



**Untersuchung zur optischen Regulation von
elektrischer Leitfähigkeit in DNA und
Synthese neuer photolabiler Schutzgruppen
für Protein- und Oligonukleotid-
anwendungen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Felix Friedrich

Frankfurt am Main, 2015

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Professor Doktor Alexander Heckel angefertigt und vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Erster Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Joachim W. Engels

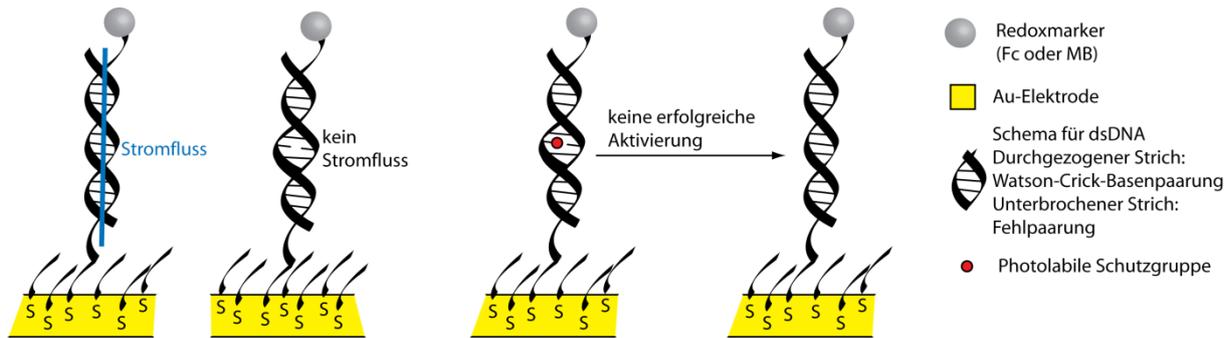
Datum der Disputation: 04.12.2015

Zusammenfassung

Die präzise Steuerung und Kontrolle von molekularen Wechselwirkungen und Funktionen ist essentiell für viele moderne Anwendungen im technischen, biologischen und medizinischen Kontext. Ein geeignetes Werkzeug, um dies zu erreichen, ist Licht, da es die Entwicklungen im Bereich der optischen Anregung ermöglichen, unter hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung Photonen bestimmter Energie zu dosieren. Daher sind lichtaktivierbare Verbindungen zur Funktionskontrolle auf molekularer Ebene weit verbreitet. Die Arbeitsgruppe von Prof. Heckel, in der die vorliegende Arbeit erstellt wurde, untersucht überwiegend biologische Fragestellungen mit Hilfe von optisch zu aktivierenden oder zu schaltenden Molekülen.

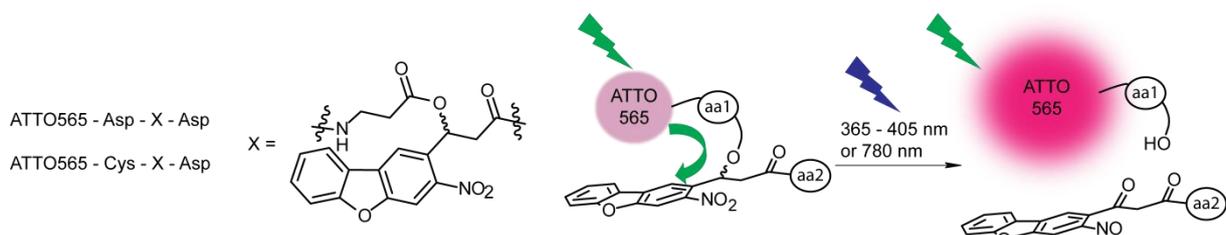
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde einerseits der Einsatz lichtaktivierbarer Oligonukleotide zur Kontrolle der Leitfähigkeit entlang von DNA untersucht sowie neue photoaktivierbare Verbindungen für die Peptidchemie und für eine neu entwickelte Variante des SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) Verfahrens synthetisiert.

DNA vermittelte Ladungsübertragung verläuft entlang des gestapelten π -Systems der heteroaromatischen Nucleobasen. Die Leitfähigkeit von Oligonukleotiden reagiert daher empfindlich auf Störungen in der Watson-Crick-Basenpaarung. Die in der Arbeitsgruppe Heckel etablierte Technik, Nucleobasen an für die Basenpaarung relevanten Positionen mit photolabilen Schutzgruppen zu modifizieren, sollte daher mit Systemen der Ladungsübertragung in DNA kombiniert werden. Solche Schutzgruppen destabilisieren doppelsträngige Oligonukleotide und stellen eine photochemisch wieder auflösbare Störung im Basenstapel dar. Die Leitfähigkeit von bekannten Systemen für Ladungsübertragung entlang DNA sollte mit Hilfe der photolabilen Schutzgruppe kontrolliert werden. Im Verlauf dieses Projekts wurden zwei literaturbekannte Varianten, in denen Ladungstransport über einen lichtinduzierten Redoxprozess zwischen Metallkomplexen ablaufen und über eine dabei unterdrückte Fluoreszenz optisch verfolgt werden sollte, als ungeeignete Systeme identifiziert. Durch den Wechsel zu elektrodengestützter Leitfähigkeitsmessung konnte der prinzipielle Effekt von Leitfähigkeit in perfekt gepaarter DNA und deutlich reduziertem Stromfluss in Oligonukleotiden mit Fehlpaarungen gezeigt werden. Beim Einsatz photolabil geschützter Oligonukleotide konnte jedoch auch in diesem System noch nicht der gewünschte Effekt gefunden werden.



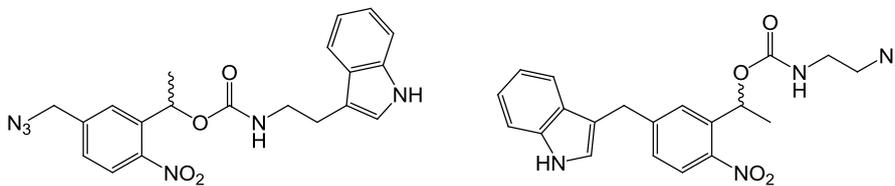
Der Ansatz mit Schutzgruppen auf den Nucleobasen führte nicht zu einer sich auf die Ladungsübertragung auswirkenden Störung des Basenstapels. Zukünftige Studien zu diesem Projekt müssen Methoden zur Lichtregulation der DNA nutzen, die deutlich größere Auswirkungen auf die Struktur besitzen. Solche Techniken versprechen nach den geleisteten Vorarbeiten die gewünschten Ergebnisse.

Im zweiten Projekt dieser Arbeit wurden neue photolabile Verbindungen hergestellt, die Peptide nach ihrem Einbau in das Peptidrückgrat durch Zwei-Photonen-Anregung mit IR-Licht spalten sollen. Drei entsprechende Nitrodibenzofuran-Verbindungen und ein Cumarin-Baustein konnten erfolgreich synthetisiert werden. Die neuen Moleküle zeigten im Rahmen der Peptid-Festphasensynthese Stabilitätsprobleme. Diese Schwierigkeiten konnten durch Peptid-Kopplungen in Lösung umgangen werden. Mit Hilfe eines der hergestellten Bausteine wurden zwei Tripeptide hergestellt, die jeweils mit dem Farbstoff ATTO565 markiert und hinsichtlich ihrer photochemischen Eigenschaften charakterisiert wurden. Der neue Baustein zeigte neben den Eigenschaften als photospaltbare Gruppe, dass er gleichzeitig ein Quencher für den Farbstoff ATTO565 darstellt. Nach Belichtung stieg die Fluoreszenz um den Faktor 81 an. Die Aktivierung gelang wie erwartet mit Ein- und Zwei-Photonen-Anregung. In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Heilemann konnten Antikörper mit einem der Tripeptide modifiziert werden und die Kompatibilität der Verbindung mit hochauflösender Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie demonstriert werden.



An einer weiteren Anwendung der neuen Sonde zum Verfolgen von mRNA-Verteilung in Zellen wird aktuell gearbeitet. Zusätzlich sollte in der Zukunft die Übertragung der neuen Nitrodibenzofuran-Bausteine auf weitere Farbstoffe untersucht werden.

Im letzten in dieser Arbeit thematisierten Projekt wurden neue lichtspaltbare Verbindungen für eine Variante des SELEX-Prozesses hergestellt. Diese Verbindungen erlauben die temporäre Einführung einer Indol Modifikation an Alkin-modifizierte Oligonukleotide über die sogenannte Click-Chemie. Neue chemische Modifikationen wie die hier verwendeten Indole erhöhen die chemische Vielfalt der Oligonukleotide. Eine größere Vielfalt führt zu neuen potentiellen Wechselwirkungen gegenüber Verbindungen, gegen die mit Hilfe herkömmlicher SELEX-Verfahren keine Aptamere erzeugt werden konnten. Da die chemische Modifikation über eine photolabile Gruppe an die Oligonukleotide gebunden wird, kann sie photochemisch von der DNA gespalten werden, wodurch eine Interferenz der Modifikation mit den enzymatisch katalysierten Schritten innerhalb der SELEX ausgeschlossen werden kann.



Die Arbeiten an diesem Projekt sind zum Ende der Dissertation noch nicht abgeschlossen. Noch ausstehende SELEX-Runden gegen Oligonukleotide mit der photolabilen Indolverbindung sowie das Photolyseprodukt werden fortgesetzt. Eine erfolgreiche Selektion gegen beide Verbindungen könnte ein System ermöglichen, in dem Aptamere von einem Zielmolekül zu einem anderen geschaltet werden.

Allgemein verspricht die neu entwickelte Methode die Herstellung einer größeren Anzahl an Aptameren und vergrößert somit die Möglichkeit, dass therapeutische Aptamere hergestellt werden können.

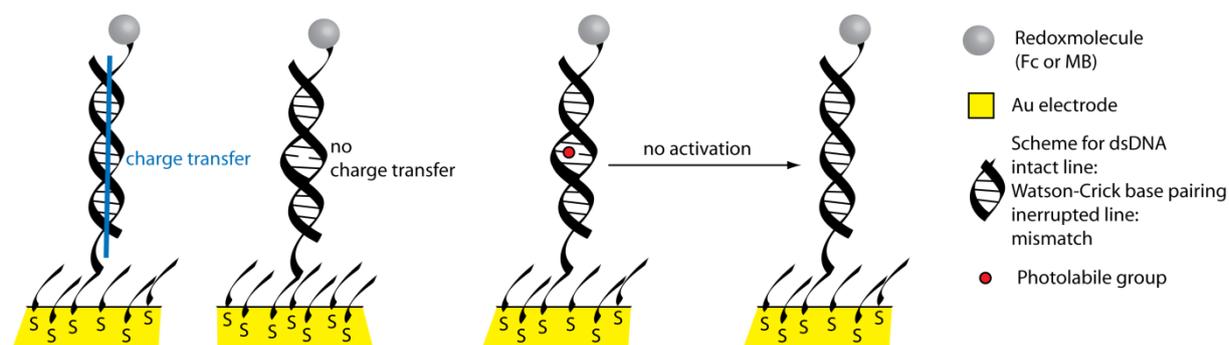
Summary

Many modern technical, biological and medical applications require the ability to precisely control a molecular interaction and function. The progress in the area of light activation enables such a control by using irradiation with a certain wavelength in a high spatiotemporal resolution. Thus, light activatable compounds have become popular to control molecular interaction and function. This PhD thesis was completed in the research group of Prof. Heckel that is active in the field of regulation of biological molecules by photolabile or photoswitchable molecules.

This work focused on the control of charge transfer along DNA with photoactivatable oligonucleotides and the synthesis of new photocleavable molecules for peptide and oligonucleotide applications.

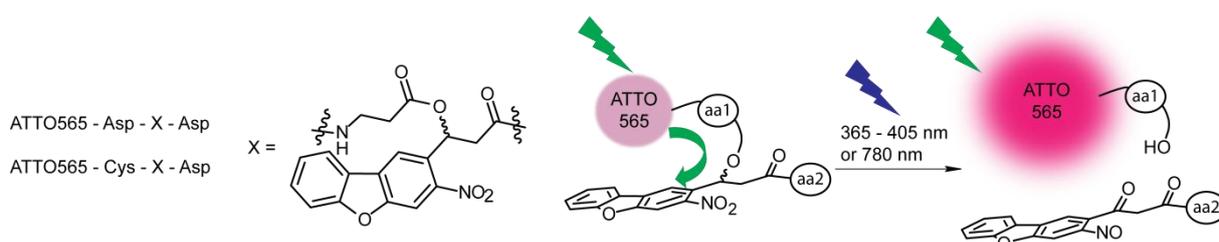
Charge transfer along DNA is known to be very sensitive for disruptions in a perfectly stacked double helix. Nucleotides, however, that are modified on the Watson-Crick base pairing side with photocleavable protecting groups, have the advantage that they interfere with the base pairing. This led to the expectation that the photolabile groups would disturb the base pairing and prevent charge transfer up to the point of irradiation, because irradiation will eliminate the photolabile groups.

We did not achieve the expected charge transfer along DNA with two already published systems. The incompatibility of the two known systems to achieve charge transfer along DNA is demonstrated in this thesis. The two systems had in common that they used metal complexes on the 5' ends of DNA strands that exchange electrons upon irradiation. A result of the charge transfer process should have been that the fluorescence of the system is suppressed. However, this effect was not observed in the conducted experiments. As a result, the methodology for the observation of the charge transfer process was changed to a system that measured the conductivity directly by immobilizing DNA on gold electrodes. This technique enabled to make a proof of principle: Completely paired DNA showed high conductivity compared to double strands that contain mismatches. However, this system also did not allow light activatable control of charge transfer along DNA that was modified with photocleavable groups.



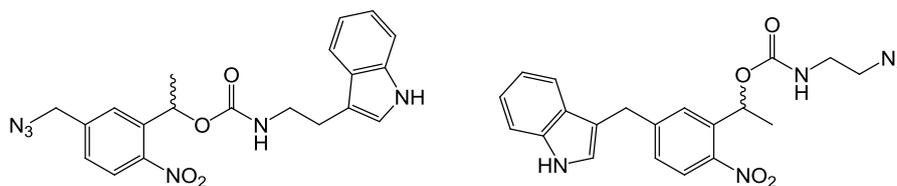
In conclusion the tested approach to use photocleavable groups on nucleobases does not disturb the stacked π system in a manner that suppresses the charge transfer. The use of other strategies with light activatable compounds that have more influence on the structure of the double strand in combination with the measurement of the conductivity on gold electrodes are expected to lead to the suppression of the charge transfer in the near future.

In the second project of this thesis new photocleavable molecules were synthesized for the cleavage of peptides with two photon irradiation. The successful synthesis of three new derivatives based on the nitrodibenzofuran core and one new coumarin derivative is reported in this work. The new molecules showed stability problems during solid phase peptide synthesis. These problems were solved by synthesis in solution. A new nitrodibenzofuran molecule was coupled to different amino acids with standard peptide coupling conditions. Two tripeptides were synthesized containing the new molecule. They were further modified with the dye ATTO565 and their photochemical properties were analyzed. In the new constructs the nitrodibenzofuran molecule showed the properties of a photocleavable group that could be addressed with one and two photon irradiation. The new construct also quenched the fluorescence of the attached dye. Upon irradiation the fluorescence could be increased 81 times. In collaboration with the group of Prof. Heilemann we coupled the new tripeptides to antibodies and demonstrated the application of the new photocleavable quencher with super resolution single molecule fluorescence spectroscopy.



The new fluorogenic construct could also work as a probe for mRNA distribution in cells and is currently being tested. In continuation of this project the application of the new quencher to other fluorophores should be explored.

The last project of the thesis dealt with the synthesis of new photocleavable compounds for a newly developed methodology of the SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) process. The molecules temporarily introduce a new chemical modification to alkyne modified oligonucleotides by click chemistry. As modification an indole was chosen to increase the chemical diversity and interaction properties of DNA. Such new modifications increase the possibility to find aptamers against targets that cannot be addressed by the normal SELEX process. Unfortunately, such new modifications often cause incompatibilities with enzymatic steps like PCR and are therefore not suitable for the SELEX process. In our approach the new group is attached to the DNA by a photocleavable linker allowing cleavage of DNA to avoid interferences during the SELEX cycles.



The third project is being further continued by the collaboration partner at the end of this thesis. The collaboration partner is working on SELEX cycles for the photocleavable indole oligonucleotides and for the product of the photolysis. If these selections are successful, this might allow to generate an aptamer that can be switched from one target to another.

The newly developed methodology will likely result in generating new aptamers against target molecules that are not accessible with the original SELEX process. This will increase the likelihood for the generation of aptamers for therapeutic use.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	IV
Inhaltsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Ladungsübertragung in Biomolekülen	1
1.1.1 Theorie der Ladungsübertragung.....	2
1.1.2 Modelle der Ladungsübertragung.....	4
1.1.3 Ladungsübertragung in Peptiden	6
1.1.4 Ladungsübertragung in Oligonukleotiden.....	7
1.1.5 Methoden zur direkten Bestimmung von Ladungsübertragung.....	13
1.1.6 Schaltbarer Ladungstransfer entlang von DNA	16
1.2 Lichtaktivierbarkeit von Peptiden	18
1.2.1 Photolabile Schutzgruppen an Seitenketten.....	20
1.2.2 Kontrolle der Proteinaktivität durch lichtaktivierbare Aptamere	23
1.2.3 Photolabile Schutzgruppen im Peptidrückgrat.....	25
1.3 SELEX-Prozess.....	28
2 Zielsetzung und Aufgabenstellung	33
3 Allgemeiner Teil.....	37
3.1 Lichtinduzierte Leitfähigkeit entlang von Oligonukleotiden	37
3.1.1 Vorarbeiten.....	37
3.1.2 Synthese des DNA-Rh-Konjugats.....	39
3.1.3 Synthese der neuen Liganden für den Ru-Komplex	42
3.1.4 Synthese des neuen Ru-Komplexes und dessen DNA-Konjugaten	43
3.1.5 Fluoreszenzmessungen mit den DNA-Komplex-Konjugaten.....	46
3.1.6 Oligonukleotide für Immobilisierung auf Goldelektroden	48
3.1.7 Elektrochemische Untersuchung von DNA	50
3.1.8 Zusammenfassung und Ausblick	54

3.2	Zwei-Photonen aktivierbare Aminosäure	56
3.2.1	Vorarbeiten und Ziele.....	56
3.2.2	Synthese einer Zwei-Photonen spaltbaren Aminosäure auf NDBF-Basis	59
3.2.3	Synthese einer Zwei-Photonen spaltbaren Aminosäure auf Cumarin-Basis.....	67
3.2.4	Peptidsynthese mit den neuen Aminosäuren	70
3.2.5	Anwendung der hergestellten Peptide	77
3.2.6	Zusammenfassung und Ausblick	85
3.3	Photoaktivierbare Click-SELEX.....	87
3.3.1	Vorarbeiten und Projektidee.....	87
3.3.2	Synthese des ersten Zielmoleküls Azidomethyl-NPE-Indol.....	88
3.3.3	Synthese des zweiten Zielmoleküls Indol-NPE-Azid.....	91
3.3.4	Synthese von Maleimid modifizierten Molekülen	92
3.3.5	SELEX-Ergebnisse.....	95
3.3.6	Zusammenfassung.....	96
4	Experimenteller Teil	97
4.1	Allgemeine Geräte und Materialien	97
4.2	Lichtinduzierte Leitfähigkeit entlang von Oligonukleotiden	100
4.2.1	Projektbezogene Geräte und Materialien.....	100
4.2.2	Chemische Synthesen.....	102
4.2.3	DNA Chemie	111
4.2.4	Fluoreszenzmessungen der dsDNA-Komplex-Konjugate	114
4.2.5	Elektrochemie Messungen	115
4.3	Zwei-Photonen aktivierbare Aminosäure	116
4.3.1	Projektbezogene Geräte und Materialien.....	116
4.3.2	Chemische Synthesen.....	118
4.3.3	Peptidsynthese	128
4.3.4	Aktinometrie.....	137
4.3.5	Zwei-Photonen-Belichtung.....	141

4.3.6	Weitfeld und hochaufgelöste Mikroskopie	142
4.4	Photoaktivierbare Click-SELEX.....	144
4.4.1	Projektbezogene Geräte und Materialien.....	144
4.4.2	Chemische Synthesen.....	144
5	Anhang.....	152
5.1	UV-Vis-Spektren	152
5.2	Elektrochemie-Messungen.....	154
5.3	Analytische HPLC-Spektren der Farbstoff-markierten Tripeptide.....	159
5.4	Literaturverzeichnis.....	161
5.5	Abkürzungsverzeichnis	166
6	Danksagung	169
7	Lebenslauf	170

1 Einleitung

1.1 Ladungsübertragung in Biomolekülen

Elektronentransfer gehört zu den grundlegenden chemischen Prozessen in den Naturwissenschaften. Er ist essentiell für biologische, physikalische, organische und anorganische Systeme. Innerhalb der Biologie ist Ladungsübertragung entlang von Oligonukleotiden und Proteinen für viele zelluläre Prozesse von entscheidender Bedeutung. Elektronentransfer tritt unter anderem in der Photosynthese oder bei der Atmung und der Herstellung von Adenosintriphosphat auf, wobei Ladungen zwischen verschiedenen Proteinkomplexen in mehreren Schritten übertragen werden (Abb. 1).^[1]

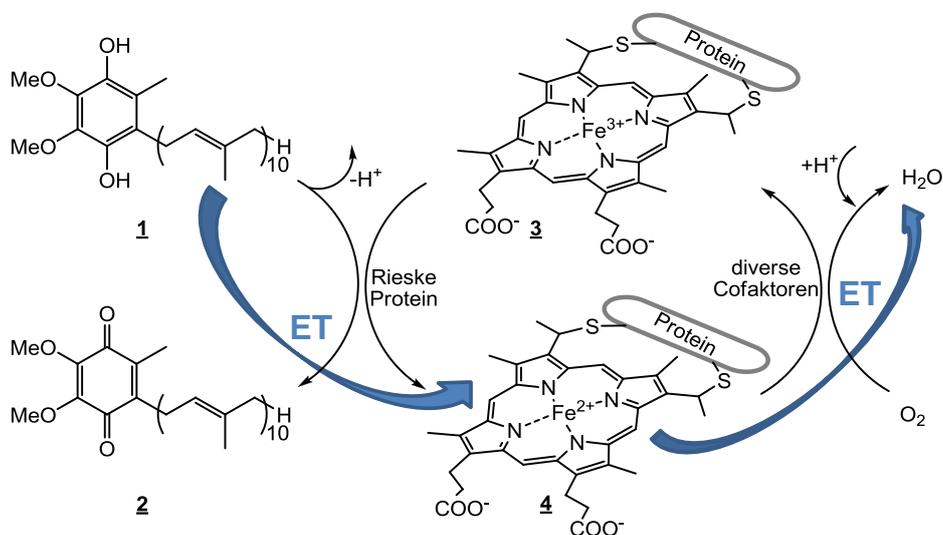


Abb. 1: Ausschnitt aus der Kette von Elektronenübertragungen, die bei der Atmungskette auftreten. Das Hydrochinon Ubichinol **1** überträgt Elektronen an die Häm-Gruppe des Cytochrom c (**4**), welches anschließend Sauerstoff zu Wasser reduziert.^[1]

Die Untersuchung dieser Prozesse verspricht neben einem tieferen Verständnis für die Chemie der Biomoleküle auch mögliche Anwendungen im Bereich der Sensortechnik und der Nanotechnologie. In einer vereinfachten Darstellung kann auf diese Prozesse das von Mark A. Ratner entwickelte

Donor-Bridge-Acceptor Modell (DBA-Modell) angewandt werden.^[2] Für den Mechanismus der Ladungsübertragung spielt dabei die Brücke, die die Ladungen zwischen den Redoxpartnern überwinden müssen, eine bestimmende Rolle. Die theoretische Grundlage solcher Ladungsübertragungen zwischen Donor und Akzeptor wurde beginnend in den 50iger Jahren von Rudolph A. Marcus mit der *Marcus Theory* geliefert (Nobelpreis 1992).

1.1.1 Theorie der Ladungsübertragung

Die Berechnung von Elektronentransferprozessen steht vor der Herausforderung, einen Nicht-Gleichgewichtsprozess zu lösen. Dafür müssen die elektronischen Wellenfunktionen der beteiligten Redoxpartner *ab initio* gelöst werden. Eine solche Lösung ist nur bei Betrachtung einzelner Geometrien der Redoxpartner und der Vereinfachung ganzer Moleküle auf einzelne Orbitale darstellbar. Doch auch mit diesen Vereinfachungen ist eine Lösung komplex. In der *Marcus Theory* wird für Ladungstransferprozesse in Lösung die Abweichung aus dem Gleichgewicht mit Hilfe der klassischen Physik beschrieben. Eine solche Näherung ist bei Raumtemperatur zulässig. Für diese Abweichung werden die Kernbewegungen als Schwingungen mit einheitlicher harmonischer Oszillation angenommen.^[3]

Befinden sich Donor und Akzeptor in unmittelbarer Nähe zueinander, hängt die Geschwindigkeit der Ladungsübertragung k_{ET} von der Triebkraft der Reaktion $-\Delta G^0$ und der Energie λ ab, die benötigt wird um die Redoxpartner und beteiligte Lösungsmittelmoleküle in die, für den Ladungstransfer notwendige Anordnung zu bringen. Der schnellst mögliche Ladungstransfer liegt vor, wenn Triebkraft und Reorganisationsenergie gleich sind und keinerlei Energie für den Transfer benötigt wird ($-\Delta G^0 = \lambda$).^[1]

$$k_{ET} = k_{ET}^0 e^{-\frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4 \lambda R T}} \quad (1)$$

R = Universelle Gaskonstante

T = Temperatur

Diese Gleichung setzt einen direkten Kontakt zwischen den Reaktionspartnern voraus. Muss für den Ladungstransfer eine Distanz überbrückt werden, müssen quantenmechanische Effekte in die *Marcus Theory* integriert werden. Die Effizienz der Ladungsübertragung hängt zusätzlich von der

elektronischen Kopplung H_{DA} der Redoxpartner ab. Diese Kopplung gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der Elektronen zwischen Donor und Akzeptor tunneln können und ist sowohl vom Abstand des Redoxpaares r_{DA} , als auch von der Verknüpfung zwischen Donor und Akzeptor und dessen Fähigkeit, elektronische Kopplung zu vermitteln, abhängig. Diese Eigenschaft wird durch die molekülspezifische Konstante β ausgedrückt. Für die Geschwindigkeit der Ladungsübertragung folgt aus Gleichung (1).^[4,5]

$$k_{ET} = \sqrt{\frac{4\pi^3}{h^2 \lambda k_B T}} H_{DA}^2 e^{-\frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4 \lambda RT}} - \beta r_{DA} \quad (2)$$

H_{DA} = Maximale elektronische Kopplung zwischen Donor und Akzeptor

h = Plancksches Wirkungsquantum

k_B = Boltzmann Konstante

Eine Lösung dieser Gleichung benötigt die elektronische Kopplung H_{DA} , die von den Wellenfunktionen von Donor und Akzeptor abhängt. Dies wiederum erfordert *ab initio* Berechnungen, die meist nicht darstellbar sind.^[1] Daher werden vereinfachte Modelle angenommen. Ein Beispiel für ein solches Modell für den Ladungstransfer in Proteinen verknüpft die elektronischen Eigenschaften mit der Struktur des Peptids. Die elektronische Kopplung zwischen Donor und Akzeptor hängt von allen möglichen Verknüpfungen zwischen ihnen über kovalente Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und räumliche Annäherung ab.^[6] Jeweils unabhängig voneinander werden die drei Fälle unter Berücksichtigung einiger Näherungen semi-empirisch gelöst und der jeweilige β -Wert einer Verknüpfung zwischen Donor und Akzeptor ergibt sich vereinfacht aus der Summe der einzelnen Lösungen. Bei flexiblen Proteinen folgt für β des gesamten Proteins, dass es aus einem Mittelwert verschiedener Konformationen gebildet wird. In starren Peptiden kann dagegen ein einziger Weg für die Ladungsübertragung ausschlaggebend sein.

Trotz der Vereinfachungen durch verschiedene Modellannahmen ist der Aufwand für die Berechnungen der elektronischen Eigenschaften für unbekannte Systeme hoch. Alle Modellsysteme lassen sich jedoch mit zwei mechanistisch unterschiedlichen Formen der Ladungsübertragung beschreiben, die im Einklang zu allen bisher beobachteten experimentellen Daten stehen.

1.1.2 Modelle der Ladungsübertragung

Wie Mark A. Ratner beim Entwurf seines DBA Modells erkannt hat, spielt die Art und Weise wie zwei Redoxpartner miteinander verbunden sind eine entscheidende Rolle für die Ladungsübertragung. Entweder die Brücke zwischen Donor und Akzeptor spielt lediglich eine transferierende Rolle oder sie ist selbst direkt in den Transport der Ladung mit eingebunden. Beim Transfer entlang der Brücke liegt ein *superexchange* Mechanismus vor. Die Ladung wird in einem Ein-Schritt Prozess zwischen Donor und Akzeptor übertragen, wobei die Effizienz der Übertragung von der Fähigkeit der Brücke beeinflusst wird, die Orbitale von Donor und Akzeptor miteinander in Wechselwirkung zu bringen (Abb. 2 b und c). Der Transfer einer Ladung im *superexchange* Mechanismus erfolgt immer durch Tunneln der Elektronen zwischen den Energiezuständen. Durch die exponentielle Distanzabhängigkeit des Tunneleffekts ist dieser Ladungstransfer auf geringe Abstände beschränkt. Der Einfluss der Brücke kann jedoch so groß sein, dass die Effizienz des Transfers bei verschiedenen Molekülen mit unterschiedlichem Donor-Akzeptor-Abstand in der gleichen Größenordnung liegt.^[7] Lokalisiert sich die Ladung beim Transfer zwischen Donor und Akzeptor innerhalb der Brücke, läuft ein mehrstufiger Mechanismus des Ladungstransports ab. Ein solch mehrstufiger Transport zwischen Donor und Akzeptor wird als *hopping* Mechanismus bezeichnet (Abb. 2 d). Dieser Ladungstransport weist eine deutliche geringere Abstandsabhängigkeit auf als der Tunnelprozess und hängt antiproportional von der Anzahl an auftretenden *hopping* Schritten ab. Alle beobachteten Ladungsübertragungen über große Distanzen laufen nach dieser Art Mechanismus ab.^[8] Entlang der einzelnen Zwischenschritte beim Ladungshopping findet der Transfer nach dem *superexchange* Mechanismus statt.

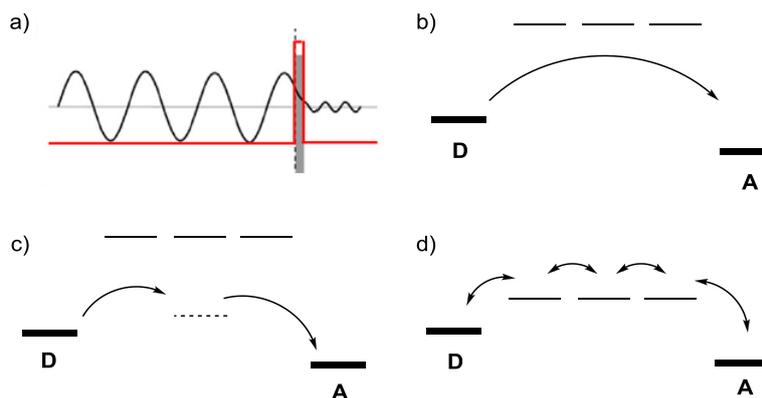


Abb. 2: Schematische Darstellung für die Mechanismen der Ladungsübertragung zwischen einem Donor (D) und einem Akzeptor (A) entlang einer verbindenden Brücke. a) Quantenmechanischer Tunnelprozess, durch den eine Ladung eine Potentialbarriere überwinden kann, die nach den Gesetzen der klassischen Physik zu hoch ist. b) Ladungstransfer zwischen D und A durch Tunneln der Ladung. Die Brücke hat bei dieser Art des *superexchange* Mechanismus keinen Einfluss. c) Die Brücke zwischen den Redoxpartnern vermittelt eine elektronische Kopplung, die den Ladungstransfer nach dem *superexchange* Mechanismus begünstigt. Es existiert ein virtueller Zwischenschritt, der jedoch nicht lokalisiert werden kann. d) Ladungstransport entlang der Brücke nach dem *hopping* Mechanismus. Die Brücke zwischen D und A nimmt aktiv am Redoxprozess teil und auftretende Ladungszustände können detektiert werden. (a) entnommen aus Artés et al.)^[7]

Durch den Nachweis von auftretenden Zwischenschritten können *superexchange* und *hopping* Mechanismen voneinander unterschieden werden. Zusätzlich beweist die Detektion eines Zwischenschritts, dass die Ladungsübertragung in einem intra- und keinem intermolekularen Prozess stattfindet. Alternativ konnte dies auch durch die Untersuchung der Eigenschaften von verbundenen Redoxpaaren mit den Eigenschaften von getrenntem Ladungsdonor und -akzeptor kontrolliert werden (Abb. 3). Die Unterschiede zwischen beiden Varianten müssen auf ihre Verknüpfung und damit einen intramolekularen Prozess zurückzuführen sein.

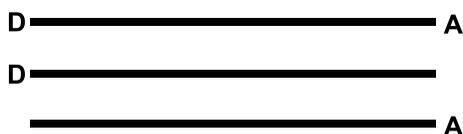
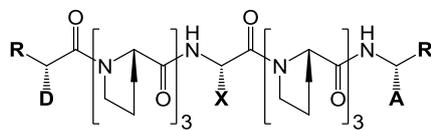


Abb. 3: Einfaches Schema nach dem bewiesen werden konnte, dass die Ladungsübertragung in einem intra- und keinem intermolekularen Prozess stattfindet. Durch den Vergleich der Ladungsübertragung zwischen einem System, das Donor (D) und Akzeptor (A) in einem Molekül trägt, mit einem System, in dem zwei getrennte Moleküle jeweils entweder D oder A modifiziert sind, müssen unterschiedliche Ergebnisse auf die Art der Verknüpfung zurückzuführen sein.

Mit Hilfe des *superexchange* und des *hopping* Modells konnten bis heute alle Ladungsübertragungen entlang von Proteinen und Oligonukleotiden beschrieben werden.

1.1.3 Ladungsübertragung in Peptiden

Der Ladungstransfer entlang von Proteinen spielt eine fundamentale Rolle in der Biologie. Folglich hat die Natur verschiedene Peptide zum effizienten Ladungstransport optimiert. Der Ladungstransport findet meist über Proteine statt, die Metallionen komplexieren oder andere ionische Kofaktoren mit einbinden.^[9] In ausschließlich aus Aminosäuren aufgebauten Proteinen ist der Ladungstransfer wegen der strukturellen Vielfalt der proteinogenen Aminosäuren stark sequenzabhängig. Verschiedene Berechnungen ergaben für solche Peptide einen maximalen Abstand von 20 Å, bis zu dem Elektronen über den *superexchange* Mechanismus transferiert werden können.^[1] Wegen ihres hohen Redoxpotentials ist Ladungshopping entlang der Peptidbindungen nicht möglich. Durch die Untersuchung verschiedener Aminosäuren innerhalb eines Modellpeptids konnte gezeigt werden, dass der *hopping* Mechanismus ausschließlich über aromatische oder heteroaromatische Seitenketten der Aminosäuren abläuft (Abb. 4). Ladungen am Peptid beeinflussen über die Coulomb-Wechselwirkung die Effizienz der Ladungsübertragung, sie sind aber selbst nicht direkt in die Redoxprozesse mit eingebunden.



R, R' - ungeladene (NHAc oder COOMe) oder geladene Termini (NH₃⁺ TFA⁻)

X - aromatische oder aliphatische Aminosäure

D, A - Ladungsdonor und -akzeptor

Abb. 4: Starres Modellpeptid in dem Ladungshopping entlang von Peptiden untersucht wurde. Eine aromatische Aminosäure zwischen Ladungsdonor (D) und -akzeptor (A) erhöht die Ladungsübertragung im Vergleich zu einer aliphatischen Aminosäure um den Faktor 20–30. Die Redoxreaktion der aromatischen Aminosäure konnte mittels Ultrakurzzeitspektroskopie bewiesen werden. Geladene Termini R bzw. R' beeinflussen den Ladungstransport über Coulomb-Wechselwirkungen, werden jedoch nicht direkt in die Reaktion mit eingebunden.^[8,10]

Befinden sich die Redoxpartner in einem großen Abstand zueinander, können flexible Peptide durch Änderung ihrer Konformation große strukturelle Distanzen in kleine räumliche Abstände überführen. Dies ermöglicht einen Ladungstransfer nach dem *superexchange* Mechanismus über den Raum und nicht entlang des Peptids.^[9] Ohne den Einfluss von zusätzlichen Metallionen oder anderer Kofaktoren besitzen Peptide im Vergleich mit Oligonukleotiden eine hohe Flexibilität und damit bessere Voraussetzungen, Ladungstransfer über tunnelnde Elektronen zu ermöglichen. Der Transport von

Ladungen über Zwischenschritte kann hingegen nur von vier der natürlichen Aminosäuren unterstützt werden (Abb. 5).

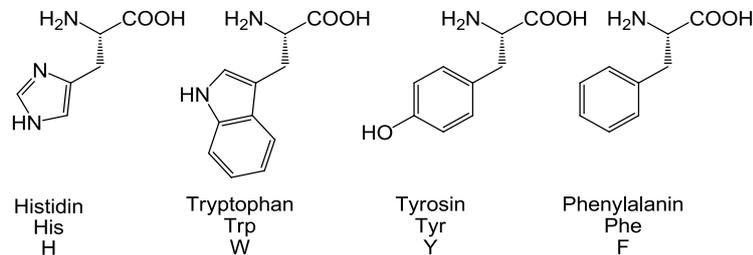


Abb. 5: Nur die vier aromatischen bzw. heteroaromatischen Aminosäuren ermöglichen Ladungshopping entlang eines Peptids.

Für die Ladungsübertragung entlang großer Distanzen eignen sich Oligonukleotide durch den aromatischen Charakter jeder Base besser als reine, ausschließlich aus Aminosäuren aufgebaute Peptide.

1.1.4 Ladungsübertragung in Oligonukleotiden

Die Struktur der Oligonukleotide hat schon in den 60er Jahren zu der Vermutung geführt, dass DNA ein vielversprechendes Material für die Ladungsübertragung sein müsste. Nach den damaligen Ergebnissen waren die elektrischen Eigenschaften der DNA vergleichbar mit vielen Halbleitern.^[11] Erst 14 Jahre später konnte nachgewiesen werden, dass die damaligen Resultate nicht von der DNA selbst, sondern von eingeschlossenen Wassermolekülen verursacht wurden.^[12] Seit dieser Zeit wird die Ladungsübertragung entlang von Oligonukleotiden intensiv untersucht.

Anders als bestimmte Proteine wie z.B. die Cytochrome haben Oligonukleotide andere biologische Aufgaben als die Ladungsübertragung. Die Struktur der gestapelten Heteroaromaten innerhalb eines doppelsträngigen Oligonukleotids eignet sich jedoch auch für die effiziente Bewegung von Ladungen. Der Einfluss von Lösungsmittelmolekülen, von Gegenionen, die sich an das Phosphatrückgrat angelagert haben, die unterschiedlichen Redoxpotentiale der Nukleobasen, die in den verschiedenen Experimenten verwendeten Redoxpartner sowie deren Einfluss auf die elektronische Struktur der Nukleotide und die umgebende Solvathülle, haben zu vielen widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der elektrischen Eigenschaften von Oligonukleotiden geführt.^[13,14,15] Heutzutage ist die

überwiegende Meinung, dass Oligonukleotide thermisch gesteuerte Halbleiter sind.^[14,15] Liegen innerhalb eines Oligonukleotids die Heteroaromaten ideal gestapelt vor, erlaubt dies eine möglichst große elektronische Kopplung zwischen den π -Orbitalen. Je geringer die Distanz zwischen den einzelnen Basen, desto effizienter kann diese Wechselwirkung erfolgen. Zusätzlich begünstigt Temperatur kleine Bewegungen innerhalb der Struktur, wodurch der Überlapp der Orbitale erhöht wird (Abb. 6). Die Einschränkung dieser Bewegung durch zu niedrige Temperatur, vermindert die Effizienz für die Ladungsübertragung. Die Wechselwirkung zwischen Oligonukleotiden und umgebenden Wassermolekülen ist die thermodynamische Triebkraft für den Verlust der idealen Überlappung der Nukleobasen. Dies muss für effiziente Ladungsübertragung durch thermische Bewegung kompensiert werden (Abb. 6 a).

In einer Studie, in der DNA in nicht wässriger Umgebung durch die Herstellung von DNA-Lipid-Komplexen untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass ohne den dynamischen Einfluss von Wasser, die ideal überlappende Struktur der DNA begünstigt wird und Ladungsübertragung wesentlich schneller ablaufen konnte als in wässriger Umgebung (Abb. 6 b).^[16]

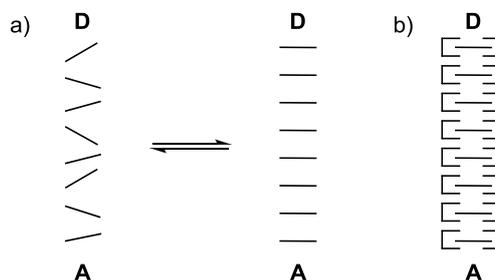


Abb. 6: Die Bewegung der Nukleobasen beeinflusst die Ladungsübertragung entlang von Oligonukleotiden. a) Bei Raumtemperatur können die gestapelten Basen von einer Konformation mit schwächeren Orbitalwechselwirkungen (links), in eine ideale Konformation für die Ladungsübertragung übergehen (rechts). Die Störung in der idealen Orbitalüberlappung wird durch die Interaktion mit umgebenden Wassermolekülen verursacht.^[15] b) Die Leitfähigkeit eines DNA-Lipid Komplexes wurde in nicht wässriger Umgebung untersucht. Das unpolare Lösungsmittel interagiert wesentlich schwächer mit den Nukleobasen, weshalb die Struktur mit dem größtmöglichen Überlapp der Orbitale stabilisiert wird und die Leitfähigkeit steigt.^[16]

Eine Störung im Basenstapel kann folglich einen immensen Einfluss auf die Ladungsübertragung entlang von Oligonukleotiden haben. Je größer die Störung, desto größer ist der beobachtete Effekt. Eine einzelne Ausbuchtung führte beispielsweise nur zu einer geringen Änderung in der Ladungsübertragung.^[17] Eine GA Fehlpaarung kann in bestimmten Sequenzen relativ gut interkalieren und zeigt nur geringen Einfluss auf die Ladungsübertragung,^[18] hingegen zeigt sie in einer anderen

Sequenz eine Verminderung der Effizienz um den Faktor 9 – 13.^[19] In der gleichen Studie wurden noch weitere Fehlpaarungen untersucht. Ein mit Naphthalimid und Phenothiazin modifizierter DNA-Strang wurde mit 355 nm belichtet, wodurch ein Ladungstransfer zwischen den beiden Modifikationen induziert wurde. In diesem System konnten bei zwei von sechs Fehlpaarungen ein positiver Einfluss auf die Geschwindigkeit der Ladungsübertragung festgestellt werden (Abb. 7).^[19]

Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, dass auch Störungen im Basenstapel von der Bewegung der Nucleobasen kompensiert werden können, falls Konformationen existieren, in denen die ungepaarten Nucleobasen weiterhin in den Basenstapel interkalieren können. Diese Kompensation der Störung kann durch Absenken der Temperatur rückgängig gemacht werden und der erwartete störende Einfluss auf die Ladungsübertragung tritt wieder auf.^[15]

GT	8 – 17 mal langsamer
GA	9 – 13 mal langsamer
GT (an anderer Position)	4 – 5 mal schneller
AA	0 – 2 mal schneller
AC	9 mal langsamer
TT	8 mal langsamer

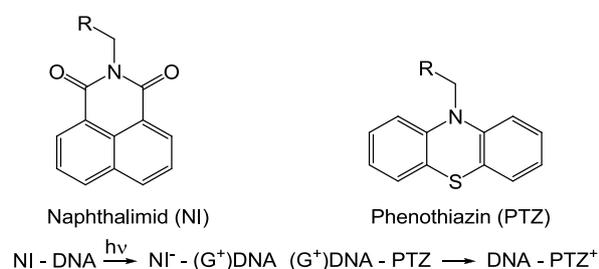


Abb. 7: Einfluss von Fehlpaarungen auf die Übertragung von Ladung entlang DNA. Die Geschwindigkeit der Ladungsübertragung variiert in Abhängigkeit der fehlgepaarten Nucleobasen und deren Position im untersuchten Duplex. Die Messungen erfolgten an einem mit Naphthalimid (NI) und Phenothiazin (PTZ) modifiziertem 12mer DNA-Duplex. Bei Belichtung fand ein Ladungstransport entlang der untersuchten Oligonucleotide statt.^[19]

In der Mehrzahl von Untersuchungen zum Einfluss von Fehlpaarungen auf die Ladungsübertragung hat sich gezeigt, dass einzelne Fehlpaarungen ausreichen, um die Ladungsübertragung um Größenordnungen zu vermindern. Selbst bei effizienten Systemen, in denen Stromfluss über mehr als 100 Basenpaare und 34 nm gemessen werden konnte, blockierte eine einzelne Fehlpaarung den Stromfluss.^[20]

Neben einem möglichst ungestörten Basenstapel wird die Leitfähigkeit von Oligonukleotiden zusätzlich durch die Sequenz geprägt. Eine positive Ladung bewegt sich bevorzugt über Guanosin, welches am leichtesten von den vier Nukleobasen oxidiert werden kann (Tab. 1). Für einen Ladungstransfer entlang zweier G's konnte bis zu einem Abstand von drei Basenpaaren eine deutliche Effizienzabnahme bewiesen werden.^[21] Der Transport über längere DNA Abschnitte war deutlich weniger distanzabhängig, da in diesen Fällen die Ladung auch über die andere Purinbase Adenin transportiert werden konnte. Zwischen Guaninen im Abstand von bis zu drei Basenpaaren findet somit eine Ladungsübertragung nach dem *superexchange* Mechanismus statt. Längerer Transport läuft über *hopping* der Ladungen zwischen Adeninen und Guaninen ab.^[18] Eine lokalisierte positive Ladung auf G kann, anders als bei A, durch Lösungsmittelmoleküle abgefangen werden, wodurch sich 8-Oxoguanin bildet (Abb. 8). Diese Reaktion wurde vielfach zum Nachweis für Ladungsübertragung genutzt. Beispielsweise wurde sie für die Untersuchung der Leitfähigkeit von G-Quadruplexen angewandt. Vier G-reiche DNA-Stränge wurden in Anwesenheit von Kalium- oder Strontiumionen zu einem Quadruplex hybridisiert, wobei ein Strang zusätzlich mit Anthrachinon modifiziert war. Für eine Stunde wurde bei 365 nm belichtet und die DNA mit einer 10 %igen Piperidin Lösung behandelt. Diese Lösung spaltet DNA überall dort, wo Guanin an Position acht modifiziert ist. Eine Polyacrylamid Gelelektrophorese zeigte anschließend die Positionen, an denen die positiven Ladungen an Guaninen abgefangen wurden. Durch die Kontrolle der Anwesenheit der Kationen für die Quadruplexbildung konnte die Ausbildung der DNA Architektur und damit auch ihre Leitfähigkeit geschaltet werden.^[22]

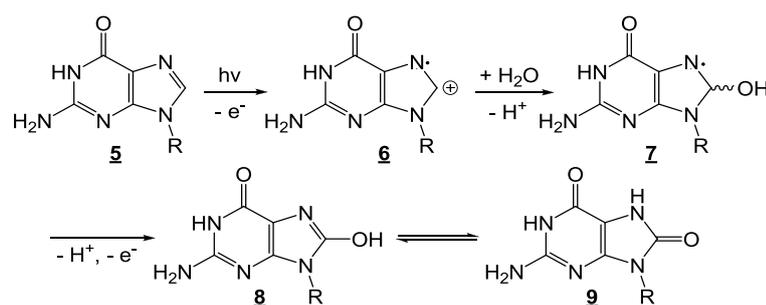


Abb. 8: Mechanismus der Oxidation von Guanin. Mit Wasser kann das Radikal zu 8-oxo-Guanin 9 reagieren.

Die Tatsache, dass positive Ladungen somit entlang von Oligonukleotiden wandern können, bedeutet für hervorgerufene DNA Schäden, dass Orte an denen die Defekte schlussendlich lokalisiert sind, weit entfernt von dem Ort sein können, an dem die oxidative Schädigung auftrat.^[23] Viele Gene besitzen außerhalb der codierenden Domänen GC reiche Sequenzabschnitte. Deren Aufgabe könnte der

gezielte Schutz vor oxidativer Schädigung sein, um positive Ladungen an diesen Orten abregieren zu lassen.^[24]

Negative Ladungen werden anstelle über die Purine von den Pyrimidinbasen übertragen. Die Aufteilung, dass positive Ladungen über die Purine und negative Ladungen über die Pyrimidine übertragen werden, korreliert mit den Redoxpotentialen der Nucleobasen (Tab. 1).

	E_{ox} experimentell [V]	E_{ox} berechnet [V]	E_{red} experimentell [V]	E_{red} berechnet [V]
A	1,94	1,75	-2,45	-2,86
T	2,09	2,00	-2,14	-2,32
G	1,47	1,40	-2,76	-3,31
C	2,12	2,18	-2,23	-2,41

Tab. 1: Berechnete^[25] und experimentell^[26] gegen Normal-Wasserstoff-Elektrode ermittelte Redoxpotentialen der Nucleobasen. Die Experimente wurden in Acetonitril oder Dimethylformamid durchgeführt.

Für die Ladungsübertragung entlang von Nucleobasen ist der energetische Abstand zwischen den beteiligten Orbitalen entscheidend. Je näher ihre Energieniveaus liegen, desto effizienter kann der Prozess ablaufen. Um die Leitfähigkeit von Oligonucleotiden zu verbessern, wurden deshalb in einer Untersuchung Adenine durch 7-Deazaadenine ersetzt (Abb. 9 a), welche ein zu den Guaninen vergleichbares Oxidationspotential von $E_{ox} = 1,39 V$ besitzen. Durch die Annäherung der HOMOs aller Purinbasen konnte die Leitfähigkeit der untersuchten Sequenz deutlich gesteigert werden.^[27] Weitere Ansätze um die Leitfähigkeit von Oligonucleotiden zu verbessern, beruhen beispielsweise auf dem Einbau von Basenanaloga, die zusätzliche Metallionen innerhalb des Basenstapels komplexieren können (Abb. 9 b).^[28]

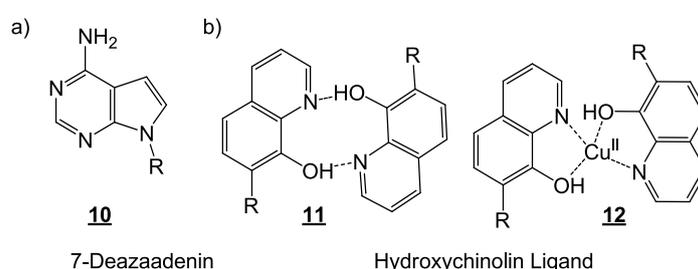


Abb. 9: Basenanaloga, die entwickelt wurden, um die Leitfähigkeit in Oligonucleotiden zu erhöhen. a) 7-Deazaadenin besitzt ein zum Guanin vergleichbares Oxidationspotential. Durch den Einbau haben alle Purine ein ähnliches Energieniveau und positive Ladungen können effizienter entlang des Oligonucleotids übertragen werden.^[27] b) Hydroxychinolinderivate, die eine zu AT vergleichbare Stabilität aufweisen, können zusätzlich Metallionen innerhalb des Basenstapels komplexieren, wodurch die Leitfähigkeit steigt.^[28]

In anderen Experimenten dienen Oligonukleotide nicht mehr selbst als Ladungsüberträger, sondern sie werden wegen ihrer einmaligen strukturellen Eigenschaften wie der Fähigkeit der Selbstorganisation eingesetzt. So wurden Oligonukleotide beispielsweise als Templat zum Abscheiden von Metallionen genutzt, um einen molekularen Draht zu erzeugen,^[29] oder um leitfähige Materialien wie Kohlenstoffnanoröhrchen mit den strukturellen Selbsterkennungseigenschaften der Oligonukleotide zu erweitern.^[30]

Neben der gewünschten Übertragung von Ladungen können innerhalb von Oligonukleotiden auch bereits erwähnte Nebenreaktionen wie die Bildung von 8-Oxoguanin stattfinden. Ende der 90er Jahre waren über 50 Produkte von oxidativer oder reduktiver Schädigung an Oligonukleotiden bekannt.^[31] Dazu gehören zum Beispiel auch weitere Zersetzungsprodukte, die sich aus 8-Oxoguanin bilden können (Abb. 10 a). Von Thymin sind nach Guanin die meisten Produkte durch oxidative Schädigung bekannt. Die häufigsten auftretenden Schäden in Oligonukleotiden sind 8-Oxoguanin **13** sowie Thyminglycol **20** (Abb. 10 b).

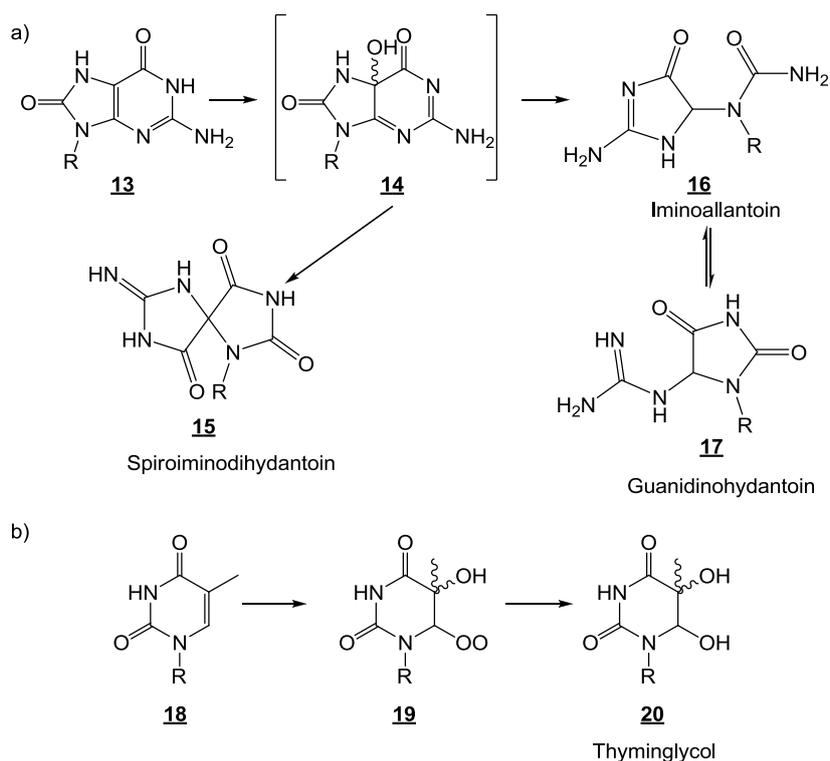


Abb. 10: Neben der gewünschten Übertragung von Ladungen können in Oligonukleotiden auch eine Vielzahl an Nebenreaktionen durch am weitesten verbreitet oxidative Einflüsse stattfinden. Einige Beispiele, die sich a) aus der Zersetzung des 8-Oxoguanins bilden können oder die b) aus Thymin entstehen, sind abgebildet.

Neben Versuchen solche Art von Schäden an Oligonukleotiden durch Ladungsübertragung wieder zu reparieren und damit einer medizinischen Anwendung, werden leitfähige DNA Bausteine auch in der molekularen Elektronik oder Sensorik als potentielle Materialien untersucht. Theoretische Arbeiten verfolgen in den letzten Jahren die Überlegung, eine neuartige Form der Sequenzierung über die unterschiedliche Leitfähigkeit der Nukleobasen zu ermöglichen. Solch eine Technik verspricht schneller und effizienter zu werden, als die heute genutzten Methoden.^[32] Für solche Anwendungen sind Techniken notwendig, die Messungen der Ladungsübertragung entlang von Oligonukleotiden in Echtzeit ermöglichen.

1.1.5 Methoden zur direkten Bestimmung von Ladungsübertragung

Der Ladungstransfer entlang von Oligonukleotiden kann entweder optisch, elektrochemisch oder rasterkraftmikroskopisch direkt verfolgt werden. Im Fall der optischen Detektion sind entweder die Redoxpartner oder im Molekül auftretende Zwischenschritte UV- oder fluoreszenzspektroskopisch nachweisbar. Durch die Änderung der Oxidationsstufen verändern sich die optischen Eigenschaften der betrachteten Moleküle, wodurch über die Spektren auf den Redoxprozess geschlossen werden kann. Beispiel für den Einsatz dieser Technik sind die Modifikationen von Oligonukleotiden mit Metallkomplexen, die konjugiert an DNA in einem ihrer Oxidationszustände fluoreszieren (Abb. 11 a).

Der elektrochemische Nachweis für die Übertragung von Ladungen erfordert die Immobilisierung der zu untersuchenden Probe auf einer Elektrodenoberfläche. Das zusätzlich notwendige Redoxmolekül kann entweder an die Probe gebunden sein oder es wird in Lösung zugesetzt. Zwei Beispiele für gelöste, frei bewegliche und diffusionsgesteuerte Redoxpartner für Oligonukleotide sind Ferricyanid $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ und Hexaaminruthenium $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$. Ferricyanid wird wegen der negativen Ladung des Phosphatrückgrats von den Oligonukleotiden abgestoßen. Die Elektrodenoberfläche wird folglich durch die immobilisierte Probe abgeschirmt und ein hoher Widerstand für Ladungstransfer zwischen Elektrode und Komplex liegt vor. Über die Höhe des Widerstands kann auf die Belegung der Oberfläche geschlossen werden. Die Belegungsdichte der Elektrodenoberfläche kann auch mit dem zweiten Komplex ermittelt werden, doch lagert sich Hexaaminruthenium wegen seiner positiven Ladung an das Phosphatrückgrat an. Ohne immobilisierte Probe treten Komplex und Elektrode direkt in Wechselwirkung miteinander. Durch die Anlagerung des Komplexes an die Oligonukleotide muss für einen vergleichbaren Stromfluss wie in dem Experiment ohne Probe eine höhere Menge an Komplex zugesetzt werden. Die dazu notwendige Menge an Metallkomplex erlaubt Rückschlüsse auf

die Oberflächenbelegung der Elektrode.^[33] Bei beiden Messungen wird nicht der direkte Ladungstransfer entlang der Oligonukleotide untersucht. Beide liefern keine Informationen über die Struktur der Probe oder Unterschiede in den Sequenzen. Für diese Informationen muss der Redoxpartner direkt mit der Probe verbunden sein. Über die Elektrode wird dann der Stromfluss in Abhängigkeit des angelegten Potentials bestimmt. Durch die Modifikation eines Peptids oder Oligonukleotids mit einer Redoxsonde wie Ferrocen, kann der Stromfluss direkt auf den Transport entlang der Probe und damit auf die Leitfähigkeitseigenschaften dieser Struktur zurückgeführt werden (Abb. 11 b).

Bei den rasterkraftmikroskopischen Methoden handelt es sich schließlich um Experimente, die die Betrachtung der Ladungsübertragung als Einzelmolekül-Messung ermöglichen.^[7] Dazu müssen die Proben ebenfalls auf einer Oberfläche immobilisiert werden. Bei der *scanning tunneling microscopy* wird eine feine Metallspitze über die modifizierte Oberfläche bewegt und der dabei auftretende Tunnelstrom zwischen Spitze und Oberfläche wird gemessen. Die Untersuchung der Oberfläche mit einem konstanten Tunnelstrom liefert ein Bild vom Oberflächenprofil, da sich der Abstand während der Messung ändern muss, damit der Strom konstant bleibt. Wird die Oberfläche dagegen mit konstantem Abstand untersucht, erlauben Änderungen im Tunnelstrom Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit zwischen Spitze und Oberfläche. Zusammen ergeben beide Experimente ein Bild davon, wo sich die zu untersuchende Substanz auf der Oberfläche befindet und wie sie die Ladungsübertragung zwischen Spitze und Oberfläche beeinflusst. Bei dieser Methode muss sich die Spitze immer in einem geringen Abstand zur untersuchten Probe befinden. Ein ähnlicher experimenteller Aufbau, bei dem jedoch die anziehenden und abstoßenden Wechselwirkungen zwischen der Spitze und der modifizierten Oberfläche beobachtet werden, ist die *atomic force microscopy*. Diese Methode beruht darauf, dass die Spitze immer so nah zur Oberfläche sein muss, dass sich schwache van der Waals Wechselwirkungen ausbilden können. Verwendet man bei dieser Methode eine Spitze, die ebenfalls als Elektrode genutzt werden kann, ist zusätzlich die Messung der Leitfähigkeit möglich (Abb. 11 c).

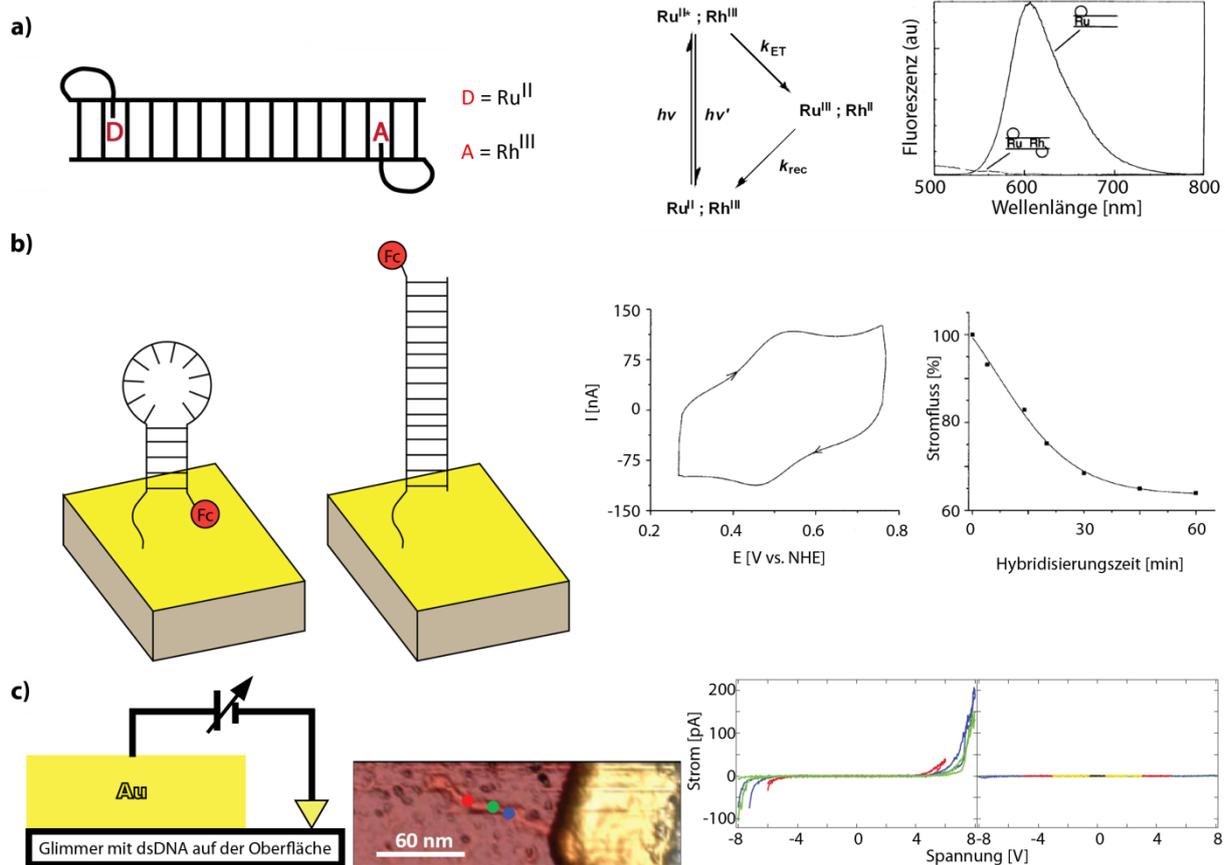


Abb. 11: Beispiele für verschiedene Messmethoden, um direkt die Ladungsübertragung entlang von Oligonukleotiden zu verfolgen. a) Das in die DNA interkalierende Redoxpaar aus einem Ruthenium- ($\text{Ru}(\text{II})$) und einem Rhodium-Komplex ($\text{Rh}(\text{III})$) zeigte den Ladungstransfer über die Abnahme der Fluoreszenz des $\text{Ru}(\text{II})$ Komplexes an. Ein nur mit dem $\text{Ru}(\text{II})$ Komplex modifizierter DNA-Doppelstrang besitzt bei Belichtung mit 480 nm ein Fluoreszenzmaximum bei 610 nm. Eine Helix, die gleichzeitig den $\text{Rh}(\text{III})$ Komplex trägt, zeigt eine deutlich reduzierte Fluoreszenz, da ein Ladungstransfer zwischen beiden Komplexen entlang der DNA stattfindet. (aus und nach Murphy et al. und Arkin et al.)^[34,35] b) Ein Konzept analog zu einem *Molecular Beacon* zeigte den Stromfluss einer Ferrocen-Modifikation (Fc) in Abhängigkeit zur Hybridisierung an. Anfänglich lag der auf einer Goldelektrode immobilisierte Einzelstrang in einer Haarnadelstruktur vor. Goldelektrode und Ferrocen hatten nur einen geringen Abstand zueinander, so dass ein direkter Tunnelstrom fließen konnte (Cyclovoltammogramm). Nach Zugabe des komplementären Gegenstrangs erhöhte sich der Ferrocen-Gold-Abstand durch die Hybridisierung zum Doppelstrang. Die Ladungsübertragung musste nun entlang der DNA erfolgen, was zu einer Abnahme des Stromflusses um fast 40 % führte. (aus und nach Fan et al.)^[36] c) In einer Einzelmolekül-Messung wurde die Leitfähigkeit von DNA-Strängen mit und ohne G-Quadruplexen mit leitfähiger *atomic force microscopy* (AFM) untersucht. Dazu wurde die dsDNA auf einer Glimmeroberfläche abgeschieden. Auf den Glimmer wurde anschließend eine Goldelektrode aufgedampft. Mittels AFM wurden nun solche DNA-Stränge identifiziert, die die Elektrode direkt kontaktierten. Die Leitfähigkeit dieser Stränge wurde in verschiedenen Abständen zur Elektrode und bei verschiedenen Potentialen gemessen. Während die Oligonukleotide mit Quadruplex Strom bei höheren Potentialen auch über große Abstände wie 6 Å transportierten (linker Graph), zeigten die normalen Oligonukleotide auch bei geringeren Abständen zu den Elektroden keine Leitfähigkeit (rechter Graph). (aus und nach Livshits et al.)^[37]

1.1.6 Schaltbarer Ladungstransfer entlang von DNA

Die Leitfähigkeit entlang von Oligonukleotiden wurde in allen bisher vorgestellten Studien durch ein einzelnes Signal induziert. Dabei handelte es sich entweder um Photonen bestimmter Energie oder das Anlegen eines Potentials. Nanoelektronische Anwendungen mit Oligonukleotiden setzen jedoch analog zu elektronischen Bauteilen wie Transistoren eine größere Kontrolle über die Leitfähigkeit voraus. Der Stromfluss darf nur bei der Kombination aus zwei verschiedenen Signalen auftreten. Ein Beispiel für eine solche Methode nutzte die Ausbildung von G-Quadruplexen als zusätzliches Signal. Ein Ferrocen-modifizierter Doppelstrang wurde auf einer Goldelektrode immobilisiert. An der Elektrode lag ein variierendes Potential von 0.2 – 0.4 V an. Im anfänglichen Zustand konnte dieses System fast keinen Strom transportieren. Erst nach Zugabe von Kaliumionen bildete sich der G-Quadruplex und Leitfähigkeit trat auf. Durch die Zugabe und den Entzug der Kationen konnte die Leitfähigkeit kontrolliert werden (Abb. 12).^[38]

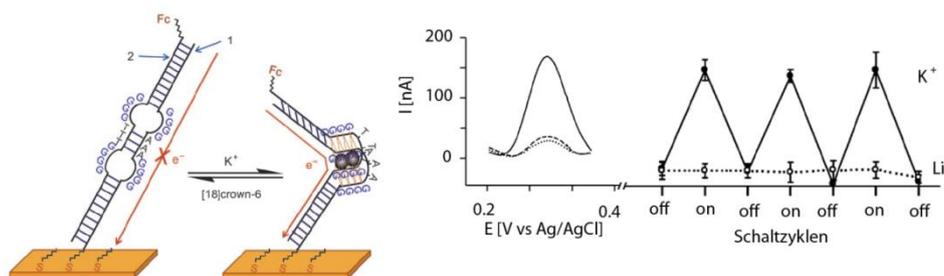


Abb. 12: Kontrolle der Leitfähigkeit entlang der DNA über Spannung und G-Quadruplex-Bildung. Nur nach Zugabe der für den G-Quadruplex notwendigen Ionen fließt ein Strom (linker Graph, gepunktete Linie ohne K^+ , durchgezogene Linie mit 10 mM KCl, gestrichelte Linie mit 10 mM KCl und nach Zugabe von K^+ komplexierenden Liganden). Über die Zugabe und den Entzug der Kationen wurde der Stromfluss mehrfach geschaltet. Die Zugabe von Ionen wie Li^+ , die keinen Einfluss auf die Ausbildung eines G-Quadruplexes haben, zeigte keinen Effekt (rechter Graph). (entnommen aus Ge et al.)^[38]

Ein ähnlicher Ansatz, in dem die Leitfähigkeit wiederum von der Spannung an der Elektrode und der Zugabe einer Verbindung abhängt, resultierte in verschiedenen Varianten von Aptamer-Sensoren.^[39] Aptamere sind Oligonukleotide, die mit hoher Spezifität an bestimmte Zielverbindungen binden können und dazu eine bestimmte Konformation einnehmen müssen. Wird ein Aptamer auf eine Goldoberfläche immobilisiert und zusätzlich mit einer Redoxprobe modifiziert, kann die Zugabe der entsprechenden Zielverbindung die Konformation so beeinflussen, dass Stromfluss stattfinden kann (Abb. 13 a und c) oder unterbrochen wird (Abb. 13 b).

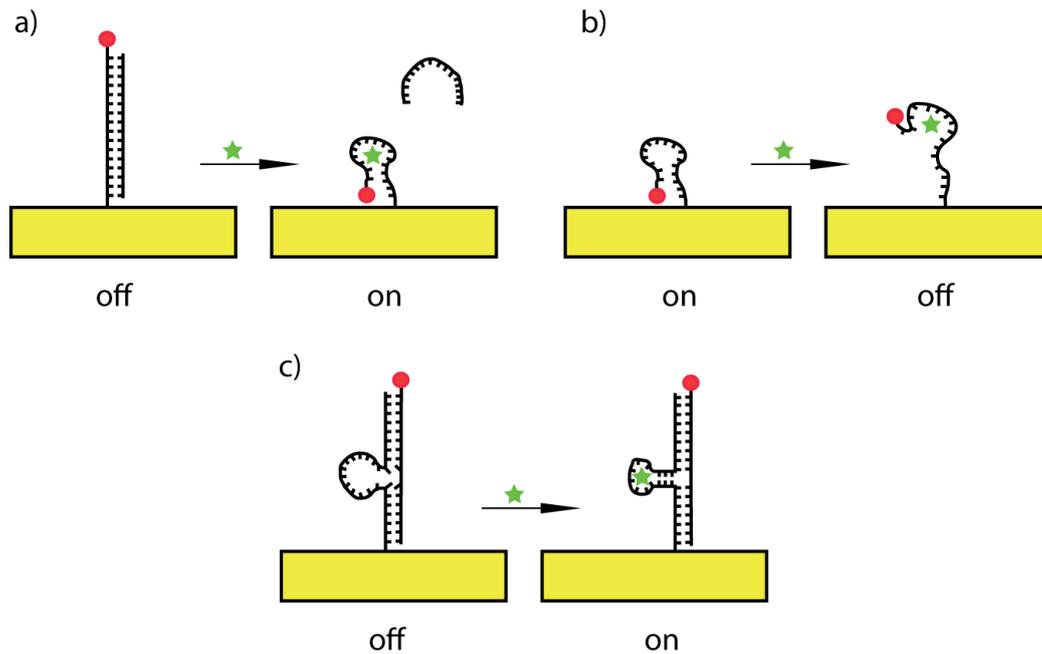


Abb. 13: Beispiele für Aptamer Sensoren, die Leitfähigkeit in Abhängigkeit der Elektrodenpotentialspannung und der Anwesenheit der jeweiligen Zielverbindungen anzeigen. a) Das Aptamer ist als Doppelstrang auf die Goldelektrode immobilisiert. Die Zugabe des Zielmoleküls löst den Doppelstrang auf und das Aptamer verändert seine Struktur. Dadurch nähert sich der Redoxmarker der Elektrode an und Strom kann fließen. b) Das Aptamer ist als Einzelstrang auf die Elektrode immobilisiert. Redoxmarker und Elektrode weisen einen geringen Abstand auf, weshalb Strom fließen kann. Die Zugabe der Zielverbindung verändert die Konformation des Aptamers, wodurch sich der Abstand vergrößert und der Stromfluss abnimmt. c) Ein immobilisierter Doppelstrang besitzt einen ungepaarten Sequenzabschnitt, der die Aptamersequenz enthält. Ohne Zielverbindung stört dieser Sequenzabschnitt die Struktur des Doppelstrangs. Es liegen Fehlpaarungen vor und die Leitfähigkeit ist blockiert. Die Zugabe der Zielverbindung transformiert den ungepaarten Abschnitt in eine Haarnadelstruktur und die Störung im Basenstapel wird aufgelöst. Leitfähigkeit ist möglich.^[39]

Die bisher vorgestellten Systeme nutzen neben der Elektrodenpotentialspannung nachträglich zugesetzte Verbindungen, um die Leitfähigkeit zu erzeugen. Die Möglichkeit, Licht als zweites Signal zu verwenden, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht und wird im Allgemeinen Teil weiter diskutiert.

1.2 Lichtaktivierbarkeit von Peptiden

Nahezu alle Prozesse innerhalb von Zellen bedienen sich der Eigenschaften und Funktionen von unterschiedlichen Proteinen. Um diese Prozesse gezielt untersuchen und verstehen zu können, ist die Kontrolle über ihre Aktivität notwendig. Dies kann über die Regulierung der beteiligten Proteine erfolgen. Ein Kontrollmechanismus, der mittels Licht gesteuert werden kann, ist dabei besonders geeignet, da dieses Signal orthogonal zu den meisten zellulären Prozessen ist und bei geeigneter Wellenlänge biologisches Gewebe nicht schädigt. Zusätzlich kann Licht sehr einfach dosiert werden und es erlaubt eine sehr hohe räumliche und zeitliche Auflösung bei entsprechender Anwendung.

Eine Möglichkeit, um Peptidaktivität optisch zu regulieren, bedient sich natürlicher lichtsensitiver Proteine. Bei Belichtung ändern sie ihre Struktur und können neue Wechselwirkungen eingehen. So konnte beispielsweise die Transkription einer Zelle reversibel dadurch gesteuert werden, dass ein Aktivator für die Transkription mit einem lichtsensitiven Protein modifiziert wurde. Das Protein enthielt einen zusätzlichen Sequenzabschnitt, der für den Transport aus dem Zellkern codierte. Dieses System, im folgenden Protein eins genannt, konnte die Kernmembran nicht durchdringen. Bestrahlung mit blauem Licht führte zu einer Strukturänderung und Protein eins konnte nun mit einem zweiten Protein wechselwirken. Dieses zweite Protein war mit einer Sequenz modifiziert, die den Transport in den Zellkern ermöglichte. Daher wurde der Aktivator nun in den Zellkern transportiert und die Transkription startete. Ohne Bestrahlung dissoziierten beide Proteine und der Aktivator wurde wieder aus dem Zellkern heraus transportiert, wodurch die Transkription wieder gestoppt werden konnte (Fig. 14 a).^[40]

Ein weiteres Beispiel für die Lichtregulation von Proteininteraktionen nutzte die photochemischen Eigenschaften einer Proteindomäne aus, die bei Bestrahlung einen Peptidstrang, mit dem sie anfangs wechselwirkte, neu faltete. Durch entsprechende Modifikationen in diesem Strang konnte durch die Umfaltung die Wechselwirkung mit dieser Proteindomäne im Vergleich zu der Wechselwirkung mit einem zweiten Zielmolekül abgeschwächt werden. Das Zielmolekül verdrängt die lichtsensitive Proteindomäne und bindet somit unter Regulation von Licht an das Peptid (Fig. 14 b).^[41]

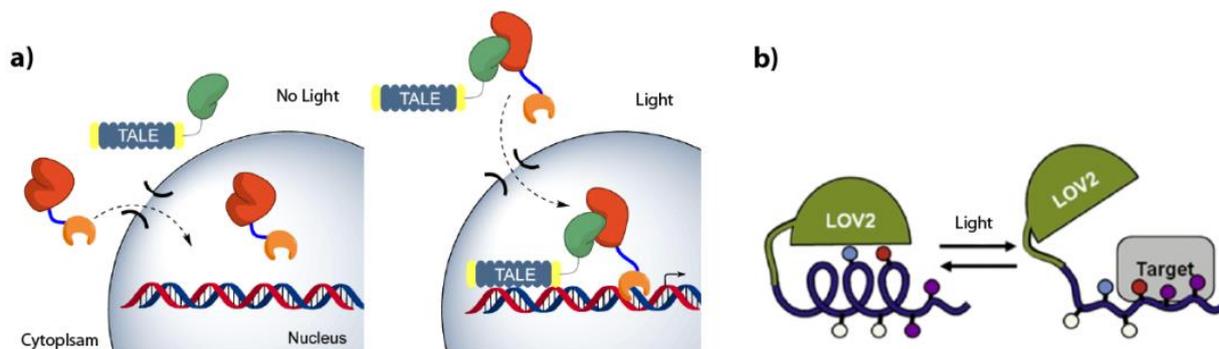


Abb. 14: Beispiele für die Lichtregulation biologischer Prozesse durch photosensitive Proteine. a) Das licht-sensitive Proteine CRY2 (grün) ist an einen Aktivator für die Transkription (TALE *transcription activator – like effector*) gebunden. Das Protein trägt einen zusätzlichen Sequenzabschnitt, der es zum Ziel für den Transport aus dem Zellkern macht. Ändert CRY2 seine Konformation durch Bestrahlung mit Licht, kann CIB1 (rot) daran binden. CIB1 trägt eine Modifikation, die zum Transport des Proteins in den Zellkern führt. Nach Bestrahlung gelangt der Aktivator somit in den Zellkern und Transkription findet statt. Wird die Bestrahlung unterbrochen, dissoziiert der Komplex und der Aktivator wird wegen der entsprechenden Sequenz wieder aus dem Zellkern heraus transportiert. (entnommen aus Konermann et al.)^[40] b) Die Proteindomäne LOV2 induziert bei Bestrahlung mit Licht eine Umfaltung der angrenzenden α -Helix. Die Helix enthält Abschnitte, die eine starke Wechselwirkung mit LOV2 ausbilden können (blau), eine starke Wechselwirkung mit einem anderen Zielmolekül (Target) eingehen können (violett), mit beiden wechselwirken können (rot) oder mit keinem der beiden interagieren können (weiß). Im gefalteten Zustand ist die Interaktion von LOV2 und der Helix thermodynamisch begünstigt. Nach Belichtung ist die Wechselwirkung mit dem Zielmolekül größer und dieses lagert sich an die Helix an. (entnommen aus Lungu et al.)^[41] Durch die Wahl der Modifikation konnten mit Hilfe dieser induzierten Dimerisierung beispielsweise die Aktivität von Enzymen oder ebenfalls die Transkription reguliert werden.^[42]

Gegenüber der Manipulation biologischer Prozesse mit den Eigenschaften von natürlichen lichtsensitiven Proteinen besitzen chemisch eingebaute photolabile Verbindungen den Vorteil, dass potentiell beliebige Zielverbindungen mit diesen versehen und deren Aktivitäten geblockt werden können. Ein solcher Einsatz von photolabilen Schutzgruppen wird als „caging“ der Verbindung bezeichnet. Die photolabilen Gruppen sind im Vergleich zu den zu modifizierenden Proteinen sehr klein, wodurch die Gesamtstruktur von Proteinen nur minimal beeinflusst wird. Die Vielzahl an bekannten photolabilen Schutzgruppen mit unterschiedlichen Eigenschaften erhöht die Flexibilität beim Entwurf potentieller lichtaktivierbarer Proteine.^[43,44,45] Die Kontrolle von Proteinaktivität mit Hilfe lichtaktivierbarer Schutzgruppen kann auf unterschiedliche Weise entweder durch die Herstellung von photolabil geschützten Peptiden während der Festphasensynthese, durch den Einbau der unnatürlichen Aminosäuren im Rahmen der Translation bestimmter Zellen oder die Modifikation von Kofaktoren erfolgen, wobei die Schutzgruppen entweder funktionelle Gruppen blockieren oder in das Rückgrat der Struktur eingebaut werden.

1.2.1 Photolabile Schutzgruppen an Seitenketten

Die Modifikation von Aminosäuren mit photolabilen Verbindungen ist bisher auf jene Aminosäuren beschränkt, die ein modifizierbares Heteroatom enthalten. Alle bekannten Schutzgruppen sind, um lichtaktivierbar zu sein, auf die Verknüpfung über diese Heteroatome angewiesen. Beispiele für diese Aminosäuren sind Tyrosin,^[46] Lysin,^[47] Cystein,^[48] Serin,^[49] Asparaginsäure^[50] und Histidin^[51]. Verschiedene Derivate dieser Aminosäuren wurden in der Festphasensynthese genutzt (Abb. 15 a). Andere Aminosäuren konnten genetisch codiert werden (Abb. 15 b).

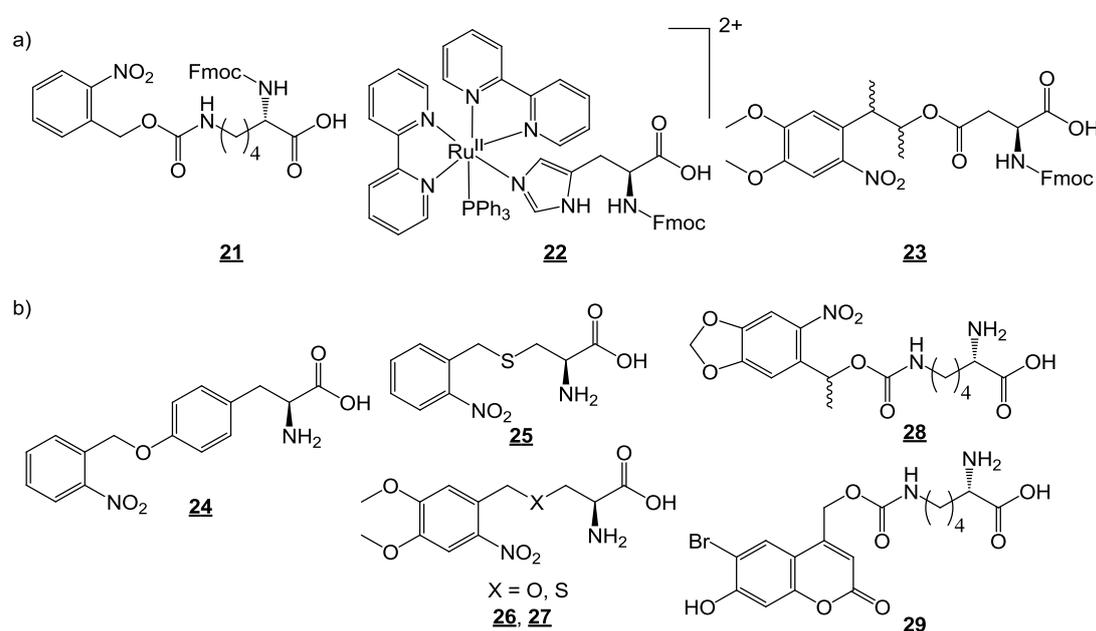


Abb. 15: Beispiele von Aminosäuren, die mit photolabilen Modifikationen hergestellt werden konnten. a) Photolabile Aminosäuren, die für die Festphasensynthese von kleinen Proteinen hergestellt wurden. b) Verschiedene Aminosäuren, die genetisch codiert werden konnten, wodurch sie im Rahmen der zellulären Translation in Proteine eingebaut wurden.^[42, 46-52]

Die Anwendung von modifizierten Aminosäuren in der Festphasensynthese setzt voraus, dass die eingebrachten photolabilen Schutzgruppen gegenüber den verschiedenen Reaktionsbedingungen bei der Synthese stabil sind. Mit Hilfe kleiner Peptide, die über Festphasensynthese hergestellt wurden, konnte beispielsweise die Aktivität von Proteasen gesteuert werden. In einem kleinen Peptid aus neun Aminosäuren, das von Metalloproteasen gespalten werden kann, wurde ein Lysin identifiziert, das sich für die Spaltung in eine tiefe Furche der Protease einlagern muss. Durch die Herstellung des Peptids mit **21** (Abb. 15) anstelle des ursprünglichen Lysins, ist die Einlagerung sterisch nicht länger

möglich. Die Spaltung des Peptids kann durch Bestrahlung mit Licht und Entfernen der Schutzgruppe induziert werden.^[52] In einer anderen Anwendung konnte durch die Modifikation des Tripeptids Arg-Gly-Asp mit **23** (Abb. 15) die Fähigkeit der Zellanlagerung an Oberflächen von Fremdkörpern innerhalb von Mäusen kontrolliert werden. Von dem unmodifizierten Tripeptid ist bekannt, dass es eine hohe Affinität zu vielen verschiedenen Zellen besitzt. Dieses Tripeptid wurde auf einer zellabweisenden Oberfläche immobilisiert und führte dann zu einer vermehrten Anlagerung von Zellen. Die Modifikation der Asparaginsäure mit einer Schutzgruppe verhinderte diese Anlagerung und erlaubte es, den Prozess der Interaktion von Zellen, mit auf dieser Art modifizierten Fremdkörpern zeit- und ortsaufgelöst stattfinden zu lassen.^[50]

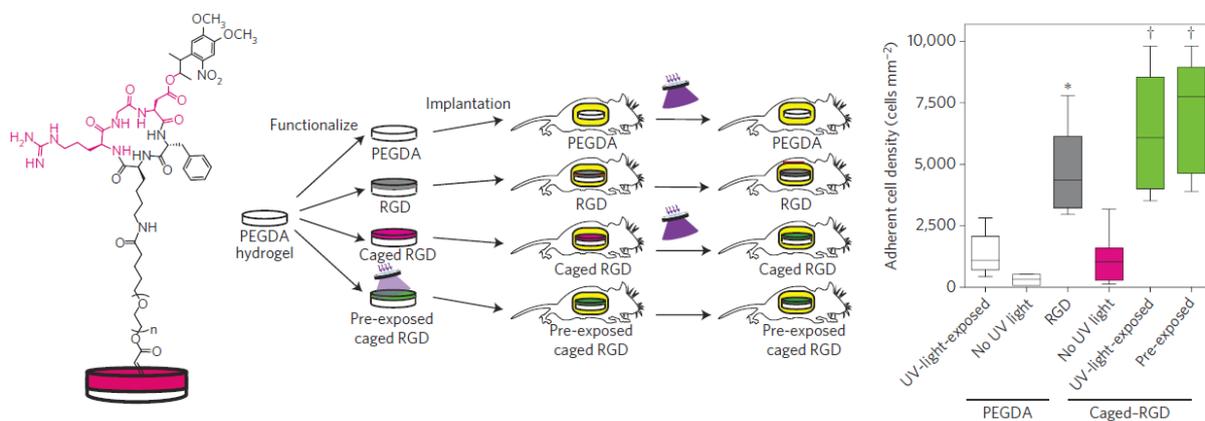


Abb. 16: Beispiel für die Anwendung eines Peptids, das über Festphasensynthese hergestellt wurde und eine photolabile Schutzgruppe trägt. Die Sequenz Arg-Gly-Asp (linkes Bild, rosa) besitzt eine hohe Affinität zu verschiedenen Zellen. Dieses Tripeptid wurde an der Asparaginsäure mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen. In einer Versuchsreihe wurden in verschiedene Mäuse unterschiedliche Varianten eines Materials transplantiert, das bekanntlich wenig mit Zellen interagiert (PEGDA). Während die Kontrollversuche die erwarteten Ergebnisse zeigten (unmodifiziertes PEGDA, wenig Zellabscheidung; PEGDA mit immobilisiertem unmodifiziertem Tripeptid [RGD], hohe Zellabscheidung; vor Transplantation belichtetes PEGDA, auf das modifiziertes Tripeptid immobilisiert war [pre exposed caged RGD], hohe Zellabscheidung), konnte im Fall des modifizierten Tripeptids (caged RGD) die Zellabscheidung durch Belichtung induziert werden. Die Gewebereaktionen auf die transplantierten Fremdkörper konnte somit optisch kontrolliert werden. (entnommen aus Lee et al.)^[50]

Da die Festphasensynthese maximal bis zu einer Länge von 100 Aminosäuren isolierbare Mengen an Produkt liefern kann, können größere Proteinstrukturen über diesen Weg nur durch Kombination mit Ligationsmethoden hergestellt werden. Für die Ligation sind wiederum bestimmte Funktionalitäten an den zu verknüpfenden Peptiden notwendig (beispielsweise bei der nativen chemischen Ligation ein C-terminaler Thioester und ein N-terminales Cystein), was diese Methode in der Anwendung beschränkt. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass zu große Peptidfragmente wegen Faltung nicht länger an den gewünschten Stellen zugänglich sind und eine Verknüpfung über diesen Ansatz nicht

länger anwendbar ist.^[53] Aus diesem Grund wurden Methoden entwickelt, die modifizierten Aminosäuren genetisch zu codieren. Durch gezielte Mutation von tRNA Synthetasen konnten die dazugehörigen tRNAs ausschließlich mit den modifizierten Aminosäuren acyliert werden. Mit verschiedenen tRNA-Synthetase/tRNA Paaren konnten die Aminosäuren **24**–**29** (Abb. 15) genetisch codiert werden, so dass sie von Zellen in Reaktion auf ein Amber-Stop-Codon anstelle des Stops eingebaut wurden. Neben der Kontrolle von Ionenkanälen, der Genexpression, von Nuklease- oder Polymeraseaktivität,^[42] konnte mit dieser Technik beispielsweise eine neue Methode zur Herstellung zyklisierter Peptide entwickelt werden. Zyklisierte Peptide haben auf Grund ihrer Struktur einzigartige Wechselwirkungen zu anderen Molekülen, weshalb sie als neue Stoffklasse zur Gewinnung von aktiven Biomolekülen großes Interesse erregen. Eine Technik, mit der zyklisierte Peptide hergestellt werden können ist die SICLOPPS Methode (*split intein circular ligation of peptides and proteins*). Die zu zyklisierende Sequenz wird zwischen zwei Teile eines Inteins eingebaut. Ein Intein ist eine Sequenz, die sich autokatalytisch selbst aus einem Peptid ausschneiden kann, wobei die verbleibenden Enden über eine Peptidbindung miteinander verknüpft werden. Treffen sich folglich die beiden getrennten Sequenzabschnitte des Inteins, findet die Spaltung statt und die verbleibende Sequenz wird zyklisiert. In der neuen Methode wurde das photolabil geschützte Tyrosin **24** (Abb. 15) von *E. coli* Zellen in das Intein eingebaut, wodurch die Zyklisierung erst nach Belichtung stattfinden konnte. Dies ermöglichte es den Vorläufer des zu zyklisierenden Peptides zu isolieren und zu reinigen. Da zyklisierte Peptide nur unter hohem Aufwand von allen Verunreinigungen getrennt werden können, stellt diese Technik eine wesentliche Verbesserung gegenüber der ursprünglichen Methode dar.^[54]

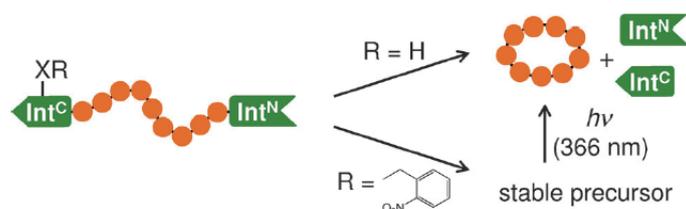


Abb. 17: Beispiel für eine weiterentwickelte Methode zur Herstellung zyklisierter Peptide, die durch den Einbau photolabil geschützter Aminosäuren innerhalb von Zellen möglich ist. Mutierte *E. Coli* Zellen erzeugen ein Peptid (grün und orange), das am C und N Terminus jeweils einen Teil eines Inteins (grün) trägt. Unmodifiziert findet die autokatalytische Reaktion statt, wodurch sich das Intein ausschneidet und die verbleibende Sequenz zyklisiert. In der Folge muss das zyklisierte Peptid isoliert und gereinigt werden, was nur sehr schlecht möglich ist. Der Einsatz eines speziellen tRNA-Synthetasen/tRNA Paares und die Zugabe der photolabil geschützten Aminosäure zu dem Zellmedium, zwingt die Zellen das geschützte Tyrosin in Reaktion auf das Amber-Stop-Codon an Stelle des Stops einzubauen. Die Schutzgruppe befindet sich in der Sequenz des Inteins, wodurch die autokatalytische Spaltung verhindert wird. Der Vorläufer des zyklisierten Peptids kann isoliert und gereinigt werden. Erst durch Belichtung wird der Zyklisierungsprozess ausgelöst. (entnommen aus Böcker et al.)^[54]

Der Einsatz der photolabilen Aminosäuren setzt in beiden vorgestellten Varianten die Kenntnis von Struktur-Funktionsbeziehungen voraus. Die Schutzgruppe muss zur Störung der Funktion an einer relevanten Position platziert sein, um den gewünschten Effekt zu erhalten. Bei unbekannter Struktur des Proteins ist die zielgerichtete Anwendung dieser Methode nicht möglich. Eine Lösung für dieses Problem kann die statistische Einführung photolabiler Schutzgruppen in ein ganzes Protein sein. Dazu werden die Schutzgruppen in Form hochreaktiver Moleküle (Abb. 18) zu dem Protein gegeben und alle reaktiven funktionellen Gruppen binden statistisch die photolabilen Verbindungen.^[55,56]

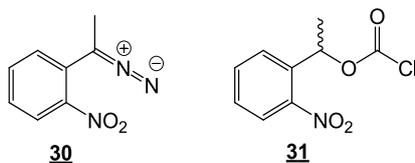


Abb. 18: Derivate von photolabilen Schutzgruppen, die zum statistischen Einbau in Proteinen genutzt werden. Die Schutzgruppen sind hochreaktiv, weshalb unter anderem freie Amine, Alkohole, Thiole oder Carbonsäuren statistisch mit ihnen reagieren.^[55,56]

Um zu gewährleisten, dass durch den statistischen Einbau der Schutzgruppen alle für die Aktivität notwendigen Funktionalitäten blockiert sind, muss viel von der hochreaktiven Verbindung zugesetzt werden. Unter Standard-Belichtungsbedingungen können anschließend nicht alle auf diesem Weg eingeführten Schutzgruppen wieder entfernt werden. Die Zugabe von geringeren Mengen der photolabilen Verbindung blockiert wiederum nicht alle entscheidenden Positionen. Der statistische Einbau von Schutzgruppen besitzt folglich den Nachteil, dass sich Proteine vor Belichtung entweder nicht vollständig ausschalten oder nach Belichtung nicht komplett wieder aktivieren lassen.^[57,58] Eine Methode, die bei unbekannter Proteinstruktur Kontrolle über die Proteinaktivität mit Licht erlaubt, wurde durch die Wechselwirkung zwischen Proteinen und Aptameren erreicht und wird in ihrer letzten Entwicklung als „Aptacaging“ bezeichnet.^[59]

1.2.2 Kontrolle der Proteinaktivität durch lichtaktivierbare Aptamere

Aptamere sind, wie in Kapitel 1.1.6 schon erwähnt, Oligonukleotide, die mit hoher Affinität an bestimmte Zielmoleküle binden können. Unter anderem können Proteine von Aptameren gebunden werden. Die Ausbildung der hochaffinen Bindung zwischen Protein und Oligonukleotid kann die

Aktivität des Proteins stören (Abb. 19 a). Die lichtinduzierte Kontrolle über die Wechselwirkung zwischen Aptamer und Protein liefert daher eine Möglichkeit, die Proteinaktivität photochemisch zu regulieren.

Die ersten Untersuchungen auf diesem Gebiet kontrollierten die Aktivität des Antithrombinaptamers HD1 über den Einbau photolabiler Schutzgruppen. Die Bindung vom Aptamer zum Thrombin konnte erfolgreich durch die Schutzgruppen inhibiert und erst nach Belichtung das Protein überwiegend deaktiviert werden (Abb. 19 b).^[60] Dieses System wurde vom Ausschalten des Proteins zum lichtinduzierten Einschalten von Thrombin weiterentwickelt. Dazu wurde das Aptamer um eine photoaktivierbare Gegenstrangdomäne erweitert, die komplementär zu einem Abschnitt von HD1 ist. Nach Belichtung bildeten diese Sequenzabschnitte einen Doppelstrang. Eine Bindung an das Protein war nicht länger möglich und das Protein wurde eingeschaltet (Abb. 19 c).^[61] Nachdem festgestellt wurde, dass eine Sequenzverlängerung am 5'-Ende die generelle Aktivität des Aptamers reduzierte, hingegen die gleiche Verlängerung am 3'-Ende keinen negativen Einfluss hatte, konnte mit dieser Methode die Aktivität von Thrombin von einem komplett deaktivierten System vollständig aktiviert werden.^[62] Die Interaktion zwischen Aptamer und Protein beruht in allen bisher vorgestellten Fällen auf nicht kovalenten Wechselwirkungen mit einer Affinität von ca. 100 nM. Fällt die Konzentration des Aptamer-Protein Komplexes unter diesen K_D , dissoziiert der Komplex und Thrombin wird unerwünscht aktiviert. Um dies zu verhindern, wurde in einer weiteren Studie HD1 und Thrombin kovalent miteinander verbunden, wobei zwischen ihnen eine photolabile Verbindung eingebaut wurde. Das Aptamer wurde dazu am 3'-Ende mit einer photolabilen Verbindung und mit einer Aminogruppe modifiziert. Über die Aminogruppe konnte ein Aktivester an HD1 gebunden werden, der nach der Bindung an das Protein von einer freien Lysinseitenkette angegriffen werden konnte. Thrombin und Aptamer waren kovalent miteinander verbunden und die Proteinfunktion blockiert. Nach Belichtung konnte HD1 bei einer Konzentration unterhalb der Dissoziationskonstanten vom Protein wegdiffundieren und die Proteinaktivität wieder herstellen. Auf diesem Weg konnte in Glaskapillaren die Gerinnung von Blutbestandteilen photochemisch induziert werden.^[59]

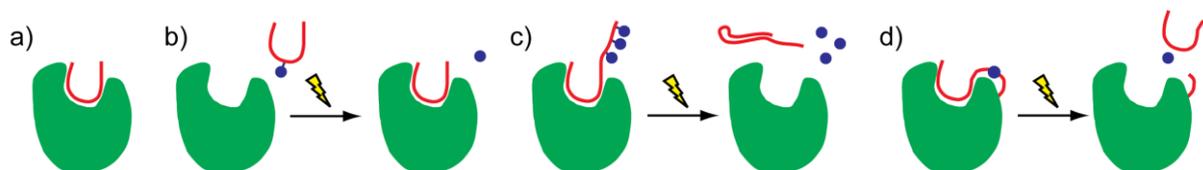


Abb. 19: Schema für die Entwicklungen im Bereich der lichtgesteuerten Aktivität eines Proteins (grün) durch die Wechselwirkung mit einem Aptamer (rot). Die Kontrolle wird durch photolabile Schutzgruppen (blau) erreicht. Für diese Form der Kontrolle über die Aktivität des Proteins ist keine direkte Kenntnis der Struktur des Proteins notwendig. a) Beispiel der Wechselwirkung von Aptamer und Protein. Die aktive Proteindomäne wird durch die Wechselwirkung mit dem Aptamer blockiert und die Funktion des Proteins ausgeschaltet. b) Durch eine photolabile Schutzgruppe am Aptamer, konnte die Wechselwirkung mit dem Protein unterbunden werden. Das Protein ist aktiv, bis das Aptamer photochemisch aktiviert wird und an das Protein bindet.^[60] c) Das Aptamer wurde um einen Sequenzabschnitt erweitert, der komplementär zu Bereichen des Aptamers ist und mit lichtaktivierbaren Schutzgruppen modifiziert ist. Das Aptamer bindet an das Protein und deaktiviert dessen Funktion, bis die Schutzgruppen photochemisch abgespalten werden. Das Aptamer bildet einen Doppelstrang, der nicht länger an das Protein binden kann, wodurch dessen Aktivität wieder hergestellt wird.^[61] d) Die intermolekulare Wechselwirkung zwischen Protein und Aptamer beruht auf elektrostatischer Anziehung. Liegt die Konzentration unterhalb der Dissoziationskonstanten, löst sich der Komplex auf und die Proteinaktivität wird wieder hergestellt. Daher wurden Aptamer und Protein über einen Linker verknüpft, der eine photolabile Gruppe enthielt. Das Protein war bei entsprechender Konzentration so lange inaktiv, bis durch Belichtung die Interaktion von einer intra- zu einer intermolekularen Wechselwirkung geschaltet wurde.^[59]

Dieser letzte vorgestellte Ansatz nutzt photolabile Moleküle nicht länger als Schutzgruppen. Stattdessen wurden sie in das Rückgrat des Oligonukleotids eingebaut, wodurch nach Bestrahlung mit Licht die Verbindung gespalten wurde. Auf diese Art genutzte photolabile Verbindungen werden als „strand breaks“ bezeichnet. Sie finden ebenfalls innerhalb von Peptiden Anwendung, um deren Aktivitäten optisch zu regulieren.

1.2.3 Photolabile Schutzgruppen im Peptidrückgrat

Bei der Verwendung von Aminosäuren, die photolabile Schutzgruppen tragen, wird die Aktivität des Peptids dadurch reguliert, dass bestimmte für die Wechselwirkung mit anderen Verbindungen notwendige funktionelle Gruppen blockiert werden. Nach der Belichtung wird das ursprüngliche Peptid wieder hergestellt. Dagegen ermöglicht der Einbau einer photolabilen Gruppe innerhalb des Peptidrückgrats, dass das Peptid nach Belichtung gespalten wird. Die resultierenden Fragmente können ihrer ursprünglichen Aufgabe nicht länger nachgehen. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass keine Kenntnis der exakten Wechselwirkungen zwischen Peptid und den weiteren beteiligten Molekülen notwendig ist. Keine essentiellen Gruppen müssen blockiert werden, weshalb sie auch

nicht identifiziert werden müssen. Zusätzlich kann es möglich sein, dass für die Blockade der Aktivität mit geschützten Aminosäuren mehrere Positionen in einem Peptid blockiert werden müssen. Wird das Peptid dagegen gespalten, kann eine einzelne photolabile Aminosäure ausreichen, um Fragmente zu erzeugen, die nun andere oder keine Aktivität mehr besitzen.

Alle bisher bekannten Verbindungen, die Peptide lichtinduziert spalten können, sind auf den chemischen Einbau während der Festphasensynthese des Peptids angewiesen. Die photolabile Gruppe beruht dabei in den bisher genutzten Systemen auf dem Nitrobenzylgerüst (Abb. 20).

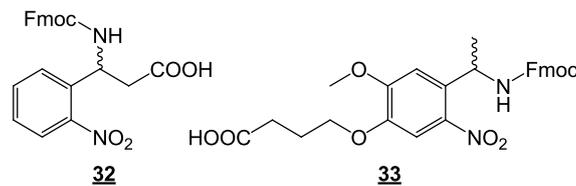


Abb. 20: Die beiden am häufigsten eingesetzten photolabilen Aminosäuren, die während der Fmoc-Festphasensynthese in das Peptidrückgrat eingebaut werden können. **32** beruht auf der 2-(2-Nitrophenyl)-propyl Schutzgruppe und **33** auf der photolabilen *o*-Nitroveratryl Schutzgruppe. Bei Belichtung mit UV-Licht spalten sie das Peptid.

Mit Hilfe von Verbindung **32** konnte beispielsweise die Aktivität eines Peptids dadurch unterbunden werden, das es anfänglich in einer zyklisierten, inaktiven Form vorlag. Nach Belichten bildete sich das lineare Peptid, das an eine Metalloprotease binden und deren Aktivität blockieren konnte (Abb. 21 a).^[63] In einer anderen Untersuchung wurde ebenfalls mit **32** die Löslichkeit von Peptiden kontrolliert. Peptide und Proteine sind bei einer entsprechend hydrophoben Oberfläche nicht länger wasserlöslich. In bestimmten Proteinen kann dies durch Umfaltung oder Mutationen ausgelöst werden. Wenn sie ihre Löslichkeit verlieren, neigen sie dazu unlösliche Fibrillen, die sogenannten Amyloid-Fibrillen zu bilden. Eine Klasse von Proteinen, die dieses Verhalten zeigen, sind die Prionen, deren unlösliche Derivate als Ursache vieler neuronaler Erkrankungen betrachtet werden.^[64] Ein Sequenzabschnitt eines solchen unlöslichen Prions wurde in der Löslichkeitsstudie über eine photolabile Aminosäure an ein sehr hydrophiles Peptid gebunden. Das resultierende Peptid war wasserlöslich und die Ausbildung der unlöslichen Fibrillen konnte photochemisch induziert werden (Abb. 21 b).^[65] In einer weiteren Untersuchung zur Regulierung von Enzymen wurden beide Aminosäuren **32** und **33** in Peptide eingebaut und deren unterschiedlicher Einfluss auf die Aktivität der Enzyme untersucht. Das Enzym Src-Tyrosinkinase besteht aus drei Domänen SH1 – SH3, wobei die katalytische Aktivität nur von SH1 abhängig ist. Ein Peptid wurde hergestellt, das mit einem Bereich an SH1 bindet und das über die photolabile Aminosäure mit dem zweiten Bereich verbunden ist, der an SH2 bindet. Verknüpft ist die Affinität des Peptids zum Enzym um den Faktor 50 höher als

die Affinitäten der getrennten Bausteine. Folglich wurde das Enzym durch das Peptid blockiert, bis es durch Belichtung gespalten wurde. Die einzelnen Fragmente des Peptids konnten nicht länger an das Enzym binden und die Aktivität wurde wieder hergestellt (Abb. 21 b).^[66]

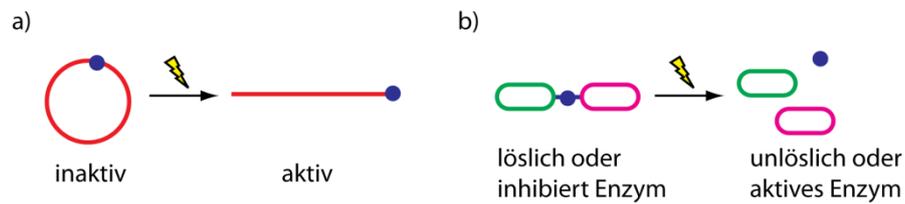


Abb. 21: Photolabile Aminosäuren, die Peptide bei Belichtung spalten, können die Aktivität von Proteinen kontrollieren. a) Die Kontrolle über die Konformation bestimmt die Aktivität.^[63] b) Das intakte Peptid hat Eigenschaften, die die Fragmente nicht besitzen. Die Spaltung aktiviert einen Prozess^[65] oder blockiert ihn.^[66]

Anders als bei den photolabilen Schutzgruppen, die eine große Vielfalt und damit auch die unterschiedlichsten Eigenschaften mitbringen, existieren bis heute nur sehr wenige unterschiedliche Verbindungen, die Peptide nach Belichtung spalten können. Die Entwicklung eines solchen neuen Moleküls, das speziell auch mit Zwei-Photonen-Anregung gespalten werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und wird im Allgemeinen Teil weiter diskutiert.

1.3 SELEX-Prozess

In den 90iger Jahren haben unabhängig voneinander zwei Forschergruppen eine Methode entwickelt, mit der Oligonukleotide selektiert werden konnten, die mit hoher Affinität an bestimmte Zielverbindungen binden. Die eine Gruppe prägte für die generierten Oligonukleotide den Begriff Aptamer,^[67] die andere Gruppe nannten den für die Herstellung notwendigen Prozess SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*).^[68] Der Prozess beruht auf einem sich wiederholenden Kreislauf aus unterschiedlichen Schritten, der aus einem Vorrat an unbekanntem Oligonukleotiden jene herausfiltert, die an das untersuchte Zielmolekül binden können. Die Bindung blockiert in manchen Fällen die Aktivität des Zielmoleküls, weshalb diese Oligonukleotide ein neues Werkzeug darstellen, um Kontrolle über verschiedene Verbindungen zu erlangen (siehe Kapitel 1.1.6 oder 1.2.2). Heute werden Aptamere in der medizinischen und pharmazeutischen Grundlagenforschung, in der Wirkstoffentwicklung, bei der Krankheitserkennung sowie in der Entwicklung neuer Analyse- und Trennmethode intensiv untersucht.^[69] Ein Nachteil der Aptamere ist, dass der für ihre Herstellung notwendige SELEX-Prozess relativ zeitintensiv ist und in keiner standardisierten Form vorliegt. Folglich werden große Anstrengungen unternommen, die Effizienz dieses Prozesses zu erhöhen und den Zeitaufwand zu reduzieren.

Zum Beginn einer SELEX wird eine Molekülbibliothek aus unbekanntem Oligonukleotidsequenzen hergestellt. Die Sequenzen besitzen jeweils am 5'- und am 3'-Ende einen Abschnitt mit definierten Nucleobasen, der zur Bindung von Primern dient. Dazwischen folgt ein Bereich mit meist 20 – 80 Nucleobasen, die eine beliebige, unbekanntem Reihenfolge besitzen. Dies wird dadurch erreicht, dass bei der Herstellung der Bibliothek an diesen Stellen eine Mischung aus allen Nucleobasen zum Festphasenmaterial gespült wird. In Summe enthält eine auf diesem Weg generierte Bibliothek ca. 10^{15} verschiedene Sequenzen. Die Bibliothek wird im ersten Schritt in Wechselwirkung mit der Zielverbindung gebracht, gegen die ein Aptamer gefunden werden soll (Abb. 22 Bindung). Dies kann in Lösung erfolgen oder die Zielverbindung ist an ein Trägermaterial gebunden. Eine gewisse Anzahl von Oligonukleotiden wird an die Zielverbindungen binden und muss anschließend von den übrigen Sequenzen getrennt werden (Abb. 22 Waschen). Wenn die Zielverbindungen immobilisiert, kann das Trägermaterial mit Zielmolekül und den gebundenen Oligonukleotiden per Filtration von den übrigen Strängen getrennt werden. Ein spezieller Fall liegt vor, wenn das Trägermaterial magnetisch ist (*magnetic beads*). In solchen Fällen kann es mit einem starken Magneten lokal fixiert werden, während die übrigen Oligonukleotide zusammen mit dem Lösungsmittel entnommen und verworfen werden. Die Trennung von gebundenen und ungebundenen Strängen ist im Fall der immobilisierten Proben einfacher zu bewerkstelligen, als wenn diese in Lösung zugesetzt werden. Dafür kann nicht

ausgeschlossen werden, dass die Affinität der Oligonukleotide aus dem Zusammenspiel von Festphasenmaterial und Nukleobasen erfolgt. Ohne Trägermaterial könnten die Stränge ihre Affinität verlieren, wodurch in einigen Fällen auf die feste Phase verzichtet wird. In Lösung zugesetzte Zielverbindungen konnten zusammen mit den daran gebundenen Oligonukleotiden auf verschiedenen Wegen isoliert werden. Die Einzelstränge der Bibliothek besitzen eine definierte Länge und nur die gebundenen Oligonukleotide weichen in Form von Ladung, Masse, Beweglichkeit und bestimmten Wechselwirkungen zu modifizierten Oberflächen von den ungebundenen ab. Diese Unterschiede wurden je nach untersuchtem Zielmolekül genutzt, um beispielsweise die Trennung mit verschiedenen Methoden wie Kapillarelektrophorese, Durchflusszytometrie, Oberflächenplasmonresonanz, Zentrifugation, Ultrafiltration oder am weitesten verbreitet Affinitätschromatographie durchzuführen. Die isolierten Zielverbindungen mit den daran gebundenen Oligonukleotiden werden anschließend von einander getrennt (Abb. 22 Elution) und die isolierten Einzelstränge mittels PCR vervielfältigt (Abb. 22 Amplifikation). Die resultierenden Doppelstränge müssen anschließend wieder in die Einzelstränge überführt und der unerwünschte Gegenstrang entfernt werden (Abb. 22 Konditionierung). Auch hierfür existieren verschiedene Methoden, die meist Modifikationen an den Primern zur Trennung der beiden Stränge nutzen. Ein Beispiel nutzt die Biotin-Streptavidin Affinität. Der Primer des zu isolierenden Strangs trägt ein Biotin, das eine Immobilisierung auf einer Streptavidin modifizierten Oberfläche erlaubt. Nach Denaturierung kann der Gegenstrang abgetrennt und der immobilisierte Strang anschließend wieder von der Oberfläche entfernt werden. Andere Beispiele nutzen Modifikationen, die an der jeweiligen Stelle im Primer entweder die Polymerase blockieren oder eine Spaltung des Strangs an dieser Stelle ermöglichen. Dadurch unterscheiden sich Strang und Gegenstrang in ihrer Länge und können per Größenaufschlusschromatographie voneinander getrennt werden. Mit den isolierten Einzelsträngen kann der Zyklus anschließend wiederholt werden. Um ausschließlich die Sequenzen zu isolieren, die eine hohe Affinität zum Zielmolekül aufweisen, werden die Bedingungen in jedem folgenden Zyklus restriktiver. Entweder wird die Elution bei der Affinitätschromatographie durch Änderungen in Pufferzusammensetzung, Spülvolumen oder Verkleinern des Zeitfensters, in dem Oligonukleotide gesammelt werden, verschärft oder beispielsweise durch die Verringerung der Anzahl an zugegebenen Zielmolekülen nur diejenigen selektiert, die eine höhere Affinität ihnen gegenüber besitzen. Nach 6 - 20 Zyklen werden die letzten übrig gebliebenen Sequenzen in einen Vektor kloniert und nach erneuter Vervielfältigung sequenziert, um die potentiellen Aptamere zu identifizieren.^[69]

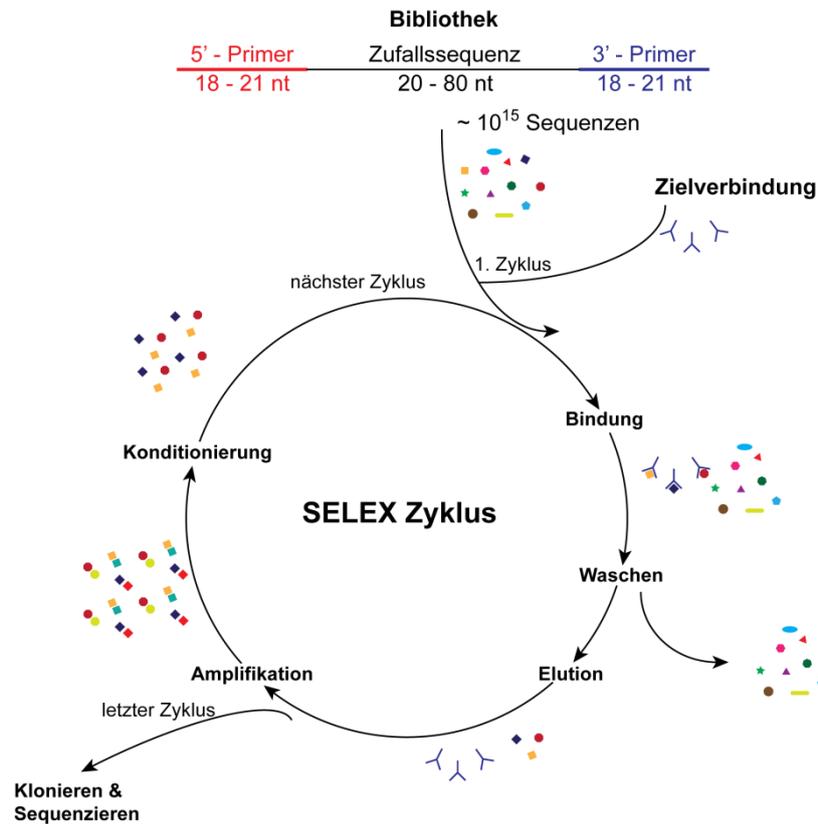


Abb. 22: Schema für den SELEX-Prozess, in dem ssDNA Aptamere generiert werden können. Eine anfänglich hergestellte Bibliothek aus ca. 10^{15} unterschiedlichen DNA Sequenzen wird mit einer Verbindung versetzt, gegen die Aptamere gesucht werden. Verschiedene Sequenzen mit Affinität zum Zielmolekül binden und die übrigen Einzelstränge werden durch Waschen entfernt. Anschließend werden die gebundenen Stränge vom Zielmolekül getrennt und per PCR amplifiziert. Die erhaltenen Doppelstränge werden denaturiert, die gewünschten Einzelstränge isoliert und einem folgenden SELEX-Zyklus unterzogen. Das Verfahren wird 6 - 20 Mal unter restriktiver werdenden Bedingungen wiederholt. Falls Aptamere gegen die Zielverbindung existieren, können sie so angereichert und nach dem letzten Zyklus kloniert und anschließend sequenziert werden.^[69]

Auf diesem Weg generierte Aptamere konnten beispielsweise erfolgreich zur Erkennung von Prostata-Krebszellen genutzt werden^[70] oder lieferten einen neuen Sensor für Kokain. Dazu wurde das Aptamer zusätzlich mit einem Fluorophor und einem Quencher modifiziert. Solange dieses Aptamer seine Zielverbindung nicht binden konnte, befanden sich Fluorophor und Quencher in einem flexiblen Abschnitt des Oligonukleotids. Erst die Bindung von Kokain schränkte die Beweglichkeit des Aptamers ein und fixierte Fluorophor und Quencher nah beieinander. Der nun mögliche FRET-Effekt sorgte dafür, dass so gut wie keine Fluoreszenz mehr detektiert werden konnte. Die Anwesenheit der Droge führte folglich zu einer Abnahme in der Fluoreszenz, was zum Nachweis von Kokain genutzt werden konnte (Abb. 23).^[71]

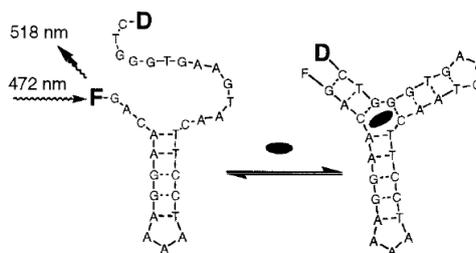


Abb. 23: Erfolgreicher Einsatz eines Aptamers als Sensor für Kokain. Die Bindung der Droge fixierte Fluorophor und Quencher nah beieinander. Der auftretende FRET-Effekt reduzierte die Fluoreszenz und durch diese Abnahme konnte die Anwesenheit der Droge bewiesen werden. (entnommen aus Stojanovic et al.)^[71]

Die größte Schwachstelle von Aptameren ist, dass sie zwar eine hohe Affinität gegen das gesuchte Zielmolekül besitzen, meist jedoch nicht ausschließlich nur dieses binden können. Trotzdem werden Aptamere für die therapeutische Anwendung intensiv untersucht. Im Vergleich zu neuen, monoklonalen Antikörpern sind sie immer noch einfacher herstellbar, provozieren keine Immunabwehr, besitzen eine deutlich kleinere Struktur und werden in einem in vitro Prozess gewonnen, wodurch auch die Selektion gegen toxische Verbindungen möglich ist.^[69]

Die Herausforderung in der Herstellung von Aptameren besteht darin, dass keine Standardprozedur für ihre Gewinnung existiert, sondern dass der Zyklus immer auf das jeweilige Problem angepasst werden muss. Auch dann ist es möglich, dass kein Aptamer für das gesuchte Zielmolekül gefunden werden kann, da die chemische Vielfalt in der Interaktion der Oligonukleotide mit den Zielverbindungen durch die Beschränkung auf die vier Nukleobasen und ihre möglichen Wechselwirkungen limitiert ist. Die Wechselwirkung zwischen Aptamer und Zielmolekül beruht neben einer zueinander komplementären Form, auf polaren Kontakten, Wasserstoffbrückenbindungen und Ladungsinteraktionen. Die Selektion von Aptameren gegen menschliche Proteine ist mit den natürlichen Basen nur gegen ca. 30 % des humanen Proteoms möglich. Oligonukleotiden mangelt es im Vergleich zu Proteinen an einer stärkeren hydrophoben Wechselwirkung, die für die Interaktion mit vielen Proteinen essentiell ist.^[69] Die Erweiterung der natürlichen Nukleobasen um eine unnatürliche Base oder Modifikation, die eine solche zusätzliche Wechselwirkung ermöglicht, erhöht die Chancen Aptamere gegen humane Proteine zu finden auf ca. 84 %.^[72] Die Kompatibilität der neuen Verbindungen und Modifikationen mit den enzymatischen Schritten des SELEX-Prozesses wie der PCR ist dabei essentiell. Ein solches Basenpaar, das zu 99,9 % von PCR erkannt und toleriert wurde, ist 7-(2-Thienyl)-imidazo[4,5-b]pyridin, das mit einem Diol-Derivat von 2-Nitro-4-propynylpyrrol wechselwirken kann (Abb. 24 a). Die Modifikation einer Bibliothek mit dem Pyridin Derivat an bis zu drei verschiedenen Positionen innerhalb einer 43 Basen langen Zufallssequenz erlaubte die Erzeugung von Aptameren gegen die Proteine IFN- γ und

VEGF-165. Die Affinität dieser neu gewonnen Aptamere gegen die jeweilige Zielverbindung war um den Faktor 100 größer als die Dissoziationskonstanten von ebenfalls hergestellten unmodifizierten Aptameren.^[73]

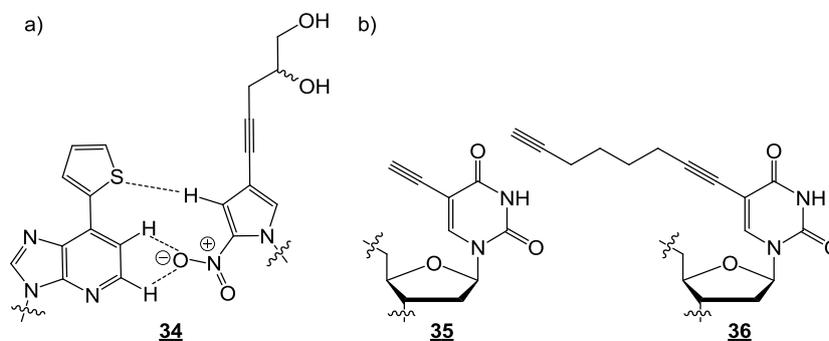


Abb. 24: Beispiel für verschiedene unnatürliche Bausteine, die von PCR toleriert werden und die Herstellung von Aptameren mit neuen Wechselwirkungsmöglichkeiten erlauben. a) Unnatürliches Basenpaar, mit dessen Hilfe Aptamere selektiert werden konnten, deren Affinität zum entsprechenden Zielprotein um den Faktor 100 größer war als von unmodifizierten Aptameren.^[73] b) Alkin-modifizierte Desoxyuridin-Derivate, die mittels Click-Chemie variabel modifiziert werden können und damit eine Vielzahl an neuen Modifikationen innerhalb der Oligonukleotid-Bibliothek erlauben.^[74]

Eine alternative Art, Modifikationen sogar auf variable Art und Weise in die Oligonukleotid-Bibliothek einzuführen, entsteht dadurch, dass die Alkin-modifizierten Derivate des Desoxyuridins ebenfalls PCR kompatibel sind (Abb. 24 b). An Stelle der natürlichen Base T wird die entsprechende Modifikation in die Sequenzen eingebaut. Anschließend können alle Modifikationen über die Cu(I)-katalysierte Huisgen-[3+2]-Cykloaddition, häufig auch als Click-Reaktion bezeichnet, mit Aziden gekoppelt werden. Die Auswahl von verschiedenen Azid-Derivaten erlaubt auf diesem Weg die Herstellung ganz unterschiedlich modifizierter Bibliotheken für die Aptamerselektion.^[74]

Bei der Wahl der Modifikation unterliegt diese Methode wiederum der Beschränkung, dass die Gruppe während der PCR toleriert werden muss, damit die Alkin-Derivate eingebaut werden können. Ein Ansatz, der dieses Verfahren für beliebige Modifikationen öffnet, da diese photochemisch vor dem Start der enzymatischen Reaktionen abgespalten werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und wird im Allgemeinen Teil vorgestellt.

2 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Eine der prominentesten Methoden zur Kontrolle der Funktionen von Verbindungen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung nutzt die lichtinduzierte Isomerisierung oder Spaltung von Verbindungen. Während bei reversiblen Isomerisierungsprozessen sogenannte Photoschalter eingesetzt werden, kommen irreversibel abspaltbare photolabile Gruppen an Schlüsselpositionen der zu regulierenden Funktionen zur Anwendung. Zwar sind photolabile Gruppen im Vergleich zu Photoschaltern nur irreversibel zu aktivieren, sie sind jedoch in der Regel wesentlich einfacher in die Zielverbindungen zu integrieren und haben wegen ihrer vergleichsweise geringen Größe lediglich an der gewünschten Stelle Einfluss auf die Struktur und Funktion der Verbindung. Daher finden sie auch heute noch vielfältig Verwendung.

Die Kombination von photolabilen Schutzgruppen mit Biomolekülen und damit eine Brücke zwischen damals rein synthetisch genutzten Verbindungen und biologischen Anwendungen wurden erstmals in den 70er Jahren von zwei Forschergruppen unternommen.^[75,76] Seit dieser Zeit haben sich vielfältige Anwendungen dieser Technik durch die Kontrolle von Oligonukleotiden oder Peptiden mit photolabilen Schutzgruppen ergeben.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde sowohl an neuen photolabilen Verbindungen für spezielle Anwendungen gearbeitet, als auch die Kombination aus in der Arbeitsgruppe von Prof. Heckel bereits etablierten modifizierten Oligonukleotiden mit dem Gebiet der Ladungsübertragung entlang von DNA-Bausteinen untersucht.

Der Ladungstransfer entlang von Biomolekülen wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht, da Biomoleküle erweitert um Ladungstransfereigenschaften die Grundlage für eine molekulare Elektronik im Nanometer-Maßstab liefern könnten. Aus vielen Untersuchungen bezüglich der Ladungsübertragung entlang von doppelsträngiger DNA ist bekannt, dass Störungen in der Basenpaarung den Stromfluss deutlich reduzieren (siehe Kapitel 1.1.4). Daher sollte im ersten Projekt dieser Dissertation ein bereits etabliertes System für die Ladungsübertragung mit photolabil geschützten Nucleobasen kombiniert werden. Geschützte Nucleobasen tragen die Schutzgruppe an einer Position, die in der Watson-Crick-Basenpaarung notwendig ist. Folglich wird durch ihren Einbau der Duplex und seine Stabilität gestört. Diese Störung sollte den Ladungstransfer analog wie bei einer Fehlpaarung unterbinden. Aktivierung mit UV-Licht sollte den Doppelstrang wieder herstellen und Stromfluss ermöglichen (Abb. 25 a). Im Zuge der Dissertation sollte dieses Projekt ausgehend von der

irreversiblen Schaltung in drei Stufen hin zu einem reversibel schaltenden System entwickelt werden. Dabei sollten die Möglichkeiten weiterer photolabiler Verbindungen bezüglich anderer Anregungswellenlängen und eines Einbaus innerhalb des Phosphatrückgrats untersucht werden (Abb. 25 b, c). In der letzten Entwicklungsstufe sollten schließlich Photoschalter eingebaut werden, um die Ladungsübertragung zwischen aktivem und blockiertem Zustand hin und her schalten zu können (Abb. 25 d).

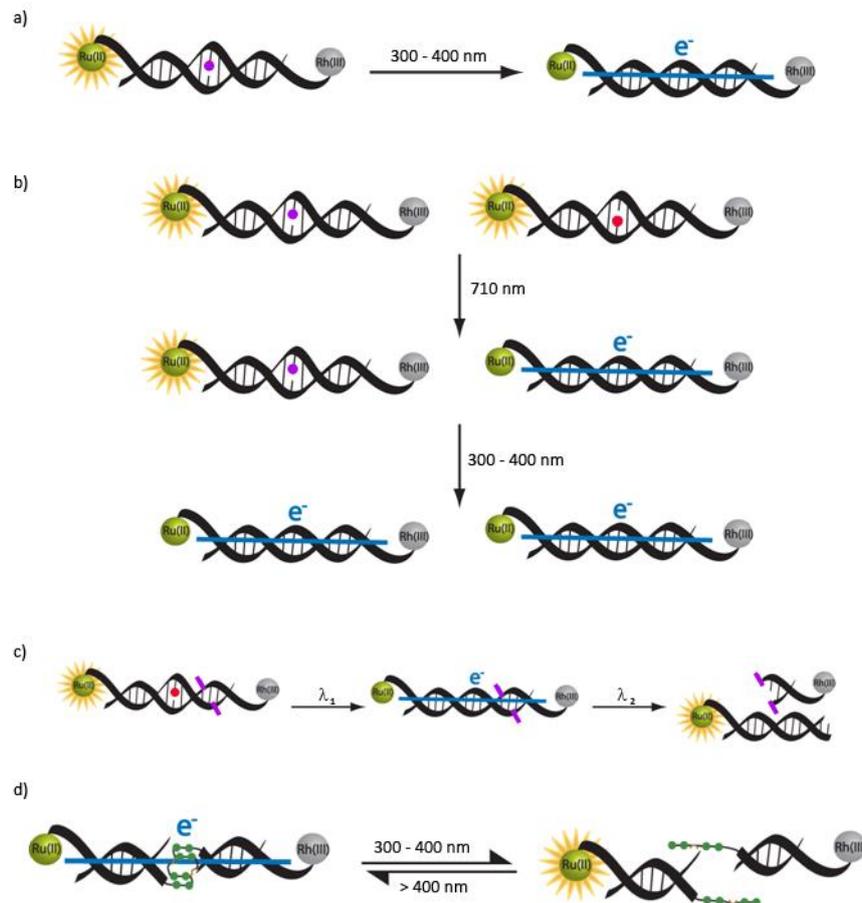


Abb. 25: Anfänglicher schematischer Plan für die Untersuchung der lichtregulierten Leitfähigkeit entlang von DNA. Durch den Nutzen von photolabilen Schutzgruppen soll der Ladungstransfer eines etablierten Systems gesteuert werden. Generell zeigt Stromfluss entlang von Oligonukleotiden eine hohe Abhängigkeit von einem intakten Basenstapel. a) Eine photolabile Schutzgruppe sollte die Basenpaarung stören und damit den Ladungstransfer bis zur irreversiblen Aktivierung mit UV-Licht blockieren. b) Die Anwendung verschiedener Schutzgruppen, die bei unterschiedlichen Wellenlängen aktiviert werden können, sollte ein selektives Einschalten der Ladungsübertragung entlang der DNA erlauben. c) Die Kombination von Schutzgruppen auf den Nukleobasen mit photolabilen Gruppen im Phosphatrückgrat der DNA sollte ein zweifaches Schalten des Stromflusses ermöglichen. Zunächst würde der Basenstapel durch Belichtung wieder hergestellt werden und Strom könnte fließen. Die Aktivierung mit der zweiten Wellenlänge würde nun die DNA spalten und Ladungsdonor und -akzeptor voneinander trennen, wodurch der Stromfluss wieder gestoppt werden würde. d) Der Einsatz von Photoschaltern, die die Ausbildung eines G-Quadruplexes zwischen zwei DNA-Duplexen kontrollieren können, wurde als abschließende Stufe für die reversible Kontrolle der Leitfähigkeit geplant. Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits Vorversuche, die den Einfluss der cis-trans Isomerisierung von Azobenzolen, eingebaut in eine G-reiche Sequenz, auf die G-Quadruplexbildung belegen konnten.

Die optische Kontrolle der Leitfähigkeit entlang von Oligonukleotiden könnte als erstes System Stromfluss ohne die Zugabe weiterer Chemikalien regulieren und die Möglichkeiten von Oligonukleotiden in der molekularen Elektronik deutlich erhöhen.

Das zweite Projekt dieser Dissertation entwickelte sich aus einem kollaborativen Forschungsverbund im Rahmen des *Cluster of Excellence Macromolecular Complexes* mit den Arbeitsgruppen von Prof. Tampé und Prof. Heilemann. Die Aufgabe des Arbeitskreises von Prof. Heckel bestand in der Synthese und Entwicklung neuer photolabiler Verbindungen, die in Peptide eingebaut werden können und eine Spaltung der Peptide mittels Zwei-Photonen-Anregung mit IR-Licht ermöglichen sollten. Diese Technik besitzt gegenüber herkömmlicher UV-Anregung eine deutlich vergrößerte dreidimensionale Auflösung, da die Zwei-Photonen-Anregung auf den Bereich im Fokus der Anregung beschränkt ist. Gleichzeitig würde eine neue Gruppe mit diesen Eigenschaften mit bereits vorhandenen, mit UV-Licht spaltbaren Aminosäuren, kombiniert werden können. Zuerst würde nur die neue Verbindung mittels IR-Strahlung gespalten und anschließend mit UV-Licht die zweite Gruppe aktiviert werden. Von den bekannten Schutzgruppen, die über einen entsprechend hohen Zwei-Photonen-Einfangquerschnitt verfügen, so dass sie für biologische Anwendungen interessant sind, wurde auf Grundlage des Nitrodibenzofurans die Synthese einer neuen Verbindung geplant (Abb. 26).

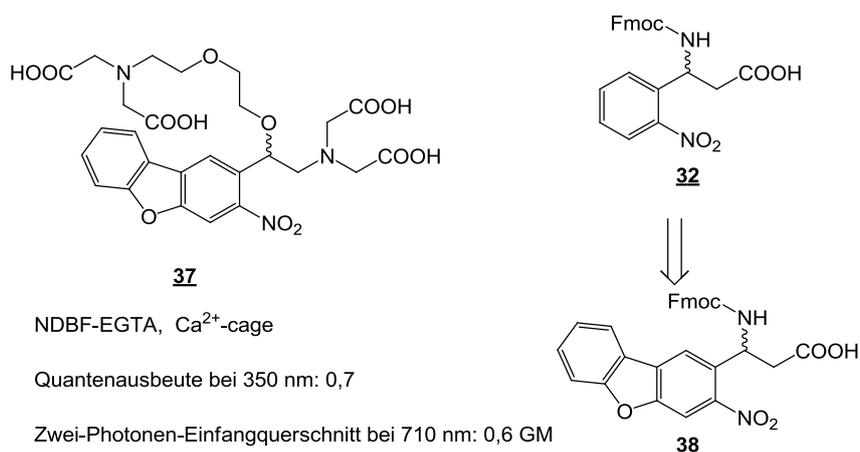


Abb. 26: Eine neue, mittels Zwei-Photonen-Anregung spaltbare Verbindung sollte hergestellt werden, die in Peptide eingebaut werden kann, um diese zu spalten. Grundlage für die neue Verbindung war Nitrodibenzofuran, dessen Zwei-Photonen-Aktivität bekannt ist (links).^[77] In Anlehnung an die bisher genutzte photospaltbare Aminosäure **32**, wurde das neue Zielmolekül als analoge β -Aminosäure entworfen (rechts).

Ebenfalls eine neue lichtspaltbare Verbindung sollte auch für das dritte Projekt dieser Arbeit synthetisiert werden. In Kollaboration mit der Gruppe von Prof. Mayer sollte eine Technik entwickelt werden, mit der Oligonukleotide lichtspaltbar um neue chemische Wechselwirkungen erweitert werden können. Die beschränkte chemische Vielfalt der Nucleobasen begrenzt die Möglichkeiten von Oligonukleotiden, als Aptamere gegen eine Vielzahl von Verbindungen zu fungieren (siehe Abschnitt 1.3). Werden im Rahmen des SELEX-Prozesses zur Herstellung von Aptameren modifizierte Oligonukleotide genutzt, kann gegen eine wesentlich größere Anzahl Zielverbindungen erfolgreich selektiert werden. Gleichzeitig kann DNA durch die chemischen Modifikationen ihre Kompatibilität zu den enzymatischen Schritten verlieren, die essentieller Bestandteil des SELEX-Verfahrens sind. Der Einbau der neuen chemischen Modifikationen sollte daher über eine photolabile Gruppe erfolgen, so dass die Modifikationen vor den gehinderten Schritten wieder entfernt werden können. Als neue Gruppe für eine erweiterte Wechselwirkung der Oligonukleotide mit Proteinen wurde in Anlehnung an die Aminosäure Tryptophan ein Indol Rest gewählt. Damit der neue Baustein an die DNA Bibliothek und die angereicherten Oligonukleotide aus den jeweiligen SELEX-Runden gebunden werden kann, sollte das Molekül zusätzlich über eine Azid-Modifikation verfügen. Diese Modifikation erlaubt die Verknüpfung der neuen Verbindung mit bekanntermaßen SELEX kompatiblen Alkin-modifizierten Oligonukleotiden über Click-Chemie. Folglich kann eine aus den drei Bestandteilen aufgebaute Verbindung (Abb. 27) über das Azid an entsprechend Alkin-modifizierte DNA konjugiert werden. Die DNA trägt dann die neue chemische Modifikation mit deren Hilfe Aptamere gegen die Zielverbindungen selektiert werden können. Vor der Amplifikation kann diese Gruppe lichtinduziert entfernt werden und nach der Anreicherung für den nächsten Zyklus wieder an den neuen Pool über Click-Chemie gebunden werden.

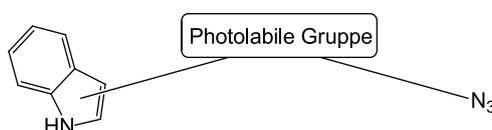


Abb. 27: Konzept für ein neues lichtspaltbares Molekül, das die Wechselwirkungen von Oligonukleotiden mit potentiellen Zielverbindungen während des SELEX-Verfahrens erhöht. Das Molekül besteht aus den drei Bereichen: Neue chemische Wechselwirkung (hier durch das Indol symbolisiert), ein Azid zum Funktionalisieren der Oligonukleotide mit dem neuen Molekül über Click-Chemie und einer photolabilen Gruppe zwischen den beiden anderen Modifikationen, damit eine potentielle Interferenz mit den enzymatischen Schritten durch photochemische Abspaltung umgangen werden kann.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Lichtinduzierte Leitfähigkeit entlang von Oligonukleotiden

3.1.1 Vorarbeiten

Die Idee für dieses Projekt wurde schon im Vorfeld dieser Arbeit im Rahmen einer Diplomarbeit untersucht. Ladungsübertragung entlang von Oligonukleotiden zeigt eine hohe Abhängigkeit vom Zustand des π -Systems (siehe Kapitel 1.1.4). Die Kombination eines literaturbekannten Systems für die Ladungsübertragung entlang von DNA mit lokalen und leicht auflösbaren Störungen im Basenstapel, wie sie durch photolabile Schutzgruppen vermutlich hervorgerufen werden, stellte ein vielversprechendes Thema für die Dauer einer solchen Arbeit da. Dabei wurde auf ein bereits publiziertes System zurückgegriffen, das reproduziert und gleichzeitig um photolabile Schutzgruppen erweitert werden sollte.³³ Das System wurde bereits im Abschnitt 1.1.5 kurz angesprochen. Dort wurde der Effekt genutzt, dass der eingesetzte Ruthenium-Komplex eine Sonde für die Anwesenheit von dsDNA in wässrigen Lösungen darstellt. Der Komplex kann bei 450 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. In wässrigen Lösungen wird diese Fluoreszenz jedoch durch die Interaktion mit Wassermolekülen unterdrückt. Die Anwesenheit von dsDNA ermöglicht dem Komplex in die DNA zu interkalieren, wodurch er gegenüber Wassermolekülen abgeschirmt wird und wieder fluoreszieren kann. Wird dsDNA mit diesem Komplex modifiziert, kann folglich bei Anregung mit 450 nm Fluoreszenz beobachtet werden. Durch eine zweite Modifikation des Doppelstrangs mit einem Rhodium-Komplex wurde die Fluoreszenz jedoch wieder unterdrückt. Anstelle Photonen für die Fluoreszenz zu emittieren, fand zwischen dem Ruthenium und dem Rhodium-Komplex ein Energietransfer in Form einer Ladungsübertragung entlang des π -Systems des Doppelstrangs statt (Abb. 28).

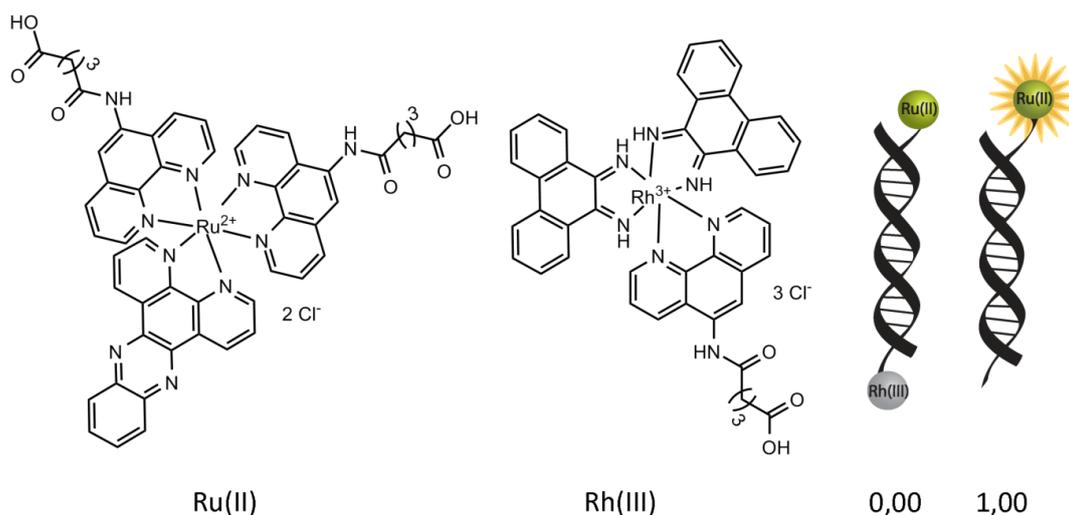


Abb. 28: Die abgebildeten Komplexe wurden als Redoxpaar für Ladungstransfer entlang von DNA genutzt. Interkaliert der Dipyridophenazin (dppz) Ligand des Ruthenium-Komplexes in DNA, kann der Komplex zur Fluoreszenz angeregt werden. Bei gleichzeitiger Modifikation des Strangs mit dem Rhodium-Komplex wird die Fluoreszenz unterdrückt. Im Ergebnis wurde ein deutlicher An/Aus (1,00/0,00) Effekt berichtet.³³

Das Auslesen der Ladungsübertragung mit Fluoreszenzmessungen stellte eine vergleichsweise einfache Methode zum Nachweis für den gewünschten Effekt dar. Zusätzlich war dieses System durch die Fluoreszenzanregung bei 450 nm kompatibel zu den in der Arbeitsgruppe Heckel etablierten photolabilen Schutzgruppen wie 1-(2-Nitrophenyl)ethyl (NPE) oder 2-(2-Nitrophenyl)propyl (NPP). Daher wurde versucht oben abgebildetes System nach den publizierten Daten zu reproduzieren.

Nach der erfolgreichen Synthese der Komplexverbindungen, stellte die Kupplung an Amino-modifizierte DNA ein Problem dar. Unabhängig von verschiedenen getesteten Bedingungen konnte in keinem Fall eine erfolgreiche Konjugation an DNA beobachtet werden. Dass die Komplexe grundsätzlich an Amine binden konnten, wurde durch erfolgreiche Verknüpfung mit anderen Aminen wie Benzylamin demonstriert. Ebenfalls konnte auf der anderen Seite die DNA mit anderen Verbindungen wie Farbstoffen modifiziert werden.^[78] Nach einer Vielzahl an erfolglosen Versuchen wurde daher Kontakt zu der Arbeitsgruppe aufgenommen, die diese Experimente veröffentlicht hatte. Es stellte sich heraus, dass auch in der dortigen Arbeitsgruppe die Reproduktion dieser alten Ergebnisse nicht mehr möglich war. Außer dem damaligen Doktoranden war niemand mehr in der Lage diese erste Generation an Komplexen an DNA zu binden. Alternativ wurde vorgeschlagen die weiter entwickelten Versionen der beiden Komplexe zu verwenden (Abb. 29), mit denen auch die aktuellen Doktoranden positive Ergebnisse erzielen konnten. Diese neuen Komplexe wurden

hinsichtlich ihrer Kupplungseffizienz an DNA sowie ihrer optischen Eigenschaften optimiert. Die Eigenschaften für die Ladungsübertragung zwischen ihnen sollten analog wie in der ursprünglichen Publikation sein. Freundlicherweise stellte die Arbeitsgruppe von Prof. Barton gegen Ende der Diplomarbeit einige Milligramm des Rhodium-Komplexes zur Verfügung. Die Verknüpfung des neuen Rh-Komplexes mit DNA war die erste Aufgabe im Rahmen dieser Dissertation.

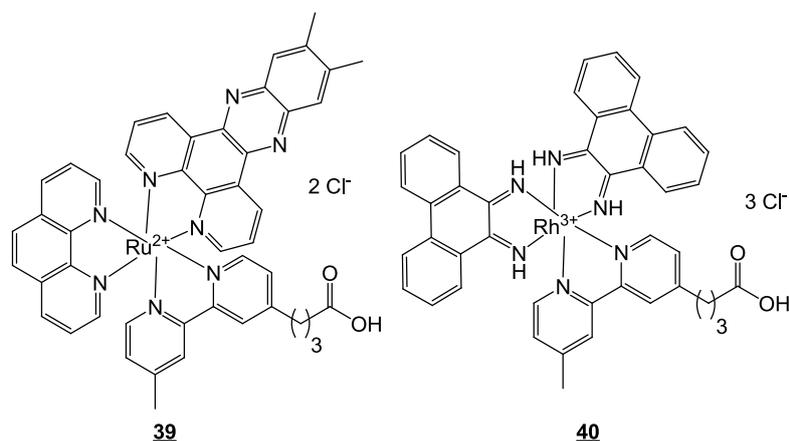


Abb. 29: Neue Generation der Ruthenium- und Rhodium-Komplexe, die auf Vorschlag der Arbeitsgruppe von Prof. Barton an Stelle der älteren Verbindungen genutzt werden sollten. Diese Verbindungen konnten reproduzierbar von verschiedenen Doktoranden der aktuellen Gruppe an Amin-modifizierte Oligonukleotide gebunden werden.

3.1.2 Synthese des DNA-Rh-Konjugats

Zur Modifikation von DNA mit der neuen Generation des Rhodium-Komplexes, wurde ein C9-Amino-Linker manuell an den entsprechenden DNA-Strang synthetisiert. Die Sequenz des Strangs blieb in Anlehnung an die ursprüngliche Publikation unverändert. Der DNA-Strang wurde im DMTr-off Modus per DNA Festphasensynthese hergestellt und die freie 5'-OH Gruppe mittels Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert. Die aktivierte DNA kann prinzipiell mit jedem beliebigen Diamin umgesetzt werden. Der Aktivester wird angegriffen und resultiert in einem Carbamat, welches ein freies, primäres Amin für weitere Funktionalisierung besitzt (Abb. 30).

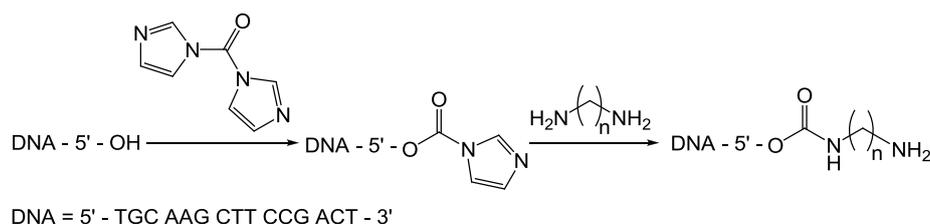


Abb. 30: Aktivierung von DNA am 5'-OH mit CDI und anschließende Reaktion mit einem beliebigen Diamin lieferte Amino-modifizierte DNA mit frei wählbaren Linkerlängen. Die Sequenz für den Strang, der mit dem Rh-Komplex modifiziert wurde, ist angegeben.

Für die Kupplung der Komplexverbindung an die DNA wurde Diaminononan ($n = 9$) eingesetzt. Durch Abspaltung einer analytischen Menge der DNA vom Festphasenmaterial konnte die erfolgreiche Kupplung bestätigt werden und die DNA direkt weiter mit dem Rhodium-Komplex zur Reaktion gebracht werden. Als Bedingung für die Kopplung an DNA wurde eine Mischung aus 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) und 1-Hydroxybenzotriazol Hydrat (HOBt) gewählt, die auch bei den Kopplungsversuchen der alten Komplexe an Amine wie Benzylamin die höchsten Ausbeuten erzielt hatte. Für die Reaktion wurde der Komplex in Gegenwart einer Base (Diisopropylethylamin, DIPEA) mit den beiden Aktivierungsreagenzien in Dimethylformamid (DMF) gelöst und zur DNA gegeben. Da die DNA noch immer ans Festphasenmaterial gebunden war, konnten überschüssige Reagenzien im Anschluss an die Reaktion einfach per Filtration entfernt werden. Anschließend wurde die DNA von der festen Phase gespalten, per HPLC getrennt und massenspektrometrisch analysiert, um die gewünschte erfolgreiche Kupplung zu bestätigen (Abb. 31).

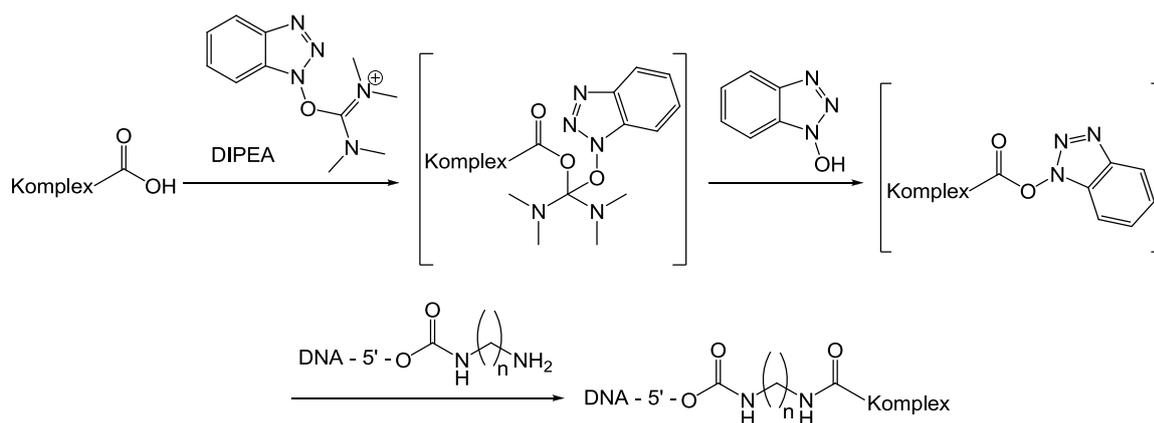


Abb. 31: Kopplung von Carbonsäuren (hier dem Rh-Komplex) an Amino-modifizierte DNA über Aktivierung mit einer Mischung aus HBTU, HOBT und DIPEA.

Nachdem die Kupplung des neuen Rh-Komplexes erfolgreich bestätigt werden konnte (Abb. 32), musste der neue Ru-Komplex, angefangen mit den benötigten Liganden synthetisiert werden.

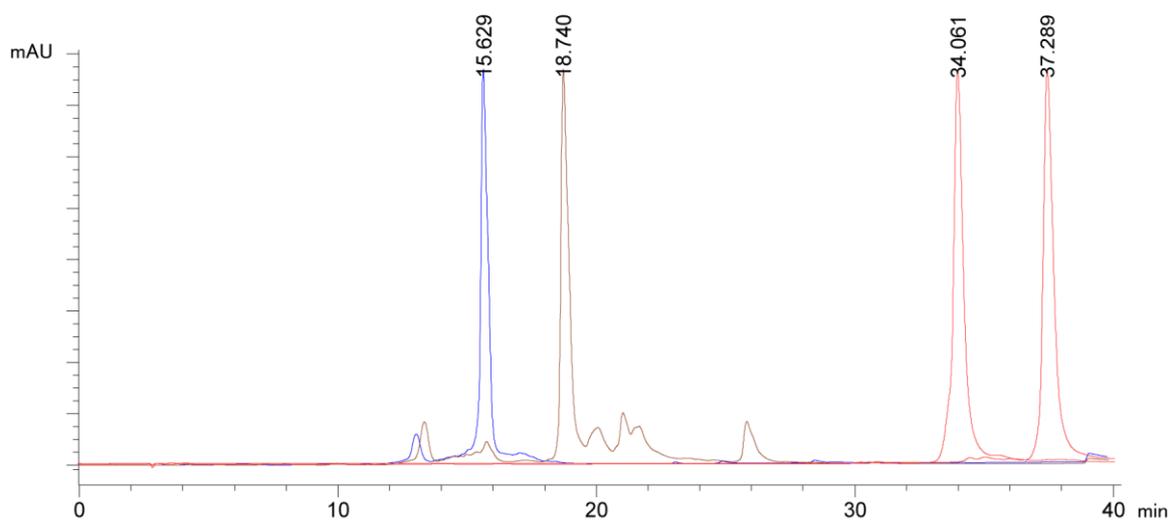


Abb. 32: Veränderung der Retentionszeit der DNA-Stränge durch Modifikation des 15mers (blau) mit Diaminononan (braun) und anschließender Reaktion mit dem Rh-Komplex **40** (rot). Massenspektrometrisch wurden zwei Peaks als das gewünschte Produkt identifiziert. Die abgebildeten Spektren des Endprodukts (rot) entsprechen analytischen Proben der zwei isolierten Diastereomere.

3.1.3 Synthese der neuen Liganden für den Ru-Komplex

Vor der Synthese des Ru-Komplexes mussten zwei neue Liganden auf Basis des dppz und Bipyridingerüsts (bpy) hergestellt werden. Die Synthese des Me₂dppz konnte innerhalb von zwei Schritten analog zu veröffentlichten Vorschriften erfolgen (Abb. 33).^[79] Nachteil dieser Reaktion war, dass die Oxidation von Phenanthrolin (phen) in Nitriersäure nur als Nebenprodukt die gewünschte Verbindung ergab. Hauptprodukt der Reaktion war Nitrophenanthrolin. Durch mehrfache Wiederholung dieser Reaktion konnten jedoch auch mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 10 % eine ausreichende Menge für alle weiteren Reaktionen hergestellt werden. Nach anschließender Umsetzung mit einem Diamin, das in einer Mannich-artigen Reaktion mit dem Diketon reagierte, konnte der erste neue Ligand synthetisiert werden.

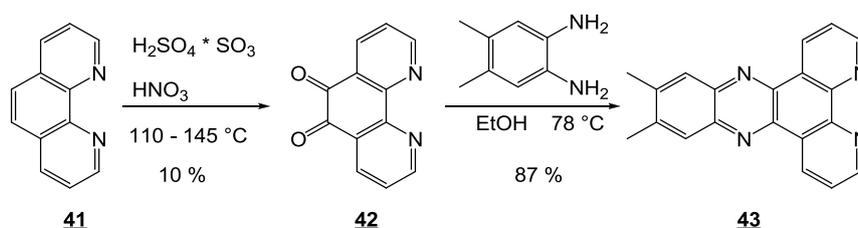


Abb. 33: Synthese des neuen Me₂dppz Liganden. Die Oxidation im ersten Schritt lieferte schlechte Ausbeuten, da das gewünschte Produkt lediglich als Nebenprodukt der Reaktion entsteht.

Die Synthese des zweiten Liganden erfolgte ebenfalls nach einer bereits veröffentlichten Vorschrift.^[80] 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin wurde zu Beginn mittels Organo-Lithium Chemie deprotoniert und als Nukleophil mit dem Aldehyd-geschützten Derivat des 3-Brompropanals umgesetzt. Nach saurer Entschützung des Aldehyds, Oxidation zur Carbonsäure mit Kaliumpermanganat und abschließender Schützung der neuen Säurefunktion als Methylester, konnte auch der zweite Ligand erfolgreich hergestellt werden (Abb. 34). Zur Reinigung dieses Liganden erwies sich Kieselgel als ungeeignet, da die verschiedenen bpy-Derivate oft sehr ähnliche Wechselwirkungen mit Kieselgel zeigten. Dieses Problem konnte durch den Einsatz von neutralem Aluminiumoxid als feste Phase gelöst werden, da hier die Verbindungen deutlich andere Muster bei Kontrolle mit Dünnschichtchromatographie aufgewiesen haben. Eine saubere Trennung der gewünschten Produkte war auf diesem Weg möglich.

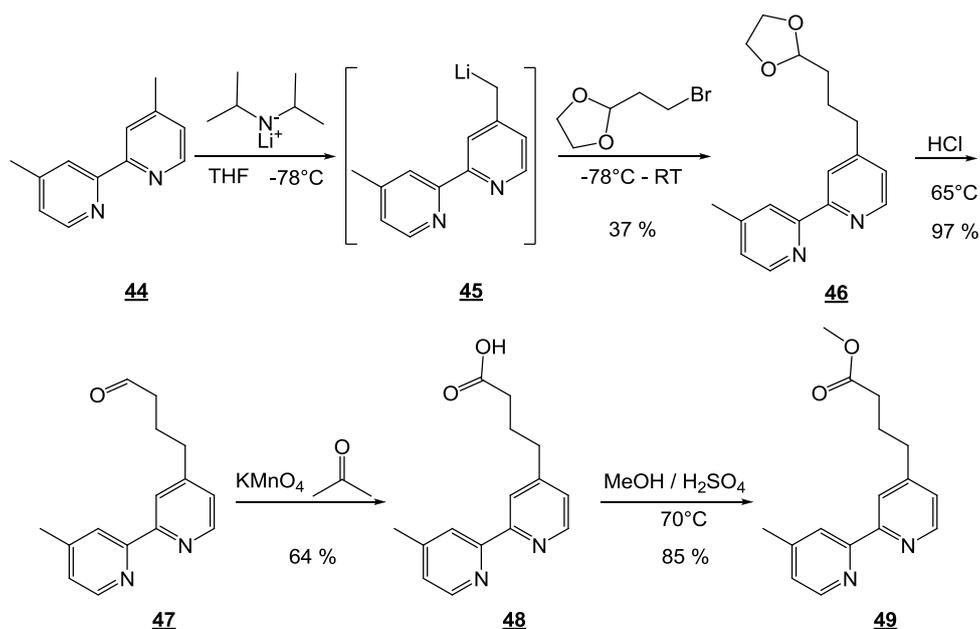


Abb. 34: Synthese des zweiten neuen Liganden bpy^{OMe} für die zweite Generation des Ru-Komplexes.

3.1.4 Synthese des neuen Ru-Komplexes und dessen DNA-Konjugaten

Die Synthese von Metallkomplexen, die drei verschiedene Liganden tragen sollen, folgt dem Muster, dass nach jeder Reaktion mit einem Liganden der Komplex von einer stabilen Zwischenstufe in eine reaktive Spezies umgesetzt werden muss, damit anschließend der nächste Ligand eingeführt werden kann. Die Synthese wurde in Anlehnung an Vorschriften zu ähnlichen Ru-Komplexen durchgeführt.^[81] Zu Beginn wurde Rutheniumtrichlorid in einer Mischung aus Ameisensäure und Paraformaldehyd erhitzt und zu einem reaktiven Polymer umgesetzt. Diese Reaktion und das entstehende Produkt sind sehr luftempfindlich. Wenn keine direkte Umsetzung der Verbindung erfolgte, wurde sie unter Vakuum bis zur weiteren Reaktion gelagert. Meist wurde direkt der erste Ligand phen an den Komplex gebunden und lieferte die erste stabile Zwischenstufe der Reaktion. Im nachfolgenden Schritt wurden die zwei Chlorid-Liganden durch Trifluormethansulfonsäure substituiert. Das gebildete Zwischenprodukt besaß eine wesentlich höhere Reaktivität, wodurch der zweite Ligand Me_2dppz eingeführt werden konnte. Wieder in einer stabilen Zwischenstufe angekommen, wurde der dritte Ligand bpy^{OMe} in Gegenwart von Trimethylaminoxid eingeführt. Das Aminoxid reagiert bekanntermaßen mit Carbonylliganden, wobei Trimethylamin und Kohlenstoffdioxid freigesetzt werden. Folglich entstanden zwei freie Koordinationsplätze am Komplex, an die der dritte Ligand binden konnte. Der gewünschte Komplex stand nach Entschützen des Methylesters am bpy Liganden für Konjugation an DNA zur Verfügung (Abb. 35).

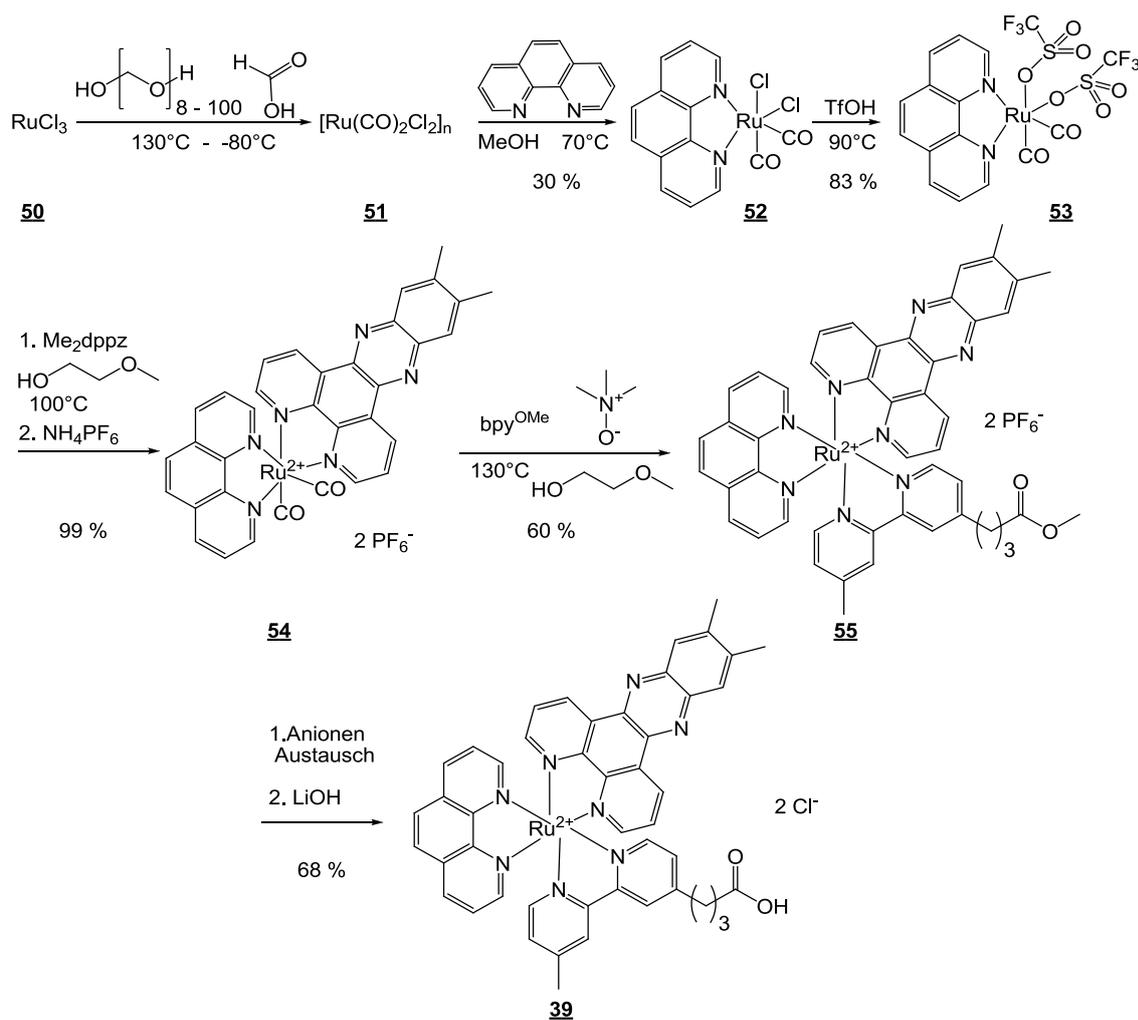


Abb. 35: Synthese des neuen Ru-Komplexes.

Die Herausforderungen bei der Herstellung des Komplexes lagen in der Reinigung der verschiedenen Produkte. Für die Zwischenprodukte wurden verschiedene Kristallisations- bzw. Ausfällbedingungen genutzt, die nach einiger Optimierung alle Stufen in NMR sauberer Reinheit ergaben. Die Endstufe bereitete größere Probleme. Umkristallisation stellte sich als ungeeignet heraus, da sich das Produkt dabei zu $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ zersetzte. Verschiedene säulenchromatographische Trennungen wurden mit Kationentauschern und Aluminiumoxid getestet. Die Ergebnisse verschiedener Trennversuche wurden über Dünnschichtchromatographie (DC) mit wässrigen Salzlösungen verfolgt. Zum Einsatz kam entweder eine Mischung aus 0,5 M wässriger KNO_3 :MeCN:MeOH 1:10:1 oder 2 M wässrige NH_4Cl Lösung:DMF:H₂O 2:1:1. Nach einigen erfolglosen Versuchen, bei denen das Produkt teilweise oder wie im Fall der versuchten Kristallisation vollständig verloren ging, konnte eine Reinigung über Aluminiumoxid mit Acetonitril und einem steigenden Anteil an Wasser erfolgreich durchgeführt werden.

Die Verknüpfung an DNA erfolgte analog zu den beschriebenen Synthesen in 3.1.2 und konnte wie im Fall des neuen Rh-Komplexes erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 36).

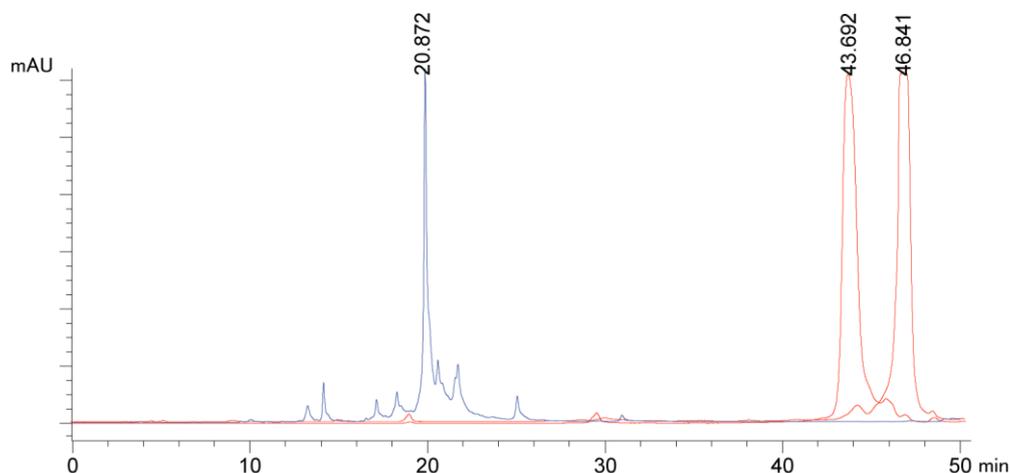


Abb. 36: Der neu hergestellte Ru-Komplex **39** konnte ebenfalls erfolgreich an DNA gekuppelt werden. Die Retentionszeit der C9-Amino-modifizierten 15mer DNA (blau) verschiebt sich nach der Kopplung deutlich (rot) und zwei Diastereomere des gewünschten Produkts konnten massenspektrometrisch identifiziert werden. Die abgebildeten Spektren zeigen die erfolgreiche Kupplung an einen 15mer DNA-Strang, der eine photolabile Schutzgruppe enthielt. Die Spektren des Endprodukts (rot) entsprechen analytischen Proben der isolierten Diastereomere.

Die Kupplung wurde in verschiedenen Experimenten wiederholt, um einerseits eine perfekt komplementäre DNA zum Rh-Strang zu erhalten und zusätzlich noch einen Strang mit einer Fehlpaarung sowie eine Sequenz mit einer photolabilen Schutzgruppe zu generieren. Als Fehlpaarung wurde eine CC-Paarung gewählt, da diese nach Schmelzpunktstudien die größte Störung des Duplexes bewirkt.^[82] Als photolabile Schutzgruppe wurde eines der Guanosine der Sequenz durch ein NPE geschütztes Derivat ersetzt (Abb. 37). Diese photolabile Schutzgruppe kann mit 365 – 400 nm gespalten werden. Dieser Anregungsbereich ist für das Komplexsystem geeignet, da niedrigere Wellenlängen um 310 nm zu einer Spaltung der DNA durch den Rh-Komplex führen^[83] und höhere Wellenlängen um 450 nm den Ru-Komplex zur Fluoreszenz anregen.

Perfekt komplementärer Gegenstrang: 5' - AGT CGG AAG CTT GCA - 3'

Gegenstrang mit Fehlpaarung: 5' - AGT CGG AAG CTT GCA - 3'

Gegenstrang mit photolabiler Schutzgruppe: 5' - AGT CGG AAG^{NPE} CTT GCA - 3'

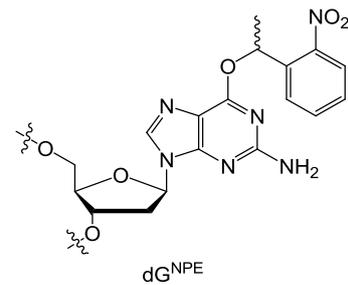


Abb. 37: Verschiedene Sequenzen wurden als Gegenstränge für den Rh-DNA-Strang mit dem Ruthenium-Komplex modifiziert. Neben einem perfekt gepaarten Gegenstrang (oben), wurde ein Gegenstrang mit einer Fehlpaarung (Mitte, Fehlpaarung ist gekennzeichnet) und ein Gegenstrang mit photolabiler Schutzgruppe (unten, Struktur des dG^{NPE} ist rechts abgebildet) hergestellt.

3.1.5 Fluoreszenzmessungen mit den DNA-Komplex-Konjugaten

Nach der Herstellung der Komplexverbindungen und der erfolgreichen Modifikation von DNA-Strängen wurden zur Untersuchung der Leitfähigkeit verschiedene Doppelstränge hybridisiert und deren Fluoreszenz untersucht.

1. Ru-DNA mit unmodifiziertem Gegenstrang. Sollte die höchste Fluoreszenz zeigen.
2. Rh-DNA mit Ru-Gegenstrang, perfekt komplementär. Die Fluoreszenz sollte gelöscht sein.
3. Rh-DNA mit Ru-Gegenstrang mit Fehlpaarung. Ladungstransfer sollte unterbrochen und die Fluoreszenz nur gering unterdrückt werden.
4. Rh-DNA mit Ru-Gegenstrang, der eine photolabile Schutzgruppe trägt. Die Fluoreszenz sollte wegen der Störung im Basenstapel reduziert sein und sich photochemisch aktivieren lassen.

Mit diesen Doppelsträngen wurde analog wie in der ursprünglichen Publikation die Fluoreszenz nach Anregung mit 450 nm im Bereich von 500 – 700 nm gemessen (Abb. 38).

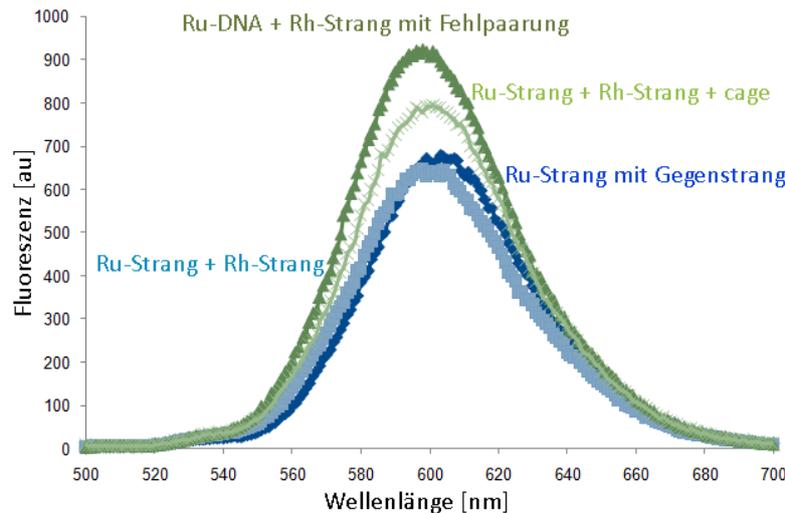


Abb. 38: Fluoreszenzmessungen unterschiedlicher Doppelstränge, die mit Metallkomplexen modifiziert waren.

Anders als erwartet folgten die aufgenommen Spektren keinerlei Muster aus dem ein ablaufender, gestörter oder unterbundener Ladungstransfer abgeleitet werden konnte. Der Doppelstrang, der ausschließlich den Ru-Komplex enthielt, zeigte eine Fluoreszenz in der gleichen Höhe wie eine Helix, die mit beiden Komplexen modifiziert war. Das Vergleichssystem analog zu der Publikation zeigte folglich keinerlei Effekt. Die beiden zusätzlich untersuchten Stränge mit Fehlpaarung und photolabiler Schutzgruppe wiesen im Vergleich sogar eine erhöhte Fluoreszenz auf. Diese Abweichung ist vermutlich auf Fehler in der exakten Konzentrationsbestimmung der Stränge zurückzuführen. Die Absorption von DNA wird näherungsweise über die Summe der Extinktionskoeffizienten der enthaltenen Nucleobasen berechnet, ohne dass eine Wechselwirkung zwischen ihnen berücksichtigt wird. Diese Näherung liefert für unmodifizierte Oligonukleotide verlässliche Ergebnisse. Eine solche Näherung auf mit Komplexverbindungen modifizierte Oligonukleotide auszudehnen, wobei die Komplexe bekanntermaßen mit den Heteroaromaten der Nucleobasen wechselwirken, könnte eine größere Fehlerquelle in der Bestimmung der Konzentrationen liefern. Unabhängig von der Erklärung für die erhöhte Fluoreszenz kann jedoch festgehalten werden, dass keinerlei Fluoreszenzlöschung beobachtet werden konnte.

In der Folge wurde eine weitere Untersuchung durchgeführt, bei der Komplexverbindungen in wässrigen Lösungen zu doppelsträngiger DNA hinzugegeben wurden. Die Komplexe waren nicht an die DNA gebunden, wodurch keine festen Stöchiometrien vorgegeben waren. Bei dieser Untersuchung hat sich gezeigt, dass die Fluoreszenz des neuen Ru-Komplexes in wässrigem Puffer anderes als für den ursprünglich publizierten Komplex nicht länger gelöscht wurde. In Gegenwart von doppelsträngiger DNA steigt die Fluoreszenz zwar an, doch konnte auch ohne Interkalation in

Oligonukleotide eine Fluoreszenz gemessen werden. Die Titration einer Lösung aus Ru-Komplex und doppelsträngiger DNA mit einer Lösung des Rh-Komplexes reduzierte die Fluoreszenz, doch selbst bei sechsfachem Überschuss des Rh-Komplexes konnten immer noch 17 % der ursprünglichen Fluoreszenz gemessen werden. Verantwortlich für die Fluoreszenz und dieses neue Verhalten in wässriger Lösung war der neue Ligand Me_2dppz . Die Fluoreszenz dieses neuen optimierten Liganden wird nicht länger von Wassermolekülen gelöscht, doch soll die Fluoreszenz nach Interkalation in DNA deutlich höher ansteigen als dies bei dem ursprünglichen dppz Liganden der Fall war.^[84] Da eine grundsätzliche Löschung in der Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte sowie der Me_2dppz Ligand als Ursache für die neuen Fluoreszenzeigenschaften identifiziert wurde, wurde in einer weiteren Synthese versucht diesen Liganden wieder gegen die ursprünglich genutzte Verbindung dppz zu tauschen. Diese Synthese gelang, doch schlug nun wieder die Konjugation des Komplexes an DNA fehl. Mit dem Resultat, dass sich die ursprünglich publizierten Komplexe nicht an die DNA binden ließen, die auf Empfehlung stattdessen hergestellten Komplexe nicht länger das damals beobachtete Verhalten zeigten und eine Abänderung der neuen Komplexe hin zu den ursprünglich publizierten Verbindungen wieder die Verknüpfung an DNA fehlschlagen ließ, wurde Prof. Dr. Achim Wagenknecht in Karlsruhe aufgesucht. Prof. Wagenknecht forscht unter anderem an Ladungstransfer entlang von DNA. Im Rahmen dieses Gesprächs zeigte sich, dass die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit von Ladungstransferuntersuchungen mit Komplexverbindungen umstritten und teilweise sogar angezweifelt wird. Die vorgelegten Ergebnisse bewertete er in diese Richtung und er empfahl für dieses Projekt verlässlichere Methoden für die Messung der Ladungsübertragung zu nutzen. Zu solchen Methoden zählen alle Arten der Leitfähigkeitsmessung, die direkten Stromfluss über Elektroden detektieren.

3.1.6 Oligonukleotide für Immobilisierung auf Goldelektroden

Die direkte Messung des Stromflusses entlang von DNA mit Hilfe von Elektroden kann entweder durch Techniken erfolgen, in denen DNA zwischen zwei Elektroden untersucht wird, wie beispielsweise bei der *break junction technique*,^[85] oder in dem Oligonukleotide auf einer Goldelektrode immobilisiert werden und der Stromfluss zwischen Elektrode und einer Redoxsonde gemessen wird.

Messungen zwischen zwei Elektroden stehen vor der Herausforderung sicher zu stellen, dass tatsächlich die Leitfähigkeit von genau einem DNA-Doppelstrang untersucht wird. Um dies zu

erreichen, werden technisch komplizierte Aufbauten genutzt. Solchen Messungen können nur von wenigen Arbeitsgruppen außerhalb Frankfurts durchgeführt werden. Messtechnisch einfacher umzusetzen sind dagegen Messungen des Stromflusses mit auf Goldelektroden immobilisierter DNA. Solche Messungen konnten in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Terfort in Frankfurt durchgeführt werden. Daher wurde als nächstes Ziel die Synthese eines mit dieser Messmethode kompatiblen Systems angestrebt. Grundlage für das neu vorgeschlagene Konstrukt war eine in Kapitel 1.1.6 kurz vorgestellte Publikation. Die Leitfähigkeit einer auf einer Goldelektrode immobilisierten DNA wurde durch die Kontrolle der Hybridisierung des Doppelstrangs zu G-Quadruplexen kontrolliert. Ohne Quadruplex lagen Fehlpaarungen entlang des Doppelstrangs vor und der Stromfluss von der Elektrode zu einer Ferrocen-Modifikation wurde unterbrochen. Die Ausbildung des G-Quadruplexes hybridisierte die DNA und ermöglichte die Messung der Ladungsübertragung hin zum Ferrocen-Rest.^[38] An Stelle durch die Ausbildung von G-Quadruplexen sollte in dem neu angestrebten System die Leitfähigkeit durch unterschiedliche Hybridisierungszustände in verschiedenen Doppelsträngen beeinflusst werden. Während ein intakter Basenstapel die Redoxreaktion zwischen Elektrode und Ferrocen übertragen sollte, sollte die Ladungsübertragung bei Störungen der Basenpaarung durch Fehlpaarungen oder photolabile Schutzgruppen reduziert werden (Abb. 39). Daher wurden verschiedene DNA-Stränge hergestellt:

- DNA-Strang mit Ferrocen-Modifikation. Der Strang wird 5'-C6-Amino-modifiziert kommerziell erworben und mit Ferrocen-Aktivester umgesetzt, um die für die Redoxreaktion notwendige Sonde in den späteren Doppelstrang einzubauen.
- Verschiedene Gegenstränge für den Fc-Strang. Ein perfekt gepaarter Gegenstrang, ein Gegenstrang mit Fehlpaarungen und ein Gegenstrang mit einer oder zwei photolabilen Schutzgruppen. Alle drei Stränge wurden mit einer 5'-Disulfidmodifikation mit C6-Linker hergestellt, um im weiteren Verlauf auf Goldoberflächen immobilisiert werden zu können.

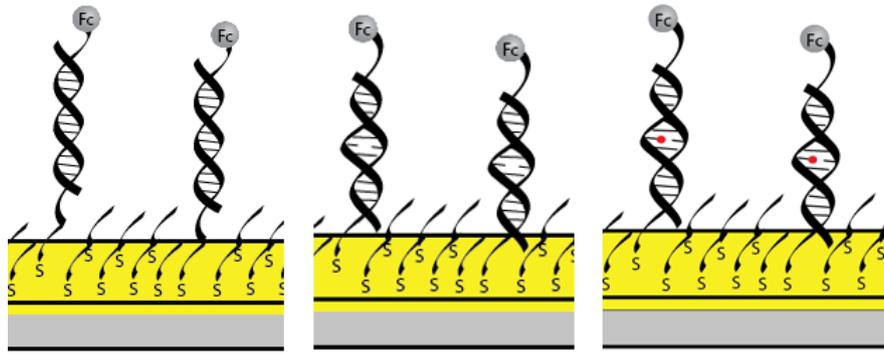


Abb. 39: Schema für die Varianten, die zur Untersuchung der Leitfähigkeit entlang einer auf Gold immobilisierten DNA und Ferrocen als Redoxsonde hergestellt wurden. Während der perfekt gepaarte Doppelstrang Stromfluss zulassen sollte (links), sollten die beiden anderen Systeme den Stromfluss dauerhaft (Mitte, Fehlpaarung) oder bis zu einem optischen Signal (rechts, photolabile Schutzgruppe) blockieren. Neben den Oligonukleotiden wurde ebenfalls ein Verdünnungsthiol immobilisiert, um eine geschlossene Monoschicht auf der Elektrode sicher zu stellen.

Die Sequenz der DNA wurde in Anlehnung an für Ladungstransfer genutzte Stränge gewählt sowie um sicherzustellen, dass die Redoxsonde nicht in direkte Wechselwirkung mit der Elektrode treten kann, auf 20 Basenpaare festgelegt. Damit weisen Sonde und Elektrode im hybridisierten Zustand einen Abstand von ca. 7 nm auf. Der Verdacht einer Störung der optischen Aktivierung photolabiler Verbindungen in der Nähe von Goldoberflächen, die ihrerseits ebenfalls UV-Strahlen absorbieren, konnte bereits durch andere Arbeiten ausgeräumt werden.^[86] Da große Strukturen wie Oligonukleotide beim Immobilisieren auf Goldoberflächen wegen sterischer Abstoßung untereinander keine geschlossenen Monoschichten bilden, wurde neben den Strängen ein zusätzliches Verdünnungsthiol immobilisiert. Entsprechend dem C6-Linker der Disulfidmodifikation wurde Mercaptohexanol gewählt, um eine geschlossene Monoschicht zu gewährleisten.

3.1.7 Elektrochemische Untersuchung von DNA

Die elektrochemischen Untersuchungen der hergestellten Oligonukleotide wurden von Sebastian Schneider aus der Arbeitsgruppe von Prof. Terfort durchgeführt. Für kleine Moleküle ist bekannt, dass ihre Disulfide beim Kontakt mit Gold gespalten werden.^[87] Daher wurde zunächst eine Immobilisierung von Disulfid-DNA versucht. Bei großen Molekülen wie Oligonukleotiden scheint diese Spaltung jedoch nicht statt zu finden. Folglich mussten die Disulfide vor der Immobilisierung mit einem Reduktionsmittel gespalten werden. Die Wahl fiel auf Tris-(2-carboxyethyl)phosphin

(TCEP), ein hochselektives Reduktionsmittel für Disulfide, das diese in Gegenwart von Wasser zu den Thiolen reduziert und dabei selbst zum Oxid reagiert. TCEP besitzt gegenüber anderen häufig eingesetzten Reduktionsmitteln den Vorteil, dass die Reduktion irreversibel sowie über einen größeren pH Bereich abläuft und das Reagenz eine höhere Stabilität gegenüber Oxidation an Luft aufweist. Nach der Spaltung und Immobilisierung auf einer Goldoberfläche konnten über Cyclovoltammetrie (CV) und Square Wave Voltammetrie (SWV) ein geringes Signal für die perfekt gepaarte Doppelhelix gemessen werden. Die DNA mit Fehlpaarungen zeigte keinerlei Signal. Die geringe Signalthöhe im Fall der Ladungsübertragung erschwerte eine verlässliche und reproduzierbare Messung des Stromflusses. Nach weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Berechnung der Konzentration der Fc-DNA-Konjugate einen relativ großen Fehler durch einen falschen Extinktionskoeffizienten für Ferrocen enthielt. Nach einer Korrektur der Konzentrationsberechnung,^[88] wurde ein deutliches Signal erhalten und der prinzipielle Nachweis, dass gepaarte DNA Ladungstransport unterstützt sowie Fehlpaarungen und damit Störungen im Basenstapel den Ladungstransport unterbinden, konnte wiederholt beobachtet werden (Abb. 40, a). Die Untersuchung von Proben mit photolabilen Schutzgruppen zeigte jedoch nicht das gewünschte Verhalten. Die immobilisierten Proben wurden auf der Oberfläche belichtet, zeigten vor UV-Bestrahlung ein geringes Anfangssignal für die Redoxreaktion, welches bei Belichtung jedoch vollständig verschwand und ein neues, nicht zu ordnendes Signal gemessen wurde (Abb. 40, b). Das neue Signal konnte reproduzierbar auch bei Proben ohne photolabile Modifikationen durch Belichtung von DNA auf der Goldoberfläche erzeugt werden (Abb. 40, c). Die Belichtung auf der Oberfläche induziert folglich eine Nebenreaktion. Gleichzeitig konnte in der Messung der lichtaktivierbaren Probe kein Anstieg sondern eine Abnahme im Redoxsignal beobachtet werden. Um auszuschließen, dass sowohl die beobachtete Nebenreaktion bei der Belichtung als auch der fehlende Effekt im Redoxverhalten der lichtaktivierbaren Proben auf die gewählte Redoxsonde Ferrocen zurückzuführen waren, wurde als zusätzliche Sonde Methylenblau (MB) untersucht. Von MB ist bekannt, dass es im Vergleich zu Fc eine deutlich höhere elektrochemische Stabilität besitzt.^[89] Diese Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse aus den Fc-DNA-Messungen: während gepaarte DNA deutliche Redoxsignale lieferte, fand bei Fehlpaarungen ein deutlich reduzierter Stromfluss statt. Werden die Proben auf der Oberfläche belichtet, entsteht ein neues, unidentifiziertes Signal und Oligonukleotide mit photolabilen Schutzgruppen zeigten im Verlauf der UV-Bestrahlung ausschließlich dieses neue Signal und keinen Stromfluss im Spannungsbereich der gewünschten Redoxreaktion. Nachdem die Belichtung bei 365 nm auf Goldoberflächen eine Nebenreaktion auslöste, wurden in einem weiteren Versuch Proben mit photolabilen Schutzgruppen vor dem Immobilisieren in Lösung belichtet. Bei diesen Proben konnte so gut wie kein Unterschied zwischen

belichteten und unbelichteten Proben festgestellt werden (Abb. 40, d). In beiden Fällen wurde ein geringes Signal für die Redoxreaktion von Fc oder MB erhalten.

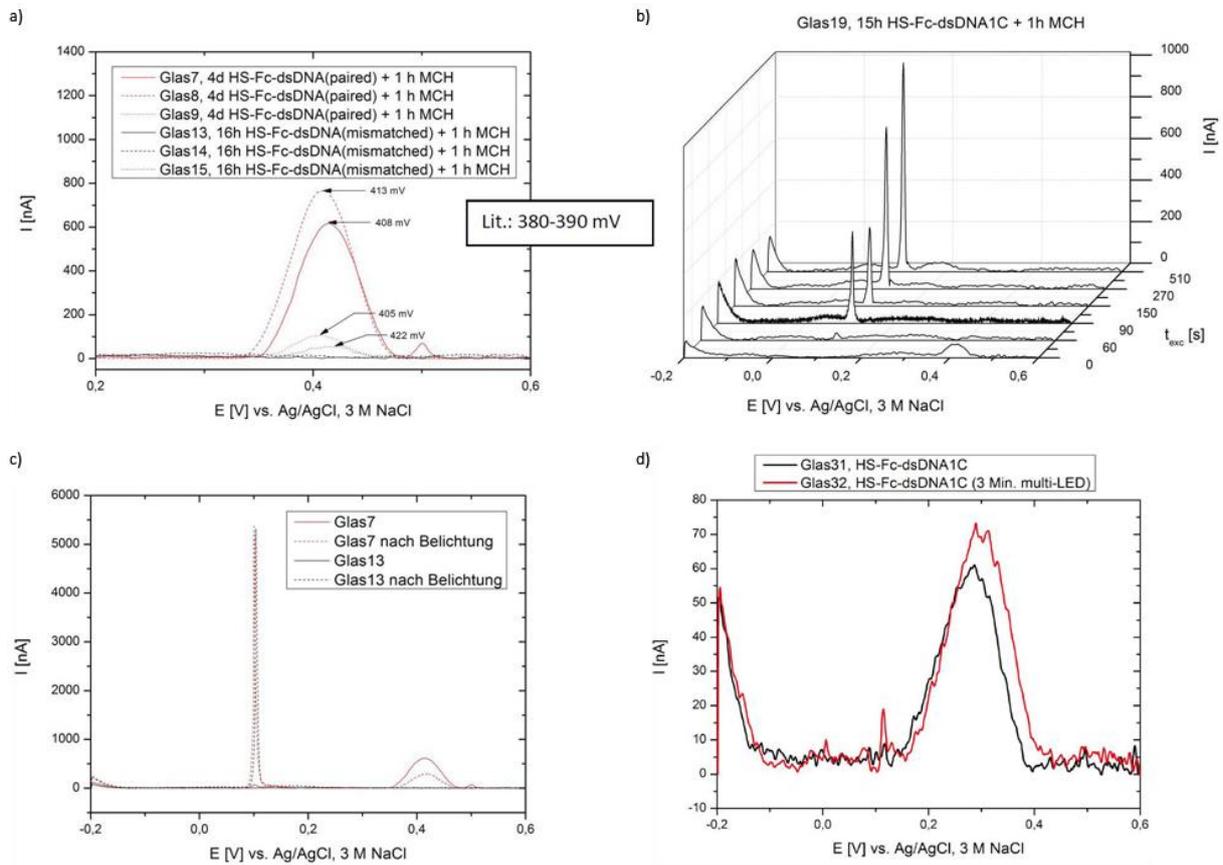


Abb. 40: Übersicht über Messungen von Ferrocen-DNA-Konjugaten immobilisiert auf Goldelektroden. Alle elektrochemischen Messungen für Fc- und MB-DNA-Proben sind nochmals im Anhang 5.2 hinterlegt. a) Der prinzipielle Nachweis, das gepaarte DNA Stromfluss zulässt, hingegen Fehlpaarungen den Stromfluss deutlich reduzieren, gelang mit diesem Messaufbau. b) Die Aktivierung von DNA-Strängen, die photolabile Schutzgruppen trug, schlug jedoch fehl. Das anfänglich vorhandene, geringe Signal von Fc bei 0,4 V, verschwindet bei Belichtung und ein neues Signal tritt auf. c) Dieses neue Signal wird auch beobachtet, wenn Proben ohne photolabile Schutzgruppen auf der Goldoberfläche belichtet werden. Die beobachtete Nebenreaktion konnte nicht identifiziert werden. d) Vergleich von DNA Proben mit einer photolabilen Schutzgruppe, die einmal ohne Belichtung immobilisiert wurden und einmal im Vorfeld in Lösung belichtet wurden. Die Proben zeigen keinen Unterschied. (Bilder wurden aufgenommen und erstellt von Sebastian Scheider, Arbeitsgruppe von Prof. Terfort)

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die genutzte Strategie von bis zu zwei photolabilen Schutzgruppen verteilt auf 20 Basen nicht zu der gewünschten Störung in der DNA führten und daher den Stromfluss nicht unterdrücken konnten. Ebenso kann die geringe Signalthöhe wie in den ersten Experimenten auf Probleme bei der Konzentrationsbestimmung der verschiedenen Stränge

hindeuten. Daher wurde ein weiterer DNA-Strang hergestellt, der eine ausgeprägte Störung enthalten sollte. Als Redoxsonde wurde MB gewählt und der Strang enthielt vor dieser Gruppe eine Abfolge von vier Nucleobasen mit photolabilen Schutzgruppen. Auch bei diesen Messungen wurden zum einen nur sehr geringe Signale detektiert und zum anderen konnte kein Unterschied durch Belichtung festgestellt werden. Daher wurde die Methode zur Konzentrationsbestimmung der DNA-Stränge nochmals untersucht. Auf Grundlage der bisherigen Konzentrationsbestimmungen von Oligonucleotiden wurden Konzentrationsreihen erstellt, in denen der Anteil des Gegenstrangs und damit einer möglichen Doppelstrangbildung von 10 % auf 200 % gesteigert wurde. Die Lösungen wurden zu Doppelsträngen hybridisiert und per HPLC untersucht (Abb. 41).

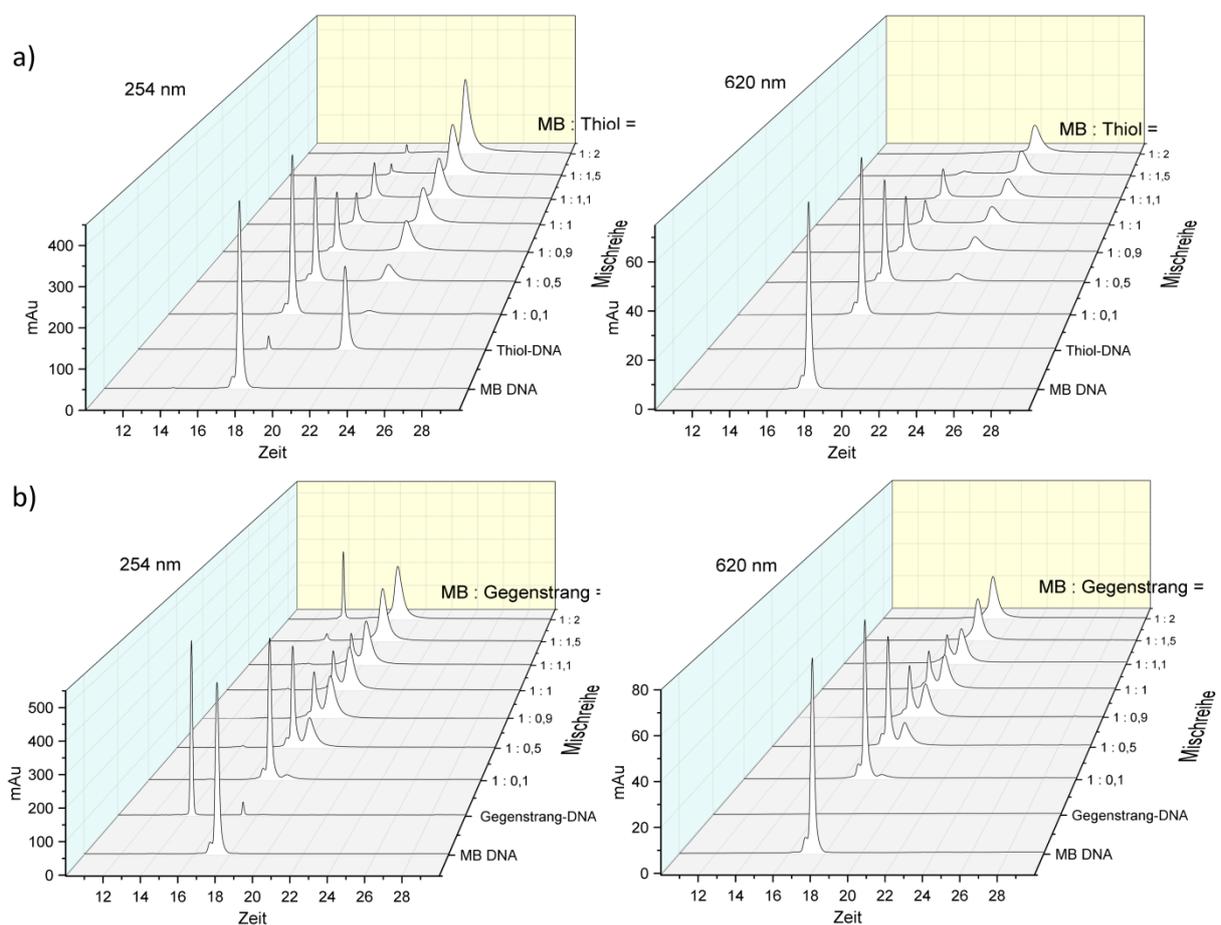


Abb. 41: HPLC Untersuchungen von der Hybridisierung von DNA-Strängen. In beiden Experimenten wurde DNA, die mit Methylenblau modifiziert war, mit einem Gegenstrang, dessen Menge nach der herkömmlichen Konzentrationsbestimmung von 10 % auf 200 % gesteigert wurde, hybridisiert (z-Achse, erste zwei Spuren zeigen die Einzelstränge, danach Verhältnis beider Stränge). Zur Auswertung wurden die Wellenlängen für DNA (254 nm) und MB (620 nm) betrachtet. a) Als Gegenstrang wurde DNA genutzt, die am 5'-Ende eine unpolare Modifikation trug (Thiol-DNA). b) Der Gegenstrang war ein unmodifizierter DNA-Strang (Gegenstrang-DNA).

Die Messungen zeigten, dass sich ein neuer Peak für den Doppelstrang bildete und dieser unter den genutzten HPLC Bedingungen stabil blieb. Die Retentionszeit des Doppelstrangs wurde im Fall des Gegenstrangs mit unpolarer 5'-Modifikation von dessen Laufverhalten geprägt. Der Doppelstrang bildete sich als neuer breiter Peak bei der Retentionszeit des Gegenstrangs. Bei unmodifiziertem Komplementärstrang zeigte der Doppelstrang ein leicht unpolares Verhalten als die beiden Einzelstränge. Gleichzeitig ist zu erkennen, dass bei einer vermeintlichen 1:1 Konzentration der beiden Stränge immer noch einzelsträngige MB-DNA vorhanden war. Erst bei einem Überschuss von knapp 50 % des Gegenstrangs war dieser vollständig hybridisiert. Bei Gegensträngen mit photolabilen Schutzgruppen war die Abweichung noch deutlicher zu beobachten, da die Konzentrationsbestimmung durch die photolabilen Schutzgruppen und deren Absorptionseigenschaften eine noch größere Fehlerquelle enthielt.

Die Bestimmung der Leitfähigkeit entlang der DNA mit Hilfe der elektrochemischen Messungen zeigte eine große Fehlerquelle im Rahmen der Konzentrationsbestimmungen der Oligonukleotide auf. Zusätzlich scheint die Strategie von photolabilen Schutzgruppen innerhalb des Basenstapels nicht zu den gewünschten Störungen in den π - π -Wechselwirkungen des Oligonukleotids zu führen.

3.1.8 Zusammenfassung und Ausblick

Die Kontrolle der Leitfähigkeit entlang von Oligonukleotiden durch den Einbau von photolabilen Verbindungen, die den Basenstapel temporär stören sollten, konnte im Rahmen der Dissertation nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz konnten wichtige Erkenntnisse für eine Fortführung des Projekts gesammelt werden.

Nach intensiven Untersuchungen konnten die Systeme mit optischem Nachweis für den Ladungstransport als schwer reproduzierbare und teils auch unglaubwürdige Varianten zum Nachweis von Leitfähigkeit verworfen werden. Stattdessen gelang der grundsätzliche Nachweis, dass Störungen im Basenstapel die Leitfähigkeit im Vergleich zu perfekt hybridisierten Doppelsträngen unterbinden mit Hilfe von elektrochemischen Methoden. Ein System, das photochemisch von einem Zustand des gestörten DNA Basenstapels in einen Zustand mit kontinuierlicher π - π -Wechselwirkung entlang der DNA überführt werden kann, kann mit Hilfe dieser Methode somit erfolgreich vermessen werden.

Die Methode von photolabilen Schutzgruppen an den Nucleobasen und einer damit verbundenen Störung der Watson-Crick-Basenpaarung zeigte nicht den gewünschten Effekt. Die Störung reichte scheinbar nicht aus, um die Ladungsübertragung effektiv zu unterbinden. Daher könnten andere Ansätze verfolgt werden, die einen größeren Einfluss auf die Struktur der DNA haben. Möglich wäre beispielsweise der Einbau von Photoschaltern (Abb. 42 a)^[90] oder eine neue Strategie von photolabilen Schutzgruppen, die deutliche Strukturverzerrungen der DNA durch kovalente Verknüpfung zweier Punkte im Phosphatrückgrat bewirkt (Abb. 42 b).

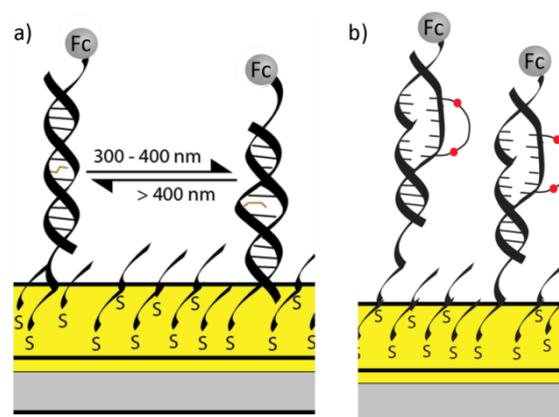


Abb. 42: Möglichkeiten wie durch lichtaktivierbare Verbindungen größerer Störungen im Basenstapel der DNA erzeugt werden können. a) Eine Möglichkeit wäre der Einbau von Photoschaltern wie Azobenzolen, die optisch zwischen cis- und trans-Zustand geschaltet werden können. Die Azobenzole ersetzen ein Basenpaar. Im cis-Zustand interkalieren sie in den Doppelstrang, während sie sich im trans-Zustand aus der Helix heraus drehen. Damit soll eine Fehlpaarung simuliert und die π - π -Wechselwirkungen des Basenstapels unterbrochen werden.^[90] b) Alternativ kann eine Störung der DNA-Struktur durch Schutzgruppen erzeugt werden, die Oligonukleotide in eine zyklische Struktur zwingen. Die damit einhergehende Störung der DNA ist wesentlich größer als sie von Schutzgruppen an Oligonukleotiden bewirkt wird.^[91] Eine entsprechende neue Methode, mit der zwei Alkin-modifizierte Oligonukleotide über Click-Chemie mit einem photolabilen Linker verknüpft werden können und damit einen Teil des Oligonukleotids in eine zyklische Struktur zwingen, befindet sich in der Arbeitsgruppe von Prof. Heckel in Entwicklung.

Zusätzlich stellte sich heraus, dass die elektrochemischen Messungen sehr empfindlich auf fehlerhafte Stöchiometrien bei der Doppelstranghybridisierung reagieren. Im Rahmen von Konzentrationsreihen muss für das verwendete System über HPLC Experimente ermittelt werden, wann eine tatsächliche 1:1 Mischung der Einzelstränge vorliegt.

Ebenso konnte eine Nebenreaktion bei Belichtung mit 365 nm beobachtet werden. Hier sollte untersucht werden, bei welchen Wellenlängen diese Reaktion auftritt, da alternative photolabile Verbindungen auch bei höheren Wellenlängen gespalten werden können.

3.2 Zwei-Photonen aktivierbare Aminosäure

3.2.1 Vorarbeiten und Ziele

Moderne chemische Biologie versucht, eine möglichst optimale Kontrolle von Proteinwechselwirkungen zu erreichen, um damit zelluläre Prozesse aufschlüsseln zu können. Dabei hat sich der Einsatz von lichtaktivierbaren Verbindungen weit verbreitet, da Licht als externer Stimulus bei entsprechender Wellenlänge mit den meisten Zellen sowie mit Modellorganismen wie Zebrafischen kompatibel ist. Mit Hilfe lichtspaltbarer Aminosäuren wurde im Vorfeld dieser Arbeit ein System entwickelt, das die Affinität zwischen zwei Biomolekülen optisch kontrollierte. Auf diesem Konzept bauten die Arbeiten dieses Projekts auf.

Durch den Einbau einer photolabilen Aminosäure konnte die Wechselwirkung zwischen trisNTA und einem His-tag (*tag* engl. für Markierung) an einem Zielprotein (POI, *protein of interest*) von 0 zu nanomolarer Affinität geschaltet werden. Dazu wurde ein Peptid hergestellt, das neben dem trisNTA Rest zusätzlich einen poly-Histidin Abschnitt enthielt. Eine intramolekulare Wechselwirkung blockierte das trisNTA vor Wechselwirkungen mit anderen His-tags. Der Einbau einer photolabilen Aminosäure (**32**, Abb. 20) innerhalb der Peptidsequenz ermöglichte durch Belichtung eine Spaltung des Peptids und damit die Transformation der intramolekularen Wechselwirkung zu einer intermolekularen Interaktion, die nun mit anderen intermolekularen Wechselwirkungen konkurrieren musste. Ein Zielmolekül konnte mit seinem His-tag das Peptidfragment verdrängen und damit unter Lichtregulation binden.^[92] Dieses System wurde anschließend optimiert, in dem die Peptidsequenz optimiert und die Position sowie die Anzahl der photolabilen Aminosäuren angepasst wurde (Abb. 43).^[93]

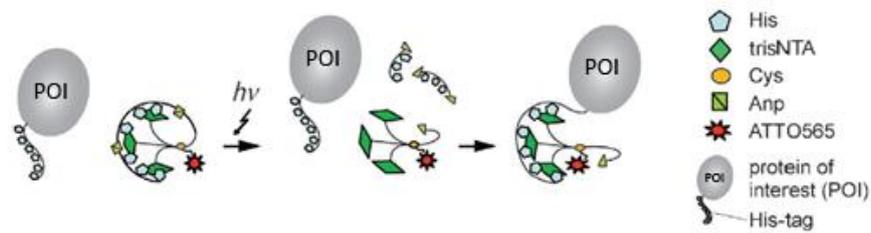


Abb. 43: Die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen konnte durch photolabile Aminosäuren (Anp, [32](#), [Abb. 20](#)) kontrolliert werden. Anfänglich wurde der trisNTA Ligand durch eine intramolekulare Wechselwirkung zu einem Poly-His-Abschnitt im gleichen Peptid inhibiert. Belichtung spaltete diesen His-Abschnitt und erlaubte einer intermolekularen Wechselwirkung, die Peptidfragmente zu verdrängen. Die Modifikation des trisNTA Peptids mit einem Farbstoff ermöglichte ein Zielprotein nach optischer Aktivierung zu markieren. (entnommen aus Labòria et al.)^[93]

Die Entwicklung einer neuen photolabilen Aminosäure zur Kontrolle dieser trisNTA His-tag Wechselwirkung mit höherer räumlicher Auflösung sowie der Möglichkeit einer selektiven Aktivierung gegenüber der bisher genutzten Aminosäure waren die Grundidee dieses Projekts. Beide Ziele könnten durch den Einbau einer Aminosäure erreicht werden, die mit Hilfe von Zwei-Photonen-Anregung aktiviert werden kann. Mit dieser Verbindung sollte eine dreidimensionale Kontrolle von Protein-Protein Wechselwirkungen und der Bildung von Proteinansammlungen (Clustern) innerhalb von Zellmembranen ausgeübt werden ([Abb. 44](#)).^[94] Proteincluster sind wesentlicher Bestandteil zellulärer Kommunikation, wodurch eine Kontrolle über ihre Entstehung zur Regulation verschiedenster Prozesse genutzt werden könnte.

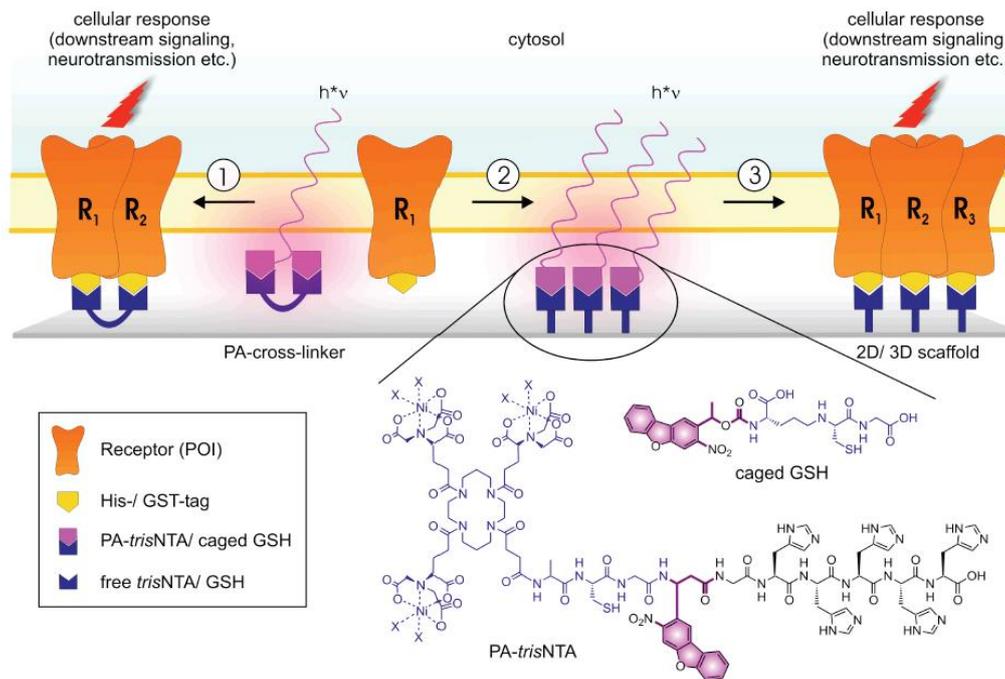


Abb. 44: Geplante Ziele bei der Anwendung der neuen lichtaktivierbaren Verbindung. Eine Zwei-Photonen spaltbare Aminosäure (hier Nitrodibenzofuran, NDBF) soll die trisNTA His-tag Wechselwirkungen über die mögliche Schaltung von einer intra- zu einer intermolekularen Interaktion kontrollieren. Die neue Technik soll mit hoher dreidimensionaler Auflösung die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und trisNTA aktivieren, wodurch eine lokale Aggregatbildung mit Zielrezeptoren in der Membran möglich sein soll. Die Zielrezeptoren müssen dazu His-tag modifiziert sein, wodurch sie an auf diesem Weg aktivierte trisNTAs binden können. (entnommen aus Research Report CEF, Wieneke et. al.)^[94]

Zu Beginn dieser Arbeit existierte bereits eine Veröffentlichung, die behauptet eine neue Zwei-Photonen spaltbare Aminosäure hergestellt zu haben. Jedoch wurde in dieser Studie die bereits erwähnte *o*-Nitroveratryl Gruppe (**33**, Abb. 20) genutzt. Die berichteten Daten von 0,23 GM^[95] widersprechen den Resultaten, die andere Forscher für diese Schutzgruppe mit 0,02 GM bestimmt hatten.^[96] Für den deutlich erhöhten Wert wurde keine Begründung geliefert. Zu einem späteren Zeitpunkt berichtete eine weitere Gruppe ähnliche Daten durch den Einbau von *o*-Nitroveratryl in Hydrogelen.^[97] Auch hier wurde keine Erklärung für die abweichenden optischen Eigenschaften geliefert. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die Schutzgruppe in beiden Fällen nicht photochemisch sondern thermisch aktiviert wurde. Bei Zwei-Photonen-Bestrahlung entsteht durch die verwendeten Laser-Intensitäten eine lokal hohe Temperatur und in beiden Spaltungsreaktionen musste zusätzlich Wasser abgespalten werden. Aus dieser Überlegung heraus wurde ein Einsatz der *o*-Nitroveratryl Gruppe als Zwei-Photonen aktivierbare Verbindung verworfen.

Allgemein existierten zum Beginn dieses Projekts sieben Klassen an photolabilen Verbindungen, die einen ausreichend großen Zwei-Photonen-Einfangquerschnitt für Belichtung im IR-Bereich und den

Einsatz in biologischen Systemen aufweisen. Neben bestimmten Cumarinderivaten^[98] waren für den Dinitroaromaten 4-Carboxymethoxy-5,7-dinitroindoliny],^[99] verschiedene Donor-Akzeptor substituierte Biphenylderivate,^[100] bestimmte Metallkomplexe,^[101] Nitrodibenzofuran,^[77] Brom-Hydroxyquinolin^[102] und *o*-Hydroxycinnamat^[103] entsprechende Eigenschaften bekannt (Abb. 45). Auf Grund von Erfahrungen der Arbeitsgruppe von Prof. Heckel mit Cumarinen^[104] und Nitrodibenzofuran^[105] wurden auf Grundlage dieser beiden Moleküle Synthesen zu neuen, vermutlich mit Zwei-Photonen spaltbaren Aminosäuren geplant.

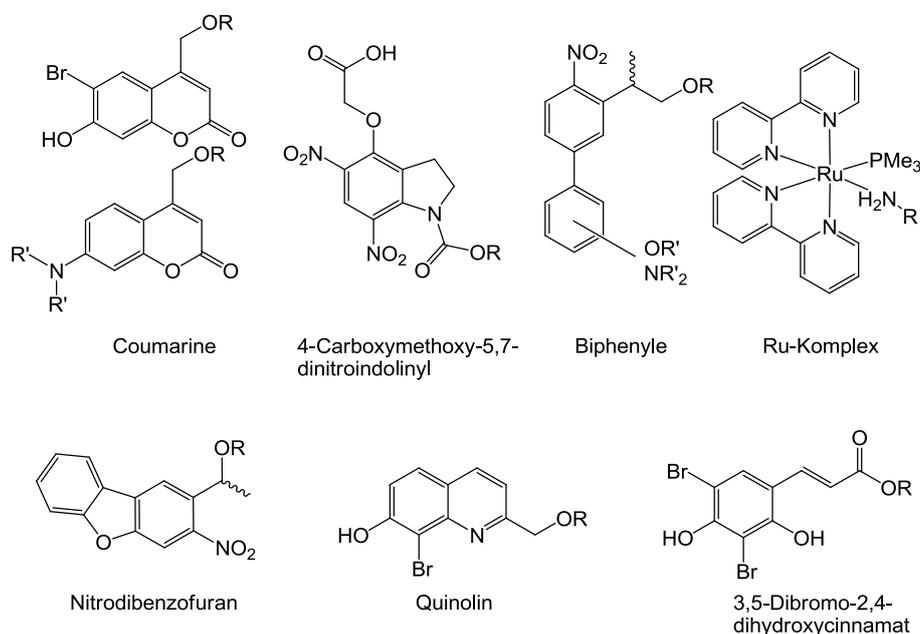


Abb. 45: Ein ausreichend hoher Zwei-Photonen-Einfangquerschnitt für biologische Anwendungen war zu Beginn dieses Projekts für die abgebildeten Verbindungen bzw. Stoffklassen bekannt. Mit R ist in allen Fällen der Rest am Heteroatom der Abgangsgruppe der Verbindung markiert.^[77,98-103]

3.2.2 Synthese einer Zwei-Photonen spaltbaren Aminosäure auf NDBF-Basis

Als erstes Zielmolekül wurde auf Basis des NDBF-Gerüsts entsprechend der bisher genutzten Ein-Photonen spaltbaren Aminosäure **32** (Abb. 20) eine β -Aminosäure konstruiert und anschließend retrosynthetisch analysiert (Abb. 46). Die Herstellung des NDBF-Kerns sollte in Analogie zu einer bekannten Vorschrift in zwei Stufen über eine Ullmann- und eine anschließende Heck-Kupplung erfolgen.^[106] Vor dem Ringschluss sollte die Aminosäureseitenkette am Nitroaromaten aufgebaut werden. Das Amin sollte über reduktive Aminierung eines 1,3-Diketons hergestellt werden, das nach

einer bekannten Vorschrift aus der Reaktion von Meldrumsäure mit einem Säurechlorid gebildet werden sollte.^[107] Das Säurechlorid sollte mit Hilfe von Thionylchlorid aus der kommerziell verfügbaren Carbonsäure als Startmaterial der Synthese hergestellt werden.

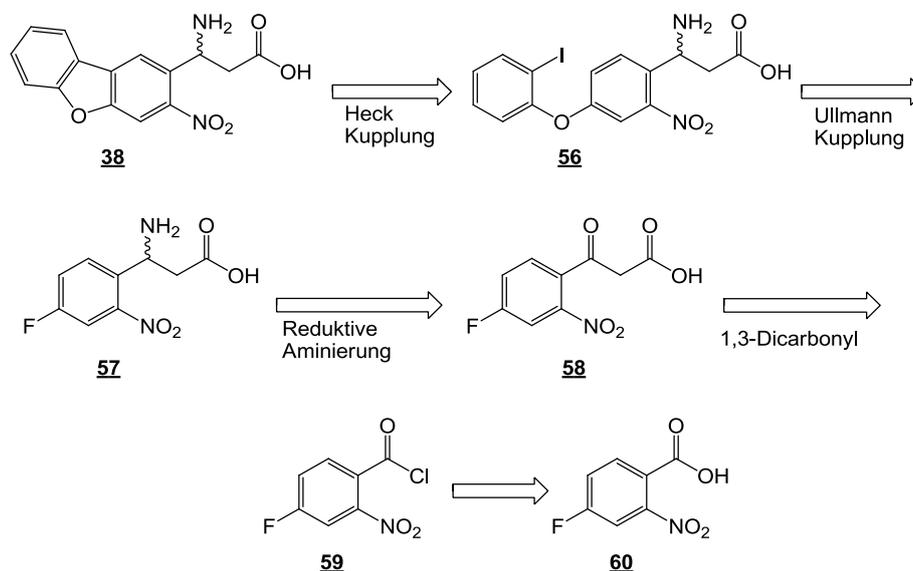


Abb. 46: Erste retrosynthetische Überlegung für die Synthese der gewünschten NDBF-Aminosäure **38**.

Die Umsetzung der Carbonsäure zum Säurechlorid gelang in guten Ausbeuten, doch schon die zweite Stufe, die Umsetzung mit Meldrumsäure (Abb. 47), ergab nicht das gewünschte Produkt. Die Herstellung des Anhydrids an Stelle des Säurechlorids und erneute Umsetzung mit dem Natriumsalz der Meldrumsäure zeigte wiederholt nicht das gewünschte Ergebnis.

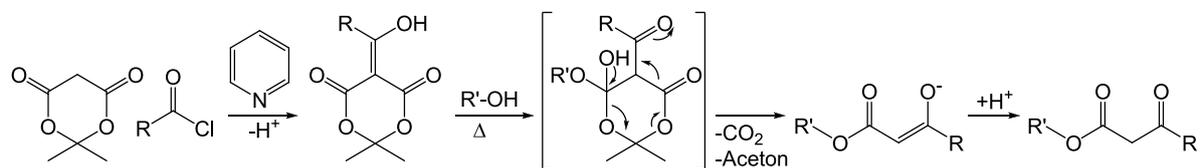


Abb. 47: Mechanismus der Umsetzung von Meldrumsäure mit einem Säurechlorid. Die Reaktion mit dem Anhydrid an Stelle des Säurechlorids folgt dem gleichen Reaktionsmechanismus. Beide Reaktionen zeigten in den Fällen mit R = Nitroaromat keine Umsetzung zum gewünschten Produkt.

Die Darstellung des 1,3-Diketons konnte alternativ durch die Umsetzung des Säurechlorids mit Essigsäuremethylester, der im Vorfeld mittels Lithium-Chemie deprotoniert wurde, erfolgreich

durchgeführt werden. Der Versuch der reduktiven Aminierung resultierte jedoch in einer Vielzahl an Produkten, weshalb die gewünschte Zielverbindung nicht identifiziert werden konnte (Abb. 48).

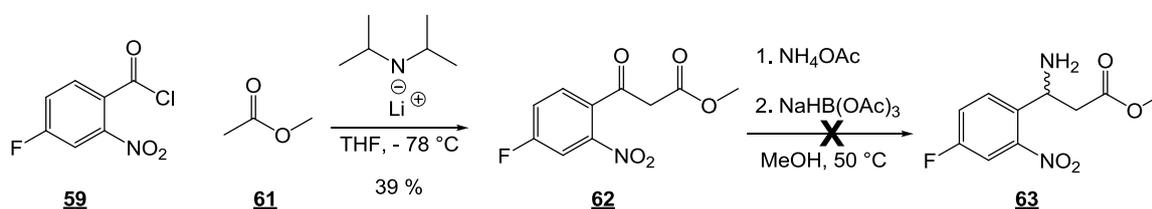


Abb. 48: Nachdem die Reaktion zum 1,3-Diketon mit Hilfe von Meldrumsäure nicht funktioniert hat, konnte das Produkt mit Hilfe von Organo-Lithium Chemie synthetisiert werden. Die anschließende reduktive Aminierung gelang jedoch nicht.

Alternativ wurde daher eine neue Variante zum Aufbau der Aminosäureseitenkette versucht. An Stelle der Carbonsäure wurde der ebenso kommerziell erhältliche Aldehyd erworben und in einer Drei-Komponenten-Mannich-Reaktion mit Malonsäure und Ammoniumacetat umgesetzt. Diese Vorschrift gehört zu einer bekannten Variante um β -Aminosäuren aufzubauen.^[108,109] Das gewünschte Produkt konnte isoliert und anschließend an den Seitenketten geschützt werden (Abb. 49).

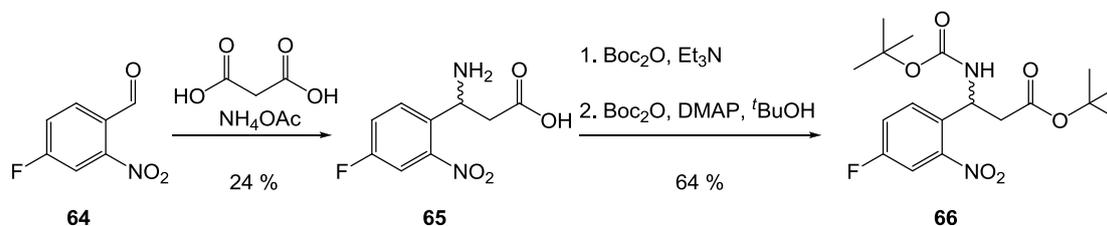


Abb. 49: Nachdem der ursprüngliche Synthesepfad zum Aufbau der Aminosäureseitenkette fehlschlug, wurde alternativ die Drei-Komponenten-Mannich-Reaktion genutzt. Die Seitenkette wurde anschließend mit Schutzgruppen modifiziert, bevor Versuche zum Aufbau des NDBF-Ringsystems durchgeführt wurden.

Entsprechend dem ursprünglichen Plan sollte nun der Aufbau des NDBF-Rings erfolgen, doch konnte keine Methode gefunden werden, nach der die Ullmann-Reaktion mit dem hergestellten Startmaterial ablief. Da in der publizierten Vorschrift eine erfolgreiche Kupplung mit dem Aldehyd erreicht werden konnte, wurde der Synthesepfad umgestellt, dass zuerst der NDBF-Kern hergestellt und anschließend die Seitenkette aufgebaut werden sollte. Ziel war somit ein NDBF-Aldehyd (Abb. 50). Entsprechend der publizierten Vorschrift konnte die Ullmann-Kupplung mit 4-Fluoro-2-

nitro-benzaldehyd und 2-Iodphenol erfolgreich durchgeführt werden.^[106] Der Ringschluss über eine Heck-Kupplung, war in Gegenwart des Aldehyds nicht zu erreichen. Vermutlich koordinierte der Aldehyd an den Katalysator, wodurch die Reaktion blockiert wurde. Daher wurde der Aldehyd mit Hilfe von Glycol als Acetal geschützt. Die anschließende Heck-Kupplung lief nach Zusatz einer geringen Menge Wasser, die vermutlich die Löslichkeit der als Salz zugesetzten Base erhöhte, erfolgreich ab. Der Verlauf dieser Reaktion konnte unter verschiedenen getesteten Bedingungen nicht mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt werden. Edukt und Produkt zeigten identische Wechselwirkungen mit der festen Phase. Daher wurde der Reaktionsfortschritt mittels NMR kontrolliert. Nachdem die Reaktion für zehn Tage unter Rückfluss zum Sieden erhitzt wurde, entstand das gewünschte Produkt in quantitativer Ausbeute. Das Acetal wurde unter sauren Bedingungen entschützt. Die Ausbeute dieser Reaktion betrug nur 63 % an sauberem Produkt, da die Entschützung als Gleichgewichtsreaktion ablief. Die restlichen 37 % wurden als Mischung von Produkt und Edukt isoliert. Über vier Stufen konnte somit der NDBF-Aldehyd erfolgreich hergestellt werden (Abb. 50).

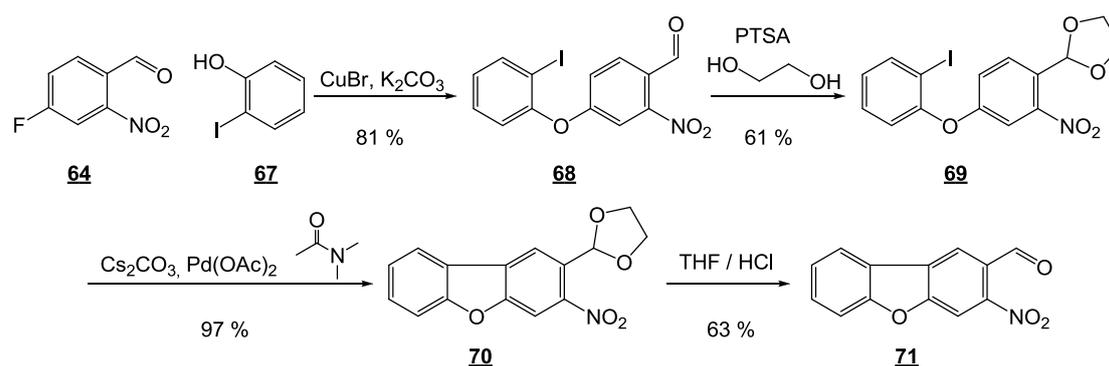


Abb. 50: Die Reihenfolge der Synthese wurde von - erst die Seitenkette, dann NDBF - zu - erst NDBF dann die Seitenkette - umgestellt. Das NDBF-Gerüst konnte in vier Stufen erfolgreich hergestellt werden.

Der Aldehyd wurde anschließend nach der oben schon genutzten Variante zum Aufbau von β -Aminosäuren umgesetzt (Abb. 49). Es stellte sich heraus, dass die Drei-Komponentenreaktion, die im Fall des 4-Fluoro-2-nitro-benzaldehyd funktionierte, mit NDBF-Aldehyd nicht wie geplant ablief. Falls sich das Produkt gebildet hat, konnte es weder sauber isoliert, noch charakterisiert werden. Versuche der Reinigung der Reaktion führten zu einem Farbumschlag von farblosen Lösungen bzw. weißen Feststoffen zu schwarzen Lösungen bzw. grauen Feststoffen, die in der Analytik eindeutig nicht das gewünschte Produkt enthielten. Als Alternative wurde daher eine schrittweise Reaktion des Aldehyds über ein stabiles Imin hin zur Aminosäure versucht. Ein stabiles, isolierbares Imin ist zum

Beispiel das *p*-Methoxyphenyl geschützte Imin **72** (Abb. 51), das erfolgreich durch die Umsetzung des Aldehyds mit 4-Methoxyanilin hergestellt werden konnte.

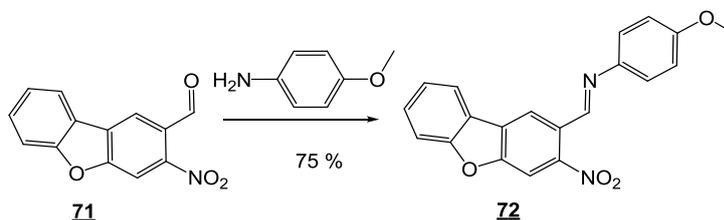


Abb. 51: Herstellung eines stabilen, isolierbaren Imins als Zwischenprodukt bei der Umsetzung zur β -Aminosäure.

Sowohl das hergestellte Imin als auch der Aldehyd wurden anschließend einer Folge an Testreaktionen mit verschiedenen Metallen unterzogen, um *tert*-Butylbromoacetat als Nucleophil an das Imin bzw. den Aldehyden angreifen zu lassen (Abb. 52).

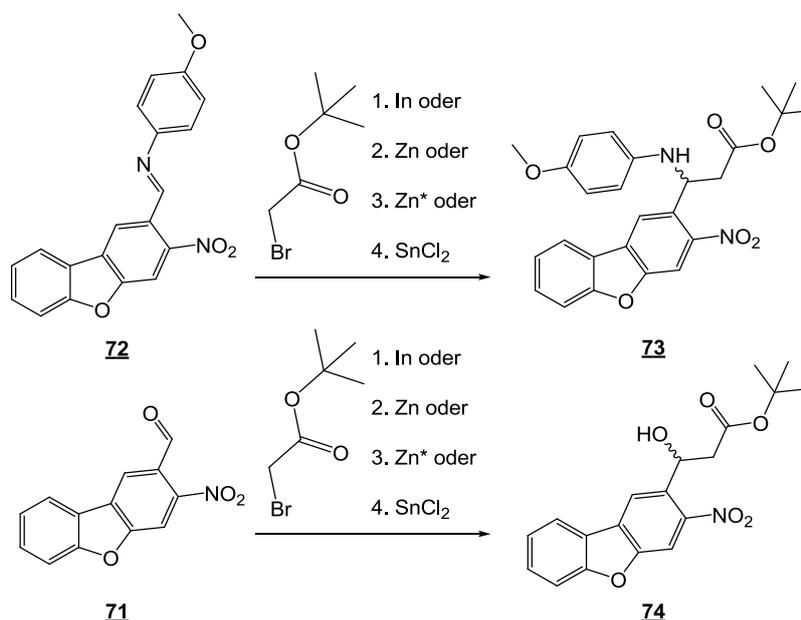


Abb. 52: Verschiedene Testreaktionen um die Seitenkette am NDBF aufzubauen. Die Reaktion wurde sowohl mit dem stabilen Imin **72** als auch mit dem Aldehyd **71** versucht. Neben Reformatzki-Bedingungen (Zn) wurde das mildere Metall Indium für den Fall getestet, dass Zink die Nitrogruppe reduzieren sollte sowie aktiviertes Zink (Zn*) und abschließend eine Barbier-Reaktion (SnCl₂).

Das gewünschte Produkt konnte aus der Reaktion mit aktiviertem Zink isoliert werden. Aktiviertes Zink zeichnet sich durch eine sehr große Oberfläche aus und kann durch die Reduktion von

Zinkchlorid mit elementarem Lithium hergestellt werden. Es wird häufig auch nach seinem Entwickler als Rieke-Zink bezeichnet. Für die Herstellung von aktiviertem Zink sind jedoch sehr trockene Bedingungen notwendig, weshalb veröffentlichte Vorschriften meist spezielle Laborausstattung mit geschlossener, wasserfreier Umgebung unter Schutzgas voraussetzen (*Glovebox*).^[110,111,112] Ohne diese Ausstattung konnten lediglich Ausbeuten unter 30 % erzielt werden, die zusätzlich auch noch verunreinigt waren. Aus diesem Grund wurde die Möglichkeit genutzt, aktiviertes Zink sowie ein fertiges Reformatzki-Reagenz kommerziell zu erwerben. Mit dem Reformatzki-Reagenz wurde eine weitere Umsetzung von Imin und Aldehyd durchgeführt, um saubere Produkte (analog zu Abb. 52) zu erhalten und zu charakterisieren. Massenspektrometrisch konnte die erfolgreiche Reaktion sowohl vom Imin als auch vom Aldehyd bestätigt werden, jedoch gelang nur bei der Reaktion des Aldehyds eine saubere und eindeutige NMR-Zuordnung. Daher wurde die Umsetzung des Aldehyds weiter verfolgt und lief sowohl mit dem Reformatzki-Reagenz, als auch bei der Umsetzung des Halogenids mit Rieke-Zink in nahezu quantitativer Ausbeute ab. Der Alkohol sollte nun durch ein Amin substituiert werden, um die fertige Aminosäure zu generieren. Verschiedenste Bedingungen wurden in diesem Zusammenhang getestet, die jedoch nicht zum gewünschten Produkt führten (Abb. 53).

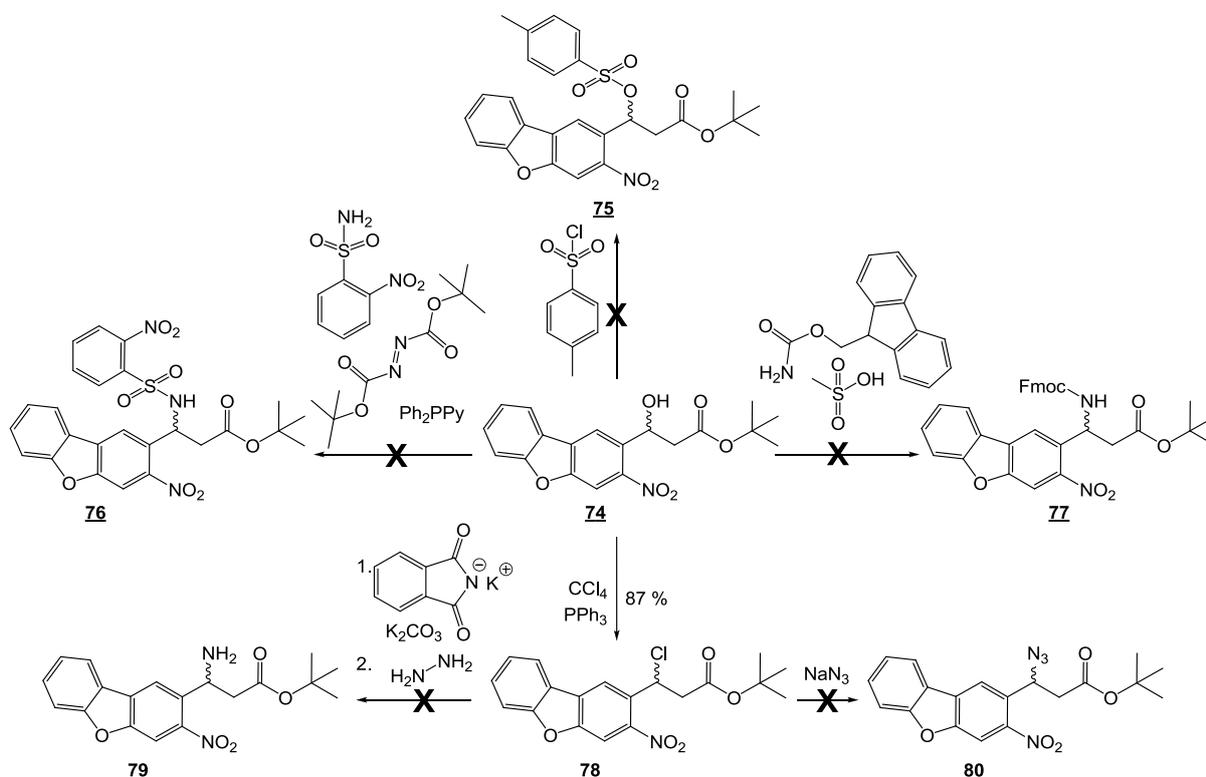


Abb. 53: Auszug aus verschiedenen getesteten Reaktionsbedingungen, um den Alkohol in ein Amin zu überführen. Die Reaktionen waren mit Ausnahme der Appel-Reaktion nicht erfolgreich.

In den Reaktionen wurde überwiegend das eliminierte Produkt erhalten. Weder unter Standard-Substitutionsbedingungen, noch bei abgewandelter, für Amine optimierter Mitsunobu-Reaktion,^[113] konnte das gewünschte Produkt isoliert werden. Selbst die Substitution des über Appel-Reaktion erfolgreich hergestellten Chlorids **78** mit Natriumazid resultierte im eliminierten Produkt. Berechnungen für die Azidität der C_α Protonen mit Hilfe der Software ACD Labs Percepta ergaben keinen nennenswerten pK_a für diese Protonen, weshalb die Stabilität der Verbindung nicht generell angezweifelt werden musste. Aus diesem Grund wurde der Alkohol in der nächsten Reaktion mit Fmoc-Cl geschützt sowie die Carbonsäure entschützt, damit die Verbindung in ersten Versuchen in Form eines Depsipeptids in Peptide eingebaut werden konnte (Abb. 54).

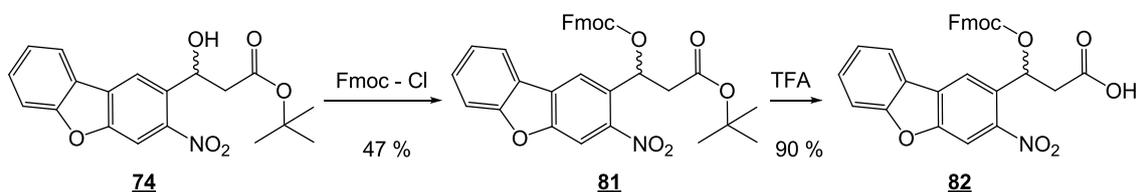


Abb. 54: Herstellung eines NDBF-Bausteins, der in ein Depsipeptid - ein Peptid, das neben Amid- auch Ester-Bindungen im Rückgrat enthält - eingebaut werden sollte.

Dieser Baustein wurde im weiteren Verlauf nochmals verändert, in dem die Alkohol-Funktionalität zum Anknüpfen eines Amins genutzt wurde. Mit Hilfe des Amins sollte eine Kopplung innerhalb der Peptid-Festphasensynthese vereinfacht werden. Die Verknüpfung des Amins über einen Kohlendioxidester konnte durch Reaktion des entsprechenden Alkohols mit Phosgen und anschließender Zugabe von **74** erfolgen (Abb. 55). Die Herstellung eines Carbamats durch direkte Reaktion von **74** mit Phosgen und anschließender Zugabe eines Amins, war dagegen nicht erfolgreich. Neben dieser Anknüpfung des Amins über einen reaktiven Kohlendioxidester wurde zusätzlich eine Kopplung über einen Ester unter Standard-Kupplungsbedingungen durchgeführt (Abb. 55). Aus photochemischer Sicht sollte der Kohlendioxidester bessere Photolyseeigenschaften als die Ester zeigen, da er eine bessere Abgangsgruppe für die Spaltungsreaktion trägt. Auf der anderen Seite sollten die Ester eine größere Hydrolysestabilität aufweisen. Alle dargestellten NDBF-Aminosäuren sowie der Syntheseweg zu diesen sind in Abb. 55 nochmals zusammengefasst.

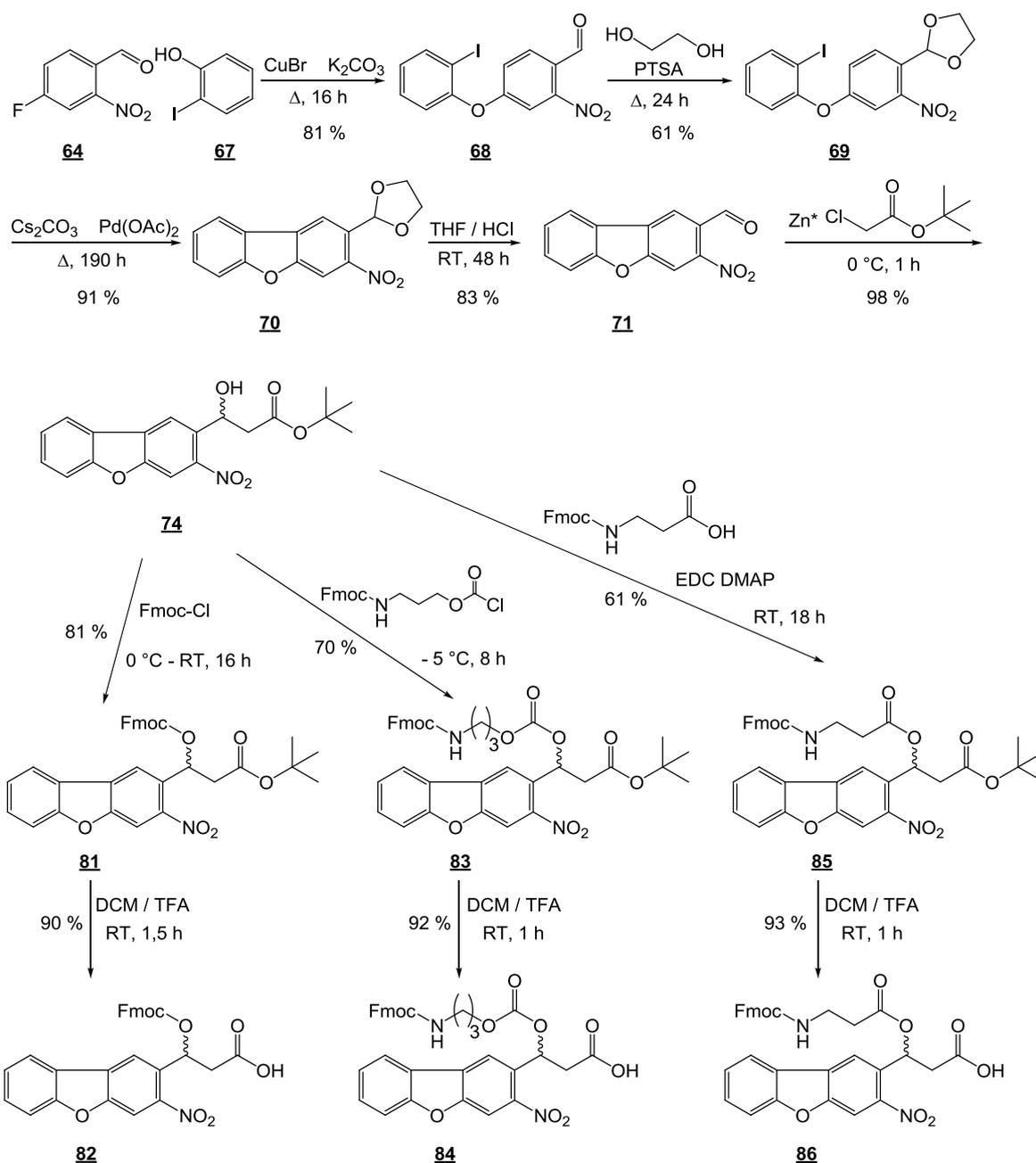


Abb. 55: Übersicht über die Synthesen zu den drei hergestellten NDBF-Bausteinen, die für den Einbau in Peptide hergestellt wurden.

Die dargestellten Verbindungen wurden an Dr. Ralph Wieneke aus der Arbeitsgruppe von Prof. Tampé übergeben, um sie in Peptide einzubauen, die über ein trisNTA und einen His-tag entsprechend Abbildung 44 (PA-trisNTA) verfügen sollten. Gleichzeitig wurde die Synthese einer alternativen Zwei-Photonen spaltbaren Aminosäure auf Grundlage eines Cumarins gestartet.

3.2.3 Synthese einer Zwei-Photonen spaltbaren Aminosäure auf Cumarin-Basis

Ein Cumarin sollte synthetisiert werden, das im Rahmen der Festphasensynthese in Peptide eingebaut und durch Belichtung mit IR-Licht gespalten werden kann. Dabei kamen nur solche Cumarinstrukturen in Betracht, die über eine nachgewiesene Zwei-Photonen-Aktivität verfügen. Dies sind neben 6-Brom-7-hydroxycumarin (Bhc) verschiedene 7-Dialkylaminocumarine. Um einen strukturellen Unterschied zu den NDBF-Derivaten zu gewährleisten, sollten die Amino- und Carboxy-Funktionalität räumlich getrennt am Cumarin verankert sein. Eine der beiden Funktionalitäten kann über einen Sauerstoff an die 4-Methylgruppe der Cumarine gebunden werden. Dies stellt gleichzeitig die Spaltungsstelle bei der Photoreaktion der Cumarine dar. Eine Verknüpfung der zweiten Funktionalität über die Hydroxyfunktion des Bhc ist nicht möglich, da eine Alkylierung dieser Position die Zwei-Photonen-Aktivität des Bhc aufhebt.^[114] Eine Alkylierung von 7-Aminocumarin mit zwei verschiedenen Alkylresten, von denen einer die zweite Funktionalität trägt, entspricht dagegen einem Produkt des gewünschten Musters. Da die Arbeitsgruppe von Prof. Tampé in ersten Versuchen Probleme bei der Wasserlöslichkeit der neu hergestellten Peptide vermutete, wurde für die zweite Gruppe am Amin ein Rest gewählt, der die Wasserlöslichkeit der Verbindung erhöhen sollte. Die damit entworfene Struktur wurde anschließend retrosynthetisch analysiert (Abb. 56).

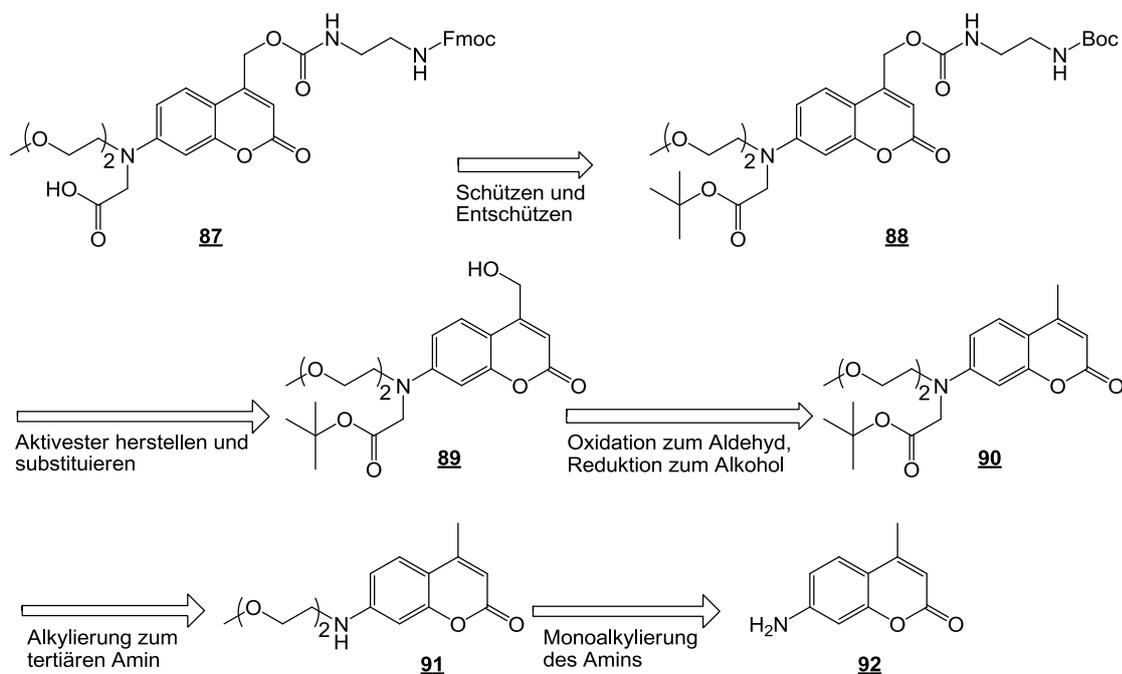


Abb. 56: Retrosynthetische Überlegungen zur Synthese einer Zwei-Photonen spaltbaren Aminosäure auf Cumarin-Basis.

Ausgangsverbindung für die Synthese war das kommerziell erhältliche 7-Amino-4-methylcumarin. Im ersten Schritt wurde eine publizierte Methode für selektive Monoalkylierungen versucht.^[115] Die Reaktion ähnelt einer Mitsunobu-Reaktion, nutzt jedoch 2,3-Dichlor-5,6-dicyanobenzoquinon (DDQ), das von Triphenylphosphin angegriffen wird. Nach zusätzlicher Anlagerung des Alkohols, soll die Substitution durch das Amin stattfinden. Beim Einsatz des Cumarin-Amins, konnte jedoch nicht das gewünschte Produkt hergestellt werden (Abb. 57, a). Ein anschließender Versuch der Monoalkylierung über eine Schutzgruppenstrategie, zersetzte sich nach der gewünschten Alkylierung, als die Schutzgruppe wieder abgespalten werden sollte (Abb. 57, b).

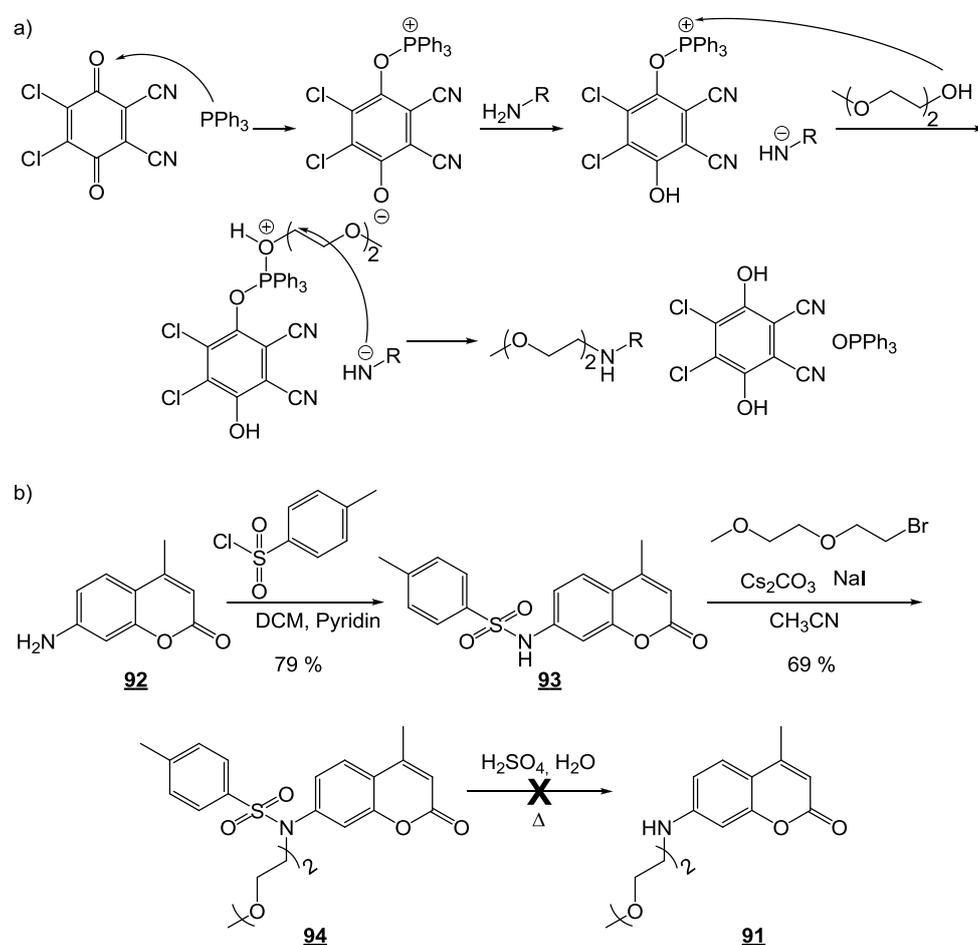


Abb. 57: Erfolgreiche Versuche der Monoalkylierung des Cumarinamins. a) Die Umsetzung mit DDQ und Triphenylphosphin entsprechend einer literaturbekannten Methode^[115] gelang für R = Cumarin nicht. b) Die Monoalkylierung mit Hilfe einer Schutzgruppenstrategie schlug ebenfalls fehl, da sich das gewünschte Produkt beim Entfernen der Schutzgruppe zersetzte.

Daher wurde die Alkylierung unter Standardbedingungen durchgeführt, die bei anderen Stöchiometrien zur Dialkylierung des Cumarins führten (Abb. 58).^[116]

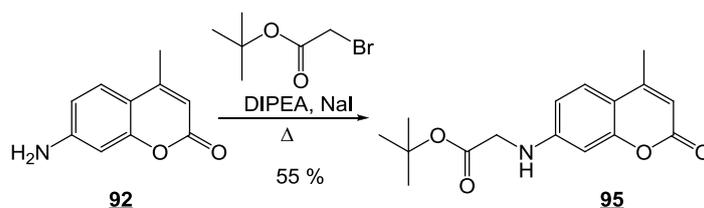


Abb. 58: Die Monoalkylierung des Coumarin-Amins wurde durch die Stöchiometrie bei der Umsetzung mit *tert*-Butylbromoacetat erreicht. Im Rahmen der Reinigung der Reaktion konnte ein Großteil des nicht umgesetzten Edukts wieder isoliert werden.

Die Einführung des zweiten Substituenten gestaltete sich schwieriger. Der sterische Anspruch des hergestellten sekundären Amins verlangsamte die Substitution zum gewünschten tertiären Amin. Nach einiger Optimierung wurde eine abgewandelte Methode wie zur Einführung des ersten Substituenten genutzt, in der DIPEA durch Caesiumcarbonat ersetzt und zusätzlich Tetrabutylammoniumbromid eingesetzt wurde. Diese Zusammensetzung erzielte bessere Ergebnisse als die anderen Bedingungen, vermutlich da der Phasentransferkatalysator eine bessere Mischung des polaren Ethylenglycols mit den anderen Reagenzien bewirkte. Doch auch unter diesen Bedingungen lief die Reaktion sehr langsam und mit mäßigen Ausbeuten ab (nach 10 Tagen Erhitzen nur 35 % Produkt). Anschließend wurde die Methylgruppe des Coumarins entsprechend dem ursprünglichen Synthesepfad mit Selendioxyd zum Aldehyd oxidiert und ohne Reinigung direkt mit Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert. Die geplante Aktivierung des Alkohols mit 4-Nitrophenylchloroformat und Umsetzung zum Carbamat mit einem Amin lief nicht wie gewünscht ab. Alternative Varianten zum Aufbau eines Carbamats beispielsweise durch Aktivierung mit DSC zeigten ebenfalls nicht den gewünschten Effekt. Die Verknüpfung der Aminofunktionalität mit dem Coumarin konnte über einen Ester durch Kupplung mit EDC und DMAP durchgeführt werden. Im Fall des Coumarins wurde entgegen dem ursprünglichen Plan und anders als bei der Verlängerung des NDBF-Bausteins, das chirale Fmoc-L-Alanin zum Einführen der Aminogruppe genutzt. Dieser Fehler war auf eine Verwechslung der Startmaterialien zurück zu führen, konnte NMR spektroskopisch jedoch identifiziert werden. Die letzte Stufe dieser Reaktion, die Entschützung der Carbonsäure bereitete nochmals größere Probleme, obwohl die gleiche Reaktion für das zweifach mit *tert*-Butylacetat substituierte Coumarin mit guten Ausbeuten veröffentlicht ist.^[116] Die Umsetzung in einer Mischung aus DCM und Trifluoressigsäure (TFA) führte in einer Nebenreaktion auch zur Decarboxylierung der Carbonsäure. Nach Optimierung in Reaktionsdauer und Säurekonzentration, konnte die Nebenreaktion auf unter 50 % reduziert werden. Die erfolgreiche Syntheseroute zum Coumarin-Derivat, das über eine geschützte Amino- und eine freie Carboxyunktionalität zum Einsatz in Fmoc-Peptid-Festphasensynthese verfügt, ist in Abb. 59 zusammengefasst.

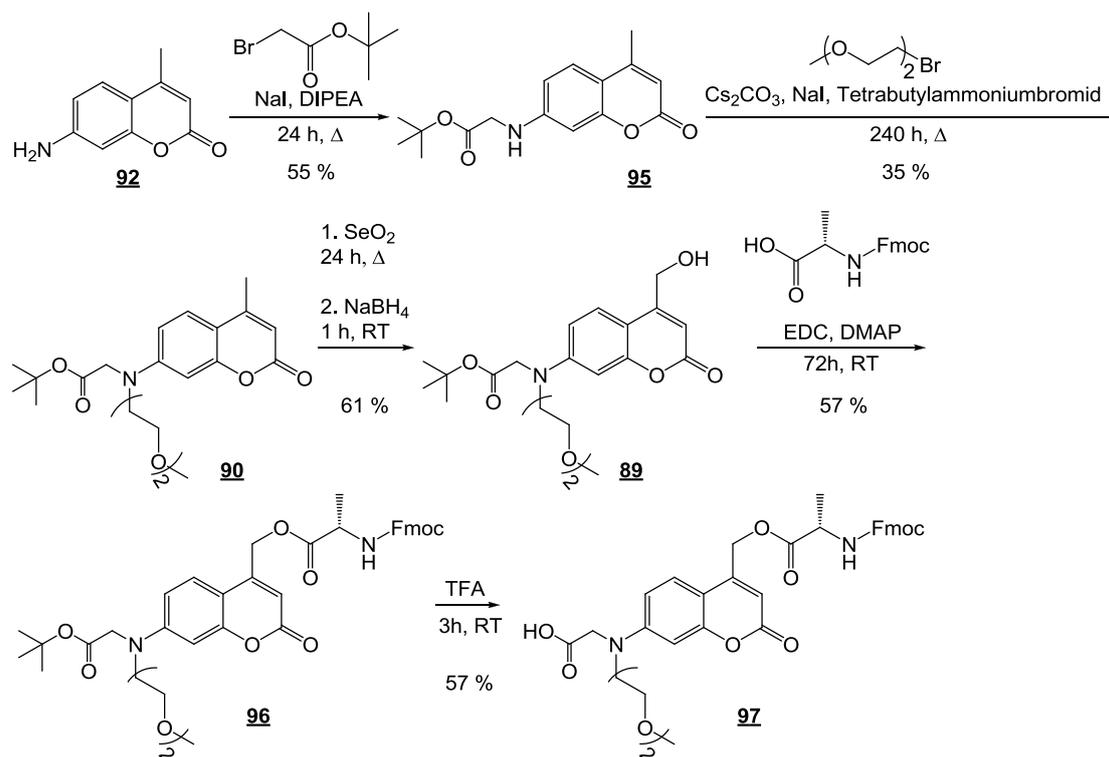


Abb. 59: Syntheschema, nach dem die Darstellung einer Zwei-Photonen spaltbaren Coumarin-Aminosäure erfolgreich ablief.

Die hergestellte Verbindung wurde wiederum an Dr. Ralph Wieneke zwecks Einbaus in Peptide mit Festphasensynthese gegeben.

3.2.4 Peptidsynthese mit den neuen Aminosäuren

Vor zellulären Untersuchungen bezüglich Rezeptorclustering sollten die neuen Aminosäuren auf ihre photochemische Funktionalität in etablierten Testsystemen für Membranen untersucht werden. Ein solches System liefern beispielsweise *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs). In der Arbeitsgruppe von Prof. Tampé wurde eine Methode erfolgreich modifiziert, um ein solches Testsystem mit His-Tags an der simulierten Membran herzustellen. Die Synthese eines Peptids, das analog wie in Abb. 43 ein selbst inhibiertes trisNTA sowie zwecks Detektion einen Farbstoff trägt, kann nach Belichtung an die His-Tags der GUVs binden. Durch die Aktivierbarkeit der neuen Verbindungen mit Zwei-Photonen-Anregung, sollte mit dreidimensionaler Auflösung eine Anlagerung der Peptide an die simulierte

Membran induziert und damit eine Verlagerung der Fluoreszenz aus dem Inneren der GUVs an die Wände beobachtet werden können (Abb. 60 a).

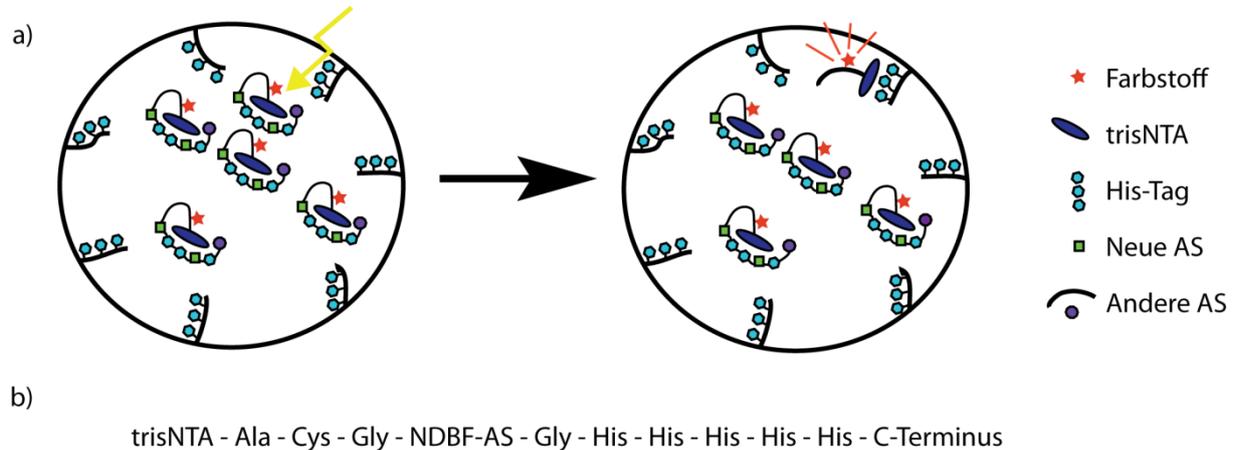


Abb. 60: Schema für die geplante erste Anwendung der neuen Peptide. a) Als Testsystem für das Verhalten in Zellmembranen sollten GUVs hergestellt werden, die in der simulierten Membran stochastisch an verschiedenen Positionen herausstehende His-Tags enthalten. Das neue Peptid kann durch eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen seinem trisNTA und dem eigenen His-Tag nicht an die Hülle binden. Die Fluoreszenz der Peptide verteilt sich diffusionsgesteuert innerhalb der GUVs. Belichtung sollte die intramolekulare Wechselwirkung spalten und zu einer Anlagerung der Peptide und damit auch der Fluoreszenz an der Hülle führen. Die Anwendung von Zwei-Photonen-Anregung sollte eine Anreicherung unter hoher räumlicher Auflösung erlauben. b) Abgeleitete Zielsequenz aus vorherigen Experimenten mit dem selbstinaktivem trisNTA Peptid.^[92] An Stelle der bisherigen photolabilen Aminosäure sollten die neuen Bausteine eingebaut werden. Über das Cys sollte analog wie in der ursprünglichen Anwendung die Modifikation mit einem Farbstoff möglich sein.

Die daraus resultierende Zielsequenz für die neuen Peptide wurde in Anlehnung an die schon erfolgten Experimente mit selbstinaktivem trisNTA konzipiert (Abb. 60 b).^[92] Die Festphasensynthese in der Arbeitsgruppe von Prof. Tampé ergab jedoch nur für eine Synthese eine erfolgreiche massenspektrometrische Charakterisierung des gewünschten Produkts. Nur der Einbau des ersten NDBF-Bausteins **82** (Abb. 55) zeigte die gesuchte Zielverbindung. Die Reproduktion dieser Messung oder die Charakterisierung eines anderen vollständigen Peptids schlugen fehl. Die über HPLC isolierten Verbindungen konnten nicht als die gewünschten Produkte identifiziert werden, doch veränderte sich ihre Retentionszeit nach Belichtung mit 365 nm. Dies deutete auf eine Photoreaktion und damit den erfolgreichen Einbau der photolabilen Aminosäure hin. Eine Modifikation des enthaltenen Cysteins gelang jedoch nicht, was entweder auf eine ungewollte Wechselwirkung zwischen der neuen Aminosäure und dem Cystein oder einem nicht erfolgten Einbau ebenjenes Cys hindeutete.

Nach abgeschlossener Synthese der vier neuen Bausteine wurde die Schwierigkeit in der Kopplung systematisch untersucht. Dazu wurden Fragmente der gewünschten Zielverbindung mit dem NDBF-Baustein **86** (Abb. 55) im Arbeitskreis von Prof. Tampé hergestellt und in der Arbeitsgruppe von Prof. Heckel analysiert. Zunächst wurde die Synthese bis zum Glycin nach der photolabilen Schutzgruppe durchgeführt (siehe Abb. 60 b). Ein Teil des Festphasenmaterials wurde für die spätere Charakterisierung entnommen. Das Festphasenmaterial wurde in zwei Hälften geteilt. An den ersten Teil wurde versucht wie auch ursprünglich geplant ein Cystein zu kuppeln. Da Cys wie schon erwähnt Probleme bei der Folgereaktion mit Farbstoffen verursachte, wurde der zweite Teil stattdessen mit einem Lysin umgesetzt. Von beiden Reaktionen wurde wieder eine analytische Menge entnommen, bevor die letzte Aminosäure und das trisNTA mit der festen Phase umgesetzt wurden. Die Analyse der entnommenen Proben zeigte nur für den Fall der Synthese bis zum Glycin das gewünschte Produkt. In dieser Probe konnte zu fast 50 % ein zweiter Peak identifiziert werden, der in den Untersuchungen der nachfolgenden Kopplungen ausschließlich gefunden wurde. In der Analyse konnte dieser Peak als das eliminierte Produkt des NDBFs **98** charakterisiert werden (Abb. 61 a). Auch eine Umstellung der basischen Bedingungen im Rahmen der Synthese von 20 % Piperidin in DMF zu milderer Reagenzien wie 50 % Morpholin in DMF^[117] oder 25 % N-Methylpyrrolidin mit 2 % HOBt und 2 % Hexamethylenimin in einer 1:1 Mischung DMSO und N-Methyl-2-pyrrolidon^[118] zeigten keine Anreicherung der gewünschten Produkte. Die Änderung in der Retentionszeit von **98** nach Belichtung liegt vermutlich an einer cis-trans-Isomerisierung der entstandenen Doppelbindung. In der Folge wurde zum einen versucht, den NDBF-Baustein nochmal neu aufzubauen, so dass die Acidität der Protonen verschwinden sollte (Abb. 61 b). Zusätzlich wurde eine manuelle Synthese eines Peptids in Lösung getestet, um festzustellen ob der Baustein grundsätzlich die Bedingungen während der Peptidsynthese toleriert.

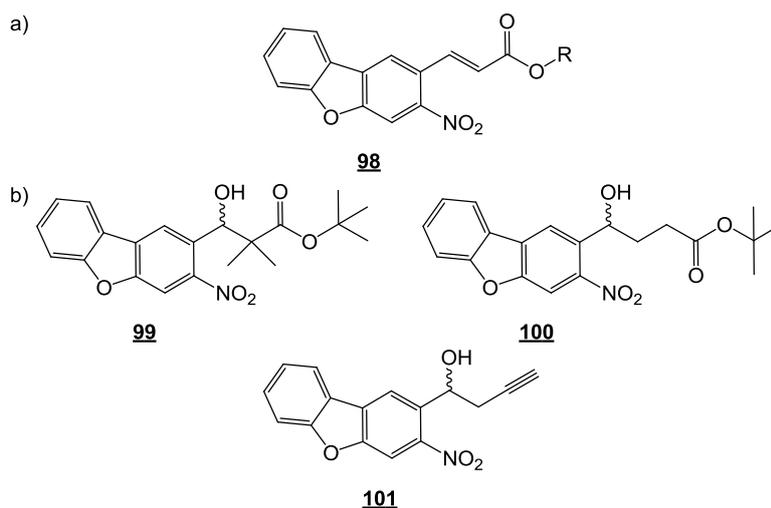


Abb. 61: Die Synthese von Peptiden mit den neuen Bausteinen bereitet Probleme. a) In jeder vollständigen Synthese zum gewünschten Produkt wurde ausschließlich die Verbindung **98** nach Eliminierungsreaktion isoliert. b) Daher wurden Synthesen zu den neuen Derivaten **99** – **101** untersucht, die nach ihrer Herstellung keine weitere Tendenz zu Eliminierungsreaktionen zeigen sollten.

Die Synthese der Derivate **99** – **101** sollte wie bereits bei der Herstellung des ursprünglichen Moleküls aus Umsetzung des NDBF-Aldehyds mit den entsprechenden Halogeniden in einer Reformatzki-Reaktion mit Rieke-Zink erfolgen. Verbindung **99** enthält zwei Methylgruppen in der C $_{\alpha}$ Position, wodurch keine Eliminierung möglich sein sollte. Bei Verbindung **100** wurde die Seitenkette um eine CH $_2$ Gruppe verlängert, wodurch bei Eliminierung kein konjugiertes System mehr entsteht und damit die Triebkraft dieser Reaktion verschwindet. In einem dritten Testsystem, wurde die Seitenkette um ein Alkin erweitert, das eine anschließende Modifikation über Click-Chemie möglich machen sollte. Ohne Carbonyl sollte Verbindung **101** nicht eliminieren können. Bei der Herstellung aller drei Verbindungen konnte für Verbindung **101** eine saubere Umsetzung vom Startmaterial zum Produkt beobachtet werden. Bei den Verbindungen **99** und **100** wurde nach der gleichen Reaktionsdauer mittels Dünnschichtchromatographie eine Mischung aus Startmaterial und zwei neuen Produkten entdeckt. Da in beiden Umsetzungen das Startmaterial überwog, wurde versucht eine Umsetzung des überschüssigen Edukts zu erreichen. Durch Zugabe einer geringen Menge Natriumiodid, das die Reaktivität des Halogenids erhöhen sollte, gingen beide Reaktionen sauber in ein neues Produkt über. Im Ergebnis wurde dabei jedoch nicht die gewünschte Verbindung generiert, sondern ausschließlich die Nitrogruppe des Aldehyds zum Amin reduziert (Abb. 62).

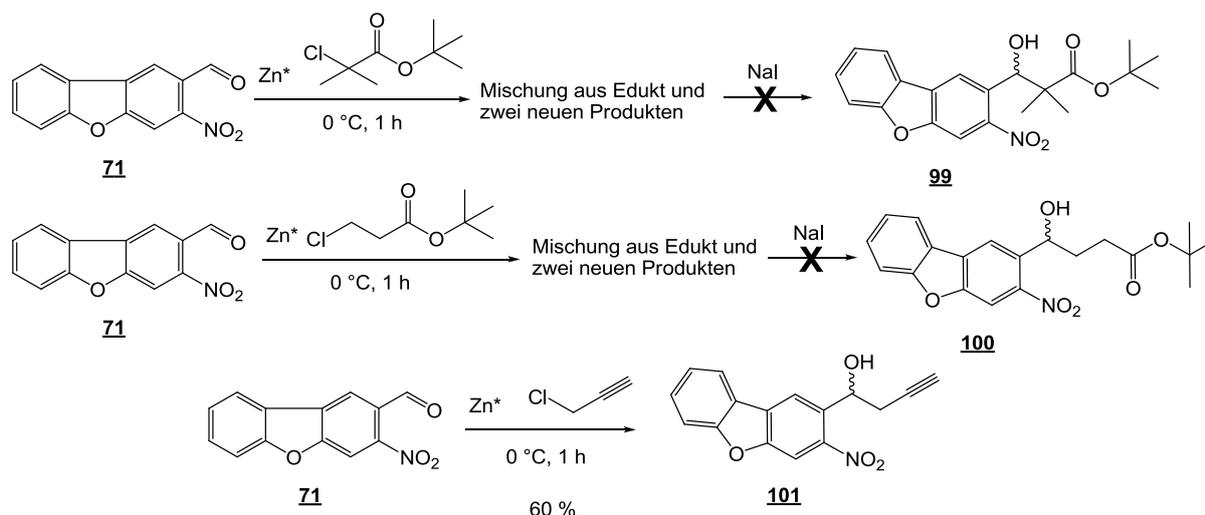


Abb. 62: Drei getestete Reformatski-Reaktionen, um die NDBF-Aminosäuren **99** – **101** herzustellen. Alle drei Verbindungen sollten nicht länger zu Eliminierungsreaktionen neigen. Während die Reaktion mit Propargylchlorid sauber eine neue Verbindung zeigte, entstand bei den Reaktionen mit *tert*-Butyl- α -bromoisobutyrat und *tert*-Butyl-3-bromopropionat eine Mischung aus Startmaterial und zwei neuen Produkten. Nach Zugabe von NaI setzte sich in beiden Reaktionen sowohl das restliche Edukt als auch eines der Produkte ausschließlich zum zweiten in der Reaktionskontrolle schon beobachteten Produkt um. **101** konnte als das gewünschte Produkt charakterisiert werden. Anstatt von **99** und **100** bildete sich jedoch ausschließlich Startmaterial bei dem die Nitrogruppe zum Amin reduziert wurde.

Die parallele Umsetzung zum gewünschten Produkt **101** erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Bromide *tert*-Butyl- α -bromoisobutyrat und *tert*-Butyl-3-bromopropionat nicht für Reformatski-Umsetzungen geeignet sind. Die hergestellte Verbindung **101** wurde anschließend versucht mit Natriumhydrid zu deprotonieren und mit einem Halogenid umzusetzen, um eine der gewünschten Funktionalitäten an die Verbindung zu modifizieren. Es stellte sich heraus, dass der Alkohol unter keinen der getesteten Bedingungen deprotoniert werden konnte. Ausschließlich das Startmaterial wurde nach versuchter Umsetzung mit starken Basen wie NaH oder Ethanolaten und der Zugabe der Halogenide nahezu quantitativ wieder zurück gewonnen (Abb. 63).

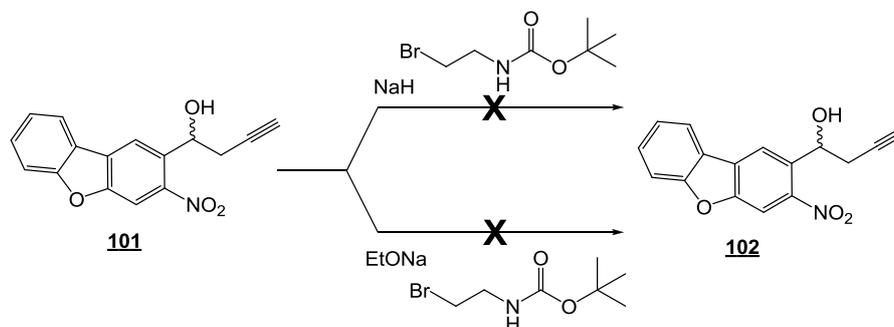


Abb. 63: Der Alkohol von **101** ließ sich nicht deprotonieren und zu einem Produkt mit den gewünschten Funktionalitäten umsetzen.

Da in parallelen Experimenten eine manuelle Kopplung von zwei Asparaginsäuren an den NDBF-Baustein **86** erfolgreich war (Abb. 64), wurde die Synthese neuer NDBF-Derivate gestoppt. Unter Standardbedingungen wie in der Festphasensynthese mit Kopplung der Säuren und Amine mit Hilfe von EDC, HOBt und DIPEA, Fmoc-Abspaltung mit 20 % Piperidin und ^tBu Entschützung mit verdünnter TFA, konnte das Tripeptid hergestellt werden. Einziges Problem im Rahmen dieser Synthese war, dass Verbindung **103** nicht stabil war und sich zersetzt. Deshalb wurde sie ohne Reinigung direkt weiter umgesetzt. Neben dem Tripeptid **105** wurde zusätzlich noch ein weiteres Tripeptid hergestellt, in dem das zweite Asp durch Cystein ersetzt wurde. Durch die Herstellung von zwei unterschiedlichen Tripeptiden konnte die Reproduzierbarkeit der Synthese bewiesen und über das Cystein eine zusätzliche Position für eine spätere Modifikation geschaffen werden. Folglich lagen die Probleme während der Festphasensynthese nicht an der grundsätzlichen Stabilität der neuen Verbindungen. Die Probleme könnten mit dem verwendeten Festphasenmaterial zusammenhängen, das laut Aussage des Kollaborationspartners freie Amine besaß und damit über eine eigene Basizität verfügte. Diese könnte die Eliminierungsreaktion hervorgerufen haben. Durch die Wahl der hydrophilen Aminosäure Asp, war das hergestellte Peptid **105** in den synthetisierten Mengen vollständig wasserlöslich (mindestens bis 2 mM) und zeigte im Dunkeln in wässrigem Puffer bei pH 7,5 weniger als 5 % Zersetzung über 170 h.

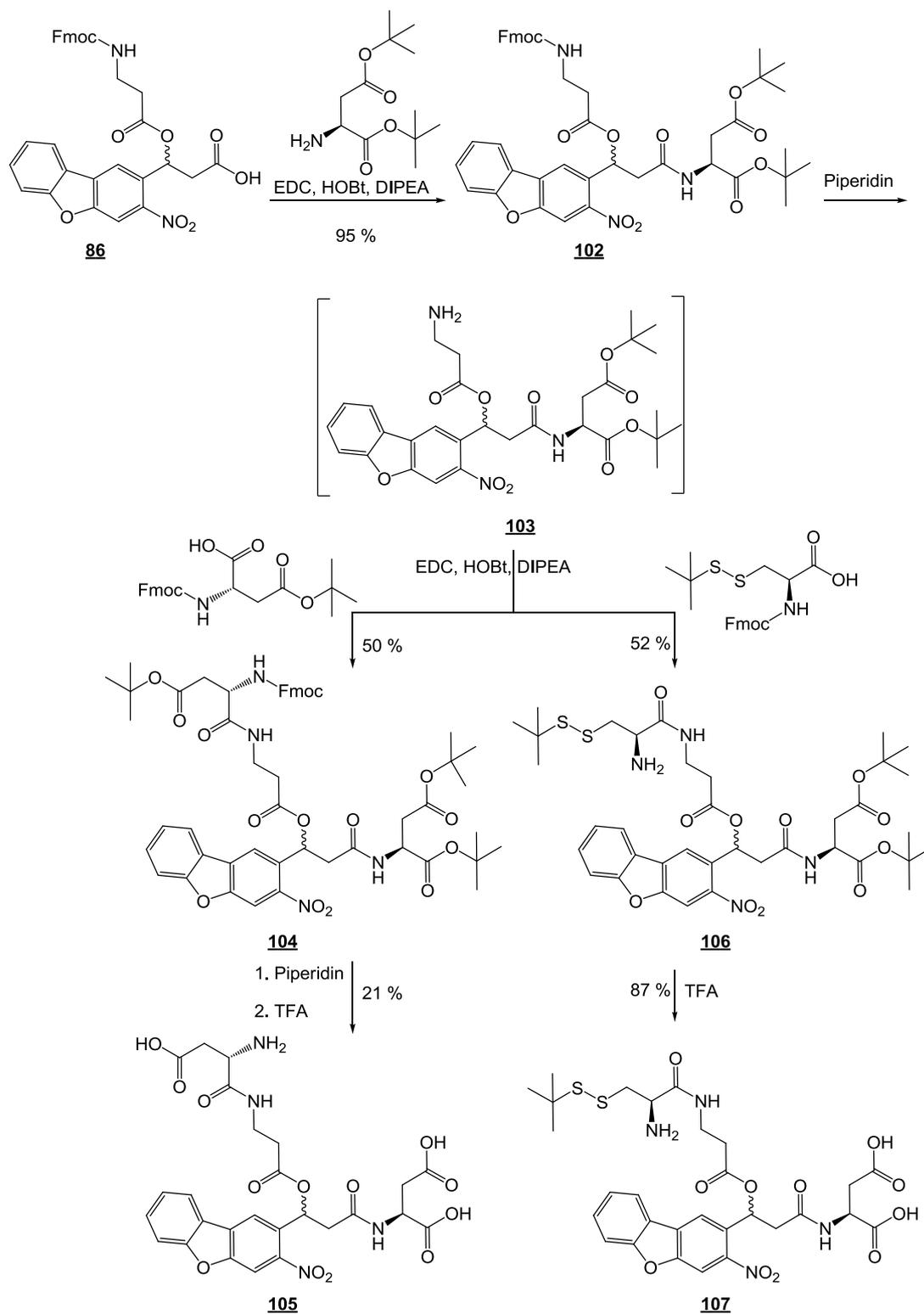


Abb. 64: Nachdem die automatisierte Festphasensynthese von Peptiden mit den neuen Verbindungen fehlschlug, wurden zwei Tripeptide durch Reaktionen in Lösung aufgebaut. Die Bausteine waren mit Standardbedingungen der Festphasensynthese in Lösung kompatibel.

3.2.5 Anwendung der hergestellten Peptide

Die Herstellung der ursprünglich geplanten Peptide konnte wegen der wiederholt nicht gegebenen Stabilität der neuen Aminosäuren während der Festphasensynthese nicht durchgeführt werden. Daher konnte auch die ursprünglich geplante Anwendung nicht umgesetzt werden.

Zunächst sollten die manuell hergestellten Tripeptide hinsichtlich ihrer photochemischen Eigenschaften charakterisiert werden. Für den Nachweis der Zwei-Photonen-Aktivität sollte in Anlehnung an frühere Beobachtungen die Fähigkeit von NDBF zum Löschen der Fluoreszenz des Farbstoffs ATTO565 genutzt werden. In den damaligen Experimenten führte die Aktivierung einer Lösung des NDBF-Peptids in einer Küvette mit Zwei-Photonen-Belichtung zu einem messbaren Anstieg in der Fluoreszenz. Dieser Anstieg folgte, wie für den Zwei-Photonen-Effekt üblich, einer quadratischen Abhängigkeit zwischen Fluoreszenzzunahme und Bestrahlungsleistung.^[119] Zum Nachweis der Zwei-Photonen-Aktivierung der neuen Tripeptide sollte dieses System reproduziert werden.

Die Modifikation der Tripeptide mit dem Farbstoff ermöglichte zusätzlich eine Detektion der Farbstoff tragenden Fragmente nach der Photolyse. Ohne Farbstoff wäre dieses Fragment mit Hilfe der HPLC nicht zu detektieren. Die ausschließliche Detektion des Nitroaromaten und nach der Photolyse des Nitrosoaromaten ist wegen zusätzlicher Nebenreaktionen des reaktiven Photolyseprodukts ungeeignet. Mehrere Produkte, die alle bei der gleichen Wellenlänge absorbieren, stören vor allem bei quantitativen HPLC-Untersuchungen wie der Bestimmung der Quantenausbeute.

Die Peptide wurden mit ATTO565 NHS-Aktivester umgesetzt und am N-Terminus mit dem Farbstoff markiert (Abb. 65 a). Die Löschung der Fluoreszenz war bei diesen neuen Verbindungen wesentlich stärker als in dem vorherigen System des Glutathions. So konnte nach vollständiger UV-Aktivierung eine Steigerung der Fluoreszenz um den Faktor 81 nachgewiesen werden (Abb. 65 b). Für die Belichtung mit 365 nm wurde mit Hilfe eines Ferrioxalat Aktinometers die Quantenausbeute der Photolyse von Verbindung **108** auf 0,13 bestimmt. Ein erfolgreicher Nachweis der Zwei-Photonen-Aktivität analog wie im publizierten Fall des Glutathions gelang jedoch nicht. Unter reproduzierten Bedingungen konnte keinerlei Effekt in der Fluoreszenzzunahme außerhalb von Messschwankungen registriert werden.

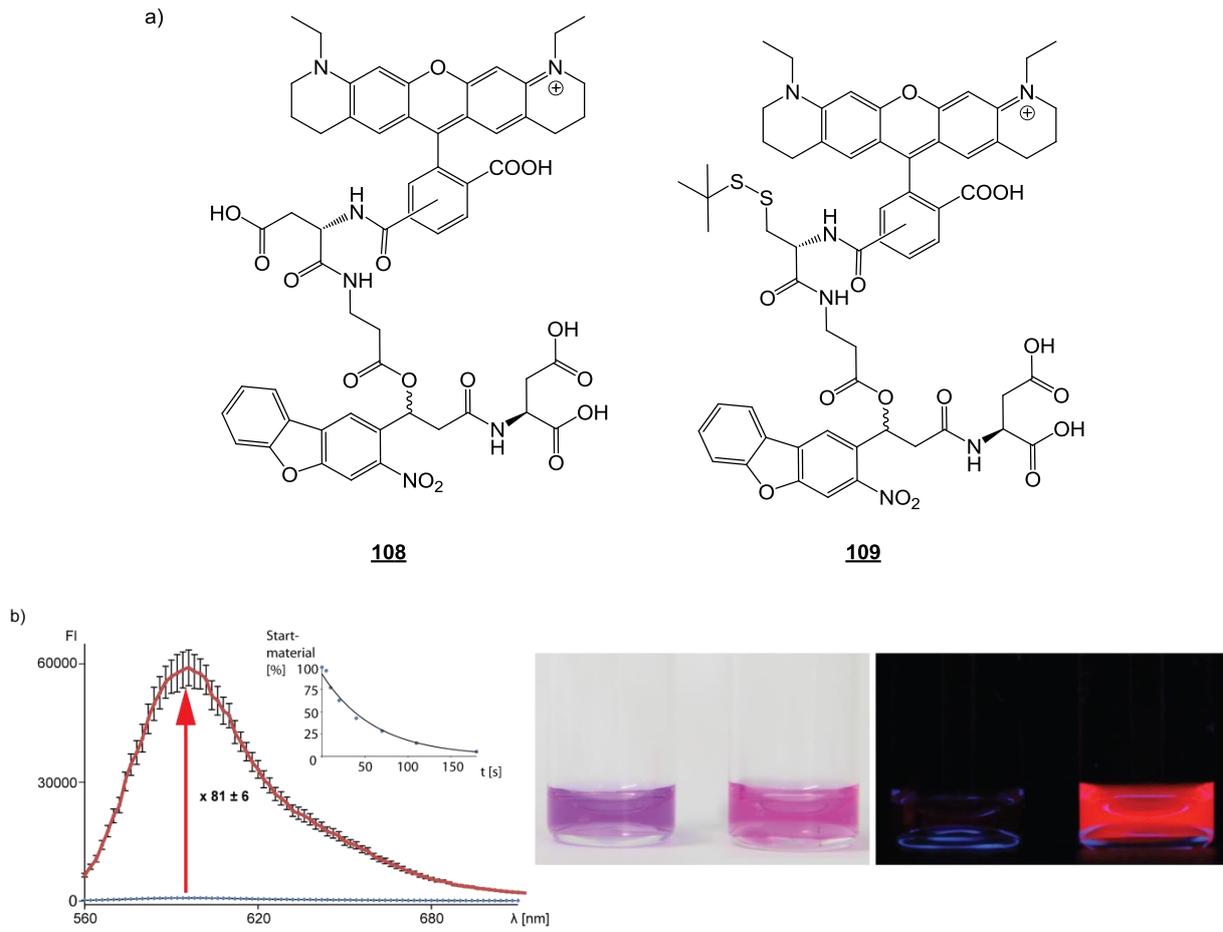


Abb. 65: a) Zum Nachweis der Aktivierbarkeit der neuen Peptide mit Zwei-Photonen-Anregung und zur besseren Überwachung der Photolysereaktion wurden die hergestellten Tripeptide am N-Terminus mit ATTO565 modifiziert (analytisches HPLC Spektrum von **108** im Anhang). b) Die photochemischen Eigenschaften wurden für Peptid **108** untersucht. Die Aktivierung mit UV-Strahlung bei 365 nm (250 mW, 3 Min) zeigte einen Anstieg der Fluoreszenz um den Faktor 81. Der eingefügte Graph bestätigt über Auswertung von HPLC Spektren, dass nach dieser Belichtungsdauer die Probe vollständig aktiviert wurde. Die Fotos zeigen den deutlichen Anstieg der Fluoreszenz einer 0,22 mM Lösung des Peptids vor und nach Belichtung unter weißem Licht und unter einer UV-Handlampe bei 366 nm.

An Stelle einer Zwei-Photonen-Aktivierung in Lösung wurde eine Aktivierung von immobilisierten Peptiden versucht. Dafür wurde in Verbindung **109** das Disulfid gespalten und das freie Cystein (Abb. 66) mit einem kommerziell erhältlichen Hydrogel, das Maleimide enthält, versetzt. Ein Fluoreszenzanstieg konnte schon in ersten Aufnahmen registriert werden, doch waren die beobachteten Effekte mit dem verwendeten Aufbau nicht sehr deutlich. Nach einem leichten Anstieg in der lokalen Fluoreszenz fand ein sofortiger Übergang zu gelblichem Farbstoff statt. Nach einigen erfolglosen Versuchen gute Effekte aufzuzeichnen, konnte Manuela Fichte die Proben am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in der Mikroskopie Abteilung zusammen mit Dr. Stephan Junek an einem *Laser Scanning Microscope* vermessen. Der dortige Aufbau ermöglichte die zeitgleiche Anregung der Proben mit einem Zwei-Photonen-Laser und einem zweiten Laser für die

Fluoreszenzanregung, während gleichzeitig Bilder aufgenommen wurden. Die Aktivierung der Proben mit Zwei-Photonen-Anregung in hoher dreidimensionaler Auflösung konnte mit Hilfe dieser Aufnahmen demonstriert werden (Abb. 66).

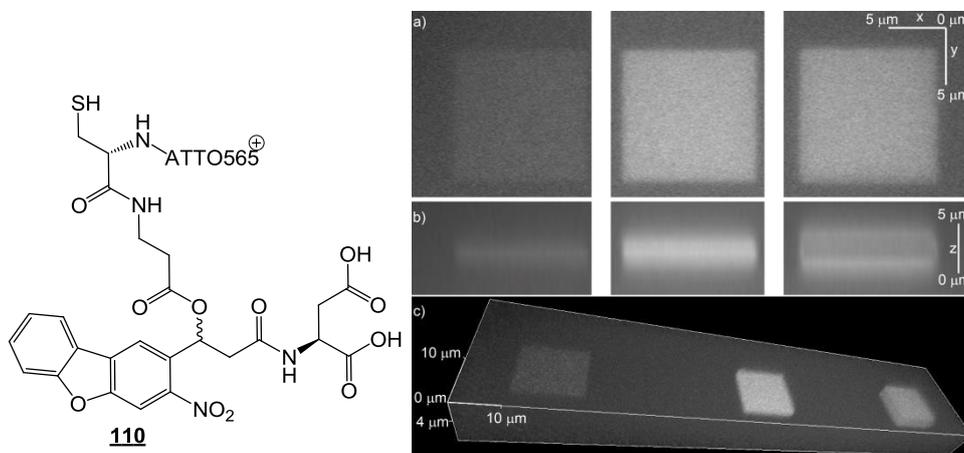


Abb. 66: Der Nachweis der Aktivierung der neuen Aminosäure mit Hilfe von Zwei-Photonen-Anregung bei 780 nm gelang durch Immobilisieren des freien Thiols (links, analytisches HPLC Spektrum von **110** im Anhang) in einem kommerziell erhältlichen Hydrogel, das Maleimide enthält. In diesem Hydrogel konnte die Aktivierung der Fluoreszenz in begrenzten lokalen Bereichen demonstriert werden (rechts). Die Leistung bei der Belichtung stieg vom linken Quadrat mit 6 mW, über 14 mW in der Mitte bis 20 mW rechts an. a) – c) zeigen verschiedene Orientierungen der gleichen Aufnahme. Die Fluoreszenz steigt bei höherer Leistung wie erwartet an (linke Quadrate zur Mitte), nimmt bei weiter zunehmender Leistung wegen Bleichens des Farbstoffes jedoch wieder ab (Mitte zum rechten Quadrat). Die hohe dreidimensionale Auflösung der Zwei-Photonen-Anregung wird durch Aufnahme b) belegt. (Die Zwei-Photonen-Aktivierung wurde von Manuela Fichte und Dr. Stephan Junek in der Mikroskopie Abteilung des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung aufgenommen).

Die lichtaktivierbare Fluoreszenz der neu hergestellten Verbindungen eröffnete zusätzliche Möglichkeiten in der Anwendung der Probe für Fluoreszenz-Mikroskopie auf zellulärer Ebene. Dieses Gebiet wird aktuell intensiv untersucht. So wurde der Nobelpreis für Chemie im Jahr 2014 für die Entwicklung hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie verliehen.

Normale Lichtmikroskopie kann wegen der Beugung des Lichts keine Objekte kleiner 200 nm scharf abbilden. Wegen dieser als Abbe-Limit bezeichneten Grenze erscheinen einzelne Lichtpunkte verschwommen mit einer Auflösung in der xy-Ebene von 200 – 300 nm und 500 – 700 nm in der z-Ebene.^[120] Erste Verbesserungen dieser Auflösung wurden durch Änderungen im experimentellen Aufbau erreicht. Zwei gegenüberliegende Objektive konnten eine Belichtung und Detektion der Probe idealerweise aus allen Raumrichtungen simulieren. Ein solcher Aufbau führt zu einer wesentlich verbesserten räumlichen Auflösung (bis zu 100 nm Auflösung in z-Ebene) und kommt in der 4Pi- oder I⁵M-Mikroskopie zum Einsatz. Die Entwicklung neuer Methoden konnte die Abbe-

Begrenzung schließlich vollständig umgehen.^[120] Dabei kann zwischen zwei Arten von neuen Methoden unterschieden werden, von denen die einen den Anregungsbereich der Proben optimieren und die anderen innerhalb der Proben Einzelmolekül-Anregung erreichen.

Beispiele für die Fluoreszenzanregung in definierten Bereichen sind STED- (*stimulated-emission depletion*), GSD- (*ground state depletion*) Mikroskopie und SIM (*structured-illumination microscopy*). Bei STED werden die zu untersuchenden Systeme von zwei Lasern gescannt, von denen der erste eine kreisförmige Fluoreszenzanregung erzeugt und der zweite, rotverschobene Laser in einer Donat-Form stimulierte Emission induziert. Übereinander gelegt findet die Fluoreszenzanregung nur im Bereich des Donat-Lochs statt, wodurch eine deutlich verbesserte Auflösung erreicht wird. Für die Entwicklung dieser Methode bekam Stefan Hell 2014 den Nobelpreis. Eine ähnlich Funktionsweise nutzt auch die GSD-Mikroskopie, jedoch induziert der zweite Laser keine Emission, sondern überführt die Moleküle in einen langlebigen, dunklen Zustand. Beispielsweise kann dies ein Triplet-Zustand sein, der selbst nicht zur Fluoreszenz angeregt werden kann, wodurch nur die nicht überführten Moleküle über Laser eins aktiviert werden. Die SIM-Technik nutzt strukturierte Belichtung, um eine bessere Auflösung der Proben zu erhalten. Mit Hilfe einer wechselnden Belichtung mit einem feinen Streifenmuster wird ein Bereich der Probe mehrfach aufgenommen, wobei durch die leichten Änderungen im Streifenmuster zusätzliche Informationen über die Probenstruktur gewonnen werden. Die Nachbearbeitung aller Aufnahmen ermöglicht die Konstruktion eines hochauflösten Bildes.

Methoden für die Einzelmolekül-Anregung setzen voraus, dass im Umkreis von 200 nm des aktivierten Moleküls keine weitere Aktivierung erfolgt. Nur dann kann mathematisch der Mittelpunkt der angeregten Moleküle berechnet werden. Für ein hochauflöstes Bild müssen wiederholt stochastisch wenige Moleküle angeregt, lokalisiert und deaktiviert (oder geblichen) werden. Anschließend können alle lokalisierten Einzelmoleküle zu einem Bild mit verbesserter Auflösung zusammengesetzt werden. Zwei Beispiele für solche Methoden sind PALM (*photoactivated localization microscopy*) und STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*). Die zwei weiteren Nobelpreisträger im Jahr 2014, William Moerner und Eric Betzig, bekamen die Auszeichnung für die Entwicklung von PALM. William Moerner entwickelte Varianten von fluoreszierenden Proteinen, die zwischen einem aktiven, fluoreszierenden und einem inaktiven Zustand hin und her geschaltet werden konnten. Mit Hilfe dieser Moleküle konnte Eric Betzik schließlich PALM entwickeln. Ein aktiver und inaktiver Zustand, zwischen dem die Fluorophore geschaltet werden können, ist Grundvoraussetzung für Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie. STORM unterscheidet sich prinzipiell nicht von PALM, wurde jedoch separat von einer anderen

Forschergruppe entwickelt und nutzte an Stelle von photoschaltbaren fluoreszierenden Proteinen organische Fluorophore.

Die Aktivierung solcher Fluorophore erfolgt dabei häufig über die Modifikation von Farbstoffen mit photolabilen Verbindungen, die das konjugierte π -System unterbrechen und so bis zu ihrer Abspaltung die Fluoreszenz unterdrücken (Abb. 67 a).^[121,122] In einigen Arbeiten wurden die bekannten photolabilen Schutzgruppen durch wesentliche kleinere Strukturen ersetzt. Beispielsweise konnte 2-Diazoketon als neuartige Schutzgruppe die Aromatizität verschiedener Rhodamine unterbrechen und die Fluoreszenz unterbinden. Durch Belichtung mit UV- oder Zwei-Photonen-Anregung spaltete diese Schutzgruppe Stickstoff ab und reagierte in einer Umlagerung zum funktionsfähigen Farbstoff (Abb. 67 b).^[123,124] In einem anderen Konzept werden sogenannte *push-pull* Fluorophore – π -Systeme, die am jeweils anderen Ende des konjugierten Systems über zusätzliche elektronenschiebende (*push*) und elektronenziehende (*pull*) Substituenten verfügen – maskiert. Der Verlust einer dieser zusätzlichen Gruppen verhindert, dass die Verbindungen fluoreszieren können. Durch die Maskierung der elektronenschiebenden Aminogruppen als Azide, die bei Bestrahlung mit UV-Licht Stickstoff abspalten, konnten somit weitere lichtaktivierbare Fluorophore generiert werden (Abb. 67 c).^[125,126]

Eine alternative Technik, mit der Fluoreszenz photochemisch induziert werden konnte, nutzte photolabile Verbindungen, um den Abstand zwischen einem Fluorophor Quencher Paar zu kontrollieren. Nach Belichtung diffundierte das Paar voneinander weg, wodurch die Fluoreszenz nicht länger per FRET-Effekt unterdrückt wurde.^[127,128]

Im Vergleich zu diesen bekannten Systemen liefern die in dieser Arbeit hergestellten Peptide einen neuen Ansatz, um die Fluoreszenz photochemisch zu kontrollieren. Anderes als in den bisher bekannten Varianten kombinierte die neue NDBF-Aminosäure die Eigenschaften einer photospaltbaren Gruppe und eines Quenchers. Daher wurde diese neue Technik auf ihre Kompatibilität mit zellulärer, hochauflöser Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

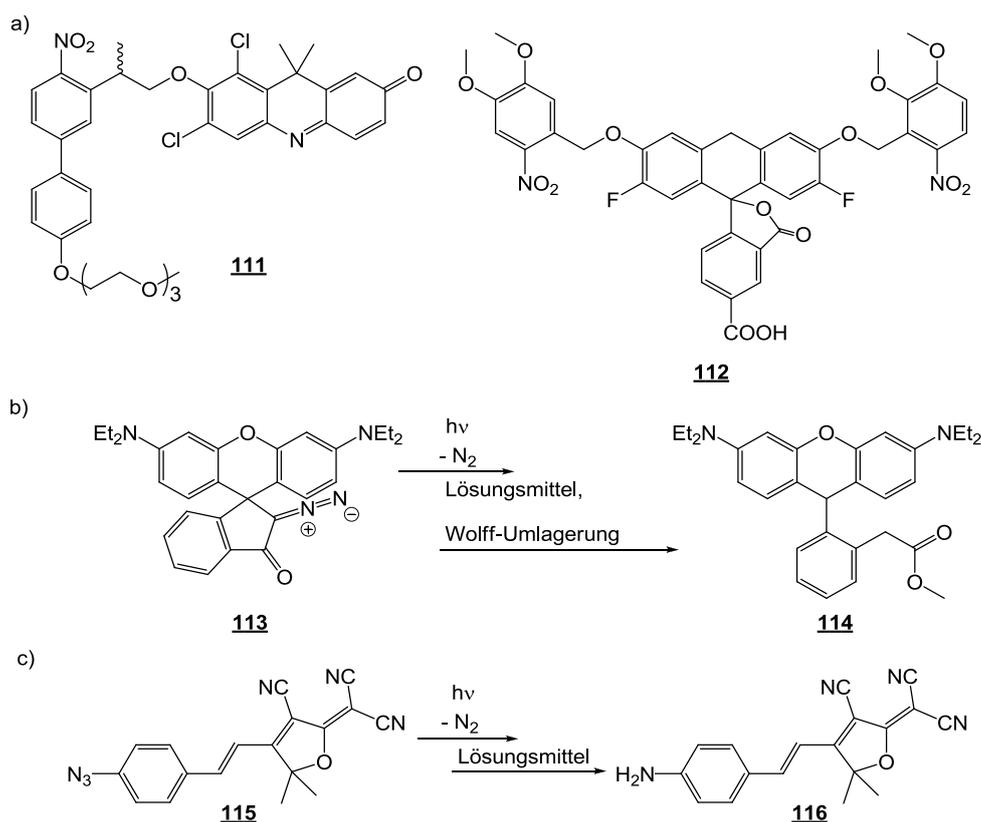


Abb. 67: Verschiedene bekannte lichtaktivierbare Chromophore. a) Zwei Beispiele für Farbstoffe, deren Aktivität durch photolabile Schutzgruppen kontrolliert wurde. Verbindung **101** ist ein Acridinon Farbstoff. Der zur Fluoreszenz notwendige Alkohol wurde mit einer Biphenylschutzgruppe modifiziert, wodurch der Chromophor mit Hilfe von UV- und Zwei-Photonen-Anregung aktiviert werden konnte.^[121] **102** ist ein Fluorescein, dessen π -System durch *o*-Nitroveratrylschutzgruppen unterbrochen wurde. UV-Bestrahlung konnte das Fluorescein aktivieren. Nach Modifikation der freien Carbonsäure mit einem Azid konnte Alkin-modifizierte DNA mit diesem Farbstoff verknüpft und innerhalb von Zellen hochaufgelöste Fluoreszenzbilder der markierten Oligonukleotide aufgenommen werden.^[122] b) Die neue 2-Diazoketon Schutzgruppe wurde zum Aktivieren einer Vielzahl an Rhodamin Farbstoffen genutzt. Sie ist sowohl mit UV- als auch mit Zwei-Photonen-Anregung zu aktivieren und spaltet Stickstoff ab. Dabei bildet sich ein reaktives Carben, das in einer Wolff-Umlagerung zum aktiven Chromophor reagiert. Die Kompatibilität dieses System mit hochaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie konnte nach Modifikation eines entsprechend geschützten Farbstoffs mit einem NHS-Ester und anschließender Verknüpfung mit einem entsprechenden Antikörper bewiesen werden. Beispielsweise konnte auf diesem Weg das zelluläre Cytoskelett hochaufgelöst visualisiert werden.^[123,124] c) Ebenfalls mit Stickstoff als Abgangsgruppe wurden sogenannte *push-pull* Fluorophore optisch reguliert. Als Azid besaß das System keinen elektronenschiebenden Substituenten und war daher nicht fluoreszent. Mit UV-Anregung spaltet das Azid Stickstoff ab und ein reaktives Nitren entsteht, das mit Lösungsmittelmolekülen zum Amin reagiert und damit den Chromophor wieder herstellt. Auch diese Systeme waren beispielweise durch Markierung von Proteinen in Zellen mit hochaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie kombinierbar. Dazu wurde ein entsprechend geschütztes System mit einem endständigen Chlorid modifiziert und mit Hilfe der HaloTag-Methode an zelluläre Proteine gebunden.^[125,126]

Für die mikroskopische Untersuchung der neu hergestellten Tripeptide sollten diese an Antikörper gebunden werden. Antikörper können selektiv an bestimmte zelluläre Strukturen binden und

ermöglichen damit gezielte Aufnahmen dieser Strukturen. Verbindung **110** wurde mit einem bifunktionalen Linker umgesetzt. Der Linker enthielt ein Maleimid, das an das freie Thiol binden konnte sowie einen NHS Ester, der die anschließende Verknüpfung mit freien Aminen von Antikörpern ermöglichte (Abb. 68).

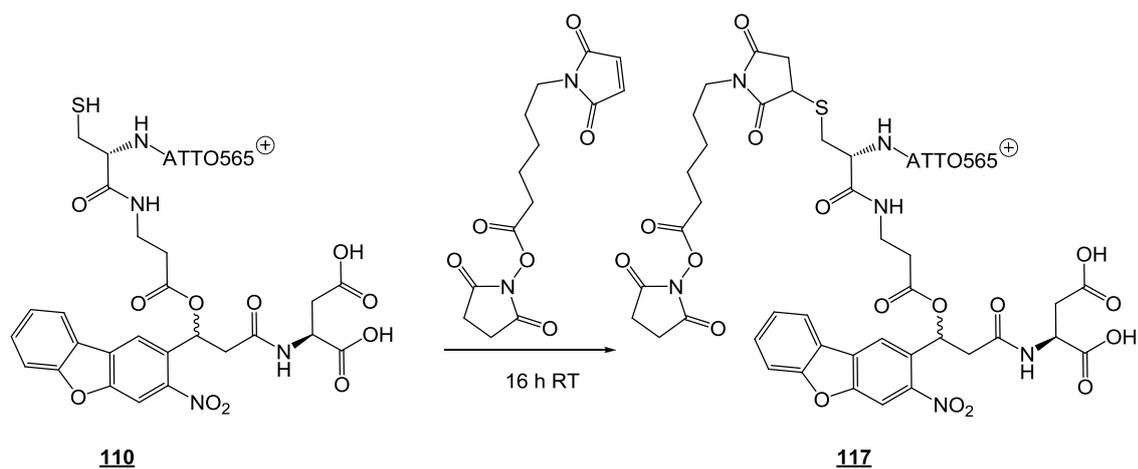


Abb. 68: Ein neu hergestelltes Tripeptid wurde mit Hilfe des bifunktionalen Linkers 6-Maleimidohexansäure-*N*-hydroxysuccinimidester erweitert. Der resultierende NHS-Ester **107** wurde anschließend zur Verknüpfung mit freien Aminen von Antikörpern genutzt.

Nach erfolgreicher Synthese von **117** wurde die Verbindung an Kathrin Klehs aus der Arbeitsgruppe von Prof. Heilemann gegeben. Sie modifizierte Antikörper mit der Verbindung, die selektiv an Mikrotubuli von U2OS Zellen binden konnten. Nachdem die Zellen für die Mikroskopie fixiert wurden, wurde im Vorfeld von hochaufgelösten Aufnahmen der Farbstoff durch einen kurzen 405 nm Laser-Puls und kontinuierlicher Anregung der Fluoreszenz bei 568 nm aktiviert. NDBF konnte bei dieser Wellenlänge bereits in früheren Experimenten gespalten werden.^[105] Die Aktivierung oberhalb von 400 nm ist ebenfalls mit den neuen Verbindungen möglich (Abb. 69).

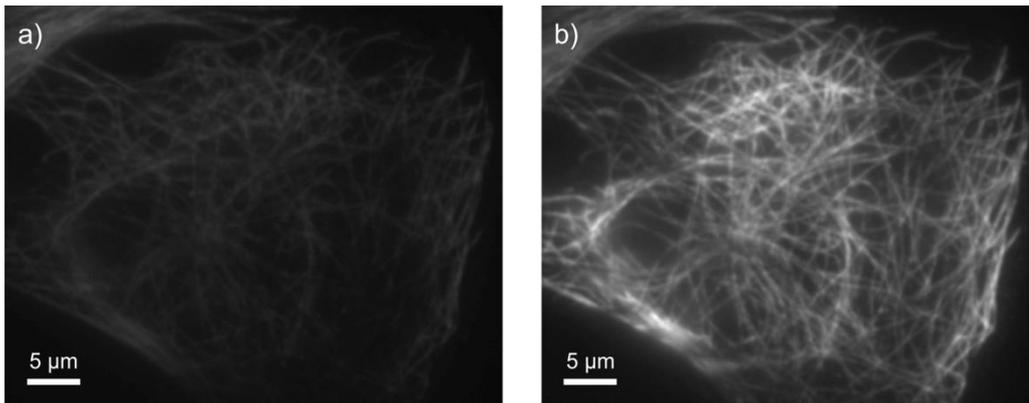


Abb. 69: Aktivierung von Antikörpern, die mit ATTO565 modifiziertem Tripeptid **117** markiert waren. Die Antikörper waren an die Mikrotubuli von U2OS Zellen gebunden. a) Fluoreszenzanregung mit 568 nm zeigt eine gewisse Fluoreszenz, die durch einen kurzen Laserpuls mit 405 nm (b) deutlich erhöht werden konnte. Die neu hergestellten Tripeptide lassen sich folglich auch oberhalb von 400 nm aktivieren. (Bild erstellt und aufgenommen von Kathrin Klehs, Arbeitsgruppe von Prof. Heilemann)

Für die anschließende Aufnahme eines hochaufgelösten Bildes mit Hilfe von photoaktivierbarer Lokalisationsmikroskopie wurden die fixierten Zellen ausschließlich mit 568 nm aktiviert. Die Leistung der Bestrahlung wurde schrittweise von 80 W/cm^2 auf 230 W/cm^2 erhöht und 10.000 Bilder der Struktur erstellt. Das neue Konstrukt aus Farbstoff und Quencher ermöglichte eine Anregung einzelner Farbstoffmoleküle. Stochastisch wurden einzelne Moleküle angeregt und geblichen (Abb. 70).

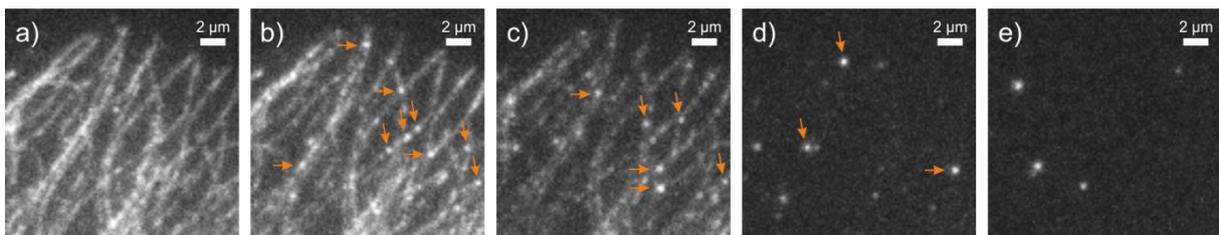


Abb. 70: Mit **117** modifizierte Antikörper, die an die Mikrotubuli von U2OS Zellen gebunden waren wurden mit 568 nm aktiviert. a) Hintergrundfluoreszenz der neuen Verbindung. Die Leistung wurde im Verlauf der Aufnahme (b – d) von 80 W/cm^2 auf 230 W/cm^2 erhöht, wobei einzelne Moleküle aktiviert (angezeigt durch gelbe Pfeile) und geblichen werden konnten, bis nur noch wenige aktive Farbstoffmoleküle vorhanden waren (e). (Bild erstellt und aufgenommen von Kathrin Klehs, Arbeitsgruppe von Prof. Heilemann)

Mit Hilfe von Standard-Lokalisationsalgorithmen wurden die Mittelpunkte jedes einzeln angeregten Moleküls berechnet und anschließend zu einer hochaufgelösten Aufnahme der Mikrotubuli zusammengesetzt (Abb. 71).

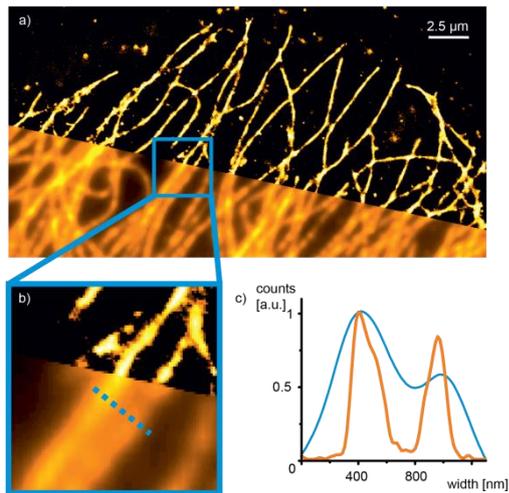


Abb. 71: Hochaufgelöste Fluoreszenzaufnahme der Mikrotubuli in U2OS Zellen. a) Vergleich zwischen einer Weitfeldfluoreszenzaufnahme (unterer Bereich) und dem aus einzelnen aktivierten Molekülen berechneten hochaufgelöstem Bild (oberer Bereich). b) Vergrößerung des Ausschnitts vom Übergang der klassischen zur hochaufgelösten Fluoreszenzmikroskopie. In der Vergrößerung (blaue Punkte) wurden die Intensitätsprofile benachbarter Mikrotubulifilamente ermittelt und in c) die verbesserte Auflösung vom Weitfeld (blauer Graph) zum hochaufgelösten Bild (orangener Graph) demonstriert. (Bild wurde erstellt und aufgenommen von Kathrin Klehs aus der Arbeitsgruppe von Prof. Heilemann).

Normalerweise wird für hochaufgelöste Fluoreszenzaufnahmen ein Verhältnis von 90 % nicht aktiviertem und 10 % aktiviertem Fluorophor benötigt.^[129] Bei einem solchen Verhältnis werden lokal einzelne Farbstoffe für eine kurze Zeit aktiviert, was als Blinken des Farbstoffes bezeichnet wird. In der Regel wird dies durch die Zugabe chemischer Substanzen erreicht, die die Fluorophore in ihrem deaktivierten Zustand stabilisieren. Die neu hergestellten Verbindungen erlaubten die Einzelmolekül-Anregung und damit eine Bildgebung unterhalb der optischen Auflösungsgrenze ohne den Zusatz solcher zusätzlichen Chemikalien.

3.2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Spaltung von Peptiden mit Zwei-Photonen-Anregung wurden im Verlauf dieser Arbeit vier neue Moleküle synthetisiert. Das erste NDBF-Derivat sollte als Fmoc-geschützter Alkohol während der Festphasensynthese in Peptide eingebaut werden. Von dieser Verbindung ausgehend wurden zwei weitere Moleküle hergestellt, die an besagter Alkoholfunktionalität einmal über einen Kohlensäurelinker und einmal über einen Esterlinker um ein Amin verlängert wurden. Neben den drei NDBF-Derivaten konnte zusätzlich eine neue Cumarin-Aminosäure für Peptidspaltungen hergestellt werden.

Die neuen Verbindungen zeigten bei der Synthese über automatisierte Peptid-Festphasensynthese Stabilitätsprobleme. Peptidsynthese mit den gleichen Reagenzien in Lösung war hingegen erfolgreich. Folglich müssen die Stabilitätsprobleme auf Parameter der Festphasensynthese zurückzuführen sein. Die ursprünglich geplanten Peptide konnten wegen dieser Stabilitätsprobleme

nicht synthetisiert werden, weshalb auch die Kontrolle von Proteinzusammenlagerung nicht untersucht werden konnte. Stattdessen wurden mit einem der neuen NDBF-Bausteine zwei Tripeptide in Lösung hergestellt und mit dem Farbstoff ATTO565 modifiziert. Beide Tripeptide zeigten eine deutliche Fluoreszenzlöschung des Chromophors. Aktivierung der Fluoreszenz konnte erfolgreich mit Ein-Photonen-Anregung bei 365 nm und 405 nm sowie Zwei-Photonen-Anregung bei 780 nm durchgeführt werden. Die Peptide zeigten einen helldunkel Kontrast von 81:1. Die hergestellten NDBF-Aminosäuren sind neben photolabilen Verbindungen, die Peptide spalten können, gleichzeitig Quencher für die Fluoreszenz des Rhodaminfarbstoffs ATTO565. Die Tripeptide zeigten moderate bis sehr gute Wasserlöslichkeit und eine hohe Stabilität in wässrigen Puffersystemen, weshalb sie als neue Sonden für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt wurden. Es konnte eine erfolgreiche Einzelmolekül-Anregung der Verbindungen ohne den Zusatz weiterer Chemikalien erreicht werden. Die dabei gesammelten Daten wurden zu einer hochauflösenden Aufnahme von Mikrotubuli in Zellen genutzt. Die neu hergestellte Verbindung reduziert die notwendige Anzahl von Molekülen, die für die Herstellung von photoaktivierbaren Fluorophor Quencher Systemen notwendig sind von drei (Fluorophor, Quencher und photolabile Verbindung) auf zwei (Fluorophor und neue Aminosäure als Linker).

In der Zukunft sollte der Mechanismus für die Fluoreszenzlöschung der neuen Aminosäure untersucht werden. Bisher wird nur vermutet, dass der Energietransfer über *contact quenching* abläuft. Ebenfalls sollte eine Erweiterung auf andere Chromophore versucht werden. In einer weiteren Kooperation wurden zwischenzeitlich erste Versuche unternommen, die hergestellten Tripeptide an Amino-modifizierte DNA-Stränge zu konjugieren. In diesem Projekt soll untersucht werden, ob die neu hergestellten Fluoreszenzsonden modifiziert an Oligonukleotide zum Verfolgen von mRNA Verteilung in Zellen genutzt werden können.

Abschließend kann ebenso die Synthese der ursprünglich geplanten Peptide nochmals versucht werden. Die Probleme in der Festphasensynthese waren auf die ausschließlich dort eingesetzten Parameter zurückzuführen, weshalb eine systematische Änderung in diesen Parametern beispielsweise durch Änderung des verwendeten Festphasenmaterials die Schwierigkeiten der Stabilität der Aminosäure lösen könnten. Alternativ könnten auch zwei Fragmente per Festphasensynthese hergestellt werden, die anschließend in Lösung an die neue Aminosäure gebunden werden.

3.3 Photoaktivierbare Click-SELEX

3.3.1 Vorarbeiten und Projektidee

Die Entwicklung von Aptameren für Proteine steht vor der Herausforderung, dass die natürlichen Nucleobasen für die Wechselwirkung mit einem Großteil an humanen Proteinen über zu wenige unpolare Wechselwirkungen verfügen. Werden die Nucleobasen chemisch modifiziert, kann die benötigte Wechselwirkung eingeführt werden, doch es besteht das Risiko, dass die Kompatibilität der veränderten Oligonukleotide zu enzymatischen Prozessen verloren geht (siehe auch Kapitel 1.3). Die Firma *Caris Life Science* beauftragte daher Prof. Mayer eine Methode zu entwickeln, in der chemische Modifikationen so an Oligonukleotide gebunden werden, dass sie während des SELEX-Verfahrens bei der Selektion potentieller Aptamere temporär an den Oligonukleotiden enthalten sind. Vor den enzymatischen Schritten sollen sie entfernt werden können und vor der nächsten Selektionsrunde wieder an die mit potentiellen Aptameren angereicherte Oligonukleotidbibliothek gebunden werden.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Mayer konnten Alkin-modifizierte Desoxyuridinderivate mit den enzymatischen Schritten des SELEX-Prozesses kombiniert werden. Diese Bausteine können zur Modifikation vollständiger Oligonukleotidbibliotheken über Click-Chemie genutzt werden. Dies ist sowohl vor der ersten Selektionsrunde, als auch in angereicherten Bibliotheken möglich. Eine Anreicherung kann in diesen Systemen jedoch nur erfolgen, solange die modifizierten Oligonukleotide PCR kompatibel sind. Um Zugang zu prinzipiell jeder beliebigen chemischen Modifikation zu erhalten, wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Heckel gestartet, um Moleküle herzustellen, die

1. eine neue chemische Modifikation in die DNA einbringen,
2. per Click-Chemie an Alkin-modifizierte DNA gebunden werden können,
3. photochemisch gespalten werden können, so dass die Modifikation vor enzymatischen Schritten entfernt werden kann.

Solche Moleküle sollten im Rahmen des dritten Projekts dieser Dissertation synthetisiert werden.

Neben einer Indolmodifikation, die in Anlehnung an die Aminosäure Tryptophan als neue Wechselwirkung zu bestimmten Zielproteinen gedacht war, sollte ein Maleimid als chemische Modifikation hergestellt werden. Über das Maleimid sollten beliebige Thiole an die Oligonukleotide

gebunden werden können. Für die Click-Chemie mit Alkinen mussten die neuen Verbindungen über ein Azid verfügen und schließlich sollten das Azid und die neue chemische Modifikation über eine photolabile Gruppe verbunden sein. Diese Gruppe ermöglicht die lichtinduzierte Abspaltung der chemischen Modifikation von der DNA. Mit diesen Überlegungen wurde ein erstes Zielmolekül entworfen und retrosynthetisch analysiert (Abb. 72).

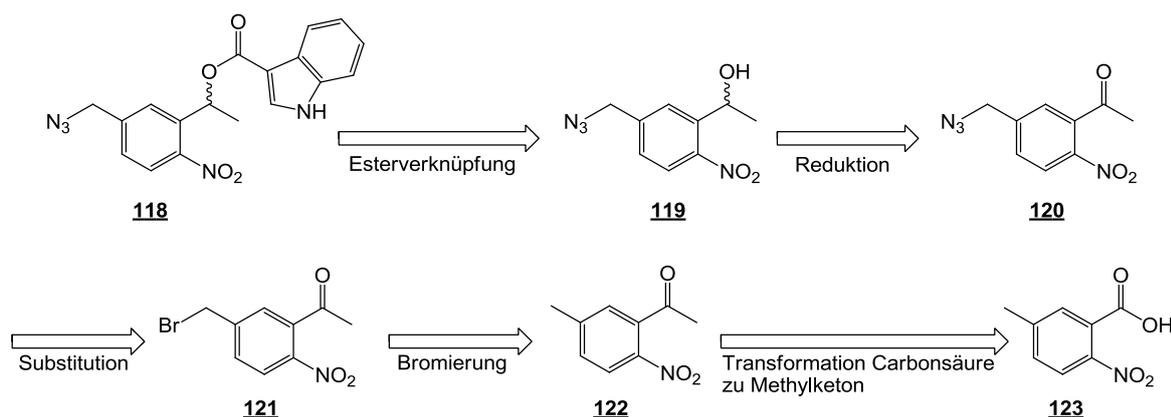


Abb. 72: Retrosynthetische Überlegung zur Synthese des ersten Zielmoleküls, das eine neue chemische Modifikation (hier das Indol) über Click-Chemie in Alkin-modifizierte DNA einführt und die Modifikation lichtinduziert von den Oligonukleotiden abspalten werden kann.

3.3.2 Synthese des ersten Zielmoleküls Azidomethyl-NPE-Indol

Ausgehend von der kommerziell erhältlichen 2-Nitro-5-methylbenzoesäure konnten die ersten Syntheseschritte in Anlehnung an bereits publizierte Vorschriften erfolgen.^[130,131] Die Carbonsäure wurde mit Thionylchlorid zum Säurechlorid umgesetzt, das anschließend in einer Abwandlung einer Grignard-Reaktion mit Diethylmalonat reagierte und nach Decarboxylierung die ursprüngliche Carbonsäure in das Methylketon transformierte. Nach radikalischer Bromierung, die als Nebenprodukt auch die zweifach bromierte Spezies enthielt, wurde das Bromid durch Natriumazid substituiert und das Keton durch Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert (Abb. 73 a). Die geplante Kupplung der Indol-3-carbonsäure an den Alkohol schlug jedoch fehl. Alle Versuche die Säure mit dem Alkohol unter Standard-Kupplungsbedingungen oder über Mitsunobu-Reaktion zu verknüpfen, ergaben ausschließlich das eingesetzte Edukt. Gleiches zeigte sich auch für die Umsetzung des

Alkohols mit dem Säurechlorid der Indol-3-carbonsäure, weshalb die Versuche mit diesem Indol-Derivat eingestellt wurden (Abb. 73 b).

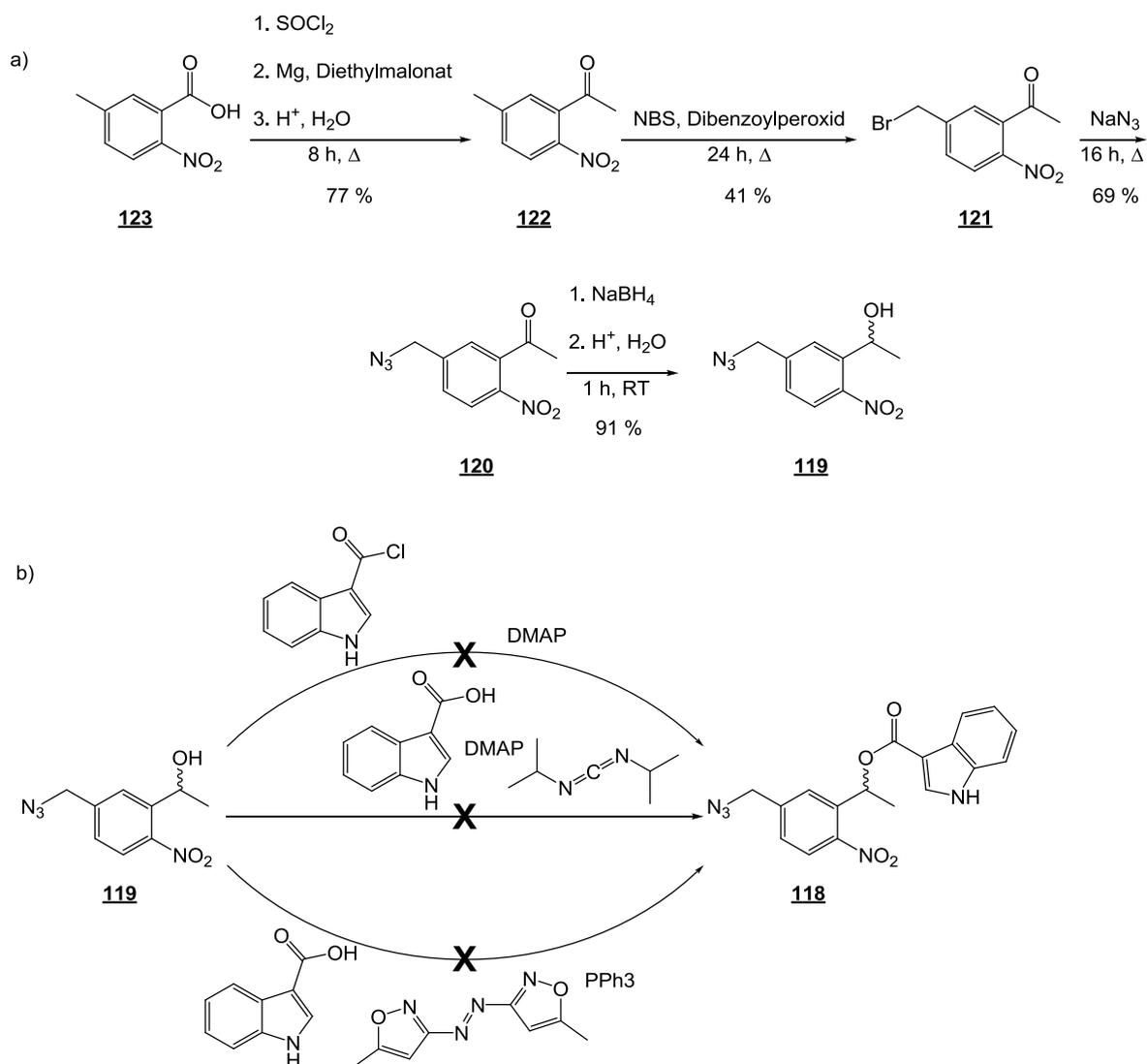


Abb. 73: a) Die erfolgreichen ersten Syntheseschritte des neuen Bausteins erfolgten in Anlehnung an publizierte Vorschriften.^[130,131] b) Die ursprünglich geplante Esterverknüpfung zwischen dem Indolbaustein und der photolabilen Gruppen lief unter verschiedenen Bedingungen nicht ab.

Alternativ wurde in den folgenden Reaktionen eine Verknüpfung des Alkohols mit Tryptamin untersucht. Nach einiger Optimierung wurde der Alkohol zunächst mit Hilfe von DSC in einen Aktivester überführt, der anschließend mit Tryptamin zum gewünschten Produkt reagierte. Der erfolgreiche Reaktionsweg zur ersten Zielverbindung ist in Abb. 74 zusammengefasst.

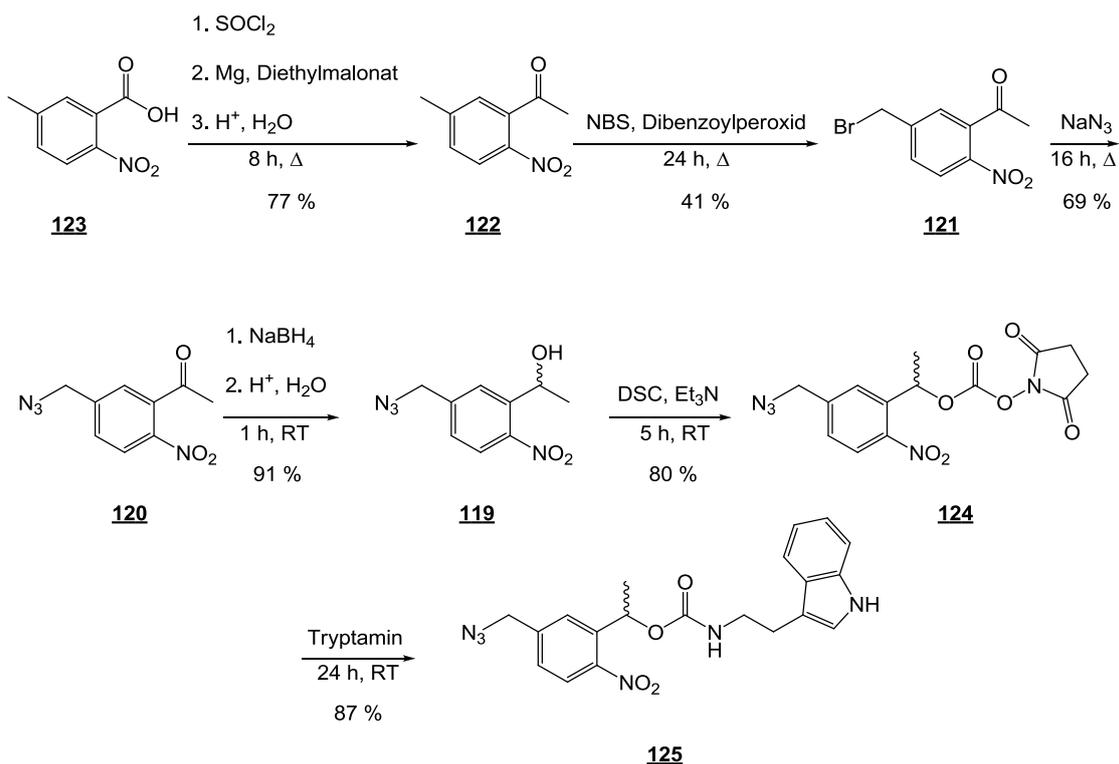


Abb. 74: Synthese des ersten photoaktivieren Click-SELEX-Bausteins, der die temporäre Einführung eines Indols in Oligonukleotidbibliotheken erlaubt.

Wenige Milligramm der säulenchromatographisch gereinigten Endverbindung wurden abschließend nochmals per HPLC gereinigt und zum Einsatz während des SELEX-Verfahrens an Fabian Tolle von der Arbeitsgruppe von Prof. Mayer geschickt.

Die hergestellte Verbindung spaltet sich bei der Photoreaktion so von der DNA ab, dass der Nitrosoaromat an der DNA verbleibt (Abb. 75). Um einen möglichst unmodifizierten Strang nach der Spaltung zu erzeugen, wurde in einer zweiten Synthese versucht, Azid und Indol zu vertauschen. Bei diesem Molekül sollte nach der Photolyse nur ein kurzer Alkylaminrest an der DNA verbleiben.

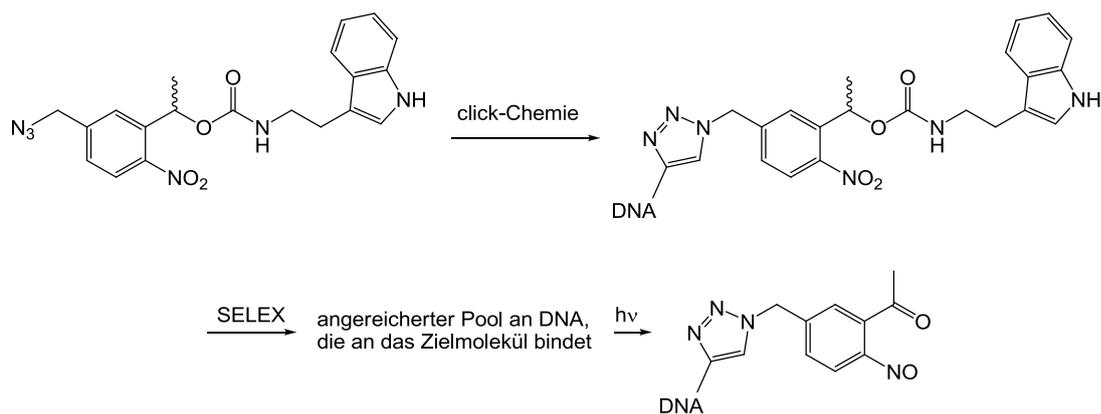


Abb. 75: Bei der Photolyse des ersten Moleküls verbleibt der Nitrosoaromat an den Oligonukleotiden. Aus diesem Grund wurde alternativ ein weiteres Molekül synthetisiert, in dem Indol und Azid in ihrer Position vertauscht sind.

3.3.3 Synthese des zweiten Zielmoleküls Indol-NPE-Azid

Um die Position der Indol- und Azid-Modifikation zu vertauschen, wurde die erfolgreiche Synthese für die erste Verbindung (Abb. 74) leicht modifiziert und wiederum in Anlehnung an bereits publizierte Synthesen, das einfach bromierte Keton direkt mit Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert.^[130] Die erhaltene Verbindung wurde anschließend in einer Mikrowelle mit Indol umgesetzt. Anschließend wurde der Alkohol in einen Aktivester überführt. Das für die Folgereaktion notwendige Azid-Amin-Derivat wurde aus Bromethyamin und Natriumazid hergestellt. Die Reaktion diesesamins mit dem Aktivester ergab das zweite Zielmolekül (Abb. 76).

Das zweite Zielmolekül hinterlässt nach der Photolyse neben dem Triazolring aus der Click-Chemie nur einen Ethylamin Rest an den Oligonukleotiden. Dieser kleine Rückstand an den DNA Strängen sollte mit enzymatischen Schritten kompatibel sein.

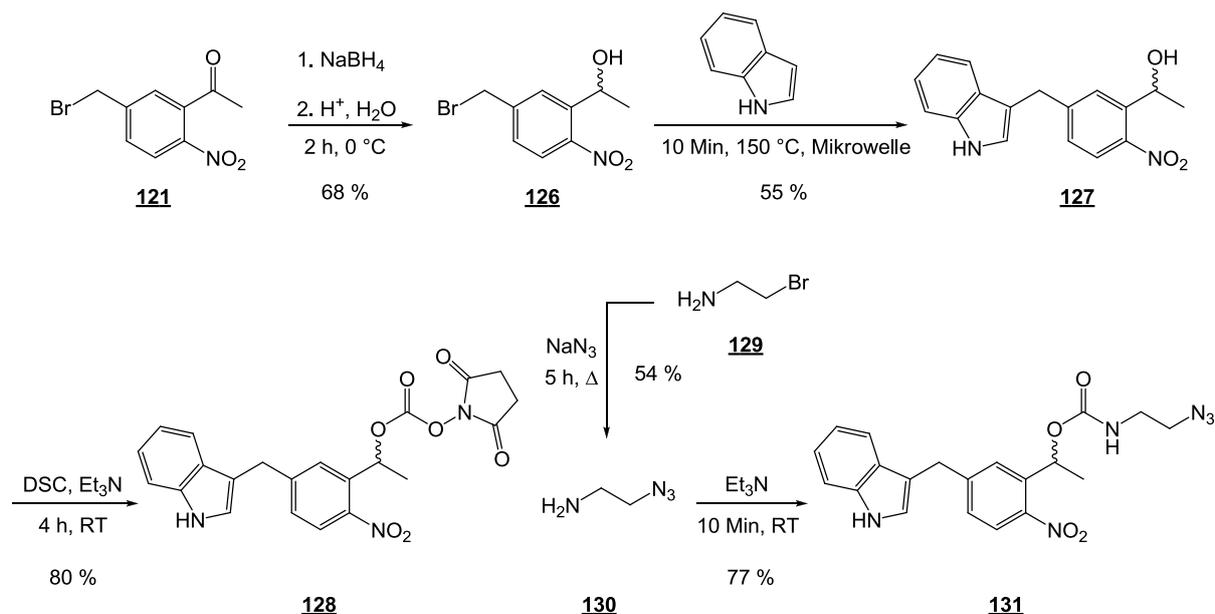


Abb. 76: Synthese der zweiten photolabilen Verbindung die einen Indol Rest per Click-Chemie an Oligonukleotide einführen kann. Nach Photolyse verbleibt neben dem Triazolring aus der Click-Chemie nur ein Ethylamin Rest an den Oligonukleotiden.

3.3.4 Synthese von Maleimid modifizierten Molekülen

Neben der Herstellung von zwei Verbindungen, die über Click-Chemie ein lichtspaltbares Indol in DNA einführen können, wurden ebenfalls Experimente durchgeführt, um auf die gleiche Art und Weise ein Maleimid an Oligonukleotide zu binden. Verschiedene Reaktionen unter Standard-Kupplungsbedingungen oder Mitsunobu-Reaktionen mit NPE-Alkohol **119** und verschiedenen geschützten oder freien Maleimiden zeigten keinerlei Umsetzung zu den gewünschten Produkten (Abb. 77 a). Eine erste erfolgreiche Verknüpfung zwischen dem NPE-Gerüst und einem als Diels-Alder Produkt mit Furan geschütztem Maleimid konnte durch Aktivierung des Maleimids als Aktivester und Reaktion mit dem zum Amin reduzierten NPE-Azid erfolgen (Abb. 77 b). Die entstandene Verbindung ließ sich jedoch auch als Aktivester nicht mit Aminen zum gewünschten Endprodukt weiter umsetzen.

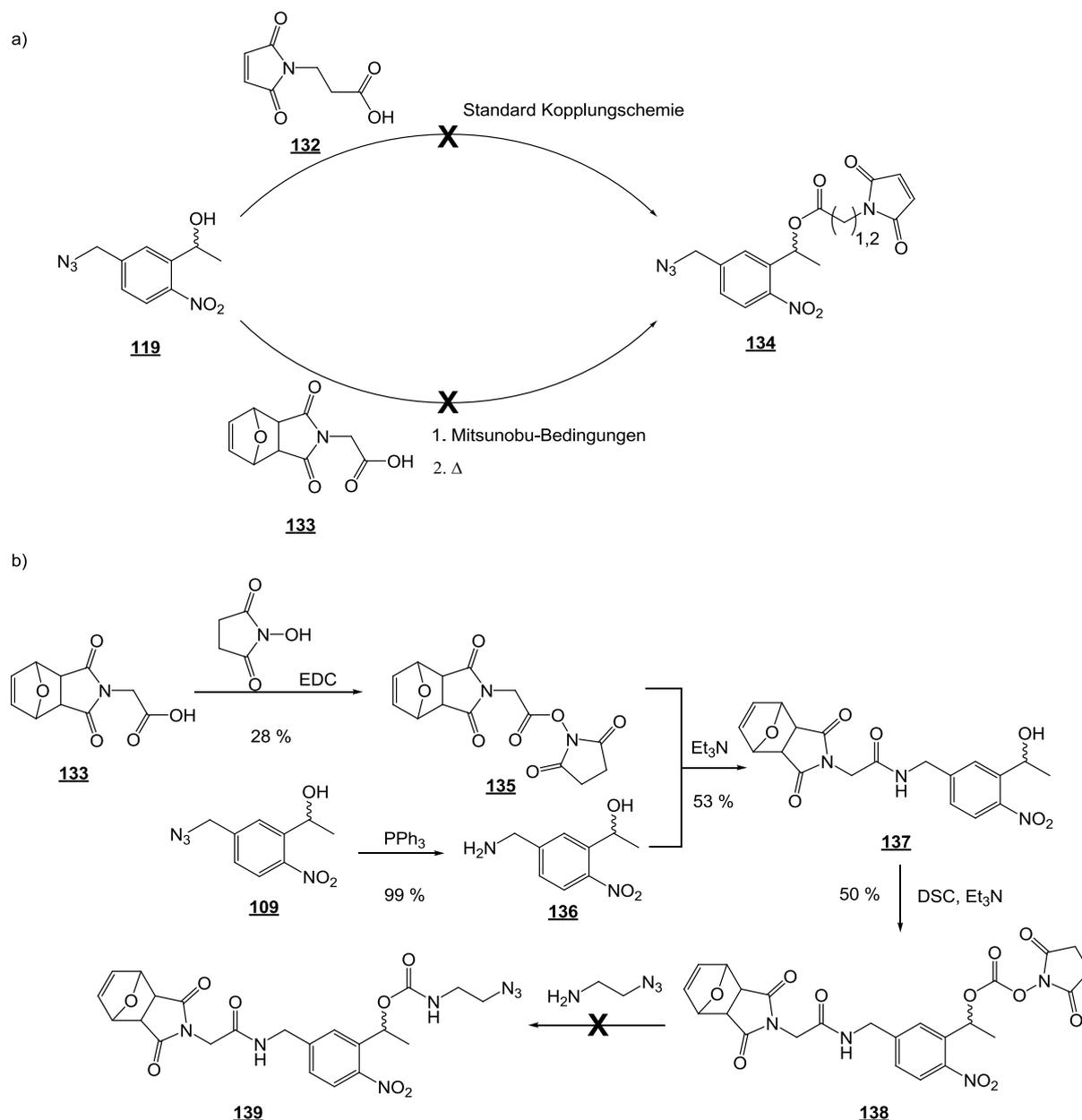


Abb. 77: Verschiedene getestete Reaktionen, um Maleimide mit dem NPE-Gerüst zu verbinden. a) Eine Verknüpfung des Alkohols mit unterschiedlichen Maleimid Carbonsäuren war unter verschiedenen Bedingungen nicht erfolgreich. b) Nachdem eine erste Verknüpfung gelang, lies sich das erhaltene Produkt nach Aktivierung als Aktivester nicht wie gewünscht mit Aminen umsetzen.

Alternativ wurde in einer weiteren Reaktion 1-(5-(Brommethyl)-2-nitrophenyl)ethanol **126** mit geschütztem Maleimid in einer Substitutionsreaktion umgesetzt. Anschließend wurde die Furan-Schutzgruppe in einer Retro-Diels-Alder-Reaktion unter Erhitzen entfernt. Der resultierende Alkohol wurde als NHS-Ester aktiviert und wiederum mit Azidaminen zur Reaktion gebracht. Nachdem diese Reaktion ebenfalls nicht zum gewünschten Produkt führte, wurde sie unter verschiedenen Bedingungen mehrfach wiederholt und der Reaktionsverlauf über NMR verfolgt. Bei einer 1:1

Stöchiometrie aus Aktivester und Amin war nach einer Stunde kein NHS Ester mehr im NMR zu detektieren. Wurde das gleiche Reaktions-NMR nach 24 h wieder gemessen hatten sich 50 % der zunächst gebildeten Substanz wieder zersetzt. Wurden die Reaktionen mit oder ohne Temperatur am Rotationsverdampfer eingengt, konnte ein Farbumschlag beobachtet werden, der auf eine Folgereaktion und damit die Zersetzung des gewünschten Produkts hindeutete. Um auszuschließen, dass die Stabilität durch die zugesetzt Base Triethylamin gestört wird, wurde die Reaktion ohne Base wiederholt. Da die gleichen Ergebnisse erzielt wurden, kann das Stabilitätsproblem auf die beiden Gruppen Maleimid und Azid zurückgeführt werden. Obwohl Moleküle mit Maleimid- und Azid-Funktionalität literaturbekannt sind,^[132] berichten kommerzielle Anbieter von Azid-Maleimid-Linkern von einer schnellen Zersetzungsreaktion auch bei tiefen Temperaturen, weshalb die Verbindungen frisch hergestellt direkt weiter umgesetzt werden müssen.^[133] Daher wurde in einer letzten Reaktion die Umsetzung mit einem deutlichen Überschuss an Amin untersucht. In diesem Fall konnte ein stabiles Produkt isoliert werden, in dem neben einer Substitution am Aktivester zusätzlich eine Addition an das Maleimid stattfand (Abb. 78).

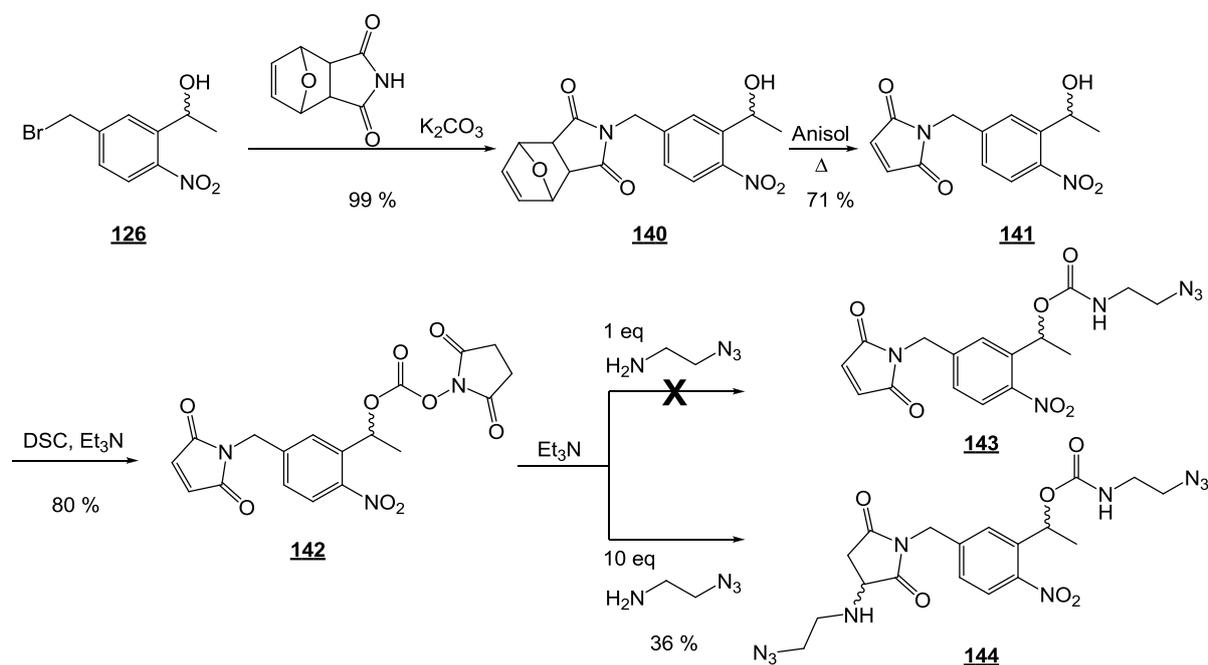


Abb. 78: Bei einer weiteren Synthese zu einem NPE-Azid, das zusätzlich Maleimid modifiziert war, konnte gezeigt werden, dass Maleimid und Azid im gleichen Molekül nicht stabil waren. Das gewünschte Produkt zersetzte sich bei Versuchen, es zu isolieren. Ein deutlicher Überschuss an Nucleophilen, die neben dem Aktivester auch das Maleimid angreifen, ergab eine stabile Verbindung, die zum Nachweis des kurzzeitigen gewünschten Produkts herangezogen wurde.

Die hergestellte Verbindung zeigte, dass eine NPE, das gleichzeitig ein Azid und ein Maleimid trägt, nicht stabil hergestellt und isoliert werden kann. Nichtsdestotrotz kann die gewünschte Verbindung als Zwischenprodukt entstehen und direkt mit einem Nukleophil zum gewünschten Produkt umgesetzt werden.

3.3.5 SELEX-Ergebnisse

Im Rahmen einer Masterarbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Mayer erste Untersuchungen mit den photospaltbaren Indolmodifikationen und Alkin-modifizierter DNA durchgeführt. Dabei konnte ein Protokoll etabliert werden, dass eine annähernd quantitative Ausbeute im Rahmen der Click-Chemie mit den Oligonukleotidbibliotheken erlaubt.^[74] Ebenso erfolgreich konnten die Indolgruppen photochemisch wieder entfernt werden. Probleme ergaben sich jedoch bei den Versuchen, Oligonukleotide im Verlauf der SELEX anzureichern. Zu viele DNA-Stränge zeigten eine ausreichend hohe Wechselwirkung mit den Zielproteinen, weshalb keine erfolgreiche SELEX erreicht werden konnte. Erst nach einer Umstellung der genutzten Alkin-Modifikation von 5-Octa-1,7-diänyldU **36** zu 5-Ethynyl-dU **35** (Abb. 24) konnte eine Anreicherung an Oligonukleotiden beobachtet werden. Durch das C8-Alkin und den Linker der Indolmodifikation besaßen die Verbindungen eine zu hohe Flexibilität, so dass der strukturelle Einfluss der Oligonukleotide auf die Wechselwirkung mit dem Zielprotein vernachlässigbar klein war. Die Umstellung auf das kürzere C2-Alkin schränkte die Flexibilität so weit ein, dass nun nur noch wenige Oligonukleotide eine ausreichend hohe Affinität zu den Zielproteinen aufwiesen. Die neue Alkin-Modifikation erforderte jedoch eine wiederholte Anpassung in den Bedingungen für die Click-Chemie. Der Verlust an Beweglichkeit führte ebenso zu einer schlechteren Reaktivität mit Aziden. Fabian Toll, der Kollaborationspartner aus der Gruppe von Prof. Mayer, konnte diese Bedingungen nach einigen Versuchen so weit optimieren, dass eine durchschnittliche Ausbeute über 95 % erzielt werden konnte. Neben einer SELEX gegen Oligonukleotide, die mit dem photospaltbaren Indol modifiziert sind, soll zusätzlich auch eine SELEX gegen das Photolyseprodukt durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde ebenfalls eine Probe von 2-Azidoethylamin **130** an den Kooperationspartner verschickt, das nach Bindung an die DNA dem Photolyseprodukt entspricht. Eine erfolgreiche SELEX sowohl gegen DNA, die das photospaltbare Indol trägt, als auch gegen DNA, die das Photolyseprodukt enthält, könnte Anwendungen erlauben, in denen Aptamere von einem Zielmolekül zu einem anderen Zielmolekül durch Belichtung geschaltet werden könnten. Zum Ende dieser Dissertation waren die Arbeiten an diesem Projekt noch nicht abgeschlossen.

3.3.6 Zusammenfassung

Für die photospaltbare Modifikation von Oligonukleotiden über Click-Chemie konnten zwei neue Verbindungen hergestellt werden, die eine temporäre Modifikation von Oligonukleotiden mit Indol erlauben. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Isolierung von Maleimid-NPE-Azid nicht möglich ist. Die Verbindung neigt, wie in der Literatur für andere Maleimid-Azide beschrieben, zu einer schnellen Zersetzungsreaktion. Vorläufer dieser Verbindung lassen sich jedoch herstellen. Der Baustein kann somit in einer Reaktion zum instabilen Produkt und direkt weiter mit den gewünschten Nukleophilen umgesetzt werden, um verschieden substituierte photospaltbare Verbindungen zu generieren, die über Click-Chemie an die DNA gebunden werden können.

Die neu hergestellten Verbindungen werden weiterhin von den Kollaborationspartnern untersucht. Bisher konnten Bedingungen für eine erfolgreiche Click-Chemie gefunden werden sowie eine prinzipielle Anreicherung an neuen Aptameren gegenüber Zielverbindungen, gegen die mit bisherigen Methoden kein Aptamer generiert werden konnte, beobachtet werden. Die photochemische Aktivität der neuen Verbindungen konnte ebenfalls demonstriert werden. Die vollständige SELEX von Aptameren sowohl von Oligonukleotiden mit dem photospaltbaren Indol als auch von Oligonukleotiden, die das Photolyseprodukt tragen, dauert noch an.

4 Experimenteller Teil

4.1 Allgemeine Geräte und Materialien

Lösungsmittel und Reagenzien

Kommerziell erhältliche Chemikalien wurden überwiegend von den Firmen *ChemPUR*, *AlfaAesar*, *TCl*, *abcr* und *Sigma-Aldrich* bezogen und ohne weitere Reinigung genutzt. Bei Synthesen wurden überwiegend wasserfreie Lösungsmittel von *AcroSeal* oder *Sigma-Aldrich* genutzt, die über 4 Å Molekularsieb gelagert wurden. Lösungsmittel zur säulenchromatographischen Reinigung waren von analytischer Qualität (*pro analysi*). HPLC Lösungsmittel entsprachen der Reinheit HPLC oder ultra HPLC. Aktiviertes Zink wurde von *Rieke Metals* bezogen. Alle Farbstoffe wurden bei der Firma *ATTO-TEC* erworben. MilliQ-Wasser wurde mit einem MilliQ Plus Gerät von *MilliPore* mit Kartuschen von *Siemens* aus destilliertem Wasser aufgearbeitet.

Dünnschichtchromatographie

Die Kontrolle des Reaktionsverlaufs erfolgte mit DC-Kieselgelplatten 60 mit Fluoreszenzindikator 254 der Firmen *Merck* oder *Machery Nagel*. Die Detektion erfolgte bei 254 und 365 nm. In seltenen Fällen wurden anstatt Kieselgelplatten Aluminiumoxid (Alox) Platten der Firma *Riedel-de-Haën* genutzt. Zum Anfärben von Reaktionskontrollen, die Amine enthielten, wurde eine Ninhydrin-Lösung genutzt (0,6 g Ninhydrin, 2 mL Eisessig, 13 mL Wasser und 420 mL *n*-Butanol).

Präparative Säulenchromatographie

Zur Reinigung der Rohprodukte über Normalphasen-Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 mit Korngrößen 0,04 – 0,063 mm der Firma *Machery Nagel* genutzt.

Komplexverbindungen wurden über Kationentauscher *CM Sephadex C-50* von *Sigma-Aldrich* oder Anionentauscher *QAE Sephadex A25* von *GE Healthcare* gereinigt. Die Harze wurden entsprechend der Herstellerinformationen aufgequollen und genutzt.

Trennung über Aluminiumoxid (Alox) erfolgte über neutrales Alox der Aktivitätsstufe V.

NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopische Untersuchung aller hergestellten Verbindungen erfolgte an AM250 (^1H : 250 MHz, ^{13}C : 63 MHz), DPX250 (^1H : 250 MHz, ^{13}C : 63 MHz), AV300 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz), AV400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz) und AV500 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz) Geräten der Firma *Bruker*. Die verwendete Messfrequenz ist bei jedem Experiment angegeben. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in DMSO- d_6 , CDCl_3 oder CD_3CN von *Deutero* mit einem Deuterierungsgrad $\geq 99,8$ % durchgeführt. Die Spektren sind auf die Lösungsmittelsignale kalibriert (CDCl_3 $^1\text{H} = 7,26$, $^{13}\text{C} = 77,16$; DMSO- d_6 $^1\text{H} = 2,50$, $^{13}\text{C} = 39,52$; CD_3CN $^1\text{H} = 1,94$, $^{13}\text{C} = 1,32, 118,26$).^[134] Die angegebenen Multipletts sind mit s für Singulett, d für Dublett, dd für Dublett vom Dublett, ddd für Dublett vom Dublett, t für Triplet, dt für Dublett vom Triplet, q für Quartett, quint für Quintett, m für Multiplett und br s für breites Singulett abgekürzt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm (*parts per million*) und die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben. Für komplizierte Zuordnungen wurden ergänzende Spektren ausgewertet ($^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC und $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC).

Massenspektrometrie

Zur Bestimmung von ESI Massen wurde ein Gerät von *Fisons* mit einer *VG-Plattform II* mit Quadrupol-Analysator im positiv und negativ Modus genutzt. MALDI Spektren wurden auf einem Flugzeit-Massenspektrometer VOYAGER DE-PRO von *Applied Biosystems* im linearen Modus gemessen. Hochaufgelöste Massen wurden an einem MALDI Orbitrap XL Gerät der Firma *Thermo* aufgenommen. Als Matrices wurden 2,5-Dihydroxybenzoesäure und α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure verwendet.

Oligonukleotidmassen wurden mit einem ESI microTOF-Q Gerät der Firma *Bruker* im Negativmodus bestimmt.

Elementaranalyse

Die Messung wurde an einem Vario Micro Cube der Firma *Elementar Analysesysteme* durchgeführt. Die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff wurden vermessen und die Angabe der Elementarzusammensetzung erfolgt in Prozent.

RP-HPLC

HPLC-Reinigung wurde mit Hilfe von MultoKromRP-C18 Säulen der Firma *CS-Chromatographie Service* mit einem Durchmesser von 250 * 4,6 mm (Flussrate 1 mL/Min) oder 250 * 8 mm (Flussrate 4 mL/Min) durchgeführt. Ein Gerät des Typs Technologies Serie 1200 von *Agilent* mit Diodenarray-Detektor zur Aufnahme vollständiger UV-Vis-Spektren im Bereich von 190 nm bis 640 nm wurde genutzt. Die genauen Bedingungen der unterschiedlichen Methoden sind in den jeweiligen experimentellen Teilen der Projekte erläutert.

UV-Vis-Spektrometer

Konzentrationsbestimmungen von Oligonukleotiden und Farbstoff-modifizierten Peptiden erfolgten an einem Nanodrop 2000 Spectrophotometer von *Thermo Scientific*. Zur Messung wurde 1 µL Probenvolumen genutzt. Gleichzeitig wurden an diesem Gerät auch UV-Vis-Spektren im Bereich 190 - 840 nm aufgenommen.

4.2 Lichtinduzierte Leitfähigkeit entlang von Oligonukleotiden

4.2.1 Projektbezogene Geräte und Materialien

Oligonukleotid-Synthese

Reagenzien und Festphasenmaterial für die DNA Synthese wurden von den Firmen *Applied Biosystems*, *Mallinckrodt Baker*, *Chemgenes Corporation*, *Link Technologies*, *AzcoBiotech* sowie *Glen Research Corporation* bezogen. Vollständige Oligonukleotide wurden bei den Unternehmen *IBA* oder *Biospring* bestellt.

Die Oligonukleotid-Synthese wurde an einem *ABI 392 RNA/DNA Synthesizer* von *Applied Biosystems* durchgeführt. Die Synthese erfolgte auf *ABI LV200* Polystyrensäulen oder *ABI 1* μmol 500 Å CPG-Säulen. Als Standard-Phosphoramidite wurden dA^{Bz} , dG^{dmf} , dC^{Ac} und dT genutzt. Ihre Konzentration betrug 0,1 M in Acetonitril. Als Aktivatorlösung diente entweder 0,25 M Ethylthiotetrazol (ETT) in CH_3CN oder 0,3 M Benzylthiotetrazol (BTT) in Acetonitril. Die Detritylierung erfolgte mit 3 % Trichloressigsäure in DCM. Zur Schützung der nicht abreagierten 5'-OH-Gruppen wurde eine Mischung aus 10 % Essigsäureanhydrid und 10 % 2,6-Lutidin zusammen mit einer Lösung aus 16 % 1-Methylimidazol in THF verwendet. Die Oxidation erfolgte mit einer Mischung aus 3 % Iod, 2 % Wasser und 20 % Pyridin in THF.

Oligonukleotide, die im DMTr-off Modus hergestellt wurden, wurden auf der festen Phase direkt für eine weitere Reaktion genutzt.

Zum Abspalten der Oligonukleotide von der festen Phase und zum Entfernen der Schutzgruppen an den Nukleobasen wurden die Synthesen in ein Eppendorfgefäß überführt und mit einer 33 %igen wässrigen Ammoniak Lösung versetzt (200 μL für 200 nmol Synthesemaßstab). Das Festphasenmaterial wurde entweder über Nacht bei RT (ca. 16 h) oder für 4 h in einem Thermoschüttler bei 65°C mit der Abspaltlösung versetzt. Die Ammoniaklösung wurde mit Hilfe von Zentrifugal-Filtern (*VWR*, 0,45 μm , 500 μL) vom Festphasenmaterial getrennt und in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt (*Concentrator plus* von *Eppendorf*). Das Oligonukleotid wurde in 100 μL MilliQ Wasser gelöst und per HPLC gereinigt. Wurde die Synthese im DMTr-On Modus ausgeführt, wurden die Produktfraktionen bei Raumtemperatur für 20 Minuten mit 100 μL 80 % wässriger

Essigsäure versetzt. Abschließend wurde die Essigsäure im Vakuum entfernt und der Rückstand HPLC gereinigt.

Gefriertrocknung

Zur schonenden Trocknung von Verbindungen wurde ein Gefriertrockner des Typs Alpha 2-4 der Firma *Christ* verwendet. Die Probe wurde in destilliertem Wasser gelöst, mit flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend gefriergetrocknet.

Größenausschlusschromatographie

Zur Entsalzung von Komplexverbindungen wurden C18 Sep-Packs von *Waters* genutzt. Die Trennung von Oligonukleotiden von kleinen Molekülen erfolgte über *illustra NAP-25* oder *illustra MicroSpin G-25* Säulen von *GE Healthcare* entsprechend der Herstellerinformationen.

Fluoreszenzspektrometer

Fluoreszenzmessungen wurden an einem F4500 Fluorescence Spectrophotometer von *Hitachi* durchgeführt. Die Proben wurden bei 450 nm angeregt und die Emission von 500 –700 nm detektiert.

Lichtquellen

Die Belichtung von Proben bei 365 nm wurde entweder an einem individuell hergestellten Gerät durchgeführt, das von drei verschiedenen Seiten mit 100 mW LEDs belichtete, oder an einem Multi-LED Gerät, das eine 250 mW LED enthielt.

Die Belichtung während elektrochemischer Messungen wurde mit Hilfe einer 365 nm LED und einer LED-Steuerungseinheit von *Thorlabs* durchgeführt. Die Belichtungsdauer wurde über eine externe Quelle kontrolliert.

Oligonukleotid HPLC-Gradienten

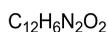
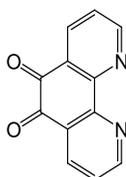
Oligonukleotide wurden mit einer Mischung aus A: Acetonitril und B: 0,1 M TEAA Puffer pH 7,0 gereinigt. Es wurden drei Gradienten genutzt.

Methode 1			Methode 2			Methode 3		
Zeit [Min]	A	B	Zeit [Min]	A	B	Zeit [Min]	A	B
0	5	95	0	5	95	0	5	95
2	5	95	2	5	95	40	25	75
35	40	60	40	25	75	50	50	50
37	100	0	45	100	0	55	100	0

4.2.2 Chemische Synthesen

4.2.2.1 Synthese des Liganden Me₂dppz (43)^[79]

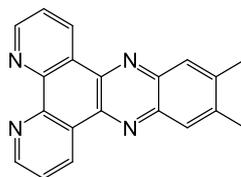
1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (42)



210,2

In 62,5 mL (1,04 mol) 20 %igem Oleum wurden unter Eiskühlung 12,5 g (63 mmol) 1,10-Phenanthrolinmonohydrat gelöst und auf 110 °C erhitzt. Anschließend wurden 17 mL (0,38 mol) 65 %ige HNO₃ zugetropft und die Lösung für 30 Minuten unter Rückfluss auf 145 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf 115 °C wurden weitere 34 mL (0,75 mol) Salpetersäure hinzugegeben und die Lösung für 1,5 h gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion auf Eis gegossen und mit 30 %iger Natronlauge neutralisiert. Entstandener Feststoff (Hauptprodukt der Reaktion Nitrophenanthrolin) wurde abfiltriert und das Filtrat mit DCM extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert, um 1,31 g (10 %) des gewünschten Produkts zu erhalten.

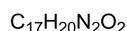
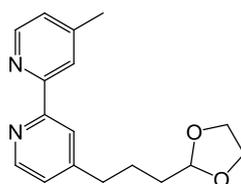
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 9,12 (dd, ³J_{HH} = 4,7, ⁴J_{HH} = 1,7, 2H, H_{ar}), 8,51 (dd, ³J_{HH} = 7,9, ⁴J_{HH} = 1,7, 2H, H_{ar}), 7,59 (dd, ³J_{HH} = 7,9, ³J_{HH} = 4,7, 2H, H_{ar}).

11,12-Dimethyldipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazin (Me₂dppz, 43)

310,4

0,5 g (2,4 mmol) 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion wurden in 27 ml Ethanol bei 78 °C gelöst. Anschließend wurden 0,61 g (4,5 mmol) 4,5-Dimethylbenzol-1,2-diamin, gelöst in 11 ml Ethanol, langsam hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 Minuten bei 78 °C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur gekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde gesammelt, um 0,65 g (87 %) des gewünschten Produkts zu erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 9,63 (dd, ³J_{HH} = 4,3, ⁴J_{HH} = 1,7, 2H, H_{ar}), 9,26 (dd, ³J_{HH} = 4,3, ⁴J_{HH} = 1,7, 2H, H_{ar}), 8,0 (s, 2H, H_{ar}), 7,78 (dd, ³J_{HH} = 7,9, ⁴J_{HH} = 3,6, 2H, H_{ar}), 2,6 (s, 6H, 2x CH₃).

4.2.2.2 Synthese des Liganden bpy'^{OMe} (49)^[80]**4-[3-(1,3-Dioxolan-2-yl)propyl]-4'-methyl-2,2'-bipyridin (46)**

284,4

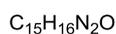
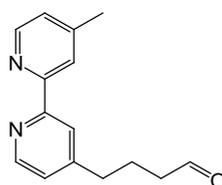
23,0 g (124,9 mmol) 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin wurden unter einer Ar-Atmosphäre in 300 mL trockenem THF gelöst und auf -78°C gekühlt. 57,5 mL einer 2 M Lösung aus LDA in THF (115 mmol) wurden langsam hinzuge tropft und die Mischung für 1,5 h bei -78°C gerührt. Anschließend wurden 25 g (138 mmol) 2-(3-Bromopropyl)-1,3-dioxolan hinzugegeben und die Reaktion wurde über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Das Lösungsmittelvolumen wurde im Vakuum auf ca. 100 mL reduziert. Diese wurden mit 100 mL Wasser versetzt und die entstandene Mischung fünfmal mit je 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde getrocknet, das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Alox, Gradient von 2:1 Cyclohexan: Diethylether zu 1:1). 12 g (37 %) Produkt wurden isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 8,55 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,3$, 2H, H_{ar}), 8,29 – 8,22 (m, 2H, H_{ar}), 7,19 – 7,12 (m, 2H, H_{ar}), 4,88 (t, $^3J_{\text{HH}} = 4,6$, 1H, CH), 4,00 – 3,79 (m, 4H, 2 CH_2), 2,76 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$, 2H, CH_2), 2,44 (s, 3H, CH_3), 1,90 – 1,67 (m, 4H, 2 CH_2).

ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M}+\text{H}]^+ = 285,2$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 307,1$.

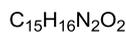
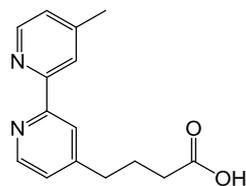
4-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)butanal (**47**)



240,3

11,6 g (40,9 mmol) 4-[3-(1,3-Dioxolan-2-yl)propyl]-4'-methyl-2,2'-bipyridin wurden in 250 mL 1M HCl gelöst und für zwei Stunden bei 60°C gerührt. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur gekühlt, mit NaHCO_3 neutralisiert und dreimal mit je 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt zu 9,8 g (97 %) erhalten. Die Verbindung konnte ohne weitere Arbeitsschritte direkt weiter umgesetzt werden.

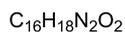
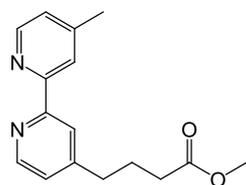
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 9,79 (m, 1H, COH), 8,57 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$, $^4J_{\text{HH}} = 5,0$, 2H, H_{ar}), 8,31 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$, 2H, H_{ar}), 7,19 – 7,16 (m, 2H, H_{ar}), 2,77 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$, 2H, CH_2), 2,55 – 2,49 (m, 2H, CH_2), 2,47 (s, 3H, CH_3), 2,06 (quint, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$, 2H, CH_2).

4-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)butansäure (48)

256,3

9,8 g (40,8 mmol) 4-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)butanal wurden in 150 mL Aceton gelöst. 5,8 g (37,6 mmol) KMnO_4 wurden portionsweise hinzugegeben und die Reaktion für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 100 mL Wasser für zwei Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung über Nacht bei 4°C gelagert. Die Reaktion wurde über Celite filtriert, um den entstandenen Niederschlag zu entfernen. Die Celite wurden zweimal mit 100 mL NaHCO_3 gewaschen und anschließend der pH-Wert der wässrigen Phase mit 1 M HCl auf 4,8 eingestellt. Anschließend wurde viermal mit je 100 mL DCM extrahiert, die organische Phase mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in wenig DCM gelöst und mit n-Hexan versetzt, bis sich ein Niederschlag bildete. Nach Kristallisieren über Nacht wurde der Niederschlag isoliert und getrocknet, um 6,7 g (64 %) an Produkt zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 8,56 - 8,51$ (m, 2H, H_{ar}), 8,23 (m, 2H, H_{ar}), 7,28 (m, 2H, H_{ar}), 2,67 – 2,72 (m, 2H, CH_2), 2,41 (s, 3H, CH_3), 2,00 – 1,80 (m, 4H, 2 CH_2).

Methyl 4-(4'-methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)butanoat (bpy'^{OMe}, 49)

270,3

6,7 g (26,3 mmol) 4-(4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)butansäure wurden in 120 mL Methanol gelöst und mit 3 mL konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wurde für fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde bei reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in 50 mL wässriger NaHCO_3 Lösung aufgenommen. Die Lösung wurde dreimal mit 50 mL DCM extrahiert. Die

organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Alox, reines DCM), um 6,2 g (85 %) an Produkt zu erhalten.

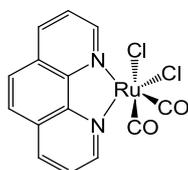
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,54$ (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$, $^4J_{\text{HH}} = 5,0$, 2H, H_{ar}), $8,25 - 8,23$ (m, 2H, H_{ar}), $7,13$ (d, $^3J_{\text{HH}} = 4,9$, 2H, H_{ar}), $3,66$ (s, 3H, OMe), $2,74$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,4$, 2H, CH_2), $2,43$ (s, 3H, CH_3), $2,36$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,4$, 2H, CH_2), $2,03$ (quint, $^3J_{\text{HH}} = 7,4$, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3): $\delta = 149,0$, $148,7$, $124,8$, $123,9$, $122,2$, $121,4$, $51,6$, $34,6$, $33,1$, $25,4$, $21,2$.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 271,14410$, gefunden $271,14486$ ($\Delta m = 0,00076$, Fehler 2,8 ppm).

4.2.2.3 Synthese des Ruthenium-Komplexes^[81]

[Ru(CO)₂Cl₂phen] (52)



408,2

50 mL 88 %ige Ameisensäure wurden für 10 Minuten mit Argon gespült. Anschließend wurden 4,0 g (15 mmol) Rutheniumtrichlorid (38 % Ru) und 2,0 g Paraformaldehyd hinzugegeben und die Mischung in einer Argonatmosphäre über Nacht auf 130°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung vor Licht geschützt für 24 h bei -80°C gelagert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Hexan und DCM gewaschen, um 2,4 g des Polymers $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2]_n$ zu erhalten.

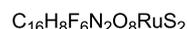
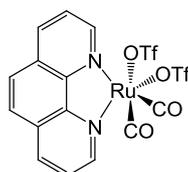
80 mL Methanol wurde für 10 Minuten mit Argon gespült. 3,6 g (20 mmol) 1,10-Phenanthrolin wurden in 48 mL des mit Ar gespülten Methanols gelöst und zum Zwischenprodukt gegeben. Die Lösung wurde für 15 Min auf 70°C erwärmt. Anschließend wurden die restlichen 32 mL des gespülten MeOH hinzugegeben und die Lösung wurde auf RT gekühlt. Das Produkt fiel beim Abkühlen aus. Das Rohprodukt wurde isoliert und in einer Mischung aus je 200 mL MeOH und CHCl_3 zum Sieden erhitzt. Die Lösung wurde heiß filtriert und anschließend im Vakuum eingedunstet, bis sich ein Niederschlag

bildete. Das Einengen wurde gestoppt und die Lösung zum Kristallisieren des Produkts über Nacht stehen gelassen. 1,84 g (30 %) Produkt wurden auf diesem Weg hergestellt.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 9,65$ (dd, $^3J_{\text{HH}} = 5,1$, $^4J_{\text{HH}} = 1,3$, 2H, H_{ar}), $9,02$ (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,3$, $^4J_{\text{HH}} = 1,3$, 2H, H_{ar}), $8,39$ (s, 2H, H_{ar}), $8,19$ (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,3$, $^4J_{\text{HH}} = 5,1$, 2H, H_{ar}).

ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M}+\text{Cl}]^- = 445,4$.

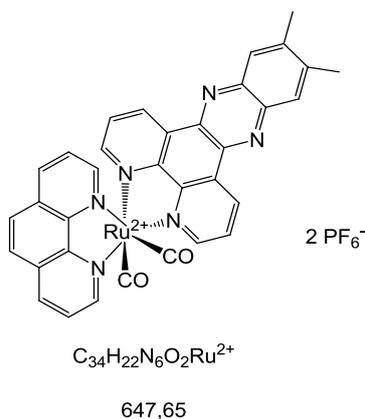
[Ru(CO)₂(OTf)₂phen] (53)



635,4

1,84 g (4,5 mmol) des Vorläuferkomplexes $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2\text{phen}]$ wurden unter einer Argonatmosphäre mit 5 g (33 mmol) Trifluormethansulfonsäure versetzt und für 90 Min bei 90°C gerührt. Die Mischung wurde anschließend für 15 Min bei -75°C gerührt, bevor 60 mL trockener und gekühlter Ether hinzugegeben wurden. Es entstand ein gummiartiger Feststoff. Die Lösung wurde über Nacht bei starkem Rühren im Kühlraum bei 4°C stehen gelassen, wobei ein Spatel durch das Septum der Reaktion gestochen war. Das starke Rotieren um den Spatel befreite Reste von Trifluormethansulfonsäure aus dem Feststoff, wodurch die gummiartige Konsistenz verschwand. Nach Filtrieren wurden 2,36 g (83 %) an Produkt isoliert. Das reaktive Produkt wurde sofort im nächsten Schritt weiter umgesetzt.

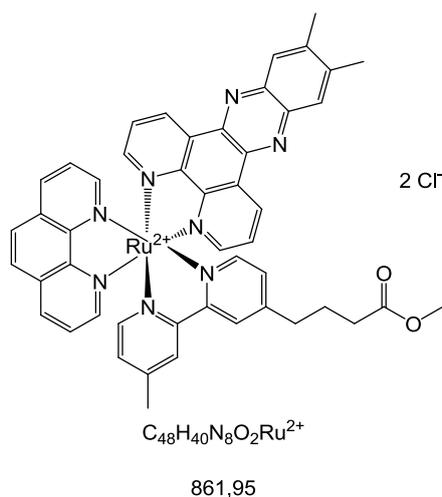
ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M}-2\text{OTf}+\text{Cl}]^- = 373,3$.

[Ru(CO)₂phen(Me₂dppz)] (54)

2,36 g (3,7 mmol) des reaktiven Komplexes [Ru(CO)₂(OTf)₂phen] wurden unter Ar in 34 mL Methylglycol unter leichtem Erwärmen auf 60°C gelöst. 1,38 g (4,4 mmol) des Liganden Me₂dppz wurden portionsweise hinzugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion für 2 h auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurden 10 mL einer gesättigten wässrigen NH₄PF₆-Lösung zur Reaktion hinzugegeben. Das Produkt fiel als schwerlösliches Salz aus, wurde filtriert, intensiv mit Wasser gewaschen und anschließend in wenig Acetonitril wieder gelöst. Tropfenweise wurde CHCl₃ hinzugegeben, bis das Produkt wieder ausfiel. Auf diesem Weg wurde das Produkt in quantitativer Ausbeute (2,4 g, 99%) erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 10,02 (dd, ³J_{HH} = 8,33, ⁴J_{HH} = 1,18, 1H, H_{ar}), 9,81 – 9,74 (m, 2H, H_{ar}), 9,68 (dd, ³J_{HH} = 8,18, ⁴J_{HH} = 1,28, 1H, H_{ar}), 9,26 (dd, ³J_{HH} = 8,38, ⁴J_{HH} = 0,95, 1H, H_{ar}), 8,90 (dd, ³J_{HH} = 8,28, ⁴J_{HH} = 1,14, 1H, H_{ar}), 8,58 – 8,27 (m, 6H, H_{ar}), 7,93 – 7,74 (m, 4H, H_{ar}), 2,67 (s, 3H, CH₃), 2,65 (s, 3H, CH₃).

ESI-MS: *m/z* gefunden [M+PF₆]⁺ = 792,4.

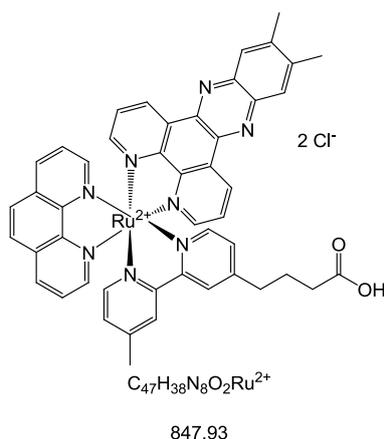
[Ru(phen)(Me₂dppz)(bpy^{OMe})] (55)

1,0 g (1,1 mmol) [Ru(CO)₂phen(Me₂dppz)] wurden zusammen mit 250 mg (3,2 mmol) frisch sublimiertem Trimethylamin-*N*-oxid und 440 mg (1,6 mmol) des Biphenyl-Liganden unter Argon in 20 mL Methylglycol gelöst und vor Licht geschützt auf 130 °C erhitzt. Entstandenes Trimethylamin wurde in einer Waschflasche mit 1 M HCl aufgefangen. Nachdem keine weitere Gasentwicklung zu beobachten war (2 h), wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und 50 mL Wasser hinzugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde isoliert und über Anionentauscher (QAE Sephadex A25, aufgequollen in 0,1 M NaCl) in das wasserlösliche Chloridsalz überführt. Anschließend wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Alox, Gradient von 0 bis 10 % H₂O in MeCN), um 510 mg (60 %) Produkt zu erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN): δ = 9,66 – 9,62 (m, 1H, H_{ar}), 9,59 – 9,55 (m, 1H, H_{ar}), 8,73 – 8,61 (m, 4H, H_{ar}), 8,41 – 8,28 (m, 4H, H_{ar}), 8,25 – 8,23 (m, 1H, H_{ar}), 8,18 – 7,68 (m, 8 H, H_{ar}), 7,61 – 7,55 (m, 1H, H_{ar}), 7,34 – 7,24 (m, 2H, H_{ar}), 3,60 – 3,58 (m, 3H, CH₃), 2,86 – 2,82 (m, 2H, CH₂), 2,65 – 2,59 (m, 9H, 3x CH₃), 2,46 – 2,40 (m, 2H, CH₂), 2,09 – 2,03 (m, 2H, CH₂).

ESI-MS: *m/z* gefunden [M]⁺ = 863,2, [M]²⁺ = 431,0.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C₄₈H₄₀N₈O₂Ru [M]⁺ = 862,23122, gefunden 862,23206 (Δ*m* = 0,00084, Fehler 1,0 ppm).

[Ru(phen)(Me₂dppz)(bpy')]₂Cl₂ (39)

150 mg (0,16 mol) des Komplexes [Ru(phen)(Me₂dppz)(bpy'^{OMe})] wurden in 20 mL 1M wässrigem Lithiumhydroxid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion in gleichen Teilen auf zwei 5 g Sep-Packs aufgeteilt, mit 150 mL Wasser gespült und das Produkt mit einer Mischung MeCN:0,1 % wässrige TFA 9:1 isoliert. Die entsalzte Probe wurde in wenig Methanol gelöst und durch die langsame Zugabe von Ether wieder gefällt. Das Produkt wurde isoliert, in 20 mL Wasser gelöst und gefriergetrocknet, um 100 mg (68 %) der sauberen Zielverbindung zu erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 12,17 (br s, 1H, COOH), 9,58 (d, ³J_{HH} = 7,9, 1H, H_{ar}), 9,47 (d, ³J_{HH} = 8,0, 1H, H_{ar}), 8,85 – 8,83 (m, 2H, H_{ar}), 8,78 – 8,73 (m, 2H, H_{ar}), 8,42 – 8,01 (m, 9H, H_{ar}), 7,97 – 7,94 (m, 1H, H_{ar}), 7,83 – 7,80 (m, 1H, H_{ar}), 7,74 – 7,71 (m, 2H, H_{ar}), 7,52 – 7,47 (m, 1H, H_{ar}), 7,31 – 7,23 (m, 2H, H_{ar}), 3,53 – 3,51 (m, 3H, CH₃), 2,80 – 2,78 (m, 2H, CH₂), 2,63 – 2,58 (m, 6H, 2 CH₃), 2,30 – 2,28 (m, 2H, CH₂), 1,94 – 1,90 (m, 2H, CH₂).

ESI-MS: *m/z* gefunden [M]²⁺ = 424,4.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C₄₇H₃₈N₈O₂Ru [M]⁺ = 848,21557, gefunden 848,21978 (Δ*m* = 0,00421, Fehler 4,9 ppm).

4.2.3 DNA Chemie

4.2.3.1 DNA-Komplex-Konjugate

Für die Kupplung der Komplexverbindungen wurden vier verschiedene DNA-Stränge je zweimal im 1 μ mol Synthesemaßstab im DMTr-off Modus hergestellt (Tab. 2).

Strang	Oligonukleotid (5' nach 3')
Rh-Strang	TGC AAG CTT CCG ACT
Ru-Strang matched	AGT CGG AAG CTT GCA
Ru-Strang mismatched	AGT CGG AAC CTT GCA
Ru-Strang caged	AGT CGG AAG ^{NPE} CTT GCA

Tab. 2: Synthetisierte DNA-Stränge für die Herstellung der DNA-Komplex-Konjugate.

Die Stränge wurden auf der festen Phase belassen und über die Kupplung von 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) und 1,9-Diaminononan am 5'-Ende Amino-modifiziert. Dazu wurden 50 mg CDI (0,31 mmol) in 1 mL trockenem Dioxan gelöst und zu zwei 1 μ mol Synthesen der entsprechenden DNA gegeben. Die Reaktion wurde eine Stunde bei RT gerührt, anschließend filtriert und das Festphasenmaterial intensiv mit Dioxan gespült. 44 mg des Diamins (0,28 mmol) wurden in einer 9:1 Mischung aus Dioxan und Wasser gelöst und zum aktivierten Oligonukleotid gegeben. Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Lösung und Festphasenmaterial wurden wieder getrennt und die feste Phase einmal mit 9:1 Dioxan Wasser, zweimal mit Dioxan und zweimal mit Methanol gewaschen. Eine analytische Probe jeder Reaktion wurde von der festen Phase abgespalten und nach HPLC Reinigung analysiert (Tab. 3).

Strang	Oligonukleotid (5' nach 3')	Massen berechnet [Da]	Massen gemessen [Da]
Rh-Strang	H ₂ N-C ₉ -TGC AAG CTT CCG ACT	4709,9	4710,2
Ru-Strang matched	H ₂ N-C ₉ -AGT CGG AAG CTT GCA	4799,0	4799,1
Ru-Strang mismatched	H ₂ N-C ₉ -AGT CGG AAC CTT GCA	4759,0	4759,7
Ru-Strang caged	H ₂ N-C ₉ -AGT CGG AAG ^{NPE} CTT GCA	4961,0	4962,4

Tab. 3: Hergestellte DNA-Stränge nach Aktivierung mit CDI und Modifikation mit Diaminononan. Die Aminomodifikation dient zur Kupplung der Komplexverbindungen an die Oligonukleotide.

Die Amino-modifizierten DNA-Stränge wurden anschließend mit dem jeweiligen Komplex umgesetzt. Dazu wurden 4,5 mg (11 µmol) HBTU, 1,9 mg (14 µmol) HOBt und 10 mg des Komplexes (ca. je 11 µmol) für 24 h am Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden die Verbindungen vor Licht geschützt, in einer Mischung aus 1 mL DMF und 80 µL (460 µmol) DIPEA gelöst und zu den 2 µmol Amino-modifizierter DNA gegeben. Unter Argon wurde die Reaktion für 3 h gerührt, bevor die feste Phase per Filtration isoliert und je dreimal mit DMF und MeOH gewaschen wurde. Die DNA-Komplex-Konjugate wurden für 4 h bei 60 °C mit konzentriertem Ammoniak entschützt, per HPLC gereinigt und massenspektrometrisch analysiert (Tab. 4).

Strang	Oligonukleotid (5' nach 3')	Massen berechnet [Da]	Massen gemessen [Da]	HPLC Retentionszeit [Min]
Rh-Strang	Rh-Komplex-HN-C ₉ -TGC AAG CTT CCG ACT	4709,9	4710,2	34,06, 37,29 (Methode 2)
Ru-Strang matched	Ru-Komplex-HN-C ₉ -AGT CGG AAG CTT GCA	4799,0	4799,1	34,55, 38,29, 42,57, 44,56 (Methode 3)
Ru-Strang mismatched	Ru-Komplex-HN-C ₉ -AGT CGG AAC CTT GCA	4759,0	4759,7	45,42, 46,12, 47,41 (Methode 3)
Ru-Strang caged	Ru-Komplex-HN-C ₉ -AGT CGG AAG ^{NPE} CTT GCA	4961,0	4962,4	35,81, 45,56 (Methode 3)

Tab. 4: DNA-Komplex-Konjugate zur Untersuchung der Leitfähigkeit entlang von DNA.

4.2.3.2 DNA Proben für Elektrochemie an Goldelektroden

Für die Untersuchung der Leitfähigkeit von Oligonukleotiden nach Bindung auf die Oberfläche von Goldelektroden wurden verschiedene DNA-Stränge synthetisiert, die am 5'-Ende mit einem Disulfid modifiziert waren (Tab. 5).

Strang	Oligonukleotid (5' nach 3')	Massen berechnet [Da]	Massen gemessen [Da]	HPLC Retentionszeit [Min]
Au-Strang matched 1	C ₆ -S-S-C ₆ -GTA ATT ACG ATA CGT CTT TC	6408,1	6408,2	22,46 (Methode 1)
Au-Strang mismatched 1	C ₆ -S-S-C ₆ -GTA ATT ACC TGA CGT CTT TC	6384,1	6384,1	23,02 (Methode 1)
Au-Strang ein cage 1	C ₆ -S-S-C ₆ -GTA ATT ACG ^{NPE} ATA CGT CTT TC	6557,2	6557,2	23,96 (Methode 1)
AU-Strang zwei cages 1	C ₆ -S-S-C ₆ -GTA ATT ACG ^{NPE} ATA CG ^{NPE} T CTT TC	6706,2	6706,2	25,58 (Methode 1)

Tab. 5: Hergestellte Oligonukleotide mit 5'-Disulfid Modifikation.

Diese Stränge können nach Disulfidspaltung mit den freien Thiolen auf Goldoberflächen binden. Für die Spaltung wurden die Stränge in 100 µL MilliQ Wasser mit 100 mM Tris pH 7,4 und 10 mM TCEP gelöst und 4 h bei RT gerührt. Die Proben wurden anschließend entweder über MicroSpin Säulen oder HPLC gereinigt.

Als Gegenstrang wurden mit C₆-Amin modifizierte DNA-Stränge kommerziell erworben. Die Stränge waren vollständig geschützt und HPLC gereinigt. Sie wurden entweder mit Ferrocen- oder Methylenblau-NHS-Ester umgesetzt. Ferrocen-NHS Ester wurde entsprechend der Literatur hergestellt.^[135] MB-NHS Ester wurde kommerziell erworben. Zwischen 100 und 130 nmol Oligonukleotid kam pro Reaktion zum Einsatz. Die DNA wurde in 20 µL frisch angesetztem 0,5 M NaHCO₃ / Na₂CO₃ Puffer pH 9,0 gelöst und 1 mg des jeweiligen NHS Esters gelöst in 50 µL DMSO dazu gegeben. Die Lösung wurde für 10 Minuten im Ultraschallbad geschwenkt und anschließend über Nacht bei RT gerührt.^[136] Die Reaktionen wurden im ersten Schritt über NAP25 Säulen entsprechend der Herstellerinformationen gereinigt und anschließend per HPLC die Produkte isoliert und analysiert (Tab. 6).

Strang	Oligonukleotid (5' nach 3')	Massen berechnet [Da]	Massen gemessen [Da]	HPLC Retentionszeit [Min]
Fc -Strang 1	Fc-HN-C ₆ -GAA AGA CGT ATC GTA ATT AC	6538,2	6538,1	18,87 (Methode 1)
MB-Strang 1	MB-HN-C ₆ -GAA AGA CGT ATC GTA ATT AC	6663,3	6663,3	16,94 (Methode 1)

Tab. 6: Die Gegenstränge für die Oligonukleotide, die an Goldelektroden binden können, sind mit je einer Redoxsonde für elektrochemische Messungen modifiziert.

In einem abschließenden Experiment wurde ein weiterer Doppelstrang analog zu den obigen Bedingungen hergestellt, der eine Abfolge von photolabilen Schutzgruppen in einem Strang trug (Tab.7).

Strang	Oligonukleotid (5' nach 3')	Massen berechnet [Da]	Massen gemessen [Da]	HPLC Retentionszeit [Min]
MB-Strang 2	MB-HN-C ₆ -GTT TTA CGC TAC TTC AGA ACT	6885,3	6885,1	16,27 (Methode 1)
Au-Strang matched 2	C ₆ -S-S-C ₆ -AGT TCT GAA GTA GCG TAA AAC	6804,2	6804,0	21,32 (Methode 1)
Au-Strang caged 2	C ₆ -S-S-C ₆ -AGT TCT GAA GTA GCG TA ^{NPE} A ^{NPE} A ^{NPE} A ^{NPE} C	7520,5	7520,3	34,28 (Methode 1)

Tab. 7: Weitere Variante für die Messung der Leitfähigkeit auf einer Goldelektrode. Als Redoxsonde wurde Metylenblau gewählt. Der auf der Goldelektrode zu immobilisierende Strang trug eine Abfolge von vier photolabilen Schutzgruppen in seiner Sequenz bzw. als Kontrollversuch keine Modifikation.

4.2.4 Fluoreszenzmessungen der dsDNA-Komplex-Konjugate

Zur Messung der Fluoreszenz der DNA-Komplex-Verbindungen wurden je 250 pmol der zu hybridisierenden Stränge in 50 µL einer Mischung aus 5 mM Tris und 50 mM NaCl pH 7,2 gelöst und für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Die Probe wurde im Anschluss langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und das Fluoreszenzspektrum gemessen.

4.2.5 Elektrochemie Messungen

Für die elektrochemische Untersuchung des Ladungstransfers entlang der DNA wurden die jeweiligen Disulfidstränge frisch gespalten und mit dem entsprechenden Gegenstrang versetzt. Die Konzentration des Thiol-Strangs wurde UV-Vis spektroskopisch auf 5 μM und die des Gegenstrangs auf 5,5 μM in einem wässrigen Puffer aus 10 mM Tris und 50 mM LiCl pH 8,4 eingestellt. Die Mischung wurde für 3 Min auf 85 °C erhitzt und anschließend langsam abgekühlt, damit der Doppelstrang hybridisieren konnte. Die Proben wurden anschließend an Sebastian Schneider vom Arbeitskreis von Prof. Terfort übergeben, der die elektrochemischen Messungen vorgenommen hat.

Die Proben wurden auf mit Gold beschichteten Silizium-(111)-Wafern immobilisiert. Die Wafer wurden direkt vor der Nutzung mit Caroscher Säure (3:1 konz. H_2SO_4 :30 % H_2O_2) gereinigt und mehrfach mit Reinstwasser gespült. Für jeden untersuchten Doppelstrang wurden 100 μL der dsDNA-Lösung auf ca. 1 cm^2 der Goldoberfläche aufgetragen und für 12 – 48 h bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss an die Immobilisierung wurde die Goldoberfläche mehrfach mit dem verwendeten wässrigen Puffer gespült und mit Druckluft (Stickstoff) getrocknet. Auf die gleiche Fläche wurde anschließend ein Verdünnungsthiol gegeben (1 mM Mercaptohexanol in einer Mischung aus 10 mM Tris und 50 mM LiCl pH 7,4) und wiederum für mindestens 16 h bei 4 °C immobilisiert. Anschließend wurden die Proben nochmals mit Puffer gespült und mit Druckluft getrocknet.

Die elektrochemischen Messungen wurden an einem Drei-Elektroden-Aufbau mit einem Ivium CompactStat Potentiostaten (*Ivium Technologies*) durchgeführt. Die Datenaufzeichnung und -auswertung erfolgte über die Software IviumSoft (Version 2.411). Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Arbeitselektrode wurden die modifizierten Substrate verwendet, Gegenelektrode war ein Platindraht und als Referenzelektrode diente eine Ag/AgCl-Pseudoreferenzelektrode. Auf die Arbeitselektrode wurde in dem Bereich der abgeschiedenen Probe eine selbstgebaute Messzelle gesetzt und mit 200 μL Puffer aufgefüllt (10 mM Tris und 50 mM LiCl pH 7,4), der vor Benutzung für mindestens 30 Minuten mit Argon gespült wurde. Gegen- und Referenzelektrode wurden vorsichtig in die Lösung eingebracht, ohne dass die Elektroden Kontakt zueinander hatten. Es wurden cyclovoltammetrische (CV) und Square Wave Voltammetrie (SWV) Messungen mit den verschiedenen Proben durchgeführt (Elektrochemie Ergebnisse sind im Anhang hinterlegt).

4.3 Zwei-Photonen aktivierbare Aminosäure

4.3.1 Projektbezogene Geräte und Materialien

HPLC Gradienten für Peptide

HPLC von Peptiden wurde mit einer Mischung aus A: Acetonitril und B: 0,1 % TFA in MilliQ Wasser durchgeführt. Eingesetzt wurden drei verschiedene Gradienten:

Methode 1			Methode 2			Methode 3		
Zeit [Min]	A [%]	B [%]	Zeit [Min]	A [%]	B [%]	Zeit [Min]	A [%]	B [%]
0	5	95	0	5	95	0	35	65
30	60	40	30	60	40	60	35	65
32	100	0	40	60	40	64	100	0
			42	100	0			

Lichtquellen

Die Belichtung von Proben mit UV-Strahlung wurde mit einem speziell hergestellten Multi LED Gerät mit LEDs von *Roither Lasertechnik* durchgeführt. Belichtet wurde mit einer Energie von 250 mW bei 365 nm. Die aktinometrische Bestimmung der Quantenausbeute erfolgte mit Hilfe einer 365 nm LED, einer LED-Steuerungseinheit und einem Küvettenhalter von *Thorlabs*. Die Belichtungsdauer wurde über eine externe Quelle kontrolliert.

Die Aufnahme der Zweiphotonenexperimente wurde an einem LSM 780 AxioObserver NLO mit einem C-Apochromat 63x/1,20 W Korr M27 Objektiv von *Zeiss* durchgeführt. Die Zwei-Photonen-Anregung erfolgte mit Hilfe eines Coherent Ultra II Lasers bei 780 nm. Die Fluoreszenz wurde über die Dauer dieser Messungen kontinuierlich durch einen zweiten Laser bei 561 nm angeregt.

Fluoreszenzmessungen

Fluoreszenzmessungen wurden an einem *TECAN* plate reader infinite M200 PRO im fluorescence top reading mode durchgeführt. Die Anregungswellenlänge war 530 nm (Spaltbreite 8 nm) und die Emission wurde von 560 – 850 nm (Spaltbreite 20 nm) aufgenommen.

Hydrogel Herstellung

Hydrogele wurden entsprechend der Herstellerinformationen von *Cellendes* mit dem Produkt 3D Life PVA-PEG hergestellt. 1,5 µL Wasser, 0,63 µL CB Puffer mit einem pH Wert von 5,5, 1,25 µL Mal PVA-Lösung, 1 µL Peptid-Lösung (118 pmol in HBS Puffer pH 7,5) und 1,87 µL PEG-Linker wurden in einer Kammer eines transparenten Deckglases miteinander vermischt. Das entstandene Hydrogel wurde mit 200 µL HBS Puffer pH 7,5 überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern.

Antikörper und Zellkultur

Experimente mit Antikörpern und Zellen wurden im Arbeitskreis von Prof. Heilemann von Kathrin Klehs durchgeführt.

Als Antikörper wurden die Fragmente $F(ab')_2$ des IgG (H + L) Anti-Maus Antikörpers von Ziegen von *Life Technologies* erworben (Chargennummer A10534). Im Anschluss an die Reaktion wurden die Antikörper per Größenausschluss-Chromatographie über illustra NAP-5 Säulen (*GE Healthcare*) gereinigt. Absorptionsspektren der Antikörper-Farbstoff Konjugate wurden an einem Cary 100 UV-Vis spectrometer (*Agilent*) gemessen.

Der primäre Maus Anti- β -Tubulin Antikörper wurde von *Invitrogen* bezogen.

U2OS Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Nährmedium F-12 (DMEM F-12) (3,15 g/L (+)D-Glucose, *Gibco, Life Technologies*) ergänzt mit 1 % GlutaMAX (*Gibco, Life Technologies*) und 10 % fetalem Kälberserum (*Gibco, Life Technologies*) bei 37 °C in 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert. Zellwachstum wurde einen Tag vor Fixierungsexperimenten auf 8-Kammer Trägerplatten durchgeführt (170 µm Dicke, *Sarstedt*, 1,5 x 10⁴ Zellen pro Kammer).

Mikroskopie

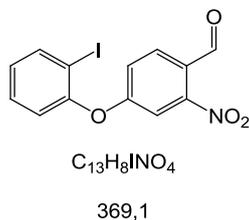
Mikroskopie wurde von Kathrin Klehs aus dem Arbeitskreis von Prof. Heilemann an einem eigens gebauten Weitfeldmikroskop durchgeführt, das für Einzelmolekül-Aufnahmen geeignet ist.^[137]

Ein 405 nm Diodenlaser (CUBE 405-100C, *Coherent*) und ein 568 nm Laser (Saphire 568 LP, *Coherent*) waren mit einem IX71 invertiertem Mikroskop (*Olympus*) verbunden, das mit einem Faktor 100 Immersionsobjektiv ausgestattet war (PLAPO 100x TIRFM, $NA \geq 1,45$, *Olympus*). Ein zusätzlicher Spiegel im Anregungspfad der Probe ermöglicht Anregung der Probe über Totalreflexion. Die Laserintensitäten wurden über Filter eingestellt (acousto-optic Filter, *AA Optics*). Die Probe wurde auf einem Objektivwechselrevolver (IX2-NPS, *Olympus*) fixiert. Anregungs- und Emissionsstrahlung wurden über Quad-Band Spiegel (HC Quad 410/504/582/669, *AHF Analysetechnik*) und einen Bandpassfilter (ET 605/52, *AHF Analysetechnik*) im Detektionspfad getrennt. Fluoreszenzsignale wurden auf einem 512 x 512 Pixel Chip einer EMCCD Kamera (*electron multiplying charge-coupled device*, iXon3, *Andor*) aufgenommen. Mit Hilfe der Kameralinsen wurde die Pixelgröße auf 160 nm eingestellt.

4.3.2 Chemische Synthesen

4.3.2.1 Synthese der Nitrodibenzofuran-Aminosäure

4-(2-Iodphenoxy)-2-nitrobenzaldehyd (**68**)^[106]



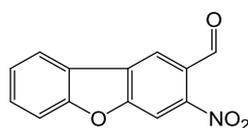
6,8 g (40,4 mmol) 4-Fluoro-2-nitro-benzaldehyd wurden in 100 mL Pyridin gelöst. 8,9 g (40,4 mmol) 2-Iodphenol, 5,8 g (40,4 mmol) Kupfer(I)bromid und 11,2 g (80,2 mmol) K_2CO_3 wurden hinzugefügt. Die Reaktion wurde unter einer Argonatmosphäre auf 60 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle, 16 h) wurde die Reaktion auf RT abgekühlt und das Pyridin im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 200 mL Ether gelöst, unlöslicher Feststoff abfiltriert und die Etherphase

nacheinander mit 200 mL 1M NaOH, 200 mL H₂O und 200 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch getrennt (CH:EE 20:1). Es wurden 12,1 g (81,2 %) Produkt isoliert.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 10,33 (s, 1H, COH), 7,98 (d, ³J_{HH} = 8,8, 1H, H_{ar}), 7,95 (dd, ³J_{HH} = 8,0, ⁴J_{HH} = 1,5, 1H, H_{ar}), 7,50 – 7,42 (m, 2 H, H_{ar}), 7,22 (dd, ³J_{HH} = 8,8, ⁴J_{HH} = 2,5, 1H, H_{ar}), 7,15 – 7,08 (m, 2H, H_{ar}).

ESI-MS: *m/z* gefunden [M-H]⁻ = 368.

3-Nitrodibenzofuran-2-carbaldehyd (71)



C₁₃H₇NO₄

241,2

12,0 g (32,5 mmol) 4-(2-Iodophenoxy)-2-nitrobenzaldehyd wurden in 150 mL Toluol gelöst. 10,9 mL (195 mmol) Ethylenglycol und 1,0 g *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (5,3 mmol) wurden hinzugegeben und die Reaktion anschließend unter Argon unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Umsetzung des Startmaterials (DC Kontrolle, 20 h) wurde die Reaktion mit 100 mL DCM verdünnt und mit 50 mL gesättigter NaHCO₃ extrahiert. Die wässrige Phase wurde noch dreimal mit 50 mL DCM gewaschen und die vereinigte organische Phase anschließend mit MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (CH:EE 5:1) gereinigt, um 8,2 g (61 %) des gewünschten Zwischenprodukts zu erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7,91 (dd, ³J_{HH} = 7,8, ⁴J_{HH} = 1,5, 1H, H_{ar}), 7,75 (d, ³J_{HH} = 8,6, 1H, H_{ar}), 7,45 – 7,35 (m, 2H, H_{ar}), 7,15 (dd, ³J_{HH} = 8,6, ⁴J_{HH} = 2,5, 1H, H_{ar}), 7,08 – 6,94 (m, 2H, H_{ar}), 6,40 (s, 4H, CH₂).

8,1 g (19,6 mmol) des Zwischenprodukts wurden in 40 mL Dimethylacetamid gelöst. Nach Zugabe von 12,8 g (39,2 mmol) Cs₂CO₃, 1,0 g (4,5 mmol) Pd(OAc)₂ und 1 mL H₂O wurde die Reaktion auf 80 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung (NMR Kontrolle, eine Woche) wurde die Reaktion über Celite filtriert und das Filtrat mit 80 mL EE verdünnt. Die organische Phase wurde dreimal mit 80 mL Wasser und einmal mit 80 mL gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand (5,4 g, 97 %) wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion genutzt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,38$ (s, 1H, H_{ar}), $8,18$ (s, 1H, H_{ar}), $8,06 - 8,02$ (m, 1H, H_{ar}), $7,68 - 7,54$ (m, 2H, H_{ar}), $7,48 - 7,41$ (m, 1H, H_{ar}), $6,63$ (s, 1H, CH), $4,12$ (s, 4H, CH_2).

5,3 g (18,6 mmol) 2-(1,3-Dioxolan-2-yl)-3-nitrodibenzofuran wurden in einer Mischung aus 50 mL THF und 40 mL 1M HCl gelöst und bei RT gerührt. Nach Umsetzung des Edukts (DC Kontrolle, 48 h) wurde die Reaktion dreimal mit 100 mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in warmem Chloroform gelöst und durch langsame Zugabe von n-Hexan kristallisiert. Das Produkt wurde in 2,8 g (63 %) Ausbeute isoliert.

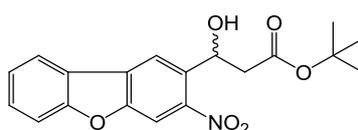
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 10,50$ (s, 1H, COH), $8,56$ (s, 1H, H_{ar}), $8,32$ (s, 1H, H_{ar}), $8,08$ (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$, 1H, H_{ar}), $7,71 - 7,63$ (m, 2H, H_{ar}), $7,52 - 7,48$ (m, 1H, H_{ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3): $\delta = 187,8$, $158,8$, $157,2$, $131,5$, $130,4$, $129,5$, $127,4$, $124,7$, $122,4$, $122,3$, $122,2$, $112,7$, $109,0$.

ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M-H}]^- = 239,5$, $[\text{M+H}]^+ = 242,6$, $[\text{M+Na}]^+ = 264,2$.

MALDI-HRMS: m/z berechnet $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_3$ $[\text{M-O+2H}]^+ = 227,05769$, gefunden $227,05790$ ($\Delta m = 0,00021$, Fehler 0,9 ppm).

***tert*-Butyl-3-hydroxy-3-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)propanoat (74)**



$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_6$

357,4

3,2 mL (22,4 mmol) *tert*-Butylchloroacetat wurden in einem ausgeheizten Kolben in 40 mL Ether gelöst und unter Argon auf 0 °C gekühlt. 58,4 mL einer Lösung aus 2,5 g Rieke Zink in 100 mL THF (22,4 mmol) wurden langsam hinzugetropfelt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Lösung innerhalb von 1 h langsam auf RT aufgewärmt. In einem zweiten ausgeheizten Kolben wurden 2,7 g (11,2 mmol) 3-Nitrodibenzofuran-2-carbaldehyd in 50 mL THF gelöst und unter Argon auf 0 °C gekühlt. Die erste Lösung wurde nun tropfenweise zur zweiten Lösung hinzugegeben. Nach Zugabe wurde noch eine Stunde bei 0 °C gerührt (DC Kontrolle zeigte kein Edukt mehr), bevor die Reaktion langsam auf RT aufgewärmt wurde. Die Reaktion wurde mit 100 mL 1 M HCl verdünnt und dreimal mit 100 mL EE

extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient von CH:EE 10:1 zu 1:1), um 3,9 g (98 %) des gewünschten Produkts zu erhalten.

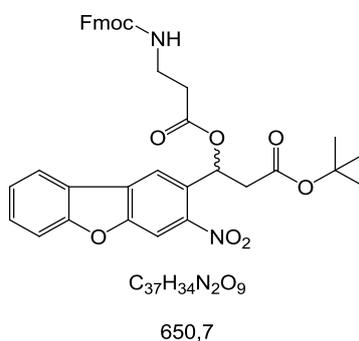
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 8,45 (s, 1H, H_{ar}), 8,20 (s, 1H, H_{ar}), 8,02 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$, $^4J_{\text{HH}} = 1,1$, 1H, H_{ar}), 7,65 – 7,54 (m, 2H, H_{ar}), 7,45 – 7,39 (m, 1H, H_{ar}), 5,77 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 9,2$, $^3J_{\text{HH}} = 2,7$, 1H, CH), 3,86 (br s, 1H, OH), 2,97 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 16,6$, $^3J_{\text{HH}} = 2,7$, 1H, CHH), 2,64 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 16,7$, $^3J_{\text{HH}} = 9,3$, 1H, CHH), 1,48 (s, 9H, $t\text{Bu-Me}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3): δ = 172,1, 158,6, 154,2, 146,0, 133,8, 129,6, 129,5, 124,0, 122,8, 122,0, 120,1, 112,4, 108,7, 82,1, 66,7, 43,9, 28,3.

ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M-H}]^- = 357,3$, $[\text{M+Na}]^+ = 380,6$.

EA: berechnet C: 63,86, H: 5,36, N: 3,92; gefunden C: 63,83 ($\Delta = 0,03$), H: 4,94 ($\Delta = 0,42$), N: 3,91 ($\Delta = 0,01$).

***tert*-Butyl-3-(3-(Fmoc)amino)propanoyloxy)-3-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)propanoat (85)**



3,8 g (10,6 mmol) *tert*-Butyl-3-hydroxy-3-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)propanoat wurden zusammen mit 4,9 g (15,9 mmol) Fmoc- β -alanin, 12,2 g (63,8 mmol) EDC und 390 mg (3,2 mmol) DMAP unter Argon in 100 mL DCM gelöst. Die Reaktion wurde vor Licht geschützt und bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle, 18 h) wurde die Reaktion auf Eis gegeben und dreimal mit EE extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde über Säulenchromatographie gereinigt (Gradient von CH:EE 10:1 zu 1:1). 4,2 g (61 %) des gewünschten Produkts wurden isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 8,60 (s, 1H, H_{ar}), 8,44 (s, 1H, H_{ar}), 8,33 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,9$, 1H, H_{ar}), 7,85 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$, 2H, 2x Fmoc-H), 7,78 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,3$, 1H, H_{ar}), 7,63 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$, 1H, H_{ar}), 7,58 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,4$, 1H, Fmoc-H), 7,55 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,4$, 1H, Fmoc-H), 7,45 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$, 1H, H_{ar}), 7,41 – 7,34 (m, 3H, 2x Fmoc-

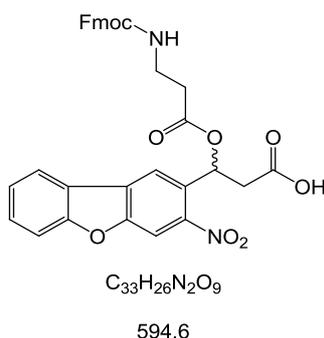
H, NH), 7,28 – 7,22 (m, 2H, 2x Fmoc-H), 6,52 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 5,4$, $^3J_{\text{HH}} = 2,8$, 1H, CH), 4,22 – 4,14 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4,07 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,8$, 1H, Fmoc-CH), 3,27 – 3,14 (m, 2H, CH₂), 3,06 – 2,99 (m, 2H, CH₂), 2,59 – 2,51 (m, 2H, CH₂), 1,40 (s, 9H, ^tBu-H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 172,3, 168,4, 157,7, 155,8, 153,5, 146,0, 143,7, 143,6, 140,7, 140,6, 130,0, 129,7, 128,6, 127,6, 127,5, 127,0, 126,9, 125,1, 125,0, 124,1, 122,6, 121,9, 120,7, 120,1, 120,0, 112,2, 108,7, 80,8, 68,9, 65,6, 49,3, 46,5, 41,4, 27,7, 16,7$.

ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 673,3$, $[\text{M}+\text{K}]^+ = 689,3$.

MALDI-HRMS: m/z berechnet C₃₇H₃₄N₂O₉Na $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 673,21565$, C₃₇H₃₄N₂O₉K $[\text{M}+\text{K}]^+ = 689,18959$, gefunden 673,21488 ($\Delta m = 0,00077$, Fehler 1,14 ppm) und 689,18978 ($\Delta m = 0,00019$, Fehler 0,27 ppm).

3-(3-(Fmoc)amino)propanoyloxy)-3-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)propanoat (**86**)



4,1 g (6,3 mmol) *tert*-Butyl-3-(3-(Fmoc)amino)propanoyloxy)-3-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)propanoat wurden in einer Mischung aus 30 mL DCM und 5 mL Trifluoressigsäure gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach Umsetzung des Edukts (DC Kontrolle, 3 h) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand dreimal mit 10 mL Toluol coevaporiert. Nach Trocknen am Hochvakuum wurden 3,5 g (93 %) sauberes Produkt erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 12,64$ (br s, 1H, COOH), 8,57 (s, 1H, H_{ar}), 8,43 (s, 1H, H_{ar}), 8,34 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$, 1H, H_{ar}), 7,85 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$, 2H, 2x Fmoc-H), 7,78 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,3$, 1H, H_{ar}), 7,63 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$, 1H, H_{ar}), 7,59 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,4$, 1H, Fmoc-H), 7,54 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,4$, 1H, Fmoc-H), 7,45 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$, 1H, H_{ar}), 7,41 – 7,33 (m, 3H, NH, 2x Fmoc-H), 7,29 – 7,22 (m, 2H, 2x Fmoc-H), 6,53 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$, $^4J_{\text{HH}} = 4,2$, 1H, CH), 4,24 – 4,12 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4,10 – 4,00 (m, 1H, Fmoc-CH), 3,29 – 3,13 (m, 2H, CH₂), 3,12 – 2,97 (m, 2H, CH₂), 2,58 – 2,52 (m, 2H, CH₂).

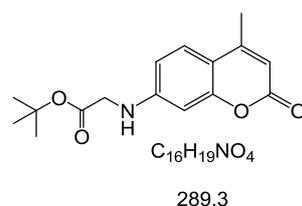
^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 171,3, 170,9, 158,1, 156,4, 153,9, 146,9, 144,3, 144,2, 141,1, 141,1, 130,5, 130,4, 129,0, 128,0, 127,5, 127,4, 125,5, 124,5, 123,3, 122,4, 121,2, 120,5, 112,6, 108,9, 68,5, 65,8, 47,1, 40,8, 40,4, 36,6, 34,4.

ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ = 613,1, $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 596,1.

MALDI-HRMS: m/z berechnet $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 617,15305, gefunden = 617,15298 (Δm = 0,00007, Fehler 0,11 ppm).

4.3.2.2 Synthese der Cumarin-Aminosäure

tert-Butyl(2,4-methyl-2-oxo-2-chromen-7yl-amino)acetat (95)

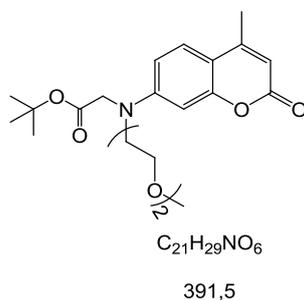


14,2 g (81,1 mmol) 7-Amino-4-methylcumarin wurden in 200 mL Acetonitril gelöst und nacheinander 2,4 g (16,2 mmol) Natriumiodid, 42 mL (81,1 mmol) DIPEA und 12 mL (81,1 mmol) *tert*-Butylbromoacetat hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 24 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Die Reaktion wurde filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum reduziert. Der Rückstand wurde mit 750 mL EE verdünnt und dreimal mit 150 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Gradient CH:EE 9:1 zu 1:1) und ergab 12,7 g (55 %) des gewünschten Produkts.

^1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 7,46 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8,7, 1H, H_{ar}), 6,89 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 6,3, 1H, NH), 6,63 (dd, $^3J_{\text{HH}}$ = 9,3, $^4J_{\text{HH}}$ = 2,3, 1H, H_{ar}), 6,39 (d, $^4J_{\text{HH}}$ = 2,2, 1H, H_{ar}), 5,95 – 5,94 (m, 1H, H_{ar}), 3,90 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 6,9, 2H, CH_2), 2,32 – 2,31 (m, 3H, CH_3), 1,42 (s, 9H, $^t\text{Bu-H}$).

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 169,6, 160,6, 155,4, 153,7, 152,0, 125,9, 110,3, 109,3, 108,0, 96,9, 80,9, 44,9, 27,7, 18,0.

***tert*-Butyl-2-((2-(2-methoxyethoxy)ethyl)(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)amino)acetat
(90)**



4,6 g (16 mmol) *tert*-Butyl(2,4-methyl-2-oxo-2-chromen-7yl-amino)acetat wurden in 20 mL Acetonitril gelöst. 19,1 g (160 mmol) 1-Brom-2-(2-methoxyethoxy)ethan, 7,8 g (24 mmol) Cs₂CO₃, 2,4 g (16 mmol) Natriumiodid und 1,0 g (3,2 mmol) Tetrabutylammoniumbromid wurden nacheinander mit dem Acetat vermischt und die Reaktion anschließend unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Die Reaktion wurde nach 10 Tagen gestoppt, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde in EE gelöst, zweimal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Säulenchromatographie gereinigt (Gradient CH:EE 3:1 zu 1:1). Auf diesem Weg wurden 2,3 g (35 %) des gewünschten Produkts isoliert.

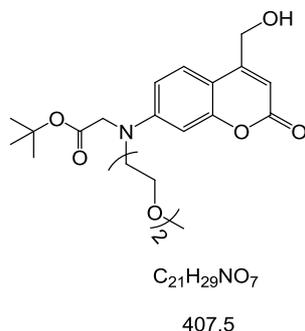
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,52 (d, ³J_{HH} = 9,0, 1H, H_{ar}), 6,66 (dd, ³J_{HH} = 9,0, ³J_{HH} = 2,4, 1H, H_{ar}), 6,51 (d, ⁴J_{HH} = 2,4, 1H, H_{ar}), 5,99 (d, ⁴J_{HH} = 1,0, 1H, H_{ar}), 4,19 (s, 2H, CH₂), 3,60 – 3,40 (m, 8H, 4x CH₂), 3,24 (s, 3H, CH₃), 2,34 (d, ⁴J_{HH} = 0,9, 3H, CH₃), 1,41 (s, 9H, ^tBu-H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 160,1, 160,6, 155,1, 153,5, 151,3, 126,0, 109,3, 108,9, 108,5, 97,7, 81,0, 71,3, 71,2, 69,7, 69,5, 68,1, 58,1, 52,8, 50,9, 27,7, 17,9.

ESI-MS: *m/z* gefunden [M+H]⁺ = 392,9, [M+Na]⁺ = 415,1.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet C₂₁H₂₉NO₆ [M]⁺ = 391,19894, gefunden = 391,19973 (Δ*m* = 0,00079, Fehler 2,0 ppm).

***tert*-Butyl-2-((4-(hydroxymethyl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl)(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)amino)acetat (**89**)**



2,18 g (5,59 mmol) *tert*-Butyl-2-((2-(2-methoxyethoxy)ethyl)(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)amino)acetat wurden zusammen mit 0,93 g (8,38 mmol) Selendioxid in 50 mL Xylol vermischt und unter Rückfluss für 24 h zum Sieden erhitzt. Die Reaktion wurde warm filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL MeOH gelöst. Portionsweise wurden 420 mg (11 mmol) Natriumborhydrid hinzugegeben und für eine Stunde bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 10 mL 1 M HCl und 40 mL Wasser verdünnt. Anschließend wurde das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt in DCM extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Gradient CH:EE 1:1 zu 1:3), um 1,4 g (61 %) des gewünschten Produkts zu erhalten.

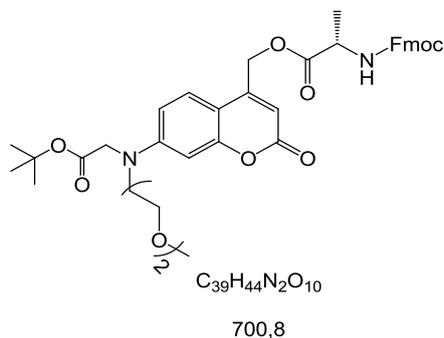
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,44 (d, ³J_{HH} = 9,0, 1H, H_{ar}), 6,62 (dd, ³J_{HH} = 9,0, ³J_{HH} = 2,5, 1H, H_{ar}), 6,52 (d, ³J_{HH} = 2,5, 1H, H_{ar}), 6,12 (s, 1H, H_{ar}), 5,53 (t, ³J_{HH} = 5,6, 1H, OH), 4,67 (dd, ³J_{HH} = 5,5, ³J_{HH} = 1,0, 2H, CH₂), 4,19 (s, 2H, CH₂), 3,59 (s, 4 H, 2x CH₂), 3,55 – 3,41 (m, 4H, 2x CH₂), 3,24 (s, 3 H, CH₃), 1,41 (s, 9 H, ^tBu-H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 169,1, 161,0, 160,6, 156,8, 155,1, 151,1, 124,8, 108,9, 106,8, 104,8, 97,7, 81,0, 71,3, 69,7, 68,1, 59,7, 59,0, 58,1, 52,8, 50,8, 27,7.

ESI-MS: *m/z* gefunden [M+H]⁺ = 409,2, [M+Na]⁺ = 431,2.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet C₂₁H₂₉NO₇ [M]⁺ = 407,19385, gefunden = 407,19299 (Δ*m* = 0,00086, Fehler 2,1 ppm).

(S)-(7-((2-tert-Butoxy-2-oxoethyl)(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)amino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl-3-Fmoc-aminopropanoat (96)



1,29 g (3,14 mmol) des Alkohol-Edukts wurden in 55 mL DCM gelöst und anschließend 1,42 g (4,6 mmol) Fmoc-L-Alanin, 3,70 g (19,3 mmol) EDC und 0,15 g (1,2 mmol) DMAP hinzugegeben. Das Gemisch wurde unter Lichtausschluss und Argonatmosphäre für drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 100 mL Eiswasser verdünnt und zweimal mit je 50 mL DCM sowie noch zweimal mit je 50 mL EE extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Gradient CH:EE 1:1 zu 1:3). 1,26 g (57 %) des gewünschten Produkts wurden isoliert.

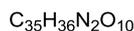
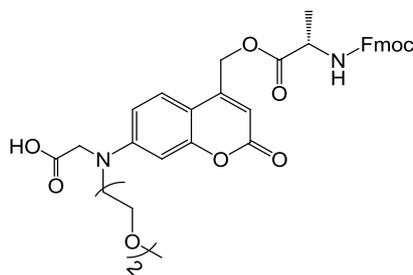
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,93 (d, ³J_{HH} = 7,3, 1H, NH), 7,88 (d, ³J_{HH} = 7,5, 2H, 2x Fmoc-H), 7,69 (d, ³J_{HH} = 7,4, 2H, 2x Fmoc-H), 7,46 (d, ³J_{HH} = 9,0, 1H, H_{ar}), 7,40 (t, ³J_{HH} = 7,3, 2H, 2x Fmoc-H), 7,31 (t, ³J_{HH} = 7,4, 2H, 2x Fmoc-H), 6,63 (dd, ³J_{HH} = 7,0, ⁴J_{HH} = 2,0, 1H, H_{ar}), 6,53 (d, ⁴J_{HH} = 2,0, 1H, H_{ar}), 6,09 (s, 1H, H_{ar}), 5,33 (s, 2H, CH₂), 4,41– 4,15 (m, 6H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, CH₂, CH), 3,58 (s, 4H, 2x CH₂), 3,53 – 3,40 (m, 4H, 2x CH₂), 3,23 (s, 3H, CH₃), 1,40 (s, 9H, ^tBu-H), 1,35 (d, ³J_{HH} = 7,3, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 172,3, 168,9, 160,4, 155,9, 155,2, 151,4, 150,2, 143,8, 143,7, 143,6, 140,7, 127,6, 127,0, 125,2, 125,1, 120,1, 109,0, 106,3, 106,1, 97,8, 81,0, 71,3, 69,7, 68,1, 65,7, 61,6, 58,1, 52,4, 50,8, 49,6, 46,7, 27,7, 16,8.

ESI-MS: *m/z* gefunden [M+H]⁺ = 701,9, [M+Na]⁺ = 723,9.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet C₃₉H₄₅N₂O₁₀ [M+H]⁺ = 701,30687, gefunden = 701,30685 (Δ*m* = 0,00002, Fehler 0,03 ppm).

(S)-2-((4-((3-Fmoc-aminopropanoyloxy)methyl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl)(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)amino)essigsäure (97)



644,7

570 mg (0,81 mmol) des geschützten Vorläufermoleküls wurden in 10 mL einer 1:1 Mischung aus DCM und Trifluoressigsäure gelöst und bei RT gerührt. Nach Abschluss der Reaktion (DC Kontrolle, 3 h) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert und abschließend säulenchromatographisch gereinigt (Gradient CH:EE 1:1 zu reinem EE). 300 mg (57 %) des Produkts wurden isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 12,73 (br s, 1H, COOH), 7,93 (d, 3J = 7,3, 1H, NH), 7,88 (d, 3J = 7,5 2H, H_{ar}), 7,69 (d, 3J = 7,4, 2H, 2x Fmoc-H), 7,47 – 7,29 (m, 5H, 4x Fmoc-H, NH), 6,66 (d, 3J = 6,8, 1H, H_{ar}), 6,55 (s, 1H, H_{ar}), 6,08 (s, 1H, H_{ar}), 5,33 (s, 2H, CH_2), 4,45 – 4,20 (m, 6H, Fmoc- CH_2 , Fmoc-CH, CH_2 , CH), 3,58 (s, 4H, 2x CH_2), 3,53 – 3,40 (m, 4H, 2x CH_2), 3,23 (s, 3H, CH_3), 1,35 (d, 2H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 172,4, 171,3, 160,4, 156,0, 155,3, 151,5, 150,3, 143,8, 143,7, 140,7, 127,6, 127,0, 125,2, 125,1, 120,1, 109,1, 106,2, 106,0, 97,8, 71,3, 69,8, 68,2, 65,7, 61,7, 58,1, 52,1, 50,8, 49,5, 46,6, 16,8.

ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M}+\text{H}]^+ = 646,1$, $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 667,8$.

MALDI-HRMS: m/z berechnet $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 645,24427$, gefunden = 645,24405 ($\Delta m = 0,00022$, Fehler 0,3 ppm).

4.3.3 Peptidsynthese

Für die Synthese der Peptide wurden Standardbedingungen, wie sie auch in der Peptid-Festphasensynthese genutzt werden, eingesetzt.

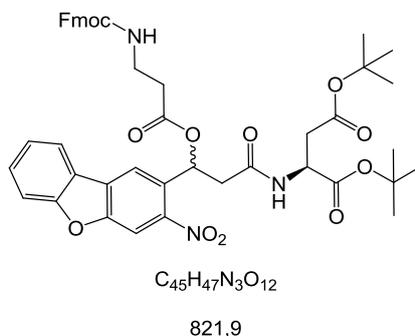
Durchführung A: 1 Äquivalent der Carbonsäure wurde in THF gelöst (40 mL pro 0,5 mmol) und nacheinander 1,1 Äquivalente HOBt, 1,1 Äquivalente EDC, 2 Äquivalente DIPEA und 1,1 Äquivalente des primären Amins hinzugegeben. Die Reaktion wurde unter Argon über Nacht bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 100 mL EE und 100 mL Wasser gelöst. Die organische Phase wurde separiert und zweimal mit 100 mL H₂O, dreimal mit 60 mL 10 %iger wässriger Natriumcarbonat Lösung und einmal mit 50 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Durchführung B: Das Fmoc geschützte Startmaterial wurde in einer Mischung aus 4 mL DMF und 1 mL Piperidin gelöst und für 30 Minuten bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Durchführung C: Das Startmaterial wurde in einer Mischung aus je 100 µl DCM, 80 µl Trifluoressigsäure und 20 µl H₂O pro mg Edukt gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand dreimal mit 200 µl Toluol coevaporiert.

4.3.3.1 Synthese des Tripeptids ATT0565 – Asp – NDBF-AS – Asp

(S)-Di-*tert*-butyl-2-(3-(3-Fmoc-amino)propanoyloxy)-3-(3-nitrodibenzo[b,d]furan-2-yl)propanamido)succinat (**102**)



Nach Methode A wurden aus 715 mg (1,2 mmol) 3-(3-(Fmoc)amino)propanoyloxy)-3-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)propanoat und 370mg (1,3 mmol) L-Asparaginsäure-di-*tert*-butylester Hydrochlorid 940 mg (95 %) des gewünschten Produkts hergestellt.

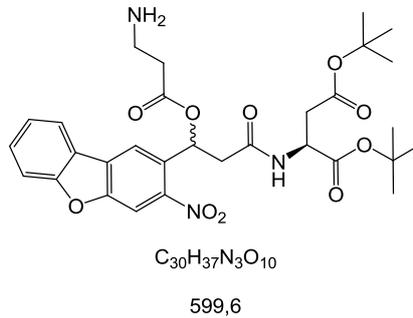
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 8,49 (d, 1H, ³J = 6,1, H_{ar}), 8,45 – 8,38 (m, 2H, NH, H_{ar}), 8,34 (d, 1H, ³J = 7,7, H_{ar}), 7,85 (d, 2H, ³J = 8,1, 2x Fmoc-H), 7,78 (d, 1H, ³J = 8,3, H_{ar}), 7,63 (t, 1H, ³J = 7,7, H_{ar}), 7,58 (d, 1H, ³J = 7,6, Fmoc-H), 7,56 (dd, 1H, ³J = 7,7, ⁴J = 2,4, Fmoc-H), 7,45 (m, 1H, H_{ar}), 7,38 (t, 2H, ³J = 7,5, 2x Fmoc-H), 7,36 – 7,30 (m, 1H, NH), 7,29 – 7,23 (m, 2H, 2x Fmoc-H), 6,55 (dd, 1H, ³J = 9,1, ³J = 4,0, CH), 4,56 – 4,49 (m, 1H, CH), 4,21 – 4,12 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4,10 – 4,05 (m, 1H, Fmoc-CH), 3,30 – 3,14 (m, 2H, CH₂), 3,02 (ddd, 1H, ²J = 15,9, ³J = 9,2, ⁴J = 1,8, CHH), 2,85 (dd, 1H, ²J = 15,6, ⁴J = 3,9, CHH), 2,67 – 2,60 (m, 1H, CHH), 2,57 – 2,51 (m, 3H, CHH, CH₂), 1,37 (m, 9H, ^tBu-H), 1,35 (m, 9H, ^tBu-H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 170,40, 169,62, 169,18, 169,13, 168,07, 167,98, 157,59, 155,95, 153,44, 146,46, 146,43, 143,78, 143,72, 140,66, 130,32, 130,29, 129,90, 128,34, 127,57, 126,99, 125,07, 123,98, 122,72, 121,90, 120,60, 120,54, 120,08, 112,15, 108,44, 80,97, 80,41, 68,15, 67,02, 65,37, 49,29, 49,22, 46,57, 37,17, 34,09, 34,01, 27,66, 27,61, 27,49, 27,48, 25,13.

ESI-MS: *m/z* gefunden [M+H]⁺ = 822,5, [M+Na]⁺ = 844,6.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet C₄₅H₄₇N₃O₁₂Na [M+Na]⁺ = 844,30519, gefunden = 844,30718 (Δ*m* = 0,00199, Fehler 2,36 ppm).

(S)-Di-*tert*-butyl-2-(3-(3-aminopropanoyloxy)-3-(3-nitrodibenzo[b,d]furan-2-yl)propanamido)succinat (103)

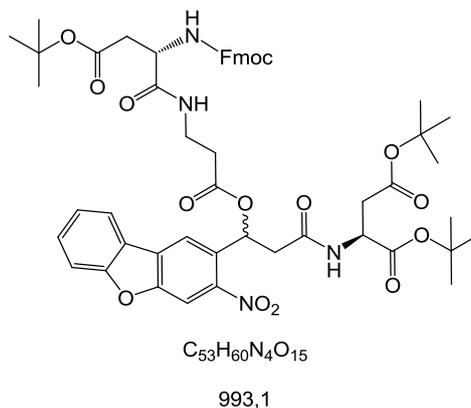


Nach Vorschrift B wurde das gewünschte Produkt hergestellt. Die Verbindung ist instabil, weshalb das Rohprodukt direkt quantitativ im nächsten Syntheseschritt eingesetzt wurde.

ESI-MS: m/z gefunden $[M+H]^+ = 600,2$.

MALDI-HRMS: m/z berechnet $C_{30}H_{38}N_3O_{10}$ $[M+H]^+ = 600,25517$, gefunden = 600,25407 ($\Delta m = 0,0011$, Fehler 1,8 ppm).

(S)-Di-*tert*-butyl-2-(3-(3-((S)-4-*tert*-butoxy-2-(Fmoc-amino)-4-oxobutanamido)propanoyloxy)-3-(3-nitrodibenzo[b,d]furan-2-yl)propanamido)succinat (104)

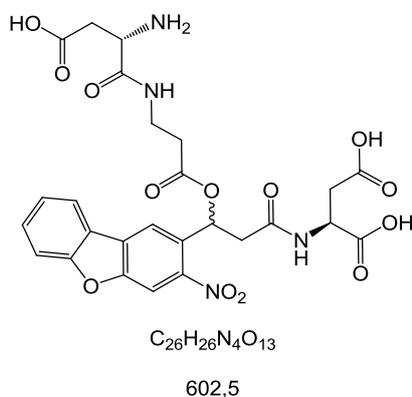


Den Bedingungen in Methode A folgend wurden, ausgehend von 110 mg (0,18 mmol) des Vorläuferpeptids und 76 mg (0,18 mmol) Fmoc-L-Asparaginsäure-4-*tert*-butylester, das gewünschte Produkt in 50 % Ausbeute (90 mg) erhalten.

ESI-MS: m/z gefunden $[M+H]^+ = 993,5$.

MALDI-HRMS: m/z berechnet $C_{53}H_{60}N_4O_{15}Na$ $[M+Na]^+ = 1015,39474$, gefunden = 1015,37496 ($\Delta m = 0,01978$, Fehler 19,5 ppm).

(S)-2-(3-(3-((S)-2-amino-3-carboxypropanamido)propanoyloxy)-3-nitrodibenzo[b,d]furan-2-yl)propanamido)butandisäure (105)



Die Vorläufer Verbindung wurde schrittweise von allen Schutzgruppen befreit. Zunächst wurde nach Methode B Fmoc entfernt und direkt im Anschluss nach Methode C die ^tBu Schutzgruppen der Carbonsäuren abgespalten. Das Rohprodukt wurde über HPLC gereinigt (Methode 1). Ausgehend von 60 mg (60 μmol) Startmaterial konnten 26 mg (52 %) des gewünschten Produkts isoliert werden.

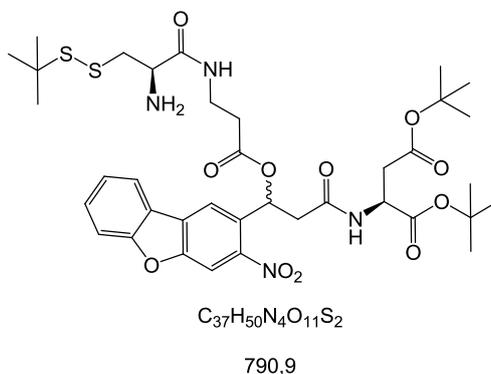
HPLC-Retentionszeit: 17,5 und 17,9 Min.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 12,74 (br s, 3H, 3x COOH), 8,50 (d, 1H, ⁴J = 2,25, H_{ar}), 8,49 – 8,40 (m, 3H, H_{ar}, 2x NH), 8,34 (d, 1H, ³J = 7,8, H_{ar}), 8,12 (br s, 2H, NH₂), 7,82 (dd, 1H, ³J = 7,9, ⁴J = 0,9, H_{ar}), 7,68 (dt, 1H, ³J = 7,2, ⁴J = 1,2, H_{ar}), 7,52 (dt, 1H, ³J = 7,9, ⁴J = 0,8, H_{ar}), 6,56 – 6,51 (m, 1H, CH), 4,62 – 4,53 (m, 1H, CH), 4,00 – 3,94 (m, 1H, CH), 3,37 – 3,23 (m, 2H, CH₂), 3,13 – 3,07 (m, 1H, CHH), 3,06 – 2,99 (m, 1H, CHH), 2,90 – 2,83 (m, 1H, CHH), 2,78 – 2,51 (m, 5H, CHH, 2x CH₂).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 172,73, 172,16, 172,12, 171,32, 171,28, 170,97, 170,95, 168,52, 168,50, 168,10, 168,08, 158,84, 158,59, 158,33, 158,10, 158,09, 153,93, 146,99, 146,92, 130,72, 130,68, 130,43, 128,84, 124,60, 123,12, 122,38, 121,08, 120,90, 118,53, 116,16, 112,69, 108,94, 108,92, 68,90, 68,84, 49,37, 49,32, 49,14, 48,99, 41,53, 41,41, 36,53, 36,39, 35,79, 35,07, 33,64, 33,60.

ESI-MS: *m/z* gefunden [M-H] = 601,1.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet C₂₆H₂₇N₄O₁₃ [M+H]⁺ = 603,15691, gefunden = 603,15752 (Δ*m* = 0,00061, Fehler 1,0 ppm).

4.3.3.2 Synthese des Tripeptids ATT0565 – Cys^{NHS} – NDBF-AS – Asp**(S)-Di-*tert*-butyl-2-(3-(3-((R)-2-amino-3-(*tert*-butyldisulfanyl)propanamido)propanoyloxy)-3-(3-nitrodibenzo[b,d]furan-2-yl)propanamido)succinat (106)**

In einer Zwei-Schritt Reaktion wurde das Produkt ausgehend von (S)-Di-*tert*-butyl-2-(3-(3-Fmoc-amino)propanoyloxy)-3-(3-nitrodibenzo[b,d]furan-2-yl)propanamido)succinat und *N*_α-Fmoc-*S*-*tert*-butylthio-L-cystein hergestellt. Zunächst wurde die Fmoc Schutzgruppe des Dipeptid Edukts nach Methode B abgespalten und das entstandene Produkt direkt nach Vorschrift A weiter umgesetzt. Das gewonnene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Gradient MeOH in DCM von 1 % zu 5 %). Das isolierte Produkt trug auch am neu gekoppelten Cystein nicht länger eine Fmoc Gruppe. Beim Einsatz von 400 mg (0,49 mmol) des Dipeptids wurden 140 mg (21 %) des Produkts isoliert.

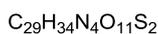
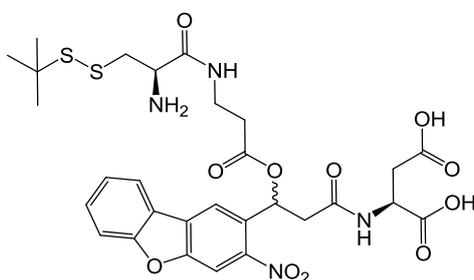
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,48 (d, 1H, ⁴*J* = 2,3, H_{ar}), 8,42 (d, 1H, ³*J* = 8,2, NH), 8,39 (d, 1H, ⁴*J* = 1,5, H_{ar}), 8,33 (d, 1H, ³*J* = 8,2, H_{ar}), 8,05 (t, 1H, ³*J* = 6,1, NH), 7,78 (d, 1H, ³*J* = 8,3, H_{ar}), 7,65 (t, 1H, ³*J* = 7,6, H_{ar}), 7,48 (t, 1H, ³*J* = 7,3, H_{ar}), 6,56 (dd, 1H, ³*J* = 9,4, ³*J* = 4,2, CH), 4,59 – 4,50 (m, 1H, CH), 3,40 – 3,22 (m, 3H, CH, CH₂), 3,08 – 2,99 (m, 1H, CHH), 2,93 (m, 1H, CHH), 2,89 – 2,83 (m, 1H, CHH), 2,74 – 2,62 (m, 2H, CHH, CHH), 2,59 – 2,52 (m, 3H, CHH, CH₂), 1,88 (br s, 2H, NH₂), 1,39 (m, 9H, ^tBu-H), 1,36 (m, 9H, ^tBu-H), 1,22 (m, 9H, ^tBu-H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173,09, 173,08, 170,62, 170,59, 169,62, 169,17, 169,14, 168,05, 167,99, 162,26, 157,60, 153,42, 146,45, 146,39, 130,30, 129,89, 128,38, 128,36, 123,99, 122,68, 121,90, 120,57, 120,52, 112,10, 108,38, 80,96, 80,94, 80,40, 80,38, 68,17, 54,44, 54,38, 49,29, 49,22, 48,60, 47,52, 47,51, 46,32, 46,27, 41,08, 40,89, 37,18, 35,76, 34,33, 33,79, 33,75, 30,74.

ESI-MS: *m/z* gefunden [M+H]⁺ = 790,9.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet C₃₇H₅₁N₄O₁₁S₂ [M+H]⁺ = 791,29903, gefunden = 791,29864 (Δ*m* = 0,00039, Fehler 0,5 ppm).

(S)-2-(3-(3-((R)-2-Amino-3-(tert-butylsulfanyl)propanamido)propanoyloxy)-3-nitrodibenzo[b,d]furan-2-yl)propanamido)butandisäure (107)



678,7

Die gewünschte Verbindung wurde durch Abspalten aller ^tBu-Schutzgruppen von 4 mg (5 μmol) des Startmaterials nach Vorschrift C erhalten. Nach Reinigung des Produkts mit HPLC Methode 1 wurden 3 mg (87 %) der Zielverbindung isoliert.

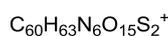
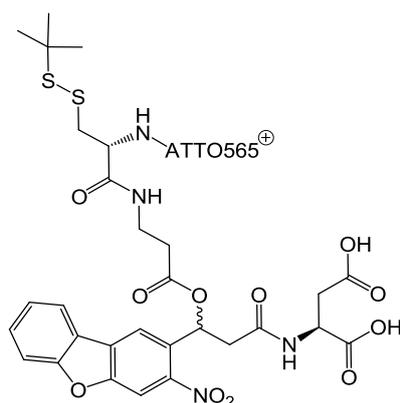
HPLC-Retentionszeit: 23,6 und 24,2 Min.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 12,65 (br s, 2H, 2x COOH), 8,61 (m, 1H, NH), 8,50 (d, 1H, ³J = 4,5, H_{ar}), 8,46 – 8,40 (m, 2H, H_{ar}, NH), 8,34 (d, 1H, ³J = 7,7, H_{ar}), 8,32 – 8,21 (m, 2H, NH₂), 7,83 (dd, 1H, ³J = 8,4, ⁴J = 0,5, H_{ar}), 7,69 (t, 1H, ³J = 7,4, H_{ar}), 7,52 (t, 1H, ³J = 7,2, H_{ar}), 6,57 – 6,50 (m, 1H, CH), 4,64 – 4,52 (m, 1H, CH), 3,96 – 3,79 (m, 1H, CH), 3,44 – 3,19 (m, 2H, CH₂), 3,11 – 2,98 (m, 2H, CH₂), 2,93 (d, 1H, ³J = 6,2, CHH), 2,90 – 2,82 (m, 1H, CHH), 2,74 – 2,54 (m, 4H, 2x CH₂), 1,20 (m, 9H, ^tBu-H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 172,27, 171,66, 170,54, 170,46, 168,08, 167,99, 166,77, 166,71, 158,60, 158,32, 158,04, 157,76, 157,67, 157,64, 153,48, 146,56, 146,44, 137,37, 130,32, 130,22, 129,99, 128,41, 128,36, 125,34, 124,15, 122,68, 121,95, 120,66, 120,61, 117,16, 114,83, 112,25, 108,47, 68,38, 51,65, 51,39, 48,70, 48,54, 48,05, 47,99, 41,16, 41,00, 40,81, 40,53, 36,11, 35,94, 34,64, 34,59, 33,14, 33,08, 31,32, 29,35, 29,26.

ESI-MS: *m/z* gefunden [M+H]⁺ = 679,4.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet C₂₉H₃₅N₄O₁₄S₂ [M+H]⁺ = 679,17383, gefunden = 679,17414 (Δ*m* = 0,00031, Fehler 0,5 ppm).

ATTO565 – Cys-(S^tBu) – NDBF-AS – Asp (109)

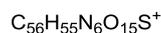
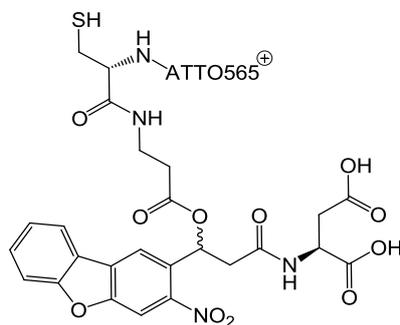
1172,30

1,0 mg (1,4 μmol) ATTO565 wurde in 50 μL trockenem DMSO gelöst. Ungefähr 1,0 mg (ca. 1,4 μmol) des Peptids wurde in 350 μL Kopplungspuffer analog zu den Angaben von ATTO Tech gelöst (Mischung aus Phosphat- und Natriumhydrogencarbonatpuffer pH 8,3) und zum Farbstoff gegeben. Nach einer Stunde bei RT wurde die Reaktion in vier Läufe je 100 μL nach HPLC Methode 2 gereinigt.

HPLC-Retentionszeit: 33,6 Min.

ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M}^+]^+ = 1171,8$.

MALDI-HRMS: m/z berechnet $\text{C}_{60}\text{H}_{63}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{S}_2$ $[\text{M}^+]^+ = 1171,37873$, gefunden = 1171,38168 ($\Delta m = 0,00295$, Fehler 2,5 ppm).

ATTO565 – Cys – NDBF-AS – Asp (110)

1084,13

Für die Spaltung des Disulfids von ATTO565 – Cys-(S^tBu) – NDBF-AS – Asp wurde das Startmaterial in einer 1:1 Mischung aus 100 mM Tris Puffer pH 7,4:Acetonitril und der entsprechenden Menge an

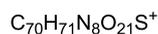
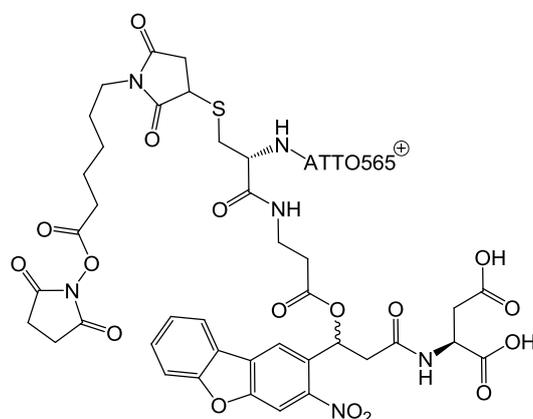
TCEP für eine 50 mM [TCEP] Lösung gelöst. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend über HPLC Methode 2 gereinigt.

HPLC-Retentionszeit: 30,0 und 30,4Min.

MALDI-MS: m/z gefunden $[M^*]^+ = 1082,5$.

MALDI-HRMS: m/z berechnet $C_{56}H_{55}N_6O_{15}S$ $[M^*]^+ = 1083,34406$, gefunden = 1083,34527 ($\Delta m = 0,00121$, Fehler 1,1 ppm).

ATTO565 – Cys^{NHS} – NDBF-AS – Asp (117)



1392,42

0,5 mg (0,46 μ mol) ATTO565 – Cys – NDBF-AS – Asp wurden mit 1,3 mg (4,3 μ mol) 6-Maleimido-hexansäure-*N*-hydroxysuccinimid-ester in 100 μ L DMF gelöst. Nach Zugabe von 1 μ L (57 μ mol) DIPEA wurde die Reaktion für 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 100 μ L einer 1:1 Mischung $H_2O:MeCN$ gelöst und mit HPLC Methode 2 gereinigt.

HPLC-Retentionszeit: 31,5 und 31,7Min.

MALDI-MS: m/z gefunden $[M-2H]^+ = 1390,8$.

4.3.4 Aktinometrie

Entsprechend *Current Protocols* wurde die Quantenausbeute der neuen NDBF-Aminosäure über Ferrioxalat Aktinometrie bestimmt.^[138] Ein entsprechend der Literatur kalibriertes Aktinometer wurde genutzt (Abb. 79).

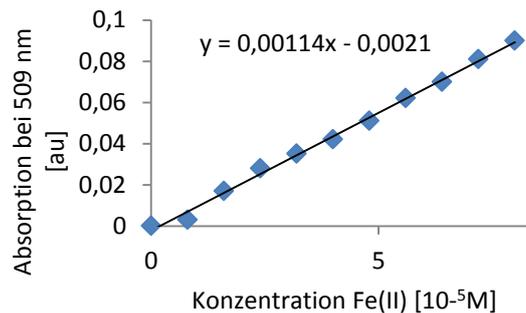


Abb. 79: Kalibriertes Ferrioxalat Aktinometer. Die Absorption des Phenanthrolin – Eisen(II) Komplexes bei 509 nm wurde für bekannte Konzentrationen an Fe(II) Ionen gemessen. Die Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration wurde über lineare Regression ermittelt und ist im Graphen hinterlegt.

Im Vorfeld der Aktinometrie wurden sechs verschiedene Lösungen angesetzt:

1. Eisen(III)oxalat Lösung (130 mg $(\text{NH}_4)_3\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ gelöst in einer Mischung aus 45 mL MilliQ Wasser und 5 mL 0,05 M Schwefelsäure).
2. Phenanthrolin Lösung (60 mg 1,10-Phenanthrolin gelöst in 50 mL MilliQ Wasser).
3. Natriumacetat Puffer (4,08 g NaOAc in einer Mischung aus 32 mL MilliQ Wasser und 18 mL 0,5 M Schwefelsäure).
4. Puffer B (16 mL 0,05 M Schwefelsäure gemischt mit 10 mL des Natriumacetat Puffers und 16 mL MilliQ Wasser).
5. Interner Standard (2 mg Uracil gelöst in 10 mL MilliQ Wasser).
6. Peptid-Lösung (492 μL einer 45 μM Lösung ATTO565-Asp-NDBF-AS-Asp in HBS Puffer pH 7,5 gemischt mit 23 μL Lösung 5).

Die Versuchsdurchführung erfolgt in einem Dunkelraum unter Rotlicht. Je 13 μL von Lösung 1 wurden in einer Küvette mit dem entsprechenden Fassungsvermögen mit 365 nm (184 mW) bei ansteigender Dauer (1 s, 2 s, 3 s, 5 s und 7 s) belichtet. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt. Nach Belichtung wurden die vollständigen 13 μL aus der Küvette in ein Eppendorf Gefäß überführt und gut

vermischt. 4 μL dieser Lösung wurde anschließend mit 4 μL Lösung 2 und 42 μL Puffer 4 gemischt. Damit sich der phen-Fe(II)-Komplex bilden konnte, wurde für mindestens 30 Min gewartet, bevor die Absorption jeder Probe bei 509 nm gemessen wurde (Abb. 80).

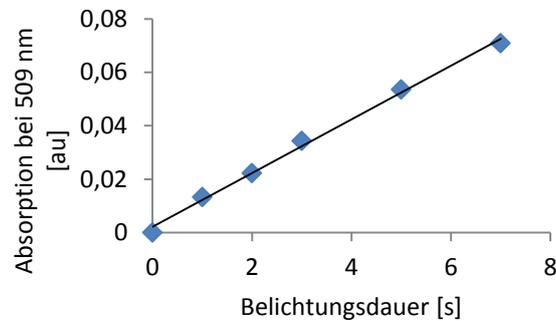


Abb. 80: Gemessene Absorption des phen-Fe(II)-Komplexes nach Belichtung einer Ferrioxalat Lösung bei steigender Belichtungsdauer. Der lineare Trend der Absorption bei zunehmender Belichtungszeit bestätigt das kalibrierte Aktinometer. Messpunkte, die im Bereich des linearen Anstiegs liegen, können zusammen mit dem Kalibrierungsgraphen zur Berechnung der Konzentration an Fe(II) genutzt werden.

Solange der aufgezeichnete Graph eine lineare Zunahme der Absorption bei steigender Belichtungsdauer zeigt, wurde das Aktinometer im kalibrierten Bereich genutzt. Die Konzentration von mit diesem Belichtungsaufbau gebildeten Fe(II)-Ionen kann über die Steigung des kalibrierten Aktinometers (Abb. 79) und einem Messpunkt aus Abb. 80 berechnet werden. Die Berechnung wurde für die Absorption nach Belichtung für 5 s durchgeführt.

$$n_{\text{Fe(II)}} = \frac{A_{t=5} - A_0}{a_{\text{calc}} * d} * V = 7,7 \text{ nmol}$$

$n_{\text{Fe(II)}}$: Stoffmenge an gebildeten Eisen(II)-Ionen.

$A_{t=5}$: Absorption bei 509 nm nach 5s Belichtung, 0,0865.

A_0 : Absorption bei 509 nm ohne Belichtung, 0,0325.

a_{calc} : Zunahme der Absorption eines kalibrierten Ferrioxalat Aktinometers bei steigender Konzentration an Fe(II)-Ionen (Steigung aus Abb. 71, $\frac{0,00114}{\mu\text{M}}$).

d : Korrekturfaktor für die Verdünnung der Probe. 4 μL Lösung 1 wurde auf 50 μL verdünnt, ergibt 0,08.

V : Gemessenes Volumen, 13 μL .

Die Stoffmenge an reduziertem Eisen erlaubt mit Hilfe der Quantenausbeute des Ferrioxalats die Berechnung der Anzahl der Photonen, die von dem Belichtungsaufbau in der entsprechenden Zeit auf die Probe übertragen wurden.

$$\frac{n_{\text{photons}}}{s} = \frac{n_{\text{Fe(II)}}}{\phi_{\text{Ferrioxalate}} * t} = 1,27 \frac{\text{nmol}}{s}$$

n_{photons} : Anzahl an emittierten Photonen dieses Versuchsaufbaus bei 365 nm.

$\phi_{\text{Ferrioxalate}}$: Quantenausbeute von Ferrioxalat , 1,21.

t : Belichtungsdauer, 5 s.

Je 13 μL von Lösung 6 wurden für 0, 2, 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 50 und 60 Min je dreimal mit dem gleichen experimentellen Aufbau belichtet, für den die Anzahl der emittierten Photonen berechnet wurde. Alle Proben wurden im Anschluss an die Belichtung per HPLC (Methode 1) untersucht. Der interne Standard hat eine Retentionszeit von 3,9 Min und das Peptid von 27,5 Min. Die Photolyse des Peptids wurde über die Abnahme des Integrals des Startmaterials, normalisiert auf den internen Standard, graphisch aufgetragen (Abb. 81).

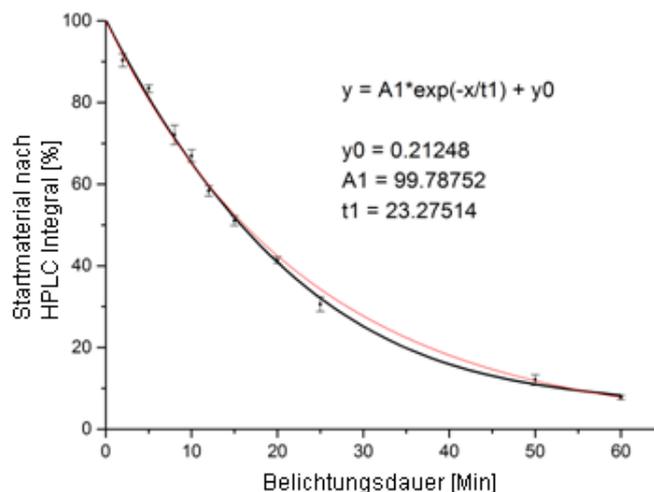


Abb. 81: Zersetzung des Peptids mit zunehmender Belichtungsdauer. Die Abnahme des Startmaterials wurde über Integration in den entsprechenden HPLC Spektren und Normierung auf einen internen Standard ermittelt. Das Verhalten zeigt einen exponentiellen Verlauf, der kalkuliert der abgebildeten Formel folgt.

Die zu Beginn der Belichtung ablaufende Zersetzungsreaktion des Peptids kann über die Anfangssteigung der ermittelten Zersetzungskurve bestimmt werden.

$$y' = -\frac{A_1}{t_1} * e^{-\frac{x}{t_1}}$$

$$y'(x = 0) = -\frac{A_1}{t_1} = 4,3 \frac{\%}{s} = 25,7 \frac{pmol}{s}$$

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes konnte anschließend die Anzahl an Photonen berechnet werden, die von der Probe absorbiert werden konnten.

$$E_{365} = \varepsilon_{365} * c * d = -\log T$$

$$A = 1 - T = 1 - 10^{-E_{365}} = 0,158$$

E_{365} : Absorption bei 365 nm.

ε_{365} : Extinktionskoeffizient der neuen NDBF-AS bei 365 nm (1660 $\frac{L}{mol\ cm}$).

c : Konzentration der Proben (45 μM).

d : Pfadlänge der genutzten Küvette (1 cm).

T : Transmission.

A : Relative Absorption.

Zusammen mit der berechneten Anzahl der pro Sekunde emittierten Photonen, der von der Probe tatsächlich absorbierten Photonen und der ermittelten Anfangssteigung der Zersetzungsreaktion, wurde die Quantenausbeute des neuen NDBF-Bausteins berechnet.

$$\varphi = \frac{25,7 \frac{pmol}{s}}{A * \frac{n_{Photons}}{s}} = 0,13$$

φ : Quantenausbeute der neuen Verbindung.

4.3.5 Zwei-Photonen-Belichtung

Der Nachweis der Zwei-Photonen-Aktivität der neuen Verbindung wurde durch Immobilisieren des Peptids ATTO565 – Cys – NDBF-AS – Asp in Maleimid funktionalisierten Hydrogelen von *Cellendes* erreicht (genauere Informationen in Sektion 4.2.1 Hydrogel Herstellung). Alle Versuche des Nachweises in Lösung zeigten keinen Effekt außerhalb der Messschwankungen. Die erfolgreichen Belichtungsexperimente wurden in Kooperation mit Manuela Fichte aus der Arbeitsgruppe von Prof. Heckel und Dr. Stephan Junek von der *Imaging Facility* des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung an den dortigen Aufbauten (genauere Informationen in Sektion 4.2.1 Lichtquellen) durchgeführt.

Die Zunahme der Fluoreszenz konnte mit Hilfe des dortigen Messaufbaus lokal bestimmt werden (Abb. 82). Die Sättigung deutet darauf hin, dass alle in dem Abschnitt vorliegenden Moleküle aktiviert wurden. Weitere Bilder, in denen die dreidimensionale Auflösung der Zwei-Photonen-Anregung demonstriert wurde, sind im Allgemeinen Teil (Abschnitt 3.2) hinterlegt.

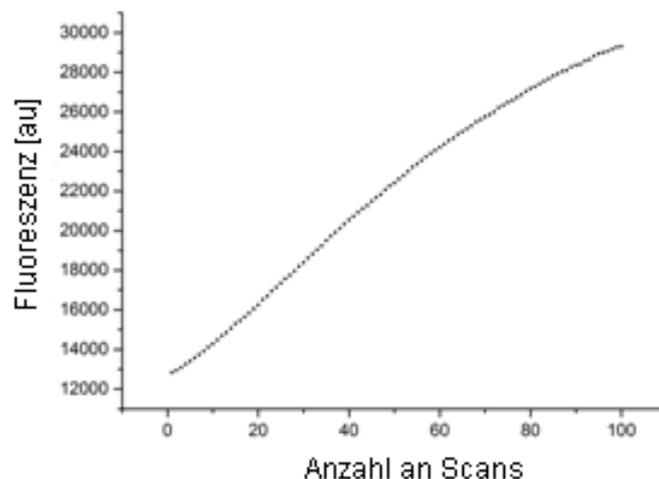


Abb. 82: Die Fluoreszenz von ATTO565 – Cys – NDBF-AS – Asp wurde mit Hilfe des Zwei-Photonen-Aufbaus am MPI für Hirnforschung aktiviert. Der Zwei-Photonen-Laser belichtete das Hydrogel in einem definierten Volumen. Die Fluoreszenz nimmt über 100 Scans bei 780 nm bis zur Sättigung zu.

4.3.6 Weitfeld und hochaufgelöste Mikroskopie

Diese Experimente wurden von Kathrin Klehs aus der Arbeitsgruppe von Prof. Heilemann durchgeführt.

Im Vorfeld der Bildgebung wurden $F(ab')_2$ Antikörperfragmente in 50 μL 0,1 M NaHCO_3 Puffer pH 8,3 auf eine Konzentration von 1 mg/mL verdünnt. 0,1 μL einer 2 mM Lösung des Farbstoffs ATTO565-Cys^{NHS}-NDBF-AS-Asp gelöst in DMF wurden zum Antikörper gegeben und für 30 Min bei RT gerührt. Nach Reinigung über NAP-5 Säulen mit PBS Puffer (0,2 g/L KCl, 0,2 g/L KH_2PO_4 , 8,0 g/L NaCl, 1,15 g/L Na_2HPO_4) entsprechend der Anweisungen des Herstellers, wurde das Farbstoff-Antikörper Verhältnis mittels Absorptionsspektroskopie auf 0,5 ermittelt.

Mit dem markierten Antikörper wurden anschließend U2OS Zellen am Tubulin Cytoskelett markiert und mit Glutaraldehyd fixiert. Die Zellen wurden nach Wachstum mit PBS Puffer gewaschen und in einer Mischung aus 80 mM PIPES, 1 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA und 0,5 % (v/v) Triton X-100 (pH 6.8) extrahiert. Die Zellen wurden mit einer 25 %igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd zu einer Konzentration von 0,5 % an Aldehyd verdünnt. Nachdem die Mischung 10 Min auf die Zellen einwirken konnte, wurden die Zellen isoliert und für 7 Min mit 0,1 % NaBH_4 in PBS Puffer versetzt. Die Zellen wurden intensiv mit PBS gewaschen und für 10 Min mit einer Mischung aus 2 % Rinderalbumin und 0,1 % Triton X-100 in PBS Puffer vermischt. Im gleichen Puffer wurde der primäre Maus Anti- β -Tubulin Antikörper verdünnt zu 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hinzugegeben. Der Antikörper wirkte für 40 Min auf die Zellen ein, bevor diese intensiv mit PBS Puffer, der 0,1 % Triton X-100 enthielt, gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen mit dem markierten $F(ab')_2$ Antikörper versetzt, der ebenfalls zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 2 % Rinderalbumin und 0,1 % Triton X-100 in PBS Puffer verdünnt war. Nach 30 Min wurden die Zellen wieder mit 0,1 % Triton X-100 in PBS und anschließend reinem PBS gewaschen. Nach einer weiteren Fixierung der Zellen mit 3,7 % Formaldehyd in PBS wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in einer Mischung aus PBS und 0,1 % Natriumazid bei 4 °C gelagert.

Für die Mikroskopie wurden die markierten Zellen auf einem Objektträger innerhalb des Mikroskops kontinuierlich mit 568 nm ($80 \text{ W}/\text{cm}^2$) belichtet. Entweder wurde der Farbstoff mit kurzen Pulsen des 405 nm Lasers aktiviert ($100 \text{ W}/\text{cm}^2$, Weitfeldaufnahme) oder die Intensität der Anregung bei 568 nm erhöht (bis $230 \text{ W}/\text{cm}^2$, hochauflösende Aufnahme). Weitfeldaufnahmen wurden über 500 Bilder in einer Frequenz mit 33 Hz und einer EM Einstellung der Kamera von 100 aufgenommen. Hochaufgelöste Bilder wurden bei ausschließlicher Belichtung mit 568 nm erreicht. 10000 Bilder wurden in einer Frequenz von 33 Hz bei einer Einstellung von 200 EM aufgenommen und mit Hilfe

des Programms rapidSTORM einzelne Fluorophore lokalisiert und mit ihnen das hochaufgelöste Bild konstruiert.^[139]

4.4 Photoaktivierbare Click-SELEX

4.4.1 Projektbezogene Geräte und Materialien

HPLC-Gradienten für kleine organische Moleküle

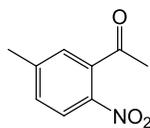
HPLC Reinigung von organischen Molekülen wurde mit einer Mischung aus A: Acetonitril und B: 0,1 % Trifluoressigsäure durchgeführt. Anfänglich wurde die Löslichkeit der Verbindungen in dieser Mischung untersucht. Bis zu einer Mischung aus 60 % A und 40 % B waren Lösungen der hier untersuchten Moleküle trüb. Die Verbindungen wurden mit den so ermittelten Bedingungen ohne Gradient gereinigt.

Methode: Isokratisch 60 % Acetonitril, 40 % 0,1 % Trifluoressigsäure in MilliQ Wasser.

4.4.2 Chemische Synthesen

4.4.2.1 Synthese von Azidomethyl-NPE-Indol

2-Nitro-5-methylacetophenon (122)^[130]



179,2

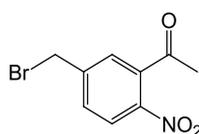
25 g (0,14 mol) 2-Nitro-5-methylbenzoesäure wurden in einem ausgeheizten Kolben in 200 mL (2,8 mol) SOCl_2 gelöst. Anschließend wurde eine katalytische Menge an Dimethylformamid zugegeben und die Lösung unter Schutzgas für 3 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Das überschüssige Thionylchlorid wurde abdestilliert. Das Produkt wurde quantitativ als brauner Feststoff isoliert und ohne weitere Charakterisierung weiter umgesetzt.

3,5 g (0,14 mol) Magnesium wurden zusammen mit 0,33 mL (3,4 mmol) Tetrachlorkohlenstoff und 3,3 mL (56 mmol) Ethanol unter Argon in einem ausgeheizten Kolben erwärmt. Nach Anspringen der Reaktion wurden 130 mL Ether zugetropft. Anschließend wurden 22 ml (0,14 mol) Diethylmalonat in einer Mischung aus 17 mL Ether und 13 mL (0,23 mol) Ethanol hinzugegetropft, wobei die Lösung kontinuierlich siedete. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion so lange unter Rückfluss erwärmt, bis das Magnesium aufgebraucht war. Dann wurde eine Mischung aus 26 g (0,13 mol) 2-Nitro-5-methylbenzoylchlorid in 32,5 mL Ether hinzugegetropft. Die Viskosität der Lösung stieg an. Sobald die Lösung nicht länger gerührt werden konnte, wurde eine Mischung aus 9 mL Schwefelsäure mit 130 mL Wasser hinzugegeben. Die entstehenden Phasen wurden getrennt und die wässrige einmal mit 50 mL Ether gewaschen. Die vereinigte organische Phase wurde mit $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Zwischenprodukt Diethyl-5-methyl-2-nitrobenzoyl-malonat wurde in 26 mL Eisessig gelöst und 5 mL Schwefelsäure hinzugegeben. Die Lösung wurde so lange unter Rückfluss zum Sieden erhitzt, wie eine Gasentwicklung beobachtet werden konnte. Anschließend wurde die Lösung auf Eis gegeben und mit Natronlauge alkalisiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ether extrahiert. Die gesammelte organische Phase wurde mit $MgSO_4$ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (15:1 CH:EE). Auf diesem Weg wurden 18,1 g (77 %) der gewünschten Zielverbindung isoliert.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,02 (d, 3J = 8,4, 1H, H_{ar}), 7,37 (m, 1H, H_{ar}), 7,17 (d, 4J = 1,2, 1H, H_{ar}), 2,53 (s, 3H, CH_3), 2,48 (s, 3H, CH_3).

ESI-MS: m/z gefunden $[M+Na]^+$ = 202,1.

5-(Brommethyl)-2-nitroacetophenon (**121**)^[131]



$C_9H_8BrNO_3$

258,1

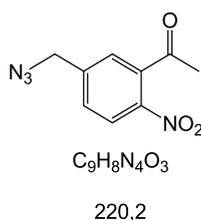
18,1 g (0,10 mol) 2-Nitro-5-methylacetophenon wurden zusammen mit 18,9 g (0,11 mol) *N*-Bromsuccinimid und 2,4 g (10 mmol) Dibenzoylperoxid in 60 mL Tetrachlorkohlenstoff gelöst und unter Schutzgas für 16 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden nochmals 1,21 g (5 mmol) Dibenzoylperoxid hinzugegeben und weitere 8 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in EE

gelöst und je einmal mit gesättigter NaHCO₃ und Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt über Säulenchromatographie gereinigt (CH:EE 15:1). Es wurde eine Mischung aus dem gewünschten Produkt und der zweifach bromierten Verbindung isoliert. Die Mischung wurde in 200 mL Ether gelöst und mit 50 mL n-Hexan zum Kristallisieren überschichtet. Nach 12 h bei 4 °C wurde der entstandene Feststoff isoliert und ergab 9,9 g (41 %) der gewünschten Zielverbindung.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,09 (d, ³J = 8,4, 1H, H_{ar}), 7,61 (dd, ³J = 8,4, ⁴J = 1,9, 1H H_{ar}), 7,42 (d, ⁴J = 1,8, 1H, H_{ar}), 4,49 (s, 2H, CH₂), 2,56 (s, 3H, CH₃).

ESI-MS: *m/z* gefunden [M-H]⁻ = 255,8, [M+Br]⁻ = 336,0.

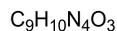
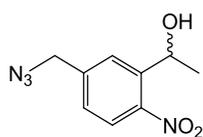
5-Azidomethyl-2-nitroacetophenon (**120**)^[131]



In einer Mischung aus 84 mL Aceton und 16 mL Wasser wurden 7,76 g (30,2 mmol) 5-(Brommethyl)-2-nitroacetophenon gelöst und 2,95 g (45,3 mmol) Natriumazid hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h auf 75°C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum reduziert und das Produkt mit 200 mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde mit 50 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH:EE 10:1) und ergab 4,6 g (69 %) des gewünschten Produkts.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8,12 (d, ³J = 8,5, 1H, H_{ar}), 7,54 (dd, ³J = 8,5, ⁴J = 1,9, 1H, H_{ar}), 7,36 (d, ⁴J = 1,9, 1H, H_{ar}), 4,53 (s, 2H, CH₂), 2,56 (s, 3H, CH₃).

ESI-MS: *m/z* gefunden [M+Na]⁺ = 243,5.

1-[5-(Azidomethyl)-2-nitrophenyl]ethanol (119)^[131]

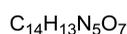
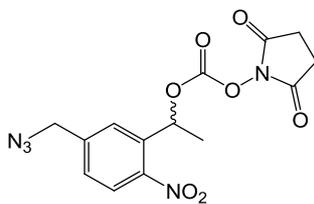
222,2

4,0 g (18,2 mmol) 5-Azidomethyl-2-nitroacetophenon wurden in einer Mischung aus 60 mL Methanol und 40 mL Dioxan gelöst. 1,0 g (27,2 mmol) Natriumborhydrid wurde hinzugegeben und die Reaktion unter Schutzgas gerührt. Nach 1 h wurden 160 mL Wasser und 6,5 mL 1M Salzsäure hinzugegeben. Das Produkt wurde in EE extrahiert. Die organische Phase wurde mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend mit MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Säulenchromatographie gereinigt (CH:EE 5:1), um 3,66 g (91 %) des Produkts zu erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7,94 (d, ³J = 8,4, 1H, H_{ar}), 7,80 (d, ⁴J = 1,6, 1H, H_{ar}), 7,38 (dd, ³J = 8,4, ⁴J = 1,9, 1H, H_{ar}), 5,47 (q, ³J = 6,4, 1H, CH), 4,48 (s, 2H, CH₂), 2,15 (br s, 1H, OH), 2,56 (d, ³J = 6,4, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 147,2, 142,0, 141,8, 127,4, 127,1, 125,2, 65,7, 54,0, 24,6.

ESI-MS: *m/z* gefunden [M-H]⁻ = 221,5, [M+Cl]⁻ = 256,6.

1-[5-(Azidomethyl)-2-nitrophenyl]ethyl-*N*-succinimidyl Kohlensäurediester (124)

363,3

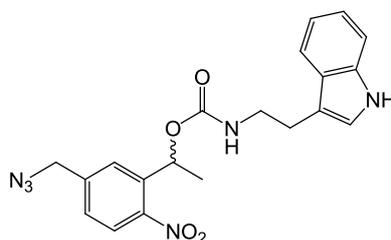
In 6 mL Acetonitril wurden 0,65 g (3,0 mmol) 1-[5-(Azidomethyl)-2-nitrophenyl]ethanol gelöst. 0,70 mL (5,0 mmol) Triethylamin gefolgt von 1,53 g (6,0 mmol) *N,N'*-Discuccinimidylcarbonat wurden hinzugegeben und die Lösung unter Schutzgas gerührt. Nach fünf Stunden (vollständige Umsetzung in DC-Kontrolle) wurden 10 mL Wasser und 0,2 mL gesättigte Kochsalzlösung hinzugegeben und das Produkt in EE extrahiert. Die organische Phase wurde separiert, mit Magnesiumsulfat getrocknet, im

Vakuum eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch getrennt (CH:EE 2:1). Das gewünschte Produkt wurde in 80 % (640 mg) Ausbeute erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,07$ (d, $^3J = 8,4$, 1H, H_{ar}), $7,66$ (d, $^4J = 1,2$, 1H, H_{ar}), $7,47$ (dd, $^3J = 8,4$, $^4J = 1,6$, 1H, H_{ar}), $6,42$ (q, $^3J = 6,4$, 1H, CH), $4,56$ (s, 2H, CH_2), $2,80$ (s, 4H, CH_2), $1,80$ (d, $^3J = 6,4$, 3H, CH_3).

ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 386,8$, $[\text{M}+\text{Cl}]^- = 398,2$.

1-[5-(Azidomethyl)-2-nitrophenyl]ethyl-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]carbammat (125)



$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_4$

408,4

640 mg (1,8 mmol) des NHS aktivierten Startmaterials wurden in 11 mL Tetrahydrofuran gelöst. Anschließend wurden 0,41 mL (2,9 mmol) Triethylamin und 235 mg (1,47 mmol) Tryptamin hinzugegeben und die Reaktion für 24 h unter Schutzgas gerührt. Die Reaktion wurde mit 55 mL DCM und 170 mL 5 %iger Salzsäure verdünnt. Die wässrige Phase wurde getrennt und zweimal mit 60 mL DCM gewaschen. Die vereinigte organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Gradient von CH:EE 5:1 zu 5:3), um 520 mg (87 %) des gewünschten Produkts zu erhalten.

30 mg des Produkts wurden ein weiteres Mal per HPLC gereinigt und anschließend für Click-Experimente an Oligonukleotiden genutzt.

HPLC-Retentionszeit: 8,7 Min.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 10,8$ (s, 1H, NH), $8,01$ (d, $^3J = 8,4$, 1H, H_{ar}), $7,64$ (s, 1H, H_{ar}), $7,53$ (dd, $^3J = 8,4$, $^4J = 1,8$, 1H, H_{ar}), $7,45$ (m, 2H, H_{ar} , NH), $7,32$ (d, $^3J = 8,0$, 1H, H_{ar}), $7,05$ (m, 2H, H_{ar}), $6,95$ (t, $^3J = 7,1$, 1H, H_{ar}), $6,02$ (q, $^3J = 6,4$, 1H, CH), $4,64$ (s, 2H, CH_2), $3,18$ (m, 2H, CH_2), $2,77$ (t, $^3J = 7,3$, 2H, CH_2), $1,54$ (d, $^3J = 6,5$, 3H, CH_3).

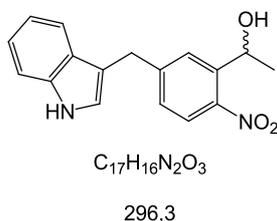
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 155,1$, $146,7$, $142,1$, $138,6$, $136,2$, $128,1$, $127,1$, $126,3$, $124,7$, $122,5$, $120,8$, $118,2$, $118,1$, $111,5$, $111,3$, $66,8$, $52,6$, $41,1$, $25,3$, $21,8$.

ESI-MS: m/z gefunden $[M+H]^+ = 409,2$, $[M+Cl]^- = 443,2$.

MALDI-HRMS: m/z berechnet $C_{20}H_{20}N_6O_4Na$ $[M+Na]^+ = 431,14382$, gefunden = 431,14304 ($\Delta m = 0,00078$, Fehler 1,8 ppm).

4.4.2.2 Synthese von Indol-NPE-Azid

1-(5-((1H-Indol-3-yl)methyl)-2-nitrophenyl)ethanol (**127**)

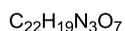
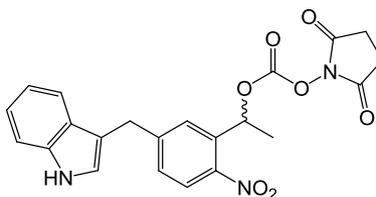


650 mg (2,5 mmol) 1-(5-(Brommethyl)-2-nitrophenyl)ethanol wurden mit 20 mL Wasser vermischt und 350 mg (3,0 mmol) Indol hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 10 Min unter Rückfluss in einer Mikrowelle erhitzt (200 W, 150 °C, 30 s Anlaufzeit, 10 Min Temperatur halten). Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung zweimal mit 50 mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde mit $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH:EE 3:1) und ergab 410 mg (55 %) des gewünschten Produkts.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 10,91$ (br s, 1H, NH), 7,81 – 7,78 (m, 2H, 2x H_{ar}), 7,41 (d, $^3J = 7,9$, 1H, H_{ar}), 7,34 (d, $^3J = 8,1$, 2H, H_{ar}), 7,22 (d, $^4J = 2,1$, 1H, H_{ar}), 7,06 (t, $^3J = 7,1$, 1H, H_{ar}), 6,94 (t, $^3J = 7,1$, 1H, H_{ar}), 5,43 (d, $^3J = 4,3$, 1H, OH), 5,17 – 5,11 (m, 1H, CH), 4,15 (s, 2H, CH_2), 1,33 (d, $^3J = 6,3$, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 148,0$, 145,2, 142,2, 136,4, 127,7, 127,4, 126,8, 124,0, 123,5, 121,1, 118,4, 118,3, 112,5, 111,5, 63,7, 31,0, 25,1.

ESI-MS: m/z gefunden $[M+H]^+ = 296,9$, $[M+Na]^+ = 338,0$.

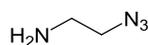
1-(5-((1H-Indol-3-yl)methyl)-2-nitrophenyl)ethyl 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl Carbonat (128)

437,4

690 mg (2,7 mmol) DSC wurden in einem ausgeheizten Kolben in 5 mL Acetonitril gelöst. Dazu wurden 400 mg (1,4 mmol) 1-(5-((1H-Indol-3-yl)methyl)-2-nitrophenyl)ethanol, die separat in 10 mL Acetonitril gelöst waren, hinzugegeben. Nach Zugabe von 0,55 mL (4,0 mmol) Triethylamin wurde die Reaktion unter Argon bei RT gerührt. Nach 4 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (CH:EE 3:1). 470 mg (80 %) des gewünschten Produkts wurden isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 10,94 (br s, 1H, NH), 7,94 (d, 3J = 8,5, 1H, H_{ar}), 7,79 (d, 4J = 1,7, 1H, H_{ar}), 7,45 – 7,40 (m, 2H, H_{ar}), 7,35 (d, 3J = 8,1, 1H, H_{ar}), 7,24 (d, 4J = 2,3, 1H, H_{ar}), 7,08 – 7,05 (m, 1H, H_{ar}), 6,97 – 6,94 (m, 1H, H_{ar}), 6,26 (q, 3J = 6,4, 1H, CH), 4,21 (s, 2H, CH_2), 2,79 (s, 4H, 2x CH_2), 1,70 (d, 3J = 6,4, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 169,8, 150,5, 149,4, 145,3, 136,4, 134,6, 129,5, 127,1, 126,7, 124,9, 123,7, 121,2, 118,6, 118,4, 112,1, 111,5, 75,3, 30,8, 25,4, 21,1.

2-Azidoethylamin (130)

86,1

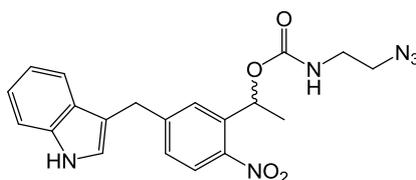
10 g (49 mmol) 2-Bromethylamin Hydrobromid wurden in 50 mL Wasser vorgelegt. 9,51 g (150 mmol) Natriumazid wurden hinzugegeben und die Lösung auf 75 °C erwärmt. Nach 5 h wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und 50 mL Ether sowie 15 g KOH hinzugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL Ether gewaschen. Die vereinigten Etherphasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel vorsichtig am Rotationsverdampfer entfernt.

Der Rückstand wurde unter leicht reduziertem Druck destilliert. Auf diesem Weg wurden 2,26 g (54 %) des gewünschten Produkts isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 3,33$ (t, $^3J = 5,5$, 2H, CH_2), $2,84$ (t, $^3J = 5,9$, 2H, CH_2), $1,30$ (s, 2H, NH_2).

ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M}+\text{H}]^+ = 296,9$, $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 338,0$.

1-(5-((1H-Indol-3-yl)methyl)-2-nitrophenyl)ethyl 2-azidoethylcarbammat (**131**)



$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_4$

408,4

460 mg (1,1 mmol) des NHS Esters wurden in 5 mL THF gelöst. Nacheinander wurden 91 mg (1,1 mmol) 2-Azidoethylamin und 0,3 mL (82,1 mmol) Triethylamin hinzugegeben. Die Lösung wurde für 10 Min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (CH:EE 3:1). Es wurden 330 mg (77 %) des gewünschten Produkts isoliert.

Für Click-Reaktionen mit Oligonukleotiden wurden 10 mg des Produkts ein weiteres Mal per HPLC gereinigt.

HPLC-Retentionszeit: 10,2 Min.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 10,93$ (br s, 1H, NH), $7,88$ (d, $^3J = 8,4$, 1H, H_{ar}), $7,65$ (d, $^4J = 1,3$, 1H, H_{ar}), $7,60$ (t, $^3J = 5,7$, 1H, NH), $7,40 - 7,34$ (m, 3H, 3x H_{ar}), $7,19$ (d, $^4J = 2,0$, 1H, H_{ar}), $7,08 - 7,04$ (m, 1H, H_{ar}), $6,95 - 6,92$ (m, 1H, H_{ar}), $6,02$ (q, $^3J = 6,4$, 1H, CH), $4,15$ (s, 2H, CH_2), $3,28 - 3,25$ (m, 2H, CH_2), $3,12 - 3,09$ (m, 2H, CH_2), $1,50$ (d, $^3J = 6,5$, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 155,3$, $148,8$, $145,2$, $138,3$, $136,4$, $128,5$, $126,71$, $126,70$, $124,6$, $123,5$, $121,1$, $118,5$, $118,3$, $112,3$, $111,5$, $67,2$, $49,9$, $40,0$, $31,0$, $21,8$.

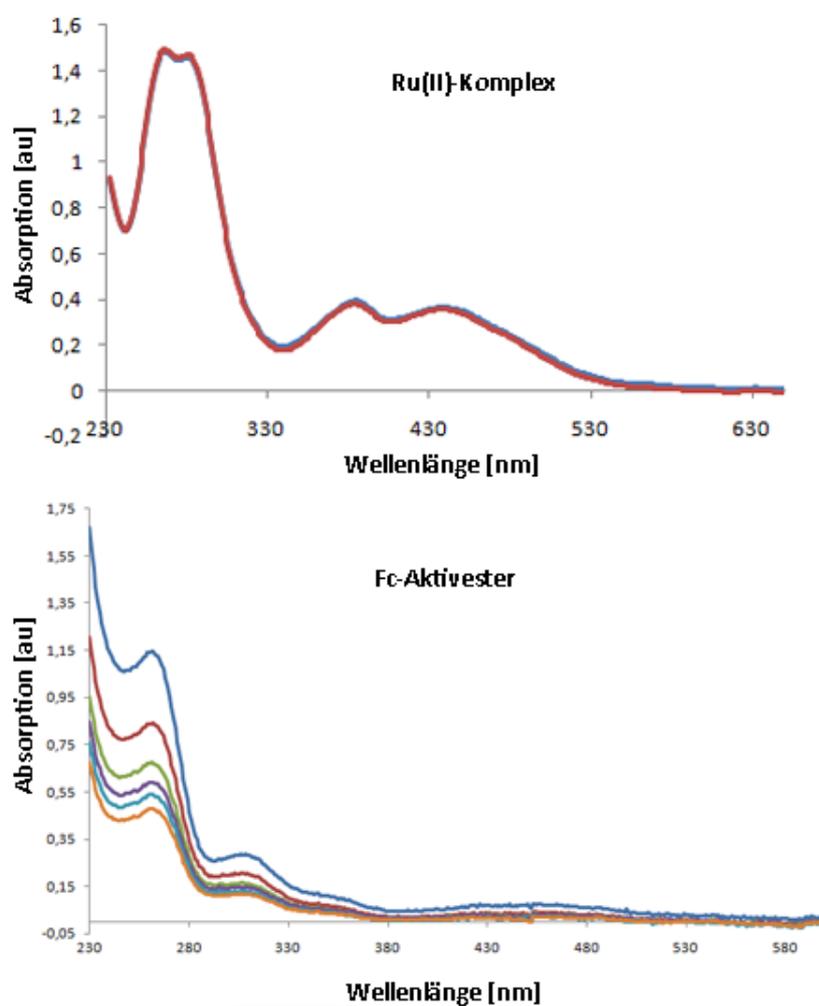
ESI-MS: m/z gefunden $[\text{M}-\text{H}]^- = 406,9$, $[\text{M}+\text{Cl}]^- = 442,9$.

MALDI-HRMS: m/z berechnet $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_4$ $[\text{M}]^+ = 408,15405$, gefunden = $408,15402$ ($\Delta m = 0,00003$, Fehler 0,1ppm).

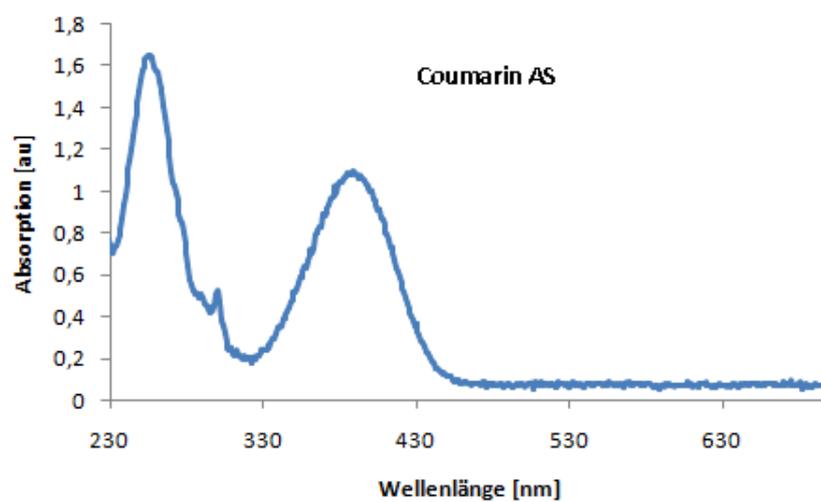
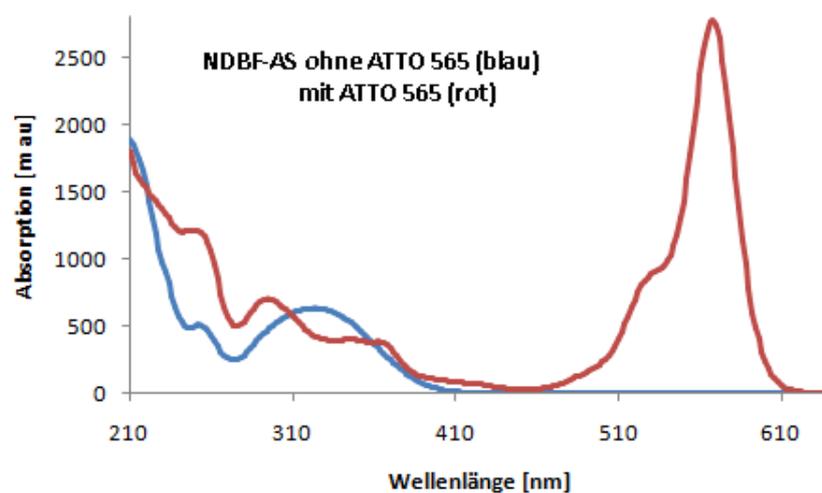
5 Anhang

5.1 UV-Vis-Spektren

Spektren von Metallverbindungen die an Oligonukleotide konjugiert wurden. Die Spektren zeigen, bei welchen Wellenlängen die DNA-Konjugate zusätzlich während der HPLC-Läufe detektiert werden können (Ru(II)-Komplex entspricht Verbindung **39**, der Fc-Aktivester wurde entsprechend der Literatur hergestellt)^[135].



Spektren der beiden neu erstellten Zwei-Photonen aktivierbaren Aminosäuren. Die Spektren deuten darauf hin, mit welchen Wellenlängen die Verbindungen aktiviert werden können (NDBF-AS ist Verbindung **86**, NDBF mit ATTO565 entspricht Verbindung **108**, Coumarin-AS ist Verbindung **97**).

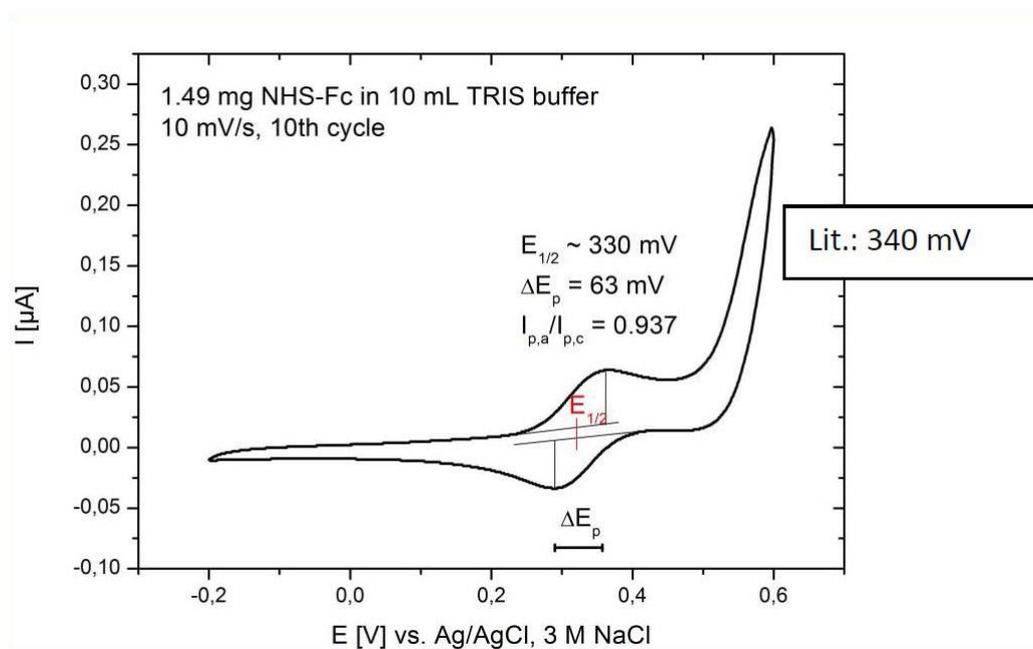


5.2 Elektrochemie-Messungen

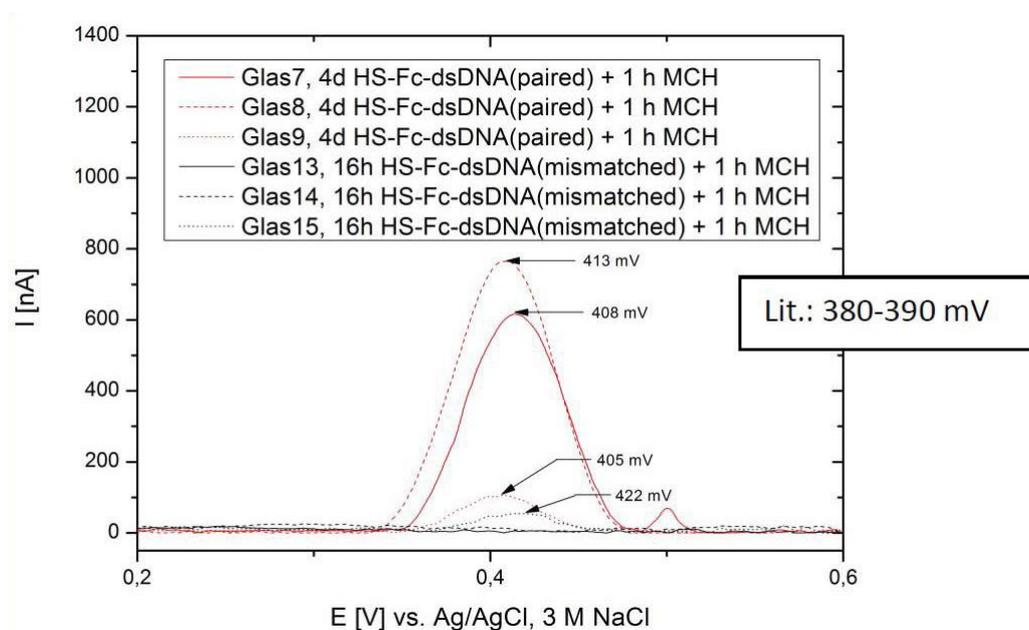
Die Elektrochemie Messungen wurden von Sebastian Schneider aus dem Arbeitskreis von Prof. Terfort aufgenommen.

Spektren mit Fc:

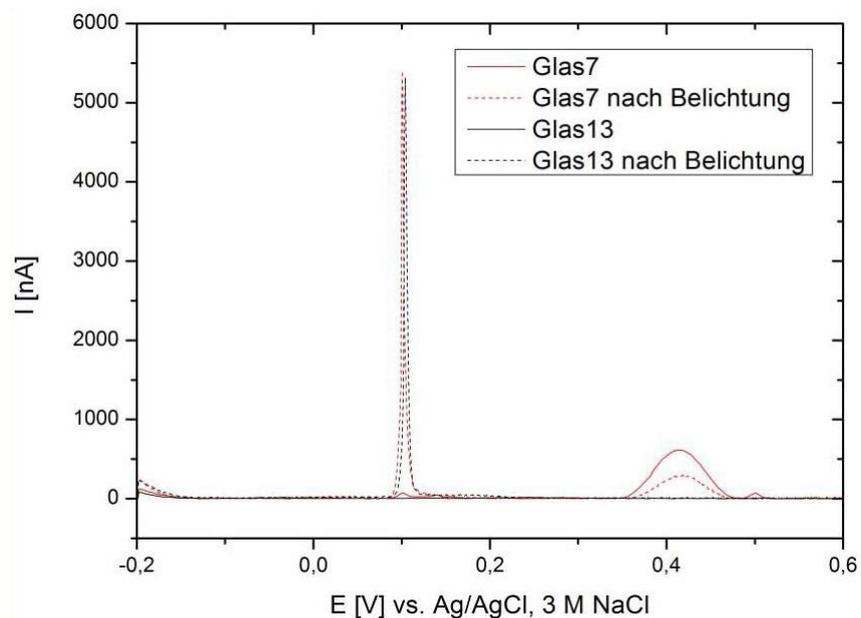
1. CV Ferrocen-Aktivester.



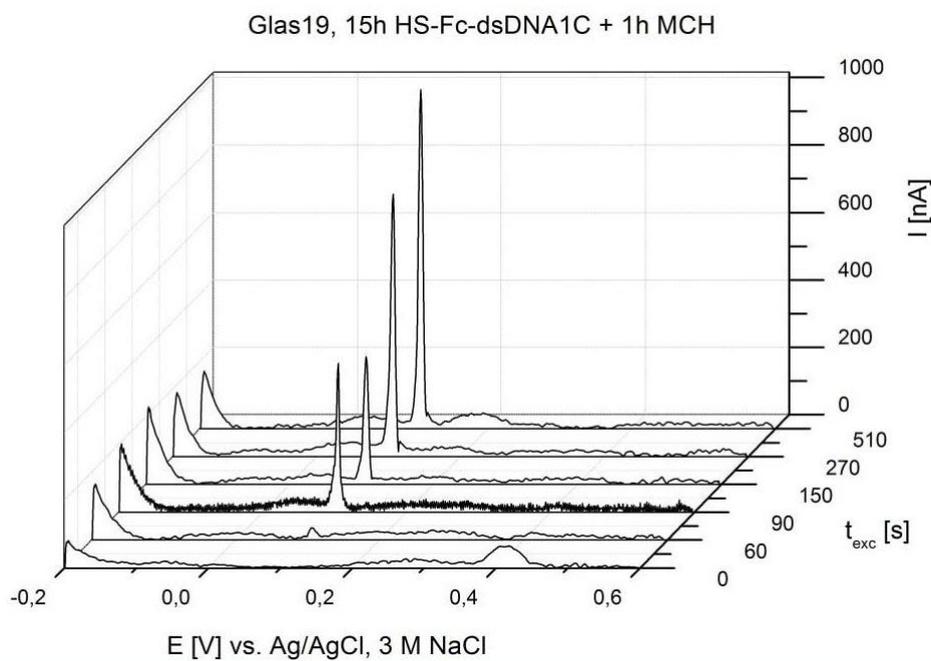
2. Differenz SWV Spektren von gepaarten und ungepaarten Fc-DNA-Konjugaten.



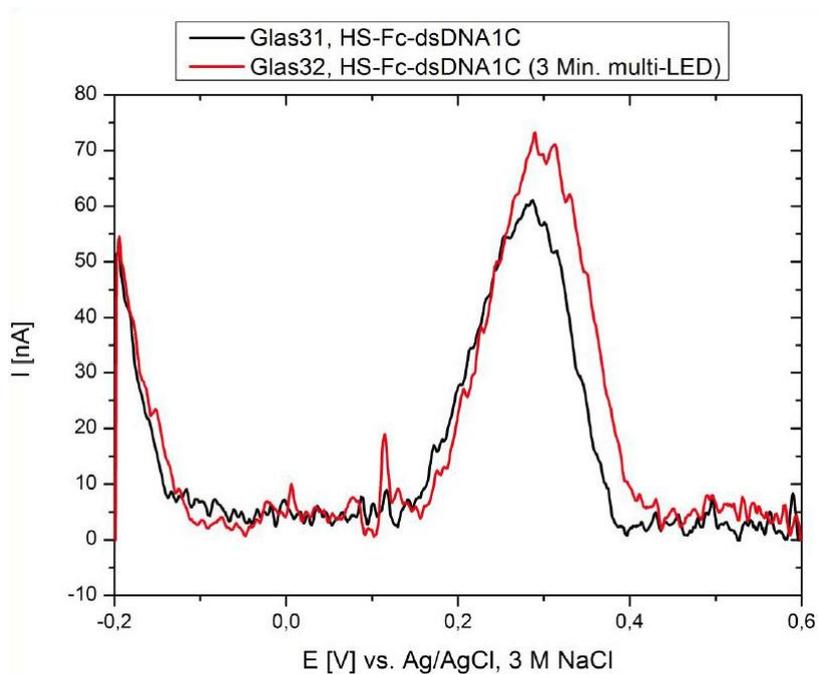
3. Differenz SWV Spektren von gepaarter und ungepaarter Fc-DNA vor und nach Belichtung, die beide keine lichtaktivierbare Gruppe enthalten.



4. Differenz SWV Spektren bei zunehmender Belichtungsdauer von Fc-DNA, die photolabile Schutzgruppen enthält.

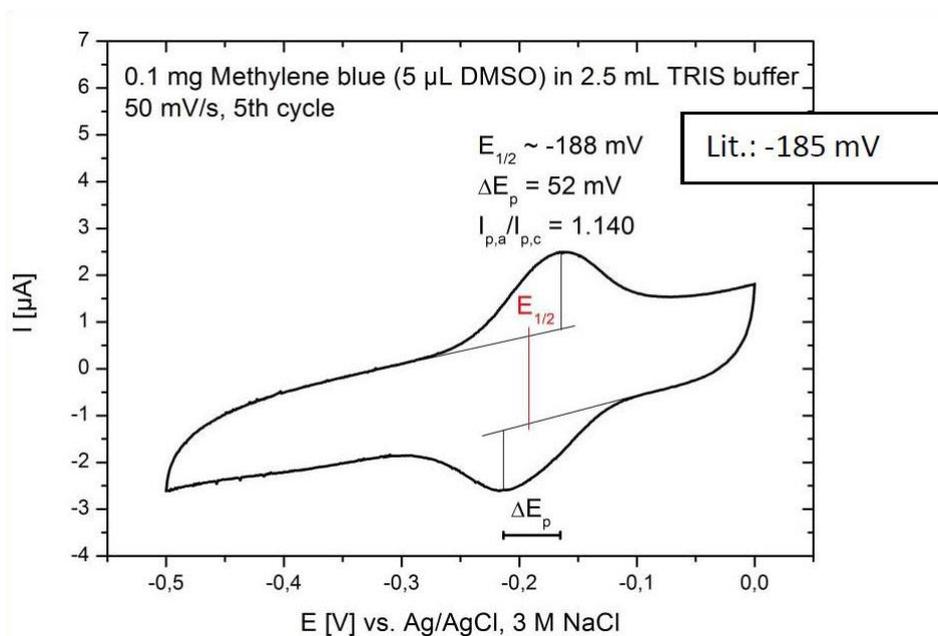


5. Differenz SWV Spektren von Fc-DNA-Proben mit photolabiler Schutzgruppe, die vor Immobilisierung in Lösung belichtet oder gar nicht belichtet wurden.

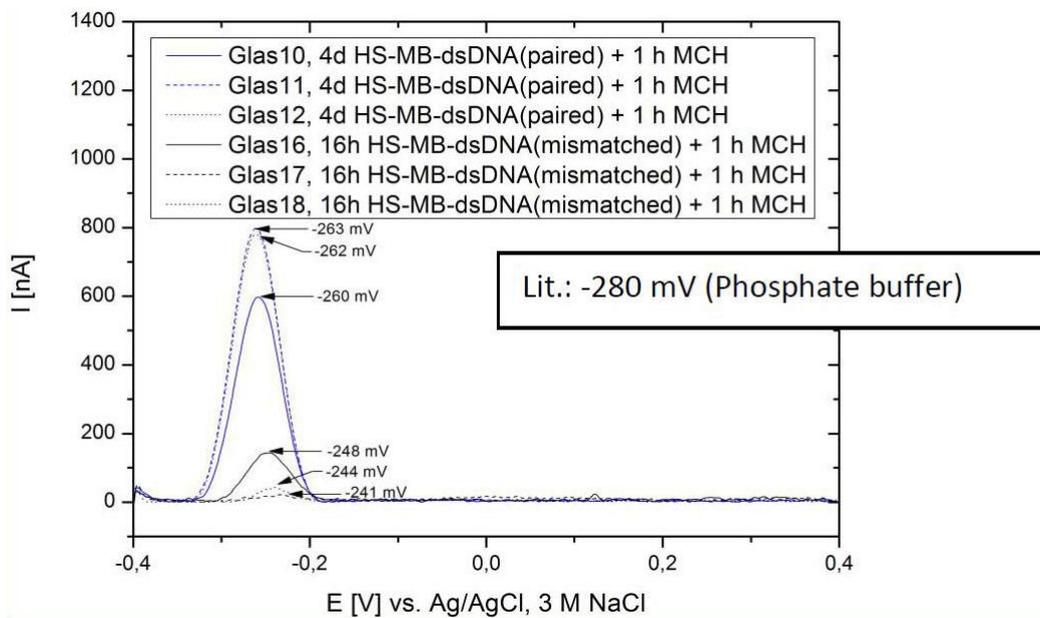


Spektren mit MB:

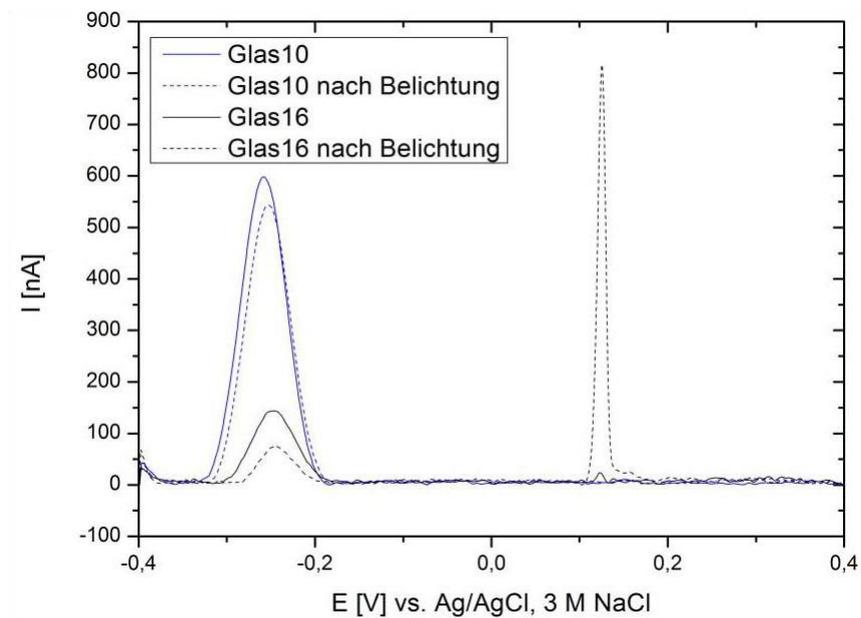
1. CV MB-Aktivester



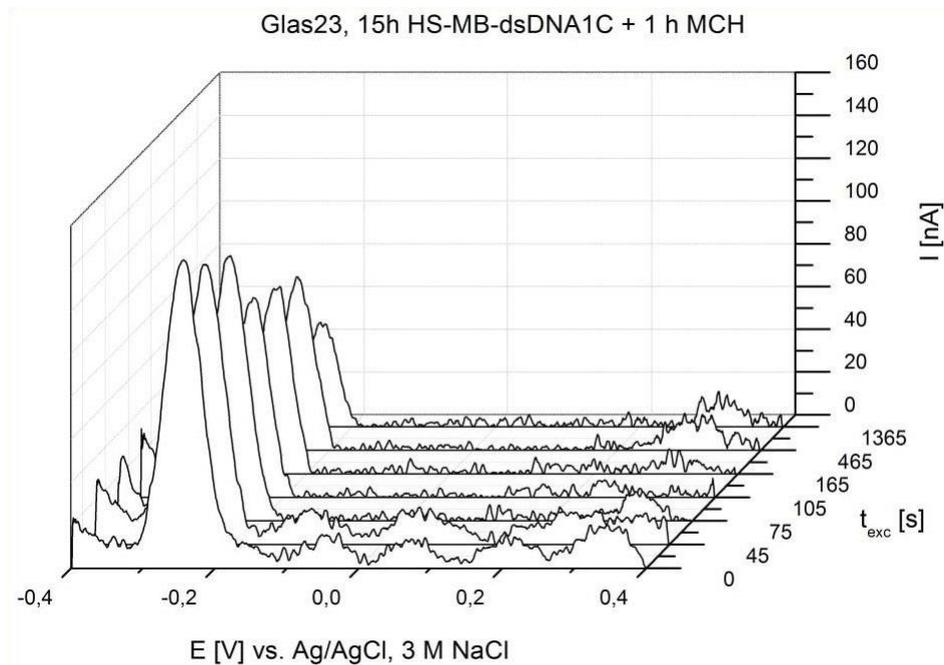
2. Differenz SWV Spektren von gepaarten und ungepaarten MB-DNA-Konjugaten.



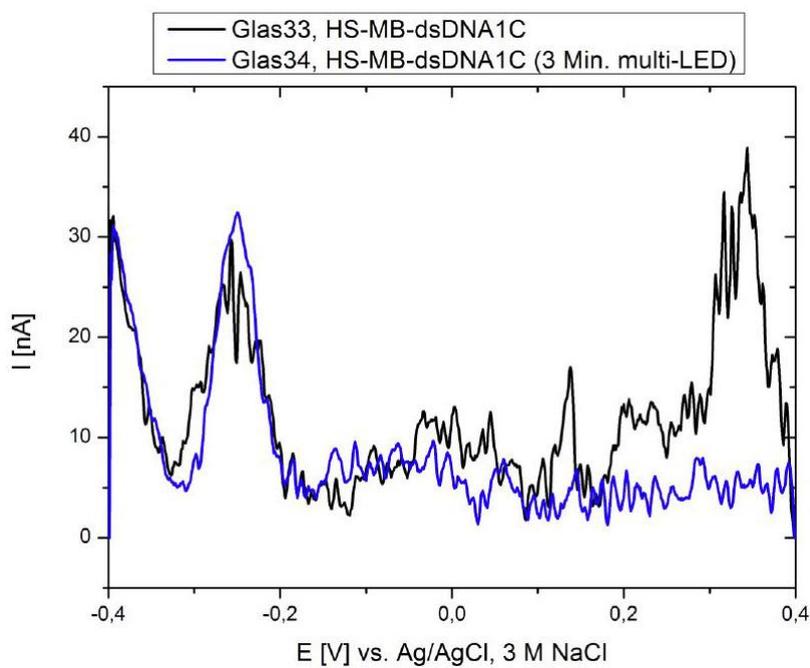
3. Differenz SWV Spektren von gepaarter und ungepaarter MB-DNA vor und nach Belichtung, die beide keine lichtaktivierbare Gruppe enthalten.



4. Differenz SWV Spektren bei zunehmender Belichtungsdauer von MB-DNA, die photolabile Schutzgruppen enthält.



5. Differenz SWV Spektren von MB-DNA-Proben mit photolabiler Schutzgruppe, die vor Immobilisierung in Lösung belichtet oder nicht belichtet wurden.



5.4 Literaturverzeichnis

- [1] M. Cordes, B. Giese, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 892.
- [2] A. Aviram, M. A. Ratner, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *29*, 277–283.
- [3] A. Nitzan, *Science* **2003**, *300*, 1384–1389.
- [4] D. M. Adams, L. Brus, C. E. D. Chidsey, S. Creager, C. Creutz, C. R. Kagan, P. V. Kamat, M. Lieberman, S. Lindsay, R. A. Marcus, et al., *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6668–6697.
- [5] C. C. Moser, J. M. Keske, K. Warncke, R. S. Farid, P. L. Dutton, *Nature* **1992**, *355*, 796–802.
- [6] D. N. Beratan, J. N. Onuchic, J. J. Hopfield, *J. Chem. Phys.* **1987**, *86*, 4488.
- [7] J. M. Artés, M. López-Martínez, I. Díez-Pérez, F. Sanz, P. Gorostiza, *Electrochimica Acta* **2014**, *140*, 83–95.
- [8] J. Gao, P. Müller, M. Wang, S. Eckhardt, M. Lauz, K. M. Fromm, B. Giese, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1926–1930.
- [9] B. Giese, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6139–6143.
- [10] M. Cordes, A. Köttgen, C. Jasper, O. Jacques, H. Boudebous, B. Giese, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3461–3463.
- [11] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans Faraday Soc* **1962**, *58*, 411–415.
- [12] D. van Lith, J. M. Warman, M. P. de Haas, A. Hummel, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **1986**, *82*, 2933–2943.
- [13] S. O. Kelley, N. M. Jackson, M. G. Hill, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 941–945.
- [14] L. Valis, Q. Wang, M. Raytchev, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 10192–10195.
- [15] M. A. O’Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5896–5900.
- [16] A. K. Mishra, R. M. Young, M. R. Wasielewski, F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15792–15797.
- [17] R. E. Holmlin, R. T. Tong, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9724–9725.
- [18] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9861–9870.
- [19] Y. Osakada, K. Kawai, M. Fujitsuka, T. Majima, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5562–5570.
- [20] J. D. Slinker, N. B. Muren, S. E. Renfrew, J. K. Barton, *Nat Chem* **2011**, *3*, 228–233.
- [21] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Kohler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318–320.
- [22] Y. C. Huang, D. Sen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14055–14059.
- [23] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848–1851.
- [24] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51–70.
- [25] K. Lewis, K. Copeland, G. Hill, *Int. J. Quantum Chem.* **2014**, *114*, 1678–1684.
- [26] C. A. Seidel, A. Schulz, M. H. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541–5553.
- [27] K. Kawai, H. Kodera, Y. Osakada, T. Majima, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 156–159.
- [28] T. Ehrenschwender, W. Schmucker, C. Wellner, T. Augenstein, P. Carl, J. Harmer, F. Breher, H.-A. Wagenknecht, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 12547–12552.
- [29] C. T. Wirges, J. Timper, M. Fischler, A. S. Sologubenko, J. Mayer, U. Simon, T. Carell, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 225–229.
- [30] Y. Li, T. Kaneko, Y. Hirotsu, R. Hatakeyama, *Small* **2010**, *6*, 27–30.
- [31] J. Cadet, T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **1999**, *424*, 9–21.
- [32] H. W. C. Postma, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 420–425.
- [33] Y. Tang, B. Ge, D. Sen, H.-Z. Yu, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 518–529.
- [34] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025–1029.
- [35] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, R. E. Holmlin, J. K. Barton, A. Hörmann, E. J. C. Olson, P. F. Barbara, *Science* **1996**, *273*, 475–480.

- [36] C. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 9134–9137.
- [37] G. I. Livshits, A. Stern, D. Rotem, N. Borovok, G. Eidelstein, A. Migliore, E. Penzo, S. J. Wind, R. Di Felice, S. S. Skourtis, et al., *Nat Nano* **2014**, *9*, 1040–1046.
- [38] B. Ge, Y. C. Huang, D. Sen, H.-Z. Yu, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10161–10163.
- [39] Y. Lu, X. Li, L. Zhang, P. Yu, L. Su, L. Mao, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1883–1890.
- [40] S. Konermann, M. D. Brigham, A. Trevino, P. D. Hsu, M. Heidenreich, Le Cong, R. J. Platt, D. A. Scott, G. M. Church, F. Zhang, *Nature* **2013**, DOI 10.1038/nature12466.
- [41] O. I. Lungu, R. A. Hallett, E. J. Choi, M. J. Aiken, K. M. Hahn, B. Kuhlman, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 507–517.
- [42] A. S. Baker, A. Deiters, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1398–1407.
- [43] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [44] M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chem Soc Rev* **2015**, *44*, 3358–3377.
- [45] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.
- [46] A. Deiters, D. Groff, Y. Ryu, J. Xie, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2728–2731.
- [47] J. Luo, R. Uprety, Y. Naro, C. Chou, D. P. Nguyen, J. W. Chin, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15551–15558.
- [48] N. Wu, A. Deiters, T. A. Cropp, D. King, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14306–14307.
- [49] E. A. Lemke, D. Summerer, B. H. Geierstanger, S. M. Brittain, P. G. Schultz, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 769–772.
- [50] T. T. Lee, J. R. García, J. I. Paez, A. Singh, E. A. Phelps, S. Weis, Z. Shafiq, A. Shekaran, A. del Campo, A. J. García, *Nat. Mater.* **2014**, *14*, 352–360.
- [51] J. Mosquera, M. I. Sánchez, J. L. Mascareñas, M. Eugenio Vázquez, *Chem Commun* **2015**, *51*, 5501–5504.
- [52] E. Decaneto, S. Abbruzzetti, I. Heise, W. Lubitz, C. Viappiani, M. Knipp, *Photochem Photobiol Sci* **2015**, *14*, 300–307.
- [53] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [54] J. K. Böcker, K. Friedel, J. C. J. Matern, A.-L. Bachmann, H. D. Mootz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2116–2120.
- [55] B.-T. Williger, R. Reich, M. Neeman, T. Bercovici, M. Liscovitch, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29656–29659.
- [56] S. Thompson, J. A. Spoors, M. C. Fawcett, C. H. Self, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *201*, 1213–1219.
- [57] C. H. Self, S. Thompson, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 817–820.
- [58] L. Bédouet, H. Adenier, S. Pulvin, C. Bedel-Cloutour, D. Thomas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 939–944.
- [59] F. Rohrbach, F. Schäfer, M. A. H. Fichte, F. Pfeiffer, J. Müller, B. Pöttsch, A. Heckel, G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11912–11915.
- [60] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822–823.
- [61] A. Heckel, M. C. R. Buff, M.-S. L. Raddatz, J. Müller, B. Pöttsch, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6900–6902.
- [62] M. C. R. Buff, F. Schafer, B. Wulffen, J. Muller, B. Potzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2111–2118.
- [63] N. Umezawa, Y. Noro, K. Ukai, N. Kato, T. Higuchi, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1694–1698.
- [64] S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 13363–13383.
- [65] C. J. Bosques, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7530–7531.
- [66] H. Li, J.-M. Hah, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10474–10475.
- [67] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- [68] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- [69] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 381–403.

- [70] S. E. Lupold, B. J. Hicke, Y. Lin, D. S. Coffey, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4029–4033.
- [71] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928–4931.
- [72] L. Gold, D. Ayers, J. Bertino, C. Bock, A. Bock, E. N. Brody, J. Carter, A. B. Dalby, B. E. Eaton, T. Fitzwater, et al., *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15004.
- [73] M. Kimoto, R. Yamashige, K. Matsunaga, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 453–457.
- [74] J. Victor, In Vitro Selection of “Click”-Modified, Readily Photolabile Aptamers, Master Thesis, Life and Medical Sciences Institute University of Bonn, **2013**.
- [75] J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- [76] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry (Mosc.)* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [77] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [78] F. Friedrich, Untersuchungen Zu Lichtinduzierbarem Elektronentransfer in DNA, Diplom Arbeit, Goethe Universität Frankfurt, **2010**.
- [79] R. E. Holmlin, J. A. Yao, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 174–189.
- [80] L. Della Ciana, I. Hamachi, T. J. Meyer, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1731–1735.
- [81] P. A. Anderson, G. B. Deacon, K. H. Haarmann, F. R. Keene, T. J. Meyer, D. A. Reitsma, B. W. Skelton, G. F. Strouse, N. C. Thomas, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 6145–6157.
- [82] A. Tikhomirova, I. V. Beletskaya, T. V. Chalikian, *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *45*, 10563–10571.
- [83] D. T. Odom, E. A. Dill, J. K. Barton, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2026–2033.
- [84] R. M. Hartshorn, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5919–5925.
- [85] S.-P. Liu, S. H. Weisbrod, Z. Tang, A. Marx, E. Scheer, A. Erbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3313–3316.
- [86] M. Wirkner, J. M. Alonso, V. Maus, M. Salierno, T. T. Lee, A. J. García, A. del Campo, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3907–3910.
- [87] T. Ishida, S. Yamamoto, W. Mizutani, M. Motomatsu, H. Tokumoto, H. Hokari, H. Azebara, M. Fujihira, *Langmuir* **1997**, *13*, 3261–3265.
- [88] A. Anne, A. Bouchardon, J. Moiroux, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1112–1113.
- [89] D. Kang, X. Zuo, R. Yang, F. Xia, K. W. Plaxco, R. J. White, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9109–9113.
- [90] T. Goldau, K. Murayama, C. Brieke, S. Steinwand, P. Mondal, M. Biswas, I. Burghardt, J. Wachtveitl, H. Asanuma, A. Heckel, *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 2845–2854.
- [91] J. C. Griepenburg, T. L. Rapp, P. J. Carroll, J. Eberwine, I. J. Dmochowski, *Chem Sci* **2015**, *6*, 2342–2346.
- [92] C. Grunwald, K. Schulze, A. Reichel, V. U. Weiss, D. Blaas, J. Piehler, K.-H. Wiesmuller, R. Tampe, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 6146–6151.
- [93] N. Labòria, R. Wieneke, R. Tampé, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 848–853.
- [94] R. Wieneke, A. Heckel, M. Heilemann, R. Tampé, Optochemical Biology: In-Situ Receptor Clustering by Light, Research report, **2012**.
- [95] A. Shigenaga, J. Yamamoto, Y. Sumikawa, T. Furuta, A. Otaka, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2868–2871.
- [96] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, *Chem. - Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
- [97] D. D. McKinnon, T. E. Brown, K. A. Kyburz, E. Kiyotake, K. S. Anseth, *Biomacromolecules* **2014**, 140624102736007.
- [98] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [99] S. Kantevari, M. Matsuzaki, Y. Kanemoto, H. Kasai, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 123–125.
- [100] A. Specht, F. Bolze, L. Donato, C. Herbivo, S. Charon, D. Warther, S. Gug, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 578.
- [101] M. Salierno, E. Marceca, D. S. Peterka, R. Yuste, R. Etchenique, *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 418–422.

- [102] O. D. Fedoryak, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419–3422.
- [103] N. Gagey, P. Neveu, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2467–2469.
- [104] C. Menge, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4620–4623.
- [105] F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. H. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450–1453.
- [106] H. Lusic, R. Uprety, A. Deiters, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 916–919.
- [107] Y. Oikawa, K. Sugano, O. Yonemitsu, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2087–2088.
- [108] P. Kuehne, A. Linden, M. Hesse, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1085–1094.
- [109] S. Abele, D. Seebach, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000*, 1–15.
- [110] X. Wu, T.-A. Chen, R. D. Rieke, *Macromolecules* **1996**, *29*, 7671–7677.
- [111] R. D. Rieke, J. D. Brown, X. Wu, *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 3923–3930.
- [112] L. Zhu, R. M. Wehmeyer, R. D. Rieke, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1445–1453.
- [113] C. Guisado, J. E. Waterhouse, W. S. Price, M. R. Jorgensen, A. D. Miller, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1049.
- [114] T. Furuta, T. Watanabe, S. Tanabe, J. Sakyo, C. Matsuba, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4717–4720.
- [115] N. Iranpoor, H. Firouzabadi, N. Nowrouzi, D. Khalili, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3893–3899.
- [116] V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geißler, D. Lorenz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7887–7891.
- [117] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 618–621.
- [118] X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8669–8672.
- [119] V. Gatterdam, R. Ramadass, T. Stoess, M. A. H. Fichte, J. Wachtveitl, A. Heckel, R. Tampé, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5680–5684.
- [120] M. Heilemann, *J. Biotechnol.* **2010**, *149*, 243–251.
- [121] L. M. Wysocki, J. B. Grimm, A. N. Tkachuk, T. A. Brown, E. Betzig, L. D. Lavis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11206–11209.
- [122] D. Warther, F. Bolze, J. Léonard, S. Gug, A. Specht, D. Puliti, X.-H. Sun, P. Kessler, Y. Lutz, J.-L. Vonesch, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2585–2590.
- [123] V. N. Belov, C. A. Wurm, V. P. Boyarskiy, S. Jakobs, S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3520–3523.
- [124] V. N. Belov, G. Y. Mitronova, M. L. Bossi, V. P. Boyarskiy, E. Hebisch, C. Geisler, K. Kolmakov, C. A. Wurm, K. I. Willig, S. W. Hell, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 13162–13173.
- [125] S. J. Lord, N. R. Conley, H. D. Lee, R. Samuel, N. Liu, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9204–9205.
- [126] S. J. Lord, H. D. Lee, R. Samuel, R. Weber, N. Liu, N. R. Conley, M. A. Thompson, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 14157–14167.
- [127] J. S. Rinne, T. P. Kaminski, U. Kubitscheck, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5375.
- [128] H.-M. Lee, M. A. Priestman, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1446–1447.
- [129] K. Kolmakov, V. Belov, J. Bierwagen, C. Ringemann, V. Müller, C. Eggeling, S. Hell, *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16*, 158–166.
- [130] D. Saran, D. H. Burke, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 275–279.
- [131] J. Szychowski, A. Mahdavi, J. J. L. Hodas, J. D. Bagert, J. T. Ngo, P. Landgraf, D. C. Dieterich, E. M. Schuman, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18351–18360.
- [132] M. A. Azagarsamy, K. S. Anseth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13803–13807.
- [133] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **2008**.
- [134] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179.
- [135] S. Takenaka, Y. Uto, H. Kondo, T. Ihara, M. Takagi, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 436–443.
- [136] T. Ihara, Y. Maruo, S. Takenaka, M. Takagi, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4273–4280.
- [137] F. Fricke, S. Malkusch, G. Wangorsch, J. Greiner, B. Kaltschmidt, C. Kaltschmidt, D. Widera, T. Dandekar, M. Heilemann, *Histochem. Cell Biol.* **2014**, *142*, 91–101.

- [138] A. Rodrigues-Correia, P. Seyfried, A. Heckel, in *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* (Eds.: M. Egli, P. Herdewijn, A. Matusda, Y.S. Sanghvi), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2014**, pp. 6.11.1–6.11.32.
- [139] S. Wolter, A. Löschberger, T. Holm, S. Aufmkolk, M.-C. Dabauvalle, S. van de Linde, M. Sauer, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 1040–1041.
- [140] F. Friedrich, K. Klehs, M. A. H. Fichte, S. Junek, M. Heilemann, A. Heckel, *Chem Commun* **2015**, DOI 10.1039/C5CC05700K.
- [141] F. Tolle, F. Friedrich, A. Heckel, G. Mayer, *A Method of Identifying or Producing an Aptamer*, **2015**.
- [142] F. Friedrich, A. Heckel, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2073–2075.

5.5 Abkürzungsverzeichnis

A Adenin
Abb. Abbildung
AFM *atomic force microscopy*
Ar Argon
Arg Arginin
AS Aminosäure
Asp Asparaginsäure
Bhc 6-Brom-7-Hydroxycumarin
bpy Bipyridin
bzw. beziehungsweise
C Cytosin
ca. circa
CDI 1,1'-Carbonyldiimidazol
CH Cyclohexan
CRY Cryptochrom
CV Cyclovoltametrie
Cys Cystein
DBA *donor-bridge-acceptor*
DC Dünnschichtchromatographie
DCM Dichlormethan
DDQ 2,3-Dichlor-5,6-dicyanobenzoquinon
DIPEA Diisopropylethylamin
DMAP 4-(Dimethylamino)pyridin
DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMF Dimethylformamid
DMTr Dimethoxytrityl
DNA Desoxyribonukleinsäure
dppz Dipyridophenazin
Dr. Doktor
ds doppelsträngig
DSC Disuccinimidylcarbonat
EDC *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EE Essigester
EGTA Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure
EMCCD *Electron Multiplying Charge-Coupled Device*
ESI *Electron spray ionization*
et al. et alii
Fc Ferrocen
Fmoc Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET Förster-Resonanzenergietransfer
G Guanin
Gly Glycin

GSD *ground state depletion*
GUV *Giant Unilamellar Vesicles*
h Stunde
HBS *HEPES buffered saline*
HBTU *2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat*
His Histidin
HOBt *1-Hydroxybenzotriazol Hydrat*
HOMO *highest occupied molecular orbital*
HPLC *High-performance liquid chromatography*
IFN- γ *Interferone- γ*
IT *InfraRot*
 K_D *Dissoziationskonstante*
LOV *Light oxygen voltage*
MALDI *Matrix assisted laser desorption spectroscopy*
MB *Methylenblau*
Min Minute
MPI *Max-Planck-Institut*
MSA *N-Methyl-N-trimethylsilylacetamid*
NDBF *Nitrodibenzofuran*
NHS *N-Hydroxysuccinimid*
NI *Naphthalimid*
NMR *nuclear magnetic resonance*
NPE *1-(2-Nitrophenyl)ethyl*
NPE *1-(2-Nitrophenyl)ethyl*
NPP *2-(2-Nitrophenyl)propyl*
PALM *photoactivated localization microscopy*
PBS *Phosphate buffered saline*
PCR *Polymerase chain reaction*
PEGDA *Poly(ethylenglycol) Diacrylat*
phen *Phenanthrolin*
PIPES *1,4-Piperazindiethansulfonsäure*
PMP *p-Methoxyphenyl*
POI *Protein Of Interest*
PTZ *Phenothiazin*
Py *Pyridin*
Prof. Professor
RGD *Arg-Gly-Asp*
RNA *Ribonukleinsäure*
RP *reverse phase*
RT *Raumtemperatur*
SELEX *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*
SICLOPPS *split intein circular ligation of peptides and proteins*
SIM *structured-illumination microscopy*
STED *stimulated-emission depletion*
STORM *stochastic optical reconstruction microscopy*

SWV *Square Wave* Voltammetrie

T Thymin

Tab. Tabelle

TCEP Tris-(2-carboxyethyl)phosphin

TEAA Triethylammoniumacetat

TFA Trifluoressigsäure

THF Tetrahydrofuran

tRNA transport RNA

UV Ultra Violett

VEGF-165 *Vascular Endothelial Growth Factor*

z.B. zum Beispiel

6 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all jenen besonders bedanken, die mich in der einen oder anderen Form unterstützt und mir damit diese Arbeit ermöglicht haben.

Herzlichster Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Alexander Heckel. Ich durfte ein spannendes, selbst mit entwickeltes Thema bearbeiten. Trotz Schwierigkeiten in meinem ursprünglichen Projekt hast du mir einen erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit durch ergänzende Projekte ermöglicht.

Prof. Dr. Joachim Engels danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtes dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern in den analytischen Abteilungen der Universität danke ich für die Aufnahme zahlreicher Spektren und die Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei aufgetretenen Unstimmigkeiten.

Der ganzen Arbeitsgruppe sowie allen meinen Praktikanten und Kollaborationspartnern danke ich für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie für den fachlichen und oft auch gesellschaftspolitischen Austausch über viele Themen. Ich hoffe die eine oder der andere teilten meinen Spaß an den manchmal auch hitzigen Gesprächen. Ein besonderer Dank gilt denjenigen, die gezwungenermaßen durch ein gemeinsames Labor meine ausgeprägte diskussionsbereitschaft und alle weiteren Eigenheiten hautnah erleben mussten: Manuela Fichte, Dr. Florian Schäfer und Josefine Kahlstatt. Manuela danke ich zusätzlich für die Hilfe bei der Zwei-Photonen-Anregung und Florian für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Freunden danke ich für tolle Zeiten außerhalb des Labors. Ebenso auch meiner Freundin Larissa, die mich immer wieder auf andere Gedanken bringen kann und mich in so vielen Situationen zum Lachen anregt.

Mein größter Dank gilt abschließend meiner Familie: dass ich die Doktorarbeit, trotz sehr schwieriger Zeiten, beenden konnte, geht ausschließlich auf eure gesamte Unterstützung zurück. Tausend Dank!

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Friedrich
Vorname: Felix
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Anschrift: In den Obergärten 7, 61184 Karben
Geburtsdatum/-ort: 10.11.1984 in Offenbach am Main



Schule und Studium

09/2010 bis voraussichtlich 10/2015 Promotion am *Cluster of Excellence Frankfurt Macromolecular Complexes*, Thema der Dissertation: „Untersuchung zur optischen Regulation von elektrischer Leitfähigkeit in DNA und Synthese neuer photolabiler Schutzgruppen für Protein- und Oligonukleotid-anwendungen“, Betreuer: Prof. Dr. Alexander Heckel.

10/2004 bis 06/2010 Studium der Chemie an der Johann-Wolfgang- Goethe Universität in Frankfurt am Main, Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Alexander Heckel (Abschlussnote: sehr gut, 1,2).
 Nebenfach Betriebswirtschaft (Abschluss 1,0).

1995 bis 2004 Abitur am Kaiserin-Friedrich-Gymnasium in Bad Homburg v. d. H. (Abschlussdurchschnitt: 1,6).

1991 bis 1995 Grundschule in Petterweil.

Stipendien und Auszeichnungen

2011 - 2015 Promotionsstipendien der Konrad-Adenauer-Stiftung und des *Cluster of Excellence Frankfurt Macromolecular Complexes*.

2006 - 2010 Stipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung, Studienförderung.

2007 Dr. Albert Hloch Preis für herausragende Leistungen im Chemie Vordiplom.

2004 Buchpreise der Firma Lilly GmbH und der Deutschen Physikalischen Gesellschaft für die Leistungen im Chemie und Physik Abitur.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen (Stand 09/2015)

A two-photon activatable amino acid linker for the induction of fluorescence, F. Friedrich, K. Klehs, M. A. H. Fichte, S. Junek, M. Heilemann, A. Heckel, *ChemComm*, **2015**, accepted manuscript.^[140]

Patent: A method of identifying or producing an aptamer, F. Tolle, F. Friedrich, A. Heckel, G. Mayer, Patent application PCT/EP2014/071205, **2013**.^[141]

Highlight article: Photon cascade with clip-on fluorophores, F. Friedrich, A. Heckel, *ChemPhysChem*, **2011**, *11*, 2073-2075.^[142]