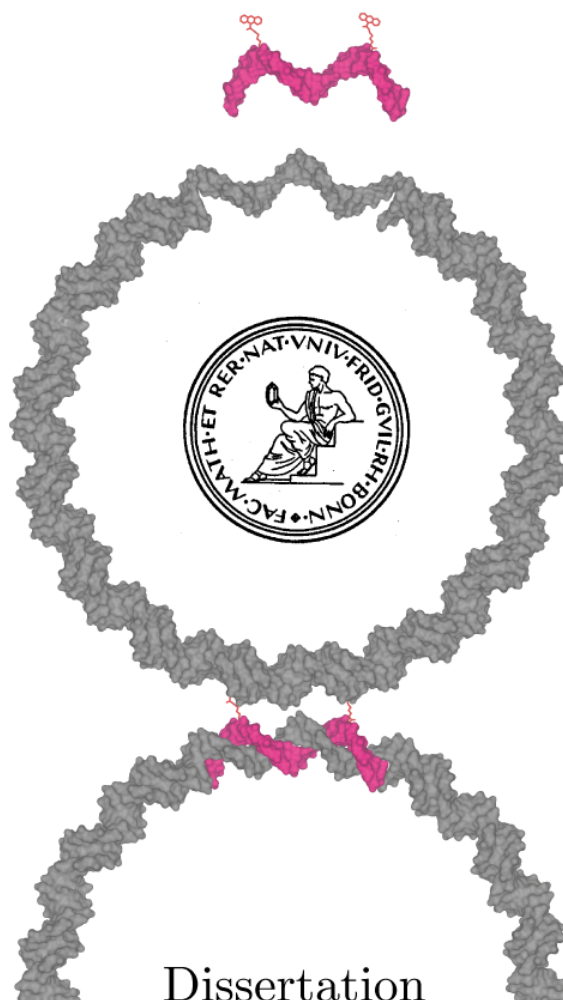

Aufbau von DNA-Nanoarchitekturen mittels funktionalisierter DNA-Bausteine



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

(Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

Vorgelegt von

Dipl.-Chem. Goran Gerhard G. Rasched

aus Troisdorf

Bonn, 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität zu Bonn.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Michael Famulok
2. Priv.-Doz. Dr. Thomas Kolter
3. Prof. Dr. Jörn Piel
4. Prof. Dr. Alexander Heckel

Tag der Promotion: 16. November 2007

Yoda: *Try not. Do. Or do not. There is no try.*

Luke: *I can 't. It 's too big.*

Yoda: *Size matters not. Look at me. Judge me by my size, do you? Mmmm?
And well you should not.....*

from Star Wars V, The Empire Strikes Back

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15071.

T. L. Schmidt, C. K. Nandi, G. Rasched, P. P. Parui, B. Brutschy, M. Famulok, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4460.

T. L. Schmidt, C. K. Nandi, G. Rasched, P. P. Parui, B. Brutschy, M. Famulok, A. Heckel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 4382.

G. Rasched, D. Ackermann, T. L. Schmidt, P. Broekmann, A. Heckel, M. Famulok, DNA minicircles with gaps for versatile functionalization, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008** (akzeptiert).

G. Rasched, D. Ackermann, T. L. Schmidt, P. Broekmann, A. Heckel, M. Famulok, DNA Ringe mit Einzelstrangdomänen zur vielseitigen Funktionalisierung, *Angew. Chem.* **2008** (akzeptiert).

1	Einleitung	1
1.1	Nucleinsäuren: Funktion, Struktur und struktur-korrelierte Funktion	1
1.2	DNA-Nanotechnologie und DNA-Architekturen	6
1.3	Modifizierte Nucleotide und Nucleinsäuren mit erweiterter Funktionalität in der Bio- und Nanotechnologie	13
1.3.1	Basen-modifizierte Nucleotide und Nucleinsäuren	26
1.3.1.1	Hoch funktionalisierte DNA (fDNA)	31
1.3.1.2	Basenstapelung und Interkalator modifizierte Nucleoside	36
1.3.1.3	Abasic Site (Abasische Stellen) enthaltende Nucleinsäuren.....	39
2	Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	44
3	Ergebnisse und Diskussion	49
3.1	Synthese des C-5-modifizierten Desoxyuridin-3'-O-phosphoramidits (17)...	49
3.1.1	Syntheseplanung.....	49
3.1.1.1	C5-modifizierte Pyrimidin-Nucleoside	49
3.1.1.2	Interkalator und Linker Verknüpfung	54
3.1.1.3	Überführung von Nucleosiden in die 3'-O-Phosphoramidite	59
3.2	Darstellung modifizierter Oligonucleotide durch DNA Festphasen Synthese ^[44, 136, 137]	60
3.2.1	Sequenz-Design der funktionalisierten DNA Oligonucleotide	64
3.2.2	Reinigung und Charakterisierung der modifizierten Oligonucleotide.....	66
3.2.2.1	Massenspektrometrische Untersuchung	72
3.3	Molekularbiologische Experimente zur Herstellung von funktionalisierbaren DNA Miniplasmiden	76
3.3.1	Design von DNA Miniplasmiden	76
3.3.2	Probenvorbereitung und Ligation der DNA Miniplasmid-Segmente.....	80
3.3.3	Isolierung der DNA Miniplasmide durch native zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (native 2D PAGE).....	84
3.3.4	Reinigung der DNA Miniplasmide durch Nuclease Verdau	90
3.3.5	Größen Bestimmung der DNA Miniplasmide durch Fluoreszenz Korrelationspektroskopie (FCS).....	94
3.4	Rasterkraftmikroskopie der DNA Miniplasmide	95
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	117

5	Material und Methoden.....	121
5.1.....	Chemische Synthese.....	121
5.1.1.....	ϵ -Aminocaprönsäuremethylester Hydrochlorid (11) ^[185]	122
5.1.2.....	Anthracen-9-carbamido- ϵ -amino-caprönsäuremethylester (13).....	123
5.1.3.....	Anthracen-9-carbamido- ϵ -amino-caprönsäure (14).....	124
5.1.4.....	<i>N</i> -Propargyltrifluoracetamid (4) ^[112]	125
5.1.5.....	5-[3-(Trifluoracetyl-amino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin (5) ^[110]	126
5.1.6.....	5'-O -(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-[3-(Trifluoracetyl-amino)-prop-1-ynyl]-2'- desoxyuridin (7).....	127
5.1.7.....	5'-O -(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-[3-Aminoprop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin (8).....	128
5.1.8.....	5'-O -(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-[3-((Anthracen-9-carbamido)- ϵ -amino- capröyl-amino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin (15) ^[132]	129
5.1.9.....	5'-O -(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-[3-((Anthracen-9-carbamido)- ϵ -amino- capröyl-amino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin-3'-O-(2-Cyanoethyl- <i>N,N</i> - diisopropyl)-phosphoramidit (17).....	130
5.2.....	DNA Festphasen Synthese.....	132
5.2.1.....	Reagenzien.....	132
5.2.2.....	Geräte.....	132
5.2.3.....	Kopplungsbedingungen.....	132
5.2.4.....	Entschützung und Abspaltung von der Festphase.....	133
5.2.5.....	Säulenchromatographische Reinigung der 5'-O-DMT geschützten Oligonucleotid Sequenzen.....	133
5.2.6.....	Detritylierung und erneute säulenchromatographische Reinigung der Zielsequenzen.....	134
5.3.....	Charakterisierung der Oligonucleotide.....	135
5.3.1.....	Thermische Denaturierungsstudien modifizierter und unmodifizierter doppelsträngiger DNA.....	135
5.3.2.....	Massenspektrometrische Untersuchung funktionalisierter Oligonucleotide.....	136
5.4.....	Molekularbiologische Experimente.....	137
5.4.1.....	Oligonucleotide.....	137
5.4.2.....	Chemikalien.....	138
5.4.3.....	Enzyme.....	139
5.4.4.....	Nucleotide und Radiochemikalien.....	139
5.4.5.....	5'-OH Phosphorylierung von DNA.....	139
5.4.6.....	5'-OH Markierung von DNA mit dem Radioisotop [³² P].....	139
5.4.7.....	Ethanol-Fällung von DNA.....	140
5.4.8.....	Oligonucleotid Ligation.....	140
5.4.9.....	Exonuclease Verdau mit Nuclease <i>Bal-31</i>	141

5.4.10... Ein-Topf-Reaktion zur schnellen Herstellung komplett geschlossener DNA-Miniplasmide	141
5.4.11... Elektrophoretische Methoden	142
5.4.11.1 Native zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (native 2D PAGE)	142
5.4.11.2 Agarose Gelelektrophorese.....	143
5.4.11.3 DNA Isolierung aus Polyacrylamid Gelen	144
5.5..... Rasterkraftmikroskopie der DNA Miniplasmide ^[146-148, 150, 174-184]	144
5.5.1..... Rasterkraftmikroskopie im magnetischen AC-Modus an trockenen Proben	145
5.5.1.1.. Probenvorbereitung.....	145
5.5.2..... Rasterkraftmikroskopie im magnetischen AC-Modus in wässriger Lösung	146
5.5.2.1.. Probenvorbereitung.....	146
6 Literaturverzeichnis	148
7 Anhang	154
7.1..... Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	154
7.2..... Abbildungsverzeichnis	157
7.3..... Spektren	166
7.3.1..... Anthracen-9-carbamido- ϵ -amino-capronsäure.....	166
7.3.2..... <i>N</i> -Propargyltrifluoracetamid	167
7.3.3..... 5-[3-(Trifluoracetylamino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin.....	168
7.3.4..... 5'-O -(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-[3-(Trifluoracetylamino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin	169
7.3.5..... 5'-O -(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-[3-((Anthracen-9-carbamido)- ϵ -aminocaproylamino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin	170
7.3.6..... 5'-O -(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-[3-((Anthracen-9-carbamido)- ϵ -aminocaproylamino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin-3'-O-(2-Cyanoethyl- <i>N,N</i> -diisopropyl)-phosphoramidit.....	171
7.3.7..... Oligonucleotidsequenz GRU1 (LC-ESI-MS)	174
7.3.8..... Oligonucleotidsequenz GRN1 (LC-ESI-MS)	175
7.3.9..... Oligonucleotidsequenz GRN1 (ESI-ICR-MS)	176
7.3.10... Oligonucleotidsequenz GRN2 (ESI-ICR-MS)	176
7.3.11... Oligonucleotidsequenz GRN3 (ESI-ICR-MS)	177
7.3.12... Oligonucleotidsequenz GRN4 (ESI-ICR-MS)	177
7.3.13... Oligonucleotidsequenz GRN5 (ESI-ICR-MS)	178
7.4..... Danksagung.....	179

8	Lebenslauf	180
---	-------------------------	-----

1 Einleitung

1.1 Nucleinsäuren: Funktion, Struktur und struktur-korrelierte Funktion

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) repräsentiert den gesamten genetischen Datenbestand der Natur und enthält somit alle notwendigen Informationen für die zellulären Prozesse eines Organismus.^[1] Im Organismus erscheint die DNA als langes fadenförmiges, manchmal zirkuläres Makromolekül, das sich aus zahlreichen Desoxyribonucleotiden zusammensetzt, die jeweils aus einer Nucleobase, einem Zucker und einer Phosphatgruppe bestehen (Abbildung 1). Während die Sequenz der unterschiedlichen Basen der DNA die genetische Information trägt, erfüllen der Zucker und das Phosphatrückgrat strukturelle Aufgaben.

Die molekulare Erkennung zwischen den Nucleinsäuren über die Komplementarität der Nucleobasen ist ein eleganter und wichtiger Wechselwirkungsprozess, der den Erhalt, den Transfer und die Expression der genetischen Information gewährleistet.^[2, 3] Der hoch spezifische Erkennungsprozess der natürlichen Basenpaarung hat in der Vergangenheit steigendes Interesse hervorgerufen und ist immer noch Gegenstand intensiver Forschung und findet heute in der Diagnostik und in der Entwicklung von auf Nucleinsäure-basierenden Therapeutika wie Antisense und Antigen Oligonucleotiden Anwendung.

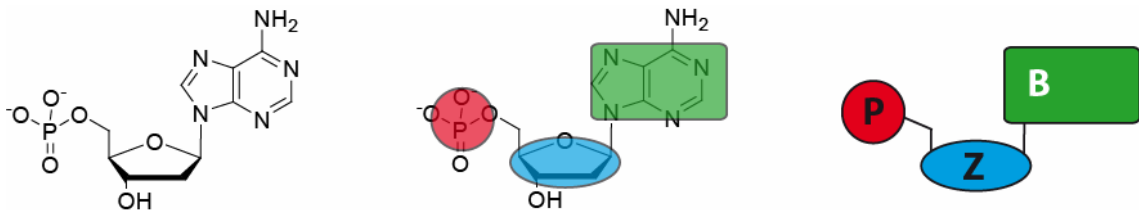


Abbildung 1: Schematische Darstellung der funktionellen Komponenten eines Desoxyribonucleotids (hier dA), der Monomere der DNA. Rot (P) der Phosphat-Rest und blau (Z) der Zucker; beide als strukturegebende Komponenten. Die Nucleobase (grün, B) kann variieren und enthält durch ihre Sequenzabfolge im Polymer die genetisch Information.

Die einfache Eleganz und gleichzeitige Zuverlässigkeit und Vielseitigkeit der Basenpaarung in der Natur ist für den Chemiker sehr ansprechend und herausfordernd, da sie es ihm ermöglicht, den molekularen Erkennungsprozess durch den Einsatz von nicht-natürlichen oder modifizierten Nucleobasen zu manipulieren und auf völlig neue Anwendungen Maß zu schneiden.^[3-6] So gelingt es heute, DNA Oligonucleotide als Bausteine für die Ausbildung von Nanostrukturen wie beispielsweise Würfel oder zwei- und dreidimensionale Netzwerke zu verwenden.^[7-10] Sogar mechanische Bauelemente und auf DNA basierende Messwerkzeuge

ge, wie das DNA-Thermometer^[11] wurden bereits realisiert.^[12] Der Ersatz der natürlichen Nucleobasen durch analoge heterocyclische Systeme oder gar durch völlig andere molekulare Strukturen trägt zum Verständnis des Beitrags der Nucleobasenpaarung im Hinblick auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, sowie dem Beitrag der Basenstapelung und den strukturellen Anforderungen der Molekularen Erkennung bei (siehe Kapitel 1.3.1).^[3]

James Watson und *Francis Crick* gründeten 1953 mit ihrem Strukturvorschlag für die DNA die Basis für die intensive Forschung und die strukturelle Aufklärung der DNA, ihrer Replikation und der dafür nötigen Molekularen Erkennung.^[13, 14] Ihre Beschreibung von der DNA, als zwei umeinander gewundene Nucleinsäure-Moleküle, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen stabilisiert werden und zusammen eine rechtsgängige Helix ausbilden, wurde seit dem in Experimenten verifiziert, bestätigt und erweitert (Abbildung 2). Im Zuge der strukturellen Aufklärung wurden viele weitere molekulare Mechanismen zellulärer Prozesse erschlossen. Aus strukturellbiologischer Sicht war die DNA-Doppelhelix das erste Strukturmodell einer der wichtigsten makromolekularen zellulären Komponenten.^[15]

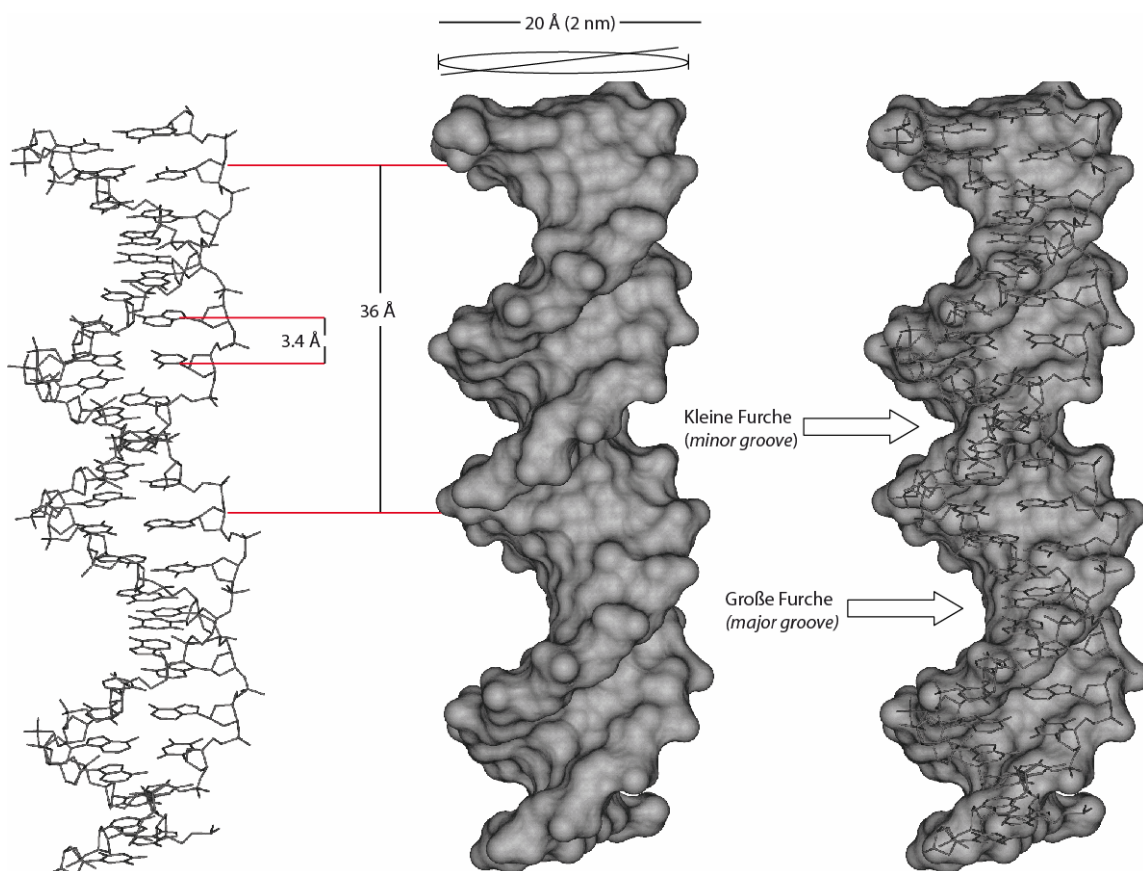


Abbildung 2: Drahtmodell (links), plastisches Modell (mitte) und kombiniertes Modell (rechts) einer regulären B-DNA unter Angaben einiger grundlegender Eigenschaften.

Bereits wenige Jahre nach *Watson* und *Crick's* nunmehr klassischem Strukturmodell der DNA-Doppelhelix wurde von *Hoogsteen*^[16-18] eine alternative Interaktionsmöglichkeit komplementärer Basenpaarung entdeckt (Abbildung 3, rechts und Abbildung 4, rechts). Diese alternative Art der Basenpaarung wird allerdings in relativ unüblichen DNA-Strukturen gefunden. Mit zunehmendem Interesse von Chemikern und Biochemikern für das DNA Molekül wurde schließlich eine steigende Zahl solcher, in der Natur relativ unüblicher, nicht-kanonischer Strukturen gefunden. Bei den Strukturuntersuchungen solcher DNA sind die am einfachsten interpretierbaren Ergebnisse diejenigen, die auf einfachen synthetischen Polymer-Strängen beruhen, welche über ihre gesamte Sequenzlänge nur eine Nucleobase wiederholen, z.B Poly dA und Poly dU. Denn ausgerechnet solche einfachen Polymere zeigen bemerkenswertes Verhalten, wenn man beispielsweise komplementäre Stränge von Poly dA und Poly dU zueinander titriert. Das resultierende stöchiometrische Verhältnis bei solchen Experimenten kann zum einen, wie im kanonischen Fall erwartet, 1:1 ausfallen oder aber 1:2. Ein weiteres interessantes Beispiel bildet die Selbst-Assoziation von Polyguaninen (Poly dG) zu viersträngigen Strukturen (Tetraplex oder Quadruplex).

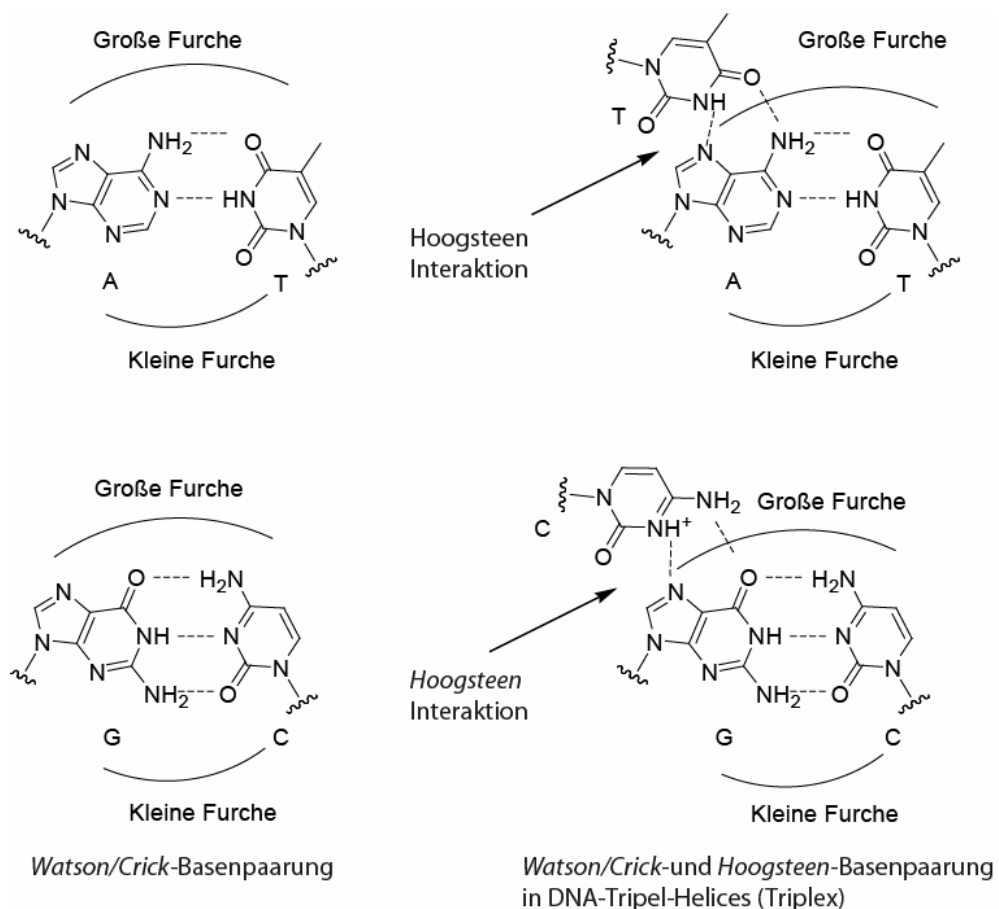


Abbildung 3: Darstellung der kanonischen Nucleobasenpaarung in der DNA-Doppelhelix nach *Watson* und *Crick* (links) und der zusätzlichen Basenpaarung nach *Hoogsteen* im Falle der Tripel-Helix (rechts).

Obwohl die Stöchiometrie dieser beschriebenen Beispiele von der der klassischen Doppelhelix abweicht – statt zwei assoziieren in einem Fall drei individuelle Stränge miteinander im andern vier – wurde jedes Mal das Modell der *Watson/Crick* Doppelhelix erfolgreich als Ansatz zur Interpretation der Ergebnisse herangezogen. Dies führte im Falle der ungewöhnlichen Stöchiometrie zwischen Poly dA und Poly dU DNA-Strängen zu der Annahme der Ausbildung einer dreisträngigen Helix, der sogenannten Triplex-Helix oder Triplex-Formation. Resultate, die zunächst durch Modellbaustudien erhalten und schließlich durch kristallographische Untersuchungen untermauert wurden, zeigten, dass die Nucleobasen in der Triplex-Helix über zwei unterschiedliche Wasserstoffbrücken-Bindungsmuster interagieren; Bindungsmuster, die heute als die kanonische *Watson/Crick*-Basenpaarung und im anderen Fall als die *Hoogsteen*-Basenpaarung bezeichnet werden (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4, rechts). Diese bereits früh entdeckten ungewöhnlichen Strukturen der DNA gaben bereits einen kleinen Hinweis auf die Vielfältigkeit der möglichen Strukturen der DNA, begründet durch ihre konformationelle Flexibilität. Ein Molekül als Ursprung für viele unterschiedliche Helices; doch in den meisten Fällen bildet der ursprüngliche Strukturvorschlag von *Watson* und *Crick* das Grundgerüst bzw. die Basis für die neue abweichende Form.

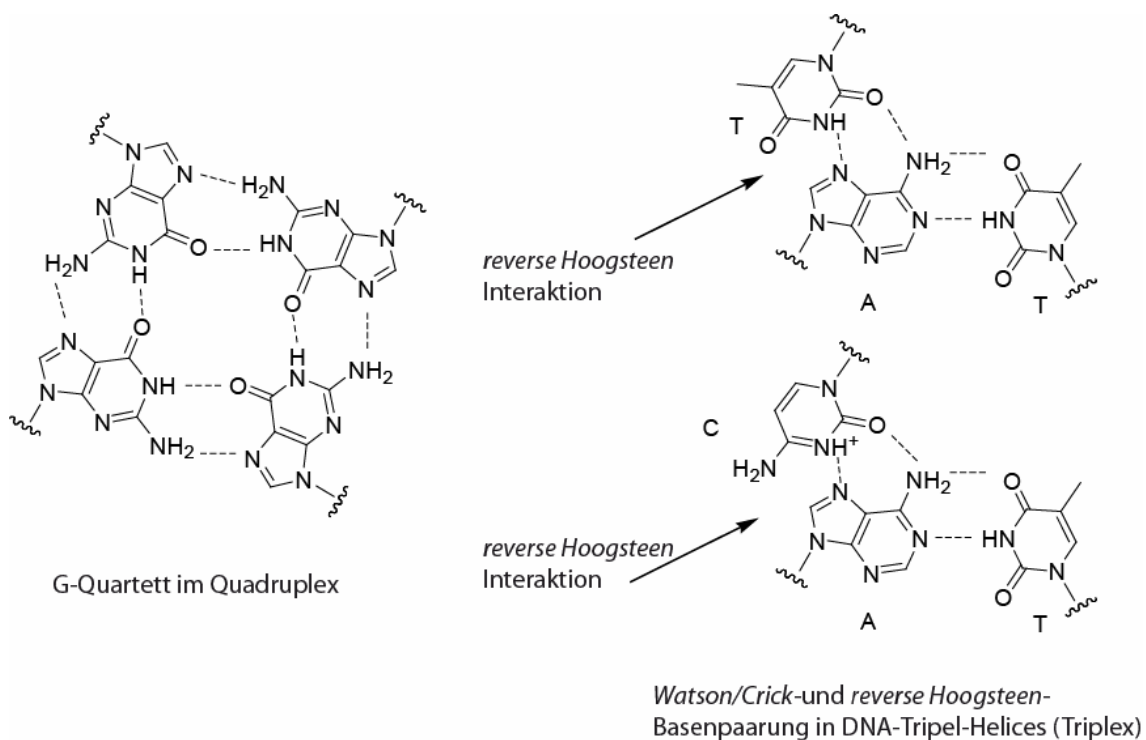


Abbildung 4: Basenpaarungsmuster in einem G-Quartett (Quadruplex oder Guanosintetrade, links) und reverse Hoogsteen Paarung eines DNA-Tripel (rechts).

Eine Liste der häufigsten Nucleinsäure-Doppelhelixstrukturen mit einigen ihrer Parameter ist in Tabelle 1 aufgeführt und in Abbildung 5 schematisch dargestellt. In vielen Fällen resultieren die verschiedenen DNA-Formen aus nur rela-

tiv kleinen Änderungen der Helixstruktur, wenn man beispielsweise die DNA der A und B Konformation vergleicht. Es gibt aber auch Beispiele, die drastische Abweichungen von der klassischen *Watson/Crick* Struktur zeigen; prominente Beispiele sind die Z-DNA und DNA mit parallelem Verlauf beider Stränge. Der radikale Unterschied bei der Z-DNA Struktur ist die Umkehrung des Drehsinns der Helixachse, so dass eine linksgängige statt einer rechtsgängigen Helix resultiert. Bei ihrer anfänglichen Entdeckung wurden die oben beschriebenen, scheinbar nicht-konformen Strukturen als biophysikalische Merkwürdigkeiten ohne oder mit nur geringer biologischer Relevanz angesehen. Mittlerweile sind aber all diese Strukturen in Zellen nachgewiesen worden und ihre biologische Notwendigkeit bestätigt.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Parameter der drei gängigsten Nucleinsäure Helixstrukturen.

Parameter	A-Form	B-Form	Z-Form
Helikale Orientierung	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
Basen pro Windung	ca. 11.5	ca. 10.5	12
Ganghöhe	28 Å	34 Å	45 Å
Steigung pro Base	2.6 Å	3.4 Å	3.8 Å
Durchmesser	26 Å	20 Å	18 Å
Neigung der Base zur Helixachse (Inklination)	19 ° C	-1.2 ° C	-9 ° C
Ribosekonformation	C3'- <i>endo</i> (N-Typ)	C2'- <i>endo</i> (S-Typ)	Purine: Base <i>anti</i> , C3'- <i>endo</i> (N-Typ) Pyrimidine: Base <i>syn</i> , C2'- <i>endo</i> (S-Typ)

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist es interessant festzustellen, in welche Zeit die Entdeckungen von *Watson* und *Crick* und ihrer Nachfolger fiel und welche weiteren recht neuen wissenschaftlichen Zweige bis heute Auswirkungen auf ihre Ergebnisse haben. Es sind die Hand in Hand gehenden Errungenschaften in den Informations- und Computerwissenschaften, die in derselben Zeit bis heute in exponentieller Weise vorangetrieben wurden und als willkommene Werkzeuge nicht nur in den Biowissenschaften ihre Anwendung finden.^[15] Ohne die Entwicklung effizienter Algorithmen und leistungsstarker Hardware wären viele Methoden und analytische Verfahren in den Biowissenschaften gar nicht mehr realisierbar. Das Interesse von Mathematikern, Physikern und Ingenieuren, Informationen in unterschiedliche Arten von Signalen umzuwandeln und wieder auszulesen, die Suche nach Möglichkeiten der Speiche-

rung und Übertragung von immer größeren Mengen an Information und Daten, findet ihr biologisches Gegenstück und vielleicht ihre Ergänzung und Zukunft nun in den Biowissenschaften. Mit dem dramatischen Anstieg der Datenflut gilt es, die Informationen, schnell, sicher und auch effizient zu prozessieren, zu speichern und zu verwalten. Hier sind die Nanowissenschaften gefragt, die das Konzept des Aufbaus kleinster Strukturen aus grösseren Bauelementen (*top down*-Prinzip) ablösen müssen, indem sie kleinste Strukturen aus noch kleineren molekularen Bausteinen zusammensetzen (*bottom up*-Prinzip). DNA erscheint hier als einfach zu replizierendes und amplifizierendes Molekül mit strukturgebender, aber auch kodierender Funktion, ein geeignetes Material zu sein.

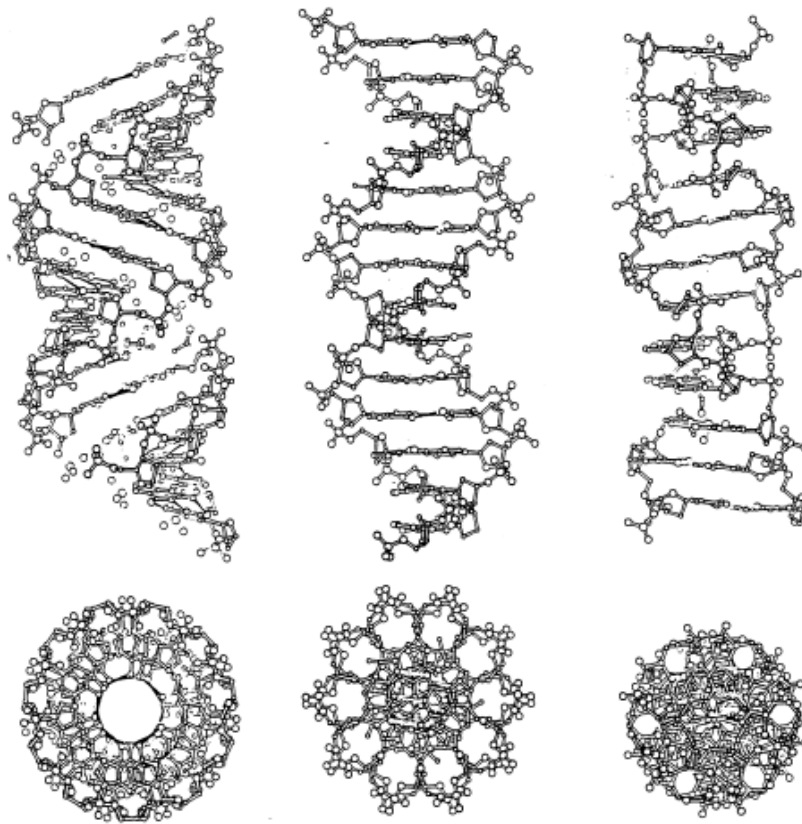


Abbildung 5: Struktur der A-DNA (links), B-DNA (mitte) und Z-DNA (rechts) mit der Blickrichtung jeweils senkrecht zur Helix-Achse (oben) und parallel entlang der Helix-Achse (unten) im Vergleich.

1.2 DNA-Nanotechnologie und DNA-Architekturen

Die Phänomäne der Biochemie an sich, wie sie der Wissenschaftler beobachtet, sind Phänomäne aus dem Nanometerbereich. Die meisten makromolekularen Komponenten der Zelle, wie die Proteine und Nucleinsäuren (DNA und RNA), sowie Nucleosomen und Ribosomen haben Dimensionen in den Größenordnun-

gen einiger Nanometer und größere Gebilde wie Mikrotubuli oder Mikrofilamente sind aus kleineren Komponenten dieser Größenordnung zusammengesetzt. Aus dem Blickwinkel eines Materialwissenschaftlers stellt die DNA ein nanometergroßes Gerüst mit einer ausgeklügelten feinen Sub-Struktur dar, die eine hohe Stabilität über ein weites Spektrum an Umgebungsbedingungen aufweist und in der Lage ist, mit anderen - nicht gezwungenermaßen Biomolekülen - zu interagieren.^[19]

Die reguläre DNA-Doppelhelix (auch Duplex genannt) hat einen Durchmesser von ca. 20 Å (2 nm) und der Basenpaar Abstand entlang der Helix-Achse beträgt 3.4 Å. Eine komplette Helix-Windung ist nach ca. 10.5 Basenpaaren (bp) erreicht, was einer Steigung von ca. 3.6 nm pro Windung entspricht (Abbildung 2).^[20]

Die strukturelle Linearität und „Steffheit“ der DNA, ihre Fähigkeit, auf Grund der Komplementarität der Basenpaarung, vorhersagbare Strukturen auszubilden und die Erfolgsgeschichte der DNA-Festphasensynthese machen die DNA zu einem der attraktivsten Grundbausteine für den Aufbau von Nanoarchitekturen. Wie einleitend erklärt wurde, gibt es zwei prinzipielle Strategien zum Aufbau von Nanoarchitekturen in der Nanotechnologie: Den *top down*- und den *bottom up*-Ansatz. Das Ziel, kleinste Nanoarchitekturen durch die mikroskopische Manipulation größerer Bausteine nach dem *top down*-Prinzip herzustellen, kann jedoch nicht bis zu beliebig kleinen Größen betrieben werden. Die Konstruktion von Nanostrukturen aus kleineren Komponenten durch Selbstorganisation aufgrund von molekularer Erkennung nach dem *bottom up* Ansatz findet ihre Begrenzung aber lediglich in den molekularen Grundbausteinen selbst. Die ersten Ansätze, DNA als Schlüsselkomponente für solche Konstruktionen zu benutzen, reichen bis zum Beginn der 70er Jahre zurück, als Wissenschaftler DNA Doppelstränge mit sogenannten *sticky-ends* (klebrige Enden) aneinanderhefteten und so in einfacher Weise kontrolliert größere molekulare Strukturen auf der Basis kleinerer Komponenten ohne kovalente Bindungsknüpfung erzeugten.^[21] Bei *sticky ends* handelt es sich um kurze (ca. 3-8 Basen), einzelsträngige Überhänge, die an den Enden der DNA-Doppelhelix herausragen und wie bei einem Klett-Verschluss mit einem anderen Überhang, der eine komplementäre Sequenz besitzt, hybridisieren. Bei Bedarf können diese hybridisierten Konstrukte in einer enzymatischen Reaktion auch ligiert werden, das heißt durch Ausbildung einer Phosphordiesterbindung zu jeweils einem kontinuierlichen Strang und Gegenstrang kovalent verbunden werden; eine Art permanentes Verkleben des als Beispiel herangezogenen Klett-Verschlusses. Seit dem haben viele Laboratorien das Prinzip der Hybridisierung durch Basenpaarung und die Verwendung von *sticky ends* erfolgreich genutzt, um vielfältige Strukturen, allein basierend auf DNA, aufzubauen. So zum Beispiel *Seemans* DNA-Würfel und ein beschnit-

tener bzw. abgestumpfter Oktaeder^[7, 20] oder *Turberfields* DNA-Tetraeder^[22] sowie *Rothemunds* zweidimensionale Muster und Formen^[10] wie das „Smiley“ (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7).



Abbildung 6: Zweidimensionales Nanokonstrukt („Smiley“), aufgebaut aus doppelsträngiger DNA. Links: rudimentäres Konzept der Doppelstrang-Verteilung und Faltungsmuster. Mitte: darstellung der benötigten Überkreuzungsmuster der dsDNA mit Farbkodierung zur Indizierung komplementärer Sequenzen. Rechts: rasterkraftmikroskopische Aufnahme der erhaltenen DNA-Nanostruktur.^[10]

Diese Konstrukte, sowie alle DNA-Architekturen, die auf schlichter Basenpaarung basieren, benötigen allerdings zum Aufbau, zusätzlich zu den *sticky ends*, eine Verzweigungs-Möglichkeit. So bestechend die Eigenschaften der DNA zum Aufbau von Nanostrukturen auch sein mögen, ein großer Nachteil ist die inhärente Linearität dieser Makromoleküle.^[21] Die Achsen der DNA Doppelhelix sind unverzweigte Linien, die lediglich gekrümmt werden können. Die Verknüpfung solcher linearer Moleküle durch *sticky ends* führt ausschließlich zu längeren Linien oder je nach Anordnung auch zu cyclischen Objekten, wobei die Ausbreitung trotzdem auf eine Dimension beschränkt bleibt. Tatsächlich handelt es sich bei den, die genetische Information tragenden, dicht gepackten Chromosomen in Zellen um nichts anderes als solche eindimensionale lineare Anordnungen von Nucleotiden.

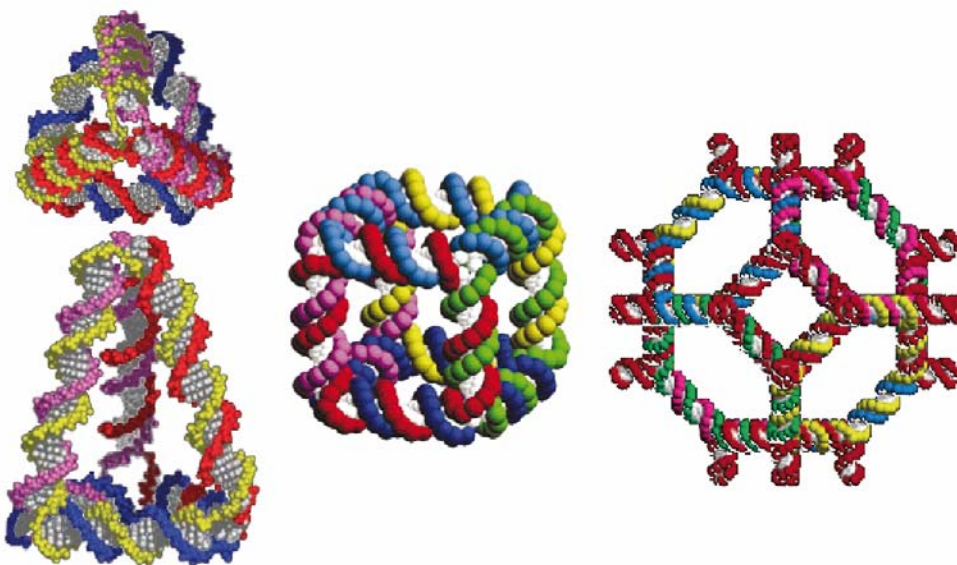


Abbildung 7: Beispiele für aus dsDNA aufgebaute dreidimensionale Nanoobjekte. *Turberfields* DNA-Tetraeder^[22] (links), *Seemans* DNA-Würfel (mitte) und ein beschnittener bzw. abgestumpfter Oktaeder^[7, 20] (rechts).

Um aber Konstruktionen in alle Raumrichtungen wachsen zu lassen, müssen Verzweigungsstellen in die DNA eingebracht werden. Die oben beschriebenen DNA Architekturen bedienen sich dabei einem Verzweigungsprinzip, das auch in der Natur in lebenden Zellen als Intermediat bei der Meiose auftritt. Bei der Zellteilung, die zur Ausbildung der Gameten führt (Reduktionsteilung), lagern sich kurz vor der Zellteilung zwei homologe Chromosomenpaare aneinander und werden durch Endonucleasen geschnitten. Die homologen DNA-Einzelstränge der Chromosomen (insgesamt vier: zwei zueinander komplementäre aus jedem Doppelstrang) können sich jetzt überkreuzen und bilden dabei die vierarmigen *Holliday-Junctions* (Holliday-Verzweigungen nach *Holliday*) aus vier separaten einzelsträngigen DNA-Fragmenten. Jeder Arm entspricht einer doppelsträngigen Region, die die Verzweigung in der Mitte flankiert (Abbildung 8).

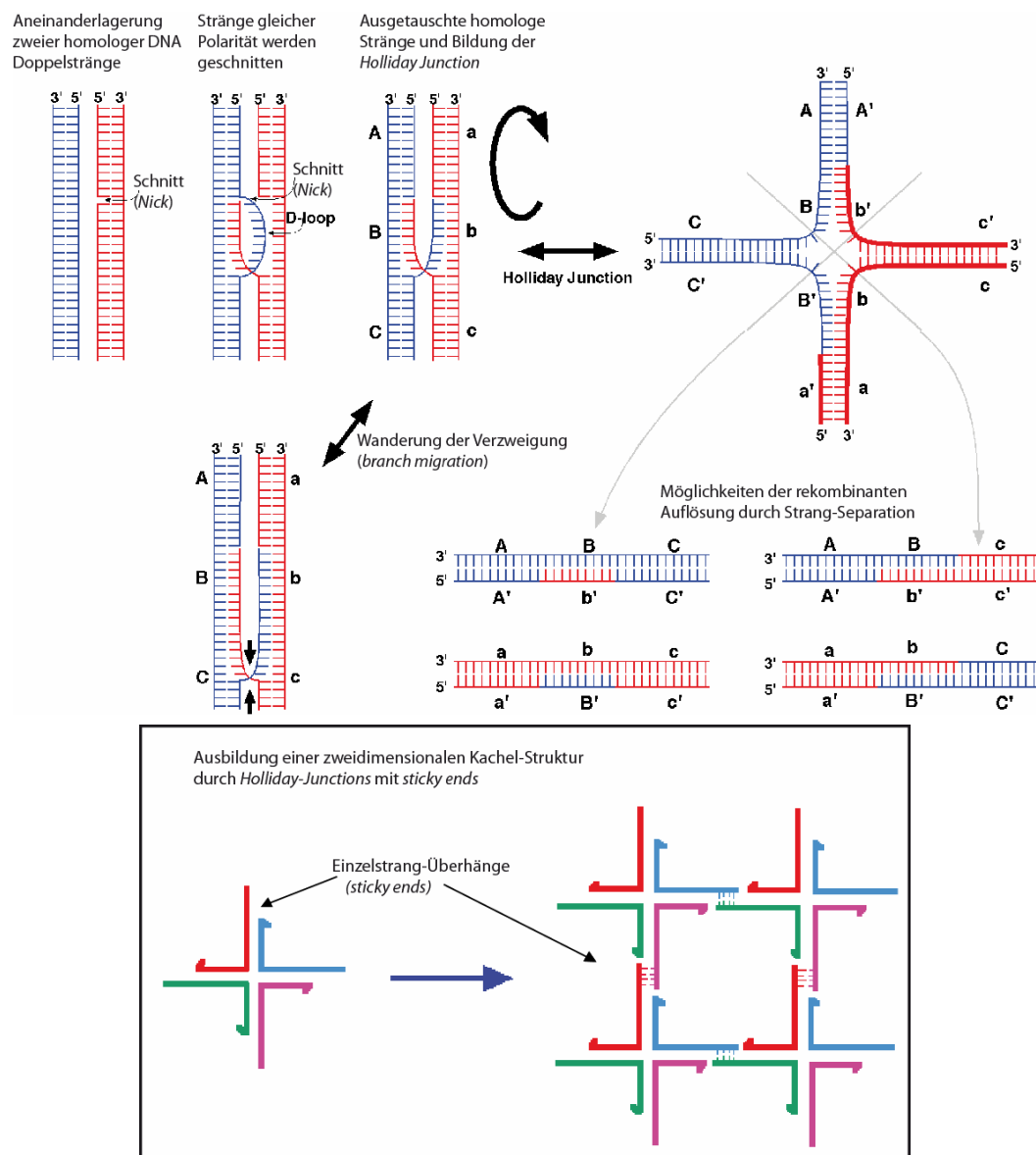


Abbildung 8: Ausbildung von *Holliday-Junctions* während der homologen Rekombination (oben) und Erzeugung von Kachel-Strukturen durch *Holliday-Junctions* mit *sticky ends* (unten, Kasten).

Aufgrund der homologen Sequenzen kann dieser Verzweigungspunkt wandern (*branch migration*). Diesem Vorbild entlehnt wurden *Holliday-Junctions* konstruiert, die nur über bestimmte Regionen homologe Sequenzen besitzen und so feste, nicht-wandernde Verzweigungen bilden. Diese künstlichen Konstrukte können drei bis acht doppelsträngige Seitenarme mit *sticky ends* aufweisen und zur Herstellung von ausgeklügelten zweidimensionalen Kachel-Strukturen herangezogen werden. Aus diesen Kachel-Strukturen können wiederum dreidimensionale Objekte wie die oben beschriebenen zusammengesetzt werden.

Nun handelt es sich bei Polyedern und Gitter-Mustern um statische Objekte, doch wird die Kontrolle über Strukturen erst dann wirklich ausgeschöpft, wenn man in der Lage ist, diese Formen und Strukturen auch gezielt zu verändern. Dies bildet den Vorstoß in das Gebiet der nanomechanischen Geräte und Maschinen, für die es auch bereits literaturbekannte Beispiele gibt (Abbildung 10 und Abbildung 11).^[12, 23, 24] Eine der ersten mechanischen Konstruktionen basiert auf dem Übergang von regulärer rechtsgängiger B-DNA in linksgängige Z-DNA (Abbildung 10).^[25] Dabei sind zwei vergleichsweise rigide DNA-Konstrukte (bestehend aus je zwei ineinander verschränkten Doppelhelices; DX-DNA = *Double Crossover*-DNA^[7, 20, 21, 26], Abbildung 9, C) über eine Art flexibles dsDNA-Scharnier miteinander verbunden.

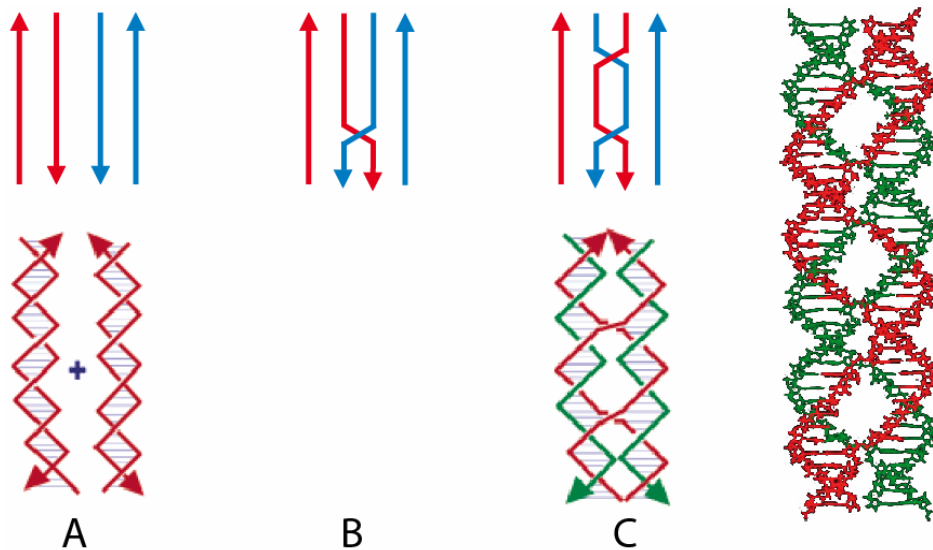


Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer rigiden DX (*Double Crossover*, C) DNA-Struktur, abgeleitet aus dem Prinzip der *Holliday Junctions* mit nur einer Überkreuzung (B, vgl. auch Abbildung 8).^[20, 26] Das DX enthält zwei statt eine sich überschneidende Verzweigungsstellen (*crossover*, C) die zwei zueinander co-planare DNA-Duplexe verbindet. Die Verknüpfung findet durch den Strangaustausch an den *crossover*-Punkten statt. Ein Strang einer jeden Helix tauscht zweimal aus und führt seine Basenpaarung am komplementären Strang des homologen Nachbarn weiter. Die obere Reihe zeigt das vereinfachte Überkreuzungsschema ohne Berücksichtigung der Helixwindungen. Die untere Reihe berücksichtigt die Windung. Ganz rechts ein gezeichnetes Molekülmodell einer rigiden DX-DNA.

Dieses Scharnier besteht aus einem kurzen (20 bp) Lauf von dsDNA mit einer Sequenz, geeignet zur Ausbildung von Z-DNA (Sequenz $(CG)_n$). Durch Zugabe eines Kobalthexamin-Komplexes kann der Zustand dieses Scharniers von B- in Z-DNA gewandelt werden und man erhält einen nanomechanischen Schalter. *Yurke et al.* entwickelten eine Art Pinzette aus dsDNA deren Zustände „offen“ und „geschlossen“ durch Zugabe von komplementärer ssDNA ausgelöst werden. Es wird somit Hybridisierung als treibende Kraft bzw. Motor und Oligonucleotide sozusagen als „Treibstoff“ verwendet.^[12, 27, 28]

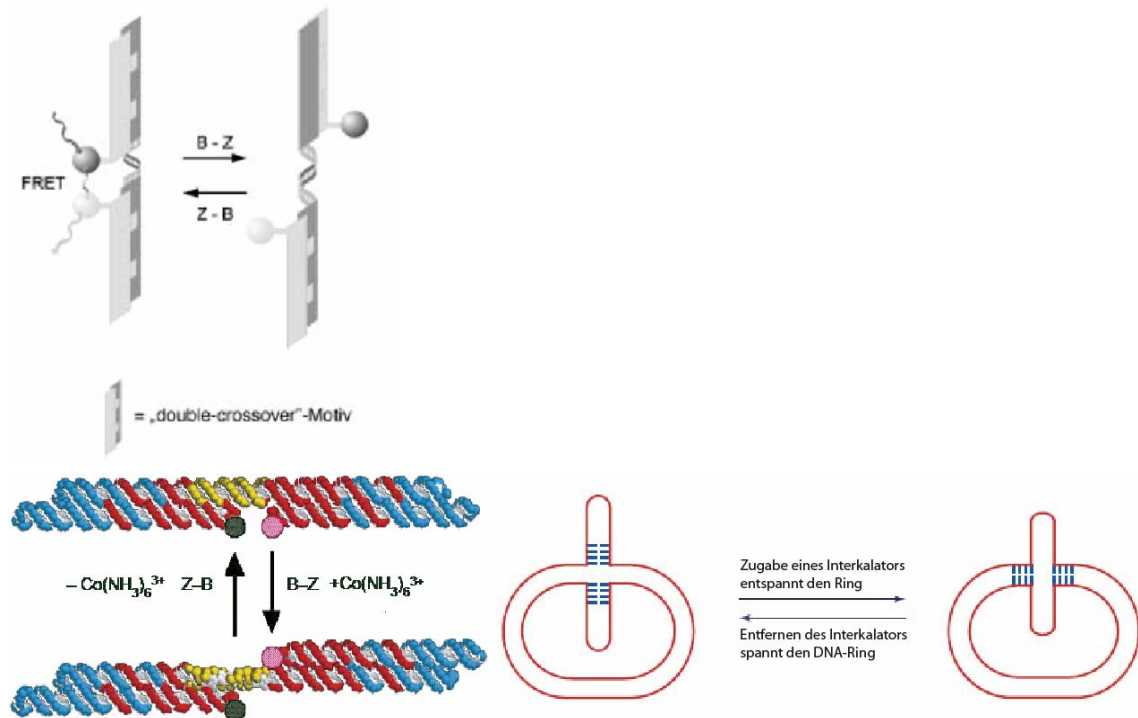


Abbildung 10: Durch den Konformationswechsel des B-DNA-Doppelhelix-„Scharniers“ (gelb) zwischen zwei rigiden DX-DNA Teilen führen diese eine Rotationsbewegung aus (oben und unten, links).^[12] Das nanomechanische Schalten wird durch Zugabe oder Entfernen von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ gesteuert und über ein FRET-Signal detektiert. Das Weiten und Verengen eines DNA-Rings durch Zugabe respektive Entfernen eines Interkalators ist rechts unten dargestellt.^[12]

Eine weitere Methode einer Molekül-induzierten mechanischen Veränderung eines DNA-Konstrukts ist das Weiten und Verengen eines kleinen DNA Rings mit einer Verzweigungseinheit (Abbildung 10, rechts unten), die sozusagen senkrecht zum Ring-Torus, nach zwei Seiten, separate Stränge von vier gepaarten Nucleotiden aufweist (ähnlich einer *Holliday-Junction*).^[12] Diese Seitenarme besitzen zueinander komplementäre Sequenzen. Durch *Supercoiling* ist diese Struktur zunächst gespannt, kann aber durch Zusatz eines Interkalators entspannt werden und den Ring weiten, wobei die komplementären Seitenarme durch Migration der Verzweigungen in den Ringtorus gezogen werden. Ein jüngeres Beispiel einer DNA-Maschine ist *Seemans* „DNA-Laufmaschine“, die aus zwei dsDNA „Beinen“ aufgebaut ist, verbunden über flexible Linker, und

durch den Wechsel von Hybridisierung und Aufschmelzen, durch Zugabe von Komplementär-Strängen, über einen „DNA-Bordstein“ bzw. „DNA-Schiene“, „läuft“ (Abbildung 11).^[12] Die Spezifität und parallele Natur der DNA Basenpaarung wurde aber auch schon dazu genutzt, mathematische Probleme zu lösen.^[29, 30] So haben *Leonard Adleman et al.* 1994 das mathematische Problem des *Traveling Salesman* mit DNA Molekülen gelöst.^[20, 31] Dieses Beispiel zeigt allerdings nur die prinzipielle Möglichkeit auf und besticht durch ihre Raffinesse, die sich der großen Anzahl an parallelen Interaktionen, die bei der Hybridisierung einer DNA Doppelhelix entstehen bedient und sie sich für die Lösung kombinatorischer Problemstellungen zu nutze macht. In der praktischen Anwendung sind elektronische Digitalrechner (Computer) immer noch effizienter und bequemer.

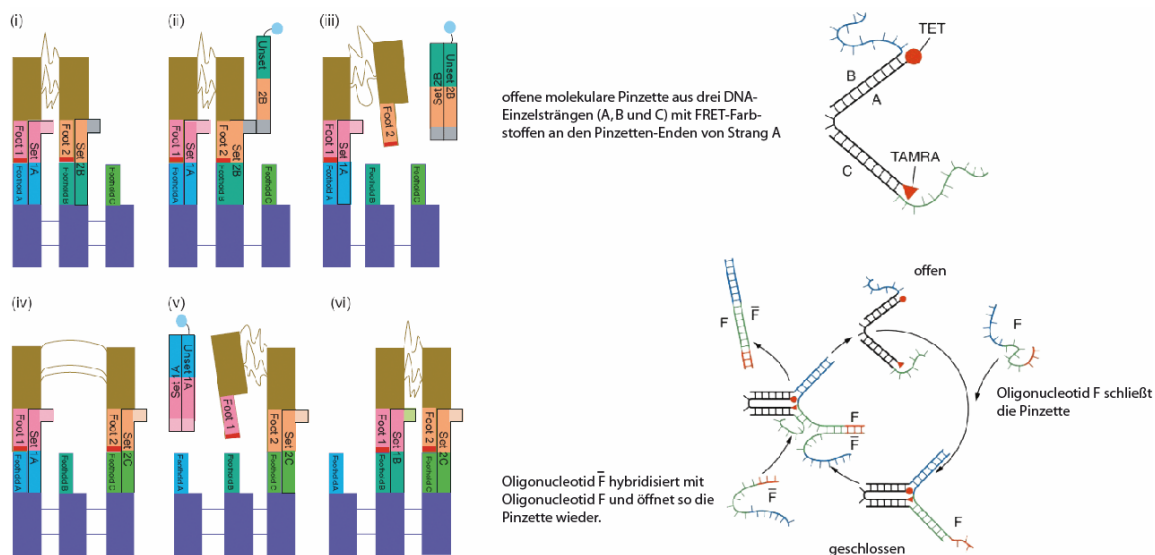


Abbildung 11: Linkes Schema: Eine DNA-Laufmaschine, bestehend aus zwei doppelhelikalen „Beinen“ (braun), die an einzelsträngigen „Füßen“ (Überhänge) enden und über flexible Linker miteinander verknüpft sind. Die Füße werden an die doppelsträngigen DNA-Bordsteine bzw. Schienen (blau), die an ihren Enden ebenfalls einzelsträngige Überhänge aufweisen über komplementäre einzelsträngige „Fuß-Bordstein-Anker“-Oligonucleotide gebunden (schwarz umrandete Oligonucleotide, links). Durch sequentielles Entfernen dieser Fuß-Bordstein-Anker und Zugabe neuer Anker wird die DNA-Laufmaschine über die Bordsteinetappen geführt. Rechtes Schema: Eine aus drei Oligonucleotiden gebildete molekulare Pinzette wird durch „Treibstoff“-Oligonucleotide geschlossen und geöffnet.^[12]

Das Bestreben, geordnete DNA Formen, Gitter und Maschinen zu bauen, ist vielfältig. So ist ein Ziel, definierte selbstorganisierte DNA-Gitter zu erstellen auf denen andere (Bio-)Makromoleküle abgelagert werden, die dann (röntgen-)kristallographisch untersucht werden können. Dies ist für viele Makromoleküle interessant, die ansonsten nicht oder nur schwer als geordnete Kristalle zugänglich sind. Der Aufbau und das Zusammenbringen elektronischer Komponenten, basierend auf Nanostrukturen, in zwei und dreidimensionalen Architekturen ist ein weiteres angestrebtes, wichtiges Ziel. Der oben beschriebene kontinuierliche

Anstieg der Datenflut erhöht die Nachfrage nach immer kleineren Speicherbausteinen und immer schnelleren Rechenchips auf immer kleinerem Raum. Lithographische Techniken nach dem *top-down* Prinzip haben hier die beachtliche Grenze von Strukturen bis minimal 50 nm erreicht und man erhofft sich durch *bottom up* Ansätze noch kleinere Strukturen.^[32] Es gestaltet sich jedoch noch schwierig, DNA durch Modifikation in ein elektrisch leitendes Material zu verwandeln, aber erste Schritte zur Ablagerung metallischer Nanopartikel oder halbleitender Nanokristalle auf DNA-Gerüsten bzw. Gitter, die sozusagen als Templat bzw. Matrize dienen, sind bereits erfolgreich.^[33-37] Die Überführung der DNA selbst in ein leitendes Material ohne Metallierungsprozess durch einfache Ablagerung ist ebenfalls Gegenstand intensiver Forschung. Bestrebungen, DNA-Doppelstränge zu konstruieren, die Metallionen in der Mitte der Helix übereinander gestapelt, entlang der Helixachse tragen, machen sich beispielsweise den Metall-chelatierenden Effekt modifizierter Nucleobasen zu nutze.^[38] Auf diese Weise konnte die Basenpaarung und somit die Ausbildung der Doppelhelix durch die Chelatierung von Cu^{2+} Ionen induziert werden und Interaktion der Cu^{2+} Ionen untereinander nachgewiesen werden.^[32, 39, 40] (Abbildung 12)

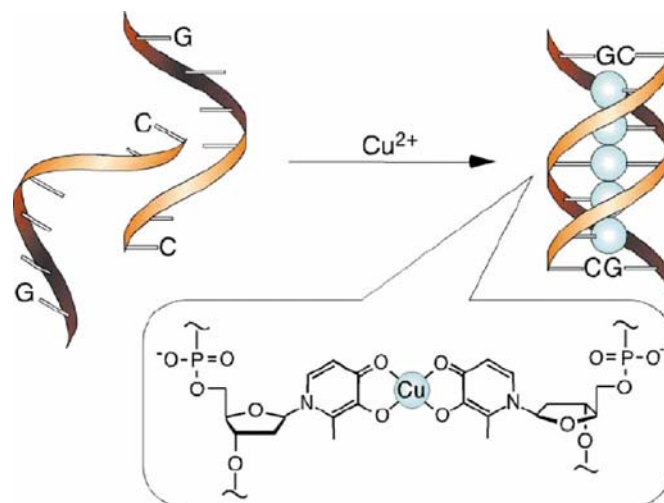


Abbildung 12: Der chelatierende Effekt von Hydroxypyridon Liganden, die als Nucleobasen-Ersatz in synthetische DNA eingebaut wurde, erlaubt eine Cu^{2+} - vermittelte Hybridisierung zweier solcher modifizierter DNA-analoger Einzelstränge.^[32, 39, 40]

1.3 Modifizierte Nucleotide und Nucleinsäuren mit erweiterter Funktionalität in der Bio- und Nanotechnologie

Das Design und die Synthese modifizierter bzw. funktionalisierter DNA hat während der letzten zwei Jahrzehnte eine steigende Aufmerksamkeit erfahren.

Die Errungenschaften auf diesem Gebiet sind in der Hauptsache der Entwicklung und Verbesserung der automatisierten DNA Festphasen-Synthese^[41-45] zu verdanken.^[46] Das letzte, unter Kapitel 1.2 beschriebene, Beispiel der Metallionen vermittelten Hybridisierung einer DNA Doppelhelix zeigt mögliche Aussichten und Strategien zur Konstruktion funktionaler Strukturen im Bereich der Nucleinsäure-Nanotechnologie. Der Austausch der natürlichen stapelnden Nucleobasenpaare durch andere stapelnde Molekülbausteine, wie den Hydroxypyridonen als Chelat-Liganden für Metallionen (Abbildung 12)^[39, 40], ist ein aktives Forschungsgebiet^[38, 47] und hat bereits viele bemerkenswerte Strukturen hervorgebracht (siehe Kapitel 1.3.1). Andere Ansätze der Funktionalisierung individueller Nucleotid-Bausteine zum Aufbau von funktionalisierten Nucleinsäuren beruhen auf der Modifikation des Nucleosid-verbindenden Phosphatrückgrats, des Kohlenwasserstoffgerüsts der Zuckereinheit oder auf der Modifikation der Nucleobasen, anstatt eines kompletten Basen-Austauschs. Dabei ist der Erhalt der Sequenzspezifität und der Stabilität der Nucleobasenpaarung während der Hybridisierung eine wichtige Voraussetzung und gleichzeitig eine Beschränkung, die bei den Erwägungen der zur Verfügung stehenden Mittel und der Anzahl der Modifikationen beachtet werden muss. Geläufige Beispiele für die Modifikation des Phosphatrückgrats sind die Phosphoramidate, Phosphortriester, Methylphosphonate und die Phosphorthioate (Abbildung 13).^[48] Man kann zwei Klassen von Phosphoramidat-Nucleinsäuren unterscheiden. Es gibt Phosphoramidate die eine N3'→P5'- oder eine P5'-N3'-Internucleosid-Verbindung enthalten. Dabei ist entweder die 3'- oder die 5'-Hydroxygruppe der Nucleoside durch eine Aminofunktion ausgetauscht. Solche Nucleinsäuren bilden sehr stabile Komplexe mit RNA und DNA und erweisen sich als äußerst stabil gegenüber Nucleasen.^[49, 50] Die Aminogruppe des Phosphoramidats kann aber auch als Ersatz für den, in regulären Nucleinsäuren negativ geladenen, Sauerstoff eingebracht werden. Auf diese Weise gelingt das Einbringen unterschiedlichster Funktionalitäten an das Phosphatrückgrat durch die vielfältige Auswahl zweier möglicher Substituenten am Stickstoff. Methylphosphonate sind, im Vergleich zu ihren negativ-geladenen natürlichen Phosphordiester-Gegenstücken, nicht-ionische Nucleinsäure Analoga, die ebenfalls vor Nuclease-Verdau geschützt sind. Diese Analoga sind hydrophob und können durch passive Diffusion in Säugerzellen aufgenommen werden.^[51] Es hat sich gezeigt, dass diese Nucleinsäure-Spezies als effektives Antisense-Reagenz die virale und zelluläre Genexpression auf der Ebene der mRNA spezifisch zu kontrollieren vermag.

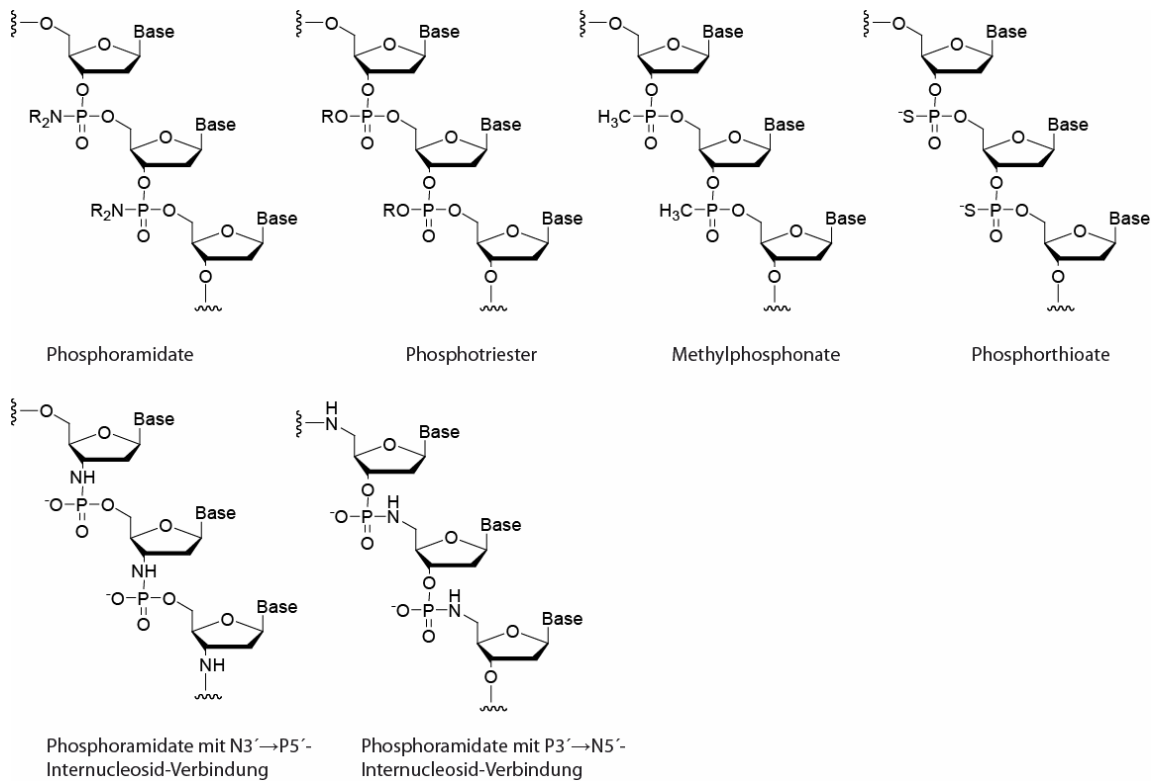


Abbildung 13: An der Internucleosidbindung (Phosphatrückgrat) modifizierte Nucleinsäuren.

Phosphorthioat-Analoga (S-DNA), bei denen der nicht-verbrückende, negative Sauerstoff durch Schwefel ersetzt wurde, haben weitverbreitete Anwendung in der Molekularbiologie gefunden. Die erhöhte Resistenz der Phosphorthioate gegenüber einem Nuclease-Verdau ist in vielen molekularbiologischen Experimenten von Vorteil und auch für medizinische Anwendungen sind sie im Gespräch.^[51] Neben ihrem großen Nutzen als Antisense-Sonden, werden Phosphorthioate auch dazu verwendet, Reporter-Gruppen ortsspezifisch an das Rückgrat von Nucleinsäuren einzubringen. Weiterhin verhindern sie den Verdau von Oligonucleotiden durch die 3'→5' Exonuclease-Aktivität von Polymerasen mit Korrekturlesefunktion, wie *Vent* und *Pfu*.^[52] Obwohl nur kleine strukturelle Änderungen in Oligonucleotiden, wie der Ersatz eines Sauerstoff-Atoms im Phosphatrückgrat durch Schwefel (Phosphorthioat) oder die neutrale Methylgruppe (Methylphosphonat), eine signifikante Reduzierung der Bindungsaffinität zu einem Gegenstrang zur Folge hat^[2], ist es umso erstaunlicher, dass einige drastische Änderungen des Rückgrates zu verbesserter Hybridisierung und erhöhter biochemischer Stabilität führen.^[46] Einige bekannte Beispiele solcher drastischen Modifikationen mit einhergehender Erhöhung der Hybridisierungsstabilität sind, neben den bereits erwähnten Phosphoramidaten mit N3'→P5'-Internucleosidbindung, die Peptid-Nucleinsäuren (PNA), die *Locked*-Nucleinsäuren (LNA, in etwa: abgeschlossene bzw. verriegelte Nucleinsäuren im Bezug auf die starre Konformation des Zuckers), Hexopyranose Nucleinsäuren

(Bsp.: „*homo*-DNA“, HNA) und Threose-Nucleinsäuren (TNA)(siehe Abbildung 14).

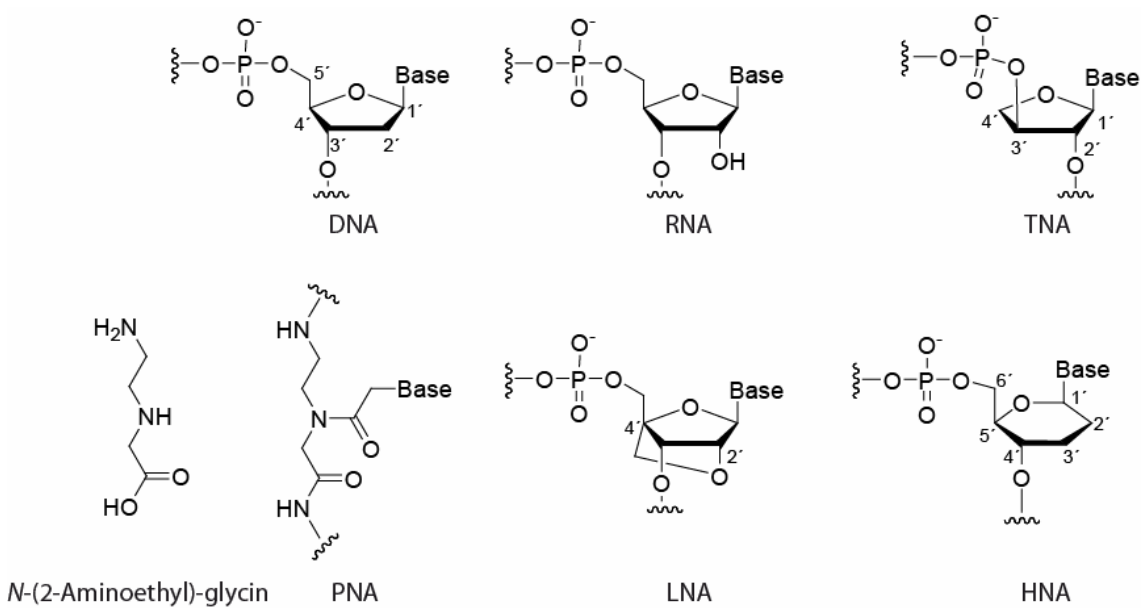


Abbildung 14: Vergleich von DNA und RNA Struktureinheiten mit am Kohlenwasserstoff-Rest modifizierten Nucleinsäure-Analoga.

Nielsen et al. beschrieben 1991 als erste eine bis heute sehr interessante und für verschiedene Verwendungszwecke viel benutzte Klasse an Nucleinsäure-Derivaten, den Polyamid- bzw. Peptid-Nucleinsäuren (PNA).^[2, 3] Bei der PNA ist das gesamte Zucker- und Phosphatrückgrat durch ein Peptid-ähnliches Polyamid-Gerüst (beispielsweise *N*-(2-Aminomethyl)-glycin-polyamid) ausgetauscht (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15).

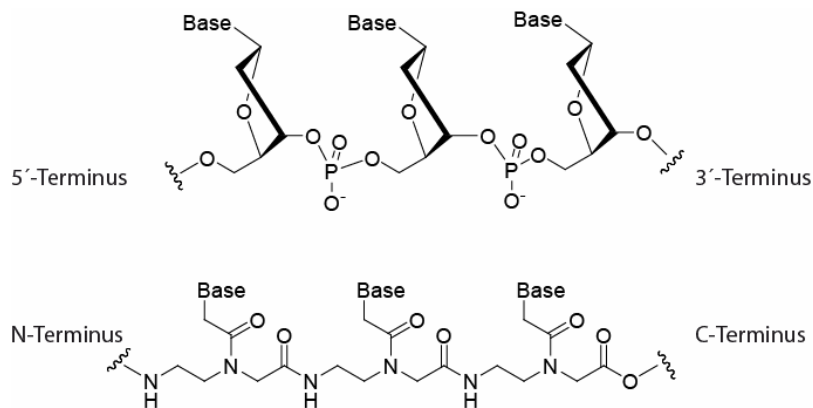


Abbildung 15: Gegenüberstellung des Ribosephosphat-Rückgrats der DNA mit dem Pseudopeptid-Gerüst der PNA.

PNA bindet mit sehr hoher Affinität an komplementärer DNA und noch stärker an RNA. Im Gegensatz zur DNA vermag PNA jedoch sowohl in paralleler als auch in antiparalleler Orientierung zu hybridisieren. Dabei entspricht der C-Terminus der PNA dem 3'-Ende und der N-Terminus dem 5'-Ende regulärer Nucleinsäuren (Abbildung 15). Die stärkste Bindungsaffinität hat PNA zu ande-

rer komplementärer PNA. Als ungeladene Spezies scheint sie prädestiniert zu sein, Tripelhelix-Strukturen auszubilden und in der Tat ist die Bildung von PNA₂-DNA Hybriden, manchmal unter „Strang-Verdrängung“ (*strand displacement*) bei dsDNA, favorisiert (Abbildung 16). Wird eine Sequenz gewählt, die Triplex-Bildung nicht erlaubt, entstehen PNA-DNA, PNA-RNA und PNA-PNA Duplexe. Ursprünglich von *Nielsen et al.* als Triplex-bildendes, DNA-erkennendes, *Major-Groove*-bindendes Oligonucleotid-Analagon konzipiert und entwickelt, zeigte sich, dass das Pseudopeptid- (Polyamid-) Grundgerüst der PNA das Ribosephosphat-Rückgrat der Nucleinsäuren in seiner Struktur sehr gut nachahmt.

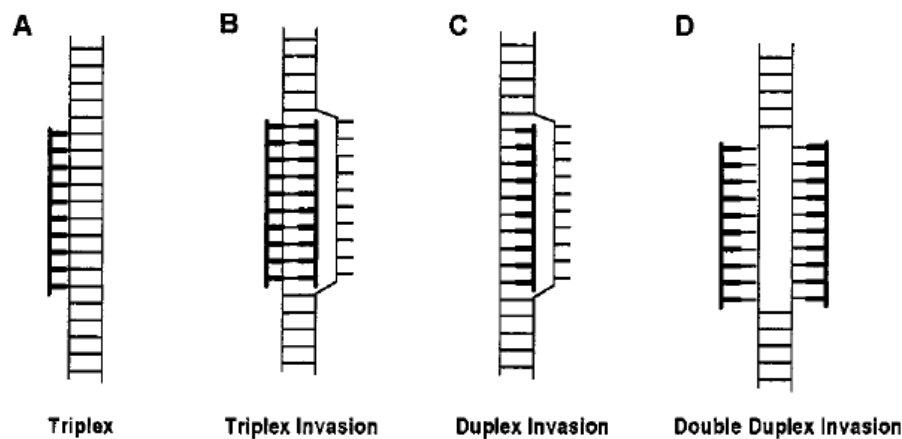


Abbildung 16: Schematisch dargestellte Bindungs-Modi der PNA mit dsDNA als Zielsequenz. Die dick unterlegten Strukturen sind PNA.^[3]

Daher hat PNA als mögliches Therapeutikum bei der Entwicklung von Antisense- und Antigen-Strategien und als Werkzeug in der genetischen Diagnostik innerhalb der Medizinischen Chemie große Aufmerksamkeit erregt. Obwohl von der Konzeption her ein Nucleinsäure-Analagon, ist PNA chemisch gesehen ein Pseudopeptid oder Polyamid und erlaubt in seiner Interaktion mit Nucleinsäuren die Studie einiger grundlegender Fragen zu Funktion, Evolution und Struktur von DNA. Für die wichtigsten PNA-Komplexe wurden bereits dreidimensionale Strukturen vermessen und bestimmt (Abbildung 17).^[3] Die doppelhelikalen Strukturen von PNA-RNA und PNA-DNA Hybriden wurden mit Hilfe von NMR-Experimenten ermittelt, während die Struktur einer PNA₂-DNA Triplex (Tripelhelix) und eines PNA₂ Duplex durch röntgenkristallographische Messungen bestimmt wurde (Abbildung 17).^[53] Die erhaltenen Strukturen demonstrieren deutlich, dass die PNA genügend Flexibilität besitzt, um sich der A- bzw. B-Form der RNA-, respektive DNA-Doppelhelix anzupassen, aber sie zeigen auch, dass die von der PNA bevorzugte helikale Struktur in den Komplexen deutlich weiter (ca. 28 Å statt 20 Å) und mit langsamerer Steigung (18 bp statt

10.5 bp pro Windung) ausfällt als in B-DNA. Diese Struktur wird dann als P-Form bezeichnet.^[3]

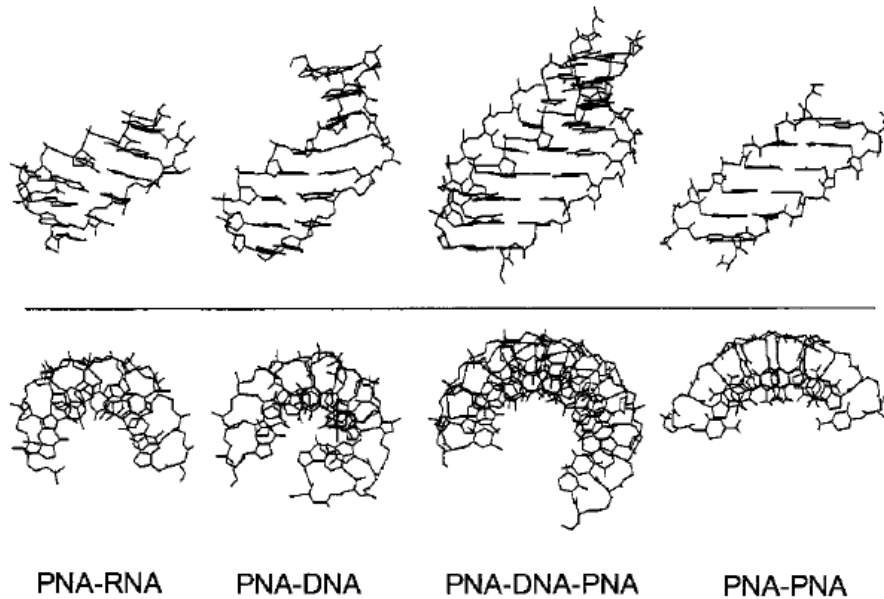


Abbildung 17: Strukturen der verschiedenen PNA-Komplexe, basierend auf röntgenkristallographischen- und NMR-Daten.^[3, 53]

LNA (Locked Nucleic Acids) besteht aus 2'-O, 4'-C-Methylen verbrückten, bicyclischen Ribonucleosid-Monomeren (Abbildung 14). Es wurde eine bemerkenswert erhöhte thermische Stabilität von +3 bis +8 °C pro Modifikation in Hybridkomplexen zwischen sowohl DNA und RNA und ganz oder teilweise mit LNA modifizierten Oligonucleotidsequenzen festgestellt.^[54, 55] Dabei gehorcht die LNA den Regeln der *Watson/Crick* Basenpaarung mit einer allgemein gesteigerten Selektivität im Vergleich zu korrespondierenden unmodifizierten Nucleinsäure-Standards. Die sehr hohe thermische Stabilität und exzellente Diskriminierung von Fehlpaarungen der LNA wird teilweise auf ihre konformelle Beschränkung bzw. Einschränkung durch die bicyclische Verbrückung der Ribose Einheit (daher „verriegelt“ bzw. *locked*) zurückgeführt. Die 2'-O, 4'-C-Methylen-Verbrückung zwingt die LNA Monomere in die sogenannte 3'-*endo*-Konformation des Zuckers die auch N-Typ-Konformation genannt wird (vgl. Tabelle 1). Die Bezeichnung N-Typ resultiert aus der Form des Buchstaben N, den die Atombindungen von C4', C3', C2' und C1' bilden wenn die Blickrichtung auf die Ribose senkrecht zu Flächennormale der von C4', 4'-O und C1' aufgespannten Fläche fällt (Abbildung 18). Die N-Typ Konformation der Monomere in Nucleinsäuren führt zur Ausbildung von A-Typ Duplexen (vgl. Tabelle 1, A-DNA, A-RNA) und tritt in der Natur häufig bei RNA₂ Duplexen und DNA-RNA Hybridkomplexen auf. Die durch den bicyclischen Kohlenhydrat-Rest der Monomere induzierte Prä-Organisation der Zuckerkaltung in die N-Form wurde zunächst durch Anschauungsmodelle und computergestütztes *Mo-*

deling vorausgesagt^[54, 55] und schließlich auch durch NMR- und röntgenkristallographische Daten bestätigt.^[56] Ein großer Vorteil der LNA ist die vollständige Kompatibilität mit üblicher DNA/RNA Chemie, eingeschlossen der automatisierten Nucleinsäure Festphasensynthese. Dies macht voll- oder teilweise mit LNA modifizierte Oligonucleotide mit Hilfe von gängigen DNA-Synthesizern leicht zugänglich.

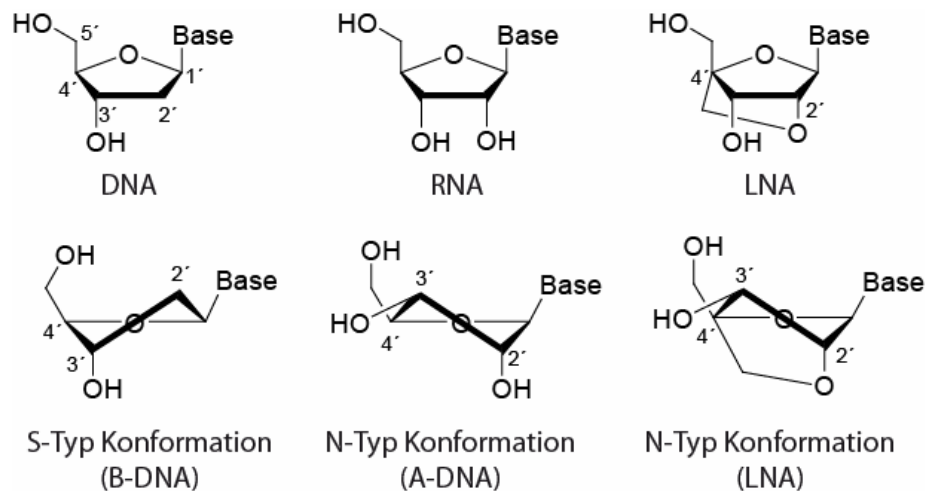


Abbildung 18: Zuckerfaltung (engl. *puckering*) und resultierende Konformationsbezeichnung bei DNA, RNA und LNA Monomeren.

Eine andere Klasse von bicyclischen Nucleosid-Monomeren wurde von *R. Steffens* und *C. J. Leumann* hergestellt um den Effekt der Prä-Organisation von Einzelstrang-DNA auf ihre Paarungseigenschaften mit komplementären Sequenzen zu testen.^[57] Die von ihnen eingeführte Bicyclo-DNA unterscheidet sich durch eine zwischen 3'- und 5'- Position des Desoxynucleosids eingeführte Ethylen-Einheit von natürlichen DNA-Monomeren (Abbildung 19). Sie fanden heraus, dass Bicyclo-DNA im Gegensatz zum natürlichen Vorbild eine sehr starke Basenpaarungstendenz nach dem *Hoogsteen* und dem *reversen Hoogsteen* Muster statt des üblichen *Watson/Crick* Musters zeigt. Auch bei diesen bicyclischen Systemen wird die erhöhte Komplexstabilität auf die konformelle räumliche Einschränkung zurückgeführt, während die Präferenz zur *Hoogsteen* bzw. *reverse Hoogsteen* Nucleobasen-Assoziation durch eine Veränderung des Torsionswinkels γ gegenüber natürlicher DNA hervorgerufen wird. *Steffens* und *Leumann* führten die Idee des konformell eingeschränkten Zuckerphosphat-Rests konsequent weiter, indem sie im nächsten Schritt ein, ihrem bicyclischen System analoges, tricyclisches System (Tricyclo-DNA) synthetisierten welches den bereits ankondensierten 5-Ring weiter sterisch einschränkt. Die Abweichung von ihrem ursprünglichen bicyclischen DNA-Monomer-Analogon besteht in der Ausbildung eines zusätzlichen Cyclopropanrings an der 5'-/6'-Position des Kohlenwasserstoff-5-Rings durch Einführung einer verbrückenden Methylen-Einheit (Abbildung 19).^[57] Dies führt zu einer doppelt tertiären Phosphordiester

Funktion zwischen zwei Monomeren die eine höhere sterische Rigidität aufweist als die Bicyclo- oder reguläre DNA. Die von *Eschenmoser et al.* vorgestellten Threose Nucleinsäuren (TNA, (L)- α -Threofuranosyl Nucleinsäure, Abbildung 14 und Abbildung 20) enthalten *vicinal* (3'→2') verbrückte Phosphordiester Bindungen und bilden Hybridkomplexe mit DNA und RNA in üblicher antiparalleler Orientierung.^[58] Abgeleitet von einem natürlichen Zucker-Grundgerüst (Threose) mit nur vier Kohlenstoffatomen, ist TNA bis zum heutigen Stand die strukturell einfachste aller denkbaren Oligonucleotid-ähnlichen Nucleinsäure-Alternativen basierend auf einem natürlichen Zucker.^[58, 59]

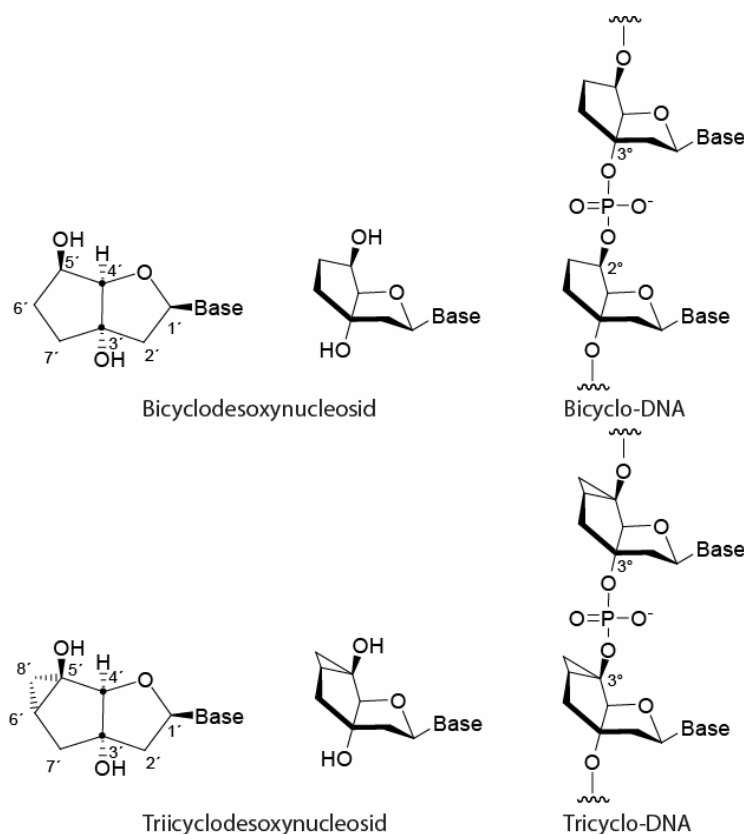


Abbildung 19: Konstitution und Konfiguration der Bicyclo- und Tricyclo-Desoxynucleoside (links oben und unten). Konformation der Nucleoside und Oligonucleotide von Bicyclo und Tricyclo-DNA (mitte und rechts).

Erstaunlicher noch als die zuverlässige Basenpaarung der TNA mit natürlicher DNA und RNA, trotz des um ein Atom verkürzten Zuckerphosphatrückgrats, ist die Tatsache, dass es einigen DNA-Polymerasen möglich ist, kurze Segmente von TNA als Templat zur Replikation von regulärer DNA zu verwenden.^[60]

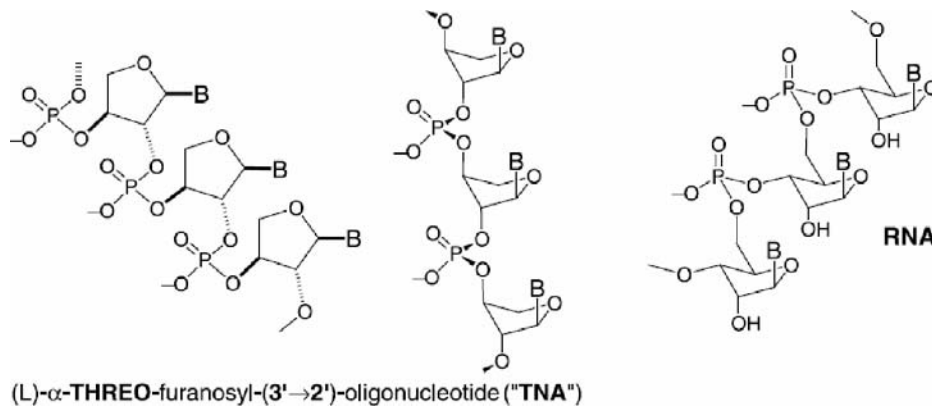


Abbildung 20: Links: Konstitution und Konfiguration der TNA. Mitte und rechts: Gegenüberstellung der strukturellen Konformation von TNA und RNA im Oligonucleotid (mit linearisiertem Ribosephosphat-Rückgrat)^[58]

Anders als beim verkürzten Zuckerphosphat-Rest in TNA wurde im Zuge der Erforschung von alternativen Nucleinsäure-Systemen bereits in den achtziger Jahren an der *ETH* ein um eine Methylen-Gruppe erweitertes Kohlenhydrat-Gerüst als Nucleosid-Basis verwendet. Das Zuckerphosphat-Analogon liegt dabei in der sechsgliedrigen Pyranose-Form statt in der, in natürlichen Nucleinsäuren auftretenden, Furanose-Form vor (Abbildung 21). Diese als „*homo*-DNA“ (HNA oder Hexopyranosyl-Oligonucleotide) bezeichneten Oligonucleotide zeigten, dass die Fünfgliedrigkeit des Kohlenhydrat-Teils keine zwingende Bedingung für die Ausbildung von *Watson/Crick*-Basenpaaren ist.^[59] HNA war das erste Oligonucleotid-System das sich orthogonal zu den natürlichen Nucleinsäure-Systemen (DNA und RNA) verhält. Es kann zu keiner Ausbildung von HNA·DNA oder HNA·RNA Hybridkomplexen kommen. Aber in ihren hybridisierten Doppelstrangkomplexen zeigt das HNA-System eine, im Vergleich zu natürlichen Nucleinsäuren, äußerst stabile Basenpaarung. Dies wird, wie in den zuvor genannten Beispielen, auf eine stärkere Rigidität der Zucker-Konformation zurückgeführt, die aus dem konformellen Unterschied der Pyranose verglichen zur Furanose resultiert.^[59] Die konformelle Rigidität führt zu einer Prä-Organisation des Einzelstrang-Rückgrats zu Gunsten einer vorteilhaften Ausrichtung der Nucleobasen im Hinblick auf die Doppelstrang-Paarungskonformation. Außerdem zeigt das System eine ausgeprägte Tendenz zur Adenin und Guanin Selbstpaarung nach dem *reversen Hoogsteen* Muster. Es wurden auch andere Hexopyranosyl-(6'→4')-oligonucleotide, die im Gegensatz zu *homo*-DNA zwei zusätzliche Hydroxy-Gruppen an 2'- und 3'-Position enthalten und sich damit zu den natürlichen Hexosen so verhalten wie Ribose zu RNA, hergestellt. Diese zeigen aber keine ausgeprägte Fähigkeit zur *Watson/Crick* Basenpaarung, vielmehr entstehen Purin-Purin Paarungen nach dem *reversen Hoogsteen* Muster. Dieser Unterschied in der Selektivität der voll hydroxylierten Hexopyranosen, im Vergleich zu ihrem *homo*-DNA Gegenstück, wurde als Konsequenz einer sterischen

Hinderung im jeweiligen Einzelstrang bei der nötigen Konformationsänderung für die Strangpaarung durch die räumlich anspruchsvolleren Hydroxy-Gruppen interpretiert.

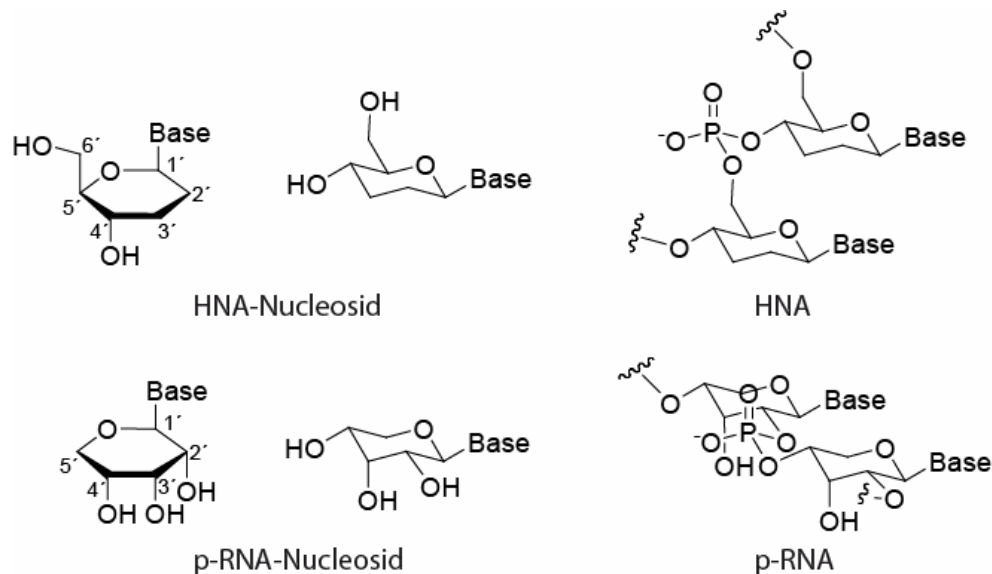


Abbildung 21: Gegenüberstellung von Oligonucleotiden und ihren Nucleosiden die auf Pyranose-Analoga beruhen. Oben *homo*-DNA (HNA) und unten Pyranosyl-RNA (p-RNA).

Auch ein Zuckerphosphat-Analogon in Pyranose-Form, aber abgeleitet aus der Ribose (Familie der Pentosen) statt wie bei HNA aus der Familie der Hexosen, ist die Pyranosyl-RNA (Abbildung 21).^[61] In p-RNA sind die Nucleobase sowie die Phosphordiesterbindungen zwischen 2'- und 4'-O-Position äquatorial angeordnet. Voraussagen über die Konformation einer p-RNA Doppelhelix auf Basis der idealisierten Konformation ihrer Monomere beschreiben eine quasi-lineare, auf alle Fälle erheblich reduziert helikale Struktur mit stabiler Watson/Crick-Basenpaarung.^[59] Im Experiment wurde, wie bereits bei vielen der vorangegangenen vorgestellten Nucleinsäure-Analoga, eine erhöhte Duplex-Stabilität im Vergleich zu DNA festgestellt und auch die Selektivität bezüglich der Nucleobasenpaarung ist erheblich ausgeprägter. Es wurde keine Selbstpaarung bei Guaninreichen Sequenzen durch *Hoogsteen* oder *reverse Hoogsteen* Basenpaarung festgestellt. Eine letzte Klasse von Oligonucleotid-Analogen soll vorgestellt werden, die Phosphordiamidat-Morpholino-Oligonucleotide (PMO oder Morpholinos, Abbildung 22).^[62] PMOs zeigen sowohl Abweichung im Kohlenhydrat-Teil des Zuckerphosphat-Gerüsts, als auch am Phosphat-Rückgrat. PMOs tragen, wie die zuvor beschriebenen Beispiele, die natürlichen Nucleobasen, doch statt auf einer Desoxyribose, sind sie an einem sechsgliedrigen Morpholin-Ring, der über eine Phosphordiamidat-Gruppe (ein Stickstoff des Phosphordiamidats ist Teil des Morpholin-Rings) mit anderen Monomeren verknüpft ist, angebracht. Ähnlich den Methylphosphonaten sind diese Oligonucleotid-Analoga im physiologischen pH-Bereich ungeladen. Sie zeigen hohe Sequenzspezifität und werden wie

Phosphorothioat-Oligonucleotide gern in Antisense-Experimenten verwendet. Anders als bei S-DNA jedoch, zeigen PMOs vollständige Resistenz gegenüber Nuclease-Verdau in ihren Hybridkomplexen mit RNA.^[52, 62] Weder der hybridisierte RNA-Zielstrang noch die PMO wird verdaut, die Inhibierung der RNA-Funktionalität bzw. ihrer Templateigenschaft resultiert lediglich durch sterisches Blockieren der RNA.

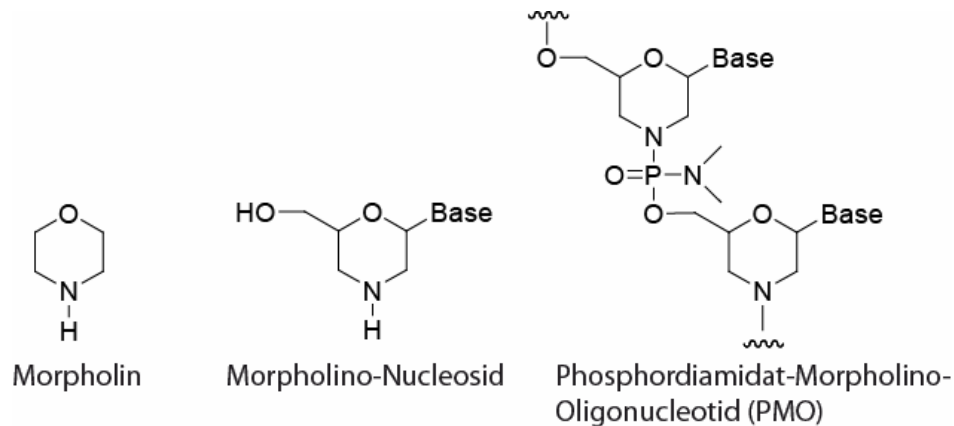


Abbildung 22: Komponenten und Struktur der Phosphordiamidat-Morpholino-Oligonucleotide (PMO).^[62]

Die Verwendung von am Ribosephosphat-Rest modifizierten Oligonucleotiden beim Aufbau von DNA Nanostrukturen soll an zwei Beispielen vorgestellt werden. *Kiedrowski et al.*^[63, 64] synthetisierten ein aus drei unterschiedlichen Einzelsträngen (**A'**, **B'**, **C'**, je 15 Basenpaare) zusammengesetztes verzweigtes Oligonucleotid (**Y**, Abbildung 23). Die Modifikation bildet die aus zwei Kohlenstoff-*Spacern* (Abstandshalter) bestehende Verzweigungsstelle. Drei weitere 5'-Phosphat-modifizierte Oligonucleotide unterschiedlicher Länge (11 bp (**A**), 13 bp (**B**), 15 bp (**C**)) mit drei komplementären Sequenzen zu den Sequenzen des Tris-Oligonucleotids **Y** wurden synthetisiert. Die über einen kurzen *Spacer* am 5'-Ende eingeführten Hydrazid-Modifikationen erlauben die kovalente Bindungsknüpfung mit dem dreiarmligen Linker Molekül **L** unter Ausbildung des Tri-Hydrazons **LABC** (Abbildung 23).

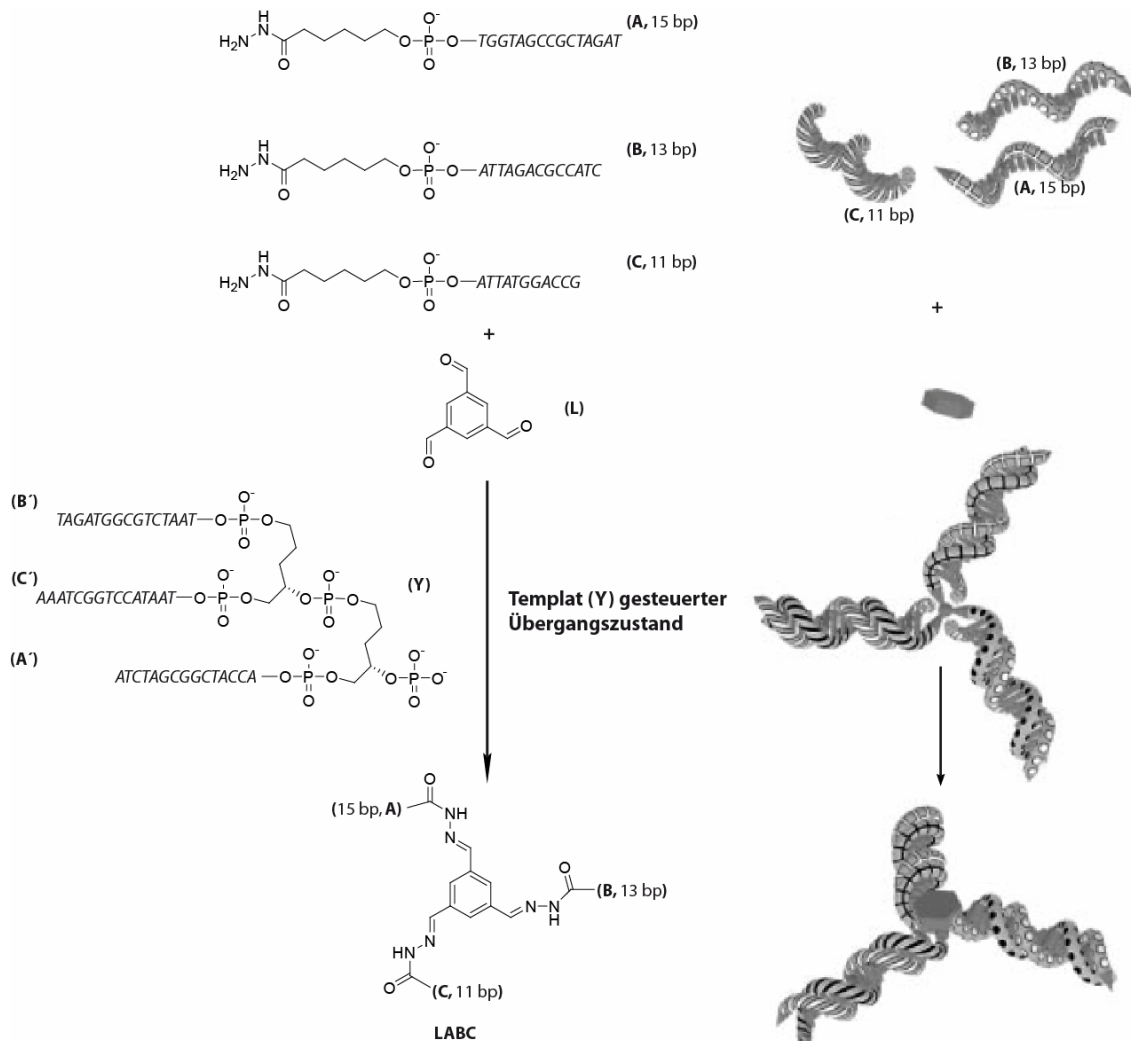


Abbildung 23: Schema der Templat(**Y**)-gesteuerten Verknüpfung dreier Hydrazid-modifizierter Oligonucleotide (**A**, **B**, **C**) mit einem Linker-Molekül (**L**) zu einem definierten Tris-Oligonucleotid-Produkt **LABC** ohne Produkt-Gemische anderer Zusammensetzung.^[63]

Durch das verzweigte Templat Tris-Oligonucleotid **Y** findet nun eine Prä-Organisation der drei komplementären modifizierten Oligonucleotide **A-C** mit dem Templat **Y** statt (quartärnerer Komplex!), basierend auf der sich ausbildenden *Watson/Crick*-Basenpaarung (Hybridisierung). Das führt dazu, dass bei Zugabe des Tris-Aldehyd-Linkers **L** die Bindungsknüpfung zum Tri-Hydraxon nur zwischen je drei unterschiedlichen Oligonucleotiden und dem Linker stattfindet. Es bildet sich nur die Spezies **LABC** nicht aber Verknüpfungen mit doppeltem oder dreifachem Auftreten eines Oligonucleotids einer Sorte am selben Linker **L**. Dies lies sich in gelelektrophoretischen Experimenten verifizieren, da die drei Oligonucleotide **A-C** unterschiedliche Basenpaar-Längen haben und somit die Migrationsgeschwindigkeit der Tris-Produkte sich im Gel unterscheiden. Im Ergebnis zeigte sich, dass in Gegenwart des Templats tatsächlich nur das Produkt mit der vorausgesagten Basenpaar-Anzahl entsteht. Als Nebenprodukte sind auch drei der sechs möglichen Bis-verknüpften Oligonucleotid-

Linker-Produkte detektierbar. In Abwesenheit des Templats ist überhaupt kein Tris-verknüpftes Produkt zu detektieren, lediglich ein Gemisch aus Bis-verknüpften Spezies. Unter kinetischen Gesichtspunkten ist dies nicht verwunderlich, da ohne Templat drei Moleküle zusammentreffen müssten, um ein Tris-Produkt zu ergeben; ohne Prä-Organisation durch das Templat ein relativ unwahrscheinliches Ereignis.

Das andere Beispiel beschreibt die Konstruktion von DNA-Nanoröhren aus DNA-Crossover-Kacheln, die an bestimmten Regionen mit Thiol-Gruppen modifiziert sind.^[65] Bei den rigiden DNA-Kachel-Strukturen (**A** und **B** in Abbildung 24) handelt es sich um aus DX-DNA-Motiven abgeleitete Strukturen (vgl. Kapitel 1.2, Abbildung 9). Anders als bei der DX-DNA sind hier drei statt nur zwei DNA-Duplexe co-planar (Helix-Achsen sind parallel zueinander) angeordnet (TX: *Triple-Crossover*).^[66] Die Nanoröhre besteht aus zwei unterschiedlichen Spezies von TX-DNA-Kacheln. Spezies A ist eine einfache TX-Kachel mit *sticky ends* komplementär zu den *sticky ends* der B-Typ TX-Kachel. Kacheln vom Typ B haben an ihrem mittleren Duplex noch zwei *Stem-Loops* die senkrecht zur Helix-Achse des mittleren Duplex und auch senkrecht zur Kachelfläche heraus, bzw. herein ragen (Abbildung 24, rechts).

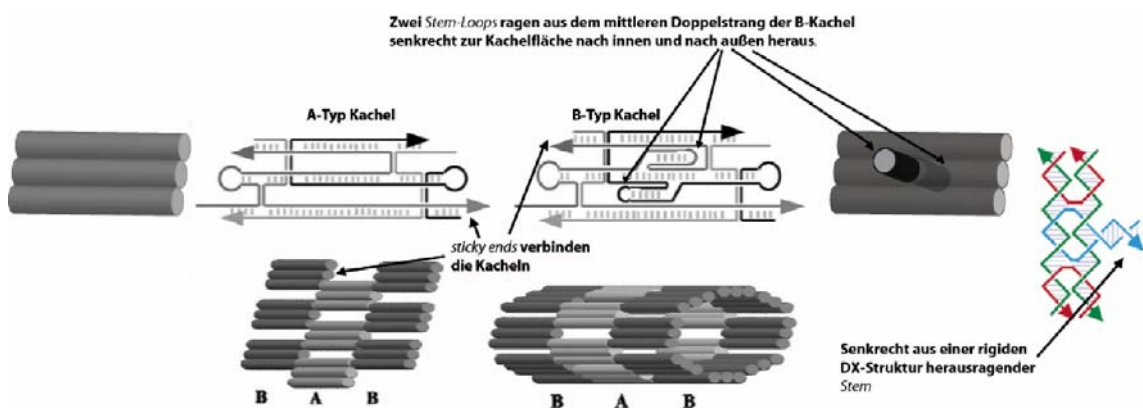


Abbildung 24: Konstruktionsplan der aus zwei DNA-Kachel-Spezies (**A** und **B**) aufgebauten Nanoröhren. Zur Vereinfachung sind die aus den Kachelflächen herausragenden *Stem-Loops* in der unteren Bilderreihe, die die zusammengesetzten Konstruktionen zeigt, nicht eingezeichnet.^[65]

Die Thiol-Modifikation befindet sich am 5'-Ende des nach innen ragenden *Stem-Loops* der Kachel vom B-Typ. Wenn sich die Kacheln über die *sticky ends* zu zweidimensionalen Flächen angeordnet haben, wird durch Oxidation von Thiolgruppen benachbarter B-Kacheln, unter Ausbildung von Disulfidbrücken, die Fläche nach innen gekrümmt und eine Nanoröhre kann entstehen.

1.3.1 Basen-modifizierte Nucleotide und Nucleinsäuren

Unabhängig von ihren strukturellen Eigenschaften, werden die meisten funktionellen Eigenschaften der DNA über die Nucleobasen und ihre Sequenz-Abfolge bestimmt. Dabei agieren die Nucleobasen gleichsam als „funktionelle Gruppe“, die sich in ihrem Informationsgehalt und ihren molekularen Erkennungseigenschaften unterscheiden, während das Ribosephosphatrückgrat gleich bleibt.^[47] Und obwohl die natürlichen Nucleobasen somit ein definiertes, etabliertes Repertoire mit wohl bekannten physiko-chemischen und funktionellen Eigenschaften darstellen, ist der Chemiker an dieses verbindliche Besteck nicht gebunden. Die Gründe die Limitierung auf vier bzw. fünf Nucleobasen (DNA/RNA: A, C, G und T sowie U für DNA respektive RNA) aufzuheben sind vielfältig, bedenkt man die unzähligen Alternativen an organischen Molekülen, die an Stelle der natürlichen Strukturen verwendet werden könnten. Die natürlichen Nucleobasen variieren nicht besonders stark in ihrer Polarität oder ihren Stapelungs-Eigenschaften, verglichen mit an diesen Positionen möglichen molekularen Alternativen. Mit ihren zwei heterocyclischen Grundgerüsten (Purine, Pyrimidine) bieten sie auch keine große Vielfalt in ihrer Größe oder Struktur. Sie enthalten keine stark elektrophilen Positionen und keine stark nucleophilen Positionen und nahe dem neutralen pH ändern sie ihren Protonierungszustand kaum. Die natürlichen Nucleobasen absorbieren Licht nur im UV-Bereich und sie sind nahezu nicht fluoreszent. Die Modifizierung oder Erweiterung dieser wenig ausgeprägten Eigenschaften ist ein von vielen Forschern verfolgtes Ziel.

Alle bisher beschriebenen Beispiele von Nucleinsäure-Analoga haben die natürlichen Nucleobasen beibehalten um die Wechselwirkung mit DNA oder RNA des natürlichen genetischen Systems zu gewährleisten. Anders als bei den modifizierten Kohlenhydrat-Phosphat-Gerüsten, wird in Studien mit modifizierten Nucleobasen häufig das Ziel, völlig neue Basenpaare zu konzipieren, angestrebt. Bereits in frühen arbeiten von *Benner et al.* wurden eine ganze Reihe von neuen Wasserstoffbrücken Paarungsmustern vorgeschlagen und präsentiert, die dazu geeignet wären das bestehenden genetische Alphabet zu erweitern.^[46, 67] Durch Änderung der an Wasserstoffbrücken beteiligten funktionellen Gruppen werden alternative Paarungs-Selektivitäten erzeugt. Es wird dabei zum einen versucht, die Selektivität und Bindungsstärke zu erhöhen und zum anderen die Fähigkeit der Polymerasen zu erhalten, solche nicht-natürlichen Nucleinsäuren als Template zur Replikation zu akzeptieren.^[47] Aber nicht nur auf Wasserstoffbrücken basierende Nucleobasenpaare wurden hergestellt, sondern auch nicht-polare Paare, sowie durch Metallionen vermittelte Paare (vgl. letzter Abschnitt Kapitel 1.2 und Abbildung 12).^[46] Das Haupt-Augenmerk dieser Arbeiten gilt dabei, die

passende Geometrie zum Erhalt der natürlichen helikalen DNA-Struktur nachzuzahlen, dem als Hauptfaktor angenommenen Struktur-Merkmal für die biochemische Replikation. Im Hinblick auf die photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften der Nucleobasen erweist sich gerade die Fluoreszenz immer mehr als hilfreiches Mittel in den Biowissenschaften, als biomolekulares Analysewerkzeug. Eine der ersten Verwendungen von mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierten Oligonucleotiden war deren Gebrauch in der automatisierten DNA-Sequenzierung und im *genotyping*.^[51] Außer in der DNA-Sequenzierung und in *Micro-Array*-Techniken findet Fluoreszenz in Oligonucleotiden auch in der Mikroskopie und bei Bindungsstudien durch Polarisations-Anisotropie, neben anderen Anwendungen, Verwendung. Meist wird ein auf handelsüblichen Fluorophoren (z. B. Fluorescein oder Cyanin) basierender Fluoreszenz-Marker über einen Linker an ansonsten reguläre DNA geknüpft. Es sind aber auch inhärent fluoreszierende Nucleobasen-Analoga für Oligonucleotide bekannt, wie beispielsweise 2-Aminopurin^[68] und Ethenoadenin.^[69-71] Deren Vorteil liegt darin, dass sie mit den anderen Nucleobasen innerhalb der Doppelhelix paaren und an der Basenstapelung beteiligt sind, statt als DNA-fremder Rest über einen Linker, sozusagen als Ballast, mitgeführt zu werden.

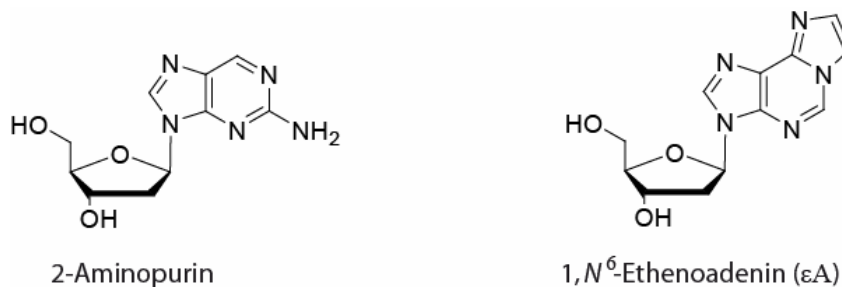


Abbildung 25: Fluoreszierende Nucleosid-Analoga.

Aber auch 2-Aminopurin und Ethenoadenin sind im Vergleich zu anderen, bereits erfolgreich als Nucleobasen-Ersatz verwendeten, Molekülstrukturen, wie beispielsweise Pyren^[72], Phenanthren^[72] und Naphthalen relativ schwach fluoreszierend und zeigen niedrige Absorption und Quantenausbeuten.^[47] Eine Vielzahl gut fluoreszierender Basen-Analoga, die teilweise auf recht einfachen, aromatischen annelierten Systemen basieren, wurde seit dem über automatisierte DNA Festphasensynthese in Oligonucleotide eingebracht (siehe auch Kapitel 1.3.1.2 und Abbildung 26).^[73-75] Diese können in Zukunft in kombinatorischer Weise als molekulare Sensoren in den Biowissenschaften benutzt werden.^[76]

Bei den letzteren Nucleobasen-Analoga handelt es sich um Strukturen, die allerdings keine Wasserstoffbrücken ausbilden. *Kool et al.* haben in diesem Zusammenhang gezielt Struktur-Analoga der natürlichen Nucleobasen syntheti-

siert, die in ihrer Größe und Geometrie die natürlichen Vorbilder nachahmen, aber durch den Austausch von Sauerstoff mit Fluor und von Stickstoff mit Kohlenstoff den polaren Charakter und somit die Wasserstoffbrücken-Bildungskapazität verlieren unter Aufrechterhaltung der Aromatizität (Abbildung 26). *Kool et al.* bezeichnen diese hydrophoben Verbindungen als nicht-polare Isostere der Nucleobasen.^[47]

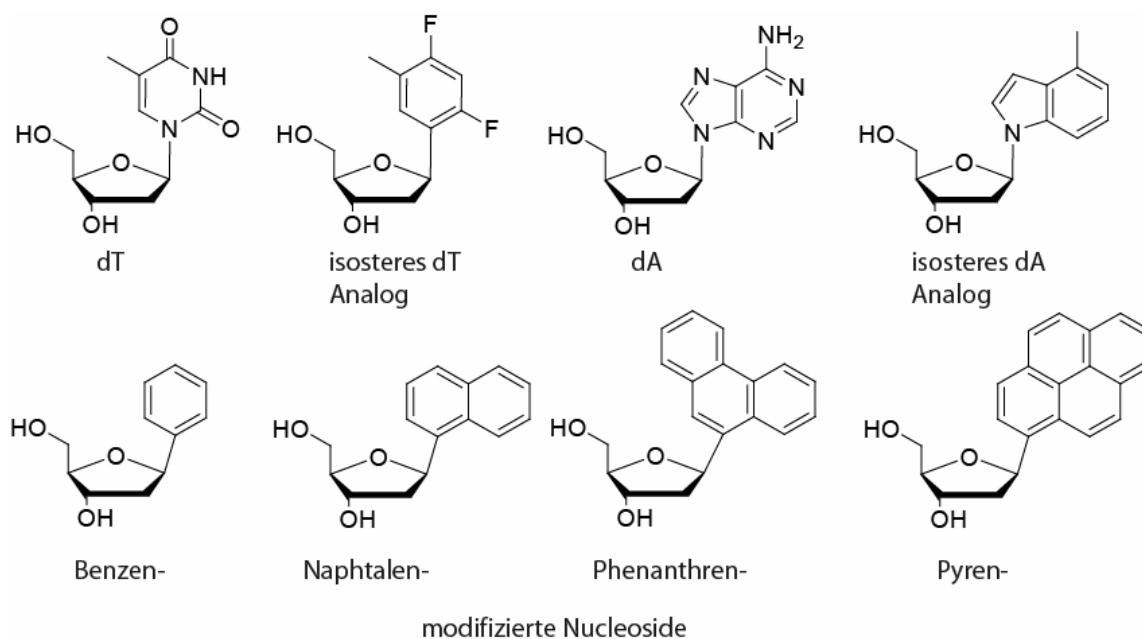


Abbildung 26: Strukturen einiger unpolarer Nucleobasen Isostere (obere Reihe, neben ihren natürlichen Vorbildern) und einfacher aromatischer Kohlenwasserstoff-Nucleosid-Analoga (untere Reihe).^[77]

Die erfolgreiche Hybridisierung solcher Basen-Analoga tragender DNA zu regulären DNA-Doppelhelices bestätigt die Theorie, dass die *Watson/Crick*-Basenpaarung im wesentlichen zwei Regeln der Komplementarität folgt: zum einen der Komplementarität der Größe und Geometrie (große Purine paaren mit kleinen Pyrimidinen), zum anderen der Komplementarität der Wasserstoffbrücken-Bildung (Donoren der einen Base paaren mit Akzeptoren der andern).^[67] Eine weitere treibende Kraft der Basenpaarung ist in einem gewissen Maße die Hydrophobie der Basen. Selbst ohne große aromatische Systeme und ohne funktionelle Gruppen zur Wasserstoffbrückenbildung wurden vergleichsweise stabile Duplexe in Experimenten von *Romesberg et al.* erhalten, wenn komplementäre Oligonucleotide an einzelnen gegenüberliegenden Stellen Nucleotide mit einfachen Methyl-derivatisierten Benzenen, statt natürlicher Nucleobasen, enthielten.^[78] Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse entwickelten *Kool et al.* in einem nächsten Schritt eine neue molekulare Klasse des genetischen Paarungssystems unter Beibehaltung des natürlichen Rückgrats aber unter Austausch der natürlichen Basenpaare durch größere, erweiterte Paare. Die als xDNA (x für

das engl. *expanded* = erweitert; Abbildung 27) bezeichneten Nucleinsäure-Analoga bestanden zunächst aus den beiden, um die Weite eines Benzenrings (2.4 Å) vergrößerten Paare des Thymins (xT) und des Adenins (xA). Rein formal wird das Thymin durch die Annelierung eines Benzenrings zum bicyclischen aromatischen System und das Adenin durch Insertion eines Benzen-Rings in sein bicyclisches, heteroaromatisches System zu einem tricyclischen Analogon. Außer dieser Erweiterung bleibt das Akzeptor/Donor Muster mit Rücksicht auf die Wasserstoffbrücken-Bindungsfähigkeit unangetastet. Die Kombination dieser erweiterten Nucleosid-Analoga mit ihren korrespondierenden natürlichen Purin und Pyrimidin Bindungspartnern sollte also zur Ausbildung einer regulären DNA-Doppelhelix-Struktur mit gegebenenfalls erweitertem Helix-Durchmesser führen. So wurde gezeigt, dass eine DNA-Doppelhelix bestehend aus Paarungen von xA mit natürlichem T und gleichzeitiger Paarung von xT mit natürlichem A innerhalb derselben Helix tatsächlich zu einer stabilen Struktur mit rechts-händiger Orientierung führt.^[79, 80]

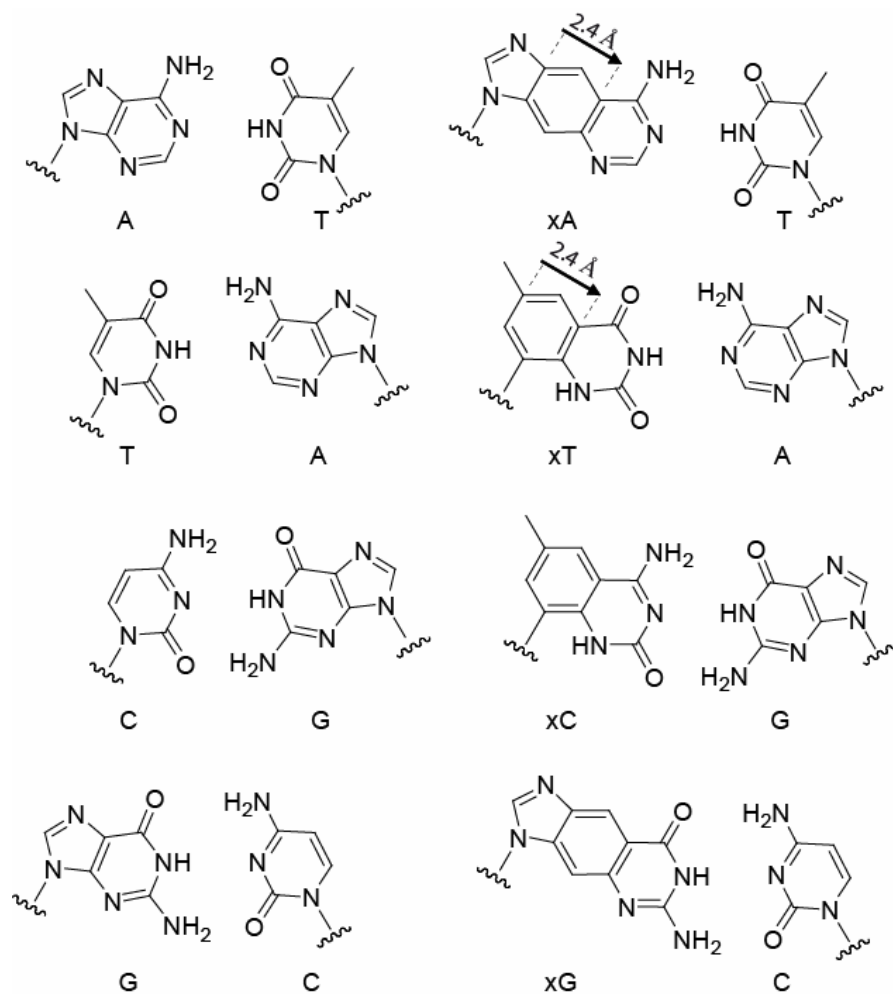


Abbildung 27: Um die Länge eines Benzen-Rings erweiterte xDNA in Watson/Crick-Basenpaarung mit ihrem komplementären natürlichen Analogon (rechte Spalte) im Vergleich zur Basenpaarung regulärer DNA (linke Spalte). Es paart immer ein xNucleotid mit einem natürlichen komplementären Nucleotid.

Die Stabilität solcher Helices, die ausschließlich aus erweiterten Basenpaaren aufgebaut sind, erwies sich als höher, verglichen mit natürlicher B-DNA, was dem stabilisierenden Effekt einer größeren aromatischen Oberfläche bei der Basenstapelung zugesprochen wird. Die Selektivität bezüglich Fehlpaarungen ist allerdings reduziert. Auch hat das Einbringen vereinzelter erweiterter Basenpaare in ansonsten regulärer DNA einen eindeutig destabilisierenden Effekt, vermutlich wegen des wechselnden Platzbedarfs und Durchmessers der erweiterten Basenpaare, verglichen zu den flankierenden natürlichen Basenpaaren. Durch das vergrößerte aromatische π -System sind die Nucleobasen-Analoga generell stark fluoreszierend, wovon man sich praktischen Nutzen für Anwendungen erhofft. Neben den erweiterten Paaren xA·T und xT·A wurden später auch die Paare xG·C und xC·G erfolgreich synthetisiert und in xDNA inkorporiert (Abbildung 27).^[80] Molekulares Modeling sagt für xDNA, aufgrund des größeren Umfangs den das xDNA Rückgrat durch den vergrößerten Helix-Durchmesser bestreiten muss, eine höhere Anzahl an Basenpaaren pro Windung voraus. *Kool et al.* bestimmten grob 14 Basenpaare pro Windung statt der für B-DNA üblichen 10.5 Basenpaare. Außerdem nehmen sie eine Vertiefung sowohl der großen als auch der kleinen Furche der xDNA an, weil die Akzeptor/Donor-Oberflächen der xBasen, durch die Erweiterung um 2.4 Å, in Richtung des xDNA Rückgrates der gegenüberliegenden Nucleobase verschoben werden.^[46, 80] Durch die Änderung der Geometrie dieser erweiterten Nucleobasen wurde mit yDNA eine weitere, vergleichbare Klasse von Nucleobasen erzeugt (Abbildung 28). Die yDNA (das englische *y* entspricht im Laut in etwa dem Anfangslaut im englischen *wide* = weit) wird, ähnlich der xDNA, auch durch die formale Addition bzw Annelierung eines Benzenrings an die reguläre Nucleobase aufgebaut, jedoch ist die Orientierung der Verlängerung von 2.4 Å um 60° gedreht (siehe Abbildung 28). Die generellen Effekte der Erweiterung des DNA-Doppelhelix-Durchmessers und der Erhöhung der Basenpaar-Zahl pro Windung bleiben bestehen, aber durch die Vektor-Änderung der Verlängerung werden unterschiedliche Auswirkungen auf die große und kleine Furche erwartet. Es wird angenommen, dass die große Furche weniger tief ausfällt und die kleine Furche tiefer. Noch sind aber keine zuverlässigen Strukturdaten verfügbar. Schmelzpunktmessungen und Absorptions-Spektren bestätigen aber die Ausbildung stabiler DNA-Doppelhelices mit einer Präferenz für Hybridisierungen mit antiparalleler Orientierung ganz nach dem Vorbild natürlicher DNA.^[81]

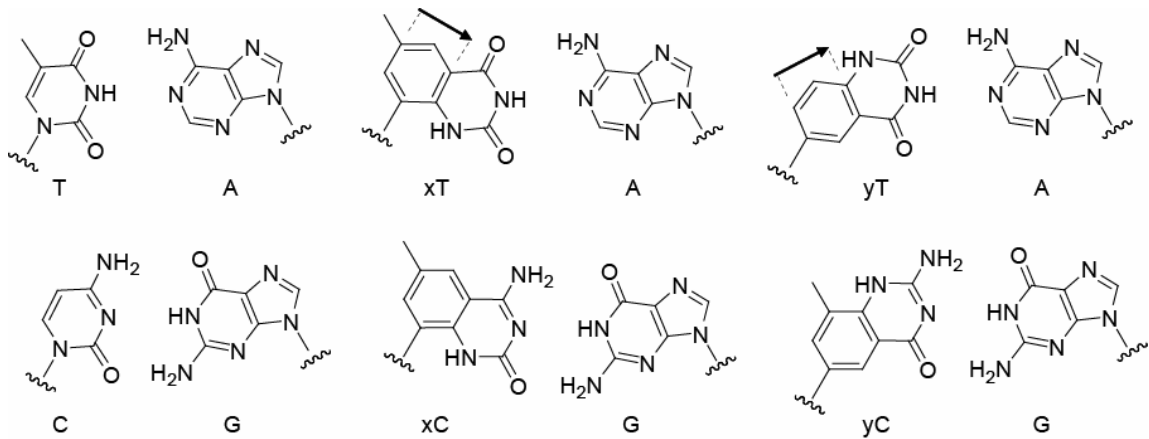


Abbildung 28: Gegenüberstellung der Basenpaarung von natürlicher DNA (links), xDNA (mitte) und bisher hergestellter yDNA (rechts). Man beachte den Unterschied in der Orientierung der Erweiterung bei xDNA und yDNA.

1.3.1.1 Hoch funktionalisierte DNA (fDNA)

Die oben beschriebenen Nucleobasen-Analoga ahmen ihre natürlichen Vorbilder entweder in ihrer Geometrie, unter Veränderung der auf Wasserstoffbrücken beruhenden Wechselwirkungsfläche nach, oder sie sind in ihrer Geometrie, unter Beibehaltung der *Watson/Crick*-Wechselwirkung, verändert. Beide Konzepte helfen das Verständnis der Wechselwirkungsanteile besser zu verstehen. Um die Einsatzgebiete von Nucleinsäuren in praktischen Anwendungsgebieten zu erweitern, sind die in natürlicher DNA bereits vorhandenen Eigenschaften, die zuverlässige molekulare Erkennung und die damit einhergehende Templat-Eigenschaft, die enzymatische Replizierbarkeit und Amplifizierbarkeit, unerlässlich. Aus der Sicht eines Chemikers oder Biochemikers ist es allerdings wünschenswert die chemische Diversität durch ein größeres Repertoire an funktionellen Gruppen, unter Erhalt der zuvor aufgezählten Eigenschaften, zu erhöhen. Wie eingangs erwähnt, sind die vier bzw. fünf natürlichen Nucleobasen mit wenigen, vergleichsweise schwach reaktiven, funktionellen Gruppen ausgestattet. Im Vergleich zur Vielfalt der chemischen Funktionalitäten auf die Proteine durch die große Zahl an Aminosäure-Resten zurückgreifen können, unterliegen die Nucleinsäuren einer großen Beschränkung. In jüngsten Studien ist es erfolgreich gelungen, die chemische Diversität von DNA durch den Einsatz von synthetischen, Basen-modifizierten Nucleosid-Triphosphaten (fdNTPs) zu erhöhen.^[4-6] Der entscheidende Aspekt in diesen Studien ist der hohe Grad der Funktionalisierung der durch diesen Ansatz erreicht wird. Das Einbringen von funktionalisierten Nucleotiden in DNA durch chemische Methoden, wie der DNA-Festphasensynthese ist im Vergleich zur Herstellung von DNA durch enzymatische *in vitro* Reaktionen immer noch vergleichsweise aufwendig. Außerdem ist,

trotz der stetigen Weiterentwicklung der etablierten Nucleinsäure-Festphasensynthese, die Herstellung von längeren Nucleinsäure-Ketten mit mehr als 60-70 bp schwierig und mit steigender Anzahl an Modifikationen sinken auch die Ausbeuten. Der Einsatz von funktionalisierten Nucleosid-Triphosphaten, die als Substrate von DNA-Polymerasen akzeptiert werden, kann die oben genannte Beschränkung umgehen. DNA-Polymerasen, die im Organismus für die DNA-Replikation, der Herstellung einer Kopie zur Übertragung der genetischen Information von Eltern auf Tochterzellen, verantwortlich sind, finden in vielfältigen Experimenten und Methoden der Biowissenschaften Anwendung.

Dabei erzeugt die DNA-Polymerase gegenüber einem, als Templat dienenden, DNA-Einzelstrang einen komplementären DNA-Einzelstrang, indem sie passende Nucleotide, die als Triphosphate im Reaktionsmedium vorhanden sind, Schritt für Schritt über Phosphordiester-Brücken zu einem Polymer (DNA-Strang) verknüpft (Abbildung 29). Zur Initiation dieser Katalyse muss ein kurzes, als Primer bezeichnetes, komplementäres Oligonucleotid an den Templatstrang hybridisieren, an dessen 3'-OH-Ende die Kettenverlängerung der DNA-Polymerisation beginnt.

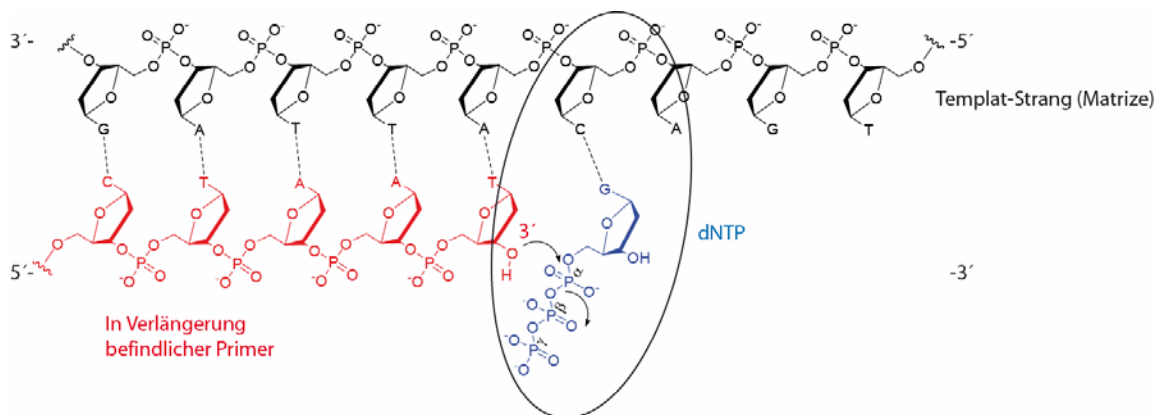


Abbildung 29: Schema des von der DNA-Polymerase katalysierten nucleophilen Angriffs der 3'-Hydroxy-Gruppe eines naszierenden Primers an das α -Phosphoratom eines Nucleosid-5'-O-triphosphats (dNTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat und Ausbildung einer Phosphordiesterbindung.

Es gelang die vier Nucleoside der DNA an der Base zu funktionalisieren, in Triphosphate zu überführen und alle natürlichen dNTPs durch diese modifizierten Spezies in Primer-Verlängerungsreaktionen (Primer-Elongation) und sogar Polymerase-Kettenreaktionen (PCR; engl. *polymerase chain reaction*) zu ersetzen.

Dabei werden die neuen chemischen Funktionalitäten so an die vier Nucleobasen geknüpft, dass die *Watson/Crick*-Basenpaarung nicht beeinträchtigt wird. Die geeigneten Ankerstellen für Modifikationen an den Pyrimidinen befinden sich an der C-5 Position der Nucleobase (siehe auch Kapitel 3.1.1.1 und

Abbildung 43) und die optimale Position an den Purinen ist die Position 7 des Nucleobasen-Heterobicyclus. Um eine Modifikation an dieser Stelle einzubringen, wird der N7 Stickstoff der Purine durch einen Kohlenstoff ersetzt (7-Deazapurine). Das verlangt eine komplette *de novo* Synthese der Purin-Nucleobasen und somit des gesamten Purin-Nucleosids. Der Zuckerphosphat-Rest bleibt unverändert, um eine natürliche B-DNA-Struktur der resultierenden dsDNA zu gewährleisten. Die in die Triphosphate überführten funktionalisierten Nucleoside (fdNTP) werden als Substrate von DNA-Polymerasen erkannt und sequenzspezifisch gegenüber ihren komplementären natürlichen Analoga eingebaut. In Primer-Verlängerungsreaktionen konnte gezeigt werden, dass jedes natürliche Nucleosid-Triphosphat (dNTP) gegen ein beliebig modifiziertes Nucleosid-Analogon ausgetauscht werden kann. So wurden DNA-Doppelstränge, bestehende aus einem funktionalisierten (fdNA) und einem nicht-funktionalisiertem DNA-Strang enzymatisch hergestellt (fdNA-DNA-Hybrid).^[5] In einem nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass auch ein fdNA-Einzelstrang, in dem jede Nucleobase durch ein C5-funktionalisiertes Pyrimidin oder ein C7-modifiziertes 7-Deazapurin ersetzt wurde, selbst als Templat dienen kann, an dem wiederum sequenzspezifisch funktionalisierte Nucleoside von DNA-Polymerasen eingebaut werden. Daraus resultiert dann vollständig funktionalisierte, doppelsträngige DNA (dfDNA). Dabei müssen diese funktionalisierten Nucleosid-Triphosphate nicht denselben Satz an funktionellen Gruppen tragen wie der Templat-fdNA-Strang. Mit einem neuen Satz an funktionellen Gruppen resultiert eine Doppelsträngige fdNA, die acht unterschiedliche chemische Funktionalitäten besitzt, je einen Satz aus vier Funktionalitäten an einem der zwei hybridisierten fdNA-Stränge. Diese hochgradig funktionalisierten DNA-Doppelstränge werden auch als *high-density functionalized DNA* bezeichnet.^[4, 6] Die Vielfalt der so eingebrachten Funktionalitäten reicht von basischen über saure bis zu lipophilen Gruppen, die von DNA-Polymerasen als Substrate akzeptiert werden.

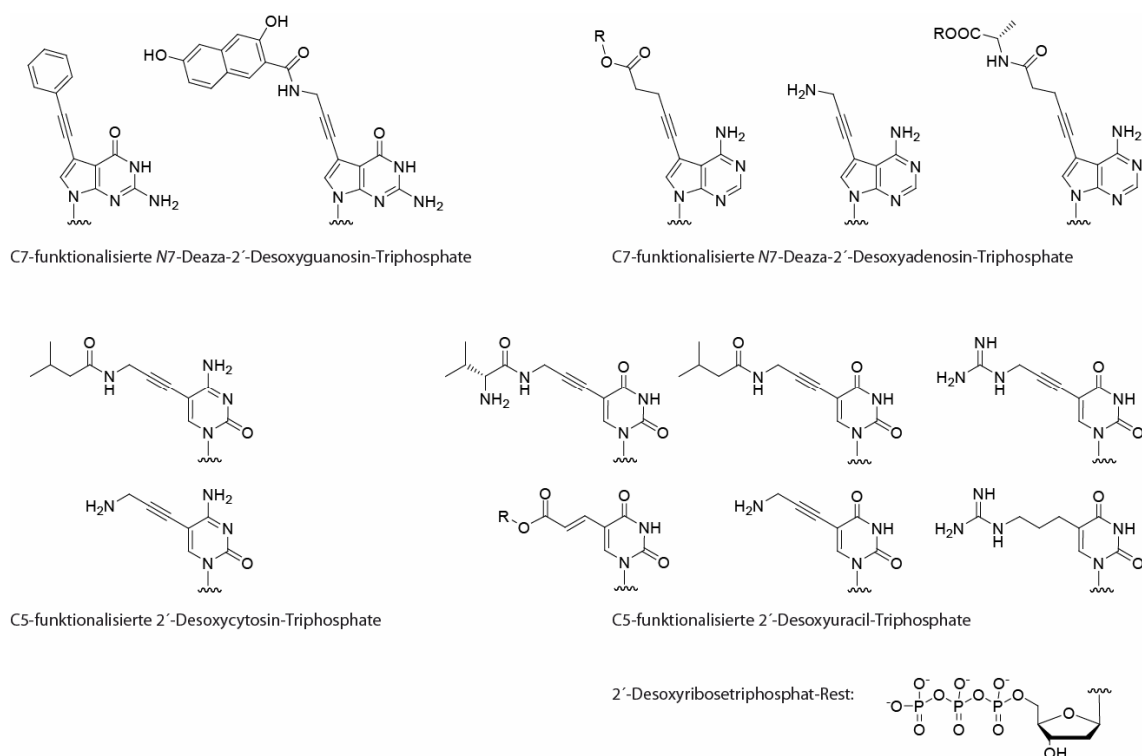


Abbildung 30: Auswahl der von *Famulok et al.* in Primer-Verlängerungsreaktionen und PCR-Experimenten verwendeten modifizierten 2'-Desoxynucleosid-Triphosphate (fdNTP).^[4, 6]

Die für den erfolgreichen Einbau der funktionalisierten Nucleosid-Triphosphate entscheidende Akzeptanz der verwendeten DNA-Polymerase gegenüber dem nicht-natürlichen dNTP-Analog ist dabei keine Selbstverständlichkeit. In den Studien wurde ein signifikanter Unterschied in der Toleranz bei den im Laboralltag verwendeten rekombinanten DNA-Polymerasen der Familien A und B festgestellt. Auf der Basis von Sequenzhomologien werden DNA-Polymerasen in unterschiedliche Familien und Unter-Familien klassifiziert. Zur Zeit werden 6 Hauptfamilien (A, B, C, D, X und Y) unterschieden.^[82] Trotz der unterschiedlichen Sequenz zeigen die DNA-Polymerasen der Familie A und B eine große Ähnlichkeit im strukturellen Aufbau.^[83, 84] In den Primer-Verlängerungsstudien und den PCR Experimenten erwiesen sich aber die Polymerasen der Sequenzfamilie B als deutlich toleranter gegenüber den modifizierten Nucleosid-Triphosphaten.^[4] Diese Unterschiede werden vor allen Dingen deutlich, wenn, statt vergleichsweise einfachen Templaten mit gleichbleibender Häufigkeit und Verteilung der vier unterschiedlichen Nucleobasen, anspruchsvollere Sequenzen gleicher Länge gewählt werden. Die anspruchsvolleren Sequenzen bestehen aus Abfolgen sich mehrfach direkt hintereinander wiederholender (bis zu vier mal hintereinander, z.B. GGGG) Nucleobasen mit Lücken ausgewogener Basenverteilung. Im Falle des Einbaus von funktionalisierten dNTPs bedeutet dies eine lokale Anreicherung gleicher Funktionalitäten und sterischer Ansprüche, die eine Herausforderung für die betreffend Polymerase darstellen können. Durch

Vergleich der Menge des entstehenden Vollängenprodukts bei Primer-Verlängerungsreaktionen, einmal mit natürlichen dNTPs im anderen Fall mit vollständig funktionalisierten dNTPs, unter Einsatz von DNA-Polymerasen beider unterschiedlicher Familien (Typ A: *KF* (exo-), *Tth*; Typ B: *Vent* (exo-), *Tgo*, *Pfu* (exo-), *Pwo*), zeigte sich, dass die Enzyme der Familie B ähnliche Ausbeuten bei der Bildung von fdNA und DNA erzielten. Die Ausbeuten der Familie A Polymerasen ist hingegen bei den anspruchsvolleren Sequenzen deutlich reduziert und bei häufig auftretenden Wiederholungen von dA oder dT wurde zum Teil sogar kein Vollängenprodukt nachgewiesen. Die besten Resultate bei der Primer-Verlängerungsreaktion wurden mit den DNA-Polymerasen des B-Typs *Pwo* und *Vent* (exo-) erzielt. Eine bemerkenswerte Eigenschaft der entstandenen fdNA:DNA Hybride, die im Einklang mit der festgestellten erhöhten Helix-Stabilität in Schmelzpunktexperimenten steht, ist die Resistenz gegenüber dem Verdau durch das Enzym *Pwo* mit 3'→5' Exonuclease-Aktivität. Die Exonuclease-Aktivität ist Teil des korrekturlesenden und fehlerkorrigierenden Systems einiger DNA-Polymerasen und wird absichtlich in einigen rekombinanten DNA-Polymerasen, wie *Vent* (exo-), ausgeschaltet. *Pwo* besitzt diese Exonuclease-Aktivität und baut die natürlichen Vollängenprodukte der Primer-Verlängerungsreaktion bei langen Elongationszeiten (>30 Min.) ab. Dieses Phänomen wird bei fdNA nicht beobachtet; ein Hinweis auf die erhöhte Stabilität des fdNA:DNA-Duplex. Die Duplex-Stabilität von hochfunktionalisierter doppelsträngiger fdNA ist sogar noch weiter erhöht, so dass PCR Reaktionen, die eine Separation von Doppelsträngen (sogenanntes „Aufschmelzen“ oder Denaturieren) in Zyklen benötigen, die üblicherweise durch eine Erhöhung der Temperatur auf 95 °C erreicht wird, nicht ohne Weiteres stattfinden. Das Prinzip der PCR das hinter der enzymatischen Vervielfältigung einer DNA-Zielsequenz steht, ist eine sich in Zyklen wiederholende Folge von Reaktionen in deren Zentrum die Primerverlängerung, wie sie oben bereits beschrieben wurde, steht. Eine typische Reaktionslösung enthält die zu vervielfältigende DNA in geringen Mengen als Doppel oder Einzelstrang und passende komplementäre Primer für Strang und Gegenstrang, eine thermostabile DNA-Polymerase sowie alle vier dNTPs. Der Zyklus beginnt mit dem Aufschmelzen doppelsträngiger DNA durch Erhitzen der Reaktionslösung auf 95 °C; dem schließt sich die Hybridisierung der Primer an die Einzelsträngige DNA an (üblicherweise bei 50-52 °C), gefolgt vom Elongationsschritt bei ca. 72 °C, bevor ein neuer Zyklus mit dem Schritt des Aufschmelzens beginnt. Man erhält eine exponentielle (2^x , x= Anzahl der Zyklen) Vervielfältigung der Zielsequenz. Dies konnte im Fall der fdNA durch Verwendung von fdNTP und fdNA als Ausgangsmaterial auch realisiert werden, jedoch nur unter Erhöhung der Temperatur des jeweiligen Denaturierungsschritts am Anfang eines Zyklus von 95 °C auf 99 °C und den Zusatz

chemischer Additive wie DMSO, Formamid und kommerziellen Reagenzien (GC-Rich Solution, *Roche*) zur Überwindung der erhöhten Duplex-Stabilität. Die Anforderungen bei PCR-Reaktionen an die DNA-Polymerasen sind ungleich höher, da der Primer-Elongationsschritt kürzer ausfällt als bei einfachen Primer-Verlängerungsreaktionen und die Korrekturfunktion weniger stark zum tragen kommt. Der sich wiederholende Temperaturwechsel kann ebenfalls die Selektivität des Einbaus beeinträchtigen. Der Erhalt der Sequenz bei der PCR-Reaktion von fDNA wurde durch Sequenzierungsexperimente nach der Didesoxymethode nach *Sanger*^[85] für die nicht anspruchsvollen Templat-Sequenzen bestätigt. Bei anspruchsvolleren Sequenzen mit sich hintereinander wiederholenden Nucleobasen wurde die Sequenztreue an den repetitiven Regionen oftmals nicht erhalten.

1.3.1.2 Basenstapelung und Interkalator modifizierte Nucleoside

Das Beispiel des bemerkenswerten Stabilitätsgewinns der Doppelhelices von xDNA und yDNA durch die erhöhte π - π -Wechselwirkungsfläche der Basenstapelung zeigt eindrucksvoll den wichtigen Beitrag dieser Wechselwirkung zur Duplexbildung, neben der Wasserstoffbrücken-Bindung. Die aromatische π - π Basenstapelung findet zwar hauptsächlich zwischen den benachbarten Nucleobasen eines Stranges statt, aber durch die helikale Windung sind auch die Basen des jeweils anderen Stranges anteilig beteiligt.^[77] In allen doppelhelikalen Nucleinsäure-Strukturen befinden sich die Nucleobasen im π - π *van der Waals* Kontakt, was einem Abstand von ca. 3.4 Å der Basen-Flächen voneinander nahekommt, also der Ausdehnung des π -Systems eines aromatischen Ringes entspricht.^[47] Untersuchungen an kurzen RNA-Helices haben ergeben, dass die bicyclischen Purine stärkere Basenstapelung aufweisen als Pyrimidine. An noch kleineren Modell-Molekülen wurde das Stapelungsverhalten einfacher aromatischer Kohlenwasserstoffe mit Adenin-Derivaten gemessen (Abbildung 31), mit dem Resultat, dass die überlappende aromatische Fläche einen maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität bzw. den Energiegewinn hat.^[77]

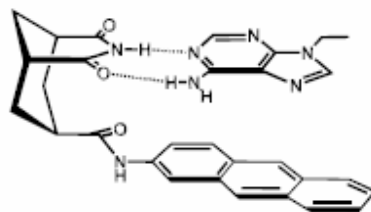


Abbildung 31: Beispiel eines Modell-Systems zur Bestimmung der aromatischen π - π Basenstapelung in Wasser.^[86] Die Bindung des Adeninderivats wird in Abhängigkeit verschiedener aromatischer π -Stapelungs-Partner bestimmt. Die gemessene freie Enthalpie korreliert dabei gut mit der aromatischen Fläche des Interaktionspartners.^[77]

Dabei muss eine große Anzahl an Parametern berücksichtigt werden, wie beispielsweise Dispersionskräfte, Dipol-induzierte Dipol-Wechselwirkungen, Solvat-Effekte und auch elektrostatische Effekte. Allgemein lassen sich Nucleinsäure-Duplexe signifikant stabilisieren, wenn an den Helixenden Nucleobasen mit starker Basenstapelungstendenz eingefügt werden, selbst wenn diese nicht an Basenpaarung teilnehmen.^[77]

Das Prinzip der auf aromatische π - π -Wechselwirkung beruhenden Basenstapelung machen sich auch kleine, häufig polycyclische, planare, aromatische Moleküle zu nutze wenn sie in DNA interkalieren. Die Interkalation ist ein Bindungs-Modus, der Auftritt, wenn der Zwischenraum von benachbarten Basenpaaren doppelsträngiger DNA ausreichenden Platz (3.4 Å) bietet, dass aromatische Ringsysteme in diese Zwischenräume insertieren können.^[87] Diese Einlagerung geht einher mit einer Separation der vormals direkt benachbarten Basenpaare, die nun wie zwei Sandwich-Hälften das interkalierende aromatische Molekül in ihrer Mitte umgeben. Der Abstand der Basenpaare beträgt dann ca. 6.8 Å statt der normalen 3.4 Å.^[88] Dieses klassische Modell der Interkalation wurde bereits in den frühen 1960er Jahren von *Lerman*^[89-92] formuliert und in Studien durch Messung der Interaktion von planaren aromatischen Systemen wie Acridin (Abbildung 32) mit DNA experimentell bestätigt.^[87] Studien an Molekülmodellen bestätigten, dass die B-Form DNA Doppelhelix durch Drehung an nur einer Einfachbindung so gestreckt werden kann, dass zwischen den Basenpaaren die erforderliche Lücke von 3.4 Å entstehen kann, um interkalierende aromatische Gast-Moleküle zuzulassen.^[87, 90] Das klassische Interkalationsmodell beschreibt die folgenden entscheidenden Merkmale: die Struktur und die Wasserstoffbrücken-Bindungen der B-DNA müssen beibehalten werden; zwei direkt benachbarte Basenpaare separieren voneinander um eine planare Lücke für die Interkalation zu erzeugen; eine Entwindung und damit eine Streckung der Doppelhelix entlang der Helix-Achse wird induziert und ein (poly-)cyclisches, flaches, planares, aromatisches System des Interkalators wird zwischen und parallel zu den Basenpaaren insertiert, so dass der Raum der durch die Helix-Streckung entstanden ist voll ausgefüllt wird.^[87] Durch die Entdeckung von geschlossener superhelikaler DNA - DNA-Ringe die zusätzlich zu ihrer helikalen Verdrillung die aus der B-DNA-Form resultiert in sich weiter verdrillt sind - erlaubte die quantitative Bestimmung der Entwindungs-Winkel die durch Interkalation induziert werden. Während ein Interkalator zu eine Lösung von superhelikaler zirkulärer DNA hinzu titriert wird, wird die Doppelhelix langsam entwunden und im Zuge dessen auch die Superspiralisierung der Superhelices aufgedreht bis keine superhelikale Struktur mehr vorhanden ist. Wenn die anfängliche Anzahl an superhelikalen Windungen bekannt ist und die Menge an gebundenem Interkalator zur Entfernung dieser Windungen bestimmt wird, kann der durch-

schnittliche Entwindungswinkel errechnet werden.^[87, 93] Einer der größten bestimmten Entwindungswinkel ist der von Ethidiumbromid (26° , Abbildung 32); klassische Interkalatoren wie Acridin erzeugen Entwindungswinkel von 17° - 20° .^[87, 94] Interkalatoren sind vielseitig einsetzbar, beispielsweise als Medikamente gegen so unterschiedliche Krankheiten wie parasitäre Infektionen oder Krebs. Der fluoreszierende Farbstoff Quinarcin (Abbildung 32) wurde während des zweiten Weltkriegs und bis in die 1950er Jahre als Anti-Malaria Therapeutikum eingesetzt, bevor es durch bessere Medikamente, unter Anderem auch dem Interkalator Chloroquin (Abbildung 32 und vgl. Kapitel 3.3.3), abgelöst wurde. Quinarcin wird auch häufig in zytochemischen Analysen zur Anfärbung von Chromosomen eingesetzt. Der Interkalator Acridin-Orange wird zum Anfärben von DNA in der Mikroskopie verwendet, während Ethidiumbromid das Standard-Reagenz zur Detektion von Nucleinsäure-Banden in den meisten gelelektrophoretischen Experimenten darstellt. Anthracycline wie das Daunomycin und Adiamycin (Abbildung 32) sind wichtige Medikamente in der Krebs-Bekämpfung. Auch die einfachen aromatischen Kohlenstoffe Anthracen und Pyren (Abbildung 32) sind stark fluoreszierend und gute Interkalatoren. Wie alle potentiellen Interkalatoren, sind sie auch potentiell Krebs-erregend, da die Enzyme des Replikations- und Transkriptions-Apparates interkalierte DNA zum Teil fehlerhaft lesen und die Replikations- und Transkriptions-Genauigkeit stark nachlässt. Einfache aromatische Kohlenwasserstoffe waren unter den ersten Strukturen die als Ersatz für die natürlichen Nucleobasen in Nucleoside eingebaut wurden. Das Benzen als Prototyp eines aromatischen Systems wurde schon 1984 als Nucleobasen-Ersatz an die C1'-Position einer Ribose eingeführt.^[95] Seit dem sind eine ganze Palette solcher einfachen aromatischen Kohlenwasserstoff-Modellsysteme, vom monocyclischen bis zu tetracyclischen Strukturen (Benzen, Naphthalen, Phenanthren, Pyren siehe Abbildung 26), über DNA-Festphasensynthese in DNA eingebracht worden.^[47] Bei der Untersuchung der thermodynamischen Stapelungsaffinität natürlicher Nucleobasen mit solchen einfachen aromatischen Kohlenwasserstoff-Analogen zeigte sich, dass zusätzlich zur wechselwirkenden Oberfläche auch die Hydrophobie ein für die π - π -Stapelung vorteilhaften Einfluss ausübt. So wurde für Pyren-derivatisierte Nucleosid-Analoga eine Stabilisierung der DNA um 1.7 kcal/mol bestimmt und in Schmelzpunktmessungen eine Erhöhung der Schmelztemperatur T_m um 11.5°C pro Pyren-Nucleosid-Substitut festgestellt.^[77]

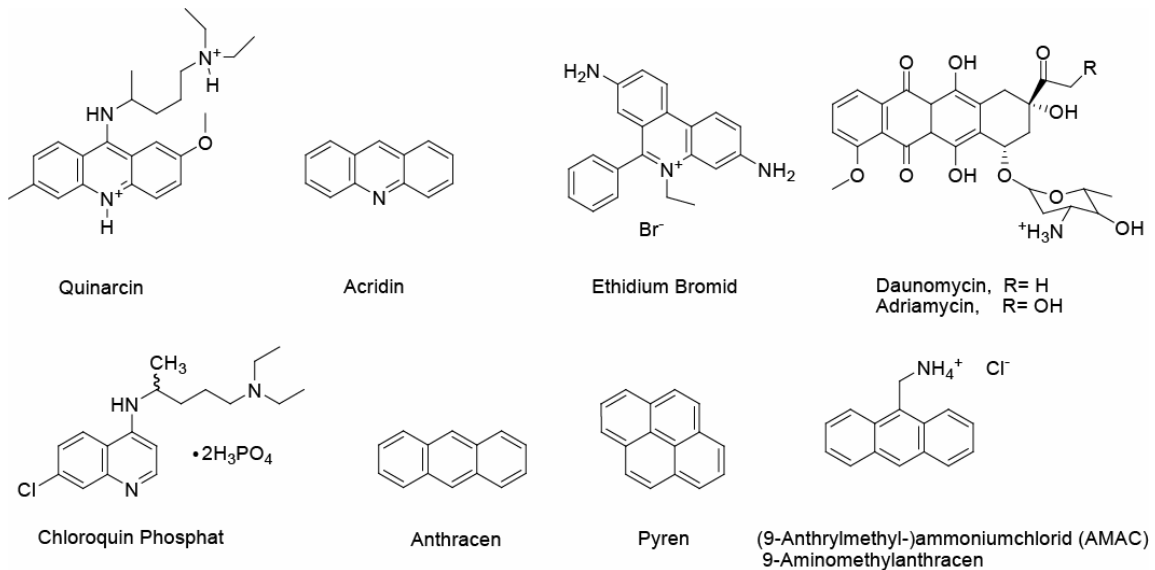


Abbildung 32: Eine kleine Auswahl wichtiger Interkalatoren aus Medizin und Forschung.

Pyren als starkes Fluorophor reiht sich mit den vorher bereits erwähnten 2-Aminopurine und Ethenoadenine in die Klasse der Moleküle ein, die als inhärent fluoreszierender Basenersatz dienen können. Es entsteht so eine wachsende Bibliothek von Nucleosiden mit durch Fluorophore ausgetauschten Basen, die auch als Fluoroside (Fluoroside in Analogie zu Nucleosiden) oder fluorophore Desoxyriboside bezeichnet werden und sich für manche Anwendungen als sehr nützlich erweisen können, da sie an der Basenstapelung der DNA partizipieren, statt in der Peripherie an einem flexiblen Linker zu hängen.^[47]

1.3.1.3 Abasic Site (Abasische Stellen) enthaltende Nucleinsäuren

Das im letzten Abschnitt erwähnte Pyren-Derivat natürlicher Nucleoside (dP) wurde von *Kool et al.* auch erfolgreich in das korrespondierende Triphosphat überführt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Nucleosidtriphosphat als Substrat von DNA Polymerasen erkannt wird und diese das hydrophobe Pyren-Desoxynucleotid spezifisch gegenüber Abasic Sites in DNA-Doppelstränge einbauen.^[96, 97]

Abasic Sites (Abasische Stellen) sind eine der am häufigsten vorkommenden Formen der DNA-Schädigung und werden auch als Intermediate bei der Reparatur von DNA-Schäden erzeugt.^[98, 99]

Abasic Sites entstehen durch Hydrolyse der C1'-Nucleobasen Bindung. Unter physiologischen Bedingungen ist dies ein sehr langsamer Prozess der meist Deoxyadenosin betrifft und zu einer De-Purinierung führt. Dieser Prozess wird bei niedrigem pH-Wert beschleunigt und begünstigt, wenn bereits eine oxidative Beschädigung der Nucleobase vorliegt. Geschädigte Nucleobasen können auch

enzymatisch durch DNA *N*-Glycosylase vom Zucker gespalten werden, was auch zu einer Abasic-Site führt. Eine solche Abasic Site (dR, Abbildung 34) liegt hauptsächlich in ihrer cyclischen Furanose-Form vor, ist aber sehr instabil, vor allem im basischen Medium. Die Instabilität resultiert aus der Reaktivität der im Gleichgewicht stehenden tautomeren, offenkettigen Aldehyd-Form die sich unter β -Eliminierung zersetzt. Zum Studium der Eigenschaften von Abasic Sites wird deshalb meist ein stabiles Tetrahydrofuran-Analog (häufige kommerzielle Bezeichnung dSpacer, Abbildung 34) verwendet.^[100] Dieser Variante einer Abasic Site fehlt das C1'-OH und sie ist während der Oligonucleotid-Festphasensynthese, der Reinigung und Aufbewahrung stabil. Alternativ kann die reaktive instabile Abasic Site mit C1'-OH im Labor durch die Behandlung von 2'-Desoxyuridin enthaltender DNA mit *N*-Uracil-Glycosylase erzeugt werden. Abasic Sites können eine signifikante strukturelle Störung in der DNA-Doppelhelix hervorrufen und die Helix-Stabilität messbar beeinträchtigen. Die Platzierung eines Pyren-Nucleotids gegenüber einer Abasic Site in einem DNA-Doppelstrang führt zu einer signifikanten Stabilisierung des Duplex, verglichen mit einem Doppelstrang gleicher Sequenz aber einer regulären Nucleobase mit kleinerer π -Elektronenfläche gegenüber der Abasic Site. Der Einbau des Pyren-Nucleotids in den Gegenstrang zur Paarung mit der Abasic Site gelang sowohl über die Festphasensynthese eines Gegenstrangs (Abbildung 33, unten), als auch in einer enzymatischen Reaktion durch selektive Inkorporation eines Pyren-Nucleosid-Triphosphats an die gegenüberliegende Stelle eines dSpacers (Abbildung 33, oben).

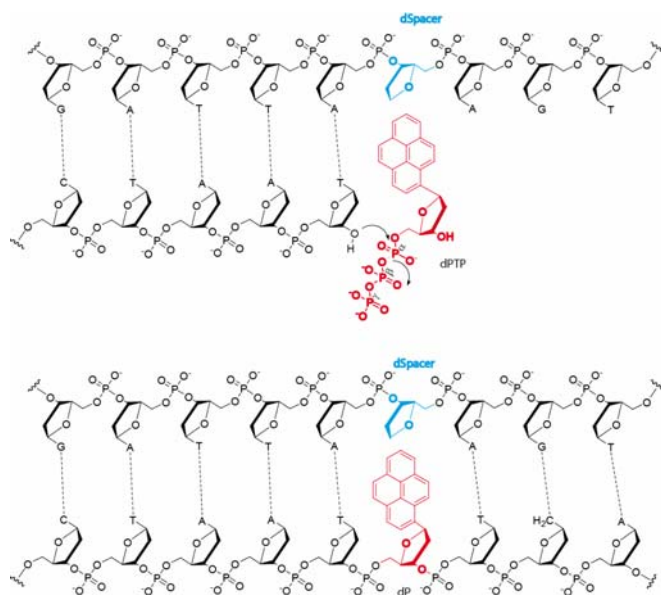


Abbildung 33: Oben dargestellt ist die selektive enzymatische Inkorporation eines Pyren-Nucleosid-Triphosphats (dP) gegenüber einer Abasic Site (dSpacers) und unten die Hybridisierung zweier jeweils durch Festphasensynthese erzeugter komplementärer Oligonucleotide mit einem dP gegenüber einem dSpacer in der Doppelstrangsequenz.

DNA-Schmelzpunktbestimmungen zeigten, dass Oligonucleotid-Doppelstränge mit dP:dSpacer Paaren ähnliche Schmelztemperaturen wie dA:dT Paar enthaltende Vergleichs-Oligonucleotide haben. Messungen der freien Enthalpie bestätigten außerdem, dass die Paarung von dP mit dSpacer in der Ausbildung von Oligonucleotid-Duplexen gegenüber der Paarung von dP oder dSpacer mit irgendeiner der vier natürlichen Nucleobasen oder der kompletten Entfernung des Paares favorisiert ist. Diese Beobachtungen unterstützen noch einmal die Hypothese der sterischen Komplementarität die zusammen mit der Basenstapelung für die erfolgreiche spezifische Duplex-Bildung und auch Replikation ausreichend sein könnte, trotz Fehlen der Wasserstoffbrücken-Bindungen.^[96, 97]

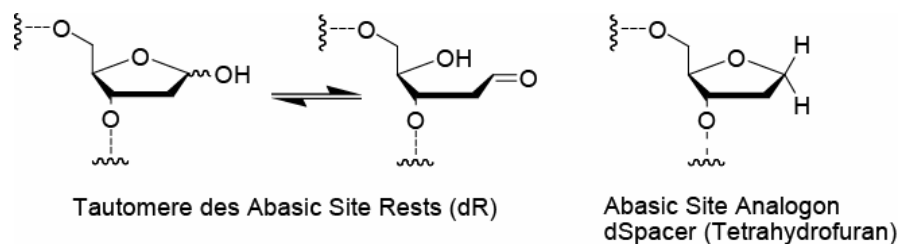


Abbildung 34: Darstellung der Furanose-Form und der reaktiven, offenen Aldehyd-Form einer Abasic Site (links, Gleichgewicht). Rechts: Kommerziell erhältliches Abasic Site-Analogon dSpacer.

Im Zuge dieser Untersuchungen wurde durch molekulares Modeling gezeigt, dass das Pyren-Desoxyribosid nahezu die gesamte Distanz zwischen den beiden Zuckerphosphat-Rückgräten überspannt und mit einer Fläche von ca. 22 \AA^2 auch nahezu die gesamte Oberfläche eines regulären Basenpaares (ca. 27 \AA^2) abdeckt.^[96] So zeigt der Pyren-Rest die optimale Passform für die freie Cavität die gegenüber einer Abasic Site entsteht und besitzt zusätzlich zur passenden Geometrie auch ein ungestörtes π -System das effizient mit den flankierenden Nachbar-Basenpaaren stapeln kann. Das letzte Beispiel zeigt, dass auch Abasic Sites Regionen spezifischer molekularer Erkennung darstellen, was auch zu einer gezielten Interaktionen zwischen Molekülen genutzt werden kann. Die molekulare Erkennung an Abasic Sites im wässrigen Medium, auf Basis der spezifischen Wasserstoffbrücken-Bindungen der Nucleinsäuren, könnte als Anker-Region, als molekulare Sonde oder Schalter genutzt werden.

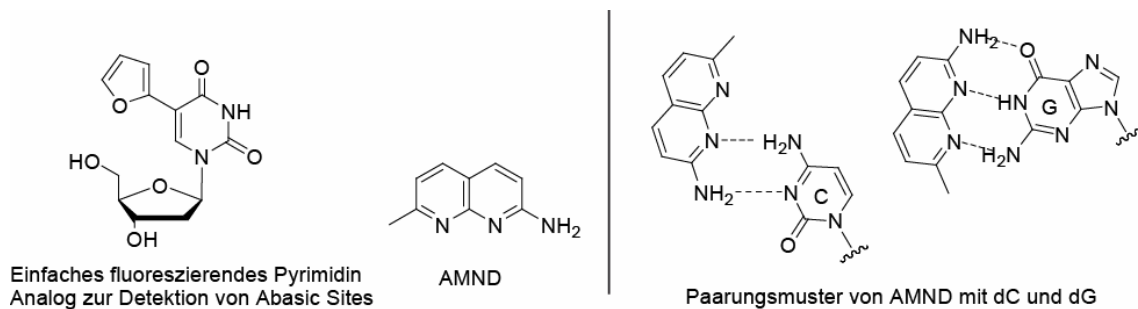


Abbildung 35: Zwei Beispiele für fluoreszierende Abasic Site Sonden (links) und Paarungsmuster von AMND mit zwei verschiedenen Nucleobasen gegenüber einer Abasic Site (rechts).

Ein Beispiele für ein Abasic Site detektierendes Nucleosid ist das Pyrimidin Analogon (Abbildung 35, ganz links) von *Tor et al.*^[101], bei dem es sich allerdings um ein modifiziertes dU und nicht um ein basenersetztes Nucleosid handelt, das über Festphasensynthese in einen Komplementärstrang eingebaut wird. Befindet sich das modifizierte Nucleosid gegenüber einer Abasic Site ist eine Fluoreszenz-Emission des modifizierten Nucleosids eindeutig messbar. Jedoch ist im gepaarten Zustand mit einer Nucleobase keine Fluoreszenz beobachtbar. Die Detektorsonde ist hierbei an einem komplementären DNA-Strang befestigt. Alternativ können auch einfach Nucleobasen-Analoga, die nicht an Oligonucleotide mit ihrem Zuckerphosphat-Gerüst gebunden sind, sondern einfach aus einem aromatischer Heterocyclensystem mit geeigneten Wasserstoffdonor und -akzeptorstellen bestehen, als Abasic Site Sonden dienen. Ein Abasic Site enthaltender DNA-Einzelstrang, der mit einem normalen komplementären DNA-Strang zum Duplex hybridisiert wird, erzeugt in der Abasic Site Region eine hydrophobe Bindungstasche gegenüber einer Nucleobase. Diese hydrophobe Cavität kann durch planare Moleküle mit entsprechender Geometrie, der zur Basenstapelung nötigen aromatischen π -Elektronenfläche und dem zur gegenüberliegenden Nucleobase passenden Donor/Akzeptor-Muster gefüllt werden. So wurde beispielsweise das fluoreszierende Nucleobasen-Analogon 2-Amino-7-methyl-naphthyridine (AMND, Abbildung 35) erfolgreich zur Detektion von Abasic Sites eingesetzt.^[98] AMND detektiert Abasic Sites gegenüber allen vier natürlichen Basenpaaren, was durch deutliche Fluoreszenzänderungen (Fluoreszenz-Reduzierung beim Bindungsereignis) gemessen wurde. Keine molekulare Erkennung und somit keine Fluoreszenz-Änderung wurde bei regulären DNA-Duplexen verzeichnet. Schmelzpunkt-Experimente zeigten auch hier, dass durch die Basenstapelung die Schmelztemperatur der Abasic Site enthaltenen Duplexe durch die Inkorporation der AMND Sonde erhöht wurde. Die größte Stabilisierung erfährt dabei der Duplex mit Abasic Sites gegenüber dC. Obwohl AMND mit dG beispielsweise drei Wasserstoffbrücken auszubilden vermag, im Gegensatz zu nur zwei Wasserstoffbrücken mit dC (Abbildung 35, rechts), scheint die

Größe und geometrische Ausrichtung des Paares AMND:dC einen größeren Einfluss auf die Stabilität zu haben als die Anzahl an Wasserstoffbrücken.

Dies scheint dadurch bestätigt, dass Duplexe mit dSpacer:dT Paaren bei der Stabilisierung durch AMND an zweiter Stelle stehen, was durch die Verwandtschaft des bicyclischen Moleküls AMND zu den Purinen erklärbar ist. Die Fluoreszenz-Änderung während der Titration von AMND zum Abasic Site enthaltendem Duplex gegenüber einem dC ergab einen Titrations-Endpunkt bei einer 1:1 Stöchiometrie. Die aus der Titrationskurve berechnete 1:1 Bindungskonstante zeigt eine vergleichsweise Starke Bindung mit $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ obwohl nur zwei Wasserstoffbrücken-Bindungen neben der Basenstapelung bei der Komplexbildung beteiligt sind.^[98] Eine andere, interessante Art die molekulare Erkennung an Abasic Sites durch aromatische Heterocyclus auszunutzen zeigen die Experimente von *Herschlag et al.*^[102] Die Forschergruppe synthetisierte verschiedene *Hammerhead*-Ribozym Varianten, die alle in der Nähe des katalytischen Zentrums Abasic Sites, statt der dort regulär vorhandenen Nucleobase enthalten. Die katalytische Aktivität dieser Ribozyme wurde durch diese Modifikation gegenüber dem Wildtyp signifikant reduziert. In einigen Fällen gelang es jedoch, durch Zusatz der fehlenden Nucleobase, die katalytische Aktivität nahezu wieder auf die Effizienz des Wildtyps zu regenerieren (*Rescue*-Experimente).

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Es existiert ein wachsendes Interesse an neuen Materialien und Methoden, die für den „*Bottom-up*“-Ansatz zur Erzeugung von höher geordneten zwei- und dreidimensionalen Strukturen im Nanometermaßstab geeignet sind. Wie einleitend (Kapitel 1.2) beschrieben wurde, eignen sich Nucleinsäuren als leicht zugängliches, einfach zu replizierendes biologisches Material sehr gut als Bausteine für solche Strukturen. Das logische Grundprinzip der spezifischen Basenpaarung erlaubt die Programmierung von Strukturinformationen in den strukturgebenden Baustein selbst. Mit den vielfältigen, etablierten Möglichkeiten der synthetischen und biochemischen Manipulation und Amplifikation von Nucleinsäuren und Nucleotiden, stehen eine Reihe von Werkzeugen zur Verfügung, um maßgeschneiderte Makromoleküle und Nanoarchitekturen für diverse Anwendungen zu erzeugen.

Im Rahmen dieser Dissertation soll neben der Watson-Crick-Basenpaarung eine weitere strukturgebende Wechselwirkungsmöglichkeit in DNA eingebracht werden. Durch Funktionalisierung von Nucleinsäuren an ihren Untereinheiten, den Nucleotiden, soll DNA zu einer zusätzlichen, von der Basenpaarung unabhängigen, nicht-kovalenten Interaktionsmöglichkeit befähigt werden.

Die Methode zur Einführung funktioneller Gruppen soll über ein vorfunktionalisiertes Nucleosid erfolgen, welches anschließend sehr einfach weiter derivatisiert werden kann. Durch diese Strategie entsteht ein modulares und flexibles Konzept das den synthetischen Zugang zu Nucleosiden und Oligonucleotiden mit diversen Modifikationen erlaubt (Abbildung 36 und Abbildung 37). Das Projekt umfasst somit die chemische Synthese von modifizierten Nucleosiden, die in Phosphoramidite überführt werden, um die Funktionalität dann durch DNA-Festphasensynthese in synthetische DNA einzubauen.

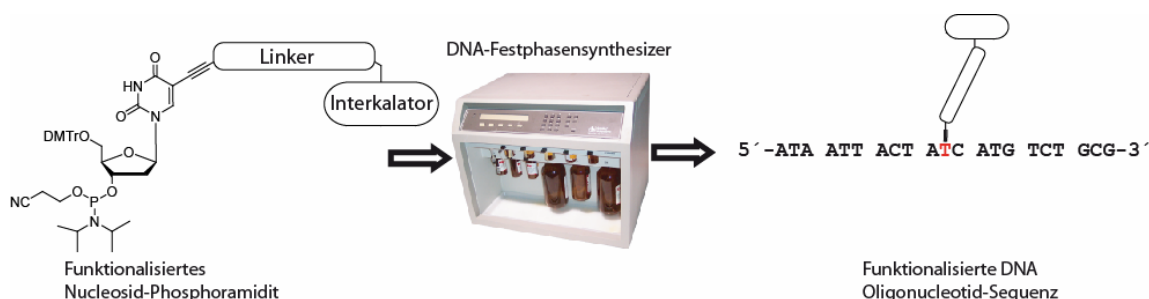


Abbildung 36: Das modifizierte Nucleosid-Phosphoramidit als allgemeine Ziel-Struktur der organischen Synthese (links) und kurze modifizierte DNA-Oligonucleotid-Zielsequenzen (rechts) für die spätere Inkorporation in DNA-Makromoleküle.

Als Modell-Funktionalität wird ein Interkalator-System gewählt, in Anlehnung an Experimente in denen mit Interkalatoren-derivatisierte Goldnanopartikel bereits erfolgreich an DNA gebunden wurden.^[36, 37]

Bei der Wahl eines geeigneten Interkalators soll die Fähigkeit zur Interkalation in Literaturbeispielen belegt sein und der Interkalator in seinen chemischen Eigenschaften kompatibel zur DNA-Festphasensynthese sein, also zum Beispiel keine ungeschützten nucleophilen Gruppen enthalten. Der Interkalator als funktionelle Gruppe wird über einen Linker an die Nucleobase eines Nucleosids geknüpft. Hierbei gilt es darauf zu achten, dass die Linkerlänge ausreicht, die Distanz zwischen dem eigenen Ankerpunkt in der großen Furche doppelsträngiger DNA bis in das Helixzentrum eines direkt benachbarten DNA-Doppelstrangs zu überbrücken, um so die Interkalation des am Linker befindlichen Substituenten in den benachbarten Dublex zu ermöglichen (Abbildung 38 unten). Andererseits müssen Effekte wie die Selbst-Interkalation durch ein zu langes Linkersystem vermieden werden.

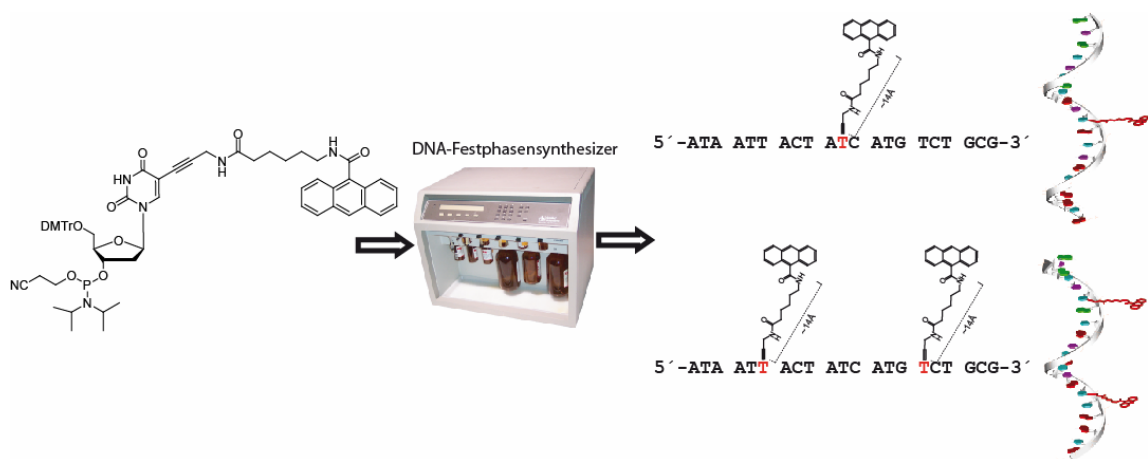


Abbildung 37: Konkrete Beispiele für ein modifiziertes Nucleosid-Phosphoramidit (links) und daraus synthetisierten kurzen funktionalisierten DNA-Oligonucleotid-Sequenzen (rechts) mit unterschiedlicher Anzahl und Position von Modifikationen.

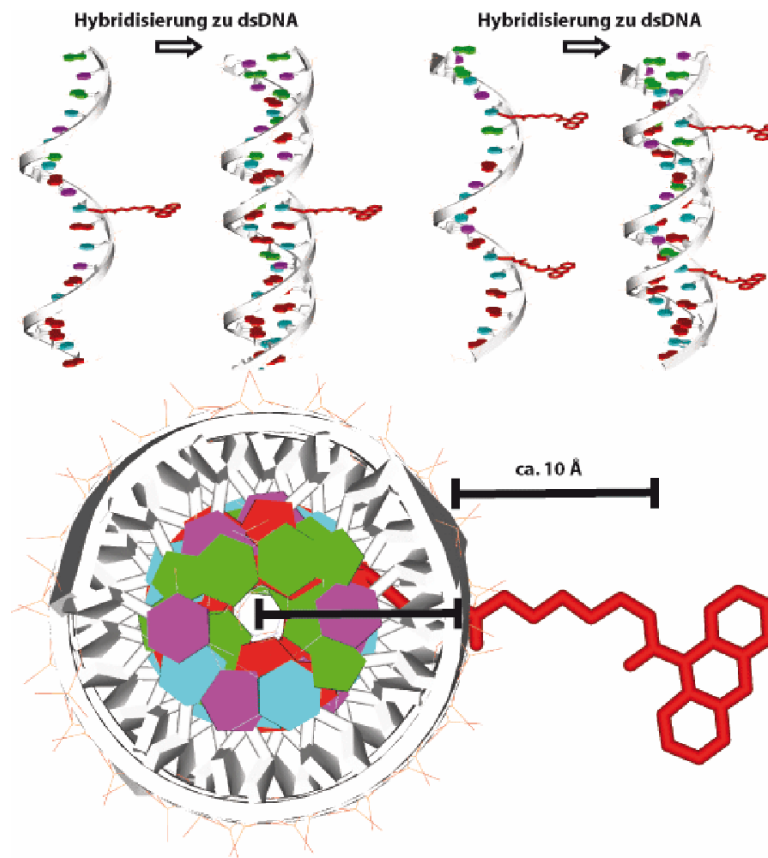


Abbildung 38 : Die obere Reihe zeigt die Ausbildung funktionalisierter dsDNA nach Hybridisierung mit einem komplementären unmodifizierten Gegenstrang. Unten: der Querschnitt (Blick entlang der Helixachse) einer funktionalisierten dsDNA. Der Linker-Arm ist lang genug um aus der Helix herauszuragen und die funktionelle Gruppe (Interkalator Anthracen) kann in eine benachbarte Helix interkalieren.

Ein direkter und sehr anschaulicher Nachweis für die kooperative Interaktion der funktionalisierten DNA mit anderen DNA-Doppelsträngen soll durch Visualisierung der Moleküle mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) geschehen (Abbildung 41). Zu diesem Zweck wird die am DNA-Synthesizer hergestellte funktionalisierte DNA mit biochemischen Methoden in größere DNA-Makromoleküle eingebracht (Abbildung 39). Diese Makromoleküle müssen die Eigenschaft besitzen, als vergleichsweise formstabile Nano-Objekte identifizierbar zu sein, um die Aggregation durch ihre nicht-kovalente Wechselwirkung miteinander mittels AFM zu detektieren. DNA-Miniplasmide erfüllen die Anforderungen an ein solches DNA-Makromolekül: Sie sind ausreichend formstabil, besitzen eine definierte Größe im Nanometer-Bereich, wurden bereits erfolgreich mit Rasterkraftmikroskopie untersucht und sind synthetisch mit Hilfe von biochemischen Methoden zugänglich, die das Einbringen von funktionalisierter DNA erlauben (Abbildung 40 und Abbildung 42).

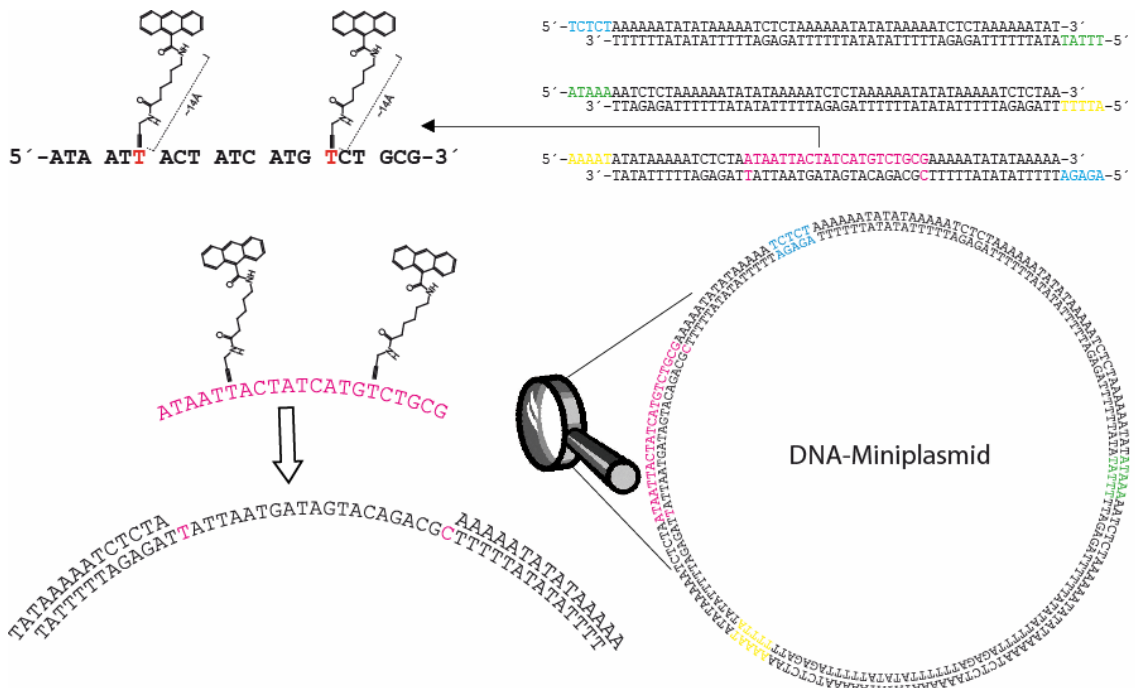


Abbildung 39: Aufbau und Sequenz eines DNA-Miniplasmids als potentielles DNA-Nanoobjekt (rechts), das durch Hybridisierung mit modifizierten Oligonucleotiden (links) funktionalisiert werden kann.

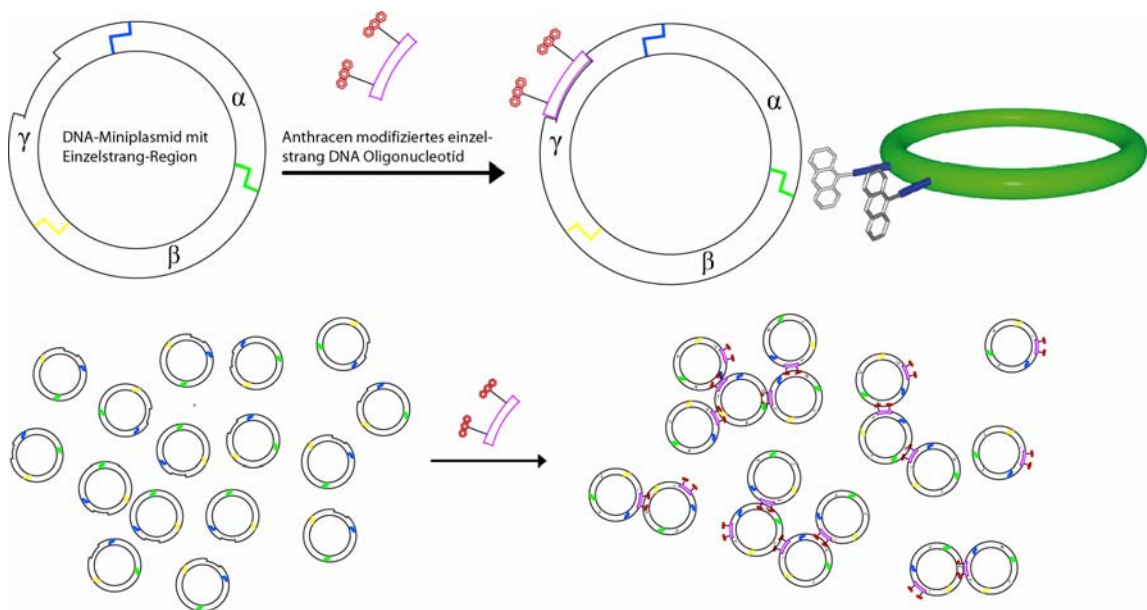


Abbildung 40: Schema der *in situ* Funktionalisierung von DNA-Miniplasmiden durch Hybridisierung mit funktionalisierten Oligonucleotiden (oben). Induzierung von Aggregation (unten rechts) und Aufhebung der statistischen Verteilung der DNA-Nanoobjekte (unten links) durch Funktionalisierung.

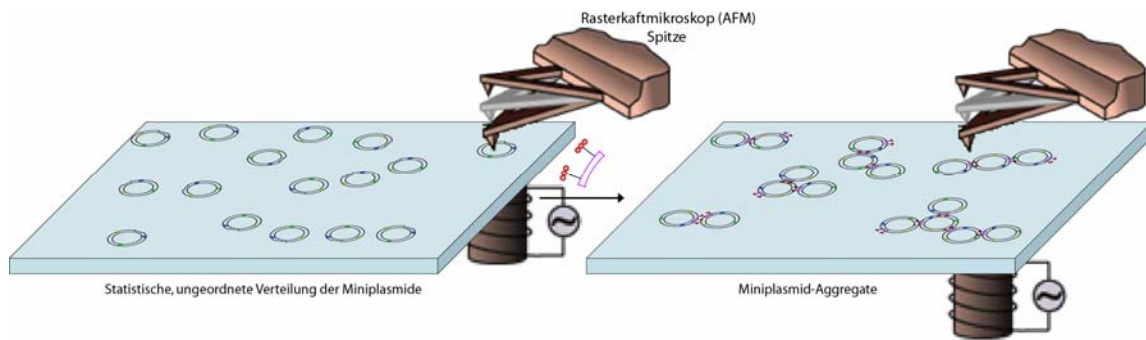


Abbildung 41: Nachweis der Interaktion der Miniplasmide nach Hybridisierung mit funktionalisierter DNA durch Abbildung der Aggregate mittels Rasterkraftmikroskopie.

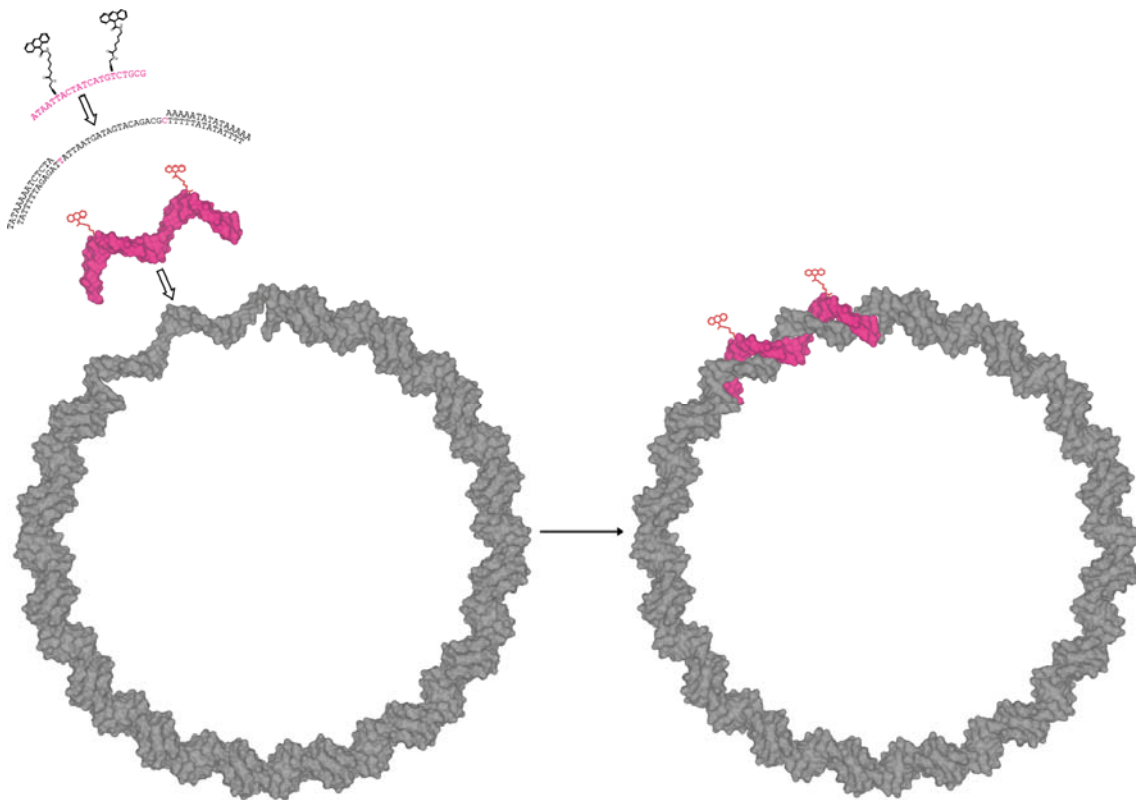


Abbildung 42: Gezeichnetes dreidimensionales Strukturmodell eines DNA Miniplasmids mit Einzelstrangregion (links) der durch die Hybridisierung mit einem komplementären Interkalator-modifizierten Oligonucleotid (violett) funktionalisiert werden kann (rechts).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese des C-5-modifizierten Desoxyuridin-3'-O-phosphoramidits (17)

3.1.1 Syntheseplanung

Im vorliegenden Projekt dienen DNA-Makromoleküle als Bausteine und Modell-Objekte, die durch Rasterkraftmikroskopie als nanometer-große Strukturen abgebildet werden sollen. Diese Objekte sollen mit Interkalatoren als zusätzlichen Funktionalitäten ausgestattet werden, um sie zu befähigen, mit anderen DNA-Objekten in Wechselwirkung zu treten und zu aggregieren. Um eine möglichst vielseitige Anwendbarkeit zu gewährleisten und methodische sowie synthetische Flexibilität zu erhalten, wurde ein modularer Aufbau gewählt, der es ermöglicht einzelne Komponenten zu verändern oder auszutauschen ohne das gesamte methodische oder synthetische Konzept verändern zu müssen. Die DNA-Makromoleküle lassen sich in kleinere Nucleinsäure-Fragmente als logische Einheiten zerlegen. Die DNA-Festphasensynthese erlaubt die Herstellung beliebiger DNA Sequenzen, die als Einzelfragmente durch Hybridisierung und/oder Ligation in die DNA Makromoleküle eingebracht werden können. Die funktionelle Modifikation kann an beliebiger Stelle durch die DNA-Festphasensynthese in diese Sequenzen inkorporiert werden. Als kleinste logische Bausteineinheit wurde deshalb das Nucleosid gewählt, um durch organische Synthese die funktionelle Modifikation einzubringen. Die Kompatibilität von basen-modifizierten Nucleosiden in der Phosphoramidit-Festphasensynthese von DNA und auch der enzymatischen Replikation und Amplifikation von DNA mit entsprechenden Nucleosid-Triphosphaten führte zum Entschluss, die Nucleobase als Ankerpunkt für Modifikationen zu wählen.^[4-6, 103]

Bei der Wahl eines geeigneten Nucleosid-Grundkörpers als Basis für ein Interkalator-modifiziertes Nucleosid-Phosphoramidit schien Thymidin (welches korrekterweise in seiner C-5 derivatisierten Form als Desoxyuridin bezeichnet werden muss) als sehr geeignet. Basen-modifizierte Pyrimidin Nucleoside sind generell relativ leicht synthetisch zugänglich und erweisen sich stabiler gegenüber Säuren als Purin Nucleoside.

3.1.1.1 C5-modifizierte Pyrimidin-Nucleoside

In doppelsträngiger DNA ist die C-5 Position der Pyrimidine nicht auf der an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligten Seite (Abbildung 43, oben). Sie weist in Richtung der großen Furche der DNA, so dass mit Linker versehene

Modifikationen aus der großen Furche herausragen. Diese signifikante sterische Toleranz macht die C-5 Position ideal als Ankerposition für über Linker angebrachte funktionelle Gruppen und Modifikationen mit keinen bis nur geringen Auswirkungen für die DNA-Basenpaarung.^[104] Um nicht mit den Wasserstoffbrücken der Basenpaarung zu interferieren, scheidet das Einbringen der Modifikation über eine exocyclische Amino- oder Hydroxygruppe aus (Abbildung 43, oben).

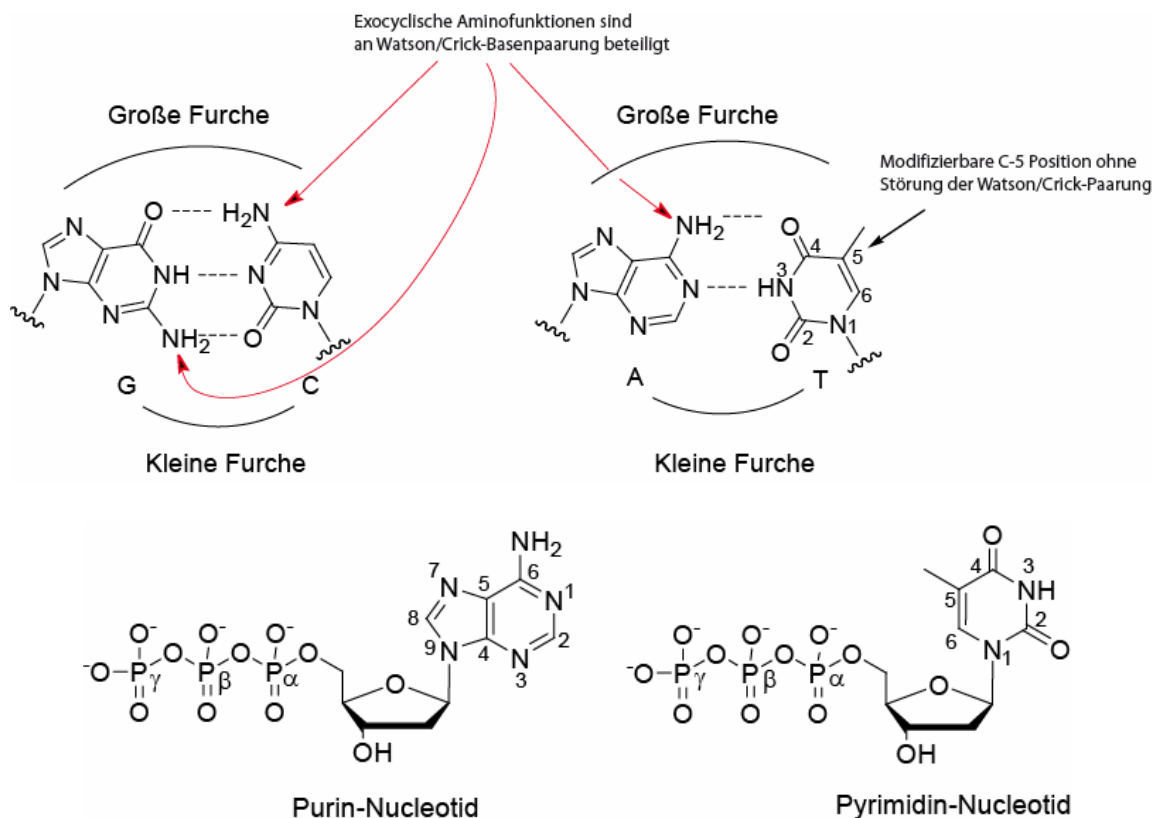


Abbildung 43: Oben: Watson/Crick-Basenpaarungsmuster und Konsequenz für die Nucleobasen-Positionen im Bezug auf die Geometrie der DNA-Doppelhelix. Unten: Allgemeine Nummerierung von Purin und Pyrimidin Nucleotiden.

Die Purine Adenin und Guanin sind vom chemisch/synthetischen Blickwinkel aufgrund ihrer schlechteren Löslichkeit und der pH-Sensibilität schwieriger zu handhaben und benötigen sowohl bei der synthetischen Modifikation, als auch bei der DNA-Festphasensynthese, Schutzgruppen an den exocyclischen Aminofunktionen. Die Notwendigkeit des Schutzes der exocyclischen Aminogruppe ist auch der Grund, weshalb Cytosin nicht die erste Wahl bei der Suche nach einer einfach zu modifizierenden Nucleobase ist. Eine sehr häufig angewendete Methode zur Derivatisierung der C-5 Position von Pyrimidinen ist die Mercurierung oder Halogenierung der C-5 Position mit anschließender Alkylierung durch eine Kreuzkupplung. Die Kreuzkupplung wird mit terminalen Olefinen oder

Alkinen in Gegenwart eines Palladiumkatalysators durchgeführt.^[104] Die Reaktion beruht auf einer von *Sonogashira et al.*^[105] adaptierten Variante der *Heck-Kupplung*,^[106] die erstmals von *Bergstrom et al.*^[107] auf Nucleoside übertragen wurde. Von den vielen Gruppen, die auf diese Weise an Nucleobasen eingebracht wurden, haben Propinyl-Gruppen eine besondere Aufmerksamkeit erfahren, da sie Duplex-stabilisierende Eigenschaften aufweisen.^[108]

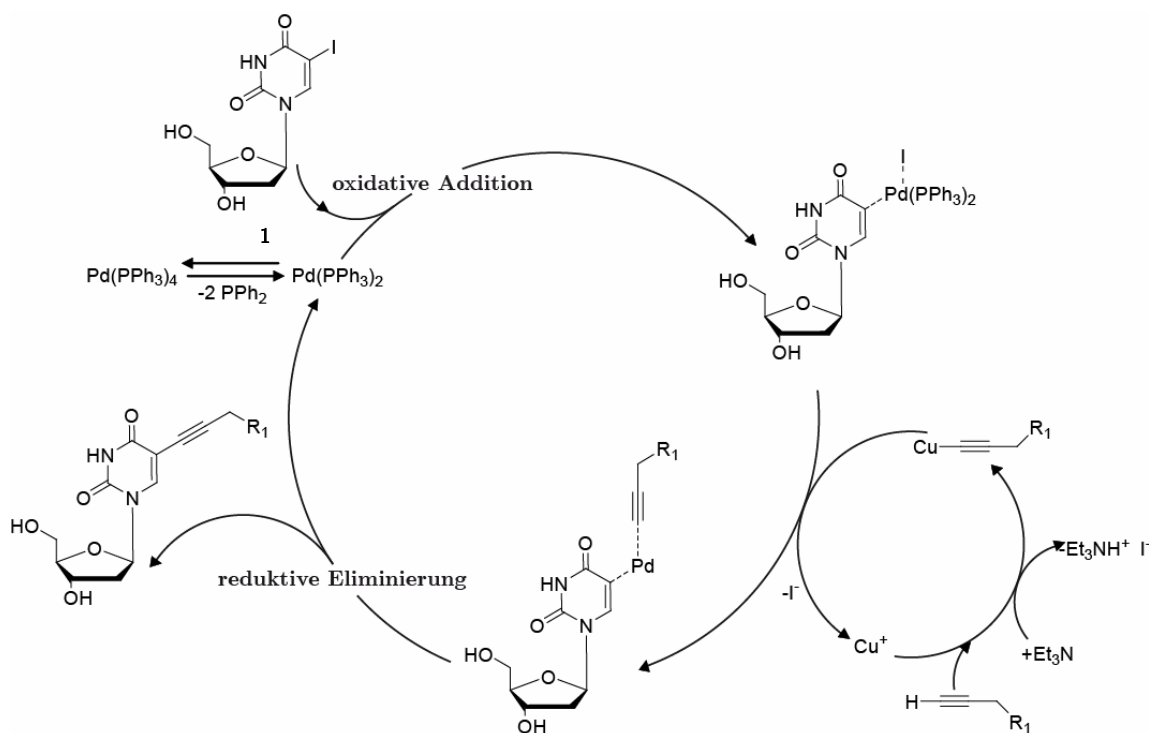


Abbildung 44: Katalysezyklus der Palladium-vermittelten Sonogashira-Kupplung.

Robins und *Barr*^[109] hatten 1981 erstmals die erfolgreiche Kupplung von 5-Iodo-2'-desoxyuridin-Derivaten mit terminalen Alkinen beschrieben. Alkinylamino-Linker haben sich als universell geeignete Anker-Gruppen bzw. Seitenarme zur weiteren Funktionalisierung von Nucleosiden herausgestellt.^[110, 111] Mittlerweile sind halogenierte Nucleoside wie das 5-Iodo-2'-desoxyuridin **1** kommerziell erhältlich und mit den von *Hobbs*^[110] beschriebenen milden Reaktionsbedingungen sind C5-Alkinylamino derivatisierte Nucleoside leicht synthetisch zugänglich (Abbildung 44). In einer solchen Kupplungsreaktion insertiert eine Palladium(0) Spezies oxidativ zwischen die Kohlenstoff-Halogen Bindung. Das zu kuppelnde Acetylen-Derivat reagiert mit Triethylamin als Base zum korrespondierenden Ammoniumacetylid bevor das deprotonierte Alkin mit dem substöchiometrisch eingesetzten Kupfer(I)iodid in ein Cuprat überführt wird. Es erfolgt eine Transmetallierung des Alkin-Derivats auf das insertierte Palladium(II). Bei der anschließenden reduktiven Eliminierung des als Mediator dienenden Palladiums wird die neue C-C Bindung zwischen der 5-Position der Nucleobase und dem

terminalen Alkin geknüpft, während das Palladium wieder für einen weiteren Katalysezyklus zur Verfügung steht. Dabei dient der Reaktion Tetraakis(triphenylphosphin)-palladium(0) als Pd(0)-Quelle und löst die bis 1989 von *Hobbs*^[110] als Standard verwendeten Palladium(II)-Salze ab. Das Verhältnis von Palladium(0) zu Kupfer(I) (1:2 ist ideal) ist für die Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Als Lösungsmittel wird DMF verwendet, um die Löslichkeit von ungeschütztem 5-Iodo-2'-desoxyuridin **1** zu gewährleisten.

Im vorliegenden Projekt wurde Propargylamin **3** als Seitenarm-Modifikation für die C-5 Position gewählt (Abbildung 45). Diese Verbindung hat sich in der Vergangenheit als sehr guter Kupplungspartner in Sonogashira-Reaktionen mit Pyrimidin und Purin Basen bewährt.^[4] Die freie Aminofunktion des Propargylamins erlaubt das Einbringen von diversen Linkerarmen und anderen Funktionalitäten über eine einfache Amid-Bindungsknüpfung. Vor der Palladiumkatalysierten Kreuzkupplung muss die freie Aminofunktion zunächst geschützt werden. Eine etablierte Schutzgruppe in diesem Zusammenhang ist die Trifluoracetyl-Schutzgruppe (TFA), die einfach über die Reaktion des Propargylamins **3** mit Trifluoressigsäureanhydrid **2** erhalten wird.^[4, 112] Die TFA-Schutzgruppe kann unter vergleichsweise milden basischen Bedingungen mit Ammoniak bei Raumtemperatur abgespalten werden und ist somit orthogonal zur säure-lablen Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (4,4'-Dimethoxytritylgruppe, DMT), welche nach der Kreuzkupplung zum Schutze der nucleophilen 5'-OH-Funktion des Nucleosids eingebracht werden muss (Abbildung 45).^[113, 114]

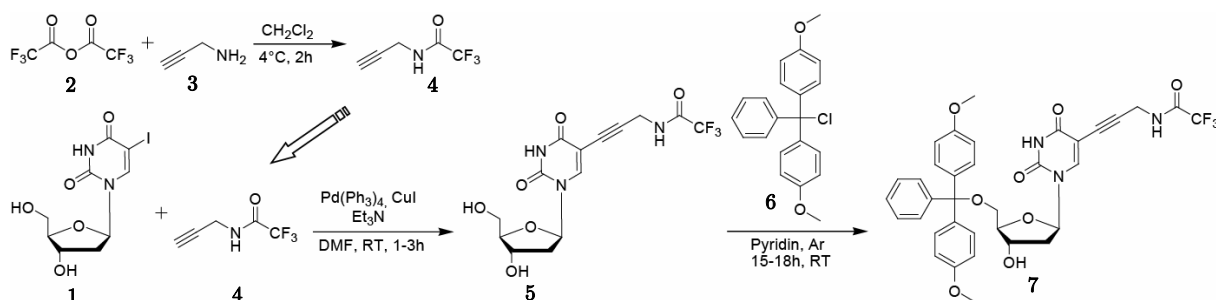


Abbildung 45: Propargylamin-Seitenarm Schützung mit der TFA-Schutzgruppe (oben) mit anschließender Sonogashira-Kupplung an das halogenierte Nucleosid **1** und Schutz der 5'-OH Gruppe mit DMT-Chlorid **6** (unten).

Die DMT-Schutzgruppe ist essentiell für die Schutzgruppenstrategie bei der DNA-Fesphasensynthese (vgl. Kapitel 3.2) und bleibt bis zum Festphasen-Syntheseschritt am Nucleosid, während die TFA-Gruppe nach Einführung der DMT-Gruppe zur weiteren Funktionalisierung des Nucleobasen-Seitenarms wieder entfernt werden muss, ohne das DMT abzuspalten. Die Synthese des *N*-Propargyltrifluoroacetamids **4** gelang in sehr guten Ausbeuten von 98%. Die

Palladium katalysierte Kreuzkupplung zwischen dem kommerziell erworbenen 5-Iodo-2'-desoxyuridin **1** und *N*-Propargyltrifluor-acetamid **4** verlief zufriedenstellend mit einer Ausbeute von 63% bezogen auf das Nucleosid.^[110] Da die Kupplungsreaktion äußerst luftempfindlich ist, wurden das Lösungsmittel DMF, *N*-Propargyltrifluoracetamid **4** und die Base Triethylamin vorher separat gründlich entgast. Das Entgasen geschieht durch wiederholtes abwechselndes Ultrabeschallen im Vakuum, gefolgt von Spülen mit Argon (Ar). Diese Prozedur wird anschließend nach Zugabe der einzelnen Reagenzien in einem Zweihalskolben wiederholt. Die Zugabe von 5-Iodo-2'-desoxyuridin **1** zu DMF resultiert in einer Suspension, die sich durch Zugabe von Triethylamin schnell auflöst. Nach der Zugabe von entgastem *N*-Propargyltrifluoracetamid **4** und Tetrakis(triphenylphosphan)-palladium(0) als Feststoff färbt sich die Lösung bräunlich. Während der Reaktionsdauer von 3-4 Stunden kann der Reaktionsverlauf über Umkehrphasen-Dünnschichtchromatographie (RP-DC, Acetonitril/Wasser 1:3) verfolgt werden. Der Farbumschlag der Reaktionslösung von braun nach orange ist ein weiterer Hinweis auf das Ende der Reaktion. Das bei der Reaktion entstehende Triethylammonium-Iodid lässt sich am effektivsten durch Rühren des Rohprodukts in einer Methanol/Dichlormethan-Lösung (1:1 v/v) mit Anionentauscher-Hartz (Amberlite IRA-400, HCO₃-Form) entfernen. Das funktionalisierte Nucleosid wird zur Vorbereitung der DMT-Schätzung mehrfach mit Pyridin koevaporiert und jedes Mal sorgfältig im Vakuum getrocknet. Anschließend gibt man 4,4'-Dimethoxytritylchlorid **6** hinzu und löst nach kurzer erneuter Evakuierung die Feststoffe unter Argonatmosphäre in Pyridin und rührt über Nacht. Dabei dient Pyridin sowohl als Lösungsmittel wie auch als Base. Es wird davon abgesehen die Reaktionszeit durch Einsatz einer weiteren Base zu beschleunigen, um die TFA-Schutzgruppe nicht zu verlieren. Die DMT-Schutzgruppe verhindert während der DNA Festphasensynthese die Selbstpolymerisation der aktivierten Nucleosid Phosphoramidite. Dabei ist die Einführung der Schutzgruppe aufgrund ihres sterischen Anspruchs regioselektiv auf die 5'-OH Position des Zuckers beschränkt. Im Vergleich zu den anderen Zucker-Hydroxyfunktionen ist diese primäre Hydroxyfunktion sterisch ungehindert und am wenigstens dem elektronenziehenden Effekt der anderen Funktionalitäten ausgesetzt und somit die nucleophilste Position. Obwohl säure-labil, besitzt die Funktion ausreichende Stabilität gegenüber dem Aktivierungsschritt mit Tetrazol bei der Festphasensynthese. Allerdings muss in allen folgenden säulenchromatographischen Reinigungsschritten darauf geachtet werden dem Laufmittel 0.1-1% Triethylamin zuzusetzen, weil das Silikagel durch seinen latent sauren Charakter die Abspaltung von DMT begünstigt. Außerdem müssen latent saure Lösungsmittel wie Dichlormethan entweder durch Filtration über Aluminiumoxid neutralisiert werden oder durch Triethylamin basisch gehalten werden. Die

Abspaltung des DMT-Kations im sauren Milieu wird durch die intensive Färbung des DMT-Kations sichtbar, ein Effekt den man sich auch bei der Quantifizierung der Kupplungseffizienz in der DNA-Festphasensynthese zu nutze macht (siehe Kapitel 3.2). Das DMT-geschützte Nucleosid wurde mit 75% in zufriedenstellenden Ausbeuten als gelblicher Feststoff erhalten und konnte aufgrund der UV-Aktivität der DMT-Schutzgruppe leicht im UV detektiert werden. Zur Vorbereitung des Nucleobasen-Seitenarms zur folgenden Amid-Bindungsknüpfung muss die TFA-Schutzgruppe kurz vor der Reaktion entfernt werden. Dies geschieht durch Aminolyse mit 33% wässriger Ammoniak-Lösung in Methanol (Abbildung 46).

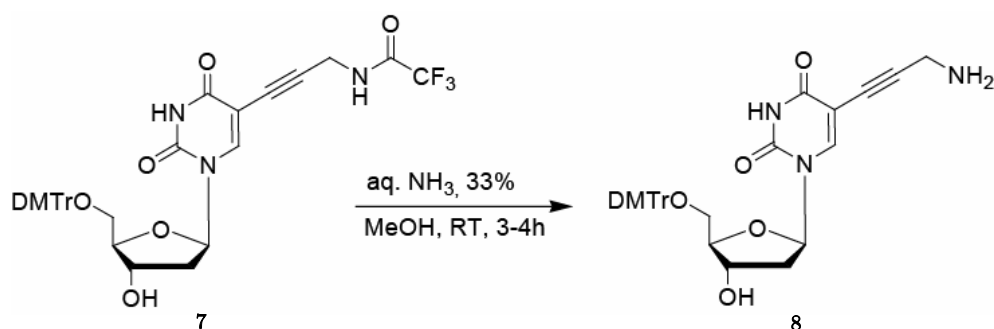


Abbildung 46: Aminolyse des TFA geschützten Nucleobasen-Seitenarms des 5'-DMT geschützten Desoxyuridin-Derivats.

Die daraus resultierende TFA-entschützte Verbindung **8** wird ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt (siehe Abbildung 51). Lediglich Wasser und Ammoniak werden durch wiederholte Koevaporation mit Methanol unter vermindertem Druck entfernt und die Verbindung gründlich im Ölpumpenvakuum getrocknet.

3.1.1.2 Interkalator und Linker Verknüpfung

Mit Anthracen (Abbildung 48) wurde ein Interkalator gefunden der die in Kapitel 2 bereits erwähnten Voraussetzungen - literaturbeschriebene Fähigkeit zur Interkalation, Kompatibilität mit DNA-Festphasenstrategien - mitbringt. Anthracen ist ein hydrophobes fluoreszierendes Molekül, besitzt eine elektronenreiche, planare Struktur mit einer Fläche von ca. 0.21 nm² und eignet sich somit als DNA Interkalator.^[104, 115, 116] Die verschiedenen Bindungs-Modi (Abbildung 47) von Anthracen-Derivaten sind ausgiebig untersucht worden und der dominierende Bindungs-Modus ist die Interkalation.^[116-118]

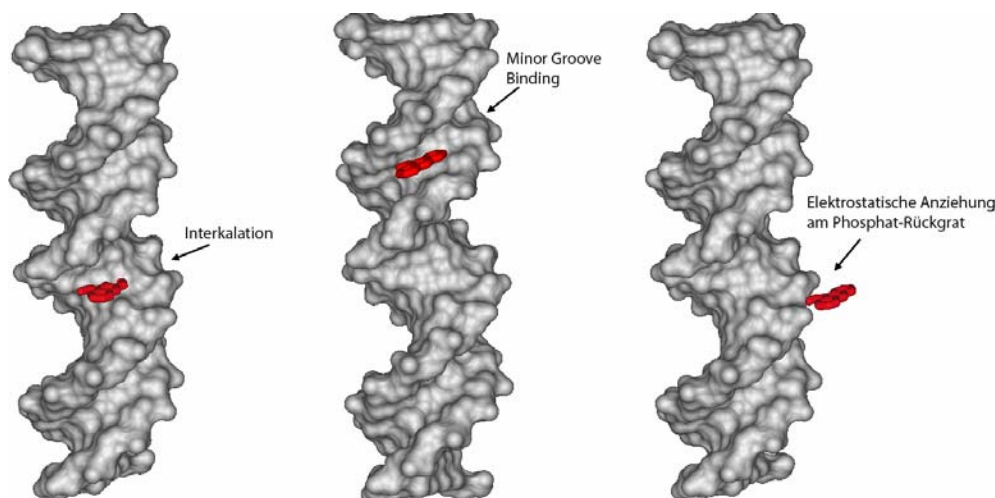


Abbildung 47: Mögliche Bindungs-Modi aromatischer, ggf. positiv geladener Verbindungen an dsDNA.^[119]

Eines der ersten Beispiele für die Interkalation des Anthracen-Kerns bildete (9-Anthrylmethyl)-ammoniumchlorid (AMAC, Abbildung 48) welches synthetische wie natürliche DNA bindet (Bindungskonstante $K_A \sim 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, abgeleitet aus Messungen der Fluoreszenz- und Absorptionsänderung).^[116, 117, 119] Die freie Bindungsenthalpie (ΔG) für ungeladene Anthracen-Derivate wird mit $\Delta G = 26\text{--}27 \text{ kJ/mol}$ angegeben.^[120] Durch die Derivatisierung mit Alkylamino-Gruppen, die durch Protonierung eine positive Ladung erhalten, ist es möglich die Interkalation um je 5 kJ pro Ionenpaar zu erhöhen. Davon wurde in den folgenden Experimenten abgesehen, weil ein Alkylaminosubstituent zum einen an der Aminofunktion während der gesamten Synthese geschützt werden müsste und der sterische Anspruch durch den Alkylteil und die Aminoschutzgruppe gestiegen wäre. Eine positive Ladung in der Nähe des Interkalatorsystems könnte auch primär zu ionischen Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat der eigenen modifizierten DNA und somit zu Bindung in der kleinen Furche führen (*minor groove binding*; Abbildung 47, Mitte), statt dass der Interkalator aus der Helix heraus der Umgebung präsentiert wird. Studien mittels Absorptionsmessungen und Linear- sowie Zirkulardichroismus beider Bindungs-Modi - Interkalation und *groove binding* - wurden mit Derivaten der Anthracen-9-carbonsäure (**9**, Abbildung 48) wie zum Beispiel Anthracen-9-carbonyl- N^1 -spermin (Abbildung 48) durchgeführt. Bei diesen Messungen, die durch molekulares Modelling unterstützt wurden, zeigte sich, dass der stabilste Bindungszustand der der Interkalation des Anthracen-Restes ist.^[121, 122]

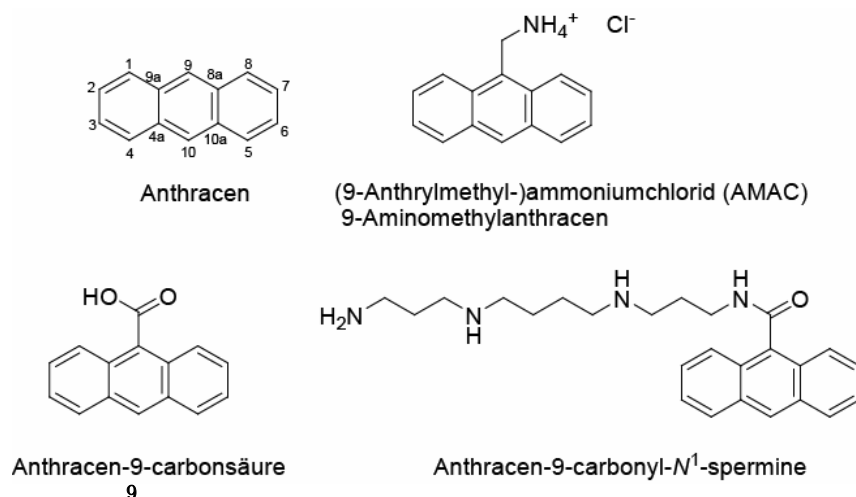


Abbildung 48: Anthracen und exemplarische Derivate die in Interkalations-Experimenten eingesetzt wurden.

Zusätzlich zu den beschriebenen Wechselwirkungen geht Anthracen Cycloadditionsreaktionen ein, eine interessante Eigenschaft, die alternative Interaktionsmöglichkeiten mit potentiellen Interaktionspartnern wie funktionalisierter DNA erlaubt. Anthracen reagiert mit Dienophilen, wie z.B. Maleimid-Derivaten, zu den entsprechenden Diels-Alder-Produkten^[123-128] und des weiteren kann man reversible Photodimerisierungen^[129-131] mit Anthracen und seinen Derivaten durchführen (Abbildung 49). Diese Vielseitigkeit könnte in späteren Anwendungen, neben dem primären Ziel der Interkalation und somit der nicht-kovalenten Wechselwirkung, eine Rolle spielen und neue Wege der Verknüpfung von DNA-Strukturen zu größeren Aggregaten eröffnen.

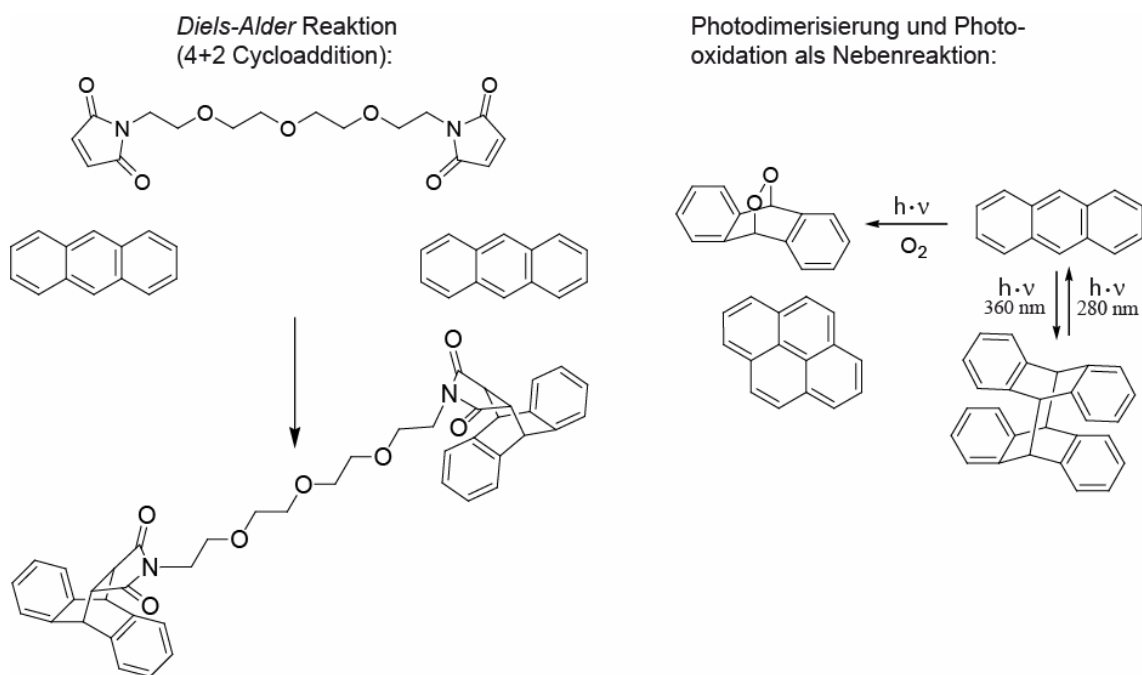


Abbildung 49: Weitere chemische Eigenschaften des Anthracens, die zur kovalenten Bindungsbildung führen.

Das Anthracen wurde über die kommerziell leicht erhältliche Anthracen-9-carbonsäure **9** durch Amidbindung als Substituent an den Linker geknüpft. Die Wahl des Linkers fiel auf die bifunktionale ϵ -Aminocaprinsäure (ϵ -Aminohexansäure, **10**). Mit einer Carboxyl-Gruppe und einer Amino-Funktion verbrückt dieser Linker die Amin-funktionalisierte Nucleobase **8** mit der Anthracen-9-carbonsäure **9** über Amidbindungen, beruhend auf etablierter Peptidknüpfungs-Chemie. Der resultierende Linker-Arm der Nucleobasen-Seitenkette hat so eine „Spannweite“ von ca. ~ 14 Å. Das ist lang genug, um aus der großen Furche in der Peripherie der funktionalisierten DNA-Doppelhelix herauszuragen und das Zentrum der Basenpaar-Stapelung einer direkt benachbarten DNA-Doppelhelix zu erreichen (vgl. Abbildung 38, unten). Der Arm ist aber wiederum ausreichend kurz um Selbstinterkalation durch Zurückfaltung des Interkalator-modifizierten Linkerarms zu vermeiden. Ein längerer Linker-Arm müsste zur Vermeidung von Selbstinterkalation starrer aufgebaut sein, beispielsweise durch eine Polyalkin-Kette. Ein solcher Linker würde aber einen größeren hydrophoben Rest in das System einführen und durch seine Starrheit eventuell Restriktionen bezüglich der nötigen Konformationsflexibilität für eine erfolgreiche Interkalation bedingen. Dieser Ansatz wurde hier nicht weiter verfolgt.

Nachdem die Bindungsknüpfung zwischen Anthracen-9-carbonsäure **9** und der ϵ -Amino-Funktion der ungeschützten ϵ -Aminocaprinsäure **10** trotz vorangegangener Aktivierung der Anthracen-9-carbonsäure als *O*-Succinimid- (NHS-) oder *O*-Benzotriazol- (OBt-) -Aktivester stets nur Produktgemische mit mangelhaften Ausbeuten ergab, wurde die Schützung der Carboxy-Funktion der ϵ -Aminocaprinsäure **10** der Amidbindungsknüpfung vorangestellt (Abbildung 50, oben). Durch die Überführung von ϵ -Aminocaprinsäure **10** in den korrespondierenden Methylester mit Thionylchlorid in Methanol fällt das Produkt als Hydrochlorid-Salz **11** in zufriedenstellenden Ausbeuten von 88% an. Die anschließende Amidbindungsknüpfung gelang am besten über die Aktivierung der Anthracen-9-carbonsäure mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) zum *O*-Benzotriazol-Aktivester **12** und darauf folgender Zugabe der Carboxy-geschützten ϵ -Aminocaprinsäure **11** in THF. Der Einsatz anderer Aktivester wie z. B. *O*-Succinimid-Ester oder die Aktivierung durch korrespondierende Uronium-Tetrafluorborat-Salze des Succinimids und des 1-Hydroxy-benzotriazols (TSTU, TBTU) führten zu schlechteren Ergebnissen. Diese Reaktion wurde zuvor auch in Dichlormethan und DMF durchgeführt, allerdings waren die Ausbeuten sehr mäßig und die Reinigung von Nebenprodukten gestaltete sich schwierig. Die Reaktion mit DCC und HOBT in THF lieferte mit 91% eine relativ gute Ausbeute, jedoch erforderte die Aufarbeitung häufiges Filtrieren der Lösung von anfallendem Harnstoff. Obwohl nach

Ende der Reaktion die von Harnstoff getrübe Suspension gründlich filtriert wurde, fiel während des Waschens der in Ethylacetat aufgenommenen Reaktionslösung mit ges. NaHCO_3 -Lösung stets erneut ein weißer Niederschlag aus. Durch Säulenchromatographie konnte das Produkt in reiner Form erhalten werden. Der Nachweis der Verbindung über Elektron-Ionisations-Massenspektrometrie (EI-MS) gelang erst nach Erhitzen der schwer flüchtigen Probe auf 180°C .

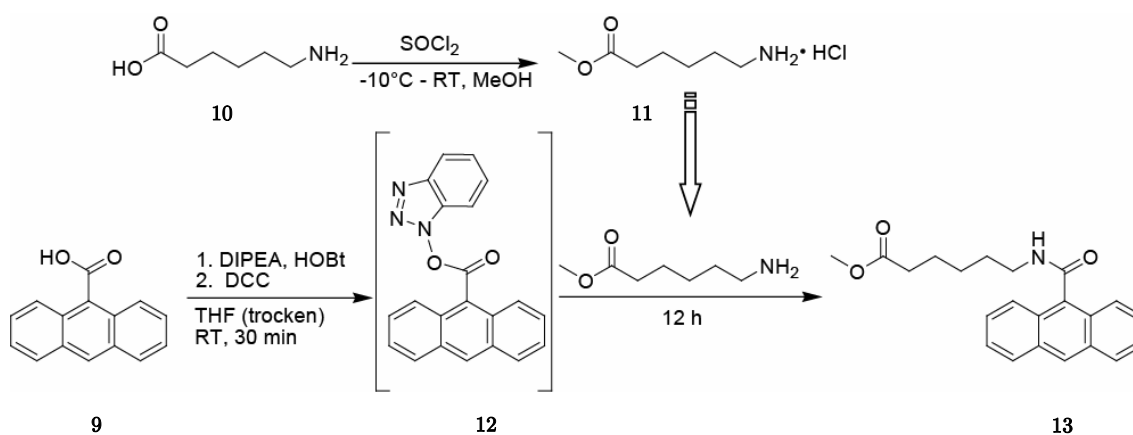


Abbildung 50: Linker-Schützung und Anthracen-Verknüpfung durch Peptidchemie.

Vor der nächsten Amidbindungsknüpfung muss der Anthracen-9-carbamido- ϵ -aminocapronsäuremethylester **13** zur entsprechenden Carbonsäure **14** hydrolysiert werden. Dies geschieht in Methanol mit 1N Natriumhydroxid-Lösung (Abbildung 51). Das Edukt ist in Methanol nicht ausreichend löslich und bildet eine Suspension. Um die bereits vorhandene Amidbindung nicht zu brechen, wird die Natronlauge in kleinen Portionen über einen längeren Zeitraum unter gelindem Kühlen hinzugegeben. Der Endpunkt der Reaktion wird durch das vollständige Lösen des Produktes in Methanol und dem Verschwinden der Suspension sichtbar. Das Produkt kann durch vorsichtiges Ansäuern mit wässriger Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH von ca. 2 gefällt werden und nach Entfernen des Methanols mit Ethylacetat extrahiert werden. Die abschließende Amidbindungsknüpfung zwischen dem Anthracen-tragenden Linker **14** und der mit der Propargylamin-Seitenkette ausgestatteten Nucleobase des DMT-geschützten Nucleosids **8** geschah durch Aktivierung der Verbindung als Succinimid-Aktivester mit TSTU (Abbildung 51).^[132]

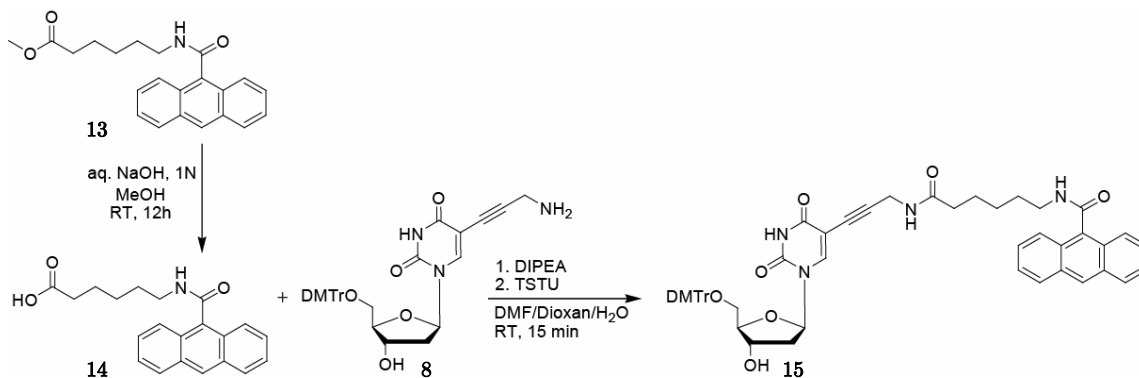


Abbildung 51: Entschützung des Anthracen-9-carbamido- ϵ -aminocaprinsäuremethylesters und Verknüpfung des Interkalators an den Nucleobasen Seitenarm des 5'-DMT-geschützten Desoxyuridins.

Die Reaktion verläuft am besten in DMF mit Diisopropylethylamin (Hünigs-Base, DIPEA) als Base und TSTU als aktiviertem Succinimid Lieferanten in Uronium-Tetrafluorborat-Salz Form. Die Aktivierung der Carboxyl-Gruppe geschieht innerhalb von wenigen Minuten (10-15 Min.) und ist an der Verfärbung der anfangs farblosen klaren Lösung ins Braune zu erkennen. Die Reaktion wird zusätzlich mit Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt. Wenn die Aktivierung beendet ist, was an einer sich nicht mehr verändernden Farbsättigung und durch DC erkannt wird, wird die Lösung direkt zu der Lösung des nicht weiter aufgereinigten, Amin-entschützten, 5'-O-DMT geschützten Nucleosids **8** in DMF hinzugegeben und der Reaktionsverlauf mit DC bis zum Reaktionsende nach ca. weiteren 35 Minuten verfolgt. Mit 37% wurde das Produkt nach säulenchromatographischer Reinigung in nur mäßigen Ausbeuten erhalten.

3.1.1.3 Überführung von Nucleosiden in die 3'-O-Phosphoramidite

Phosphoramidite sind sehr labile, wasserempfindliche Verbindungen die stets kurz vor der Festphasensynthese frisch aus den entsprechenden, geschützten Vorläufern (hier das DMT-geschützte modifizierte Nucleosid **15**) synthetisiert werden.^[44, 133-135] Aufgrund der Labilität wurde das geschützte Vorläufer Nucleosid **15** gründlich im Vakuum getrocknet bevor es unter Argonatmosphäre in trockenem THF gelöst und mit Hünigs-Base versetzt wird. Vor Zugabe des Phosphitylierungs-Reagenzes 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit **16** wird zunächst 10 Min. bei Raumtemperatur gerührt. In der Literatur und gängigen Vorschriften werden 1.3-2.5 Äquivalente (eq.) des Phosphitylierungs-Reagenzes benutzt und teilweise in zwei Portionen während des Reaktionsverlaufes hinzugegeben. Im beschriebenen Fall reichte eine Portion von zwei eq zur erfolgreichen Synthese. Die Erfahrung zeigt, dass Überschüsse an Phosphitylierungs-Reagenz die spätere Reinigung sehr erschweren. Nach der Aufarbeitung

durch Extraktion, Waschen und Säulenchromatographie wurde mit 84% eine zufriedenstellende Ausbeute an Anthracen-funktionalisiertem, 5'-O-DMT-geschützten Nucleosid-Phosphoramidit **17** als gelber Schaum erhalten.

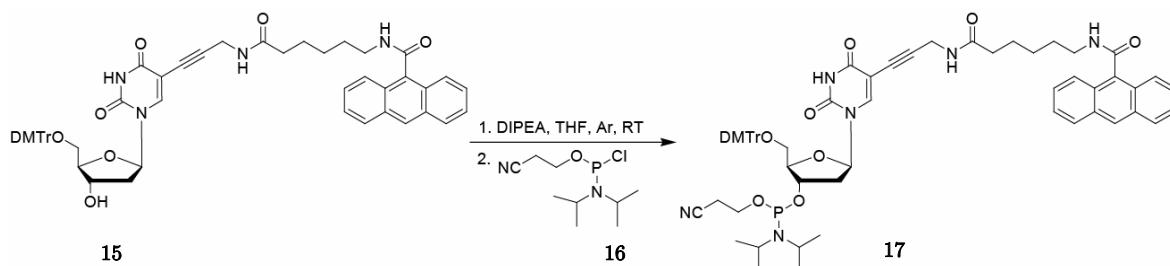


Abbildung 52: Phosphitylierung des 5'-DMT-geschützten, Interkalator-modifizierten Desoxuridins **15** zum 3'-O-Phosphoramidit **17**.

3.2 Darstellung modifizierter Oligonucleotide durch DNA Festphasen Synthese^[44, 136, 137]

Automatisierte DNA-Festphasensynthese erlaubt die relativ einfache Herstellung beliebiger DNA und RNA Oligonucleotidsequenzen mit einer Länge von bis zu 100 Basen. Zum Lieferumfang zeitgemäßer DNA Synthesizer gehören unter anderem Standardprogramme für bereits etablierte Syntheseyklen, maßgeschneidert für viele unterschiedliche Anforderungen, wie Synthesemaßstab, Schutzgruppenstrategie, RNA/DNA-Synthese und schwierigere Kopplungen mit z.B. modifizierten Nucleosiden. Diese Programme können vom Nutzer auch editiert und verändert werden, um den jeweiligen Syntheseaufgaben individuell Rechnung zu tragen. Neben der Möglichkeit kommerziell erhältliche Nucleosidphosphoramidite in die Zielsequenzen einzubauen, können auch eigene Phosphoramidit-Monomere über freie Kanäle bei der Festphasensynthese eingesetzt werden. Im vorliegenden Projekt wurde ein ABI 394 DNA-Synthesizer der Firma *Applied Biosystems* eingesetzt und das Syntheseprotokoll für 3'-O-Cyanoethylphosphoramidite angewendet.

Der Synthesestart erfolgt mit dem jeweiligen 3'-Nucleosid der zu synthetisierenden Zielsequenz. Üblicherweise ist das Startnucleosid mit einem basenlabilen Linker über die 3'-Hydroxy-Funktion an Controlled Pore Glass (CPG) oder Polystyrol (*Polystyrene Beads*) gekoppelt (Abbildung 54). In diesem Fall wurde Polystyrol eingesetzt, weil dessen Quellverhalten und Oberflächenbeschaffenheit die Diffusion und Strömungseigenschaften der Reagenzien günstig beeinflusst, so dass die Reaktionen mit geringen Volumina durchführbar werden (*Low Volume Column, LV*).^[138] Die chemische Synthese von Oligonucleotiden wird von 3' in 5'-Richtung durchgeführt. Im entscheidenden Kopplungsschritt reagiert ein 3'-Phosphoramidit mit einer freien 5'-Hydroxygruppe der entstehenden Sequenz

auf der Festphase. Es wird eine Bindung zwischen dem Phosphoratom des Amidits und der 5'-OH-Gruppe des Festphasen-gebundenen Oligonucleotids ausgebildet.

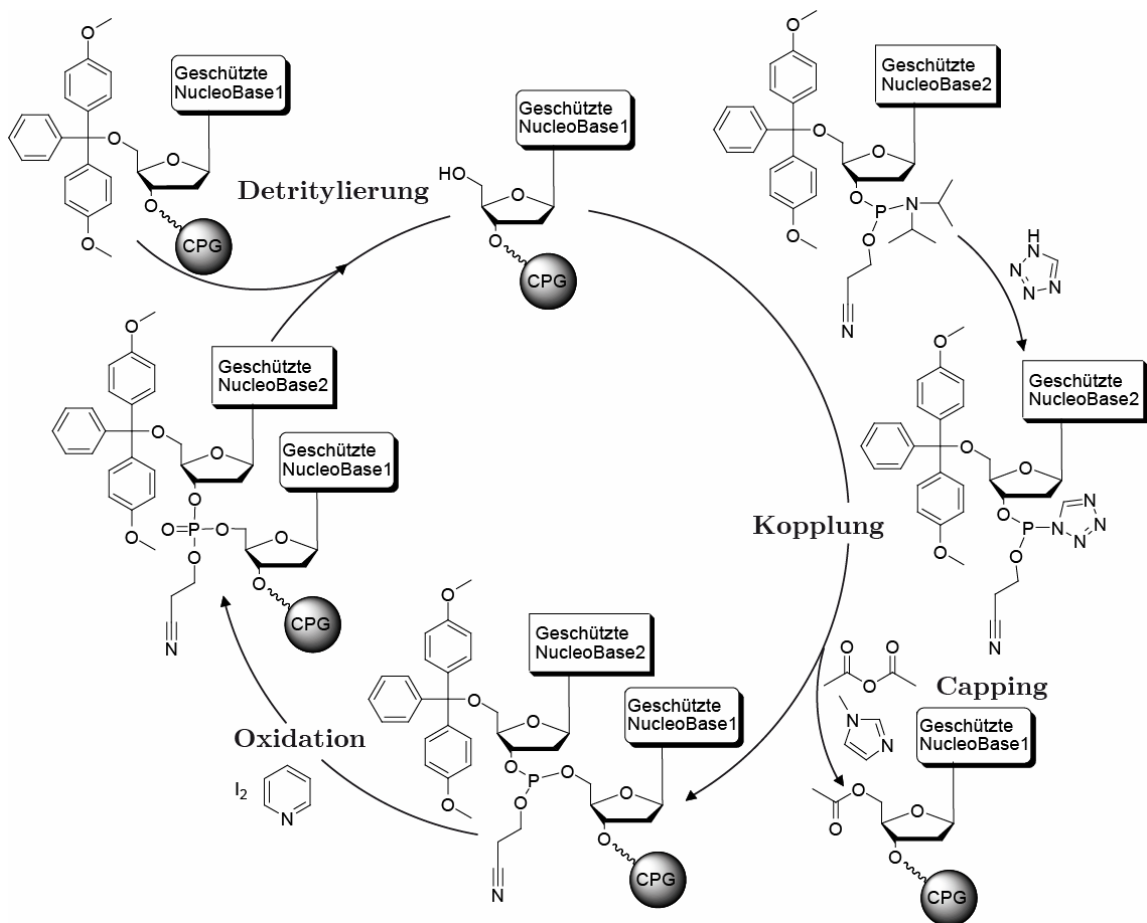


Abbildung 53: Schema des DNA-Festphasensynthesezyklus nach der Phosphoramidit-Strategie.

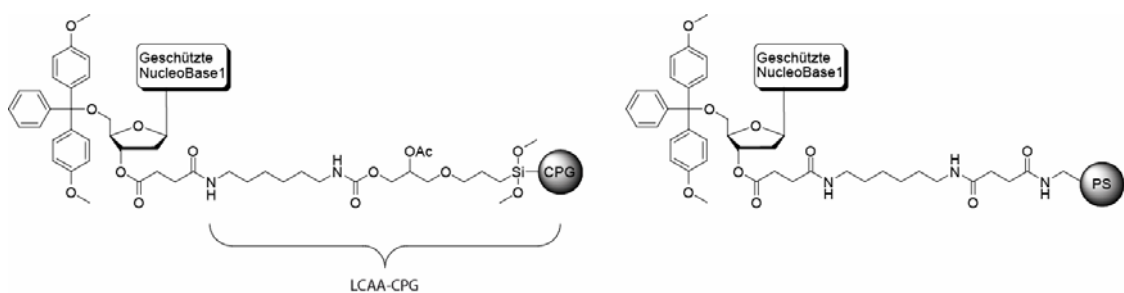


Abbildung 54: Struktur von *Long Chain Alkylamin* (LCAA) CPG und *Long Chain Spacer* Polystyrene (PS).^[138]

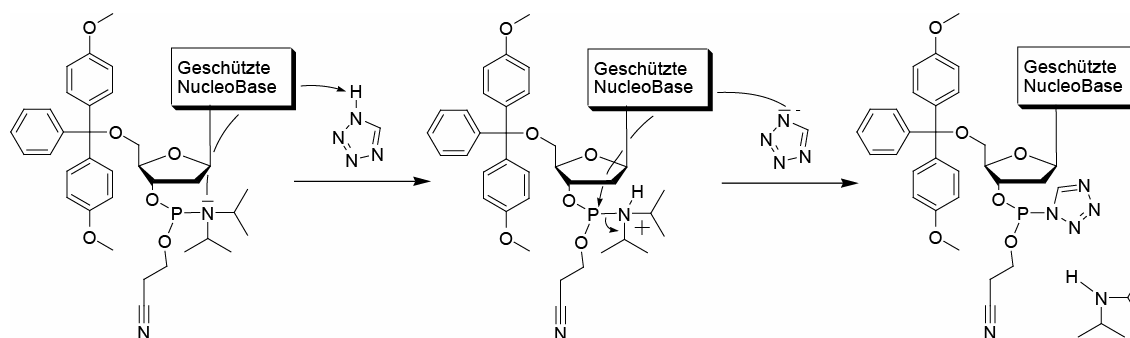


Abbildung 55: Aktivierung eines 5'-DMT geschützten Nucleosid-3'-Phosphoramidits mit Tetrazol.

Ein Synthesezyklus besteht aus:

a) *Tritylabspaltung (Deblocking)*

Zu Beginn eines jeden Kopplungszyklus wird zur Freisetzung der nucleophilen 5'-OH-Gruppe die Dimethoxytritylschutzgruppe mit Säure abgespalten. Als Abspaltreagenz dient Di- bzw. Trichloressigsäure in Dichlormethan.

b) *Kopplung (Coupling)*

Ein schwach saurer Katalysator (1*H*-Tetrazol) aktiviert das Nucleosidphosphoramidit unter Abspaltung der Isopropylamino-Gruppe (Abbildung 55). Im Anschluss erfolgt der nucleophile Angriff des festphasengebundenen, entschützten 5'-*O*-Oligonucleotids an den Tetrazol-aktivierten Phosphor nach einem S_N2 -Mechanismus.

c) *Blockieren (Capping)*

Da der Kopplungsschritt nicht zu 100% vollständig verläuft, muss verhindert werden, dass zurückbleibende freie OH-Gruppen (ca. 1%) im folgenden Synthesezyklus mitreagieren können und so zu unspezifischen, kürzeren (vor allem n-1) Sequenzen führen. Im Capping-Schritt werden sämtliche freie, reaktive Gruppen durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid blockiert; die Abbruchsequenzen spielen für die weitere Synthese dann keine Rolle mehr.

d) *Oxidation*

Die im Kopplungsschritt entstandene internucleotidische Phosphitgruppierung wird durch Iod zum Phosphat oxidiert. Dieser Schritt kann nicht am Ende der vollständigen Oligonucleotidsynthese erfolgen, da Phosphittriestere unter den Bedingungen der 5'-*O*-Detritylierung nicht stabil sind.

Ein neuer Syntheszyklus wird wieder mit Schritt a) begonnen. Diese Reaktionen werden wiederholt, bis die gewünschte Oligonucleotidsequenz hergestellt ist. Das verbleibende, noch auf der Festphase gebundene, Oligonucleotid kann entweder mit freier 5'-OH-Gruppe (DMT-off) oder mit geschützter 5'-OH-Gruppe (DMT-on) aus dem letzten Zyklus entlassen werden. Die nachstehenden Sequenzen wurden im DMT-on Modus belassen, um das Produkt nach der Aminolyse (siehe Kapitel 3.2.2) durch RP-HPLC leicht durch ihre Hydrophobizität von Verunreinigungen und Acetyl-blockierten Abbruchsequenzen abtrennen zu können.

Die Kopplungseffizienz pro Base und die Gesamtkopplungseffizienz wurden mit Hilfe des „Trityl-Monitors“ verfolgt. Unter der Kopplungseffizienz versteht man in der DNA-Synthese die Effizienz, mit der ein neues Phosphoramidit an die wachsende Oligonucleotid-Kette gekoppelt wird, also die Ausbeute über die Schritte eines Reaktionszyklus. Die Menge des bei der 5'-O-De-tritylierung (Syntheszyklus a) entstehenden Dimethoxytrityl-Kations kann photometrisch (498 nm) bzw. durch Leitfähigkeitsmessung bestimmt werden. Unter Annahme einer vollständigen Abspaltung der DMT-Gruppe von der Oligonucleotid-Kette kann aus der Menge an DMT-Kationen auf die Effizienz des vorangegangenen Kopplungsschritts geschlossen werden. Diese „Tritylwerte“ und damit die Kopplungseffizienz sind ein Maß für die Güte des Syntheseverlaufs. Die durchschnittliche Kopplungseffizienz während einer Oligonucleotidsynthese hat einen dramatischen Einfluß auf die theoretisch erhaltbare prozentuale Menge an Zielsequenz. Die Gesamtkopplungseffizienz der Zielsequenzen **GRN1-GRN7** (Abbildung 56) lag zwischen 73-86% mit Kopplungseffizienzen pro Base zwischen 92-99%, wobei kein bemerkenswerter Abfall der Effizienz beim Einbau der modifizierten Nucleoside beobachtet wurde.

Bei den Sequenzen **GRN3** und **GRN5** wurde in einigen Reaktionsschritten ein Effizienzverlust durch den Trityl-Monitor aufgenommen, so dass Gesamtausbeuten unter 73% erreicht wurden. Nach wiederholter Synthese dieser Sequenzen blieb diese Beobachtung jedoch aus. Bei der anschließenden säulenchromatographischen Aufreinigung zeigten sowohl die ersten als auch die zweiten Synthesechargen das erwünschte Produkt in vergleichbarer Quantität.

Für die Darstellung der unten aufgeführten modifizierten Zielsequenzen **GRN1-GRN7** erwies sich das Standardprogramm LV200 (Low Volume, 200nmol) als geeignet. Die meisten kommerziell erhältlichen Nucleosidphosphoramidite, sowie modifizierte und anwendungsspezifische funktionelle Gruppen tragende Phosphoramidite, werden in hochreinstem, trockenem Acetonitril gelöst; das übliche Solvens in der DNA Festphasensynthese. Stark lipophile Amidite wie Fettsäure-Amidite können auch in Dichlormethan gelöst werden, wobei Veränderungen in der Flussrate und Viskosität zu berücksichtigen sind. Obwohl

im vorliegenden Fall der in das Nucleosid eingeführte Anthracene-Rest starken lipophilen Charakter hat, gewährleistet der Nucleosid-Stamm, insbesondere die Desoxyriboseeinheit, ausreichende Löslichkeit in Acetonitril. Die beiden häufigsten Verunreinigungen die synthetisierte Phosphoramidite begleiten und einen dramatischen Effekt auf die Syntheseeffizienz haben sind ein Überschuss an Base und Wasser. Beide Verunreinigungen werden in der HPLC Analyse oder im Phosphor-NMR (bei der schnellen, kosteneffizienten kommerziellen Qualitätskontrolle) nicht detektiert sondern nur durch $^1\text{H-NMR}$. Der Basenüberschuss resultiert aus der Phosphoramidit-Reinigung. Das Wasser wird durch den oftmals stark hygroskopischen Charakter der Amidite schon bei kurzen Stoffüberführungen eingeschleppt. Beide Komponenten können durch mehrmalige Koevaporation mit Acetonitril und anschließendem intensiven Trocknen am Ölpumpen-Vakuum (Fein- bis Hochvakuum $\sim 1\text{-}10\cdot 10^{-3}$ mbar) auf eine irrelevante Menge reduziert werden.

Das modifizierte, DMT-geschützte Desoxyuridinphosphoramidit **17** wurde sorgfältig im Vakuum getrocknet und in Acetonitril (DNA-Grade) aufgenommen, bevor es als fünftes Nucleosidphosphoramidit-Reservoir, neben den vier natürlichen DNA-Nucleosidphosphoramiditen, an den Synthesizer angeschlossen wurde. Obgleich modifizierte Nucleosidphosphoramidite zu Weilen aufgrund von sterischen Gründen, Aktivierungsproblemen oder den oben beschriebenen Verunreinigungen längere Kopplungszeiten und/oder grössere Volumina im Einbauzyklus benötigen, konnte die Kopplung des modifizierten Nucleosids **17** mit dem selben Standardzyklus LV200 durchgeführt werden, welcher auch für die Standardmonomere eingesetzt wurde.

3.2.1 Sequenz-Design der funktionalisierten DNA Oligonucleotide

Da sich die Ausbeute an DNA mit jedem Synthesezyklus verringert, ist es sinnvoll relative kurze funktionalisierte DNA Oligonucleotide zu erzeugen. Es wurde eine Länge von 21 Basen gewählt, die zuverlässig in ausreichenden Mengen herstellbar ist. Nach Hybridisierung der DNA mit einem komplementären Strang weist der resultierende Doppelstrang mit 21 Basenpaaren auch eine ausreichend große thermische Stabilität auf. Mit einer Windungssteigung von ca. 10.5 Basenpaare der DNA Doppelhelix (B-DNA) erlaubt die Länge von 21 Basen auch die Positionierung der Modifikation in einer Art, die den gesamten Umfang der DNA bezüglich ihrer Längsachse zweimal abdeckt. Das ist vor allen Dingen günstig, wenn man bedenkt, dass die dsDNA Enden nicht immer in idealer Doppelhelix-Struktur, verglichen zum Hauptteil, vorliegen. So können die Modifikationen im Inneren der Sequenz eingebracht werden und trotzdem einen kompletten Windungsabstand von 10.5-11 bp überspannen, ohne in den nicht-idealen End-Regionen der Doppelhelix zu liegen.

Die Basensequenz wurde so gewählt, dass keine stabilen Sekundärstrukturen durch Selbstkomplementarität oder G-Quartetts ausgebildet werden. Weiterhin wurde, da es sich um ein Model-System handeln soll, auf eine möglichst gleichmäßige Häufigkeit der auftretenden Nucleobasen geachtet. Für die Inkorporation der Anthracen-modifizierten Nucleobase wird in der Zielsequenz, statt eines regulären, unmodifizierten dTs, das Interkalator-modifizierte dT (bzw dU) **17** eingebaut (siehe Abbildung 56, rot unterlegt). Um die mittlere Nucleobase dT sind weitere dTs positioniert, die in einigen Abständen einen Bereich von 5-11 Basen und kleinerer Abstände dazwischen abdecken, so dass die herausragende Modifikation, bei ausgetauschtem dT, den gesamten räumlichen Umfang der Doppelhelix bezüglich der Helixachse umspannt. Um die Möglichkeit zu haben Modifikationen auch im Gegenstrang einer doppelsträngigen DNA zu platzieren, wurde eine komplementäre Sequenz zur oben beschriebenen Hauptsequenz am DNA Synthesizer mit zwei funktionalisierten dTs versehen. Die erste Sequenz **GRN1** enthält ein funktionalisiertes dT Nucleosid in der Mitte der Sequenz an Position 11 (im folgenden werden die Positionen beginnend vom 5'-Ende der Sequenz gezählt). **GRN2-GRN4** haben je zwei Interkalator-modifizierte dTs in Inkrement-Schritten von zwei Basen positioniert. Mit 7, 9 und 11 Basen zwischen den Modifikationen nähern sich diese Sequenzen so dem Abstand einer Helixwindung von ca. 10.5 Basen an. Es ist zu vermuten, dass mit 9 und 11 Basen Abstand die Interkalatormodifikationen auf derselben Seite der DNA Helix übereinander mit einem Windungsabstand von ca. 3.4-3.6 nm zu liegen kommen (vgl. Abbildung 57). Sequenz **GRN5** hat 5 Basen zwischen den beiden Modifikationen und es ist zu erwarten, dass bei Ausbildung einer Doppelhelix mit dem Komplementärstrang die Anthracen-Reste auf den gegenüberliegenden Seiten der DNA Doppelhelix bezüglich ihrer Längsachse angeordnet sind (vgl. Abbildung 57). **GRN6** besitzt drei funktionalisierte Thymidine Nucleotide an den Positionen 5, 11 und 18 und sollte aufgrund der Abstände die beiden äußeren Modifikationen auf derselben Seite einer Doppelhelix präsentieren, während die mittlere Modifikation auf der gegenüberliegenden Seite aus der Helix ragt (vgl. Abbildung 57, links).

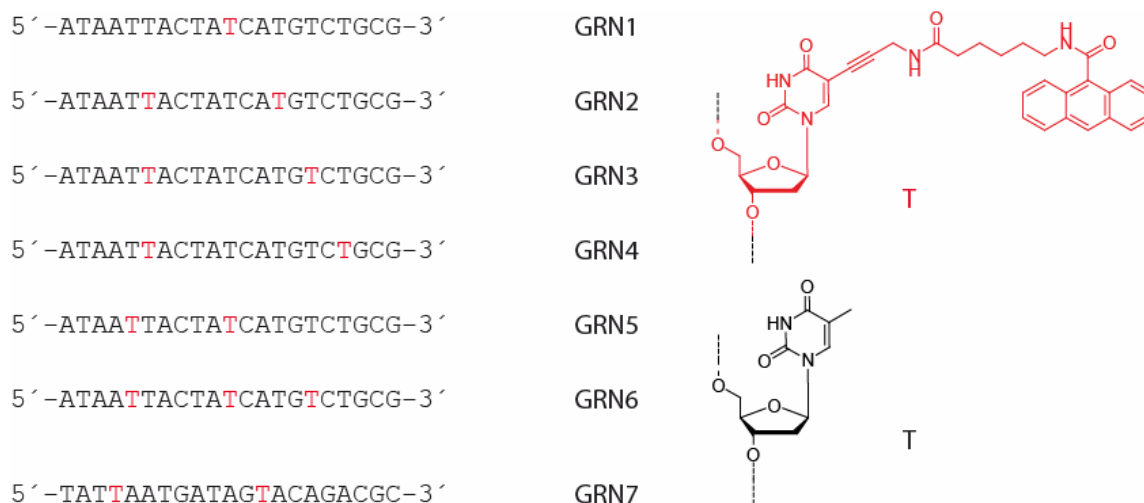


Abbildung 56: Sequenzen der durch automatisierte DNA-Festphasensynthese hergestellten modifizierten Oligonucleotide GRN1-GRN7. Bis auf GRN7, das die komplementäre Basensequenz zu GRN1-GRN6 enthält, ist die Basensequenz der übrigen Oligonucleotide identisch. Sie unterscheiden sich lediglich in der Anzahl und Position des eingebrachten modifizierten dT (rechts in rot Anthracen-modifiziertes dT, schwarz das natürliche dT).

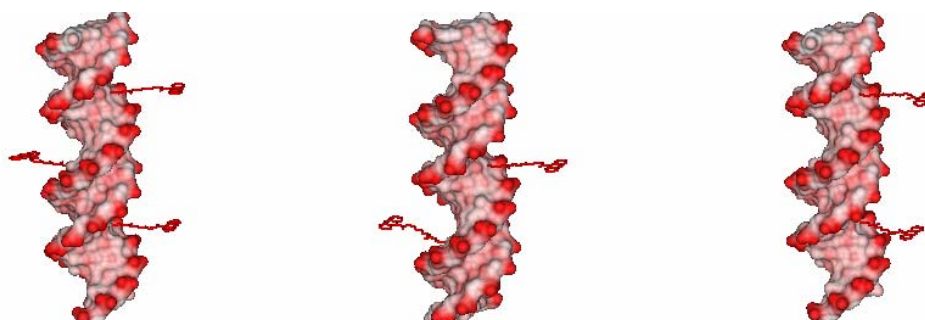


Abbildung 57: Position der Anthracen-Modifikation in Abhängigkeit des Basenpaar-Windungsabstands: links Sequenz GRN6 mit Gegenstrang zum Duplex hybridisiert; analog in der Mitte Sequenz GRN5 und rechts GRN3.

3.2.2 Reinigung und Charakterisierung der modifizierten Oligonucleotide

Nach erfolgter Synthese beinhalten die weiteren Aufarbeitungsschritte die Abspaltung des Oligonucleotids vom Trägermaterial und die Entfernung der Basenschutzgruppen und der Cyanoethyl-Phosphor-Schutzgruppen. Durch Behandlung des trägergebundenen Oligonucleotids mit konzentrierter Ammoniaklösung (33%) wird der Ester zwischen der 3'-OH-Gruppe des Oligonucleotids und dem Träger hydrolysiert. Zur Entfernung der Schutzgruppen an den Adenin- Guanin- und Cytidin-Basen (und damit zur Freisetzung der exocyclischen Aminofunktionen) wird die ammoniakalische Oligonucleotidlösung erwärmt. Dabei wird auch die Cyanoethyl-Schutzgruppe entfernt. Je nach Protokoll und verwendeten Schutzgruppen werden Temperaturen zwischen 50-75 °C für 3-12h

genannt. Weil befürchtet werden musste, dass die Basenmodifikation der modifizierten DNA bei zu hohen Temperaturen schaden nehmen könnte, wurde die Entschützung zunächst für analytische Mengen bei 50 °C während 12h durchgeführt. RP-HPLC Analysen der Entschützungsgemische zeigten aber bereits Nebenprodukte, so dass die Inkubationszeit sukzessive von 12h auf 4h reduziert wurde (siehe Abbildung 58). Anschließend wurden die Proben durch Spinfiltration (0,45 µm Porengröße) von der festen Phase abgetrennt, an der Vakuumzentrifuge vom Ammoniak befreit und getrocknet. Zur Reinigung über RP-HPLC wurde das getrocknete Rohprodukt in TEAA-Puffer (100µL, 1M) aufgenommen.

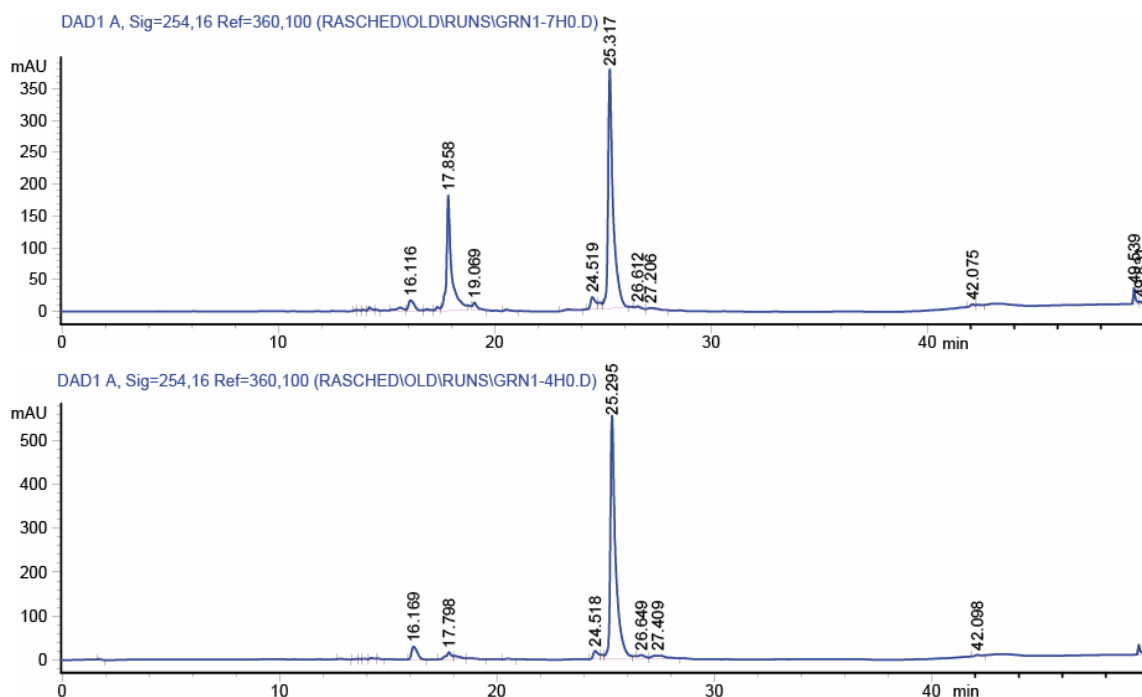


Abbildung 58: Analytisches HPLC-Chromatogramm der Aminolyse des synthetischen Oligonucleotids GRN1 bei 50 °C. Oben: Entschützung während 8h zeigt das Hauptprodukt bei einer Retentionszeit von 25.3 Min. und ein Nebenprodukt bei 17.8 Min. Unten: Entschützung während 4h. Es ist kein signifikantes Nebenprodukt detektierbar.

Die DMT-geschützten Rohprodukte der Festphasensynthese wurden nach vorangegangener analytischer RP-HPLC Charakterisierung im präparativen Maßstab gereinigt. Während bei der analytischen Trennung eindeutige Signalpeaks der Produkte detektiert wurden, erhielt man im präparativen Maßstab eine Signalverbreiterung, die ein Hinweis auf verstärkte π - π Wechselwirkungen der Anthracen-Reste sein kann oder auf andere Sekundärstrukturen - hervorgerufen durch die hydrophoben Modifikationen - zurückzuführen sein könnte (siehe Abbildung 60 und Abbildung 61). Auch ist eine Überladung der Säule nicht auszuschließen, jedoch konnte der Signalverbreiterung durch Verringerung der

Konzentration um die Hälfte bis ein Drittel nicht entgegengewirkt werden. Durch zwei bis drei semipräparative RP-HPLC Reinigungen konnten die DMT-geschützten Zielsequenzen isoliert werden.

Die von Abbruchsequenzen gereinigten DNA-Fractionen wurden gründlich im Vakuum vom Laufmittel befreit. Durch mehrmaliges Lösen in Wasser und Trocknen im Vakuum wurden die größten Reste des TEAA-Puffers entfernt. Die Entschützung des DMT-geschützten 5'-Endes der Oligonucleotide erfolgte mit 80% Essigsäure bei Raumtemperatur während 20 Minuten. Um schädlichen Einfluss der konzentrierten Säure auf die DNA durch längere Einwirkung zu verhindern, wurden die Lösungen anschließend sofort mit 1M TEAA-Puffer versetzt und erneut durch RP-HPLC gereinigt. Die entschützten Sequenzen wurden quantitativ erhalten und konnten leicht durch die kürzere Retentionszeit aufgrund der niedrigeren Hydrophobizität von den geschützten Sequenzen unterschieden werden. Die gesammelten Fraktionen wurden erneut im Vakuum vom Laufmittel befreit, in Wasser gelöst und anschließend mit Ethanol gefällt. Die funktionalisierten Oligonucleotid Sequenzen wurden in Reinstwasser gelöst und die Konzentration dieser Stammlösungen über die optische Dichte (OD_{260} bei 260 nm) bestimmt.

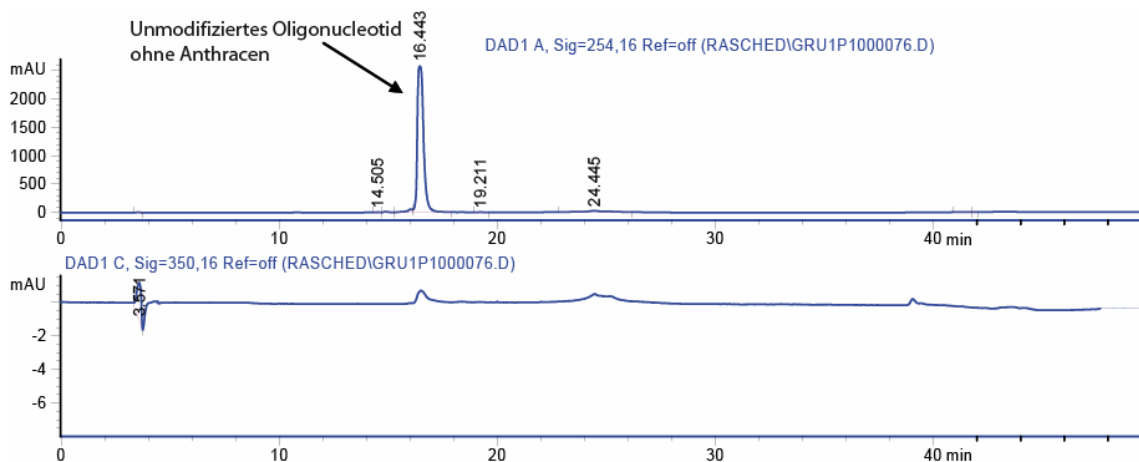


Abbildung 59 Elutionsprofil der Sequenz **GRU1** (kommerziell erworbenes, unmodifiziertes Oligonucleotid). Oben UV-Detektion bei 254 nm unten bei 350 nm. Ohne Anthracen wird kein signifikantes Signal bei 350 nm detektiert.

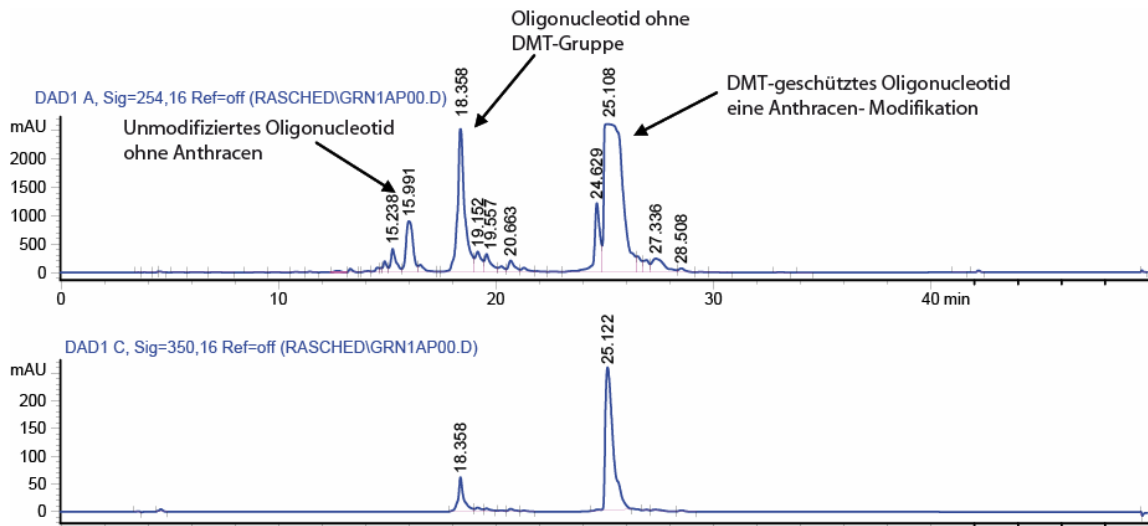


Abbildung 60: Elutionsprofil der Sequenz **GRN1** (präparativ, Basensequenz identisch mit **GRU1**, 5'-DMT geschützt inklusive einer Anthracenmodifikation an Position 11). Die Anthracenmodifikation erzeugt auch ein detektierbares Signal bei 350 nm (unteres Chromatogramm).

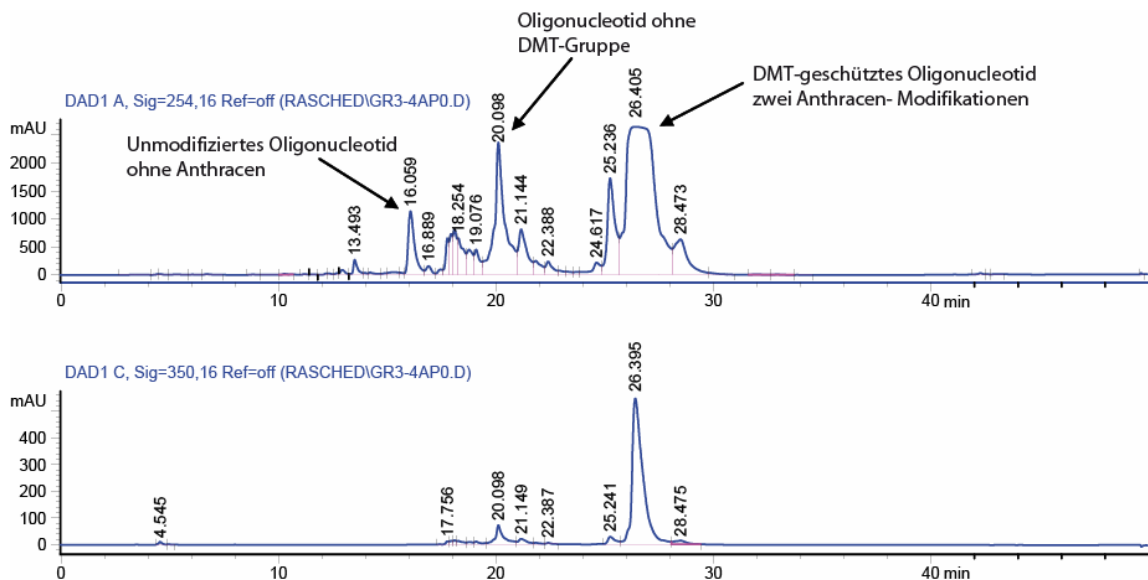


Abbildung 61: Elutionsprofil der Sequenz **GRN3** (präparativ, Basensequenz identisch mit **GRU1**, 5'-DMT geschützt inklusive zweier Anthracenmodifikationen an Position 6 und 16).

Abbildung 59 bis Abbildung 61: Elutionsprofile der präparativen HPLC-Trennungen der Sequenzen **GRU1**, **GRN1** und **GRN3**. Das obere Chromatogramm der Chromatogramm-Paare zeigt jeweils die Detektion bei 254 nm (Absorption der Nucleobasen und des Anthracens) und das untere die Detektion bei 350 nm (keine Absorption der Nucleobasen nur des Anthracens und ggf. der DMT-Schutzgruppe). Die höchste Retentionszeit zeigt die mit zwei hydrophoben Gruppen ausgestattete Sequenz **GRN3**. Die Signale der DMT geschützten Oligonucleotide **GRN1** und **GRN3** sind etwas verbreitert. Teilweise DMT-entschützte Produkte, Abbruchsequenzen und unmodifizierte Oligonucleotide machen die Hauptverunreinigungen im Elutionsspektrum aus. Das Vorhandensein der Anthracen-Modifikationen wird im UV-Spektrum durch die Signale bei 350 nm bestätigt.

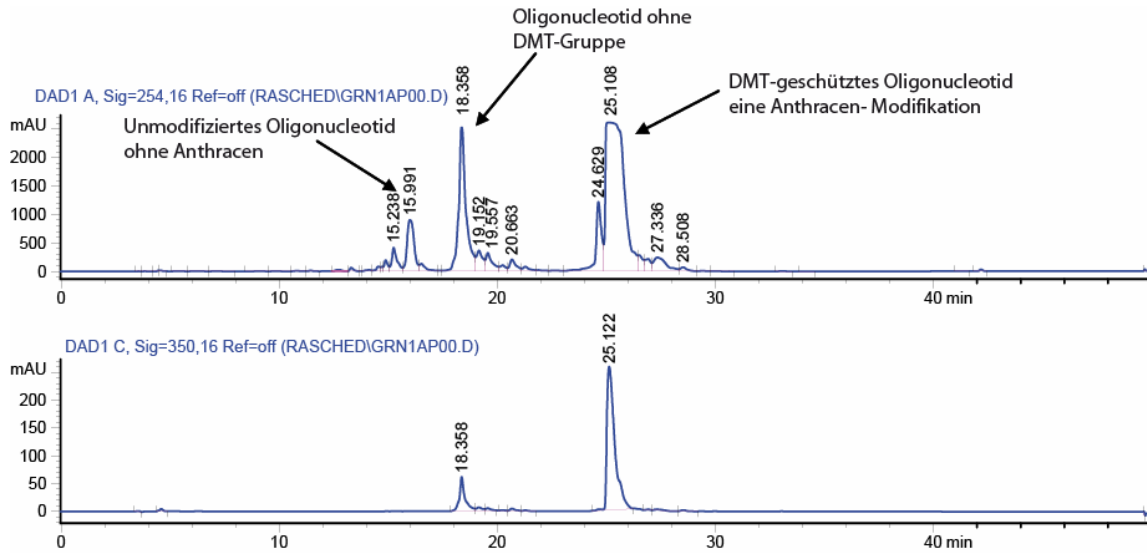


Abbildung 62: Elutionsprofil der DMT-geschützten Sequenz GRN1 mit einer Anthracen Modifikationen (präparativ).

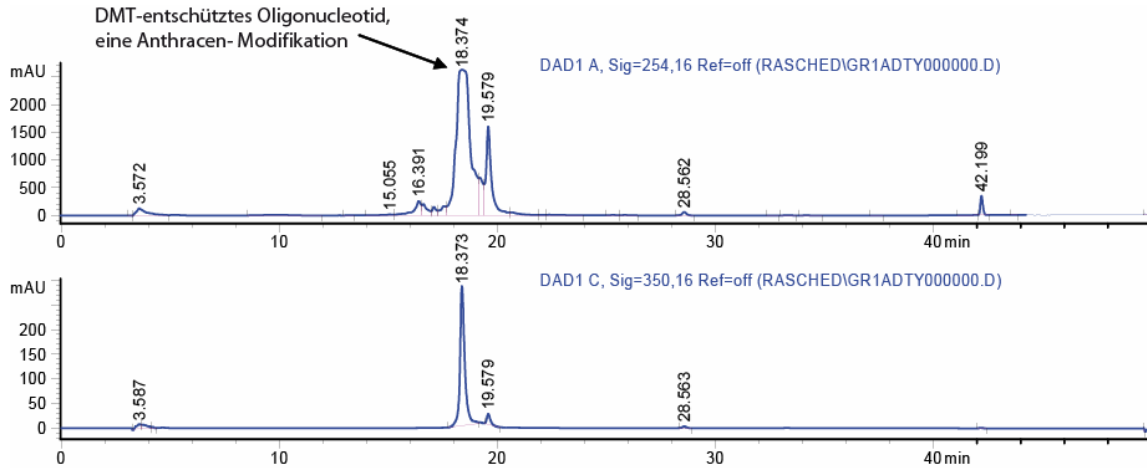


Abbildung 63: Elutionsprofil der DMT-entschützten Sequenz GRN1 mit einer Anthracen Modifikationen (präparativ)

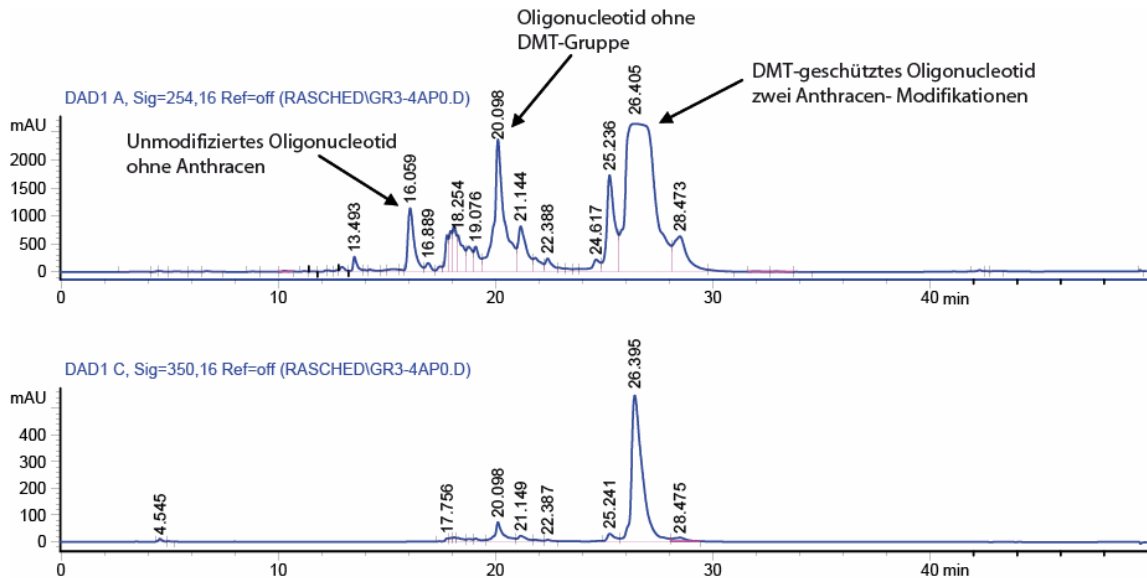


Abbildung 64: Elutionsprofil der DMT-geschützten Sequenz GRN3 mit zwei Anthracen Modifikationen (präparativ)

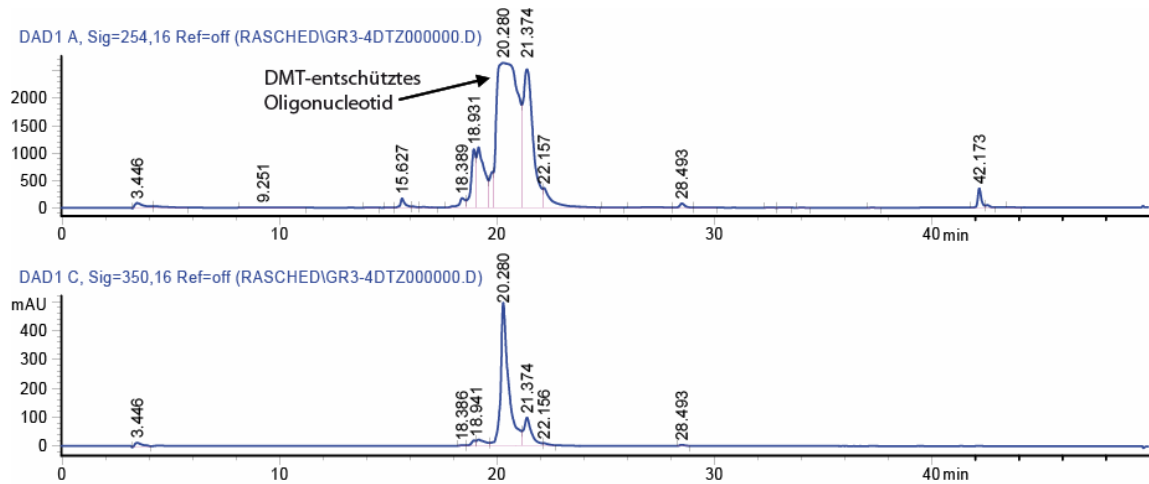


Abbildung 65: Elutionsprofil der DMT-entschützten Sequenz GRN3 mit zwei Anthracen Modifikationen (präparativ)

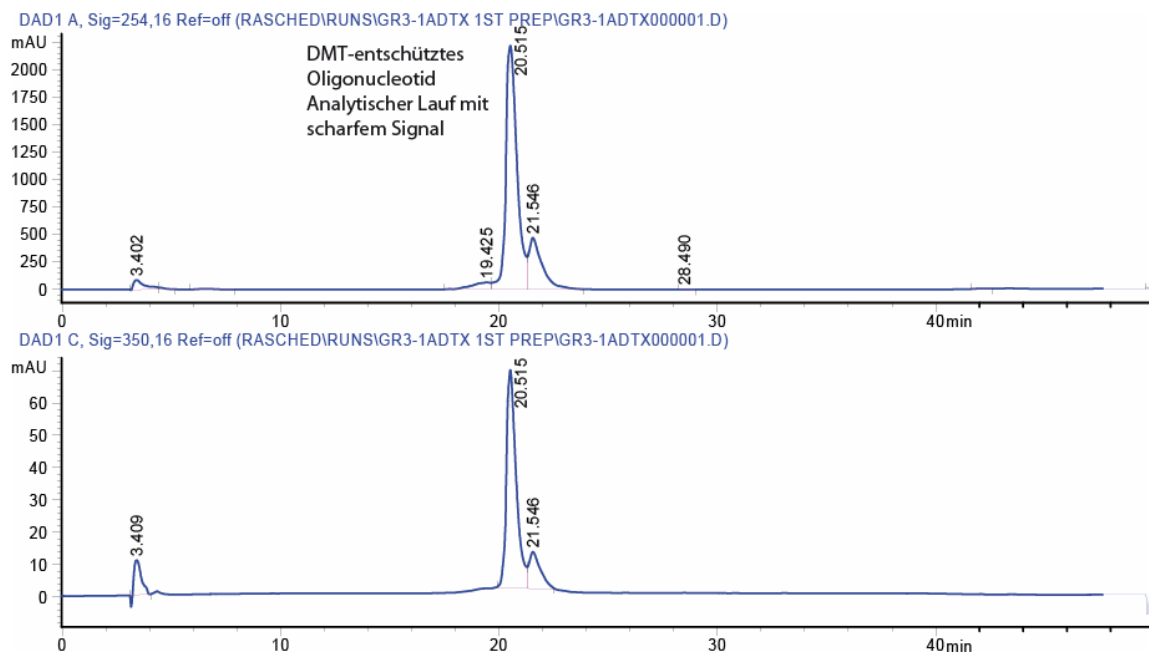
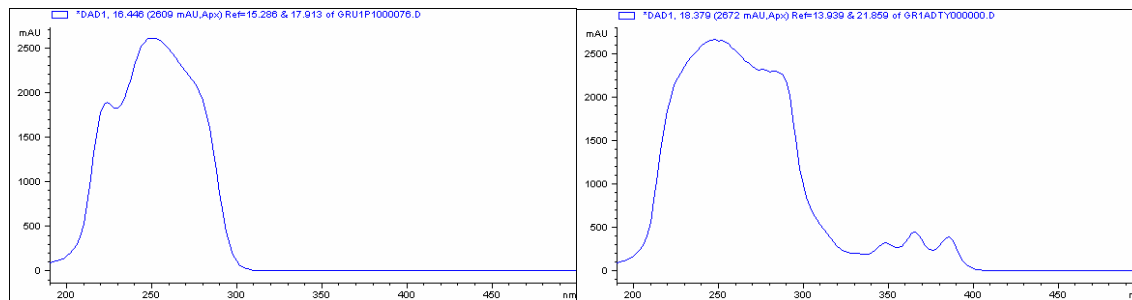


Abbildung 66: Elutionsprofil der DMT-entschützten Sequenz GRN3 mit zwei Anthracen Modifikationen (analytisch)

Abbildung 62 bis Abbildung 66: Änderung der Retentionszeit durch die DMT-Entschützung der synthetisierten Oligonucleotide exemplarisch an Sequenz GRN1 und GRN3 illustriert.

Die Anwesenheit der Anthracen-Modifikation ist im UV-Spektrum der Produktsignale gut sichtbar (Abbildung 67 bis Abbildung 66). Wie die UV-aktiven, aromatischen Nucleobasen der Oligonucleotide, so absorbiert auch Anthracen deutlich UV-Licht im Wellenlängenbereich um 250-260 nm. Zusätzlich zur dieser Absorptionsbande zeigt Anthracen aber auch drei weitere charakteristische Absorptionsbanden zwischen 330-390 nm, die bei umodifizierten Nucleinsäuren nicht auftreten und in den UV-Spektren der Produktsignale der modifizierten DNA-Sequenzen **GRN1-7** eindeutig erkennbar sind.

Absorbtionsspektrum der Produktbanden der unmodifizierten Oligonucleotid-Sequenz GRU1 (links) und der mit einem Anthracen modifizierten Sequenz GRN1 (rechts):



Absorbtionsspektrum von Anthracen-9-carbonsäure (Verbindung 9, 100 μM , MeCN/H₂O 1:1 (v/v)):

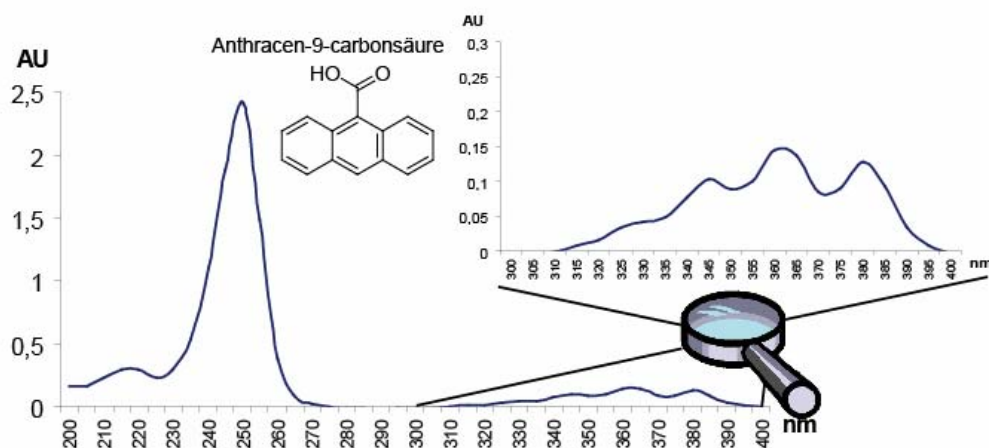


Abbildung 67: Vergleich der UV-Spektren der unmodifizierten und modifizierten Oligonucleotide (oben, links und rechts) mit dem UV-Spektrum der Anthracen-9-carbonsäure mit ihrer charakteristischen Absorbtion zwischen 330-390 nm.

3.2.2.1 Massenspektrometrische Untersuchung

Die Massenspektrometrie ist aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und Aussagekraft eine leistungsfähige Methode in der instrumentellen Analytik zur Detektion und Identifikation größerer Biomoleküle. Klassische Ionisierungsmethoden, wie Elektronenstoßionisation (EI) oder FAB (*Fast Atom Bombardment*), erlauben jedoch nur den Nachweis relativ kleiner organischer Moleküle, die unzersetzt verdampfbar sind. Im Vergleich zu anderen Biopolymeren ist die Erzeugung intakter Molekülionen von Oligonucleotiden aufgrund der hohen Polarität und Fragmentierungstendenz äußerst schwierig. Infolge des negativ geladenen Phosphatgerüsts in Gegenwart von Metallionen (Na^+ , K^+ etc.) bilden

sich mit zunehmender Länge eine Großzahl an heterogenen Kationenaddukten. Die Heterogenität im Gegenkation führt zu separaten Signalen und hat eine Abnahme des Signal/Rausch-Verhältnisses des eigentlichen Molekülions zur Folge. Eine schonende Ionisierungsmethode für größerer Biomoleküle, wie der in diesem Fall zu untersuchenden Oligonucleotide einer Länge von 21 Basenpaaren und einem Molekulargewicht deutlich größer als 5 kDa, ist die in den achtziger Jahren eingeführte Elektrospray Ionisation (ESI). Bei der Elektrospray-Ionisation wird durch Versprühen der Probe in Gegenwart eines hohen elektrischen Feldes eine Serie mehrfach geladener Molekülionen erzeugt. Die Kopplung von ESI mit dem hochauflösenden FT-ICR-MS (*fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer*) erlaubt eine sehr hohe Auflösung und Massengenauigkeit. Es wurde jeweils 2.5 nmol Oligonucleotid aus den Stammlösungen entnommen und auf ein 50 μ L Wasser/Acetonitril Lösungsgemisch eingestellt, was einer Endkonzentration von 50 μ M entspricht. Diese Proben wurden gemessen und die gefundenen Massen mit den berechneten Massen verglichen (siehe Kapitel 5.3.2 und Anhang 7.3.7 bis 7.3.13). Sowohl die einfach modifizierte Oligonucleotidsequenz **GRN1** als auch die zweifach modifizierten Sequenzen **GRN2-5** zeigten die zu erwartenden Molekül-Signale oder das korrespondierende Assoziat mit Na^+ , wie Tabelle 2 und die exemplarischen Spektrogramme (Abbildung 68 und Abbildung 69) zeigen.

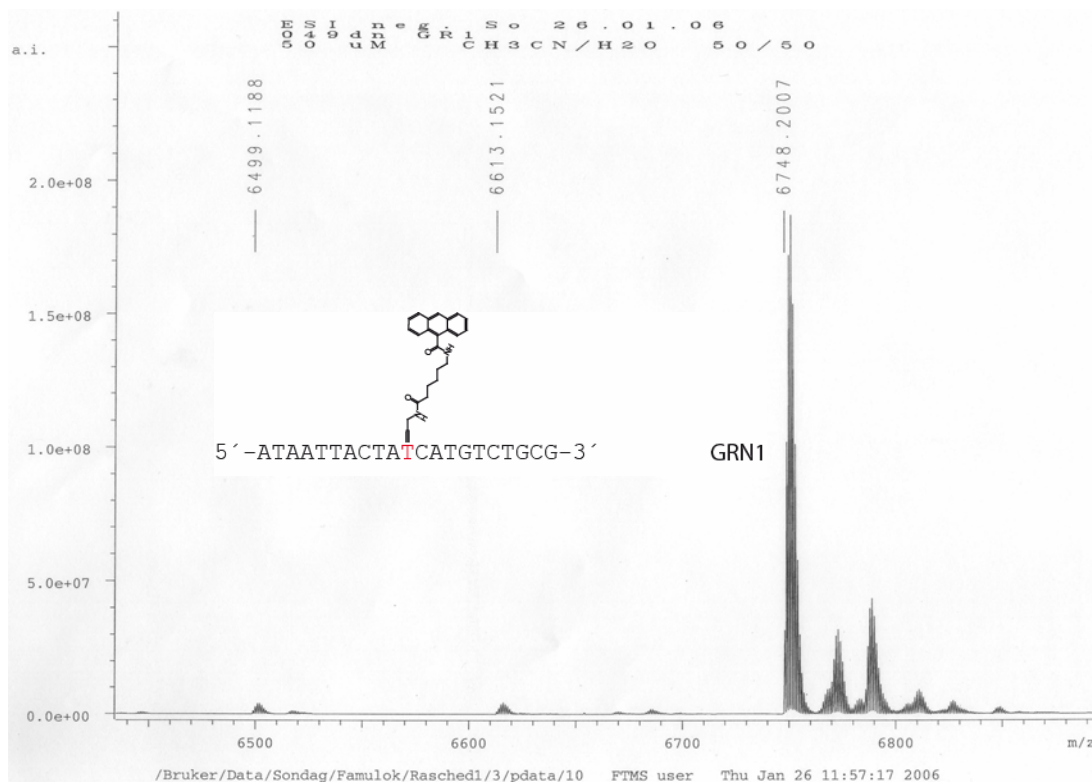


Abbildung 68: Massenspektrogramm der einfach modifizierten Oligonucleotid-Sequenz **GRN1**. Die gefundene Masse von 6748.2007 korrespondiert mit der über exakte Masseninkremente berechneten Oligonucleotidmasse von 6748.11 (vgl. Tabelle 2 und Kapitel 5.3.2).

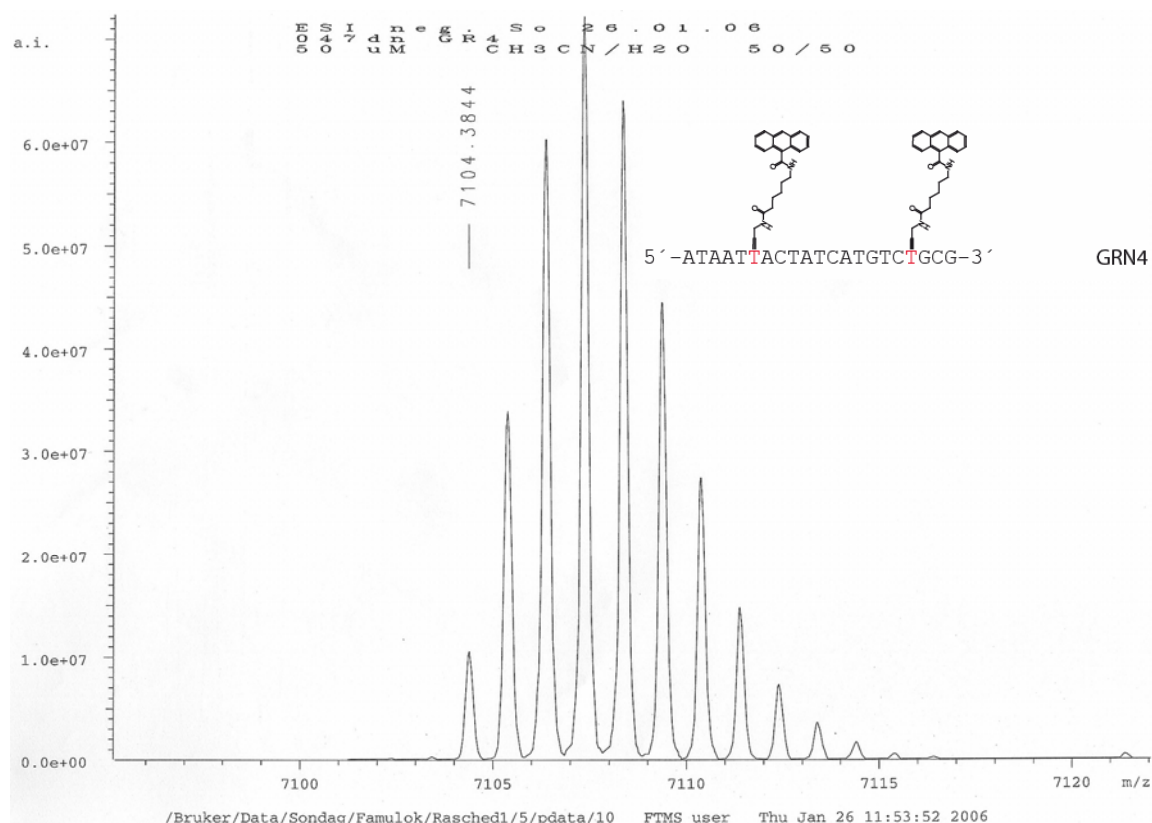


Abbildung 69: Massenspektrogramm der zweifach modifizierten Oligonucleotid-Sequenz **GRN4**. Die gefundene Masse von 7104.3844 korrespondiert mit der über exakte Masseninkremente berechneten Oligonucleotidmasse von 7104.11 (vgl. Tabelle 2 und Kapitel 5.3.2)

Tabelle 2: Auswahl an gemessenen Oligonucleotid-Sequenzen mit ESI-ICR-MS. Es wurden Probenvolumen von 50 μL mit einer Konzentration von 50 μM eingesetzt. Ausnahme ist das kommerziell erworbene umodifizierte **GRU1** mit einer Konzentration von 12 μM .

Sequenz	Gefundene Masse [u]	Berechnete Masse* [u]
GRN1	6748,2007	6748,11
GRN2	7104,3370	7104,11
GRN3	7127,6726 (M+Na)	7127,10 (M+Na)
GRN4	7104,3844	7104,11
GRN5	7104,3853	7104,11
GRU1	6458.3442 bzw. 6394.4 (LC-ESI-MS)	6392,11

* siehe Kapitel 5.3.2

Um den Einfluss der Anthracen-Modifikation auf die Stabilität eines DNA-Doppelstranges zu ermitteln, wurden DNA-Schmelzpunktkurven aufgenommen. Nucleinsäuren zeigen im doppelsträngigen, hybridisierten, helikalen Zustand eine niedrigere UV-Extinktion als die verknäuelten Einzelstränge (Hypochromie). Die

Ursache der Hypochromie liegt in der Wechselwirkung zwischen den chromophoren Basen und ist ein einfaches quantitatives Maß für die Bildung oder Auflösung geordneter Strukturen. Durch die Basenstapelung resultiert eine geringere Übergangswahrscheinlichkeit der π -Elektronen in den angeregten Zustand, was eine Abnahme des molaren Absorptionskoeffizienten zur Folge hat (Hypochromie). Bei der Denaturierung („Aufschmelzen“) der DNA steigt die Absorption wieder steil an (Hyperchromie). Die für jede Probe charakteristische Temperatur, die bei der Hälfte der vollen Absorptionsänderung auftritt, wird als Schmelztemperatur T_m definiert. Mit einem Spektralphotometer kann der Hypochromieverlauf in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgt werden.

Die zwei Modifikationen enthaltende Zielsequenz GRN3 wurde im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 mit einem unmodifizierten Gegenstrang hybridisiert. Zum Vergleich wurde ein analoges doppelsträngiges 21 bp langes Oligonucleotid derselben Sequenz ohne funktionelle Gruppen gewählt.

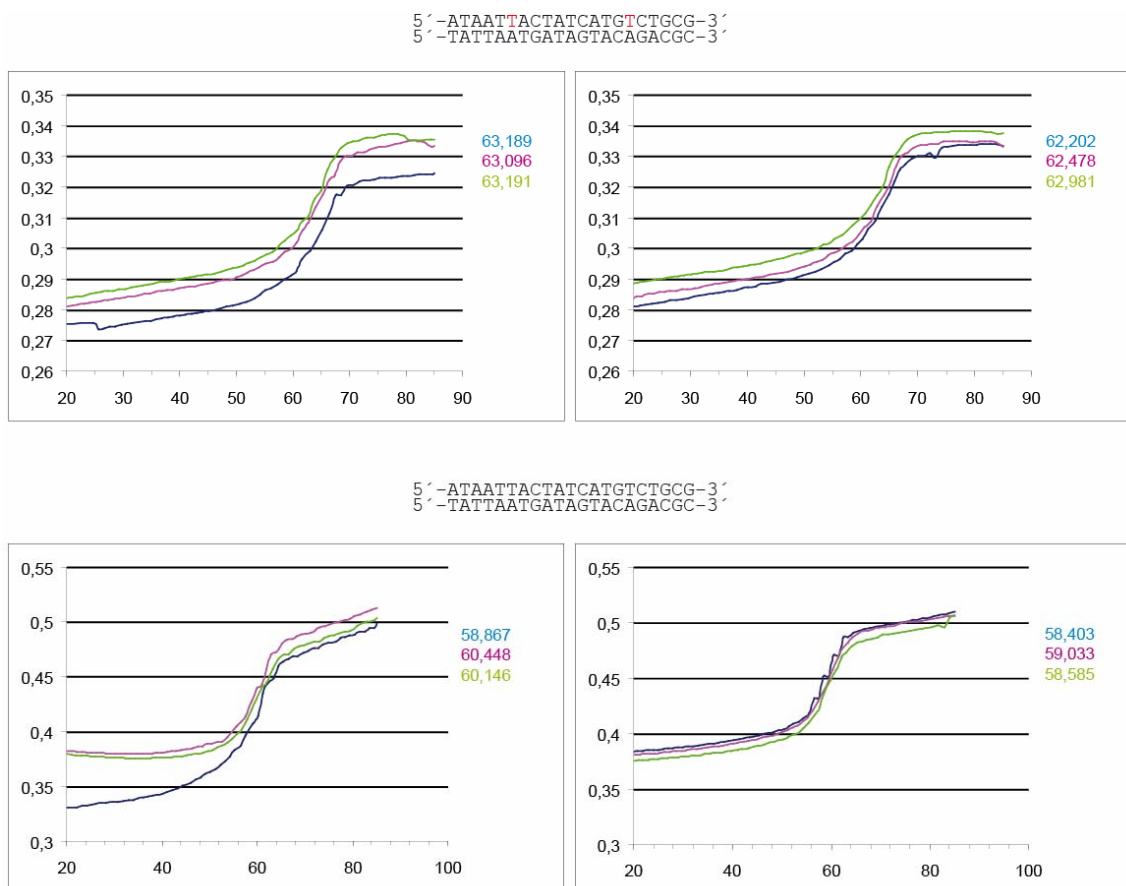


Abbildung 70: Schmelzpunktcurven eines zweifach Antracen-modifizierten DNA-Doppelstrangs (oben) und eines unmodifizierten Doppelstrangs selber Basenpaarsequenz. Das jeweils linke Absorptions-spektrum in Abhängigkeit der Temperatur wurde in den Aufheizphasen aufgenommen, während das rechte Spektrum während des Abkühlens gemessen wurde. Die Stabilität der funktionalisierten dsDNA (unten) ist um signifikante 3.5 °C höher.

Die Schmelzpunktkurven zeigen, dass die zweifach Anthracen-funktionalisierte Doppelhelix mit $T_m = 63^\circ \text{C}$ um signifikante 3.5°C stabiler ist als die völlig unmodifizierte dsDNA mit derselben Basensequenz. Diese Beobachtung verwundert nicht, da bereits berichtet wurde, dass Propinyl-modifizierte Nucleoside aufgrund erhöhter Polarisierbarkeit der Nucleobase und des hydrophoben Charakters der Gruppe einen positiven Effekt auf die Duplex-Stabilität von DNA haben.^[108, 111]

3.3 Molekularbiologische Experimente zur Herstellung von funktionalisierbaren DNA Miniplasmiden

3.3.1 Design von DNA Miniplasmiden

Eines der ersten theoretischen Modelle für die Beschreibung von inhärent gebogener DNA ist das Keil-Modell („*Wedge-Model*“) von *Trifonov et al.*, das die Krümmung der DNA, wie sie in Chromatin gefunden wird, durch die schwache 10.5 Basenpaar Periodizität von immer wiederkehrenden Dinucleotidsequenzen erklärt.^[139-141] Dieses Modell geht von der Annahme aus, dass bestimmte Dinucleotidsequenzen wie ein Keil die DNA-Helix in eine bestimmte Richtung ablenken und somit die Helix-Achse geringfügig krümmen (Abbildung 71). Entspricht die Wiederholung dieser „Keil“-Sequenz der Basenpaar-Länge einer Helix-Windung, erfolgt die Ablenkung immer kooperativ in dieselbe Richtung und führt über einen langen DNA-Doppelstrang zu einer deutlichen Krümmung der DNA.

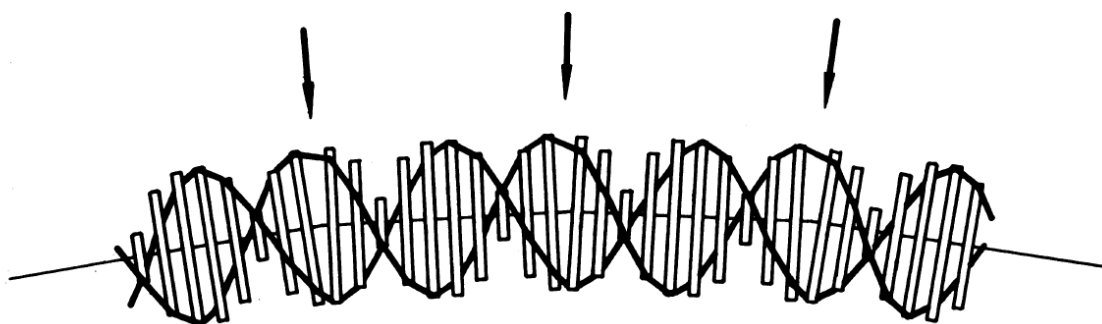


Abbildung 71: Schematische Illustration der unidirektionalen Krümmung einer DNA Doppelhelix durch die Wiederholung von „Keil“-Sequenz in Periodizität der Helix-Windung, welche die DNA-Achse ablenken.^[139, 142]

Es gibt eine Reihe von Basensequenzen, die eine systematische Krümmung der DNA bewirken aber über die gesamte Länge nur eine schwache Ausprägung zeigen. Stark gebogene DNA resultiert nur dann, wenn ein spezielles Motiv in Phase mit der helikalen Windung (ca. 10.5 bp für B-DNA) wiederholt wird, um

das wiederkehrende Element der Ablenkung stets auf derselben Seite der Doppelhelix zu platzieren und so konstruktiv zu einer „globalen“ Biegung der DNA über ihre gesamte Länge beizutragen. Solch ein starkes Motiv repräsentiert der sogenannte „A-tract“ (A-Spur oder Zug), eine homopolymere Sequenz von dA:dT Basenpaaren einer Länge von ungefähr einer halben Helix-Windung, zwischen denen gleichmäßig verteilte Basenpaare, die auch dC und dG enthalten können, liegen. Auf solchen Motiven beruhende, stark gekrümmte DNA wurde in der Arbeitsgruppe von *Englund* und *Crothers* während der Studie von DNA Minicircles des Kinetoplast - einer hochorganisierte DNA-Struktur eines einzelnen Mitochondriums- von *Leishmania tarentolae* entdeckt.^[141, 143] Eine unmittelbare Konsequenz der starken Krümmung der DNA ist eine deutlich anomale, reduzierte geleelektrophoretische Mobilität.^[142] Gekrümmte oder zirkuläre DNA wandert erheblich langsamer als ungebogene völlig flexible DNA derselben Basenpaar-Länge. Eine vereinfachende Erklärung bildet die Vorstellung, dass Nucleinsäuren als flexible lineare Moleküle ohne Vorzugsrichtung wie Schlangen oder wurmartige Fragmente an den engen Poren der Gelmatrix vorbei- „kriechen“ oder „schlängeln“ (engl. *reptate, reptational*).^[141, 142] Gebogene und stabil gekrümmte Spezies hingegen sind deutlich weniger flexibel und erfahren so deutlich mehr Reibung und Widerstand in der Gelmatrix. Diese Eigenschaft kann man sich zunutze machen, um gekrümmte DNA nachzuweisen und wird in den später beschriebenen Experimenten dazu genutzt, gekrümmte aber offene von zirkulärer DNA zu trennen. Der Nachweis, dass die Periodizität und die Anwesenheit eines A-tracts vonnöten sind, um DNA zu biegen, wurde durch den Vergleich der elektrophoretischen Mobilität von wiederholten A-tracts mit einer Periodizität von 9 bp oder 12 bp mit der von 10-11 bp derselben Länge erbracht. Die Anomalie ist bei 9 bp und 12 bp erheblich reduziert und bei nicht-A-tracts gar nicht vorhanden.^[141] Neben dem Keil-Modell, das die Ursache der Krümmung in der kumulativen Ablenkung der DNA Achse aufgrund von einheitlichen Roll-Winkeln zwischen zwei benachbarten dA:dT Basenpaaren sieht, die von ansonsten regulärer B-DNA flankiert wird, existiert auch „das *Junction*-Modell“ (Anschluss-Modell).^[141, 144] Das *Junction*-Modell geht von einer leicht verzerrten Struktur des homopolymeren dA:dT Teils des A-tracts aufgrund von negativen Inklinationswinkeln einiger Basenpaare bezüglich der Helix-Achse aus. Wenn auf diese anomale Struktur reguläre B-DNA anschließt, kommt es, so das Modell, zu einer Krümmung an dieser Anschlussstelle. Beide Modelle können die Anwesenheit einer konstanten Krümmung in Richtung der kleinen Furche des homopolymeren dA:dT Teils im Gegensatz zu einem flexiblen Segment ohne Vorzugsrichtung erklären. Das *Junction*-Modell vermag die Unterschiedlichkeit der 5'- gegenüber der 3'- Anschlussstellen des A-tract führenden Stranges an der Schnittstelle zum regulären nicht-homopolymeren Teil der regulären Se-

quenz zu erklären. Die beobachtbare Krümmung (NMR und Kristallographische Daten^[144]) ist am 3'-Ende größer. Beide Modelle lassen sich mit der Tatsache vereinen, dass die Unterbrechung des dA:dT Teils des A-tracts mit einem anderen Basenpaar die Gelmigrationsanomalie drastisch reduziert. Beide Modelle werden heute noch nebeneinander angewendet. Die NMR-spektroskopischen Daten der Vermessung eines A-tract Dodecamers d(GGCAAAAACGG/CCGTTTTTGC) beschreiben eine Gesamtkrümmung der Doppelhelix um 19°. ^[144] Dabei entfallen 14° auf die GC-Regionen, die den A-tract flankieren und die übrigen 5° sind gleichmäßig über die 6 AT Paare verteilt. Der A-tract zeigt eine verringerte Weite der kleinen Furche in 5'-3'-Richtung. Dies wird einem Propeller-Twist der AT Paare und einer wachsenden Inklination des Adenins an der 3'-Seite des Rückgratverlaufs zugesprochen. Die vier mittigen Thymin-Basen zeigen alle negative Inklination mit einem mittleren Wert von 6°. Die 5'-Krümmung an der GC-Anschlussstelle von 4° resultiert aus einem Tilt und Roll, während die größere Biegung von 10° am 3'-Ende der A-tract Flanke schrittweise über zwei Basen durch Kombinationen von Tilt und Roll entsteht.

Das Design zur Generierung von nanometer-großen DNA Objekten aus stabilen DNA Miniplasmiden basiert auf dem oben beschriebenen A-tract Konzept. Die sich wiederholende Hauptsequenz des als Vorwärts-Strang (Symbol f für das engl. *forward*) bezeichneten, A-tract-tragenden DNA-Einzelstrangs besteht aus 6 konsekutiven dA Nucleotiden, gefolgt von einer Lücke, bestehend aus sich abwechselnden dTdA mit anschließenden 5 dAs (siehe A-tract Basis-Sequenz oben in Abbildung 72). Um die Möglichkeit zu erhalten, die zuvor synthetisch hergestellten funktionalisierten 21mer DNA-Oligonucleotide durch Hybridisierung oder Ligation in die DNA Miniplasmide einzubauen, wurde in die repetetive A-tract Sequenz eine 21 Basenpaar lange Region integriert, die im Vorwärts-Strang dieselbe Basensequenz besitzt wie **GRU1** und **GRN1-GRN6** (Abbildung 56 und violette Sequenz in γf Abbildung 72). Der Gegenstrang, nachstehend als Rückwärts-Strang bezeichnet (Symbol r), enthält demzufolge die komplementäre Sequenz, die identisch mit der Basensequenz **GRN7** (Abbildung 56) ist. Forschergruppen, die DNA Miniplasmide mit Rasterkraftmikroskopischen Methoden untersucht haben, benutzten DNA Micro-Ringe von der Länge von 126 bp oder 168 bp.^[145-150] Die Entscheidung für eine Ringgröße im vorliegenden Projekt fiel auf Plasmide mit dem Umfang von 168 bp, weil sich zwar gezeigt hat, dass Micro-Ringe mit 12 Helix-Windungen (126 bp) sich leichter bilden als Plasmide mit 16 Windungen (168 bp), da die statistische Summe ihrer Krümmung ungefähr 360° C entspricht (Cyclisierungseffektivität ca. 1.32 zu 0.65 zu Gunsten von 126 bp).^[148] Es muss aber angenommen werden, dass durch das Einbringen der 21 bp Region, die nicht einem A-tract entspricht, diese Krümmung teilweise

gestört wird und ein längerer Umfang benötigt wird, um einen spannungsfreien Ringschluss zu ermöglichen. Alles in allem können sich auch 168 bp große Ringe bilden, selbst wenn im statistischen Mittel thermische Fluktuation von Nöten ist um eine Ligation der Enden zu erreichen. Die Vorhersage der Anzahl der Vielfachen einer gegebenen Sequenz, die eine ideale Krümmung zu 360°C erzeugt, also die DNA zum Ringschluss befähigt, ist ohnehin schwierig. Berechnet man die Summe der resultierenden Krümmung nach der Vorgabe für das oben erwähnte, durch NMR-Studien beschriebene Dodecamer ($19^\circ/12\text{ bp} = 1.59^\circ/\text{bp}$), so erhalte man für einen 168 bp langen Doppelstrang ($168\text{ bp} \cdot 1.59^\circ/\text{bp} = 267^\circ$) nur 267° . Mit der Wahl eines geeignet erscheinenden Ringumfangs wurden als nächstes ein Design für Vorläufer-Sequenzen erstellt.

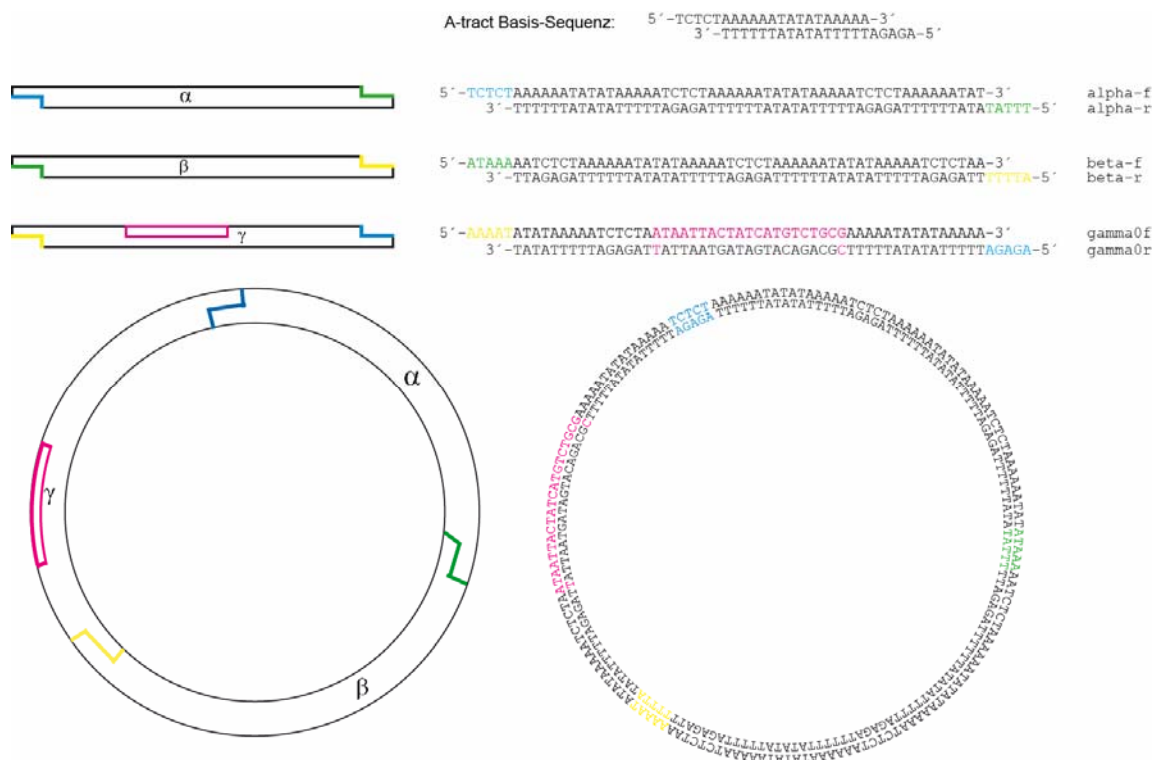


Abbildung 72: Design der DNA Miniplasmide aus drei dsDNA Segmenten, basierend auf der 21 bp langen A-tract Basis-Sequenz. Jedes ds Segment besteht aus einem Strang (α_f , β_f und γ_f) und dem komplementären Gegenstrang (α_r , β_r und γ_r) mit 5 bp Überhang (*sticky ends*, klebrige Enden). Jedes *sticky end* kann nur mit einem Ende eines anderen Segments hybridisieren (in der Abbildung farbkodiert). Während die Segmente α und β reine A-tracts sind, enthält γ in der Mitte die 21 bp Sequenz (violett gefärbt) der modifizierten Oligonucleotid Sequenzen GRN1-GRN6. Links sind die Segmente und der ligierte DNA-Mikro-Ring als Balken bzw. als Segment-Ring stilisiert dargestellt.

Der Ring wurde in drei gleich lange Segmente geteilt (Abbildung 72), so dass die doppelsträngigen Segmente einen 5 bp Überhang aufweisen (sog. klebrige Enden, engl. *stick ends*, vgl. Kapitel 1.2), deren Sequenz nur die Hybridisie-

rung mit je einem Ende eines anderen Segments erlaubt. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass ausschließlich DNA-Ringe der Größe von 168 bp oder Vielfache dieser Größe entstehen können. Man erhält drei 56 bp lange Segmente, die mit alpha (α), beta (β) und gamma (γ) bezeichnet werden und deren einzelsträngige Sequenzen keine Selbstkomplementarität aufweisen, so dass Sekundärstrukturen wie Hairpins vermieden werden. Während es sich bei Segment α und β um reine A-tracts handelt, wie oben beschrieben, enthält Segment γ in der Mitte die 21 bp Region, deren Sequenz zu den synthetischen Oligonucleotid-Sequenzen **GRN1-GRN6** und **GRU1** passt.

3.3.2 Probenvorbereitung und Ligation der DNA Miniplasmid-Segmente

Zur Ligation der käuflich erworbenen DNA Oligonucleotide ist es nötig die 5'-OH-Enden zu phosphorylieren (kinasieren), um die enzym-katalysierte Ausbildung der Phosphordiester Bindung zwischen den separaten Fragmenten zu ermöglichen. Die Phosphorylierung geschieht mit dem Enzym T4 Polynucleotidkinase (T4 PNK, *New England Biolabs*), das den Transfer einer Phosphateinheit von der γ -Position eines ATP zum 5'-Hydroxylterminus eines Polynucleotids katalysiert (Abbildung 73). Die Phosphorylierung kann auch dazu genutzt werden die Oligonucleotide radioaktiv mit ^{32}P zu markieren, um anschließend autoradiographische Detektion zu ermöglichen. Eine alternative Detektionsmöglichkeit ist die Färbung der dsDNA mit Fluoreszenz-aktiven Interkalatoren, wie Ethidiumbromid oder SYBR Green I.

Die Verknüpfung der phosphorylierten, doppelsträngigen Segmente mit Überhängen geschieht durch das Enzym T4 DNA Ligase, das die Formation von Phosphordiester Bindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Termini in dsDNA unter ATP-Verbrauch katalysiert (Abbildung 73). Ligationen werden im Laboralltag zum Einbringen von Vektoren in bakterielle DNA häufig bei Raumtemperatur während wenigen Stunden (2-4 h) durchgeführt. Bei solcher Verwendung kommt es allerdings nicht auf eine quantitative Ligationsausbeute an. Im vorliegenden Fall wird eine möglichst quantitative Umsetzung der Einzelsegmente zu einem Ligationsprodukt angestrebt, weshalb die Ligrationsreaktionen bei der für das Enzym optimalen Katalyse-Temperatur von 16 °C für mindestens 12 Stunden durchgeführt wurden. Es gilt darauf zu achten, dass die bei -20 °C gelagerten Enzym Puffer keinen Niederschlag aufweisen, da dies ein Hinweis auf präzipitiertes ATP sein kann. Ausgefallenes ATP kann die Enzymaktivität drastisch hemmen oder sogar völlig einstellen.

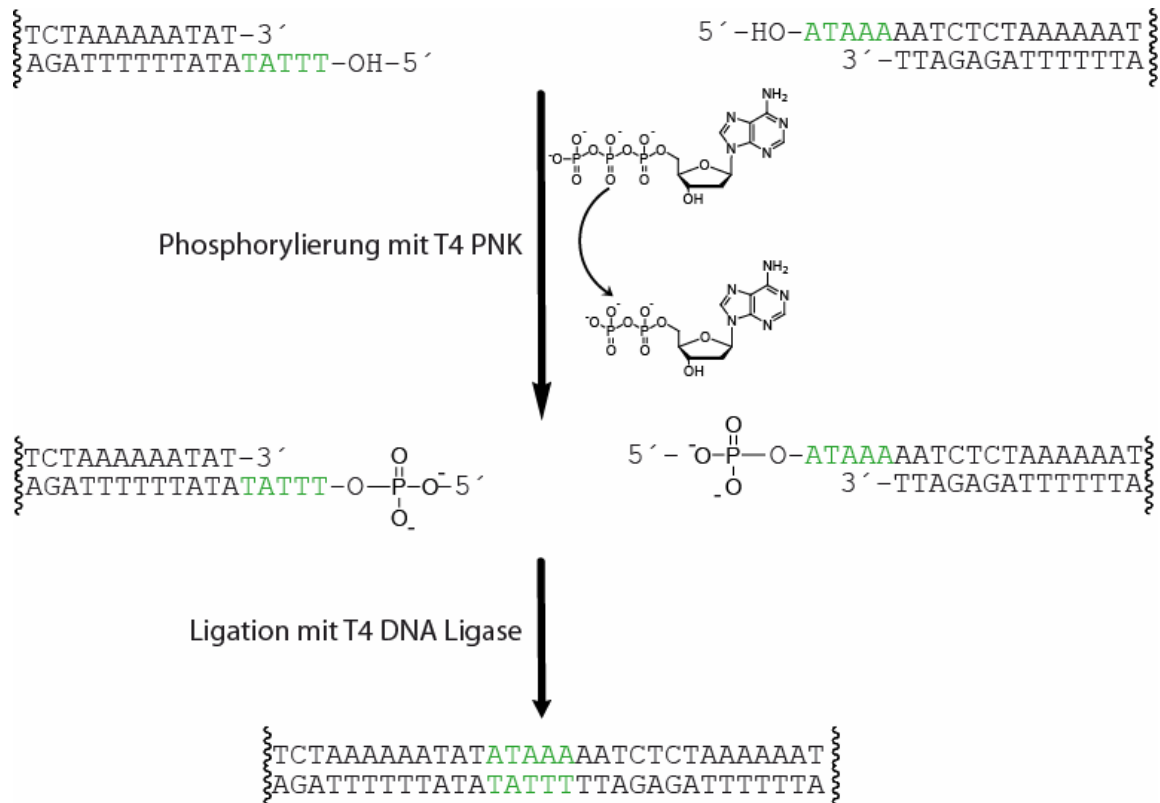


Abbildung 73: Schema der Phosphorylierung von 5'-OH-Überhängen doppelsträngiger DNA-Segmente mit anschließender Ligation.

Der Enzym-Lieferant *New England Biolabs* liefert einen ATP-haltigen Ligation Puffer, der auch für die zuvor stattfindende Phosphorylierung mit T4 PNK vom selben Hersteller geeignet ist, so dass die Phosphorylierung mit anschließender Ligation direkt hintereinander ohne Pufferwechsel und Reinigungs- oder Fällungsschritt erfolgen kann. Allerdings gilt es darauf zu achten, dass für die Phosphorylierung zusätzliches ATP der Reaktionslösung zugesetzt wird. Bei einer radioaktiven Markierung durch Kinasierung sollte der ATP-freie Kinasepuffer verwendet werden, um zu gewährleisten, dass zunächst alles eingesetzte radioaktive ATP für die Phosphorylierung genutzt wird, bevor ein Überschuss an zusätzlichem ATP die restlichen freien 5'-OH Enden phosphoryliert.

Zur Ermittlung der besten Bedingungen, im Hinblick auf die eingesetzten Konzentrationen für die Phosphorylierung und die Ligationen der DNA Segmente, wurden mehrere Test-Reaktionen mit unterschiedlichen Mengen an Enzym und DNA-Substrat durchgeführt. Der Ligationserfolg konnte mit wenig Zeitaufwand durch die, im Gegensatz zur PAGE-Elektrophorese, vergleichsweise unkomplizierte und schnelle Agarosegelelektrophorese ermittelt werden (Abbildung 74).

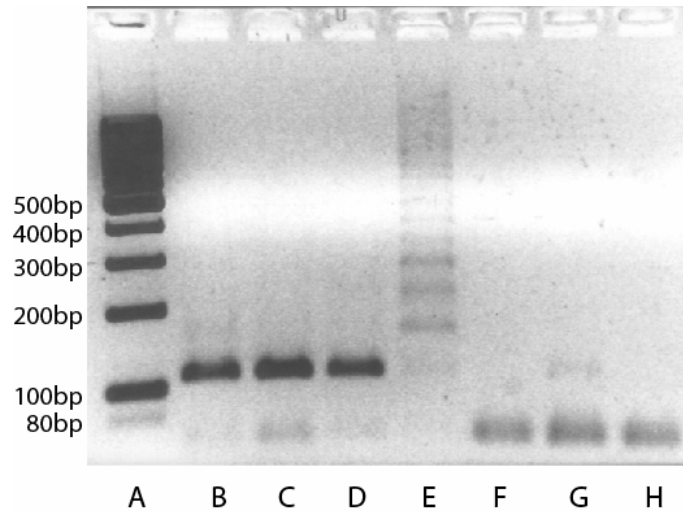


Abbildung 74: Beispiel eines 2,5% Agarose-Gels der Ligationsprodukte angefärbt mit Ethidiumbromid. Spur A: DNA-Längenmarker; Spuren A-D: Ligationsprodukte $\alpha+\beta$, $\beta+\gamma$, und $\alpha+\gamma$; Spur E: Ligationsprodukt $\alpha+\beta+\gamma$; Spur F-H: $\alpha+\beta$, $\beta+\gamma$, und $\alpha+\gamma$ ohne Ligationsenzym. Da außer dem Trimer $\alpha+\beta+\gamma$ auch vielfache dieser Segmente auftreten, erscheinen bei Spur E die Produkte als Leiter.

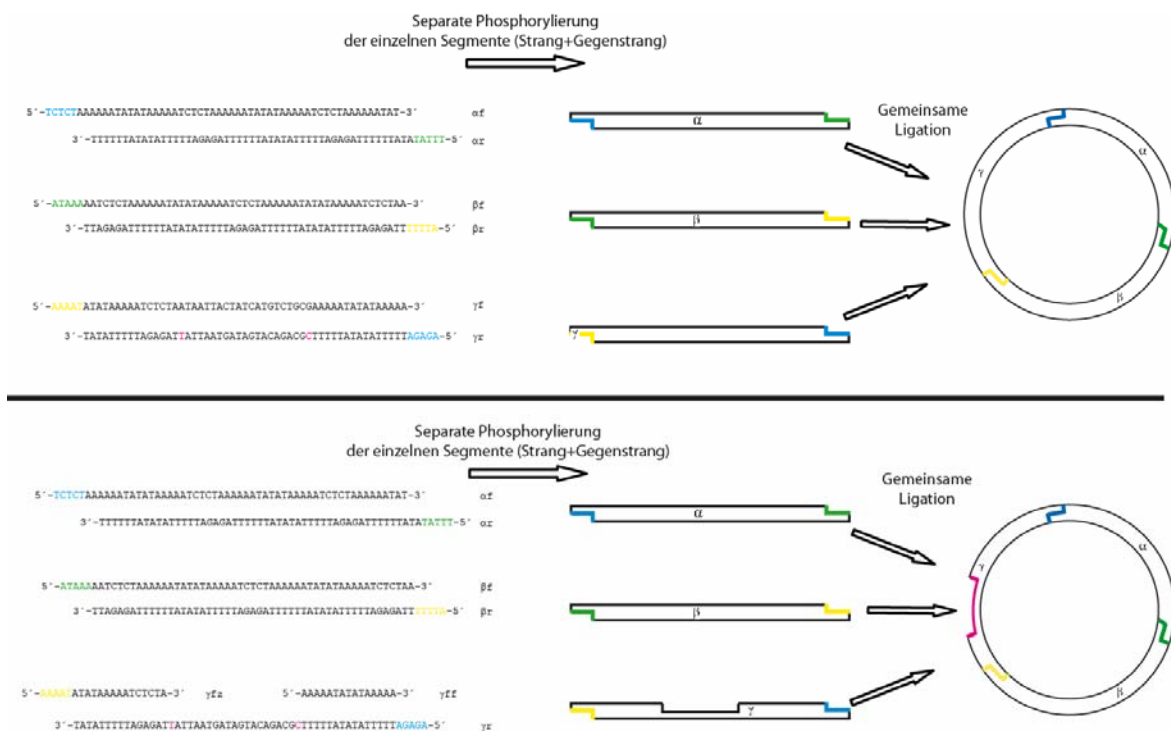


Abbildung 75: Schema des Phosphorylierungs- und Ligations-Protokolls; oben für die Darstellung völlig geschlossener DNA-Miniplasmide unten zur Erzeugung von DNA-Ringen mit Einzelstrangregion. Die einzelnen Segmente werden separat phosphoryliert (Strang und Gegenstrang zusammen) und anschließend zur gemeinsamen Ligation zusammengegeben. Im Falle der DNA-Ringe mit Einzelstrangregion besteht das γ -Segment, statt aus zwei Oligonucleotiden (γr und γf , oben) aus drei Oligonucleotiden ($\gamma f f$, $\gamma f z$ und γr , unten).

Für die Phosphorylierung stellten sich 400 pmol DNA 5'-OH-Enden und 20U T4 Polynucleotidkinase in einem Reaktionsvolumen von 50 μL als ideal heraus. Je 200 pmol der beiden komplementären Stränge eines Segments wurden dabei phosphoryliert (vgl. Abbildung 75). Danach wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in kleinen Volumina (üblich: 5 μL) Wasser gelöst und zur Ligation zusammenpipettiert. Um eine vollständige Hybridisierung der Überhangregionen der DNA-Segmente zu gewährleisten, wurden die Reaktionsgemische 30 Minuten bis ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde mit frischem Ligationspuffer und 400 U T4-DNA Ligase in einem Reaktionsvolumen von 20 μL bei 16 °C für ca. 12 Stunden ligiert. Um DNA-Miniplasmide mit Einzelstrangregion zu erzeugen, wurden, statt des Vorwärts-Strangs (γf , 56 bp), die beiden kurzen Stränge γff (15 bp) und γfz (20 bp) mit dem Rückwärts-Strang (γr) des γ Segments zur gemeinsamen Phosphorylierung und anschließender Ligation mit den anderen Segmenten verwendet (siehe Abbildung 75). Eine Möglichkeit zu verhindern, dass DNA-Plasmide entstehen, die aus vielfachen der drei Segmente bestehen (vgl. das Hexamer in Abbildung 84 rechts) oder einfach nur lange lineare Aneinanderreihungen enthalten, liegt in einer ersten vorge-schalteten separaten Ligation nur zweier Segmente (Abbildung 76). Auf diese Weise kann nur eine Art von Segment-Dimer entstehen und nach einer abschließenden Ligation mit dem fehlenden dritten Segment ist die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung langer Segment-Ketten oder DNA-Ringen mit vielfachen der drei Segmente reduziert. Erste Experimente deuten darauf hin, dass die Ausbeuten an gewünschten 168 bp Ringen so erhöht werden kann und die Menge an größeren DNA-Fragmenten so deutlich reduziert wird.

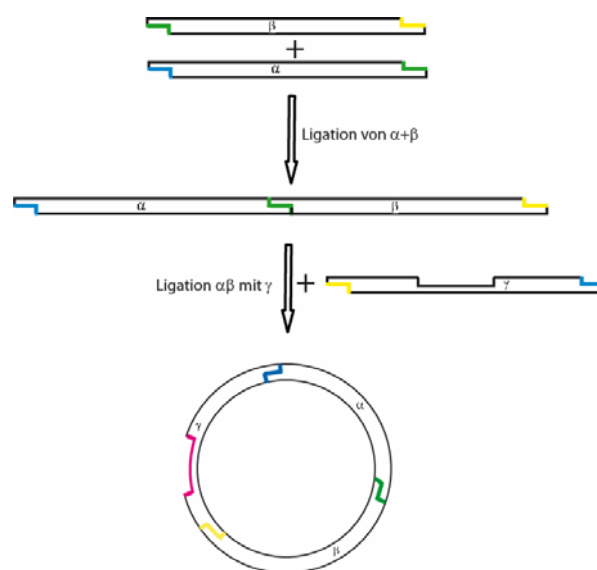


Abbildung 76: Möglich Methode zur Verhinderung der Aneinanderreihungen von Segmenten und der Ausbildung von DNA-Ringen aus Vielfachen der drei Segmente, durch die Ligation zu Ringen in zwei Ligationsschritten.

3.3.3 Isolierung der DNA Miniplasmide durch native zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (native 2D PAGE)

Bei der Ligation der drei doppelsträngigen DNA-Segmente α , β und γ können neben der Zielspezies, dem zirkulären, vollständig geschlossenen trimeren Miniplasmid, sowohl Miniplasmide mit einem vielfachen dieser Größe als auch lineare nicht geschlossene Spezies unterschiedlicher Länge entstehen. Zur Isolierung der gewünschten Miniplasmide aus dem Reaktions-Gemisch wird zweidimensionale, native Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewandt.

Wie beim Design der DNA Miniplasmide in Kapitel 3.3.1 bereits beschrieben, zeigt stark gekrümmte und zirkuläre DNA ein anomales Migrationsverhalten bei nativer PAGE-Gelelektrophorese, indem ihre elektrophoretische Gel-Mobilität stark reduziert ist, im Vergleich zu flexibler linearer DNA derselben Länge. Diesen Umstand kann man sich zunutze machen, um zirkuläre DNA von linearer DNA zu trennen.^[142, 145, 148, 150-153] Die Produkte der oben beschriebenen Ligation werden durch native PAGE zunächst in der ersten Dimension der Länge und der Konformation nach von einander getrennt. Die gewünschten Produktbanden der entsprechenden Länge, die aufgrund ihrer gekrümmten Konformation auch eine starke Verschiebung der Banden zu höheren Basenpaar-Längen aufweisen, werden ausgeschnitten (siehe Abbildung 78, unten) und nochmals gelelektrophoretisch in einer zweiten Dimension getrennt. Dieser zweite Separationsschritt ist nötig, da bei der in der ersten Dimension isolierten Produktbande ein Produktgemisch vorliegt. Das Produktgemisch besteht aus gleich langen, trimeren, stark gekrümmten Spezies, die einerseits vollständig ligiert sind, also zirkulär in Form des Buchstaben O vorliegen, andererseits aber nicht vollständig ligiert sind, also offen in der Form eines C vorliegen (Abbildung 77). Beide Spezies haben dieselbe Basenpaar-Länge und eine ähnlich topologische Konformation bezogen auf die Krümmung und lassen sich deshalb durch die Gelelektrophorese in der ersten Dimension nicht trennen. Die anschließende zweite Gelelektrophorese findet in Anwesenheit des Interkalators und als Anti-Malaria-Wirkstoff bekannten Chloroquin-Phosphats statt. Das Prinzip hinter dem zweiten Separationsschritt ist, dass durch die Interkalation des Chloroquins die starke Krümmung des C-förmigen Ligationsproduktes aufgebogen wird und das DNA-Molekül wieder eine eher lineare Struktur annimmt und so ein weniger ausgeprägt anomales elektrophoretisches Migrationsverhalten zeigt (Abbildung 77). Dieses Aufbiegen wird bei den vollständig kovalent geschlossenen zirkulären Miniplasmiden der O-Form nicht möglich sein; sie behalten ihre gekrümmte Konformation und somit ihre starke Retardierung bei der Gelelektrophorese bei.

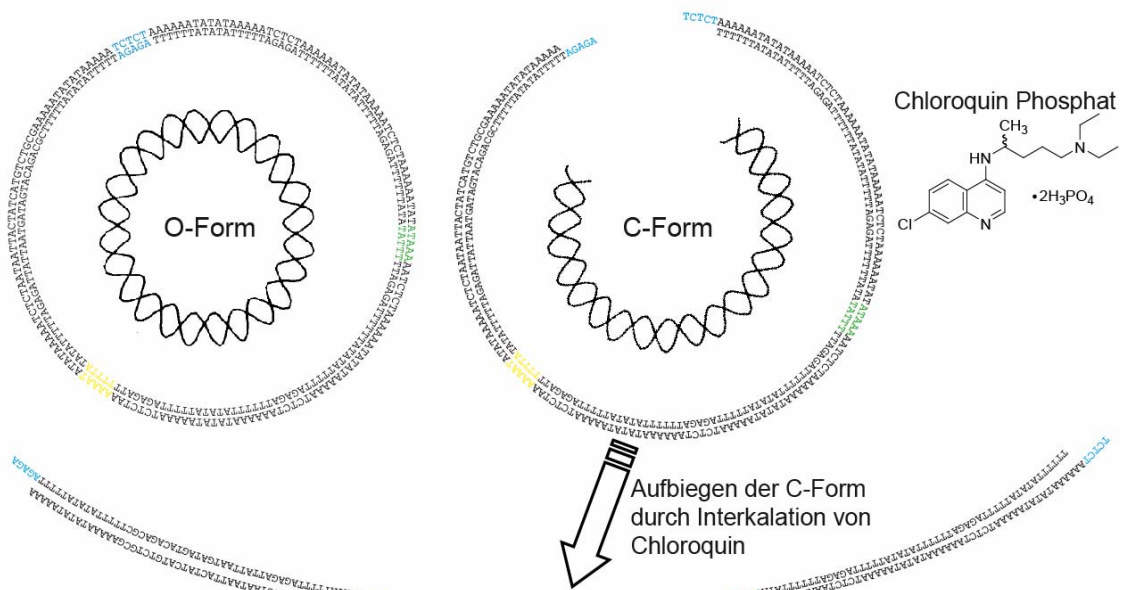


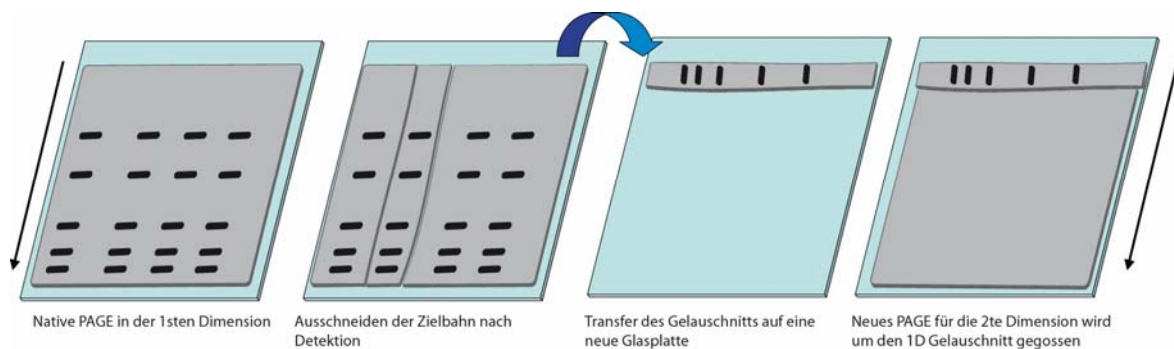
Abbildung 77: Komplett kovalent geschlossene zirkuläre DNA (O-förmig, links) und stark gekrümmte aber unvollständig ligierte DNA in C-Form (rechts). Zusatz des Interkalators Chloroquin bei der nativen Gelelektrophorese in der 2. Dimension biegt die C-Form DNA wieder auf (unten).

Die Umsetzung der zweidimensionalen PAGE-Gelelektrophorese in der Praxis erforderte die Etablierung einer geeigneten Technik, die es ermöglicht, zeitsparend sowohl analytische Informationen aus der 1D Elektrophorese zu erhalten, als auch präparativ mehrere Proben gleichzeitig zu trennen, um anschließend zu wählen, welche Banden der 2D Elektrophorese unterzogen werden. Die literaturbeschriebene Vorgehensweise der 2D Elektrophorese ist nicht sehr detailliert und benutzt für die erste Dimension als Gelkammer-Ersatz lange Einwegpipetten (1 mL, 3 mm Durchmesser), die nur das Auftragen und Trennen einer Probe erlauben.^[142] Das 4% PAGE-Gel der ersten Dimension wurde nach Autoradiographie auf ein neu-präpariertes Gel für die zweite Dimension (8% PAGE mit 50 µg/mL) gelegt und erneut einer Elektrophorese unterzogen.

Die neu entwickelte Methode bedient sich zweier aufeinander folgender Gelelektrophoresen. Die erste Elektrophorese entspricht der ersten Dimension und trennt nach Basenpaar-Länge und Konformation (siehe Schema in Abbildung 78 und Gele in Abbildung 79 sowie Abbildung 80 oben, 5% PAGE erwies sich als ideal). Nach der Detektion der Produkte durch Phosphor-Imaging (radioaktive Proben) oder UV bzw. SYBR Green I Anfärbung mit anschließender Transluminiszenz-Fotographie, werden die zu analysierenden oder zu trennenden Produktbanden bzw. Bahnen ausgeschnitten und auf neue Gelplatten überführt, um Gele für die zweite Dimension um sie herum zu gießen. Die Beschaffenheit der zur Verfügung stehenden Gel-Glasplatten und der Gelkammern bedingten, dass die Laufrichtung der zweiten Dimension in unüblicher „von unten nach oben“-

Richtung stattfinden musste, während die elektrischen Pole der Gelkammer vertauscht wurden, um die Migration der Nucleinsäuren in die richtige Richtung im Gel zu gewährleisten. Diese Art der nativen 2D PAGE erlaubt auch die radioaktive Markierung von Oligonucleotiden als Längen-Standard, so dass diese im Gel flankierend zu nicht radioaktiv markierten Proben derselben Zusammensetzung elektrophoretisch getrennt werden können. So ist eine indirekte Detektion von nicht radioaktiven Produkt-Banden durch die sie flankierenden Markierungs-Banden in beiden Dimensionen möglich.

Praktisches Prinzip der Analyse der Produkt-Zusammensetzung eines Ligationsexperiments durch 2D PAGE:



Praktisches Prinzip der präparativen Trennung der zirkulären Ligationsprodukte von nicht-zirkulären Nucleinsäuren durch 2D PAGE:

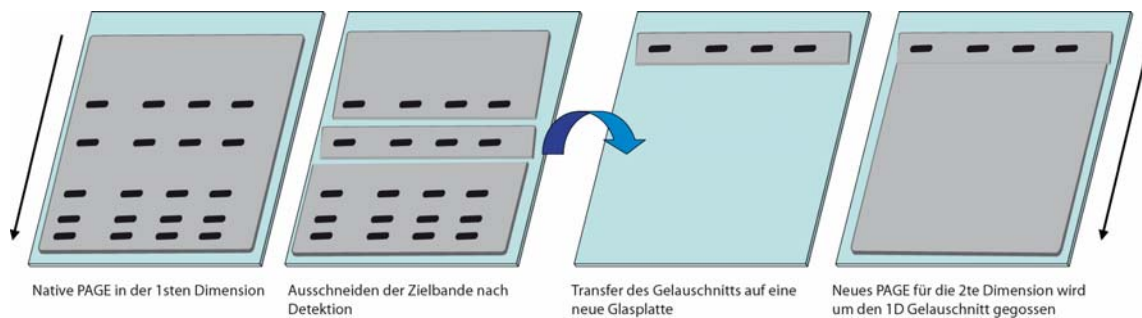


Abbildung 78: Schema der praktischen Durchführung der nativen 2D-PAGE für analytische (oben) und präparative (unten) Zwecke.

Nach erfolgter zweidimensionaler Gelelektrophorese werden die indirekt detektierten nicht radioaktiven Produktbanden ausgeschnitten und durch kleine (2 mL) Einwegspritzen in Eppendorfgefäße gepresst, um die Gelstücke zu zerkleinern und mit Wasser versetzt. Durch eine Kombination aus Einfrieren, zum Aufbrechen der Gel-Matrix, und Einweichen, zum Herauslösen der Nucleinsäuren werden die gewünschten Oligonucleotide aus den Gel-Stückchen isoliert. Es folgt eine Filtration der Gel-Suspension zur Entfernung kleiner Gelfragmente, sowie ein Entsalzungsschritt über G-25 Säulen und ggf. Ethanol-Fällung.

Um die aus den Ligationsexperimenten resultierenden Produkte zuzuordnen und zu identifizieren, wurden zunächst in der ersten Dimension Ligationen aller möglichen Kombinationen aus Segmenten durchgeführt. Jedes Segment für sich allein zeigt nur eine Bande und lässt sich nicht mit sich selbst ligieren (Bahnen E-G, Abbildung 79). Ligation jeder Kombination aus zwei Segmenten zeigt neben den Banden der Monomere auch eine Bande, die dem jeweiligen dimeren Ligationsprodukt zugeschrieben wird (Bahnen B-D, Abbildung 79). Ohne Ligase sieht man bei Anwesenheit aller Segmente wie erwartet nur die Monomer-Bande; die Hybridisierung über die *sticky ends* der Nucleinsäuren ist also nicht so stabil als dass sie im nativen Gel detektierbar wäre. Das Reaktionsgemisch der Ligation aller drei Segmente (Bahn A, Abbildung 79) zeigt sowohl Banden in Höhe der Monomere und Dimere als auch zwei weitere Banden von denen mindestens eine dem trimeren, zirkulären Produkt zugeschrieben werden kann. Das Auftreten zweier zusätzlicher Banden kann mehrere Ursachen haben. Mit dem Vorhandensein aller Segmente können zusätzlich zu dem trimeren Ligationprodukt auch beliebig viele weitere Segmente die DNA-Segment-Kette verlängern, da stets ein *sticky end* komplementär zu einem im Reaktionsgemisch vorhandenen weiteren Segment ist. In sofern ist es sogar ein bisschen erstaunlich, dass nicht, ähnlich wie bei dem zuvor gezeigten Agarose-Gel (Abbildung 74), eine „Ligations-Leiter“ zu beobachten ist. Allerdings sind das Migrationsverhalten und die sie beeinflussenden Effekte bei Agarose-Gelen leicht verschieden von denen der PAGE-Gele.

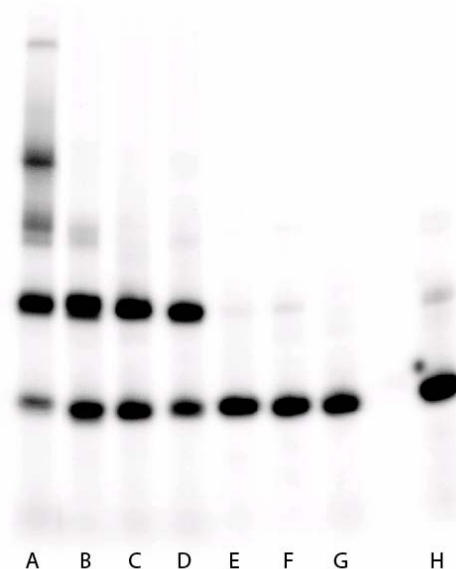


Abbildung 79: 5% PAGE-Gel der mit ^{32}P -radiomarkierten Ligationsprodukte von $\alpha+\beta+\gamma$ (A), $\alpha+\beta$ (B), $\beta+\gamma$ (C), and $\alpha+\gamma$ (D). Spuren E-G enthalten die jeweiligen Einzelsegmente α , β und γ alleine mit Ligase Enzym, während Spur H alle Segmente ($\alpha+\beta+\gamma$) ohne Ligase Enzym enthält.

Der Grund für die scheinbare „Ligations-Leiter“ beim Agarose-Gel und der zusätzlichen Bande im nativen PAGE-Gel können auch Konformationsänderungen der verschiedenen gekrümmten Ligationsprodukte sein. Das darauffolgende PAGE-Gel-Experiment in der zweiten Dimension (Abbildung 80), mit Chloroquin als Interkalator, zeigt, dass die vierte Bande - beginnend mit dem kleinsten Nucleinsäure-Fragment - diejenige ist, die sowohl zirkuläre als auch stark gekrümmte aber offene dsDNA enthält.

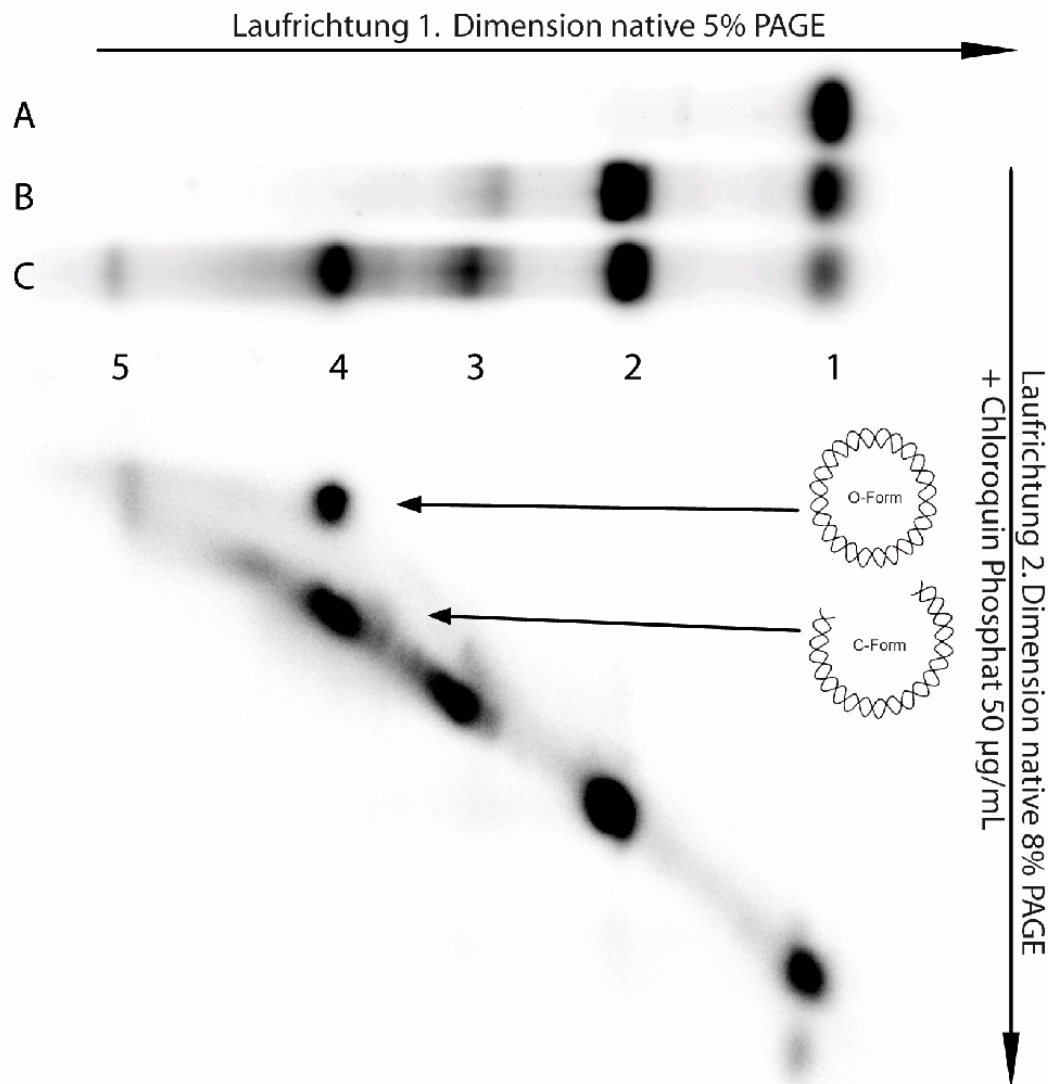


Abbildung 80: Oben von links nach rechts ein 5% PAGE-Gel mit ^{32}P -radiomarkierten Ligationsprodukten von $\alpha+\beta+\gamma$ (Bahn C), $\alpha+\beta$ (Bahn B) und β allein (A) in der 1. Dimension. Bahn C wurde ausgeschnitten und erneut einer Elektrophorese in der 2. Dimension mit 8% PAGE und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Chloroquin Phosphat unterzogen (unten von oben nach unten). Bande 4 der 1. Dimension ist die einzige Bande, die in der 2. Dimension in zwei Banden aufspaltet.

Einen starken Hinweis darauf, dass es sich bei der dritten Bande tatsächlich um ein Konformationsgemisch von nicht-zirkulären Trimeren handelt, liefert die Tatsache, dass die dritte Bande in der ersten Dimension unscharf und ver-

schmiert ist. Untermauert wird diese Hypothese durch das nachstehende zwei-dimensionale denaturierende PAGE-Experiment. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur ohne Kühlung und unter Verwendung von Harnstoff als denaturierendes, Basenpaar-störendes Mittel durchgeführt. Das Gel wurde auch dichter (10% PAGE im Gegensatz zu 8% bei nativer 2D PAGE) gewählt, um einen besseren Trenneffekt zu erzielen. Es ist zu beobachten, dass trotz der denaturierenden Bedingungen die vierte Bande der ersten Dimension in zwei Banden aufspaltet, vermutlich weil die zirkuläre DNA ihre beiden Einzelstränge wegen der kovalenten Verknüpfung und gleichzeitigen Verdrillung nicht voneinander zu trennen vermag. Daraus resultiert in der zweiten Dimension die Bande mit geringerer elektrophoretischen Mobilität. Die Bande höhere Mobilität läuft nahezu auf gleicher Höhe mit der Bande des dritten Signals der ersten Dimension. Diese beiden Banden sollten also Moleküle gleicher Länge enthalten.

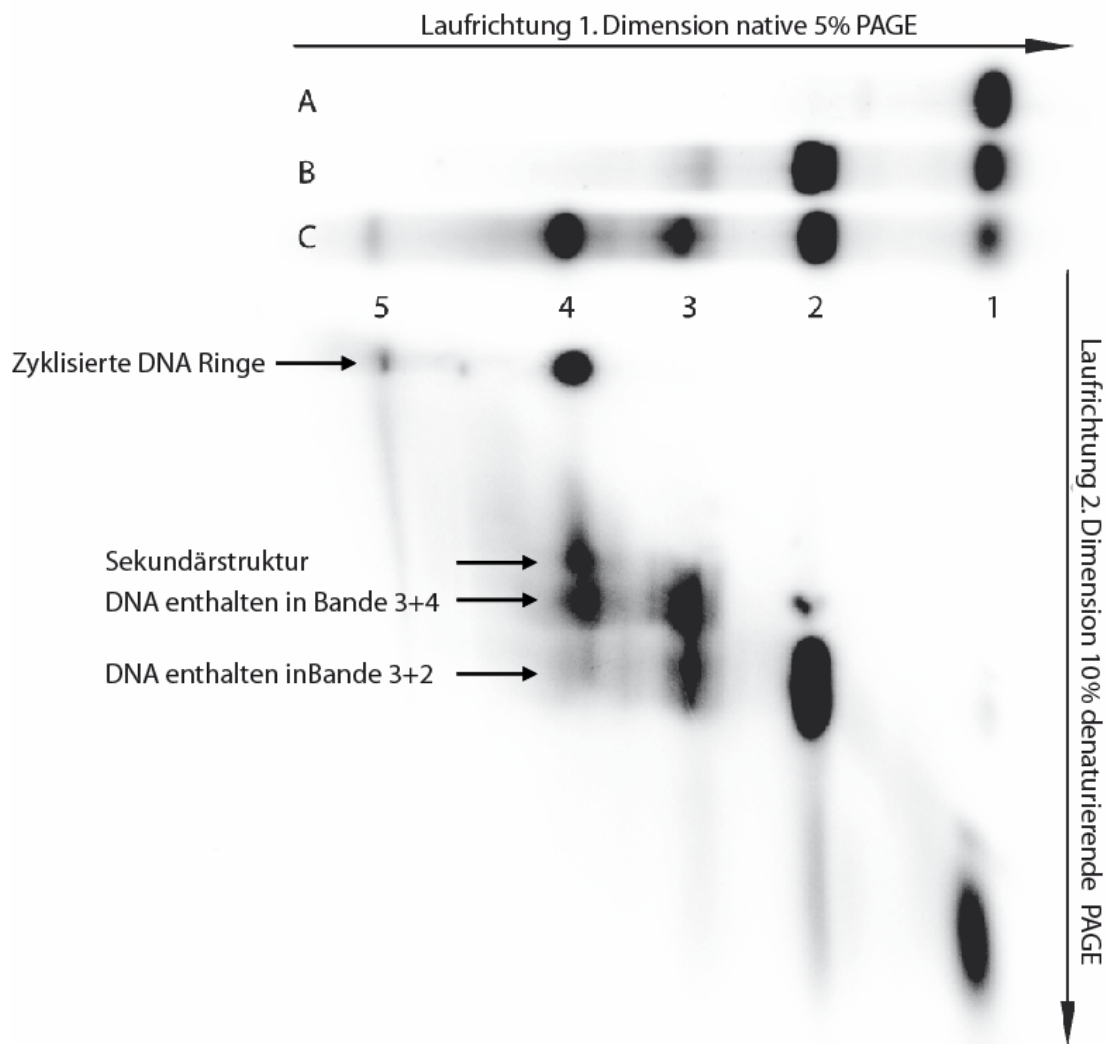


Abbildung 81: Oben von links nach rechts ein 5% PAGE-Gel mit ^{32}P -radiomarkierten Ligationsprodukten von $\alpha+\beta+\gamma$ (Bahn C), $\alpha+\beta$ (Bahn B) und β allein (A) in der 1. Dimension. Bahn C wurde ausgeschnitten und erneut einer Elektrophorese in der 2. Dimension mit 10% PAGE unterzogen (von oben nach unten). Bande 4 der 1. Dimension spaltet in eine Bande mit sehr niedriger elektrophoretischer Mobilität (DNA-Miniplasmide) und einer Doppelbande auf.

Der Effekt, dass die Banden des dritten und vierten Produkts weiter in eng beieinander liegende Doppelbanden aufspalten, kann seine Ursache darin haben, dass der denaturierende Effekt der Elektrophorese-Bedingungen nicht vollständig zu Separation in Einzelstränge führt und deshalb weiterhin Sekundärstrukturen auftreten. Es ist auch sichtbar, dass die dritte Bande der ersten Dimension sowohl Anteile der vierten Bande (Trimere) als auch Anteile der zweiten Bande (Dimere) enthält, wenn man die Lauflänge der Komponenten in der zweiten Dimension betrachtet. Die Co-Migration dieser Anteile in der verschmierten breiten dritten Bande der ersten Dimension ließe sich also gut auf Konformationseffekte zurückführen.

3.3.4 Reinigung der DNA Miniplasmide durch Nuclease Verdau

Eine Bestätigung für die vollständige kovalente Cyclisierung der DNA Miniplasmide liefert die Behandlung der Ligationenprodukte mit einem Exonuclease Enzym. Das Enzym wird aufgrund seiner Exonuclease-Aktivität alle offenkettigen DNA-Spezies verdauen und ohne Endonuclease-Aktivität ringförmige, geschlossene DNA-Spezies intakt lassen. Bei der Suche nach einer geeigneten Exonuclease fiel die erste Wahl auf die Exonuclease Lambda, welche keine Endonuclease-Aktivität besitzt und einzelsträngige und doppelsträngige DNA vom 5'-Ende her verdaut. Die Experimente mit diesem Enzym waren nicht erfolgreich. Es konnte bei keiner Produktbande ein Verdau durch herabgesetzte Bandenintensität oder gar Verschwinden einer Produktbande registriert werden. Eine Ursache hierfür könnte die stark reduzierte Enzymaktivität bei nicht vorhandener 5'-O-Phosphatgruppe bei der zu verdauenden DNA sein oder die scheinbar generell relativ niedrige *Enzymaktivität*. In dem oftmals nicht explizit als Exonuclease sondern nur als Nuclease vermarkteten Enzym *BAL-31* (*New England Biolabs*) wurde schließlich ein geeignetes Enzym zum spezifischen und effektiven Verdau der unerwünschten DNA-Nebenprodukte aus den Ligationsexperimenten gefunden. Die Nuclease *BAL-31* zeigt bei doppelsträngiger DNA Exonuclease-Aktivität, indem sie sowohl vom 3'- als auch vom 5'-Terminus die dsDNA abbaut, ohne interne Schnitte zu generieren. Das Enzym zeichnet sich auch durch eine, für einzelsträngige DNA spezifische, Endonuclease-Aktivität aus. Somit baut sie auch ssDNA effektiv ab und zersetzt dsDNA, die einzelsträngige Lücken oder nicht geknüpfte Phosphordiester-Bindungen im Phosphatrückgrat aufweist (Abbildung 82).^[154, 155]

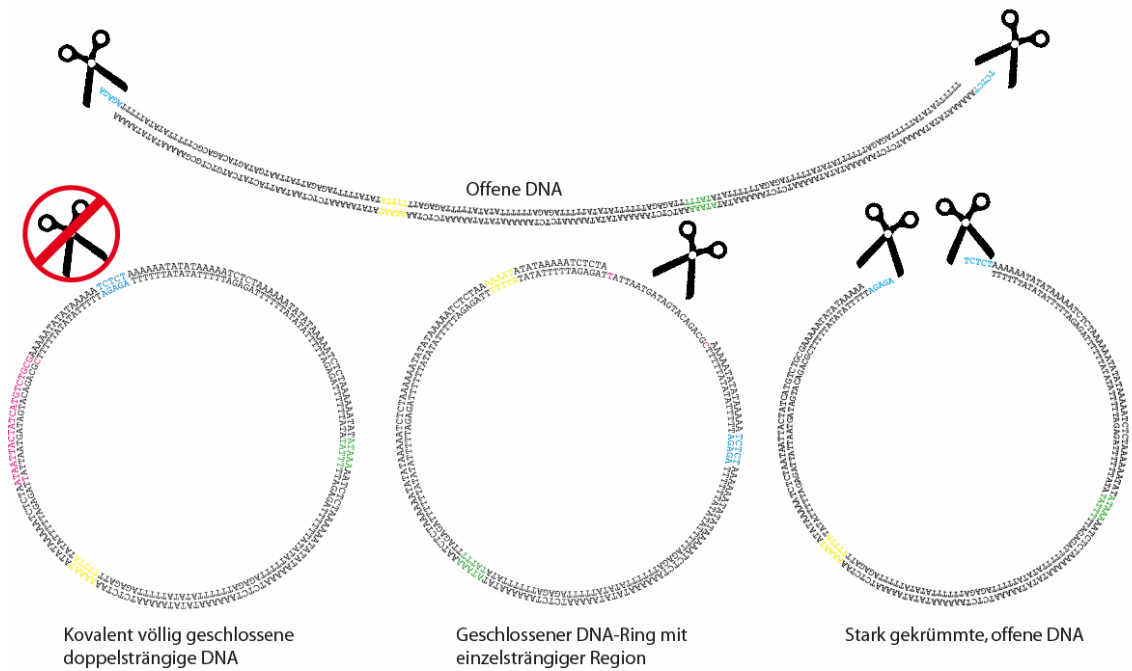


Abbildung 82: Spezifische Exo- und Endonuclease-Aktivität der Nuclease *Bal-31*.

Das Enzym konnte in allen Experimenten, in denen vollständig geschlossene DNA-Miniplasmide das Zielmolekül darstellten, als zusätzlicher Reinigungsschritt zur Separation von offenkettigen Molekülen verwendet werden. Für Experimente in denen absichtlich DNA-Miniplasmide mit einzelsträngigen Abschnitten generiert wurden, um sie später mit funktionalisierten komplementären Oligonucleotiden zu hybridisieren (vgl. Abbildung 39, Abbildung 40 und Abbildung 82), war dies keine Option. Die Nuclease würde aufgrund ihrer Endonuclease-Aktivität bei ssDNA Regionen die Ringe abbauen.

Das nachstehende eindimensionale Experiment in Gegenwart einer kommerziell erhältlichen DNA-Leiter (100 bp-Leiter, *PeqLab*) wurde durchgeführt, um einen Anhaltspunkt über die Migration der Ligationsprodukte im Verhältnis zu üblichen DNA-Längenstandards zu erhalten und um durch Anwendung eines Exonuclease-Verdaus die Anwesenheit von zirkulärer DNA zu verifizieren. Die Detektion der Banden geschieht sowohl durch Anfärben mit SYBR Green I als auch durch radioaktive Markierung. Zu diesem Zweck musste die am 5'-OH-Ende phosphorylierte DNA-Leiter zunächst mit dem Enzym CIAP dephosphoryliert werden und anschließend wieder mit radioaktivem ATP kinasiert werden.

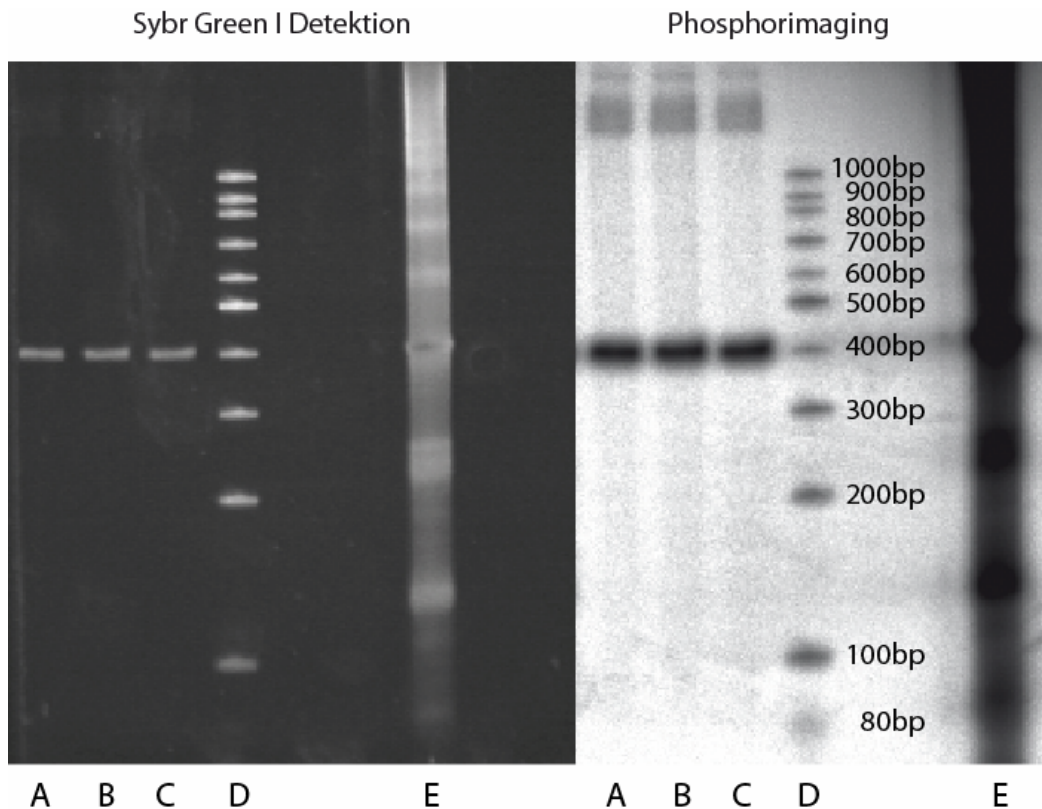


Abbildung 83: Das 5% PAGE-Gel (1. Dimension) zeigt ^{32}P -radiomarkierte Ligationsprodukte der Segmente $\alpha+\beta+\gamma$ (Bahnen A-C und E); Bahn D ist ein kommerziell erhältlicher, vom Experimentator selbst radioaktiv markierter Längenstandard. Die linke Aufnahme ist ein Transilluminations-Photo und rechts ein Phosphorimager-Bild. Die Ligationsprodukte in den Bahnen A-C wurden mit steigenden Mengen Exonuclease *Bal-31* behandelt (A: 0.1 U, B: 0.2 U, 0.5 U). Die zirkuläre DNA zeigt sich inert gegen den Exonuclease-Verdau, während alle Nebenprodukte abgebaut und nicht mehr sichtbar sind. Bahn E enthält alle Ligationsprodukte und wurde nicht mit Exonuclease behandelt.

Die starke Retardierung der, das zirkuläre Miniplasmid enthaltenden Produkt-Bande, bei einer Höhe des DNA-Längenstandards von 400 bp, wirft die Frage auf, ob es sich bei diesem DNA-Ring wirklich um ein Trimer von 168 bp mit einem Durchmesser von theoretisch ~ 20 nm (Abbildung 84, links), bzw. praktisch nach AFM-Messungen von *Han et al.* ^[148] ~ 25 nm und einem geschätzten Molekulargewicht von 104 kDa handelt. Eine aufgrund des Migrationsverhaltens naheliegende Vermutung wäre, dass es sich gegebenenfalls um ein Vielfaches, wie zum Beispiel dem Hexamer mit 336 bp, handelt. Diese Frage konnte durch Fluoreszenz Korrelationspektroskopie (FCS, Kapitel 3.3.5) beantwortet werden.^[156]

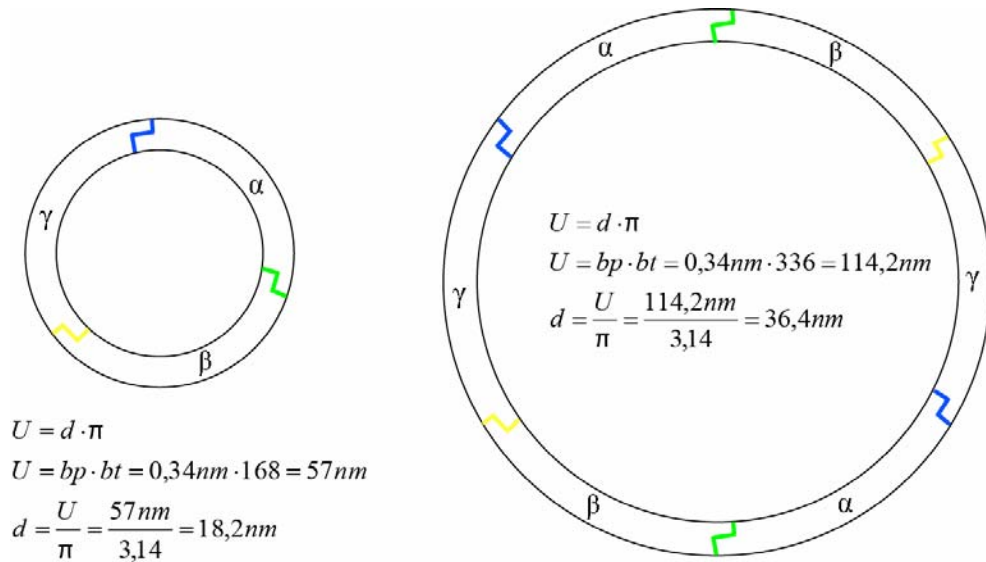


Abbildung 84: Berechnungen des theoretischen Durchmessers des trimeren (aus drei Segmenten bestehendes) und hexameren (6 Segmente) Miniplasmids. U = Umfang [nm]; d =Durchmesser [nm]; bp =Anzahl der Basenpaare; bt = abgeschätzte Höhe einer Basenpaarsteigung.

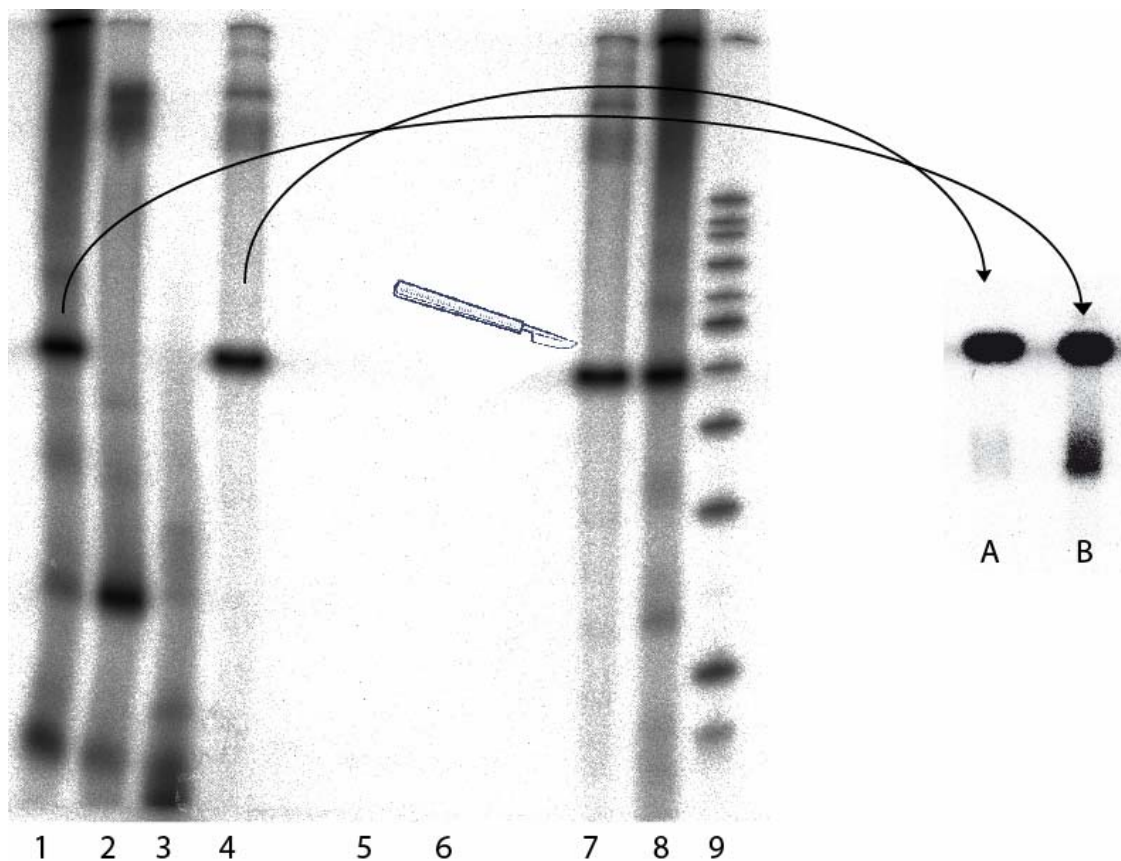


Abbildung 85: Ein PAGE-Gel zur Isolation von nicht radioaktiv markierten DNA Miniplasmiden ist links dargestellt. Die Bahnen 4 und 7 enthalten durch Nuclease-Verdau gereinigte Miniplasmide während Bahn 1 ohne Nuclease-Verdau in der Hauptproduktbande auch noch offene gekrümmte DNA enthält. Je eine Hauptbande mit und ohne Nuclease-Behandlung (aus Bahn 1 und 4) wird ausgeschnitten und in einer zweiten Dimension mit Chloroquin erneut aufgetrennt (rechts, A und B).

Ein typisches PAGE-Gel zur Isolation von nicht radioaktiv markierten DNA Miniplasmiden, die nach Ausschneiden und anschließender Elution aus dem Gel in AFM-Experimenten verwendet werden können, ist in Abbildung 85 dargestellt. Alle sichtbaren Banden sind radioaktiv markiert. Die Bahnen 5 und 6 enthalten dieselbe Reaktionszusammensetzung wie die Bahnen 4 und 7 die als Markierungen der Laufhöhe dienen, enthalten aber keine radioaktiv phosphorylierte DNA. So können die Positionen der Produktbanden anhand der radioaktiven Marker und den Farbstoffen Bromphenol Blau und Xylenecyanol - die in jedem Ladepuffer enthalten sind und so die Bahn auf dem Gel markieren - identifiziert werden. Während Bahn 4 und 7 mit Exonuclease *BAL-31* behandelt wurden, enthält Bahn 1 das gesamte Produktgemisch der Ligation der drei Segmente. In Bahn zwei waren nur die Segmente $\alpha+\beta$ bei der Ligation vorhanden und Bahn drei enthält nur das Segment β allein. Zur Ermittlung der Effektivität des Nuclease Verdaus wurden die Trimer-Banden der Bahnen 1 und 4 ausgeschnitten und ein Chloroquin-enthaltendes zweidimensionales natives PAGE-Gel Experiment angeschlossen (Abbildung 85, kleines Gel rechts, vgl. Methode in Abbildung 78). Die Bahn A enthält die Exonuclease behandelte Produkt-Bande der Bahn 4 und Bahn B zeigt den Ausschnitt der Produkt-Bande der Nuclease-unbehandelten Bahn 1. Auch bei Bahn A ist noch ein Restanteil an nicht-zirkulärer DNA auszumachen. Eine Quantifizierung ergab, dass weniger als 1% offener DNA in Bahn A vorhanden sind, während die Bande mit höhere elektrophoretischer Mobilität in Bahn B, die der offenkettigen DNA zugesprochen wird, 20% des Gesamtanteils der DNA ausmacht.

3.3.5 Größen Bestimmung der DNA Miniplasmide durch Fluoreszenz Korrelationspektroskopie (FCS)

Die Masse und somit die Größe bzw. Anzahl Basenpaare der generierten DNA Miniplasmide wurde indirekt durch Bestimmung des relativen Diffusionskoeffizienten durch FCS in der Arbeitsgruppe von *Prof B. Brutschy* (Frankfurt) bestätigt.^[156] Bei diesem Verfahren werden die zeitaufgelösten Fluoreszenzfluktuationen (Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit) von fluoreszenzmarkierten Molekülen innerhalb eines sehr kleinen focalen Volumenelements gemessen. Grundlage für diese Messtechnik sind ein konfokales Mikroskop und ein System von Lasern, die durch ihre sehr kleine fokale Ausdehnung das geringe Anregungsvolumen (\sim Femtoliter) begrenzen und Wellenlängen korrespondierend zu den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen besitzen.

Diffundieren die fluoreszenzmarkierten Moleküle in das Anregungsvolumen, so werden diese dort zur Fluoreszenz angeregt und das emittierte Licht wird über einen, für das Anregungslicht undurchlässigen, Strahlteiler auf eine Fotodetektor

gelenkt und detektiert. Um die detektierten Spezies auf wenige Moleküle zu reduzieren, wird im nM Konzentrationsbereich gemessen. Die aufgenommenen zeitaufgelösten Intensitätsfluktuationen werden durch die Korrelations-Hardware verarbeitet und die resultierenden Auto-Korrelationskurven analysiert. Daraus kann man Information über den Diffusionskoeffizienten der fluoreszierenden Moleküle in der Lösung erhalten.

Zur Größenbestimmung der DNA-Miniplasmide werden diese mit einem Fluorophor (beispielsweise Rhodamin Grün oder Cy-5) markiert, die zeitaufgelösten Fluoreszenzfluktuationen gemessen und daraus die Diffusionsgeschwindigkeit ermittelt. Dieselbe Prozedur geschieht mit mindestens einem weiteren, als internen Standard dienenden, fluoreszenzmarkierten Molekül bekannter Masse (hier ein Hairpin der Länge 21 bp und der Masse 15016 Da). Durch den Vergleich der Diffusionskoeffizienten des „Größen-“ bzw. „Gewichts-“, Standards mit dem zu bestimmenden Molekül, hier dem Miniplasmid, kann Rückschluss auf dessen Masse bzw Größe gezogen werden. Beim Vergleich der berechneten Diffusionszeiten für das 168 bp DNA-Miniplasmid und dem 21 bp Hairpin als linearem Standard muss die Topologie der gemessenen Teilchen berücksichtigt werden. Während der Hairpin als lineares DNA-Konstrukt angenommen wird, muss das DNA-Plasmid als torusförmiges Objekt mit einem Korrekturfaktor ($e^{1/2}$) für die Diffusion rinförmiger Polymere versehen werden.^[157] Die Masse ergab sich zu ~ 120 kDa was in der Größenordnung der erwarteten Masse (104 kDa) liegt und eine Ringgröße von 336 bp (~ 208 kDa) ausschließt.^[156]

3.4 Rasterkraftmikroskopie der DNA Miniplasmide

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM, engl. *Atomic Force Microscopy*) gehört zur Klasse der Rastersondenmikroskopie (SPM, engl. *Scanning Probe Microscopy*) deren erster Vertreter die Rastertunnelmikroskopie (STM, engl. *Scanning Tunneling Microscopy*) war.^[158] Das STM wurde 1981 von *G. Binnig* und *H. Rohrer*^[159-165] erfunden. Die ersten Anwendungen beschränkten sich zunächst auf Messungen dreidimensionaler Oberflächentopographien von vergleichsweise starren und flachen Oberflächen mit Höhenunterschieden von wenigen Atomlagen. Die Erfinder erhielten 1986 den Physik-Nobelpreis für ihre Entwicklung, deren Wechselwirkungsprinzip auf einen schwachen Tunnelstrom^[166, 167] zwischen der leitenden Probenoberfläche und der Sondenspitze des STM beruht, die zur Abbildung der Oberfläche genutzt wird. Die Weiterentwicklung dieser Technik und die Erweiterung der Rastersonden-Methode auf andere Wechselwirkungsprinzipien ermöglicht heute die Vermessung von Oberflächen und auf Oberflächen abgelagerten Proben, deren Strukturen in Dimensionen der Größenordnung

gen eines zwischenatomaren Abstandes bis hin zu wenigen Bruchteilen eines Millimeters reichen. Allen SPM-Methoden gemein ist das rasterförmige Abtasten der jeweiligen Proben mit einer sehr feinen, oft wenige Atome umfassenden, Sondenspitze. Dabei findet das Abtasten sehr dicht im Nahfeld der Probenoberfläche statt. Diese Instrumente, im speziellen das STM, waren die ersten, die atomare Strukturen direkt abzubilden vermochten und auch heute noch ist das STM das Instrument mit der höchsten Auflösung. Da das STM allerdings auf den Tunnelstrom zwischen Sondenspitze und Probenoberfläche angewiesen ist, ist diese Methode beschränkt auf die Vermessung von leitenden oder halbleitenden Materialien. Dies führte 1986 zur Entwicklung der Rasterkraftmikroskopie (AFM) und der Einführung des ersten kommerziell erhältlichen AFM *NanoScope*® von *Digital Instruments* im Jahr 1989.^[158] Wie beim STM wird auch beim AFM eine sehr feine Sondenspitze zur Abtastung der Probenoberfläche verwendet. Allerdings greift man nicht auf einen Tunnelstrom als Wechselwirkungsprinzip zurück, sondern nutzt die Oberflächenabstoßung aus, die Eintritt, wenn die Sondenspitze in direkten Kontakt mit der Probenoberfläche tritt (*contact-mode*). Die Sondenspitze des AFM ist am Ende eines feinen, als Cantilever bezeichneten, Arms in Form eines dünnen, schmalen Plättchens oder einer Nadel angebracht, welcher eine sehr geringe Federkonstante besitzt. Die abstoßende Kraft der Oberfläche (üblicher Weise im nano-Newton Bereich^[158]) führt zu einer Verbiegung oder Ablenkung des Cantilevers von der Probenoberfläche weg. Das Maß der Ablenkung wird durch die Änderung der Reflexion eines Laserstrahls, der auf die obere reflektierende Schicht des Cantilevers gerichtet ist und zu einer in Quadranten aufgeteilten Photodiode gelenkt wird, gemessen (Abbildung 86).

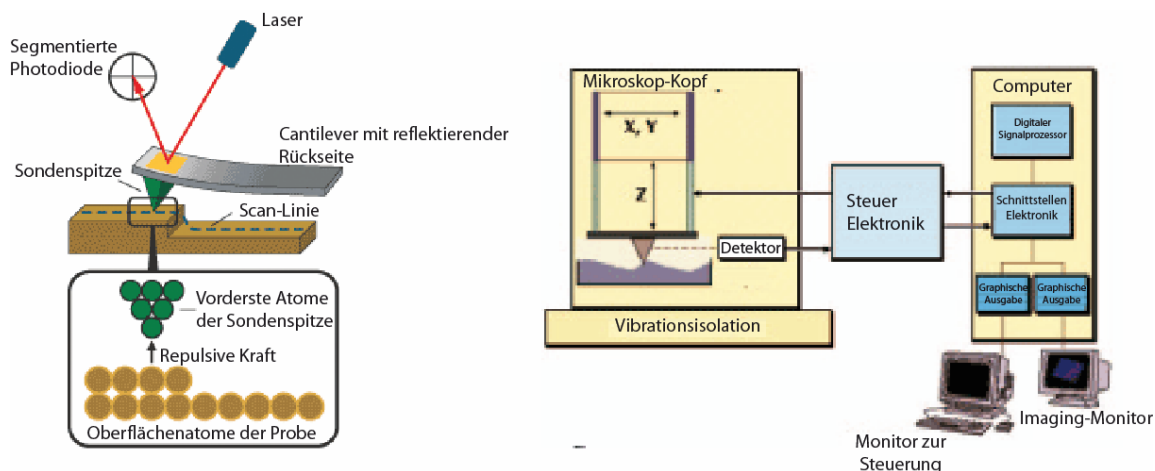


Abbildung 86: Prinzipielles Schema des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops (AFM). Links: Detektion der Oberflächen-Topographie durch Messung der Reflexionsänderung eines Laserstrahls durch die Ablenkung des reflektierenden Cantilevers mit Sondenspitze. Rechts: Allgemeiner Aufbau von Mikroskop, Steuer- und Abbildungseinheit des AFM.^[158]

Beim sogenannten *contact-mode* (Kontakt-Modus), der ersten etablierten AFM-Technik, wird die Kraft mit der die Sondenspitze auf die Probe drückt konstant gehalten, während die Sonde die zu vermessende Oberfläche abtastet. Dabei folgt die Spitze in ihrer vertikalen Bewegung (*z*-Achse, Höhen-Achse) dem Oberflächenprofil der Probe und erstellt dabei ein topographisches Bild. Eine Hauptkomponente des AFM-Instruments ist der Scanner (Abtaster), der entweder, bei ausreichend kleiner Probe, die Probe selbst unter der Sondenspitze zur Abtastung bewegt oder, wie meist der Fall, die Sondenspitze über die Probenoberfläche führt. Um eine ausreichend hohe Präzision der Bewegung zu erhalten werden piezoelektrische Kristalle zur Bewegung eingesetzt; diese erreichen Genauigkeiten im Sub-Ångström Bereich. Der Sonden-Bewegungssensor beruht in den meisten AFM-Systemen auf dem bereits beschriebenen optischen Ablenk- bzw. Reflexions-System, bei dem der vom Cantilever reflektierte und auf die segmentierte Photodiode abgelenkte Laserstrahl in ein elektronisches Signal umgewandelt wird, welches Auskunft über die Abstoßungskräfte zwischen Sondenspitze und Probenoberfläche gibt. Eine sensible Elektronik (Abbildung 86, rechts) justiert den *Z*-Anteil des piezoelektronischen Scan-Kopfes, so dass eine konstante Kraft aufrecht erhalten wird. Dieses optische Messprinzip ist wenig stör anfällig, vielseitig und zeigt nur ein geringes Rauschen. Das gesamte AFM-Messprinzip ist allerdings sehr rauschanfällig, weshalb das Instrument durch Isolationsvorrichtungen und schwingungsfreie Aufhängung von Vibrationen aller Art und akustischen, elektronischen sowie optischen Störquellen isoliert werden muss. Der Vorteil der Rasterkraftmikroskopie liegt in der erzielten hohen Auflösung (2-10 nm), der zu anderen Systemen vergleichsweise geringen Probenvorbereitung und der Möglichkeit Proben auch im flüssigen Medium zu messen. STMs erzielen eine höhere Auflösung (bis 0.1 nm) sind allerdings auf leitende oder halbleitende Materialien angewiesen. Optische Mikroskope sind in ihrer Darstellung und Auflösung aufgrund der physikalischen Grenzen limitiert (ca. 1.0 μm , und eine gewisse Transparenz der Proben ist vonnöten). Elektronenmikroskope, wie das Rasterelektronen Mikroskop (SEM, engl. *Scanning Electron Microscope*, Auflösung ca. 5 nm), benötigen eine aufwendige Probenvorbereitung, können nur im Vakuum durchgeführt werden und schließen sich elektrisch aufladende Probenoberflächen aus.

Die Entwicklung des sogenannten *TappingMode*TM (etwa tastender Modus) oder AC-Mode (*Actuated-Mode*, Anregungs-Modus) zur Messung von Probenoberflächen mittels AFM durch *Digital Instruments Inc.*^[168] führte einen zusätzlichen Vorteil bei der Rasterkraftmikroskopie ein. Im *TappingMode*TM tritt die Sondenspitze nur zwischenzeitlich mit der Probenoberfläche in Kontakt, statt wie im *contact-mode* in permanentem Kontakt zu stehen. Dies verhindert die Manipulation, Beschädigung oder Verschiebung von weichen, empfindlichen oder nicht

fest immobilisierten Proben, wie zum Beispiel biologischem Material, durch Elimination von Scheerkräften. Bei dieser Scan-Methode wird der Cantilever durch einen Anregungsantrieb (AC-Mode, *Actuated-Mode*) in Schwingung versetzt und tastet so, wie ein sanft klopfender Finger, die Oberfläche ab. Die Frequenz mit der der Cantilever oszilliert befindet sich meist im kHz Bereich. Die Detektion der Interaktion findet nach dem selben bereits beschriebenen optischen Prinzip statt, wobei jetzt neben der Ablenkung die Änderung der Amplitude und der Phase des hochfrequent oszillierenden Cantilevers die Information über die Oberflächenbeschaffenheit und Topographie liefern. Die Auflösung ist mit dem *contact-mode* vergleichbar; aber durch die Aufnahme der Phasenänderung in Abhängigkeit vom Anregungssignal des Cantilevers können neben der topographischen Information auch Eigenschaften wie Härte, Elastizität und Reibung in ein und dem selben Scan ermittelt werden (vgl. den Schärfe-Unterschied von Phasen- und Amplitudenbild in Abbildung 96 und Abbildung 97). Die weit verbreitetste Art der Schwingungsanregung ist die akustische Anregung durch eine Piezokeramik; eine relativ neue Anregungsmethode beruht auf der Verwendung eines magnetischen Wechselfeldes (MAC-Mode, engl *Magnetic Actuated Mode* siehe Abbildung 92). Es sind viele weitere Modi hinzugekommen, so auch ein sogenannter *non-contact Mode* bei dem die Sonden spitze wie im *TappingMode*TM oszilliert. Dabei wird allerdings, ähnlich der STM-Methode, die Probenoberfläche nicht berührt, sondern es werden im van der Waals Abstand die schwachen Anziehungskräfte bei niedriger Amplitude überwunden. Diese Methode ist aber weniger stabil und störanfälliger.

Die Summe der oben aufgezählten Vorteile macht die Rasterkraftmikroskopie zum idealen Instrument bei der Abbildung von bioorganischem Material, wie die im vorliegenden Fall zu untersuchenden DNA-Miniplasmide in ihrer regulären sowie funktionalisierten Form. Nucleinsäuren befanden sich unter den ersten biologischen Proben, die mit Methoden der SPM abgebildet wurden.^[169, 170] Eine häufig angewendete Methode der Probenvorbereitung von Nucleinsäuren zur Abbildung mittels AFM ist das Abscheiden des Substrates aus einer Lösung auf einem atomar flachen Träger wie Mica. Das Schichtsilikat Mica wird mit Hilfe eines herkömmlichen Haushalts-Transparentklebestreifens von seinen oberen Schichten durch Abziehen befreit, was eine frische, nicht-kontaminierte fast atomar-flache Substratoberfläche gewährleisten soll (Abbildung 87). Die Adsorption der negativ geladenen Nucleinsäuren wird dabei durch Puffer, die divalente Kationen wie Ni^{2+} oder Mg^{2+} enthalten, begünstigt. Die Oberfläche frisch abgezogener Mica-Plättchen ist negativ geladen, so dass die divalenten Kationen als Mediatoren zwischen Mica und den negativ geladenen Nucleinsäuren dienen.

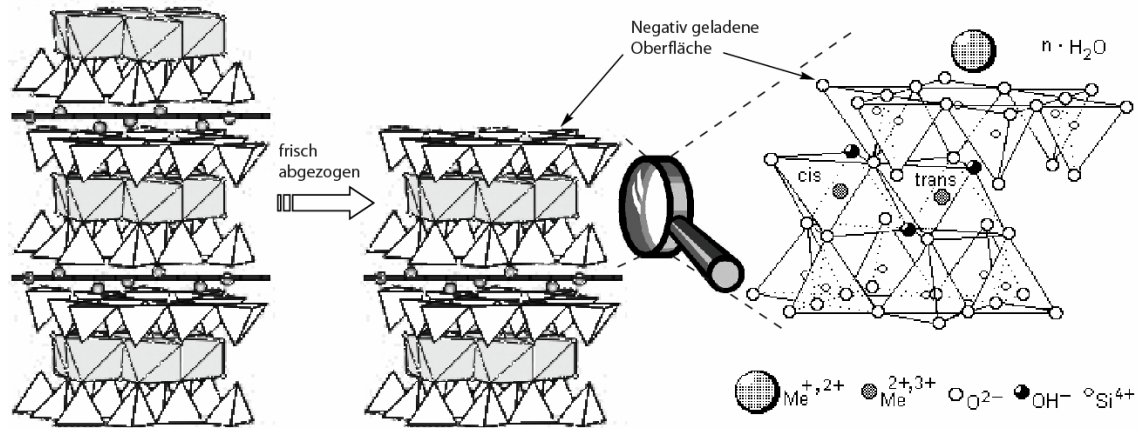


Abbildung 87: Allgemeine Struktur des Schichtsilikats Mica an der atomaren Oberfläche.

Mit wenigen Nanogramm oder Femtomol an Nucleinsäuren erhält man unter diesen Bedingungen eine thermodynamische Gleichgewichtsverteilung die eine gleichmäßige Ablagerung auf dem Trägersubstrat gewährleistet.^[158, 171] Die so präparierten Proben werden für gewöhnlich an der Luft getrocknet und anschließend in normaler Umgebungsatmosphäre trocken vermessen. Allerdings können dynamische Phänomene so nicht beobachtet werden. Außerdem zeigen viele biologische Proben Artefaktbildung nach dem Trocknen, ein Phänomen das nicht nur bei Abbildungsversuchen mit AFM einen störenden Einfluss hat und auf viele Ursachen zurückgeführt werden kann, beispielsweise akkumulierte Ablagerungen des Puffers. Zu diesem Zweck wurden Flüssigkeitszellen entwickelt, die die Vermessung von biologischen Proben wie DNA auch im wässrigen Medium erlauben und somit den natürlichen physiologischen Umweltbedingungen der Substrate sehr nahe kommen (Abbildung 93).^[158] Auf diese Weise werden *in situ* Messungen möglich, bei denen konformationelle Änderungen oder Änderungen der Anordnung und Verteilung von bioorganischem Material, wie DNA, beobachtbar sind. Mehr noch als bei trockenen Proben sind biologische Proben auf Trägeroberflächen wie Mica in einer Flüssigkeitszelle nicht sonderlich fest durch ihre ionischen Wechselwirkungen immobilisiert. Der Abtastmodus der Wahl ist deshalb der *TappingMode*TM, der ein aktives Verschieben der Proben auf der Trägeroberfläche durch das Abtasten der Sondenspitze minimiert oder sogar verhindert.^[172, 173]

Um die gewünschte Interaktion von Anthracen-modifizierten DNA-Miniplasmiden mittels AFM zu nachzuweisen, galt es zunächst die vollständig geschlossenen DNA-Miniplasmide (Abbildung 88, links) zuverlässig als Nano-Objekte detektieren und identifizieren zu können. Nach dem Gelingen werden die modifizierbaren, einzelsträngige Region enthaltenden DNA-Miniplasmide (Abbildung 88, Mitte) in statistischer Verteilung auf der Mica-Oberfläche abgebildet, bevor zuletzt zu solchen Proben mit Anthracen funktionalisierte, kom-

plementäre Oligonucleotide zugegeben werden, die eine Aggregation der DNA-Ringe induzieren sollen (Abbildung 88, rechts).

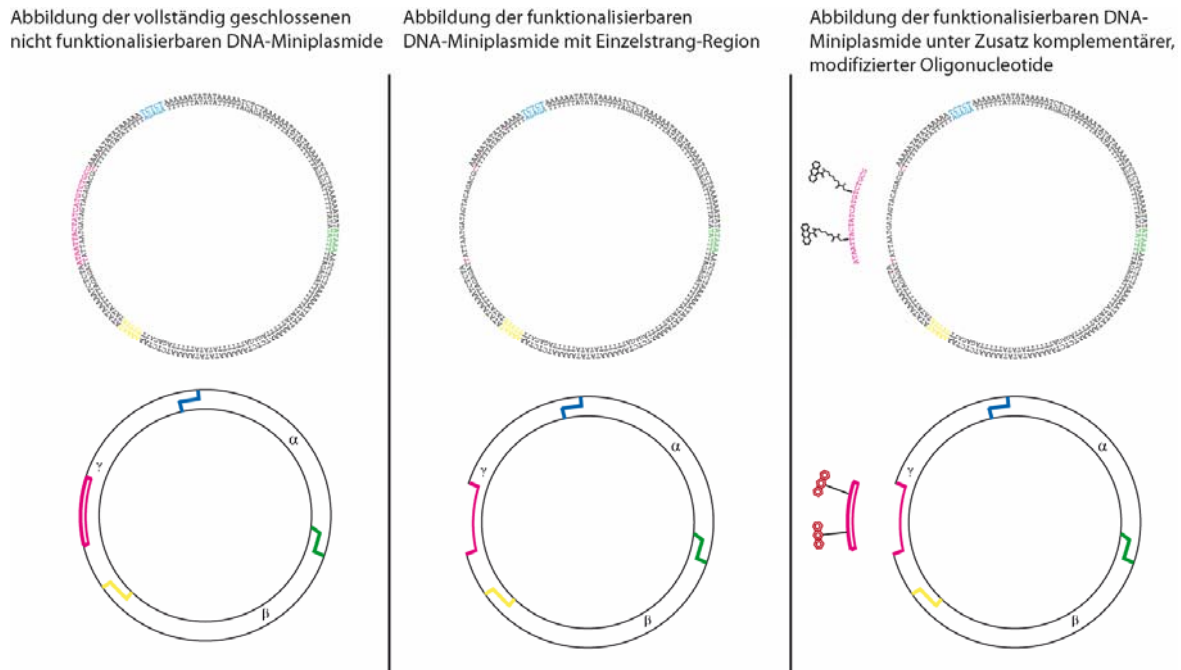


Abbildung 88: Reihenfolge der zu bewältigenden Aufgabe der erfolgreichen Visualisierung der unterschiedlichen DNA-Nano-Objekt Spezies (von links nach rechts).

In den nachstehend beschriebenen Experimenten zur Detektion der DNA Miniplasmide wurde in ersten Versuchen die DNA durch die Methode der Abscheidung aus einer gepufferten Lösung mit divalenten Kationen auf Mica und anschließender Lufttrocknung angewendet.^[174-183] Die Benetzung der Trägeroberfläche Mica mit der gepufferten Lösung kann auf unterschiedliche Weise geschehen; häufig durchgeführt werden die Benetzung mit einem Tropfen (*Drop-Coating*) oder das kurze Eintunken in eine Probenlösung (*Dipp-Coating*) zur Erzeugung eines dünnen Flüssigkeitsfilms (Abbildung 89).

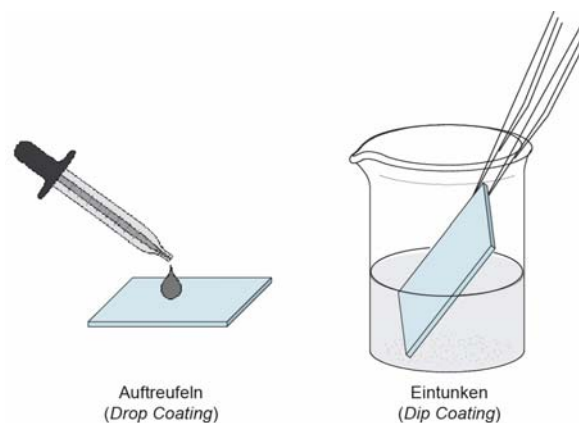


Abbildung 89: Zwei Methoden der Abscheidung von bioorganischen Proben aus gepufferten Lösungen auf Mica-Trägerplättchen.

Das Betreffeln und anschließend aktive (im Argon-Strom) oder passive (Luft-trocknen) Trocknen kann im Falle schlechter Abscheidungstendenz oder stark verdünnter Proben ein gutes Resultat erzielen, jedoch können auch leicht Eintrocknungen durch Puffer und andere Salze entstehen, die die Abbildung der gewünschten Proben beeinträchtigen oder sogar vollständig überlagern. Die Methode des Eintunkens soll eine gleichmäßig dünne Verteilung der Moleküle auf Mica gewährleisten und eine Anhäufung von Puffersalzen durch Eintrocknung verhindern. Beide Methoden führten zu unbefriedigenden Resultaten. Die Konzentrationen der DNA Miniplasmide betrug zwischen 10-100 nM in Tris-HCl Puffer (10 oder 100 mM, pH=7.5) unter Zusatz von Ni^{2+} oder Mg^{2+} (Endkonzentrationen zwischen 1-50 mM). Es war auf diese Weise nicht möglich ringförmige individuelle DNA Moleküle abzubilden. Stattdessen wurden häufig entweder größere Strukturen identifiziert, die Verkrustungen und eingetrockneten Anhäufungen von Puffer-Salzen gleichen (Abbildung 90), oder individuelle punktförmige Erhebungen ohne Feinstruktur (Abbildung 91).

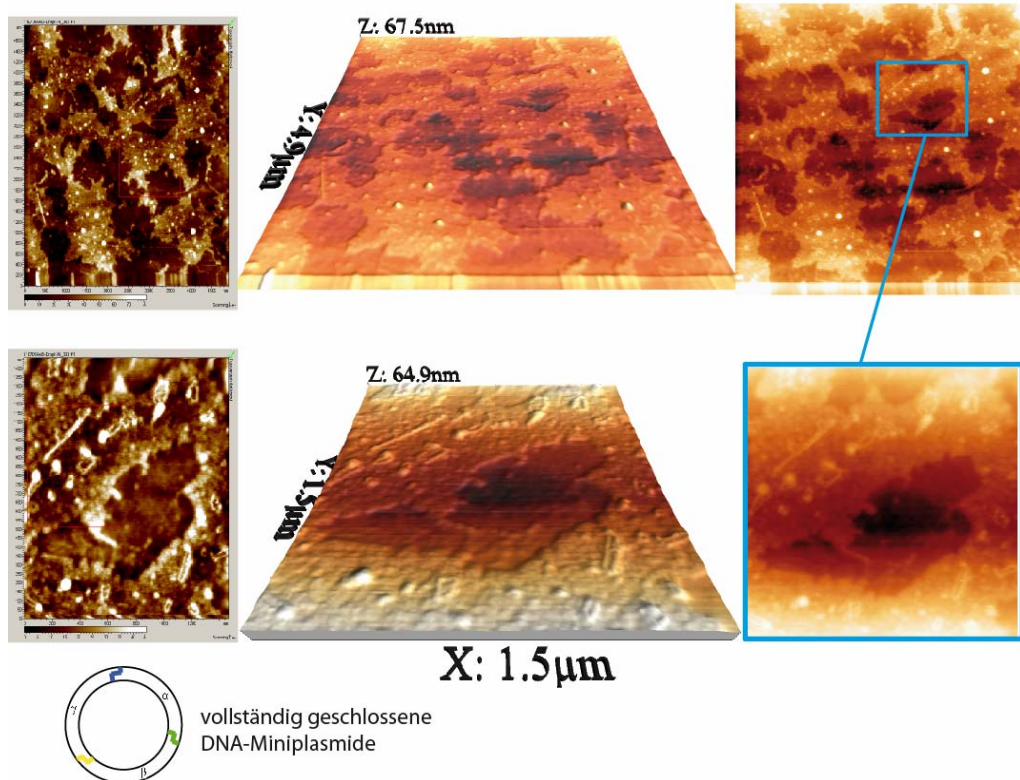


Abbildung 90: MAC-Mode AFM Aufnahme einer Probe von vollständig geschlossenen DNA-Miniplasmiden auf Mica, aufgebracht durch Drop-Coating (60 nM DNA-Miniplasmid (0.6 pmol absolut) in 10 mM NiCl_2 , 10 mM TrisHCl-Puffer (pH=7.5)). Die untere Reihe zeigt einen vergrößerten Ausschnitt derselben Probe. Links ist jeweils die Bildschirm-Momentaufnahme eines Scans gezeigt, rechts außen eine bearbeitete Abbildung des Original-Datensatzes und in der Mitte die dreidimensionale, topographische Darstellung dieser Abbildung. Neben einigen Hügelartigen Erhebungen mit Durchmessern von 40-80 nm sind Plateaus zu sehen, die als Verkrustungen oder Eintrocknungen des Puffers interpretiert werden könnten.

Aufgrund ihres Durchmessers im Rahmen der möglichen Auflösung (ca. 2-5 nm) könnte es sich dabei um DNA Miniplasmide handeln. Aber die bleibende Unsicherheit und das Fehlen an Feinstruktur, die zur Abbildung eines ringförmigen Gebildes mit einem Durchmesser zwischen 20-50 nm benötigt werden, machen diese Resultate für die spätere Darstellung von Interaktionen zwischen DNA Miniplasmiden unbrauchbar.

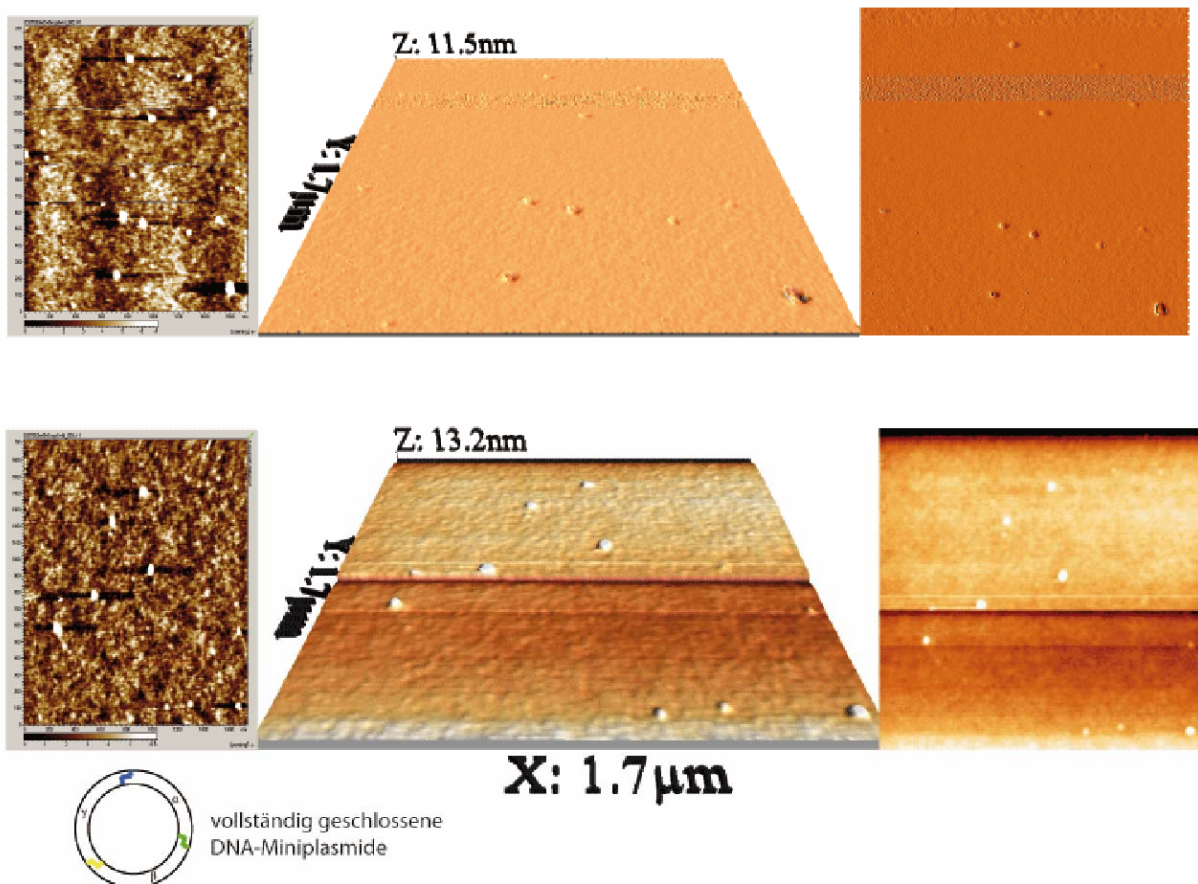


Abbildung 91: MAC-Mode AFM Aufnahme einer Probe von vollständig geschlossenen DNA-Miniplasmiden auf Mica, aufgebracht durch Dip-Coating (120 nM DNA-Miniplasmid (2.4 pmol absolut) in 10 mM NiCl_2 , 10 mM TrisHCl-Puffer (pH=8.0)). Obere und untere Reihe zeigen unterschiedliche Ausschnitte derselben Probe. Links ist jeweils die Bildschirm-Momentaufnahme eines Scans gezeigt, rechts außen eine bearbeitete Abbildung des Original-Datensatzes und in der Mitte die dreidimensionale, topographische Darstellung dieser Abbildung. Bei den punktförmigen Erhebungen oder Hügeln könnte es sich um unscharfe Abbildungen von Miniplasmiden handeln, da die Größenordnung der Durchmesser (20-60 nm) in diesem Bereich liegt. Ohne weitere Experimente lässt sich dies aber nicht bestätigen.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Abbildung der DNA-Miniplasmide als trockene Proben auf Mica in Umgebungsatmosphäre wurde die Messung der Proben in einer Flüssigkeitszelle angestrebt. Bei der Etablierung dieser Technik wurden die Methoden von *Lindsay et al.*, dem die saubere Abbildung von DNA-Miniplasmiden in Flüssigkeitszellen 1996 gelang, studiert und für den zur Verfü-

gung stehenden apparativen Aufbau adaptiert.^[146-148] Die Ausstattung des zur Verfügung stehenden Rasterkraftmikroskops gestatte den Einsatz des oben bereits erwähnten MAC-Modes zur Abtastung der DNA-Proben in der Flüssigkeitszelle. Der Vorteil des MAC-Modes gegenüber dem akkustischen *Tapping-Mode*TM (AC-Mode) ist zum einen, eine einfachere Handhabung bei der Bestimmung der Resonanzfrequenz des Cantilevers und zum anderen die Möglichkeit, Messungen mit relativ kleinen Amplituden, also geringerer Kraft durchzuführen als beim AC-Mode. Dies führt auch indirekt häufig zu einer besseren Bildauflösung. Der Grund liegt darin, dass beim AC-Mode eine Piezokeramik den Cantilever-Halter anregt und sowohl der Cantilever als auch die Flüssigkeit in der Flüssigkeitszelle in Schwingung versetzt wird (indirekte Anregung). Die gemessene Resonanz bei der Bestimmung der Cantilever-Resonanzfrequenz ist dann eine Überlagerung der mechanischen Resonanzen von Cantilever, Cantilever-Halterung und der Flüssigkeit, die durch die akustische Anregung induziert wird und häufig eine sehr komplexe Struktur aufweist.^[172] Dieses komplizierte Signal entfällt, wenn nur der Cantilever direkt in Schwingung versetzt wird, ohne die direkte Anregung von Halterung und Flüssigkeit. Dies ist möglich durch die direkte Anregung eines, mit einem magnetischen Film auf der Rückseite (Kobalt oder Chrom/Kobalt) versehenen Cantilevers, durch einen Elektromagneten unter dem Probenhalter, der ein magnetisches Wechselfeld erzeugt (Abbildung 92). Da der Cantilever-Halter und die Flüssigkeit nicht direkt angeregt werden, ist das Resonanz-Signal nur von der Resonanzfrequenz des Cantilevers abhängig und führt zu einem einfachen Signal einer gedämpften harmonischen Schwingung.^[184]

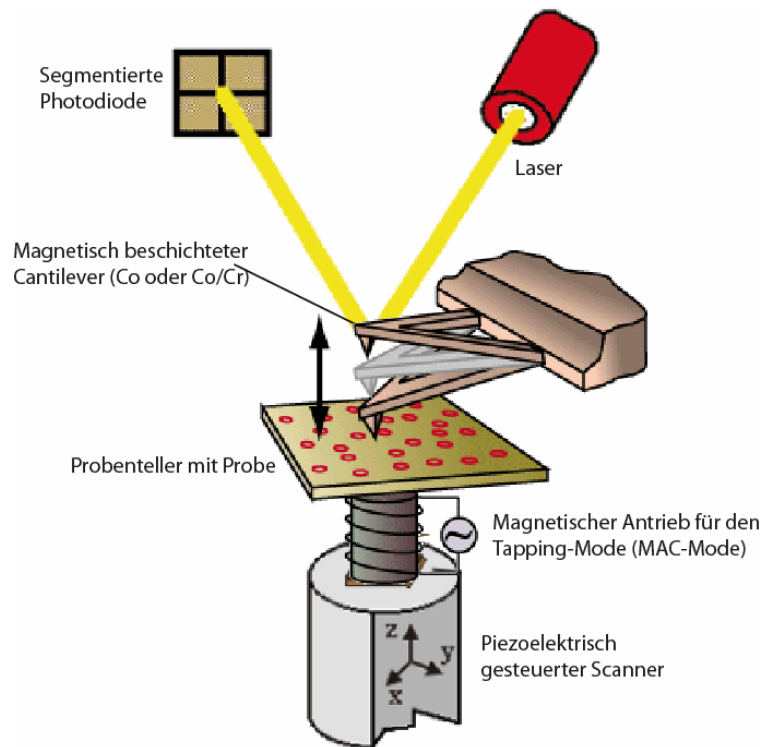


Abbildung 92: Prinzip der AFM-Messung im magnetischen Tapping-Mode (MAC-Mode).

Zur Anregung kann eine geringere Amplitude benutzt werden als im AC-Mode. Eine geringere Amplitude resultiert in einer geringeren auf die Probe wirkenden Kraft, was sich positiv auf die Auflösung auswirken kann, da feine atomare Fortsätze der Sondenspitze, die bei größerer Krafteinwirkung im *Tapping-Mode*TM zerstört würden, als „super-spitze“ Sonden erhalten bleiben. So können Cantilever die einen nominalen Radius der Sondenspitze von 50 nm haben aufgrund dieser intakten Fortsätze höhere Auflösungen in der Größenordnung von bis zu 1-2 nm liefern. Der Einsatz der Flüssigkeitszelle für das vorliegende Rasterkraftmikroskop (*PicoScan/PicoSPM I, Molecular Imaging Inc.*) in dem zur Verfügung stehenden Labor war zunächst noch nicht etabliert, was zu anfänglichen Schwierigkeiten beim experimentellen Aufbau führte. Die vom Hersteller mitgelieferte Flüssigkeitszelle, ein Aufsatz für den Probenteller mit eingelassener Teflon-Vertiefung (siehe Abbildung 93 und Abbildung 94), erwies sich im Übergang zwischen Mica-Plättchen und Aufsatz als nicht dicht. Zur Abdichtung wurde schließlich eine Gummidichtung aus handelsüblichem chemikalienbeständigem Gummi gefertigt und zwischen dem Flüssigkeitszellen-Aufsatz und dem Mica-Plättchen platziert. Die zuvor in den Trocken-Proben verwendeten Mica-Plättchen aus dem speziellen AFM/SPM-Bedarf (1x1 cm² bezogen von der Firma *Lot-Oriel*) erwiesen sich dabei als ungeeignet, da der Durchmesser der zylinderförmigen Teflon-Flüssigkeitszelle so groß war, dass die Flüssigkeitszelle und die darunterliegende Dichtung nicht mit dem Mica-Plättchen dicht abschlossen. Es wurden deshalb Mica-Plättchen mit größerer Fläche verwendet (ca

$2 \times 2.5 \text{ cm}^2$, handelsübliche Mica (bzw. Glimmer) –Kondensator-Plättchen bezogen von der Firma *P+M Elektronik, Bonn* als günstige Alternative zum SPM-Fachhandel).

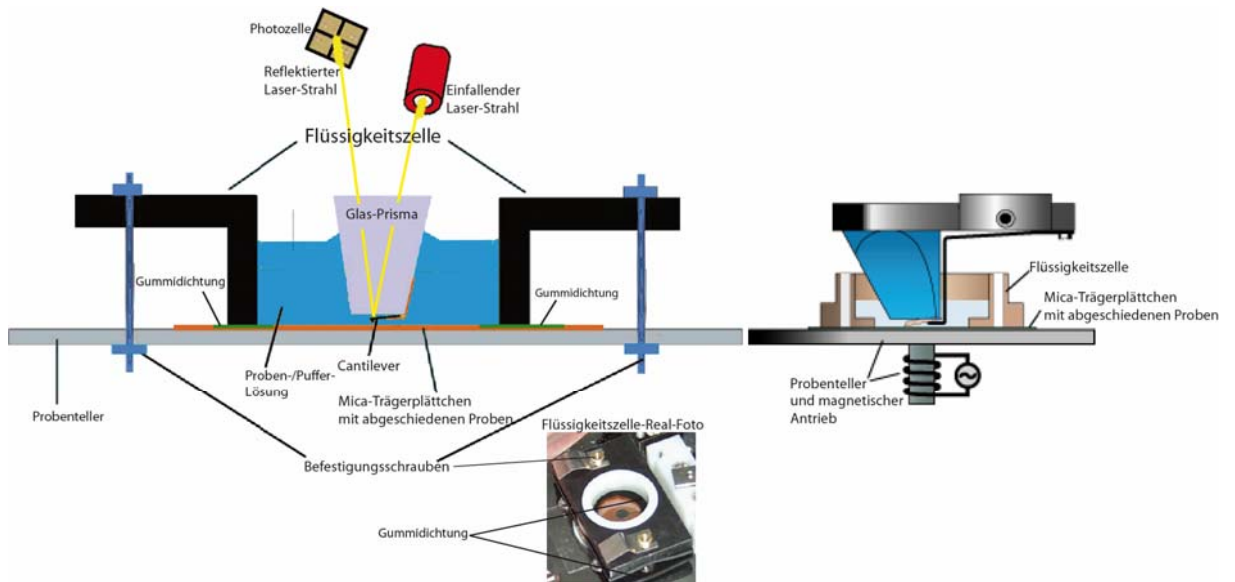


Abbildung 93: Querschnitt (links) und Seitenansicht (rechts) mit Komponentenbeschreibung des experimentellen Aufbaus zur AFM-Messung in einer Flüssigkeitszelle (oben). Unten ist das Real-Foto der eingesetzten Flüssigkeitszelle abgebildet.

Mit diesem experimentellen Aufbau gelang erfolgreich die Abbildung von vollständig geschlossenen DNA-Miniplasmiden (Abbildung 95 bis Abbildung 97). Dabei lag die ideale Menge an DNA-Miniplasmiden für *in-situ* AFM-Aufnahmen zwischen 0.2 pmol und 0.5 pmol bei einem Probenvolumen von $100 \text{ }\mu\text{L}$ (Konzentration 2 nM - 5 nM).

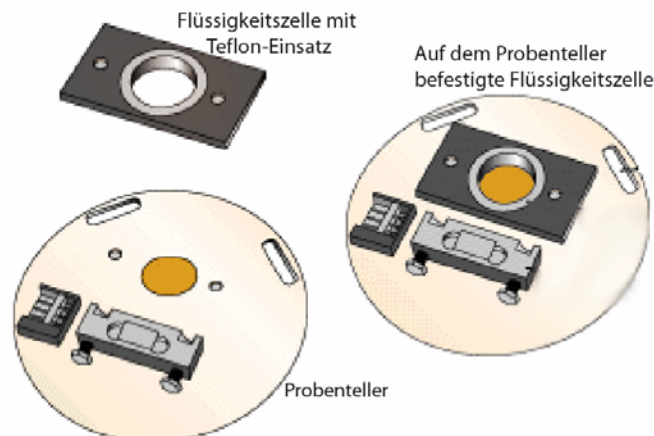


Abbildung 94: Probenteller und Flüssigkeitszelle des *Molecular Imaging AFM PicoScan / PicoSPM I*.

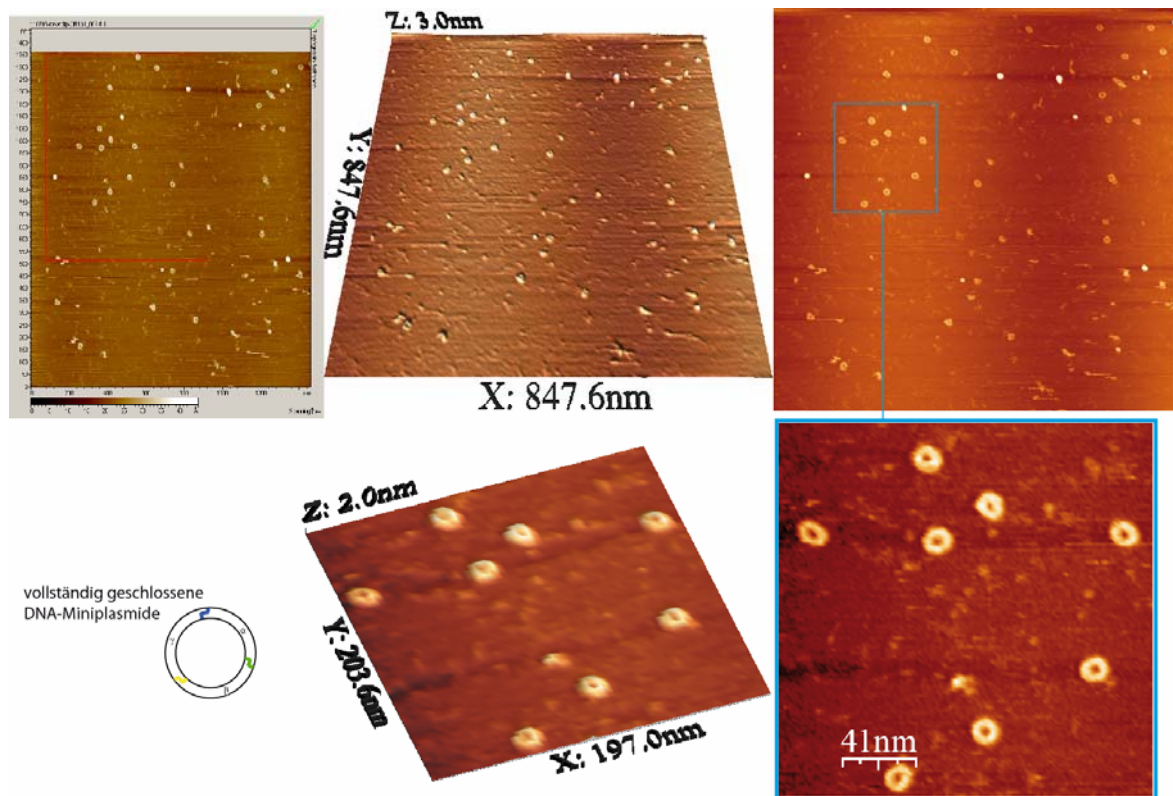


Abbildung 95: MAC-Mode AFM Aufnahme einer Probe von vollständig geschlossenen DNA-Miniplasmiden auf Mica mittels einer Flüssigkeitszelle (*in-situ* Messung, 0.085 pmol in 100 μ L Probenlösung). Die untere Reihe zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Probe bei dem 8 DNA-Ringe gut erkennbar sind (3D-Ansicht in der Mitte). Sie weisen eine Höhe von ca 2 nm auf (entspricht dem Durchmesser von dsDNA) und einen Ring-Durchmesser von ca 18-20 nm, was sehr gut mit dem berechneten Wert (\sim 18.2 nm) des Durchmessers von Miniplasmiden mit 168 bp übereinstimmt (vgl. Abbildung 84). Links oben ist eine Bildschirm-Momentaufnahme des Scans gezeigt, rechts oben ist eine bearbeitete Abbildung des Original-Datensatzes dargestellt und in der Mitte die dreidimensionale, topographische Darstellung dieser Abbildung.

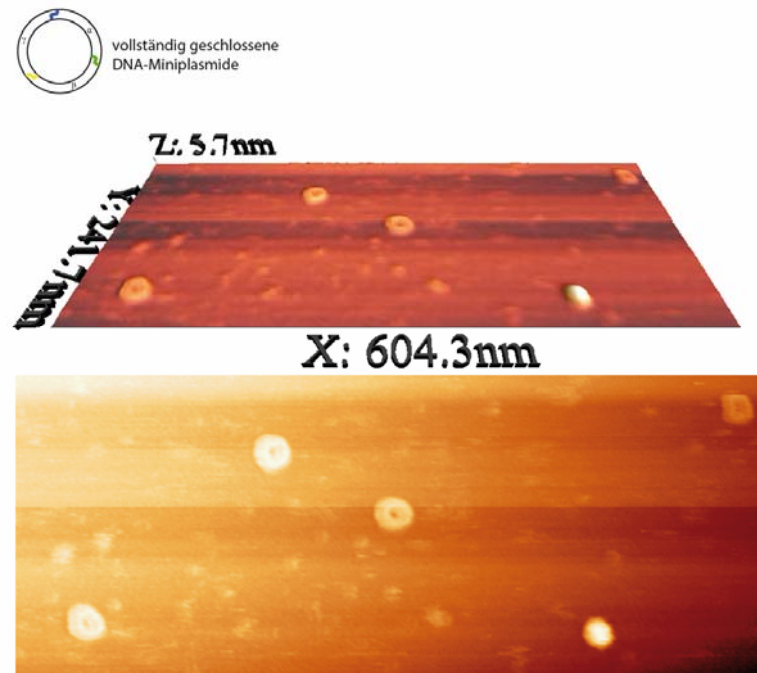


Abbildung 96: Rasterkraftmikroskopisches Amplituden-Bild einer weiteren DNA-Miniplasmid Probe *in-situ*. Unten dargestellt das relativ unscharfe Bild von 5 DNA-Ringen, oben eine topographische dreidimensionale Darstellung.

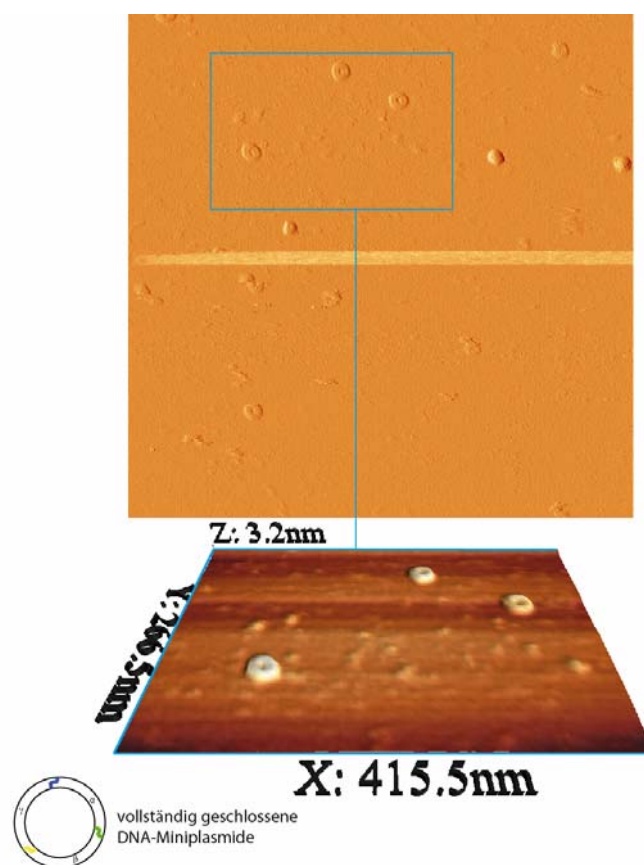


Abbildung 97: AFM-Phasen-Bild der in Abbildung 96 präsentierten Probe. Oben das deutlich schärfere 2D-Bild im Vergleich zu Abbildung 96 und unten die daraus abgeleitete 3D-Darstellung.

Um die Aggregation von mit dem Interkalator Anthracen funktionalisierten DNA-Miniplasmiden mittels Rasterkraftmikroskopie nachzuweisen, mussten zunächst einmal die nicht funktionalisierten aber funktionalisierbaren DNA-Miniplasmide, jene die eine 21 bp lange einzelsträngige Region besitzen (Abbildung 88, Mitte), erfolgreich abgebildet werden. Es galt dabei die Konzentration der DNA so zu wählen, dass eine statistische, monomolekulare Verteilung mit ausreichend großen Abständen zwischen den DNA-Objekten resultiert, um im zweiten Schritt, durch Zugabe und Hybridisierung der DNA-Miniplasmide mit den komplementären Anthracen-modifizierten Oligonucleotiden (Abbildung 88, rechts), eine Interaktion zu induzieren, die zu einer Aggregation führt. Die Abbildung der DNA-Miniplasmide mit einzelsträngiger Region gelang; jedoch zeigten alle Proben auch stets nicht-zirkuläre, lineare bzw Wurm-förmige DNA-Stücke (Abbildung 98 und Abbildung 99).

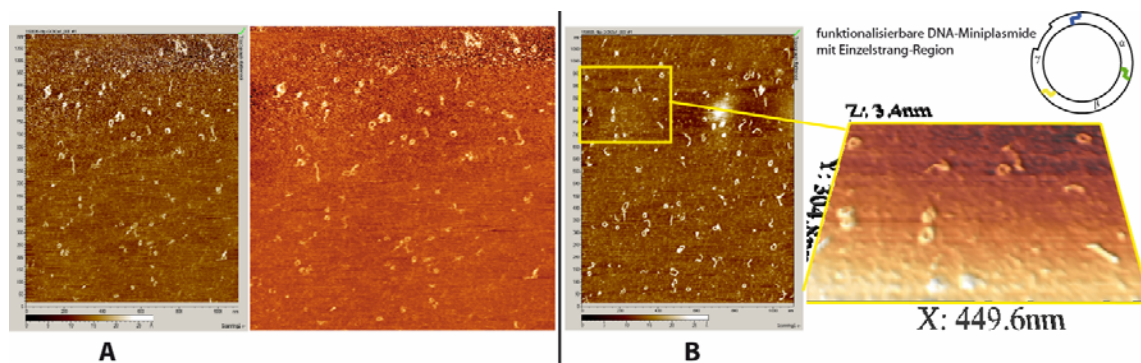


Abbildung 98: AFM-Bilder zweier exemplarischer Proben (**A** und **B**, jeweils eine Bildschirmaufnahme links und eine bearbeitete Darstellung rechts daneben) von DNA-Miniplasmiden mit einzelsträngiger Region. Es sind sowohl geschlossene DNA-Ringe als auch lineare und offene, gekrümmte DNA-Spezies sichtbar.

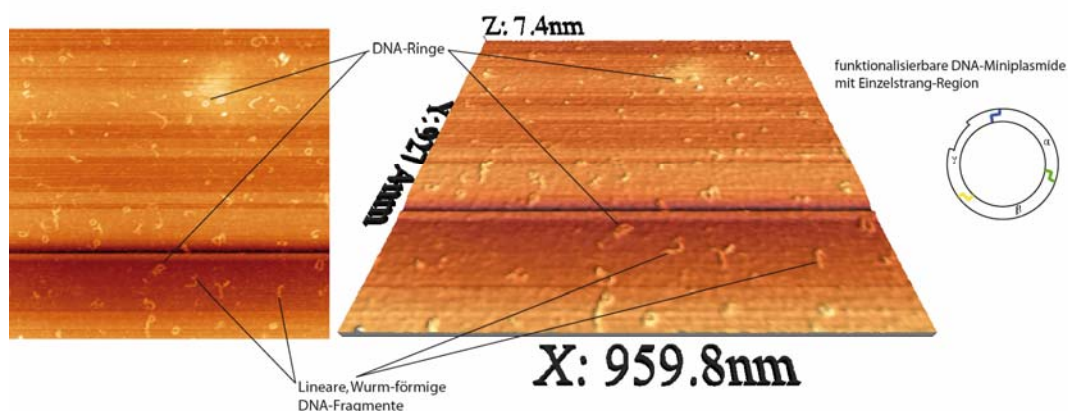


Abbildung 99: AFM-Aufnahmen einer weiteren Probe von DNA-Miniplasmiden mit Einzelstrangregion (2D links, 3D topographisches Bild rechts). Einige DNA-Ringe und einige lineare DNA-Fragmente sind gekennzeichnet.

Das Auftreten dieser unerwünschten Spezies kann ihre Ursache entweder in der unvollständigen Separation der stark gekrümmten, offenen DNA von den geschlossenen DNA-Miniplasmiden während der zweidimensionalen Gelelektrophorese haben oder aus der teilweisen oder vollständigen Entwindung der mit einzelsträngiger Region versehenen DNA-Miniplasmide resultieren. Anders als die komplett doppelsträngigen DNA-Miniplasmide, kann sich der unvollständige DNA-Strang, der für die einzelsträngige Region im funktionalisierbaren Miniplasmid verantwortlich ist, vom Gegenstrang trennen und so als wurmförmiges, lineares DNA Fragment im AFM-Bild erscheinen (Abbildung 100).

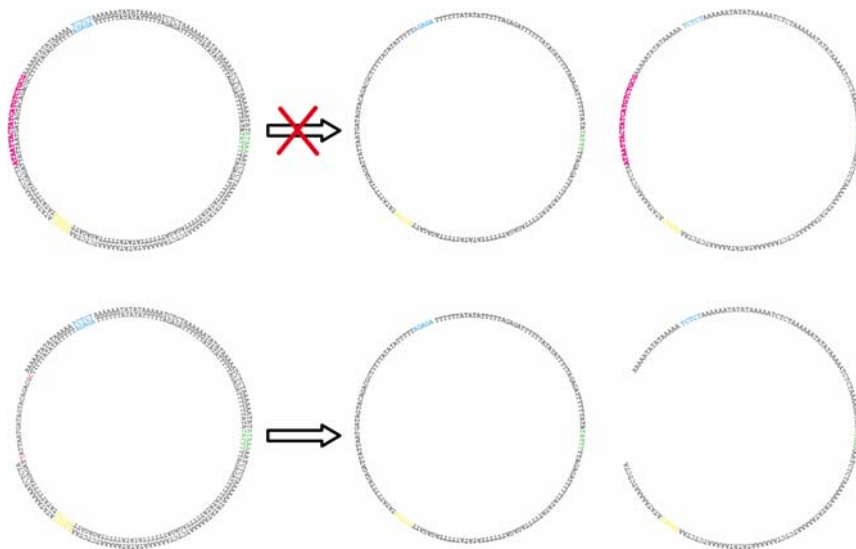


Abbildung 100: Entwindung und Separation der Einzelstränge von nicht vollständig doppelsträngigen DNA-Miniplasmide (unten). Vollständig geschlossene, doppelsträngige DNA-Ringe können so nicht entwunden und separiert werden (oben).

Die einzelsträngige Region des funktionalisierbaren DNA-Miniplasmids ist auch eine geschwächte Position in einem ansonsten doppelsträngigen DNA-Duplex mit einer Ringspannung, die wie eine Art Sollbruchstelle durch einen Bindungsbruch in eine entspanntere Konformation übergehen kann (Man beachte die schmalere Ring-Kontur einiger DNA-Ringe in Abbildung 101). Trotz des Versuchs der sorgfältigeren Reinigung der DNA-Miniplasmide durch native 2D PAGE gelang keine reine Darstellung der funktionalisierbaren Miniplasmide ohne offene DNA-Fragmente, was die beiden letztgenannten Thesen als Herkunft für die Verunreinigungen am wahrscheinlichsten erscheinen läßt.

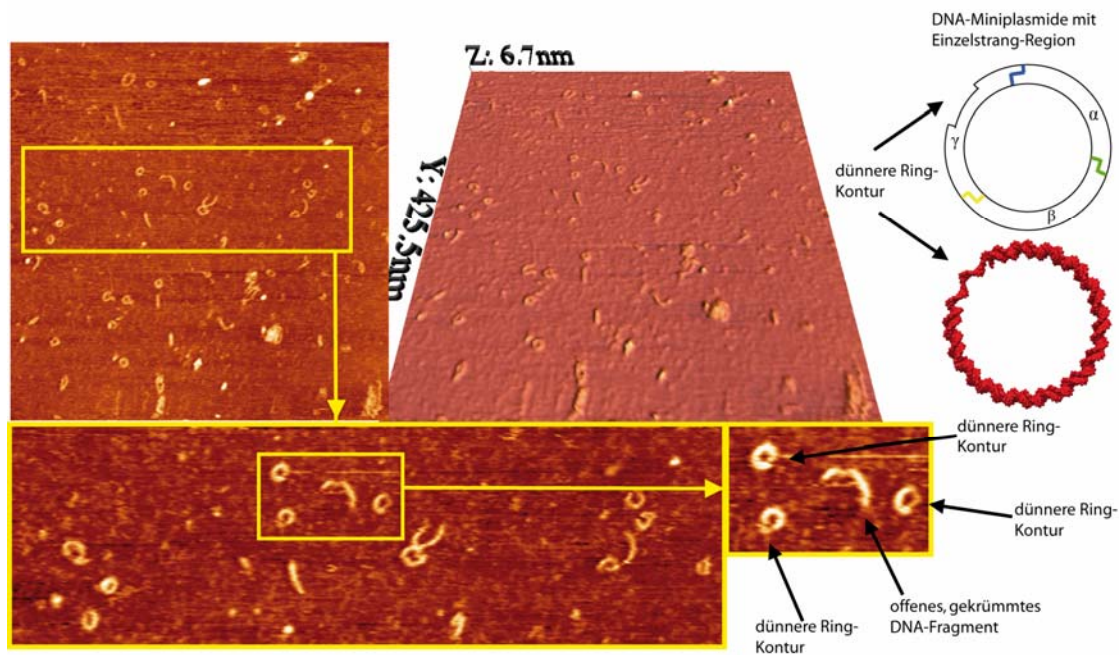


Abbildung 101: AFM-Aufnahmen einer Probe von DNA-Miniplasmiden mit Einzelstrangregion auf Mica *in situ*. Hauptauschnitte in 2D und 3D (oben) und vergrößerte Ausschnitte (unten). Bei den meisten intakten DNA-Ringen ist über einen kleinen Bereich des Ringtorus eine schmalere Ring-Kontur zu erahnen. Es könnte sich dabei um den einzelsträngigen Bereich des DNA-Miniplasmids handeln (unten rechts mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet).

Als nächstes erfolgte die Vermessung von Proben, die sowohl funktionalisierbare DNA-Miniplasmide mit Einzelstrangregion, als auch die dazu komplementären Anthracen-modifizierten Oligonucleotide enthielten. Exemplarisch sind nachstehend die Experimente und Ergebnisse aufgeführt, die mit dem zweifach Anthracen-modifizierten Oligonucleotid der Sequenz **GRN3** erhalten wurden. Die jeweils absolut auf das Mica aufgegebene Menge an DNA-Miniplasmid betrug 0.23 pmol (die Konzentration entspricht 4.5 nM in 50 μ L Probenlösung) und die Menge an modifiziertem Oligonucleotid **GRN3** betrug 1.2 pmol (die Konzentration entspricht 30 nM in 50 μ L Probenlösung). Alle Aufnahmen zeigen, neben den bereits aus den Experimenten ohne modifiziertes Oligonucleotid bekannten isoliert-auftretenden, zirkulären DNA-Miniplasmiden und den offenen, gekrümmten DNA-Fragmenten, auch Aggregationen von DNA-Ringen und offenen DNA-Fragmenten. Oft handelt es sich dabei um Agglomerate deren Stöchiometrie aufgrund der großen Anzahl und Dichte der DNA-Fragmente nicht zu bestimmen ist (Abbildung 102 und Abbildung 103 mit Pfeilen gekennzeichnet). Es sind aber auch Anhäufungen mit einer definierten Zahl an Interaktionspartnern zu erkennen. Paare von zwei eng benachbarten DNA-Miniplasmiden wurden genauso identifiziert wie Gruppen von drei oder vier miteinander verbundenen DNA-Ringen (Abbildung 102, Abbildung 103 und Abbildung 104 mit Pfeilen gekennzeichnet).

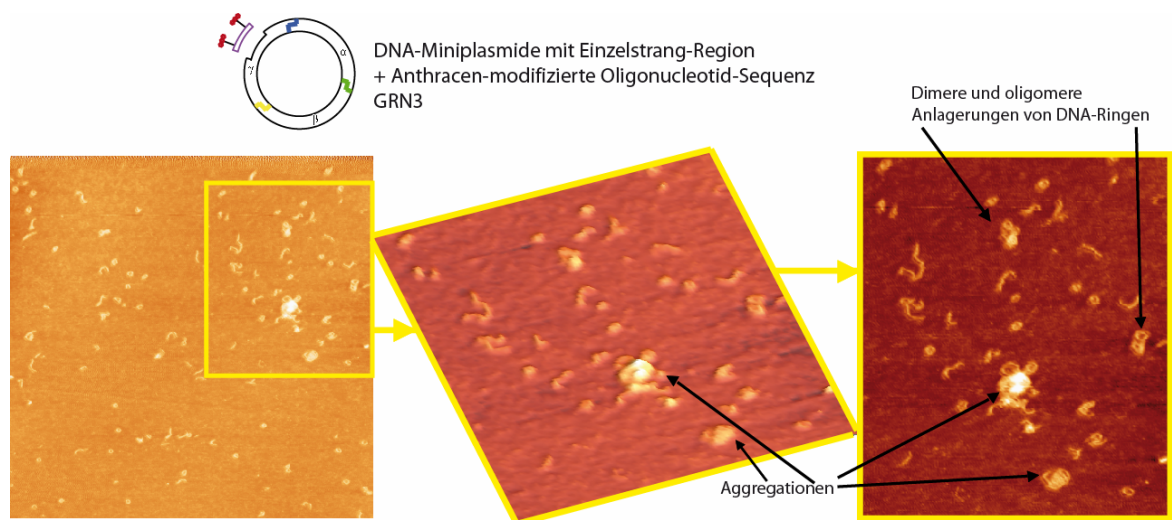


Abbildung 102: AFM-Aufnahme von funktionalisierbaren DNA-Miniplasmiden mit dem komplementären Anthracen-modifizierten Oligonucleotid **GRN3**. Links ist der Hauptausschnitt der Probe dargestellt, in der Mitte ein 3D topographisches Bild eines vergrößerten Ausschnitts (2D, rechts) mit Kennzeichnung einiger beobachteter Aggregate.

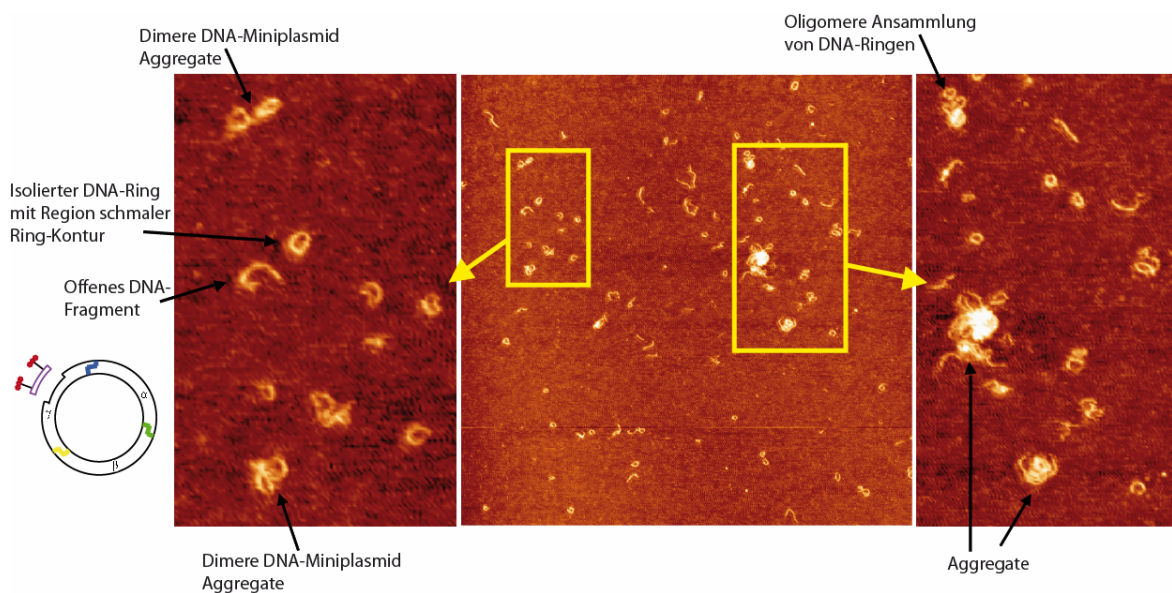


Abbildung 103: AFM-Aufnahme von funktionalisierbaren DNA-Miniplasmiden mit dem komplementären Anthracen-modifizierten Oligonucleotid **GRN3**. Es handelt sich um dieselbe Probe wie in Abbildung 102 mit weiter vergrößerten Ausschnitten und Kennzeichnung der unterschiedlichen beobachtbaren DNA-Spezies: isolierte DNA-Ringe, offene DNA-Fragmente und Aggregate mit definierter und undefinierter Anzahl an Interaktionspartnern.

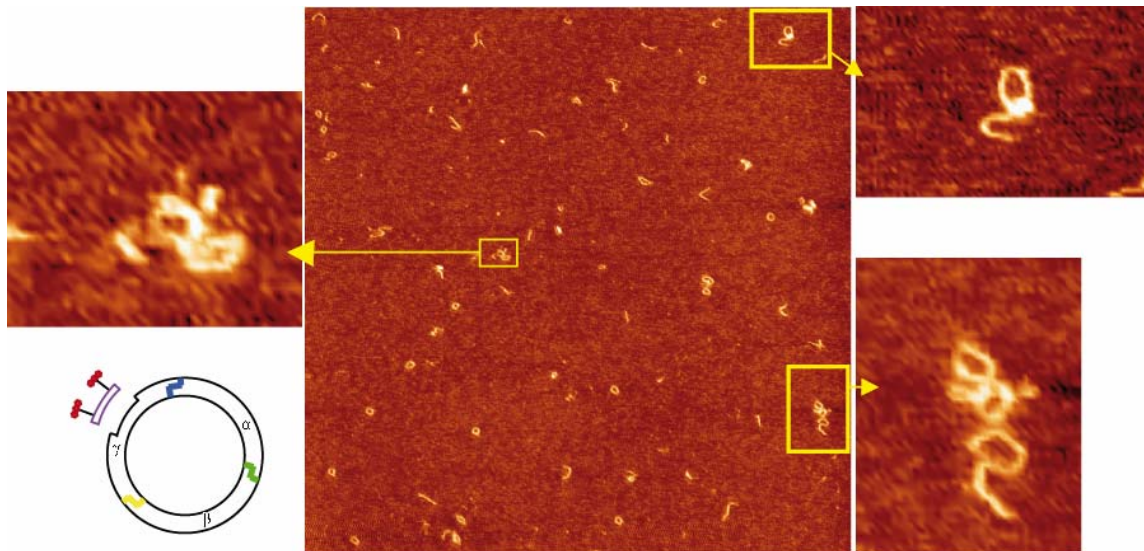


Abbildung 104: AFM-Aufnahme einer weiteren DNA-Miniplasmid Probe unter Zusatz von **GRN3**. Obwohl die Mengen und Konzentrationen aller Komponenten identisch zu den zuvor beschriebenen Experimenten sind, ist die Population an aggregierten DNA-Ringen scheinbar geringer. Die Vergrößerungsausschnitte links und rechts des Hauptausschnitts (Mitte) zeigen aber immer noch das Aggregate detektierbar sind.

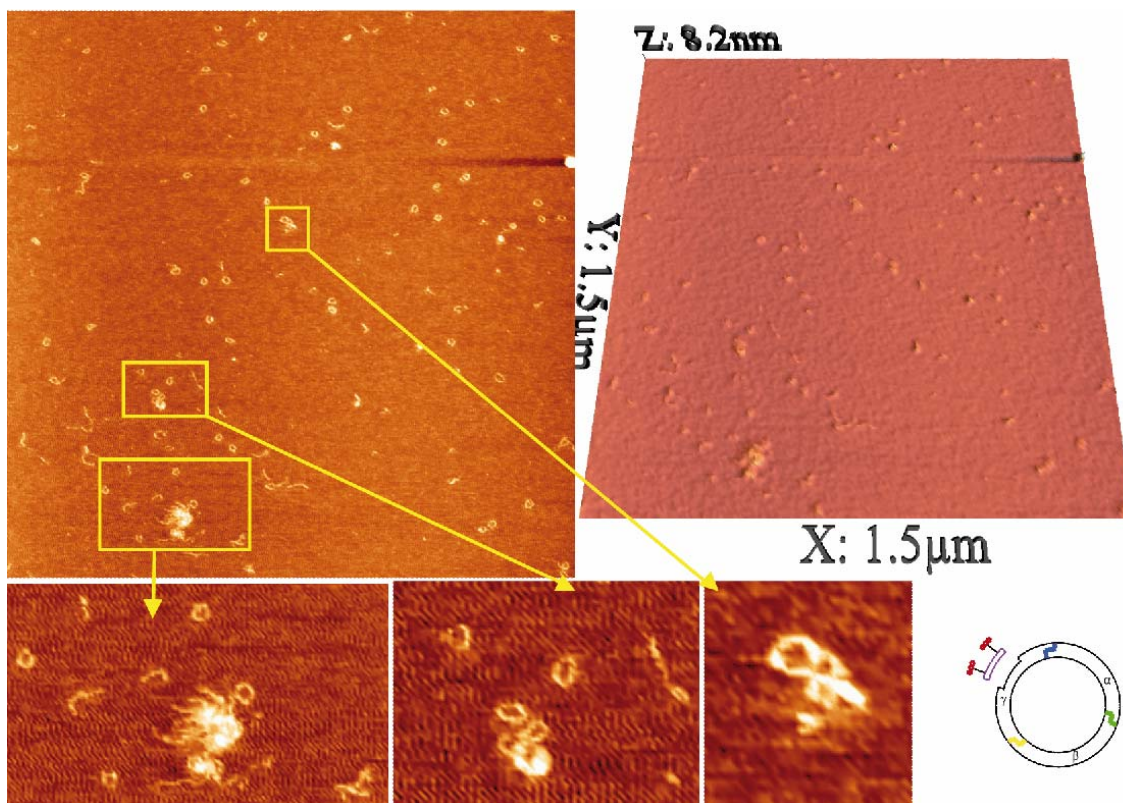


Abbildung 105: Ein anderer Ausschnitt (3D Bild rechts) derselben Probe wie aus Abbildung 104 mit vergrößerten Regionen (unten), die zusammenhängende Aggregate zeigen.

Diese AFM-Aufnahmen lassen zunächst die Interpretation zu, dass die Zugabe des zweifach Anthracen-modifizierten Oligonucleotids zu einer Hybridisierung

mit der einzelsträngigen Region der unvollständigen DNA-Plasmide führt und sich, durch Interkalation der Anthracen-Modifikation mit benachbarter doppelsträngiger DNA, Aggregate bilden. Da das Ereignis der Interkalation nicht sequenzspezifisch ist und somit jede doppelsträngige DNA Spezies als Interaktionspartner dienen kann, finden sich sowohl Paare von DNA-Ringen als auch Verknüpfungen zwischen offenen DNA-Fragmenten und DNA-Ringen sowie Anhäufungen mehrerer verschiedener DNA-Spezies. Die Interaktion zwischen einem Anthracen-modifizierten DNA-Miniplasmid mit einem weiteren funktionalisierten DNA-Ring hindert den zweiten Ring nicht mit seinen Interkalator-Funktionalitäten eine weitere doppelsträngige DNA zu binden, es sei denn beide Ringe sind je über ihre funktionalisierten Regionen miteinander verknüpft. So können sich kleine Ketten und Anhäufungen bilden.

Die zu bewältigende Aufgabe, Aggregation zwischen isolierten, modifizierbaren DNA-Nanoobjekten durch den Einsatz funktionalisierter DNA zu induzieren, wäre mit diesem Ergebnis zufriedenstellend gelöst, wenn nicht ähnliche Beobachtungen sporadisch auch in Proben ohne das funktionalisierte Element **GRN3** auftauchten.

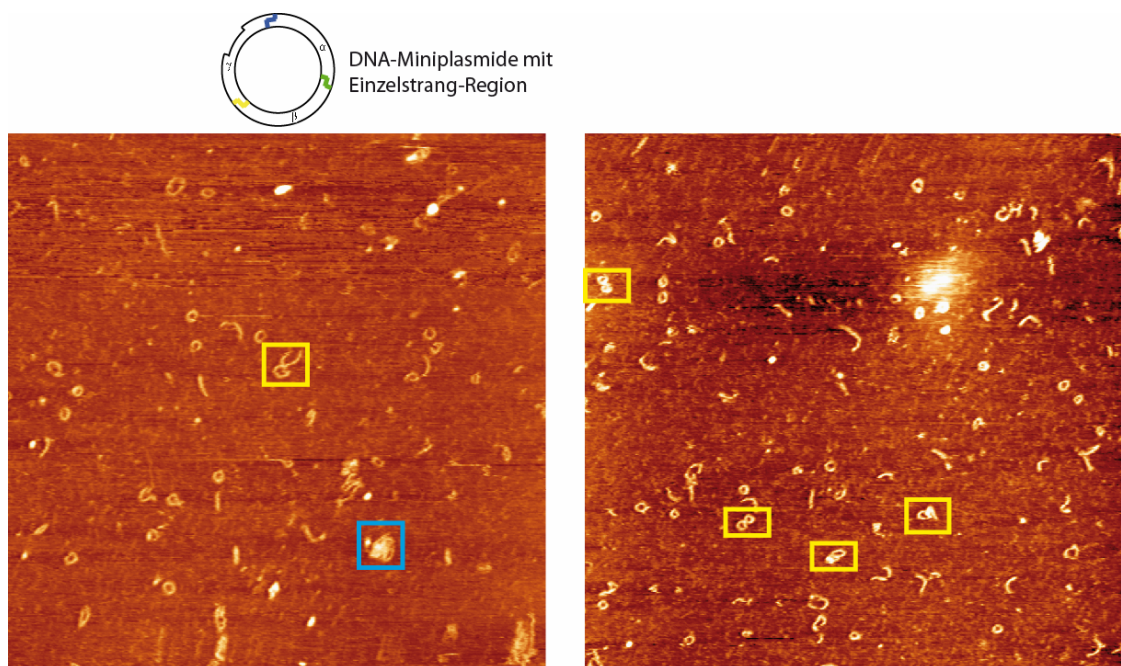


Abbildung 106: Zwei ausgesuchte AFM-Aufnahmen von Proben auf Mica *in situ*, die DNA-Miniplasmide mit Einzelstrangregion enthalten, aber nicht mit Interkalator-modifizierten, komplementären Oligonucleotiden versetzt wurden. In diesen Aufnahmen sind auch in Abwesenheit des eigentlichen verbindenden Elements, dem Anthracen-modifizierten Oligonucleotid, dimere Paare von DNA-Ringen (gelbe Kästchen) und eine größere DNA Anhäufung (blauer Kasten) beobachtbar.

Deutlich weniger ausgeprägt, nichts desto trotz ab und zu vorhanden, sind dimere Paare von DNA-Miniplasmiden und in einem Fall auch eine DNA-

Anhäufung (Abbildung 106) in Proben von DNA-Miniplasmiden mit Einzelstrangregion aber ohne Interkalator-modifiziertes, komplementäres Oligonucleotid. Dass eine Aggregation der DNA-Miniplasmide nicht wirklich ausschließlich in der Gegenwart des als verbindendes Element gedachten funktionalisierten Oligonucleotids detektiert wird, stellt die für die Aufgabenstellung ansonsten beobachteten positiven Ergebnisse in Frage. Gründe für die beobachteten Aggregationen der DNA-Ringe in Abwesenheit modifizierter komplementärer Oligonucleotide können zum einen eine Art des *Strand Displacements* (Strang-Austausch) sein (vgl. Kapitel 1.3 und Abbildung 16) oder zum anderen durch eine Metallionen-induzierte Verbrückung der Einzelstrangregionen der DNA-Ringe resultieren. Aufgrund der nicht vollständig geschlossenen Struktur der DNA Doppelhelix in den DNA-Miniplasmiden mit Einzelstrangregion, kann sich der offene DNA-Strang teilweise oder vollständig entwinden und vom Ring teilweise oder vollständig trennen (vgl. Abbildung 100). Geschieht dies bei zwei benachbarten DNA-Ringen, können diese sich über komplementäre Regionen mit dem jeweils anderen Ring austauschen, was zu einer Verbindung der DNA-Ringe über *Watson/Crick*-Basenpaarung durch eine Art des *Strand Displacements* führt. Eine derartige teilweise Entwindung, ausgerechnet über benachbarte komplementäre Regionen, erscheint allerdings nicht wahrscheinlich und auf den ersten Blick energetisch wie sterisch nicht sonderlich favorisiert. Eine wahrscheinlichere Erklärung wäre die Verbrückung der Einzelstrangregion benachbarter DNA-Ringe durch divalente Kationen, wie das in den Probenlösungen vorhandene Nickel(II), welches ja auch die DNA auf die negativ geladene Mica Oberfläche fixiert. Die Einzelstrangregion weist kein geschlossenes negativ geladenes Phosphatrückgrat auf um das Zentrum der Nucleobasen herum auf, wie es in einem Doppelstrang der Fall ist. Es ist denkbar das Ni^{2+} -Ionen über die exocyclischen Aminogruppen der Nucleobasen oder auch über die negativen Phosphat-Sauerstoffe der Einzelstrangregionen zweier benachbarter DNA-Miniplasmide chelatisiert werden und so als verbrückendes Element wirken. Eindeutig ist, dass solche Aggregate bei völlig geschlossenen DNA-Miniplasmiden nicht beobachtet werden. Solche Spezies zeigten immer eine statistische Verteilung ohne Kontakt zueinander, zurückzuführen auf die elektrostatische Abstoßung des negativen Phosphatrückgrats der Doppelstränge. Die Tatsache, dass trotz der großen Zahl an Aggregaten von dimerer aber auch oligomere Zusammensetzung bei funktionalisierten DNA-Ringen auch eine kleine Zahl von Aggregaten bei nicht-funktionalisierten aber funktionalisierbaren DNA-Ringen auftritt, verlangt nach der Klärung, ob die im ersten Fall häufiger beobachteten Interaktionen wirklich auf die Funktionalisierung zurückzuführen sind. In anschließenden Experimenten wurde versucht diesen Beweis zu erbringen.

Es sollte der Nachweis der Interaktion von Interkalator-modifizierten Oligonucleotiden mit doppelsträngiger DNA mit alternativen Methoden erbracht werden (Abbildung 107). In sogenannten *Gelshift* Experimenten sollte durch die Veränderung der gelelektrophoretischen Mobilität gezeigt werden, dass Interkalator-modifizierte Oligonucleotide mit Fluoreszenz markierter Doppelsträngiger DNA aggregieren. Die Fluoreszenzmarkierung dient hierbei als orthogonale Detektionsmethode. Während alle DNA-Moleküle im Gel-Experiment durch einen später zugesetzten interkalierenden Farbstoff wie *SybrGreen I*® angefärbt werden, ist der fluoreszenzmarkierte Doppelstrang unabhängig davon separat detektierbar. Als doppelsträngiges Zielmolekül wurde eine Hairpin DNA mit einem 9 bp langen *Stem* und einem 5 bp *Loop* gewählt, der am 3'-Ende mit *Fluorescein* markiert war. Im Falle der Interaktion mit einem der Anthracen-modifizierten Oligonucleotide (**GRN1** und **GRN3** wurden getestet) sollte eine Reduzierung der elektrophoretischen Mobilität zu einer Bandenverschiebung in einem nativen PAGE-Gel führen. Unter Zusatz eines noch längeren, einzelsträngigen Nucleinsäure Moleküls (γf), mit einer Region komplementärer Sequenz zu den funktionalisierten Oligonucleotiden **GRN1** bzw **GRN3**, sollte dieser Effekt noch verstärkt werden (Abbildung 107).

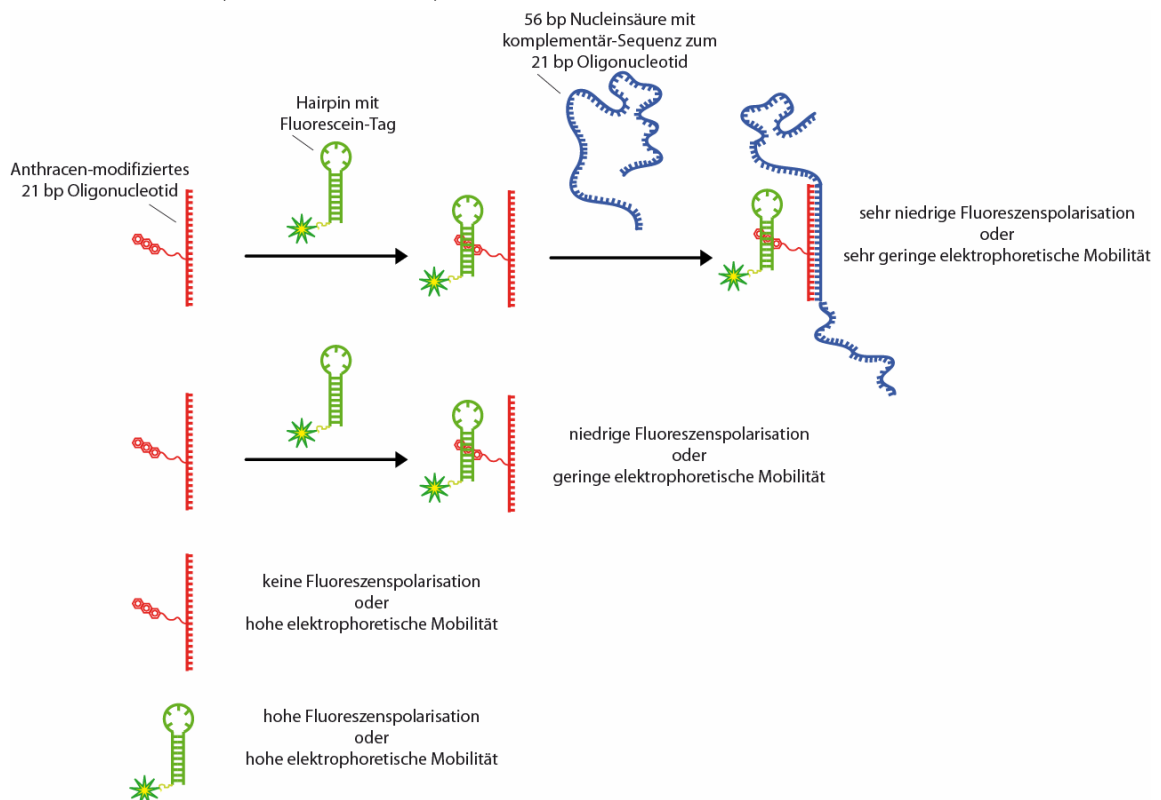


Abbildung 107: Prinzipien der alternativen Detektionsmethoden (FluPol und *Gelshift*) zum Nachweis der Interkalation der Anthracen-modifizierten Oligonucleotide (rot) mit doppelsträngiger DNA (Hairpin mit Fluorescein-Tag, grün). Eine Verstärkung des Antwort-Signals könnte durch den Zusatz eines größeren DNA-Fragments mit komplementärer Region (blau) zum modifizierten Oligonucleotid erzielt werden.

Diese Experimente zeigten aber in keinster Weise die erwünschten Ergebnisse. Es könnte argumentiert werden, dass die Bedingungen der Gelelektrophorese, beispielsweise die Abwesenheit von Metallionen-Salzen, die Interaktion erschweren. Die Überwindung der elektrostatischen Abstoßung der negativen Phosphatgerüste der DNA könnte durch Anwesenheit verbrückender divalente Kationen erleichtert werden. So weit das in Gelelektrophorese-Experimenten möglich ist, wurden solche Salze ergänzend hinzugefügt, jedoch ebenfalls ohne Erfolg. Der fluoreszenzmarkierte Hairpin erlaubte auch die Detektion einer Interaktion mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisations-Methode (FluPol, Abbildung 107). Bei diesem Verfahren wird ein Fluorophor-tragendes Molekül mit linear-polarisiertem Licht angeregt und das emittierte Licht unter Berücksichtigung des linear-polarisierten Anteils gemessen. Die Emission, Streuung und Absorption linear-polarisierten Lichtes durch ein Fluorophor, unter Beibehaltung der Polarisation, ist umso stärker, je weniger schnell sich das Fluorophor bewegt. Je größer und sperriger der Molekülrest in der unmittelbaren Umgebung eines Fluorophors, desto stärker ist die Beibehaltung der Polarisation. So kann, durch eine Änderung der Polarisation, die Aggregation eines fluoreszenzmarkierten Moleküls mit einem weiteren Molekül, unter der Reduzierung der Beweglichkeit des Fluorophors und somit einer Erhöhung der Fluoreszenzpolarisation gemessen werden. Auch dieser Effekt blieb, selbst unter Zusatz von divalenten Kationen wie Ni^{2+} , aus. Als letzte Methode wurden Messungen mit Oberflächen-Plasmonresonanz durchgeführt. Das patentierte System, das die photophysikalischen Änderungen von feinen Goldoberflächen bei erhöhter Massenablagerung ausnutzt, um kleinste Massenänderungen auf der Oberfläche zu detektieren, wurde verwendet um eine Interaktion zwischen Anthracen-modifizierten Oligonucleotiden und einem immobilisierten Hairpin nachzuweisen. Auch diese Experimente lieferten keinen Hinweis auf eine Interaktion. Die Ursache für das Scheitern all dieser Nachweisversuche einer Interaktion im Sinne einer stabilen Interkalation zwischen Anthracen-modifizierten Oligonucleotiden und doppelsträngiger DNA liegt wohl in der für solche Nachweismethoden zu hohen Dissoziationskonstante K_D (vgl. Kapitel 3.1.1.2). Mit einer $K_D \sim 1 \times 10^{-4}$ M ist die Wechselwirkung zu gering um durch *Gel-Shift*, Fluoreszenzpolarisation oder Oberflächen-Plasmonresonanz sicher detektiert zu werden. Zum Nachweis würden Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich benötigt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode etabliert, mit deren Hilfe die gezielte Funktionalisierung makromolekularer DNA-Bausteine - wie hier die DNA-Miniplasmide - zur Herstellung von höheren, DNA-basierten Aggregaten gelingt. Die funktionalisierten DNA-Miniplasmide konnten mittels Rasterkraftmikroskopie *in situ* abgebildet werden, und Aggregate von zusammenhängenden DNA-Ringen wurden nachgewiesen. Die in diesem Fall eingeführte Funktionalisierung ist der Interkalator Anthracen, der die DNA-Miniplasmide befähigt mit anderen doppelsträngigen DNA-Bausteinen zu aggregieren und so eine, zur *Watson/Crick*-Hybridisierung orthogonale, nicht-kovalente Wechselwirkungsmöglichkeit von DNA-Nanoobjekten ermöglicht.

Der Interkalator Anthracen wurde zunächst erfolgreich durch chemische Synthese über einen flexiblen Linker-Arm an die C5-Position der Nucleobase eines 2'-Desoxyuridin-Derivats geknüpft, in ein Phosphoramidit überführt und mittels DNA-Festphasensynthese in verschiedene Sequenzen kurzer Oligonucleotide eingebaut. Diese 21 bp kurzen Oligonucleotide, die ein bis drei Anthracen-modifizierte Nucleoside enthielten, können an beliebige makromolekulare DNA-Bausteine mit entsprechenden komplementären Einzelstrangsequenzen hybridisieren und diese so mit der Interkalator-Funktionalität ausstatten.

Auf der Basis von DNA-Miniplasmiden wurden funktionalisierbare DNA-Miniplasmid-Konstrukte mit eben solchen, zu den funktionalisierten Oligonucleotiden komplementären, Einzelstrangregionen hergestellt, die als DNA-Nanoobjekte rasterkraftmikroskopisch untersucht werden konnten. Dazu war es nötig, bereits etablierte Methoden zur Generierung von DNA-Miniplasmiden zu erweitern und zu modifizieren. Mit Hilfe eines ausgeklügelten Sequenz-Designs konnten so gezielt DNA-Miniplasmide einer definierten Basenpaarlänge erzeugt werden, in die auch kurze, für DNA-Miniplasmide ungewöhnliche, Sequenzen eingebaut werden konnten. Die erfolgreiche Abbildung regulärer, vollständig geschlossener DNA-Miniplasmide und ihrer funktionalisierbaren, Einzelstrangregion-enthaltender Analoga gelang erst nach der Etablierung der rasterkraftmikroskopischen *in situ* Messung in der Flüssigkeitszelle. Obwohl die Aggregation von Anthracen-modifizierten DNA-Ringen nachgewiesen wurde, konnte aufgrund der Beobachtung geringer Aggregation auch bei nicht Interkalator-enthaltenden DNA-Ringen, eine unspezifische Wechselwirkung durch andere Effekte als Interkalation, nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Weitere Experimente zur Bestätigung der Aggregation Anthracen-modifizierter DNA mit doppelsträngigen DNA-Zielmolekülen, beruhend auf Interkalation, schlugen bislang fehl. Mit *Gel-Shift*-, Fluoreszenzpolarisations- sowie Oberflächen-

Plasmonresonanz-Experimenten konnten keine Interaktionen zwischen Anthracen-modifizierten Oligonucleotiden und doppelsträngigen DNA-Modellsystemen nachgewiesen werden, was vermutlich an der für solche Experimente vergleichsweise schwachen Bindungskonstante von Interkalatoren liegt (vgl. Kapitel 3.1.1.2).

Es ist in ersten Experimenten versucht worden, die Anthracen-modifizierten Oligonucleotide kovalent zu verknüpfen, indem versucht wurde, die in Kapitel 3.1.1.2 aufgeführten weiteren chemischen Eigenschaften des Anthracens auszunutzen (vgl. Abbildung 49). Anthracen-modifizierte Oligonucleotide wurden unter erhöhter Temperatur mit einem wasserlöslichen Bismaleimid inkubiert, um in einer Diels-Alder-Reaktion eine Verbrückung der funktionalisierten Nucleinsäuren zu erzielen. Der Nachweis sollte durch Gelelektrophorese und gekoppelter Flüssigkeitschromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS) erbracht werden. Es konnten keine derart verknüpften DNA-Aggregate detektiert werden, vermutlich weil die Anthracen-Modifikation an der 9-Position mit einer elektronenziehenden Gruppe (Amid) substituiert ist und das Anthracen als Dien somit deaktiviert ist.

Des Weiteren wurde eine Photodimerisierung unter Bestrahlung von Anthracen-modifizierten Oligonucleotiden mit 366 nm UV-Licht versucht. Die Auswertung der Reaktionsprodukte mittels LC-ESI-MS zeigte keine Oligonucleotid-Dimere.

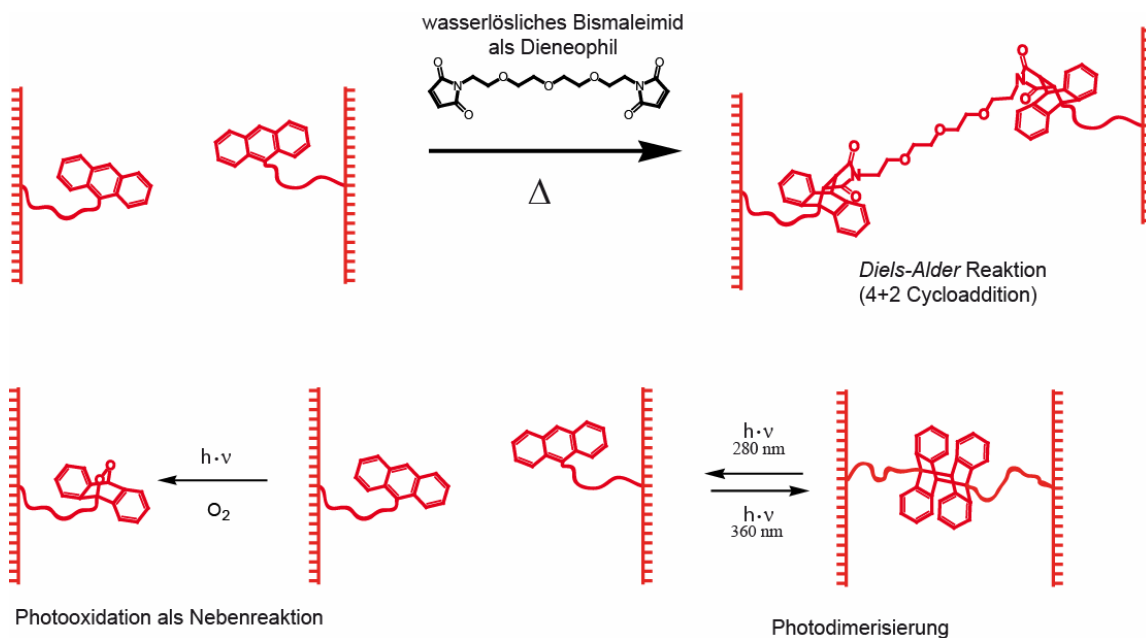


Abbildung 108: Versuch der kovalenten Verknüpfung Anthracen-modifizierter Oligonucleotide. Massenspektrometrische Untersuchungen und *Gel-Shift* Experimente konnten keine Verknüpfung von Oligonucleotiden bestätigen.

Obwohl weitestgehend unter Sauerstoff-Ausschluss und Argon-Atmosphäre bestrahlt wurde, wurden Massen detektiert, die auf eine Photooxidation der Anthracen-Modifikation hindeuten. Bestrahlung nicht-funktionalisierter Oligonucleotide gleicher Sequenz änderten ihre Masse nicht. Das Fehlschlagen der Photodimerisierung hat ihre Ursache sehr wahrscheinlich in der geringen Konzentration der funktionalisierten Oligonucleotide bei der die Bestrahlung durchgeführt wurde. Im vorliegenden Fall war eine Erhöhung der Konzentration aufgrund von Material-Mangel nicht möglich. Das prinzipielle Gelingen einer Photodimerisierung sollte damit allerdings nicht verworfen werden.

Trotz der verbleibenden Unsicherheit ob der eigentlichen Natur der DNA-Miniplasmid-Aggregation, ist durch die Etablierung einer modularen Strategie zur Funktionalisierung von DNA-Nanoobjekten, die einfach durch *in situ* Rasterkraftmikroskopie im MAC-Mode visualisierbar sind, eine hilfreiche Methode entstanden, welche leicht auf andere Wechselwirkungsprinzipien und andere Funktionalitäten anwendbar ist. Der Austausch des Anthracens mit einem anderen Molekül-Rest, wie beispielsweise Psoralen, einem Maleimid oder einem Thiol, würde beispielsweise eine reaktive Gruppe mit Fähigkeit zur kovalenten Bindungsknüpfung in DNA-Nanoobjekte einbringen. Bis auf die Änderung eines Syntheseschritts auf der Ebene des modifizierten Nucleosids würden alle weiteren Schritte identisch bleiben. Das auf Segmentierung beruhende Design der nachweislich gut mit AFM detektierbaren DNA-Miniplasmide, erlaubt auch das einfache Einbringen kommerziell erworbener modifizierter DNA durch reguläre Hybridisierung. Die Möglichkeit solche Einzelstrangregion-enthaltende DNA-Ringe mit verschiedenen RNA-Konstrukten, wie Hairpins zu hybridisieren, die ihrerseits stabile *Watson/Crick*-Ankerstellen an ihren Loops enthalten über die sie sequenzspezifisch aggregieren, werden zur Zeit verifiziert.

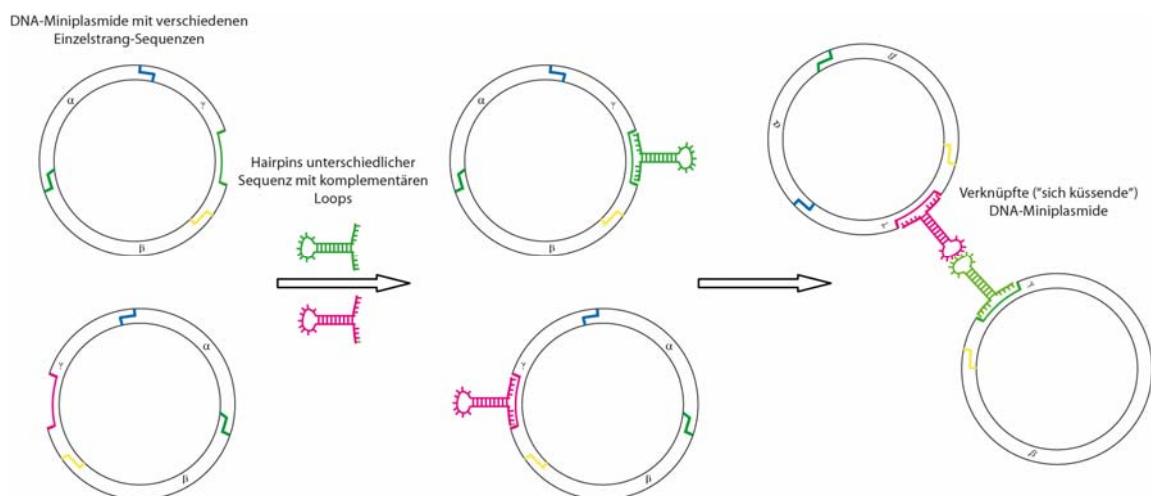


Abbildung 109: Prinzip einer sequenzspezifischen Verknüpfung zwischen DNA-Ringen mit unterschiedlichen Einzelstrang-Sequenzen über RNA-Hairpins.

Das Einbringen beliebiger Sequenzmotive auch in vollständig doppelsträngige DNA-Ringe, ermöglicht die gezielte Adressierung dieser Sequenzen mit sequenzspezifischen DNA-bindenden Molekülen, wie Dervan-Polyamide oder PNA. Verknüpfungen von so ausgestatteten DNA-Miniplasmiden mit Hilfe dieser Molekül-„Klebstoffe“ werden zur Zeit getestet und können, neben anderen geeigneten Methoden, auch anschaulich durch MAC-Mode rasterkraftmikroskopische Aufnahmen in der Flüssigkeitszelle nachgewiesen und visualisiert werden.

5 Material und Methoden

5.1 Chemische Synthese

Dünnschichtchromatographie: „DC-Aluminiumfolien 20 x 20 cm, Kieselgel 60 F₂₅₄“ (*Merck*, Darmstadt), beschichtet mit Fluoreszenzindikator. Visualisierung erfolgte mittels UV-Licht oder durch Anfärben mit Färbereagenzien.

Färbereagenz 1: (zum Anfärben der Nucleoside) 10 mL *para*-Anisaldehyd, 2 mL Eisessig, 180 mL Ethanol, 10 mL konz. Schwefelsäure.

Färbereagenz 2: (nach *Seebach*): 2.5 g Cer(IV)sulfat-Tetrahydrat, 6.25 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat, 225 mL Wasser, 25 mL konz. Schwefelsäure.

Flash-Säulenchromatographie: Kieselgel G60, Körnung 63-200 μm (*Merck*, Darmstadt).

MPLC: Pumpe Modell 687 und Gradientenformer Modell 688 von *Büchi*, Flawil, Schweiz; Lobar RP-18 Fertigsäulen von *Merck*, Darmstadt.

HPLC-Analyse: Quaternäres Gradientensystem (Agilent Technologies, Böblingen, Modell 1100), 150 x 4.6 mm Säulen (*Alltima C18*, 3 μm , Alltech, Deerfield, Ill., USA), 7.5 x 4.6 mm Vorsäule (*Alltima C18*, 5 μm , Alltech, Deerfield, Ill., USA), UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 254 nm. Mobile Phase A: 100 mM TEAA-Puffer, Mobile Phase B: Acetonitril (LiChrosolv gradient grade, *Merck*, Darmstadt).

NMR-Spektroskopie: NMR-Spektren wurden auf folgenden Geräten der Fa. *Bruker*, Rheinstetten, gemessen: DPX 300, DPX 400. Die angegebenen Verschiebungen δ sind in ppm relativ zu den Standards Tetramethylsilan ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) bzw. H_3PO_4 (^{31}P) angegeben. In den ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden sie durch Kalibrierung der deuterierten Lösungsmittelsignale auf Literaturwerte erhalten. Kopplungskonstanten wurden mit *1D-WinNMR* (*Bruker Daltonic*, Bremen) und MestReC 4.9.9 (*Mestrelab Research*, Spanien) ausgewertet. Die Multiplizitäten der ^1H -NMR Signale werden folgendermaßen abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, ddd = Dublett von Doppeldubletts, t = Triplett, q = Quartett, qi = Quintett, m = Multiplett, br = verbreitert.

Alle ^{13}C -Spektren wurden breitbandenkoppelt aufgenommen. Die Ergebnisse der Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer (DEPT)-

Messungen sind in die Auswertung integriert. Informationen aus H,H-COSY und C,H-HMQC-Experimenten für Verbindung **15** wurden bei der Signalzuordnung berücksichtigt.

Massenspektrometrie: EI-MS wurden auf einem *Finnigan MAT 95XL* (*Thermo Finnigan*, Bremen) gemessen, FAB-MS Spektren auf einem *Concept 1H* (*Kratos*, Hofheim) unter Verwendung von *meta*-Nitrobenzylalkohol (mNBA) als Matrix. HR ESI-MS Spektren wurden auf einem APEX IV Fourier-Transform Ion-Cyclotron-Resonance (FT-ICR) (*Bruker*, Deutschland) gemessen.

UV-Spektren wurden auf einem Agilent 1100 Diodenarray-Detektor gemessen (*Agilent Technologies*, Böblingen) bzw. auf einem UV/VIS Spektrometer Lambda 2S (*Perkin Elmer*).

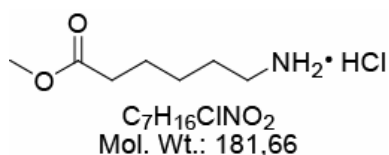
Lösungsmittel wurden wenn nötig absolutiert bezogen (*Fluka*, *Acros*) oder nach Standardverfahren getrocknet. Bei Lösungsmittel beziehen sich die angegebenen Mischungsverhältnisse auf die eingesetzten Volumina (v/v).

Chemikalien: Alle Chemikalien wurden von den Firmen *Acros*, *Aldrich*, *Fluka* oder *Sigma* bezogen und, falls nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung in der Synthese eingesetzt.

5-Iodo-2'-desoxyuridin wurde von der Fa. *Pharma Waldhof*, Düsseldorf bezogen.

Reaktionen wurden wenn notwendig unter Argon als Schutzgas durchgeführt.

5.1.1 ϵ -Aminocapronsäuremethylester Hydrochlorid (**11**)^[185]



Thionylchlorid (24 mL, 39.36 g, 330.8 mmol, 3.6 eq) wird langsam zu auf $-10^\circ C$ gekühltes Methanol (160 mL) getropft. Nach 15 Min. bei $-10^\circ C$ wird ϵ -Aminocapron-säure (**10**, 12 g, 91.5 mmol, 1 eq) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei RT weitere 12 h gerührt. Die Lösung wird im Vakuum aufkonzentriert und wieder in Methanol (45 mL) gelöst. Durch Zugabe von Diethylether (250 mL) wird das Produkt als Hydrochlorid-Salz (**11**) ausgefällt. Das Produkt

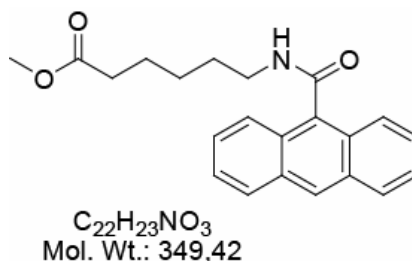
wird abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Es werden weiße Nadeln als Produkt erhalten (13.91 g, 76.6 mmol, 84%).

$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3 , d_3): δ = 8.15 (br, 3H, NH_3^+), 3.59 (s, 3H, CH_3O), 2.98-2.93 (m, 2H, CH_2NH_3^+), 2.27 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.37$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.79-1.71 (m, 2H, CH_2), 1.64-1.56 (m, 2H, CH_2), 1.42-1.34 (m, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , d_3): δ = 173.86 ($\text{HO}C=O$), 51.55 (CH_3O), 39.75 ($^+\text{NH}_3\text{CH}_2$), 33.64 (HOOCCH_2), 27.17 (CH_2), 25.93 (CH_2), 24.19 (CH_2).

EI-MS: berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2^+$ [M^+] = 145.11 gefunden 145.1 (13%) und für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}$ [M^-] = 114.12 gefunden 114.1 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}$.

5.1.2 Anthracen-9-carbamido- ϵ -amino-capronsäuremethylester (13)



Zu einer Suspension von Anthracen-9-carbonsäure (**9**, 3 g, 13.5 mmol, 1 eq) und HOBT (1.98 g, 14.85 mmol, 1.1 eq) in trockenem THF (50 mL) wird DIPEA (8.7 g, 11.6 mL, 67.5 mmol, 5 eq) zugegeben. Die Lösung wird auf 4 °C gekühlt und mit einer 4 °C gekühlten Lösung von DCC (3.34 g, 16.2 mmol, 1.2 eq) in trockenem THF (20 mL) versetzt. Nach 30 Min. bei 0 °C wird ϵ -Aminocapronsäuremethylester Hydrochlorid (**11**, 2.45, 13.5 mmol, 1 eq) hinzugegeben, eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt und weitere 12 h bei RT. Die Reaktionslösung wird filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der resultierende Feststoff wird in Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird eingengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EE/Cy 1:3 \rightarrow 2:1). Nach sorgfältigem trocknen im Vakuum erhält man einen farblos bis gelblichen Feststoff (4.3 g, 12.3 mmol, 91%).

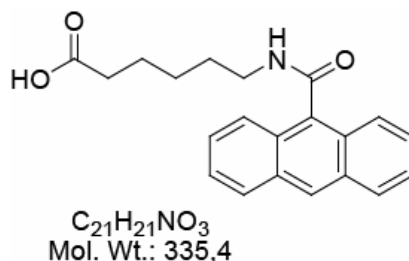
R_f -Wert: 0.13 (EE/Cy 1:2, UV, Seebach).

$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3 , d_3): $\delta = 8.37$ (s, 1H, Anthracen *H*-10), 7.97-7.90 (m, 4H, arom. Anthracen), 7.44-7.37 (m, 4H, arom. Anthracen), 6.07 (br, 1H, *NH*), 3.60-3.57 (m, 2H, CH_2NH), 3.56 (s, 3H, CH_3O), 2.26 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.38$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.69-1.59 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 1.43-1.35 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , d_3): $\delta = 173.94$ ($\text{CH}_3\text{OC}=\text{O}$), 169.50 ($\text{HNC}=\text{O}$), 132.11 (arom, 1C, q), 131.14 (arom, 2C, q), 128.53 (arom, 2C, CH), 128.17 (arom, 2C, q), 128.05 (arom, 1C, CH), 126.69 (arom, 2C, CH), 125.51 (arom, 2C, CH), 125.09 (arom, 2C, CH), 51.53 (CH_3O), 39.97 (NHCH_2), 33.93 (HOOCCH_2), 29.44 (CH_2), 26.60 (CH_2), 24.57 (CH_2).

EI-MS: berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ [M^+] = 349.17 gefunden 349.1 (13%).

5.1.3 Anthracen-9-carbamido- ϵ -amino-capronsäure (14)



Anthracen-9-carbamido- ϵ -amino-capronsäuremethylester (**13**, 1.5 g, 4.3 mmol, 1eq) wird in Methanol (30 mL) suspendiert und auf 4 °C gekühlt. Die Lösung wird langsam mit 1N aq. NaOH-Lösung versetzt (ca. 10 mL) und danach die Kühlung beendet. Über einen Zeitraum von ca. 12 h wird zusätzlich tropfenweise 1N aq. NaOH-Lösung zum Reaktionsgemisch aufgegeben und der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Wenn kein Edukt mehr detektiert wird, wird die Lösung erneut auf 4 °C gekühlt und mit aq. KHSO_4 (6M) tropfenweise auf einen pH von 2 angesäuert. Die resultierende, weiss-gelbliche Suspension wird vorsichtig im Vakuum von Methanol befreit und das verbleibende wässrige Gemisch geringfügig eingengt. Es wird mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach gründlichem trocknen im Vakuum erhält man einen weiss-gelblichen Feststoff (1.33 g, 4 mmol, 93%).

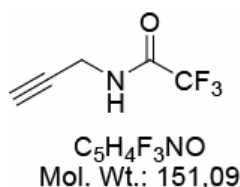
R_f-Wert: Basislinie (Edukt 0.43, EE/Cy 1:1, UV).

¹H-NMR (400.1 MHz, MeOD, d₄): δ = 8.55 (s, 1H, Anthracen H-10), 8.06-7.98 (m, 4H, arom. Anthracen), 7.56-7.46 (m, 4H, arom. Anthracen), 4.81 (br, MeOH, Lösungsmittel), 3.60 (t, ³J_{HH} = 6.98 Hz, 2H, CH₂NH), 2.35 (t, ³J_{HH} = 7.24 Hz, 2H, CH₂COOH), 3.34 (s, CH₃OH, Lösungsmittel) 1.82-1.67 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 1.59-1.51 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, MeOD, d₄): δ = 177.46 (HOC=O), 172.24 (HNC=O), 133.39 (arom, 1C, q), 132.64 (arom, 2C, q), 129.62 (arom, 2C, CH), 129.26 (arom, 2C, q), 129.09 (arom, 1C, CH), 127.68 (arom, 2C, CH), 126.58 (arom, 2C, CH), 126.03 (arom, 2C, CH), 40.92 (NHCH₂), 34.87 (HOOCCH₂), 30.15 (CH₂), 27.81 (CH₂), 25.78 (CH₂).

MS (FAB): berechnet für C₂₁H₂₁NO₃ [M⁺] = 335.15 gefunden 335.1 (21%).

5.1.4 *N*-Propargyltrifluoracetamid (4)^[112]

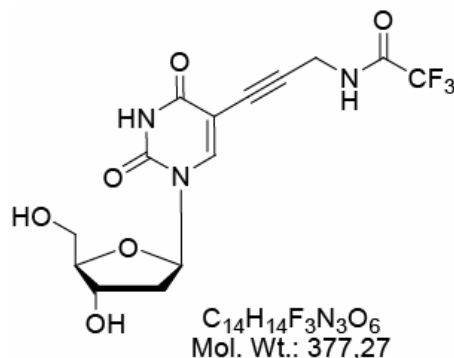


Zu einer Lösung von Propargylamin (**3**, 15 g, 18.75 mL, 270 mmol) in Dichlormethan (200 mL) wird eine Lösung von Trifluoressigsäureanhydrid (**2**, 74 g, 50 mL, 350 mmol) langsam hinzuge tropft und 1 Stunde bei 0-4 ° C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser (100 mL) beendet und weitere 45 Minuten gerührt. Die Phasen werden getrennt, die organische Phase wird mit 1 N HCl (100 mL), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL) und gesättigter Kochsalzlösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt destillativ gereinigt (Sdp. 85 ° C, 1mbar). Die so erhaltene farblose Flüssigkeit fällt in der Kälte als weißer, wachsartiger Feststoff aus (33.1 g, 219 mmol, 81 % der Theorie, Lit.: 79 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.01$ (s, br, NH), 4.08 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 5.42$, $^4J_{\text{HH}} = 2.53$ Hz, 2H, CH_2), 2.26 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2.58$ Hz, 1H, $\text{HC}\equiv\text{C}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz; CDCl_3): $\delta = 157.17$ (q, $^2J_{\text{C-F}} = 37.88$ Hz), 115.61 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 287.31$ Hz), 77.05 ($\text{HC}\equiv\text{C}$, überlagert durch Lösungsmittel), 72.96 ($\text{HC}\equiv\text{C}$), 29.63 (CH_2)

5.1.5 5-[3-(Trifluoracetyl-amino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin (**5**)^[110]



In einem Zweihalskolben wird eine Suspension von 5-Iodo-2'-desoxyuridin (**1**, 5 g, 14.12 mmol, 1 eq) und Kupfer(I)-iodid (268.5 mg, 1.41 mmol, 0.1 eq) in 20 ml trockenem DMF durch repetitive Ultrabeschallung im Vakuum, gefolgt von Spülen der Reaktionsapparatur mit Argon, entgast. Dann gibt man zunächst Triethylamin (4 ml, 28,3 mmol, 2 eq), anschließend *N*-Trifluoressigsäure-2-propargylamid (**4**, 7.6 ml, 70.6 mmol, 5eq) und schließlich Tetrakis(triphenylphosphan)-palladium(0) (808.9 mg, 0.7 mmol, 0.05 eq) hinzu. Man lässt ca. 1 Stunden bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre rühren. Der Verlauf der Reaktion kann mit RP-DC verfolgt werden (Acetonitril/ H_2O , 1:3). DMF und Triethylamin werden im Ölpumpenvakuum entfernt. Anschließend werden 25 ml einer Mischung von Dichlormethan, Methanol (1:1 (v/v)) und Anionenaustauscher (1 g, Amberlite IRA-400, HCO_3^- -Form) zugegeben und 30 Min. bei RT gerührt. Der Ionenaustauscher wird abfiltriert und gut mit Dichlormethan und Methanol (1:1) gewaschen. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit.

Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 \rightarrow 85:15 (v/v)). Nach Entfernen der Lösungsmittel unter vermindertem Druck und Trocknen im Hochvakuum erhält man 3.37 g (8.9 mmol, 63%) gelben Feststoff.

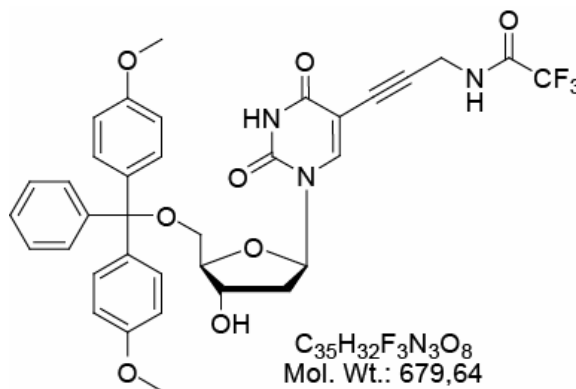
R_f -Wert: 0.45 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, Färbereagenz 1).

$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO, d_6): δ = 11.59 (s, 1H, N3-*H*) 10.02 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 5.34 Hz, 1H, *NHCH*₂), 8.18 (s, 1H, *H*-6), 6.09 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 6.64 Hz, 1H, *H*-1'), 4.95 (br, 2H, 3'-*OH*, 5'-*OH*), 4.23-4.21 (m, 3H, *NHCH*₂, *H*-4'), 3.78 (m, 1H, *H*-3'), 3.63-3.52 (s, 2H, *H*-5'), 2.13-2.10 (m, 1H, *H*-2').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO, d_6): δ = 161.97 (C4), 156.49 (q, $^2J_{\text{CF}}$ = 36.67 Hz, *CF*₃*C=O*), 149.82 (C5), 144.53 (C6), 116.21 (q, $^1J_{\text{CF}}$ = 288.21 Hz, *CF*₃), 98.10 (C5), 88.09 (*C* \equiv *C*), 85.25 (C4'), 85.99 (C1'), 75.80 (*C* \equiv *C*), 70.61 (C3'), 61.42 (C5'), 48.99 (C2'), 29.86 (*NHCH*₂).

MS (FAB): berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{H}^+$] = 378.09 gefunden 378.1 (32%).

5.1.6 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[3-(Trifluoroacetyl-amino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin (7)



Nucleosid **5** (500 mg, 1.33 mmol, 1eq.) wird 3 mal mit Pyridin (je 3 ml, abs.) ko-evaporiert und am Vakuum getrocknet. Man gibt 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (**6**, 496 mg, 1.46 mmol, 1.1 eq.) hinzu, evakuiert das Reaktionsgefäß noch einmal kurz und löst die Feststoffe unter Ar-Atmosphäre in Pyridin (3 ml, abs.). Es wird 15 h bei RT gerührt. Zu der Lösung gibt man MeOH (10 ml), destilliert das Lösungsmittel unter vermindertem Druck ab und ko-evaporiert mit MeOH. Nach flashchromatographischer Aufreinigung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$ 95:4:1 (v/v)) erhält man das geschützte Nucleosid in Form eines gelblichen Feststoffs (677 mg, 1 mmol, 75 % Ausbeute).

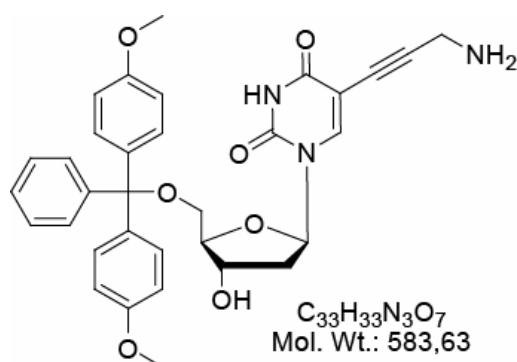
R_f -Wert: 0.46 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, Färbereagenz 1).

$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3): δ = 8.12 (s, 1H, *H*-6), 7.34 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.16 Hz, 2H, arom DMT), 7.26-7.23 (m, 7H, arom. DMT), 7.13 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.14 Hz, 1H, *NH*), 6.76 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.94 Hz, 4H, arom. DMT), 6.29-6.25 (m, 1H, *H*-1'), 4.51 (m, 1H, *H*-3'), 4.07 (m, 1H, *H*-4'), 3.86 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 5.30 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 3.70 (s, 6H, OCH_3), 3.29 (s, br, 2H, *H*-5'), 2.50-2.47 (m, 1H, *H*-2'), 2.24 (m, 1H, *H*-2').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CD_3OD): δ = 162.73 (C4), 158.69 (C=O), 158.66 (arom, q), 149.54 (C5), 143.55 (C6), 135.52 (arom, q), 130.04, 129.97, 128.05, 127.92, 127.02, 113.39 (br, CF_3), 98.99 (C5), 87.33 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 87.10 ($\text{Ar}_3\text{C-O-5}'$), 86.93 (C4'), 85.99 (C1'), 75.49 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 72.23 (C3'), 63.58 (C5'), 55.28 (OCH_3 , 2C), 41.64 (C2'), 30.41 (NHCH_2).

MS (FAB): berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_8$ [M^+] = 679.21 gefunden 679.3 (32%).

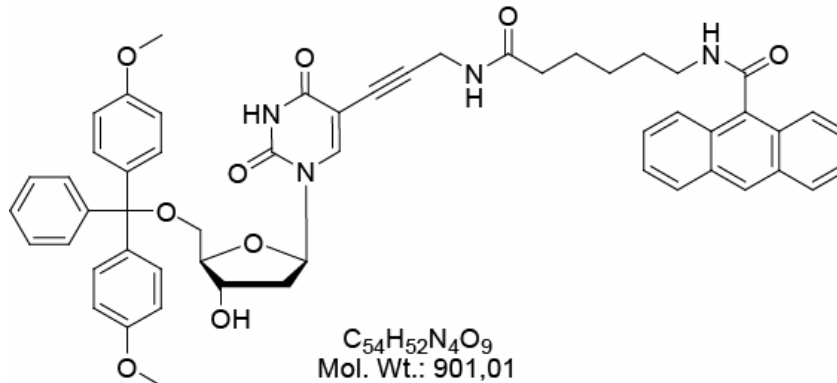
5.1.7 5'-O -(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-[3-Aminoprop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin (8)



5'-O -(4,4'-Dimethoxytrityl)- 5-[3-(Trifluoracetyl-amino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin (**7**, 977.59 mg, 1.43 mmol) wird in Methanol gelöst und innerhalb von 3 h 35 Min. mit 35 ml 33%iger, wässriger Ammoniak-Lösung versetzt. Das Methanol und die verbliebene Ammoniak-Lösung werden unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Methanol koevaporiert und unter Vakuum getrocknet. Man erhält einen gelblich-weißen Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung in DMF gelöst und weiter zur Darstellung von Verbindung **15** eingesetzt wird.

R_f -Wert: 0.46 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 85:15, Färbereagenz 1).

5.1.8 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[3-((Anthracen-9-carbamido)- ϵ -aminocaproylamino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin (15)^[132]



(Anthracen-9-carbamido)- ϵ -aminocapronsäure (**14**, 479.62 mg, 1.43 mmol, 1eq) wird in 3mL DMF gelöst und unter Rühren mit DIPEA (0.735 mL, 4.29 mmol, 3eq) versetzt. Zu der Lösung wird TSTU (542.52 mg, 1.80 mmol, 1.3 eq) gegeben. Nach 15-20 Min. wird eine Lösung des Nucleosids **8** (ca. 1.43 mmol ~ 834.6 mg in 5 mL DMF) unter Rühren zur Lösung gegeben. Nach ca. 1h entfernt man das Lösungsmittel unter vermindertem Druck. Der gelblich-weiße Feststoff wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (EE/MeOH/ Et_3N 98:1:1 \rightarrow 97:2:1). Nach Entfernen der Lösungsmittel unter vermindertem Druck erhält man 470 mg (0.52 mmol, 37.0 %) eines gelblichen Schaums.

R_f -Wert: 0.57 (EE/MeOH/ Et_3N 98:1:1, Färbereagenz 1).

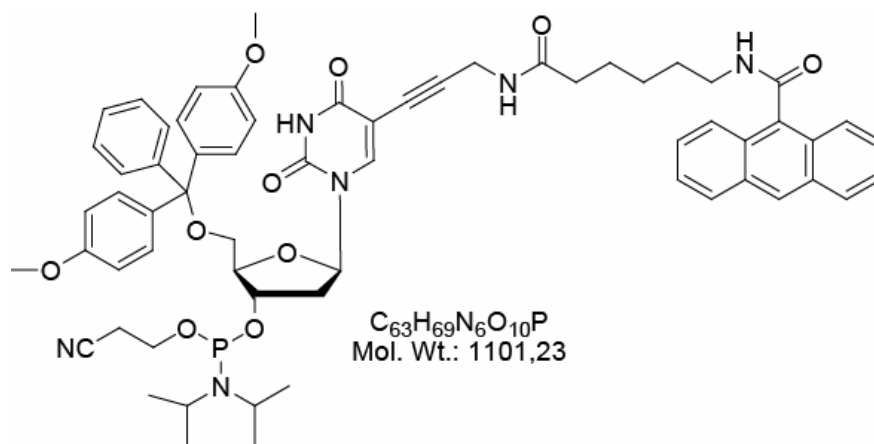
$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3): δ = 8.25 (s, 1H, Anthracen H -10), 7.88 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.60 Hz, 2H, arom. Anthracen), 7.82 (s, 1H, H -6), 7.80-7.78 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.37 Hz, 2H, arom. Anthracen), 7.36-7.28 (m, 6H, arom Anthracen/DMT), 7.19-7.17 (m, 6H, arom., Anthr/DMT), 7.09 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.26 Hz, 1H, Phenyl H -6), 6.71 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.73 Hz, 4H, arom. DMT), 6.65 (br, 1H, NH), 6.04 (m, 1H, NH, 1H, H-1'), 4.24 (s, 1H, H -3'), 3.89 (m, 1H, H -4'), 3.68 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 10.10 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 3.63 (s, 6H, OCH_3), 3.48-3.46 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.19-3.11 (m, 2H, H-5'), 2.26 (m, 1H, H-2'), 1.95 (m, 1H, H-2'), 1.87 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.06 Hz, 1H,

NHCOCH₂), 1.57-1.54 (m, 2H, CH₂CH₂NH), 1.49-1.45 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1.30-1.27 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂NH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ = 172.4 (C=O), 169.7 (C=O), 162.3 (C4), 158.6 (arom, q), 149.2 (C5), 144.7 (arom, q), 143.0 (C6), 135.67 (arom, q), 132.1 (arom, q), 131.0 (arom, q), 130.0 (arom, 4C, CH), 128.5 (arom, 2C, CH), 128.0 (arom, 4C, CH), 128.0 (arom, CH), 127.9 (arom, CH), 127.0 (arom, CH), 126.7 (arom, 2C, CH), 125.6 (arom, 2C, CH), 125.00 (arom, 2C, CH), 113.37 (arom, 4C, Dimethoxytrityl 3,5 CH), 99.1 (C5), 89.4 (C≡C), 86.9 (Ar₃C-O-5'), 86.6 (C4'), 85.8 (C1'), 74.0 (C≡C), 71.8 (C3'), 63,6 (C5'), 55.3 (OCH₃, 2C), 41.6 (C2'), 40.0 (CH₂), 35.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.2 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.0 (CH₂).

MS (FAB): berechnet für C₅₄H₅₂N₄O₉ [M⁺] = 900.37 gefunden 900.4 (10%).

5.1.9 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[3-((Anthracen-9-carbamido)-ε-amino-caproylamino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin-3'-O-(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidit (17)



Zu Nucleosid **15** (470 mg, 0.52 mmol, 1eq) in THF (2-5 ml, abs.) gibt man 0.45 ml DIPEA, rührt 10 Min. bei Raumtemperatur, tropft 0.23 ml (1.03 mmol) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-chlorophosphoramidit hinzu und rührt 1 h bei RT. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 %iger wässriger NaHCO₃ beendet. Es wird mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rück-

stand wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (EE/MeOH/Et₃N 98:1:1 → 94:5:1). Nach Entfernen der Lösungsmittel unter vermindertem Druck erhält man 480 mg (0.44 mmol, 84,0%) eines gelblichen Schaums.

R_F-Wert: 0.53 (EE/MeOH/Et₃N 94:5:1, Färbereagenz 1).

¹H-NMR (400.1 MHz, CD₃CN): δ = 8.52 (s, 1H, Anthracene *H*-10), 8.05-7.99 (m, 4H, arom. Anthracen), 7.86 (d, ³J_{HH} = 11.73 Hz, 1H, *H*-6), 7.55-7.44 (m, 6H, arom. Anthr/DMT), 7.36-7.29 (m, 6H, arom. Anthracene/DMT), 7.24 (t, ³J_{HH} = 7.25 Hz, 1H, Phenyl *H*-6), 7.15 (br, 1H, *NH*), 6.89-6.86 (m, 4H, arom. DMT), 6.28 (br, 1H, *NH*), 6.13-6.06 (m, 1H, *H*-1'), 4.65-4.56 (m, 1H, *H*-3'), 4.15-4.10 (m, 1H, *H*-4'), 3.79 (m, 2H, CH₂C≡C), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.74-3.57 (m, 2H, CH₂P, 2H, NCH(CH₃)₂), 3.57-3.52 (m, 2H, CH₂CH₂NH), 3.37-3.24 (m, 2H, *H*-5'), 2.64 (t, ³J_{HH} = 5.96 Hz, 1H, NCCCH₂CH₂OP), 2.53 (t, ³J_{HH} = 5.96 Hz, 1H, NCCCH₂CH₂OP), 2.50-2.29 (m, 2H, *H*-2'), 2.08-2.04 (m, 2H, NHCOCH₂), 1.72-1.65 (m, 2H, CH₂CH₂NH), 1.62-1.56 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1.46-1.39 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1.24-1.06 (m, 12H, CH(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃CN): δ = 173.29, 173.27, (C=O), 171.73, 169.81 (C=O), 162.62 (C4), 159.78 (arom, q), 150.20 (C5), 146.00 (arom, q), 144.02 (C6), 136.85, 136.63 134.24, 132.13, 131.17, 131.14, 131.11, 131.08, 129.45, 129.43, 129.05, 128.98, 128.94, 128.77, 128.56, 127.94, 127.56, 126.60, 126.24, 118.32 (N≡C), 114.28 (arom, 4C, Dimethoxytrityl 3,5 *CH*), 99.79, 99.70 (C5), 90.39, 90.36 (C≡C), 87.70, 87.68 (Ar₃C-O-5'), 86.65, 86.61 (C4'), 86.41, 86.35 (C1'), 74.72, 74.69 (C≡C), 74.39 (d, ²J_{CP} = 17.24 Hz, C3'), 73.91 (d, ²J_{CP} = 16.35 Hz, C3'), 64.23, 63.98 (C5'), 59.65, 59.45 (CH₂OP), 56.03(OCH₃), 55.98 (OCH₃), 44.17, 44.05 (NCH(CH₃)₂), 40.78, 40.73 (C2'), 40.45 (CH₂), 36.46 (CH₂), 30.00, 29.97 (CH₂), 27.37 (CH₂), 25.97 (CH₂), 24.99, 24.92, 23.29-22.79 (m, 2C, CH₃), 23.29-22.79 (m, 2C, CH₃).21.19-20.99 (m, 2C, CH₃).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CD₃CN): δ = 151.02 (s).

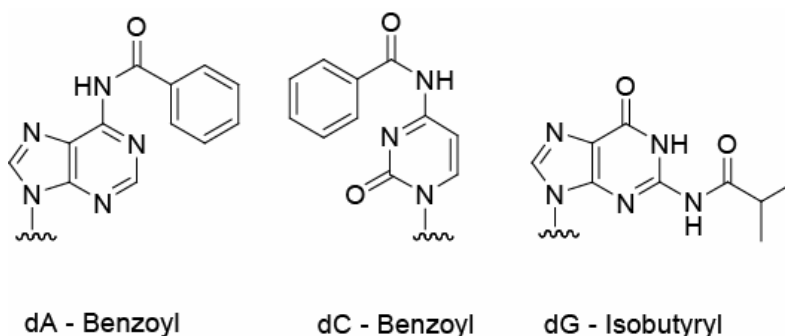
MS (FAB): berechnet für $C_{63}H_{69}N_6O_{10}P [M^+]$ 1100.48 gefunden 1100.5 (12%) und $C_{63}H_{69}N_6O_{10}PNa [M+Na^+]$ = 1123.47 gefunden 1123.5 (17%).

5.2 DNA Festphasen Synthese

Für alle Arbeitsschritte wurden sterile Einwegmaterialien verwendet und Einmalhandschuhe getragen. Für wässrige Lösungen wurde gereinigtes, steril filtriertes (0,2 μm) deionisiertes Wasser verwendet (*Werner* Reinstwassersysteme, EASYpure® UV/UF compact reagent grade water systems).

5.2.1 Reagenzien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel für die DNA-Synthese wurden von den Firmen *J.T. Baker*, *Transgenomics*, *GlenResearch* oder *Applied Biosystems* bezogen. Die eingesetzten Standardphosphoramidite sind Produkte der Firma *Applied Biosystems*. Die Nucleobasen der Phosphoramidite waren wie folgt geschützt:



Bei den Säulenkartuschen mit dem an die Festphase (*Polystyrene*, PS) gebundenen ersten Nucleotid handelt es sich um LV200 columns (Low Volume, 200 nm, *Applied Biosystems*), die im 0,2 μmol Maßstab verwendet werden.

5.2.2 Geräte

Die OligoNucleotidsynthesen wurden auf einem DNA-Synthesizer des Modells ABI 394 der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt.

Zur Abspaltung und Aufarbeitung wurde eine Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, *Eppendorf*) benutzt.

5.2.3 Kopplungsbedingungen

Die Synthesen der Sequenzen **GRN1-GRN6** wurden je mit einer dG^{iBu} PS Column LV200 begonnen. Sequenz **GRN7** begann mit dC^{Bn} PS Column LV200. Das eingesetzte Programm für alle Kupplungszyklen, einschließlich der modifi-

zierten Nucleosidphosphoramidite, war LV200. Die Detritylierung nach jedem Kopplungsschritt erfolgte durch 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan. Die Kopplungsschritte wurden mit 0,1 M Phosphoramiditlösung in Acetonitril sowie 1-*H*-Tetrazol (4% 1-*H*-Tetrazol in MeCN) als Aktivator durchgeführt. Das Capping erfolgte mit Essigsäureanhydrid und Pyridin in THF (Ac₂O 10%, 2,6-Luthidin 10%, THF 80%) und *N*-Methylimidazol (16% in THF). Zur Oxidation wurde eine Lösung aus 0,02 mM I₂/ Pyridin/ H₂O in THF (I₂ 3%, Py, 20%, H₂O 2%, THF 75%) eingesetzt. Das Syntheseprogramm endete im „Trityl-on“ Modus ohne finale Entschützung der 5'-OH Gruppe zur einfacheren anschließenden Aufreinigung mittels RP-HPLC.

5.2.4 Entschützung und Abspaltung von der Festphase

Nach der Synthese wird die Säulenkartusche zur Entnahme der Polystyrol Festphase vorsichtig geöffnet (keine Handschuhe; elektrostatische Aufladung ist möglich) und die Hälfte des Säulenmaterials in ein Braunglasgefäß mit teflonbeschichtetem Deckel überführt; die andere Hälfte wird in einem identischen Gefäß bei -20 ° C zur späteren Verwendung gelagert. Zur Entschützung werden 1 mL wässrige 33% NH₃ Lösung (DNA-Grade) auf die Festphase gegeben und bei 55 ° C für 5 h bei fest geschlossenem Gefäß inkubiert.

Im Anschluss wird der flüssige Überstand der Festphasensuspension über ein Spinfiltrertube (Millipore Amicon Bioseparations Ultrafree-MC Centrifugal Filter Device, Vol<0.5 mL, 0.45 µm Porengröße) abgetrennt und dann nochmals mit 150 µL Wasser gespült. Das Filtrat wird bei RT an der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt und in TEAA-Puffer (100 µL; 0.1 M) aufgenommen.

5.2.5 Säulenchromatographische Reinigung der 5'-O-DMT geschützten Oligonucleotid Sequenzen

Die Umkehrphasen-Säulenchromatographische Analyse und präparative Trennung (RP-HPLC) geschah an einer Agilent HPLC mit Quaternären Gradientensystem und automatisierter Probeninjektion (*Agilent Technologies*, Böblingen, Modell 1100) mit einer 250 x 4.6 mm Säule (Nucleosil 100-5 C18, *CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe*), 7.5 x 4.6 mm Vorsäule (Nucleosil 100-5 C18, *CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe*) und UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 254 nm und 350 nm. Mobile Phase A: 100 mM TEAA-Puffer, Mobile Phase B: Acetonitril (*LiChrosolv gradient grade, Merck*, Darmstadt).

Für analytische RP-HPLC Läufe werden 2.5 μL der 100 μL Oligonucleotid Stammlösungen (siehe Abschnitt 5.2.4) entnommen und mit Wasser auf 20 μL verdünnt. Aus dieser Probenlösung werden 18 μL zur Analyse injiziert.

Gradient :

Zeit	Solvent A[%]	Solvent B[%]
[Min.]	MeCN	aq. 0.1 M TEAA-Puffer
0	2	98
4	5	95
35	50	50
40	98	2
50	98	2

Für präparative RP-HPLC Trennungen werden 50-97 μL der Oligonucleotid Stammlösungen (siehe Abschnitt 5.2.4) ohne Verdünnung direkt injiziert. Es wird der oben beschriebene Gradient zur Trennung benutzt und die Produkt-Fractionen gesammelt.

5.2.6 Detritylierung und erneute säulenchromatographische Reinigung der Zielsequenzen

Die Produkt-Fractionen aus Abschnitt 5.2.5 werden gründlich durch mehrmaliges Lösen in Wasser und Trocknen im Vakuum vom Laufmittel befreit. Zur DMT-Entschützung werden 75 μL 80% Essigsäure auf die getrockneten Oligonucleotid-Proben gegeben und unter mildem Schütteln für 20 Minuten inkubiert. Um schädlichen Einfluss der konzentrierten Säure auf die DNA durch längere Einwirkung zu verhindern, werden die Lösungen sofort mit 25 μL 1M TEAA-Puffer versetzt und die Proben direkt durch erneute RP-HPLC gereinigt. Für analytische RP-HPLC Läufe werden 2.5 μL der 100 μL entschützten Oligonucleotid Stammlösungen entnommen und mit Wasser auf 20 μL verdünnt. Aus dieser Probenlösung werden 18 μL zur Analyse injiziert. Es wird der in Abschnitt 5.2.5 beschriebene Gradient verwendet.

Für präparative RP-HPLC Trennungen werden 50-97 μL der entschützten Oligonucleotid Stammlösungen entnommen und ohne Verdünnung direkt injiziert. Es wird der oben beschriebene Gradient zur Trennung benutzt und die Produkt-Fractionen gesammelt.

5.3 Charakterisierung der Oligonucleotide

Die Nucleinsäuren wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert. Aus der gemessenen Absorption konnte dann über das Lambert-Beersche Gesetz die Endkonzentration an Nucleinsäuren berechnet werden.

Lambert-Beersches Gesetz:

$$\ln \frac{I}{I_0} = \chi * c * d$$

mit I : gemessene Intensität,
 I_0 : einfallende Intensität,
 χ : molarer Extinktionskoeffizient
 d : Schichtdicke,
 c : Konzentration an Nucleinsäuren

Das Ergebnis wurde entweder direkt vom Photometer bestimmt oder man verwendete die Formel:

$$c_{RNA/DNA} \left[\frac{mmol}{l} \right] = \frac{OD_{260} \times k \times d}{\sum nt \times MG}$$

mit: OD_{260} : gemessene Absorption bei 260 nm
 k : Koeffizient^[186, 187]: 1.0 OD_{260} Einheiten dsDNA = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 1.0 OD_{260} Einheiten ssDNA = 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 1.0 OD_{260} Einheiten ssRNA = 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 d : Verdünnungsfaktor
 $\sum nt$: Summe an Nucleotiden
 \overline{MG} : durchschnittliches Molekulargewicht^[186, 187] ssDNA: 330 g/mol
 ssRNA: 345 g/mol
 dsDNA: 660 g/mol

5.3.1 Thermische Denaturierungsstudien modifizierter und unmodifizierter doppelsträngiger DNA

DNA-Schmelzpunktkurven wurden auf einem Spektralphotometer Lambda 2, ausgestattet mit einem thermostatisierbaren Peltier-Element (PTP-6) der Firma *Perkin-Elmer* aufgenommen. Die Proben wurden bei einer Detektionswellenlänge von 260 nm über einen Temperaturbereich von 20-85 °C vermessen. Die Aufheiz- und Abkühlrate lag bei jeweils 1 °C/Min. Es wurden für jede Probe drei Aufheiz- und Abkühlzyklen aufgenommen. Schmelzpunkte (T_m in °C) wurden

dem Wendepunkt der erhaltenen Schmelzkurve entnommen (A_{260} gegen Temperatur).

Messungen wurden in 1xPBS-Puffer $\text{pH} = 7.5$ aufgenommen. Die $0.6 \mu\text{M}$ konzentrierten Duplex DNA Proben wurden in Küvette mit 1.0 mL Fassungsvermögen gemessen. Um Lufteinschlüsse zwischen dem im Küvettendeckel enthaltenen Temperaturfühler und der Küvette zu vermeiden, wurde das Gefäß mit ca. $1500 \mu\text{L}$ gelinde Überfüllt und beim Verschließen der überquellende Probenüberschuss abgetupft. Vor den Messungen wurden die Proben 2 Min. auf 95°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Eine Messung des Puffers ohne DNA wurde separat durchgeführt und von den Messungen der Proben vor der Auswertung subtrahiert.

10x PBS:

Salz	MW[g/mol]	Einwage/500 mL [g]	Konzentration[M]
NaCl	58.44	40.03	1.37
KCl	74.54	1.0	0.027
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	177.99	8.9	0.1
KH_2PO_4	136.09	1.4	0.02

5.3.2 Massenspektrometrische Untersuchung funktionalisierter Oligonucleotide

ESI-MS Spektren funktionalisierter Oligonucleotide wurden entweder auf einem APEX IV Fourier-Transform Ion-Cyclotron-Resonance (FT-ICR) (*Bruker*, Deutschland) oder auf einem LC-(ESI)MS System (esquire6000 ESI-MS, *Bruker Daltonics*, gekoppelt an ein Agilent 1100 HPLC System, *Agilent Technologies*) im negativ Modus gemessen. Zur Massenberechnung der Oligonucleotide wurden folgende Masseninkremente verwendet:

Name	Masseninkrement Exakte Masse	Masseninkrement Relatives Molekulargewicht
Desoxyadenosin	313,06	313,21
Desoxycytidin	289,05	289,18
Desoxyguanosin	329,05	329,21
Desoxythymidin	304,05	304,20

Bei der exakten Masse basieren die Atommassen jedes Atoms der Struktur auf dem am häufigsten auftretenden Isotop des entsprechenden Elementes. Das relative Molekulargewicht der Struktur berechnet die Masse basierend auf den durchschnittlichen Atommassen, ermittelt unter Berücksichtigung der natürlichen Häufigkeit der Isotope eines jeden Elements.

5.4 Molekularbiologische Experimente

Das Erhitzen, Kühlen und Schütteln von Oligonucleotid Proben geschah in 1.5 µL und 2.0 µL *Eppendorf*-Gefäßen in einem Thermoschüttler („Thermomixer comfort“) der Firma *Eppendorf*.

Zur Aufkonzentrierung und Trocknung von Oligonucleotid Proben wurde eine Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, *Eppendorf*) benutzt.

5.4.1 Oligonucleotide

GRF1: 5'-ATAATTACTATCATGTCTGCG-3'

GRR1: 5'-CGCAGACATGATAGTAATTAT-3'

alpha-f (α f): 5'- TCTCTAAAAAATATATAAAAAATCTCTAAAAAATATA-TAAAAATCTCTAAAAAATAT-3'

alpha-r (α r): 5'- TTTATATATTTTTTTAGAGATTTTTTATATATTTTTTTA-GAGATTTTTTATATATTTTTTT-3'

beta-f (β f): 5'- ATAAAATCTCTAAAAAATATATAAAAAATCTCTAAAAAATATATAAAAAATCTCTAA-3'

beta-r (β r): 5'- ATTTTTTAGAGATTTTTTATATATTTTTTTAGAGATTTT-TATATATTTTTTTAGAGATT-3'

gamma0f (γ f): 5'- AAAATATATAAAAAATCTCTATAAATTACTAT-CATGTCTGCGAAAAATATATAAAAA-3'

gamma0r (γ r): 5'- AGAGATTTTTTATATATTTTTTCGCAGACATGATAG-TAATTATTAGAGATTTTTTATAT-3'

gamma0f (γ fz): 5'- AAAATATATAAAAAATCTCTA-3'

gamma0f (γ ff): 5'-AAAAATATATAAAAA-3'

5.4.2 Chemikalien

Acrylamid 25% (19:1)	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Agarose	<i>GibcoBRL</i>
Borsäure	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Bromphenolblau	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	<i>Fluka</i>
Dinatriumhydrogenphosphat*2H ₂ O	<i>Merck</i> , Darmstadt
Essigsäure	<i>Riedel de Haën</i>
Ethanol (100%)	<i>Riedel de Haën</i>
Formamid	<i>Fluka</i>
Glycogen	<i>Roche</i> , Mannheim
HEPES	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Kaliumchlorid	<i>Merck</i> , Darmstadt
Low melting point agarose	<i>Sigma</i>
Natriumacetat	<i>Merck</i> , Darmstadt
Natriumchlorid	<i>Merck</i> , Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat*H ₂ O	<i>Merck</i> , Darmstadt
SYBR-Green I	<i>Fluka</i>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Xylencyanol	<i>Fluka</i>

Für alle beschriebenen Elektrophoresen wurde TBE Laufpuffer verwendet und die zu analysierenden Proben mit Ladepuffer versetzt:

10x TBE-Laufpuffer: 890 mM Tris-Base (108 g/L)
 890 mM Borsäure (55 g/L)
 20 mM EDTA (9.3 g Na₄EDTA/L, pH

8.3)

6x Gel-Ladepuffer: 50% (v/v) Glycerin
 50 mM Tris
 50 mM EDTA (pH 8.0)
 ca. 0.01% (w/v) Bromphenol Blau
 ca. 0.01% (w/v) Xylenecyanol

Als Längenstandard dient eine 100 bp-Leiter (80 bp – 1000 bp, *PeqLab*, Erlangen)

5.4.3 Enzyme

T4-Polynucleotid Kinase	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt
T4-DNA-Ligase	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt
<i>BAL-31</i>	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt

5.4.4 Nucleotide und Radiochemikalien

dNTPs	<i>Roche</i> , Mannheim
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	<i>NEN</i> , Zaventem, Belgien

5.4.5 5'-OH Phosphorylierung von DNA

Zur 5'-OH Phosphorylierung von DNA mit ^{31}P wird das zu kinasierende Oligonucleotid (2 μL , 100 pmol/ μL) in Wasser (37 μL) und Puffer (5 μL , 10x-T4-Ligasepuffer des Enzymlieferanten) gelöst. Anschließend wird ATP (4 μL , 50 mM, *Roche*, Mannheim) und T4-Polynucleotidkinase (2 μL , 10000U/mL, *New England Biolabs*, Frankfurt) zugegeben und 45 Min. bei 37 °C im Thermo-Schüttler (*Eppendorf*) inkubiert. Die Reaktionslösung wird über eine MicroSpin Sephadex G-25 Säule (3000 rpm, 1Min., illustra MicroSpin G-25 Column, *GE Healthcare*) entsalzt und kann bei -20 °C gelagert oder zum weiteren Einsatz Ethanolpräzipitiert werden. Zur schnellen Kinasierung der DNA Minicircle Segmente können je 200 pmol der beiden komplementären Stränge in einem Reaktionsgefäß wie oben beschrieben phosphoryliert werden (je 2 μL einer 100 pmol/ μL konzentrierten Stammlösung der komplementären Stränge mit 35 μL Wasser, 5 μL Puffer, 4 μL ATP in den oben beschriebenen Konzentrationen).

5.4.6 5'-OH Markierung von DNA mit dem Radioisotop ^{32}P

Zur 5'-Markierung von DNA mit ^{32}P wird das zu markierende Oligonucleotid (2 μL , 100 pmol/ μL) in Wasser (39.5 μL) und Puffer (5 μL , 10x-T4-Polynucleotid-kinase-Puffer des Enzymlieferanten) gelöst. Anschließend wird $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (2.5 μL , 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$, *NEN*, Zaventem, Belgien) und T4-Polynucleotidkinase (1 μL , 10000U/mL, *New England Biolabs*, Frankfurt) zugegeben und 30 Min. bei 37 °C im Thermo-Schüttler (*Eppendorf*) inkubiert. Um zu gewährleisten, dass verbleibende unmarkierte Nucleinsäuren auch 5'-

phosphorliert werden, wird nicht-radioaktives ATP (4 μL , 50 mM) und ein weiteres mal T4-Polynucleotidkinase (1 μL , 10000U/mL) hinzugegeben und weitere 15 Min. inkubiert. Die Reaktionslösung wird über eine MicroSpin Sephadex G-25 Säule (3000 rpm, 1 Min., illustra MicroSpin G-25 Column, *GE Healthcare*) entsalzt und kann bei -20°C gelagert oder zum weiteren Einsatz Ethanolpräzipitiert werden.

1X T4 Polynucleotide Kinase Reaktions Puffer:

70 mM Tris-HCl

10 mM MgCl_2

5 mM Dithiothreitol

pH 7.6 @ 25°C

5.4.7 Ethanol-Fällung von DNA

In der zu fällenden Nucleinsäurelösung wird eine Natriumacetat-Konzentration von 300 mM eingestellt. Anschließend wird das dreifache Volumen Ethanol zugegeben und die Lösung für mindestens 1 Stunde bei -80°C gekühlt. Danach wird der Nucleinsäureniederschlag durch Zentrifugieren bei $20.800 \times g$ für 20 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wird entfernt und das Präzipitat kurz durch Vakuumzentrifugation (RT) getrocknet. Das trockene Pellet wird in einem geeigneten Volumen Wasser oder Puffer gelöst.

5.4.8 Oligonucleotid Ligation

Nach gemeinsamer 5'-OH Kinasierung der komplementären Oligonucleotid-Segmente und anschließender Ethanol-Fällung werden die Pellets (200 pmol je Strang) in je 5 μL Wasser gelöst und die zu ligierenden Segment Lösungen (5 μL , 40 μM) zusammenpipettiert. Es wird 2 μL T4-Ligasepuffer des Enzymlieferanten sowie 1 μL T4-DNA Ligase (400000U/mL, *New England Biolabs*, Frankfurt) zugegeben und mit Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 20 μL aufgefüllt. Die Reaktionslösung wird entweder 3-6 Stunden bei RT oder idealerweise 12 Stunden bei 16°C inkubiert. Das Ligationsprodukt kann bei -20°C gelagert werden.

1X T4 DNA Ligase Puffer:

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 mM MgCl_2

10 mM Dithiothreitol
1 mM ATP
25 g/ml Bovine Serum Albumin

5.4.9 Exonuclease Verdau mit Nuclease *Bal-31*

Zu analytischen Zwecken wurde eine verdünnte Probe des Ligationsproduktes aus 5.4.8 (5 μL , 2 pmol) mit 25 μL *BAL-31* Nuclease Puffer (*New England Biolabs*, Frankfurt) und 0.2 μL *BAL-31* Nuclease (1000 U/mL, *New England Biolabs*) versetzt und mit 19.8 μL Wasser auf 50 μL Reaktionsvolumen aufgefüllt. Die Reaktionslösung wird 1-2 Stunden bei 30 ° C inkubiert und anschließend bei -80 ° C eingefroren.

Zu präparativen Zwecken wurde die Reaktionslösung des Ligationsproduktes aus 5.4.8 (20 μL , 200 pmol) mit 25 μL *BAL-31* Nuclease Puffer (*New England Biolabs*, Frankfurt) und 2 μL *BAL-31* Nuclease (1000 U/mL, *New England Biolabs*) versetzt und mit 3 μL Wasser auf 50 μL Reaktionsvolumen aufgefüllt. Die Reaktionslösung wird 1-2 Stunden bei 30 ° C inkubiert und anschließend bei -80 ° C eingefroren.

1X Nuclease *BAL-31* Reaktions Puffer:

20 mM Tris-HCl
600 mM NaCl
12 mM CaCl_2
12 mM MgCl_2
1 mM EDTA
pH 8.0

5.4.10 Ein-Topf-Reaktion zur schnellen Herstellung komplett geschlossener DNA-Miniplasmide

Nachstehend werden die Puffer-Lösungen und Enzyme wie in 5.4.5 und 5.4.8 beschrieben für ein verkürztes Protokoll verwendet. Die vier Oligonucleotide der zwei Segmente α und β werden separat von den zwei übrigen Oligonucleotiden des Segments γ phosphoryliert. Je 2 μL einer 100 μM Stammlösung der vier Oligonucleotide für Segmente α und β werden in 31 μL Wasser mit 5 μL Ligase-Puffer, 4 μL ATP-Lösung und 2 μL T4-PNK versetzt und bei 37 ° C während 45 Min. inkubiert (Gesamtvolumen 50 μL). Je 2 μL einer 100 μM Stammlösung der

zwei Oligonucleotide für Segment γ werden in 35 μL Wasser mit 5 μL Ligase-Puffer, 4 μL ATP-Lösung und 2 μL T4-PNK versetzt und bei 37 ° C während 45 Min. inkubiert (Gesamtvolumen 50 μL). Nach der Phosphorylierung werden ohne weitere Aufreinigung 6 μL Ligase-Puffer und 2 μL T4 DNA-Ligase zur Reaktionslösung der Segmente α und β hinzugegeben und für mindestens 6 h bei 16 ° C inkubiert. Im Anschluß werden die 50 μL Reaktionslösung der Phosphorylierung des γ Segments zur Ligations-Lösung hinzugegeben, sowie weitere 6 μL Ligase-Puffer und 2 μL T4 DNA-Ligase. Es wird für mindestens weitere 6 h bei 16 ° C inkubiert. Nach der Ligation werden die Enzyme durch wahlweise einfrieren bei -80 ° C für 2h oder erwärmen auf 65 ° C für 10 Min. inaktiviert. Es kann im Anschluss noch ein Nuclease-Verdau durch Versetzen der Lösung mit 100 μL 2x*Bal-31*-Puffer, 4 μL *Bal-31* und inkubieren bei 30 ° C während 1-2h stattfinden. Reinigung und Isolation der DNA-Miniplasmide erfolgte wie unter 5.4.11.1 und 5.4.11.3 beschrieben.

5.4.11 Elektrophoretische Methoden

5.4.11.1 Native zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (native 2D PAGE)

Zur Separation der Ligations- oder Nuclease-Verdau-Produkte nach Basen-Paar-Länge in der ersten Dimension wurde eine Lösung (5%iges nicht-denaturierendes Gel, 60 mL Gesamtvolumen) aus Polyacrylamid (7.5 mL, 40%, Monoacrylamid/Bisacrylamid 19:1, UltraPure AcuuGel, SeqGrade), TBE-Puffer (6 mL, 10xPuffer), Wasser (34.6 mL) und Glycerol (11.9 mL) hergestellt. Die Polymerisation wird durch Zugabe von TEMED (20 μL) und APS (400 μL) gestartet und das Gemisch zügig zwischen die gründlich gereinigten und mit Abstandshaltern zu einer Gelgussform präparierten Glasplatten (20 cm x 20 cm) gegossen. Ein Kamm zur Ausbildung der Gelprobentaschen wird eingesetzt und das Gel zur vollständigen Polymerisation für mindesten 45 Min. waagrecht gelagert. Vor dem Auftragen werden die Reaktionslösungen der Ligation oder des anschließenden Nuclease-Verdaus mit 1/6 Volumen Gel-Ladepuffer (6x Puffer) versetzt und dann in die Taschen des polymerisierten Gels pipettiert. Die Proben werden in einer Gelelektrophoresekammer gefüllt mit 1xTBE-Laufpuffer unter kontinuierlicher Kühlung (4 ° -7 ° C, Kühlraum) bei 120-150 V (ca. 17-25 mA) für 12-16 Stunden im elektrischen Feld aufgetrennt. Nach beendeter Elektrophorese wird die Gelkammer geöffnet und das Gel vorsichtig von den Glasplatten entfernt und in Frischhaltefolie gepackt. Zur Stabilisierung der Gel-Fläche kann ein Stück Pappe in den Dimensionen der Gel-Fläche unter das

Gel gelegt werden. Die Analyse erfolgt bei radioaktiv markierten Proben durch Phosphor-Imaging auf wieder verwendbaren, mit Lanthaniden dotierten, kristall-beschichteten Platten (Scanner: *Fujifilm*, FLA 3000, *Raytest*, Straubenherdt; Auswertungssoftware AIDA 3.11.002). Alternativ wurden die Oligonucleotide durch Färben des Gels mit Sybr Green I visualisiert.

Die das Produkt enthaltende Bande des Gels wird entlang der gesamten Länge des Gels senkrecht zur Laufrichtung der ersten Dimension ausgeschnitten und auf den Rand einer neuen Glasplatte gelegt. Mit Abstandshaltern und einer weiteren Glasplatte wird eine neue Gussform für die zweite Dimension um den Gelausschnitt erstellt und eine zuvor präparierte Polyacrylamid-Lösung (8% ige nicht-denaturierendes, Chloroquin-enthaltendes (50 µg/ml) Gel, 60 mL Gesamtvolumen) hineingegossen. Ohne Kamm wird das Gel zur vollständigen Polymerisation für mindesten 45 Min. waagrecht gelagert. Die Zusammensetzung der 8%igen Polyacrylamid-Lösung (60 mL) für die zweite Dimension ist Polyacrylamid (12 mL, 40%, Monoacrylamid/Bisacrylamid 19:1, UltraPure AcuuGel, SeqGrade), TBE-Puffer (6 mL, 10xPuffer), Wasser (30 mL), Glycerol (12 mL) und Chloroquin-Phosphat (3 mg). Die Polymerisation wird kurz vor dem Gießen durch Zugabe von TEMED (20 µL) und APS (400 µL) gestartet. Die Elektrophorese wird unter kontinuierlicher Kühlung (4 ° -7 °, Kühlraum) in 1xTBE-Laufpuffer (mit Chloroquin-Phosphat 50 mg/L) bei 120-150 V (ca. 17-25 mA) für 12-16 Stunden durchgeführt. Nach beendeter Elektrophorese wird die Gelkammer geöffnet und das Gel vorsichtig von den Glasplatten entfernt und in Frischhaltefolie gepackt. Zur Stabilisierung der Gel-Fläche kann ein Stück Pappe in den Dimensionen der Gel-Fläche unter das Gel gelegt werden. Die Analyse erfolgt bei radioaktiv markierten Proben durch Phosphor-Imaging auf wieder verwendbaren, mit Lanthaniden dotierten, kristall-beschichteten Platten (Scanner: *Fujifilm*, FLA 3000, *Raytest*, Straubenherdt). Alternativ wurden die Oligonucleotide durch Färben des Gels mit Sybr Green I visualisiert.

5.4.11.2 Agarose Gelelektrophorese

Zur schnellen Analyse der DNA Ligation dient die Agarosegelelektrophorese. In Abhängigkeit der Fragmentlängen werden Gele mit 1.5-2.5% (w/v) Agarose hergestellt. Hierzu wird Agarose (Life Technologies, Paisly, Schottland) eingewogen und in 0.5 x TBE-Puffer (100 mL) suspendiert und vorsichtig im Mikrowellenherd erhitzt. Zum Entfernen von Luftblasen wird die Lösung einige Stunden bei 65 ° C aufbewahrt. Zur Visualisierung wird vor dem Gießen des Gels Ethidiumbromid-Lösung (10 µL auf 100 mL Agarose, 10 mg/mL, *Roth, Karlsruhe*) zugegeben und sorgfältig gemischt. Die Nucleinsäureproben werden mit einem Volumen Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und die Moleküle

in einer Gelkammer gefüllt mit 0.5 x TBE-Puffer bei einer Spannung von 6 – 8 V/cm aufgetrennt. Als Längenstandard dient eine 100 bp-Leiter (80 bp – 1000 bp)

Da der Farbstoff Ethidiumbromid in die doppelsträngigen Nucleinsäuremoleküle interkaliert, können diese als fluoreszierende Banden mit einem UV-Transilluminator (*Bio-Rad, München*) bei einer Wellenlänge von 360 nm sichtbar gemacht und anschließend fotografiert werden.

5.4.11.3 DNA Isolierung aus Polyacrylamid Gelen

Die Produkt-Banden werden nach der Elektrophorese ausgeschnitten und die Gelstücke durch herkömmliche 2 mL Kunststoff-Einwegspritzen in 2 mL Eppendorf-Schnappdeckelgefäße gedrückt und auf diese Weise zerkleinert. Die Spritze wird zwei mal mit 400 µL Wasser gespült, um das gesamte Gel-Material vollständig mit dem Wasser in die Eppendorfgefäße zu überführen. Die Gel-Suspension wird für mindestens 3 Stunden bei -80 ° C gefroren um die Gelmatrix aufzubrechen und anschließend über Nacht im Wasser bei RT unter gelindem Schütteln eingeweicht um die Nucleinsäuren aus dem Gel zu lösen. Die wässrige Gelaufschlammung wird durch Spin-Filter-Tubes (Ulrafree-MC Centrifugal Filter Devices, *Millipore*) filtriert und der Filtrerrückstand noch zweimal mit 50 µL Wasser gespült. Die vereinigten Filtrate werden in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von ca. 50 µL aufkonzentriert und mit Wasser auf 100 µL Gesamtvolumen gebracht. Es folgt eine Ethanol-Fällung. Die Pellets können anschließend in einem geeigneten Volumen Wasser oder Puffer aufgenommen werden oder zur Entfernung von Salzen und Färbereagenzien oder Interkalator nach Auflösung in 50 µL Wasser durch eine G25 Säule (illustra MicroSpin G-25 Column, *GE Healthcare*) filtriert werden.

5.5 Rasterkraftmikroskopie der DNA Miniplasimde^[146-148, 150, 174-184]

Rasterkraftmikroskop der Firma *Molecular Imaging Inc.* (jetzt eine Tochter von *Agilent*), Modell *PicoScan* bzw *PicoSPM I* (jetzt *Agilent Series 4500 SPM*). Es wurden Cantilever der Firma *Molecular Imaging* verwendet (MAC Levers, Type II) und von der Firma *Lot-Oriel GmbH* (Darmstadt) bezogen:

MAC Levers Type II, sind Silizium-Cantilever aus einem Einkristall mit einer dünnen magnetischen Beschichtung auf der Rückseite. Die nominale Kraftkonstante beträgt ca. 2.8 N/m. Die Sondenspitze ist pyramidenförmig mit einer polygonen Basis. Der makroskopische Öffnungswinkel der pyramidalen Spitze liegt zwischen 40 ° und 60 ° und verjüngt sich auf weniger als 20 ° am äußersten

Spitzenende. Der Spitzenradius ist üblicherweise geringer als 7 nm bei einer Höhe von 10-15 μm .

5.5.1 Rasterkraftmikroskopie im magnetischen AC-Modus an trockenen Proben

5.5.1.1 Probenvorbereitung

Für die Vermessung an Luft werden Mica-Plättchen (Glimmer-Plättchen, $1 \times 1 \text{ cm}^2$, ca 0.3 cm dick) mit handelsüblichem Transparent-Klebestreifen abgezogen um die oberen Atomschichten des Schichtsilikats zu entfernen und eine frische, saubere hydrophile Oberfläche zu erzeugen. Anschließend wird eine Lösung der zu vermessenden DNA-Probe^{*1} (20 μL) entweder mit einer Pipette auf die Mitte des Plättchens getreufelt (*Drop-Coating*) oder ein Tropfen mit der Pipette auf das, mit einer Pinzette schräg gehaltene, Mica-Plättchen entlanggleiten gelassen, um nur einen dünnen Flüssigkeitsfilm zu hinterlassen (*Dip-Coating*). Alternativ zur letzten Beschreibung kann, bei ausreichender Materialmenge, auch das Mica-Plättchen langsam in eine Probenlösung eingetunkt werden und schräg wieder herausgezogen werden, um den Flüssigkeitsfilm zu erzeugen.

Die aus den nativen 2D-PAGE Experimenten isolierten DNA-Miniplasmide haben üblicherweise eine Konzentration zwischen 90 nM und 340 nM (Messung der OD_{260} der 100 μL Stammlösungen ergab 0.2-0.75 OD, Berechnung der Konzentration siehe Kapitel 5.3). Die Konzentration und absolute Menge der aufgetragenen DNA werden ebenso variiert wie die Konzentration von Puffer und divalenten Salzen. Übliche Mengen und Konzentrationen, die sich schließlich vor allen Dingen in den Messungen in der Flüssigkeitszelle (siehe nächster Abschnitt 5.5.2.1) bewährten, sind:

*1

0.1 pmol – 2.5 pmol DNA-Miniplasmid (entsprechendes Volumen einer Stammlösung oder Verdünnung),
2 μL NiCl_2 -Lösung (100 mM) oder 2 μL MgAc_2 -Lösung (100 mM),
2 μL TrisHCl-Puffer (100 mM, pH=7.5),
mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μL bringen.

Nach der Benetzung der Mica-Trägeroberfläche wird der Tropfen bzw. der Flüssigkeitsfilm 5-15 Min. inkubiert und die Oberfläche anschließend mit wenig Reinstwasser vorsichtig gespült. Die Mica-Oberfläche kann dann entweder luftgetrocknet werden (30 Min. bis 1 h) oder durch einen sanften Inertgas-Strom (Ar oder N_2) getrocknet werden. Die Probe kann schließlich auf dem AFM-Probenteller fixiert und vermessen werden.

Die Variation der Puffer-Konzentration und der divalenten Salze (zwischen 10 und 100 mM) zeigte keinen signifikanten Effekt bei den Messungen. Bei Messungen in der Trockene wird meist Magnesiumacetat (MgAc_2) als divalentes Salz der Vorzug vor Nickelchlorid gegeben.^[174-176, 188] In den vorliegenden Experimenten werden bei der Verwendung von MgAc_2 häufiger Strukturen abgebildet, die Puffer-Verkrustungen gleichen. Dieser Effekt wird bei NiCl_2 weniger häufig beobachtet. In der Summe war die eindeutige Abbildung von DNA-Miniplasmiden mit der erwarteten ringförmigen bzw. torischen Struktur durch Messungen in der Trockene an Luft nicht erfolgreich.

5.5.2 Rasterkraftmikroskopie im magnetischen AC-Modus in wässriger Lösung

5.5.2.1 Probenvorbereitung

Für die *in-situ* Vermessung der DNA-Miniplasmide in einer Flüssigkeitszelle mit Mica-Plättchen als Trägermaterial werden die Mica-Plättchen (Glimmer-Kondensator-Plättchen, $2 \times 2.5 \text{ cm}^2$, ca 0.2 cm dick) mit handelsüblichem Transparent-Klebestreifen abgezogen, um die oberen Atomschichten des Schichtsilikats zu entfernen und eine frische, saubere hydrophile Oberfläche zu erzeugen. Das Mica-Plättchen wird unter einer Gummidichtung mit einer Aussparung im Durchmesser der Flüssigkeitszelle auf dem AFM-Probenteller fixiert. Die Teflon-Flüssigkeitszelle wird auf die Gummidichtung gelegt und arretiert, so dass mit dem Mica-Plättchen als Boden der Flüssigkeitszelle ein dichtes, nach oben offenes, zylindrisches Volumen entsteht, in das die zu vermessende DNA-Probenlösung^{*2} eingefüllt wird (100 μL). Die DNA-Probenlösung wird für 10-20 Min. inkubiert bevor weitere 300 μL Puffer-Lösung (TrisHCl, 10mM, pH=7.5) in die Flüssigkeitszelle eingefüllt werden. Um die optimalen Bedingungen für gute Abbildungen herauszufinden werden die Menge an DNA-Miniplasmiden und die Konzentrationen der Puffer-Lösungen variiert. Die besten Ergebnisse werden mit den nachstehenden Mengen und Konzentrationen erzielt:

*2

0.1 pmol – 1.0 pmol DNA-Miniplasmid (entsprechendes Volumen einer Stammlösung oder Verdünnung),
10 μL NiCl_2 -Lösung (100 mM),
10 μL TrisHCl-Puffer (100 mM, pH=7.5),
mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 100 μL bringen.

Exemplarisches Pippetierschema der Probenvorbereitung für die in den Abbildung 98 und Abbildung 99 sowie Abbildung 101 dokumentierten Experimenten:

5 μL DNA-Miniplasmid mit Einzelstrangregion ($\text{OD}_{260}=0.2$, ~ 90 nM),
10 μL NiCl_2 -Lösung (100 mM)
10 μL TrisHCl-Puffer (100 mM, pH=7.5)
75 μL Reinstwasser

Es folgt Inkubation der Probenlösung während 10-20 Min. und anschließende Zugabe von 300 μL Puffer-Lösung (TrisHCl, 10mM, pH=7.5) in die Flüssikeitszelle.

Exemplarisches Pippetierschema der Probenvorbereitung für die in den Abbildung 102 und Abbildung 103 sowie Abbildung 104 dokumentierten Experimenten mit DNA-Miniplasmiden und modifizierten Oligonucleotiden:

5 μL DNA-Miniplasmid mit Einzelstrangregion ($\text{OD}_{260}=0.2$, ~ 90 nM),
10 μL NiCl_2 -Lösung (100 mM)
10 μL TrisHCl-Puffer (100 mM, pH=7.5)
75 μL Reinstwasser

Die Proben-Lösung wird in zwei gleich große 50 μL Fraktionen geteilt. Zur einen werden 5 μL der modifizierten Oligonucleotid-Lösung (300 nM) hinzugegeben, zur anderen 5 μL Reinstwasser. Beide Proben werden separat voneinander gemessen. Vor der Messung nach der Inkubation der DNA-Probenlösung während 10-20 Min. werden weitere 350 μL Puffer-Lösung (TrisHCl, 10mM, pH=7.5) statt der üblichen 300 μL in die Flüssikeitszelle eingefüllt um das verkleinerte Probenvolumen auszugleichen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] J. G. Voet, D. Voet, *Biochemistry*, 2 ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, **1995**.
- [2] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2797.
- [3] P. E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624.
- [4] S. Jager, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15071.
- [5] O. Thum, S. Jager, M. Famulok, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 3990.
- [6] S. Jager, M. Famulok, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 3337.
- [7] N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 225.
- [8] N. C. Seeman, *Chem. Biol. (Cambridge, MA, U. S.)* **2003**, *10*, 1151.
- [9] P. W. Rothmund, A. Ekani-Nkodo, N. Papadakis, A. Kumar, D. K. Fygenson, E. Winfree, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16344.
- [10] P. W. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297.
- [11] R. Tashiro, H. Sugiyama, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 6018.
- [12] N. C. Seeman, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 119.
- [13] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737.
- [14] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964.
- [15] R. B. MacGregor, G. M. K. Poon, *Comput. Biol. Chem.* **2003**, *27*, 461.
- [16] K. Hoogsteen, *Acta Crystallographica* **1963**, *16*, 907.
- [17] K. Hoogsteen, *Acta Crystallographica* **1963**, *16*, 28.
- [18] K. Hoogsteen, *Acta Crystallographica* **1966**, *S 21*, A116.
- [19] S. N. Laboratories, *SANDIA REPORT* **2005**.
- [20] N. C. Seeman, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7259.
- [21] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427.
- [22] R. P. Goodman, I. A. Schaap, C. F. Tardin, C. M. Erben, R. M. Berry, C. F. Schmidt, A. J. Turberfield, *Science* **2005**, *310*, 1661.
- [23] G. Kiedrowski, L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Reimold, M. Rein, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 609.
- [24] V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3349.
- [25] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, *397*, 144.
- [26] N. C. Seeman, N. R. Kallenbach, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, *23*, 53.
- [27] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, Jr., F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, *406*, 605.
- [28] H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **2002**, *415*, 62.
- [29] C. Mao, T. H. LaBean, J. H. Relf, N. C. Seeman, *Nature* **2000**, *407*, 493.
- [30] A. Carbone, N. C. Seeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12577.
- [31] L. M. Adleman, *Science* **1994**, *266*, 1021.
- [32] J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 277.
- [33] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2002**, *297*, 72.
- [34] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Science* **2003**, *301*, 1882.
- [35] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775.
- [36] G. Wang, J. Zhang, R. W. Murray, *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **2002**, *74*, 4320.
- [37] F. Patolsky, Y. Weizmann, O. Lioubashevski, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2323.
- [38] H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3204.

- [39] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science* **2003**, 299, 1212.
- [40] K. Tanaka, Y. Yamada, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, Y. Takezawa, M. Yori, M. Shiro, M. Shionoya, *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2003**, 121.
- [41] R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heavner, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 3278.
- [42] R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 3655.
- [43] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 719.
- [44] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859.
- [45] T. Shimidzu, R. L. Letsinger, *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 708.
- [46] H. Liu, J. Gao, L. Maynard, Y. D. Saito, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1102.
- [47] E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 936.
- [48] J. Goodchild, *Bioconjugate Chem.* **1990**, 1, 165.
- [49] S. M. Gryaznov, N. S. Banait, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2002**, 12, 543.
- [50] M. Egli, S. M. Gryaznov, *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, 57, 1440.
- [51] Eurogentech, in *Catalog*, **2006**, p. 76.
- [52] J. Summerton, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1489, 141.
- [53] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nature Structural Biology* **1996**, 3, 410.
- [54] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, 54, 3607.
- [55] S. K. Singh, P. Nielsen, A. A. Koshkin, J. Wengel, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **1998**, 455.
- [56] A. A. Koshkin, J. Fensholdt, H. M. Pfundheller, C. Lomholt, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8504.
- [57] R. Steffens, C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11548.
- [58] K. Schoning, P. Scholz, S. Guntha, X. Wu, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Science* **2000**, 290, 1347.
- [59] A. Eschenmoser, *Science* **1999**, 284, 2118.
- [60] J. C. Chaput, J. K. Ichida, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 856.
- [61] R. Micura, R. Kudick, S. Pitsch, A. Eschenmoser, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, 38, 680.
- [62] J. Summerton, D. Weller, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **1997**, 7, 187.
- [63] L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Rein, M. Schweitzer, N. Windhab, G. von Kiedrowski, *Nature* **2002**, 420, 286.
- [64] S. I. Antsyrovich, G. von Kiedrowski, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2005**, 24, 211.
- [65] D. Liu, S. H. Park, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 717.
- [66] T. H. LaBean, H. Yan, J. Kopatsch, F. R. Liu, E. Winfree, J. H. Reif, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1848.
- [67] S. A. Benner, T. R. Battersby, B. Eschgfäller, D. Hutter, J. T. Kodra, S. Lutz, T. Arslan, D. K. Baschlin, M. Blattler, M. Egli, C. Hammer, H. A. Held, J. Horlacher, Z. Huang, B. Hyrup, T. F. Jenny, S. C. Jurczyk, M. König, U. von Krosigk, M. J. Lutz, L. J. MacPherson, S. E. Moroney, E. Müller, K. P. Nambiar, J. A. Piccirilli, C. Y. Switzer, J. J. Vogel, C. Richert, A. L. Roughton, J. Schmidt, K. C. Schneider, J. Stackhouse, *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70, 263.
- [68] A. Holmen, B. Norden, B. Albinsson, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3114.
- [69] A. Holmen, B. Albinsson, B. Norden, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 13460.
- [70] M. W. Grinstaff, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3845.
- [71] B. Singer, A. Antocchia, A. Basu, M. Dosanjh, H. Fraenkel-Conrat, P. Gallagher, J. Kusmierik, Z. Qiu, B. Rydberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89, 9386.

- [72] R. X. F. Ren, N. C. Chaudhuri, P. L. Paris, S. Rumney, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671.
- [73] N. C. Chaudhuri, R. X. F. Ren, E. T. Kool, *Synlett* **1997**, 341.
- [74] K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X. F. Ren, C. J. Sheils, P. L. Paris, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8182.
- [75] C. Strassler, N. E. Davis, E. T. Kool, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 2160.
- [76] J. Gao, S. Watanabe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12748.
- [77] E. T. Kool, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **1997**, *97*, 1473.
- [78] S. Matsuda, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14419.
- [79] H. B. Liu, J. M. Gao, S. R. Lynch, Y. D. Saito, L. Maynard, E. T. Kool, *Science* **2003**, *302*, 868.
- [80] H. Liu, J. Gao, E. T. Kool, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 639.
- [81] A. H. F. Lee, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3332.
- [82] J. Filee, P. Forterre, T. Sen-Lin, J. Laurent, *J. Mol. Evol.* **2002**, *54*, 763.
- [83] M. M. Alba, *Genome Biol.* **2001**, *2*, 1.
- [84] D. K. Braithwait, J. Ito, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 787.
- [85] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 5463.
- [86] V. M. Rotello, E. A. Viani, G. Deslongchamps, B. A. Murray, J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 797.
- [87] E. T. Kool, *DNA and Aspects of Molecular Biology, Vol. 7*, **1999**.
- [88] H. M. Berman, P. R. Young, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1981**, *10*, 87.
- [89] L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **1964**, *10*, 367.
- [90] L. S. Lerman, *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1964**, *64*, 1.
- [91] L. S. Lerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1963**, *49*, 94.
- [92] L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18.
- [93] B. M. J. Revet, M. Schmir, J. Vinograd, *Nat. New Biol.* **1971**, *229*, 10.
- [94] R. L. Jones, A. C. Lanier, R. A. Keel, W. D. Wilson, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 1613.
- [95] T. A. Millican, G. A. Mock, M. A. Chauncey, T. P. Patel, M. A. W. Eaton, J. Gunning, S. D. Cutbush, S. Neidle, J. Mann, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 7435.
- [96] S. Smirnov, T. J. Matray, E. T. Kool, C. de los Santos, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5561.
- [97] T. J. Matray, E. T. Kool, *Nature* **1999**, *399*, 704.
- [98] K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa, N. Teramae, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8982.
- [99] O. D. Scharer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946.
- [100] GlenResearch, (Ed.: www.glenres.com), **2005**.
- [101] N. J. Greco, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10784.
- [102] A. Peracchi, L. Beigelman, N. Usman, D. Herschlag, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 11522.
- [103] S. Verma, S. Jager, O. Thum, M. Famulok, *Chem. Rec.* **2003**, *3*, 51.
- [104] U. Asseline, N. T. Thuong, C. Helene, *New J. Chem.* **1997**, *21*, 5.
- [105] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *50*, 4467.
- [106] H. A. Dieck, R. F. Heck, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1133.
- [107] D. E. Bergstrom, J. L. Ruth, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1587.
- [108] J. L. He, F. Seela, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5485.
- [109] M. J. Robins, P. J. Barr, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 421.
- [110] F. W. Hobbs, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3420.
- [111] M. Ahmadian, P. Zhang, D. E. Bergstrom, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3127.
- [112] E. J. Trybulski, J. Zhang, R. H. Kramss, R. M. Mangano, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3533.
- [113] H. Seliger, M. Holupirek, H. H. Gortz, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 2115.

- [114] H. Schaller, G. Weimann, H. G. Khorana, B. Lerch, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3821.
- [115] K. Toshima, M. Hasegawa, J. Shimizu, S. Matsumura, *ARKIVOC (Gainesville, FL, U. S.)* **2004**, 28.
- [116] C. V. Kumar, E. H. A. Punzalan, W. B. Tan, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7027.
- [117] C. V. Kumar, E. H. Asuncion, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8547.
- [118] W. D. Wilson, Y. H. Wang, S. Kusuma, S. Chandrasekaran, N. C. Yang, D. W. Boykin, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1985**, 189, 67.
- [119] N. K. Modukuru, K. J. Snow, B. S. Perrin, J. Thota, C. V. Kumar, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 11810.
- [120] R. Ostaszewski, E. Wilczynska, M. Wolszczak, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2995.
- [121] G. Adlam, I. S. Blagbrough, S. Taylor, H. C. Latham, I. S. Haworth, A. Rodger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2435.
- [122] A. Rodger, S. Taylor, G. Adlam, I. S. Blagbrough, I. S. Haworth, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *3*, 861.
- [123] F. Stuhlmann, A. Jaschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3238.
- [124] R. Breslow, Z. N. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9923.
- [125] B. Seelig, A. Jaschke, *Chem. Biol. (Cambridge, MA, U. S.)* **1999**, *6*, 167.
- [126] X. G. Lei, J. A. Porco, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 795.
- [127] P. V. Alston, R. M. Ottenbrite, J. Newby, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4939.
- [128] K. L. Handoo, Y. Lu, V. D. Parker, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9381.
- [129] H. Bouas-Laurent, A. Castellan, J. P. Desvergne, R. Lapouyade, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 43.
- [130] J. de Bony, J. F. Tocanne, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *143*, 373.
- [131] H. Bouas-Laurent, A. Castellan, J. P. Desvergne, R. Lapouyade, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 248.
- [132] W. Bannwarth, R. Knorr, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1157.
- [133] L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 245.
- [134] N. D. Sinha, J. Biernat, J. Mcmanus, H. Koster, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 4539.
- [135] N. Usman, K. K. Ogilvie, M. Y. Jiang, R. J. Cedergren, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7845.
- [136] S. Beaucage, M. Caruthers, *Current Protocolls in Nucleic Acid Chemistry* **2000**, *1*.
- [137] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223.
- [138] E. Birch-Hirschfeld, K. H. Gührs, Z. Földes-Papp, H. Seliger, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 137.
- [139] E. N. Trifonov, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 3816.
- [140] E. N. Trifonov, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 4041.
- [141] D. M. Crothers, T. E. Haran, J. G. Nadeau, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7093.
- [142] L. Ulanovsky, M. Bodner, E. N. Trifonov, M. Choder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 862.
- [143] J. C. Marini, S. D. Levene, D. M. Crothers, P. T. Englund, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 7664.
- [144] D. MacDonald, K. Herbert, X. Zhang, T. Pologruto, P. Lu, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 1081.
- [145] H. Zhou, Y. Zhang, Z. Ou-Yang, S. M. Lindsay, X. Z. Feng, P. Balagurumoorthy, R. E. Harrington, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 227.
- [146] W. Han, S. M. Lindsay, M. Dlakic, R. E. Harrington, *Nature* **1997**, *386*, 563.
- [147] W. Han, S. M. Lindsay, T. W. Jing, *Appl. Phys. Lett.* **1996**, *26*, 4111.
- [148] W. Han, M. Dlakic, Y. J. Zhu, S. M. Lindsay, R. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10565.

- [149] P. Balagurumoorthy, H. Sakamoto, M. S. Lewis, N. Zambrano, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, E. Appella, R. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92, 8591.
- [150] P. Balagurumoorthy, S. M. Lindsay, R. E. Harrington, *Biophys. Chem.* **2002**, 101-102, 611.
- [151] M. Dlakic, R. E. Harrington, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 29945.
- [152] M. Dlakic, R. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 3847.
- [153] Y. Lyubchenko, L. Shlyakhtenko, B. Chernov, R. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 5331.
- [154] H. B. Gray, Jr., D. A. Ostrander, J. L. Hodnett, R. J. Legerski, D. L. Robberson, *Nucleic Acids Res.* **1975**, 2, 1459.
- [155] R. J. Legerski, J. L. Hodnett, H. B. Gray, Jr., *Nucleic Acids Res.* **1978**, 5, 1445.
- [156] T. L. Schmidt, C. K. Nandi, G. Rasched, P. P. Parui, B. Brutschy, M. Famulok, A. Heckel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 4382.
- [157] B. Schaub, D. B. Creamer, *Phys. Lett. A* **1987**, 121, 435.
- [158] Veeco, M. Wright, I. Revenko, *TappingMode Atomic Force Microscopy: Technology Overview and Update* **2004**.
- [159] G. Binnig, H. Rohrer, *Ultramicroscopy* **1983**, 11, 157.
- [160] G. Binnig, H. Rohrer, *Helvetica Physica Acta* **1983**, 56, 481.
- [161] A. Baratoff, G. Binnig, H. Rohrer, *Journal of Vacuum Science & Technology B* **1983**, 1, 703.
- [162] G. Binnig, H. Rohrer, *Zeitschrift Fur Kristallographie* **1983**, 162, 23.
- [163] G. Binnig, H. Rohrer, *Helvetica Physica Acta* **1982**, 55, 726.
- [164] G. Binnig, H. Rohrer, *Surface Science* **1983**, 126, 236.
- [165] G. Binnig, H. Rohrer, *Helvetica Physica Acta* **1982**, 55, 128.
- [166] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, *Appl. Phys. Lett.* **1982**, 40, 178.
- [167] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, *Physica B & C* **1982**, 110, 2075.
- [168] Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller, V. B. Elings, *Surface Science* **1993**, 290, L688.
- [169] Veeco, F. Landousy, E. Le Cam, *Manual on AFM* **2006**.
- [170] T. P. Beebe, T. E. Wilson, D. F. Ogletree, J. E. Katz, R. Balhorn, M. B. Salmeron, W. J. Siekhaus, *Science* **1989**, 243, 370.
- [171] C. Rivetti, M. Guthold, C. Bustamante, *J. Mol. Biol.* **1996**, 264, 919.
- [172] P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, V. Elings, *Appl. Phys. Lett.* **1994**, 64, 1738.
- [173] C. A. J. Putman, K. O. Vanderwerf, B. G. Degrooth, N. F. Vanhulst, J. Greve, *Appl. Phys. Lett.* **1994**, 64, 2454.
- [174] D. P. Allison, P. S. Kerper, M. J. Doktycz, T. Thundat, P. Modrich, F. W. Larimer, D. K. Johnson, P. R. Hoyt, M. L. Mucenski, R. J. Warmack, *Genomics* **1997**, 41, 379.
- [175] P. R. Hoyt, M. J. Doktycz, P. Modrich, R. J. Warmack, D. P. Allison, *Ultramicroscopy* **2000**, 82, 237.
- [176] P. R. Hoyt, M. J. Doktycz, R. J. Warmack, D. P. Allison, *Ultramicroscopy* **2001**, 86, 139.
- [177] H. G. Hansma, I. Revenko, K. Kim, D. E. Laney, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 713.
- [178] H. G. Hansma, D. E. Laney, *Biophys. J.* **1996**, 70, 1933.
- [179] J. Mou, D. M. Czajkowsky, Y. Zhang, Z. Shao, *FEBS Lett* **1995**, 371, 279.
- [180] D. D. Dunlap, A. Maggi, M. R. Soria, L. Monaco, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 3095.
- [181] Y. L. Lyubchenko, L. S. Shlyakhtenko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 496.
- [182] Y. L. Lyubchenko, L. S. Shlyakhtenko, T. Aki, S. Adhya, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 873.

-
- [183] S. Kasas, N. H. Thomson, B. L. Smith, H. G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E. T. Kool, M. Kashlev, P. K. Hansma, *Biochemistry* **1997**, 36, 461.
- [184] S. M. Lindsay, *Molecular Imaging Application Notes* **1997**.
- [185] C. M. Jakobsen, S. R. Denmeade, J. T. Isaacs, A. Gady, C. E. Olsen, S. B. Christensen, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 4696.
- [186] D. M. Freifelder, *Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, Freeman, W. H., **1982**.
- [187] AppliedBiosystems, *Applied Biosystems Manual on the Quantitative Analysis of the PCR Reaction* **2007**.
- [188] D. P. Allison, L. A. Bottomley, T. Thundat, G. M. Brown, R. P. Woychik, J. J. Schrick, K. B. Jacobson, R. J. Warmack, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89, 10129.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

A	Adenin
abs.	absolut
AC-Mode	<i>Actuated-Mode</i> , Anregungs-Modus
ACN	Acetonitril
AC ₂ O	Essigsäureanhydrid
AIDA	<i>Advanced Image Data Analyzer</i>
AMAC	(9-Anthrylmethyl)-ammoniumchlorid
AMND	2-Amino-7-methyl-naphthyridine
aq.	wässrig
AFM	Atomic Force Microscopy
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>BAL31</i>	Nuclease isoliert aus <i>Alteromonas espejiana</i>
Boc:	tert-Butoxycarbonyl
bp:	Basenpaare
C	Cytosin
Cbz:	Benzyloxycarbonyl
CPG	Controlled Pore Glass
Cy	Cyclohexan
d	Dublett
Da	Dalton
dA	2'-Desoxyadenosin
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dC	2'-Desoxycytosin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dG	2'-Desoxyguanosin
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin (Hünigs Base)
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl
DMT-Cl	4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure

dNTP	2'-Desoxynucleosidtriphosphat
dP	2'-Desoxypyrenosin
dPTP	2'-Desoxypyrenosintriphosphat
dR	natürliche Abasic Site
dsDNA	doppelsträngige DNA
dT	2'-Desoxythymidin
dU	2'-Desoxyuridin
dUTP	2'-Desoxyuridintriphosphat
DX-DNA	<i>Double Crossover</i> DNA
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Ethylacetat
EI	Electron Impact
eq.	Äquivalente
ESI	Elektrosprayionisation
EtBr	Ethidiumbromid
FAB	Fast Atom Bombardement
FCS	Fluoreszenz Korrelationsspektroskopie
fDNA	funktionalisierte DNA
fdNTP	funktionalisiertes 2'-Desoxynucleotid
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HNA	Hexopyranose Nucleinsäure (<i>homo</i> -DNA)
HOBt	1-Hydroxbenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HV	Hochvakuum
KF	Klenow-Fragment
Kp.	Kochpunkt (Siedepunkt)
LCAA	<i>Long Chain Alkylamin</i>
LNA	<i>Locked</i> -nucleic acid (<i>Locked</i> -Nucleinsäuren)
LV	<i>Low volume</i>
M	Multipllett
MAC-Mode	<i>Magnetic Actuated-Mode</i> , Magnetischer Anregungs-Modus
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MPLC	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometrie
NEt ₃	Triethylamin

NHS	<i>N</i> -Hydroxysucinimid
nm	nano mol
NMR	Kernspinresonanz
nt	Nucleotide
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	DNA-Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Ph	Phenyl
pm	pico mol
PMO	Phosphordiamidat-Morpholino-Oligonucleotid
PNA	Peptid-Nucleinsäure
p-RNA	Pyranosyl-RNA
PS	Polystyrol, <i>Polystyrene</i>
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
Py	Pyridin
q	Quadruplett
R_f	<i>R(elate to) f(ront)</i> -Wert
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (reversed-phase)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-DNA-Polymerasekettenreaktion
S	Singulett
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
Smp.	Schmelzpunkt
SPM	Scanning Probe Microscopy
ssDNA	einzelsträngige DNA
ssfDNA	einzelsträngige funktionalisierte DNA
STM	Scanning Tunneling Microscopy
t	Triplett
T4 PNK	T4 Polynucleotide Kinase aus E.coli mit cloniertem Gen des Bacteriophagen T4
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBDMS	tertButyldimethylsilyl
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborat
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEAB	Triethylammoniumhydrogencarbonat
TEAC	Tetraethylammoniumchlorid

TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
<i>Tgo</i>	<i>Thermococcus gorgonarius</i>
THF	Tetrahydrofuran
TNA	Threose-Nucleinsäuren
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TSTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -succinimidyl)uronium tetrafluoroborat
<i>Tth</i>	<i>Thermo thermophilus</i>
TTP	Thymidintriphosphat
U	Einheit
UV	Ultraviolett(spektrum)
xDNA	<i>Extended</i> DNA
yDNA	<i>Wide</i> DNA

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der funktionellen Komponenten eines Desoxyribonucleotids (hier dA), der Monomere der DNA. Rot (P) der Phosphat-Rest und blau (Z) der Zucker; beide als strukturgebende Komponenten. Die Nucleobase (grün, B) kann variieren und enthält durch ihre Sequenzabfolge im Polymer die genetisch Information. 1

Abbildung 2: Drahtmodell (links), plastisches Modell (mitte) und kombiniertes Modell (rechts) einer regulären B-DNA unter Angaben einiger grundlegender Eigenschaften. 2

Abbildung 3: Darstellung der kanonischen Nucleobasenpaarung in der DNA-Doppelhelix nach *Watson* und *Crick* (links) und der zusätzlichen Basenpaarung nach *Hoogsteen* im Falle der Tripel-Helix (rechts). 3

Abbildung 4: Basenpaarungsmuster in einem G-Quartett (Quadruplex oder Guanosintetrad, links) und reverse Hoogsteen Paarung eines DNA-Triplex (rechts). 4

Abbildung 5: Struktur der A-DNA (links), B-DNA (mitte) und Z-DNA (rechts) mit der Blickrichtung jeweils senkrecht zur Helix-Achse (oben) und parallel entlang der Helix-Achse (unten) im Vergleich. 6

Abbildung 6: Zweidimensionales Nanokonstrukt („Smiley“), aufgebaut aus doppelsträngiger DNA. Links: rudimentäres Konzept der Doppelstrang-Verteilung und Faltungsmuster. Mitte: Darstellung der benötigten Überkreuzungsmuster der dsDNA mit Farbkodierung zur Indizierung komplementärer Sequenzen. Rechts: rasterkraftmikroskopische Aufnahme der erhaltenen DNA-Nanostruktur.^[10] 8

Abbildung 7: Beispiele für aus dsDNA aufgebaute dreidimensionale Nanoobjekte. *Turberfields* DNA-Tetraeder^[22] (links), *Seemans* DNA-Würfel (mitte) und ein beschnittener bzw. abgestumpfter Oktaeder^[7, 20] (rechts). 8

Abbildung 8: Ausbildung von *Holliday-Junctions* während der homologen Rekombination (oben) und Erzeugung von Kachel-Strukturen durch *Holliday-Junctions* mit *sticky ends* (unten, Kasten). 9

Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer rigiden DX (*Double Crossover*, C) DNA-Struktur, abgeleitet aus dem Prinzip der *Holliday Junctions* mit nur einer Überkreuzung (B, vgl. auch Abbildung 8).^[20, 26] Das DX enthält zwei statt eine sich überschneidende Verzweigungsstellen (*crossover*, C) die zwei zueinander co-planare DNA-Duplexe verbindet. Die Verknüpfung findet durch den Strangaustausch an den *crossover*-Punkten statt. Ein Strang einer jeden Helix tauscht zweimal aus und führt seine Basenpaarung am komplementären Strang des homologen Nachbarn weiter. Die obere Reihe zeigt das vereinfachte Überkreuzungsschema ohne Berücksichtigung der Helixwindungen. Die untere Reihe berücksichtigt die Windung. Ganz rechts ein gezeichnetes Molekülmodell einer rigiden DX-DNA..... 10

Abbildung 10: Durch den Konformationswechsel des B-DNA-Doppelhelix-„Scharniers“ (gelb) zwischen zwei rigiden DX-DNA Teilen führen diese eine Rotationsbewegung aus (oben und unten, links).^[12] Das nanomechanische Schalten wird durch Zugabe oder Entfernen von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ gesteuert und über ein FRET-Signal detektiert. Das Weiten und Verengen eines DNA-Rings durch Zugabe respektive Entfernen eines Interkalators ist rechts unten dargestellt.^[12] 11

Abbildung 11: Linkes Schema: Eine DNA-Laufmaschine, bestehend aus zwei doppelhelikalen „Beinen“ (braun), die an einzelsträngigen „Füßen“ (Überhänge) enden und über flexible Linker miteinander verknüpft sind. Die Füße werden an die doppelsträngigen DNA-Bordsteine bzw. Schienen (blau), die an ihren Enden ebenfalls einzelsträngige Überhänge aufweisen über komplementäre einzelsträngige „Fuß-Bordstein-Anker“-Oligonucleotide gebunden (schwarz umrandete Oligonucleotide, links). Durch sequentielles Entfernen dieser Fuß-Bordstein-Anker und Zugabe neuer Anker wird die DNA-Laufmaschine über die Bordsteinetappen geführt. Rechtes Schema: Eine aus drei Oligonucleotiden gebildete molekulare Pinzette wird durch „Treibstoff“-Oligonucleotide geschlossen und geöffnet.^[12] 12

Abbildung 12: Der chelatierende Effekt von Hydroxypyridon Liganden, die als Nucleobasen-Ersatz in synthetische DNA eingebaut wurde, erlaubt eine Cu^{2+} - vermittelte Hybridisierung zweier solcher modifizierter DNA-analoger Einzelstränge.^[32, 37, 38] 13

Abbildung 13: An der Internucleosidbindung (Phosphatrückgrat) modifizierte Nucleinsäuren..... 15

Abbildung 14: Vergleich von DNA und RNA Struktureinheiten mit am Kohlenwasserstoff-Rest modifizierten Nucleinsäure-Analoga 16

Abbildung 15: Gegenüberstellung des Ribosephosphat-Rückgrats der DNA mit dem Pseudopeptid-Gerüst der PNA. 16

Abbildung 16: Schematisch dargestellte Bindungs-Modi der PNA mit dsDNA als Zielsequenz. Die dick unterlegten Strukturen sind PNA.^[3] 17

Abbildung 17: Strukturen der verschiedenen PNA-Komplexe, basierend auf röntgenkristallographischen- und NMR-Daten.^[3, 51] 18

Abbildung 18: Zuckerkaltung (engl. *puckering*) und resultierende Konformationsbezeichnung bei DNA, RNA und LNA Monomeren..... 19

Abbildung 19: Konstitution und Konfiguration der Bicyclo- und Tricyclo-Desoxynucleoside (links oben und unten). Konformation der Nucleoside und Oligonucleotide von Bicyclo und Tricyclo-DNA (mitte und rechts). 20

Abbildung 20: Links: Konstitution und Konfiguration der TNA. Mitte und rechts: Gegenüberstellung der strukturellen Konformation von TNA und RNA im Oligonucleotid (mit linearisiertem Ribosephosphat-Rückgrat)^[56] 21

Abbildung 21: Gegenüberstellung von Oligonucleotiden und ihren Nucleosiden die auf Pyranose-Analoga beruhen. Oben *homo*-DNA (HNA) und unten Pyranosyl-RNA (p-RNA). 22

Abbildung 22: Komponenten und Struktur der Phosphordiamidat-Morpholino-Oligonucleotide (PMO). ^[60]	23
Abbildung 23: Schema der Templat(Y)-gesteuerten Verknüpfung dreier Hydrazid-modifizierter Oligonucleotide (A, B, C) mit einem Linker-Molekül (L) zu einem definierten Tris-Oligonucleotid-Produkt LABC ohne Produkt-Gemische anderer Zusammensetzung. ^[61]	24
Abbildung 24: Konstruktionsplan der aus zwei DNA-Kachel-Spezies (A und B) aufgebauten Nanoröhren. Zur Vereinfachung sind die aus den Kachelflächen herausragenden Stem-Loops in der unteren Bilderreihe, die die zusammengesetzten Konstruktionen zeigt, nicht eingezeichnet. ^[63]	25
Abbildung 25: Fluoreszierende Nucleosid-Analoga.....	27
Abbildung 26: Strukturen einiger unpolarer Nucleobasen Isostere (obere Reihe, neben ihren natürlichen Vorbildern) und einfacher aromatischer Kohlenwasserstoff-Nucleosid-Analoga (untere Reihe). ^[75]	28
Abbildung 27: Um die Länge eines Benzen-Rings erweiterte xDNA in Watson/Crick-Basenpaarung mit ihrem komplementären natürlichen Analogon (rechte Spalte) im Vergleich zur Basenpaarung regulärer DNA (linke Spalte). Es paart immer ein xNucleotid mit einem natürlichen komplementären Nucleotid.....	29
Abbildung 28: Gegenüberstellung der Basenpaarung von natürlicher DNA (links), xDNA (mitte) und bisher hergestellter yDNA (rechts). Man beachte den Unterschied in der Orientierung der Erweiterung bei xDNA und yDNA.....	31
Abbildung 29: Schema des von der DNA-Polymerase katalysierten nucleophilen Angriffs der 3'-Hydroxy-Gruppe eines naszierenden Primers an das α -Phosphoratom eines Nucleosid-5'- <i>O</i> -tri-phosphats (dNTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat und Ausbildung einer Phosphordiesterbindung.	32
Abbildung 30: Auswahl der von <i>Famulok et al.</i> in Primer-Verlängerungsreaktionen und PCR-Experimenten verwendeten modifizierten 2'-Desoxynucleosid-Triphosphate (fdNTP). ^[4, 6]	34
Abbildung 31: Beispiel eines Modell-Systems zur Bestimmung der aromatischen π - π Basenstapelung in Wasser. ^[84] Die Bindung des Adeninderivats wird in Abhängigkeit verschiedener aromatischer π -Stapelungs-Partner bestimmt. Die gemessene freie Enthalpie korreliert dabei gut mit der aromatischen Fläche des Interaktionspartners. ^[75]	36
Abbildung 32: Eine kleine Auswahl wichtiger Interkalatoren aus Medizin und Forschung.	39
Abbildung 33: Oben dargestellt ist die selektive enzymatische Inkorporation eines Pyren-Nucleosid-Triphosphats (dP) gegenüber einer Abasic Site (dSpacers) und unten die Hybridisierung zweier jeweils durch Festphasensynthese erzeugter komplementärer Oligonucleotide mit einem dP gegenüber einem dSpacer in der Doppelstrangsequenz.....	40
Abbildung 34: Darstellung der Furanose-Form und der reaktiven, offenen Aldehyd-Form einer Abasic Site (links, Gleichgewicht). Rechts: Kommerziell erhältliches Abasic Site-Analogon dSpacer.	41
Abbildung 35: Zwei Beispiele für fluoreszierende Abasic Site Sonden (links) und Paarungsmuster von AMND mit zwei verschiedenen Nucleobasen gegenüber einer Abasic Site (rechts).	42
Abbildung 36: Das modifizierte Nucleosid-Phosphoramidit als allgemeine Ziel-Struktur der organischen Synthese (links) und kurze modifizierte DNA-Oligonucleotid-Zielsequenzen (rechts) für die spätere Inkorporation in DNA-Makromoleküle.....	44

- Abbildung 37: Konkrete Beispiele für ein modifiziertes Nucleosid-Phosphoramidit (links) und daraus synthetisierten kurzen funktionalisierten DNA-Oligonucleotid-Sequenzen (rechts) mit unterschiedlicher Anzahl und Position von Modifikationen..... 45
- Abbildung 38 : Die obere Reihe zeigt die Ausbildung funktionalisierter dsDNA nach Hybridisierung mit einem komplementären unmodifizierten Gegenstrang. Unten: der Querschnitt (Blick entlang der Helixachse) einer funktionalisierten dsDNA. Der Linker-Arm ist lang genug um aus der Helix herauszuragen und die funktionelle Gruppe (Interkalator Anthracen) kann in eine benachbarte Helix interkalieren..... 46
- Abbildung 39: Aufbau und Sequenz eines DNA-Miniplasmids als potentielles DNA-Nanoobjekt (rechts), das durch Hybridisierung mit modifizierten Oligonucleotiden (links) funktionalisiert werden kann. 47
- Abbildung 40: Schema der *in situ* Funktionalisierung von DNA-Miniplasmiden durch Hybridisierung mit funktionalisierten Oligonucleotiden (oben). Induzierung von Aggregation (unten rechts) und Aufhebung der statistischen Verteilung der DNA-Nanoobjekte (unten links) durch Funktionalisierung..... 47
- Abbildung 41: Nachweis der Interaktion der Miniplasmide nach Hybridisierung mit funktionalisierter DNA durch Abbildung der Aggregate mittels Rasterkraftmikroskopie..... 48
- Abbildung 42: Gezeichnetes dreidimensionales Strukturmodell eines DNA Miniplasmids mit Einzelstrangregion (links) der durch die Hybridisierung mit einem komplementären Interkalator-modifizierten Oligonucleotid (violett) funktionalisiert werden kann (rechts). 48
- Abbildung 43: Oben: *Watson/Crick*-Basenpaarungsmuster und Konsequenz für die Nucleobasen-Positionen im Bezug auf die Geometrie der DNA-Doppelhelix. Unten: Allgemeine Nummerierung von Purin und Pyrimidin Nucleotiden..... 50
- Abbildung 44: Katalysezyklus der Palladium-vermittelten Sonogashira-Kupplung..... 51
- Abbildung 45: Propargylamin-Seitenarm Schützung mit der TFA-Schutzgruppe (oben) mit anschließender Sonogashira-Kupplung an das halogenierte Nucleosid 1 und Schutz der 5'-OH Gruppe mit DMT-Chlorid 6 (unten). 52
- Abbildung 46: Aminolyse des TFA geschützten Nucleobasen-Seitenarms des 5'-DMT geschützten Desoxyuridin-Derivats. 54
- Abbildung 47: Mögliche Bindungs-Modi aromatischer, ggf. positiv geladener Verbindungen an dsDNA.^[117] 55
- Abbildung 48: Anthracen und exemplarische Derivate die in Interkalations-Experimenten eingesetzt wurden. 56
- Abbildung 49: Weitere chemische Eigenschaften des Anthracens, die zur kovalenten Bindungsbildung führen..... 56
- Abbildung 50: Linker-Schützung und Anthracen-Verknüpfung durch Peptidchemie. 58
- Abbildung 51: Entschützung des Anthracen-9-carbamido- ϵ -aminocaprinsäuremethylesters und Verknüpfung des Interkalators an den Nucleobasen Seitenarm des 5'-DMT-geschützten Desoxyuridins. 59
- Abbildung 52: Phosphitylierung des 5'-DMT-geschützten, Interkalator-modifizierten Desoxyuridins 15 zum 3'-O-Phosphoramidit 17..... 60
- Abbildung 53: Schema des DNA-Festphasensynthesezyklus nach der Phosphoramidit-Strategie..... 61

Abbildung 54: Struktur von <i>Long Chain Alkylamin</i> (LCAA) CPG und <i>Long Chain Spacer</i> Polystyrene (PS). ^[135]	61
Abbildung 55: Aktivierung eines 5'-DMT geschützten Nucleosid-3'-Phosphoramidits mit Tetrazol.	62
Abbildung 56: Sequenzen der durch automatisierte DNA-Festphasensynthese hergestellten modifizierten Oligonucleotide GRN1-GRN7. Bis auf GRN7, das die komplementäre Basensequenz zu GRN1-GRN6 enthält, ist die Basensequenz der übrigen Oligonucleotide identisch. Sie unterscheiden sich lediglich in der Anzahl und Position des eingebrachten modifizierten dT (rechts in rot Anthracen-modifiziertes dT, schwarz das natürliche dT).	66
Abbildung 57: Position der Anthracen-Modifikation in Abhängigkeit des Basenpaar-Windungsabstands: links Sequenz GRN6 mit Gegenstrang zum Duplex hybridisiert; analog in der Mitte Sequenz GRN5 und rechts GRN3.	66
Abbildung 58: Analytisches HPLC-Chromatogramm der Aminolyse des synthetischen Oligonucleotids GRN1 bei 50 °C. Oben: Entschützung während 8h zeigt das Hauptprodukt bei einer Retentionszeit von 25.3 Min. und ein Nebenprodukt bei 17.8 Min. Unten: Entschützung während 4h. Es ist kein signifikantes Nebenprodukt detektierbar.	67
Abbildung 59 Elutionsprofil der Sequenz GRU1 (kommerziell erworbenes, unmodifiziertes Oligonucleotid). Oben UV-Detektion bei 254 nm unten bei 350 nm. Ohne Anthracen wird kein signifikantes Signal bei 350 nm detektiert.	68
Abbildung 60: Elutionsprofil der Sequenz GRN1 (präparativ, Basensequenz identisch mit GRU1, 5'-DMT geschützt inklusive einer Anthracenmodifikation an Position 11). Die Anthracenmodifikation erzeugt auch ein detektierbares Signal bei 350 nm (unteres Chromatogramm).	69
Abbildung 61: Elutionsprofil der Sequenz GRN3 (präparativ, Basensequenz identisch mit GRU1, 5'-DMT geschützt inklusive zweier Anthracenmodifikationen an Position 6 und 16). ...	69
Abbildung 62: Elutionsprofil der DMT-geschützten Sequenz GRN1 mit einer Anthracen Modifikationen (präparativ).	70
Abbildung 63: Elutionsprofil der DMT-entschützten Sequenz GRN1 mit einer Anthracen Modifikationen (präparativ)	70
Abbildung 64: Elutionsprofil der DMT-geschützten Sequenz GRN3 mit zwei Anthracen Modifikationen (präparativ)	70
Abbildung 65: Elutionsprofil der DMT-entschützten Sequenz GRN3 mit zwei Anthracen Modifikationen (präparativ)	71
Abbildung 66: Elutionsprofil der DMT-entschützten Sequenz GRN3 mit zwei Anthracen Modifikationen (analytisch)	71
Abbildung 67: Vergleich der UV-Spektren der unmodifizierten und modifizierten Oligonucleotide (oben, links und rechts) mit dem UV-Spektrum der Anthracen-9-carbonsäure mit ihrer charakteristischen Absorbtion zwischen 330-390 nm.	72
Abbildung 68: Massenspektrogramm der einfach modifizierten Oligonucleotid-Sequenz GRN1. Die gefundene Masse von 6748.2007 korrespondiert mit der über exakte Masseninkremente berechneten Oligonucleotidmasse von 6748.11 (vgl. Tabelle 2 und Kapitel 5.3.2)	73
Abbildung 69: Massenspektrogramm der zweifach modifizierten Oligonucleotid-Sequenz GRN4. Die gefundene Masse von 7104.3844 korrespondiert mit der über exakte Masseninkremente berechneten Oligonucleotidmasse von 7104.11 (vgl. Tabelle 2 und Kapitel 5.3.2)	74

Abbildung 70: Schmelzpunktkurven eines zweifach Antracen-modifizierten DNA-Doppelstrangs (oben) und eines unmodifizierten Doppelstrangs selber Basenpaarsequenz. Das jeweils linke Absorbtiions-spektrum in Abhängigkeit der Temperatur wurde in den Aufheizphasen aufgenommen, während das rechte Spektrum während des Abkühlens gemessen wurde. Die Stabilität der funtionalisierten dsDNA (unten) ist um signifikante 3.5 ° C höher..... 75

Abbildung 71: Schematische Illustration der unidirektionalen Krümmung einer DNA Doppelhelix durch die Wiederholung von „Keil“-Sequenz in Periodizität der Helix-Windung, welche die DNA-Achse ablenken.^[136, 139] 76

Abbildung 72: Design der DNA Miniplasmide aus drei dsDNA Segmenten, basierend auf der 21 bp langen A-tract Basis-Sequenz. Jedes ds Segment besteht aus einem Strang (α f, β f und γ f) und dem komplementären Gegenstrang (α r, β r und γ r) mit 5 bp Überhang (*sticky ends*, klebrige Enden). Jedes *sticky end* kann nur mit einem Ende eines anderen Segments hybridisieren (in der Abbildung farbkodiert). Während die Segmente α und β reine A-tracts sind, enthält γ in der Mitte die 21 bp Sequenz (violett gefärbt) der modifizierten Oligonucleotid Sequenzen GRN1-GRN6. Links sind die Segmente und der ligierte DNA-Mikro-Ring als Balken bzw. als Segment-Ring stilisiert dargestellt. 79

Abbildung 73: Schema der Phosphorylierung von 5'-OH-Überhängen dopplesträngiger DNA-Segmente mit anschließender Ligation. 81

Abbildung 74: Beispiel eines 2,5% Agarose-Gels der Ligationsprodukte angefärbt mit Ethidiumbromid. Spur A: DNA-Längenmarker; Spuren A-D: Ligationsprodukte $\alpha+\beta$, $\beta+\gamma$, und $\alpha+\gamma$; Spur E: Ligationsprodukt $\alpha+\beta+\gamma$; Spur F-H: $\alpha+\beta$, $\beta+\gamma$, and $\alpha+\gamma$ ohne Ligationsenzym. Da außer dem Trimer $\alpha+\beta+\gamma$ auch vielfache dieser Segmente auftreten, erscheinen bei Spur E die Produkte als Leiter. 82

Abbildung 75: Schema des Phosporilyierungs- und Ligations-Protokolls; oben für die Darstellung völlig geschlossener DNA-Miniplasmide unten zur Erzeugung von DNA-Ringen mit Einzelstrangregion. Die einzelnen Segmente werden separat phosphoryliert (Strang und Gegenstrang zusammen) und anschließend zur gemeinsamen Ligation zusammengegeben. Im Falle der DNA-Ringe mit Einzelstrangregion besteht das γ -Segment, statt aus zwei Oligonucleotiden (γ r und γ f, oben) aus drei Oligonucleotiden (γ ff, γ fz und γ r, unten)..... 82

Abbildung 76: Möglich Methode zur Verhinderung der Aneinanderreihungen von Segmenten und der Ausbildung von DNA-Ringen aus Vielfachen der drei Segmente, durch die Ligation zu Ringen in zwei Ligationsschritten..... 83

Abbildung 77: Komplette kovalent geschlossene zirkuläre DNA (O-förmig, links) und stark gekrümmte aber unvollständig ligierte DNA in C-Form (rechts). Zusatz des Interkalators Chloroquin bei der nativen Gelelektrophorese in der 2. Dimension biegt die C-Form DNA wieder auf (unten)..... 85

Abbildung 78: Schema der praktischen Durchführung der nativen 2D-PAGE für analytische (oben) und präparative (unten) Zwecke. 86

Abbildung 79: 5% PAGE-Gel der mit ³²P-radiomarkierten Ligationsprodukte von $\alpha+\beta+\gamma$ (A), $\alpha+\beta$ (B), $\beta+\gamma$ (C), and $\alpha+\gamma$ (D). Spuren E-G enthalten die jeweiligen Einzelsegmente α , β und γ alleine mit Ligase Enzym, während Spur H alle Segmente ($\alpha+\beta+\gamma$) ohne Ligase Enzym enthält..... 87

Abbildung 80: Oben von links nach rechts ein 5% PAGE-Gel mit ³²P-radiomarkierten Ligationsprodukten von $\alpha+\beta+\gamma$ (Bahn C), $\alpha+\beta$ (Bahn B) und β allein (A) in der 1. Dimension. Bahn C wurde ausgeschnitten und erneut einer Elektrophorese in der 2. Dimension mit 8% PAGE und 50 μ g/mL Chloroquin Phosphat unterzogen (unten von oben nach unten). Bande 4 der 1. Dimension ist die einzige Bande, die in der 2. Dimension in zwei Banden aufspaltet. 88

Abbildung 81: Oben von links nach rechts ein 5% PAGE-Gel mit ³²P-radiomarkierten Ligationsprodukten von $\alpha+\beta+\gamma$ (Bahn C), $\alpha+\beta$ (Bahn B) und β allein (A) in der 1. Dimension. Bahn C wurde ausgeschnitten und erneut einer Elektrophorese in der 2. Dimension mit 10%

PAGE unterzogen (von oben nach unten). Bande 4 der 1. Dimension spaltet in eine Bande mit sehr niedriger elektrophoretischer Mobilität (DNA-Miniplasmide) und einer Doppelbande auf. 89

- Abbildung 82: Spezifische Exo- und Endonuclease-Aktivität der Nuclease *Bal-31*.91
- Abbildung 83: Das 5% PAGE-Gel (1. Dimension) zeigt ³²P-radiomarkierte Ligationsprodukte der Segmente $\alpha+\beta+\gamma$ (Bahnen A-C und E); Bahn D ist ein kommerziell erhältlicher, vom Experimentator selbst radioaktiv markierter Längenstandard. Die linke Aufnahme ist ein Transilluminations-Photo und rechts ein Phosphorimager-Bild. Die Ligationsprodukte in den Bahnen A-C wurden mit steigenden Mengen Exonuclease *Bal-31* behandelt (A: 0.1 U, B: 0.2 U, 0.5 U). Die zirkuläre DNA zeigt sich inert gegen den Exonuclease-Verdau, während alle Nebenprodukte abgebaut und nicht mehr sichtbar sind. Bahn E enthält alle Ligationsprodukte und wurde nicht mit Exonuclease behandelt.92
- Abbildung 84: Berechnungen des theoretischen Durchmessers des trimeren (aus drei Segmenten bestehendes) und hexameren (6 Segmente) Miniplasmids. U= Umfang [nm]; d=Durchmesser [nm]; bp=Anzahl der Basenpaare; bt= abgeschätzte Höhe einer Basenpaarsteigung.93
- Abbildung 85: Ein PAGE-Gel zur Isolation von nicht radioaktiv markierten DNA Miniplasmiden ist links dargestellt. Die Bahnen 4 und 7 enthalten durch Nuclease-Verdau gereinigte Miniplasmide während Bahn 1 ohne Nuclease-Verdau in der Hauptproduktbande auch noch offene gekrümmte DNA enthält. Je eine Hauptbande mit und ohne Nuclease-Behandlung (aus Bahn 1 und 4) wird ausgeschnitten und in einer zweiten Dimension mit Chloroquin erneut aufgetrennt (rechts, A und B).93
- Abbildung 86: Prinzipielles Schema des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops (AFM). Links: Detektion der Oberflächen-Topographie durch Messung der Reflexionsänderung eines Laserstrahls durch die Ablenkung des reflektierenden Cantilevers mit Sondenspitze. Rechts: Allgemeiner Aufbau von Mikroskop, Steuer- und Abbildungseinheit des AFM.^[155]96
- Abbildung 87: Allgemeine Struktur des Schichtsilikats Mica an der atomaren Oberfläche.99
- Abbildung 88: Reihenfolge der zu bewältigenden Aufgabe der erfolgreichen Visualisierung der unterschiedlichen DNA-Nano-Objekt Spezies (von links nach rechts)..... 100
- Abbildung 89: Zwei Methoden der Abscheidung von bioorganischen Proben aus gepufferten Lösungen auf Mica-Trägerplättchen..... 100
- Abbildung 90: MAC-Mode AFM Aufnahme einer Probe von vollständig geschlossenen DNA-Miniplasmiden auf Mica, aufgebracht durch Drop-Coating (60 nM DNA-Miniplasmid (0.6 pmol absolut) in 10 mM NiCl₂ , 10 mM TrisHCl-Puffer (pH=7.5)). Die untere Reihe zeigt einen vergrößerten Ausschnitt derselben Probe. Links ist jeweils die Bildschirm-Momentaufnahme eines Scans gezeigt, rechts außen eine bearbeitete Abbildung des Original-Datensatzes und in der Mitte die dreidimensionale, topographische Darstellung dieser Abbildung. Neben einigen Hügelartigen Erhebungen mit Durchmessern von 40-80 nm sind Plateaus zu sehen, die als Verkrustungen oder Eintrocknungen des Puffers interpretiert werden könnten. 101
- Abbildung 91: MAC-Mode AFM Aufnahme einer Probe von vollständig geschlossenen DNA-Miniplasmiden auf Mica, aufgebracht durch Dip-Coating (120 nM DNA-Miniplasmid (2.4 pmol absolut) in 10 mM NiCl₂ , 10 mM TrisHCl-Puffer (pH=8.0)). Obere und untere Reihe zeigen unterschiedliche Ausschnitte derselben Probe. Links ist jeweils die Bildschirm-Momentaufnahme eines Scans gezeigt, rechts außen eine bearbeitete Abbildung des Original-Datensatzes und in der Mitte die dreidimensionale, topographische Darstellung dieser Abbildung. Bei den punktförmigen Erhebungen oder Hügeln könnte es sich um unscharfe Abbildungen von Miniplasmiden handeln, da die Größenordnung der Durchmesser (20-60 nm) in diesem Bereich liegt. Ohne weitere Experimente lässt sich dies aber nicht bestätigen. 102
- Abbildung 92: Prinzip der AFM-Messung im magnetischen Tapping-Mode (MAC-Mode). 104

Abbildung 93: Querschnitt (links) und Seitenansicht (rechts) mit Komponentenbeschreibung des experimentellen Aufbaus zur AFM-Messung in einer Flüssigkeitszelle (oben). Unten ist das Real-Foto der eingesetzten Flüssigkeitszelle abgebildet...105

Abbildung 94: Probenhalter und Flüssigkeitszelle des *Molecular Imaging AFM PicoScan / PicoSPM I*.....105

Abbildung 95: MAC-Mode AFM Aufnahme einer Probe von vollständig geschlossenen DNA-Miniplasmiden auf Mica mittels einer Flüssigkeitszelle (*in-situ* Messung, 0.085 pmol in 100 μ L Probenlösung). Die untere Reihe zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Probe bei dem 8 DNA-Ringe gut erkennbar sind (3D-Ansicht in der Mitte). Sie weisen eine Höhe von ca 2 nm auf (entspricht dem Durchmesser von dsDNA) und einen Ring-Durchmesser von ca 18-20 nm, was sehr gut mit dem berechneten Wert (\sim 18.2 nm) des Durchmessers von Miniplasmiden mit 168 bp übereinstimmt (vgl. Abbildung 84). Links oben ist eine Bildschirm-Momentaufnahme des Scans gezeigt, rechts oben ist eine bearbeitete Abbildung des Original-Datensatzes dargestellt und in der Mitte die dreidimensionale, topographische Darstellung dieser Abbildung.106

Abbildung 96: Rasterkraftmikroskopisches Amplituden-Bild einer weiteren DNA-Miniplasmid Probe *in-situ*. Unten dargestellt das relativ unscharfe Bild von 5 DNA-Ringen, oben eine topographische dreidimensionale Darstellung.....107

Abbildung 97: AFM-Phasen-Bild der in Abbildung 96 präsentierten Probe. Oben das deutlich schärfere 2D-Bild im Vergleich zu Abbildung 96 und unten die daraus abgeleitete 3D-Darstellung.....107

Abbildung 98: AFM-Bilder zweier exemplarischer Proben (A und B, jeweils eine Bildschirm-Momentaufnahme links und eine bearbeitete Darstellung rechts daneben) von DNA-Miniplasmiden mit einzelsträngiger Region. Es sind sowohl geschlossene DNA-Ringe als auch lineare und offene, gekrümmte DNA-Spezies sichtbar.....108

Abbildung 99: AFM-Aufnahmen einer weiteren Probe von DNA-Miniplasmiden mit Einzelstrangregion (2D links, 3D topographisches Bild rechts). Einige DNA-Ringe und einige lineare DNA-Fragmente sind gekennzeichnet.....108

Abbildung 100: Entwindung und Separation der Einzelstränge von nicht vollständig doppelsträngigen DNA-Miniplasmide (unten). Vollständig geschlossene, doppelsträngige DNA-Ringe können so nicht entwunden und separiert werden (oben).....109

Abbildung 101: AFM-Aufnahmen einer Probe von DNA-Miniplasmiden mit Einzelstrangregion auf Mica *in situ*. Hauptausschnitte in 2D und 3D (oben) und vergrößerte Ausschnitte (unten). Bei den meisten intakten DNA-Ringen ist über einen kleinen Bereich des Ringtorus eine schmalere Ring-Kontur zu erahnen. Es könnte sich dabei um den einzelsträngigen Bereich des DNA-Miniplasmids handeln (unten rechts mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet).....110

Abbildung 102: AFM-Aufnahme von funktionalisierbaren DNA-Miniplasmiden mit dem komplementären Anthracen-modifizierten Oligonucleotid GRN3. Links ist der Hauptausschnitt der Probe dargestellt, in der Mitte ein 3D topographisches Bild eines vergrößerten Ausschnitts (2D, rechts) mit Kennzeichnung einiger beobachteter Aggregate.111

Abbildung 103: AFM-Aufnahme von funktionalisierbaren DNA-Miniplasmiden mit dem komplementären Anthracen-modifizierten Oligonucleotid GRN3. Es handelt sich um dieselbe Probe wie in Abbildung 102 mit weiter vergrößerten Ausschnitten und Kennzeichnung der unterschiedlichen beobachtbaren DNA-Spezies: isolierte DNA-Ringe, offene DNA-Fragmente und Aggregate mit definierter und undefinierter Anzahl an Interaktionspartnern.111

Abbildung 104: AFM-Aufnahme einer weiteren DNA-Miniplasmid Probe unter Zusatz von GRN3. Obwohl die Mengen und Konzentrationen aller Komponenten identisch zu den zuvor beschriebenen Experimenten sind, ist die Population an aggregierten DNA-Ringen scheinbar geringer. Die Vergrößerungsausschnitte links und rechts des Hauptausschnitts (Mitte) zeigen aber immer noch das Aggregate detektierbar sind.112

Abbildung 105: Ein anderer Ausschnitt (3D Bild rechts) derselben Probe wie aus Abbildung 104 mit vergrößerten Regionen (unten), die zusammenhängende Aggregate zeigen..112

Abbildung 106: Zwei ausgesuchte AFM-Aufnahmen von Proben auf Mica *in situ*, die DNA-Mini-plasmide mit Einzelstrangregion enthalten, aber nicht mit Interkalator-modifizierten, komplementären Oligonucleotiden versetzt wurden. In diesen Aufnahmen sind auch in Abwesenheit des eigentlichen verbindenden Elements, dem Anthracen-modifizierten Oligonucleotid, dimere Paare von DNA-Ringen (gelbe Kästchen) und eine größere DNA Anhäufung (blauer Kasten) beobachtbar. 113

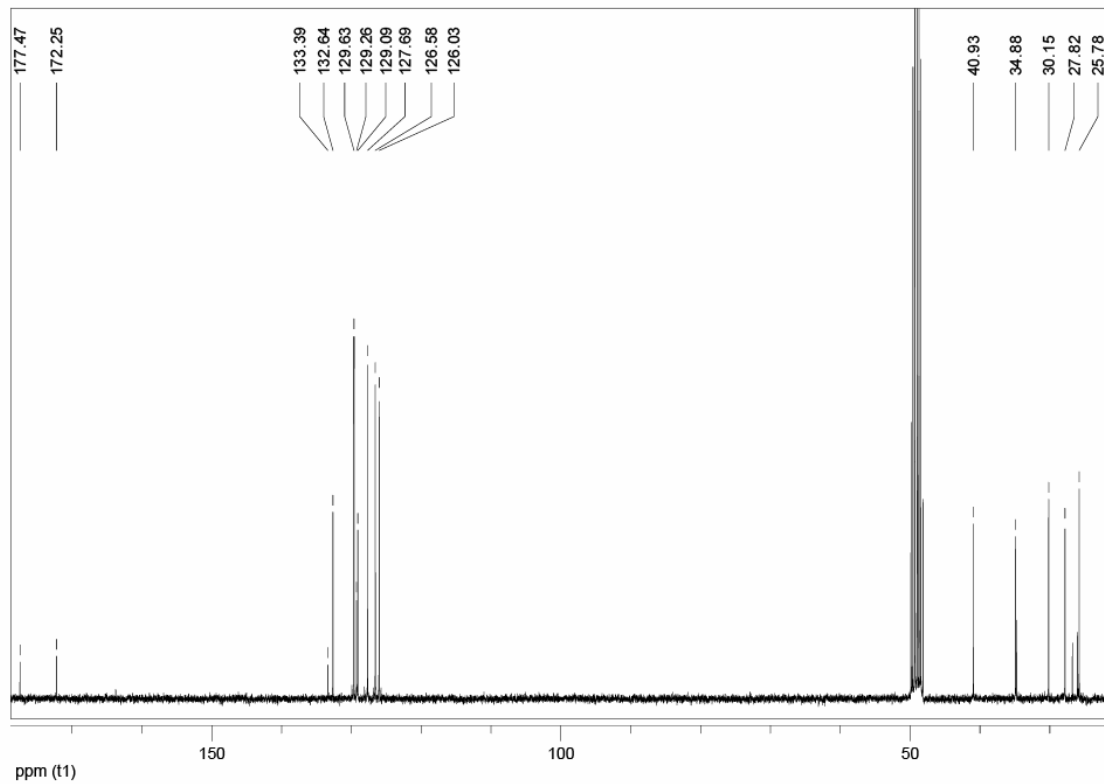
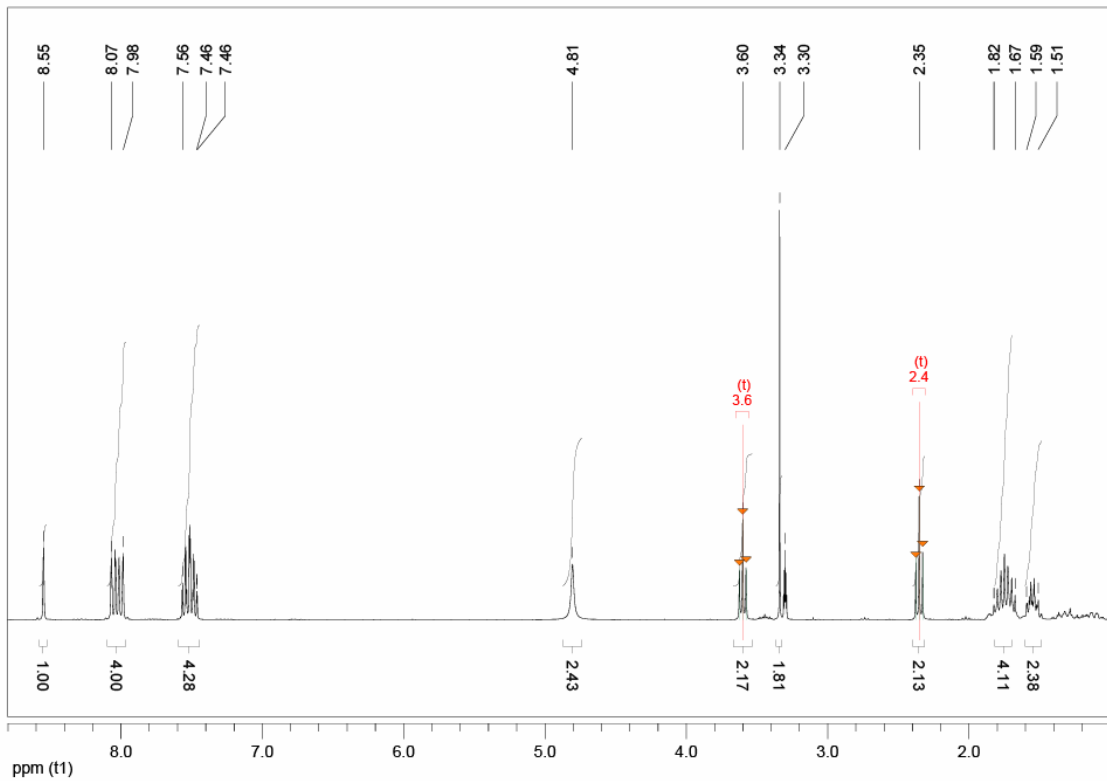
Abbildung 107: Prinzipien der alternativen Detektionsmethoden (FluPol und *Gelshift*) zum Nachweis der Interkalation der Anthracen-modifizierten Oligonucleotide (rot) mit doppelsträngiger DNA (Hairpin mit Fluorescein-Tag, grün). Eine Verstärkung des Antwort-Signals könnte durch den Zusatz eines größeren DNA-Fragments mit komplementärer Region (blau) zum modifizierten Oligonucleotid erzielt werden..... 115

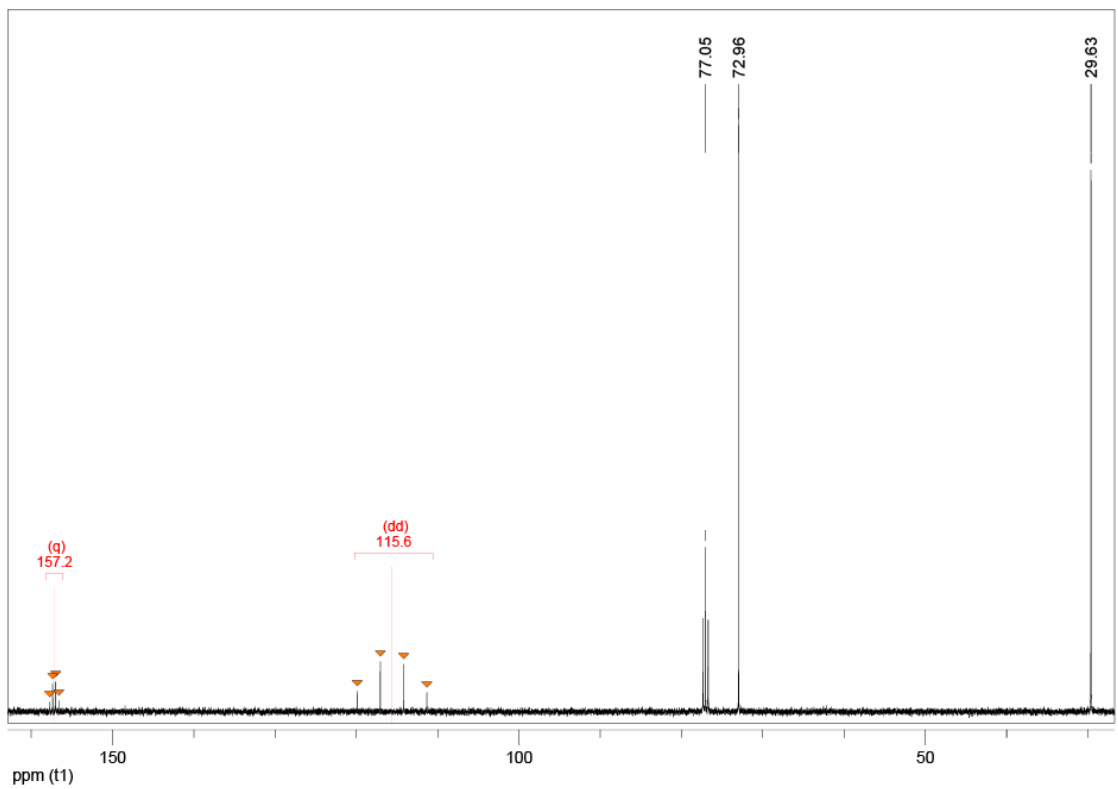
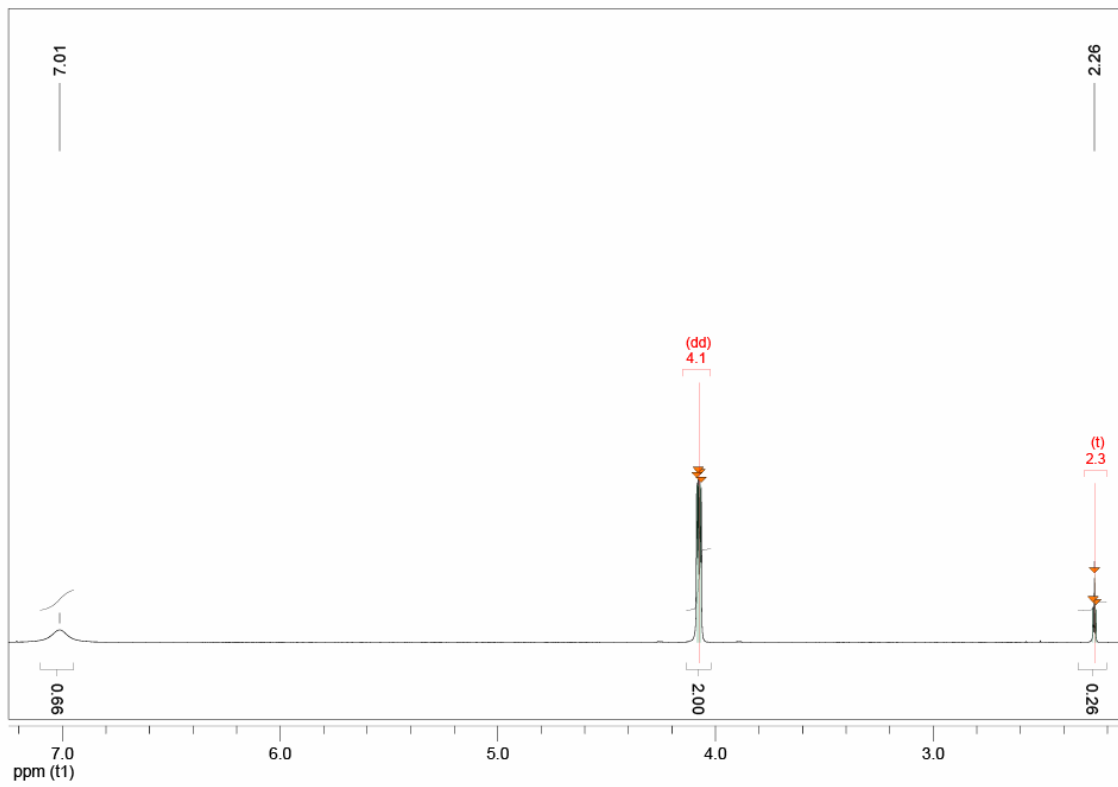
Abbildung 108: Versuch der kovalenten Verknüpfung Anthracen-modifizierter Oligonucleotide. Massenspektrometrische Untersuchungen und *Gel-Shift* Experimente konnten keine Verknüpfung von Oligonucleotiden bestätigen..... 118

Abbildung 109: Prinzip einer sequenzspezifischen Verknüpfung zwischen DNA-Ringen mit unterschiedlichen Einzelstrang-Sequenzen über RNA-Hairpins..... 119

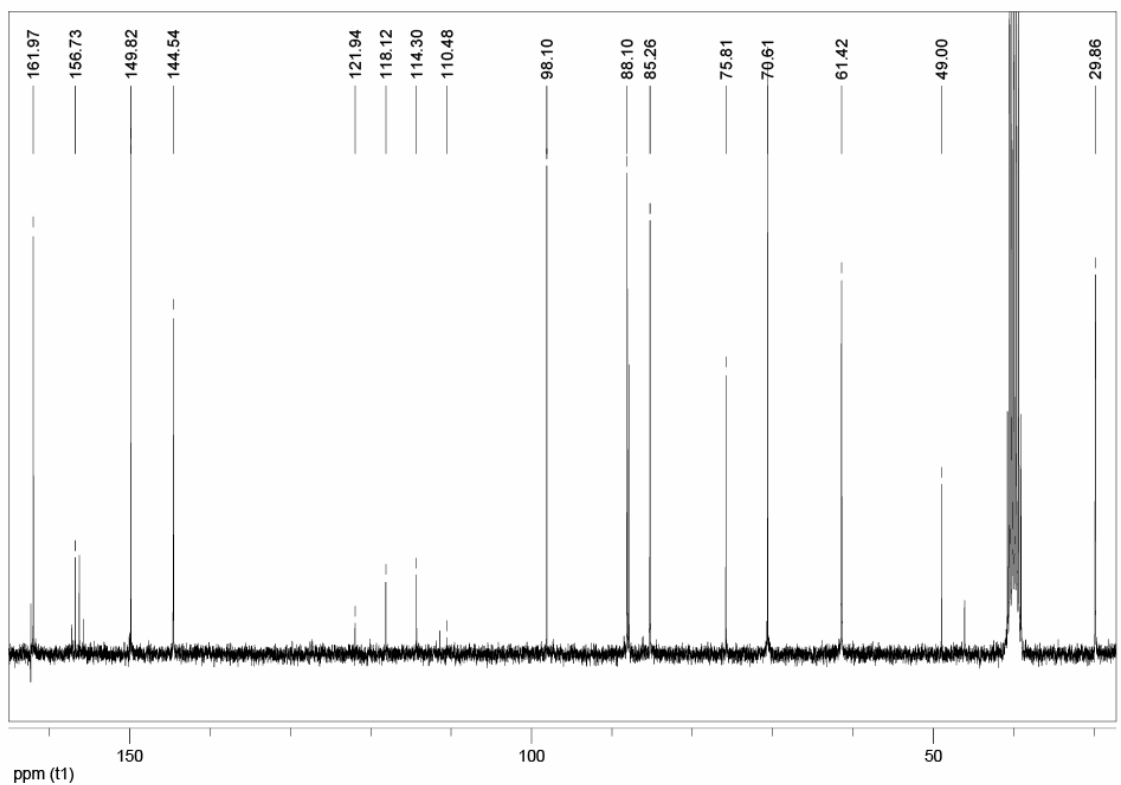
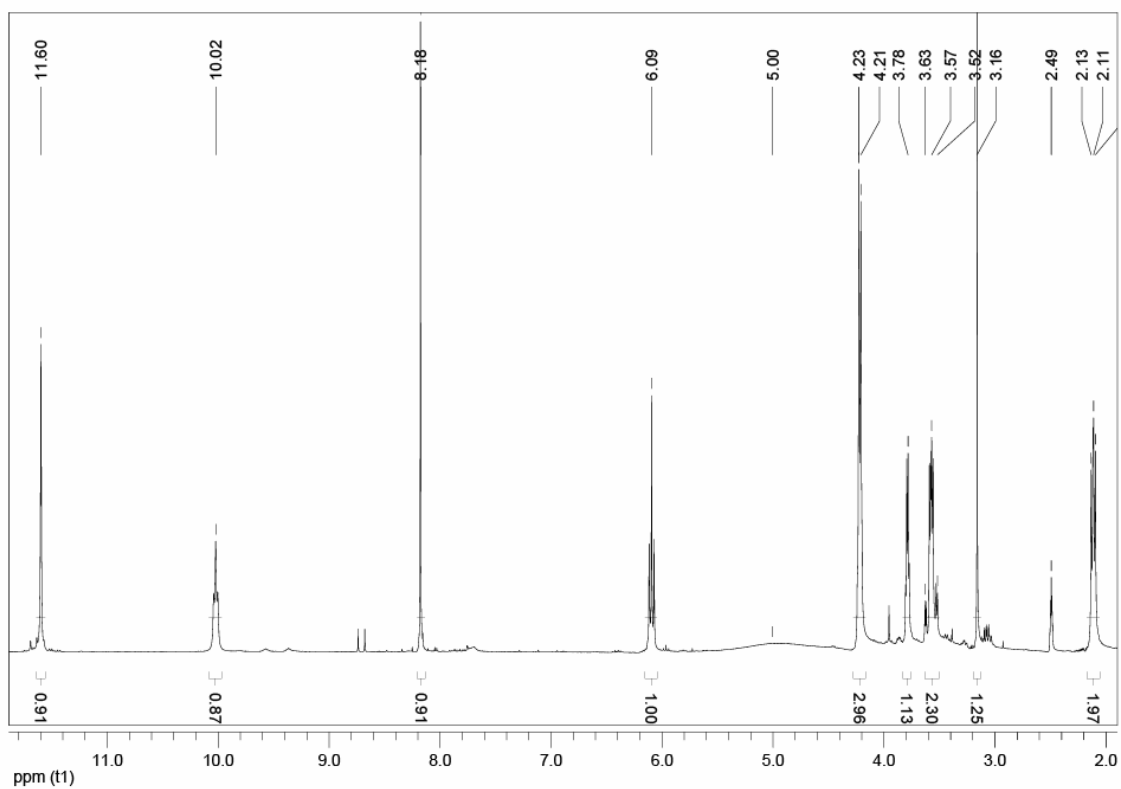
7.3 Spektren

7.3.1 Anthracen-9-carbamido- ϵ -amino-capronsäure

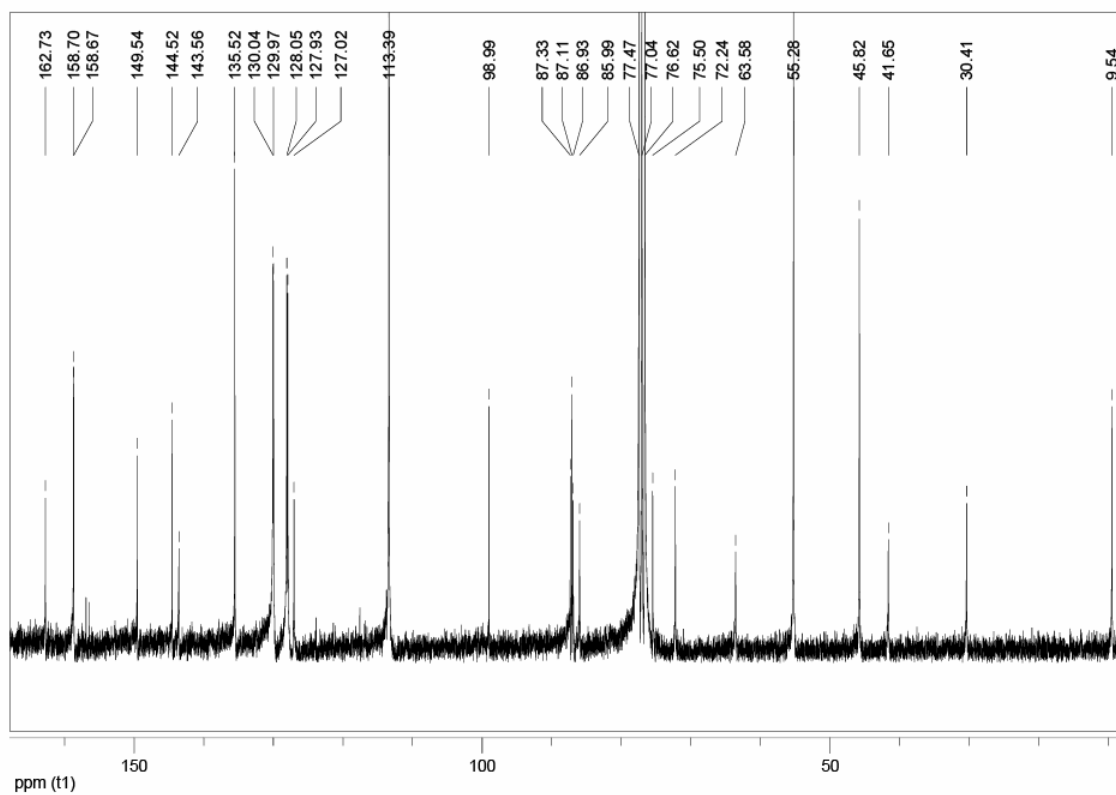
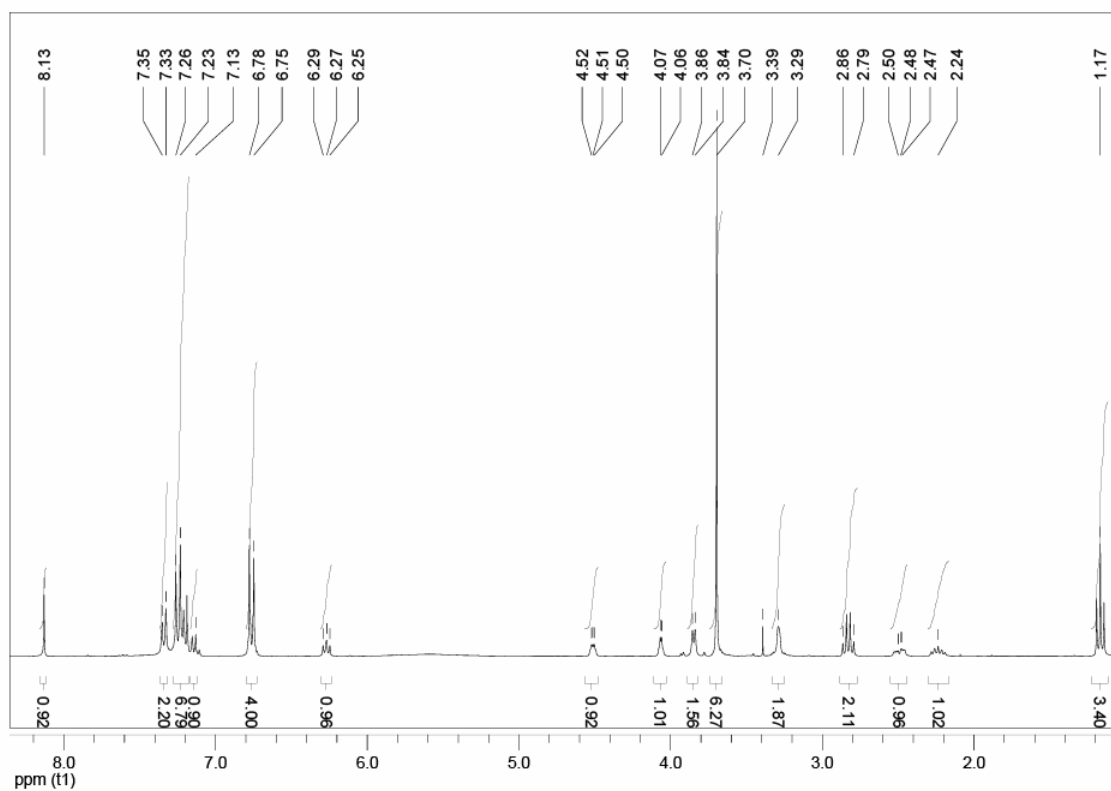


7.3.2 *N*-Propargyltrifluoracetamid

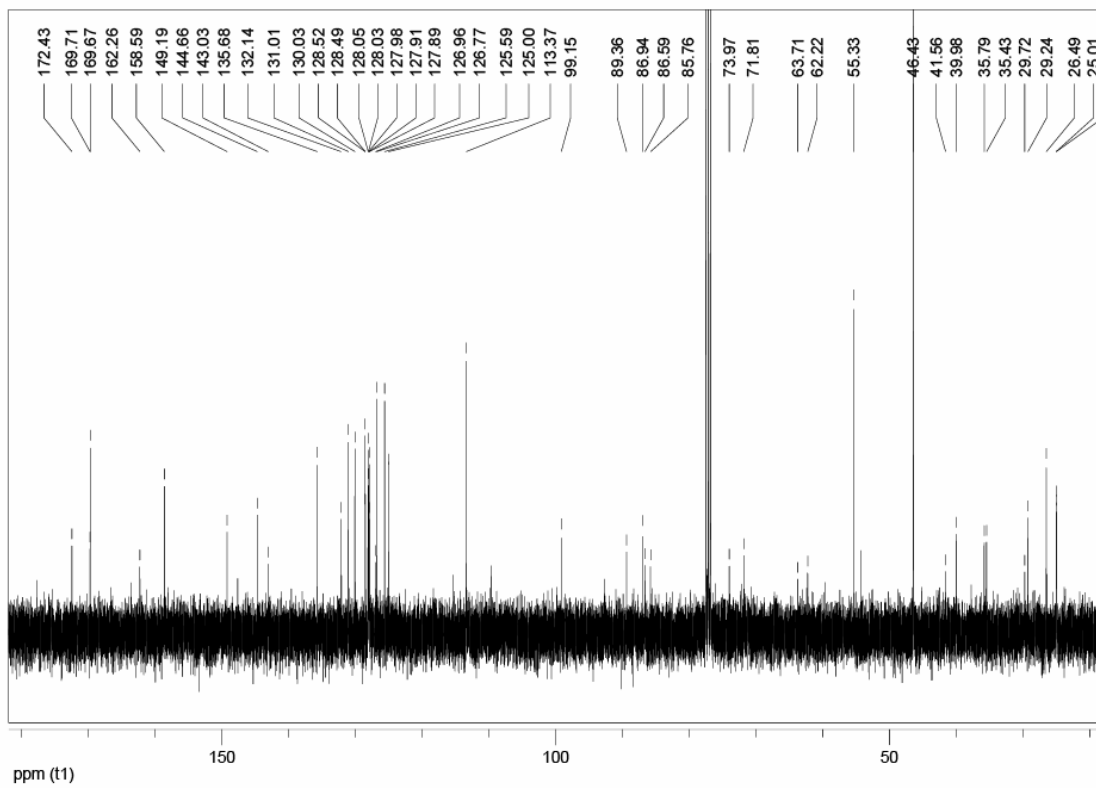
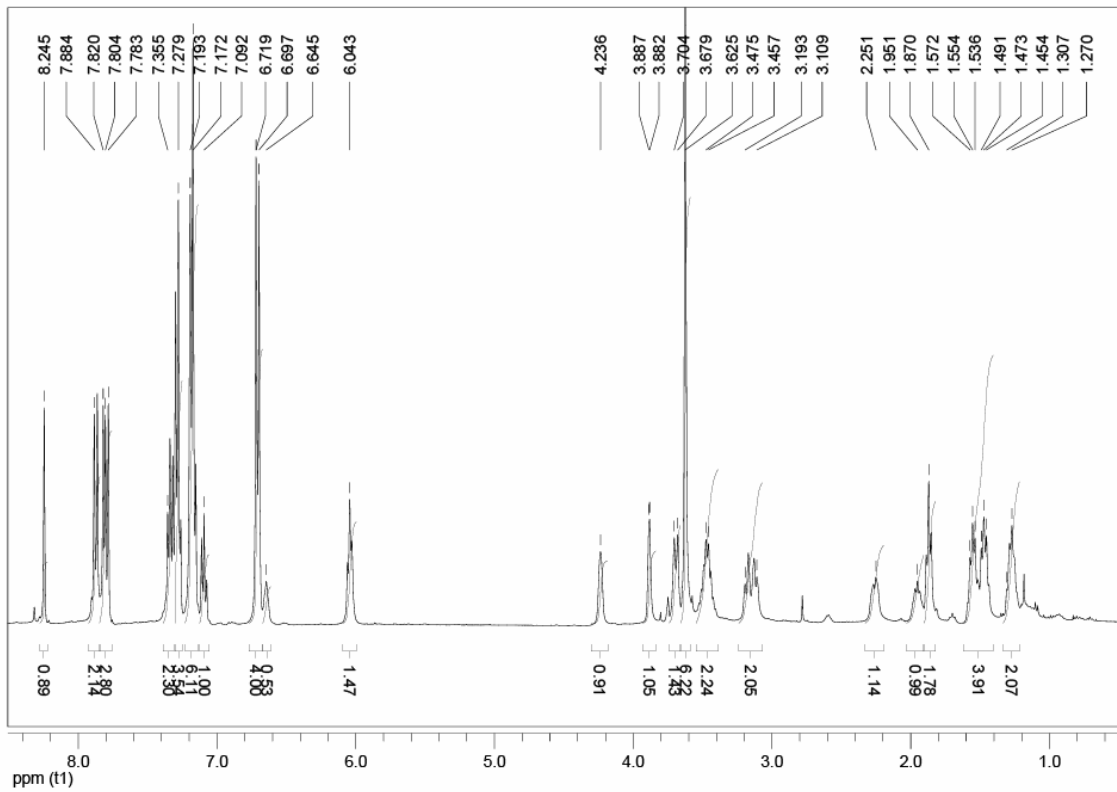
7.3.3 5-[3-(Trifluoracetyl-amino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin

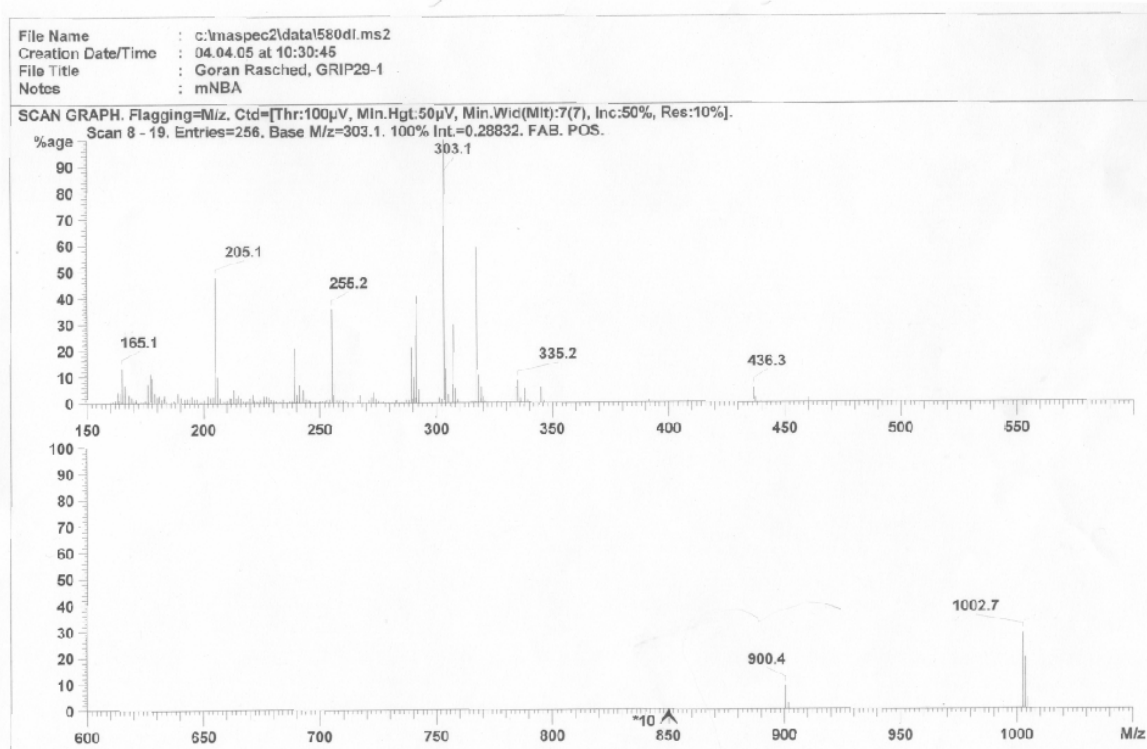


7.3.4 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[3-(Trifluoroacetyl-amino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin

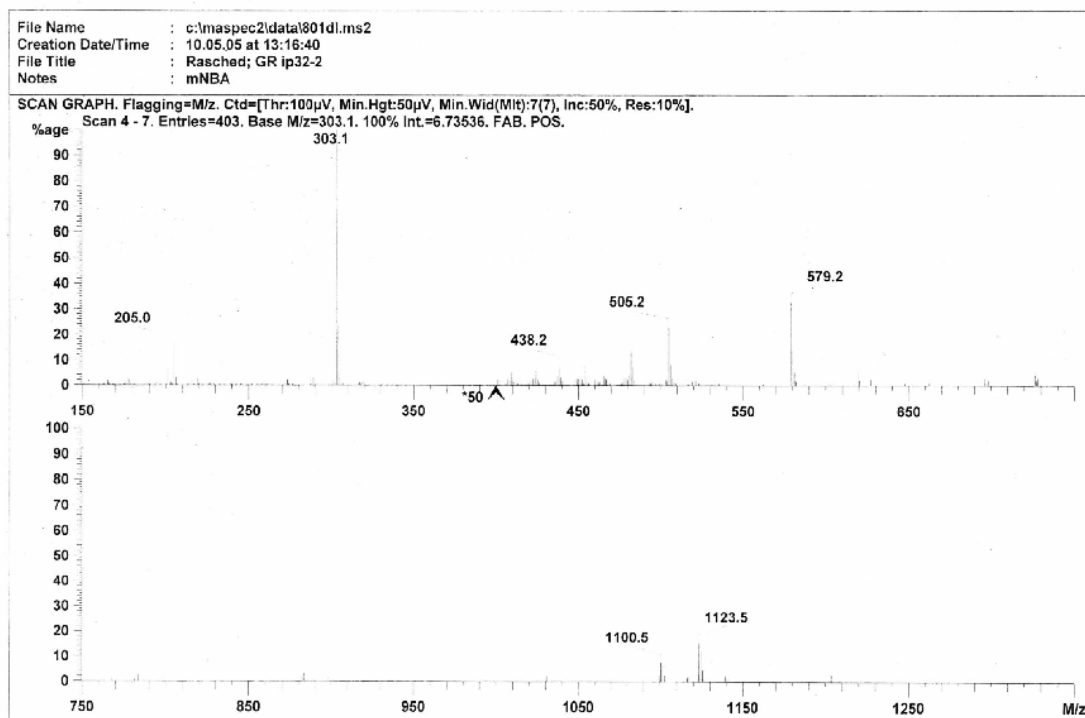


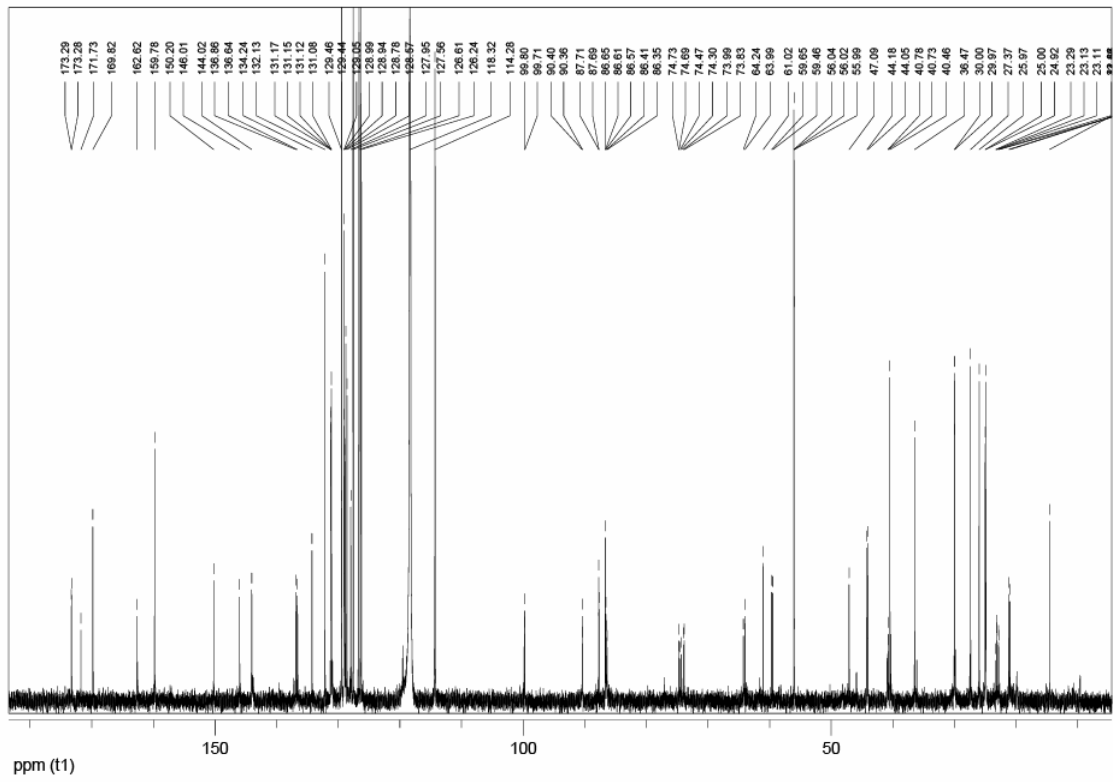
7.3.5 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[3-((Anthracen-9-carbamido)- ϵ -amino-caproylamino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin



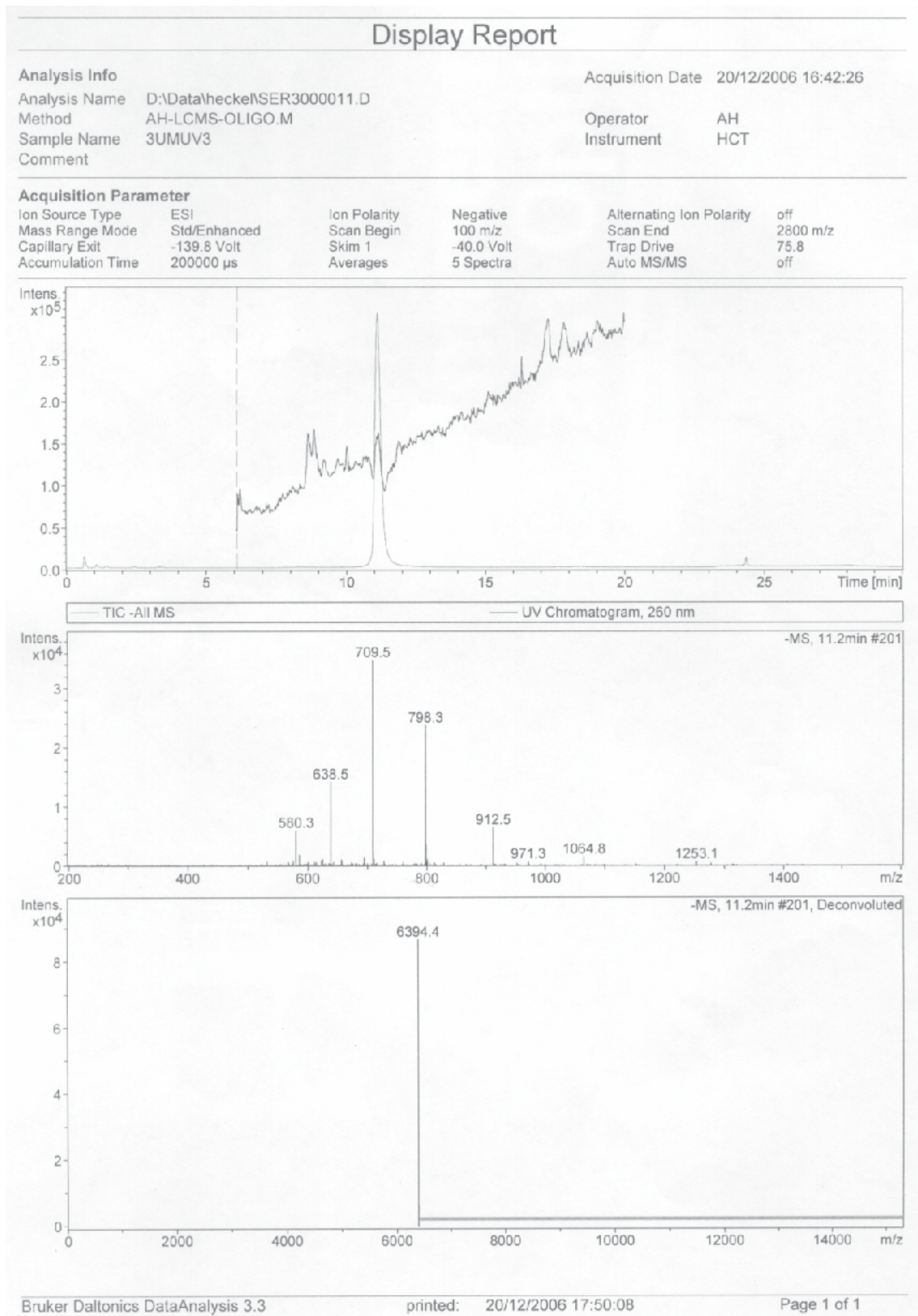


7.3.6 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[3-((Anthracen-9-carbamido)- ϵ -amino-caproylamino)-prop-1-ynyl]-2'-desoxyuridin-3'-O-(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidit

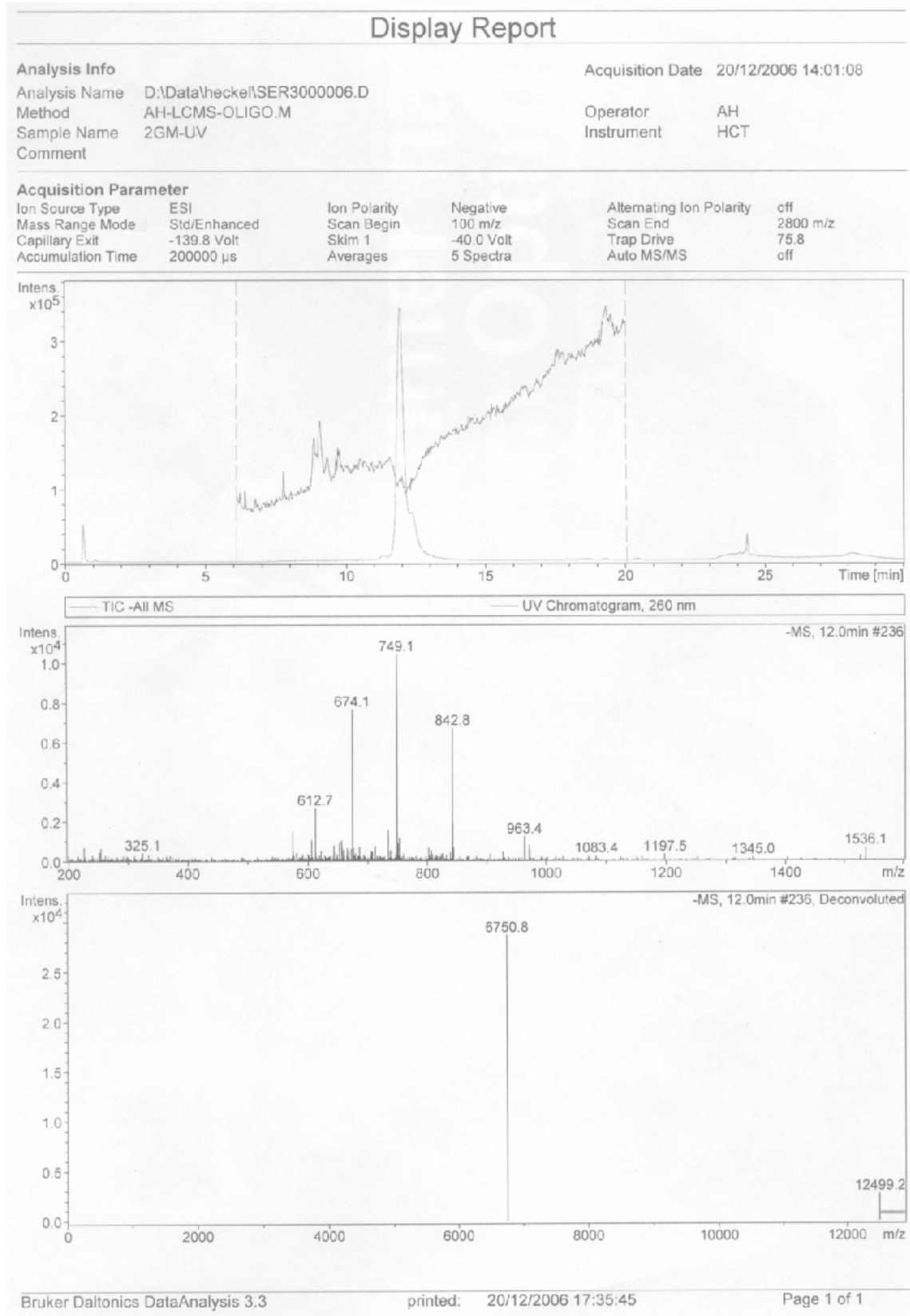




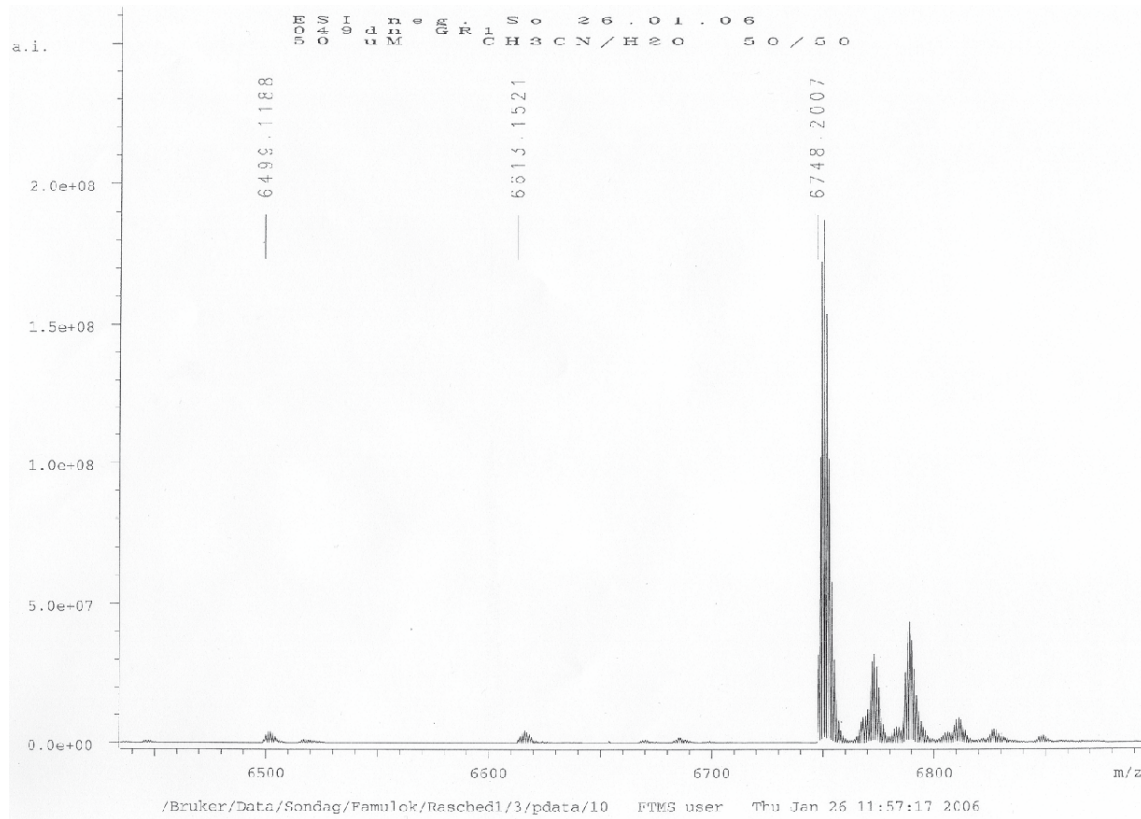
7.3.7 Oligonucleotidsequenz GRU1 (LC-ESI-MS)



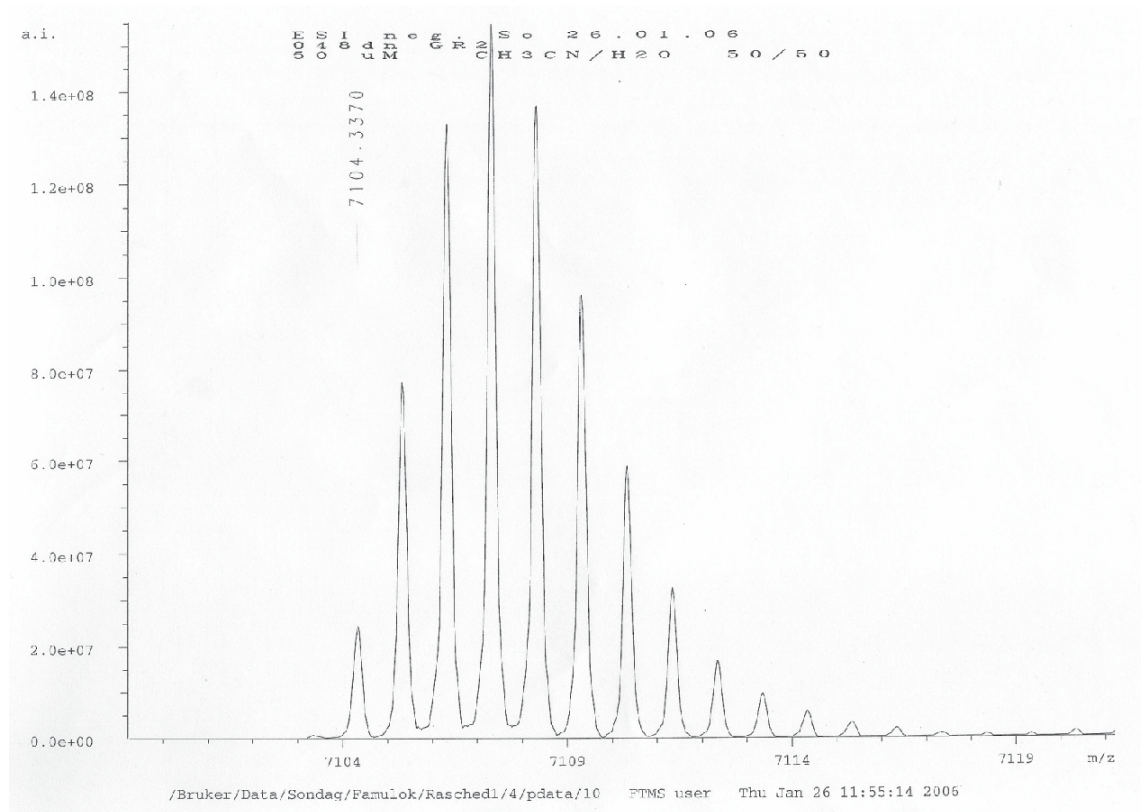
7.3.8 Oligonucleotidsequenz GRN1 (LC-ESI-MS)



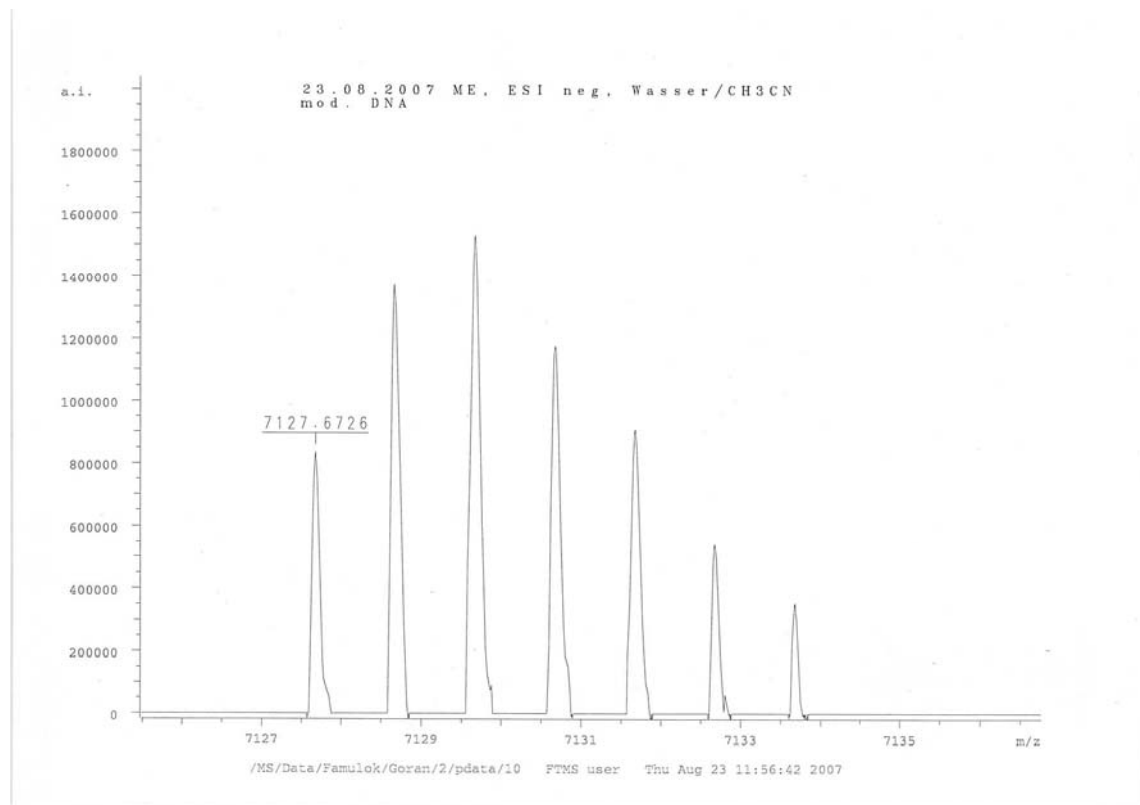
7.3.9 Oligonucleotidsequenz GRN1 (ESI-ICR-MS)



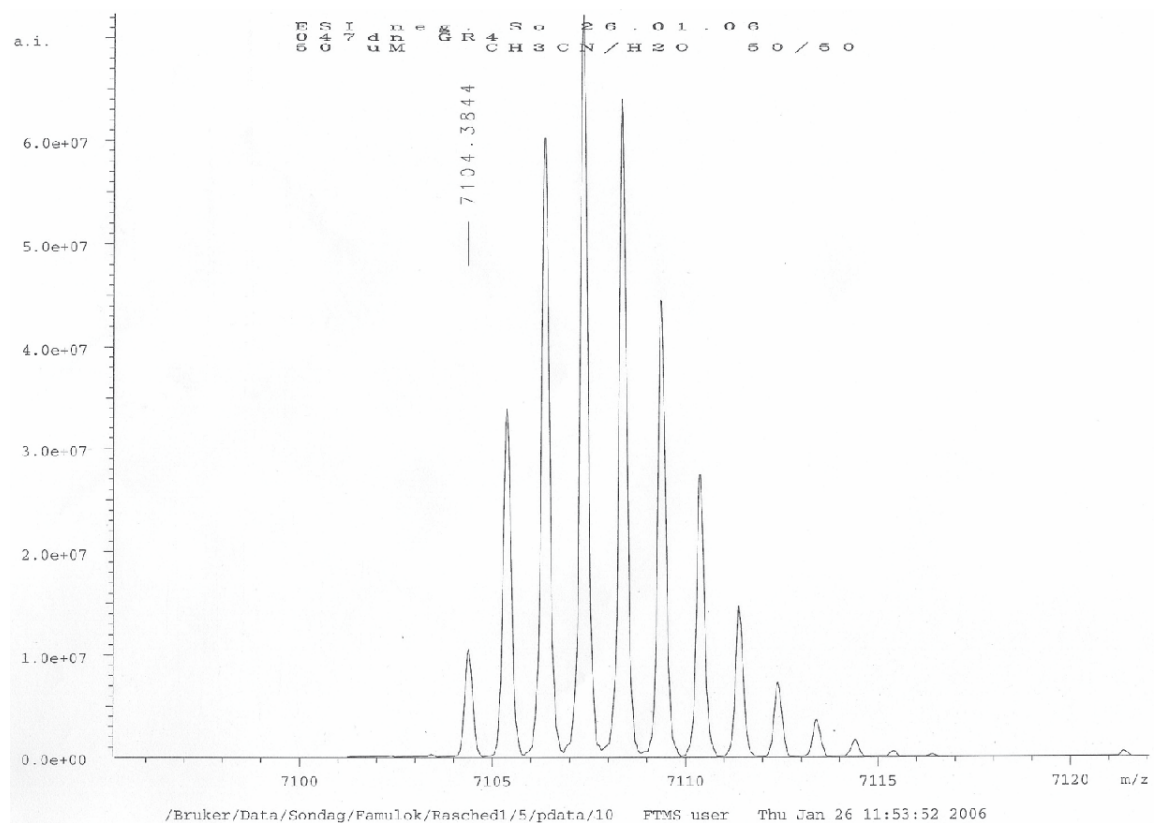
7.3.10 Oligonucleotidsequenz GRN2 (ESI-ICR-MS)



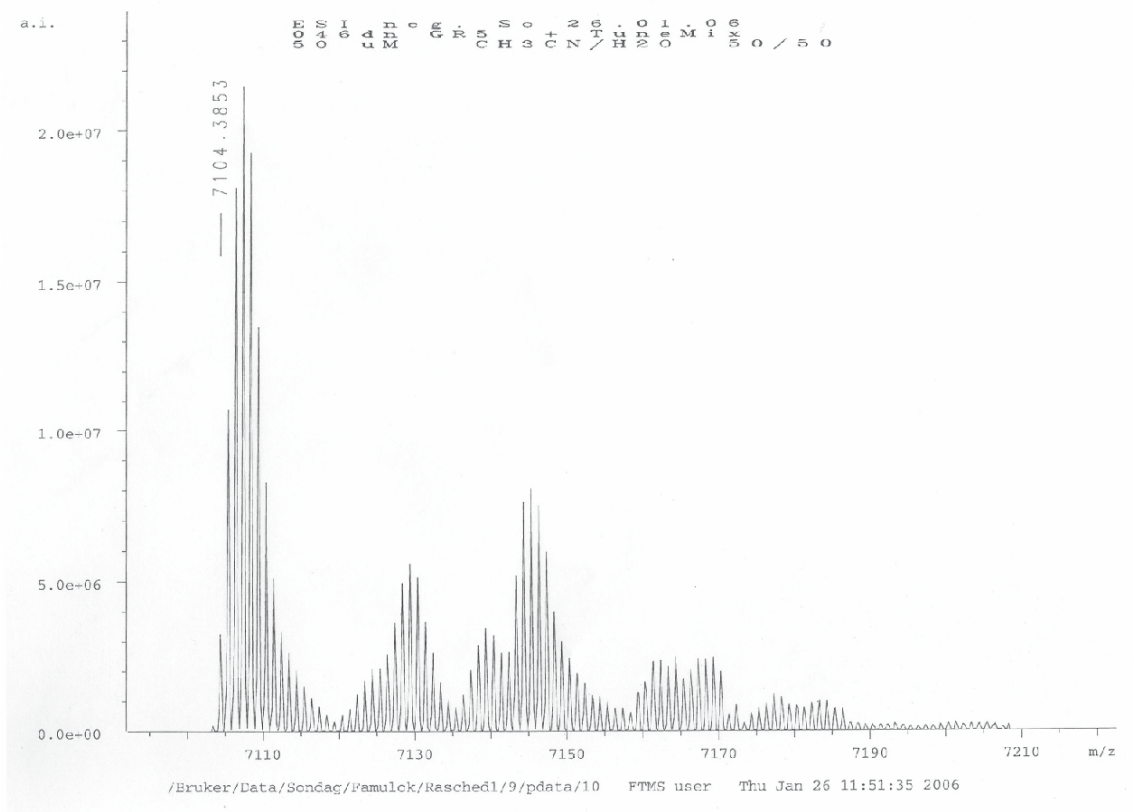
7.3.11 Oligonucleotidsequenz GRN3 (ESI-ICR-MS)



7.3.12 Oligonucleotidsequenz GRN4 (ESI-ICR-MS)



7.3.13 Oligonucleotidsequenz GRN5 (ESI-ICR-MS)



7.4 Danksagung

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. Michael Famulok, Life an Medical Sciences (LIMES) Institut der Universität Bonn, Abteilung Chemische Biologie, für die Vergabe des Themas und die engagierte Betreuung dieser Dissertation.

den Herren Priv.-Doz. Dr. Thomas Kolter, Prof. Dr. Jörn Piel und Prof. Dr. Alexander Heckel für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Alexander Heckel für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen, seine stete Hilfsbereitschaft und das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Damian Ackermann für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. Sven Freudenthal und Frau Ursula Mette für Hilfe in Fragen der Bürokratie.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Zentralanalytik für die Aufnahme von Spektren, Frau Dr. Marianne Engeser für die Aufnahme der ESI-ICR-Massenspektren und Alexander Hommes sowie Dr. Peter Broekmann für die Einführung in AFM.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitskreise von Prof. Dr. Michael Famulok, Prof. Dr. Alexander Heckel, Prof. Dr. Andreas Marx (Universität Konstanz) und Dr. Günter Mayer für das hervorragende Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und manchen Spaß im Labor und der wirklichen Welt.

Allen Praktikanten, ohne die vieles in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht hätte verwirklicht werden können.

Meinen lieben Freunden, die zu allen Zeiten hilfsbereit, unterstützend und freundschaftlich das Leben und die Arbeit verschönern.

Meiner lieben Freundin Lucie Nicole Schröter, die jederzeit für meine Arbeit und den damit verbundenen Aufwand Verständnis hatte.

Meinem Bruder Heinz Rasched, der das C-Programm „bender.c“ geschrieben hat, das es mir ermöglicht hat B-DNA Computermodelle zu Tori zu biegen.

Meiner Mutter für ihre Liebe und Unterstützung während meines Studiums und der Promotion.

Gewidmet meinen Großeltern Dora und Antun Lorenčić.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit selbst verfasst zu haben und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

(Goran Rasched)

Bonn, August 2007

