



Zweiphotonen-Entschützung von Oligonukleotiden

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Manuela A. H. Fichte
aus Frankfurt a. M./Höchst

Frankfurt am Main, 2016
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe-Universität als Dissertation
angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

1. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Engels

Datum der Disputation: 24.11.16

Meiner Familie

Zusammenfassung

Um die Funktionsweise von biologischen Prozessen zu untersuchen, werden Trigger-Signale benötigt, die die Prozesse initiieren können, ohne dabei dem Organismus zu schaden oder Nebenreaktionen hervorzurufen. Ein durch seine hochentwickelte Technik geeignetes Trigger-Signal stellt Licht dar, da es bei geeigneter Wellenlänge nichtinvasiv ist und nur wenige biologische Prozesse durch Licht gesteuert werden. Um einen Prozess mit Licht aktivierbar zu machen, benötigt man eine lichtsensitive Einheit, beispielsweise eine photolabile Schutzgruppe, die durch die Bestrahlung mit Licht einen zuvor blockierten Bereich freisetzt. Solche photolablen Schutzgruppen werden als *cage* bezeichnet und wurden erstmals 1977 von Engels *et al.* im biologischen Kontext eingesetzt. Seither wurden unzählige Publikationen auf diesem Gebiet veröffentlicht und die Technik exzessiv verwendet und weiterentwickelt. Aktuellere Untersuchungen beschäftigen sich neben der wellenlängenselektiven Photolyse der Schutzgruppen, mit der Entwicklung von Zweiphotonen-sensitiven Schutzgruppen und deren Einsatz im biologischen Kontext.

Hauptziel dieser Arbeit war es die Zweiphotonen-Technik für die Photolyse von photolabil geschützten Oligonukleotiden nutzbar zu machen und das Photolyseergebnis zu visualisieren. Dazu wurden zunächst verschiedene mit Zweiphotonen-sensitiven Schutzgruppen modifizierte Phosphoramidite synthetisiert und über Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut. Die erstmals in Oligonukleotide eingebaute *p*-Dialkylaminonitrobiphenyl (ANBP)-Schutzgruppe auf dG und die *h*-Nitrodibenzofuran (hNDBF (*h* = „homolog“))-Schutzgruppe auf dT wurden zunächst auf ihre Einphotonen-Eigenschaften untersucht. Von diesen Oligonukleotiden wurden Schmelzpunktmessungen durchgeführt und UV/Vis-Absorptionsspektren gemessen. Auch die Photolyse-Quantenausbeuten dieser Oligonukleotide wurden mittels DMNB-Aktinometrie gemessen. Weiterhin wurden erste Versuche zur wellenlängenselektiven Photolyse hNDBF- in Anwesenheit NPP-geschützter Oligonukleotide vorgenommen. Das ANBP-geschützte Oligonukleotid wurde auf seine Photolysierbarkeit mit höheren Wellenlängen untersucht. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung zur Zweiphotonen-Photolyse.

Die Existenz eines Zweiphotonen-induzierten Effekts kann durch die quadratische Abhängigkeit des erzeugten Effekts von der eingestrahlten Leistung nachgewiesen werden. Da die leistungsabhängige Zweiphotonen-Photolyse von Oligonukleotiden nur zu sehr geringen photolysierten Mengen führt, schlugen erste Versuche (durchgeführt von Dr. Florian Schäfer) die Eduktabnahme/ Produktzunahme/Produktenstehung über eine RP-HPLC-Analytik zu quantifizieren, fehl. Ziel dieser Arbeit war es nun eine bessere Detektionsmethode zu entwickeln. Aufgrund der sensitiven Erfassungsgrenze von Fluoreszenz, sollte das Photolyse-Ereignis in ein Fluoreszenz-Signal umgewandelt werden.

Dazu wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zunächst wurde ein Verdrängungs-Assay entwickelt, dessen Doppelstrang-Sonde aus einem FRET-Paar bestand. Der Fluorophor-markierte Strang dient dabei als Gegenstrang zum photolabil geschützten Strang. Durch Einphotonen-Photolyse konnte hier eine Fluoreszenzzunahme in Lösung detektiert werden. Da allerdings die Zweiphotonen-Belichtung nicht zum gewünschten Ergebnis führte, wurden Versuche zur Immobilisierung eines photolabil geschützten Strangs auf selbst silanisierten oder kommerziell erhältlichen silanisierten Glasoberflächen durchgeführt. Zwar konnte der photolabil geschützte Strang immobilisiert werden, aber die Hybridisierung erzeugte Probleme, die das Verdrängungs-Assay auf der Oberfläche nicht realisierbar machten. In Anlehnung an ein von Tampé et al. entwickeltes NDBF-Glutathion-Farbstoff Konstrukt, bei dem die Fluoreszenz des Farbstoffs durch die Anwesenheit der photolabilen Schutzgruppe gequencht wird, wurde ein dC^{NDBF} -Monomer über einen Aminolinker mit einem Farbstoff gekoppelt. Durch diese räumliche Nähe wurde auch hier die Fluoreszenz des Farbstoffs gequencht und der Beweis der Zweiphotonen-Photolyse über die quadratische Abhängigkeit der durch die Photolyse entstehenden Fluoreszenzzunahme von der eingestrahlten Leistung konnte erzielt werden. Zur Veranschaulichung des Effekts wurde das dC^{NDBF} -Monomer sowie ein dG^{ANBP} -Monomer, jeweils mit einem Fluorophor markiert, über die Einführung eines zusätzlichen Thiol-Linkers in Maleimid-Hydrogelen immobilisiert. In diesen modifizierten Hydrogelen konnten verschiedene geometrische Formen im Mikroskop photolysiert werden und diese, über die durch die Abspaltung der Schutzgruppe erhöhte Fluoreszenz, detektiert werden. Mit Hilfe dieser erfolgreichen Immobilisierungsmethode konnten auch photolabil geschützte Oligonukleotide über einen Thiol-Linker erfolgreich in Maleimid-Hydrogele immobilisiert werden und der Verdrängungs-Assay dort durchgeführt werden. Die immobilisierten Stränge enthielten 7-[(Diethylamino)cumarin-4-yl]-methyl (DEACM) bzw. ANBP Schutzgruppen. Neben der quadratischen Abhängigkeit der Photolyse von der eingestrahlten Leistung konnten in diesen Hydrogelen auch 3D-aufgelöste Photolysen realisiert werden, die eindeutig die Zweiphotonen-Photolyse belegen. Diese 3D-Experimente wurden zusammen mit Dr. Stephan Junek am MPI für Hirnforschung durchgeführt. Durch die Wahl zweier unterschiedlicher Sequenzen für die dT^{DEACM} und dG^{ANBP} modifizierten Stränge und zwei unterschiedlicher Fluorophore für die Doppelstrang-Sonden, konnte die wellenlängenselektive Zweiphotonen-Photolyse gezeigt werden. Die ANBP Schutzgruppe ließ sich in Anwesenheit der DEACM Schutzgruppe photolysieren ohne die DEACM Schutzgruppe abzuspalten. Erstaunlicherweise konnte durch die Photolyse mit geringer Leistung sogar eine orthogonale Photolyse realisiert werden, die es ermöglichte ebenfalls die DEACM Schutzgruppe in Anwesenheit der ANBP Schutzgruppe zu photolysieren.



Um zu zeigen, dass die Zweiphotonen Photolyse von Oligonukleotiden auch in Organismen realisiert werden kann ohne das biologische System zu schädigen wurde versucht den Verdrängungs-Assay auch in Zellen durchzuführen. Versuche die Stränge in HeLa-Zellen zu transfizieren, schlugen fehl, da vermutlich die Doppelstrang-Sonde bereits bei den Inkubationstemperaturen der Zellen dissoziierte oder durch die Belichtung thermisch dissoziiert wurde. Durch die Verwendung der Patch-Clamp-Technik in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Junek am MPI für Hirnforschung konnten die Stränge über die Elektrolyt-Lösung in Hippocampus-Neuronen eingebracht werden und durch Zweiphotonen-Bestrahlung dort photolysiert werden, was zu einem deutlichen Fluoreszenzanstieg führte. Durch die angeschlossene Patch-Clamp-Pipette konnten so zusätzlich elektrophysiologische Messungen durchgeführt werden, die zeigten, dass die durchgeführte Zweiphotonen-Bestrahlung nicht invasiv für die Zellen ist.

Die durchgeführten Experimente beweisen, dass Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppen auf Oligonukleotiden photolysiert werden können und dass ihr Einsatz auch in biologischen Systemen möglich ist, da die Photolyse bei Laser-Leistungen durchgeführt werden kann, die den Organismus nicht schädigen. Der entwickelte Verdrängungs-Assay ermöglicht es weiterhin neue photolabile Schutzgruppen auf Oligonukleotiden auf ihre Zweiphotonen-Sensitivität zu untersuchen.

Ein weiteres Projekt beschäftigte sich mit der Synthese der neuen Schutzgruppe DMA-NDBF-OH, die *in-silico* von der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Dreuw aus Heidelberg als effiziente Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppe beschrieben wird. Es wurde versucht DMA-NDBF-OH über zwei Syntheserouten herzustellen. Eine Route basierte auf der Einführung der Funktionalitäten an einem unmodifizierten Dibenzofuran, die leider an der Bromierung der Seitenkette scheiterte. Die zweite Syntheseroute wurde in Anlehnung an die NDBF-Synthese von Deiters et al., bei der das Dibenzofuran durch eine Kondensation zweier modifizierter Benzolringe und einem Pd-katalysierten Ringschluss aufgebaut wird, durchgeführt. Mit dieser Syntheseroute konnte das DMA-NDBF-OH erfolgreich synthetisiert werden. Aufgrund seiner starken bathochromen Verschiebung eignet sich diese Schutzgruppe hervorragend für die wellenlängenselektive Photolyse auf Ein- und Zweiphotonenebene.

Summary

For the investigation of biological processes, trigger signals are needed, which have the ability to initiate these processes without perturbation of the biological system or induction of side reactions. Due to its highly developed technology, light represents a suitable trigger signal since its non-invasiveness at a certain wavelength and only a few biological processes are light sensitive. In order to activate a process with light, a light sensitive unit is necessary, e.g. a photolabile protecting group which releases a previously protected functionality upon irradiation. Such photolabile protecting groups are termed *cage* and were first applied to a biological system by Engels et al in 1997. Ever since, numerous amounts of publications were issued in this field and the technology has been used and advanced to a high degree. Current investigations deal with wavelength selective photolysis, the development of two-photon sensitive cages and their application in a biological context.

The main aim of this thesis was to make the two photon technology accessible to the photolysis of oligonucleotides protected with cages and to visualize the event of photolysis.

Therefore, several two-photon sensitive caged phosphoramidites were synthesized and incorporated into oligonucleotides by solid phase synthesis. The oligonucleotides containing the cages *p*-dialkylaminonitrobiphenyl (ANBP) on a dG and *h*-nitrodibenzofuran (hNDBF (h = "homologous")) on a dT were incorporated into a oligonucleotide for the first time and their one-photon properties were determined. Melting point studies and UV/Vis absorption measurements were performed with these strands. The photolysis quantum yield of the oligonucleotides was determined via DMNB actinometry. Furthermore, first tests of wavelength selective uncaging of hNDBF in the presence of NPP protected strands were realized. The ANBP caged oligonucleotide was tested upon photolysis at higher wavelengths, followed by investigation of two-photon photolysis.

The existence of a two-photon induced effect can be proven by the quadratic dependency of the generated effect from the power of irradiation. Since the power dependent two-photon photolysis of oligonucleotides lead only to small amounts of photolysed sample, first trials (performed by Dr. Florian Schäfer) determining the product formation through RP-HPLC failed. Aim of this work was to develop an improved detection method. Due to the sensitivity of fluorescence, the photolysis event should be converted into a fluorescence signal.

Therefore, different approaches were pursued. At first, a double strand displacement assay was developed whose probe was composed of a FRET double strand. The fluorophore labeled strand is designed as the counter strand to the caged strand. Through one-photon photolysis, an increase of fluorescence was detectable in solution. Since the two-photon photolysis did not lead to the desired result, attempts on the immobilization of a caged oligonucleotide on self-silanized or purchased glass surfaces were implemented. Indeed, it was possible to

immobilize the caged strand on the surface, but the hybridization was problematic and thus the displacement assay not realizable. Based on a NDBF-glutathion dye construct by Tampé et al. where the fluorescence of the dye is quenched in presence of a cage, a dC^{NDBF}-monomer was coupled over an amino modifier to a dye. Through spacial proximity the fluorescence of the dye was quenched even here and proof of the two-photon photolysis by the quadratic dependency of the fluorescence from the power of irradiation could be achieved. In order to visualize the effect, the dye labeled dC^{NDBF} and dG^{ANBP} monomers were immobilized in maleimid hydrogels by an additionally attached thiol modification. In these modified hydrogels several geometrical shapes were photolysed in a microscope and the resulting fluorescence detected. By implementing this successful immobilization method, caged oligonucleotides were immobilized in maleimid hydrogels over a thiol linker and the displacement assay was performed, successively. The immobilized strands were caged with 7-[(diethylamino)coumarin-4-yl]-methyl (DEACM) or ANBP. In this assay, not only was the quadratic dependency of the power of the incident laser determined, but although 3d resolved plots of the photolysis realized which prove two photon photolysis. The 3d experiments were performed together with Dr. Stephan Junek at the MPI for brain research. By choosing two different sequences for the dT^{DEACM} and dG^{ANBP} modified strands and two different fluorophores for the DNA duplex probe, wavelength selective two-photon uncaging could be demonstrated. The uncaging of the ANBP cage in presence of DEACM was possible without the photolysis of DEACM. Surprisingly, low power values lead to orthogonal uncaging which allowed the uncaging of DEACM in the presence of ANBP.



To demonstrate that two-photon uncaging of oligonucleotides is functional in biological systems without damage, the double strand displacement assay was performed in cells. Attempts to transfect the strands into HeLa-cells failed, possibly caused by dissociation of the double stranded probe due to incubation temperature or thermic dissociation by irradiation. Applying the patch clamp technology in cooperation with Dr. Stephan Junek at the MPI for brain research, double strands were transferred in a electrolyte solution in neurons of the hippocampus. In there, they were photolyzed with two-photon irradiation which lead to an increase in fluorescence. By the attached patch clamp pipette, electrophysiological

measurements were performed which proved that two photon irradiation is non-invasive to the cells.

The performed experiments prove that two-photon sensitive cages on oligonucleotides can be uncaged and are applicable in biological systems since the required laser power for photolysis does not harm the organism. The development of the double strand displacement assay enables the further investigation of new cages on oligonucleotides regarding their two-photon sensitivity.

A further project dealt with the synthesis of the new cage DMA-NDBF-OH which is expected to be an efficient two-photon sensitive protection group as a result of an *in-silico* screen by Prof. Dr. Andreas Dreuw from Heidelberg. Two different synthetic routes were tested. One route is based on the attachment of functional groups to the unmodified dibenzofuran, but at bromination of the sidechain failed. The second synthetic route was performed according to the NDBF synthesis by Deiters et al. where the dibenzofuran is obtained by condensation of two modified benzenes and a subsequent Pd catalyzed ring formation. Following this synthetic route DMA-NDBF-OH was successfully assembled.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Photolabile Schutzgruppen	1
1.1.1.	Anforderungen an photolabile Schutzgruppen	3
1.1.2.	Anwendungen photolabiler Schutzgruppen.....	6
1.1.2.1.	Photolabil geschützte Oligonukleotide	6
1.1.2.2.	Photolabile Schutzgruppen in Hydrogelen und auf Oberflächen	9
1.1.2.3.	Wellenlängenselektive Photolyse.....	12
1.1.2.4.	Die Grenzen der bathochromen Verschiebung	16
1.2.	Zweiphotonen-Absorption	19
1.2.1.	Aufbau eines Lasers	21
1.2.2.	Zweiphotonen-Theorie und deren Anwendung bei photolabilen Schutzgruppen	23
1.2.2.1.	Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppen in Proteinen.....	27
1.2.2.2.	Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppen in Hydrogelen.....	28
1.2.2.3.	Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppen auf Neurotransmittern	28
1.3.	DNA Synthese mit Modifikationen.....	31
1.4.	Mikroskopie	34
1.4.1.	Fluoreszenz-Mikroskopie	37
1.4.1.1.	Konfokal-Mikroskopie	38
2.	Zielsetzung.....	43
3.	Ergebnisse und Diskussion	45

3.1. Synthese photolabil geschützter Oligonukleotide und deren Einphotonen-Charakterisierung.....	45
3.1.1. Synthese des dT ^{hNDBF} -Phosphoramidits.....	46
3.1.2. Synthese des dG ^{ANBP} -Phosphoramidits.....	47
3.1.3. Charakterisierung der photolabil geschützten Oligonukleotide.....	49
3.1.4. Zusammenfassung und Ausblick.....	57
3.2. Zweiphotonen-Charakterisierung von Oligonukleotiden.....	59
3.2.1. Vorarbeiten und erste eigene Versuche zur Zweiphotonen-Photolyse mit anschließender HPLC-Analyse.....	59
3.2.2. Versuche zur Zweiphotonen-Charakterisierung mit Hilfe eines Verdrängungs-Assays.....	61
3.2.3. Versuche zur Durchführung des Verdrängungs-Assay nach Immobilisierung der photolabil geschützten Stränge an Oberflächen.....	67
3.2.3.1. Silanisierung von Glasoberflächen und anschließende Immobilisierungs-Versuche.....	68
3.2.3.2. Immobilisierungs-Versuche auf käuflich erwerblichen silanisierten Objektträgern und anschließende Hybridisierungs-Versuche.....	72
3.2.4. Detektion der Zweiphotonen-Photolyse durch Fluoreszenz-Quenching einer photolabilen Schutzgruppe.....	77
3.2.4.1. Messung der Fluoreszenzänderung durch Photolyse eines mit NDBF und ATTO565 modifizierten Tetramers.....	78
3.2.4.2. Messung der Fluoreszenzänderung durch Photolyse eines mit NDBF und ATTO565 modifizierten Monomers.....	79
3.2.5. Verdrängungs-Assay im Hydrogel und in Zellen.....	86
3.2.5.1. Zellanwendungen.....	102
3.2.6. Zusammenfassung und Ausblick.....	106

3.3.	Synthese der neuen photolabilen Schutzgruppe DMA-NDBF-OH.....	109
3.3.1.	Syntheseroute 1: Substitution des Dibenzofurans.....	110
3.3.2.	Syntheseroute 2: Aufbau des Dibenzofurans aus substituierten Benzolderivaten	116
3.3.3.	Zusammenfassung und Ausblick	120
4.	Experimenteller Teil	123
4.1.	Chemische Synthese.....	123
4.1.1.	Materialien und Methoden	123
4.1.2.	Synthese des dT ^{hNDBF} -Phosphoramidits.....	125
4.1.3.	Synthese des dG ^{ANBP} -Phosphoramidits	129
4.1.4.	Synthese weiterer Phosphoramidite	133
4.1.5.	Synthese von DMA-NDBF-OH - Route 1	136
4.1.6.	Synthese von DMA-NDBF-OH - Route 2	144
4.2.	Oligonukleotid-Synthese.....	147
4.3.	Projekt-spezifische Methoden.....	149
4.3.1.	Einphotonen-Charakterisierung	149
4.3.2.	Zweiphotonen-Visualisierung.....	152
4.3.2.1.	Allgemeine Methoden.....	152
4.3.2.2.	Spezielle Methoden	154
4.3.2.3.	Verdrängungs-Assay im Hydrogel	158
5.	Anhang	163
5.1.	RP-HPLC-Chromatogramme	163
5.2.	Literaturverzeichnis.....	166
5.4.	Abkürzungsverzeichnis.....	171
6.	Danksagung.....	177
7.	Lebenslauf	179

1. Einleitung

1.1. Photolabile Schutzgruppen

Um biologische Prozesse zu Untersuchungszwecken zeitlich kontrollierbar zu machen, werden externe Trigger benötigt, die zeit- und orts aufgelöst durch ihre Zugabe Prozesse starten oder stoppen können.^[1] Diese Trigger können chemischer Natur sein, z. B. eine Säure, die eine zuvor durch eine säurelabile Schutzgruppe unreaktive Funktionalität freisetzt. Ein bedeutendes nicht invasives Werkzeug zur zeitlich kontrollierten Untersuchung von biologischen Prozessen stellt die Verwendung von Licht da. Dies liegt unter anderem an dessen leichter Dosierbarkeit, die durch die Regulation der Leistung der Lichtquelle oder Abschwächung durch Filter erfolgen kann. Ein weiterer Vorteil ist die präzise Ortsauflösung aufgrund der guten Fokussierbarkeit des Lichts durch optische Linsen. Auch fungiert Licht als orthogonaler Trigger, da die meisten Zellen nichtlichtsensitiv sind. Wird bei diesen Experimenten Licht oberhalb von 300 nm verwendet, finden kaum Zellschäden statt, was auch den Einsatz in Organismen ermöglicht. Eine Regulation durch Licht in einem Organismus ist bei Verwendung von transparenten Organismen wie *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans* des Stammes der Fadenwürmer) oder Zebrafischen möglich.^[1] Bei nicht transparenten Organismen kann die Haut mit Licht direkt adressiert werden, durch den Einsatz von Glasfasern ist auch eine Bestrahlung von verschiedenen Organen möglich, wobei die zu adressierende Stelle am besten oberflächennah vorliegen sollte. In der photodynamischen Therapie kann durch solche Glasfasern beispielsweise die Harnblasenwand homogen belichtet werden.^[2]

Um Prozesse mit Hilfe von Licht zu kontrollieren, gibt es drei mögliche Ansätze. Zum einen die Verwendung von Photoschaltern, die durch alternative Bestrahlung mit zwei chromatisch verschobenen Wellenlängen zwischen zwei isomeren Zuständen hin- und hergeschaltet werden können. Zum anderen die Verwendung der Optogenetik, die bereits photosensitive Proteine an den zu regulierenden Stellen implementiert, und so eine photosensitive Regulation ermöglicht. Eine dritte Möglichkeit besteht in der Verwendung von photolabilen Schutzgruppen. Diese können an reaktive oder regulatorisch wichtige Funktionalitäten angebracht werden, wodurch diese Funktionalität inhibiert wird. Durch Photolyse wird die photolabile Schutzgruppe wieder abgespalten und die Funktionalität dadurch wieder

freigesetzt.^[3] Da im Rahmen dieser Arbeit nur photolabile Schutzgruppen verwendet wurden, wird sich auch hier auf diese beschränkt.

Die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen in der chemischen Synthese ist schon seit 1962^[4] bekannt, wurde allerdings erst 1977 von Engels *et al.*^[5] und 1978 von Kaplan *et al.*^[6] zum Schützen von biologischen Systemen verwendet. Engels *et al.* synthetisierten in ihrer Studie verschiedene cyclische Adenosinmonophosphat-Triester (cAMP), unter anderem auch einen *ortho*-Nitrobenzyl-Ester, die die Membrangängigkeit von exogen verabreichtem cAMP verbessern sollten (siehe Abbildung 1). Alle Benzylester, auch der *ortho*-Nitrobenzylester des cAMP konnten von Rattengliomzellen aufgenommen werden und durch Hydrolyse innerhalb der Zellen cAMP freisetzen. *In vitro* konnte auch gezeigt werden, dass die photolabile Schutzgruppe mit 366 nm abgespalten werden konnte (Halbwertszeit ca. 1h) und die anschließende Stimulation einer Protein-Kinase zu vergleichbaren Halbwertszeiten führte wie das unmodifizierte cAMP. Eine Belichtung der Zellen, die das geschützte cAMP aufgenommen haben, erfolgte in dieser Studie aber nicht.^[5]

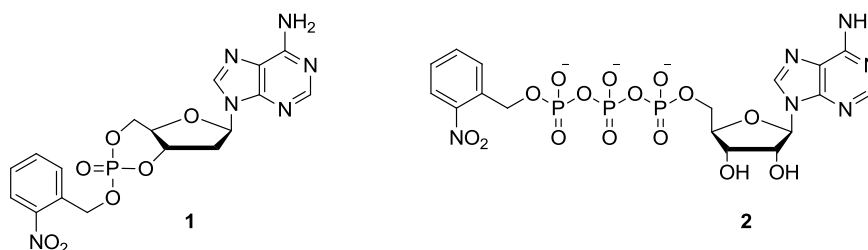


Abbildung 1: Die ersten photolabil geschützten Biomoleküle, links *ortho*-Nitrobenzyl-geschütztes cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)^[7] und rechts *ortho*-Nitrobenzyl geschütztes Adenosintriphosphat (ATP).^[6]

Hoffman *et al.* synthetisierten und untersuchten *ortho*-Nitrobenzyl-geschütztes Adenosintriphosphat (ATP) (siehe Abbildung 1) welches in wässrigem Milieu durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 340 nm innerhalb von 30 Sek. zu 70% freigesetzt werden konnte. Das geschützte ATP wurde in Erythrozyten-Gosts eingebracht, und dort durch Bestrahlung freigesetzt. Kaplan *et al.* verwendeten auch als erste den missverständlichen aber bis heute verwendeten Begriff des *Cages* für photolabile Schutzgruppen, die in biologischen Systemen verwendet werden.^[6] Missverständlich ist der Begriff des *Cages* – übersetzt Käfig – insofern, als das geschützte Molekül nur an einer funktionellen Gruppe kovalent an eine photolabile Schutzgruppe geknüpft ist und nicht integriert in einer Käfigverbindung geschützt wird.

1.1.1. Anforderungen an photolabile Schutzgruppen

Eine ideale Schutzgruppe verfügt über möglichst viele der folgenden Eigenschaften:^[8]

- Die Absorption der Schutzgruppe sollte möglichst weit oberhalb vom UV-C und UV-B-Bereich des Spektrums liegen, um einen Einsatz in biologischen Systemen zu ermöglichen, ohne dieses System zu beschädigen.
- Die Photolyseprodukte sollten nicht im gleichen Wellenlängenbereich absorbieren wie das Edukt, da sonst das Produkt Photonen absorbiert, die dann nicht mehr für die Photolysereaktion zur Verfügung stehen.
- Die Quantenausbeute der Photolysereaktion und auch der Extinktionskoeffizient der photolabilen Schutzgruppe sollten möglichst hoch sein um eine schnelle effektive Photolyse zu gewährleisten. Eine Aussage über die Effizienz einer photolabilen Schutzgruppe gibt das Produkt aus Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient an.
- Das Photolyseprodukt sollte nicht toxisch sein und auch keine hohe Reaktivität innerhalb des verwendeten Systems aufweisen.
- Die photolabile Schutzgruppe muss innerhalb des verwendeten Systems vor der Bestrahlung über eine gewisse Stabilität verfügen.
- Die Abspaltungskinetik muss schneller ablaufen als die Kinetik eines zu untersuchenden Prozesses.
- Das Photolyseprodukt sollte im eingesetzten Milieu löslich sein.

Dass all diese Anforderungen nicht von jeder photolabilen Schutzgruppe erfüllt werden können, ist verständlich aber auch nicht zwingend erforderlich. Wichtig ist, dass für die jeweilig gewünschte Anwendung eine Schutzgruppe mit den dazu passenden Eigenschaften gewählt wird.^[8] Aufgrund der vielseitigen Anforderungen an photolabile Schutzgruppen, wurde bereits eine unglaubliche Vielzahl von Schutzgruppen entwickelt, die auf verschiedensten Grundgerüsten aufbauen und je nach Substitution ihre Eigenschaften verändern. Ein kompletter Überblick kann im Rahmen dieser Arbeit nicht dargestellt werden, dazu sei auf verschiedene Übersichtsartikel verwiesen.^[1,3,9]

Die am meisten verwendeten Schutzgruppen basieren auf dem Nitrobenzol-Gerüst, dazu gehören u.a. *o*-Nitrobenzyl (NB) und 1-(2-Nitrophenyl)ethyl (NPE). NB und NPE sind Schutzgruppen die ihre Stärke in der einfachen synthetischen Zugänglichkeiten haben. So wurden und werden sie trotz der Bildung der toxischen Abspaltungsprodukte Nitrosoaldehyd (NB) bzw. Nitrosoketon (NPE), in vielen Studien eingesetzt.^[9] Der Photolysemechanismus der NB- und NPE-Schutzgruppe ist exemplarisch in Abbildung 2 dargestellt.^[8,9]

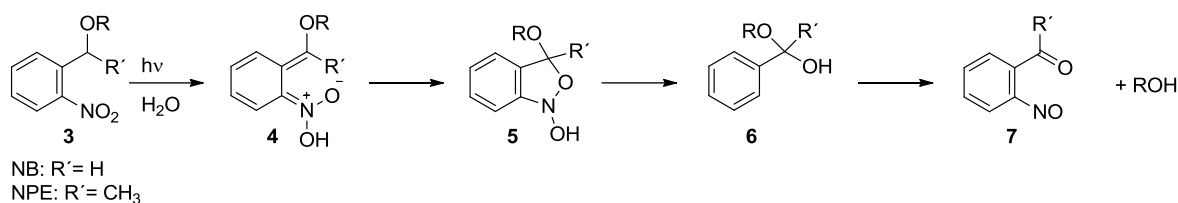


Abbildung 2: Photolyse-Mechanismus der NB- und NPE-Schutzgruppe.^[8,9]

Durch die Bestrahlung mit Licht einer mit der NB-Gruppe geschützten Verbindung **3** erfolgt dessen Umlagerung zum neutralen Aci-Nitro-Intermediat **4**. Aus dem Aci-Nitro-Intermediat bildet sich das cyclische Benzisoxazol **5**. Die anschließend gebildete Verbindung **6** setzt unter β -Eliminierung das Produkt frei und bildet dabei den Nitrosoaldehyden **7**.

Eine weniger toxische Abwandlung des NPEs stellt das 2-(2-Nitrophenyl)propyl (NPP) dar, bei dessen Photolyse anstelle des Nitrosoaldehyds ein Nitrostyrolerivat entsteht. Der Photolyse-Mechanismus von 2-(2-Nitrophenyl)propyl ist in Abbildung 3 gezeigt.^[10]

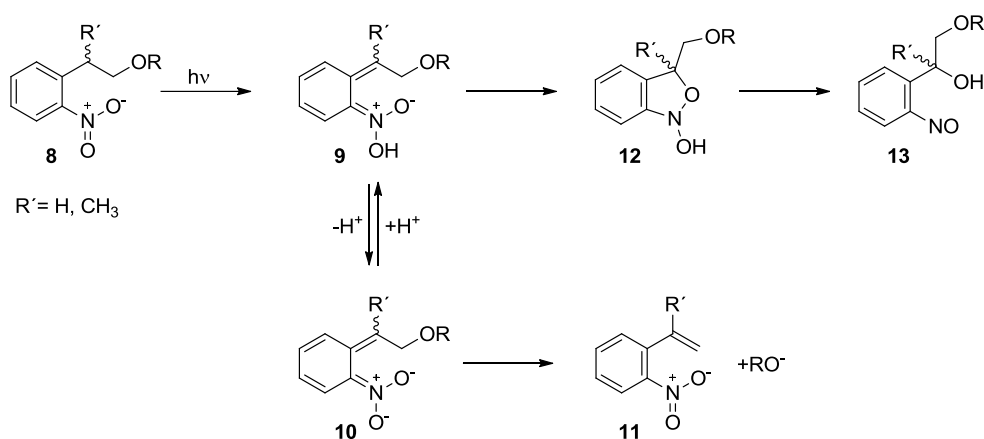


Abbildung 3: Photolyse-Mechanismus der NPP-Schutzgruppe.^[10]

Durch die Anregung mit Licht wird Verbindung **8** in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand angeregt aus dem entweder direkt die Aci-Nitro-Spezies **9**, oder über einen ISC (Inter-System-Crossing) der Triplett-Zustand $T_1(n\pi^*)$ bevölkert wird, der im Anschluss über ein Triplet-Biradikal ebenfalls den Singulett-Grundzustand **9** generiert. Aus diesem erfolgt bereits in Anwesenheit einer schwachen Base wie H₂O die Deprotonierung zur Aci-Verbindung **10** und die anschließende β -Eliminierung zum Nitro-Styryl-Derivat **11** unter Abspaltung des Produkt-Alkoholats. Findet die Reaktion allerdings in einem zu aciden Milieu statt, verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der Aci-Nitro-Komponente **9**, die über einen Ringschluss **12** zum Nitroso-Produkt **13**

führt.^[10] Erkennbar ist, dass es hier auch nicht zu einer Freisetzung der geschützten Funktionalität führt, weshalb auch bereits bei physiologischem pH-Wert das Nitroso-Nebenprodukt zu geringen Anteilen beobachtet werden kann.^[11]

Ausgehend von diesen Grundverbindungen gibt es eine Vielzahl von Derivaten, bei denen meist die Einführung anderer Substituenten am Benzolring, die entweder elektronenziehende oder –schiebende Effekte aufweisen oder das π -Systems erweitern, erfolgt. Diese Variationen erfolgen um den Extinktionskoeffizienten zu erhöhen, das Absorptionsmaximum in Richtung höherer Wellenlängen zu verschieben oder die Zweiphotonen-Sensitivität zu erhöhen (siehe Abschnitt 1.2).

Eine weitere weitverbreitet eingesetzte Schutzgruppen-Klasse stellen die Cumarine dar, die erstmals von Givens *et al.* zur photoinduzierten Freisetzung eines Diethylphosphatesters eingesetzt wurden.^[12] Cumarine stellen aufgrund ihrer hohen molaren Extinktionskoeffizienten bei hohen Wellenlängen, ihrer schnellen Photolyserate und ihrer Stabilität eine interessante Gruppe von photolabilen Schutzgruppen dar. Einen Vorteil, aber auch gleichzeitig einen Nachteil stellt die Fluoreszenz der Cumarine dar. Von Vorteil kann sie sein, um das geschützte Molekül zu verfolgen. Von Nachteil ist allerdings, die durch die Fluoreszenz resultierende geringere Photolyse-Quantenausbeute. Durch geschickte Wahl der Substituenten, kann sowohl die Wasserlöslichkeit als auch das Absorptionsmaximum der Grundverbindung verbessert bzw. rotverschoben werden. Es existieren mittlerweile eine Vielzahl von Derivaten, die entweder die Wasserlöslichkeit erhöhen oder die Absorptionseigenschaften verbessern, sei es hinsichtlich der Quantenausbeute, des Extinktionskoeffizienten oder des Absorptionsmaximums.^[9] Ein Beispiel stellt (7-Diethylaminocumarin-4-yl)methyl (DEACM) dar, bei dem durch die Einführung eines 7-Diethyl-Aminosubstituenten die photochemischen und spektroskopischen Eigenschaften des Cumarins deutlich verbessert wurden, mit dem Resultat eines Absorptionsmaximums bei ca. 400 nm und einer für Cumarine recht hohen Quantenausbeuten von ~0.2. Erstmals wurde diese Schutzgruppe zum Schützen des Phosphats von cAMP und cGMP eingesetzt.^[9,13]

Der allgemeine Photolyse-Mechanismus für Cumarine als Schutzgruppe von Phosphaten, Sulfaten oder Carbonsäuren ist in Abbildung 4 abgebildet.

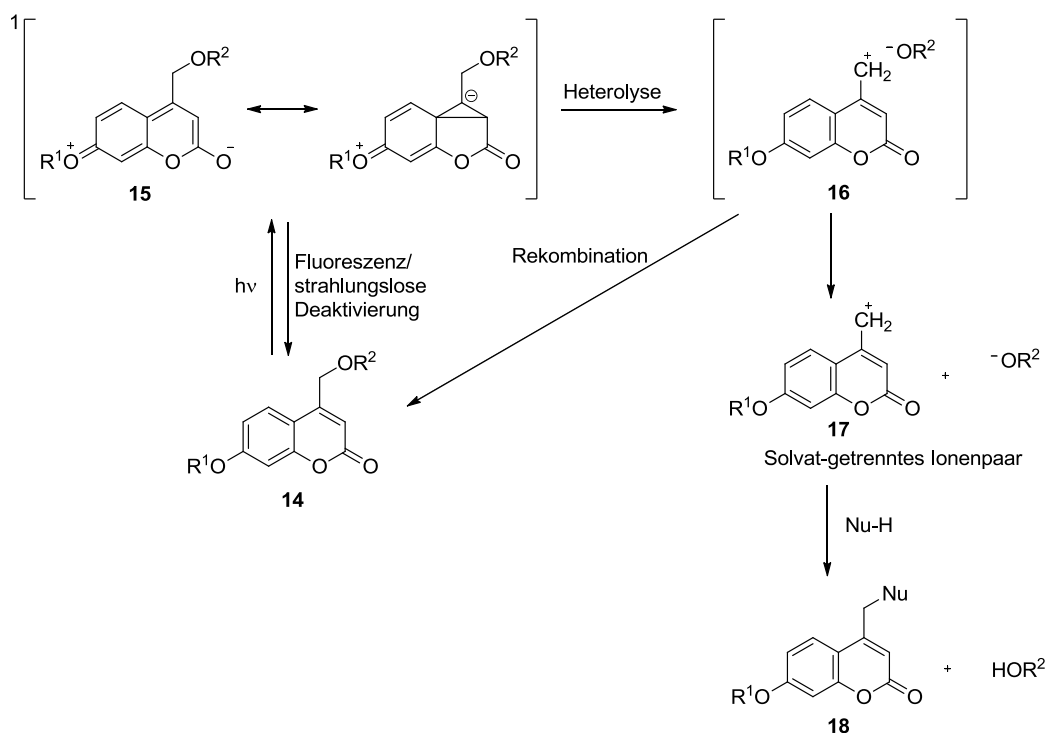


Abbildung 4: Photolyse-Mechanismus der Cumarin-Schutzgruppe.^[9,14]

Durch die Überführung des Cumarins **14** in einen angeregten Zustand **15** kommt es zu einer Lösungsmittel-unterstützten Photoheterolyse **16** und einer anschließenden Ionenpaar-Separation durch das polare Lösungsmittel.^[14] Abschließend reagiert das Cumarin-Carbokation **17** entweder mit einem vorliegenden Nukleophil oder dem Lösungsmittel um ein stabiles Cumarin-Produkt **18** zu bilden. Schlechte Abgangsgruppen wie Amine, Thiole und Alkohole können über einen Carbamatlinker ebenfalls mit Cumarinen photolabil geschützt werden.^[9]

1.1.2. Anwendungen photolabiler Schutzgruppen

Photolabile Schutzgruppen wurden für eine Vielzahl von Studien verwendet, von denen an dieser Stelle nur exemplarisch auf einige wenige Anwendungen eingegangen werden kann.

1.1.2.1. Photolabil geschützte Oligonukleotide

Oligonukleotide haben im Organismus eine Vielzahl von Aufgaben. DNA hat dabei vermeintlich die größte Aufgabe, da sie der Träger unserer Erbinformationen ist. Doch ist die

Rolle der RNA nicht zu vernachlässigen. Die bekanntesten Aufgaben sind die als mobiler Informationsträger als mRNA nach der Transkription und die Beteiligung beim Aufbau von Aminosäureketten für die Protein-Synthese als tRNA bei der Translation. Eine weitere wichtige Gruppe der RNAs stellen die kurzen (ca. 22 Nukleotide) nicht codierenden *microRNAs* (miRNA) dar, die wiederum regulatorisch auf die mRNA einwirken können. Durch Ihre Bindung an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) der mRNA, kann diese entweder temporär nicht translatiert werden, oder sogar enzymatisch abgebaut werden. Die miRNA hat dabei aber aufgrund ihrer nicht perfekt spezifischen Komplementarität und ihrer kurzen Sequenz Einfluss auf verschiedene mRNAs. Um die Aktivität von mRNAs, die durch miRNAs reguliert werden, hochzuregulieren, können artifizielle Gegensequenzen zur jeweiligen miRNA, sogenannte AntimiRs, zugegeben werden. Aufgrund der vielseitigen regulatorischen Wirkung der miRNAs, treten dabei allerdings viele Nebenwirkungen auf. In einer Arbeit unserer Arbeitsgruppe von Schäfer *et al.* konnte gezeigt werden, dass durch Einbau von photolabilen Schutzgruppen in ein AntimiR die miRNA-92a durch Photolyse inaktiviert werden kann und somit die zuvor von der miRNA-92a unterdrückte Genexpression wieder aktiv ist (siehe Abbildung 5a). Dies führt im Falle der miRNA-92a zu einem Anstieg der Angiogenese-Aktivität. Da die miRNA-92a ebenfalls andere mRNAs reguliert bietet dieser Ansatz die Möglichkeit, die AntimiRs ortsaufgelöst an der zu regulierenden Position freizusetzen und somit mögliche Nebenwirkung einer systemischen Verabreichung zu minimieren.^[15]

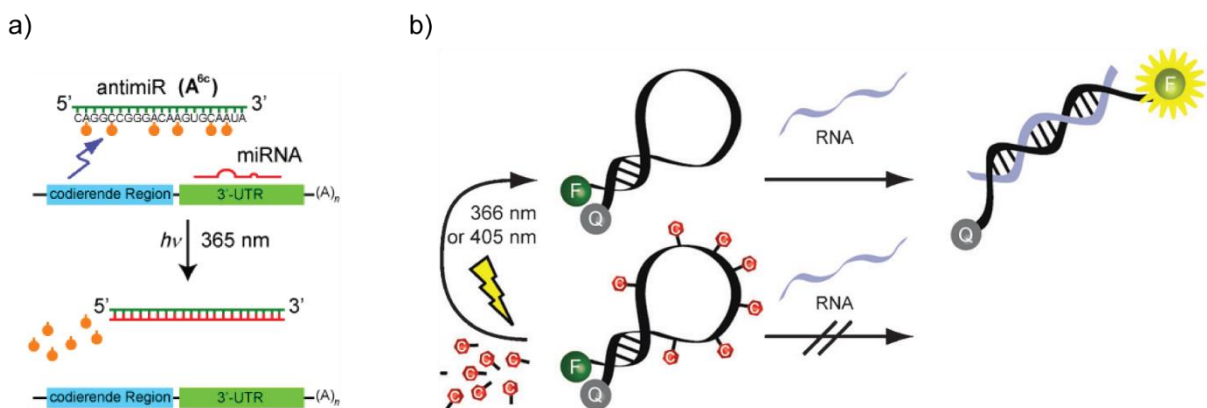


Abbildung 5: In a) ist schematische die Funktionsweise des von Schäfer *et al.* entwickelten photolabil geschützten AntimiRs gezeigt, dass durch Belichtung die miRNA bindet und so dessen inhibierende Wirkung aufhebt.^[15] In b) ist der photolabil geschützte *molecular beacon* von Joshi *et al.* gezeigt, der erst nach Photolyse in der Lage ist seine Target-RNA zu binden.^[16] Die Abbildungen wurden aus den entsprechenden Publikationen entnommen.

Die miRNA gehört zu den Molekülen, die RNA-Interferenz (RNAi), also die Stilllegung von Genen, initiieren kann. Auch die *small interfering RNA* (siRNA) ist zur RNAi fähig. Bei der

siRNA handelt es sich im Hauptunterschied zur miRNA nicht um eine endogene RNA, sondern um eine exogen synthetische oder virale dsRNA. Diese wird in der Zelle ähnlich wie die miRNA prozessiert um im Anschluss mRNA zu schneiden und diese so zu inaktivieren. siRNA wurde bereits in der biomedizinischen Forschung untersucht um selektive Genaktivitäten zu unterdrücken.^[17] Um die RNAi zeitlich und räumlich regulierbar zu machen, wurde von Mikat *et al.* eine photolabil geschützte siRNA hergestellt und untersucht. Tatsächlich war die Genexpression eines eGFP-Gen in HeLa-Zellen in Anwesenheit einer photolabil geschützten siRNA unverändert und nach Photolyse deutlich minimiert.^[18]

Um mRNA innerhalb einer Zelle verfolgen zu können und dadurch Informationen über deren Funktionsweise zu erhalten, wurden sogenannte *molecular beacons* entwickelt. Sie bestehen aus einem DNA oder RNA-Strang, der über einen doppelsträngigen Stammbereich und eine einzelsträngige Schleifenstruktur verfügt. Die Schleifenstruktur besteht aus der Komplementärsequenz der Ziel-mRNA und die beiden Enden der Stammstruktur verfügen über einen Quencher bzw. einen Fluorophor, die ein FRET-Paar bilden. Durch die räumliche Nähe des Fluorophors und des Quenchers ist in diesem Grundzustand kaum Fluoreszenz detektierbar. Bindet nun ein Target an die Schleifenstruktur wird auch die Stammstruktur aufgebrochen und folglich der Fluorophor und der Quencher räumlich separiert, was zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt. Um nun eine mRNA von einem spezifischen Ort ausgehend verfolgen zu können, wurde in einer Studie von Joshi *et al.* ein *molecular beacon* entwickelt, dessen Schleifenregion mit 7 photolabilen Schutzgruppen geschützt wurde (siehe Abbildung 5b). In diesem Zustand ist das Target nicht in der Lage an den *molecular beacon* zu binden. Erst nach Photolyse kommt es zur Bindung des Targets und der damit verbundenen Fluoreszenzzunahme.^[16]

Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Tan *et al.* die ebenfalls einen photosensitiven *molecular beacon* konzipierten. Ihr Inaktivierungsprinzip beruht auf der kovalenten Verknüpfung des Fluorophors und des Quenchers über einen photolabilen Linker. In diesem Zustand kann das Target nicht an den *molecular beacon* binden, dies ist erst nach der Photolyse möglich.^[19]

Sehr viele interessante Arbeiten kommen dabei von Deiters *et al.*, die beispielsweise durch Einführung von photolabilen Schutzgruppen an den Basen eines *splice-switching* Oligonukleotides, denen eine wichtige Rolle beim Splicing beiwohnt, in der Lage waren das korrekte Splicing zu unterdrücken und in der Folge die Expression eines eGFP-Gens zu unterdrücken.^[20] Ebenfalls gelang es Deiters *et al.* die gezielte Gen-Stilllegung durch photoinduzierte Freisetzung von photolabil geschützten Antisense-Reagenzien.^[21]

Ein weiteres Prinzip zur photolabilen Inaktivierung von Oligonukleotiden beruht auf der Verwendung einer gekürzten Komplementärsequenz, die durch einen photolabilen Linker kovalent an das Oligonukleotid gebunden ist. Nach Photolyse kann die Komplementärsequenz

durch einen Target-Strang verdrängt werden. Mit diesem Prinzip konnten Dmochowski *et al.* beispielsweise die RNase H Aktivität regulieren.^[22]

Auch die von Dmochowski *et al.* verwendete Methode der End-zu-End-Cyclisierung eines Morpholino-Oligonukleotides über einen Ruthenium-Photolinker, stellt eine gute Inaktivierungsmethode dar. Sie konnten so entwicklungsrelevante Gene in Zebrafisch-Embryos gezielt durch Photolyse runterregulieren und so die Missbildung der Embryos hervorrufen.^[23]

1.1.2.2. Photolabile Schutzgruppen in Hydrogelen und auf Oberflächen

Hydrogele können als Zellkultur-Plattform dienen, die in *In-Vitro*-Studien erlauben, Informationen über die komplexen und dynamischen Aspekte der extrazellulären Matrix zu erhalten.^[24] Besonders geeignet sind diese dreidimensionalen Medien um den Einfluss des *matrix signaling* auf verschiedenste Zellfunktionen, wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Differentiation zu untersuchen.^[24] Ein Ansatz diese Hydrogele zu generieren, basiert auf der Click-Chemie. Auch hier gibt es verschiedene Click-Typen, aber gerade die Photo-Click-Chemie, wie die Thiol-En-Reaktion stellt eine interessante Gruppe dar, da dabei durch Licht gezielt lokal die Kreuzvernetzung initiiert werden kann. Diese Art der Hydrogele haben einen weiteren Vorteil, sie können mit für die Zelle wichtigen Peptiden funktionell modifiziert werden, wie z.B. zelladhäsiven oder zellabbauenden Sequenzen.^[24] In einer Studie von Anseth *et al.*^[24] wurde dazu ein Hydrazon-basierendes Polyethylenglykol-(PEG)-Hydrogel entworfen, bei dem neben einem Hydrazin-PEG-Baustein ein PEG-Nitrobenzyl-Alkohol-Baustein verwendet wird, der durch Belichtung zu einem PEG-Nitrobenzaldehyd umgewandelt wird. Erst nach der Belichtung kann die Hydrazon-Bindung entstehen. Verwendet man den PEG-Nitrobenzyl-Baustein im deutlichen Überschuss, kann nach der Polymerisation ein Hydrazin-modifiziertes Peptid zugegeben werden und durch Belichtung in das Hydrogel kovalent verknüpft werden. Zu Visualisationszwecken wurde das Peptid mit einem Fluorophor markiert.^[24]

Ebenfalls interessant für die dreidimensionale Zellkultur sind photoabbaubare Hydrogele, die an den mit Licht bestrahlten Stellen ihre polymere Struktur verlieren. Durch solche Gele ist eine Kontrolle über die Freisetzung und den Transport von therapeutischen Zellen und Proteinen möglich.^[25] In einer Studie von Anseth *et al.*^[25] wurde ein 4-armiger-PEG-Baustein mit einem Azid-modifizierten Cumarin versehen. Dieser kann über eine Cu(I)-katalysierte Click-Reaktion mit dem 4-armigen-PEG-Tetraalkin-Baustein vernetzt werden. In dem so erhalten Hydrogel kann nun durch Einphotonen- oder Zweiphotonen-Anregung das Cumarin photolysiert werden, wodurch es zum Bindungsbruch und zum Abbau des Polymers kommt.^[25]

In einer anderen Studie von Anseth *et al.*^[26] wurden Hydrogele über Cu-freie Katalyse generiert, die auf ähnliche Weise Nitrobenzyle (NBA) zwischen dem PEG-Gerüst und dem Azid eingebaut haben (siehe Abbildung 6). In diese Hydrogele wurden Neuronen eingebettet und mit einem zelladhäsiven Peptid und Zellmedium umgeben. Weiterhin wurde ein Farbstoff zugegeben, der die Visualisierung der Zellen ermöglicht. Durch Einphotonen- oder Zweiphotonen-Anregung wurden ausgehend von den Neuronen Kanäle erzeugt. Wie in Abbildung 6b zu sehen ist, konnten die Axone der Neuronen entlang dieser Kanäle gerichtet wachsen.^[26]

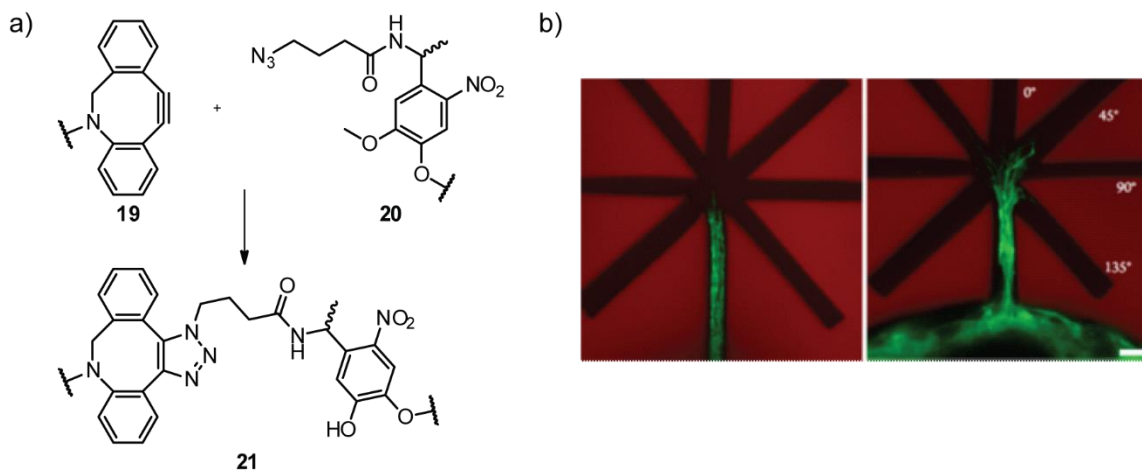


Abbildung 6: In a) ist die Struktur der Nitrobenzyl-haltigen PEG-Hydrogele dargestellt, die über eine Cu-freie Katalyse polymerisieren und durch Bestrahlung mit Licht wieder zersetzt werden können. In b) ist ein Hydrogel gezeigt, in dem durch Bestrahlung Kanäle erzeugt wurden, entlang derer die Axone von Neuronen gerichtet wachsen konnten. Die Abbildung wurde nach Anseth *et al.* modifiziert.^[26]

Die Gruppe von Shoichet beschäftigte sich in einigen Studien mit ähnlichen Fragestellungen wie Anseth, verwendete dazu neben PEG-Hydrogelen auch Agarosegele, die über photolabil geschützte Thiofunktionen verfügen. Nach Polymerisation der Agarosegele können die Thiofunktionen mittels Einphotonen- oder Zweiphotonen-Anregung freigesetzt werden und über Dithiol- oder Maleimid-Thiol-Bindungen Peptide oder Proteine wie z.B. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A immobilisiert werden. Durch unterschiedlich starke Bestrahlung kann im Gel ein Gradient z.B. eines Wachstumsfaktors generiert werden, wodurch die Wachstumsrichtung von Zellen beeinflusst werden kann. In einer Studie wurde das Zelladhäsive Peptid GRGDS-Oligopeptid, durch Bestrahlung eines Agarosegel das mit 2-Nitrobenzyl geschütztem Cystein **22** modifiziert ist (Abbildung 7a), in einem Kanal immobilisiert. Es zeigte sich, dass primäre Spinalganglion-Zellen von Ratten (dorsal root

ganglia = DRG) nur in Richtung des GRGDS-Oligopeptid-modifizierten Agarosekanals wuchsen (Abbildung 7b-d).^[27]

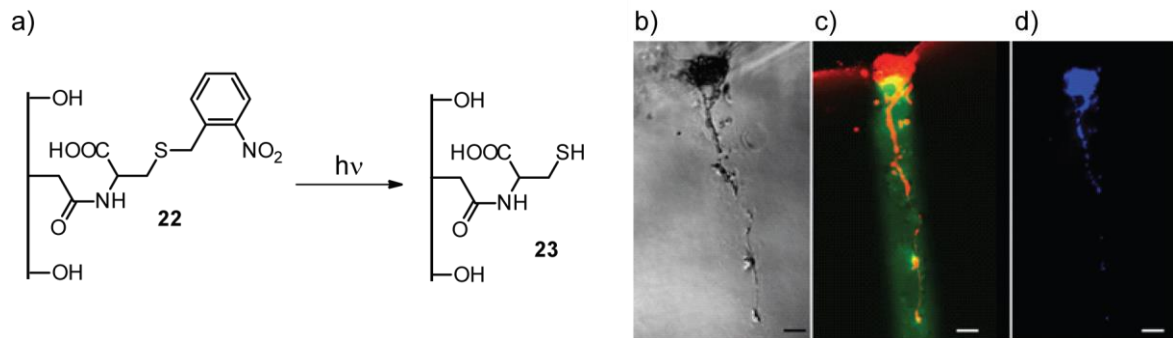


Abbildung 7: a) Agarose, die mit 2-Nitrobenzyl geschütztem Cystein versehen wurde, kann durch Belichtung freie Thiofunktionen generieren, an die im Anschluss über modifizierte Maleimide Zelladhäsive Peptide wie GRGDS-Oligopeptide gebunden werden können. In einem solchen Agarosegel wuchsen die Zellen eines Zellklusters aus DRG-Zellen nur entlang eines GRGDS-Oligopeptid-Kanals. In b) ist eine Durchlicht-Aufnahme, in c) eine konfokale Fluoreszenzaufnahme zu sehen, (gelb die Fluoreszenz des mit Fluorescein modifizierten Oligopeptids und rot die gefärbten Zellen) und in d) eine Fluoreszenzaufnahme der mit DAPI gefärbten Zellen. Die Abbildung wurde aus Shoichet *et al.* entnommen.^[27]

Im Mittelpunkt mehrerer Studien von del Campo *et al.* stehen ebenfalls photolabil modifizierte Polymere oder Oberflächen. Dabei wurden ein adhäsives Peptid (cyclisches RGD) mit 3-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)-2-butyl (DMNPB) geschützt und auf Glasoberflächen immobilisiert. Zellen, die auf diese Oberflächen gegeben wurden, adhärten nur dann auf der Oberfläche, wenn diese bestrahlt wurde. So war es beispielsweise möglich durch die Breite eines photolysierten Streifens die Form der Zellen zu beeinflussen, was schematisch in Abbildung 8 dargestellt ist. Je schmaler der Streifen war, desto langgezogener entwickelten sich die Zellen.^[28–32]

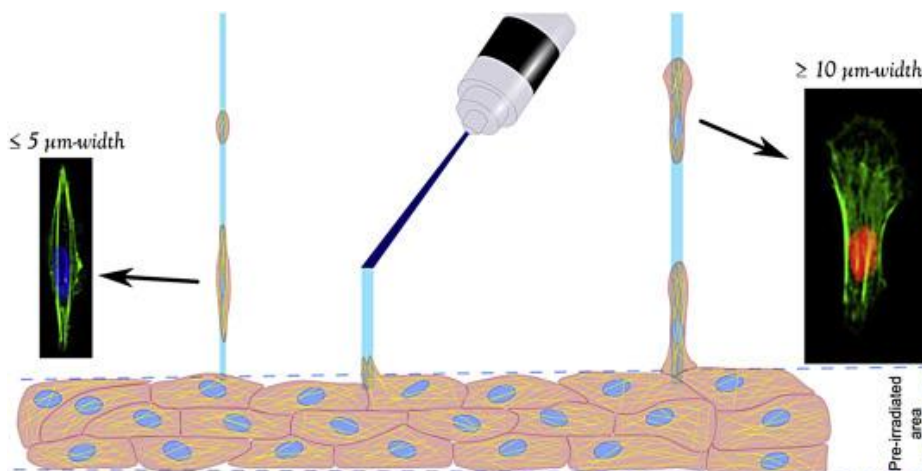


Abbildung 8: Schematische Zeichnung der mit photoaktivierbaren cyclischen RGD-Peptiden versehenen Oberfläche. Nur dort, wo der Laser die cyclischen RGD-Peptide freisetzt, können sich die Zellen anheften. Durch die Breite des photolysierten Bereichs kann deren Form beeinflusst werden. Die Abbildung wurde aus del Campo *et al.* entnommen.^[28]

In einer weiteren Studie wurde ein photolabil geschütztes Ca^{2+} in ein Alginate gegeben. Vor Belichtung ist dieses flüssig, doch durch Belichtung werden die Ca^{2+} -Ionen freigesetzt und diese sorgen durch Einlagerung in die Alginate-Struktur für eine Gelierung, die zu einem Hydrogel führt. Gibt man einen Ca^{2+} -Ionen-Komplexbildner wie EGTA zu, liegt das Alginate wieder in seiner flüssigen Form vor.^[33,34]

1.1.2.3. Wellenlängenselektive Photolyse

Bei den bisherigen Anwendungsbeispielen wurden eine Schutzgruppe oder mehrere gleiche Schutzgruppen verwendet, um eine Funktionalität bzw. einen Bindungsbereich abzuschirmen. Möchte man allerdings komplexere, sich möglicherweise konkurrierende Prozesse mit Licht steuern zu können, ist ein möglicher Lösungsansatz die oben erwähnte Verwendung von Photoschaltern, die durch Bestrahlung mit Licht in zwei isomere Zustände überführt werden können. Photoschalter haben den großen Vorteil, dass sie mehrfach in den jeweils anderen isomeren Zustand überführt werden können. Leider weist dieser Prozess nie ein 100%-0%-Verhalten auf, es kann also immer nur ein Anteil der Moleküle überführt werden. Dadurch haben solche Systeme meist kein 100%iges An/Aus-Verhalten. Auch ist es schwer vorherzusagen an welcher Stelle der Einbau eines Photoschalters eine Struktur von einem aktiven in einen inaktiven Zustand schaltbar macht.^[35] Aus diesem Grund, wird für einige Anwendungen der Einsatz von photolabilen Schutzgruppen bevorzugt, da hier die Einbaustelle einfach zu finden ist und ein 100%iges An/Aus-Verhalten möglich ist. Um mit diesem Ansatz

auch komplexere Szenarien, wie miteinander konkurrierende Prozesse, regulierbar zu machen, benötigt man photolabile Schutzgruppen. Diese müssen sich in ihren spektralen Eigenschaften wie Absorptionsmaximum, molarer Extinktionskoeffizient oder Quantenausbeute voneinander unterscheiden.^[36] Die Idee des orthogonalen Entschützens einer photolabilen Schutzgruppe in Anwesenheit einer zweiten, wurde erstmals von Bochet *et al.* beschrieben und an Carbonsäuren mit zwei unterschiedlichen Schutzgruppen gezeigt.^[37] Seither wurden viele verschiedene Sets an photolabilen Schutzgruppen für unterschiedliche Anwendungen zur wellenlängenselektiven Entschützung entwickelt, im Rahmen dieser Arbeit wird allerdings nur auf einzelne näher eingegangen.

In der Literatur werden die Begriffe orthogonal und wellenlängenselektiv gerne gleichbedeutend verwendet, obwohl orthogonal bedeutet, dass zwei Schutzgruppen komplett unabhängig voneinander adressierbar sind.^[36] wellenlängenselektiv bedeutet dagegen, dass die Schutzgruppen in einer bestimmten Reihenfolge photolysiert werden müssen, da in der Gegenrichtung keine Selektivität erhalten werden würde. Dies liegt daran, dass photolabile Schutzgruppen, deren Absorptionsmaximum bathochrom verschoben ist, auch eine gewisse Absorption im UV-Bereich aufweisen. Allerdings wird dann bei der Photolyse einer zweiten Schutzgruppe, die eine geringere bathochrome Verschiebung aufweist, die erste Schutzgruppe mit abgespalten. Wird die Photolyse bei höheren Wellenlängen begonnen, kann zunächst die erste Schutzgruppe abgespalten werden, bevor bei niedrigeren Wellenlängen die zweite, und gegebenenfalls verbleibende Reste der ersten Schutzgruppe abgespalten werden. Diese Art der Photolyse wurde in mehreren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt. Schäfer *et al.* konnten zeigen, dass eine Nitrodibenzofuran-(NDBF)-geschützte DNA selektiv in Anwesenheit einer NPE-geschützten DNA mit 420 nm photolysiert werden kann.^[38] In einer vergleichbaren Studie zeigten Menge *et al.*, dass auch eine DEACM-geschützte DNA in Anwesenheit einer NPP-geschützten DNA photoinduziert entschützt werden kann.^[39] Dass auch mehr als zwei photolabile Schutzgruppen sequentiell photolysiert werden können, zeigten Rodrigues-Correia *et al.* mit den Schutzgruppen DEACM, NDBF, NPP und *p*-Hydroxyphenacyl (pHP), die nacheinander mit abnehmender Wellenlänge abgespalten werden konnten (siehe Abbildung 9).^[35]

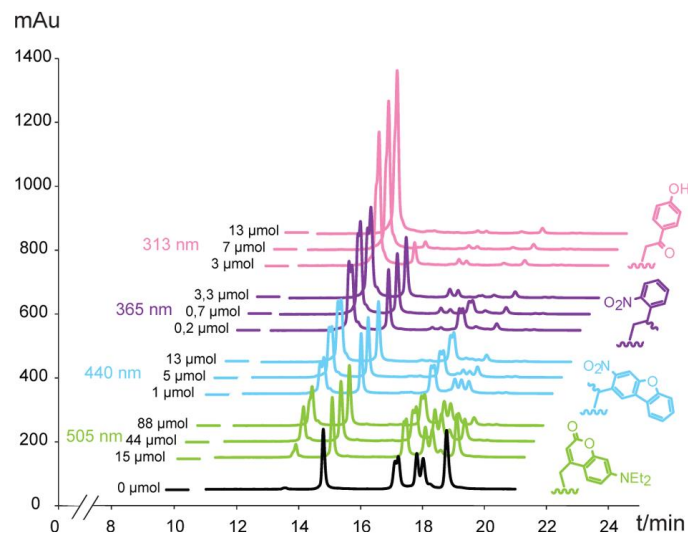


Abbildung 9: HPLC-Chromatogramme von 4 Oligonukleotiden die mit den Schutzgruppen DEACM, NDBF, NPP und pHP geschützt wurden, die als Mischung mit geringer werdenden Wellenlängen bestrahlt wurden. Die Abbildung wurde aus Rodrigues-Correia *et al.* entnommen.^[35]

Eine neue Art der Selektivität gelang Rodrigues-Correia *et al.* durch Unterschiede in der Quantenausbeute von photolabilen Schutzgruppen. Durch Anbringung der Schutzgruppen pHP oder DEACM entweder an N^{β} oder O^4 der Base des Thymidins unterscheiden sich diese in ihrer Photolyseeffizienz. So konnte über die Photolysezeit bei einer Wellenlänge selektiert werden, ob nur die O^4 -Schutzgruppe oder bei längerer Belichtung auch die N^{β} -Schutzgruppe photolysiert wird.^[40] Zu erwähnen ist, dass bei all diesen Studien aus unserer Gruppe lediglich eine Retentionszeitverschiebung bei der HPLC-Analyse beobachtet wird und keine Regulation eines biologischen Prozesses mittels wellenlängenselektiver Photolyse erfolgt.

Eine interessante Anwendung der sequentiellen Photolyse gelang Bochet *et al.* 2003^[41], die dieses Prinzip bei der Festphasensynthese von Proteinen erfolgreich einsetzten. Ein photolabiler Linker, abspaltbar bei 305 nm, verknüpft die erste Aminosäure mit der festen Phase. Die Aminfunktionen der Aminosäuren wiederum sind mit *o*-Nitroveratryloxycarbonyl (NVOC)-Schutzgruppen versehen, die mit 360 nm photolysiert werden können. Während der Synthese werden die NVOC-Schutzgruppen jeweils nach einem erfolgreichen Kupplungsschritt photolysiert, damit dort die nächste Aminosäure angreifen kann. Nach der letzten Kupplung, wird nach Abspaltung der NVOC-Schutzgruppe der Linker mit 305 nm photolysiert und so das vollständige Peptid freigesetzt.^[41] In einer neueren Studie von 2012 zeigten Bochet *et al.*^[42], dass sie in der Lage sind ein Pentapeptid nur durch Photolyse ohne weitere Reagenzien zu synthetisieren. Dazu wurden die Aminfunktionen der Aminosäuren mit einer Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl-(Ddz)-Schutzgruppe und die

Carboxyfunktion mit 5,7-Dinitroindoliny (Dni) geschützt. Mit 385 nm kann die Säurefunktion freigesetzt werden, die mit der freien Aminofunktion der ersten Aminosäure reagieren kann. Durch anschließende Photolyse mit 300 nm wird die Aminofunktion von der Dbz-Schutzgruppe befreit und der Zyklus beginnt wieder von vorne.^[36,42]

Auch bei den oben bereits erwähnten Hydrogelen kann die wellenlängenselektive Photolyse von Nutzen sein. Del Campo und Specht *et al.* beschäftigten sich mit der photoinduzierten Polymerisation und Depolymerisation von Polyurethan, welches als günstiges Fotolack-Material für lithographische Anwendungen einsetzbar sein soll.^[43] Um ein Polyurethan-Polymer zu erhalten, dass wellenlängenselektiv polymerisiert wird und durch eine zweite Wellenlänge wieder depolymerisiert werden kann, wurden 3 Komponenten zusammengegeben: eine Diaminolinker dessen Amine mit p-Dialkylaminonitrobiphenyl (ANBP) geschützt sind, ein 3-(2-Propyl)-4'-methoxy-4-nitrobiphenyl (PMBP)-Dialkohol und ein dreiarmliges Triisocyanat. Im Polymerisationsschritt werden die ANBP-Schutzgruppen des Diaminolinkers abgespalten und das freie Amin kann mit dem Isocyanat reagieren, wodurch sich das Hydrogel bildet. Um das Polymer zu zersetzen, wird die kurzwelliger absorbierende PMBP-Schutzgruppe abgespalten.^[44]

Ebenfalls im Bereich der Materialwissenschaften untersuchte del Campo mit Bochet *et al.* Silicaoberflächen, die mit unterschiedlichen Schutzgruppen geschützt waren. Die geschützten Funktionalitäten waren Thiole, Amine und Carbonsäuren. Auf den Oberflächen konnten 4 verschiedene Schutzgruppen adressiert und deren geschützte Funktionalität wellenlängenselektiv freigesetzt werden.^[45]

Die sequentielle Inaktivierung von Genfunktionen in Organismen konnte von Chen und Deiters *et al.* in Zebrafisch-Embryos mit cyclischen Morpholino-Oligonukleotiden (cMO) erreicht werden. Die cMOs verfügen jeweils über einen photolabilen Linker, der auf NB bzw. DEACM basiert, und in diesem cyclischen Zustand nicht mit der RNA wechselwirken kann. Nach Belichtung mit 405 nm wird nur das DEACM-cMO photolytisch gespalten, wodurch das MO die RNA bindet und dadurch dessen Genfunktion unterbindet. Bei anschließender Belichtung mit 365 nm wird auch das NB-cMO gespalten, so dass auch dieses MO an die entsprechende RNA binden kann. In den Zebrafisch-Embryos konnte gezeigt werden, dass je nachdem ob nur eine oder beide MO freigesetzt werden, der Phänotyp der Embryonen die der inhibierten Gene entsprechenden Fehlbildungen aufweist.^[46]

Im Bereich der Neurotransmitter hat Ellis Davies in vielen Studien wellenlängenselektive Photolyse zeigen können, doch verwendet er dazu meist Zweiphotonen-Anregung unterschiedlicher Wellenlänge. (Details im Abschnitt 1.2.2)

Viele Arbeitsgruppen, darunter Jullien,^[47] Ellis-Davies,^[48] Hagen^[49] und Bochet^[50] beschäftigen sich mit der Entwicklung neuer photolabiler Schutzgruppen, deren Absorptionseigenschaften

für den Bereich der Wellenlängenselektivität oder besser noch der chromatischen Orthogonalität eingesetzt werden können.^[36]

1.1.2.4. Die Grenzen der bathochromen Verschiebung

Um biologische Prozesse mit Licht regulieren zu können, sollten die verwendeten photolabilen Schutzgruppen möglichst weit entfernt von 300 nm absorbieren um Zellschäden zu vermeiden. Betrachtet man allerdings in Abbildung 10 die Absorption verschiedener Systemkomponenten eines biologischen Systems, sieht man deutlich, dass problematischerweise die Absorption besonders von Blut zwischen 200 und 600 nm am höchsten ist, was eine Bestrahlung in diesem Bereich schwierig macht. Den Wellenlängenbereich zwischen ca. 600 und 1200 nm nennt man das phototherapeutische Fenster.^[51]

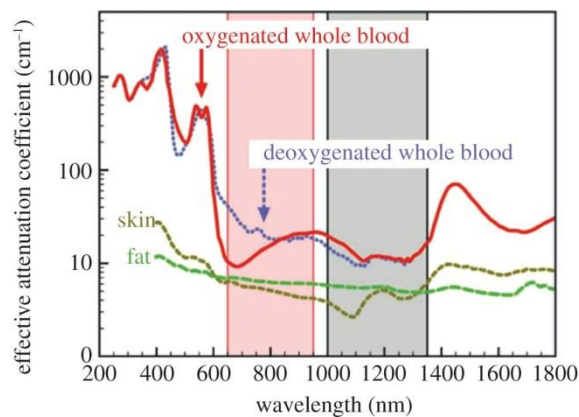


Abbildung 10: Aufgetragen gegen die Wellenlänge ist der Dämpfungskoeffizient (*attenuation coefficient*) von Haut, Fett und Blut. Die Abbildung wurde aus Smith *et al.* entnommen.^[52]

Es gibt verschiedene Schutzgruppen, die bis zu diesem Bereich Absorption aufweisen, die Photolyse-Effizienz dieser Schutzgruppen wird aber mit zunehmender Absorptionswellenlänge schlechter, da die von der Wellenlänge übertragene Energie, die zur Photolyse benötigt wird, immer geringer wird. Da die meisten Schutzgruppen über eine Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung an das Zielmolekül verknüpft sind, wird auch zur Bindungsspaltung eine gewisse Energie benötigt. Betrachtet man beispielsweise eine Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung mit einer Bindungsenergie von 293 kJ/mol^[53], so entspricht dies rein rechnerisch einer Wellenlänge von ca. 410 nm, die benötigt wird um diese Bindung zu spalten. Dieser Wert ist kein Absolutwert, da auch die Umgebung der C-N-Bindung die Bindungsenergie beeinflusst. Trotzdem kann man sich vorstellen, dass die Bestrahlung einer solchen Bindung mit deutlich höheren Wellenlängen als 410 nm keine Bindungsspaltung

hervorrufen kann. Um trotzdem diese und höhere Wellenlängen zur Photolyse verwenden zu können, gibt es verschiedene Möglichkeiten.

Die erste Möglichkeit besteht in der Verwendung einer weniger stabilen Bindung wie einer Koordinativen Bindung. Dieses Prinzip wurde sich von Etchenique *et al.*^[54] bei Komplexen des Typs $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}_2]^+$ zu Nutze gemacht. Für L wurden jeweils zwei Neurotransmitters Serotonin und γ -Aminobuttersäure (GABA) und deren Analoga Tryptamin, Butylamin und Tyramin verwendet. Diese sind jeweils über ihre Aminofunktion an das Ruthenium koordiniert. In Abbildung 11 ist der Ru-Komplex **24** am Beispiel von koordiniertem Serotonin dargestellt.^[54]

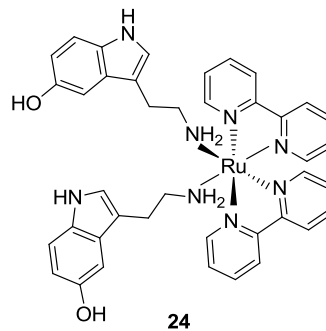


Abbildung 11: Strukturformel des von Etchenique *et al.* Ruthenium-Komplexes mit koordinierten Serotonin, der durch Bestrahlung mit 488 nm seine Liganden freisetzen kann.^[54]

Durch Bestrahlung mit 488 nm kann ein Ligand freigesetzt werden. Die Freisetzung des Liganden ist mit einer Quantenausbeute von 0.03 für die verwendete Wellenlänge recht hoch. Das Absorptionsspektrum der Komplexe zeigt allerdings eine Absorption bis über 600 nm.^[54] Möglicherweise ist deshalb auch die Photolyse bei höheren Wellenlängen möglich, diese wurde in der Studie aber nicht beschrieben.^[54]

Ein weiteres Prinzip beruht auf der vorherigen photooxidativen C-C-Bindungsspaltung, die z.B. bei Hepamethincyanin durch Bestrahlung mit 690 nm initiiert werden kann (siehe Abbildung 12). Im Anschluss erfolgt eine Hydrolyse mit intramolekularem Ringschluss und daraus resultierender Freisetzung der geschützten Funktionalität.^[55] Ein Problem von Schutzgruppen, die im sichtbaren Bereich des Lichts absorbieren, ist deren erschwerte Handhabung.^[9]

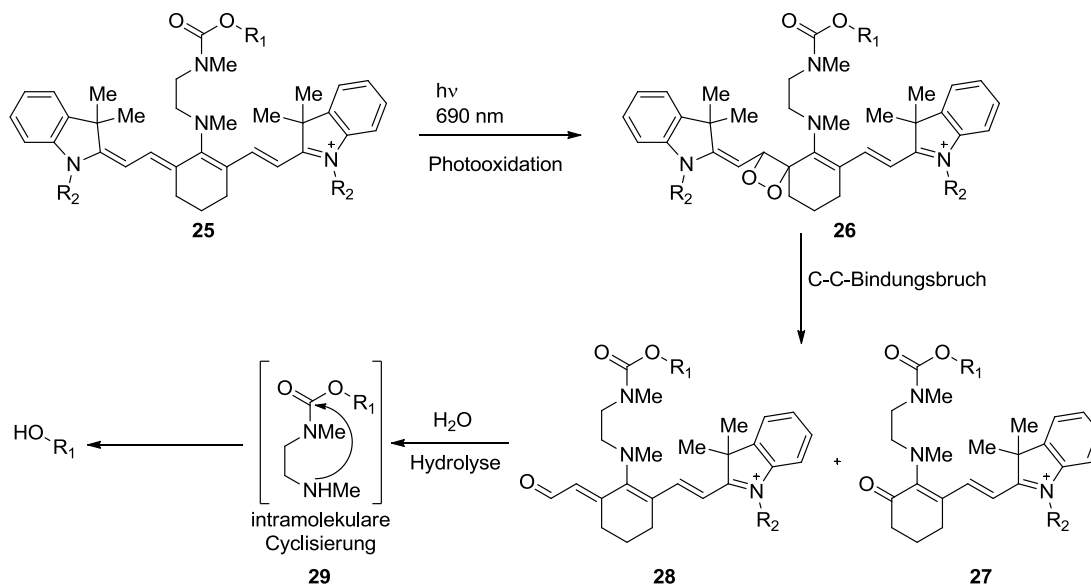


Abbildung 12: Reaktionsmechanismus der photolabilen Schutzgruppe Hepamethincyanin, die durch Bestrahlung mit 690 nm photooxidiert wird und im Anschluss über einen C-C-Bindungsbruch und eine Hydrolyse die geschützte Verbindung freisetzt (Modifiziert nach Schnermann *et al.*).^[55]

Eine vierte Möglichkeit besteht in der Verwendung von Up-Conversion-Nanopartikeln. Diese sind in der Lage niederenergetisches Licht zu absorbieren und emittieren selbst wiederum Licht mit einer höheren Energie. Es gibt zwar viele Materialien die hochenergetisches Licht in niederenergetisches Licht umwandeln können, aber nur sehr wenige, die den umgekehrten Fall erzeugen können. Materialien die sich als Up-Conversion-Nanopartikel eignen sind z.B. LaF₃, YF₃, Y₂O₂, LaPO₄ und NaYF₄ die mit trivalenten Lanthanoiden wie Yb³⁺, Er³⁺ und Tm³⁺ codotiert sind.^[56,57] Je nach Art der Dotierung kann die Up-Conversion von NIR- zu kürzerem NIR-, VIS- oder UV-Licht erfolgen.^[57] Die Effizienz eines Up-Conversion-Prozesses ist um einige Größenordnungen höher als die einer nichtlinearen Multiphotonenabsorption, weshalb für die Up-Conversion-Prozesse einfache CW-Laser ausreichen.^[58]

Die fünfte Möglichkeit besteht in der Verwendung der Zweiphotonen-Technik, bei der Licht mit ungefähr der halben Energie, also doppelter Wellenlänge des üblicherweise verwendeten Lichts, ausreicht um das Molekül in den gleichen angeregten Zustand (meistens) zu überführen und somit die Photolyse zu initiieren.^[59] Der Vorteil bei der Verwendung von IR-Licht, ist neben seiner größeren Eindringtiefe in Gewebe, bedingt durch geringere Streuung und der Photolyse-Stabilität bei sichtbarem Licht, die geringe Autofluoreszenz der Zellen und die minimierte Phototoxizität.^[9,59,60] Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Vorteil der Verwendung der Zweiphotonen-Technik liegt in der dreidimensionalen Auflösung dieses Prozesses. Da es sich bei diesem Prozess um einen nichtlinearen Prozess handelt,

beschränkt sich das Photolyse-Ereignis auf den Fokus der Belichtung, da nur hier die Photonendichte ausreicht um einen Bindungsbruch zu induzieren.^[9,59,60]

1.2. Zweiphotonen-Absorption

Bereits im Jahr 1931 postulierte Maria Göppert-Mayer in ihrer Dissertation an der Universität Göttingen in theoretischen Berechnungen die Existenz eines Zweiphotonen-Effekts.^[61] Erst im Jahr 1961 konnten, dank der Entwicklung des gepulsten Lasers^[62] im Jahr zuvor, Kaiser und Garrett den praktischen Beweis dieser Theorien antreten. Sie konnten als erste eine durch Zweiphotonen-Absorption induzierte Fluoreszenz in einem $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ -Kristall beobachten.^[63] Erst 1990 wurde von Webb *et al.* das erste Zweiphotonen-Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop veröffentlicht^[64], was nicht zuletzt der verbesserten Lasertechnik zu verdanken war. Seither ist die Zweiphotonen-Technik nicht mehr wegzudenken und findet vielerlei Einsatz unter anderem in der Mikroskopie^[65,66], in der photodynamischen Therapie^[67], in der dreidimensionalen Datenspeicherung^[68,69], in der 3D Strukturierung durch Zweiphotonen-Absorption induzierte Polymerisation von beispielsweise Mikroinduktionsspulen in der Elektronik^[60,70,71] und natürlich nicht zuletzt auch zur lokalen Freisetzung zuvor photolabil geschützter Moleküle^[72], wie z.B. Neurotransmitter oder Medikamente.^[60]

Der Hauptunterschied zwischen der Einphotonen-Absorption und der Zwei-Photonen-Absorption resultiert daraus, dass bei der Zweiphotonen-Absorption zwei Photonen simultan absorbiert werden müssen, weshalb die Absorption mit dem Quadrat der Lichtintensität ansteigt, bei der Einphotonen-Absorption hängt sie dagegen linear von der Leistung ab. Eine der Lambert-Beerschen-Regel entsprechende Gleichung für die Zweiphotonen-Absorption lautet wie folgt:^[60]

$$\frac{\partial I}{\partial z} = -N\alpha_2 I^2 = -N\delta FI \quad (1.1)$$

wobei I der Laserintensität, z der Dicke des absorbierenden Mediums, N der Anzahl der Moleküle pro Volumeneinheit und α_2 einem molaren Koeffizienten der Zweiphotonen-Absorption entspricht.^[60] Die Intensität I kann allerdings auch als Photonenfluss $F = \frac{I}{h\nu}$ ausgedrückt werden, bei dem $h\nu$ für die Photonen-Energie steht und δ dem molaren Zweiphotonen-Absorptions-Koeffizienten entspricht, der in der Einheit Göppert-Mayer ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s Photon}^{-1} \text{ Moleküle}^{-1}$) angegeben wird.^[60]

Aus diesem nichtlinearen Zusammenhang der Laserleistung resultiert auch die 3D-Auflösung der Zweiphotonen-Anregung.^[60,73]

Am plastischsten kann der Zweiphotonen-Effekt an fluoreszierenden Proben gezeigt werden. In Abbildung 13 sind drei Küvetten abgebildet, die mit einer Fluoreszein-Lösung (links und Mitte) bzw. einer Oregon-Green-Lösung (rechts) gefüllt sind, zu sehen. Von der rechten Seite werden sie mit Hilfe eines Laserstrahls der Wellenlänge 365 nm (links) bzw. 730 nm (Mitte und rechts) angeregt. Mit Hilfe eines Objektivs wird der Laserstrahl fokussiert. Bei der Einphotonen-Anregung in der linken Küvette ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzanregung entlang des Strahls des Anregungslasers verläuft. Im Kontrast dazu erfolgt die Fluoreszenzanregung bei der Zweiphotonen-Anregung bei der Küvette in der Mitte nur im Fokus des Laserstrahls. Um dieses Phänomen zu verdeutlichen, wurden zu der Fluorophor-Lösung in der Küvette auf der rechten Seite Nanopartikel hinzugefügt, die das Anregungslicht streuen und es so „sichtbar“ machen. Auch hier ist im Fokus dieses Anregungslasers die durch die Zweiphotonen-Anregung erzeugte Fluoreszenz des Farbstoffes deutlich zu sehen.^[3,74]

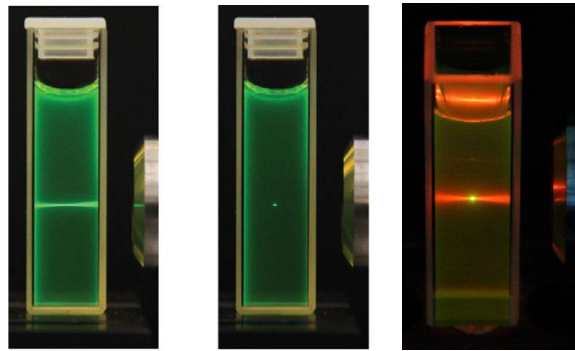


Abbildung 13: Fluoreszenzanregung einer Fluoreszein-Lösung (links und Mitte) und einer Oregon-Green-Lösung (rechts) mit einem Laserstrahl der Wellenlänge 365 nm (links) und 730 nm (Mitte und rechts), der über ein Objektiv in die Küvette fokussiert wird. Die Fluoreszenzanregung mit Einphotonen-Licht (links) erzeugt überall entlang des Anregungsstrahls Fluoreszenz. Im Unterschied dazu ist bei der Zweiphotonen-Anregung (Mitte) nur im Fokus des Lasers ein fluoreszierender Punkt sichtbar. In der Küvette rechts wurden zu Visualisierungszwecken Nanopartikel zur Oregon-Green-Lösung gegeben, die das Anregungslaserlicht streuen und es somit sichtbar machen. Die Abbildungen wurden aus Heckel *et al.* entnommen.^[3,74]

Da die Grundvoraussetzung für den Zweiphotonen-Effekt die extrem hohe Photonendichte eines gepulsten Lasers darstellt, wird im Folgenden zunächst kurz der Aufbau von Lasern beschrieben.

1.2.1. Aufbau eines Lasers

Das Wort LASER steht für *light amplification by stimulated emission of radiation*. Die Nobelpreisträger (Physik 1964) Charles Hard Townes, Alexander Michailowitsch Prochorow und Nikolai Gennediewitsch Basow waren in den 1950er Jahren maßgeblich an der Entwicklung des Masers (*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) einem Laser im Mikrowellenbereich beteiligt. Die Funktion beruht auf der quantenmechanischen Wechselwirkung von Strahlungsenergie und Materie. Nachdem Arthur L. Schawlow und Charles Hard Townes 1958 voraussagten, wie diese Technik prinzipiell auch im optischen Spektralbereich angewendet werden kann,^[75] publizierte Theodore H. Maimann 1960 in Nature über die erfolgreiche stimulierte optische Strahlung in Rubin. Damals war also der erste Laser, eine Rubinlaser, damals noch weitläufig als optischer Maser bezeichnet, realisiert worden.^[62] Für die Realisierung dieses Lasers verwendete Maimann Rubin (Al_2O_3) mit ca. 0.05 Masseprozent Cr_2O_3 als aktives Medium. Dieses wurde durch eine spiralförmig um das aktive Medium angeordnete Blitzlicht-Gasentladungsröhre optisch gepumpt. Beides befand sich in einem Zylinder, dessen Stirnseiten verspiegelt bzw. teilverspiegelt waren – Resonator genannt.^[76,77]

Allgemein bestehen Laser aus drei Komponenten, einem aktiven Medium, einer Anregungsquelle und einem optischen Resonator. Betrachtet man ein Zwei-Niveau-System (siehe Abbildung 14) werden im aktiven Medium Atome aus dem elektronischen Grundzustand in den angeregten Zustand durch eine Anregungsquelle angeregt. Diese überschüssige Energie wird normalerweise nach ca. 10 ns durch spontane Emission in Form eines Photons abgegeben und das Atom gelangt zurück in seinen elektronischen Grundzustand. Regt allerdings ein einstrahlendes Photon das Atom im angeregten Zustand an, kommt es zur stimulierten Emission, bei der das Anregungsphoton und das stimulierte Photon die gleiche Phase, Polarisation und Ausbreitungsrichtung haben. Da sich allerdings gemäß der Boltzmannverteilung mehr Atome im Grundzustand, als im angeregten Zustand befinden, ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon ein Atom im Grundzustand anregt deutlich höher als auf eines im angeregten Zustand zu treffen. Je höher die Energie des angeregten Zustandes ist, desto höher ist die Besetzung des Grundzustandes.^[76,77]

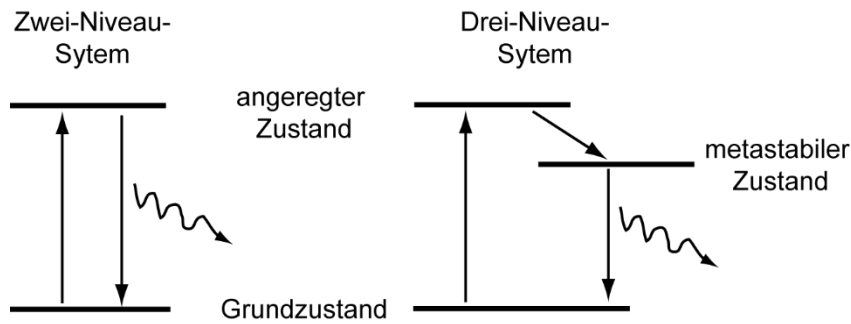


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines Zwei- und eines Drei-Niveau-Lasers. (Abbildung modifiziert)^[77]

Die stimulierte Emission stellt aber die Grundvoraussetzung eines Lasers dar. Um die Besetzungswahrscheinlichkeit im angeregten Zustand zu erhöhen, muss dieser langlebiger sein. Dies ist dann der Fall, wenn ein Atom einen energetisch niedrigeren metastabilen Zustand aufweist, ein solches System nennt man Drei-Niveau-System (siehe Abbildung 14). Aus dem angeregten Zustand relaxiert das Atom dann zunächst durch strahlungslose Übergänge in den metastabilen Zustand, dessen Lebensdauer mehrere Millisekunden umfasst. Wenn ein Großteil der Atome in diesen metastabilen Zustand angeregt wird, kommt es zur Besetzungsinversion. Trifft nun ein spontan emittiertes Photon mit geeigneter Wellenlänge auf ein angeregtes Atom, kommt es zur stimulierten Emission eines Photons. Durch den Resonator, der aus zwei Spiegeln besteht, deren Abstand so gewählt wird, dass er immer ein ganzzahliges Vielfaches von $\lambda/2$ beträgt, kommt es zu einer lawinenartigen Emission energetisch und phasengleicher Photonen. Ohne Verwendung eines Resonators haben die Photonen nicht die gleiche Ausbreitungsrichtung und ein Laserstrahl mit kohärentem Licht würde nicht entstehen. Einer der beiden Spiegel im Resonator ist teildurchlässig, sodass durch ihn das Laserlicht austreten kann. Der Resonator sorgt also dafür, dass nur Photonen der gewünschten Richtung verstärkt werden, da alle Photonen anderer Richtung die Spiegel nicht treffen. Der Übergang aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand liefert ein großes Frequenzspektrum, doch werden im Resonator durch konstruktive und destruktive Interferenz nur wenige schmale Banden, longitudinale Resonatormoden genannt, verstärkt. Außer den longitudinalen Schwingungsmoden gibt es auch die transversalen Moden oder TEM_{nm} -Moden (*transverse electric and magnetic*). Dabei stehen n und m für die Anzahl der transversalen Knotenlinien. Die am meisten verwendete Transversalmode ist die der niedrigsten Ordnung TEM_{00} , da sie als Strahlprofil einem Gaußprofil sehr nahe kommt, über vollständige räumliche Kohärenz verfügt, einen besonders kleinen Streuwinkel hat und sich am besten fokussieren lässt.^[76,77]

Um gepulste Laserstrahlen mit extrem hoher Leistung pro Puls zu erhalten, wird ein Güteschalter benötigt, der im Prinzip dafür sorgt, dass einer der Resonatorspiegel entfernt wird. Daraus wird der Schwingungsbeginn verzögert, wodurch die Besetzungsinversion sehr groß wird. Durch zeitlich optimiertes Einschalten des Resonators, relaxieren alle Atome annähernd gleichzeitig in den Grundzustand und ein hochenergetischer Puls mit mehreren hundert Megawatt entsteht. Dieses Prinzip wird als Modenkopplung bezeichnet, wobei zwischen aktiver und passiver Modenkopplung unterschieden wird. Dies kann unter anderem durch Kerr- oder Pockelszellen realisiert werden.^[76,77]

1.2.2. Zweiphotonen-Theorie und deren Anwendung bei photolabilen Schutzgruppen

Ob und wie gut eine photolabile Schutzgruppe durch die Zweiphotonen-Anregung freigesetzt werden kann, hängt stark von ihrer elektronischen Struktur ab. Bei der Bestrahlung eines Chromophors mit Anregungslichts kommt es zur Wechselwirkung des elektrischen Feldes des Anregungslichts (E) mit der Elektronenwolke des Moleküls, wodurch eine Ladungsumverteilung oder elektrische Polarisation P induziert wird, bei der sich das Dipolmoment μ des Chromophors verändert.^[73] In der linearen Optik hängt diese Polarisationsänderung linear von der Amplitude des eingestrahlten Lichts ab, sie verhält sich näherungsweise wie ein harmonischer Oszillator und wird beschrieben durch:

$$P(t) = \epsilon_0 \cdot \chi \cdot E(t) \quad (1.2)$$

wobei χ der Suszeptibilität und ϵ_0 der elektrischen Feldkonstante entspricht.^[76]

Bei der Verwendung von gepulsten Lasern treten bei der Interaktion dieser mit Medien Phänomene auf, die in der linearen Optik, nicht erklärt werden können. Dies liegt daran, dass sich die elektrische Polarisation P durch die hohen Laserleistungen wie ein anharmonischer Oszillator verhält und sich der Zusammenhang zwischen der induzierten Polarisation und dem einfallenden Lichtfeld nun näherungsweise durch eine Taylorreihen-Entwicklung beschreiben lässt:^[73,76]

$$P(t) = \epsilon_0(\chi E(t) + \chi_2 E(t)^2 + \chi_3 E(t)^3 + \dots) \quad (1.3)$$

Die höheren Terme werden also nur dann relevant, wenn die Intensität des einwirkenden Feldes sehr hoch ist, was bei fokussierten gepulsten Lasern der Fall ist. Sie sind für das Auftreten von Frequenzen ungleich der Anregungsfrequenz verantwortlich. Die Zweiphotonen-

Absorption wird durch den zweiten Term verursacht, Absorptionsprozesse höherer Ordnung werden durch die entsprechenden weiteren Terme verursacht.^[73,76]

Die Zahl der absorbierten Photonen n_a und die daraus resultierende Wahrscheinlichkeit der Absorption eines Photons bei einem Zweiphotonen-Prozess hängen von einer Vielzahl von Faktoren ab:^[64]

$$n_a \approx \frac{P_0^2 \delta}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{NA^2}{2\hbar c \lambda} \right)^2 \quad (1.4)$$

wobei P_0 der Laserleistung, δ dem Zweiphotonen-Einfangquerschnitt, τ_p der Pulsdauer, f_p der Pulswiederholungsrate, NA der numerischen Apertur, \hbar dem Planckschen Wirkungsquantum, c der Lichtgeschwindigkeit und λ der Wellenlänge entspricht.^[64]

Die Anregung eines Moleküls aus dem Grundzustand, sei es zentrosymmetrisch oder nichtzentrosymmetrisch, erfolgt über einen virtuellen angeregten Zustand in den angeregten Zustand. Im Falle eines nichtsymmetrischen Moleküls ist dieses der gleiche angeregte Zustand (S_1) wie im Falle der Einphotonen-Anregung. Bei zentrosymmetrischen Molekülen wird allerdings der bei der Einphotonen-Anregung verbotene $1A_g \rightarrow 2A_g$ (S_2) Übergang angeregt. Bei zentrosymmetrischen Molekülen sind folglich die Auswahlregeln der Zweiphotonen-Anregung umgekehrt zu denen der Einphotonen-Anregung.^[60]

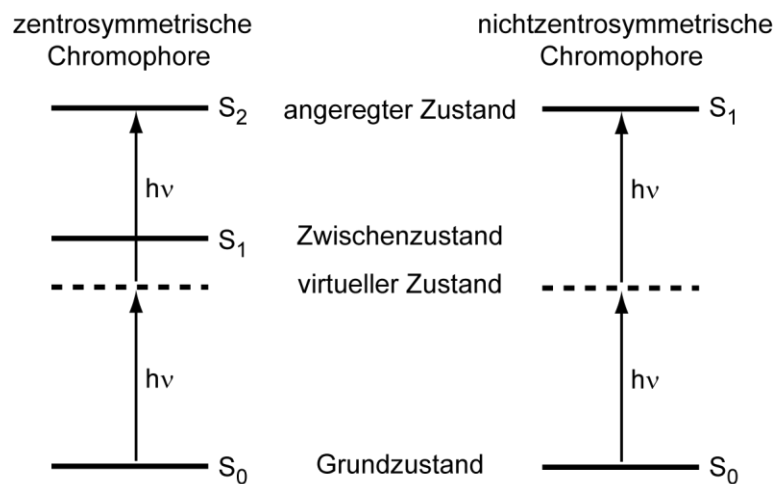


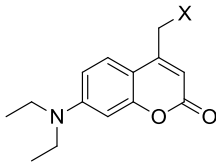
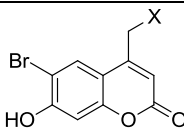
Abbildung 15: Energie-Diagramm für die Zweiphotonen-Anregung eines zentrosymmetrischen und eines nichtzentrosymmetrischen Chromophors. (Modifiziert nach Anderson *et al.* und Dalko *et al.*)^[59,60]

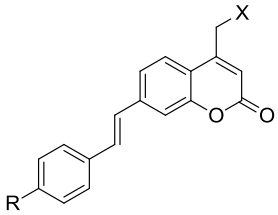
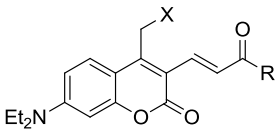
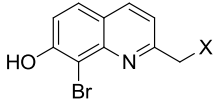
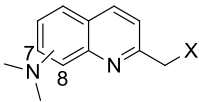
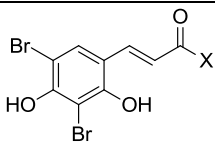
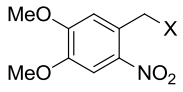
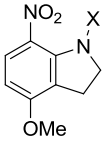
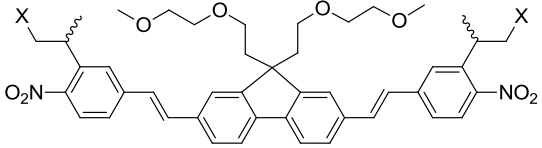
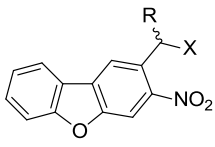
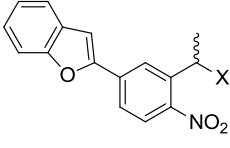
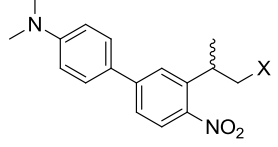
Die einfachsten durch Zweiphotonen-Absorption anregbaren Systeme sind linear oder eindimensional und bestehen aus einem mehr oder weniger starren konjugierten Zentralkern, umgeben von konjugierten Systemen, die wiederum elektronenziehende oder schiebende

Gruppen enthalten. Um nun die Zweiphotonen-Eigenschaften zu verbessern, wird meist das konjugierte System erweitert und der elektronenziehende oder schiebende Charakter von einem Teil des Molekül-Systems erhöht.^[73]

Wie effizient eine Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppe abgespalten werden kann, wird durch den Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt δ_u in GM (Göppert-Mayer, $1\text{GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{Photonen}^{-1}$) bestimmt. Dieser Wert ist das Produkt aus dem Zweiphotonen-Einfangquerschnitt δ und der Zweiphotonen-Quantenausbeute Φ und ist vergleichbar mit dem Produkt aus dem Extinktionskoeffizienten ϵ und der Quantenausbeute ϕ auf Einphotonen-Ebene. Allerdings ist bei Betrachtung dieser Werte zu berücksichtigen, dass diese Werte sehr starke Schwankungen aufweisen und abhängig vom jeweiligen Labor, in dem die Messungen durchgeführt wurden, stark voneinander abweichen können. Werte die innerhalb einer Arbeitsgruppe gemessen wurden, sind besser miteinander vergleichbar, als solche, die von unterschiedlichen Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Messaufbauten durchgeführt wurden. So existieren in der Literatur z.B. für 6-Brom-7-hydroxycumarin-4-methyl-(Bhc)-OAc sowohl der Wert $0.72 \text{ GM}^{[78]}$ als auch $1.99 \text{ GM}^{[79]}$ als Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt bei 740 nm . Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppen wurden mit den verschiedensten Grundgerüsten entwickelt. Dazu gehören die Cumarine, Chinoline, Nitroindole, Hydroxycinnamate, Pyridinium, Hydroxyphenacyle, Nitrobenzole und Nitrophenethylene mit vielen verschiedenen Derivaten. Beispielhaft sind einige der Zweiphotonen-sensitiven Schutzgruppen mit ihren Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitten in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 zeigt verschiedene Schutzgruppen mit deren Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitten.

Abkürzung der Schutzgruppe	Struktur	Zweiphotonen-wirkungsquerschnitt δ_u
DEACM		$0.12 \text{ GM (800 nm)}^{[80]}$
Bhc		$0.42 \text{ GM (800 nm)}^{[79]}$

Styryl-konjugiertes Cumarin		0.26 GM (800 nm) ^[80]
DEAC450		0.5 GM (900 nm) ^{abgeschätzt[48]}
BHQ		0.59 GM (740 nm) ^[78]
7-/8-DMAQ		0.05/0.67 GM (730 nm) ^[81,82]
Dibromo-2,4- dihydroxymitsäure		1.6 GM (750 nm) ^[83]
DMNB		0.02 GM (750 nm) ^[84]
MNI		0.06 GM (720 nm) ^[85]
BNSF		5 GM (800 nm) ^[86]
NDBF		0.6 GM ^[87]
NPBF		5 GM (740 nm) ^[88]
ANBP		11 GM (800 nm) ^[44]

Einige vielversprechende Zweiphotonen-Schutzgruppen basieren auf dem Nitrobenzyl-Grundgerüst, obwohl NB selbst nur einen sehr geringen Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt aufweist. Doch, wie oben erwähnt, können durch Erweiterung des konjugierten π -Systems und die Einführung von Donor- und Akzeptorgruppen die Zweiphotonen-Eigenschaften verbessert werden. Jullien *et al.*^[84] haben etliche NPE-Derivate synthetisiert und analysiert, die in para-Stellung zur Nitrogruppe verschiedene Modifikationen wie Phenyl, (4-Methoxyphenyl)oxazol, Methoxyphenylacetylen oder Methoxy-Styryl tragen und Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte von 0.015 bis 0.065 GM aufweisen. Weiterhin gehören zu diesen verbesserten NB-Derivaten z.B. 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB) mit 0.02 GM oder NDBF mit 0.6 GM. Auch (2,7-Bis-{4-nitro-8-[3-(2-propyl)-styryl]}-9,9-bis-[1-(3,6-dioxaheptyl)]-fluoren (BNSF) mit 5 GM und ANBP^[89] mit 11 GM sowie ähnliche Verbindungen der Arbeitsgruppe um Göldner stellen Nitrobenzyl-Derivate dar. Sie wurden in der Arbeitsgruppe um Göldner synthetisiert, charakterisiert und z.B. auf Neurotransmitter angewendet. Eine jüngere Entwicklung von Katan *et al.*^[88] basiert ebenfalls auf der Erweiterung des Nitrobenzyls durch ein Benzofuran, das sogenannte 2-(4-Nitrophenyl)benzofuran (NPBF) das einen hohen Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt von 5 GM (740 nm) aufweist.^[88]

Anwendungen der Zweiphotonen-sensitiven Schutzgruppen erfolgten bereits in verschiedenen Bereichen wie unter anderem in der Proteinaktivitäts-Kontrolle, in der Freisetzung von Funktionalitäten in Hydrogelen und in der Regulation von Neurotransmittern. Auf Ebene der Oligonukleotide sind neben Studien über photolabil geschützte Monomere^[90,91] bisher nur Morpholino-Oligonukleotide bekannt, die über den Einbau eines 6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxy-8-(methoxycarbonyl)cumarin-(BHQ)-Linkers durch Zweiphotonen-Anregung in Zebrafischen gespalten werden konnten.

1.2.2.1. Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppen in Proteinen

Deiters *et al.*^[92] konnten mit Hilfe der Erweiterung des genetischen Codes um unnatürliche Aminosäuren, ortsspezifisch Bhc-modifizierte Lysine in Proteine einbringen. Als Testsystem verwendeten sie das eGFP-Gen an dessen K85-Stelle ein Bhc-geschütztes Lysin eingebaut wurde, wodurch die korrekte Faltung des Proteins und damit verbunden die Fluoreszenz des eGFP unterbunden wurde. Die Photolyse erfolgte sowohl bei 365 und 405 nm aber auch mit 760 nm.^[92]

Durch photolabiles Schützen einer Giberellinsäure, die im entschützten Zustand die Dimerisierung des GA3-Rezeptor *GID1* und *GAI* induziert, können zwei Proteine, die jeweils an *GID1* bzw. *GAI* gebunden sind, durch Photolyse in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Dazu wurden 3 verschiedenen photolabil geschützte Giberellinsäuren hergestellt, mit 2-

(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)propyl (DMNPP), (2-(4'-Bis((2-methoxyethoxy)ethyl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol) (EANBP) und einer in dieser Studie neu vorgestellten NPP-Schutzgruppe mit Diphenylacetylen verlängertem π -System, die eine 1.8fach bessere Zweiphotonen-Abspaltungs-Effizienz im Vergleich zur EANBP-Schutzgruppe aufweist. In Zellen wurden durch diese Methode GID1 modifizierte eGFP-Proteine, die sich zunächst im gesamten Cytosol aufhalten, durch Photolyse an die in den Mitochondrien lokalisierte TOM20-mCherry-GAI-Proteine gebunden. Ein entsprechendes Experiment konnte auch durch Zweiphotonen-Anregung mit 800 nm erfolgreich durchgeführt werden.^[93]

Durch ein NDBF-geschütztes Glutathion (GSH) konnte dessen Bindung an die Glutathion-S-Transferase (GST) mittels Zweiphotonen-Photolyse reguliert werden. Durch Immobilisierung des NDBF-GSH über seine Thiolfunktion in Hydrogele konnte eGFP-modifiziertes GST durch Zweiphotonen-Photolyse dreidimensional angeordnet werden.^[94]

Ebenfalls NDBF wurde von Distefano *et al.*^[95] als Schutzgruppe für Thiole in Cysteinen eingesetzt. Durch die Photolyse der NDBF-Schutzgruppe konnte gezielt die Palmitoylierung durch die Palmitoyl-acryltransferase (PAT) des zuvor geschützten Peptids initiiert werden, wodurch diese Stränge im Anschluss aus dem Cytosol und Golgi-Apparat in die Plasmamembran migrieren.^[95]

1.2.2.2. Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppen in Hydrogelen

Die Zweiphotonen-Technik ermöglicht bei photosensitiven Hydrogelen deren dreidimensionales Strukturieren, um z.B. ein photoabbaubares Hydrogel mit Aussparungen zu versehen, entlang derer die Axone von Neuronen gerichtet wachsen können, um gezielt Netzwerke aufbauen zu können.^[26]

Auch die dreidimensionale Freisetzung von Thiolfunktionen in einem Bhc-geschützten Agarosegel und die dadurch ermöglichte Anbringung jeglicher Modifikationen, seien es Fluorophore oder Proteine, wurde unter Zuhilfenahme der Zweiphotonen-Photolyse realisiert.^[96]

1.2.2.3. Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppen auf Neurotransmittern

Das Spektrum an Zweiphotonen-sensitiv geschützten Neurotransmittern und *second messengern* ist extrem weit und kann deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht komplett dargestellt werden, sondern nur anhand einiger Beispiele vorgestellt werden.

Die ersten Studien über die Verwendung der Zweiphotonen-Anregung zur Photolyse handeln von photolabil geschützten Ca^{2+} -Chelatoren, die im geschützten Zustand die Ca^{2+} -Ionen über

4 Carboxylatgruppen chelatisieren und nach der Photolyse das Ca^{2+} freisetzen. Die Freisetzung des Ca^{2+} wurde dabei über einen Calcium-sensitiven Farbstoff (Fluo-3) visualisiert. Die erste Studie erfolgte mit DM-Nitrophen^[97]. Im darauf folgenden Jahr erfolgten entsprechende Studien zu DMNPE-EGTA-4^[98] und Azid-1 **30**, einem Azid-substituierten Chelator mit verbesserten Zweiphotonen-Eigenschaften (1.4 GM bei 700 nm)^[99], der unter Abspaltung von Stickstoff Ca^{2+} freisetzt (siehe Abbildung 16).

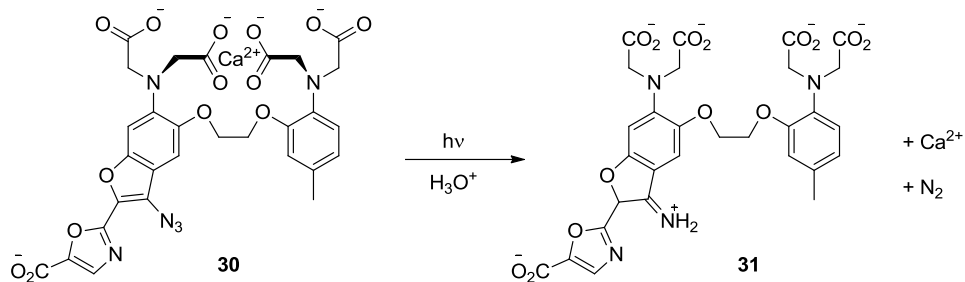


Abbildung 16: Photolyse-Reaktion des Azid-1 **30** einem Azid-substituierten Chelators, der vor der Belichtung Ca^{2+} chelatisiert und dieses nach Photolyse freisetzt.^[100]

Leider ist das System des Azid-substituierten Chelators aufgrund seiner Struktur nicht universell als Schutzgruppen-Motiv für andere Funktionalitäten übertragbar. Einen universelleren Einsatz stellt in diesem Zusammenhang die NDBF-Schutzgruppe mit einem δ_u von 0.6 GM dar, die für verschiedenste Funktionalitäten und Moleküle eingesetzt werden kann, aber erstmals am NDBF-EGTA (siehe Abbildung 17) von Ellis-Davies *et al.* vorgestellt wurde. Lichtinduziert kann auch hier Ca^{2+} als *second messenger* freigesetzt werden.^[87]

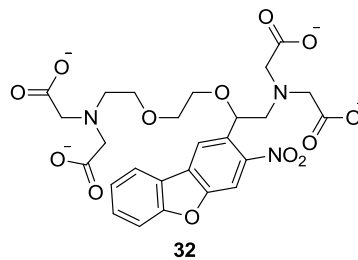


Abbildung 17: Struktur von NDBF-EGTA.^[87]

Die meisten Studien mit Zweiphotonen-sensitiven Schutzgruppen wurden an Neurotransmittern durchgeführt. Gerade auch um neue Schutzgruppen zu charakterisieren, bietet es sich an solche Systeme zu untersuchen, da hier die Freisetzung des Neurotransmitters zu einem in Neuronen messbaren Effekt führt.

Tsien *et al.*^[79] zeigten in ihrer Studie die Zweiphotonen-Eigenschaften von Bhc-Glutamat in Hippocampus-Neuronen, das mit ca. 1 GM (740 nm) einen besseren Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt lieferte als die um 1999 verwendeten Schutzgruppen wie α -Carboxy-2-nitrobenzyl (CNB) und DMNB. Sie konnten durch die Zweiphotonen-Photolyse erstmals die Glutamat-Sensitivität von Neuronen dreidimensional aufgelöst über die Oberfläche der Neuronen abbilden. Der Neurotransmitter Glutamat wird häufig in photolabil geschützter Form für verschiedene Untersuchungen herangezogen wird. Glutamat ist unter anderem ein Agonist des AMPA-Rezeptors, der aus mehreren Untereinheiten GluR1-4 besteht, in der Zellmembran eingebettet ist und einen Ionen-Kanal darstellt.^[79]

Das wohl am häufigsten für die Messung von Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte verwendete Referenzsystem ist das mittlerweile kommerziell erhältliche 4-Methoxy-7-nitroindolin (MNI)-Glutamat mit einem Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt von 0.06 GM bei 730 nm.^[85] Das geschützte Glutamat zeigte in den Studien keine antagonistische Wirkung auf den AMPA-Rezeptor, doch bereits eine Belichtung von 50 μ s mit 720 nm erzeugte ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) das vergleichbar mit dem spontanen EPSP ausfällt. Bemerkenswert ist, dass das EPSP direkt nach der Belichtung erfolgt. Die Zweiphotonen-induzierte Freisetzung des MNI-Glutamats erlaubt die Vermessung von funktionellen Glutamat-Rezeptoren auf dem Level von einzelnen Synapsen.^[85] Die Gruppe um Ellis-Davies hat in den letzten Jahren eine Vielzahl von photolabil geschützten Glutamat- und GABA-Bausteinen synthetisiert, charakterisiert und in *In-Vivo*-Experimenten angewendet. Die herausstechendste Studie gelang 2010 mit der Synthese eines 7-(Dicarboxymethyl)-aminocumarin-geschützten GABAs (N-DCAC-GABA), das in Gegenwart von 4-Carboxymethoxy-5,7-dinitroindoliny-(CDNI)-Glutamat bei Bestrahlung mit 830 nm photolysiert werden und das freigesetzte GABA inhibitorisch auf das Nervensystem einwirken kann. GABA bewirkt den entgegengesetzten Effekt zu Glutamat und ist damit im weitesten Sinne ein Gegenspieler des Glutamats. Allerdings greifen die beiden Neurotransmitter an zwei unterschiedlichen Rezeptoren an und konkurrieren nicht um denselben Rezeptor. Die Photolyse des CDNI-Glutamats erfolgt bei 720 nm. In hippocampalen Rattenneuronen konnte das Aktionspotential aktiviert und geblockt werden.^[101] Die Entwicklung der stark bathochrom verschobenen Schutzgruppe DEAC450^[48] ermöglichte die Photolyse bei 900 nm. Interessanterweise zeigte sich bei Bestrahlung mit 720 nm keine Photolyse, was diese Schutzgruppe zu einem interessanten Kandidaten für orthogonale Photolysen macht. Auch mit DEAC450 als Schutzgruppe für GABA konnte gezeigt werden, dass dieses in Anwesenheit von CDNI-Glutamat mit 900 nm photolysiert werden kann, ohne dabei auch Glutamat freizusetzen. Bei der Photolyse mit 720 nm wurden nur geringe Mengen GABA freigesetzt, so

dass das Aktionspotential etwas geringer ausfällt, als in Abwesenheit des DEAC450-GABAs.^[102]

Eine sehr interessante Studie von Anderson *et al.* verwendet ein Konstrukt aus BNSF, das über Pyridinium kovalent an GABA gebunden ist. Nach der Zweiphotonen-Anregung kommt es zu einem intramolekularen Elektronen-Transfer des BNSF zum Pyridinium, wodurch dieses in der Lage ist GABA freizusetzen. Dieses Beispiel zeigt, wie Zweiphotonen-unsensitive Schutzgruppen durch einen Elektronen-Transfer eines benachbarten Moleküls, Zweiphotonen-sensitiv photolytisch werden können.^[103]

Insgesamt zeigen all diese Studien zum einen, dass es voraussichtlich noch viele Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Zweiphotonen-sensitiven Schutzgruppen geben wird und zum anderen, dass mit Hilfe der Zweiphotonen-Technik höchst interessante Anwendungen gerade im biologischen System gibt, die durch ihre hohe örtliche Auflösung großes Potenzial für medizinische Zwecke haben könnten.

1.3. DNA Synthese mit Modifikationen

Es gibt eine Vielzahl von Modifikationen, mit denen ein Oligonukleotid verändert werden kann. Dazu gehören u.a. Modifikationen am Rückgrat, sei es am Zucker oder am Phosphat, an den Basen, am 3'- oder am 5'-Ende des Oligonukleotids. Zu den Veränderungen am Zucker gehören beispielsweise die Morpholinos, PNA und LNA. Am Phosphatrückgrat können Thioate zur höheren Stabilität gegenüber Exo-Nukleasen eingebaut werden. Auch der Einbau von C3-Modifikationen an den Enden der Oligonukleotide kann deren Exo-Nuklease-Stabilität erhöhen.^[104] Ebenso ist der Einbau von Fluorophoren in Oligonukleotiden sehr gefragt, um beispielsweise diese in Zellen verfolgen zu können. Ein solcher Einbau kann je nach gewünschter Stelle auf verschiedene Weise erfolgen. Für den internen Einbau in Oligonukleotide gibt es modifizierte Nukleotid-Phosphoramidite, die entweder direkt mit einem Fluorophor modifiziert sind, oder über eine geschützte reaktive Stelle, wie ein Amin oder Thiol verfügen, an die postsynthetisch ein Fluorophor angebracht werden kann. Ebenfalls über ein Phosphoramidit kann eine Modifikation an das 5'-Ende eingeführt werden. Auch hier gibt es bereits Fluorophor-Amidite, die direkt eingebaut werden, oder Amin- oder Thiol-Amidite, an die postsynthetisch eine Modifikation eingebracht werden kann. Der Einbau einer Modifikation am 3'-Ende erfolgt über eine modifizierte feste Phase. Auch hier gibt es bereits fertig modifizierte Varianten und Thiol- oder Amin-modifizierte feste Phasen. Der postsynthetische Einbau beispielsweise eines Fluorophors an ein Oligonukleotid, kann unter anderem über die Reaktion

eines Thiols mit einem Maleimid (Abbildung 18a), eines Amins mit einem NHS-Ester (Abbildung 18b) oder über eine Klick-Reaktion eines Alkins und eines Azids (Abbildung 18c) erfolgen. Diese postsynthetischen Modifikationen sind schematisch in Abbildung 18 dargestellt.

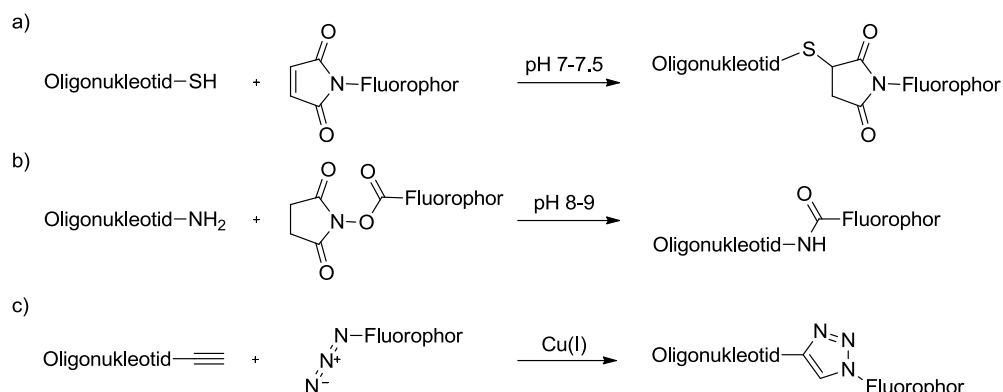


Abbildung 18: Schematische Darstellung drei verschiedener postsynthetischer Markierungs-Methoden am Beispiel eines Fluoreszenz-markierten Oligonukleotids.

Neben Fluorophoren gibt es eine Vielzahl von Modifikationen die in Oligonukleotide eingebaut werden können. Darüber hinaus gibt es auch biologische Methoden um Oligonukleotide zu modifizieren, wie beispielsweise die Ligation oder die Phosphorylierung durch Enzyme.

Eine weitere im Rahmen dieser Arbeit zentrale Modifikation stellen die photolabilen Schutzgruppen auf den Basen der Oligonukleotide dar. Für deren Einbau in Oligonukleotidsequenzen eignet sich ebenfalls meistens die Oligonukleotid-Festphasensynthese. Meistens deshalb, weil die photolabile Schutzgruppe eine gewisse Stabilität gegenüber den hier verwendeten Reagenzien mitbringen muss, was leider nicht immer gegeben ist und die Notwendigkeit von Alternativen nötigt macht. Problematisch erweist sich dabei meist der letzte Schritt der Ammoniak-Abspaltung. Dazu sei nur kurz auf die Sekine-Chemie hingewiesen, die durch spezielle Kupplungs- und Capping-Reagenzien eine schutzgruppen-freie Festphasen-Synthese ermöglicht und somit auch den Einbau von basenlabilen Schutzgruppen bzw. Modifikationen ermöglicht.^[105] Eine weitere nur kurz angerissene Methode stellt die *convertible nucleotides*-Methode dar, bei der während der Festphasensynthese Nukleotide mit einer aktivierten Funktionalität eingeführt werden, an denen nach Abspaltung von der festen Phase post-synthetisch ein Amin mit der gewünschten Modifikation angreifen kann.^[106]

Um nun photolabile Schutzgruppen auf den Basen der Oligonukleotide einbauen zu können, müssen zunächst photolabil geschützte Phosphoramidite synthetisiert werden, die anschließend über die Oligonukleotid-Festphasensynthese in Oligonukleotide gewünschter

Sequenz eingebaut werden. Die verwendeten Nukleotid-Phosphoramidite verfügen über persistente Schutzgruppen (Acetyl für dC, Dimethylformamidin für dG und Benzoyl für dA), die erst nach der Synthese abgespalten werden. Der Syntheseyklus eines DNA-Oligonukleotids ist in Abbildung 19 dargestellt.

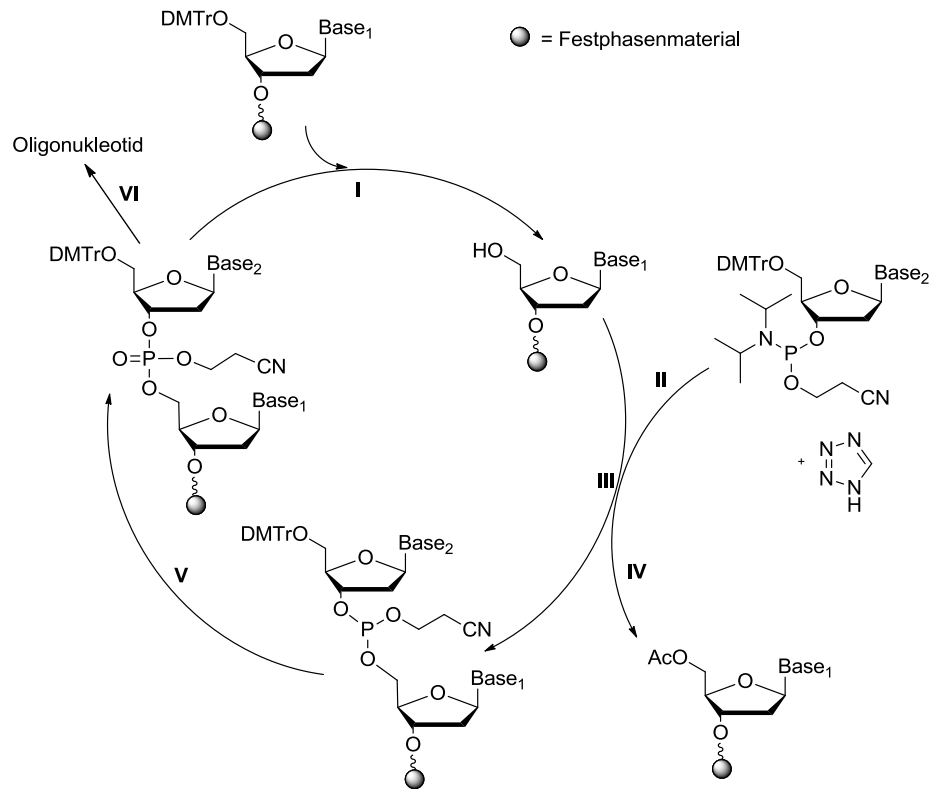


Abbildung 19: Oligonukleotid-Syntheseyklus mittels Festphasensynthese am Beispiel von DNA.

An der festen Phase ist der erste Nucleosidbaustein über seine 3'-Position an der festen Phase immobilisiert. Als erster Schritt erfolgt (I) unter Zuhilfenahme von 3%iger Trichloressigsäure in DCM die Detritylierung. Der nächste Nucleosidbaustein wird mit 1H-Tetrazol in Acetonitril aktiviert (II) und kann so im Anschluss mit dem ersten Nucleosid koppeln (III). Die nicht abreagierten 5'-Hydroxylgruppen werden beim sogenannten Capping (IV) mit Essigsäureanhydrid in Pyridin und THF acetyliert und können somit nicht mehr verlängert werden. Anschließend erfolgt die Oxidation (V) des Phosphors der gekuppelten Nucleoside durch Iod in einem Pyridin/Wasser-Gemisch. Im Anschluss erfolgt entweder ein erneuter Durchlauf des Syntheseyklus oder, bei beendeter Synthese, die Entschützung der Phosphatreste, der Basen und die Abspaltung des Oligonukleotids von der festen Phase mit Ammoniak oder Methylamin (VI). Verfügt die photolabile Schutzgruppe über eine leichte Basenlabilität kann anstelle der üblichen persistenten Schutzgruppen auf den Nucleobasen auch die sogenannte UltraMild-Methode (*i*Pr-Pac für dG und Pac für dA) verwendet werden,

bei der entweder nur sehr kurze Entschützungszeiten in Ammoniak benötigt werden oder die Abspaltung sogar mit K_2CO_3 in Methanol erfolgen kann. Benötigt wird dazu nur ein anderes Capping-Reagenz, da mit Essigsäureanhydrid ein Austausch der *i*Pr-Pac und Pac-Schutzgruppen gegen Acetyl erfolgen würde, welche dann nicht innerhalb der kurzen Abspaltungszeit abgespalten werden können. Als Capping-Reagenz wird deshalb entsprechend Pac-Anhydrid eingesetzt.

1.4. Mikroskopie

Das Grundprinzip eines Mikroskops beruht auf der Vergrößerung eines Objekts durch zwei optimal angeordnete konvexe Linsen. An der ersten Linse, der Objektiv-Linse wird das Abbild des Objekts (reelles Zwischenbild) gedreht und vergrößert. Dieses Zwischenbild muss sich hinter dem Brennpunkt der zweiten Linse befinden. Die zweite Linse, Okular genannt, bildet das Zwischenbild auf der Netzhaut ab, wodurch das Auge ein virtuelles, vergrößertes Bild wahrnimmt (siehe Abbildung 20).^[107,108]

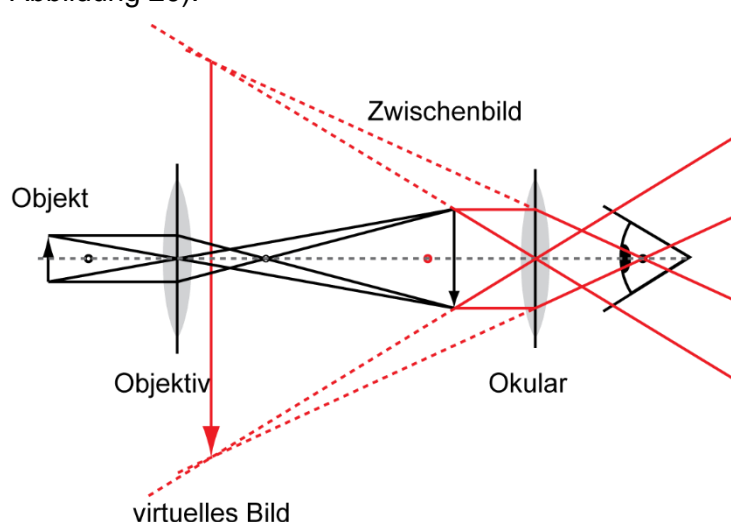


Abbildung 20: Einfache schematische Darstellung des optischen Pfads in einem Mikroskop. Der schwarze Pfeil stellt das Objekt und das Zwischenbild dar, der rote Pfeil deutet das vom Betrachter wahrgenommene virtuelle, vergrößerte Bild des Objekts an. (Abbildung modifiziert)^[107]

Um die Probe in der Präparatebene (in der sich das Objekt befindet) sehen zu können, muss diese ausgeleuchtet werden. Bei einfachen Mikroskopen erfolgt dies über die kritische Beleuchtung. Dabei wird eine Lichtquelle über eine weitere Linse auf die Präparatebene fokussiert. So wird allerdings auch die Lichtquelle selbst in dieser Ebene abgebildet, was bedeutet, dass die Lichtquelle auch mit dem Präparat im Auge abgebildet wird. Dies kann zwar mit Hilfe von Filtern abgeschwächt werden, dadurch geht aber Lichtintensität verloren, was zu

einer geringeren Auflösung führt. In teureren Mikroskopen findet die Objektbeleuchtung über die Köhler Beleuchtung statt. Sie wurde 1893 von August Köhler entwickelt und trennt den Abbildungsstrahlengang vom Beleuchtungsstrahlengang. Beim Beleuchtungsstrahlengang wird die Lichtquelle durch den Kollektor auf die sogenannte Aperturblende fokussiert und im Anschluss durch die sogenannte Kondensorlinse als breiter Strahl durch die Präparatenebene geführt. In der hinteren Brennebene des Objektivs wird die Lichtquelle abgebildet und durch das Okular erneut kurz vor der Augenlinse abgebildet. Somit wird die Netzhaut im Auge von der Lichtquelle breit ausgeleuchtet und nur das Objekt wird auf der Netzhaut abgebildet.^[108]

Ein wichtiges Kriterium bei der Mikroskopie ist die Auflösung, die mit den verwendeten Objektiven erreicht werden kann. Da an jeder verbauten Linse im Mikroskop Beugung stattfinden kann, wird ein Punkt nicht als Punkt abgebildet, sondern durch konstruktive und destruktive Interferenz als sogenanntes Beugungsscheibchen (*Airy disk*) mit einem Hauptmaximum und mehreren schwächeren Nebenmaxima abgebildet. Mathematisch wird das Phänomen als Punktspreizfunktion beschrieben. Durch eine höhere numerische Apertur (NA) des Objektivs kann der Radius des Beugungsscheibchens verkleinert werden, was zu einer besseren Auflösung führt. Die Auflösung wurde zuerst von Abbe^[109] anhand von Lichtstreuung definiert als der minimale Abstand d den zwei Strukturen haben dürfen, um getrennt voneinander detektiert werden zu können. Das Abbe-Limit ist wie folgt definiert:^[109]

$$d = \frac{\lambda}{2 NA} \quad (1.5)$$

dabei steht λ für die Wellenlänge und NA die numerische Apertur. Rayleigh^[110] ging von „selbstleuchtenden Objekten“ (Fluorophoren) aus und postulierte, dass zwei benachbarte Fluorophore nur dann räumlich aufgelöst werden können, wenn das Maximum der 1. Punktspreizfunktion nicht näher zum Maximum der 2. Punktspreizfunktion liegt, als das erste Minimum der 1. Punktspreizfunktion. Dieser Zusammenhang wird durch das Rayleigh Kriterium angegeben:^[110]

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (1.6)$$

Die numerische Apertur (NA) wiederum beschreibt die Fähigkeit eines Objektivs Licht einzusammeln. Sie wird aus dem Produkt des Brechungsindex n des Mediums zwischen dem Objekt und dem Objektiv und dem Sinus des halben Öffnungswinkels α des Objektivs berechnet:^[108]

$$NA = n \cdot \sin\alpha \quad (1.7)$$

Je weiter der Einfallswinkel und je höher der Brechungsindex des Mediums, desto höher ist die numerische Apertur und die damit verbundene Auflösung.

Neben der Punktspreizfunktion gibt es eine Vielzahl weiterer Abbildungsfehler bei Linsen. Wenn Linsen eine sphärische Krümmung aufweisen, werden Strahlen die den Randbereich der Linse treffen in einen näher an der Linse liegenden Fokus gebrochen, als die Strahlen, die die Linse näher an deren Mittelpunkt treffen. Diese sphärische Aberration hat zur Folge, dass das Bild unscharf dargestellt wird. Dieser Abbildungsfehler kann durch die Verwendung von Linsen, die zwei unterschiedliche Krümmungsradien aufweisen, ausgeglichen werden. Solche Linsen sind asymmetrisch sphärisch. Bei asphärischen Linsen tritt dieser Fehler nicht auf, da der Radius der Linse an keiner Stelle konstant ist, sie sind allerdings auch deutlich kostspieliger.^[108]

Ein weiterer Abbildungsfehler ist die chromatische Aberration, bei der Licht unterschiedlicher Wellenlänge insbesondere am Rand von Linsen unterschiedlich stark gebrochen wird. Die Folge ist, dass die einzelnen Wellenlängen unterschiedliche Fokusebenen haben. Einfache Abhilfe kann hier die Verwendung einer Blende schaffen, die dafür sorgt, dass der Randbereich der Linse nicht ausgeleuchtet wird. Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung dieses Effekts stellt die Verwendung einer Kombination aus zwei Linsen dar. Dabei wird eine zweite Linse (Flintglas) direkt an die konkave Linse (Kronglas) gesetzt, die dafür sorgt, dass mehrere Wellenlängen die möglichst gleiche Brennweite aufweisen. Werden dabei nur der rote und der blaue Spektralbereich aneinander angepasst, nennt man das Linsensystem Achromat. Wird auch der grüne Bereich mit dem roten und blauen in Einklang gebracht, nennt sich das Linsensystem Apochromat.^[108]

Auch die Bildfeldwölbung gehört zu den Abbildungsfehlern, die einfache Linsen aufweisen können. Dabei werden Bilder nicht eben abgebildet, sondern gewölbt, da Bereiche im Randbereich der Linse näher zur optischen Achse abgebildet werden, als solche, die sich mehr in der Mitte befinden. Auch hier kann durch Einsatz einer Blende der Randbereich ausgespart werden, wodurch die Bildwölbung an Bedeutung verliert. Eine teurere Methode ist wiederum der Einsatz einer Linsen Kombination.^[108]

Je nachdem für welchen Anwendungsbereich das Mikroskop eingesetzt wird, muss das entsprechend passende Objektiv ausgewählt werden. Umso mehr Korrekturen die Objektive aufweisen, desto teurer sind sie, desto besser werden aber unter Umständen auch die Bilder. Neben den Korrekturen, sind die Objektive auch unterschiedlich gut für extreme Wellenlängen, wie UV- oder IR-Licht geeignet. Auch hier ist entscheidend, für welchen Zweck das Objektiv eingesetzt wird.

Die Durchlichtmikroskopie weist einige Nachteile auf, wie einen schlechteren Kontrast und eine nur geringe Sensitivität, welche durch die Verwendung von Fluoreszenzmikroskopen ausgeglichen werden können. Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, durch zuvor gezieltes Einfärben einzelner Bereiche z.B. eines Organismus, diese im Mikroskop sichtbar zu machen. Es wird zwischen der Weitfeld- und der Konfokal-Mikroskopie unterschieden.^[77,111]

1.4.1. Fluoreszenz-Mikroskopie

Eine wichtige Voraussetzung für ein Fluoreszenzmikroskop ist, dass das für die Fluoreszenzanregung benötigte Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht getrennt wird, um das Fluoreszenzlicht detektieren zu können. Um Fluoreszenz zu generieren, benötigt man eine gewisse Energie, um den Fluorophor elektronisch auf ein höheres Energieniveau anzuregen. Die beim Übergang aus dem angeregten in den Grundzustand freiwerdende Photonen weisen weniger Energie auf, als die Photonen der Anregung, da ein gewisser Anteil durch interne Konversion verloren geht. Somit ist das vom Fluorophor emittierte Licht auch in seiner Wellenlänge im Vergleich zur Anregung zu höheren Wellenlängen verschoben. Den Abstand zwischen den Maxima des Anregungsspektrums und des Emissionsspektrums eines Fluorophors wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet und beschreibt den Energieverlust.^[77,111]

Um in einem Mikroskop Bilder einer fluoreszierenden Probe aufnehmen zu können, muss der Fluorophor so angeregt werden, dass das Anregungslicht vor dem Detektor herausgefiltert wird. Aus diesem Grund verwenden die meisten Mikroskope die Epifluoreszenz, bei der die Detektion aus der gleichen Richtung erfolgt wie die Anregung und somit ein Großteil des Anregungslichts überhaupt nicht mehr in den Detektionsstrahlengang gelangt. Ein schematischer Aufbau eines Epifluoreszenz-Mikroskops ist in Abbildung 21 dargestellt.^[77,111] Dazu wird ein dichroitischer Spiegel benötigt, der das Anregungslicht in die Probe reflektiert und der für das Emissionslicht durchlässig ist. Das in der Probe entstehende Emissionslicht, das in alle Richtungen strahlt, kann durch den dichroitischen Spiegel in den dahinter befindlichen Detektor gelangen. Je größer der Öffnungswinkel des Objektivs ist, desto mehr Emissionslicht wird eingesammelt. Wird als Anregungsquelle eine breitbandige Lichtquelle verwendet, kann durch einen zusätzlichen Extinktionsfilter der zur Anregung geeignete Wellenlängenbereich vom restlichen Lichtquellenspektrum abgetrennt werden. Auch im Strahlengang zwischen dem fluoreszierenden Objekt und dem Detektor ist meist ein weiterer Filter verbaut, der nur für das Emissionslicht des Fluorophors durchlässig ist.^[77,111]

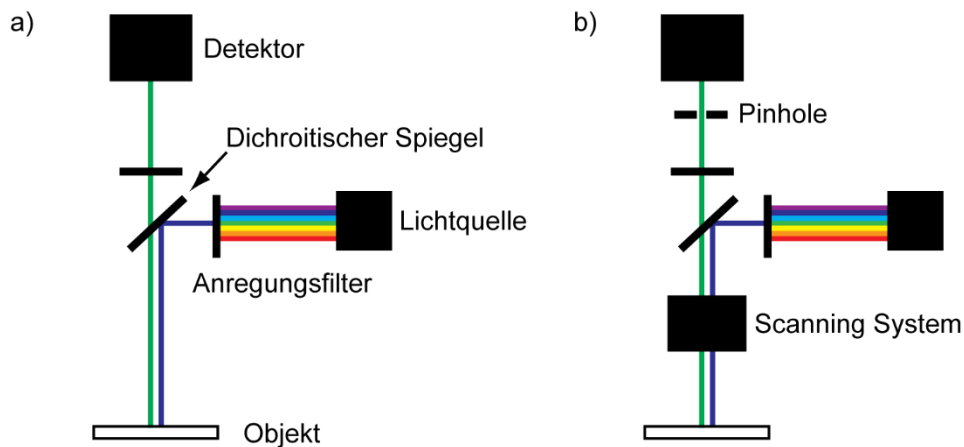


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem a) Weitfeld- und b) konfokalen Fluoreszenzmikroskops. (Abbildung modifiziert)^[112]

Erfolgt die Anregung des Fluorophors mit Hilfe einer Lichtquelle, die die komplette Bildebene durchleuchtet, wird diese Art der Mikroskopie als Weitfeld-Mikroskopie bezeichnet. Da die komplette Probe bei dieser Technik bestrahlt wird, wird auch die Fluoreszenz der kompletten Probe angeregt und vom Detektor aufgenommen. Handelt es sich bei der Probe um ein sehr dünnes Präparat ist eine solche Weitfeld-Aufnahme völlig ausreichend. Als Detektor eignen sich hier CCD-Kameras.^[77,111]

Möchte man aber dickere Präparate aufnehmen, wird man mit der Weitfeldbeleuchtung meist Bilder mit hoher Hintergrundfluoreszenz generieren. Da auch Fluorophore außerhalb der Fokusebene bei der Weitfeldbeleuchtung angeregt werden, ist deren Emission als unscharfe Hintergrundfluoreszenz zu erkennen. Mit dieser Technik ist es nicht möglich dreidimensionale Aufnahmen zu machen, dafür wird die Konfokal-Mikroskopie benötigt.^[77,111]

1.4.1.1. Konfokal-Mikroskopie

Bei einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wird das Anregungslicht in die Probe hinein fokussiert und dieses sogenannte konfokale Volumen Punkt für Punkt von einem Extinktionslaser über ein Scanning-System abgerastert (siehe Abbildung 21b). Dies hat den Vorteil, dass während der Messung nur die Fluorophore im Laserfokus angeregt werden und fluoreszieren. Doch wird auch hier der Bereich oberhalb und unterhalb des Fokus angeregt, was eine scharfe dreidimensionale Aufnahme unmöglich macht. Konfokale Mikroskope verfügen über eine Lösung des Problems, durch den Einbau einer Lochblende in den

Emissionsstrahlengang vor dem Detektor, wodurch Emissionslicht außerhalb der Fokusebene herausgefiltert wird. Schematisch ist dies in Abbildung 22 dargestellt.^[77,111]

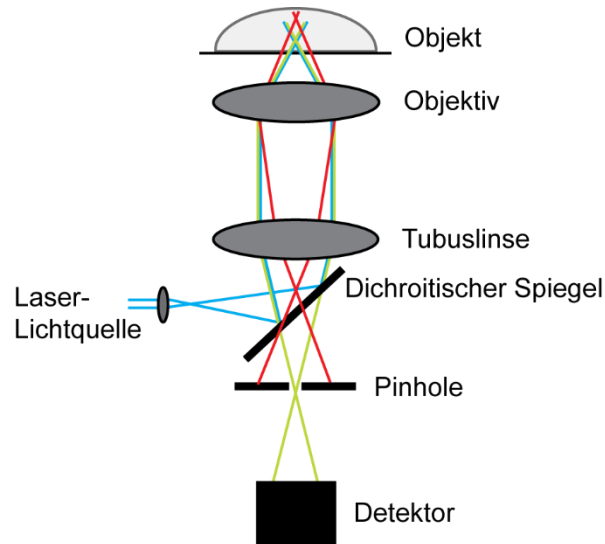


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Funktion der Lochblende in einem konfokalen Mikroskop. Licht außerhalb der Fokusebene (rot) wird durch die Lochblende herausgefiltert, während Emissionslicht aus dem Fokus (grün) die Lochblende passieren kann und am Detektor detektiert wird. (Abbildung modifiziert)^[113]

Die Extinktion durch den Laser ist in blau dargestellt. Durch den dichroitischen Spiegel gelangt das Anregungslicht in die Probe und regt dort die Probe zur Fluoreszenz an. Das aus dem Fokus kommende Emissionslicht (grün) gelangt über das Objektiv und die Tubuslinse durch die Öffnung der Lochblende auf den Detektor. Emissionsstrahlen aus Bereichen ober- oder unterhalb des Fokus (rot) haben eine andere Ausbreitungsgeometrie und werden durch die Lochblende herausgefiltert und gelangen so nicht zum Detektor. Dies ist anhand des roten Strahlengangs dargestellt. Es gelangen also nur Photonen aus der Fokusebene in den Detektor. Um nun die gesamte Probe zu detektieren, wird der Laserstrahl mit Hilfe von Spiegeln im Scanning System entlang der Probe bewegt.^[77,111]

Mit dieser Technik gelingt auch die Aufnahme von dreidimensionalen Objekten. Dazu wird der Fokus durch die z-Ebene verschoben und in definierten Abständen wird ein Bild in x-y-Ebene aufgenommen. Die so erhaltenen optischen Schnitte eines Präparats können im Nachhinein unter Zuhilfenahme von spezieller Software wie z.B. *ImageJ* oder *Zen (Zeiss)* in ein dreidimensionales Bild umgewandelt werden. Als Detektoren werden hier meist Photomultiplier eingesetzt. Um Aufnahmen mit besonders hoher Auflösung zu erhalten, können bei der konfokalen Mikroskopie mehrere Parameter variiert werden. So kann die

Leistung des Anregungslasers eingestellt werden, sie sollte allerdings nicht zu hoch gewählt werden, da es sonst zum Photobleichen des Fluorophors kommen kann. Die Scangeschwindigkeit des Lasers und damit die Belichtungszeit pro Pixel kann variiert werden, je langsamer er die Probe abscannt, desto länger regt er jeden Punkt an, was zu einem höheren Signal am Detektor führt, aber auch zum Bleichen des Fluorophors führen kann. Auch die Verstärkung des Photomultiplieres kann angepasst werden um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Auch die Öffnung der Lochblende, durch die diskriminiert wird wieviel Signal außerhalb des Fokus zum Detektor gelangen darf, kann variiert werden. Um einen Bereich im Mikroskop zu suchen, ist es ratsam die Lochblende so weit wie möglich zu öffnen. Hat man den entsprechenden Bereich gefunden, sollte man zum Aufnehmen der optischen Schnitte die Lochblende stärker schließen, um eine gute Auflösung in der z-Ebene zu erhalten. Schließt man die Lochblende zu weit, gelang zu wenig Fluoreszenz zum Detektor. Aus diesen Beschreibungen wird bereits klar, dass diese Aufnahmetechnik sehr zeitintensiv ausfallen kann und somit nicht zur Untersuchung von sehr schnellen Prozessen geeignet ist. Aus diesem Grund ist auch eine zeitaufgelöste Messung mit diesem System nicht möglich. Für die zeitaufgelöste Messung wurde die Spinning-Disk-Technologie entwickelt, die in Abbildung 23 schematisch dargestellt ist. Sie basiert auf der gleichzeitigen Anregung vieler einzelner Punkte in der Probe durch eine Vielzahl von Lochblenden. Diese Lochblenden befinden sich auf einer sogenannten Nipkow-Scheibe und sind spiralförmig auf dieser angeordnet. Die Nipkow-Scheibe befindet sich in konjugierter Ebene zur Objektebene und wird homogen ausgeleuchtet. Es gibt auch Spinning-Disk-Systeme, in denen sich über dieser Scheibe eine weitere Scheibe befindet, die sogenannte Yokogawa-Scheibe, die über die gleichen Lochblenden verfügt, die aber jeweils mit einer Mikrolinse versehen sind. Diese beiden Scheiben drehen sich in gleicher Geschwindigkeit voneinander und werden durch eine Strahlaufweitung des Anregungslasers ausgeleuchtet. Dies dient dazu, dass viele Lochblenden gleichzeitig und homogen ausgeleuchtet werden.^[77,111]

Das Extinktionslicht (blau) wird durch die Mikrolinsen der ersten Scheibe in die Ebene der Nipkow-Scheibe fokussiert und gelangt dort durch die Lochblenden in das Präparat. Das dort erzeugte Emissionslicht (grün) gelangt durch die Lochblenden der ersten Scheibe hinter der sich ein Strahlteiler befindet, der das Emissionslicht in Richtung des Detektors lenkt.

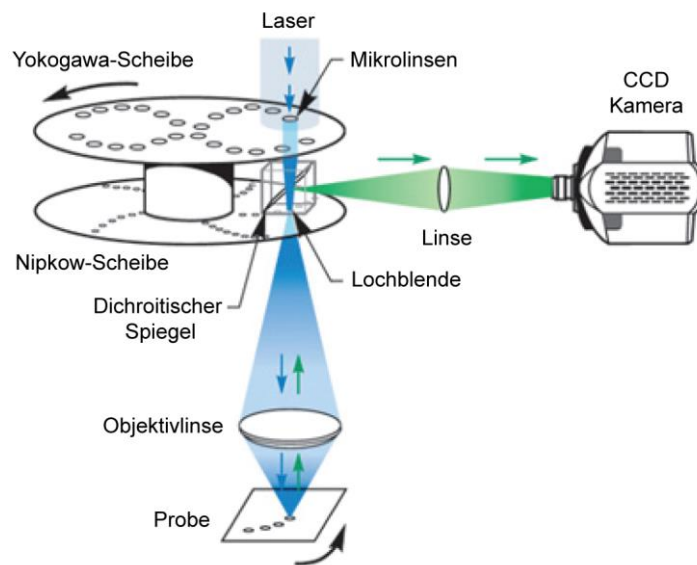


Abbildung 23: Schematische Darstellung eines Spinning-Disk-Systems. (Abbildung leicht modifiziert)^[114]

Als Detektoren werden hier CCD-Kameras eingesetzt um alle abgerasterten Punkte zweidimensional darzustellen. Durch diese Drehtechnik wird das gesamte Präparat innerhalb einer Scheibenumdrehung mehrfach vollständig aufgenommen. Dies hat den Vorteil, dass die Bilder sehr schnell aufgenommen werden, was die Beobachtung schneller Prozesse ermöglicht. Ein weiterer Vorteil gegenüber der konventionellen Laser-Scanning-Messung ist, dass der Laser sehr viel kürzer auf jedem Punkt verweilt und somit das Photobleichen deutlich minimiert ist. Von Nachteil ist, dass damit fluoreszierende Proben mit geringer Helligkeit ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen können und somit eine geringere Auflösung erreicht wird.^[77,111]

2. Zielsetzung

Die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen ermöglicht die Steuerung von zu untersuchenden Prozessen in biologischen Systemen. Ihr Einbau in Oligonukleotide kann dabei entweder Wechselwirkungen mit Proteinen oder mit anderen Oligonukleotiden inhibieren. Für die Anwendung im biologischen Milieu sollte die Photolyse der Schutzgruppen so bathochrom wie möglich erfolgen um das biologische System nicht zu schädigen. Am besten wäre eine Photolyse oberhalb von 600 nm, da Blut bis zu dieser Wellenlänge absorbiert. Um in diesen hohen Wellenlängenbereichen einen Bindungsbruch durch Bestrahlung zu verursachen, eignet sich die Zweiphotonen-Absorption. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist die größere Eindringtiefe ins Gewebe. Es existiert bereits eine Vielzahl von photolabilen Schutzgruppen, die durch Zweiphotonen-Bestrahlung angeregt werden und diese Energie in einen Bindungsbruch umwandeln können. Zu diesen Schutzgruppen gehören z.B. DEACM, NDBF und ANBP, von denen NDBF und DEACM bereits erfolgreich zur Schützen von Nucleobasen verwendet wurden. NDBF zeigte allerdings nur als Amin auf dA und dC eine ausreichend hohe Stabilität für den Einbau entsprechend geschützter Phosphoramidite mittels Festphasensynthese in Oligonukleotide. Deshalb wurde im Arbeitskreis ein NPP-analoges hNDBF-Derivat (h = homolog) synthetisiert und bereits als Schutzgruppe auf einem dG Phosphoramidit in Oligonukleotide eingebaut.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die entsprechende Synthese eines dT^{hNDBF}-Phosphoramidits, dessen Einbau in ein DNA-Oligonukleotid und die Charakterisierung des DNA-Oligonukleotids bezüglich Absorption, Quantenausbeute und Schmelzpunkt. Diese Charakterisierung sollte auch mit einem dG^{hNDBF}-modifizierten Oligonukleotid, das bereits von Dr. Cem Özçoban analysiert wurde, wiederholt werden, da sich gerade bei der Messung der Quantenausbeuten Verbesserungen in der Berechnung und der Analytik ergeben haben.

In einer Kooperation mit Prof. Dr. Alexandre Specht aus Straßburg, sollte die neue Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppe ANBP als Basenschutzgruppe für Oligonukleotide untersucht werden. Großes Ziel dabei war die Untersuchung auf Zweiphotonen-Ebene und darüber hinaus die Charakterisierung auf Einphotonen-Ebene.

In der Doktorarbeit von Dr. Florian Schäfer wurde bereits gezeigt, dass Oligonukleotide, die mit der photolabilen Schutzgruppe NDBF geschützt waren, unter Verwendung eines gepulsten IR-Lasers photolysiert werden konnten. Dabei wurden ein Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt δ_u mit Hilfe von HPLC-Analytik und MNI-Glutamat als Referenz bestimmt. Beim

anschließenden Versuch eine quadratische Abhängigkeit der Photolyse zur eingestrahlten Leistung zu erhalten, versagte die Messmethode der HPLC-Analyse, weshalb auch die ermittelten Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte in Frage gestellt wurden. Daraus ergab sich die Frage, wie glaubwürdige Zweiphotonen-Einfangquerschnitte von photolabil geschützten Oligonukleotiden bestimmt werden können. Das größte Problem der hier verwendeten Methode stellt wohl die Verwendung der HPLC dar. HPLC-Analysen haben eine Detektionsgrenze unterhalb derer keine quantitativen Aussagen über eine analysierte Probe gemacht werden können. Die Kombination aus einem Photolyseeffekt, der nur in einem sehr kleinen Bereich einer Probe stattfindet und der Analyse der kompletten Probe zur Bestimmung der Photolyseeffizienz scheint dabei nicht zielführend zu sein. Aus diesem Grund wurde nach einer sensitiveren Methode gesucht, mit deren Hilfe auch eine kleine Menge belichteter Probe detektiert werden kann. Eine geeignete Detektionsmethode stellt dabei die Messung einer Fluoreszenzzunahme dar, da Fluoreszenz sehr sensitiv detektierbar ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war primär einen Fluoreszenz-basierten-Assay zu entwickeln, mit dem gezeigt werden kann, dass photolabil geschützte DNA mit der Zweiphotonen-Technik photolysiert werden kann.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Dreuw der Universität Heidelberg wurden quantenmechanische Berechnungen zur Verbesserung des Zweiphotonen-Einfangquerschnitts des NDBF-Grundgerüsts durchgeführt. Dazu wurden neben verschiedenen Substituenten am NDBF in verschiedenen Positionen auch Veränderungen des Heteroatoms des Furans berechnet. Als eines der besten Ergebnisse resultierte ein 7-Dimethylamino-NDBF, dessen Zweiphotonen-Absorptionseigenschaften gegenüber dem unsubstituierten NDBF deutlich höher sein müssten.

Drittes Ziel dieser Arbeit war die Synthese des 7-Dimethylamino-substituierten NDBF-OH (DMA-NDBF-OH).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Synthese photolabil geschützter Oligonukleotide und deren Einphotonen-Charakterisierung

Der Arbeitskreis Heckel beschäftigt sich intensiv mit dem Einbau bekannter photolabiler Schutzgruppen an die Nukleobasen von DNA um die Hybridisierung mit Gegensträngen oder die Bindung an Proteine zeitlich kontrollieren zu können. Wie bereits in der Einleitung gezeigt wurde, konnten so interessante Anwendungen realisiert werden. Dazu gehören unter anderem die miRNA-Regulation über photolabil geschützte AntimiRs^[15], die mRNA-Regulation über photolabil geschützte siRNA^[18] oder die Regulation der G-Quadruplex-Bildung durch photolabile Schutzgruppen, die wiederum die Thrombin-Aktivität reguliert.^[115] In all diesen Anwendungen ist es wichtig, dass durch den Einbau der photolabilen Schutzgruppe die Wechselwirkungen mit der komplementären Sequenz oder die Bildung einer Sekundärstruktur unterbunden werden kann. Ein großes Interesse liegt weiterhin in der Realisierung von wellenlängenselektiven Photolyse-Szenarien, wozu photolabile Schutzgruppen mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima benötigt werden. So konnte die NDBF-Schutzgruppe einer dC^{NDBF}-geschützte DNA in Gegenwart einer dC^{NPE}-geschützten DNA sequentiell abgespalten werden.^[38] Auf gleiche Weise erfolgte die Abspaltung einer DEACM-Schutzgruppe von dG^{DEACM}-geschützter DNA in Anwesenheit einer dG^{NPP}-geschützten DNA.^[39]

NDBF stellt eine interessante Schutzgruppe dar, da sie wie bereits beschrieben als NPE-Derivat über ein verlängertes π -System verfügt, was zum einen eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums hervorruft, zum anderen aber auch eine höhere Photolyseeffizienz aufgrund des höheren Extinktionskoeffizienten aufweist. Erstmals wurde diese Schutzgruppe von Ellis-Davies beschrieben und zur Schützung von EGTA, einem Ca²⁺-Chelator, eingesetzt. Neben den hervorragenden Einphotonen-Eigenschaften, konnten Ellis-Davies *et al.* NDBF auch für Zweiphotonen-Entschützungen einsetzen. Der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt von NDBF wird mit 0.6 GM angegeben und ist somit 5-mal höher als bei der vielfach eingesetzten MNI-Schutzgruppe. Eine verbesserte Syntheseroute des NDBF wurde von Deiters *et al.* publiziert. Anwendung findet NDBF in dieser Studie aber nur als Schutzgruppe eines dT-Nukleosides, dass allerdings nicht in eine DNA eingebaut wurde. Die Vermutung liegt nahe, dass die Synthese des modifizierten Strangs an der Ammoniak-

Abspaltung scheiterte. Genau diese Basenlabilität wurde von unseren Arbeitsgruppenmitgliedern Dr. Timo Mack und Dr. Maximilian Buff, beim Versuch DNA-Stränge, die mit NDBF-geschützte dG- und dT-Modifikationen versehen waren, mit Ammoniak von den persistenten Schutzgruppen zu befreien, beobachtet.^[116,117] Der Einbau des NDBF-Amins als Basen-Schutzgruppe von dC und dA konnte erfolgreich von Dr. Florian Schäfer durchgeführt werden, da durch die Bindung über ein Amin keine Abspaltung der Schutzgruppe mittels Ammoniak erfolgte.^[38,118] Dr. Timo Mack hat im Rahmen seiner Doktorarbeit^[116] aus diesem Grund einen NPP-analogen Baustein der NDBF-Schutzgruppe hergestellt, das hNDBF (homo-NDBF). Aufgrund der zusätzlichen Methyleinheit sollte diese eine höhere Stabilität gegenüber Nukleophilen aufweisen. Dr. Cem Özçoban konnte im Rahmen seiner Diplomarbeit^[119] erstmals erfolgreich ein dG-Nukleosid mit hNDBF-OH schützen und in eine DNA einbauen. Auch erfolgten erste Messungen der Absorption, der Schmelzpunktniedrigung und der Quantenausbeute. In meiner Masterarbeit^[120] zeigte sich beim Versuch diesen Strang mit höheren Wellenlängen zu photolysieren, dass bei der Auswertung des Photolyse-Verlaufs mittels HPLC-Chromatogramm, die Integration der Edukt-Peaks zu sehr schwankenden Werten führte. Durch Verwendung eines internen Standards konnten deutlich reproduzierbarere Ergebnisse erhalten werden. Beim Überarbeiten der Art der Messung von Quantenausbeuten, die bis zu diesem Zeitpunkt im Arbeitskreis durchgeführt wurden, konnte Dr. Florian Schäfer Fehler aufdecken, die es nötig machten die Quantenausbeuten des dG^{hNDBF}-, dT^{NPP}- und dG^{NPP}- modifizierten Strangs zu wiederholen. Diese Messungen sind Teil dieser Arbeit.

Um das Set der NDBF-geschützten Bausteine zu vervollständigen, war es Ziel dieser Arbeit auch dT mit hNDBF zu schützen und anschließend eine Charakterisierung der erhaltenen DNA durchzuführen. Dazu gehören Bestimmung der Quantenausbeute, Messung des Schmelzpunkts, Messung der Absorption und Versuche zum wellenlängenselektiven Entschützen des hNDBF in Anwesenheit von NPP.

3.1.1. Synthese des dT^{hNDBF}-Phosphoramidits

Die Synthese des Bausteins erfolgte nach einer bekannten Route des Arbeitskreises.

Der TBDMS-geschützte und Triazol-aktivierte Desoxythymidinbaustein, der bereits als Vorrat im Arbeitskreis existierte, wurde in einer nukleophilen Substitution mit dem hNDBF-Alkohol und DBU als Hilfsbase in Acetonitril innerhalb von 96 h mit 71% Ausbeute zum Baustein **34** umgesetzt. Die anschließende Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen erfolgte quantitativ zu Verbindung **35** durch Zugabe von 1M TBAF-Lösung in THF und Essigsäure innerhalb von 16 h. Der Alkohol an der 5'-Position des Zuckers wurde mit DMTrCl in Pyridin mit einer

Ausbeute von 79% geschützt. Den letzten Syntheseschritt stellt die Umsetzung zum Phosphoramidit dar. Durch Zugabe von 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphamidit und DIPEA als Hilfsbase in DCM konnte das Phosphoramidit **37** mit einer Ausbeute von 55% erhalten werden.

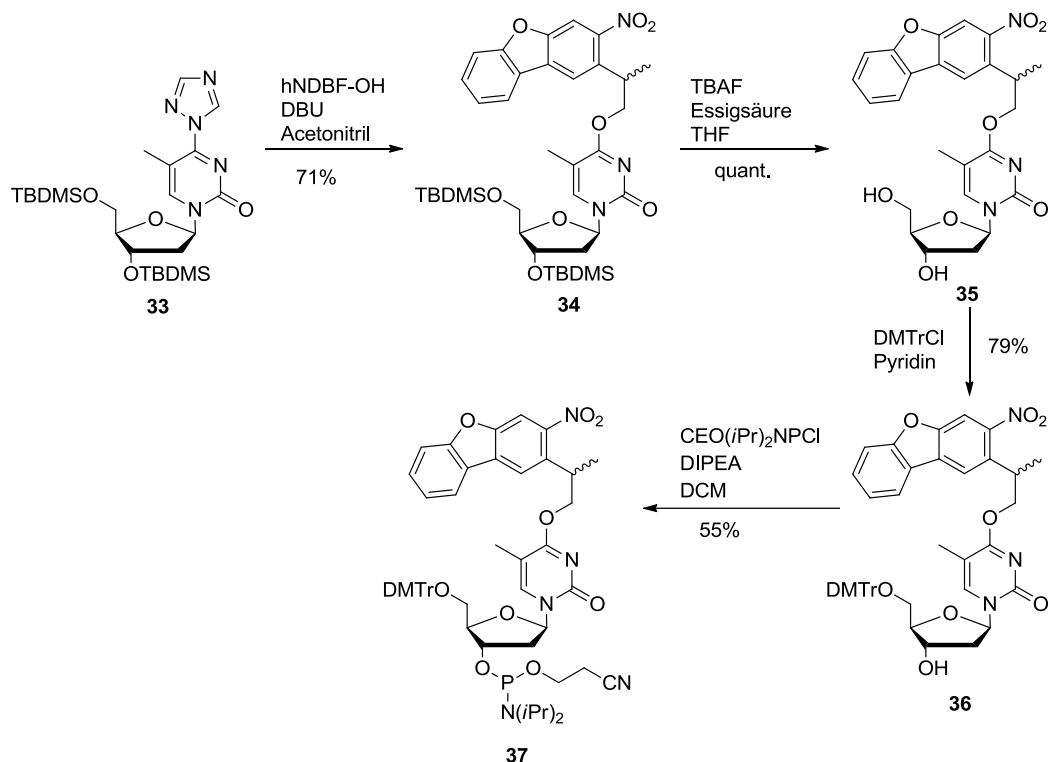


Abbildung 24: Übersicht der Synthese von Verbindung **37** ausgehend vom TBDMS-geschützten und Triazol-aktivierten Baustein **33**.

3.1.2. Synthese des dG^{ANBP} -Phosphoramidits

In Kooperation mit der Gruppe von Alexandre Specht aus Straßburg wurde versucht die vielversprechende Zweiphotonen-sensitive Schutzgruppe ANBP in DNA einzubauen. ANBP wurde bereits erfolgreich zum Schützen u.a. von Neurotransmittern verwendet und konnte einen Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt von 11 GM liefern.^[44]

Ziel war es die erhaltene ANBP-geschützte DNA bezüglich Quantenausbeute, Absorption und Schmelzpunkt zu charakterisieren. Des Weiteren sollte mit dem zu etablierenden Assay auch die Zweiphotonen-Photolyse des DNA-Strangs gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.2).

Die Synthese des Phosphoramidits erfolgte nach den im Arbeitskreis etablierten Arbeitsschritten. Mit Hilfe einer Mitsunobu Reaktion wurde die photolabile Schutzgruppe

ANBP-OH **39** an ein zuvor TBDMS und *iPr*-Pac geschütztes Desoxyguanosin **38** geknüpft. Durch Zugabe von Triphenylphosphin und DEAD in THF, konnte Verbindung **40** in einer Ausbeute von 80% erhalten werden. Mittels TBAF-Lösung wurden die TBDMS-Schutzgruppen mit einer Ausbeute von 80% abgespalten. Dem Lösungsmittel THF wurde Essigsäure zugegeben, um die Nukleophilie der Fluoridionen herabzusetzen und eine mögliche Abspaltung der *iPr*-Pac-Schutzgruppe zu vermeiden. Im Anschluss folgte die DMTr-Schätzung des 5'-Alkohols mit DMTrCl in Pyridin mit 72% Ausbeute von Verbindung **42**. Die Überführung ins Phosphoramidit **43** wurde durch Zugabe von 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit und DIPEA in DCM mit 62% Ausbeute erreicht.

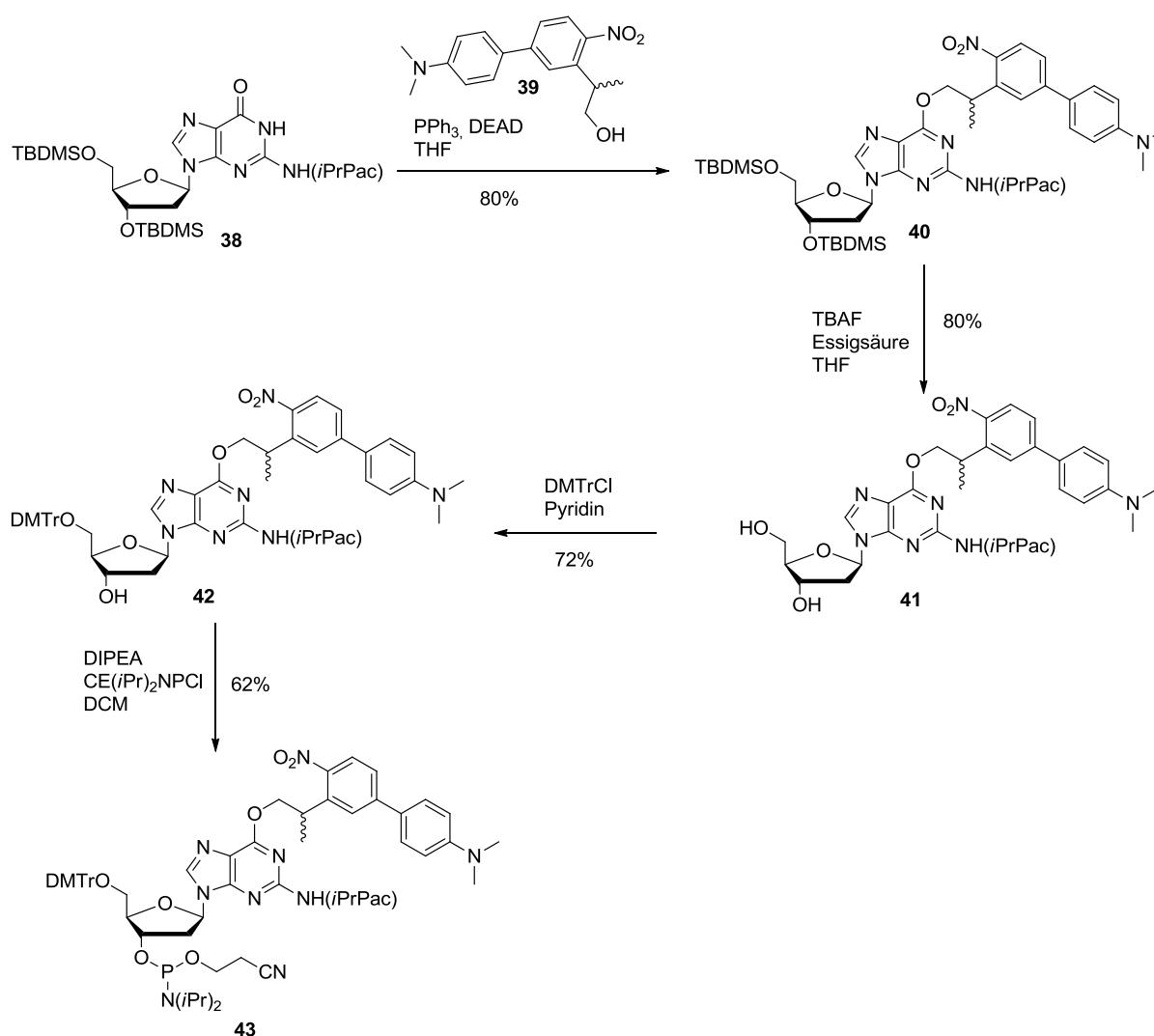


Abbildung 25: Übersicht der Synthese von Verbindung **43** ausgehend von Verbindung **38**.

3.1.3. Charakterisierung der photolabil geschützten Oligonukleotide

Die beiden beschriebenen Phosphoramidite wurden in die Mitte der sogenannten Benchmark-Sequenz eingebaut, die im Arbeitskreis Heckel in verschiedenen Studien^[35,38,39,121,122] verwendet wurde, um die Eigenschaften der photolabilen Schutzgruppen besser miteinander vergleichen zu können. Die hier verwendeten Sequenzen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 Übersicht der für dieses Projekt synthetisierten Sequenzen.

*Diese Sequenzen wurden für die Messung der Quantenausbeute und der Absorptionsspektren von Dr. Cem Özçoban zur Verfügung gestellt.

Name	Sequenz
DNA1 ^{T_hNDBF}	GCA TAA AT ^{hNDBF} A AAG GTG
DNA2 ^{T_NPP *}	GCA TAA AT ^{NPP} A AAG GTG
DNA3 ^{G_hNDBF}	GCA TAA AG ^{hNDBF} A AAG GTG
DNA4 ^{G_NPP *}	GCA TAA AG ^{NPP} A AAG GTG
DNA5 ^{G_ANBP}	GCA TAA AG ^{ANBP} A AAG GTG

DNA2^{T_NPP} und **DNA4**^{G_NPP} wurden von Dr. Cem Özçoban synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die Synthese der **DNA1**^{T_hNDBF}, **DNA3**^{G_hNDBF} und **DNA5**^{G_ANBP} erfolgten an einem ABI Synthesizer im DMTr-On Modus. Dies erleichtert die Abtrennung des Volllängenproduktes von den Abbruchsequenzen mittels HPLC. Zur Abspaltung der DNA von der festen Phase wurde Ammoniak für 16 h verwendet. An sich sind auch kürzere Abspaltungszeiten möglich, da diese allerdings höhere Temperaturen bedingen, wurde sich bewusst dagegen entschieden, um mögliche thermische Abspaltungen zu vermeiden. Die neuen photolabilen Schutzgruppen hNDBF und ANBP zeigen dabei ausreichende Basenstabilität, so dass nahezu keine Abspaltungsprodukte entstanden.

Um abschätzen zu können, wie groß der destabilisierende Einfluss einer einzelnen photolabilen Schutzgruppe ist, wird der Schmelzpunkt des photolabilen Strangs mit einem unmodifizierten Gegenstrang gemessen. Dazu wird der Duplex im UV-Vis-Spektrophotometer in mehreren Zyklen über einen kontinuierlichen Gradienten erhitzt und abgekühlt und dabei die Absorptionsänderung bei einer definierten Wellenlänge gemessen. Liegen die Stränge als Duplex vor, ist deren Absorption geringer als die der dissoziierten Einzelstränge. Eine Schmelzkurve weist einen sigmoidalen Kurvenverlauf auf, an dessen Wendepunkt der Schmelzpunkt der Probe liegt.

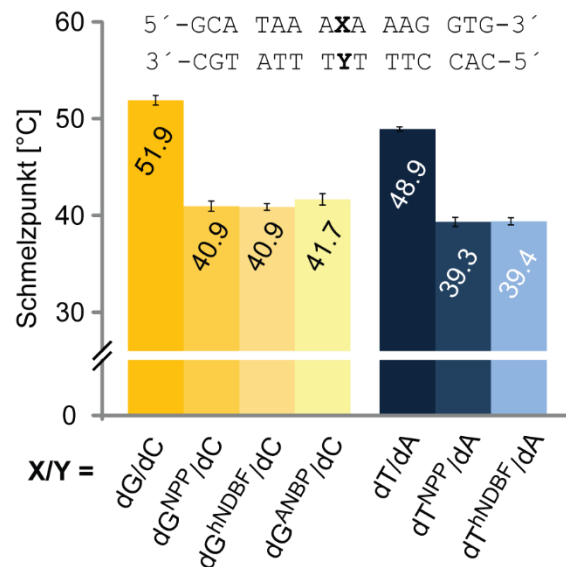


Abbildung 26: Auftragung der Schmelzpunkte verschiedener modifizierter und unmodifizierter DNA-Stränge. Die Schmelzpunkte der unmodifizierten Stränge, der **DNA2^{T-NPP}**, **DNA4^{G-NPP}** und **DNA3^{G-hNDBF}** wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit gemessen und sind hier nur zu Vergleichszwecken aufgetragen.

In Abbildung 26 sind neben den hier neu vermessenen Strängen **DNA1^{T-hNDBF}** und **DNA5^{G-ANBP}** auch die Schmelzpunkte von **DNA2^{T-NPP}**, **DNA3^{G-hNDBF}** und **DNA4^{G-NPP}** und der unmodifizierten Stränge aufgetragen, um den Destabilisierungseffekt vergleichen zu können. Zu sehen ist, dass sich der Schmelzpunkt der **DNA1^{T-hNDBF}**, **DNA3^{G-hNDBF}** und **DNA5^{G-ANBP}** praktisch nicht von denen der NPP-geschützten Stränge **DNA2^{T-NPP}** und **DNA4^{G-NPP}** unterscheidet. Interessanterweise zeigte sich bei den dC^{NDBF}- und dA^{NDBF}-modifizierten Strängen im Vergleich zu den entsprechend NPE-geschützten Sequenzen eine weitere Destabilisierung. Warum bei hNDBF keine weitere Destabilisierung auftritt, lässt sich vermutlich auf die weitere Methylen-Gruppe zurückführen, durch die hNDBF eine höhere Flexibilität aufweist. Durch die geringere Starrheit hat hNDBF wahrscheinlich die Möglichkeit sich stärker aus dem Duplex drehen und so einen geringeren Effekt auf die Destabilisierung auszuüben. Bei weiteren im Arbeitskreis untersuchten Schutzgruppen wie pHP, NPOM oder DEACM zeigte sich, dass auch diese Schmelzpunkte sich nicht stark von den hier gezeigten unterscheiden. Es scheint also ein Limit der Destabilisierung durch den Einbau von photolabilen Schutzgruppen zu geben.

Neben einer starken Schmelzpunkterniedrigung sollte eine gute photolabile Schutzgruppe für Oligonukleotide so bathochrom wie möglich verschoben absorbieren, um bei biologischen Anwendungen die Umgebung nicht zu schädigen. Ein weiterer Vorteil von bathochrom verschobenen Schutzgruppen ist ihr möglicher Einsatz in wellenlängenselektiven Ansätzen

zusammen mit hypsochrom absorbierenden Schutzgruppen. In Abbildung 27 sind die Absorptionsspektren der Stränge **DNA1^{T_hNDBF}**, **DNA2^{T_NPP}**, **DNA3^{G_hNDBF}**, **DNA4^{G_NPP}** und **DNA5^{G_ANBP}** und der entsprechenden unmodifizierten Strängen abgebildet. Für den Bereich oberhalb von 300 nm wurde die vermessende Probe 10fach höher konzentriert, um die Absorption der Schutzgruppe besser sehen zu können. Gut zu sehen ist, dass die Maxima der NPP-modifizierten Stränge unterhalb der DNA-Absorption liegen, weshalb zum Photolysieren in die Flanke bei 365 nm eingestrahlt wird. Dies reicht aus, um die Schutzgruppe abzuspalten.

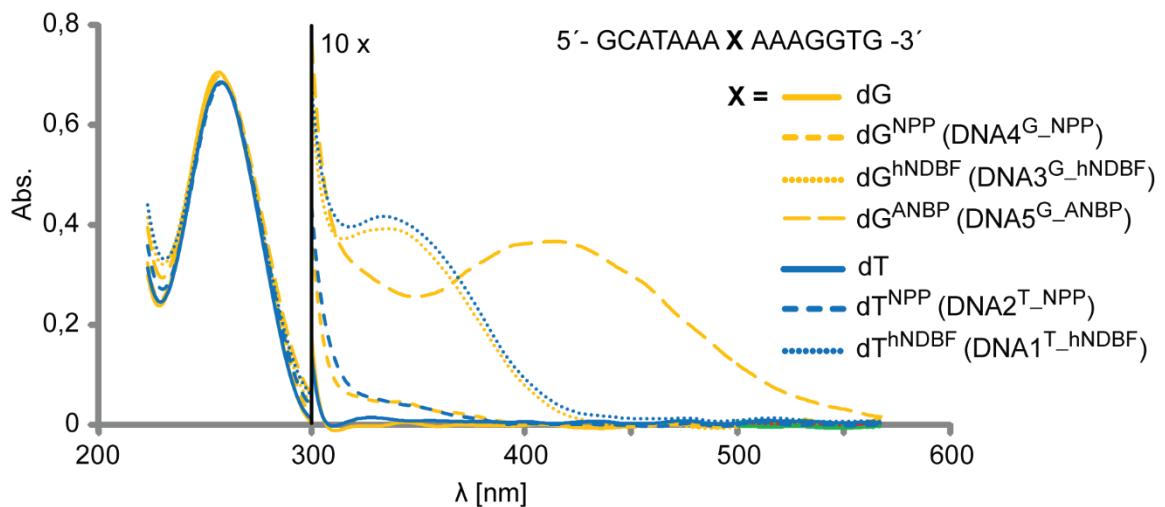


Abbildung 27: Absorptionsspektren der nativen Benchmarksequenz und der mit NPP, hNDBF und ANBP geschützten Benchmarksequenzen.

Die Spektren der **DNA1^{T_hNDBF}** und **DNA3^{G_hNDBF}** zeigen eine deutlich bathochrom verschobene Absorption gegenüber den Strängen **DNA2^{T_NPP}** und **DNA4^{G_NPP}**. Das Absorptionsmaximum liegt bei ca. 335 nm. Somit ist anzunehmen, dass bei der üblichen Photolyse-Wellenlänge von 365 nm durch den höheren Extinktionskoeffizient auch die Abspaltungsgeschwindigkeit höher sein sollte. Da die Absorption bis ca. 430 nm verläuft, sollte auch die Abspaltung mit einer Wellenlänge oberhalb von 400 nm möglich sein.

Eine noch stärkere Rotverschiebung weist die **DNA5^{G_ANBP}** auf, die im Bereich von 365 nm eher ein lokales Minimum aufweist. Das Absorptionsmaximum liegt bei ca. 410 nm, wobei das Maximum sehr breit gezogen ist. Erstaunlich ist die breite Absorption bis ca. 560 nm, was eine Belichtung und daraus resultierende Photolyse oberhalb von 500 nm realisierbar machen könnte.

Die Aussage der Absorption ist zwar ein erstes Indiz für die Abspaltungswellenlängen der Schutzgruppen, allerdings sagt sie alleine nur teilweise etwas über die Photolyse-Effizienz einer photolabilen Schutzgruppe aus. Neben dem Extinktionskoeffizient ist auch die Photolyse-

Quantenausbeute einer photolabilen Schutzgruppe wichtig und die Photolyse-Effizienz wird mit dem Produkt der beiden beschrieben.

Die Quantenausbeute gibt an wie viele der absorbierten Photonen in den Photolyse-Reaktionspfad münden. Für die genaue Bestimmung der Quantenausbeute wird die Menge der von der Probe absorbierten Photonen benötigt. Diese lässt sich über die bekannte DMNB Aktinometrie bestimmen, durch Bestrahlung des DMNB mit der gleichen Beleuchtungsquelle und derselben Küvette. Die DMNB-Probe wird nach jeder Bestrahlung im UV-Vis-Spektrophotometer vermessen. Durch die Änderung der Absorption lässt sich die DMNB-Abnahme ermitteln und durch dessen bekannte Quantenausbeute die Menge an emittierten Photonen bestimmen. Im Anschluss kann die photolabil-geschützte DNA mit unterschiedlichen Zeitintervallen belichtet werden. Durch vorherige Zugabe eines internen Standards, kann bei der anschließenden HPLC-Analytik die Abnahme des Edukts ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen werden. Durch Fitten dieses Kurvenverlaufs und dessen Ableitung nach t_0 erhält man für $x=0$ die Anfangssteigung, die eine Aussage über die Abnahme des Edukts über die Zeit macht.

Nach der folgenden Formel erhält man dann die Quantenausbeute der zu messenden Probe.^[118]

$$\varphi = \frac{\Delta n_s}{n_p \cdot A_{rel}} \quad (3.1)$$

dabei steht φ für die Quantenausbeute, Δn_s für die Abnahme des Edukts, n_p für die Anzahl Photonen und A_{rel} für die relative Absorption.

In Tabelle 3 sind die Extinktionskoeffizienten, die Quantenausbeuten und die Produkte aus beiden Parametern der photolabil geschützten Benchmarksequenzen aufgelistet.

Tabelle 3 Extinktionswerte und Quantenausbeuten der verschiedenen modifizierten Benchmarksequenzen.

DNA	ϵ (365 nm) [M ⁻¹ cm ⁻¹]	φ	$\epsilon \cdot \varphi$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
DNA4 ^G _{NPP}	625	0.16	102
DNA3 ^G _{hNDBF}	7360	0.06	431
DNA5 ^G _{ANBP}	7009	0.003	24
DNA2 ^T _{NPP}	513	0.23	118
DNA1 ^T _{hNDBF}	7953	0.06	450

Wie bereits aus den Absorptionsspektren ersichtlich, ist der Extinktionskoeffizient bei 365 nm bei **DNA1^{T-hNDBF}**, **DNA3^{G-hNDBF}** und **DNA5^{G-ANBP}** mehr als 10fach so hoch wie bei den entsprechenden NPP-Analogen-Strängen **DNA2^{T-NPP}** und **DNA4^{G-NPP}**. Bemerkenswert ist allerdings, dass die Quantenausbeute von **DNA1^{T-hNDBF}** und **DNA3^{G-hNDBF}** weniger als halb so hoch ist und von **DNA5^{G-ANBP}** sogar mehr als 50-mal niedriger ist. Dank der hohen Absorption weisen die hNDBF-geschützten Stränge **DNA1^{T-hNDBF}**, **DNA3^{G-hNDBF}** immerhin noch eine 4fach effizientere Photolyse auf, als die NPP-geschützten Stränge **DNA2^{T-NPP}** und **DNA4^{G-NPP}**. Die **DNA5^{G-ANBP}** kann trotz eines hohen Extinktionskoeffizienten nur eine 4fach schlechtere Photolyseeffizienz vorweisen, was diese Schutzgruppe für Anwendungen im Einphotonen-Bereich voraussichtlich eher weniger brauchbar macht. Dabei muss natürlich berücksichtigt werden, dass die Messungen nicht am Absorptionsmaximum des ANBPs gemacht wurden, weshalb bei Verwendung von höheren Wellenlängen die Photolyseeffizienz insgesamt etwas höher ausfallen könnte. Dabei sollte aber nicht unberücksichtigt bleiben, dass für die Photolyse der NPP-Schutzgruppen die Einstrahlung in die Absorptionsflanke der Schutzgruppe reicht, um die oben gezeigten Photolyseeffizienzen zu erzielen.

Bei den Photolysen für die Quantenausbeuten zeigte sich bei den hNDBF-geschützten Strängen sehr viel Nebenprodukt bei der HPLC-Analytik, welches sich durch Licht nicht weiter umsetzen lässt. Dieses Phänomen ist bereits bei früheren Studien zu NPP-geschützten Oligonukleotiden aufgetaucht. Dort wurde die pH-abhängige Bildung eines Nitroso-Produktes (siehe Abbildung 3) postuliert und zu Beweis Zwecken, die Photolyse im basischen Milieu durchgeführt. Wie erwartet wurde dort das Nebenprodukt nicht gebildet.^[11] Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von hNDBF zu NPP liegt es nahe, dass auch hier die Bildung des entsprechenden Nitroso-Nebenproduktes auftritt. Deshalb wurden auch 3 Proben von **DNA1^{T-hNDBF}** zum Vergleich mittels HPLC analysiert. Eine Probe wurde nicht belichtet, eine bei pH 7.4 und eine bei pH 12 belichtet. Das Ergebnis ist in Abbildung 28 zu sehen.

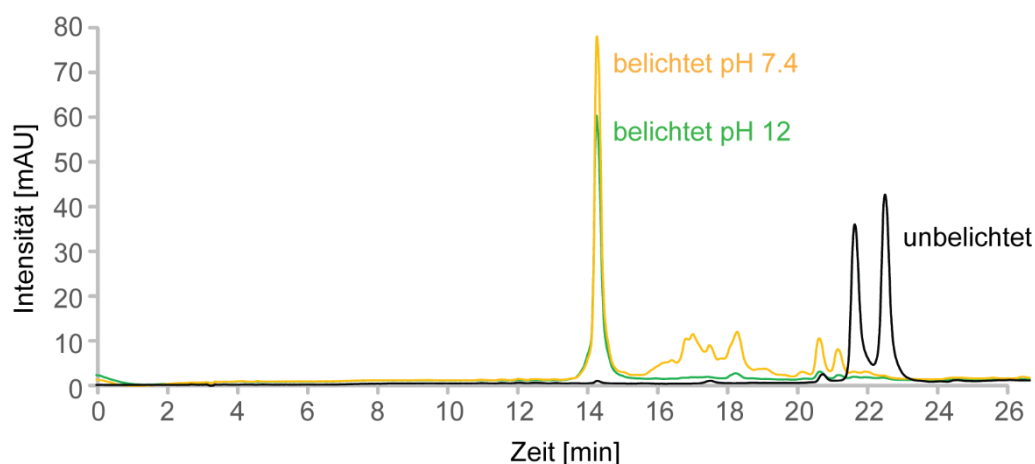


Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm von **DNA1^T-hNDBF** unbelichtet (verwendet wurde das Diastereomergemisch), sowie die Chromatogramme nach der Belichtung von **DNA1^T-hNDBF** bei pH 7.4 (gelb) und pH 12 (grün).

Beim üblicherweise verwendeten pH-Wert von 7.4 (PBS-Puffer) in Gelb sind zwischen dem Produktpeak bei ca. 14 min und dem Peak der unbelichteten Probe bei ca. 22 min mehrere Peaks zu erkennen, die auf Nebenprodukte hindeuten. Wurde der pH-Wert vor dem Belichten der Probe allerdings auf pH 12 (grün) eingestellt, zeigte sich nach der Belichtung nur der Produktpeak bei ca. 14 min. Um genau zu bestimmen welche Nebenprodukte bei der Photolyse generiert werden, müssten die entsprechenden Peaks in größerer Menge gesammelt werden und weiter analysiert werden. Darauf wurde hier allerdings verzichtet, da die Ergebnisse der HPLC-Analyse den Ergebnissen der NPP-Schutzgruppe entsprachen. Leider spricht die Tendenz zur Bildung von Nebenprodukten nicht für die breite Einsetzbarkeit dieser Proben, da so ein Teil der Proben durch Belichtung nicht freigesetzt werden kann. Bereits bei der Beschreibung der Absorptionsspektren in Abbildung 27 wurde auf die Rotverschiebung der Spektren hingewiesen. Interessant ist also, ob sich die hNDBF bzw. ANBP Schutzgruppen auch tatsächlich mit höheren Wellenlängen abspalten lassen. Dies hätte gerade für biologische Anwendungen den enormen Vorteil, dass zum einen weniger Zellschäden auftauchen würden, aber auch Bereiche adressiert werden könnten, die selbst bei niedrigen Wellenlängen absorbieren. Weiterhin gibt es die Möglichkeit, dass durch geeignete Schutzgruppen und Abspaltungswellenlängen eine wellenlängenselektive Abspaltung einer Schutzgruppe in Anwesenheit der anderen realisierbar ist. Diese Wellenlängenselektivität ermöglicht es beispielsweise, zwei Stränge mit unterschiedlichen Schutzgruppen in einem Organismus nacheinander freizusetzen. Dabei könnte der zuerst freigesetzte Strang die Bindung an biologisch funktionelle Einheiten blockieren. Verfügt der zweite kurzweiliger zu entschützende Strang über die Gegensequenz des ersten, kann der

zweite den ersten absättigen und somit die zuvor blockierte Funktion wieder freisetzen. Eine entsprechende Anwendung wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht untersucht, sondern nur, ob sich Schutzgruppen bathochrom verschoben abspalten lassen.

Als erstes wurden die Stränge **DNA1^{T-hNDBF}** und **DNA3^{G-hNDBF}** einzeln in einer Küvette mit einer 405 nm-LED belichtet. Die belichteten Proben wurden wie oben beschriebenen mit einem internen Standard versetzt und nach Belichtung per HPLC analysiert. Parallel dazu wurden auch die entsprechenden NPP geschützten Stränge **DNA2^{T-NPP}** und **DNA4^{G-NPP}** bei gleichen Bedingungen belichtet. Dabei zeichnete sich ab, dass die hNDBF-Schutzgruppen deutlich schneller abgespalten werden konnten. Deshalb wurden im Anschluss jeweils **DNA1^{T-hNDBF}** und **DNA2^{T-NPP}** bzw. **DNA3^{G-hNDBF}** und **DNA4^{G-NPP}** in ein und dieselbe Probe mit internem Standard pipettiert. Die anschließende Detektion nach der Photolyse ist möglich, da die Retentionszeiten der hNDBF-geschützten Stränge deutlich höher sind, als die der NPP-geschützten Stränge und diese wiederum höher als die Retentionszeit des photolysierten Produkts (siehe Abbildung 29).

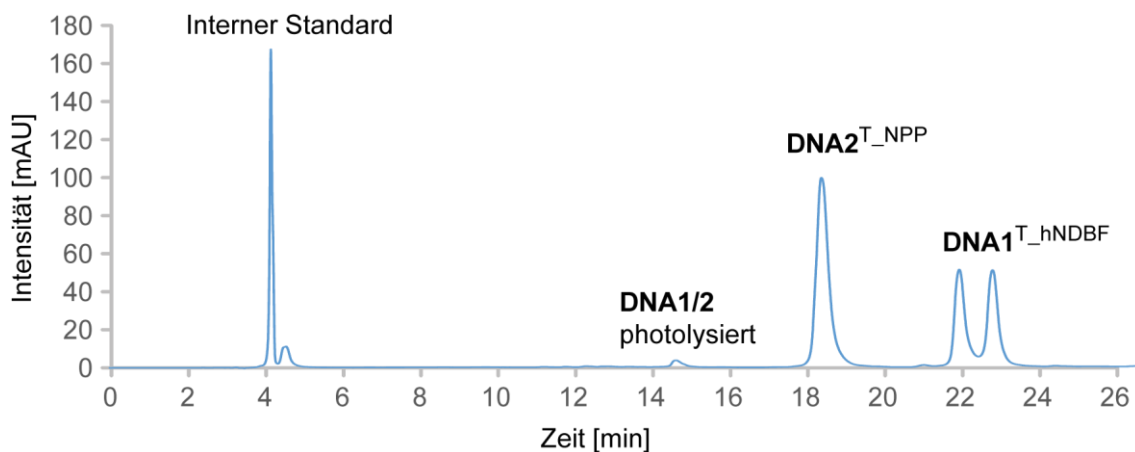


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm der Mischung aus **DNA1^{T-hNDBF}** und **DNA2^{T-NPP}** mit Internem Standard.

In Abbildung 30 ist die Abnahme des jeweiligen Strangs gegen die Zeit aufgetragen. Jede Messung wurde allerdings nur einmal durchgeführt. Trotzdem stellen die Kurvenverläufe ein interpretierbares Ergebnis dar.

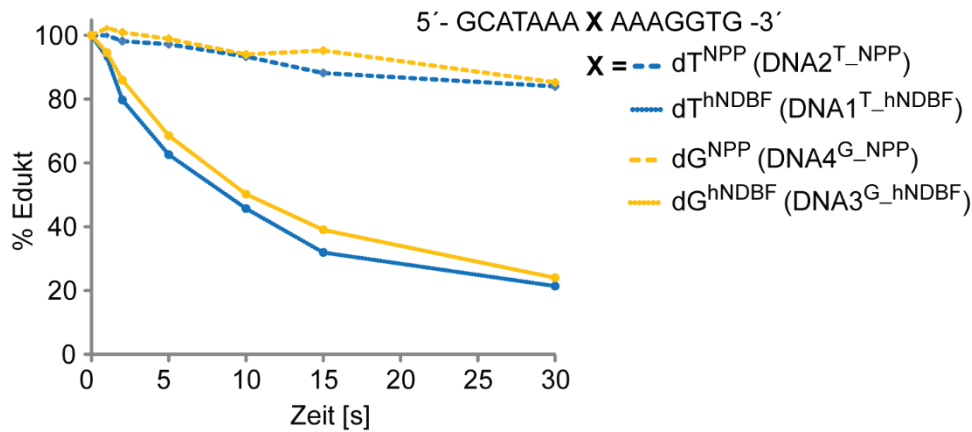


Abbildung 30: Wellenlängenselektive Abspaltung der hNDBF Schutzgruppen in Anwesenheit der NPP-geschützten DNA-Stränge bei 405 nm.

Nach 30 minütiger Belichtung sind nur noch etwa 30% der hNDBF-geschützten Stränge **DNA1^{T_hNDBF}** und **DNA3^{G_hNDBF}** intakt, wogegen die NPP-geschützten Stränge **DNA2^{T_NPP}** und **DNA4^{G_NPP}** noch etwa zu 90% geschützt vorliegen. Auch bei längerer Belichtung der Proben, werden die hNDBF-geschützten Oligonukleotide nicht vollständig entschützt, da die Belichtung in einer Küvette stattfand und diese ein Totvolumen hat, das ungefähr 15 bis 20 % der Probe entspricht. Von der Aussage ähneln die Ergebnisse aber den erfolgreichen wellenlängenselektiven Abspaltungen, die bereits (Dr. Florian Schäfer) für NDBF-geschützte Benchmarksequenzen und parallel (Dr. Clara Menge) zu dieser Arbeit für ein dG^{DEACM} modifiziertes Oligonukleotid durchgeführt und publiziert wurden. Da diese Studien bereits veröffentlicht waren, erschienen die hier erzielten Resultate alleine als nicht ausreichend für eine vergleichbare Publikation. Deshalb sollten diese Ergebnisse zusammen mit Zweiphotonen-Experimenten veröffentlicht werden. Dazu mehr in Abschnitt 3.2.

Da **DNA5^{G_ANBP}** eine so stark rotverschobene Absorption aufweist, lag hier das Interesse primär darauf, ob sich ANBP tatsächlich mit entsprechend hohen Wellenlängen abspalten lässt. Dazu wurden Proben mit **DNA5^{G_ANBP}** mit den im Arbeitskreis verfügbaren LEDs zwischen 505 und 420 nm belichtet.

LED [nm]	Ergebnis
505	✗
470	✗
440	✓
420	✓

Anders als erwartet zeigt ANBP bei 470 und 505 nm keinerlei Photolyse, obwohl die Belichtungszeit 15 bzw. 10 min betrug und die verwendete LED-Leistung auf das jeweilige Maximum gesetzt wurde. Erst bei 440 nm konnte die ANBP Schutzgruppe von **DNA5^{G-ANBP}** abgespalten werden. Nun stellt sich die Frage, warum die Anregung bei den hohen Wellenlängen nicht zur Photolyse führt. Wenn man sich die Absorption von **DNA5^{G-ANBP}** nochmal genau anschaut und sie mit den anderen Schutzgruppen vergleicht, fällt auf, dass die Absorptionsbande sehr breit ist und dass das Maximum ein sehr breites Plateau zeigt. Die Annahme liegt nahe, dass diese breite Absorptionsbande das Resultat aus mehreren Banden ist. Dementsprechend führt das Einstrahlen in den Bereich um 500nm zwar zu einer elektronischen Anregung. Es scheint jedoch so, dass es sich um einen elektronisch angeregten Zustand handelt, aus dem heraus kein Bindungsbruch erfolgt. Dies würde erklären, warum die Abspaltung der Schutzgruppe erst mit 440 nm erfolgt. Um diese These zu bestätigen müssten weitere spektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden, die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht erfolgten.

3.1.4. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieses Projekts war die Synthese der Phosphoramidite dT^{hNDBF} und dG^{ANBP} , deren Einbau in Oligonukleotide und die Charakterisierung bezüglich Schmelzpunkten, Absorption und Quantenausbeuten und deren wellenlängenselektiven Photolyse-Eigenschaften.

Die Synthese des dT^{hNDBF} -Phosphoramidit erfolgte mit 31% über 4 Stufen. Auch die Synthese des dG^{ANBP} gelang mit 29% über 4 Stufen. Beide Phosphoramidite konnten erfolgreich in Oligonukleotide der sogenannten Benchmark-Sequenz eingebaut werden. Bei der Abspaltung der persistenten Schutzgruppen zeigten beide Schutzgruppen ausreichende Ammoniak-Stabilität. Bei der Messung der Schmelzpunkte ergab sich für **DNA1^{T-hNDBF}** ein Schmelzpunkt von 39.4 °C und für **DNA5^{G-ANBP}** ein Schmelzpunkt von 41.7 °C. Beide Schmelzpunkte unterscheiden sich nur minimal von den entsprechenden NPP-geschützten DNA-Strängen. Die Destabilisierung des Duplexes beträgt ungefähr 10 °C im Vergleich zum unmodifizierten Strang. Die Schmelzpunkt-Studien dieser Derivate und auch weiterer photolabiler Schutzgruppen auf DNA-Basen, wie DEACM, NVOC oder pHP, die in unserer Gruppe vermessen wurden, lieferten die Erkenntnis, dass der Einbau immer größerer Schutzgruppen die Destabilisierung des Duplexes kaum beeinflusst. Aus diesem Grund werden zur Zeit zwei Konzepte verfolgt, um die Destabilisierung des Duplexes zu erhöhen. Dean Klötzner und Yvonne Becker arbeiten an NPE-Varianten, an denen die Methyl-Gruppe durch größere Substituenten ersetzt wird, um zu überprüfen, ob dieser Ansatz den destabilisierenden Effekt

der Schutzgruppen erhöht. Mit einem ähnlichen Vorhaben konnte Patrick Seyfried bereits zeigen, dass durch Ersatz der Methylgruppe am NPE gegen einen Alkinlinker und daran angebrachten sperrigen Resten über Click-Reaktionen eine weitere Destabilisierung erzielt werden kann. Ein weiterer Ansatz, der ebenfalls von Patrick Seyfried verfolgt wird, ist die interne Cyclisierung von Oligonukleotiden über das gleiche alkinmodifizierte NPE. Dieser Ansatz führt zu einer dramatischen Destabilisierung des Duplexes, der durch Photolyse wieder vollständig stabilisiert werden kann. Diese beiden Konzepte stellen vielversprechende Ansätze dar, um in Zukunft Oligonukleotid-Wechselwirkungen besser unterbinden zu können und somit bessere regulatorische Werkzeuge zu erhalten.

Weiterhin wurde die Quantenausbeute bei 365 nm der beiden modifizierten DNA-Stränge gemessen. Sie betragen 0.06 für **DNA1^{T-hNDBF}** und 0.003 für **DNA5^{G-ANBP}**. Auch die Absorptionsspektren der Oligonukleotide wurde gemessen und anhand dessen deren Extinktionskoeffizienten bei 365 nm von 7953 für **DNA1^{T-hNDBF}** und 7009 für **DNA5^{G-ANBP}** ermittelt. Aufgrund der bathochrom verschobenen Absorptionsmaxima wurden erfolgreiche Versuche zur wellenlängenselektiven Photolyse des hNDBF in Gegenwart des NPP durchgeführt. Es wurde ebenfalls versucht ANBP, das ein Absorptionsmaximum bei 412 nm aufweist, mit höheren Wellenlängen abzuspalten. Dies gelang allerdings nicht oberhalb von 500 nm.

Beide neuen Schutzgruppen lassen sich für die wellenlängenselektive Entschützung von Oligonukleotiden einsetzen und stellen somit gute Kandidaten für entsprechende Anwendungen dar.

3.2. Zweiphotonen-Charakterisierung von Oligonukleotiden

3.2.1. Vorarbeiten und erste eigene Versuche zur Zweiphotonen-Photolyse mit anschließender HPLC-Analyse

Wie oben erwähnt, war der Hauptgrund (h)NDBF und ANBP als Schutzgruppen zu verwenden, deren bereits für die Freisetzung von Ca^{2+} bzw. Glutamat nachgewiesene Zweiphotonen-Sensitivität. Ob diese aber auch auf Oligonukleotiden noch vorhanden ist, sollte erstmals getestet werden, bevor diese im Arbeitskreis für weitere Anwendungen eingesetzt werden. Dr. Florian Schäfer hat dazu im Rahmen seiner Doktorarbeit,^[118] die von ihm synthetisierte dC^{NDBF} modifizierte Benchmarksequenz in Kooperation mit Dr. Radhan Ramadass aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joseph Wachtveitl mit einem gepulsten IR-Laser in einer Küvette bestrahlt. In der Tat zeigte sich dabei eine langsame Abnahme des Eduktes. Da dies vielversprechende Ergebnisse waren, wurden auch die Stränge $\text{DNA1}^{\text{T}_h\text{NDBF}}$ und $\text{DNA3}^{\text{G}_h\text{NDBF}}$ auf gleiche Weise belichtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 im Vergleich mit den Ergebnissen des dC^{NDBF} aufgetragen.

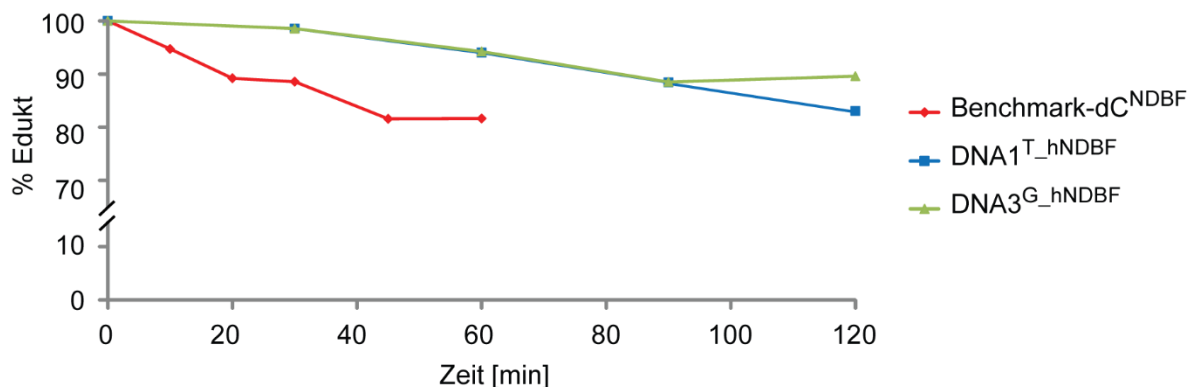


Abbildung 31: Erste Zweiphotonen-Belichtung von $\text{DNA1}^{\text{T}_h\text{NDBF}}$ und $\text{DNA3}^{\text{G}_h\text{NDBF}}$ am Laser-Setup des Arbeitskreises Wachtveitl in einer Küvette mit 730 nm und 1 W Leistung. Die Daten der dC^{NDBF} -modifizierten Benchmark-Sequenz wurden von Dr. Florian Schäfer gemessen und sind hier nur zu Vergleichszwecken aufgetragen.

Die NDBF-geschützte Benchmarksequenz zeigt eine deutlich schnellere Photolyserate als die hNDBF-geschützten Stränge, obwohl diese doppelt so lange belichtet wurden. Wenn auch nur schlecht, zeigte dies doch, dass sich hNDBF mit der Zweiphotonen-Technik von DNA abspalten lässt. Die langsamere Photolyse ist nicht so unverständlich, vergleicht man die Quantenausbeuten auf Einphotonen-Ebene des NDBFs und des hNDBFs im Oligonukleotid, so ist die des NDBFs ca. doppelt so hoch, wie die des hNDBFs. Da mit hoher

Wahrscheinlichkeit die Photolyse nach der Zweiphotonen-Anregung dem gleichen Reaktionsweg folgt, kann auch angenommen werden, dass sich die Quantenausbeute bei Zweiphotonen-Anregung ähnlich verhält, wie bei der Einphotonen-Anregung.

Dr. Florian Schäfer hat auch den Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt von 0.21 GM für die dC^{NDBF} modifizierte Benchmarksequenz bestimmt. Dazu wurde MNI-Glutamat, dessen Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt bekannt ist, mit derselben Lichtquelle wie die DNA belichtet und ebenfalls per HPLC analysiert. Nach Formel 3.2 wurde der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt mit 0.21 GM berechnet:^[79,118]

$$\delta_u = \frac{N_P \delta_{uR} c_R}{N_R c_P} \quad (3.2)$$

dabei steht δ_u für den Zweiphotonenwirkungsquerschnitts, N_p für die Photolyserate der Probe, δ_{uR} für den Zweiphotonenwirkungsquerschnitt der Referenz, c_R für die Konzentration der Referenz, N_R für die Photolyserate der Referenz und c_p für die Konzentration der untersuchten Probe.

Allerdings zeigte sich beim anschließenden Versuch die quadratische Abhängigkeit der Photolyse von der eingestrahlten Leistung zu messen nur der Kurvenverlauf in Abbildung 32.

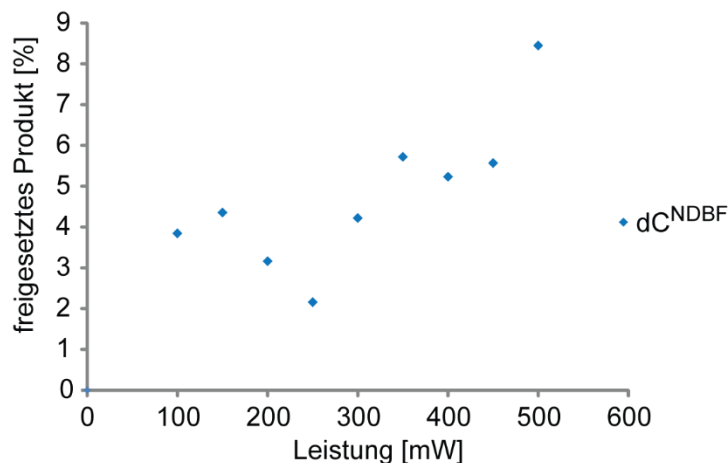


Abbildung 32: Messung der quadratischen Abhängigkeit der Photolyse der dC-NDBF-modifizierten Benchmarksequenz von der eingestrahlten Leistung.

Dieser Kurvenverlauf weist keine quadratische Abhängigkeit der Entschützung von der Laserleistung auf, wie es für einen Zweiphotonen-Prozess zu erwarten wäre. Problematisch ist, dass für diese Experimente jeweils eine Stunde auf jede Probe eingestrahlt wurde, damit für die HPLC-Analyse überhaupt eine detektierbare Menge an photolysiertem Produkt erhalten

wurde. Die Zweiphotonen-Abspaltung findet aufgrund der Nichtlinearität nur im Fokus des Laserstrahles statt. Dies ist an und für sich eine erstrebenswerte Eigenschaft, da sie eine 3D-Auflösung ermöglicht, stellt aber für die Photolyse einer kompletten Probe ein erhebliches Problem dar. Somit ist bei den hier vorgenommenen Experimenten die Bildung des Produkts mehr durch die Diffusion von neuer Probe in den Fokus des Lasers beeinflusst als von der Leistung des Lasers, da der Laser die meiste Zeit bereits photolysierte Probe trifft. Da für die Bestimmung des Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitts das im Vergleich zu einem Oligonukleotid sehr kleine MNI-Glutamat verwendet wurde, ist anzunehmen, dass deren Diffusionsgeschwindigkeiten voneinander abweichen und somit die gemessenen Werte nicht glaubwürdig erscheinen. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde die Zweiphotonen-Belichtung komplett auf diese Arbeit übertragen.

3.2.2. Versuche zur Zweiphotonen-Charakterisierung mit Hilfe eines Verdrängungs-Assays

Ziel war es eine Möglichkeit zu finden, den Photolyseprozess anders als mittels HPLC zu verfolgen. Die Überlegung war, das Abspaltungsereignis in ein sensibles, gut detektierbares Signal umzuwandeln. Sehr gut detektierbar und auch sensitiv ist Fluoreszenz. Leider sind die meisten photolabilen Schutzgruppen nicht fluoreszierend, was ein direktes Auslesen unmöglich macht. Auch wenn photolabile Schutzgruppen wie DEACM Fluoreszenz aufweisen, ist es fraglich, ob sich diese Fluoreszenz dazu nutzen lässt die Photolyse zu verfolgen. Das Problem dabei ist, dass sich zum einen die Fluoreszenz des gebundenen Zustandes kaum bis gar nicht vom photolysierten Produkt unterscheidet und zum zweiten, dass zur Detektion der Fluoreszenz, die Fluoreszenz angeregt werden muss. Dazu wird aber in die gleiche Absorptionsbande eingestrahlt, in die auch für die Photolyse eingestrahlt wird, wodurch es bei der Fluoreszenz-Anregung bereits zur Photolyse kommen kann.

Auf Grund dieser Probleme muss also eine der Photolyse nachgeschaltete Reaktion erfolgen, die ein Fluoreszenzsignal liefert. In Betracht kamen die Verwendung von *molecular beacons* und die Modifikation eines *mismatch*-Verdrängungs-Assays, die beide getestet wurden. Der *molecular beacon* wurde so gewählt, dass die geschützte Benchmarksequenz nach Abspaltung der Schutzgruppe an den Loop binden kann. Leider zeigte sich bereits sehr schnell, dass nahezu kein Fluoreszenzunterschied zwischen dem *molecular beacon* mit passendem Target und *molecular beacon* mit photolabil geschütztem Target auftritt. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht sonderlich überraschend, in Studien unserer Gruppe wurde bereits gezeigt, dass eine einzelne photolabile Schutzgruppe nicht in der Lage ist, ein 15mer daran zu hindern als Dimer vorzuliegen. Dies lässt sich recht gut von den Schmelzpunkten ableiten.

Auch in der in Abschnitt 1.1.2.1 beschriebenen Studie von Joshi *et al.* konnte gezeigt werden, dass der Loop eines *molecular beacon* mit 7 Schutzgruppen versehen werden musste, damit ein entsprechendes Target nicht binden konnte. Aus diesem Grund wurde der Ansatz des *molecular beacons* nicht weiter verfolgt.

Der zweite Ansatz wurde von der Arbeit von Li^[123] zur *mismatch* Erkennung abgeleitet. Dabei wird eine Doppelstrang-Sonde zur Erkennung einer Fehlbase in einem Oligonukleotid (Target) verwendet. Diese Sonde besteht aus einem zum Zielstrang komplementären mit einem Fluorophor markierten Strang und einem kürzeren Strang, der mit einem Quencher markiert ist. Diese Sonde ist so konzipiert, dass im Falle einer Fehlbase im Target-Strang die Sonde weiterhin als Duplex vorliegt. Wird der korrekte Target-Strang mit der Sonde versetzt, verdrängt dieser den Quencher-Strang und es kommt zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Der in dieser Studie verwendete Target-Strang hatte eine Länge von 24 Nukleotiden und der Fluoreszenzunterschied zwischen Mismatch-Target- und Target-Strang wurde mit einem 4-6 Nukleobasen kürzeren Quencher-Strang erzielt.

Die Hoffnung war nun, dass sich eine photolabil geschützte Base ähnlich zu einer Fehlbase verhält und sich so der Assay auf die Benchmarksequenz übertragen lässt. In Abbildung 33 ist der Assay schematisch dargestellt.

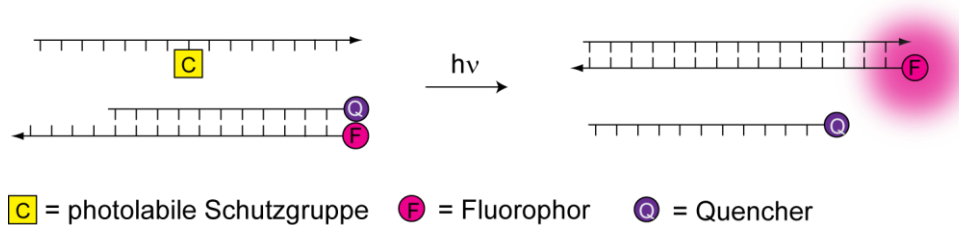


Abbildung 33: Schematische Darstellung des Verdrängungs-Assays

Der Verdrängungs-Assay besteht aus dem photolabil geschützten Strang mit 15 Nukleotiden und einer Sonde. Diese Sonde besteht wiederum aus einem 5'-Fluoreszenz-markierten Strang, der die Gegensequenz zum photolabil geschützten Strang trägt, und einem 11 Nukleotiden langen Strang, der die gleiche Sequenz wie der photolabil geschützte Strang hat, und mit einem Quencher am 3'-Ende versehen ist. Die Sonde alleine oder in Anwesenheit des photolabil geschützten Strangs sollte dabei als Duplex vorliegen und somit aufgrund des FRET-Effekts keine oder nur kaum Fluoreszenz aufweisen.

Für den Assay wurden die in Tabelle 4 gezeigten Stränge gekauft (**DNA6**^{unmodifiziert}, **DNA9**^{Cy3} und **DNA10**^{BHQ2}) beziehungsweise von Dr. Florian Schäfer zur Verfügung gestellt (**DNA7**^{C-NPE}, **DNA8**^{C-NDBF}).

Tabelle 4 Übersicht der Sequenzen, die für dieses Teilprojekt verwendet wurden. *Diese Stränge wurden kommerziell erworben. ** Dieser Strang wurde von Dr. Florian Schäfer zur Verfügung gestellt.

<i>Name</i>	<i>Enthaltene Stränge</i>	<i>Sequenz</i>
DNA6 ^{unmodifiziert *}		GCA TAA ACA AAG GTG
DNA7 ^{C_NPE **}		GCA TAA AC ^{NPE} A AAG GTG
DNA8 ^{C_NDBF **}		GCA TAA AC ^{NDBF} A AAG GTG
Sonde1	DNA9 ^{Cy3 *}	Cy3-CAC CTT TGT TTA TGC
	DNA10 ^{BHQ2 *}	AAA CAA AGG TG-BHQ2

Um zu sehen, ob der Assay wie geplant funktioniert, wurden zunächst an einem Fluoreszenz-Platereader in 96-well-Platten verschiedene Parameter getestet. Neben der oben beschriebenen Doppelstrang-Sonde **Sonde1** wurde auch eine Doppelstrang-Sonde getestet, bei der sowohl der Fluorophor als auch der Quencher am jeweils anderen Ende der Sequenzen angebracht sind. Im Vergleich zeigte diese Sonde aber schlechtere Werte, weshalb diese nicht weiter verwendet wurde. Alle Experimente wurden in PBS-Puffer durchgeführt und die Menge an mit Fluorophor-markiertem Strang **DNA9**^{Cy3} mit je 15 pmol pro Probe konstant gehalten. Die Menge vom Quencher-markierten Strang **DNA10**^{BHQ2} wurde von 0,2, 0,33, 0,5, 1, 2, 3 bis 5fach variiert. Wie zu erwarten, war die Restfluoreszenz der Sonde bei Konzentrationen der **DNA10**^{BHQ2} unterhalb der Äquimolarität sehr hoch. Niedrige Fluoreszenzwerte lieferten dagegen die Doppelt- oder höher konzentrierten Proben. Recht gute Werte mit vertretbarem Probenverbrauch lieferte die **Sonde1**, wenn **DNA10**^{BHQ2} doppelt so konzentriert war wie **DNA9**^{Cy3}. Zu dieser **Sonde1** wurden die Stränge **DNA6**^{unmodifiziert}, **DNA7**^{C_NPE} oder **DNA8**^{C_NDBF} oder die entsprechenden zuvor belichteten Stränge (in äquimolarer Konzentration zur **DNA9**^{Cy3}) pipettiert und die resultierende Fluoreszenz gemessen. Die Messungen wurden bei 23, 25, 30 und 35 °C durchgeführt. Die besten Ergebnisse wurden bei 25 °C erhalten, was aufgrund des geringen Schmelzpunkts eines 11mers nicht sonderlich überraschend ist. Die Ergebnisse bei 25 °C sind in Abbildung 34 dargestellt.

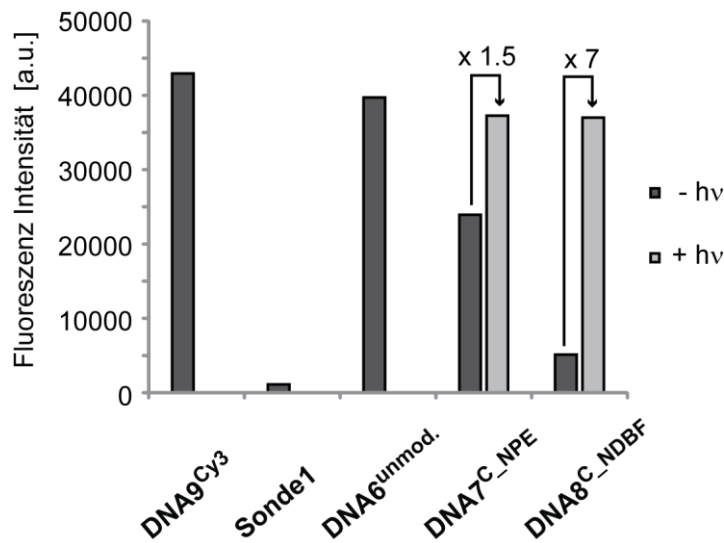


Abbildung 34: Auftragung der Fluoreszenz-Intensität der **DNA9^{Cy3}** alleine, der **Sonde1** alleine und der Mischung aus der **Sonde1** mit **DNA6^{unmodifiziert}**, **DNA7^{C_NPE}** oder **DNA8^{C_NDBF}**. **DNA7^{C_NPE}** und **DNA8^{C_NDBF}** wurden nach vollständiger Belichtung ebenfalls zusammen mit **Sonde1** vermessen.

Der NPE-geschützte Strang **DNA7^{C_NPE}** zeigt eine 1.5fach höhere Fluoreszenz nach dessen Belichtung und ist etwas geringer als die Fluoreszenz von **DNA6^{unmodifiziert}**. Deutlich besser sehen die Ergebnisse für **DNA8^{C_NDBF}** aus, zwar ist auch hier die maximale Fluoreszenz nach der Belichtung etwas geringer als bei **DNA6^{unmodifiziert}**, allerdings steigt die Fluoreszenz durch die Belichtung um das 7fache Wert an. Dieser Assay scheint also für **DNA8^{C_NDBF}** geeignet zu sein, nicht aber für **DNA7^{C_NPE}**. Dies liegt wahrscheinlich an der stärker destabilisierenden Wirkung der NDBF-Schutzgruppe gegenüber der NPE-Schutzgruppe.

Mit einem Fluorimeter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beatrix Süß wurde untersucht, ob die belichtete Probe dort auf ihre Fluoreszenzzunahme nach erfolgter Belichtung vermessen werden kann. Leider zeigte sich, dass sich die Fluoreszenzmesswerte durch einfaches bewegen der Küvette verändern lässt, was eine Messung hier unmöglich macht. Aus diesem Grund wurden die weiteren Experimente an einem Küvettenhalter mit Photomultiplier durchgeführt, der das Fluoreszenzsignal in einen Spannungswert umwandelt und über einen AD-Wandler an ein Auswerte- und Anzeigesystem (Computer) überträgt. Dieser Küvettenhalter ist wie in der Schemazeichnung in Abbildung 35b gezeigt, im Strahlengang des IR-Lasers platziert. Ein schwächerer grüner Laser mit 532 nm wird durch einen Dichroitischen Spiegel parallel zum IR-Laserstrahl durch die Küvette geführt. Dieser grüne Laser dient der Anregung des Fluorophors. Mit Hilfe der Pockels-Zelle wird die Leistung des Lasers eingestellt.

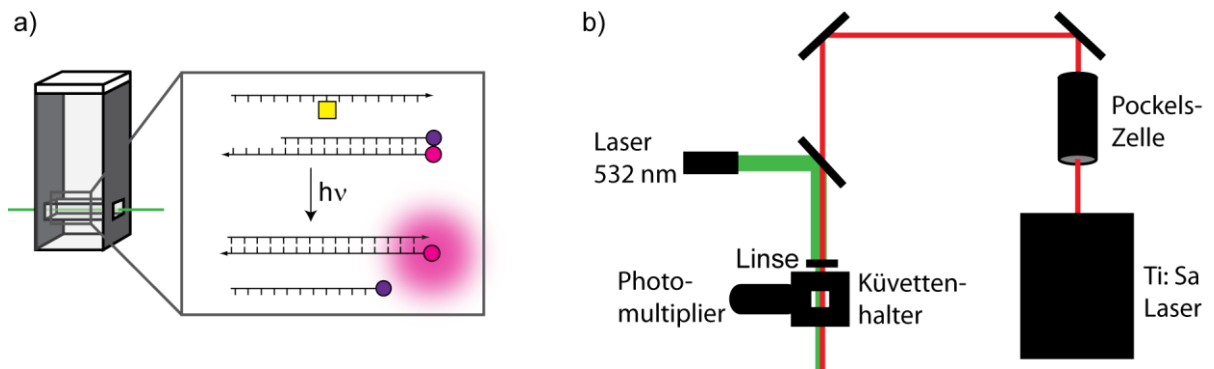


Abbildung 35: a) Schematische Darstellung des Verdrängungs-Assays in der Küvette. b) Schematische Darstellung des Aufbaus zur Zweiphotonen-Belichtung in einer Küvette mit gleichzeitiger Anregung der Fluoreszenz und deren Messung mittels Photomultiplier.

Um dieses Setup auf seine Belastbarkeit zu überprüfen wurde zunächst die Einphotonen-Belichtung getestet. Die Fluoreszenz wird durch den Photomultiplier am Küvettenhalter in einen Spannungswert umgewandelt. Die Absolutwerte der Fluoreszenz der verschiedenen Messreihen zueinander können leider nicht miteinander verglichen werden, da die Spannungswerte durch einen zusätzlichen Verstärker für jede Messreihe einzeln eingestellt wurden. Für die Messung in Abbildung 36a wurde die **Sonde1** mit **DNA8^{C-NDBF}** in PBS-Puffer in einer Küvette mit 13 μL Fassungsvermögen vorgelegt. Der Anstieg auf ca. 1 V erfolgt durch das Einschalten des Fluoreszenzanregungslasers und zeigt somit die Grundfluoreszenz der Probe an. Nach kurzer Wartezeit wurde für 10 sec mit 365 nm belichtet, dabei erfolgte die Belichtung der Küvette direkt im Küvettenhalter. Zu beobachten ist die sehr starke Fluoreszenzzunahme, die langsam zu einer Sättigung kommt. Anschließend erfolgte eine weitere Belichtung für 20 sec und 30 sec. Die Fluoreszenzanstiege werden dabei allerdings immer schwächer, woraus geschlossen werden kann, dass ein Großteil der photolabilen Schutzgruppen bereits innerhalb der ersten 10 sec abgespalten wurden.

Die Ergebnisse dieser ersten Messung waren so vielversprechend, dass im Anschluss das Experiment mit Zweiphotonen-Anregung wiederholt wurde. Die Messung wurde in Abbildung 36b aufgetragen. Auch hier wurde eine Mischung aus **Sonde1** und **DNA8^{C-NDBF}** (25pmol) in PBS-Puffer in einer Küvette mit 13 μL Fassungsvermögen vorgelegt. Der erste Fluoreszenzanstieg auf knapp 2 V erfolgte auch hier durch das Einschalten des Fluoreszenzanregungslasers.

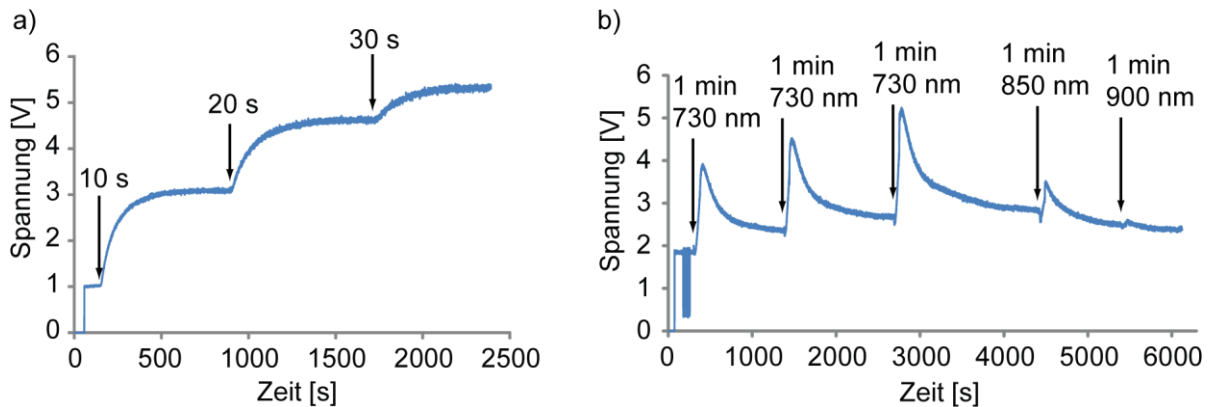


Abbildung 36: Chromatogramme der Fluoreszenz-Zunahme von **Sonde1** mit **DNA8^C_{NDBF}** durch Bestrahlung mit a) 365 nm und b) 730, 850 und 900 nm. Die Fluoreszenzzunahme wurde durch den Photomultiplier als Spannung in V ausgegeben.

Die starken Schwankungen zu Beginn der Messung resultierten aus Einstellungsversuchen der Verstärkung und dürfen ignoriert werden. Nach 1minütiger Bestrahlung der Probe mit 730 nm erfolgte ein steiler Fluoreszenzanstieg, der direkt nach der Belichtung wieder sank. Diese Beobachtung irritierte und legte die Vermutung nahe, dass die beobachtete Fluoreszenz nicht das Resultat von Photolyse ist, sondern vielmehr das Aufschmelzen der Sonde. Da der verwendete Laser ein gepulster Laser ist, könnte es sein, dass es durch die hohe Photonendichte zu einer Temperaturerhöhung im Fokus kommt, die die Dissoziation der **Sonde1** begünstigt. Um diesen Verdacht zu überprüfen wurde eine weitere Messung durchgeführt, bei der nur **Sonde1** in PBS-Puffer in der Küvette vorgelegt wurde. Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, erfolgt auch hier der erste Fluoreszenzanstieg durch das Einschalten des Fluoreszenzanregungslasers.

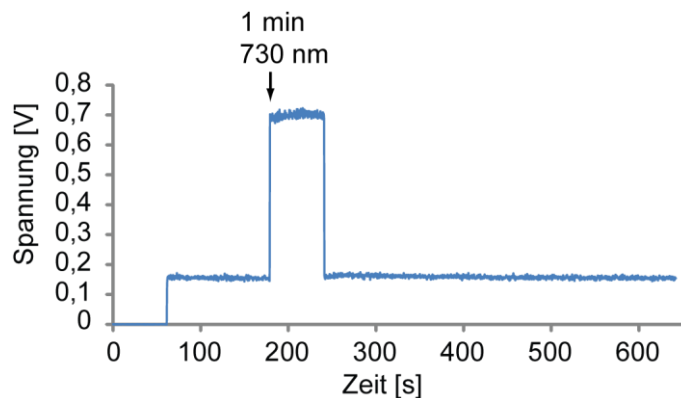


Abbildung 37: Chromatogramm der **Sonde1** alleine. Bestrahlt wurde 1 min mit 730 nm. Diese Messung diente der Überprüfung der Stabilität der Sonde1 gegenüber thermischem Aufschmelzen.

Nach kurzer Wartezeit wurde der IR-Laser mit 730 nm für 1 min auf die Probe eingestrahlt. Die dabei entstehende Fluoreszenzerhöhung bleibt über die Minute konstant und sinkt direkt nach Ausschalten des IR-Lasers wieder auf den alten Fluoreszenzwert. Aus Abbildung 37 wird klar, dass der IR-Laser den Fluorophor der Duplex-**Sonde1** zwar anregt, da aber die Fluoreszenz nach der Belichtung direkt wieder auf den Ursprungswert zurückfällt, wird **Sonde1** nicht aufgeschmolzen. Das wiederum bedeutet für die Ergebnisse in Abbildung 36b, dass die steilen Anstiege in der Spannung direkt nach der Anregung mit 730 nm aus, im Fokus photolyzierter Probe, resultieren müssen, an die **DNA9^{Cy3}** bindet, was wiederum zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals führt. Die Fluoreszenz sinkt nach der Belichtung wieder recht stark, was zwei Vermutungen nahe legt. Zum einen handelt es sich bei diesem Assay um eine Gleichgewichtsreaktion, die zwar durch die Bildung des längeren Duplexes in eine Richtung bevorzugt ist, aber durchaus auch in die andere Richtung ablaufen kann, wenn z.B. die Konzentration von **DNA10^{BHQ2}** sehr hoch ist. Diese Rückreaktion würde zu einer Erniedrigung des Fluoreszenz-Signals führen. Die zweite Erklärung beruht auf dem Messaufbau, bei dem die Fluoreszenzanregung in der Küvette durch einen schmalen Anregungslaserstrahl erfolgt. Diffundiert der fluoreszierende Duplex aus dem Anregungsvolumen des 532 nm-Lasers heraus, ist dessen Fluoreszenz nicht länger detektierbar, was ebenfalls zu einer Abnahme des Fluoreszenz-Signals führt. Die Abnahme der Fluoreszenz in Abbildung 36b ist vermutlich auf eine Mischung dieser beiden Effekte zurückzuführen.

Da die Fluoreszenzwerte nach der Belichtung bei gleicher Wartezeit zunahmen, wurde erwartet, dass sich mit diesem System Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte bestimmen lassen. Da bei den Messungen von Dr. Florian Schäfer die quadratische Abhängigkeit von der Leistung nicht gezeigt werden konnte, wurde mit diesen Messungen begonnen um das Mess-Setup zu verifizieren.

Leider zeigte sich jedoch trotz vieler Versuche kein messbarer quadratischer Zusammenhang zwischen der eingestrahlten Leistung und der resultierenden Fluoreszenzzunahme.

3.2.3. Versuche zur Durchführung des Verdrängungs-Assay nach Immobilisierung der photolabil geschützten Stränge an Oberflächen

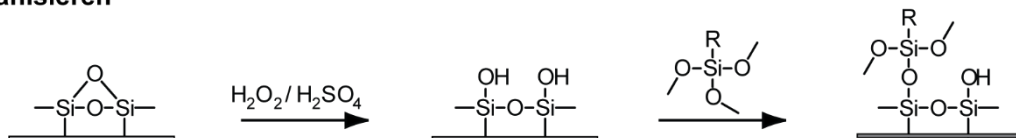
Das größte Problem der Verdrängungsmessungen in Küvetten stellt die Diffusion dar. Selbst wenn der photolabil geschützte DNA-Strang photolysiert wird, kann dieser aus dem schmalen Anregungsstrahl des grünen Lasers diffundieren, wodurch keine Fluoreszenzzunahme sichtbar wird, selbst wenn der fluoreszierende Gegenstrang bindet. Um diese

Diffusionsprobleme zu vermeiden, wurde versucht den photolabil geschützten Strang zu immobilisieren, um im Anschluss den Verdrängungs-Assay auf der Oberfläche durchführen zu können.

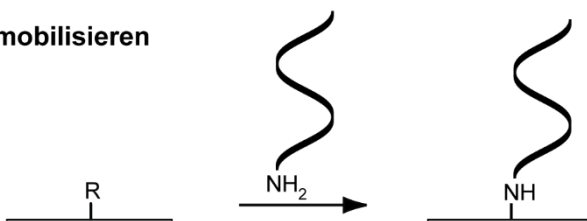
3.2.3.1. Silanisierung von Glasoberflächen und anschließende Immobilisierungs-Versuche

Als Immobilisierungsmedium wurden modifizierte Glasoberflächen gewählt. Zunächst wurde versucht die Glasoberflächen selbst mit verschiedenen Tri-Alkoxy-Silanen so zu modifizieren, dass die Funktionalitäten von einer aminomodifizierten DNA angegriffen werden können. In Abbildung 38 ist schematisch dargestellt, wie die Silanisierung, die Immobilisierung und die anschließende Hybridisierung erfolgen. Zunächst müssen die Glasoberflächen mit Hilfe von Caroscher Säure hydroxyliert werden, damit mögliche verbrückende Ether aufgebrochen werden können. So werden freie Hydroxylgruppen generiert, die im Anschluss Tri-Alkoxy-Silane nukleophil angreifen können und unter Abspaltung von Ethanol bzw. Methanol zur silanierten Oberfläche führen.^[124] Die so eingeführten reaktiven Gruppen können bei der Immobilisierung durch die Aminofunktion von aminomodifizierten DNA-Stränge angegriffen werden, wodurch die DNA-Stränge kovalent an die Silane verknüpft werden. Im Anschluss kann in einem Verdrängungs-Assay eine Hybridisierung erfolgen.

1) Silanisieren



2) Immobilisieren



3) Hybridisieren

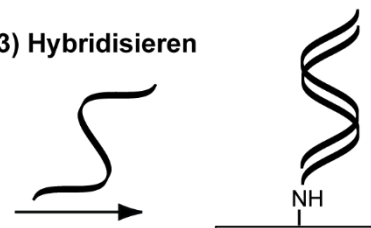


Abbildung 38: Schematische Darstellung der für den Verdrängungs-Assay auf der Oberfläche wichtigen Schritte. 1) Für die Silanisierung mit Tri-Alkoxy-Silanen muss zunächst die Glasoberfläche mit Caroscher Säure hydroxyliert werden, damit im Anschluss die Tri-Alkoxy-Silane nukleophil angegriffen werden können. 2) Bei der Immobilisierung greift ein aminomodifizierter DNA-Strang nukleophil die silanierte Oberfläche an. 3) Bei der Hybridisierung kann ein passender Gegenstrang an den immobilisierten Strang binden.

Für den Verdrängungs-Assay auf der Oberfläche soll der photolabil geschützte Strang kovalent über eine Aminofunktion auf der Oberfläche angebracht werden. Da aber weder das Silanisieren, noch das Immobilisieren bisher im Arbeitskreis durchgeführt wurden und nicht klar war, wie gut welche Schritte laufen, wurde anstelle des aminomodifizierten photolabil geschützten DNA-Strangs zunächst der Test-Strang **DNA11^{Cy3}** (siehe Tabelle 5) verwendet. Dieser beinhaltet neben der benötigten 3'-Aminofunktion am 5'-Ende einen Fluorophor (Cy3), der direkt nach der Immobilisierung detektierbar ist, ohne dass zuvor noch eine Hybridisierung stattfinden muss.

Tabelle 5 Für die Immobilisierung verwendete Sequenz. * Sequenz wurde kommerziell erworben.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
DNA11^{Cy3} *	Cy3-CAC CTT TGT TTA TGC-(CH ₂) ₆ -NH ₂

Für die Silanisierung wurde sich an der Silanisierungstechnik der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Tampé orientiert.^[124] Unterstützung kam dabei von Dr. Volker Gatterdam, mit dem der erste Silanisierungs-Versuch durchgeführt wurde. Deren Anleitung sieht zunächst die Hydroxylierung der Glasoberfläche mit Hilfe von Caroscher Säure vor, damit überhaupt die nötigen Hydroxylgruppen vorliegen. Dazu werden Deckgläser in einen Teflonblock platziert und dort mit Caroscher Säure versetzt und nach 20 min im Ultraschallbad mit Milli-Q-H₂O nachgewaschen. Dieses Verfahren wurde für die vorliegenden Versuche übernommen. Die Original-Vorschrift verwendet (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan zur Silanisierung, die Epoxidfunktion wird im Anschluss von einem Di-Amino-Linker angegriffen, danach mit einem Maleimid-Propansäure-NHS-Ester umgesetzt und abschließend das entsprechende Peptid über dessen Cysteinfunktion immobilisiert.^[124] Da für diese Arbeit aminomodifizierte DNA-Stränge immobilisiert werden sollten, wurde nach der Hydroxylierung nur die Silanisierung mit Tri-Alkoxy-Silanen übernommen, wobei neben (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan (**45**) auch (3-Iodpropyl)trimethoxysilan (**44**), Trimethoxy[2-(7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-yl)ethyl]silan (**46**), 3-(Triethoxysilyl)propyl-isocyanat (**47**) und 2-(4-Chlorsulfonylphenyl)ethyltrimethoxysilan (**84**) getestet wurde, die in Abbildung 39 dargestellt sind. Nach der Hydroxylierung wurden die Deckgläser auf der Rückseite der zu silanisierenden Seite mit einem Diamantschreiber markiert. Im Anschluss wurden die Silane auf die Deckgläser pipettiert und ein zweites Deckglas darauf gelegt, so dass immer zwei Deckgläser gleichzeitig silanisiert werden. Dies hat den Vorteil, dass die Silane gleichmäßig verteilt werden.

Die Silanisierung erfolgte immer bei 75 °C für ca. 2,5 h. Nach Waschen der Deckgläschen wurde **DNA11^{Cy3}** zum Immobilisieren auf die Oberfläche pipettiert und in einer Feuchtigkeitskammer platziert. Nach der Immobilisierung wurden die Deckgläschen gewaschen und im Mikroskop mit Weitfeld-Fluoreszenz-Anregung analysiert.

Zu Beginn der Studie wurden die oben genannten Tri-Alkoxy-Silane getestet (siehe Abbildung 39).

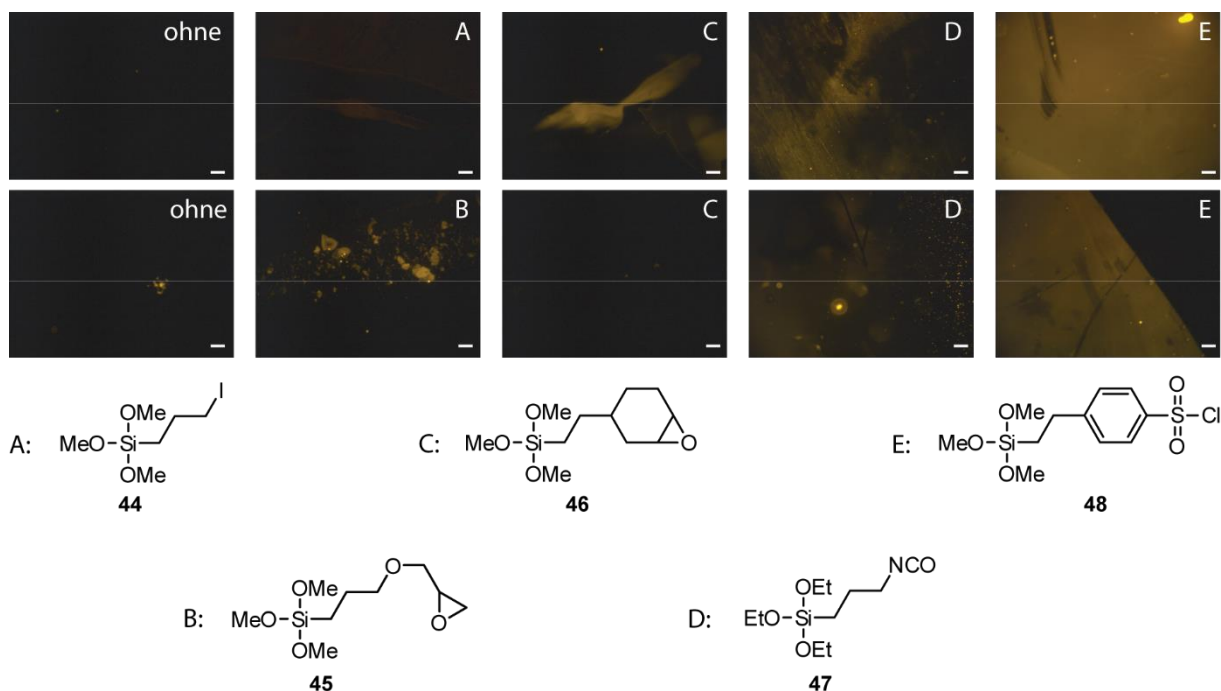


Abbildung 39: Unterschiedlich modifizierter Tri-Alkoxy-Silane zur Silanisierung von Glasoberflächen und anschließender Immobilisierung der **DNA11^{Cy3}**. A: (3-Iodpropyl)trimethoxysilan, B: (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan, C: Trimethoxy[2-(7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-yl)ethyl]silan, D: 3-(Triethoxysilyl)propyl-isocyanat, E: 2-(4-Chlorsulfonylphenyl)ethyltrimethoxysilan (Maßstab 100 µm)

In Abbildung 39 sind Ausschnitte der verschiedenen silanisierten Oberflächen gezeigt, wobei für C, D und E jeweils zwei Bereiche gezeigt wurden. Deutlich zu sehen ist, dass ohne Silanisierung keine Fluoreszenz detektierbar ist, was darauf schließen lässt, dass keine DNA auf der Glasoberfläche immobilisiert ist und auch wenig bis keine DNA auf ihr haften bleibt. Weiterhin ist gut zu sehen, dass die Iodpropyl- (A) und die 3-Glycidyloxypropyl (B) -Modifikation nur fluoreszierende Flecken liefert, was eher für unspezifische Anhaftungen der DNA auf der Oberfläche spricht. Auch die Modifikation mit 2-(7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-yl) (C) liefert keine schönen gleichmäßigen fluoreszierenden Flächen, sondern nur Teilbereiche weisen Fluoreszenz auf. Etwas mehr Fluoreszenz lässt sich bei den Isocyanat (D) -

modifizierten Deckgläsern detektieren, allerdings sind auch diese Bereiche alles andere als homogen. Das mit Abstand homogenste und am hellsten fluoreszierende Ergebnis liefern die Sulfonsäurechlorid-silanisierten Oberflächen (**E**). Aus diesem Grund wurden die weiteren Silanisierungsversuche nur noch mit 2-(4-Chlorsulfonylphenyl)ethyltrimethoxysilan durchgeführt.

Um zu testen wie lange die Immobilisierung durchgeführt werden sollte, wurde in die Immobilisierung in Abhängigkeit von der Zeit getestet. Dazu wurde die DNA-Lsg. bei einem Teil der Proben bereits nach 3 h abgewaschen, bei dem anderen Teil der Proben über Nacht auf den Deckgläsern belassen. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität bei der Hybridisierung über Nacht höher ausfällt als nach 3 h. Ebenfalls wurde getestet, ob die Silanisierung und die Hybridisierung besser als Tropfen auf der Oberfläche oder zwischen Deckgläsern funktionieren und unter welchen Bedingungen die besseren Ergebnisse erzielt werden.

Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Tri-Alkoxy-Silane zwischen zwei Deckgläser mit Platzhaltern pipettiert wurde und für 2,5 h auf dem Thermoschüttler ohne Rotation bei 75 °C gelassen wurden und die anschließende Immobilisierung über Nacht als Tropfen in einer Feuchtigkeitskammer durchgeführt wurde.

Wie in Abbildung 40 zu sehen ist, treten bei der Silanisierung oder Immobilisierung immer wieder einige Fehler auf.

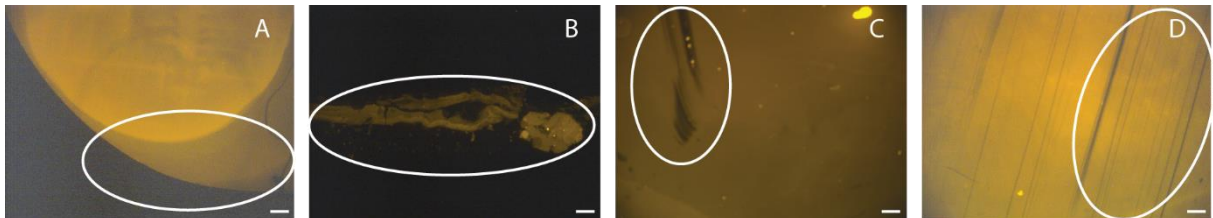


Abbildung 40: Auswahl an „Fehlern“, die beim Silanisieren bzw. Immobilisieren auftauchen können. (Maßstab 100 µm)

In **A** ist zu sehen, dass es einen helleren kleineren Kreis und einen schwächeren größeren Kreis gibt. Dieses Ergebnis ist dann der Fall, wenn der aufgetragene Tropfen über die Immobilisierungszeit verdunstet und somit kleiner wird. So kann im inneren Bereich mehr Strang immobilisiert werden als im äußeren Bereich. In **B** sieht man eine unspezifische Anhaftung auf der Oberfläche. Diese finden sich vermutlich dort, wo sich auf der Oberfläche Unebenheiten durch z.B. Salzartige Rückstände befinden. An diesen Rückständen bleibt die zu immobilisierende DNA kleben. **C** und **D** zeigen beispielhaft, was passiert, wenn bei Trennen

der Glasplatten z.B. mit der Pinzette die Oberfläche gekratzt wird. Dadurch kann entweder bereits beim Silanisieren oder im anschließenden Schritt der Immobilisierung die Modifikation mechanisch von der Oberfläche entfernt werden.

Gerade die letzten Fehler lassen sich nur schwer vermeiden, da die Deckgläser durch Adhäsionskräfte oft sehr stark aneinander haften und sich bei den Spülschritten nur schwer trennen lassen. Bei diesem Trennungsprozess kommt es weiterhin oft zu Brüchen in den sehr dünnen Deckgläsern, was diese Methode eher schlecht praktikabel macht. Da die Homogenität der Oberflächen selten über große Flächen gleich war, wären die Aussagen eines anschließenden Verdrängungs-Assay eher schwierig geworden. Aus einer geringeren Fluoreszenz an einer belichteten Stelle, hätte nicht mit Sicherheit auch auf eine geringere Photolyse-Effizienz geschlossen werden können. Deshalb wurde dieser Ansatz verworfen.

3.2.3.2. Immobilisierungs-Versuche auf käuflich erwerblichen silanisierten Objektträgern und anschließende Hybridisierungs-Versuche

Parallel zu den Silanisierungsexperimenten wurden Versuche mit kommerziell erwerblichen funktionalisierten Glasobjektträgern gemacht. Getestet wurden zwei Objektträger der Firma Schott: NEXTERION® Slide E mit einer Epoxid-Beschichtung und NEXTERION® Slide AL mit einer Aldehyd-Beschichtung. Bei ersten Tests mit dem Teststrang **DNA11^{Cy3}** war bei beiden Typen nach der Immobilisierung nach beigelegter Anleitung keine Fluoreszenz detektierbar. Auch bei weiteren Versuchen mit den NEXTERION® Slide E Objektträgern konnten keinen befriedigenden Ergebnisse erhalten werden, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Die Anleitung der NEXTERION® Slide AL Objektträger sieht nach der Immobilisierung der Stränge einen „Blocking“-Schritt vor, bei dem die verbleibenden Funktionalitäten inaktiviert werden. Bei den NEXTERION® Slide AL Objektträgern werden dabei die Aldehydfunktionen mit NaBH₄ zum Alkohol reduziert. Dieser Schritt wurde auch nach der Immobilisierung des Teststrangs **DNA11^{Cy3}** durchgeführt. Bei der anschließenden Kontrolle im Mikroskop war keine Fluoreszenz sichtbar. Da die Vermutung nahe lag, dass NaBH₄ auch die Doppelbindungen des Fluorophors Cy3 reduzieren könnte, wurden im folgenden Versuch die Objektträger direkt nach der Immobilisierung im Mikroskop untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 41 zu sehen.

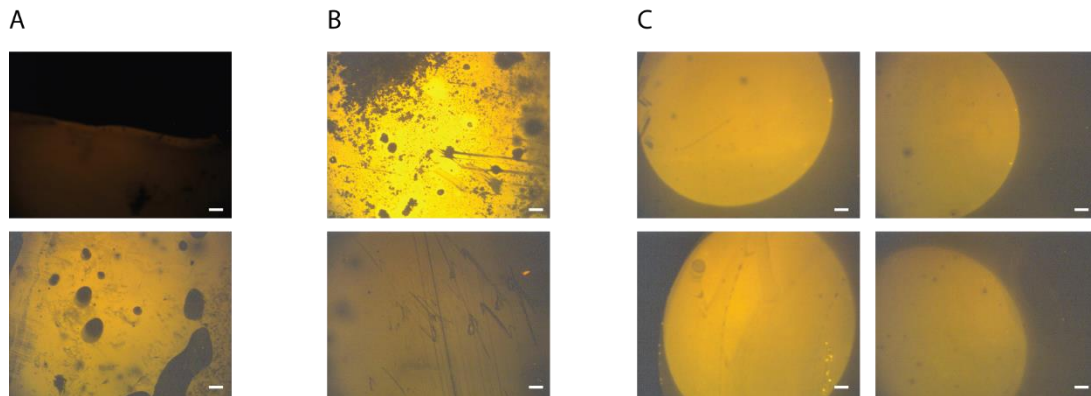


Abbildung 41: Immobilisierung der **DNA11^{Cy3}** auf kommerziellen Nexterion® Slide AL Objektträgern der Firma Schott. **A:** DNA-Lsg. wurde mit Deckglas und Platzhaltern aufgetragen. **B:** DNA-Lsg. wurde als Tropfen à 2 μL aufgetragen und hochkant in eine Feuchtigkeitskammer gestellt. **C:** Tropfen à 2 μL der DNA-Lsg. wurden auf den Objektträger pipettiert und waagrecht in eine Feuchtigkeitskammer gelegt. Es wurden immer zwei Bereiche der jeweiligen Bedingung abgebildet. (Maßstab 100 μm)

In der Tat ist ohne Umsetzung mit NaBH_4 Fluoreszenz sichtbar. In **A** wurde die DNA-Lsg. zum Immobilisieren unter ein Deckglas mit Platzhalter pipettiert um eine großflächige Immobilisierung zu erreichen. Deutlich zu erkennen ist, dass die Fluoreszenz nicht sehr hoch ist und kleine Löcher vorhanden sind. Dies liegt vermutlich daran, dass unter dem Deckglas auch kleine Luftblasen eingeschlossen wurden, wodurch an diesen Stellen keine Immobilisierung stattfinden konnte. In **B** wurden 2 μL Tropfen auch den Objektträger aufgetragen, der Objektträger im Anschluss aber hochkant in eine DC-Kammer gestellt, die als Feuchtigkeitskammer fungieren sollte. Leider zeigte sich aber, dass die Tropfen zum Ende des Objektträgers laufen und nur dort Fluoreszenz erscheint. Auch hier scheinen Luftblasen zu einer ungleichmäßigen Oberfläche zu führen. Das beste Ergebnis konnte mit 2 μL Tropfen und einer Kristallisierschale mit Abdeckung als Feuchtigkeitskammer erzielt werden (siehe **C**). Da dieser Ansatz so vielversprechende Ergebnisse lieferte, wurde im Anschluss versucht den Verdrängungs-Assay auf der Oberfläche durchzuführen. Dazu wurden die Stränge in Tabelle 6 verwendet.

Tabelle 6 Verwendete Sequenzen für dieses Teilprojekt. * Diese Sequenzen wurden kommerziell erworben.

Name	Enthaltene Stränge	Sequenz
DNA12 _{unmodifiziert} *		NH ₂ -ACA TAC ATA TAC GCA
DNA13 _{1xT_NPP}		NH ₂ -ACA TAC AT ^{NPP} A TAC GCA
DNA14 _{2xT_NPP}		NH ₂ -ACA T ^{NPP} AC ATA T ^{NPP} AC GCA
DNA15 _{3xT_NPP}		NH ₂ -ACA T ^{NPP} AC AT ^{NPP} A T ^{NPP} AC GCA
Sonde2	DNA16 ^{Dye495} *	Dye495-TGC GTA TAT GTA TGT
	DNA17 ^{BHQ1} *	ACA TAT ACG CA-BHQ1

Zunächst wurde überprüft, ob die hier verwendeten Stränge auch in der Lage sind, in einem Verdrängungs-Assay zwischen einem geschützten DNA-Strang und einem unmodifizierten oder entschützten DNA-Strang zu diskriminieren. Um zu sehen, ob diese Diskriminierung besser erfolgt, wenn mehrere photolabile Schutzgruppen den Strang abschirmen, wurden neben einer einfach mit NPP photolabil geschützten **DNA13**_{1xT_NPP} auch die Sequenzen **DNA14**_{2xT_NPP} und **DNA15**_{3xT_NPP} getestet. Die Fluoreszenzintensität der Sonde2 in Anwesenheit besagter Stränge ist in Abbildung 42 gezeigt.

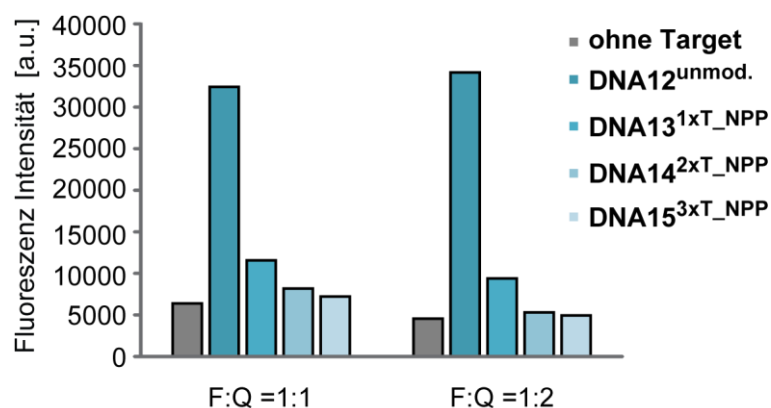


Abbildung 42: Fluoreszenzintensität der Sonde2 in Anwesenheit von **DNA12**_{unmodifiziert}, **DNA13**_{1xT_NPP}, **DNA14**_{2xT_NPP} und **DNA15**_{3xT_NPP}.

Ziel war es einen photolabil geschützten DNA-Strang zu immobilisieren und den Verdrängungs-Assay auf der Oberfläche durchzuführen. Dazu wurde als erstes der Strang **DNA12**_{unmodifiziert} als 5 µL-Tropfen für 2,5 h immobilisiert. Im Anschluss wurde direkt der

passende Fluorophor-markierte Strang **DNA16^{Dye495}** über Nacht hybridisiert. Als Referenz wurde auch eine zuvor nicht immobilisierte Stelle mit dem Strang **DNA16^{Dye495}** über Nacht inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 zu sehen. Da die zuvor verwendete Mikroskop-Kamera nicht besonders gut zur Fluoreszenzdetektion geeignet war, wurde eine neue Kamera angeschafft, die anstelle der Farbaufnahmen nur Helligkeitsunterschiede detektiert.

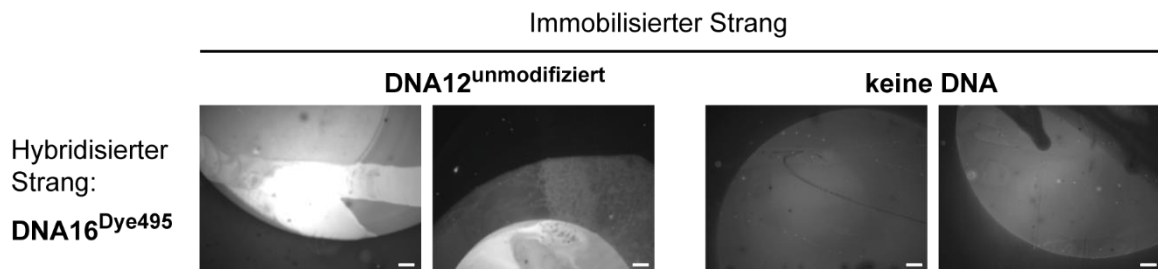


Abbildung 43: Immobilisierung von **DNA12^{unmodifiziert}** bzw. **keiner DNA** auf Nexterion® Slide AL Objektträgern und anschließende Hybridisierung der **DNA16^{Dye495}**. (Maßstab 100 µm)

Zu sehen ist in Abbildung 43, dass die Fluoreszenz an den Stellen, an denen keine DNA immobilisiert wurde, deutlich zu sehen ist, was darauf schließen lässt, dass die Aminofunktionen der Basen auch auf der Aldehyd-Oberfläche angreifen und es so zur Immobilisierung des Hybridisierungsstrangs kommt. Aus diesem Grund wurde der zuvor eliminierte „Blocking“-Schritt wieder eingeführt, wodurch der Hybridisierungsstrang nicht mehr immobilisiert werden sollte, sondern nur an die immobilisierte DNA binden kann. Das „Blocking“ wieder durchzuführen sollte für die Probe auch kein Problem darstellen, da der Hybridisierungsschritt, der die labilen Fluorophore verwendet, erst nach dem „Blocking“ erfolgt. Wie in Abbildung 44 zu sehen wurden die 4 Stränge **DNA12^{unmodifiziert}**, **DNA13^{1xT_NPP}**, **DNA14^{2xT_NPP}** und **DNA15^{3xT_NPP}** immobilisiert und die Hybridisierung erfolgte jeweils mit **DNA16^{Dye495}** und **Sonde2**. Gut zu erkennen ist, dass die Hybridisierung mit **DNA16^{Dye495}** bei jedem der immobilisierten Stränge zu einer deutlichen Fluoreszenz führt. Leider ist auch zu sehen, dass die Hybridisierung der **Sonde2** schon bei **DNA12^{unmodifiziert}**, die keinerlei photolabile Schutzgruppen trägt und somit dem photolysierten Strang entspricht, zu einer deutlich geringeren Fluoreszenz führt. Dafür ist aber auch ein deutlicher Unterschied in der Helligkeit zwischen den Strängen mit photolabilen Schutzgruppen und dem ohne zu sehen, was bei der Hybridisierung mit **DNA16^{Dye495}** nicht der Fall ist. Wenn ein Verdrängungs-Assay möglich ist, dann sollte dies mit **DNA15^{3xT_NPP}** und **Sonde2** am vielversprechendsten sein.

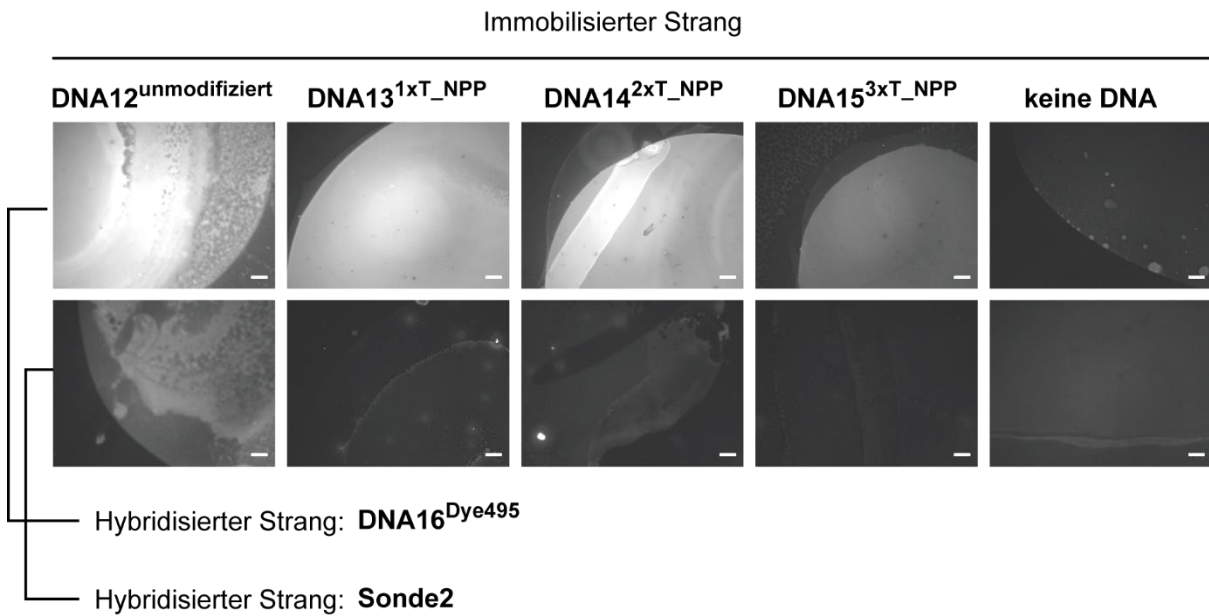


Abbildung 44: Immobilisierung von DNA12^{unmodifiziert}, DNA13^{1xT_NPP}, DNA14^{2xT_NPP} und DNA15^{3xT_NPP} bzw. keiner DNA und anschließende Hybridisierung mit DNA16^{Dye495} bzw. Sonde2.

Auch wenn dies in Abbildung 44 nur schlecht zu erkennen ist, wiesen sowohl die **Sonde1**, als auch die DNA16^{Dye495} Fluoreszenz an Stellen auf, an denen keine DNA immobilisiert wurde. Die Intensität dieser Fluoreszenz variierte bei verschiedenen Durchläufen. Allerdings stellt gerade dieses Anhaften oder Immobilisieren der Hybridisierungsprobe ein großes Problem für die Verwendung des Assays zur Quantifizierung der Zweiphotonen-Photolyse dar. Es würde zu falschen Messwerten führen, wenn die Hybridisierungs-Sonde nicht nur an den entschützten DNA-Strängen, sondern auch unspezifisch auf der gesamten Oberfläche bindet. Um dieses Problem in den Griff zu bekommen, wurden einige Wiederholungen und Veränderungen unternommen. So wurde zum einen versucht den Hybridisierungspuffer von SSC zu PBS zu ändern. Ebenfalls wurde versucht die Hybridisierungszeit so zu optimieren, dass zwar ausreichend Zeit für die Hybridisierung besteht, aber die Immobilisierung oder Anhaftung der Hybridisierungs-DNA nicht erfolgt. Dazu wurde nach 1, 2 und 3 h die Hybridisierung unterbrochen. Leider zeigte sich bei beiden Puffern und auch bei der Zeitvariation, dass die Hybridisierungs-DNA auf der nicht immobilisierten Oberfläche zurückbleibt. Es wurde auch versucht durch Zugabe von Methylamin einen weiteren „Blocking“-Schritt einzuführen, aber auch dieser führte nicht zum gewünschten Ergebnis. Nach Anfrage beim Hersteller der Objektträger, wurde mitgeteilt, dass es sich bereits bei der Immobilisierungen immer um eine Mischung aus kovalenter Verknüpfung der DNA und Eintrocknen der Probe auf der Oberfläche handele. Das bedeutet dann auch, dass an Stellen,

an denen die Hybridisierungs-Probe verdampft, was auch in der Feuchtigkeitskammer nicht komplett unterbunden werden kann, die DNA auf der Oberfläche zurückbleibt.

Obwohl dieses Problem nicht behoben werden konnte, wurde ein Versuch unternommen den Verdrängungs-Assay mit **DNA15^{3xT-NPP}** auf der Oberfläche durchzuführen. Dazu wurde die Fluoreszenz des Objektträgers nach der Immobilisierung und der Hybridisierung mit **Sonde2** im Mikroskop gemessen, dieser dann mit UV-Licht im Mikroskop belichtet und anschließend wieder mit der **Sonde2** versehen. Im Mikroskop war ein minimaler Fluoreszenzunterschied zu erkennen, der aber bereits auf den Fotos nicht mehr gut erkennbar war. Aus diesem Grund wurde auch dieser Ansatz verworfen.

3.2.4. Detektion der Zweiphotonen-Photolyse durch Fluoreszenz-Quenching einer photolabilen Schutzgruppe

Aufgrund der vielen Probleme mit dem Verdrängungs-Assay wurde nach einer Alternative gesucht. In einer Kooperation von Dr. Tatjana Stöß aus unserem Arbeitskreis mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Robert Tampé wurde ein NDBF geschütztes Glutathion synthetisiert. Dieses konnte nach der Photolyse an GSH binden, welches zu Visualisierungszwecken mit eGFP fusioniert wurde. Da reines Glutathion mittels HPLC schwer zu analysieren ist, wurde zur Verfolgung der Photolyse per HPLC des NDBF-geschützten Glutathions dessen Thiofunktion mit einem ATTO565-Fluorophor markiert. Dabei zeigte sich, dass in Anwesenheit der NDBF-Schutzgruppe die Fluoreszenz des Farbstoffs deutlich geringer ausfällt, als nach der Abspaltung des NDBFs. Dieses Phänomen beruht wahrscheinlich auf einem Quenchingeffekt des NDBFs und wurde sich bei den Zweiphotonen-Messungen zu Nutze gemacht. Mit **49** (Abbildung 45a) war es möglich im gleichen Messaufbau wie Abbildung 35b die Fluoreszenzzunahme bei entsprechender eingestrahelter Leistung zu messen. Es zeigte sich bei der Auftragung der Fluoreszenz gegen die eingestrahelte Leistung ein quadratischer Zusammenhang, der in Abbildung 45b zu sehen ist. In c) ist die Fluoreszenzintensität aufgetragen, die die Probe vor und nach der „Messung b)“ zeigte, sowie die Fluoreszenzintensität die durch totale Belichtung der Probe erreicht werden konnte. Ausgehend von der Quenching-Eigenschaft des NDBFs wurde überlegt, ob sich dieser auch hier zu Nutze gemacht werden kann.

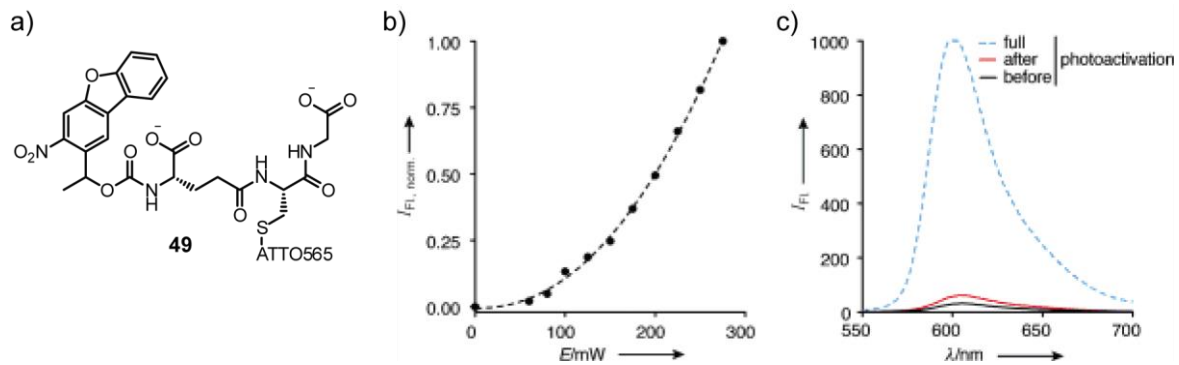


Abbildung 45: a) NDBF-geschütztes und ATTO565-markiertes Glutathion (GSH^{NDBF}). b) Messung der Fluoreszenz von ATTO565 (Anregung bei 532 nm) abhängig von der Photolyse des NDBF durch die eingestrahlte Leistung bei 730 nm. c) Fluoreszenz-Spektrum vor und nach Messung b), sowie nach kompletter Photolyse mit 365 nm. Abbildung wurde aus Tampe *et al.* übernommen.^[94]

3.2.4.1. Messung der Fluoreszenzänderung durch Photolyse eines mit NDBF und ATTO565 modifizierten Tetramers

Dazu wurde ein verkürzter DNA-Strang von 4 Basen synthetisiert, der neben der dC^{NDBF}-Base eine dT-Base mit Aminolinker enthält. An diesen Aminolinker wurde ATTO565 über einen NHS-Ester angebracht.

Tabelle 7 Für diese Studie synthetisierte Sequenz.

Name	Sequenz
DNA18 ^{Tetramer}	T T ^{ATTO565} C ^{NDBF} T

Bei der Messung der Fluoreszenzunterscheide der DNA18^{Tetramer} vor und nach Photolyse mit 365 nm ergab sich leider nur eine 20% höhere Fluoreszenz. Obwohl dieser Wert nicht sehr hoch ist, wurde trotzdem versucht, ob durch die Zweiphotonen-Belichtung die Zunahme an Fluoreszenz detektierbar ist und mit DNA18^{Tetramer} die quadratische Abhängigkeit der Photolyse von der eingestrahlten Leistung gezeigt werden kann.

Es wurde mehrfach versucht eine quadratische Abhängigkeit der Photolyse von der eingestrahlten Leistung zu erhalten, doch lieferten alle durchgeführten Messungen kaum bis keine Fluoreszenzzunahme.

Daraus kann geschlossen werden, dass die 20%ige Fluoreszenzzunahme nach vollständiger Photolyse nicht ausreicht um belastbare Messergebnisse bei der Zweiphotonen-Photolyse zu erhalten.

3.2.4.2. Messung der Fluoreszenzänderung durch Photolyse eines mit NDBF und ATTO565 modifizierten Monomers

Nach den Experimenten mit dem Tetramer, stellte sich die Frage, warum hier nicht auch die starken Quenchereigenschaften der NDBF-Schutzgruppe erkennbar sind. In Abbildung 46 sind die mit Discovery-Studio visualisierten Strukturen von GSH^{NDBF} und dem Tetramer $^{\text{hNDBF}}$ dargestellt.

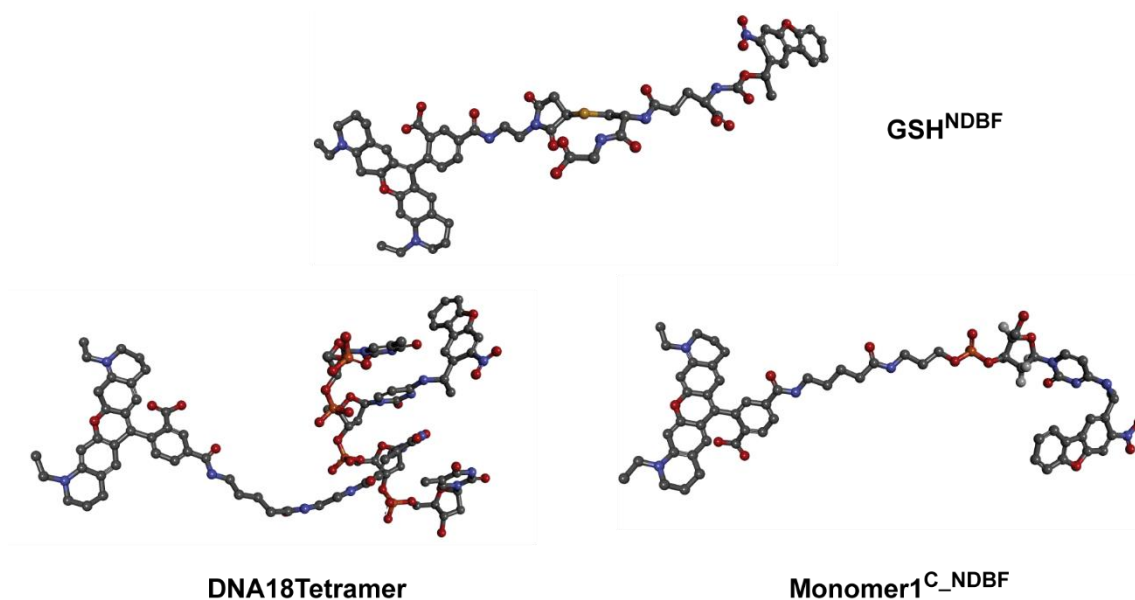


Abbildung 46: Strukturen von GSH^{NDBF} , $\text{DNA18}^{\text{Tetramer}}$ und $\text{Monomer1}^{\text{C-NDBF}}$ visualisiert mit Discovery-Studio.

Zu erkennen ist, dass beim Tetramer $\text{DNA18}^{\text{Tetramer}}$ die Nucleoside die NDBF-Schutzgruppe und den ATTO565-Farbstoff voneinander trennen. Beim GSH^{NDBF} liegen die Schutzgruppe und der Farbstoff dagegen in einer Reihe und das System verfügt über drehbare Bindungen, durch die NDBF und ATTO565 noch näher aneinander gelangen könnten, was das Quenching positiv beeinflussen würde.

Aus diesem Grund wurde ein neues Modell entwickelt, welches dem GSH^{NDBF} -ATTO565-Konstrukt besser entsprechen sollte. Es wurde sich für ein Minimalmotiv entschieden, welches möglichst wenig weitere Basen oder Aromaten aufweisen sollte, welche das System

beeinflussen könnten. Das Ergebnis ist ein Monomer (**Monomer1^{C-NDBF}**) aus dC^{NDBF} , welches am 3'-Ende eine Aminomodifikation aufweist, an die der ATTO565-NHS-Ester koordiniert wird. Diese Struktur ähnelt rein zeichnerisch dem GSH^{NDBF} -ATTO565-Konstrukt mehr als das Tetramer **DNA18^{Tetramer}**, wie in Abbildung 46 zu erkennen ist. Die Synthese des dC^{NDBF} -Monomers **Monomer1^{C-NDBF}** erfolgte über Festphasen-Synthese unter Zuhilfenahme von Amino-Linker-Festphasenmaterial. In einer anschließenden Kupplungsreaktion erfolgte die Reaktion des ATTO565-NHS-Esters mit der Aminofunktion (siehe Abbildung 47).

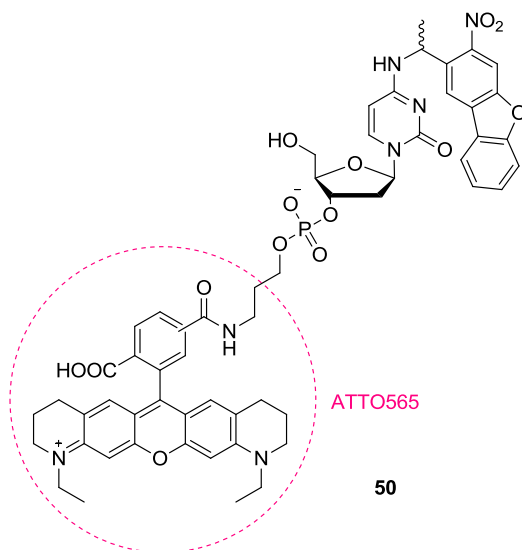


Abbildung 47: Strukturformel des **Monomer1^{C-NDBF}**.

Die Messung der Fluoreszenz der Probe vor und nach Belichtung mit 365 nm ergab eine etwa 18fache Fluoreszenzzunahme, was dafür spricht, dass diese Probe einen interessanten Kandidaten für die Messung der quadratischen Abhängigkeit der Photolyse von der eingestrahlten Leistung darstellt. Da bereits bei den Messungen mit den Doppelstrang-Sonden beobachtet wurde, dass die Probe nur im schmalen Laserstrahl des 532 nm-Lasers angeregt wurde, und so die Detektion schwierig war, wurde der Messaufbau ein wenig verändert. Die geringe Breite des Fluoreszenzanregungslasers ist durch den Messaufbau bedingt, da hier der Anregungslaser ebenfalls durch die für die Zweiphotonen-Anregung nötige Fokussierungslinse geleitet wird. Der neue Aufbau ist in Abbildung 48 zu sehen.

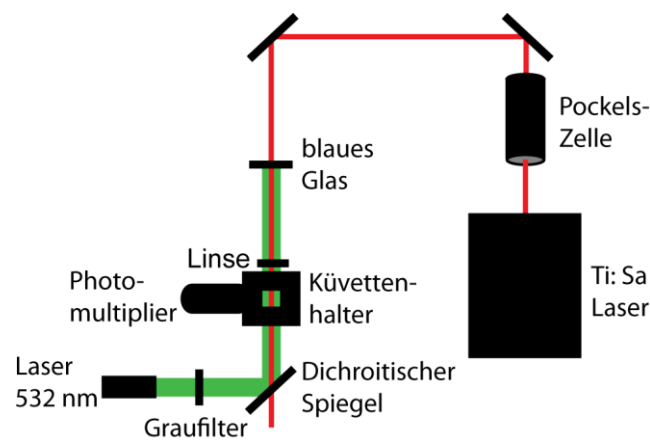


Abbildung 48: Schematische Zeichnung des veränderten Bestrahlungs-Aufbaus.

Hier befindet sich der 532 nm-Laser in der entgegengesetzten Richtung zum IR-Laser und wird durch einen dichroitischen Spiegel durch die Küvette geleitet. Dieser Spiegel wiederum lässt den IR-Laser unbeeinflusst, so dass dessen Strahlung durch eine dahinterliegende Strahlfalle abgefangen werden kann. Dieser Aufbau hat den Vorteil, dass der Fluoreszenzanregungslaser als breiter Strahl durch die Küvette verläuft und so nahezu das komplette Probenvolumen ausleuchtet. Da nun aber der 532 nm Laser über die Spiegel in die Laserquelle strahlen würde, wurde ein blaues Glas eingebaut, das zwar das Licht des IR-Lasers unberührt lässt, aber den grünen Laser nicht durchlässt.

Für die Messungen an diesem Setup wurde das **Monomer1^{C-NDBF}** in PBS-Puffer (7.5 µM) in einer Küvette mit 13 µL Fassungsvermögen mit steigender Leistung für jeweils 2 min belichtet. Beobachtet wurde dabei, dass die erhaltenen Messwerte direkt nach der Belichtung am höchsten sind und sich danach auf einen niedrigeren Wert einpendeln. Weiterhin zeigte sich, dass die Messreihen am konstantesten aussahen, wenn die Intensitätserhöhungen und entsprechenden Messungen am Stück durchgeführt wurden, da sonst die Messpunkte nach einer längeren Unterbrechung nicht mehr in den Trendverlauf der vorherigen Messpunkte passten.

Bei der Variation der Leistung ergaben sich die Messwerte in Abbildung 49a. Durch Fitten der Messpunkte mit der Formel $y = a + bx^c$ ergab sich für c der Wert 2.13. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die Photolyse des **Monomer1^{C-NDBF}** quadratisch zur eingestrahlten Leistung verhält und es sich tatsächlich um einen Zweiphotonen-Effekt handelt.

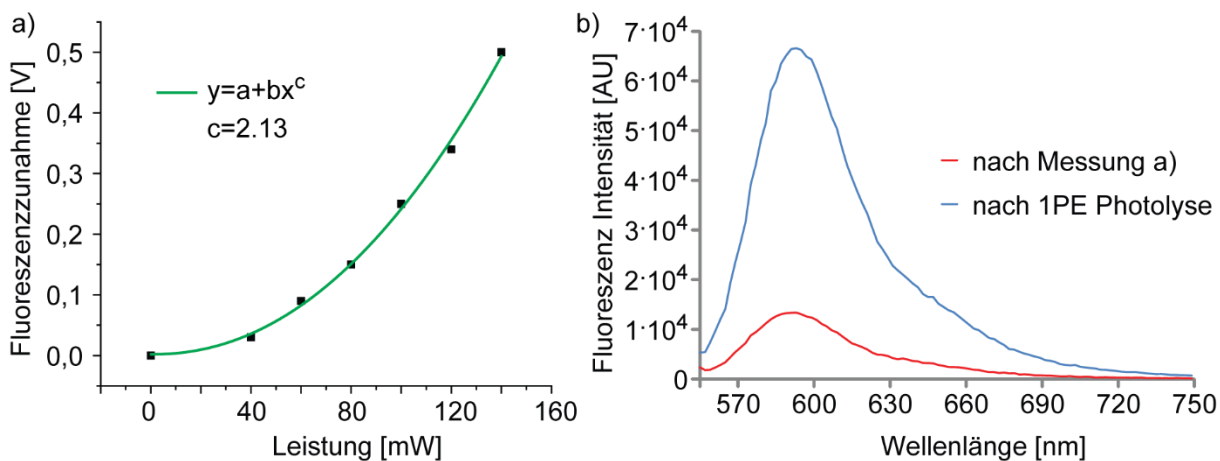


Abbildung 49: Messung der Fluoreszenzzunahme des **Monomer1^{C-NDBF}** nach zweiminütiger Belichtung bei 730 nm mit steigender Leistung. Die Messwerte wurden mit der gezeigten Formel gefittet und für c der Wert 2.13 erhalten. b) Nach der Messung der Leistungsabhängigkeit wurde die Fluoreszenz dieser Probe direkt und nach 5minütiger Photolyse mit 365 nm am Platerader vermessen.

Um sicher zu stellen, dass durch die Belichtung nur ein geringer Teil der Probe photolysiert wird und somit die Messwerte auch belastbar sind, und nicht durch nicht mehr verfügbare Probe verfälscht wird, wurde die Fluoreszenz der Probe, mit der die quadratische Abhängigkeit von der Leistung gezeigt wurde direkt nach den Messungen und nach 5minütiger Photolyse mit 365 nm am Platerader vermessen. Es zeigt sich, dass nur ein Bruchteil der Probe bei den Messungen photolysiert wurde und die Werte somit glaubwürdig erscheinen. Leider konnte beim Versuch diese Messreihe weitere zweimal zu reproduzieren kein weiterer solch quadratischer Verlauf erhalten werden. Dies liegt aber vermutlich an den immer sehr schwankenden Messwerten und den nur sehr geringen Fluoreszenzzunahmen. Um trotzdem bzw. weiterhin zeigen zu können, dass es sich hier um einen Zweiphotonen-Effekt handelt, der zur Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe führt, lag die Überlegung nahe, ähnliche Experimente in 3D-Hydrogelen zu unternehmen, wie sie für das GSH^{NDBF} von Dr. Volker Gatterdam durchgeführt wurden. Bei dem verwendeten Hydrogel handelt es sich um ein Polyvinylalkohol (PVA)-Polyethylenglycol (PEG)-Netzwerk, das sich durch die Reaktion von Thiol-PEG mit Maleimid-PVA bildet und in Abbildung 50 schematisch dargestellt ist. Diese Hydrogele sind kommerziell erhältlich.

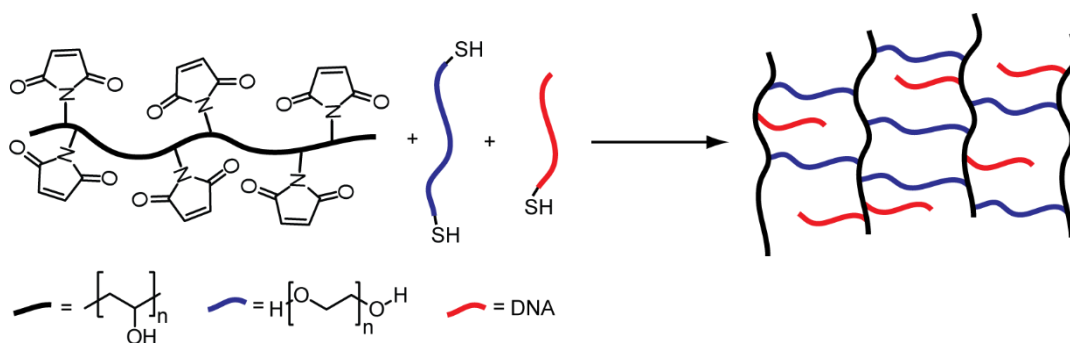


Abbildung 50: Schematische Darstellung der Komponenten Thiol-PEG-Thiol (blau) und Maleimid-PVA (schwarz), die durch Reaktion miteinander ein Hydrogel bilden, in das vor der Polymerisation Thiol-modifizierte DNA (rot) immobilisiert werden kann. (Abbildung modifiziert nach *Cellendes*)

Um nun eine Probe in den Hydrogelen zu immobilisieren, muss diese eine freie Thiofunktion aufweisen, die zunächst mit einem Überschuss Maleimid-PVA umgesetzt wird, so dass auch nach dieser Reaktion noch freie Maleimide vorhanden sind, an die im Anschluss der Thiol-PEG-Linker angreifen kann und für die Quervernetzung des Hydrogels sorgt. Zu diesem Zweck wurde das **Monomer2^{C-NDBF}** synthetisiert, das ebenfalls aus dC^{NDBF} besteht, diesmal aber mit einem 3'-Dithiol-Modifizier als Festphasenmaterial und der Aminofunktion am 5'-Ende synthetisiert wird. Auch diese Proben wurden nach der HPLC-Aufreinigung mit ATTO565-NHS-Ester markiert. Um aus der Dithiofunktion ein freies reaktives Thiol zu erhalten, wurde die Probe im Anschluss mit DTT für 1,5 h reduziert und erneut über RP-HPLC aufgereinigt. Um die Dimerisierung der Thiole zu verlangsamen wurden diese Proben bei Nichtgebrauch im Gefrierschrank bei 80 °C gelagert und nach längerer Lagerung wurde die Reduktion wiederholt, bevor die Proben verwendet wurden.

Da die Hydrogele im Mikroskop belichtet werden sollen, müssen sie zum einen von Flüssigkeit umgeben sein, damit sie nicht austrocknen, zum anderen müssen sie auf sehr dünnen Böden sitzen, da das hier verwendete Mikroskop ein inverses Mikroskop ist. Da die für die IR-Belichtungen geeigneten Objektive meist einen sehr geringen Arbeitsabstand aufweisen, ist der Einsatz von Objektträgern nicht möglich. Angeboten haben sich für diese Anwendungen *Coverglass chambers*, die die Bodendicke eines Deckglases aufweisen.

Das **Monomer2^{C-NDBF}** wurde im Hydrogel immobilisiert und im Anschluss auf dem Mikroskop platziert, wo es mit einem Titan-Saphir-Laser belichtet wurde. Der Messaufbau ist in Abbildung 51 gezeigt und wird zur besseren Differenzierung **Laser-Setup1** genannt. Um Formen mit dem Laser im Hydrogel abrastern zu können, wird der Freistrah über ein Galvosystem, bestehend aus zwei motorisierten Spiegeln, bewegt. Dieses wurde von der Firma Rapp entwickelt und eingebaut.

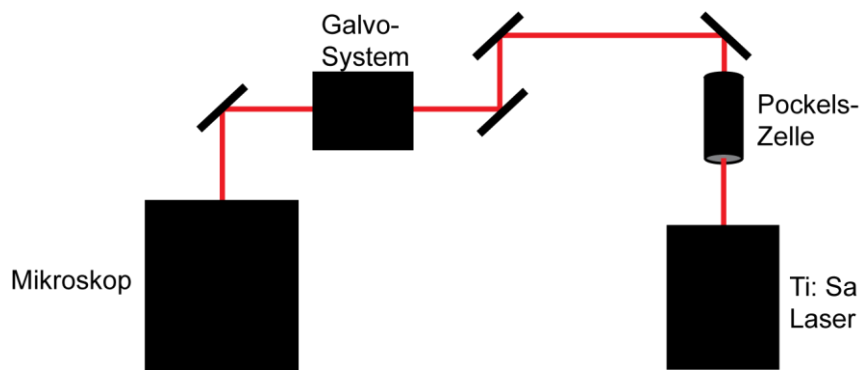


Abbildung 51: Schematische Zeichnung des Bestrahlungs-Aufbaus zur Zweiphotonen-Photolyse im Mikroskop. Dieser Messaufbau wird als **Laser-Setup1** bezeichnet.

Über die zugehörige Software können Strukturen wie Kreise oder Quadrate abgescannt werden, aber auch das Designen von eigenen Strukturen ist damit möglich. In Abbildung 52 sind die ersten Belichtungs-Versuche zu sehen, bei denen mit 730 nm verschiedene Strukturen abgescannt wurden. Die Aufnahmen wurden durch die anschließende Fluoreszenzanregung mit der Uvico-Lampe und entsprechenden Filterwürfeln am gleichen Mikroskop erzeugt. Es handelt sich dabei um Weitfeldfluoreszenzaufnahmen. Erfreulicherweise sind die Stellen, an denen Photolyse stattgefunden hat, gut an der dort deutlich erhöhten Fluoreszenz zu erkennen.

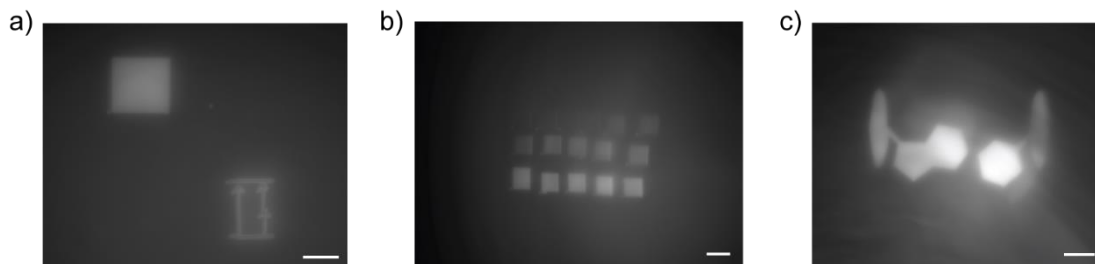


Abbildung 52: Erste Belichtungsversuche der **Monomer2^{C-NDBF}** enthaltenden Hydrogele mit 730 nm am **Laser-Setup1**. a) Ein Quadrat und ein simplifiziertes in der Software freihandgezeichnetes Energie-Diagramm wurden photolysiert. b) Zeigt Quadrate die mit zunehmender Leistung belichtet wurden (10-100 mW in 10er-Schritten und 120-200 mW in 20er-Schritten). In c) wurden vereinfachte Basenpaare in unterschiedliche Ebenen des Hydrogels photolysiert, von denen nur eine exemplarisch abgebildet ist. (Weitfeldfluoreszenzaufnahmen, Maßstab 100 μm)

Zu sehen sind in a) ein Quadrat und ein vereinfachtes freihandgezeichnetes Energie-Diagramm, in b) wurden Quadrate mit steigender Leistung (10-100 mW in 10er-Schritten und 120-200 mW in 20er-Schritten) photolysiert, aus denen im Prinzip auch eine Abhängigkeit der

Photolyse von der Leistung abgeleitet werden könnte. Problematisch ist hier allerdings, dass je nach Position der Quadrate im Sichtfeld des Mikroskops, die Ausleuchtung unterschiedlich stark erfolgt, was eine Quantifizierung dieser Fluoreszenzintensitäten schwierig macht. In c) wurden mehrere vereinfachte Basenpaare in unterschiedliche Höhen des Hydrogels photolysiert. Gut zu erkennen ist, dass außer dem ersten Basenpaar, im Hintergrund hellere Basenpaare zu erkennen sind. Um zu sehen, ob sich die Basenpaare auch wirklich in unterschiedlichen Höhen befinden und nicht ineinander übergehen, mussten konfokale Aufnahmen des Basenstapels aufgenommen werden. Zu diesem Zweck wurde das ebenfalls am Mikroskop verbaute Spinning-Disk-System verwendet. Bei diesen Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Basenpaare zwar in unterschiedlichen Höhen liegen, aber ihr Abstand zueinander so gering ist, dass nahezu immer die tieferen oder höheren Basenpaare präsent sind. Insgesamt kann aber festgehalten werden, dass die Photolyse der Schutzgruppen im Hydrogel erfolgreich ist und die photolysierten Strukturen durch deren erhöhte Fluoreszenz gut zu erkennen sind.

Um nun zu sehen, ob der Einsatz der photolabilen Schutzgruppe als Quencher der Fluoreszenz auch bei anderen Schutzgruppen erfolgreich sein könnte, wurde auch dG^{ANBP} als **Monomer3^G-ANBP** mit einem 3'-Dithiol- und einem 5'-Aminomodifier synthetisiert (siehe Abbildung 53)

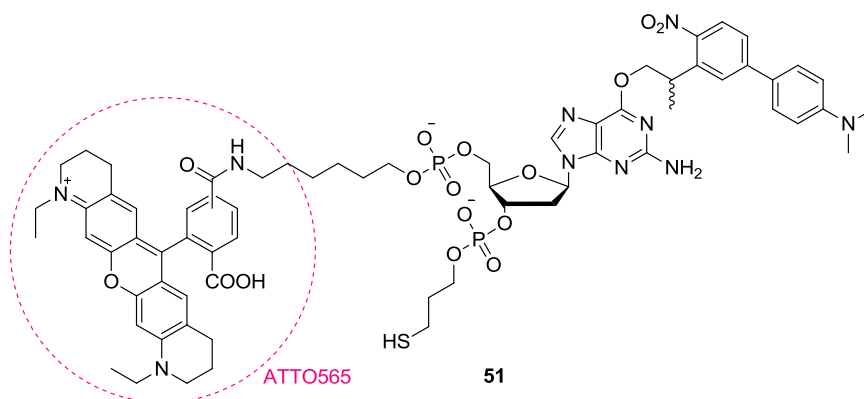


Abbildung 53: Strukturformel des **Monomer3^G-ANBP**.

Nach dem Markieren der Probe mit ATTO 565 wurde zunächst die Fluoreszenzzunahme nach Photolyse bestimmt. Diese ergab eine 20fache Fluoreszenzzunahme. Nach Thiolspaltung wurde auch diese Probe in einem Hydrogel immobilisiert, am Mikroskop belichtet und im Anschluss eine Weitfeldfluoreszenzaufnahme gemacht. Die Bilder in Abbildung 54 zeigen exemplarisch zwei verschiedene Photolyseergebnisse. In a) wurde die Wellenlänge von links nach rechts von 950 nm, über 800 nm bis hin zu 730 nm variiert. Die Leistung des Lasers

betrug jeweils etwa 20 mW und jedes Quadrat wurde 10 Mal gescannt. Hier zwar schlecht zu erkennen, aber die Photolyse mit 950 nm führte zur Abspaltung der Schutzgruppen und zeigt eine damit verbundene Fluoreszenzzunahme. Besser zu sehen ist die Photolyse eines Rechtecks mit 950 nm in b), bei dem die Bestrahlung mit 85 mW erfolgte.

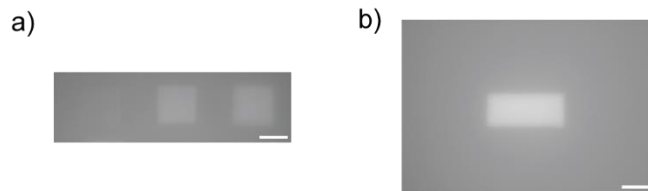


Abbildung 54: Photolyse des **Monomer3^{G-ANBP}** immobilisiert im Hydrogel mit a) 950, 800 und 730 nm (jeweils 20 mW, 10 Scans) und b) 950 nm (85 mW, 10 Scans) am **Laser-Setup1**. (Weitfeldfluoreszenzaufnahmen, Maßstab 20 µm)

Somit konnte gezeigt werden, dass beide Monomere, durch Einstrahlen mit einem IR-Laser photolysiert werden können. Da die photolysierten Objekte auf eine geringe Dicke beschränkt waren, liegt die Annahme einer Zweiphotonen-induzierten Photolyse nahe. Mit Hilfe dieser Probe konnte erstmals innerhalb dieser Doktorarbeit ein Baustein erfolgreich immobilisiert werden und dort auch photolysiert werden, was mit den silanisierten Oberflächen nicht funktionierte. Mit dieser neuen Immobilisierungsmethode und dem Wissen, dass das hier gewählte Modellsystem nur noch geringe Parallelen mit einem Oligonukleotid aufweist, war nun das Ziel diese Art der Immobilisierung auf den oben bereits verwendeten Verdrängungs-Assay anzuwenden. Vorteilhaft an diesem Assay wäre, dass so tatsächlich die Hybridisierung eines Gegenstrangs reguliert werden könnte. Hybridisierung ist bei biologischen Anwendungen, neben der Wechselwirkung eines Stranges mit Proteinen, die Hauptursache für Regulation. Somit würde der Verdrängungs-Assay ein sehr gutes Modellsystem für die Hybridisierungs-Kontrolle durch Zweiphotonen-Anregung darstellen.

3.2.5. Verdrängungs-Assay im Hydrogel und in Zellen

Der Assay ist in Abbildung 55a schematisch dargestellt. Ebenfalls schematisch dargestellt ist in Abbildung 55b das Belichtungs-Experiment im Mikroskop. In der Kammer befindet sich das Hydrogel umgeben von der Doppelstrang-Sonde und der Photolyse-Laser wird durch das Objektiv in die Probe fokussiert.

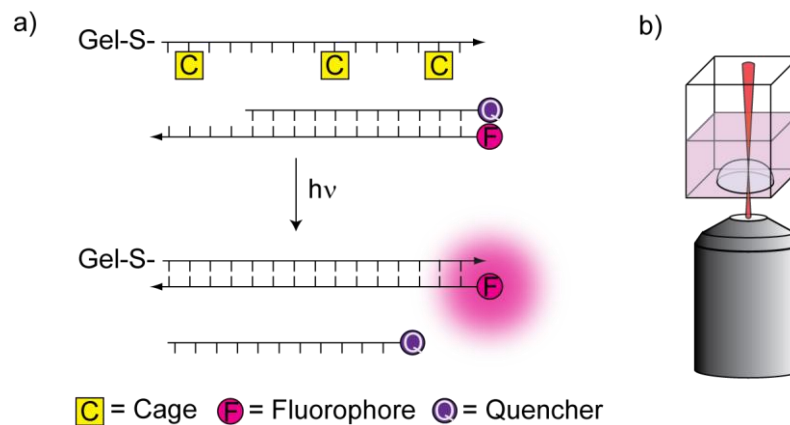


Abbildung 55: Schematische Darstellung a) des Verdrängungs-Assays mit 3 photolablen Schutzgruppen und einer Immobilisierung des photolabil geschützten Strangs im Hydrogel über eine Thiolmodifikation und b) der Belichtung des Hydrogels über ein Objektiv im Mikroskops.

Für den Assay mussten die photolabil geschützten Stränge mit einem Thiol-Linker am 5'-Ende synthetisiert werden. Neben einem 15mer DNA-Strang mit einer photolabilen Schutzgruppe, wurde ein weiterer mit 3 photolablen Schutzgruppen synthetisiert, um sicherzustellen, dass die Wechselwirkung der Doppelstrang-Sonde mit dem photolabil geschützten Strang minimal ist. Als photolabile Schutzgruppe für diese Stränge, wurde das zu diesem Zeitpunkt von Xenia Weyel im Rahmen ihrer Masterarbeit^[125] neu auf dT-Nukleoside synthetisierte DEACM verwendet, da es deutlich leichter synthetisch zugänglich ist als das NDBF und somit für spätere biologische Anwendungen einen guten Kandidaten darstellen könnte. Für die Synthese der Stränge wurde das dT^{DEACM}-Phosphoramidit verwendet, dessen Vorstufe von Xenia Weyel zur Verfügung gestellt wurde. In Abbildung 56 ist die Struktur des dT^{DEACM}-Nukleotids, eingebaut in ein Oligonukleotid, dargestellt.

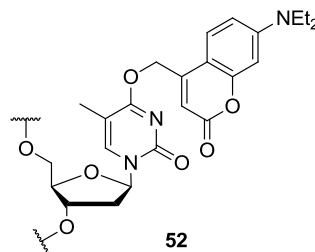


Abbildung 56: Struktur von dT^{DEACM}, eingebaut in ein Oligonukleotid.

Für die Doppelstrang-Sonde wurden ein 5'-ATTO565-markierter Strang und ein 3'-BHQ2-markiertes 11mer und 12mer hergestellt. Die Sequenzen der hier verwendeten Stränge sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8 In diesem Verdrängungs-Assay verwendete Sequenzen.

<i>Name</i>	<i>Enthalten</i>	<i>Sequenz</i>
DNA19 ^{1xT_DEACM}		HS-GCA TAA AT ^{DEACM} A AAG GTG
DNA20 ^{3xT_DEACM}		HS-GCA T ^{DEACM} AA AT ^{DEACM} A AAG GT ^{DEACM} G
Sonde3	DNA21 ^{ATTO565}	ATTO565-NH-(CH ₂) ₆ -CAC CTT TAT TTA TGC
	DNA22 ^{BHQ2_12}	TAAATAAAGGTG-BHQ2
DNA23 ^{BHQ2_11}		AAATAAAGGTG-BHQ2

Bei ersten Fluoreszenz-Messungen am Platerreader mit **DNA19**^{1xT_DEACM} und **DNA20**^{3xT_DEACM} zeigte sich, dass die einfach geschützte **DNA19**^{1xT_DEACM} vor und nach Photolyse nahezu die gleiche Fluoreszenz aufweist. Beim dreifach geschützten Strang **DNA20**^{3xT_DEACM} konnte dagegen ein starker Fluoreszenzunterschied vor und nach Photolyse beobachtet werden. Auch bei ersten Hydrogelexperimenten zeichnete sich dasselbe Bild ab. Die **DNA19**^{1xT_DEACM} zeigte beim Belichten keine Fluoreszenzzunahme, die **DNA20**^{3xT_DEACM} dagegen schon. Um das optimale Fluoreszenzverhältnis der photolysierten Probe zur geschützten Probe zu erhalten, wurden verschiedene Stoffmengenverhältnisse zwischen Fluorophor-markiertem- zum Quencher-Strang getestet. Auch die optimale Länge des Quencher-Strangs wurde getestet um die optimale Duplex-Sonde zu erhalten. In Abbildung 57 ist die Fluoreszenz der Sonde in Anwesenheit des geschützten und des belichteten Strangs aufgetragen, und die daraus resultierende relative Fluoreszenz-Zunahme dargestellt. Zu sehen ist, dass die Fluoreszenzzunahme bei Verwendung der **DNA23**^{BHQ2_11} vom Fluorophor zu Quencher-Verhältnis von 1:1.2 über 1:1.5 zu 1:2 deutlich zunimmt. Bei Verwendung von **DNA22**^{BHQ2_12} lieferten die Verhältnisse 1:1.5 und 1: 2 die höchsten relativen Fluoreszenzzunahmen. Für die weiteren Experimente wurde deshalb die Doppelstrang-Sonde **Sonde3** aus dem 1.5fachen Überschuss der **DNA22**^{BHQ2_12} zur **DNA21**^{ATTO565} hergestellt.

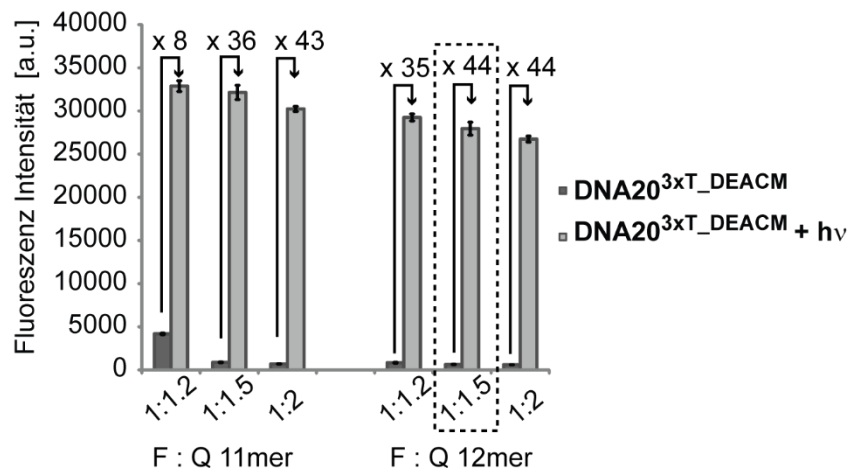


Abbildung 57: Fluoreszenzzunahme bei Bestrahlung von **DNA20^{3xT}-DEACM** bei Verwendung von verschiedenen Stoffmengenverhältnissen der **DNA21^{ATTO565}** zu **DNA23^{BHQ2_11}** bzw. **DNA22^{BHQ2_12}**.

Für die Experimente im Hydrogel wurden wiederum die kommerziell erwerblichen Hydrogele der Firma *Cellendes* verwendet. Die Spaltung des Dithiols erfolgte zunächst ebenfalls mit DTT. Da bei der HPLC-Analyse keine Retentionsverschiebung beobachtet werden konnte und auch die Immobilisierung im Hydrogel nicht erfolgreich ablief, wurde die Reduktion mit TCEP durchgeführt. Hier konnte eine Retentionsänderung hin zu niedrigeren Zeiten beobachtet werden und auch die anschließende Immobilisierung der **DNA20^{3xT}-DEACM** lief erfolgreich ab. Erste Belichtungen mit UV-Licht im Hydrogel am **Laser-Setup1** zeigten erfreulicherweise, dass auch mit diesem System eine Fluoreszenzzunahme sichtbar wird. Wurden die Hydrogele frisch angesetzt und die **Sonde3** erst nach der Belichtung zugegeben, konnte die Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit beobachtet werden, so wie es in **Abbildung 58** zu sehen ist.

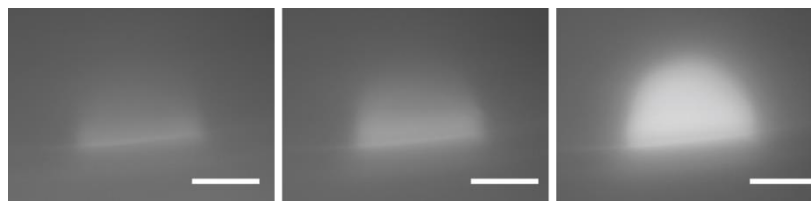


Abbildung 58: Weitfeldfluoreszenzaufnahme eines am **Laser-Setup1** belichteten Halbkreises (mit UV-Licht) in einem **DNA20^{3xT}-DEACM** enthaltenden Hydrogel. Die **Sonde3** wurde erst nach der Belichtung zugegeben und drei Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommen. (Maßstab 100 µm)

Nachdem klar war, dass der Assay im Hydrogel funktioniert, wurde als nächstes überprüft, ob sich die Photolyse durch die Zweiphotonen-Anregung auch quadratisch zur eingestrahlenen

Leistung verhält. Dazu wurden nebeneinander Striche mit jeweils zunehmender Intensität photolysiert (siehe Abbildung 59a). Damit die Daten nicht durch Photobleichung des Fluorophors verfälscht werden, wurde die Sonde erst nach der Photolyse zugegeben. Im Anschluss wurde über diese Striche ein Intensitätsprofil erstellt, welches mit Hilfe vom *Origin Peak-Analyser* ausgewertet wurde. Diese Messung wurde 3-mal durchgeführt und das Ergebnis in Abbildung 59b abgebildet.

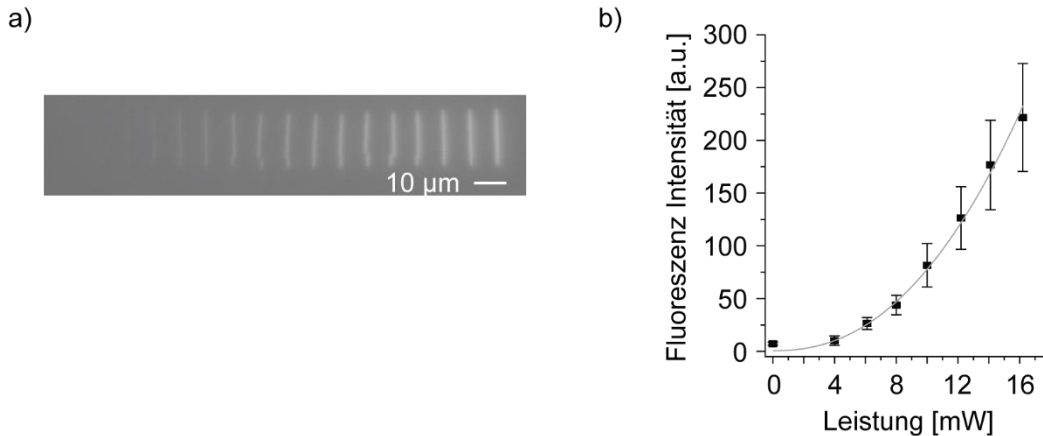


Abbildung 59: Ein DNA20^{3xT}-DEACM enthaltenden Hydrogel wurde mit zunehmender Laserleistung mit 730 nm am **Laser-Setup1** bestrahlt. Anschließend wurde die Sonde3 zugegeben und a) eine Weitfeldfluoreszenzaufnahme durchgeführt. In b) ist die Fluoreszenzintensität der ausgewerteten Bilder aus a) gegen die Leistung aufgetragen.

Erfreulicherweise liefert der Fit $y = a + bx^c$ über die Werte für c einen Wert von 2.28 ± 0.13 , was einer quadratischen Abhängigkeit der Photolyse von der Leistung entspricht. Das wiederum beweist, dass es sich hier tatsächlich um einen Zweiphotonen-Effekt handelt. Zu Beginn dieser Doktorarbeit war es Ziel mit einem Fluoreszenz-basiertem Assay, neben dem Beweis der Zweiphotonen-Photolyse durch die quadratische Abhängigkeit auch den Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt zu bestimmen. Im Falle einer fluoreszierenden Referenz muss zu diesem Zweck Formel 3.2 gelöst werden:^[79]

$$\delta_u = \frac{N_P \varphi Q_{f2} \delta_{aF} C_F}{\langle F(t) \rangle C_P} \quad (3.2)$$

wobei δ_u für den Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt, N_P für die Photolyserate der Probe, φ für die Kollektionseffizienz des Detektors, Q_{f2} für die Fluoreszenzquantenausbeute, δ_{aF} für den Zweiphotonen-Absorptionskoeffizienten, C_F für die Konzentration der Referenz, $\langle F(t) \rangle$ für die über die Zeit gemittelte Fluoreszenz und C_P für die Konzentration der Probe steht.^[79]

Von der Referenz müssen neben der Konzentration, die Quantenausbeute und der Zweiphotonen-Einfangquerschnitt bekannt sein. Für diesen Zweck würde sich Fluoreszein anbieten, dessen Zweiphotonen-Einfangquerschnitt und Quantenausbeute bekannt sind. Möchte man allerdings in dem hier verwendeten Assay, also in einem Hydrogel, die Bestimmung des Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt bestimmen, so treten dabei mehrere Probleme auf. Ein erstes Problem ist, dass die Referenz-Substanz ebenfalls im Mikroskop vermessen werden müsste. Da immobilisieren eher schwierig sein dürfte, müssten diese Messungen in Lösung stattfinden, wodurch Diffusionseffekte erhebliche Probleme liefern dürften. Weitere Probleme liefert die zu-vermessende-Probe selbst. Da sie in einem Hydrogel immobilisiert vorliegt ist die Bestimmung der Photolyserate schwierig. Dazu müsste eine Art Kalibrierung durchgeführt werden, um die Intensität der Fluoreszenz mit dem Grad der Photolyse zu korrelieren. Ebenfalls problematisch ist, dass der Fluoreszenzunterschied zwischen geschützter DNA und photolysierter DNA nur bei einer dreifach geschützten DNA ausreichend groß war. Wird bei der Photolyse nur eine einzelne photolabile Schutzgruppe abgespalten, ist nicht klar wie sich das Fluoreszenzsignal verändert. Somit ist eine Bestimmung der Photolyserate durchaus schwierig. Auch ist die Fluoreszenzzunahme das Resultat einer zweiten, der Photolyse nachgeschalteten Reaktion. Aufgrund dieser Summe an Problemen schien es nicht ratsam einen Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt an einem so komplexen System zu untersuchen. Sinn machen diese Messungen meines Erachtens nach nur dann, wenn aus der Photolyse ein direkt messbares Signal resultiert, wie das z.B. bei Neurotransmittern der Fall ist. Aus diesem Grund wurde sich bewusst gegen die Messung der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte entschieden. Dies ist auch in Ordnung, da die Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte der in diesem Assay verwendeten Schutzgruppe bereits an anderen Systemen gezeigt wurden und es somit nicht zwingend erforderlich ist diese erneut zu messen.

Um trotzdem anschaulich zeigen zu können, dass der Photolyse ein Zweiphotonen-Effekt zu Grunde liegt, war es das Ziel, eine 3D-Figur im Hydrogel zu erzeugen. Es sollte die pyramidenförmige Spitze des Frankfurter Messeturms mit Hilfe von einem Rahmenstapel, mit zunehmender Höhe immer kleiner werdend, dargestellt werden. Bei den Versuchen dies zu realisieren, traten eine Reihe Probleme auf. Zum einen zeigte sich, dass die Software des Galvo-Systems die gezeichneten Rahmen in Sequenzen übersetzt, die dazu führen, dass die Rahmen unterschiedlich breit photolysiert werden (Abbildung 60a).

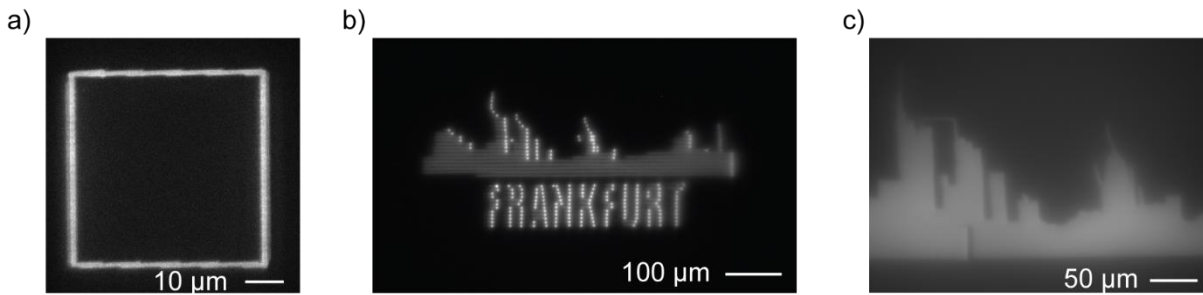


Abbildung 60: Weitfeldfluoreszenzaufnahmen eines **DNA20^{3xT}-DEACM^M** enthaltenden Hydrogels. a) Ein Rahmen und b-c) die Skyline von Frankfurt wurden am **Laser-Setup1** mit 780 nm photolysiert.

Ein weiteres Problem liegt ebenfalls in der Art und Weise wie das Galvo-System eine vorgegebene Struktur wie die Skyline in Abbildung 60b/c abscannt. Der Laser wird dabei zeilenweise von links nach rechts gefahren. Am rechten Rand wird kurz die Spannung der Pockels-Zelle auf 0 V gesetzt und anschließend die nächste Reihe von links nach rechts abgescannt. Leider ist die hier verbaute Pockels-Zelle so angeordnet, dass sie bei 0 V Spannung mehr Laserleistung durchlässt als beispielsweise bei 20 V. Dies hat zur Folge, dass bei der Photolyse die rechten Ränder des Objekts stärker belichtet werden und somit heller erscheinen (Abbildung 60b). Leider ist es von Seiten der Software der Firma Rapp nicht möglich die Spannung beim Ausschalten des Lasers am rechten Rand auf 20 V zu stellen, damit es dort nicht zur ungewollten Photolyse kommt. Eine Möglichkeit diese Artefakte zu umgehen ist den Laser bei 0 V zu betreiben, damit die Photolyse an allen Stellen gleichermaßen erfolgt. Die Probleme mit dem ungleichmäßigen Abrastern der Bereiche, die auch in Abbildung 60c zu sehen sind, dort sind Linien zwischen den Türmen zu sehen und die Türme knicken zum Teil zur Seite ab, konnten durch Variation der Scangeschwindigkeit in der Software in den Griff gekommen werden. Je langsamer die Scangeschwindigkeit eingestellt wird, desto genauer werden auch die gewünschten Bereiche abgescannt.

Weiterhin zeigte sich, dass beim Versuch die z-Schichten mit dem Spinning-Disk-System aufzunehmen, keine kontrastreichen Bilder erzeugt werden konnten, obwohl die Schichten bei den Weitfeld-Fluoreszenz-Aufnahmen optisch gut aussahen. In Abbildung 61 ist in a) die 3D-Projektion der optischen Schnitte mit unserem Spinning-Disk-System zu sehen und in b) die Aufnahme desselben Objekts mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM). Es sind jeweils eine x-y- und eine x-z-Projektion abgebildet. Im Vergleich dieser beiden Aufnahmen a und b ist deutlich zu erkennen, dass die Auflösung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops deutlich besser ist und deutlich geringere Hintergrundfluoreszenz zu sehen ist.

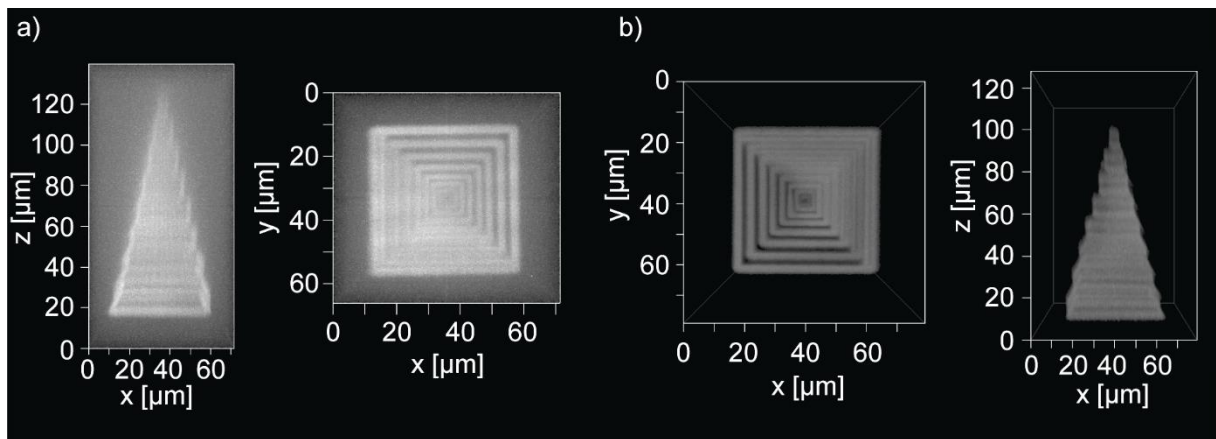


Abbildung 61: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen eines DNA20^{3xT_DEACM} enthaltenden Hydrogels, in das in verschiedenen Ebenen kleiner werdende Rahmen am **Laser-Setup1** photolysiert wurden (780 nm, 30 mW). a) Spinning-Disk-Aufnahme und b) CLSM-Aufnahme

Aufgrund all dieser Probleme wurden die nächsten Versuche zusammen mit Dr. Stephan Junek vom MPI für Hirnforschung an deren kommerziell erhältlichen Zweiphotonen-Setup (**Laser-Setup2** genannt) durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop mit integriertem gepulstem IR-Laser. Zunächst wurde ein Quadrat mehrfach abgescannt und gleichzeitig die Fluoreszenz gemessen. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde über die Anzahl der Photolyse-Scans aufgetragen (Abbildung 62a). Dabei steigt die Fluoreszenz bis zu 100 Scans an, kommt dann zu einer Sättigung, bevor die Fluoreszenz geringer wird. Das Erreichen der Sättigung dürfte der vollständigen Photolyse der Schutzgruppen entsprechen. Die anschließende Abnahme der Fluoreszenz resultiert wahrscheinlich aus dem Bleichen des Fluorophors.

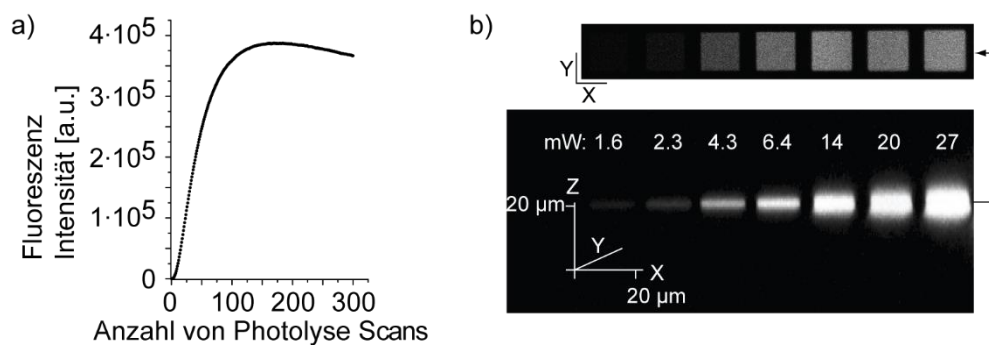


Abbildung 62: Messungen am **Laser-Setup2**. a) Fluoreszenzzunahme über die angegebene Anzahl an Photolyse-Scans an der selben Stelle mit 730 nm und 4.3 mW. b) Übersicht über die räumliche

Auflösung durch die Photolyse von Quadraten mit zunehmender Leistung (konfokale Fluoreszenzaufnahme).

Weiterhin wurden nebeneinander mehrere Quadrate mit steigender Leistung photolysiert und deren Ausbreitung in z-Ebene aufgenommen (Abbildung 62b). Deutlich zu sehen ist dabei, dass die Quadrate mit zunehmender Leistung auch zunehmend heller werden, in ihrer Ausbreitung in z-Richtung aber auch zunehmend dicker werden. Dies resultiert daraus, dass mit zunehmender Leistung auch die Photonenmenge außerhalb des Fokus höher wird und so zur Photolyse ausreichen kann. Werden höhere Leistungen als die gezeigten 27 mW zur Photolyse verwendet, geht sogar die 3D-Auflösung nahezu verloren und die Quadrate zeigen einen Kugelförmigen Verlauf, entsprechend der Photonendichte des Photolyselasers. Die Fluoreszenz im Fokus wird dabei auch zunehmend geringer, da die hohen Leistungen auch zum Photobleichen des Fluorophors führen. Bei zu hoher Leistung wird sogar das Hydrogel im Fokus weggeschmolzen. Aus diesem Experiment kann für die Belichtungen am **Laser-Setup1** die Erkenntnis gezogen werden, dass wahrscheinlich die verwendeten Leistungen von ca. 30 mW bisher zu hoch waren und so die Z-Schichten recht dick geraten sind, wodurch es schwierig wird mehre Objekte übereinander anzuordnen ohne, dass diese ineinander übergehen. Am **Laser-Setup2** konnte das gewünschte 3D-Objekt, der vereinfachte „Messeturm“ realisiert werden, der in Abbildung 63 abgebildet ist.

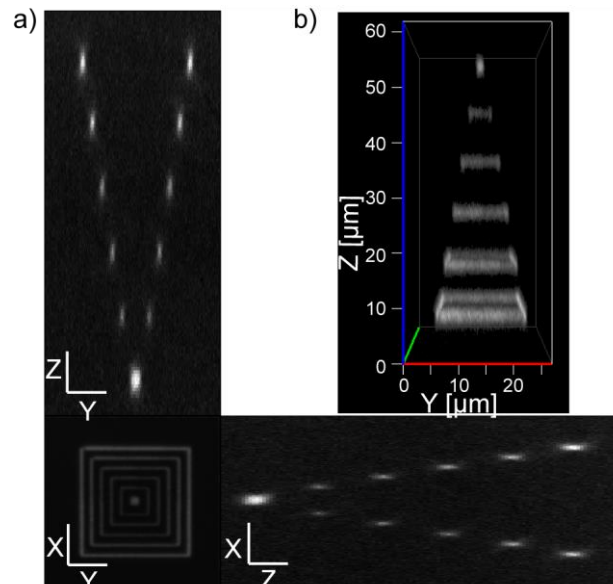


Abbildung 63: Photolyse kleiner werdender Quadrate in zunehmender Tiefe eines DNA₂₀^{3xT}-DEACM enthaltenden Hydrogels am **Laser-Setup2** mit 780 nm. a) Optische Schnitte in x-y, x-z und y-z und b) 3D-Ansicht des photolysierten Turms (konfokale Fluoreszenzaufnahme).

Zu Illustrationszwecken sollte der Unterschied zwischen der Einphotonen- und der Zweiphotonen-Photolyse im Hydrogel gezeigt werden. Als Motiv wurden zwei vereinfachte Energie-Diagramme gewählt, bei denen eines durch Einphotonen- und eines durch Zweiphotonen-Anregung photolysiert wurde. Dieses Experiment wurde ebenfalls am **Laser-Setup2** mit Dr. Stephan Junek durchgeführt. Allerdings zeigte sich im Fall der Einphotonen-Photolyse ein nicht erwartetes Photolyseprofil in der z-Ebene, was eher dem einer Zweiphotonen-Anregung ähnelte. Die Ursache für dieses atypische Verhalten konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht geklärt werden. Um allerdings ein Bild mit dem erwarteten Profil zu erhalten, wurde dieses Experiment am **Laser-Setup1** unseres Arbeitskreises wiederholt. Dabei wurde für die Einphotonen-Anregung ein Frequenzverdoppler verwendet. Dieser war im ursprünglichen Aufbau nach der Pockels-Zelle platziert worden. Dabei zeigte sich aber, dass die Frequenzverdopplung nur sehr geringe Intensitäten lieferte. Vermutlich lag das Problem an der Polarisation des Laserstrahls. Durch die Pockels-Zelle wird die Polarisationsrichtung gedreht, da aber der Frequenzverdoppler die Original-Polarisationsrichtung benötigt, wurde diese mit Hilfe eines $\lambda/2$ -Plättchen erneut gedreht. Dabei besteht die Möglichkeit, dass das mehrfache Drehen der Polarisationsrichtung dazu führte, dass der Laserstrahl nicht mehr linear polarisiert war, sondern ellipsoid polarisiert vorlag. Was wiederum zu einer ineffektiven Frequenzverdopplung führen würde. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der Firma Rapp der IR-Laser vor der Pockels-Zelle durch einen klappbaren Spiegel zum Frequenzverdoppler umgeleitet und hinter diesem eine weitere Pockels-Zelle platziert, die die Leistung des frequenzverdoppelten Laserstrahls reguliert. Dieser Umbau hatte zur Folge, dass die erreichbare Leistung deutlich höher als zuvor lag und ohne Probleme zur Einphotonen-Photolyse genutzt werden konnte.

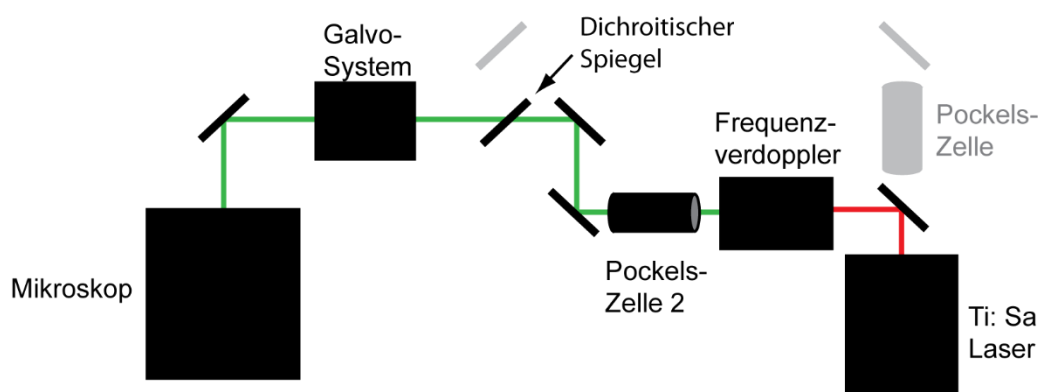


Abbildung 64: Schematische Darstellung des mit Frequenzverdoppler erweiterten **Laser-Setup1**.

Da die früheren Experimente gezeigt hatten, dass die Auflösung der Aufnahmen am Spinning-Disk-System nicht ausreichend war, wurden die Aufnahmen der z-Scans der photolysierten Proben an einem CLSM der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mike Heilemann aufgenommen. Das Ergebnis der Gegenüberstellung der Photolyse durch Einphotonen- und Zweiphotonen-Anregung ist in Abbildung 65 zu sehen. In der x-y- Aufnahme unterscheiden sich die beiden vereinfachten Energie-Diagramme nur kaum. Durch Einphotonen-Anregung wird ein etwas diffuseres und weniger scharfes Bild erhalten als das, dass durch Zweiphotonen-Anregung erzeugt wurde. Der Unterschied der beiden Photolysen wird vor allem im x-z-Schnitt sehr deutlich: bei der Anregung durch UV-Licht findet die Photolyse überall dort statt wo der Laser die Probe trifft. Bei der Zweiphotonen-Anregung ist dagegen die Photolyse auf den Fokus beschränkt.

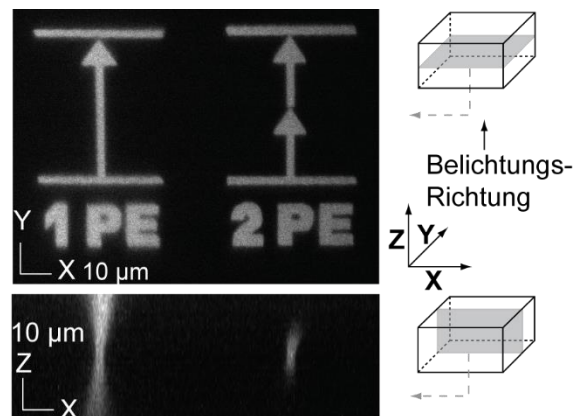


Abbildung 65: Zwei optische Schnitte eines $\text{DNA}_{20}^{3xT\text{-DEACM}}$ enthaltenden Hydrogels, in das ein vereinfachtes Energie-Diagramm photolysiert wurde. Das linke Diagramm wurde durch Einphotonen-Belichtung mit 390 nm und das rechte Diagramm durch Zweiphotonen-Bestrahlung mit 780 nm erhalten (konfokale Fluoreszenzaufnahme).

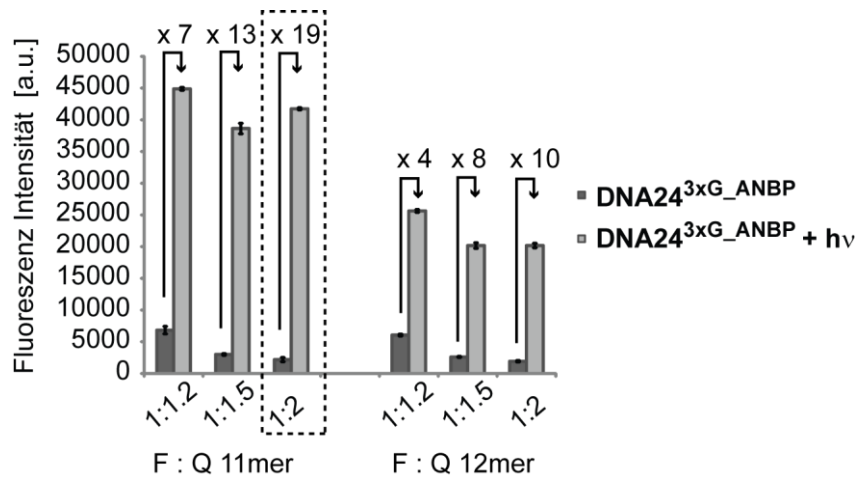
Da für die Kooperation mit der Arbeitsgruppe Göldner/Specht das in Abschnitt 3.1.2 synthetisierte dG^{ANBP} -Phosphoramidit eingebaut in DNA gerade im Hinblick auf seine Zweiphotonen-Sensitivität untersucht werden sollte, wurde der für dT^{DEACM} beschriebene Assay auch für dG^{ANBP} durchgeführt. Dabei bestand die Hoffnung, dass durch Wahl einer anderen DNA-Sequenz und Verwendung einer mit einem anderen Fluorophor markierte Sonde, die Zweiphotonen-wellenlängenselektive Photolyse beider Stränge in einem Hydrogel möglich sein könnte.

Die für den Assay verwendeten Stränge sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9 Verwendete Sequenzen für diesen Assay.

Name	Enthalten	Sequenz
DNA24 ^{3xG_ANBP}		AG ^{ANBP} A TAC AG ^{ANBP} A TAC G ^{ANBP} CA
Sonde4	DNA25 ^{ATTORho14}	ATTORho14-NH-(CH ₂) ₆ -TGC GTA TCT GTA TCT
	DNA26 ^{BBQ650_11}	ACA GAT ACG CA-BBQ-650III
DNA27 ^{BBQ650_12}		TAC AGA TAC GCA-BBQ-650III

Zunächst wurden aber die Messungen der **DNA24**^{3xG_ANBP} alleine im Hydrogel durchgeführt. In Abbildung 66 ist die relative Fluoreszenz-Zunahme nach Photolyse bei verschiedenen Fluorophor-zu-Quencher-Verhältnissen und unter Verwendung von **DNA26**^{BBQ650_11} und **DNA27**^{BBQ650_12} als Quencherstrang aufgetragen.

**Abbildung 66:** Fluoreszenzzunahme bei Bestrahlung von **DNA24**^{3xG_ANBP} bei Verwendung von verschiedenen Stoffmengenverhältnissen der **DNA25**^{ATTORho14} zu **DNA26**^{BBQ650_11} bzw. **DNA27**^{BBQ650_12}.

Das beste Verhältnis wurde dabei mit **DNA25**^{ATTORho14} und **DNA26**^{BBQ650_11} im Verhältnis 1:2 erhalten. Diese Duplex-Sonde wird **Sonde4** genannt. Als Fluorophor wurde zunächst ATTO633 verwendet, nachdem damit allerdings keine quadratische Abhängigkeit der Photolyse von der eingestrahlten Leistung gezeigt werden konnte, wurde versucht durch den Austausch von ATTO633 gegen ATTORho14 diese zeigen zu können. Leider zeigte sich auch mit ATTORho14 kein eindeutiger Kurvenverlauf und somit auch keine quadratische Abhängigkeit. Da aber bei Belichtung dieser Hydrogele mit 920 nm mit drei Quadraten in einem Abstand von etwa 10 µm (wie in Abbildung 67 zu sehen) auch eine 3D-Auflösung erhalten

wurde, liegt die Annahme nahe, dass es sich auch hier um einen Zweiphotonen-Effekt handelt, der zur Photolyse führt. Die Photolyse in Abbildung 67 wurde ebenfalls mit Dr. Stephan Junek am Max-Planck-Institut durchgeführt.

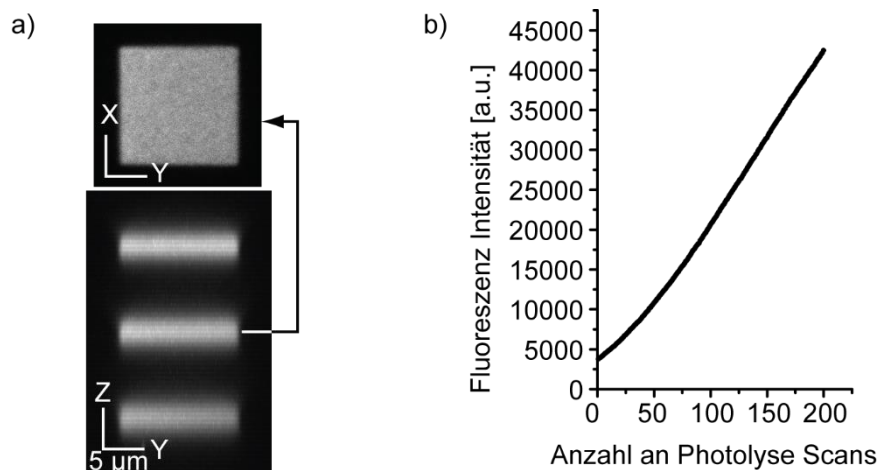


Abbildung 67: Photolyse eines **DNA24^{3xG}-ANBP** enthaltenden Hydrogels am **Laser-Setup2**. a) 3 Quadrate wurden in unterschiedlicher Höhe photolysiert und optisch Schnitte in x-y und y-z abgebildet (konfokale Fluoreszenzaufnahme). b) Fluoreszenzzunahme über die angegebene Anzahl an Photolyse-Scans an der selben Stelle mit 920 nm.

Ebenfalls wurde die Fluoreszenz-Zunahme beim Bestrahlen eines Quadrats über die Zeit aufgenommen. Die Fluoreszenz-Zunahme ist in Abbildung 67b über die Anzahl der Belichtungen aufgetragen. Zu sehen ist, dass die Fluoreszenz bei 0 Scans bereits einen gewissen Wert aufweist, was dafür spricht, dass die Sonde bereits im geschützten Zustand leicht an die immobilisierten Stränge binden kann, was die hier zu sehende Hintergrundfluoreszenz liefert. Im weiteren Kurvenverlauf ist zu sehen, dass die Fluoreszenz über die Zeit zunimmt, nach 200 Scans aber noch keine Sättigung erreicht hat, woraus geschlossen werden kann, dass noch nicht alle photolablen Schutzgruppen abgespalten wurden. Auch ist innerhalb der 200 Scans keine Fluoreszenzabnahme zu sehen, die für einen Bleichungsprozess des Fluorophors sprechen würde. Interessant ist, dass diese Ergebnisse für **DNA24^{3xG}-ANBP** sich etwas von denen der **DNA20^{3xT}-DEACM** unterscheiden. Woraus diese Unterschiede resultieren ist nicht klar und konnte im Rahmen dieser Arbeit auch nicht näher untersucht werden.

Die Sequenz der **DNA24^{3xG}-ANBP** ist wie bereits erwähnt mit Absicht eine andere, die nicht mit der **DNA20^{3xT}-DEACM** und deren **Sonde3** wechselwirkt. Die Hoffnung war, im Hydrogel die ANBP-Schutzgruppen selektiv bei sehr hohen Wellenlängen abspalten zu können und dabei

die DEACM-Schutzgruppen, deren Absorption weniger weit bathochrom verschoben ist, intakt zu lassen. Dazu wurden die beiden Stränge **DNA20^{3xT_DEACM}** und **DNA24^{3xG_ANBP}** im gleichen Hydrogel immobilisiert und die beiden Sonden **Sonde3** und **Sonde4** zum Hydrogel gegeben. In Abbildung 68 ist schematisch dargestellt welche photolabilen Schutzgruppen bei der Photolyse mit 980 nm bzw. 840 nm abgespalten werden und welche Fluoreszenz im Anschluss detektierbar ist. Bei der Belichtung mit 980 nm wird nur die ANBP-Schutzgruppe abgespalten. An diese photolysierten Stränge bindet **DNA25^{ATTORho14}**, was zu einem Fluoreszenzsignal im ATTORho14-Kanal führt. Die Belichtung mit 840 nm führt zur Photolyse der DEACM- und der ANBP-Schutzgruppe, weshalb sowohl **DNA21^{ATTO565}** als auch **DNA25^{ATTORho14}** an ihre jeweiligen photolysierten Gegensequenzen binden können und folglich im ATTO565- und im ATTORHO14-Kanal ein Signal detektierbar sein sollte.

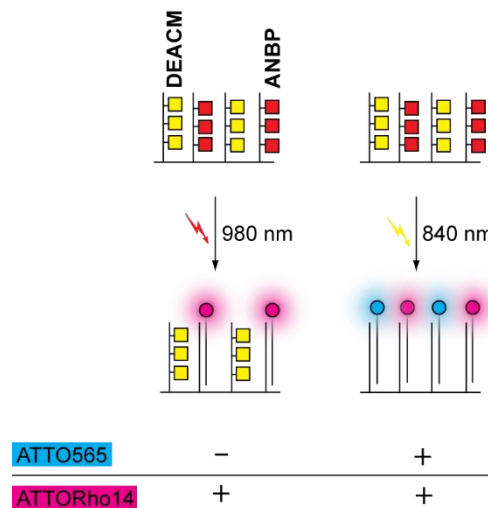


Abbildung 68: Schematische Darstellung des Verdrängungs-Assays mit **DNA20^{3xT_DEACM}** und **DNA24^{3xG_ANBP}** im gleichen Hydrogel und **Sonde3** und **Sonde4** in der umgebenden Lösung. An Stellen, an denen mit 980 nm photolysiert wird, kann nur **Sonde4** binden, was zu einer Fluoreszenz im ATTORHO14-Kanal führt. Die Bestrahlung mit 840 nm führt zur Photolyse beider Schutzgruppen, weshalb dann Fluoreszenz in beiden Kanälen detektierbar ist.

Als erstes wurde ein einfacher Smiley belichtet, bei dem Augen, Nase und Mund mit 840 nm belichtet wurden und der Kreis mit 980 nm. Somit sollte bei der Detektion des ATTO565-Fluorophors nur Augen, Nase und Mund erkennbar sein und bei der ATTORho14-Detektion sollten der kreisrunde Hintergrund und Nase, Augen und Mund fluoreszieren. Im Summenkanal sollte der komplette Smiley erkennbar sein. Das Ergebnis ist in Abbildung 69 zu sehen und zeigt genau das erwartete Resultat.

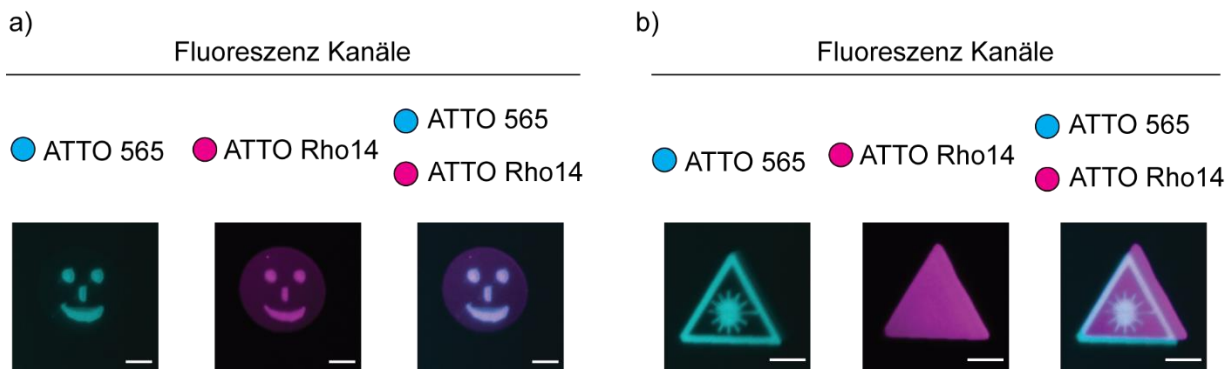


Abbildung 69: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen der **DNA20^{3xT}-DEACM** und **DNA24^{3xG}-ANBP** enthaltenden Hydrogele nach Photolyse a) eines Smileys und b) eines Laserwarnschildes am **Laser-Setup1**. (Maßstab 10 µm)

Ein entsprechendes Experiment mit illustrativerem Motiv, einem Laser-Warnschild wurde durchgeführt, bei dem der dreieckige Hintergrund mit 980 nm und die Abbildung des Lasers mit 840 nm photolysiert wurde. Erwartet wurde das gleiche Ergebnis wie in Abbildung 69a, es zeigte sich aber in Abbildung 69b erstaunlicherweise ein eher orthogonales Entschützungsverhalten. So ist im ATTO565-Kanal erwartungsgemäß nur die Abbildung des Laserstrahls zu erkennen, im ATTORho14-Kanal ist dagegen nahezu nur der dreieckige Hintergrund zu sehen. Nur im Summenkanal ist das komplette Bild sichtbar. Dies würde bedeuten, dass bei der Belichtung mit 840 nm nahezu nur die DEACM-Schutzgruppe abgespalten wurde und die ANBP-Schutzgruppe dabei nicht entschützt wurde. Es zeigte sich tatsächlich bei weiteren Photolyse-Experimenten, dass je nach verwendeter Leistung bei 840 nm tatsächlich eine gewisse Orthogonalität auftritt. Wird mit geringer Leistung von z.B. 2 mW belichtet, bleibt die ANBP-Schutzgruppe intakt und wird nicht abgespalten, wird dagegen mit einer Leistung von z.B. 13 mW bestrahlt, werden sowohl die DEACM-, als auch die ANBP-Schutzgruppe photolysiert. Basierend auf dieser Erkenntnis ist Abbildung 70 entstanden, in der versucht wurde die verschiedenen Photolyse-Parameter in einer Abbildung darzustellen. Dazu wurden ein Tic-Tac-Toe-Spielfeld und die optische Täuschung „Gesichter oder Vase“ in jeweils einem Hydrogel realisiert. In a) ist schematisch dargestellt, wie der Verdrängungs-Assay funktioniert, in b) ist das entsprechende Photolyseschema dargestellt und in c) sind die Bilder der beiden Fluoreszenzkanäle und der Summenkanal dargestellt. Auch hier ist deutlich zu sehen, dass mit geringer Photolyseleistung bei 840 nm nur das DEACM abgespalten wird, mit höherer Leistung dagegen auch ANBP photolysiert wird. Die Photolyse mit 980 nm führt zur Photolyse des ANBP.

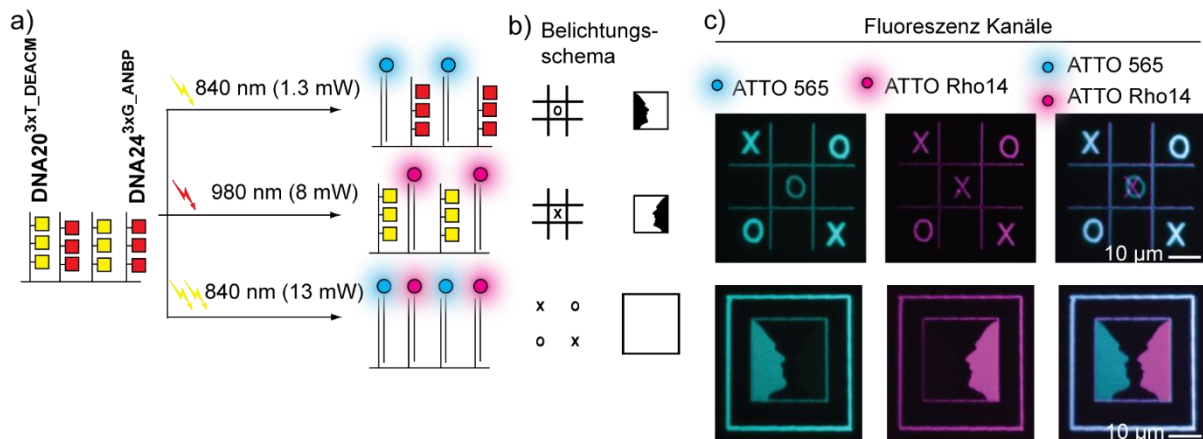


Abbildung 70: Belichtung eines DNA 20^{3xT_DEACM} und DNA 24^{3xG_ANBP} enthaltenden Hydrogels am Laser-Setup1. a) Schematische Darstellung des Verdrängungs-Assays bei 840 und 980 nm, b) Belichtungsschema, c) konfokale Fluoreszenzaufnahmen der photolysierten Hydrogele.

Dieses Verhalten ist sehr ungewöhnlich und ist auf Grundlage der Einphotonen-Absorptionsspektren nicht zu erwarten. Diese sind in Abbildung 71 dargestellt.

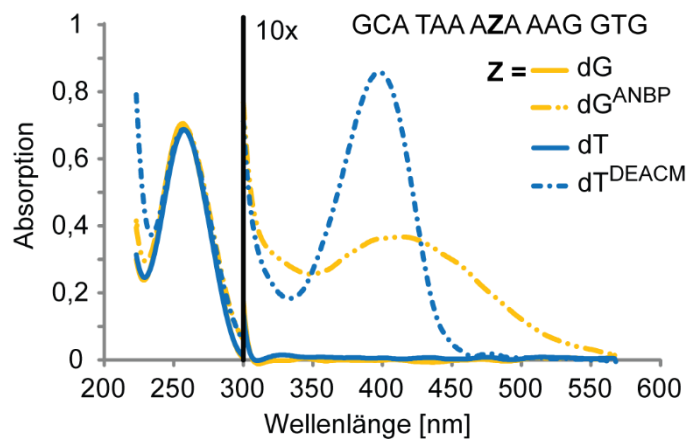


Abbildung 71: Absorptionsspektren von DNA 5^G_ANBP und der entsprechenden dT DEACM modifizierten Benchmarksequenz (deren Messung wurde von Xenia Weyel durchgeführt).

Warum ANBP bei 840 nm eine vergleichsweise geringe Photolyseaktivität hat, könnte nur aus Zweiphotonen-Absorptions-Spektren erklärt werden, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht gemessen werden konnten.

3.2.5.1. Zellanwendungen

Um zu demonstrieren, dass die verwendeten Photolyse-Parameter auch für die Anwendung in biologischen Systemen geeignet sind, sollte der Verdrängungs-Assay des Hydrogels auch innerhalb von Zellen durchgeführt werden. Allerdings wird in diesem Assay kein endogener DNA-Strang reguliert, sondern nur der artifizielle DNA-Hybridisierungs-Assay in Zellen durchgeführt. Die Zellen dienen somit als eine Art Vesikel und primär kann dabei kontrolliert werden, ob die Zellen die Bedingungen der Zweiphotonen-Photolyse unbeschadet überstehen. Werden die Zellen in ein Hydrogel eingebettet, könnte deren orts aufgelöste Photolyse durch Zweiphotonen-Anregung erzielt werden.

Zunächst wurde versucht den Verdrängungs-Assay in HeLa-Zellen durchzuführen. Dazu wurden **DNA20^{3xT-DEACM}** und **Sonde3** mit Metafecten in die Zellen transfiziert und im Anschluss versucht die Zunahme der Fluoreszenz nach Photolyse im Mikroskop zu beobachten. Die ersten Belichtungstests der **DNA20^{3xT-DEACM}** in HeLa-Zellen (**DNA20^{3xT-DEACM}** und **Sonde2** transfiziert) sahen vielversprechend aus, da im Bereich der Belichtung mit 780 nm die Fluoreszenz der Zellen stieg. Es kam allerdings auch vor, dass auch außerhalb der belichteten Bereiche Zellen heller fluoreszierten. Noch viel schwieriger stellten sich die Referenzmessungen dar, bei der die Zellen nur mit der **Sonde3** transfiziert und ebenfalls belichtet wurden. Die Fluoreszenz dieser Zellen sollte nach der Belichtung nicht steigen. In Abbildung 72 sind HeLa-Zellen zu sehen, die nur mit der **Sonde3** transfiziert wurden.

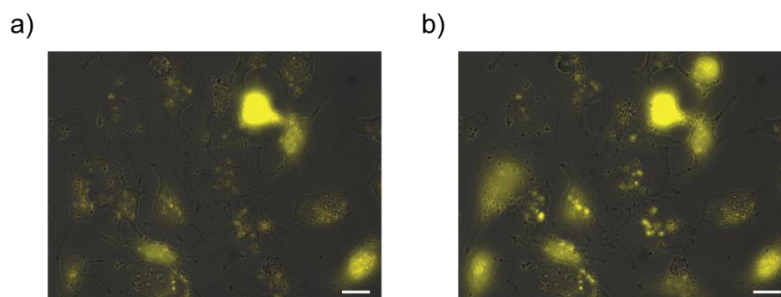


Abbildung 72: Weitfeldfluoreszenzaufnahmen a) vor und b) nach Photolyse mit 780 nm von HeLa-Zellen, die zuvor mit **Sonde3** transfiziert wurden. (Maßstab 20 µm)

Deutlich zu sehen ist, dass die Fluoreszenz nach der Belichtung mit 780 nm steigt. Die Vermutung lag nahe, dass die kurze Sonde die einen Schmelzpunkt von ca. 25 °C aufweist, durch die Bestrahlung thermisch aufgeschmolzen wird. Auch dass die Zellen zum Teil schon vor der Bestrahlung sehr hell fluoreszieren, könnte die Folge von Schmelzprozessen während der Transfektion sein, die im Brutschrank bei 37°C erfolgt. Die Experimente wurden mehrfach

mit **Sonde3** alleine und gemeinsam mit **DNA20^{3xT-DEACM}** durchgeführt, aber es konnte kein eindeutiges Verhalten festgestellt werden. Mal nahm die Fluoreszenz der Zellen mit **Sonde3** alleine weniger stark an Fluoreszenz zu als die mit **DNA20^{3xT-DEACM}**, mal war kein Unterschied der beiden Varianten zu erkennen. Da aus einem solch instabilen System keine repräsentativen Werte erhalten werden konnten, wurde nicht weiter in dieses System investiert.

Zusammen mit Dr. Stephan Junek des MPIs für Hirnforschung wurde anschließend die Anwendbarkeit des Assays in lebenden Zellen demonstriert. Da die Annahme bestand, dass die **Sonde2**, die einen berechneten Schmelzpunkt von 25 °C aufweist, bereits während der Transfektion, die bei 37 °C durchgeführt wird, aufgeschmolzen wird, wurde versucht, eine Transfektion zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde entschieden, die DNA-Stränge über eine Patch-Clamp-Pipette in Hippocampus-Neuronen einzubringen. Die Neuronen wurden aus Gehirnen von Ratten kultiviert (Primärkultur). Die Patch-Clamp-Technik weist neben der transfektionslosen Einbringung der Stränge in die Zellen einen weiteren großen Vorteil auf, da diese Technik hauptsächlich entwickelt wurde, um elektrophysiologische Messungen an den Neuronen durchzuführen. Somit kann getestet werden, ob sich „DNA-gefüllten Zellen“ wie unmodifizierte Zellen verhalten. Vor allem auch nach der Photolyse durch Zweiphotonen-Anregung sollten die Zellen weiterhin ein gesundes Verhalten aufzeigen.

Beim Patch-Clamp Verfahren wird eine zu einer feinen Spitze ausgezogene Glaspipette vorsichtig der Zelloberfläche angenähert und durch leichten Unterdruck die Pipettenspitze mit der Zellmembran versiegelt. In diese Elektrolyt-gefüllte Pipette ragt eine Elektrode hinein, eine weitere Elektrode liegt in der Außenlösung der Petrischale, in der die Neuronen kultiviert wurden, und ermöglicht so eine Messung des Membranpotenzials eines einzelnen Neurons. Der Membranbereich im Innern der Pipettenöffnung wird dazu in der sogenannten *Whole-Cell*-Konfiguration durch einen kurzen Puls an Unterdruck entfernt. Auf diese Weise wird eine elektrische und mechanische Verbindung zwischen Elektrolytlösung und dem Zellinneren hergestellt. Dadurch können zum einen in der Elektrolytlösung befindliche Moleküle in die Zelle diffundieren, zum anderen können bei elektrischen Messungen Aussagen über die komplette Zelle getroffen werden. Zum Einbringen der DNA-Stränge in die Neuronen wurden diese sehr konzentriert in die zum Zellinneren homolytische Elektrolytlösung gegeben. Damit die zugegebenen DNA-Stränge ausreichend in das Zellinnere diffundieren können, wurde vor Beginn der Belichtung 10 min gewartet. In dieser Wartezeit wurden elektrophysiologische Messungen über die Patch-Clamp-Pipette durchgeführt, um zu zeigen, dass die Nervenzelle gesund und intakt ist. Zu diesem Zweck kann der Strom, welcher über die Zellmembran fließt kontrolliert werden, während gleichzeitig das Membranpotenzial gemessen wird (*current*

clamp). Das Ruhemembranpotenzial (keine Strominjektion) lag bei diesen Experimenten – wie für Neuronen typisch – bei ca. -60 mV. Erreicht die Zelle, z.B. durch einen durch die Pipette induzierten Strom, eine gewisse Schwellenspannung, kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger Ionenkanäle für Na⁺-Ionen, die in das Innere der Zelle einströmen und zu ihrer weiteren Depolarisation führt (positive Rückkopplung). Zeitversetzt öffnen sich die ebenfalls spannungsabhängigen Kanäle für K⁺-Ionen-, die so aus der Zelle ausströmen können und folglich die Ladung wieder umkehren und zur Repolarisation der Zellen führen. Ein solches Ereignis aus Depolarisation und Repolarisation wird als Aktionspotenzial bezeichnet und läuft innerhalb von ca. 1 ms ab. In den hier durchgeführten Experimenten, bei denen der Strom für 400 ms induziert wurde, können mehrere Aktionspotenziale nacheinander auftreten.

Vermessen und belichtet wurden 6 Zellen die nur mit der **Sonde3** versehen wurden und 6 Zellen die mit der **Sonde3** und **DNA20^{3xT-DEACM}** gefüllt wurden. In Abbildung 73a) ist eine Zelle vor und nach der Belichtung mit 780 nm gezeigt, die nur mit **Sonde3** gefüllt ist. Der weiße Kreis markiert den Bereich in dem die Photolyse erfolgte. In b) sind die gleichen Messungen der entsprechenden Zelle mit **DNA20^{3xT-DEACM}** und **Sonde3** zu sehen. In c) ist die Fluoreszenzzunahme der abgebildeten Zellen links und der Mittelwerte der 6 vermessenen Zellen rechts aufgetragen. Dabei gehören die blauen Messwerte zu den Zellen die nur die **Sonde3** enthalten und die roten Messwerte zu den Zellen die **DNA20^{3xT-DEACM}** und **Sonde3** enthalten. Die grauen Bereiche markieren den Zeitraum, in dem die Zellen gepulst mit 780 nm (10 mW, 20 Pulse, 2 ms Pulsdauer bei 1 Hz) belichtet wurden. Abbildung 73a und Abbildung 73b sind unterhalb der Zellen die zu diesem Zeitpunkt durchgeführten elektrophysiologischen Messungen aufgetragen. Die unteren Kurven zeigen den induzierten Strom, der von Messung zu Messung gesteigert wurde, und darüber ist die zugehörige gemessene Membranspannung der Zellen aufgetragen.

Schön zu sehen ist, dass auch bei diesen Messungen ein Anstieg der Fluoreszenz im Falle der Referenzzellen zu beobachten ist. Auch hier wird angenommen, dass die Photolyse zum Aufschmelzen des Doppelstrangs führt. Die Fluoreszenzzunahme der Zellen mit **DNA20^{3xT-DEACM}** zeigt im Vergleich einen deutlich höheren Anstieg. Daraus kann geschlossen werden, dass hier die photolabilen Schutzgruppen abgespalten werden und die Fluoreszenzzunahme tatsächlich durch die Bindung des fluoreszierenden Strangs **DNA21^{ATTO565}** an den entschützten photolysierten Strang **DNA20^{3xT-DEACM}** bindet. Damit zeigen diese Ergebnisse, dass es möglich ist, photolabil geschützte DNA innerhalb einer Zelle mittels Zweiphotonen-Absorption zu photolysieren ohne die Zelle dabei zu schädigen. Die elektrophysiologischen Messungen zeigen deutlich, dass die Zelle vor und nach Belichten bei ähnlichen induzierten Strömen Aktionspotenziale ausführt. Daraus kann geschlossen werden,

dass die Belichtung mit den hier verwendeten Leistungen, die wie zu sehen zur Photolyse des DEACMs ausreicht, die Zelle nicht schädigt und diese weiterhin ein normales Verhalten zeigt.

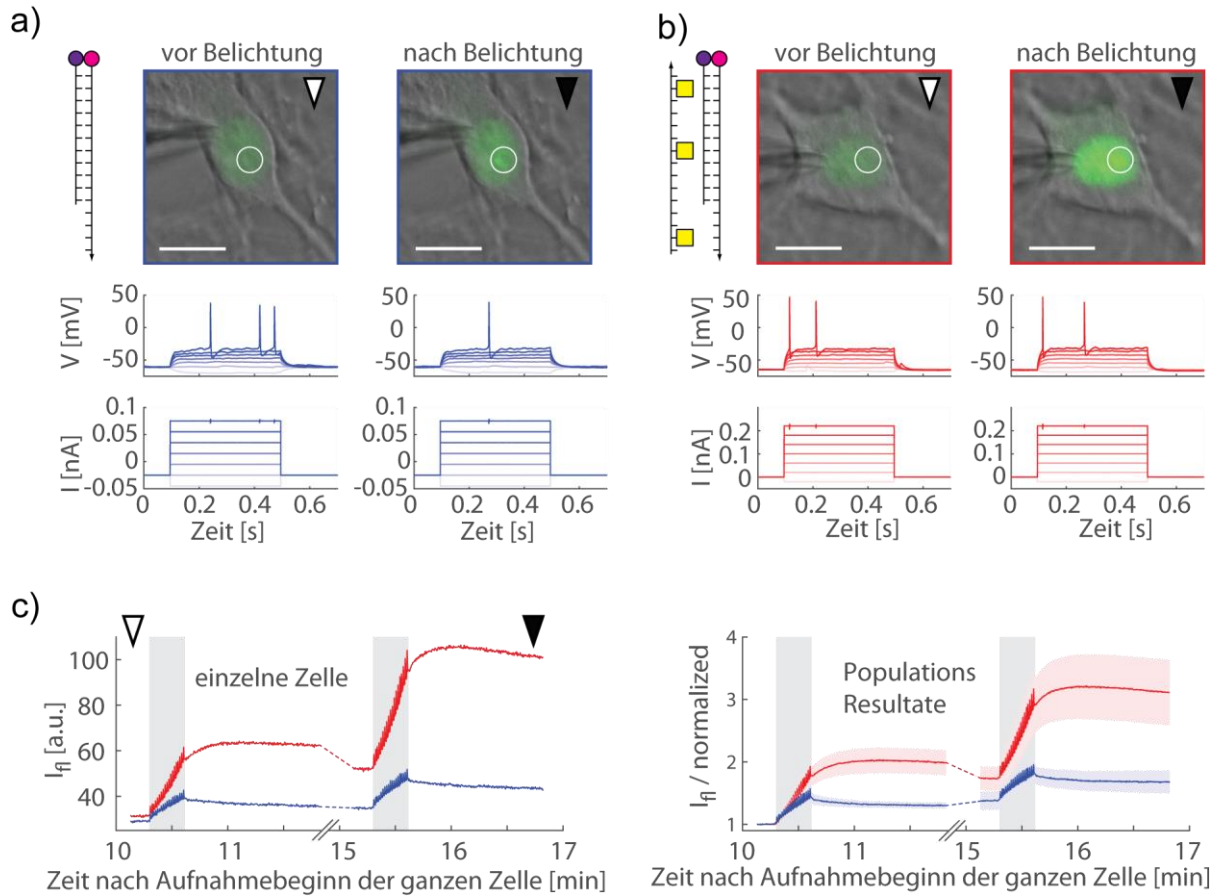


Abbildung 73: Hippocampale Neuronen wurden durch eine Patch-Pipette gefüllt mit a) **Sonde3** und b) **DNA20^{3xT₂}-DEACM** und **Sonde3** und holographisch mit 780 nm belichtet (die weißen Kreise visualisieren den Photolysebereich). (Maßstab 10 μm) Unterhalb der Zellen sind die durch Strom-Induktion erhaltenen elektrophysiologischen Messungen vor und nach der Photolyse aufgetragen. In c) ist die Fluoreszenzzunahme über die Zeit aufgetragen (blau nur **Sonde3**, rot **DNA20^{3xT₂}-DEACM** und **Sonde3**). Die grauen Bereiche markieren die Belichtungszeit (10 mW, 20 Pulse, 2 ms Pulsdauer bei 1 Hz). Diese Messungen wurden zusammen mit Dr. Stephan Junek durchgeführt und diese Abbildung von Dr. Stephan Junek erstellt.

3.2.6. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieses Projekts war die Visualisierung der durch Zweiphotonen-Anregung erzeugten Photolyse von photolabil geschützter DNA. Da die Messung der freigesetzten DNA-Stränge mittels HPLC-Analytik, die primär von Dr. Florian Schäfer durchgeführt wurde, keine belastbaren Ergebnisse lieferte, war es das Ziel die Photolyse mittels Fluoreszenz-Veränderung zu visualisieren.

Nach erfolglosen Versuchen mit einem Verdrängungs-Assay in Lösung oder durch Immobilisierung von Strängen auf Glasoberflächen die Zweiphotonen-Sensitivität zu beweisen, erfolgten die ersten erfolgreichen Visualisierungen der Zweiphotonen-Photolyse mit Hilfe eines Monomers aus dC^{NDBF} bzw. dG^{ANBP} . Diese Monomere verfügt über einen Thiolmodifizier am 3'-Ende zum immobilisieren des Strangs in einem Maleimid-Hydrogel und einen Amino-Modifizier am 5'-Ende über den ein ATTO565-Fluorophor gekuppelt wurde. Die räumliche Nähe der photolabilen Schutzgruppe zum Fluorophor sorgt für einen Quenching-Effekt, durch den im Hydrogel die Photolyse visualisiert werden kann. In Lösung konnte für das **Monomer1** C_{NDBF} auch eine quadratische Abhängigkeit gezeigt werden. Da ein Monomer nur wenig vergleichbar mit einem Oligonukleotid ist, wurde versucht die Immobilisierung in Maleimid-Hydrogelen auf das Verdrängungs-Assay zu übertragen.

Dazu wurde ein Verdrängungs-Assay entwickelt, bei dem ein 3fach photolabil geschützter Strang über eine Thiol-Modifikation in einem Hydrogel immobilisiert vorliegt, das wiederum von einer Sonde umgeben ist. Die Sonde besteht aus einem Gegenstrang zum photolabil geschützten Strang, der mit einem Fluorophor markiert ist und einem kürzeren Quencher-markierten Strang. Die Photolyse erfolgt in einem Mikroskop, in das der, für die Zwei-Photonen-Photolyse benötigte, gepulste IR-Laser eingekoppelt ist. An Stellen, wo die photolabilen Schutzgruppen photolysiert wurden, verdrängt der freigesetzte Strang den Quencher-Strang der Sonde, so dass sich ein Doppelstrang aus dem durch Photolyse freigesetzten Strang und dem mit Fluorophor markierten Strang der Sonde bildet. An den photolysierten Bereichen erfolgt folglich eine deutliche Fluoreszenz-Zunahme, die im Anschluss im Mikroskop detektiert werden kann. Diese Photolyse erfolgte an dT^{DEACM} - und dG^{ANBP} - modifizierten Strängen. In den Hydrogelen konnte die quadratische Abhängigkeit für den dT^{DEACM} -modifizierten Strang gezeigt werden und die Visualisierung der 3D-Auflösung der Photolyse erfolgte für beide Stränge. Dass die Photolyse auch in Zellen durchgeführt werden kann, konnte nach missglückten Transfektions-Experimenten in HeLa-Zellen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gezeigt werden. Die Stränge wurden dabei mittels Patch-Clamp-Pipette in Neuronen eingebracht, in denen im Anschluss die Fluoreszenz-Zunahme nach Photolyse gezeigt werden konnte. Dass auch eine wellenlängenselektive Photolyse des ANBPs vor dem

DEACM möglich ist, konnte wiederum im Hydrogel gezeigt werden. Dabei konnte sogar bei geringer Laserleistung eine gewisse Orthogonalität erzielt werden, bei der das DEACM abgespalten wurde, und nahezu kein ANBP photolysiert wurde. Insgesamt zeigt diese Arbeit deutlich, dass durch geschickten Einbau von Zweiphotonen-sensitiven Schutzgruppen an den richtigen Stellen eines Oligonukleotides, die Hybridisierung zweier Oligonukleotide durch Zweiphotonen-Anregung reguliert werden kann. Die Hybridisierung von Oligonukleotiden und die Wechselwirkung von Proteinen mit Oligonukleotiden stellen wichtige regulatorische Einheiten in biologischen Systemen dar. Die hier gezeigte Regulation der Hybridisierung durch Zweiphotonen-Anregung lässt vermuten, dass auch die Wechselwirkung mit endogene Oligonukleotide wie beispielsweise miRNAs mit der Zweiphotonen-Technik reguliert werden kann. Auch die Regulation von Protein-Oligonukleotid-Interaktionen sollte mit diesem Ansatz steuerbar sein. Gerade in biologischen Systemen ist es von großem Interesse die Zweiphotonen-Technik zu verwenden, da IR-Licht tiefer ins Gewebe eindringen kann und dabei im Organismus kaum oder keinen Schaden erzeugt.

Die durchgeführten Experimente zeigen für zukünftige Studien des Arbeitskreis, dass sowohl biologische Systeme die Zweiphotonen-Photolyse unbeschadet überstehen, aber auch dass die Regulation von zum Beispiel Doppelsträngen mit Zweiphotonen-sensitiven Schutzgruppen möglich ist. Xenia Weyel ist bereits dabei DEACM-basierte Linker in biologischen Systemen zu verwenden, die zukünftig dort durch Zweiphotonen-Anregung zur Spaltung von Oligonukleotiden benutzt werden sollen. Weiterhin eröffnet sich durch den entwickelten Verdrängungs-Assay die Möglichkeit für jede beliebige neue Schutzgruppe auf Oligonukleotiden, diese im Hydrogel zu untersuchen und auf deren Zweiphotonen-Sensitivität zu überprüfen. Auch hier konnte Xenia Weyel mit einem ähnlichen Assay zeigen, dass der neue DEACM-Linker durch Zweiphotonen-Anregung photolysiert werden kann. Auch im Rahmen der Masterarbeit von Erik Unger wurde dieser Assay verwendet, um eine neue Schutzgruppe auf ihre Zweiphotonen-Photolysierbarkeit zu überprüfen.

Die schlussendlich entwickelte Verdrängungs-Assay bietet den weiteren großen Vorteil, dass sie jegliches Licht, das die Probe trifft in ein fluoreszierendes Signal umwandelt, die Detektion aber auch zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen kann. Somit kann überprüft werden wie breit Beispielsweise die Anregung eines Lasers ist, wenn dieser zur Photolyse der Schutzgruppe geeignet ist. In einer Kooperation mit Prof. Dr. Mike Heilemann wird zurzeit untersucht, ob sich die ultrahochaufgelöste Mikroskopie-Technik STED auch auf die hochaufgelöster Photolyse übertragen lässt. Dazu wird das Verdrängungs-Assay im Hydrogel verwendet. Es soll überprüft werden, ob durch die Bestrahlung mit einem UV-Laser und einem STED-Laser gleichzeitig der photolysierte Bereich schmaler ausfällt, als durch reine Bestrahlung mit UV-Licht. Es wurden

bereits erste Testmessungen dazu durchgeführt, allerdings trat dabei erste Problemen auf. Bei dem verwendeten STED-Mikroskop existieren nur STED-Laser mit 590, 660 und 775 nm. Dabei führt die Verwendung des 590 nm Lasers zum Bleichen des Fluorophors. Unerwarteterweise kann mit dem 775 nm alleine die **DNA20^{3xT_DEACM}** photolysiert werden. Bisher konnte noch keine hochaufgelöste Photolyse gezeigt werden, die Messungen sind allerdings noch nicht abgeschlossen. Diese Technik würde eine noch präzisere Ortsauflösung erlauben und könnte sicherlich in vielen Bereichen zum Einsatz kommen wie beispielsweise im Bereich der Nanotechnologie.

3.3. Synthese der neuen photolabilen Schutzgruppe DMA-NDBF-OH

Die photolabile Schutzgruppe NDBF stellt eine interessante Schutzgruppe dar, da sie wie bereits beschrieben über eine hohe Zweiphotonen-Sensitivität verfügt. Um neue Zweiphotonen-Schutzgruppen zu entwickeln, gibt es wie erwähnt, gewisse Regeln, die zu einer guten Zweiphotonen-Schutzgruppe führen, wie beispielsweise das Push-Pull-System. Meist muss allerdings sehr viel synthetisch hergestellt und getestet werden, um tatsächlich einen guten Kandidaten zu erhalten. Eine große Erleichterung stellen hier die quantenmechanischen Berechnungen dar, da in deutlich kürzerer Zeit die Eigenschaften vieler verschiedener Substituenten und deren Positionen berechnet werden können und nur die Verbindungen, die die besten Eigenschaften bei den Berechnungen zeigen, im Anschluss synthetisiert werden und auf ihre tatsächlichen Eigenschaften überprüft werden müssen.

In Kooperation der Arbeitsgruppen Prof. Dr. Andreas Dreuw der Universität Heidelberg und Prof. Alexander Heckel wurden verschiedene Derivate der NDBF-Schutzgruppe quantenmechanisch berechnet. Ziel der Studie war die bekannte Schutzgruppe NDBF *in-silico* so zu modifizieren, dass sie bessere Zweiphotonen-Absorptions-Eigenschaften aufweist. Zu diesem Zweck wurde zunächst das NDBF selbst analysiert, um daraus geeignete quantenmechanische Parameter festzulegen, die für die Derivate verwendet werden konnten. Aus anderen Studien war bereits bekannt, dass gerade Push-Pull-Systeme am Cage die Zweiphotonen-Eigenschaften erheblich verbessern, da der Dipol-Charakter von organischen Molekülen mit ihren Zweiphotonen-Absorptionseigenschaften verknüpft ist.^[126]

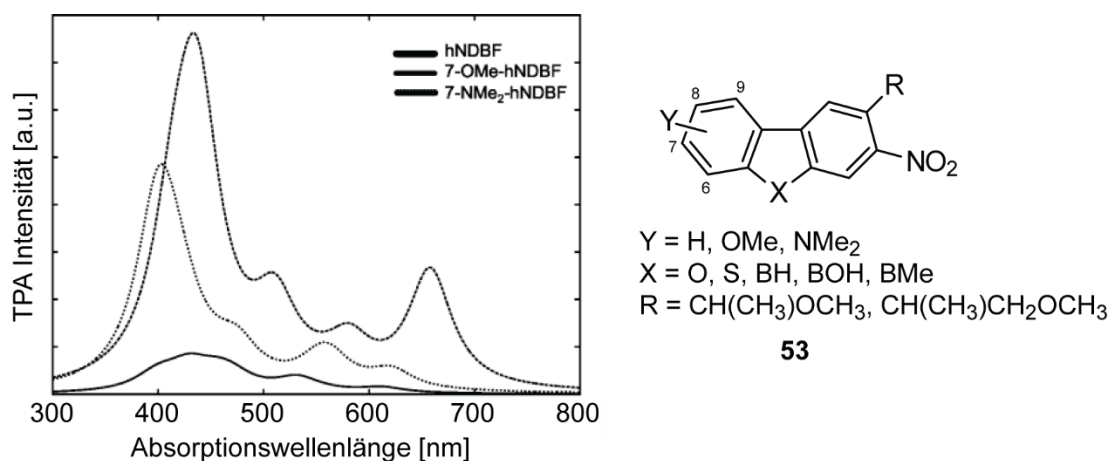


Abbildung 74: Theoretisch berechnete Zweiphotonen-Absorptionsspektren der verschiedenen NDBF-Analoga. Aufgetragen ist die Absorptionswellenlänge gegen die Zweiphotonen-Absorptions-(TPA)-Intensität. (Abbildung modifiziert nach Dreuw *et al.*)^[126]

Aus diesem Grund wurden zunächst *in-silico* Methoxy-Gruppen an die Stellen 6, 7, 8 oder 9 von **53** eingebracht, wobei sich die Absorptionseigenschaften des 7-OMe-Derivat am dramatischsten von den anderen unterschied. Eine deutlich höhere Zweiphotonen-Absorptions-Intensität ist zu beobachten. Um den Grundzustands-Dipol noch zu vergrößern, wurde der stärker elektronenschiebende Substituent Dimethylamin *in-silico* an der 7-Position eingesetzt. Dies führt wiederum, wie im Absorptionsspektrum in Abbildung 74 zu sehen, zu einer weiteren Erhöhung der Zweiphotonen-Absorption und vor allem einer weiteren Absorptionsbande bei 660 nm, was eine deutliche bathochrome Verschiebung darstellt. Des Weiteren wurden Derivate mit verändertem Heteroatom am Furan berechnet. Anstelle des Furanrings wurden ein Thiophen, Pyrrol und verschiedene Borole eingebaut. Dabei zeigte sich, dass der Austausch des Sauerstoffs gegen Stickstoff und Thiol kaum einen Unterschied darstellt. Ein Bor als Heteroatom führt dagegen zu einer weiteren starken bathochromen Verschiebung der Zweiphotonen-Absorption Richtung 800 bis 950 nm. Diese vielversprechende Gruppe von Schutzgruppen wurde von Dr. Tatjana Stöß^[127] im Rahmen ihrer Doktorarbeit untersucht.^[126]

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese des 7-Dimethylamino-Nitrodibenzofuran-Alkohols (DMA-NDBF-OH).

Für die Synthese wurden zwei mögliche Synthesewege verfolgt.

3.3.1. Syntheseroute 1: Substitution des Dibenzofurans

Syntheseroute 1 wurde ausgehend von der von Dr. Timo Mack^[116] abgewandelten und von Ellis-Davies entwickelten Synthese des homo-NDBF ((h)NDBF) auf die hier gewünschte Modifikation abgewandelt. Abbildung 75 zeigt retrosynthetisch den geplanten Aufbau des DMA-NDBF-OH **54**.

Als Edukt dient hier Dibenzofuran **62**, das zunächst zu **61** nitriert und mittels FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung zu **60** umgesetzt wird. Nächster wichtiger Schritt ist die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin **59**, die vor der Einführung der zweiten Aminofunktion erfolgen muss. Im Anschluss wird das Amin zweifach methyliert, um **58** zu erhalten. Schlüsselschritt dieses Syntheseweges stellt die Einführung der Nitrogruppe dar, die bereits bei der NDBF-Synthese problematisch war. Dort musste zunächst die eingeführte Acetylgruppe zu einer Ethylgruppe reduziert werden, um eine regioselektive Nitrierung zu erhalten. Deshalb werden auch für diese Synthese die Reduktion zu **57** und die anschließende Nitrierung zu **56** geplant. Im Anschluss muss die Ethylgruppe bromiert werden um **55** zu erhalten und um abschließend den Alkohol

und somit das zum NDBF-OH analoge DMA-NDBF-OH **54** zu erhalten. Teile dieser Syntheseroute wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Nina Deußner^[128] bearbeitet.

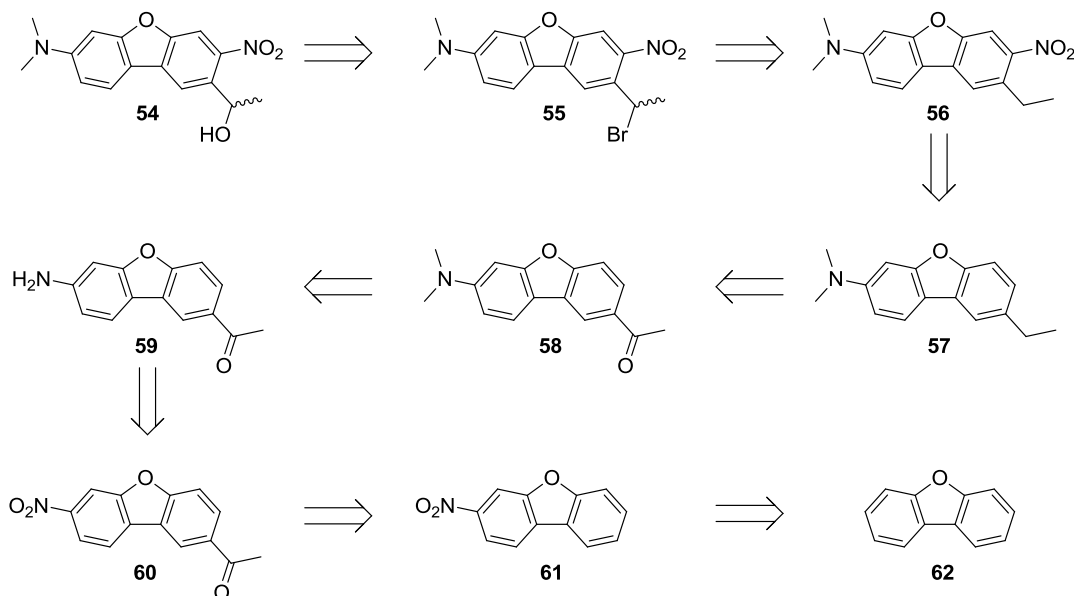


Abbildung 75: Retrosynthetische Zerlegung des DMA-NDBF-OH **54**

Abbildung 76 zeigt die ersten drei Synthesestufen. Zunächst erfolgte eine Nitrierung des Dibenzofurans mit HNO_3 in TFA nach einem Patent von Xia und Rayabarapu.^[129] In Anwesenheit der starken Säure Trifluoressigsäure entsteht ein stark elektrophiles Nitroniumion NO_2^+ , das vom nukleophilen Dibenzofuran angegriffen wird und unter Rearomatisierung ein Proton abspaltet. Prinzipiell kann die Nitrierung an verschiedenen Stellen stattfinden und auch Mehrfachnitrierung ist möglich. Doch durch geschickte Wahl des Lösungsmittels, in diesem Fall TFA, Reaktionsbedingungen bei 0°C und nur einem geringen Überschuss (1.2 eq) der 65%igen HNO_3 kann die Nitrierung nahezu selektiv in Position 3 erfolgen.^[130] Das 3-Nitrobenzofuran **61** konnte mit einer Ausbeute von 98% erhalten werden.

Die anschließende FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung erfolgte durch Zugabe von Aluminiumtrichlorid und Acetylchlorid in Nitrobenzol nach Gilman *et al.*^[131] Aluminiumtrichlorid dient als Lewis-Säure, die das Acetylchlorid aktiviert, welches elektrophil am Dibenzofuran angreift. Die Reaktivität der Positionen lautet: $2 > 3 > 1 > 4$.^[130] Die Acetylierung in Position 2 am nitromodifizierten Ring wird aufgrund des $-M$ -Effekts der Nitrogruppe nicht stattfinden. Da in der geplanten Synthese, die Acetylfunktion zu einer Ethylfunktion reduziert werden soll, wäre auch die direkte Einführung der Ethylgruppe durch eine FRIEDEL-CRAFTS-Alkylierung mit Ethylchlorid möglich gewesen. Da diese Reaktion allerdings eine deutlich geringere

Selektivität aufweist und mehrere Nebenprodukte wahrscheinlich gewesen wären^[130], wurde sich bewusst für den synthetisch etwas umständlicheren Weg über die Acylierung und anschließende Reduktion entschieden, da diese darüber hinaus auch Literaturbekannt ist. Die Acetylierung zu **60** führte zu einer Ausbeute von 58%.

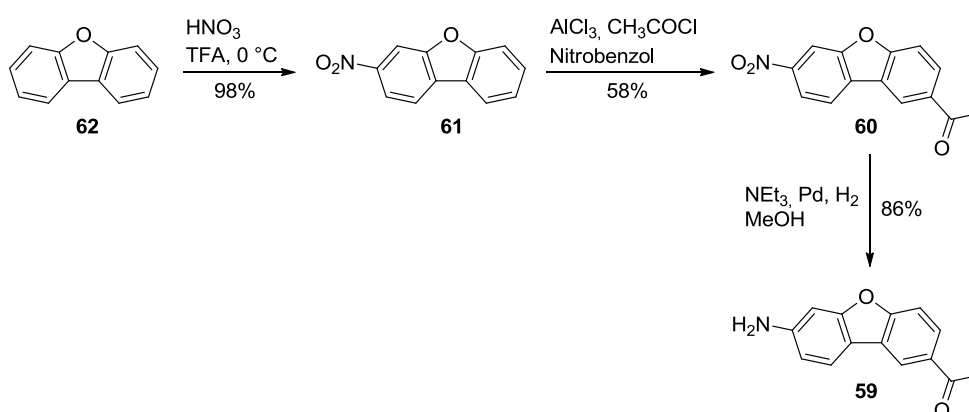


Abbildung 76: Syntheseübersicht der Verbindung **59** ausgehend von Dibenzofuran **62**.

Die Reduktion der Aminofunktion erfolgte analog einer Vorschrift von Li *et al.*^[132] mit Palladium-Katalysator unter 10 bar Druck bei Wasserstoffatmosphäre in Methanol mit einer Ausbeute von 86% für **59** (siehe Abbildung 76). Wichtig an dieser Stelle ist, dass die Reaktionszeit kurz gehalten werden muss, da sonst auch die Acetylfunktion zum Alkohol reduziert wird. Die beiden Produkte, der Alkohol und das Keton, lassen sich aber säulenchromatographisch gut voneinander trennen.

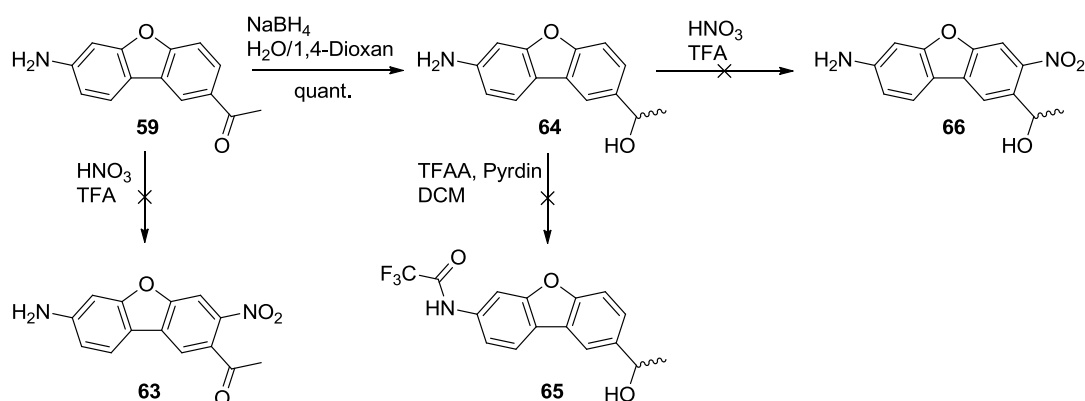


Abbildung 77: Übersicht zu den Nitrierungsversuchen ausgehend von Verbindung **59**.

Auf Grund des $-I$ und des $-M$ -Effekts der Carbonylfunktion und des $-I$ und $+M$ -Effekts der Aminofunktion ist zu erwarten, dass eine Nitrierung von Verbindung **59** (Abbildung 77) am etwas elektronenreicheren aminomodifizierten Ring am wahrscheinlichsten ist. Trotzdem wurde versucht zu nitrieren, aber wie zu erwarten führte die Nitrierung mit HNO_3 und TFA nicht zu Verbindung **63** sondern nur das Produkt **67** in Abbildung 78 konnte erhalten werden.

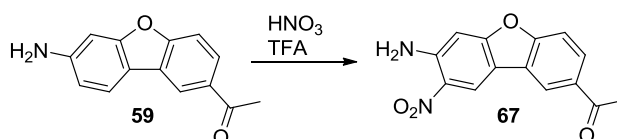


Abbildung 78: Produkt der Nitrierung von Verbindung **59**.

Um zu testen, ob die Umwandlung der Carbonylfunktion in den entsprechenden Alkohol ausreicht, um die Elektronendichte dieses Ringes zu erhöhen, wurde Verbindung **59** mit NaBH_4 in H_2O /Dioxan quantitativ zu Verbindung **64** reduziert (siehe Abbildung 77). Die Hydroxyfunktion weist zwar ebenfalls einen $-I$ - aber auch einen $+M$ -Effekt auf. Da das gewünschte Endprodukt auch eine Alkoholfunktion tragen sollte, wäre es eine große synthetische Erleichterung gewesen, wenn die Einführung der Nitrofunktion an dieser Stelle erfolgreich geklappt hätte. Leider zeigte sich auch hier nicht die Bildung des gewünschten Produkts **66**.

Um den $+M$ -Effekt der Aminofunktion abzuschwächen, wurde Verbindung **64** analog zu Lavis *et al.*^[133] mit Trifluoressigsäureanhydrid und Pyridin in DCM geschützt. Die DC-Kontrolle deutete darauf hin, dass das Produkt entstanden war. Das NMR nach säulenchromatischer Aufreinigung zeigte allerdings, dass sich anscheinend Verbindung **68** (Abbildung 79) gebildet wurde.

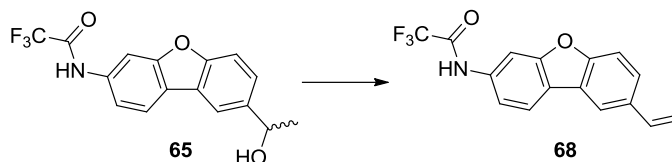


Abbildung 79: Nach der TFA-Schätzung **65** erhaltenes Produkt **68**.

Anscheinend fand während der Reaktion oder bei der säulenchromatographischen Aufreinigung eine säurekatalysierte Eliminierung statt. Somit konnte leider nicht getestet werden, ob die Nitrierung an diesem Schritt zum gewünschten Produkt geführt hätte.

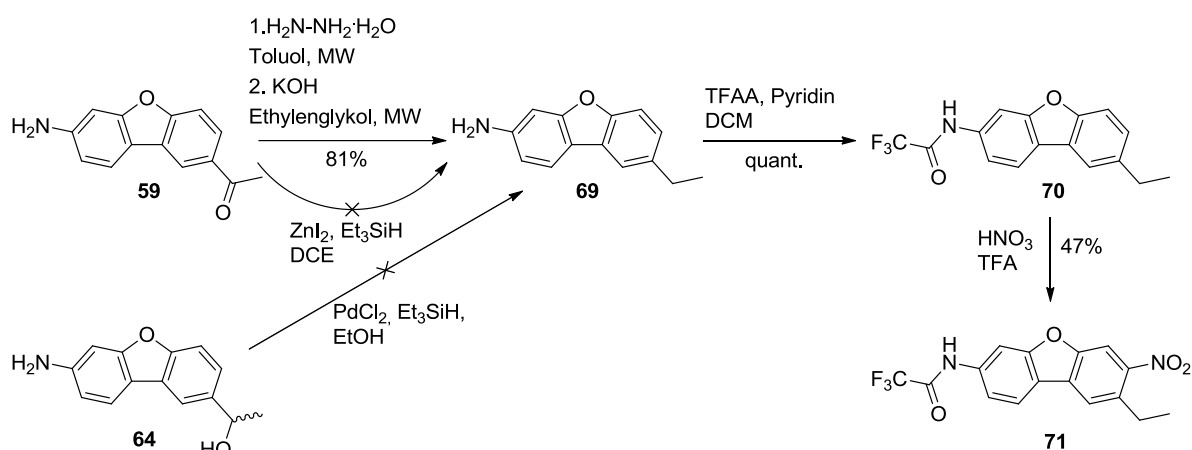


Abbildung 80: Syntheseübersicht zum nitrierten Produkt **71** ausgehend von Verbindung **59**.

Da alle bisherigen Versuche die Nitrogruppe an Position 3 einzuführen scheiterten, wurde auf den ursprünglichen Syntheseweg über die Reduktion des Carbonyl- zum Alkylrest zurückgegriffen (siehe Abbildung 80). Diese Reduktion wurde auf drei verschiedenen Wegen getestet. Zunächst wurde versucht nach Li *et al.*^[134] mit Zinkiodid und Triethylsilan in Dichlorethan zur Verbindung **69** zu gelangen. Dabei zeigte sich leider keine Umsetzung, was an der Anwesenheit der Aminofunktion liegen könnte, die in der Original-Vorschrift nicht vorhanden war.

Da die Umsetzung der Carbonylfunktion zum Alkohol so gut funktioniert hatte, wurde versucht mit Palladiumchlorid und Triethylsilan in Ethanol eine Desoxygenierung von Verbindung **64** nach einer Vorschrift von Mirza-Aghayan *et al.*^[135] durchzuführen. Auch hier zeigte sich keine Umsetzung des Edukts. Allerdings war durch die lange Lagerungszeit des verwendeten Katalysators vermutlich dessen Reaktivität herabgesetzt. Dieser Weg wurde nicht weiter verfolgt, da parallel die Reduktion zur Alkylfunktion erfolgreich über eine WOLFF-KISHNER-Reduktion erzielt wurde. Dabei wurde auf eine Vorschrift von Gadhwali *et al.*^[136] zurückgegriffen, die eine Durchführung in der Mikrowelle mit Hydrazin-Hydrat in Toluol aufzeigten. Das so erhaltene Hydrazon wurde ohne Aufarbeitung nur vom Lösungsmittel befreit und anschließend ebenfalls in der Mikrowelle nach Lin *et al.*^[137] mit KOH in Ethylenglykol zur Verbindung **69** umgesetzt. Die Ausbeute für Verbindung **69** über zwei Stufen betrug 81%. Diese Reaktion wurde aufgrund der Toxizität des Hydrazins zunächst vermieden. Alternativ hätte hier auch die bei der NDBF-Synthese etablierte CLEMMENSEN-Reaktion verwendet werden können, allerdings ist die Herstellung des Zink-Amalgams, das ebenfalls toxisch ist, schwierig in der Handhabung, weshalb die WOLFF-KISHNER-Reaktion bevorzugt wurde.

Anschließend wurde versucht den elektronenschiebenden Effekt der Aminofunktion durch Einführung einer Schutzgruppe zu minimieren. Die Aminofunktion wurde nach Lavis *et al.*^[133] mit Hilfe von Trifluoressigsäureanhydrid in Anwesenheit von Pyridin in DCM geschützt (siehe Abbildung 80). Verbindung **70** konnte quantitativ hergestellt werden. Die im Anschluss durchgeführte Nitrierung mit HNO₃ in TFA führte tatsächlich mit 47% zum Produkt **71**.

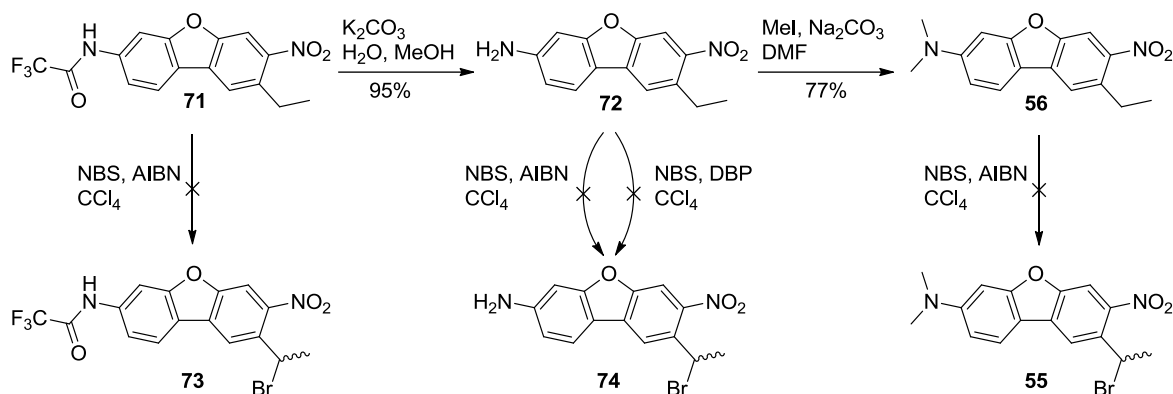


Abbildung 81: Übersicht zu den Bromierungsversuchen der Verbindungen **71**, **72** und **56**.

Nachfolgend wurde die TFA-Schutzgruppe mit K₂CO₃ in H₂O und MeOH mit einer Ausbeute von 95% entfernt (Abbildung 81). Von dieser Verbindung **72** wurde eine Kristallstruktur erhalten, die in Abbildung 82 zu sehen ist. Diese war wichtig, um zu belegen, dass sich alle Substituenten an der gewünschten Position befinden und es nicht zur Bildung eines Konstitutionsisomers gekommen ist.

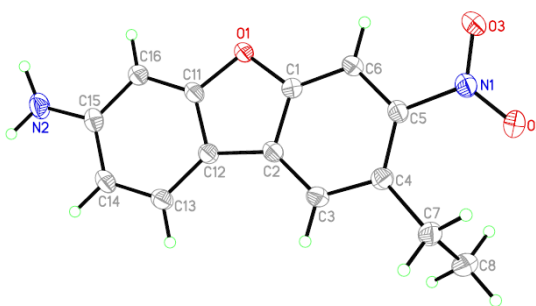


Abbildung 82: Kristallstruktur der Verbindung **72**.

Im Anschluss wurde die Aminofunktion mit Methyljodid und Natriumcarbonat in DMF methyliert. Die Ausbeute von Verbindung **56** betrug 77% (Abbildung 81).

Leider zeigte sich, dass der bis dahin schwierigste Schritt - die Einführung der Aminofunktion - nicht der letzte sein sollte. Den nächsten wichtigen Schritt stellt die Bromierung der Alkylseitenkette dar. Dazu wurde Verbindung **56** mit NBS und AIBN als Radikalstarter in CCl_4 bei $100\text{ }^\circ\text{C}$ umgesetzt. Die Reaktionszeit wurde kurz gehalten (1h) um Mehrfachbromierungen zu vermeiden. Leider zeigte sich, dass die Bromierung trotz Siedehitze und Lichteinfluss am Ring erfolgte und hier an mehreren Stellen eine Bromierung stattfand. Da die entstehenden Nebenprodukte durch eine elektrophile Substitution erfolgen, lag die Überlegung nahe, die Bromierung der Alkylkette mit elektronenärmeren Aromaten durchzuführen. Aus diesem Grund wurde die etwas elektronenärmere Verbindung **72** versucht mit NBS in Chloroform und entweder AIBN oder DBP als Radikalstarter an der Seitenkette zu bromieren. Auch hier erfolgte die anschließende Bromierung nicht an der Seitenkette, sondern es erfolgte wiederum eine Vielzahl von elektrophilen Substitutionen am Aromaten.

Zuletzt wurde auch die TFA-geschützte Verbindung **71**, die die geringste Elektronendichte im Ring aufweisen sollte, mit NBS und AIBN umgesetzt. Auch hier konnte keine Bromierung an der Seitenkette beobachtet werden, stattdessen erfolgte auch hier die Bromierung an verschiedenen Positionen des Dibenzofuranrings (Abbildung 81).

Auf Grund dieser Problem wurde der vorliegende Syntheseweg verworfen und sich auf die Route 2 konzentriert, die nach eigenen Vorarbeiten im Rahmen der Bachelorarbeit von Michael Rudolph getestet wurde.

3.3.2. Syntheseroute 2: Aufbau des Dibenzofurans aus substituierten Benzolderivaten

Syntheseroute 2 basiert auf Deiters verbesserter Synthese des NDBFs die in Abbildung 83 dargestellt ist.^[91]

Die Synthese erfolgt über eine ULLMANN-Kondensation von **75** und **76** zu Verbindung **77**, gefolgt von einer nukleophilen Methylierung zu **78** und einer Pd-katalysierten Kupplung zum NDBF-OH **79**. Der produktlimitierende Schritt dieses Reaktionsweges ist die Pd-katalysierte Kupplung, die nur eine Ausbeute von 38% lieferte.

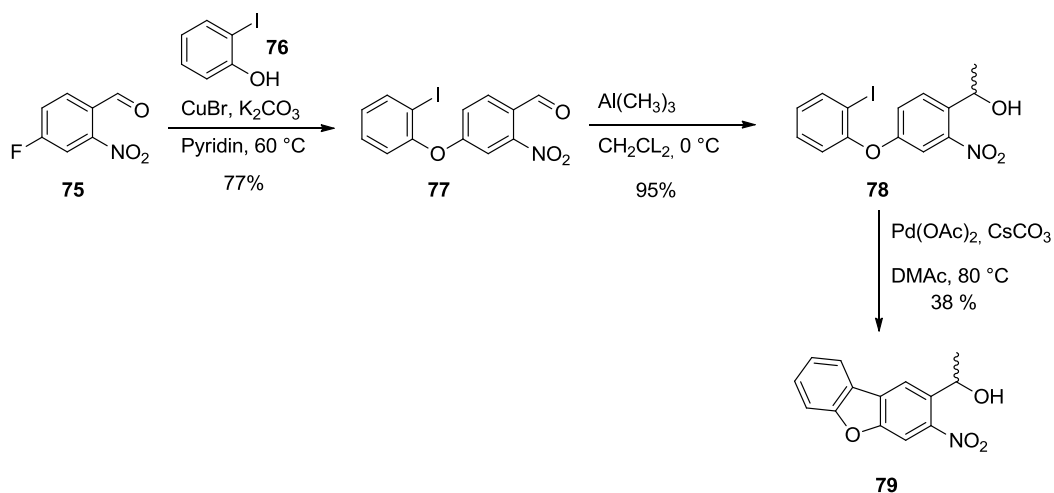


Abbildung 83: Übersicht der Synthese des NDBF-OH nach Deiters *et al.*^[91]

Für die Synthese des DMA-NDBF-OH **54** soll die fehlende Dimethylaminofunktion in Position 7 des NDBFs über diese Syntheseroute bereits im ersten Syntheseschritt erfolgen. Dazu wird ein 5-Dimethylamino-2-Iodphenol **81** benötigt, welches durch Iodierung des 3-(Dimethylamino)phenols **80** in Position 5, analog der Synthese von Wunderer^[138] erhalten werden soll. Im Anschluss folgen die bereits für NDBF gezeigten Reaktionsschritte: eine ULLMANN Kondensation mit 4-Fluor-2-nitrobenzaldehyd **75**, die Alkylierung von **82** und ein Ringschluss über eine Pd-katalysierten Kupplung um zum DMA-NDBF-OH **54** zu gelangen. Teile dieser Syntheseroute wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Michael Rudolph durchgeführt.^[139]

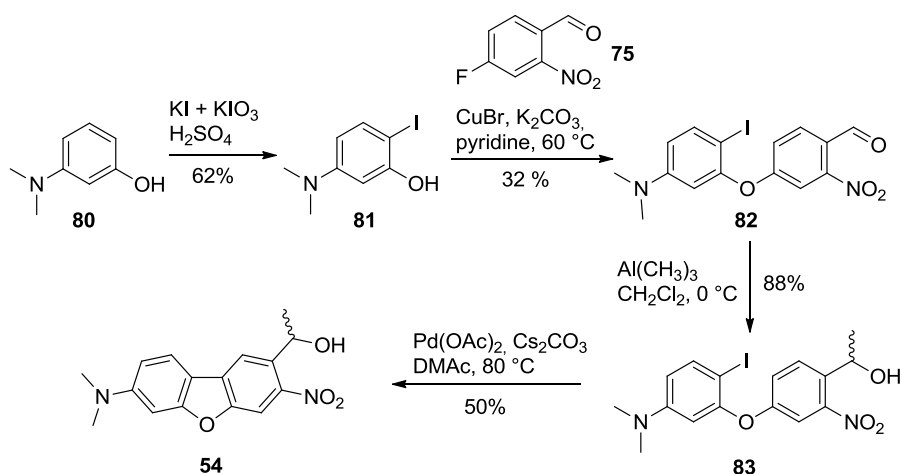


Abbildung 84: Syntheseübersicht des DMA-NDBF-OH **54** ausgehend von 3-(Dimethylamino)phenol **80**.

Die Iodierung des 3-(Dimethylamino)phenols **80** erfolgte nach einer Vorschrift von Wunderer^[138] unter Zuhilfenahme von Kaliumiodid und Kaliumiodat mit Schwefelsäure (Abbildung 84). Dabei kommt es zu einer Komproportionierung, bei der das generierte Iod elektrophil an der 6-Position des Aromaten angreifen kann. Durch den positiven induktiven Effekt und den sterischen Anspruch der Dimethylaminofunktion kommt es selektiv nur zur Bildung des gewünschten 5-(Dimethylamino)-2-iodphenols. Zunächst konnten bei dieser Reaktion nur Ausbeuten im Bereich von 10% erreicht werden. Problematisch ist hier, dass die Iodierungsgeschwindigkeit von Phenolen umgekehrt proportional zur Ioditionenkonzentration ist, ein großer Überschuss von Iodationen allerdings zur Oxidation führen kann.^[138] Deshalb musste bei dieser Reaktion immer ein leichter Iodatüberschuss beim Zutropfen beibehalten werden und die Reaktandenzugabe musste langsam über 3 h stattfinden. So konnte eine Ausbeute von 62% erreicht werden. Umkristallisationsversuche mit DCM führten zum Verlust des Produkts, dieses wurde aber bereits in der Literatur als instabil beschrieben.^[138] Deshalb wurde hier auf weitere Aufreinigung verzichtet.

Als nächstes erfolgte analog Deiters *et al.*^[91] eine ULLMANN-Kondensation mit 2-Fluor-4-nitrobenzaldehyd unter Zuhilfenahme von Cu(I)Br und K₂CO₃ in Pyridin bei Reaktionstemperaturen von 60 °C. Die Ausbeute betrug dabei 32%. Dies ist im Vergleich zur literaturbelegten Ausbeute von Verbindung **77** mit 77% für die Ullmanns-Kondensation eine eher geringe Ausbeute. Diese geringe Ausbeute kann der veränderten elektronischen Struktur des Edukts **80** geschuldet sein, die die Reaktivität beeinflussen könnte.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Michael Rudolph^[139] wurde versucht die Kondensations-Reaktion zu verbessern, wie zum Beispiel durch Austausch des K₂CO₃ gegen Cs₂CO₃, was leider keine Verbesserung der Ausbeute lieferte. Es wurde unter anderem versucht anstelle der beschriebenen ULLMANN-Kondensation eine Kondensation unter Zuhilfenahme der starken nicht-nukleophilen Base Kalium-*tert*-butanolat in DMSO durchzuführen.^[140] In der Original-Literatur wurde anstelle des Fluor-Benzols ein unsubstituiertes Brombenzol eingesetzt. Als Mechanismus wird hier und in einer ähnlichen Studie über Metall- und Liganden-freie ULLMANN-Kondensationen^[141] die Bildung eines Arins durch die Base Kalium-*tert*-butanolat beschrieben. Die Base deprotoniert ebenfalls den Alkohol des zweiten Edukts, das dann am Arin angreifen kann.^[141] Dieser Versuch lieferte bei einer Ansatzgröße von 100 mg eine Ausbeute von 45%. Bei Upscaling-Versuchen auf 1 g reduzierte sich die Ausbeute allerdings auf 6%. Diese geringe Ausbeute resultierte allerdings wahrscheinlich aus der fehlerhaften Durchführung der Reaktion. Dabei wurden alle festen Reaktanten im Kolben vorgelegt und im Anschluss das Lösungsmittel zugegeben. Dabei kam es zu einer heftigen exothermen Reaktion mit einer Verpuffung. Dies liegt an der hohen Reaktivität des Kalium-*tert*-butanolats. Im Rahmen seiner Masterarbeit konnte Erik Unger durch Vorlage des 5-

(Dimethylamino)-2-iodphenols in DMSO, Zugabe von 1.05 eq des Kalium-*tert*-butanolats und anschließender portionsweiser Zugabe des 4-Fluor-2-nitrobenzaldehyds die Ausbeute dieses Reaktionsschritts auf 63% erhöhen.

Im Anschluss an die Kondensation erfolgte eine nukleophile Methylierung mit Trimethylaluminium in DCM bei 0 °C. Diese lief ohne große Probleme ab und lieferte eine gute Ausbeute von 88% in 3 h für Verbindung **83**.

Der letzte Schritt zum Zielmolekül **54** gelingt durch eine Pd-katalysierten Kupplung mit Pd(OAc)₂ und CsCO₂ in DMAc bei 80 °C. Entscheidend ist bei diesem Reaktionsschritt die Reaktionszeit. Diese lag bei 36-48 h und ergab eine Ausbeute von 50%. Die Zielverbindung ist ein tiefroter Feststoff.

Bereits die rote Farbe lässt darauf schließen, dass die Absorption des DMA-NDBF-OH im Vergleich zum gelb gefärbten NDBF-OH eine bathochrome Verschiebung aufweist. Diese Verschiebung ist auch deutlich im Vergleichs-Absorptionsspektrum der beiden Verbindungen zu sehen, das in Abbildung 85 gezeigt wird. Für diese Spektren wurden beide Verbindungen in DMSO gelöst und vermessen. Durch Division der Absorptionswerte durch das Produkt aus Schichtdicke und Konzentration wurden die entsprechenden Extinktionskoeffizienten erhalten. Das Absorptionsmaximum von DMA-NDBF-OH liegt bei ca. 426 nm, was gegenüber NDBF-OH mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 316 nm einer bathochromen Verschiebung von 110 nm entspricht, die alleine durch die Einführung eines Dimethyl-Amino-Substituenten an Position 7 zustande kommt.

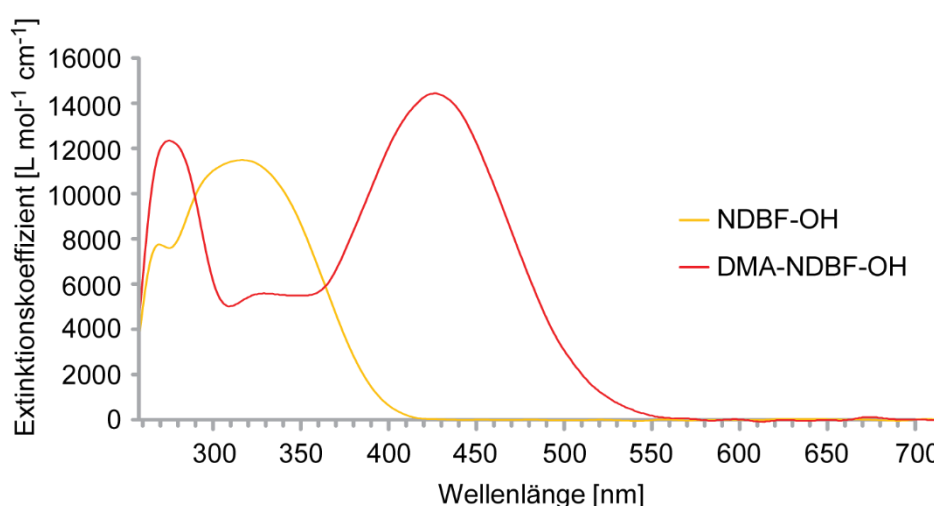


Abbildung 85 Absorptionsspektren von NDBF-OH und DMA-NDBF-OH in DMSO. Aufgetragen wurde jeweils der Extinktionskoeffizient, der durch Division der Extinktion, durch das Produkt aus Schichtdicke und Konzentration der Lösung, erhalten wurde.

Es wurde auch überprüft, ob die neue Schutzgruppe fluoresziert, was von Nachteil für die Photolyse-Quantenausbeute wäre. Zu diesem Zweck wurde am Platerader die für die Absorptionsmessung verwendete Lösung mit 400 nm angeregt und ein Emissions-Scan durchgeführt. Es zeigte sich allerdings keine Fluoreszenz, was DMA-NDBF-OH voraussichtlich zu einer effizienten photolabilen Schutzgruppe macht.

3.3.3. Zusammenfassung und Ausblick

Die photolabile Zweiphotonen-sensitiven Schutzgruppe NDBF, die bereits zur Schützung des Ca^{2+} -Chelators EGTA eingesetzt wurde, zeigte neben einer besseren Einphotonen-Freisetzung einen ausgezeichneten Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt von 0.6 GM. Durch quantenmechanische Berechnungen konnten Dreuw *et al.* durch Einfügen eines Dimethylamino-Substituenten in Position 7 *in-silico* das Zweiphotonen-Absorptionsverhalten deutlich verbessern. Ziel dieses Teilprojekts war die Synthese dieses abgewandelten DMA-NDBF-OHs. Dazu wurden zwei verschiedene Synthesewege getestet. Die erste Syntheseroute erfolgte angelehnt an die von Ellis-Davies entwickelte Syntheseroute, die für hNDBF-OH bereits von Dr. Timo Mack abgewandelt wurde. Als Grundbaustein fungiert dabei unsubstituiertes Dibenzofuran, das in geplanten 8 Stufen zum DMA-NDBF-OH umgesetzt werden sollte. Bei der Durchführung dieser Synthese ergaben sich zunächst Probleme die Nitrofunktion an der richtigen Stelle einzuführen. Dazu war es nötig die Acetylfunktion zur Ethylfunktion zu reduzieren. Weiterhin musste das Amin am anderen Ring mit TFA geschützt werden, da nur so die Nitrofunktion korrekt eingebaut werden konnte. Allerdings schlugen alle Versuche die Ethyleinheit zu Bromieren fehl, weshalb dieser Syntheseweg nicht zum Zielmolekül DMA-NDBF-OH führte.

Der zweite Syntheseweg erfolgte analog zu Deiters *et al.* über den Aufbau des Dibenzofuranrings ausgehend von zwei substituierten Benzolringen. Schlüsselschritt dieser Reaktion war die ULLMANN-Kondensation, die leider nur mit geringen Ausbeuten erfolgte. Im Rahmen der Masterarbeit von Erik Unger konnte dieser Reaktionsschritt deutlich verbessert werden. Insgesamt führte dieser Syntheseweg zum gewünschten Produkt **54**, welches mit 9% über 4 Stufen erhalten werden konnte.

Das Absorptionsspektrum des DMA-NDBF-OH **54** zeigt deutlich, dass das Absorptionsmaximum um 110 nm im Vergleich zum NDBF-OH bathochrom verschoben ist. Alleine diese starke Absorptions-Verschiebung macht diese Schutzgruppe zu einem interessanten Kandidaten für die wellenlängenselektive Photolyse.

Um die Photolyseeffizienz auf Zweiphotonen-Ebene zu analysieren, ist es sinnvoll die DMA-NDBF-OH als Schutzgruppe für einen Neurotransmitter wie Glutamat zu verwenden, da so in späteren Studien ein Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt in Neuronen bestimmt werden kann. Zu diesem Zweck wurden erste Versuche der Synthese des geschützten Glutamats und der anschließende Entschützung der Schutzgruppen des Glutamats durchgeführt. Laut Massanalyse konnte das DMA-NDBF geschützte Glutamat synthetisiert werden. Allerdings ist die Aufreinigung des geschützten Glutamats aufgrund seiner unterschiedlichen Protonierungszustände etwas schwieriger. Auch der Nachweis des freien Glutamats über HPLC-Methoden stellt aktuell noch ein großes Problem dar. Wenn all diese Probleme behoben sind, sollte von dieser Verbindung eine Einphotonen-Charakterisierung erfolgen und in Zellen die Messung der quadratischen Abhängigkeit und die Bestimmung des Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitts möglich sein.

Da der Arbeitskreis weiterhin an photolabil geschützten Oligonukleotiden interessiert ist, ist es ein Ziel DMA-NDBF als Schutzgruppe für die Schützung von Oligonukleotiden zu verwenden. Da das DMA-NDBF-OH große Ähnlichkeiten mit dem NDBF-OH hat, bei dem bereits gezeigt wurde, dass es die Abspaltungsbedingungen von der festen Phase nicht übersteht, ist es das Ziel von Erik Unger im Rahmen seiner Masterarbeit DMA-NDBF-NH₂ herstellen, dass zur Schützung eines dA oder dC Bausteins verwendet werden kann. Erik Unger konnte basierend auf der hier beschriebenen Synthese erfolgreich das DMA-NDBF-NH₂ herstellen und das entsprechend geschützte dA-Phosphoramidit synthetisieren. Mittels Festphasensynthese konnte ebenfalls ein DMA-NDBF-geschütztes DNA-Oligonukleotide synthetisiert werden. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Verdrängungs-Assay konnte bereits gezeigt werden, dass DMA-NDBF durch Zweiphotonen-Anregung im Hydrogel photolysiert werden kann.

4. Experimenteller Teil

4.1. Chemische Synthese

4.1.1. Materialien und Methoden

Reagenzien und Lösungsmittel

Wasserfreie Lösungsmittel wurden von *AcroSeal* und *Sigma-Aldrich Corporation* erworben und über 4 Å Molekularsieb gelagert. Die für die organischen Synthesen benötigten kommerziell erhältlichen Chemikalien wurden von *Sigma-Aldrich*, *TCl*, *Acros*, *Fluka*, *Carbosynth* und *ChemGenes* bezogen.

Dünnschichtchromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator der Firma *Merck* und *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* (Schichtdicke: 0.2 mm) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Zuckerbausteine wurden mittels Anisaldehyd/Schwefelsäure angefärbt. Dazu wurden 0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL Schwefelsäure gelöst und die DC-Platte anschließend auf 100 °C erhitzt. Der Zucker verfärbt sich dabei dunkelblau.^[142]

Säulenchromatographie

Die präparative Säulenchromatographie erfolgte mit Kieselgel 60 M (0.04 – 0.063 mm) von *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG*. Die Trennungen wurden mittels Gradient durchgeführt. Die für die Chromatographie eingesetzten Lösungsmittel DCM, Cyclohexan und Essigsäureethylester hatten technische Qualität, Methanol, Aceton und Iso-Propylalkohol wurden in analytischer Qualität eingesetzt.

Für die Aufreinigung der Phosphoramidite wurden Cyclohexan und Aceton in analytischer Qualität verwendet. Nachdem Patrick Seyfried im Rahmen seiner Masterarbeit zeigen konnte, dass das verwendete Cyclohexan Butyldiglykol enthielt wurden alle späteren Phosphoramidite mit Hexan anstelle des Cyclohexans aufgereinigt.^[143]

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an den Geräten AM250, AV300, AV400 und AV500 der Firma *Bruker* aufgenommen. Die Kopplungskonstanten J wurden in [Hz] angegeben. Die chemische Verschiebung wurde in [ppm] angegeben und auf das jeweilige Lösungsmittel geeicht. Die Multiplizität der ^1H -Signale werden mit s für Singulett, bs für breites Singulett, d für Dublett, dd für Dublett von Dublett, t für Triplett, q für Quartett und m für Multiplett angegeben.

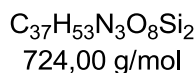
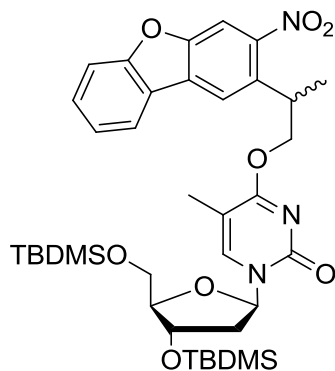
Massenspektrometrie

Zur Messung hochaufgelöster Massen erfolgte an einem MALDI Orbitrap XL der Firma *Thermo* verwendet unter Verwendung von α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix.

Die ESI-MS-Messungen wurden an einem VG Plattform II Gerät mit Quadrupolanalysator der Firma *Fisons* im positiv und negativ Modus durchgeführt.

4.1.2. Synthese des dT^{hNDBF}-Phosphoramidits

3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-O⁴-[2-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)propyl]-2'-desoxythymidin (**34**)



558 mg (1.07 mmol) **33** und 290 mg hNDBF-OH (1.07 mmol, 1 eq) wurden in trockenem Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurde 0.18 mL DBU (1.18 mmol, 1.1 eq) gegeben und für 96 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM:EE = 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

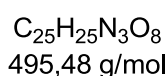
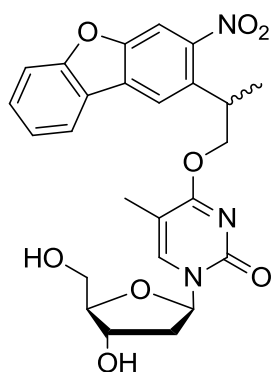
Ausbeute: 550 mg (0.76 mmol, 71 %)

DC (CH₂Cl₂: EE = 9:1): R_f = 0.93

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆): δ = 8.56 (s, 1H, H_{ar}), 8.26 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, H_{ar}), 8.14 (s, 1H, H_{ar}), 7.73-7.71 (m, 2H, H_{ar}, H₆), 7.66-7.62 (m, 1H, H_{ar}), 7.50-7.46 (m, 1H, H_{ar}), 6.23-6.20 (m, 1H, H1'), 4.64-4.52 (m, 2H, CH₂), 4.50-4.45 (m, 1H, H3'), 3.98-3.94 (m, 1H, H4'), 3.89-3.82 (m, 3H, CH, H5', H5''), 2.36-2.28 (m, 1H, H2'), 2.11-1.99 (m, 1H, H2''), 1.79 (s, 3H, C5-CH₃), 1.57 (d, ³J = 7.0 Hz, 3 H, CH₃), 0.91-0.87 (18H, SiC(CH₃)₃), 0.11-0.09 (12H, SiCH₃)

¹³C-NMR (62.9 MHz, Aceton-d₆): δ = 170.6, 158.9, 155.4, 154.2, 150.3, 140.9, 133.5, 130.2, 129.0, 124.7, 123.5, 123.0, 121.7, 112.8, 108.4, 103.8, 88.8, 87.0, 73.4, 71.8, 71.2, 63.8, 42.3, 34.5, 26.3, 26.2, 26.1, 18.9, 18.6, 18.5, 12.2, -4.5, -4.7, -5.3

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₃₇H₅₃N₃O₈Si₂ [M+K]⁺ 762.30028, gefunden 762.30020 (Δm = 0,00008, Fehler 0,1 ppm).

O⁴-[2-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)propyl]-2'-desoxythymidin (35)

470 mg (0.65 mmol) **34** wurden in 10 mL trockenem THF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden nacheinander 0.22 mL (3.89 mmol, 6 eq) Essigsäure und 1.95 mL (1M in THF, 1.95 mmol, 3 eq) TBAF Lösung zugegeben und für 16 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie (CH₂Cl₂: *i*-PrOH 100:0 → 9:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 320 mg (0.67 mmol, quantitativ)

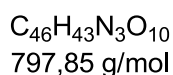
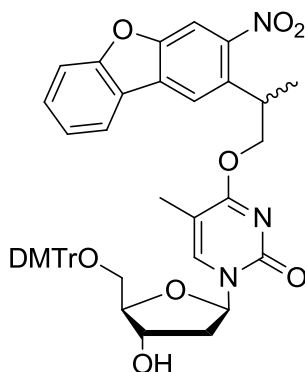
DC (CH₂Cl₂ : *i*-PrOH = 19:1): R_f = 0.21

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.58 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H_{ar}), 8.30-8.27 (m, 2H, H_{ar}), 7.95 (s, 1H, H₆), 7.78 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, H_{ar}), 7.66-7.62 (m, 1H, H_{ar}), 7.51-7.47 (m, 1H, H_{ar}), 6.12-6.07 (m, 1H, H1'), 5.21-5.19 (m, 1H, 3'-OH), 5.03-5.00 (m, 1H, 5'-OH), 4.58-4.45 (m, 2H, CH₂), 4.21-4.17 (m, 1H, H3'), 3.80-3.77 (m, 1H, H4'), 3.78-3.68 (m, 1H, CH), 3.62-3.50 (m, 2H, H5', H5''), 2.19-2.11 (m, 1H, H2'), 2.01-1.89 (m, 1H, H2''), 1.71 (d, J = 3.4 Hz, 3H, C5-CH₃), 1.48 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d₆): δ = 169.3, 157.4, 154.4, 152.6, 148.9, 141.0, 132.1, 129.4, 127.5, 123.9, 122.3, 122.1, 121.0, 112.1, 107.6, 102.7, 87.5, 85.4, 70.7, 69.9, 60.9, 40.6, 33.0, 18.1, 11.5

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₂₅H₂₅N₃O₈ [M+K]⁺ 534.12732, gefunden 534.12554 (Δm = 0,00178, Fehler 3.3 ppm).

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O⁴-[2-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)propyl]-2'-desoxythymidin (36)



300 mg (0.61 mmol) **35** wurden mit trockenem Pyridin coevaporiert und anschließend mit 5 mL trockenem Pyridin gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Zur Reaktionslösung wurden 266 mg (0.79 mmol, 1.3 eq) DMTrCl zugegeben und für 16 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethanol beendet und nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in DCM gelöst und mit 5%iger wässriger Zitronensäure und gesättigter wässriger NaHCO₃ gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (CH₂Cl₂:MeOH = 99:1 → 95:5) aufgereinigt.

Ausbeute: 380 mg (0.48 mmol, 79%)

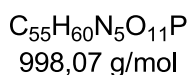
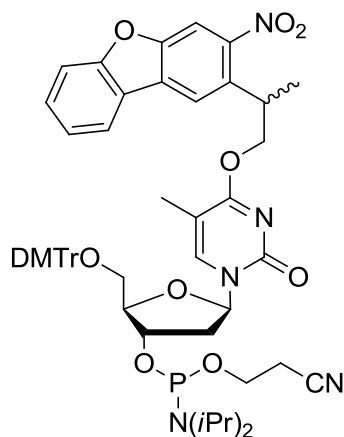
DC (CH₂Cl₂ : *i*-PrOH = 19:1): R_f = 0.59

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.58 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H_{ar}), 8.30-8.26 (m, 2H, H_{ar}), 7.79-7.74 (m, 2H, H₆, H_{ar}), 7.66-7.62 (m, 1H, H_{ar}), 7.51-7.47 (m, 1H, H_{ar}), 7.35-7.33 (m, 2H, H_{ar}), 7.28-7.15 (m, 7H, H_{ar}), 6.87-6.85 (m, 4H, H_{ar}), 6.16-6.13 (m, 1H, H1'), 5.32-5.30 (m, 1H, 3'-OH), 4.59-4.45 (m, 2H, CH₂), 4.32-4.24 (m, 1H, H3'), 3.94-3.91 (m, 1H, H4'), 3.72-3.69 (m, 7H, CH, 2x OCH₃), 3.22-3.18 (m, 2H, H5', H5''), 2.28-2.20 (m, 1H, H2'), 2.13-2.06 (m, 1H, H2''), 1.48 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 1.38-1.37 (m, 3 H, C5-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ = 169.3, 158.1, 157.4, 154.3, 152.6, 149.0, 148.9, 144.7, 144.7, 140.4, 135.4, 135.2, 132.1, 132.1, 129.7, 129.5, 127.9, 127.6, 127.6, 126.7, 124.0, 122.3, 122.1, 121.1, 121.0, 113.2, 112.1, , 107.6, 103.0, 85.9, 85.7, 85.4, 70.9, 70.8, 70.1, 63.4, 63.3, 55.0, 47.6, 45.7, 40.7, 33.0, 23.8, 18.1, 11.1 ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₄₆H₄₃N₃O₁₀ [M+K]⁺ 836.25800, gefunden 836.25904 (Δm = 0,00104, Fehler 1.2 ppm)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O⁴-[2-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)propyl]-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit (37**)**



70 mg (0.09 mmol) **36** wurde in 6 mL trockenem DCM gelöst und 80 μ L (0.48 mmol, 5.5 eq) *N,N*-Diisopropylethylamin zur Lösung zugegeben. Nach 15 minütigem Rühren bei RT wurden 40 μ L (0.18 mmol, 2 eq) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphin zugetropft und für weitere 2 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Aceton = 2:1) aufgereinigt. Als Produkt wurde ein hellgelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 48 mg (0.05 mmol, 41%)

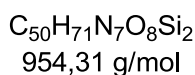
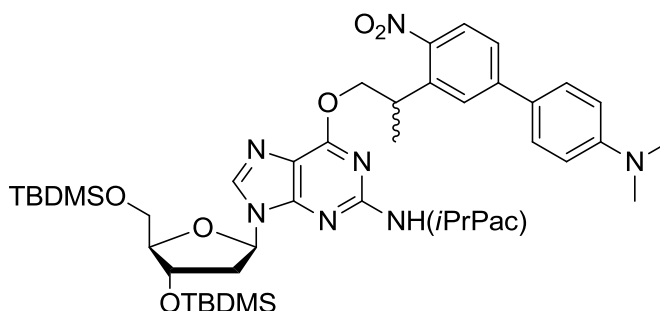
DC (Cyclohexan:Aceton = 2:1): $R_f = 0.27$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 8.59$ (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.31-8.27 (m, 2H, H_{ar}), 7.81-7.75 (m, 2H, H_6 , H_{ar}), 7.67-7.63 (m, 1H, H_{ar}), 7.52-7.48 (m, 1H, H_{ar}), 7.35-7.33 (m, 2H, H_{ar}), 7.28-7.16 (m, 7H, H_{ar}), 6.87-6.83 (m, 4H, H_{ar}), 6.18-6.10 (m, 1H, $\text{H}_{1'}$), 4.58-4.45 (m, 3H, $\text{H}_{3'}$, CH_2), 4.08-4.00 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.72 – 3.45 (m, 11H, 2x OCH_3 , CH_2 , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, 2x *i*-Pr-CH), 3.27 – 3.22 (m, 2H, $\text{H}_{5'}$, $\text{H}_{5''}$), 2.90 – 2.60 (m, 3H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, CH), 2.42 – 2.19 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{2''}$), 1.48 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3), 1.40-1.37 (m, 3H, $\text{C}_5\text{-CH}_3$), 1.23 – 0.95 (m, 12H, $\text{CH}_3\text{-i-Pr}$)

$^{31}\text{P NMR}$ (202.5 MHz, DMSO-d_6) δ : 147.54, 147.54, 147.27, 147.22

4.1.3. Synthese des dG^{ANBP}-Phosphoramidits

3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-N²-(4-isopropylphenoxyacetyl)-O⁶-[2-(4'-(dimethylamino)-4-nitrobiphenyl-3-yl)propyl]-2'-desoxyguanosin (**40**)



1.88 g (2.79 mmol) **38**, 997 mg (3.319 mmol, 1.2 eq) ANBP-OH **39** (synthetisiert von der Gruppe Göldner/Specht^[144]) und 874 mg (5.02 mmol, 1.8 eq) PPh₃ wurden in 50 mL abs. THF gelöst. Zum Reaktionsgemisch wurde 1.52 mL (40% in Toluol, 3.33 mmol, 1.2 eq) DEAD gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (CH:Aceton = 5:1) aufgereinigt. Als Produkt wurde ein roter Schaum erhalten.

Ausbeute: 2.12 g (2.22 mmol, 80%)

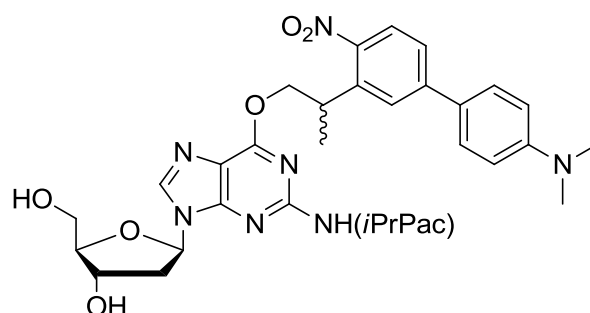
DC (CH:Aceton = 2:1): R_f = 0.54

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.58-10.57 (m, 1H, NH), 8.38 (s, 1H, H₈), 7.91-7.88 (m, 2H, H_{ar} ANBP), 7.68-7.62 (m, 3H, H_{ar} ANBP), 7.11 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, H_{ar} *i*PrPac), 6.84-6.77 (m, 4H, 2x H_{ar} ANBP, 2x H_{ar} *i*PrPac), 6.31-6.28 (m, 1H, H1'), 4.95-4.83 (m, 4H, CH₂ *i*PrPac, CH₂ ANBP), 4.60-4.57 (m, 1H, H3'), 3.94-3.87 (m, 1H, CH ANBP), 3.85-3.82 (m, 1H, H4'), 3.77-3.73 (m, 1H, H5'), 3.66-3.62 (m, 1H, H5''), 2.95 (s, 6H, N-(CH₃)₂), 2.94-2.89 (m, 1H, H2'), 2.80 (septett, ³J = 6.9 Hz, 1H, CH *i*PrPac), 2.30-2.25 (m, 1H, H2''), 1.45 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, CH₃ ANBP), 1.15 (d, ³J = 6.9 Hz, 6H, 2x CH₃ *i*PrPac), 0.86-0.81 (m, 18H, SiC(CH₃)₃), 0.08(-0.04) (m, 12H, Si(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 167.8, 160.5, 156.5, 153.1, 153.0, 152.0, 152.0, 151.2, 147.6, 145.4, 141.9, 141.9, 141.2, 138.5, 138.4, 128.4, 127.5, 127.4, 125.7, 125.4, 125.4, 125.2, 124.6, 117.9, 117.9, 115.4, 114.7, 112.8, 87.9, 83.9, 83.8, 72.6, 70.6, 67.8, 63.3, 38.9, 38.8, 33.9, 33.1, 26.2, 26.1, 24.7, 24.6, 18.5, 18.4, 18.2, -4.4, -4.5, -5.1, -5.1 ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für $C_{50}H_{71}N_7O_8Si_2$ $[M+Na]^+$ 976.47949, gefunden 976.47874 ($\Delta m = 0.00075$, Fehler 0.7 ppm)

***N*²-(4-Isopropylphenoxyacetyl)-*O*⁶-[2-(4'-(dimethylamino)-4-nitrobiphenyl-3-yl)propyl]-2'-desoxguanosin (41)**



$C_{38}H_{43}N_7O_8$
725,79 g/mol

2.00 g (2.10 mmol) **40** wurde in 24 mL abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde nacheinander 0.72 mL (12.6 mmol, 6 eq) Essigsäure und 6.3 mL (1 M in THF, 6.31 mmol, 3 eq) TBAF-Lösung gegeben und für 18 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie ($CH_2Cl_2:MeOH$ 99:1 → 94:6) aufgereinigt und als orangeroter Schaum erhalten.

Ausbeute: 1.22 g (1.679 mmol, 80%)

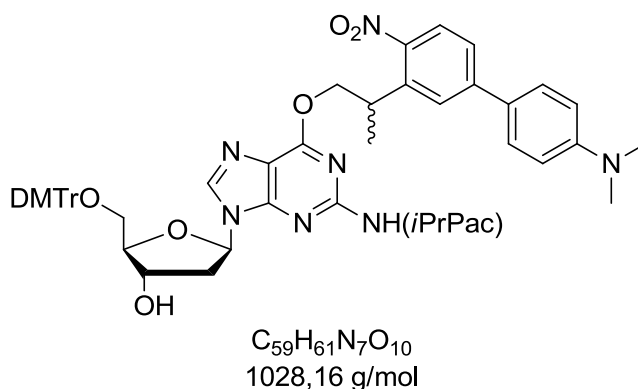
DC ($CH_2Cl_2:MeOH = 9:1$): $R_f = 0.68$

¹H-NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 10.59$ (s, 1H, NH), 8.45 (s, 1H, H8), 7.91-7.88 (m, 2H, H_{ar} ANBP), 7.67-7.62 (m, 3H, H_{ar} ANBP), 7.12 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H, H_{ar} *i*PrPac), 6.84 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H, H_{ar} *i*PrPac), 6.78 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 2H, H_{ar} ANBP), 6.34-6.31 (m, 1H, H1'), 5.32 (d, $^3J = 4.1$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.99 (s, 2H, CH_2 *i*PrPac), 4.92-4.85 (m, 3H, 5'-OH, CH_2 ANBP), 4.42-4.39 (m, 1H, H3'), 3.95-3.88 (m, 1H, CH ANBP), 3.85-3.84 (m, 1H, H4'), 3.60-3.56 (m, 1H, H5'), 3.53-3.49 (m, 1H, H5''), 2.96 (s, 6H, $N-(CH_3)_2$ ANBP), 2.80 (septet, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, CH *i*Pr-Pac), 2.70-2.66 (m, 1H, H2'), 2.29-2.25 (m, 1H, H2''), 1.46 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3 ANBP), 1.15 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 6H, 2x CH_3 *i*Pr-Pac) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 167.7, 160.0, 159.9, 156.0, 152.7, 152.7, 151.6, 150.7, 147.2, 147.2, 145.0, 145.0, 141.2, 140.8, 138.0, 138.0, 127.9, 127.1, 125.2, 125.0, 124.7, 124.7, 124.2, 117.2, 114.3, 112.4, 87.9, 83.3, 83.2, 70.6, 70.2, 67.4, 61.6, 39.8$ (unter dem $DMSO$ Signal), 33.4, 33.4, 32.6, 24.1, 18.1, 18.0 ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für $C_{38}H_{43}N_7O_8$ $[M+H]^+$ 726.32459, gefunden 726.32410 ($\Delta m = 0.00049$, Fehler 0.7 ppm)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N²-(4-isopropylphenoxyacetyl)-O⁶-[2-(4'-(dimethylamino)-4-nitrobiphenyl-3-yl)propyl]-2'-desoxyguanosin (42)



1.1 g (1.52 mmol) **41** wurde in abs. Pyridin coevaporiert und anschließend in 34 mL abs. Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C abgekühlt und 667 mg (1.97 mmol, 1.3 eq) DMTrCl hinzugefügt. Nach Rühren für 16 h bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von Ethanol hydrolysiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand in DCM gelöst, mit 5%iger Zitronensäure und gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Nach Trocknen über $MgSO_4$ wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (CH:EE = 1:1 → 1:3) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.1 g (1.094 mmol, 72%)

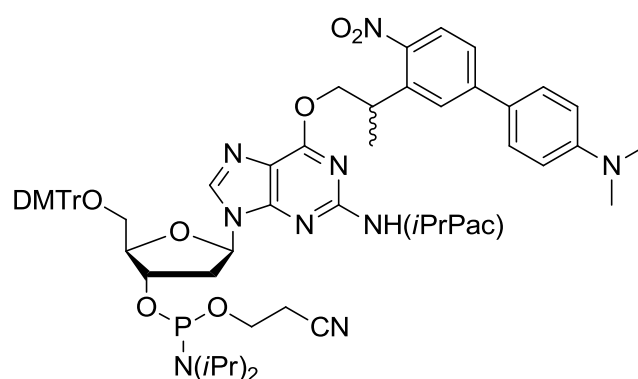
DC (CH:EE = 1:1): $R_f = 0.59$

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) $\delta = 10.54$ (s, 1H, NH), 8.33 (s, 1H, H8), 7.92-7.89 (m, 2H, H_{ar} -ANBP), 7.69-7.63 (m, 3H, H_{ar} -ANBP), 7.27-7.26 (m, 2H, H_{ar} -DMTr) 7.16-7.10 (m, 9H, H_{ar} -iPrPac, H_{ar} -DMTr), 6.82-6.69 (m, 8H, H_{ar} -DMTr, H_{ar} -ANBP, H_{ar} -iPrPac), 6.37-6.35 (m, 1H, H1'), 5.31 (d, $^3J = 4.6$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.98-4.83 (m, 4H, CH_2 -iPrPac, CH_2 -ANBP), 4.47-4.45 (m, 1H, H3'), 3.98-3.89 (m, 2H, CH-ANBP, H4'), 3.68-3.67 (m, 6H, CH_3 -O-DMTr), 3.28-3.25 (m, 1H, H5'), 3.09-3.06 (m, 1H, H5''), 2.95-2.94 (m, 6H, N-(CH_3)₂-ANBP), 2.86-2.78 (m, 2H, CH-iPrPac, H2'), 2.36-2.30 (m, 1H, H2''), 1.47 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3 -ANBP), 1.15 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 6H, 2x CH_3 -iPrPac) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, DMSO- d_6): δ = 167.4, 160.0, 157.9, 157.9, 156.0, 153.5, 152.5, 151.5, 150.7, 147.2, 145.0, 144.9, 141.5, 140.8, 138.0, 135.6, 135.6, 135.5, 129.7, 127.9, 127.6, 127.1, 126.5, 125.2, 125.0, 124.7, 124.2, 117.5, 114.3, 113.0, 112.9, 112.4, 86.3, 85.3, 83.6, 83.5, 70.6, 70.6, 70.3, 70.3, 67.4, 64.5, 64.4, 54.9, 54.9, 45.7, 39.0, 38.8, 33.4, 32.6, 24.1, 18.1 ppm.

ESI-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{59}\text{H}_{61}\text{N}_7\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1028.5, gefunden 1028.5

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^2 -(4-isopropylphenoxyacetyl)- O^6 -[2-(4'-(dimethylamino)-4-nitrobiphenyl-3-yl)propyl]-2'-desoxyguanosin-3'-O-(2-cyanoethyl- N,N -diisopropyl)phosphoramidit (43**)**



$\text{C}_{68}\text{H}_{78}\text{N}_9\text{O}_{11}\text{P}$
1228,37 g/mol

100 mg (0.097 mmol) **42** wurde in 7 mL abs. DCM gelöst und 0.09 mL (0.535 mmol, 5.5 eq) N,N -Diisopropylethylamin zur Lösung gegeben. Nach 15 min rühren bei RT wurde 0.04 mL (0.195 mmol, 2 eq) 2-Cyanoethoxy- N,N -diisopropylaminochlorophosphin zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter NaHCO_3 -Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (CH:Aceton = 2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 122 mg (0.06 mmol, 62%)

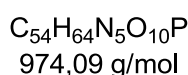
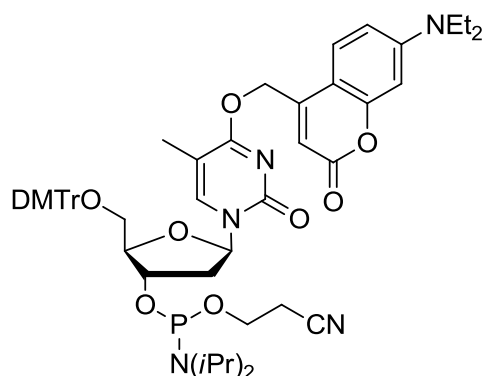
DC (Cyclohexan:Aceton = 2:1): R_f = 0.41

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.52-10.50 (m, 1H, NH), 8.36-8.34 (m, 1H, H8), 7.92-7.89 (m, 2H, H_{ar} ANBP), 7.69-7.63 (m, 3H, H_{ar} ANBP), 7.29-7.10 (m, 11H, H_{ar} i PrPac, H_{ar} DMTr), 6.82-6.69 (m, 8H, H_{ar} DMTr, H_{ar} ANBP), 6.39-6.35 (m, 1H, H1'), 4.95-4.82 (m, 4H, CH_2 i PrPac, CH_2 ANBP), 4.70-4.66 (m, 1H, H3'), 4.12-4.04 (m, 1H, H4'), 3.93-3.89 (m, 1H, CH ANBP),

3.75-3.66 (m, 7H, CH₃-O-DMTr, OCH₂CH₂CN), 3.61-3.57 (m, 1H, OCH₂CH₂CN), 3.54-3.47 (m, 2H, CH *i*Pr), 3.32-3.27 (m, 1H, H5'), 3.21-3.14 (m, 1H, H5''), 3.05-3.00 (m, 1H, H2'), 2.95-2.93 (m, 6H, N-(CH₃)₂ ANBP), 2.83-2.79 (m, 1H, CH *i*PrPac), 2.72-2.70 (m, 1H, OCH₂CH₂CN), 2.61-2.56 (m, 1H, OCH₂CH₂CN), 2.56-2.42 (m, 1H, H2'', im DMSO Signal), 1.47 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, CH₃ ANBP), 1.15 (d, ³J = 6.9 Hz, 6H, 2x CH₃ *i*PrPac), 1.11-0.97 (m, 12H, 2x *i*Pr-CH₃) ppm.
³¹P-NMR (202.5 MHz, DMSO-d₆): δ: 148.94, 148.27 ppm.

4.1.4. Synthese weiterer Phosphoramidite

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O⁴-[(7-(diethylamino)cumarin-4-yl)methyl]-2'-desoxy-thymidin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit (84)



150 mg (0.19 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O⁴-[(7-(diethylamino)cumarin-4-yl)methyl]-2'-desoxy-thymidin wurden in 6 mL DCM gelöst und 0.17 mL (1.05 mmol, 5.5 eq) DIPEA zugegeben und für 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 0.09 mL (0.38 mmol, 2eq) 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylaminochlorophosphin zugetropft und für weitere 2 h gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lsg. hydrolysiert und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Nach Trocken über MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan:Aceton =2:1)

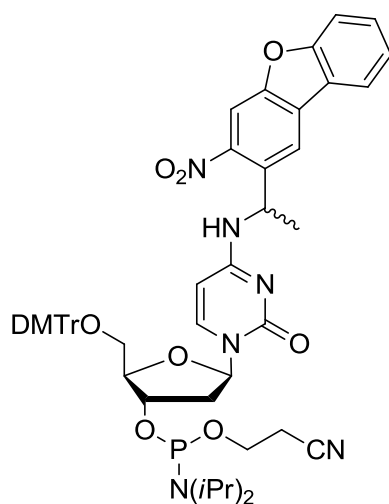
Ausbeute: 99 mg (0.10 mmol, 67%)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.94-7.92 (m, 1H, H₆), 7.51-7.49 (m, 1H, H_{ar}), 7.40-7.37 (m, 2H, H_{ar}), 7.33-7.21 (m, 8H, H_{ar}), 6.91-6.87 (m, 4H, H_{ar}), 6.71 (dd, ³J = 9.1 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, H_{ar}), 6.56 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, H_{ar}), 6.12-6.16 (m, 1H, H_{1'}), 5.98-5.97 (m, 1H, H_{ar}), 5.61-5.52 (m, 2H, CH₂ DEACM), 4.56-4.53 (m, 1H, H_{3'}), 4.13-4.06 (m, 1H, H_{4'}), 3.73-3.72 (m, 6H,

2x OCH₃), 3.68-3.48 (m, 4H, 2x *i*Pr-CH, OCH₂CH₂CN), 3.44 (q, ³J = 7.0 Hz, 4H, CH₂ NEt₂-DEACM), 3.29-3.25 (m, 2H, H5',H5''), 2.77-2.63 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 2.46-2.32 (m, 2H, H2',H2''), 1.66 (d, ³J = 10.3 Hz, 3H, C5-CH₃), 1.14-1.09 (m, 18H, 2x *i*Pr-CH₃, 2x CH₃ DEACM) ppm.

³¹P-NMR (121.5 MHz, DMSO-d₆): δ: 147.67, 147.35 ppm.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O⁴-[1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl]-2'-desoxycytidin-3'-O-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)phosphoramidit (85)



C₅₃H₅₇N₆O₁₀P
969,03 g/mol

114 mg (0.15 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O⁴-[1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl]-2'-desoxycytidin wurden in 10 mL DCM gelöst und 0.14 mL (5.5 eq, 0.81 mmol) DIPEA zugegeben und für 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 0.07 mL (2 eq, 0.30 mmol) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosfin hinzugegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lsg. hydrolysiert und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan:Aceton =2:1)

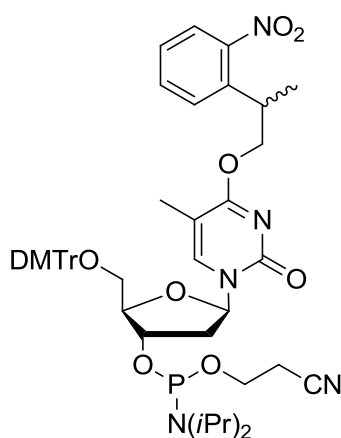
Ausbeute: 113 mg (0.12 mmol, 79%)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.42-8.37 (m, 3H, NH, H_{ar}), 8.23-8.18 (m, 1H, H_{ar}), 7.83-7.79 (m, 1H, H_{ar}), 7.70-7.61 (m, 2H, H_{ar}), 7.54-7.46 (m, 1H, H_{ar}), 7.38-7.18 (m, 9H, H_{ar}), 6.89-

6.85 (m, 4H, H_{ar}), 6.14-6.02 (m, 1H, H1'), 5.74-5.58 (m, 2H, H_{ar}), 4.51-4.37 (m, 1H, H3'), 4.00-3.92 (m, 1H, H4'), 3.73 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.69-3.38 (m, 4H, OCH₂CH₂CN, *i*Pr-CH₃), 3.26-3.16 (m, 2H, H5', H5''), 2.76-2.59 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 2.38-2.15 (m, 2H, H2', H2''), 1.60 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.12-0.94 (m, 12H, *i*Pr-CH₃) ppm.

³¹P-NMR (121.5 MHz, DMSO-d₆): δ: 147.67, 147.65, 147.34, 147.29 ppm.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O⁴-[2-(2-nitrophenyl)propyl]-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit (86)



C₄₉H₅₈N₅O₁₀P
907,99 g/mol

100 mg (0.14 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O⁴-[2-(2-nitrophenyl)propyl]-2'-desoxythymidin wurden in 10 mL DCM gelöst und 0.14 mL (5.5 eq, 0.78 mmol) DIPEA zugegeben und für 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 0.06 mL (2 eq, 0.28 mmol) 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylaminochlorophosfin hinzugetropft und für weitere 2 h gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lsg. hydrolysiert und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Nach Trocken über MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan:Aceton =2:1)

Ausbeute: 90 mg (0.10 mmol, 71%)

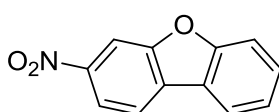
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.83-7.65 (m, 4H, H_{ar}, H6), 7.51-7.44 (m, 1H, H_{ar}), 7.38-7.21 (m, 9H, H_{ar}), 6.89-6.85 (m, 4H, H_{ar}), 6.19-6.12 (m, 1H, H1'), 4.55-4.34 (m, 3H, H3', CH₂-NPP), 4.10-4.03 (m, 1H, H4'), 3.73-3.72 (m, 6H, 2x OCH₃), 3.64-3.45 (m, 4H, OCH₂CH₂CN, 2x *i*Pr-CH), 3.30-3.23 (m, 2H, H5', H5''), 2.79-2.61 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 2.40-2.22 (m, 2H,

H2', H2''), 1.37-1.34 (m, 3H, CH₃), 1.25-1.08 (m, 12H, 2x *i*Pr-CH₃), 0.98 (d, ³J = 6.7 Hz, CH₃) ppm.

³¹P-NMR (101.3 MHz, DMSO-d₆): δ: 147.66, 147.38, 147.34 ppm.

4.1.5. Synthese von DMA-NDBF-OH - Route 1

3-Nitrodibenzofuran (61)



C₁₂H₇NO₃
213,19 g/mol

Die Synthese erfolgte nach einem Patent von Xia und Rayabarapu.^[129]

5 g (30 mmol) Dibenzofuran wurden in 65 mL Trifluoressigsäure vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. In einem zweiten Kolben wurden 2.5 mL (36 mmol, 1.2 eq, 65% v/v) Salpetersäure mit 9 mL Trifluoressigsäure gemischt und ebenfalls auf 0 °C gekühlt. Die Lösung wurde langsam unter Rühren zur Suspension bei 0 °C getropft. Nach 1.5 h rühren, wurde die Suspension auf 200 mL Eiswasser gegeben. Der Feststoff wurde abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Feststoff in DCM gelöst und mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und mit 100 mL Ethanol versetzt. Das DCM wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der verbleibende gelbe Rückstand im Ethanol wurde abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

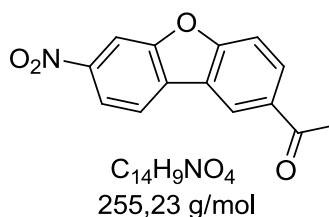
Ausbeute: 6.25 g (29.3 mmol, 98%)

DC (Cyclohexan:EE = 5:1): R_f = 0,65

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.61 (d, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H4), 8.41 (d, ³J = 8.5 Hz, H1), 8.33-8.29 (m, 2H, H2, H9), 7.83 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, H6), 7.70-7.66 (m, 1H, H7), 7.53-7.49 (m, 1H, H8) ppm.

¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ = 158.5, 155.2, 146.9, 130.3, 129.7, 123.9, 122.7, 121.9, 120.7, 118.6, 112.5, 108.1 ppm.

MS (ESI): *m/z* berechnet für C₁₂H₇NO₃ [M]⁺ 213.19, gefunden 213.2

1-(7-Nitrodibenzofuran-2-yl)-ethanon (60)

Diese Synthese wurde von Nina Deußner im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.^[128]

Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von Gilman *et al.*^[131]

4.5 g (21.1 mmol) Verbindung **61** wurden in 45 mL frisch destilliertem Nitrobenzol gelöst und mit 4.3 g (32.5 mmol, 1.54 eq) Aluminiumchlorid versetzt. Zu dieser Lösung wurden langsam 2.43 mL (34.18 mmol, 1.62 eq) Acetylchlorid zugetropft und für 1.5 h bei 100 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Nitrobenzol im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit Methanol gewaschen. Dieser graue Rückstand wurde aus Essigsäure umkristallisiert.

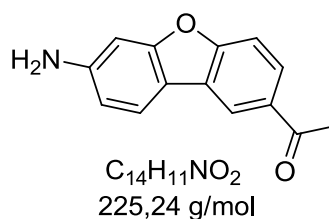
Ausbeute: 3.11 g (12.19 mmol, 58 %)

DC (Cyclohexan : EE = 5:1): R_f = 0.25

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.03 (d, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H6), 8.67 (d, ⁴J = 1.9 Hz, 1H, H1), 8.56 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H4), 8.36 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, H3), 8.26 (dd, ³J = 8.7 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 1H, H8), 7.94 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, H9), 2.72 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ = 196.9, 158.9, 155.1, 146.9, 133.1, 129.9, 129.5, 123.9, 122.3, 119.2, 112.3, 108.1, 26.9, 21.0 ppm.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C₁₄H₉NO₄ [M+H]⁺ 256.06043, gefunden 256.06053 (Δ*m* = 0.0001, Fehler 0.4 ppm)

1-(7-Aminodibenzofuran-2-yl)-ethanon (59)

Die Synthese erfolgte analog einer Vorschrift von Li *et al.*^[132]

In einem 100 mL Rundkolben wurden 3.72 g (14.46 mmol) Verbindung **60** in 35 mL Methanol gelöst. Dazu wurden 2.2 mL (15.91 mmol, 1.1 eq) NEt₃ zur Reaktionslösung hinzu getropft.

Anschließend wurden 0.41 g (3.76 mmol, 0.26 eq) Pd/C hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde in einem Autoklaven bei 10 bar H₂ über Nacht gerührt. Nach der Reduktion zum Amin wurde der Reaktionsansatz über Celite abfiltriert und anschließend mit Methanol gewaschen. Die Methanol-Phase wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen, mit Wasser gewaschen und schließlich die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das DCM wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt anschließend säulenchromatisch aufgetrennt (DCM:Methanol = 100:1).

Ausbeute: 2.81 g (12.48 mmol, 86%)

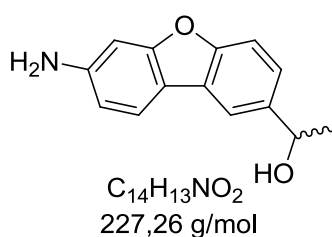
DC (Cyclohexan:EE = 1:1): R_f = 0.52

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.50 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H1), 7.92 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H3), 7.82 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H9), 7.61 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H4), 6.78 (d, ⁴J = 1.9 Hz, 1H, H6), 6.68 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 1H, H8), 5.67 (s, 2H, NH₂), 2.65 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ = 197.2, 158.5, 157.6, 150.4, 132.2, 125.2, 125.2, 121.7, 119.7, 111.4, 111.2, 110.7, 95.1, 26.8 ppm.

MS (ESI): *m/z* berechnet für C₁₄H₁₁NO₂ [M+H]⁺ 226.25, gefunden 226.8

1-(7-Aminodibenzofuran-2-yl)ethanol (64)



Diese Synthese wurde von Nina Deußner im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.^[128]

400 mg (1.76 mmol) **59** wurden unter Eiskühlung in 5 mL H₂O:1,4-Dioxan-Gemisch (3:2) gelöst und langsam 200 mg (5.30 mmol, 3 eq) Natriumborhydrid zugegeben und für 4 h unter Eiskühlung gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 10 mL Wasser versetzt. Nach 20minütigem Rühren wurde die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: quantitativ

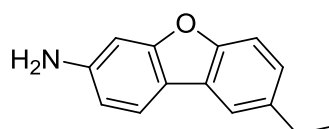
DC (Cyclohexan : EE = 1:1): $R_f = 0.33$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.80\text{-}7.79$ (m, 1H, H1), 7.69 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, H9), 7.42 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, H4), 7.25 (dd, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H3), 6.73 (d, $^4J = 1.7$ Hz, 1H, H6), 6.62 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 1H, H8), 5.51 (s, 2H, NH₂), 5.17 (d, $^3J = 4.04$ Hz, 1H, OH), 4.87-4.81 (m, 1H, CH), 1.38 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3H, CH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 158.0, 153.8, 149.6, 142.0, 142.4, 122.0, 121.1, 115.6, 112.3, 110.7, 110.1, 95.2, 68.3, 26.4$ ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₁₄H₁₃NO₂ [M]⁺ 227.09408, gefunden 227.09421 ($\Delta m = 0,00013$, Fehler 0.6 ppm).

8-Ethyl dibenzofuran-3-amin (69)



C₁₄H₁₃NO
211,26 g/mol

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an Vorschriften von Gadhwai *et al.*^[136] und Lin *et al.*^[137] 1.43 g (6.35 mmol) Verbindung **59** und 2.0 mL (26 mmol, 64%ige) wässrige Hydrazin-Lösung wurden in 20 mL Toluol vorgelegt und bei 90 °C und 120 W für 60 min in der Mikrowelle gerührt. Anschließend wurden weitere 1 mL Hydrazin-Lösung (13 mmol) hinzugegeben und der Ansatz erneut auf 90 °C bei 120 W für 60 min erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch in 50 mL H₂O überführt und mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das erhaltene hell-gelbe Zwischenprodukt wurde direkt weiter umgesetzt. Hierzu wurden 1.0 g (18 mmol) Kaliumhydroxid in 9 mL Ethylenglykol bei 100 °C und 300 W für 1 min in der Mikrowelle erhitzt. Die erhaltene hellbraune, klare Lösung wurde zu dem Hydrazon-Zwischenprodukt gegeben und bei 120 °C und 300 W in der Mikrowelle für 60 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde in 50 mL Wasser überführt, mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE:CH = 1:5) aufgereinigt. Das Produkt ist ein gelber Feststoff.

Ausbeute: 0.99 g (4.69 mmol, 81%)

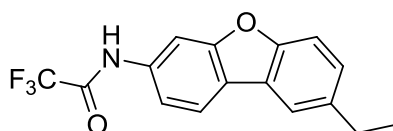
DC (Cyclohexan : EE = 1:1): $R_f = 0.69$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.67$ (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, H6), 7.61 (d, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H4), 7.38 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, H1), 7.15 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H2), 6.83 (d, $^4J = 2.0$ Hz, 1H, H9), 6.69 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, 1H, H7), 3.89 (bs, 2H, NH_2), 2.78 (q, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, CH_2), 1.31 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, CDCl_3): $\delta = 158.4, 154.5, 146.7, 138.8, 125.2, 124.9, 121.2, 118.4, 116.0, 111.3, 110.9, 97.7, 29.0, 16.5$ ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}$ $[\text{M}]^+$ 211.09917, gefunden 211.09938 ($\Delta m = 0,00021$, Fehler 1.0 ppm).

N-(8-Ethyl dibenzofuran-3-yl)-trifluoracetamid (70)



$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_2$
307,27 g/mol

Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von Lavis *et al.*^[133]

1.35 g (6.39 mmol) **69** und 2.1 mL (26 mmol, 4 eq) Pyridin wurden in 20 mL trockenem DCM vorgelegt und bei 0 °C 3.6 mL (26 mmol, 4 eq) Trifluoressigsäureanhydrid langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 17 h bei RT gerührt und anschließend mit DCM verdünnt und mit 10%iger Zitronensäure gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und ein rot-oranger Feststoff wurde erhalten.

Ausbeute: 1.95 g (6.35 mmol, quantitativ)

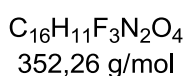
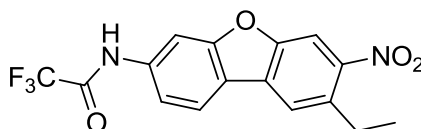
DC (Cyclohexan : EE = 5:1): $R_f = 0.47$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 11.51$ (s, 1H, NH), 8.13 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, H1), 8.07 (s, 1H, H9), 7.94 (s, 1H, H4), 7.68-7.66 (m, 1H, H2), 7.60 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, H6), 7.37-7.35 (m, 1H, H7), 2.77 (q, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, CH_2), 1.27 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, CDCl_3): $\delta = 156.7, 155.5, 154.9, 139.5, 134.0, 127.6, 123.6, 122.8, 121.1, 119.5, 115.3, 111.5, 104.6, 29.0, 16.4$ ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für $C_{16}H_{12}F_3NO_2$ $[M]^+$ 307.08146, gefunden 307.08155 ($\Delta m = 0,00009$, Fehler 0.3 ppm).

***N*-(8-Ethyl-7-nitrodibenzofuran-3-yl)trifluoracetamid (71)**



Die Synthese erfolgte nach einem Patent von Xia und Rayabarapu.^[129]

1.85 g (6.02 mmol) **70** wurden in 45 mL Trifluoressigsäure vorgelegt und bei 0 °C langsam eine Mischung aus 0.5 mL (7 mmol, 1.1 eq) Salpetersäure in 5 mL Trifluoressigsäure zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde für 2.5 h bei 0 °C gerührt und anschließend in 100 mL Eiswasser überführt. Nach Extraktion mit DCM wurde die organische Phase mit 1N Salzsäure gewaschen und die wässrige Phase erneut extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Als Produkt wurde ein roter Feststoff erhalten.

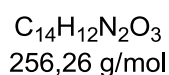
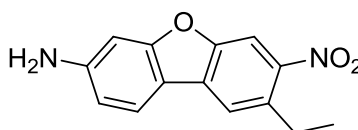
Ausbeute: 0.97 g (2.8 mmol, 47%)

DC (Cyclohexan : EE = 2:1): $R_f = 0.53$

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 11.64$ (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H6), 8.29-8.26 (m, 2H, H1, H9), 8.16 (d, $^4J = 1.7$ Hz, 1H, H4), 7.76 (dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 1H, H2), 2.96 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, C_2H), 1.31 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 3H, CH_3) ppm.

MS (ESI): m/z berechnet für $C_{16}H_{11}F_3N_2O_4$ $[M-H]^-$ 351.25, gefunden 351.07

8-Ethyl-7-nitrodibenzofuran-3-amin (72)



0.88 g (2.50 mmol) **71** wurden in 9 mL Methanol und 30 mL H₂O vorgelegt und 1.06 g (7.67 mmol, 3 eq) K₂CO₃ hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 48 h bei RT gerührt und anschließend für 20 min zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde mit DCM extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt als roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.61 g (2.38 mmol, 95%)

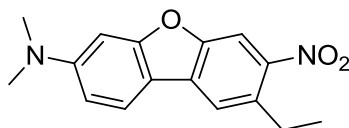
DC (Cyclohexan : EE = 2:1): R_f = 0.30

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.16 (s, 1H, H6), 7.92 (s, 1H, H9), 7.81 ((d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H1), 6.76 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H4), 6.69 (dd, (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H2), 5.96 (s, 2H, NH₂), 2.96 (q, ³J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.27 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ = 160.4, 152.0, 152.0, 144.4, 133.9, 129.9, 122.7, 120.1, 111.8, 110.0, 107.5, 94.4, 26.0, 15.3 ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₁₄H₁₂N₂O₃ [M]⁺ 256.08424, gefunden 256.08426 (Δm = 0.00002, Fehler 0.08 ppm)

8-Ethyl-*N,N*-dimethyl-7-nitrodibenzofuran-3-amin (**56**)



C₁₆H₁₆N₂O₃
284,31 g/mol

211 mg (0.82 mmol) **72** und 0.15 g (1.4 mmol, 1.7 eq) Na₂CO₃ wurden in 10 mL trockenem DMF vorgelegt und langsam 0.14 mL (2.25 mmol, 2.7 eq) MeI zugetropft. Der Ansatz wurde für 17 h bei RT gerührt und anschließend 1 h zum Rückfluss erhitzt. Danach wurden 0.9 mL wässrige Methylamin-Lösung (41%ige) hinzugegeben und für 1 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurden 5 mL (1N) Natronlauge hinzugefügt und mit DCM extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EE:CH = 1:6) und ein roter Feststoff wurde erhalten.

Ausbeute: 180 mg (0.63 mmol, 77%)

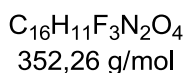
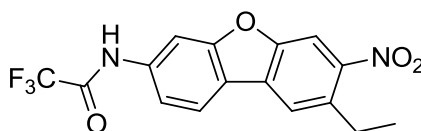
DC (Cyclohexan:EE = 2:1): R_f = 0.75

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.19 (s, 1H, H6), 7.98 (s, 1H, H9), 7.96 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, H1), 6.92 (d, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H2), 6.88 (dd, ³J = 8.7 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H4), 3.05 (s, 6H, 2x N-CH₃), 2.96 (q, ³J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.28 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): δ = 160.7, 153.3, 145.6, 135.0, 129.9, 122.2, 120.6, 110.3, 108.3, 95.4, 44.1, 41.5, 29.8, 27.9, 15.6 ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₁₆H₁₆N₂O₃ [M-H]⁺ 285.12337, gefunden 285.12278 (Δm = 0.00059, 2 ppm)

N-(8-Ethyl-7-nitrodibenzofuran-3-yl)trifluoramid (71)



Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von Lavis *et al.*^[133]

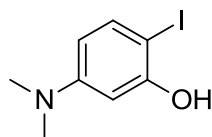
In einem Rundkolben wurden 87 mg (0.34 mmol) **72** in 4 mL DCM vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. In der Kälte wurden vorsichtig 0.19 mL (1.36 mmol, 4 eq) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.11 mL (1.36 mmol, 4 eq) Pyridin zugetropft. Anschließend wurde das Gemisch 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Lösung wurde mit 20 mL DCM verdünnt und mit 7 mL 10 %iger wässriger Zitronensäure gequenchet. Nach Trennen der organischen und wässrigen Phase, wurde die wässrige Phase mit DCM gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das DCM am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 109 mg (0.31 mmol, 92 %)

Analytik: siehe oben

4.1.6. Synthese von DMA-NDBF-OH - Route 2

5-Dimethylamino-2-iodphenol (81)



$C_8H_{10}INO$
263,08 g/mol

5 g (36.45 mmol) 3-(Dimethylamino)phenol wurden in 200 mL 0.05 M H_2SO_4 gelöst. Über einen Zeitraum von 3.5 h wurden gleichzeitig 4.05 g (24.4 mmol, 0.67 eq) Kaliumiodid, gelöst in 100 mL H_2O , und 2.6 g (12.15 mmol, 0.33 eq) Kaliumiodat gelöst in 99 mL H_2O und 0.95 mL konz. H_2SO_4 zur 3-Aminophenol-Lösung getropft, so dass immer ein leichter Iodatüberschuss bestand. Nach beendeter Reaktion wurde der pH-Wert auf 1.5 eingestellt und der ausgefallene schwarze Feststoff abfiltriert und mehrfach mit kaltem H_2O nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit festem $NaHCO_3$ auf pH 7 gebracht und der Niederschlag abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 5.91 g (22.46 mmol, 62% der theoretischen Ausbeute)

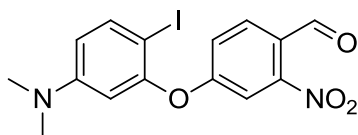
DC (CH:EE=4:1): $R_f = 0.31$

1H -NMR (500 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 8.51$ (s, 1H, OH), 7.40 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, H3), 6.35 (d, $^4J = 2.8$ Hz, 1H, H6), 6.13 (dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.8$ Hz, 1H, H4), 2.88 (s, 6H, 2x N- CH_3) ppm.

^{13}C -NMR (125.8 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 157.7, 153.3, 139.5, 107.9, 100.3, 67.7, 40.4$ ppm.

HRMS(MALDI): m/z berechnet für $C_8H_{10}INO$ $[M-H]^+$ 263.98798, gefunden 263.98812 ($\Delta m = 0.00023, 0.9$ ppm)

4-[(5'-Dimethylamino)-2'-iodphenoxy]-2-nitrobenzaldehyd (82)



$C_{15}H_{13}IN_2O_4$
412,18 g/mol

Diese Synthese wurde von Michael Rudolph im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.^[139]

Unter Argonatmosphäre wurden 350 mg (1.3 mmol) **81**, 225 mg (1.3 mmol, 1.0 eq) 4-Fluor-2-nitrobenzaldehyd, 191 mg (1.3 mmol, 1.0 eq) Cu(I)Br und 370 mg (2.7 mmol, 2.0 eq) K₂CO₃ in 5 mL Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde 16 h auf 60 °C erhitzt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Nach Abkühlen auf RT wurde der Reaktionsansatz mit Ether versetzt, mit 1M NaOH, H₂O und Brine gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgte eine säulenchromatische Aufreinigung (CH:EE = 10:1)

Ausbeute: 176 mg (0.43 mmol, 32% der theoretischen Ausbeute)

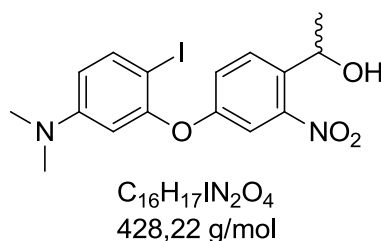
DC (CH:EE = 2:1): R_f = 0.72

¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆): δ = 10.23 (s, CHO), 8.02 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H₆), 7.68 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, H_{3'}), 7.50 (d, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, H₃), 7.33 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, H₅), 6.69 (d, ⁴J = 2.9 Hz, 1H, H_{6'}), 6.59 (dd, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.9 Hz, 1H, H_{4'}), 2.97 (s, 6H, 2x N-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (125.8 MHz, Aceton-d₆): δ = 188.0, 162.7, 155.1, 153.6, 152.5, 140.6, 132.9, 125.4, 121.3, 113.4, 112.5, 106.8, 71.2, 40.3 ppm.

HRMS(MALDI): m/z berechnet für C₁₅H₁₄IN₂O₄ [M-H]⁺ 412.99928, gefunden 412.99870 (Δm = 0.00058, 1.4 ppm)

1-{4-[5'-(Dimethylamino)-2'-iodphenoxy]-2-nitrophenyl}ethanol (**83**)



420 mg (1.0 mmol) **82** wurden unter Argonatmosphäre in DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 1.02 mL (2.0 mmol, 2.0 eq) 2 molare Trimethylaluminium-Lösung langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 0 °C gerührt und im Anschluss mit kaltem H₂O und 1 M NaOH gequench und für eine weitere halbe Stunde gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 1 M NaOH, H₂O und Brine gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ getrocknet wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (CH: EE = 4:1 → 2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 385 mg (0.9 mmol, 88% der theoretischen Ausbeute)

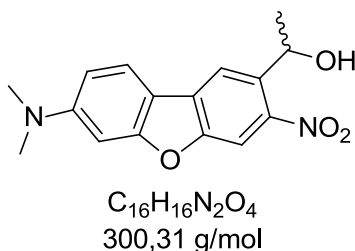
DC (CH:EE=2:1): $R_f = 0.61$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 7.88$ (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, H6), 7.65 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 1H, H3'), 7.30 (d, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, H3), 7.24 (dd, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, H5), 6.57 (d, $^4J = 2.9$ Hz, 1H, H6'), 6.53 (dd, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.9$ Hz, 1H, H4'), 5.30-5.25 (m, 1H, CH), 4.53 (d, $^3J = 4.1$ Hz, 1H, OH), 2.95 (s, 6H, 2x N-CH₃), 1.46 (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 157.7, 155.9, 153.5, 149.3, 140.5, 136.6, 130.2, 122.2, 112.9, 111.8, 106.6, 71.8, 65.2, 40.3, 25.5$, ppm.

HRMS(MALDI): m/z berechnet für C₁₆H₁₇N₂O₄ [M-H]⁺ 429.03058, gefunden 429.02979 ($\Delta m = 0.00079$, 1.8 ppm)

1-[7-(Dimethylamino)-3-nitrobenzofuran-2-yl]ethanol (**54**)



Die Synthese erfolgte analog der Literatur von Lusic *et al.*

150 mg (0.35 mmol) **83**, 230 mg (0.70 mmol, 2.0 eq) Cs₂CO₃ und 80 mg (0.35 mmol, 1.0 eq) Palladiumacetat wurden unter Argonatmosphäre in 4 mL Dimethylacetamid gelöst und 12 h bei 80 °C zum Rückfluss erhitzt und 48 h bei RT gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung wurde diese mit DCM versetzt, mit H₂O und Brine gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde zur Trockene eingengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (CH:EE = 5:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 53 mg (0.18 mmol, 50% der theoretischen Ausbeute)

DC (CH:EE = 2:1): $R_f = 0.58$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 8.35$ (s, 1H, H4), 8.07 (s, 1H, H1), 8.00 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 1H, H8), 6.93-6.91 (m, 2H, H6, H9), 5.54-5.49 (m, 1H, CH), 4.58 (d, $^3J = 4.0$ Hz, 1H, OH), 3.12 (s, 6H, 2x N-CH₃), 1.54 (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 161.1, 153.1, 152.7, 144.0, 138.6, 130.2, 122.3, 117.1, 111.1, 109.8, 106.8, 93.6, 65.0, 39.8, 25.1$ ppm.

HRMS(MALDI): m/z berechnet für $C_{16}H_{16}N_2O_4$ $[M-H]^+$ 301.11828, gefunden 301.11774 ($\Delta m = 0.00054$, 1.8 ppm)

UV-Vis-Messung

Die Messung der Absorptionsspektren des DMA-NDBF-OH und des DNBF-OH erfolgte am UV-Vis-Spektrophotometer Evolution 300 der Firma *Thermo Scientific*. Beide Verbindungen wurden als Lösung in DMSO vermessen. Die Konzentration von DMA-NDBF-OH betrug 38.8 μM und 68.0 μM für NDBF-OH. Beide Absorptionsspektren wurden nur einfach gemessen. Die Extinktionswerte wurden durch Division der Extinktionswerte durch das Produkt aus Konzentration und Schichtdicke bestimmt.

4.2. Oligonukleotid-Synthese

Festphasensynthese

Alle Oligonukleotide wurden mit einem Synthesizer ABI 392 RNA/DNA der Firma *Applied Biosystems* hergestellt. Als Festphasenmaterial wurde LV200 Polystyren Säulen der Firma *Applied Biosystems* und folgende Säulen der Firma *Link Technologies Ltd.* verwendet: PT-NH₂-C3-CPG Säulen, BHQ2-CPG Säulen, BBQ-650-III-CPG Säulen und 3'-Thiol-Modifier-C3-S-S-CPG Säulen. Die exocyclischen Basenfunktionen der verwendeten, nicht photolabil geschützten Desoxynukleosidphosphoramidite dA^{Bz}, dG^{dmf}, dC^{Ac} wurden von *Sigma-Aldrich Corporation* bezogen und als 1 M-Lösung in Acetonitril eingesetzt. Für DNA-Stränge, die dT^{DEACM} enthalten, wurden Ultra-Mild-Amidite, entsprechendes Festphasenmaterial und Pac-Anhydrid-Capping-Reagenz von *Link Technologies Ltd.* eingesetzt.

Die Aktivierung erfolgte mit 0.25 M 5-Ethylthiotetrazol in Acetonitril. Zur Detritylierung wurde 3%ige Trichloressigsäure in DCM eingesetzt. Das Capping erfolgte mit einer Mischung aus Reagenz CapA, bestehend aus 9-11% Essigsäureanhydrid und 9-10% Pyridin in THF, und Reagenz CapB, bestehend aus 15.2-16.8% 1-Methylimidazol in THF. Für die Oxidation wurde eine Lösung aus 3% Iod, 2% Wasser und 18.5-21% Pyridin in THF eingesetzt. Diese Reagenzien wurden von *J. T. Baker* bezogen. Für die Ultra-Mild Synthesen wurde anstelle des CapA mit Essigsäureanhydrid CapA mit Pac-Anhydrid (THF/Pyridin/Phenoxyacetylanhydrid 85:10:5) eingesetzt, welches von *Link Technologies Ltd.* Bezogen wurde.

Die Festphasensynthese erfolgte im „DMTr-ON“-Modus um durch die zurückbleibende Tritylgruppe des letzten Nukleosids das Volllängenprodukt besser von den Abbruchsequenzen abtrennen zu können. Die Säulen wurden nach erfolgter Synthese im Argonstrom getrocknet.

Aufreinigung der Oligonukleotide

Das für die Oligonukleotidsynthese und Aufreinigung verwendete MilliQ-Wasser wurde mit einem MilliQ Plus Gerät der Firma *MilliPore* mit Filterkartuschen der Firma *Siemens* oder *Merck Millipore* aufgearbeitet.

Das Festphasenmaterial wurde mit 200 µL konz. Ammoniaklösung für 16 h bei RT (2 h bei Ultra-Mild-Synthesen) abgespalten. Die Inkubation erfolgte mit einem Thermoschüttler der Firma *HLC Biotech*. Das Festphasenmaterial wurde mit Spinnfiltern (modifiziertes Nylon 0.45 µm, 500µL) der Firma *VWR* abgetrennt und die Oligonukleotidlösungen wurde in der Vakuumzentrifuge *Concentrator plus* der Firma *Eppendorf* auf wenige µL eingeeengt. Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte mit einer HPLC *Agilent Technologies Serie 1200*. Zum Auftrennen wurden RP-Säulen des Typs *Nukleosil 100-5 C18* und *Multokrom 100-5 C18* der Firma *CS-Chromatographie Service* mit den Eluenten 0.1 M TEAA-Puffer und Acetonitril verwendet. Die Gradienten wurden den jeweiligen Verbindungen angepasst (Im Anhang sind einige verwendete Gradienten und die entsprechenden HPLC-Spektren angegeben). Nach Evaporation des HPLC-Laufmittels wurden die DMTr-Gruppen der Oligonukleotidproben 20-30 min mit 80%iger Essigsäure abgespalten und erneut mittels RP-HPLC aufgereinigt. Auch dieses Laufmittel wurde in der Vakuumzentrifuge entfernt. Zum Entfernen von möglichen TEAA-Resten wurden für die Zelleexperimente die Stränge in 0.3 M Natriumacetat-Lösung gelöst und mit 2.5 eq Ethanol für 30 min bei -20 °C gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurde das Lösungsmittel entfernt und die DNA zweimal mit autoklaviertem MilliQ-H₂O gelöst und evaporiert.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Oligonukleotide wurde über deren OD bei 260 nm bestimmt. Dazu wurde zu Beginn ein UV-Vis-Spektrophotometer *Evolution 300* der Firma *Thermo Scientific* mit Küvetten des Typs *TrayCell Hellma* verwendet, bis der Arbeitskreis im Besitz einer *NanoDrop 2000* der Firma *Thermo Scientific* war.

Bestimmung der Masse

Zur Überprüfung der Korrektheit der Oligonukleotid-Sequenzen wurden ESI-Massenspektren an einem *micrOTOF-Q-II* der Firma *Bruker* mit einem vorgeschalteten *Agilent 1200 Series* HPLC-System im Negativmodus gemessen.

Belichtung

Die Belichtung mit Einphotonen-Licht der Oligonukleotide erfolgte mit verschiedenen LEDs. Wurde die Belichtung in einer Küvette durchgeführt, wurden dazu *MountedLEDs* der Firma

Thorlabs verwendet, die in den entsprechenden Küvettenhalter eingeschraubt werden konnten. Für die Belichtung in Flachbodengläsern der Firma *Carl Roth* existieren zwei spezialangefertigte Belichtungsgeräte der Universität Bonn. Das Eine enthält 3 UV-LEDs mit $\lambda_{\max}=365$ nm des Typs NCCU033(T) der Firma *NICHIA* die mit einer Stromstärke von 0.5 A betrieben wurden und von drei unterschiedlichen Richtungen die Probe belichten. Das zweite Gerät verfügt über verschiedene LEDs der Firma *Roithner Lasertechnik* mit unterschiedlichen Wellenlängen, die die Probe vom Boden aus belichten. Verwendet wurden die folgenden LEDs die mit den vom Hersteller angegebenen Maximalstromstärken betrieben wurden: 365 nm (500 mA), 405 nm (350 mA), 420 nm (350 mW), 440 nm (350 mW) und 505 nm (350 mW). Die Belichtungsdauer betrug jeweils ca. 3 min. Alle Belichtungen der DNA-Proben erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, in PBS-Puffer mit pH 7.4.

4.3. Projekt-spezifische Methoden

4.3.1. Einphotonen-Charakterisierung

Massen der hier untersuchten Stränge

Tabelle 10 Sequenzen und Massen der hier verwendeten Stränge. * Diese Sequenzen wurden von Cem Özçoban synthetisiert und von ihm für diese Studie zur Verfügung gestellt.

Name	Sequenz	Masse [Da] (berechnet)	Masse [Da] (gefunden)
DNA1 ^{T_hNDBF}	GCA TAA AT ^{hNDBF} A AAG GTG	4899.9	4900.2
DNA2 ^{T_NPP *}	GCA TAA AT ^{NPP} A AAG GTG	-	-
DNA3 ^{G_hNDBF}	GCA TAA AG ^{hNDBF} A AAG GTG	4924.9	4925.0
DNA4 ^{G_NPP *}	GCA TAA AG ^{NPP} A AAG GTG	-	-
DNA5 ^{G_ANBP}	GCA TAA AG ^{ANBP} A AAG GTG	4954.0	4954.2

Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte an einem UV-Vis-Spektrophotometer Evolution 300 der Firma *Thermo Scientific* mit einer 1 mL Küvette und einem innenliegenden Temperaturfühler. Die DNA-Stränge wurden in einer Konzentration von 1 μ M pro Strang (jeweils *sense* und *antisense*) in 1x PBS Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) zusammen gegeben. In der Messsoftware Vision pro wurden 4 Heiz-

und 3 Kühl-Zyklen zwischen 15 °C und 70 °C durchgeführt, bei denen die Absorption bei 260 nm gegen die Temperatur aufgetragen wird. Die erste Heiz-Kurve wurde für die anschließende Auswertung nicht berücksichtigt, da sich bei dieser erst zwei definierte Einzelstränge bilden, die dann beim Abkühlen einen definierten Duplex bilden. Von den restlichen 6 Messreihen wurde mit Hilfe der von Dr. Martin Köppel automatisierten Auswertung mittels *Origin* der Wendepunkt der Kurven bestimmt, der den Schmelzpunkt widerspiegelt. Zu diesem Zweck werden die Kurvenverläufe abgeleitet, die Ableitung mathematisch geglättet und das resultierende Maximum bestimmt, was dem Wendepunkt entspricht. Von diesen 6 erhaltenen Messwerten wurde der Mittelwert gebildet und als Schmelzpunkt mit entsprechendem Fehlerbalken angegeben.

UV-Vis-Messungen

Die Messung der Absorptionsspektren erfolgte am UV-Vis-Spektrophotometer Evolution 300 der Firma *Thermo Scientific* mit einer Küvette mit 70 µL Fassungsvermögen und einer Schichtdicke von 1 cm. Für die Messung der Absorptionsspektren der Oligonukleotide wurden die Spektren in zwei Konzentrationen gemessen, um die Absorption des Cages besser sehen zu können. Zunächst wurden 70 µL einer 40 µM-Oligonukleotid-Lösung in 1x PBS aufgenommen. Aus dieser Lösung wurde eine 4 µM Oligonukleotid-Lösung hergestellt, die ebenfalls vermessen wurde. Die Messung erfolgte im Modus „*smoothing: very high*“, bei dem die Messwerte geglättet wurden. Die so erhaltenen Spektren wurde zunächst einer Korrektur 0. Ordnung unterzogen um eine schöne Baseline zu erhalten. Um die Pipettierfehler dieser Messungen zu korrigieren wurde sich zu Nutze gemacht, dass die Absorption der DNA bei 260 nm zur Bestimmung der Konzentration verwendet wird. Somit kann berechnet werden durch welchen Punkt die Absorption bei 260 nm bei der 4 µM-Lösung verlaufen sollte. Auf diesen Wert wurde das komplette Spektrum korrigiert und das Spektrum der 40 µM Lösung wurde durch Multiplikation mit dem gleichen Korrekturfaktor auf gleiche Weise korrigiert. Die erhaltenen Werte wurden bis 300 nm von der 4 µM Lösung und ab 300 nm von der 40 µM Lösung in *Excel* als Kurve aufgetragen.

Bestimmung der Quantenausbeute

Die Bestimmung der Quantenausbeute wurde entsprechend der etablierten Methode von Dr. Florian Schäfer^[118] durchgeführt, die auf Zhang *et al.*^[145] beruht. Zur Bestimmung der eingestrahlten Photonenzahl wird eine 100 µM basische Dimethoxynitrobenzol (DMNB)-Lösung (0.5 M KOH) verwendet. 13 µL dieser Lösung wurden in einer Küvette (16.10-F/Q/10//8.5 von *Starna GmbH*) mit der 365 nm *Thorlabs Mounted LED* im entsprechenden Küvettenhalter für verschiedene Zeitintervalle belichtet. Nach jedem Zeitintervall wurde ein

UV-Vis-Spektrum am UV-Vis-Spektrophotometer Evolution 300 der Firma *Thermo Scientific* aufgenommen. Die LEDs wurden über einen Arbiträrsignalgenerator (arbitrary morphing Waveform-Generator WG-820 von *Mair & Rohner OEG*) betrieben um die Belichtungsdauer festlegen zu können. Um die Photonen-Menge zu bestimmen, musste die Abnahme des Startmaterials in % über die Zeit bestimmt werden. Dazu wurde zunächst die Absorption bei 365 nm der unbelichteten Probe zur Bestimmung der exakten Startkonzentration mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten des DMNB bestimmt. Über die Abnahme der Absorption konnte so im Anschluss die Konzentration des Startmaterials über die Zeit ermittelt werden und daraus die Abnahme in % berechnet werden. Dies gelingt, da DMNB durch die Photolyse sein Absorptionsspektrum verändert. Durch Auftragung der Menge des Startmaterials gegen die Zeit, Fitten dieses Verlaufs und Ableiten dieses Fitts konnte die Anfangssteigung ermittelt werden. Aus dieser kann zusammen mit der relativen Absorption und der bekannten Quantenausbeute des DMNBs die Zahl der eingestrahlenen Photonen berechnet werden. Zur Bestimmung der Quantenausbeute eines Oligonukleotids wurde eine 20 µM Oligonukleotid-Lösung, die einen internen Standard (Uridin und Uracil) enthält, im gleichen Belichtungsaufbau für verschiedene Zeitintervalle belichtet und die Menge des Startmaterials über die Abnahme des Eduktpeaks an der RP-HPLC ermittelt. Auch diese Abnahme gegen die Zeit wurde auf gleiche Weise gefittet und abgeleitet und die Anfangsgeschwindigkeit zur Bestimmung der Quantenausbeute in Formel 3.1 eingesetzt:^[118]

$$\varphi = \frac{\Delta n_s}{n_p \cdot A_{rel}} \quad (3.1)$$

dabei steht φ für die Quantenausbeute, Δn_s für die Abnahme des Edukts, n_p für die Anzahl Photonen und A_{rel} für die relative Absorption.^[118]

Alle Oligonukleotid-Photolysereihen wurden dreifach belichtet und gemessen. Für die Berechnung der Quantenausbeute wurden die entsprechenden Mittelwerte verwendet.

Wellenlängenselektive Photolyse

Für die sequentielle Belichtung der **DNA1^{T_hNDBF}** bzw. **DNA3^{G_hNDBF}** in Anwesenheit von **DNA2^{T_NPP}** bzw. **DNA4^{G_NPP}** wurde eine 1xPBS-Lösung bestrahlt, die jeweils 20 µM **DNA1^{T_hNDBF}** und **DNA2^{T_NPP}** bzw. **DNA3^{G_hNDBF}** und **DNA4^{G_NPP}** und einen internen Standard enthält. Die Bestrahlung erfolgte in einer Küvette (16.10-F/Q/10//8.5 von *Starna GmbH*) mit der 405 nm *Thorlabs Mounted LED* im entsprechenden Küvettenhalter für verschiedene Zeitintervalle. Die photolysierten Proben wurden mittels RP-HPLC analysiert und die Abnahme des Startmaterials über die Zeit aufgetragen. Die Messungen wurden nur einmal durchgeführt.

Die Belichtung der **DNA5^{G_hNDBF}** erfolgte entweder ebenfalls in einer Küvette mit *Thorlabs Mounted LED* (470 nm) im entsprechenden *Thorlabs* Küvettenhalter oder in den Flachbodengläsern von *Carl Roth* und den im Abschnitt **Belichtung** beschriebenen Belichtungsgerät (505, 440, 420 nm). Auch hier erfolgten nach der Belichtung eine RP-HPLC-Analyse und eine anschließende Berechnung der Eduktabnahme. Dazu wurde der Edukt-Peak integriert, durch das Integral des internen Standards geteilt und mit der unbelichteten Probe in Relation gesetzt.

4.3.2. Zweiphotonen-Visualisierung

4.3.2.1. Allgemeine Methoden

Fluoreszenz-Markierung

Zum Markieren der Oligonukleotide mit Fluorophoren wurde der pH-Wert der Probe mit gesättigter NaHCO₃-Lösung auf 8.5 eingestellt. Zur Messung wurde die pH-Elektrode InLab® Ultra-Micro der Firma *Mettler Toledo* verwendet. Zu dieser Lösung wurden 2 Äquivalente des in DMSO gelösten NHS-Farbstoffs pipettiert und für 2 bis 16 h im Thermoschüttler bei 25 °C inkubiert. Diese Mischung wurde direkt mittels RP-HPLC aufgereinigt.

Fluoreszenzmessung am Platerader

Für die Messung der Fluoreszenzzunahmen vor und nach Belichtung einer Probe wurde ein Infinite M200 Pro Plate Reader (*Tecan Trading AG*) mit 96-Well-Mikrotiterplatten (*Corning® 96 Well Black Flat Bottom Polystyrene NBS™ Microplate* von *Corning Incorporated*) verwendet. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte immer min. 30 nm niedrigerer als die Detektion der Emission und wurde dem entsprechenden Fluorophor angepasst. Die Konzentration der mit Fluorophor-markierten Proben betrug zwischen 15 und 25 pmol.

Fluoreszenzmessung mittels Photomultiplier

Für die Messung der Fluoreszenzzunahme durch Photolyse wurde eine mit zu analysierender Probe gefüllte Küvette (16.10-F/Q/10//8.5 von *Starna GmbH*, Fassungsvermögen ca. 13 µL) in einem *Thorlabs*-Küvettenhalter mit angeschlossenen Photomultiplier (PMM02 von *Thorlabs*) platziert. Die Fluoreszenz-Anregung erfolgte mit einem Laser CPS532 (532 nm von *Thorlabs*). Der Photomultiplier liefert einen Spannungswert für die gemessene Fluoreszenz, der über eine AD-Wandler-Karte am Computer mit passender Software ausgelesen werden kann. Diese Spannungswerte wurden über ca. 1 min gemittelt und der eingestrahlten Leistung des IR-

Lasers zugeordnet. Die Photolyse durch Zweiphotonen-Anregung erfolgte mit einem Mai-Tai-BB Laser von *Newport-Spectra Physics*, der durch einen optischen Modulator von *Conoptics inc*, in seiner Leistung reguliert wurde.

Reduktion von Dithiofunktionen

Für die Reduktion der Dithiofunktionen der Monomere wurde die Proben auf pH 8.5 eingestellt und mit einer 100 mM-Lösung für 30 min inkubiert und anschließend mittels RP-HPLC aufgereinigt. Die Oligonukleotide konnten mit DTT nicht reduziert werden, hier wurde die Reduktion mit 50 mM TCEP-Lösung in 100 mM Tris Puffer pH 7.4 innerhalb von 2 h durchgeführt und die anschließende Aufreinigung erfolgte mit RP-HPLC.

Laser Setup1

Das Laser-Setup1 besteht aus einem Mai-Tai BB Laser von *Newport-Spectra Physics*, dessen Reduktion der Leistung wurde durch einen Elektro-optischen Modulator von *Conoptics inc* realisiert. Der Laser wurde in ein Zeiss AxioObserver Z1 Mikroskop eingekoppelt und das Laser-Scanning wurde mit einem UGA-40 Galvanometer von *Rapp OptoElectronic GmbH* erreicht. Die Fokussierung des Lasers erfolgte durch ein A-Plan 10x/0.25 Ph1 air Objektiv bei den Monomeren und ein Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil-Objektiv beim Verdrängungs-Assay im Hydrogel. Die Hydrogele wurden am Zeiss AxioObserver Z1 Mikroskop mit einem A-Plan 10x/0.25 Ph1 air Objektiv von *Zeiss* analysiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einer UVICO Lampe der Firma *Rapp OptoElectronic GmbH* und dem entsprechenden Filterwürfel. Die Weitfeldfluoreszenzaufnahmen wurden an einer AxioCam MRm Kamera der Firma *Zeiss* aufgenommen.

Laser Setup2

Laser Setup2 besteht aus einem Mikroskop Zeiss LSM 780 AxioObserver NLO mit einem C-Apochromat 63x/1.20 W Korr M27 Objektiv und einem gepulsten IR-Laser: Coherent Ultra II Photolyse-Wellenlänge 780 nm (DEACM) oder 920 nm (ANBP). Die Fluoreszenz-Anregungs-Wellenlänge erfolgte mit 561 nm (Atto565) oder 633 nm (AttoRho14). Alle Messung am **Laser Setup2** wurden zusammen mit Dr. Stephan Junek durchgeführt.

4.3.2.2. Spezielle Methoden

Zweiphotonen-Belichtung und Analyse mittels HPLC

Die Belichtung einer 2 μM Lösung von **DNA1**^{T-hNDBF} bzw. **DNA3**^{G-hNDBF} in 1x PBS-Puffer (mit internem Standard) durch Zweiphotonen-Anregung (730 nm, 1W) erfolgte in einer Küvette an einem Tsunami HP Femtosekundenlaser von *Newport-Spectraphysics* des Arbeitskreises von Prof. Dr. Josef Wachtveitl durch Dr. Radhan Ramadass. Die anschließende RP-HPLC-Analytik erfolgte wie bei der Bestimmung der Quantenausbeute über die Berechnung des verbleibenden Edukts über die Referenzieren mit einem internen Standard.

Verdrängungs-Assay in Lösung

Für den Verdrängungs-Assay in Lösung wurden folgende Stränge verwendet:

Tabelle 11 Übersicht der verwendeten Sequenzen. * Diese Sequenzen wurden kommerziell von *iba* erworben. ** Diese Sequenzen wurden von Dr. Florian Schäfer zur Verfügung gestellt.

Name	Sequenz
DNA6 _{unmodifiziert} *	GCA TAA ACA AAG GTG
DNA7 _{C-NPE} **	GCA TAA AC ^{NPE} A AAG GTG
DNA8 _{C-NDBF} **	GCA TAA AC ^{NDBF} A AAG GTG
DNA9 _{Cy3} *	Cy3-CAC CTT TGT TTA TGC
DNA10 _{BHQ2} *	AAA CAA AGG TG-BHQ2

Die Sonde wurde im Verhältnis 1:2 (**DNA9**_{Cy3}:**DNA10**_{BHQ2}) in 1xPBS angesetzt und für 5 min auf 85 °C erhitzt und bei RT abkühlen lassen, damit sich ein stabiler Duplex bilden kann.

Für die Messungen am Plate-Reader (siehe Allgemeine Methoden) wurden 50 μL einer 0.3 μM Lösung (bezogen auf **DNA9**_{Cy3}) verwendet.

Für die Messungen am Photomultiplier (siehe Allgemeine Methoden) wurde die oben beschriebene Methode verwendet. Die Konzentration der Probe war 1.9 μM .

Silanisierung von Oberflächen

Zum Silanisieren wurden Deckgläschen (24mm, Stärke 1 $\frac{1}{2}$, *PLANO GmbH*) mit einem Diamantschreiber beschriftet, in einen Teflon-Block (Spezialanfertigung Werkstatt Universität Frankfurt) gestellt und mit Karoscher Säure (2:1 = H_2SO_4 : H_2O_2) versetzt. Dieser Teflon-Block wurde für $\frac{1}{2}$ h ins Ultraschallbad gestellt und für eine weitere Stunde bei RT stehen gelassen.

Die Deckgläschen wurden mit MilliQ-H₂O gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Die Deckgläschen wurden auf einen Objektträger auf dem Thermoblock bei 75 °C gelegt und jeweils 10 µL Trialkoxysilan zwischen zwei Deckgläschen pipettiert und für 1.5 h bei 75 °C auf dem Thermoblock gelassen. Anschließend wurden die Deckgläser in Aceton voneinander getrennt, gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Die Trialkoxysilane wurden von *Sigma-Aldrich* bezogen.

Für die anschließende Immobilisierung wurde **DNA11^{Cy3}** verwendet, deren Sequenz in Tabelle 12 angegeben ist.

Tabelle 12 Diese Sequenz wurde für die Immobilisierung der silanisierten Oberflächen verwendet. * Die Sequenz wurde von *iba* kommerziell erworben.

Name	Sequenz
DNA11^{Cy3} *	Cy3-CAC CTT TGT TTA TGC-(CH ₂) ₆ -NH ₂

30 µL einer 20 µM DNA-Lösung in 1.5 x SSC-Puffer wurden zwischen zwei mit Spacern versehenen Deckgläschen pipettiert oder 5 µL DNA-Lösung in 1.5 x SSC-Puffer als Tropfen auf die Deckgläser pipettiert. Diese wurden in einer Feuchtigkeitskammer für 1 h bei 50 °C und ü. N. bei RT stehen gelassen. Gewaschen wurde mit 0.2%iger SDS-Lösung und MilliQ-H₂O und anschließend mit Druckluft getrocknet. Die Oberflächen wurden am *Zeiss AxioObserver Z1* Mikroskop mit einem A-Plan 10x/0.25 Ph1 air Objektiv von *Zeiss* analysiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einer UVICO Lampe der Firma *Rapp OptoElectronic GmbH* und dem entsprechenden Filterwürfel. Die Weitfeldfluoreszenzaufnahmen wurden an einer AxioCam ICc1 Kamera der Firma *Zeiss* aufgenommen.

Immobilisieren auf kommerziellen Objektträgern

Zum Immobilisieren von aminomodifizierten Oligonukleotiden wurden Nexterion® Slide AL Objektträger von *Schott* verwendet. Die Durchführung der Immobilisierung erfolgte in Anlehnung an das mitgelieferte Protokoll. Die Immobilisierung erfolgte mit **DNA11^{Cy3}**, **DNA12^{unmodifiziert}**, **DNA13^{1x C_NDBF}**, **DNA14^{2x C_NDBF}** oder **DNA15^{3x C_NDBF}** deren Sequenzen und entsprechenden Massen in Tabelle 13 angegeben sind. Ebenfalls sind die für die anschließende Hybridisierung verwendeten Stränge angegeben.

Tabelle 13 Übersicht der Stränge und der Massen der selbst synthetisierten Oligonukleotide. **DNA11^{Cy3}** wurde für die ersten Experimente verwendet. Für das Assay auf der Oberfläche wurden die weiteren DNA-Stränge verwendet. * Die Sequenz wurde von *iba* kommerziell erworben.

Name	Sequenz	Masse [Da] (berechnet)	Masse [Da] (gefunden)
DNA11^{Cy3} *	Cy3-CAC CTT TGT TTA TGC-(CH ₂) ₆ -NH ₂	-	-
DNA12^{unmodifiziert} *	NH ₂ -ACA TAC ATA TAC GCA	-	-
DNA13^{1x T_{NPP}}	NH ₂ -ACA TAC AT ^{NPP} A TAC GCA	4870.0	4869.1
DNA14^{2x T_{NPP}}	NH ₂ -ACA T ^{NPP} AC ATA T ^{NPP} AC GCA	5033.0	5032.2
DNA15^{3x T_{NPP}}	NH ₂ -ACA T ^{NPP} AC AT ^{NPP} A T ^{NPP} AC GCA	5196.1	5195.3
DNA16^{Dye495} *	Dye495-TGC GTA TAT GTA TGT	-	-
DNA17^{BHQ1} *	ACA TAT ACG CA-BHQ1	-	-

Mit einem Diamantschreiber wurden die Rückseiten der Objektträger markiert und mit einem Gitter versehen, um die immobilisierten Stränge leichter wiederzufinden. Pro Feld wurden 2 µL einer 20 µM-DNA-Lösung (in 1.5 x SSC-Puffer) pipettiert oder ca. 20-30 µL unter ein mit Spacern versehenes Deckglas gegeben. Die Objektträger wurden 30 min bei RT und 2 h bei 55 °C (Trockenschrank) in eine Feuchtigkeitskammer gelegt, bevor sie mit 0.2%iger SDS-Lösung und MilliQ-H₂O gewaschen wurden. Objektträger auf denen **DNA11^{Cy3}** immobilisiert wurde, wurden anschließend mit Druckluft getrocknet und am Mikroskop analysiert. Objektträger auf denen **DNA12^{unmodifiziert}**, **DNA13^{1x C_{NDBF}}**, **DNA14^{2x C_{NDBF}}** oder **DNA15^{3x C_{NDBF}}** immobilisiert wurden, wurden für 15 min in eine frisch angesetzte NaBH₄-Lösung (0.25 g NaBH₄ in 75 mL PBS und 25 mL Ethanol) gelegt und anschließend erneut mit 0.2%iger SDS-Lösung und MilliQ-H₂O gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Die Hybridisierung des Gegenstrangs **DNA16^{Dye495}** bzw. der **Sonde2** erfolgte in einem 3 x SSC-Puffer mit 0.1% SDS über 1, 2, 3, oder 16 h in der Feuchtigkeitskammer bei 55 °C. Nach abschließendem Waschen wurden die Objektträger mit Druckluft getrocknet.

Die Oberflächen wurden am Zeiss AxioObserver Z1 Mikroskop mit einem A-Plan 10x/0.25 Ph1 air Objektiv von Zeiss analysiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einer UVICO Lampe der Firma Rapp OptoElectronic GmbH und dem entsprechenden Filterwürfel. Die Weitfeldfluoreszenzaufnahmen wurden an einer AxioCam ICc1 und einer AxioCam MRm Kamera der Firma Zeiss aufgenommen.

Tetramer

Für die ersten Versuche zur Realisierung einer photolabilen Schutzgruppe als Quencher eines Fluorophors wurde das Tetramer **DNA18^{Tetramer}** synthetisiert. Die Sequenz und die Masse sind in Tabelle 14 dargestellt. Für den Einbau des ATTO565 Farbstoffs wurde an zweiter Stelle der Sequenz ein Amino-Modifier-C2-dT-CE Phosphoramidit (*Link Technologies Ltd.*) mittels Festphasensynthese eingebaut. Nach Aufreinigung per RP-HPLC erfolgte im Anschluss die Umsetzung der Aminofunktion am Amino-dT mit ATTO565-NHS-Ester.

Tabelle 14 Sequenz und Masse der **DNA18^{Tetramer}**

Name	Sequenz	Masse [Da] (berechnet)	Masse [Da] (gefunden)
DNA18^{Tetramer}	T T ^{ATTO565} C ^{NDBF} T	1969.7	1968.6

Für die Messung der Fluoreszenzzunahme durch Photolyse am Photomultiplier wurde eine 10 µM-Lösung im oben beschriebenen Aufbau verwendet. Zur Auswertung wurde die Zunahme des Spannungswerts gegen die eingestrahlte Photolyse-Leistung aufgetragen.

Monomer in Lösung und im Hydrogel

Die Monomere wurden wie die Oligonukleotide mittels Festphasensynthese synthetisiert. Für das **Monomer1^{C_{NDBF}}** wurde folgendes Festphasenmaterial verwendet: 3'-PT-Amino-Modifier-C3-CPG von Link Technologies Ltd. An dieses Festphasenmaterial wurde nur das Phosphoramidit dC^{NDBF} gekuppelt. Die Synthese erfolgte im DMTr-OFF-Modus um eine Rückmeldung über die Syntheseeffizienz zu erhalten. Nach Aufreinigung mittels RP-HPLC wurde das Amin mit ATTO565-NHS-Ester gekuppelt und erneut aufgereinigt.

Die Masse des Monomers konnte leider nicht ermittelt werden, da in der üblichen Massenanalyse der Oligonukleotide nicht messbar war und für eine Massenanalyse für kleine organische Moleküle, die synthetisierte Ausbeute zu gering war. Da aber die Fluoreszenz der Verbindung nach Belichtung bei Messung am Platerader um den Faktor 18 anstieg, muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei der synthetisierten Verbindung um das Zielmolekül handelt. Die Fluoreszenz des Farbstoffs alleine würde nicht durch die Belichtung zunehmen, sondern allenfalls durch Bleichungsprozesse abnehmen. dC^{NDBF} alleine weist keine Fluoreszenz auf.

Für die Messung der Fluoreszenzzunahme durch Photolyse wurde eine 7.5 µM-Lösung im oben beschriebenen Aufbau mit Photomultiplier vermessen. Durch Auftragung der Zunahmen

des Spannungswerts gegen die eingestrahlte Photolyse-Leistung war ein quadratischer Zusammenhang ablesbar, der mit der Formel $y = a + bx^c$ gefittet wurde.

Für die Immobilisierung des Monomers in Hydrogelen wurde das **Monomer2^{C-NDBF}** bzw. **Monomer3^{G-ANBP}** wiederum über die Festphasensynthese hergestellt. Als feste Phase wurden 3'-Thiol-Modifier-C3-S-S-CPG Säulen (*Link Technologies Ltd.*) verwendet und ein 5'-MMT-Amino-Modifier-C6-CE Phosphoramidit (*Link Technologies Ltd.*) verwendet. Auch diese Synthese wurde im DMTr-OFF-Modus durchgeführt. Nach Abspaltung der Schutzgruppen mit Ammoniak und HPLC-Aufreinigung wurde das freie Amin mit ATTO565-NHS-Ester (*ATTO-TEC GmbH*) markiert. Die Dithiolmodifikation wurde erst kurz vor der Verwendung im Hydrogel reduziert (siehe Reduktion von Dithiolfunktionen), damit die freien Thiolfunktionen nicht zu schnell dimerisieren. Für die Herstellung der Hydrogele wurde das 3D Life PVA-PEG Hydrogel Kit von *Cellendes GmbH* verwendet. In 25 μ L Hydrogele wurden 150 pmol Monomer immobilisiert. Auch hier konnte keine Masse erhalten werden, doch gelten hier dieselben Argumente wie zuvor. Die zusätzliche Thiolfunktion kann im Hydrogel nachgewiesen werden. Verfügt die Verbindung über eine Thiolfunktion, wird die entstehende Fluoreszenz am photolysierten Bereich verbleiben und nicht wegdiffundieren. Da dies der Fall war, kann davon ausgegangen werden, dass die gewünschte Verbindung synthetisiert wurde.

Die Hydrogele wurden am *Zeiss AxioObserver Z1* Mikroskop mit einem A-Plan 10x/0.25 Ph1 air Objektiv von *Zeiss* analysiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einer UVICO Lampe der Firma *Rapp OptoElectronic GmbH* und dem entsprechenden Filterwürfel. Die Weitfeldfluoreszenzaufnahmen wurden an einer *AxioCam MRm* Kamera der Firma *Zeiss* aufgenommen.

4.3.2.3. Verdrängungs-Assay im Hydrogel

Synthese der Stränge

Die Synthese der entsprechenden Stränge erfolgte nach der oben beschriebenen Methode und die erhaltenen Massen sind in Tabelle 15 aufgetragen. Die Massen der thiolmodifizierten Stränge wurde in geschützter Form gemessen, da die freien Thiolfunktionen zur Dimerisierung neigen und so eine Mischung des Monomers und des Dimers zu erwarten gewesen wäre. Diese Massen wurden auch in der entsprechenden Publikation^[74] angegeben, allerdings wurde fälschlicherweise die Sequenz der entschützten DNA gezeigt.

Tabelle 15 Sequenzen und Massen der im Hydrogel verwendeten Stränge.

Sequenzen	Masse [Da] (berechnet)	Masse [Da] (gefunden)
HO-(CH ₂) ₆ -S-S-(CH ₂) ₆ -GCAT ^{DEACM} AAAT ^{DEACM} AAAGGT ^{DEACM} G (DNA20 ^{3xT_DEACM})	5663.3	5663.1
ATTO565-NH-(CH ₂) ₆ -CACCTTTATTTATGC (DNA21 ^{ATTO565})	5163.5	5162.8
TAAATAAAGGTG-BHQ2 (DNA22 ^{BHQ2_12})	4270.8	4272.4
AAATAAAGGTG-BHQ2 (DNA23 ^{BHQ2_11})	3967.8	3968.4
HO-(CH ₂) ₆ -S-S-(CH ₂) ₆ -AG ^{ANBP} ATACAG ^{ANBP} ATACG ^{ANBP} CA (DNA24 ^{3xG_ANBP})	5766.3	5767.0
ATTORho14-NH-(CH ₂) ₆ -TGCGTATCTGTATCT (DNA25 ^{ATTORho14})	5491.4	5489.6
ACAGATACGCA-BBQ-650III (DNA26 ^{BBQ650_11})	3997.8	3999.5
TACAGATACGCA-BBQ-650III (DNA27 ^{BBQ650_12})	4303.9	4303.6

Messung der Fluoreszenzzunahme am Platerader

Für die Messungen am Plate-Reader (siehe Allgemeine Methoden) wurden 100 µL einer 25 µM Lösung (jeweils bezogen auf den photolabil geschützten Strang) verwendet.

Hydrogel-Präparation

Für die Hydrogele wurde die Thiol-Modifikation der photolabil geschützten DNA mit 50 mM TCEP in 100 mM Tris Puffer pH 7.4 innerhalb von 2 h reduziert und anschließend mittels RP-HPLC aufgereinigt. 75 pmol dieser DNA wurden mit dem 3-D Life PVA-PEG Hydrogel Kit von *Cellendes GmbH* immobilisiert. Das Gesamtvolumen des Hydrogels betrug 6.25 µL (1.25 µL MalPVA, 1.87 µL PEG-Link in CB-Puffer pH 5.5) und wurde in eine Nunc™ Lab-Tek™ chambered coverglass Kammer pipettiert. Das Mischen des PEG-Linkers mit dem Rest des Ansatzes erfolgte erst in der Kammer und wurde durch dreimaliges Mischen mit der Pipette erzielt. Dies muss sehr schnell erfolgen, da sonst das Hydrogel bereits in der Pipette polymerisiert. Das Hydrogel wurde im Anschluss mit der entsprechenden Sonden-Lösung in 1xPBS-Puffer umgeben.

Bestimmung der quadratischen Abhängigkeit von der eingestrahelten Leistung

Ein Hydrogel, das **DNA20**^{3xT_DEACM} enthält aber keine Sonde, wurde im **Laser-Setup 1** platziert. Es wurden mit 780 nm Linien mit zunehmender Leistung (4 - 36 mW) und konstanter

Scanning-Geschwindigkeit belichtet. Die resultierende Fluoreszenz nach Zugabe von **Sonde3** wurde durch eine UVICO Lampe der Firma *Rapp OptoElectronic GmbH*, die ins Mikroskop gekoppelt ist und deren Spektrum durch den Filterwürfel 43 festgelegt wurde. Die Fluoreszenz-Bilder wurden mit der Kamera AxioCam MRm von *Zeiss* aufgenommen. Zur Messung der Fluoreszenzintensität der Linien wurde zunächst mit Hilfe der Software *Zen* (*Zeiss*) der Hintergrund von den Aufnahmen abgezogen und anschließend die Intensität der Linien und des Hintergrunds gemessen. Die erhaltenen Daten wurden mit *Origin* (*OriginPro*) durch Integration der Intensität ausgewertet und gegen die eingestrahlte Leistung aufgetragen und quadratisch gefittet. Die Messungen wurden an drei Aufnahmen durchgeführt und der Mittelwert der jeweils erhaltenen Integration aufgetragen.

Fluoreszenz-Zunahme über die zunehmende Anzahl an Photolyse-Scans

Jedes Hydrogel wurde aufs Mikroskop des **Laser-Setup2** gesetzt. Es wurde jeweils ein Quadrat mit konstanter Leistung 300 Mal mit 730 nm (**DNA20^{3xT-DEACM}**) und 200 Mal 920 nm (**DNA24^{3xG-ANBP}**) (pixel dwell time 2.55 μ s) photolysiert. Die Fluoreszenz wurde simultan mit der Photolyse detektiert.

Einphotonen- gegen Zweiphotonen-Photolyse

Für diese Experimente wurde **Laser-Setup1** und ein **DNA20^{3xT-DEACM}**-enthaltendes Hydrogel mit **Sonde3** in der umgebenden Lösung verwendet. Die Photolyse durch Einphotonen-Anregung wurde durch die Frequenz-Verdopplung des 780 nm Lasers mit Hilfe eines *Inspired Blue Frequency doubler* von *Newport SpectraPhysics* realisiert. Die Frequenz-verdoppelte Leistung betrug 0.8 mW vor dem Objektiv, der 780 nm Laser für die Zweiphotonen-Anregung wurde auf 5.3 mW eingestellt. In beiden Fällen wurde die *scan velocity* auf 806 Hz (*spot size* 1) gesetzt. Die Photolyse mit Einphotonen-Licht erfolgte in 4 Runs, die Zweiphotonen-Bestrahlung erfolgte in 60 Runs. Das Imaging des z-Stacks erfolgte an einem *Zeiss LSM710* mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Öl DIC M27 Objektiv mit einer Anregungswellenlänge von 543 nm und dem Detektions-Kanal zwischen 557-612 nm. Die Bild-Verarbeitung wurde mit der Software *Zen 2 lite* (*Zeiss*) and *Fiji* (*ImageJ*) durchgeführt.

Orthogonale Photolyse

Für diese Experimente wurde **Laser-Setup1** und ein Hydrogel, dass sowohl **DNA20^{3xT-DEACM}** als auch **DNA24^{3xG-ANBP}** in gleicher Konzentration enthält, verwendet. In der umgebenden Lösung sind beide Sonden (**Sonde3** und **Sonde4**) präsent. Die Belichtung mit den

verschiedenen Wellenlängen bzw. Leistungen erfolgte nacheinander (*scan velocity* 806 Hz, *spot size* 1, 4 *runs* mit 13 mW bei 840 nm, 100 *runs* mit 1.3 mW bei 840 nm, 100 *runs* mit 8 mW bei 980 nm). Die Leistungs-Werte wurden mit Hilfe eines Powermeters bei herausgedrehtem Objektiv gemessen. Nach erfolgter Photolyse wurden die entsprechenden Weitfeldfluoreszenzaufnahmen an einem Zeiss LSM710 Mikroskop mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 Objektiv durchgeführt. Als Anregungs-Wellenlänge wurde für ATTO565 543nm und für ATTO Rho14 633nm gewählt, der Detektions-Kanal wurde auf 557-612 nm (ATTO565) und 671-720nm (ATTO Rho14) gesetzt. Die Bilder wurden mit der Software Zen 2 lite (Zeiss) und der Min/Max Funktion für die Kanal Intensität erhalten. Die zu den gezeigten Bildern entsprechenden z-Scans sind in Abbildung 86 gezeigt.

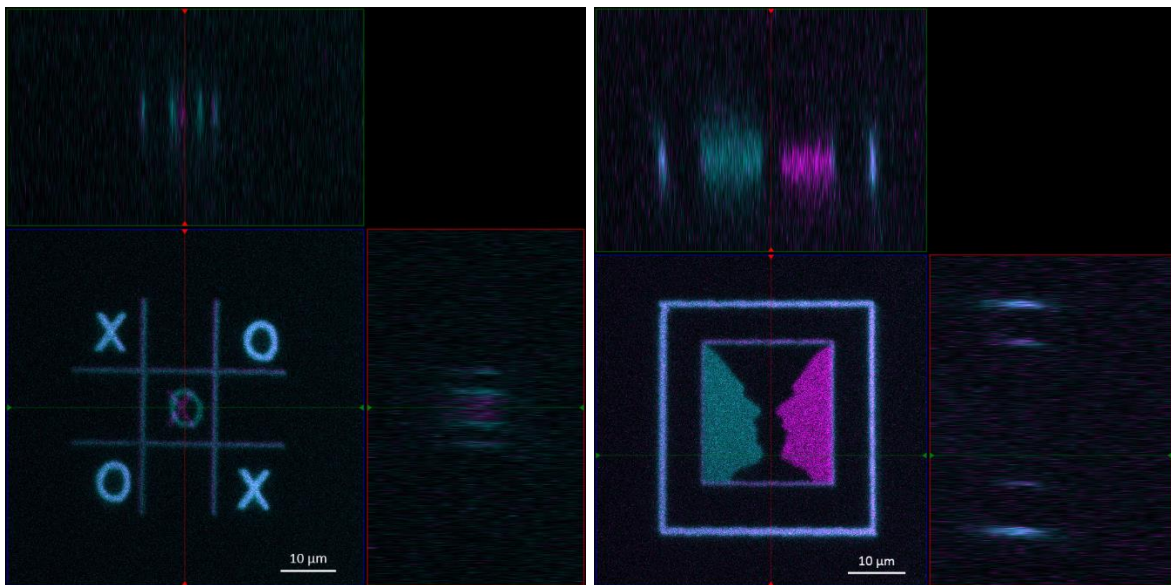


Abbildung 86: Optische Schnitte der Abbildung 70.

HeLa-Zellkultur

HeLa-Zellen wurden regelmäßig in DMEM mit 10 % FBS (*fetal bovine serum*) bei 37 °C und 5% CO₂ subkultiviert. Für die Transfektion wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Kammer einer Nunc™ Lab-Tek™ chambered coverglass Kammer in DMEM mit 10 % FBS für 24 h subkultiviert. Die Bildung des Lipid-Komplexes für die Transfektion erfolgte mit 15 pmol DNA und Metafectene 4 µL/1000 ng in serumfreien Medium innerhalb von 15 – 30 min. Dieser Komplex wurde anschließend zu den Zellen gegeben und für 4 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 4 h wurde das Transfektionsreagenz entfernt und gegen PBS (mit Mg²⁺ und Ca²⁺) ausgetauscht und direkt im Anschluss die Photolyse-Experimente durchgeführt. Die Zellen wurden am **Laser-Setup1** mit 780 nm photolysiert die Weitfeldfluoreszenzaufnahmen an einer AxioCam

MRm Kamera der Firma *Zeiss* aufgenommen. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einer UVICO Lampe der Firma *Rapp OptoElectronic GmbH* und dem entsprechenden Filterwürfel. Die Durchlicht- und Weitfeldfluoreszenzaufnahmen wurden an einer AxioCam MRm Kamera der Firma *Zeiss* aufgenommen.

Patch-Clamp-Experimente

Die Patch-Clamp-Experimente wurden zusammen mit Dr. Stephan Junek durchgeführt. Für die Patch-Clamp-Experimente wurden hippocampale Ratten-Neuronen Zellkulturen verwendet, die vom MPI für Hirnforschung zur Verfügung gestellt wurden. Für die Experimente wurden die Zellen in HEPES-Puffer (120 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Dextrose, 10 mM Hepes, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4) bei RT gemessen. Die *Whole cell* Aufnahmen wurden mit Standard Patch-Pipetten (5-6 MΩ) und einem Heka EPC10 Double Amplifier mit PatchMaster Software durchgeführt. Die **Sonde3** (**DNA21**^{ATTO565} 2.5 μM, **DNA22**^{BHQ2-12} 5 μM) und **DNA20**^{3xT-DEACM} (mit geschütztem Thiol, 2.5 μM) wurden zur internen Pipetten-Lösung (120 mM K-Gluconat, 20 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 10 mM Hepes, 2 mM MgCl₂, 2 mM Na₂-ATP, 0.4 mM Na-GTP, 10 mM Phosphokreatin) gegeben.

Die Experimente wurden an einem Sutter MOM Mikroskop (*Sutter Instrument*) mit einem Olympus LUMPlanFL N 40x W 0.8 Objektiv durchgeführt. Die Bilder wurden über Weitfeldepifluoreszenz mit einer Zyla 4.2 (*Andor*) sCMOS Kamera aufgenommen. Die Fluoreszenz-Anregung erfolgte mit einer pe4000 (*CoolLED*, 550 nm). Die Photolyse erfolgte durch ein holographisches Belichtungs-System (*Rapp OptoElectronic*), mit einem Ti:Saphire Laser (*MaiTai, Spectra Physics*), dessen Leistung über eine Pockels-Zelle (*ConOptics*) reguliert wurde. Die Laser-Leistung betrug für alle Experimente 10 mW vor dem Objektiv.

Nachdem der Membran-Seal gebrochen wurde, wurde 10 min gewartet, damit die DNA sich in der Zelle verteilen konnte. Die Elektrophysiologische Eigenschaften der Zelle wie Ruhemembranpotenzial, Spike-Schwellenwert und -Muster wurden in der *Current Clamp* Konfiguration vor und nach Belichtung gemessen.

Ein Belichtungsexperiment besteht aus einer 20-sekündigen Baseline, einer Belichtungsphase, die aus 20 1Hz Pulsen mit einer Pulsdauer von 20 ms besteht, und einer Nach-Belichtungs-Phase, bei der weitere 70 sec die Fluoreszenz aufgenommen wurde. Bei jeder der 6 gemessenen Zellen wurden zwei dieser Belichtungsexperimente durchgeführt, 10 und 15 min nach dem Aufbrechen des Membran-Seals. Am Ende wurde jeweils ein drittes Belichtungsexperiment durchgeführt, bei dem allerdings die Belichtung nicht gepulst sondern kontinuierlich durchgeführt wurde, um die maximale erreichbare Fluoreszenz zu messen und um zu zeigen, dass die Zellen auch eine längere Belichtung überstehen.

5. Anhang

5.1. RP-HPLC-Chromatogramme

Für die Aufreinigung oder Analyse von Oligonukleotiden mittels RP-HPLC wurden die folgenden Gradienten verwendet, jeweils mit den Eluenten 0.1 M TEAA-Puffer (A) und Acetonitril (B):

Gradient 1:

Zeit	A	B	Flussrate
0	95	5	1 mL/min
2	95	5	
35	50	50	
38	0	100	

Gradient 2:

Zeit	A	B	Flussrate
0	95	5	1 mL/min
2	95	5	
24	70	30	
29	0	100	

Gradient 3:

Zeit	A	B	Flussrate
0	95	5	1 mL/min
2	95	5	
26	67.7	32.3	
28	0	100	

Gradient 4:

Zeit	A	B	Flussrate
0	95	5	1 mL/min
2	95	5	
40	40	60	
42	0	100	

Gradient 5:

Zeit	A	B	Flussrate
0	95	5	2 mL/min
2	95	5	
40	40	60	
42	0	100	

Verwendete Säulen:

Säule 1: Nukleosil 100-5 C18 *CS-Chromatographie* 250 x 4.6 mm

Säule 2: Multokrom 100-5 C18 *CS-Chromatographie* 250 x 4.6 mm

Säule 3: Multokrom 100-5 C18 *CS-Chromatographie* 250 x 8 mm

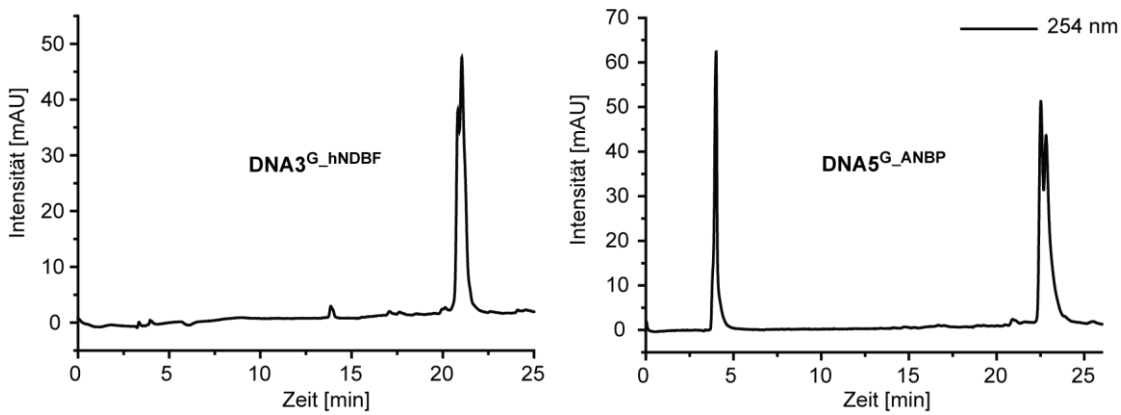


Abbildung 87: HPLC-Chromatogramme von **DNA3^G_hNDBF** und **DNA5^G_ANBP**. Im Chromatogramm von **DNA5^G_ANBP** ist bei 4 min Retentionszeit der Bestimmung der Quantenausbeuten verwendete interne Standard zu sehen. (**DNA3^G_hNDBF**: Gradient 2, Säule 1, **DNA5^G_ANBP**: Gradient 3, Säule 1)

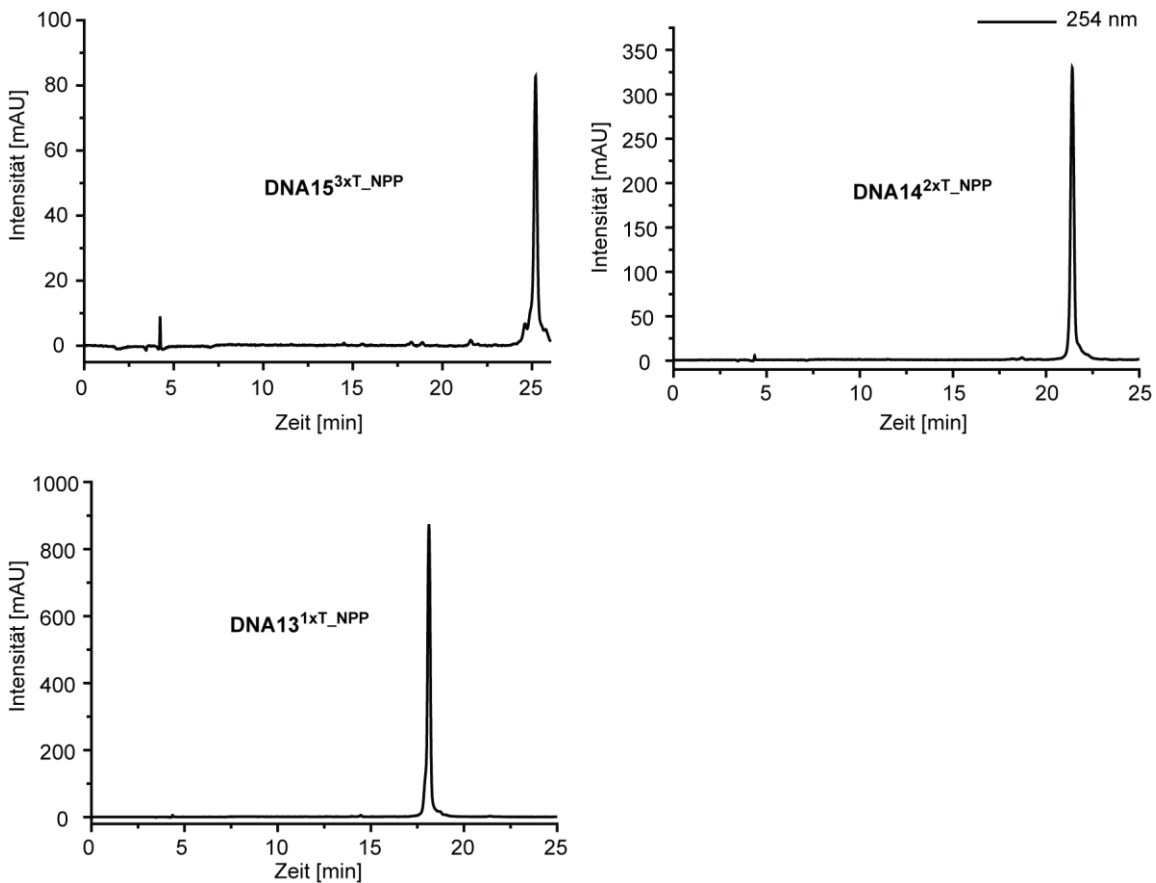


Abbildung 88: HPLC-Chromatogramme von **DNA13^{1xT}_NPP**, **DNA14^{2xT}_NPP** und **DNA15^{3xT}_NPP** (Gradient 2, Säule 1)

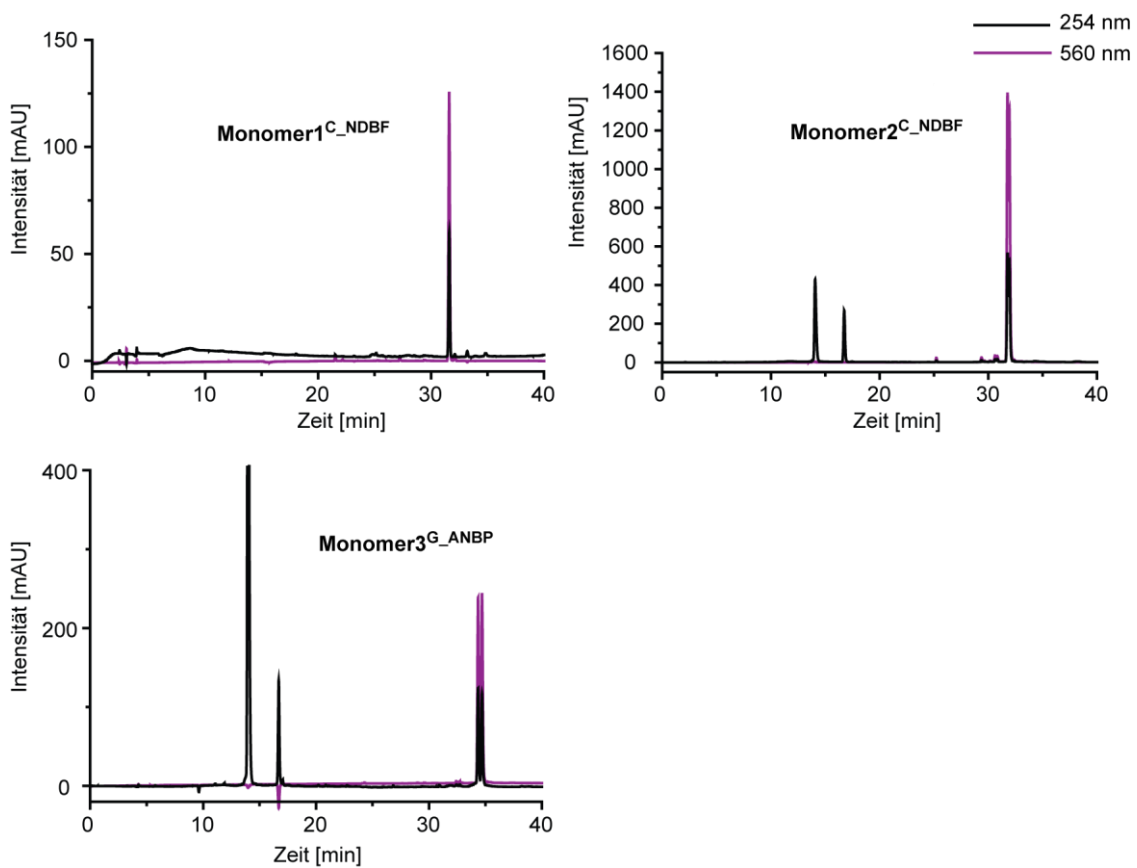


Abbildung 89: HPLC-Chromatogramme von **Monomer1^C_NDBF**, **Monomer2^C_NDBF** und **Monomer^G_ANBP**. Die Peaks zwischen 10 und 20 min gehören zum Reduktionsmittel DTT. **Monomer1^C_NDBF**: Gradient 4, Säule 2, **Monomer2^C_NDBF** und **Monomer^G_ANBP**: Gradient 5, Säule 3)

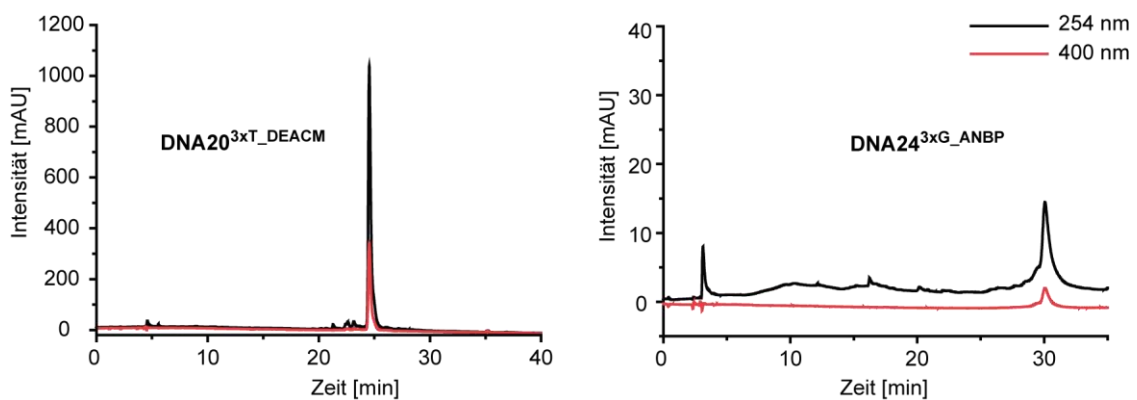


Abbildung 90: HPLC-Chromatogramme von **DNA20^{3xT}_DEACM** und **DNA24^{3xG}_ANBP** nach TCEP Reduktion (**DNA20^{3xT}_DEACM**: Gradient 5, Säule 3, **DNA24^{3xG}_ANBP**: Gradient 1, Säule 2)

5.2. Literaturverzeichnis

- [1] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [2] K. Miyazaki, Y. Morimoto, N. Nishiyama, Y. Maekawa, W.-Z. Hu, K. Nakatate, K. Kaneda, N. Shinomiya, K. Kataoka, *Lasers Surg. Med.* **2012**, *44*, 413–420.
- [3] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [4] J. A. Barltrop, P. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 697–699.
- [5] J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- [6] J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry (Mosc.)* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [7] J. Engels, E.-J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- [8] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* **2002**, *1*, 441–58.
- [9] 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.
- [10] S. Walbert, W. Pfliederer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1601–1611.
- [11] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822–823.
- [12] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860–6861.
- [13] V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter, U. B. Kaupp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1046–1048.
- [14] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 703–710.
- [15] F. Schäfer, J. Wagner, A. Knau, S. Dimmeler, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13558–13561.
- [16] K. B. Joshi, A. Vlachos, V. Mikat, T. Deller, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2746–2748.
- [17] R. C. Wilson, J. A. Doudna, *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 217–239.
- [18] V. Mikat, A. Heckel, *RNA* **2007**, *13*, 2341–2347.
- [19] C. Wang, Z. Zhu, Y. Song, H. Lin, C. J. Yang, W. Tan, *Chem. Commun. Camb. U. K.* **2011**, *47*, 5708–5710.
- [20] J. Hemphill, Q. Liu, R. Uprety, S. Samanta, M. Tsang, R. L. Juliano, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3656–3662.
- [21] D. D. Young, H. Lusic, M. O. Lively, J. A. Yoder, A. Deiters, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2937–2940.
- [22] X. Tang, I. J. Dmochowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3523–3526.
- [23] J. C. Gripenburg, T. L. Rapp, P. Carroll, I. Dmochowski, J. Eberwine, *Chem Sci* **2015**, *6*, 2342–2346.
- [24] M. A. Azagarsamy, I. A. Marozas, S. Spaans, K. S. Anseth, *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 19–23.
- [25] M. A. Azagarsamy, D. D. McKinnon, D. L. Alge, K. S. Anseth, *ACS Macro Lett.* **2014**, *5*, 515–519.
- [26] D. D. McKinnon, T. E. Brown, K. A. Kyburz, E. Kiyotake, K. S. Anseth, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2808–2816.
- [27] Y. Luo, M. S. Shoichet, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 249–253.
- [28] M. J. Salierno, L. García-Fernández, N. Carabelos, K. Kiefer, A. J. García, A. del Campo, *Biomaterials* **2016**, *82*, 113–123.
- [29] J. Iturri, L. García-Fernández, U. Reuning, A. J. García, A. del Campo, M. J. Salierno, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9533.
- [30] 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*, 352–60.
- [31] S. Weis, T. T. Lee, A. del Campo, A. J. García, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 8059–8066.

- [32] M. Wirkner, S. Weis, M. San, M. Alvarez, R. A. Gropeanu, M. Salierno, A. Sartoris, R. E. Unger, C. J. Kirkpatrick, C. del, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2623–2629.
- [33] J. Cui, R. A. Gropeanu, D. R. Stevens, J. Rettig, C. A. del, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7733–40.
- [34] J. Cui, M. Wang, Y. Zheng, G. M. Rodríguez Muñoz, A. del Campo, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1251–1256.
- [35] A. Rodrigues-Correia, X. M. M. Weyel, A. Heckel, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5500–5503.
- [36] M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3358–3377.
- [37] C. G. Bochet, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6341–6346.
- [38] F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. H. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450–1453.
- [39] C. Menge, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4620–4623.
- [40] A. Rodrigues-Correia, D. Knapp-Bühle, J. W. Engels, A. Heckel, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5128–5131.
- [41] M. Kessler, R. Glatthar, B. Giese, C. G. Bochet, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1179–1181.
- [42] J.-L. Debieux, C. G. Bochet, *Chem Sci* **2012**, *3*, 405–406.
- [43] L. García-Fernández, C. Herbivo, V. S. M. Arranz, D. Warther, L. Donato, A. Specht, A. del Campo, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 5012–5017.
- [44] L. García-Fernández, C. Herbivo, V. S. M. Arranz, D. Warther, L. Donato, A. Specht, A. del Campo, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 5012–5017.
- [45] V. San Miguel, C. G. Bochet, A. del Campo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5380–5388.
- [46] S. Yamazoe, Q. Liu, L. E. McQuade, A. Deiters, J. K. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10114–8.
- [47] L. Fournier, C. Gauron, L. Xu, I. Aujard, T. Le Saux, N. Gagey-Eilstein, S. Maurin, S. Dubruille, J.-B. Baudin, D. Bensimon, et al., *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1528–1536.
- [48] J. P. Olson, H.-B. Kwon, K. T. Takasaki, C. Q. Chiu, M. J. Higley, B. L. Sabatini, G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5954–5957.
- [49] N. Kotzur, B. Briand, M. Beyermann, V. Hagen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16927–16931.
- [50] A. Blanc, C. G. Bochet, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2649–2651.
- [51] J. V. Garcia, F. Zhang, P. C. Ford, *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2013**, *371*, 20120129.
- [52] A. M. Smith, M. C. Mancini, S. Nie, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 710–711.
- [53] *Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2014**.
- [54] L. Zayat, M. Salierno, R. Etchenique, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 1728–1731.
- [55] A. P. Gorka, R. R. Nani, J. Zhu, S. Mackem, M. J. Schnermann, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14153–14159.
- [56] G. Chen, H. Qiu, P. N. Prasad, X. Chen, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5161–5214.
- [57] M. K. G. Jayakumar, N. M. Idris, Y. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 8483–8488.
- [58] X. Wu, G. Chen, J. Shen, Z. Li, Y. Zhang, G. Han, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 166–175.
- [59] G. Bort, T. Gallavardin, D. Ogden, P. I. Dalko, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *17*, 4526–4537.
- [60] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266.
- [61] M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.* **1931**, *401*, 273–294.
- [62] T. H. Maiman, *Nature* **1960**, *187*, 493–494.
- [63] W. Kaiser, C. G. B. Garrett, *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7*, 229–231.
- [64] W. Denk, J. Strickler, W. Webb, *Science* **1990**, *248*, 73–76.
- [65] F. Helmchen, W. Denk, *Nat Meth* **2005**, *2*, 932–940.
- [66] W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, *Nat Biotech* **2003**, *21*, 1369–1377.
- [67] W. G. Fisher, W. P. Partridge, C. Dees, E. A. Wachter, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 141–155.

- [68] S. Kawata, Y. Kawata, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1777–1788.
- [69] D. A. Parthenopoulos, P. M. Rentzepis, *Science* **1989**, *245*, 843–845.
- [70] S. R. Marder, *Chem. Commun.* **2006**, 131–134.
- [71] C. N. LaFratta, J. T. Fourkas, T. Baldacchini, R. A. Farrer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6238–6258.
- [72] G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628.
- [73] A. Specht, F. Bolze, Z. Omran, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *HFSP J.* **2009**, *3*, 255–264.
- [74] M. A. H. Fichte, X. M. M. Weyel, S. Junek, F. Schäfer, C. Herbivo, M. Goeldner, A. Specht, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8948–8952.
- [75] A. L. Schawlow, C. H. Townes, *Phys. Rev.* **1958**, *112*, 1940–1949.
- [76] E. Hecht, A. Schleitzer, *Optik*, Oldenbourg, München, **2009**.
- [77] *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**.
- [78] O. D. Fedoryak, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419–3422.
- [79] 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. U. S. A.* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [80] C. Bao, G. Fan, Q. Lin, B. Li, S. Cheng, Q. Huang, L. Zhu, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 572–575.
- [81] M. J. Davis, C. H. Kragor, K. G. Reddie, H. C. Wilson, Y. Zhu, T. M. Dore, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1721–1729.
- [82] M. Petit, C. Tran, T. Roger, T. Gallavardin, H. Dhimane, F. Palma-Cerda, M. Blanchard-Desce, F. C. Acher, D. Ogden, P. I. Dalko, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6366–6369.
- [83] N. Gagey, P. Neveu, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2467–2469.
- [84] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
- [85] M. Matsuzaki, G. C. R. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, H. Kasai, *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 1086–1092.
- [86] S. Gug, F. Bolze, A. Specht, C. Bourgogne, M. Goeldner, J.-F. Nicoud, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9525–9529.
- [87] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [88] N. Komori, S. Jakkampudi, R. Motoishi, M. Abe, K. Kamada, K. Furukawa, C. Katan, W. Sawada, N. Takahashi, H. Kasai, et al., *Chem Commun* **2016**, *52*, 331–334.
- [89] A. Specht, F. Bolze, L. Donato, C. Herbivo, S. Charon, D. Warther, S. Gug, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 578–586.
- [90] T. Furuta, T. Watanabe, S. Tanabe, J. Sakyō, C. Matsuba, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4717–4720.
- [91] H. Lusic, R. Uprety, A. Deiters, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 916–919.
- [92] J. Luo, R. Uprety, Y. Naro, C. Chou, D. P. Nguyen, J. W. Chin, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15551–15558.
- [93] K. M. Schelkle, T. Griesbaum, D. Ollech, S. Becht, T. Buckup, M. Hamburger, R. Wombacher, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2825–2829.
- [94] V. Gatterdam, R. Ramadass, T. Stoess, M. A. H. Fichte, J. Wachtveitl, A. Heckel, R. Tampé, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5680–5684.
- [95] M. M. Mahmoodi, D. Abate-Pella, T. J. Pundsack, C. C. Palsuledesai, P. C. Goff, D. A. Blank, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5848–5859.
- [96] J. H. Wosnick, M. S. Shoichet, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 55–60.
- [97] P. Lipp, E. Niggli, *J. Physiol.* **1998**, *508*, 801–809.
- [98] F. DelPrincipe, M. Egger, G. C. R. Ellis-Davies, E. Niggli, *Cell Calcium* **1999**, *25*, 85–91.
- [99] E. B. Brown, J. B. Shear, S. R. Adams, R. Y. Tsien, W. W. Webb, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 489–499.
- [100] S. R. Adams, V. Lec-Ram, R. Y. Tsien, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 867–878.
- [101] S. Kantevari, M. Matsuzaki, Y. Kanemoto, H. Kasai, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 123–125.
- [102] J. M. Amatrudo, J. P. Olson, G. Lur, C. Q. Chiu, M. J. Higley, G. C. R. Ellis-Davies, *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 64–70.

- [103]K. Korzycka, P. M. Bennett, E. J. Cueto-Diaz, G. Wicks, M. Drobijev, M. Blanchard-Desce, A. Rebane, H. L. Anderson, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 2419–2426.
- [104]K. A. Lennox, R. Owczarzy, D. M. Thomas, J. A. Walder, M. A. Behlke, *Mol. Ther. Acids* **2013**, 2, e117.
- [105]A. Ohkubo, Y. Ezawa, K. Seio, M. Sekine, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10884–10896.
- [106]A. M. MacMillan, G. L. Verdine, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5931–5933.
- [107]*Physik Abitur*, Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG, Mannheim, **2003**.
- [108]W. Demtröder, W. Demtröder, *Elektrizität und Optik*, Springer Spektrum, Berlin Heidelberg, **2013**.
- [109]E. Abbe, *Arch Mikrosk Anat Entwicklunsmech* **1896**, 9, 413–418.
- [110]Lord Rayleigh, *Philos Mag* **1896**, 42, 167–195.
- [111]U. Kubitscheck, Ed. 1, *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*, Wiley-Blackwell, Weinheim, **2013**.
- [112]„LP – Fluoreszenzmikroskopie“. [Online]. Verfügbar unter: <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741>. [Zugegriffen: 23-Aug-2016].
- [113]„Fluorescence Imaging“. [Online]. Verfügbar unter: <http://malone.bioquant.uni-heidelberg.de/methods/imaging/imaging.html#fluorescence>. [Zugegriffen: 23-Aug-2016].
- [114]„Duke University Light Microscopy Core Facility - Basic introduction to microscopy: spinning disk confocal microscopes“. [Online]. Verfügbar unter: <http://microscopy.duke.edu/learn/introtomicroscopy/spinningdisks.html>. [Zugegriffen: 23-Aug-2016].
- [115]G. Mayer, L. Kröck, V. Mikat, M. Engeser, A. Heckel, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1966–1970.
- [116]T. Mack, *Dissertation*, Universität Frankfurt, **2010**.
- [117]M. Buff, *Dissertation*, Universität Frankfurt, **2010**.
- [118]F. Schäfer, *Dissertation*, Universität Frankfurt, **2013**.
- [119]C. Özçoban, *Diplomarbeit*, Universität Frankfurt, **2010**.
- [120]M. Fichte, *Masterarbeit*, Universität Frankfurt, **2010**.
- [121]A. Rodrigues-Correia, M. B. Koepfel, F. Schäfer, K. B. Joshi, T. Mack, A. Heckel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 399, 441–447.
- [122]A. Rodrigues-Correia, P. Seyfried, A. Heckel, in *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, John Wiley & Sons, Inc., **2014**.
- [123]Q. Li, G. Luan, Q. Guo, J. Liang, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, e5.
- [124]C. Grunwald, K. Schulze, A. Reichel, V. U. Weiss, D. Blaas, J. Piehler, K.-H. Wiesmüller, R. Tampé, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, 107, 6146–6151.
- [125]X. M. M. Weyel, *Masterarbeit*, Universität Frankfurt, **2012**.
- [126]A. Dreuw, M. A. Polkehn, R. Binder, A. Heckel, S. Knippenberg, *J. Comput. Chem.* **2012**, 33, 1797–805.
- [127]T. Stöß, *Dissertation*, Universität Frankfurt, **2012**.
- [128]N. Deußner, *Bachelorarbeit*, Universität Frankfurt, **2013**.
- [129]C. Xia, D. Rayabarapu, *US 20110204333 A1*, **2011**.
- [130]T. Keumi, N. Tomioka, K. Hamanaka, H. Kakahara, T. Morita, H. Kitajima, M. Fukushima, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4671–4677.
- [131]H. Gilman, P. T. Parker, J. C. Bailie, G. E. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, 61, 2836–2845.
- [132]W. Li, J. Li, Y. Wu, J. Wu, R. Hotchandani, K. Cunningham, I. McFadyen, J. Bard, P. Morgan, F. Schlerman, et al., *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 1799–1802.
- [133]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.
- [134]Z. Li, G. Deng, Y.-C. Li, *Synlett* **2008**, 2008, 3053–3057.
- [135]M. Mirza-Aghayan, R. Boukherroub, M. Rahimifard, *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 5930–5932.
- [136]S. Gadhwal, M. Baruah, J. S. Sandhu, *Synlett* **1999**, 1999, 1573–1574.

- [137]E. Parquet, Q. Lin, *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1225.
- [138]H. Wunderer, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1973**, *306*, 371–380.
- [139]M. Rudolph, *Bachelorarbeit*, Universität Frankfurt, **2014**.
- [140]A. Kumar, B. S. Bhakuni, C. D. Prasad, S. Kumar, S. Kumar, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5383–5392.
- [141]S. Yang, C. Wu, M. Ruan, Y. Yang, Y. Zhao, J. Niu, W. Yang, J. Xu, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4288–4292.
- [142]H. G. O. Becker, R. Beckert, Eds. , *Organikum: organisch-chemisches Grundpraktikum*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [143]P. Seyfried, *Masterarbeit*, Universität Frankfurt, **2013**.
- [144]L. Donato, A. Mourot, C. M. Davenport, C. Herbivo, D. Warther, J. Léonard, F. Bolze, J.-F. Nicoud, R. H. Kramer, M. Goeldner, et al., *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1876–1879.
- [145]J.-Y. Zhang, H. Esrom, I. W. Boyd, *Appl. Surf. Sci.* **1999**, *138–139*, 315–319.

5.4. Abkürzungsverzeichnis

A

abs.	absolut
Ac	Acetyl
ANBP	<i>p</i> -Dialkylaminonitrobiphenyl
ATP	Adenosintriphosphat

B

Bhc	6-Brom-7-hydroxycumarin-4-methyl
BHQ	6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxy-8-(methoxycarbonyl)cumarin
BNSF	(2,7-bis-{4-nitro-8-[3-(2-propyl)-styryl]})-9,9-bis-[1-(3,6-dioxaheptyl)]-fluoren
Bz	Benzoyl
bzw.	beziehungsweise

C

°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDNI	4-Carboxymethoxy-5,7-dinitroindolinyl
sGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CH	Cyclohexan
CNB	α -Carboxy-2-nitrobenzyl
CE	Cyanoethyl
cMO	cyclisches Morpholino-Oligonukleotid
CPG	controlled-pore glass
Cys	Cystein

D

d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
dA	Desoxyadenosin
Dbz	Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl
dC	Desoxycytidin

DC	Dünnschichtchromatographie
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DEACM	(7-Diethylaminocumarin-4-yl)methyl
DEAD	Azodicarbonsäurediethylester
dest.	destilliert
dG	Desoxyguanosin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMA-NDBF	Dimethylamino-nitrodibenzofuran
DMNB	4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl
DMNPB	3-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)-2-butyl
DMNPP	2-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)propyl
DMF	Dimethylformamid
DMTr	Dimethoxytrityl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dni	5,7-Dinitroindolinyl
DRG	dorsal root ganglia
dT	Desoxythymidin
E	
EANBP	(2-(4'-Bis((2-methoxyethoxy)ethyl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol)
EE	Essigsäureethylester
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eq	Äquivalente
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
G	
g	Gramm

GABA	γ -Aminobuttersäure
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
H	
h	Stunde
hNDBF	homo-Nitrodibenzofuran
hNDBF-OH	2-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)-propanol
HPLC	high performance liquid chromatography
Hz	Hertz
I	
ISC	Inter-System-Crossing
<i>i</i> Pr	Isopropyl
<i>i</i> PrOH	Isopropanol
<i>i</i> PrPac	Isopropylphenoxyacetyl
J	
<i>J</i> [Hz]	Kopplungskonstante bei NMR
L	
Lsg.	Lösung
M	
m	Multiplett
M	Molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulphat
min	Minute
miRNA	<i>micro</i> RNA
mL	Milliliter
μ L	Mikroliter
mmol	Millimol
MNI	4-Methoxy-7-nitroindolin

MS Massenspektrometrie

N

NB *o*-Nitrobenzyl

NPBF 2-(4-Nitrophenyl)benzofuran

NDBF Nitrodibenzofuran

NMR Nuclear Magnetic Resonance

NPE 1-(2-Nitrophenyl)ethyl

NPP 2-(2-Nitrophenyl)propyl

NVOC *o*-Nitroveratryloxycarbonyl

P

Pac Phenoxyacetylanhydrid

PEG Polyethylenglykol

pHP *p*-Hydroxyphenacyl

PMBP 3-(2-Propyl)-4'-methoxy-4-nitrobiphenyl oder *p*-Methoxynitrobiphenyl

pmol Picomol

PPh₃ Triphenylphosphin

ppm parts per million

PVA Polyvinylalkohol

R

R_f Retentionsfaktor

RNA Ribonukleinsäure

RNAi RNA-Interferenz

RP Reversed Phase

RT Raumtemperatur

S

s Singulett

siRNA *small interfering* RNA

T

TBAF Tetrabutylammoniumfluorid

TBDMS *tert*-Butyldimethylsilyl

TCEP

TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TPA	Zweiphotonen-Absorption (two-photon absorption)

U

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
--------	---------------------------

V

V	Volt
---	------

W

W	Watt
---	------

6. Danksagung

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. Alexander Heckel. Ich danke dir für die Aufnahme in deinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten und herausfordernden Projekts und nicht zuletzt für die unendliche Unterstützung und die Ermutigung das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Prof. Dr. Joachim Engels danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Ich möchte mich dafür bedanken, dass ich bereits im Rahmen meiner Bachelorarbeit in Ihrem Arbeitskreis und das von Ihnen vermittelte Praktikum in Liverpool mein Interesse an modifizierten Oligonukleotiden entdecken durfte.

Ein großer Dank geht an alle Mitarbeiter der Service-Abteilungen für Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie und der Chemikalien Ver- und Entsorgung. Es ist ein großes Glück ein so umfangreiches Repertoire an Dienstleistung zur Verfügung zu haben. Speziell sei Dr. Uwe Hener erwähnt, der immer gute Tipps bezüglich der Massen-Analyse hatte.

Den Laboranten des Arbeitskreises Heckel Martin Held, Alexandra Gütlich und Stephan Bernhard danke ich für ihre technische Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und die Aufnahme der unzähligen Massenspektren. Martin Held danke ich insbesondere für die Hilfe bei jeglichen Soft- und Hardware-Problemen an Computer, HPLC und vor allem auch an Geräten im Laserraum.

Auch der guten Seele unseres Arbeitskreises Heike Köhler danke ich für ihr immer offenes Ohr und die tolle Organisation aller anfallenden Tätigkeiten.

Allen Praktikanten Nina Deußner, Juliette Halli, Josefine Kahlstatt, Theresa Kircher, Felix Klockmann, Leona Lingstedt, Nathalie Margraf, Viktor Pfeifer, Marek Wanior, Imanuel Yüce und Bachelors Thin-Ly Dinh, Nina Deußner und Michael Rudolph danke ich für die große Hilfe bei der Synthese.

Dr. Stephan Junek danke ich für die tolle produktive Zusammenarbeit bei den Zweiphotonen-Experimenten im Max-Planck-Institut für Hirnforschung und die vielen Erklärungen zu den verwendeten Techniken. Ich habe wirklich jede Menge von dir lernen können.

Prof. Dr. Josef Wachtveitl und Dr. Markus Braun danke ich für die große Unterstützung bei den theoretischen und technischen Fragen zur Zweiphotonen-Technik. Auch allen Mitgliedern des Arbeitskreises Wachtveitl, die ich mit meinen Fragen gelöchert habe, danke ich für ihre Hilfe.

Prof. Dr. Mike Heilemann und Dr. Marko Lampe (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg) danke ich für die spannende gemeinsame Untersuchung zur STED-Photolyse. Ich hoffe wir werden in diesem Projekt noch erfolgreich sein. Auch danke ich für die Möglichkeit das CLS-Mikroskop nutzen zu können. Mein Dank gilt auch dem gesamten Arbeitskreis Heilemann, ich glaube ich habe wirklich jeden von euch schon mindestens einmal mit einer Frage belästigt und sei es nur nach dem Schlüssel zum LSM-Labor. Besonders möchte ich mich bei Dr. Marina Dietz, Kathrin Klehs und Christoph Spahn bedanken, die meiner Fragerei exzessiver ausgesetzt waren. Ihr wart mir wirklich eine große Hilfe. Auch wenn ich dank euch feststellen musste, dass schon jemand vor mir die chromatische Aberration entdeckt hat.

Herzlich danken möchte ich Dr. Marina Dietz, Reinhard Fichte, Dr. Stephan Junek, Josefine Kahlstatt, Patricia Müller, Dr. Florian Schäfer und Patrick Seyfried die diese Arbeit oder Teile daraus Korrektur gelesen haben. Vielen Dank, ohne euch würde hier so der ein oder andere Unsinn stehen!

Ein riesiger Dank geht an alle aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Heckel. Ich hatte dank euch eine so schöne Zeit hier, die ich nie vergessen werde. Besonders möchte ich mich bei meinen Laborkollegen im Biozentrum Dr. Felix Friedrich, Martin Held und Dr. Florian Schäfer bedanken, ich habe mit euch neben all den fachlichen Themen so viele lustige Gespräche gehabt. Es war eine coole, manchmal auch bizarre Zeit mit euch. Auch Matiss Reinfelds danke ich für die vielen lustigen Gespräche. Den aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Mensaboykott-Gruppe Yvonne Becker, Nina Deußner, Josefine Kahlstatt, Alexandra Gütlich, Patricia Müller, Jennifer Rinne, Dr. Florian Schäfer, Patrick Seyfried und Xenia Weyel und dem Nicht-Mitglied und Feta-Verächter Thomas Goldau, sowie dem „Resteschnorrer“ Dr. Christian Grünewald danke ich neben den vielen leckeren gemeinsamen Mittagessen, für die tolle Atmosphäre und die unglaublich lustigen Stunden neben der Arbeit. Wie ist jetzt gleich nochmal die Pomelo mit der Grapefruit verwandt?

Von Herzen danke ich meiner Familie, ohne die ich diese Arbeit niemals beendet hätte. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die wirklich immer für mich da sind und mich bedingungslos unterstützten. Ich habe wirklich die besten Eltern der Welt! Auch meiner lieben Schwester Babsi danke ich für ihre Unterstützung und die vielen schönen Erlebnisse neben der Arbeit. Last but not least danke ich meinem Freund Michael für ..., ja für eigentlich alles. Du erträgst mich sogar dann noch, wenn ich mich selbst schon lange nicht mehr ertrage! DANKE!

Ich bedanke mich auch bei all denjenigen, die ich an dieser Stelle vergessen habe.

7. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Manuela Fichte
Geburtsdatum: 15.09.1985
Geburtsort: Frankfurt a. M./Höchst
Staatsangehörigkeit: deutsch



Ausbildung

seit 11/2010 **Promotionsstudium der Chemie**
(Goethe Universität, Frankfurt am Main)

10/2005 bis 09/2010 **Studium der Chemie** (Goethe Universität, Frankfurt am Main)

mit Abschluss **Master of Science** am 27.09.2010
Titel Masterarbeit: *“Untersuchung zur Realisierung von differenziell lichtschtbaren Aptameren*

mit Abschluss **Bachelor of Science** am 22.01.2009
Titel Bachelorarbeit: *“Mikrowellen-unterstützte Synthese von 6-substituierten Chinolonnukleosiden als potentielle HIV- Integrase Inhibitoren“*

08/1995 bis 06/2005 **weiterführende Schule** (St. Angela Schule, Königstein)
mit Abschluss **Allgemeine Hochschulreife**

Wissenschaftliche Publikationen und Stipendien

Erstveröffentlichungen: M. A. H. Fichte, X. M. M. Weyel, S. Junek, F. Schäfer, C. Herbivo, M. Goeldner, A. Specht, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8948–8952

F. Friedrich, K. Klehs, M. A. H. Fichte, S. Junek, M. Heilemann, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15382–15385

V. Gatterdam, R. Ramadass, T. Stoess, M. A. H. Fichte, J. Wachtveitl, A. Heckel, R. Tampé, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5680–5684

F. Rohrbach, F. Schäfer, M. A. H. Fichte, F. Pfeiffer, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 12129–12132

F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. H. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450–1453

Stipendien: 01/2011 bis 12/2012 **Promotionsstipendium** des Fonds der Chemischen Industrie