

3'-d(T-C-A-T-A-A-C-T-G-G-A-T)d-5'

***Darstellung und Verwendung von Nucleolipiden
zur Lipophilisierung von Nucleinsäuren
sowie
deren Wechselwirkung und Duplex-Bildung
an horizontalen Lipid-Bilayers und Phasengrenzen zur
Entwicklung
einer neuartigen RNA/DNA-Analytik***

Emma Werz

Osnabrück 2015

***Darstellung und Verwendung von Nucleolipiden
zur Lipophilisierung von Nucleinsäuren
sowie
deren Wechselwirkung und Duplex-Bildung
an horizontalen Lipid-Bilayers und Phasengrenzen zur Entwicklung
einer neuartigen RNA/DNA-Analytik***

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Biologie/Chemie

von

Emma Werz

vorgelegt dem Fachbereich Biologie/Chemie der



Osnabrück, 2015

Hauptberichterstatter: apl. Prof. Dr. Helmut Rosemeyer (Chemie)
Zweitberichterstatter: apl. Prof. Dr. Richard Wagner (Biophysik)
Prof. Dr. Lorenz Walder (Chemie)
Dr. Johann Klare (Physik)

Tag der Abgabe: 23. November 2015

Meiner Familie

*„Geheimnisvoll am lichten Tag
lässt sich Natur des Schleiers nicht berauben,
und was sie deinem Geist nicht offenbaren mag,
das kannst du ihr nicht ab mit Hebeln und mit Schrauben“*

Johann Wolfgang von Goethe, Faust, Teil 1. (Verse 672ff)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 15. April 2011 bis November 2015 am Institut für Chemie neuer Materialien der Universität Osnabrück in der Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie und unter der Betreuung von Herrn apl. Prof. Dr. H. Rosemeyer erstellt. Der experimentelle Teil wurde vom Mai 2011 bis Februar 2015 angefertigt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an künstlichen Lipidmembranen wurden sowohl im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück, Arbeitsgruppe Elektrophysiologie von Herrn apl. Prof. Dr. R. Wagner, als auch in der Firma Ionovation GmbH in Osnabrück durchgeführt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben, bedanken. Mein Dank geht an....

...Herrn apl. Prof. Dr. Helmut Rosemeyer für das sehr spannende und interdisziplinäre Thema, die freundliche Betreuung, die ständige Bereitschaft und die Zeit, das Verständnis bei wissenschaftlichen Fragen und Schwierigkeiten, sowie für sein großes Interesse an meiner Arbeit und die finanzielle Unterstützung dieses Vorhabens.

...Herrn apl. Prof. Dr. Richard Wagner für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe, die Bereitstellung von Laborräumlichkeiten und Gerätschaften während meiner biophysikalischen Messungen am Mikroskop, für die fachlichen Ratschläge und nicht zuletzt für die Übernahme des Zweitgutachtens.

...Herrn Prof. Dr. Lorenz Walder und an Herrn Dr. Johann Klare für ihre Teilnahme an der Prüfungskommission.

...Herrn Prof. Dr. Uwe Beginn für die Labor- und Arbeitsplatzausstattung sowie für die finanzielle Unterstützung.

...alle Kollegen der Arbeitsgruppe Elektrophysiologie/Biologie der Universität Osnabrück für mehr als nur die kollegiale Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank geht an Malayko Montilla-Martinez für die freundschaftliche Zusammenarbeit und an Claudius Walter für die umfangreiche Einarbeitung in die FCS-Methode.

...die Firma Ionovation GmbH, insbesondere an Dr. Karsten Gall, Roland Hemmler und Stefan Dartsch für die freundliche und erfolgreiche Kooperation und die finanzielle Unterstützung. Ein besonderer Dank geht an Niklas Brending für die Zusammenarbeit am „Filmprojekt“ und die Betreuung während der Messungen.

...alle Kollegen und Mitarbeiter der gesamten Arbeitsgruppe Organischen Chemie I für das über Jahre angenehme Arbeitsklima. Ein besonderer Dank geht an meine Laborkolleginnen und Freundinnen Vanessa Ottenhaus, Rebecca Viere und Anna Diestel für die spannende und unterhaltsame gemeinsame Zeit und vieles mehr.

...Herrn Dr. Sergej Korneev für die vielen fachlichen Ratschläge auf dem Gebiet der synthetischen und an Frau Dr. Natalja Ramzaeva für die freundliche Übernahme des Lektorats der Zusammenfassung dieser Arbeit in russischer Sprache.

...Marianne Gather-Steckhan und Petra Bösel für die zahlreichen NMR-Messungen und Anja Schuster für die Elementaranalysen.

...das VirtUOS-Team der Universität Osnabrück für die Aufnahmen und die Zusammenarbeit am „Filmprojekt“. Hier geht ein besonderer Dank an Marco Könemann und an Matthias Leimann für die Aufnahmen und die Bearbeitung des Films sowie an Frau Anna Hodge für ihre wundervolle Synchronstimme.

...die Frauenförderung der Universität Osnabrück für das Stipendium.

...einen guten Freund und Lektor, Herrn Dr. Axel Weber.

...meine Familie und Freunde und an Alexander für alles, was man nicht in Worte fassen kann. DANKE auch an alle, die ich hier nicht genannt habe.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen und Symbole	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Motivation und Problemstellung	1
1.2. Ziele der Arbeit.....	3
2. Stand der Forschung	7
3. Theoretische Grundlagen	9
3.1. Aufbau, Struktur und Funktionen biologischer Membranen	9
3.2. Membrangebundene Lipoproteine.....	14
3.3. Natürliche Nucleolipide	17
3.4. Planare Membranmodelle	20
3.5. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.....	22
4. Material und Methoden.....	25
4.1. Chemikalienliste.....	25
4.2. DNA-Modell-Sequenz	26
4.3. Neue synthetische Nucleolipide	27
4.4. Oligonucleotide und Lipo-Oligonucleotide	28
4.5. Physikalisch-chemische Methoden	29
4.6. Kombinierte Methode aus konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie und der Bilayer-Technik.....	30
4.6.1. Horizontaler Lipid-Bilayer.....	30
4.6.2. Fluoreszenz-Spektroskopische Untersuchungen	32
4.6.2.1. Messung der Fluoreszenzintensitäten im Bilayer	32
4.6.2.2. Messung der Diffusionszeiten.....	33
4.6.2.3. SG I-Interkalation als Nachweis der DNA-Hybridisierung am Bilayer	34
4.7. Photometrische Bestimmung der SGI I – Konzentration.....	35
4.8. Assemblierung von Lipo-Oligonucleotiden an flüssig/flüssig-Phasengrenzen.....	35
5. Darstellungen verschiedener Nucleolipide.....	36
6. Darstellungen von Nucleolipiden des Uridins und des 5-Methyluridins sowie ihren 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Derivaten	41
6.1. 2',3'-O-Ketalisierung des Uridins und des 5-Methyluridins	43
6.1.1. 2',3'-O-(1-Pentenylhexyliden)uridin (5a).....	43
6.1.2. 2',3'-O-(1-Nonyldecyliden)uridin (5b).....	44
6.1.3. 2',3'-O-(1-Tridecyltetradecyliden)uridin (5c).....	45
6.1.4. 2',3'-O-(1-Pentadecylhexadecyliden)uridin (5d).....	46
6.1.5. 2',3'-O-(1-Heptadecyloctadecyliden)uridin (5e).....	46
6.1.6. 5-Methyl-2',3'-O-(1-nonyldecyliden)uridin (6a).....	47

6.1.7.	5-Methyl-2',3'-O-(1-Pentadecylhexadecyliden)uridin (6b)	47
6.1.8.	5-Methyl-2',3'-O-(1-Heptadecyloctadecyliden)uridin (6c)	48
6.2.	Alkylierung am N(3) der 2',3'-O-ketalisierten Uridin- und 5-Methyluridin-Derivate	49
6.2.1.	2',3'-O-(1-Nonyldecyliden)-3-[(2E, 6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-yl]uridin (9).....	49
6.2.2.	5-Methyl-2',3'-O-(1-Nonyldecyliden)-3-[(2E, 6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-yl]uridin (10).....	50
6.3.	Darstellung der 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Bausteine 2',3'-O-ketalisierter Uridin- und 5-Methyluridin-Derivate	51
6.3.1.	5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-2',3'-O-(1-pentylhexyliden)uridin (7a).....	51
6.3.2.	5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-2',3'-O-(1-nonyldecyliden)uridin (7b)	51
6.3.3.	5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-2',3'-O-(1-heptadecyloctadecyliden)uridin (7c)	51
6.3.4.	5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-5-methyl-2',3'-O-(1-nonyldecyliden)uridin (8a).....	52
6.3.5.	5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-5-methyl-2',3'-O-(1-heptadecyloctadecyliden)uridin (8b)	52
6.3.6.	5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-2',3'-O-(1-nonyldecyliden)-3-[(2E,6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1yl]uridin (11).....	52
6.3.7.	5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-5-methyl-2',3'-O-(1-nonyldecyliden)-3-[(2E,6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1yl]uridin (12).....	52
7.	Ergebnisse und Diskussion.....	53
7.1.	Lipophilie.....	53
7.2.	$\Delta\delta$ -Werte der ^{13}C -NMR Resonanzen von C-1' der O-2',3'-Ketale	55
7.3.	Einlagerung lipophiler Oligonucleotide in Lipid-Bilayer	57
7.3.1.	Vorversuchsreihe: Wechselwirkung prenylierter und/oder ketalisierter Oligonucleotide am Lipid-Bilayer	57
7.3.2.	Einfluss variierender lipophiler Kopfgruppen auf das Einlagerungsverhalten im Bilayer	62
7.3.2.1.	Anreicherung des LON 19 an der Luft/Wasser-Phasengrenze	71
7.3.2.2.	Zusammenhang zwischen der Struktur der lipophilen Kopfgruppe der LONs und ihrer Stabilität im Lipid-Bilayer	73
7.4.	Spektroskopische und hydrodynamische Eigenschaften der LONs.....	76
7.4.1.	Diffusionskoeffizienten der Lipo-Oligonucleotide.....	76
7.4.2.	Hydratation lipophilisierter Oligonucleotide	80
7.5.	DNA-Duplexbildung am Lipid-Bilayer	83
7.5.1.	Vorversuchsreihe: Bildung von DNA-Duplexen zwischen Lipo-Oligonucleotiden und ihren Gegensträngen am Lipid-Bilayer.....	83
7.5.2.	Interkalation von SYBR Green I in DNA-Duplexe am Lipid-Bilayer	89
7.5.3.	FCS-Helligkeitsmessungen SYBR Green I-markierter DNA-Duplexe am künstlichen Lipid-Bilayer	90
7.6.	Diffusionszeiten von Lipo-Oligonucleotiden und DNA-Duplexen im und um den Bilayer	106

7.6.1. Diffusionszeiten einzelsträngiger Lipo-Oligonucleotide	107
7.6.2. Diffusionszeiten lipophilisierter DNA-Duplexe	110
7.7. Assemblierung lipophiler Oligomere an flüssig/flüssig Phasengrenzen ohne Lipid-Bilayer	114
8. Zusammenfassung.....	117
9. Summary.....	120
10. Резюме	122
11. Ausblick	124
12. Literaturverzeichnis	126
13. Anhang.....	139
13.1. Publikationsliste und andere wissenschaftliche Arbeiten.....	139
13.2. Lebenslauf	141
13.3. Eigenständigkeitserklärung	142

Abkürzungen und Symbole

A	<i>a</i>	längerer Halb-Achsenabschnitt; Summe aus a_1 , a_2 und a_3
	Abs	Absorption
	Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
	Å	Angström; $1 \cdot 10^{-10}$ m
B	b_{hyd}	hydratisierter, kürzerer Halb-Achsenabschnitt <i>b</i>
	bp	Basenpaar (engl. base pair)
C	^{13}C	Kohlenstoff-Isotop
	°C	Grad Celsius
	CDCl ₃	deutertes Chloroform
	cis	oberer Kanal / Kompartiment der Bilayer Slide; über dem Bilayer; in diesen Kanal werden die Proben zugegeben
	Cy3	Indocarbocyanin 3
	Cy5	Indocarbocyanin 5
D	3D	drei-dimensional
	<i>d</i>	Schichtdicke
	<i>d</i>	Dublett
	<i>dd</i>	doppeltes Duplett
	<i>D</i>	Diffusionskoeffizient
	DC	Dünnschichtchromatographie
	D_{calc}	theoretisch berechneter Diffusionskoeffizient
	dest.	destilliert
	D_{exp}	experimentell ermittelter Diffusionskoeffizient
	$\Delta\delta$	Abstände chemischer Verschiebung in ^{13}C -Spektren zwischen C(1a'') und C(1b'')
	δ	Chemische Verschiebung in ppm
	δ	Wert der Hydratation in g H ₂ O pro g Molekül
	DEPT-135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer; Impulswinkel $\theta = 135^\circ$
	DMF	Dimethylformamid
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DMSO- <i>d</i> ₆	deutertes DMSO
	DMTr	4',4'-Dimethoxytriphenyl-Schutzgruppe am 5'-OH der Nucleoside
	DNA	Desoxyribonucleinsäure
	dsDNA	doppelsträngige DNA
E	$\epsilon_{\lambda_{\text{max}}}$	Extinktionskoeffizient bei λ_{max}
	<i>f</i>	Reibungskoeffizient
F	Farn	Farnesyl-Gruppe
	f_{calc}	theoretisch berechneter Reibungskoeffizient
	FCS	Fluoreszenz-Korrelations Spektroskopie
	Φ	Bindungswinkel zwischen C-1a'' – C _{Acetal} – C-1b''
	fL	Femtoliter
	G	<i>g</i>

H	^1H	Wasserstoff-Isotop
	h	Stunde
	Hünig-Base	N,N-Diisopropylethylamin
J	^2J	Kopplungskonstante über zwei Bindungen, vizinale Kopplung
	^3J	Kopplungskonstante über drei Bindungen
K	k_B	Boltzmann-Konstante
	KCl	Kaliumchlorid
	kHz	Kilohertz
L	$^{10}\log P_{ow}$	logarithmischer Verteilungskoeffizient zwischen Oktanol und Wasser
	LON	Lipo-Oligonucleotid
	λ_{max}	Absorptionsmaximum
M	12-mer	Dodekamer; Nucleotidoligomer aus 12 Nucleobasen
	m	Multipllett
	MALDI-TOF	Matrixunterstützte Laserdesorptions / ionisations-Flugzeit (engl. Matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight)
	MHz	Megahertz
	miRNA	microRNA
	mL	Milliliter
	mM	Millimolar
	MMFF94	Merck Molecular Force Field; Programmpaket zur Kraftfeldmethode
	MMT	Monomethoxytrityl-Gruppe; Schutzgruppe
	mN/m	Millinewton pro Meter; Einheit der Oberflächenspannung
	MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
	μg	Mikrogramm
	μL	Mikroliter
	μW	Mikrowatt
	ms	Millisekunde
	m/z	Masse/Ladungsverhältnis
	N	N_A
NL		Nucleolipid
nm		Nanometer
NMR		Kernresonanzspektroskopie (engl. Nucleic magnetic resonance)
O	OD	optische Dichte
P	^{31}P	Phosphor-Isotop
	POPC	1-Palmitoyl-2-oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
	POPE	1-Palmitoyl-2-oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
	ppm	parts per million
	P_R	R-Diastereomer des Phosphoramidits
	P-Reagenz	2-Cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidit
	P_S	S-Diastereomer des Phosphoramidits
	PTFE	Polytetrafluoroethylen; Teflon
Q	q	Quartett
R	R	Restgruppe

	R_f	Retentionsfaktor (engl. ration of fronts)
	ρ	Dichte <i>in</i> g/cm ³
	RNA	Ribonucleinsäure (engl. ribonucleic acid)
	RT	Raumtemperatur
S	s	Sekunde
	s	Singulett
	Schmp.	Schmelzpunkt
	SG	SYBR Green I
	siRNA	kleine eingreifende RNA (engl. small interfering RNA)
	ssDNA	einzelsträngige DNA (engl. single stranded DNA)
T	T	Temperatur
	t	Triplett
	τ_D	Diffusionszeit
	τ_F	Fluoreszenz-Lebenszeitdauer
	trans	unterer Kanal bzw. Kompartiment der Bilayer Slide; unter dem Bilayer
	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	tRNA	transfer RNA
U	UV	Ultravioletter Bereich des Lichts
V	V_{anh}	Volumen ohne Hydrathülle
	V_{hyd}	Volumen mit einer Hydrathülle
	\hat{v}	partiell spezifisches Volumen
	Vis	visueller Bereich des Lichts
	% (v/v)	Volumenprozent

1. Einleitung

1.1. Motivation und Problemstellung

„Bionik verbindet in interdisziplinärer Zusammenarbeit Biologie und Technik mit dem Ziel, durch Abstraktion, Übertragung und Anwendung von Erkenntnissen, die an biologischen Vorbildern gewonnen werden, technische Fragestellungen zu lösen“ (VDI 6220, 2013)¹ [1].

Laut Definition sind die biologischen Vorbilder *„biologische Prozesse, Materialien, Strukturen, Funktionen, Organismen und Erfolgsprinzipien sowie der Prozess der Evolution“* (BIOKON e. V.)² [2].

Die Analyse von Genen und Genfragmenten basiert derzeit auf der sogenannten DNA-Chip-Technologie, welche das technische Verfahren aus der Halbleiterindustrie zur Identifikation und Aktivitätsmessung bestimmter Gene anwendet. Gegen Ende der 1980er Jahre entwickelten Stephen P. A. Fodor und L. Stryer einen Micro-Chip, bei dem die DNA-Sonden direkt auf der Oberfläche der Matrix synthetisiert wurden [3], 1994 kam der erste Gen-Chip unter dem Namen HIV Gene Chip von Affymetrix [4] auf den Markt. Mit Hilfe von solchen Chips ist es heute möglich, weit mehr als 100.000 Gensequenzen aus diversen Geweben zu identifizieren und die Aktivität des entsprechenden Gens in einer Gewebeprobe zu messen. Die DNA-Chips bzw. DNA-Microarrays werden entweder über die Synthese von Sondenoligonucleotiden an festen Trägeroberflächen unter Einsatz von Masken und dem photolithographischen Verfahren, als auch über vorsynthetisiertes und terminal funktionalisiertes, über kovalente Bindungen an Oberflächen fixierte Sondenoligonucleotide hergestellt. Diese Microarrays werden sowohl zur Analyse über Änderungen der Genexpression, als auch zur Bestimmung vom Genmaterial eingesetzt.

Bei diesen Microarrays wird das zu analysierende Genmaterial auf eine feste, in Felder segmentierte Plattform eines Nylonfilters [5] oder auf einer Glasoberfläche [6] aufgetragen, die vorher mit verschiedener fluoreszenzmarkierter ssDNA oder ssRNA beschichtet worden war. Die Probe wird mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend auf das präparierte Microarray aufgebracht. Sollte auf dem Chip eine komplementäre Nucleotidsequenz vorliegen, bindet die Probe an das

¹ VDI e. V.: Verein Deutscher Ingenieure e. V.; Bionikrahmenrichtlinie VDI 6220 (2013): Bionik: Konzeption und Strategie – Abgrenzung zwischen konventionellen und bionischen Verfahren/Produkten

² BIOKON e. V.: Bionik-Kompetenznetz e.V.; <http://www.biokon.de/bionik/was-ist-bionik/>

Substrat, so dass aus den beiden Fluorophoren eine Mischfluoreszenz detektiert werden kann. Diese Untersuchungsmethode wird in mehreren Schritten durchgeführt: (i) das zu analysierende Genmaterial wird aufgearbeitet (Isolierung, PCR. etc.), (ii) im Falle der Komplementarität des Probenmaterials mit dem Substrat kommt es zur Hybridisierung der Nucleinsäuren auf dem Microarray, (iii) die Chipoberfläche wird gespült, um die ungebundene DNA zu entfernen, (iv) die hybridisierten Nucleinsäuresequenzen werden nacheinander mit einem grünen und roten Laser gescannt. (v) Die Daten werden analysiert, indem die aufgenommenen Laserbilder übereinander gelegt und auf rote, grüne und gelbe Spots ausgewertet werden ^[7].

Beide Herstellungsmethoden der DNA-Microarrays sind fehlerbehaftet. Für die erste Methode ist neben der Synthese der Substrat-Oligonucleotide direkt an der Chip-Oberfläche auch eine aufwendige Schutzgruppen-Technik mit anschließenden Waschvorgängen erforderlich. Das macht diese Methode sehr kompliziert und aufwendig in der Durchführung, besonders wenn auf dem Chip eine Vielzahl an verschiedenen Nucleinsäuresequenzen angebracht werden soll. Bei der zweiten Methode muss die feste Chip-Oberfläche – meistens handelt es sich um Glasplatten – vorher in einem aufwendigen Prozess mit funktionellen Gruppen aktiviert werden, um in ähnlicher Weise wie bei den vorgefertigten funktionalisierten Nucleinsäuren mit Oligonucleotiden bekannter Sequenz belegt zu werden. Bei dieser „Spotting-Methode“ handelt es sich ebenfalls um ein kompliziertes und aufwändiges Verfahren, bei dem eine spezielle Oberflächenchemie zwischen den vorgefertigten funktionalisierten Nucleinsäuren und den aktivierten funktionellen Gruppen am Glas durchgeführt wird, um die Nucleinsäuren über kovalente Bindungen an der Glasoberfläche anzubringen ^[6, 8].

Im Rahmen dieser Arbeit werden Experimente zu einer neuartigen DNA Chip Technologie ohne den Einsatz von Oberflächenchemie vorgestellt, die auf der spontanen Selbstorganisation und Duplex-Bildung von Lipo-Oligonucleotid Konjugaten an einem Lipid-Bilayer beruht ^[9-10]. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden eine erste Grundlage für diese neue RNA/DNA-Analytik ohne den Einsatz von festem Oberflächenmaterial. Dazu werden Nucleotide mit Naturstoffen, wie den azyklischen Terpenen, z.B. Farnesyl-, Geranyl-, Phytol-Gruppen sowie den symmetrischen Wachs-Ketonen, z.B. das langkettige Hentriacontan-16-on modifiziert, um zwei in der Natur vorkommende Verbindungen zuerst zu einem Nucleolipid zusammenzuführen und anschließend zu einem Oligonucleotid zu erweitern. Dadurch erwirbt die neue Verbindung die hydrophobe Eigenschaft der lipophilen Terpene oder Wachs-Ketone und

erlangt so die Fähigkeit zur Membranverankerung. Dass spezifische Proteine in der lebenden Zelle über Prenyl-, Fettsäure- oder Ceramid-Gruppen in der Membran verankert werden, ist bereits bekannt. Neu ist die Entdeckung geranylierter tRNA in verschiedenen Bakterien durch Dumelin et al. (2012) ^[11]. Die Geranyl-Gruppe soll die Codon- und Rasterverschiebung beeinflussen. Durch das Einführen diverser lipophiler Naturstoffe, z.B. Lipide in Nucleoside werden die biologische Struktur und Funktion der Lipide wie die Membranverankerung auf die Nucleoside und von da aus auf die synthetischen DNA-Oligonucleotide übertragen. Diese neu erworbenen Eigenschaften werden an künstlichen Lipidmembranen und Phasengrenzen untersucht.

Diese Analytik soll ihren Einsatz beim einfachen Nachweis bestimmter DNA/RNA Fragmente finden. So könnte sie Einsatz in der Geflügelzucht zur Geschlechteridentifizierung finden, indem das Geschlecht der Küken bereits im Ei identifiziert wird. In der heutigen Geflügelzucht landen allein in Deutschland 50 Millionen Eintagsküken jährlich auf dem Müll (PETA Deutschland e. V.) ^[12]. Dazu führt das Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen im Handlungsfeld Tierschutz zur Problematik der Tötung männlicher Eintagsküken die Geschlechteridentifizierung im Ei als einen möglichen Lösungsansatz auf (Frühjahrstagung der Agrarsozialen Gesellschaft e.V., Münster, 21.-22.05.2014) ^[13].

Darüber hinaus kann diese Technik in der biomedizinischen Diagnostik und Charakterisierung von Erbkrankheiten und Infektionen sowie in der Identifizierung genetischer Defekte Verwendung finden. So entwickeln bereits einige Unternehmen (z.B. Sequenom und Illumina) kommerzielle Bluttests, die in der Pränataldiagnostik zur schnellen, einfachen und kostengünstigen Analyse eingesetzt werden sollen ^[14].

1.2. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation soll erstmals eine Vielzahl an synthetischen Lipo-Oligonucleotiden mit variierenden terminalen Nucleolipid-Bausteinen systematisch auf ihr Einlagerungsverhalten in künstliche Lipid-Bilayermembrane untersucht werden. Im Mittelpunkt des Interesses steht die Verankerung der Oligonucleotide in der Lipidmembran über die terminalen lipophilen Gruppen. Insbesondere soll untersucht werden, wie fest diese Gruppen die Nucleotidsequenz in der Membran verankern und welchen Einfluss die Struktur, die Länge und die Anzahl dieser Nucleolipide darauf nehmen.

Die Dissertation beginnt mit der Darstellung und der Charakterisierung einer Reihe von Nucleolipiden des Uridins und des 5-Methyluridins. Die lipophilen Reste werden entweder am glyconischen Teil des Nucleosids und/oder an der heterozyklischen Base eingeführt und schließlich zu 5'-O-2-(Cyanoethyl)-Phosphoramiditen umgesetzt. Zur Lipophilisierung der Nucleosidbasen werden verschiedene, teils biomimetische Moleküle, wie die azyklischen Terpenoid-Gruppen Farnesyl und Geranyl oder symmetrische Wachs-Ketone unterschiedlicher Länge (C₆- bis C₁₈-Ketten) genutzt. Diese Lipidkomponenten werden an unterschiedlichen Positionen, wie hier im Falle der Pyrimidin-Nucleoside, eingeführt (vgl. **Abbildung 1**).

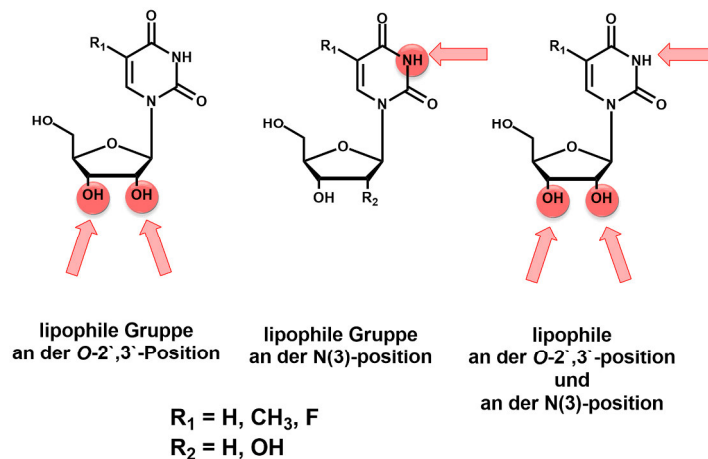


Abbildung 1. Positionen zur Lipophilisierung der Pyrimidin-Nucleoside (Uridin, Thymidin, 5-Methyluridin und 5-Fluorouridin) an N(3)- und/oder O-2',3'-Position.

Die lipophilen Gruppen werden an der O-2',3'-Position der glyconischen Hydroxylgruppen und/oder am N(3)-Atom der Pyrimidin-Base bzw. am N(1)-Atom der Purin-Base des Inosins eingeführt. Zur Lipophilisierung der Nucleoside werden Terpenoid-Gruppen über eine Direktalkylierung mit dem jeweiligen Terpenylbromid an die N(3)-Position und zyklische sowie azyklische symmetrische Ketone über eine Ketalisierungsreaktion in die O-2',3'-Position am glyconischen Teil des Nucleosids eingeführt. Im Mittelpunkt des Interesses stehen die lipophilen Eigenschaften der neuen Nucleolipid-Verbindungen. In diesem Zusammenhang wird der Einfluss der Länge der Lipid-Gruppe auf die theoretisch berechneten $^{10}\log P_{ow}$ -Werte sowie die experimentell ermittelten R_f -Werte untersucht. Über die automatische DNA-Festphasensynthese werden diese aktiven Synthesebausteine terminal am 5'-Ende zu Oligonucleotiden erweitert, die z.T. zusätzlich einen Fluoreszenzfarbstoff tragen (externe Auftragssynthese). Prinzipiell können alle diese dargestellten, an der Base alkylierten 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidite der 2'-Desoxynucleoside an jeder Position der wachsenden Nucleinsäurekette über konventionelle Festphasen-Synthese

eingebaut werden, so dass die Oligonucleotid-Kette an jeder beliebigen Position hydrophobisiert werden kann (vgl. **Abbildung 2**).

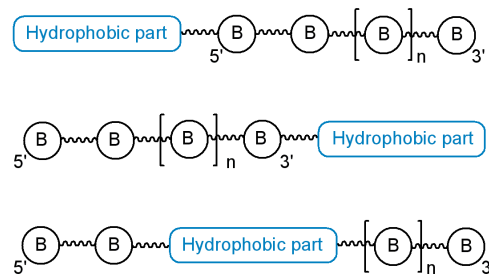


Abbildung 2. Verschiedene Positionen für Nucleolipide (blau; „Hydrophobic Part“) innerhalb der Nucleinsäurekette. Der hydrophobe Teil kann entweder terminal am 5'- oder am 3'-Ende eingefügt werden oder innerhalb der Nucleinsäurekette [15, S. 1327; 16, S. 40].

Die lipophilen Seitenketten werden an dem Atom der Nucleobase eingeführt, welches an der Watson-Crick Basenpaarung beteiligt ist, so dass es sich bei diesen DNA-Bausteinen um reine Hydrophobisierungs-Werkzeuge auf der Basis einer Nucleosidstruktur handelt. Als Seitenketten werden, z.B. azyklische Mono- und Sesquiterpene, wie Geranyl- oder Farnesyl-Gruppen eingesetzt, weil diese Verbindungen verschiedene Proteine post-translational prenylieren, damit sich diese in biologische Membrane einlagern können^[17]. Im zweiten Abschnitt dieser Dissertation werden erste Untersuchungen zum Einlagerungsverhalten einiger Fluorophor-markierter Lipo-Oligonucleotide (LONs) in künstliche Lipidmembrane durchgeführt (vgl. **Abbildung 3**), welche der Auswahl geeigneter Nucleolipide für Versuche zur Spezifität der Basenpaarung komplementärer Oligonucleotidstränge an Phasengrenzoberflächen (flüssig/flüssig oder Gas/flüssig) dienen. Ziel der Arbeit ist die Konzeption eines Nucleinsäure-Chips ohne kovalente Immobilisierung von Sondenoligonucleotiden an festen Oberflächen.

In diesen Versuchsreihen werden zuerst LONs mit variierenden Nucleolipid-Kopfgruppen auf ihr Einlagerungsverhalten in der Lipidmembran untersucht. Hier gilt es festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Struktur der Lipid-Gruppe, ihrer Lipophilie und ihrem Einlagerungsverhalten in der künstlichen Lipidmembran besteht. In diesem Rahmen werden auch die hydrodynamischen Eigenschaften einer Reihe lipophilisierter Oligonucleotide bestimmt. Dass sich synthetische LONs in diese Art von Membranen einlagern, konnte bereits an einem ersten Versuch im Rahmen meiner Masterarbeit mit dem Titel „*Terpenoid-Nucleosid Konjugate: Darstellung von DNA-Synthesebausteinen des N(3)-Farnesyl- und des N(3)-Geranyl-Thymidins*“, 2010 bestätigt werden^[18].

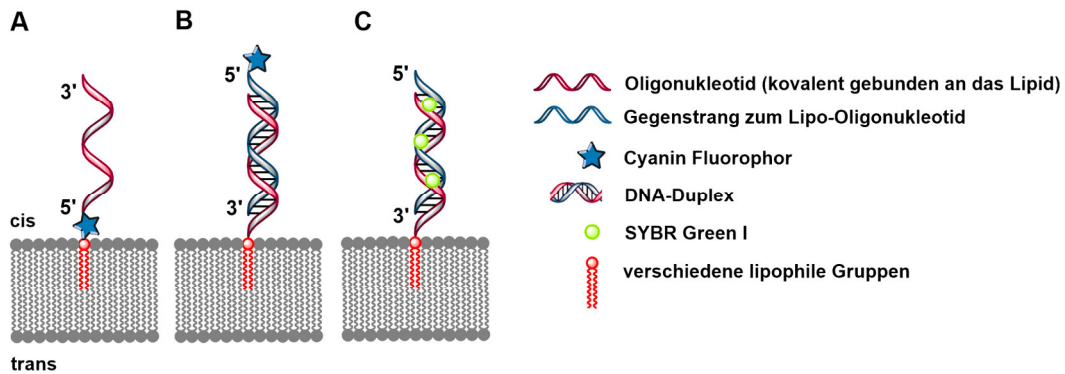


Abbildung 3. Schematische Darstellung zu geplanten Bilayer-Insertions- und DNA-Hybridisierungsversuchen an der künstlichen Lipidmembran. **A.** Einlagerung einzelsträngiger DNA-Dodekamere mit verschiedenen terminalen Nucleolipid-Gruppen. **B.** DNA-Duplex-Bildung am Lipid-Bilayer zwischen einem im Bilayer eingelagerten Lipo-Oligonucleotid und einem komplementären Fluorophor-markierten Gegenstrang. **C.** Anders als in B. wird hier der DNA-Duplex mit dem DNA-Interkalator SYBR Green I markiert.

In dieser Arbeit soll erstmals das Einlagerungsverhalten diverser LONs in einem horizontalen künstlichen Lipid-Bilayer und ihre Duplex-Bildung an dieser Membran systematisch untersucht werden. Dabei liegt der Fokus dieser Versuche auf der Effektivität, d.h. auf der Kinetik und Stabilität der Einlagerung. Dazu werden die Diffusionszeiten im und um den Bilayer gemessen. Durch automatisierte Perfusionsvorgänge soll die Festigkeit der Verankerung der LONs im Bilayer festgestellt werden, nachdem die Helligkeit dieser Bilayermembran verglichen wird. Des Weiteren gilt es herauszufinden, ob sich auch DNA-Duplexe zwischen lipophilisierten und nicht-lipophilisierten komplementären Strängen an der Bilayermembran bilden. Zum Nachweis der DNA-Duplex-Bildung am Bilayer wird der zum eingelagerten LON komplementäre Gegenstrang erst mit einem kovalent gebundenem Cyanin-Farbstoff versehen. In einer weiteren Versuchsreihe werden die DNA-Duplexe nicht mehr über den kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoff, sondern durch den Einsatz des fluoreszierenden DNA-Interkalators SYBR Green I nachgewiesen. Mit dem Einsatz von SG als DNA-Detektor wird diese Methode kostengünstiger und zeitsparender, da damit der Syntheseschritt zur kovalenten Bindung von z.B. Cy5 an das Oligomer entfällt. In dieser Versuchsreihe gilt es herauszufinden, welchen Einfluss das Variieren der DNA-Sequenzen in Länge und Komplementarität auf die Wechselwirkung von SYBR Green I hat. Auch hierzu werden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und die Helligkeit des Bilayers verglichen. Zum Schluss soll mit Hilfe ausgewählter LONs gezeigt werden, ob sich diese modifizierten Oligonucleotide an Flüssig/flüssig- oder an Gas/flüssig Phasengrenzen akkumulieren und damit die Entwicklung eines neuartigen, vereinfachten Nucleinsäure-Chip ermöglichen (vgl. **Abbildung 4**)^[9,19].

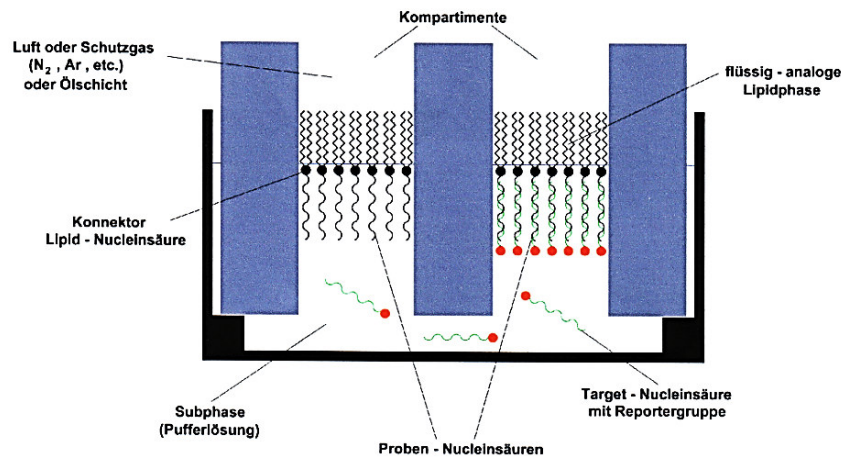


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Funktionsweise der Vorrichtung und des Verfahrens zum Nachweis von spezifischen Sequenzen (Target-Nucleinsäuren). Die lipophilisierten Oligonucleotide ordnen sich an der Gas/flüssig-Phasengrenze so an, dass die Nucleinsäuresequenzen in die wässrige Phase reinragen. An diese lagern sich die dazu komplementären Target-Nucleinsäuren mit einer Reporter-Gruppe (z.B. Cyanin-Farbstoff) an und formen Duplexe. Bei einer Anregung der Reporter-Gruppe am DNA-Duplex fluoresziert die Phasengrenze [9,19].

2. Stand der Forschung

Für die Funktion einer Zelle ist die biosynthetische Lipophilisierung von Proteinen und Kohlenhydraten über eine Palmitoylierung oder Farnesylierung von entscheidender Bedeutung [17]. Tatsächlich werden nicht nur Membranproteine und Kohlenhydrate lipophilisiert. Mit der Entdeckung geranylierter tRNA in verschiedenen Bakterien [11] erweiterten Dumelin et al. (2012) das Verständnis biosynthetischer Lipophilisierung. In den letzten Jahren ist ein stetig wachsendes Interesse für sogenannte Lipo-Oligonucleotide zu beobachten [15,20-22]. Die Untersuchung der Wechselwirkungen einzel- und doppelsträngiger Nucleinsäuren mit dem Lipid-Bilayer ist daher von großer Bedeutung, besonders aus folgenden Gründen: 1. zur Verbesserung der in-vivo Übertragung lipophiler siRNA [23-25] 2. für die Entwicklung analytischer Verfahrenstechniken zum Nucleinsäurenachweis [9,19,26], 3. für die Strukturaufklärung von Komplexen, die durch eben solche natürlichen Nanostrukturen aggregieren [27-28] und 4. für die Zelloberflächen-Technik [29]. Des Weiteren finden synthetische Lipo-Oligonucleotide Verwendung zur Aufklärung der Vesikel-Fusion, ähnlich der SNARE-Proteine [30-31]. Im Zusammenhang mit den DNA-Hybridisierungsuntersuchungen werden neben den klassischen kovalent-gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen verstärkt diverse sensitivere DNA-Interkalatoren wie SYBR Green I, einem fluoreszierenden Indikator für dsDNA, eingesetzt [32-35]. Das hat den Vorteil, dass die Ziel-DNA nicht mehr mit einem Fluorochrom wie dem Cyanin-5 (Cy5) oder dem Cyanin-3 (Cy3) über chemische Synthese oder über die PCR markiert werden muss.

Nucleolipide sind Hybridmoleküle aus organischen Komponenten wie einem Lipid-Rest und einer Nucleobase, einem Nucleosid, Nucleotid oder Oligonucleotid^[10]. Aufgrund der Fähigkeit der Nucleolipide, komplexe Nanostrukturen zu bilden^[27-28] und sich über Selbst-Assemblierung zu größeren Aggregaten wie Micellen, Vesikeln^[20] und Bilayern zu organisieren^[36], bietet diese Verbindungsklasse eine Vielzahl an Möglichkeiten, z.B. für die Medikamentenverabreichung (Galenik)^[20]. Gleichzeitig gerät die Wechselwirkung solcher Nanostrukturen mit den Lipidmembranen immer mehr in den Fokus^[27-28, 37-40].

Die Synthese von Nucleolipiden geschah in der Vergangenheit im Wesentlichen aus zwei Intentionen heraus: (i) die Verknüpfung zwischen einem Nucleosidantimetaboliten oder einem pharmakologisch aktiven Oligonucleotid (z.B. einem Antisense-Oligonucleotid) und einer Lipidkomponente diene zur Verbesserung der Membranpermeabilität eines Pharmakons oder (ii) zur erhöhten Stabilität eines Oligonucleotid-Duplexes oder -Triplexes^[10,41]. Ein besonderer Meilenstein dieser Forschung ist die in-vivo Ausschaltung von microRNA durch die sogenannten Antagomire^[42]. Barthélémy et al. haben in den letzten Jahren eine Vielzahl an neuen Erkenntnissen zu synthetischen Nucleolipiden gewonnen und verschiedene Aspekte zu Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten aufgezeigt^[15,43-47]. Eine wichtige Anwendungsmöglichkeit der Nucleolipide beruht auf ihren Hydro- und Organogelatoreigenschaften^[48]. Über die Einlagerung von Oligonucleotid-Lipid-Konjugaten in Plasmamembranen und ihre Hybridisierung mit komplementären Nucleinsäuren an der Membranoberfläche berichteten G. G. Borisenko et al. (2009)^[49]. Auch aus Deutschland wurde über die Synthese lipophiler Nucleosid- und Oligonucleotidderivate und deren Insertion in Lipidmembranen sowie über deren Wechselwirkungen mit komplementären DNA-Strängen in diversen Publikationen berichtet^[50-54].

Ein zweiter wichtiger Aspekt der Nucleolipidforschung befasst sich mit Untersuchungen zu ihrer Aggregatbildung und mit deren supramolekularen Strukturen. Die Arbeitsgruppe um P. Baglioni und D. Berti beschäftigte sich mit der Struktur und der molekularen Erkennung von Nucleolipidaggregaten^[55-57]. Mit der Entdeckung des Gen-Silencing über kurze Nucleinsäuren (siRNA)^[42], wurde eine neue therapeutische Methode zur Bekämpfung von Krebs eingeführt^[58-61]. Diese Untersuchungen kulminierten in der Synthese der sogenannten Antagomire. Das sind kurze modifizierte Oligonucleotide, bestehend aus 2'-O-Methyl- β -D-ribonucleosiden und mehreren Phosphorothioat-Internucleotiden Verknüpfungen an beiden Termini sowie einem Cholesterol-Molekül am 5'-Ende. Diese Modifikationen verhindern, dass die ver-

gleichsweise instabilen RNA-Moleküle in der Zelle enzymatisch abgebaut werden. Ferner macht die Cholesterol-Modifikation das Oligomer permeabel für die Zellmembran ^[62] und könnte als ein vielversprechendes Werkzeug zur Geneinschleusung in Betracht gezogen werden.

Diese chemisch synthetisierten Oligonucleotide sind komplementär zu einer spezifischen zelleigenen Ziel-miRNA. Wie genau der Wirkmechanismus der Antagomire aussieht, ist zurzeit noch weitgehend unbekannt. Es liegt aber nahe, dass die Antagomire irreversibel an die Ziel-mRNA binden und so die zelleigene Genexpression stilllegen.

3. Theoretische Grundlagen

3.1. Aufbau, Struktur und Funktionen biologischer Membranen

Jede Zelle ist von einer Membran umgeben, die diese von der Umwelt abtrennt und so einen abgegrenzten Reaktionsraum darstellt. Biologische Membranen stellen nicht nur eine Abgrenzung des Zellinneren von der Außenwelt dar, sie trennen die Zelle in funktionelle Räume bzw. in Kompartimente auf, die aufgrund ihrer evolutionären Herkunft entweder durch einfache oder durch mehrfache Membranen umgeben sind, wie Chloroplasten und Mitochondrien. Diese Kompartimente sind sowohl durch ihren Inhalt, wie auch durch die in ihnen ablaufenden physiologischen Prozesse und Eigenschaften der sie umgebenden Membranen gekennzeichnet. So können in der Zelle unterschiedliche Prozesse und Reaktionen gleichzeitig nebeneinander ablaufen, die eigentlich unter verschiedenen Reaktionsbedingungen, z.B. abweichendem pH-Wert ablaufen können. Biologische Membranen stellen zwar eine wirksame Barriere gegen die Permeation von Molekülen dar, sind aber keine absolut unüberwindlichen Barrieren. Vielmehr handelt es sich um hochselektive Permeabilitätsschranken, die einen gerichteten Stoff-, Energie-, und Informationsaustausch mit der Außenwelt und der benachbarten Zelle ermöglichen, da sie mit verschiedenen integralen aktiven und passiven Transportsystemen durchsetzt sind. Da nicht jede Substanz, wie geladene Teilchen entlang des Konzentrationsgefälles passiv durch die Membran diffundieren kann, leisten spezifische Membranproteine, wie die Natrium-Kalium-Pumpe den aktiven Transport zwischen der Außen- und der Innenseite der Membran und bauen ein Membranpotential auf, welches wie in einer Batterie, den Austausch geladener Substanzen durch die Membran beeinflusst.

Die Hauptbestandteile biologischer Membranen sind Lipide, Proteine und Kohlenhydrate, wobei die Phospholipide neben den Glykolipiden und dem Cholesterin ^[63] den größten Anteil der Membranlipide darstellen und die Lipidzusammensetzung je nach Zelltyp, Zellorganell oder Zellschicht variiert. Phospholipide (vgl. **Abbildung 5**), auch Phosphatide genannt, sind Triglyceride mit zwei ester- bzw. amidartig an Glycerol bzw. Sphingosin gebundenen Fettsäureresten, einer Phosphatgruppe und einem an die Phosphatgruppe gebundenem Alkohol wie Cholin, Serin oder Glycerin. Membranphospholipide, die sich vom Glycerol bzw. Sphingosin ableiten, werden Phosphoglyceride bzw. Sphingophosphatide genannt ^[64].

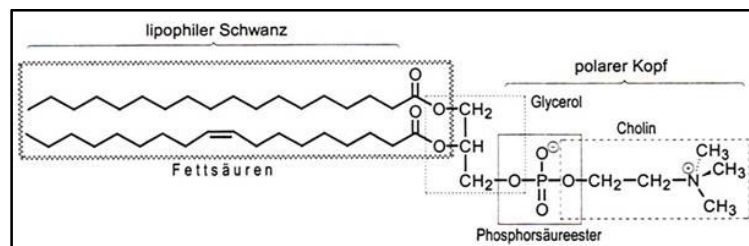


Abbildung 5. Das Phosphatidylcholin ist ein in der Zellmembran am häufigsten vorkommendes Phosphatid. Sein polarer Kopf (Cholin) ist über ein Phosphorsäurediester mit dem lipophilen Fettsäureschwanz verknüpft [65, S. 902].

Auf Grund ihrer langen, aliphatischen Säureresten, den Fettsäuren, sind Lipide organische, wasserunlösliche Moleküle mit sehr unterschiedlichen Strukturen und Funktionen. So werden auch strukturell andersartige Verbindungen wie Terpene und Steroide der Gruppe der Lipide zugeordnet ^[66]. Strukturell gesehen sind Wachse und Fette einfache Lipide, deren Fettsäurereste esterartig an Alkohole wie Glycerol (Fette) oder an andere Alkohole (Wachse) gebunden sind. Komplexe Lipide, auch Lipoi-
de genannt, setzen sich aus einer lipophilen und einer hydrophoben Komponente zusammen und sind neben Proteinen und Polysacchariden Hauptbestandteil biologischer Zellmembranen wie die der Mitochondrien, der cytoplasmatischen Membran und Membranen des endoplasmatischen Retikulums ^[65]. Das Sebum der menschlichen Haut ist eine Quelle für solche ungewöhnliche Lipide. Diese stellen überwiegend Triglyceride mit oftmals verzweigten Fettsäurekomponenten dar. Bei ihrer Hydrolyse werden letztere freigesetzt und mehrere von ihnen besitzen eine antibakterielle Wirkung. Ein Beispiel hierfür ist die Linolensäure, die eine solche Aktivität gegen *Propionibacterium acne* und *Staphylococcus aureus* aufweist ^[67]. Trotz ihrer großen strukturellen Vielfalt sind alle Membranlipide amphiphile Moleküle mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Anteil. In wässriger Umgebung ordnen sich die Lipide so an, dass sich die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten in der Lipiddoppelschicht

über van-der-Waals-Kräfte nach innen richten, während sich die hydrophilen Kopfgruppen zum Wasser hin orientieren und den hydrophoben Bereich abschirmen. Im wässrigen Milieu sorgt dieser hydrophobe Effekt dafür, dass sich amphiphile Lipide spontan zu verschiedenen, nicht kovalenten Aggregaten, wie Mizellen, Vesikeln, Bilayern oder Monolayern an Phasengrenzen (**Abbildung 6**) anordnen (self-assembly). Durch ihre strukturelle Besonderheit sowie durch ihr Organisationsprinzip sind Lipide in der Lage, sich zu Membranen zu ordnen.

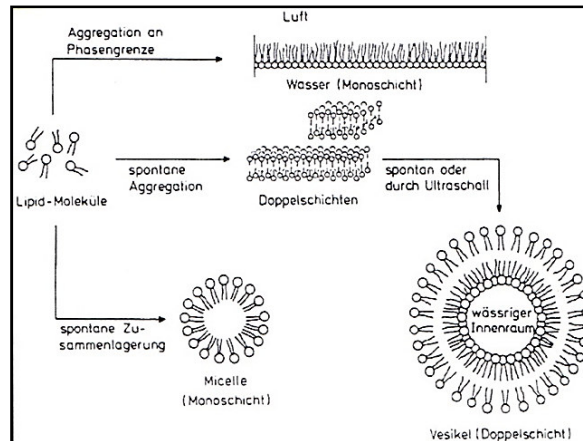


Abbildung 6. Spontan gebildete (engl. self-assembly) Strukturen amphiphiler Lipide in wässriger Umgebung [65, S. 905].

Dass Membranen aus Lipiden bestehen müssten, wurde bereits 1895 von C. E. Overton postuliert, als er beobachten konnte, dass fettlösliche Substanzen viel schneller in Zellen eindringen konnten als fettunlösliche Substanzen [68]. 1917 beschrieb I. Langmuir künstlich hergestellte Membranen aus Phospholipiden [69]. E. Gorter und F. Grendel stellten 1925 die Hypothese auf, dass Zellmembranen aus Lipiddoppelschichten bestehen müssen, denn erst dann wäre eine Abgrenzung vom wässrigen Milieu gewährleistet [70]. Erst mit der Entwicklung des Elektronenmikroskops in den fünfziger Jahren konnten Zellmembranen erstmalig beobachtet werden. Die ersten Aufnahmen stützten das 1935 entwickelte Davson-Danielli-Modell, wonach die Phospholipid-Doppelschicht beidseitig von Proteinen umgeben ist [71]. Dieses Modell wird auch „Sandwichmodell“ genannt. In den darauffolgenden Jahren ließen neue Forschungserkenntnisse über Zellmembranen Zweifel an diesem Modell aufkommen, so dass 1972 S.J. Singer und G.L. Nicolson basierend auf diesen Erkenntnissen ein Flüssig-Mosaik-Modell der biologischen Zellmembran vorstellten [72]. Demnach bestehen biologische Membranen aus einer 5 nm dicken flüssigen Lipiddoppelschicht, in die ein Mosaik aus zufällig verteilten peripheren und integralen Proteinmolekülen eingebettet oder angeheftet ist und sich mehr oder weniger frei lateral

bewegt. Die Membran wird durch schwache hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten, die es den Lipidmolekülen ermöglichen, sich auf Grund der Brownschen Molekularbewegung schnell (10^{-7} s) in der Membranebene lateral zu bewegen oder sich um die Längsachse zu drehen ^[73-75]. Der spontane Wechsel der Lipidmoleküle quer durch die Membran von einer Ebene in die andere („Flip-Flop“) findet jedoch sehr selten statt, denn dabei muss der hydrophile Teil des Lipids den hydrophoben Bereich der Membran passieren. Dieses Ereignis besitzt eine transversale Austauschzeit von Stunden oder Tagen ^[76-75]. Damit wird gewährleistet, dass die asymmetrische Anordnung der Membranzusammensetzung erhalten bleibt. Im Laufe der nächsten zehn Jahre wurde dieses Modell weiterentwickelt. So mehrten sich Hinweise darauf, dass biologische Membranen Bereiche höherer Konzentration an bestimmten Lipiden und Proteinen enthalten und widerlegten so die Vorstellung von einer homogenen Verteilung von Lipiden und Proteinen in der biologischen Zellmembran ^[77-78].

Das Steroid Cholesterin bzw. Cholesterol bildet die nächste Hauptgruppe der Membranlipide. In einer tierischen Zellmembran beträgt der Cholesterinanteil 20-25% der Gesamtmasse der Lipide, so dass Cholesterin einen wesentlichen Einfluss auf die Membranfluidität hat ^[79]. Man nimmt an, dass sich die starren Cholesterinmoleküle über Wasserstoffbrücken zwischen den Kohlenwasserstoffen der Lipide in die exo- und cytoplasmatischen Seiten der Zellmembran einordnen, so die Mobilität der Fettsäure-Acylgruppen einschränken und die dichte Packung dieser lang gestreckten Ketten stören. Damit schränkt der Cholesteringehalt die Fluidität der Membran bei höheren Temperaturen ein, begünstigt diese aber bei niedrigeren Temperaturen. Der Cholesteringehalt reguliert damit die Flexibilität der Membran und hält diese über einen weiten Temperaturbereich aufrecht. Dieses Steroid besteht aus vier miteinander verbundenen Kohlenwasserstoffringen, einer Kohlenwasserstoffkette an einem Ende und einer Hydroxylgruppe am anderen Ende (vgl. **Abbildung 7B**; rote Struktur). In der Lipiddoppelschicht ordnen sich Cholesterinmoleküle parallel zu den lipophilen Fettsäureresten der Lipide an, und die polare Hydroxylgruppe tritt mit hydrophilen Bereichen benachbarter Membranlipide in Wechselwirkung ^[63].

Die Tendenz der Cholesterinmoleküle diese stabilen Assoziate auszubilden, ist besonders in Verbindungen wie den sogenannten Sphingolipiden (**Abbildung 7A**) zu beobachten (**Abbildung 7A-B**). Das strukturelle Grundgerüst der Sphingolipide ist das Sphingosin, ein unverzweigter C_{18} -Alkohol mit einer trans-Doppelbindung zwi-

schen dem vierten und fünften Kohlenstoffatom, jeweils einer Hydroxylgruppe am ersten und am dritten und einer Aminogruppe am zweiten Kohlenstoffatom.

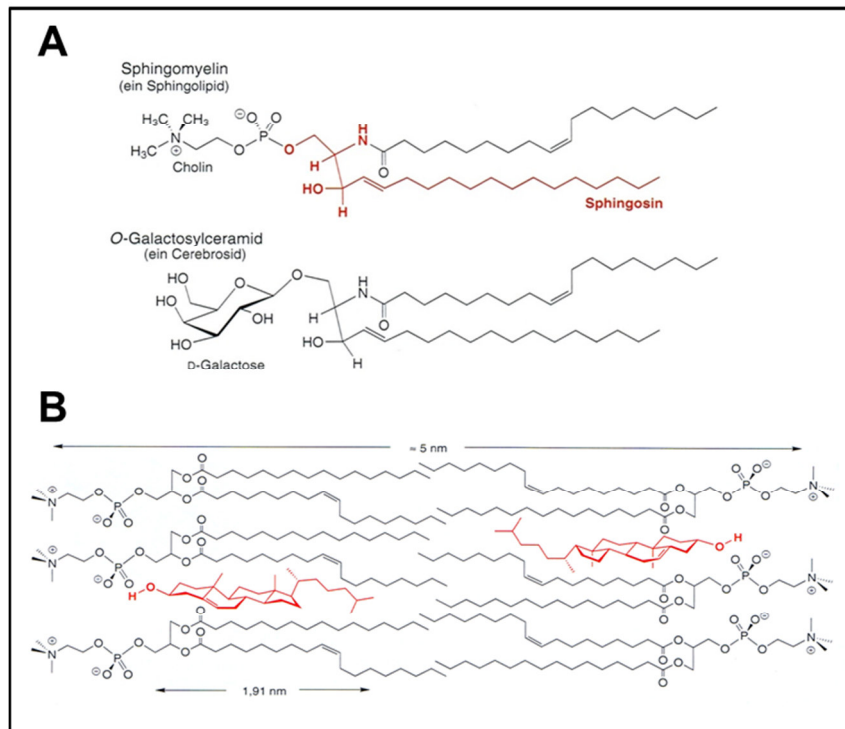


Abbildung 7. A. Sphingolipide: Derivate des Sphingosins. B. Stabilisierung der Lipiddoppelschicht durch Cholesterin. Zu A: [80, S. 403], zu B: [ebd., S. 406].

Bei allen Sphingolipiden ist die Fettsäure amidartig an die Aminogruppe des Sphingosins gebunden und bildet das Ceramid, von dem sich alle komplexen Sphingolipide wie Sphingomyeline, Cerebroside und Ganglioside ableiten lassen [64, 79]. Von diesen enthalten nur Sphingomyeline Phosphatgruppen und werden daher den Phosphatiden zugeordnet. Cerebroside und Galactoside sind Glykolipide, weil diese an der primären Hydroxylgruppe der Ceramide glykosidisch gebundene Mono- oder Polysacchride als hydrophile Komponente enthalten [79]. Die Kohlenhydratreste sind asymmetrisch in der Membran verteilt und befinden sich immer auf der extrazellulären Seite.

Diese Membranregionen wurden als cholesterol- und sphingolipidreiche Mikrodomänen mit einem höheren Ordnungsgrad als die umgebenden phospholipidreichen Membranregionen ermittelt, die unterschiedliche Proteine wie G-Proteine oder Src-Kinasen enthalten. 1997 bezeichneten K. Simons und G. van Meer diese Protein-Lipid-Domänen als „Lipid Rafts“ (dt. „Lipid-Plattformen“ bzw. „Lipid-Flöße“), weil sich diese flüssig-geordneten (lipid-ordered, l_o) Membranbereiche wie Flöße in einem Meer aus flüssig-ungeordneten (lipid-disordered, l_d) Bereichen bewegen [81]. Über den Aufbau der Lipid-Rafts in tierischen Zellmembranen weiß man inzwischen,

dass ihre Lipiddoppelschicht zwischen der exoplasmatischen (Sphingolipide) und cytoplasmatischen (Glycolipide) Seite asymmetrisch aufgebaut ist. Auf Grund der im Vergleich zu den Phospholipiden längeren Sphingolipide ragen die Lipid Rafts aus der Membran heraus ^[82]. Auf beiden Seiten dieser Mikrodomäne können unterschiedliche Proteine eingelagert sein. Über kovalente Bindungen werden Membranproteine mit den in die Lipiddoppelschicht eingebetteten hydrophoben Lipidketten verbunden. Viele solcher Membranproteine werden über Sphingolipidketten in der Membran verankert. Die Lipid Rafts stellen so eine Andock- und Interaktionsplattform, z.B. für Proteine der Signaltransduktion, dar (vgl. **Abbildung 8**).

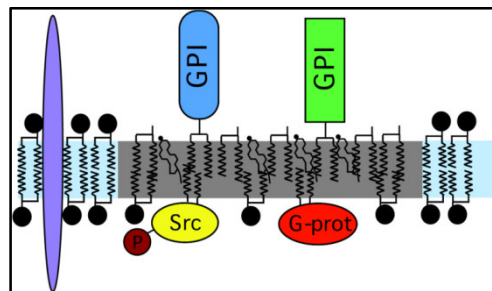


Abbildung 8. Schematische Darstellung von Lipid-Rafts. Lipid-Rafts stellen kleine „Inseln“ oder „Flöße“ in der fluiden Membran dar, die sich durch die laterale Interaktion von Glykosphingolipiden (GSL) und Cholesterin (Chol) bilden. Spezifische Proteine, vor allem zweifach acylierte Proteine, wie GPI-verankerte Proteine oder myristoylierte und palmitoylierte cytoplasmatische Proteine (hier exemplarisch dargestellt Src-Kinasen und G-Proteine), scheinen bevorzugt mit dieser Lipidumgebung zu assoziieren [83].

Derzeit wird angenommen, dass etwa 10 - 30 Proteine in einem Lipid Raft eingebettet sind und dass diese dynamischen Mikrodomänen einen Durchmesser von 25 - 100 nm haben, was etwa 3500 Sphingolipidmolekülen entspricht ^[84]. In niederen Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* konnten sogar 50 - 80 solcher in der Plasmamembran homogen verteilten Mikrodomänen als „Flecken“ mit einem Durchmesser von etwa 300 nm und etwa neun eingebetteten Proteinen identifiziert werden ^[85]. Verglichen mit tierischen Zellen, auf die sich die Lipid-Raft-Theorie ursprünglich bezieht, sind diese Domänen in *S. cerevisiae* reich an Ergosterol- und Sphingolipidmolekülen ^[86]. Anstelle des Cholesterols wird in *S. cerevisiae* Ergosterol, ein dem Cholesterin ähnliches Sterol, in die Mikrodomänen eingebaut.

3.2. Membrangebundene Lipoproteine

Membranproteine werden nach der Art ihrer Verankerung in der Zellmembran unterteilt. So unterscheidet man heute zwischen angelagerten peripheren Proteinen und in die Lipiddoppelschicht fest eingelagerten oder diese durchdringende integra-

len Membranproteine. Das photosynthetische Reaktionszentrum des Purpurbakteriums *Rhodospseudomonas viridis* ist z.B. eines der integralen Membranproteine mit bekannter Kristallstruktur^[87-88]. Diese integralen Membranproteine durchspannen die Membran mit einer oder mehreren hydrophoben Aminosäuresequenzen und sind so fest in die Membran eingebettet, so dass sie erst durch die Behandlung mit Detergentien oder organischen Lösungsmitteln sowie durch das Zerstören der Membranstruktur herausgelöst werden können. Die peripheren Membranproteine befinden sich außerhalb der Membran und sind lediglich an die Membran oder Oberfläche der integralen Membranproteine durch hydrophobe und/oder elektrostatische Wechselwirkungen transient und dynamisch angelagert und werden durch milde Bedingungen, z.B. durch hohe Salzkonzentrationen oder durch die Veränderungen des pH-Wertes, von der Membran gelöst, ohne diese zu zerstören^[63].

Integrale und periphere Proteine können co- oder posttranslational durch Bindung an Fettsäuren oder einen GPI-Anker sowie durch Prenylierung lipophilisiert werden. Diese Proteine ragen nicht durch die Membran hindurch, sondern werden über ihre kovalent mit einem in die Membran eingelagerten hydrophoben Lipidrest in der Membran verankert (vgl. **Abbildung 9A-B**). Man unterscheidet verschiedene Arten der lipophilen Verankerung mit der Membran, wie die Prenylierung mit einer C₁₅-Farnesyl- oder einer C₂₀-Geranylgeranyl-Gruppe, die post-translational über einen Thioester an einem Cysteinrest am carboxyterminalen Ende des Proteins durch jeweilige Prenyl-Transferasen eingeführt wurden. So ist die Farnesylierung für die Funktion von ras-Proteinen, kleinen monomeren G-Proteinen, die vom Protoonkogen Ras kodiert werden, entscheidend. Diese Proteine steuern Wachstums- und Differenzierungsprozesse von Zellen und können im Falle einer Genmutation Zellen in Krebszellen verwandeln. Bei der Palmitoylierung wird die Palmitoyl-Gruppe der Palmitinsäure in Gegenwart einer membrangebundenen Palmitoylacyltransferase (PAT)^[89] post-translational über einen Thioester mit einem Cystein-Rest des Proteins kovalent gekoppelt. In ähnlichen post-translationalen Acylierungsprozessen der Proteine werden Fettsäuren, wie die gesättigte Myristinsäure (*N*-Myristoylierung) oder die Stearinsäure, sowie die ungesättigte Arachidonsäure an Proteine gekoppelt^[90-91]. Im Falle der *N*-Myristoylierung wird mittels der *N*-Myristoyltransferase eine gesättigte C₁₄-Kette co-translational über eine Amidbindung am N-terminalen Glycin angehängt^[92].

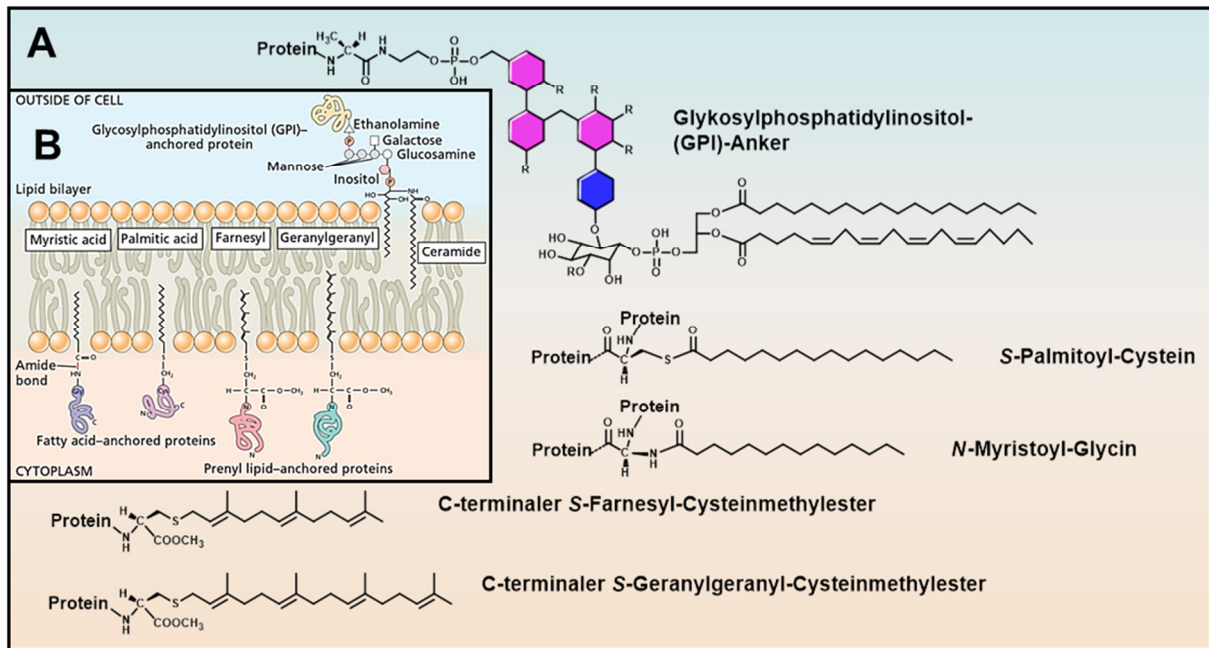


Abbildung 9. Lipidmodifikationen membrangebundener Proteine über Fettsäuren, Prenyl-Gruppen und Glycosylphosphatidylinositol. **A.** Strukturen lipophiler Membran-Anker wie Isopren-Einheiten, die über Farnesyl- oder Geranylgeranylpyrophosphat zum S-isoprenylierten Cysteinmethylester am C-terminalen Ende der Polypeptidkette binden, Fettsäureacylestern wie dem S-Palmitoyl-Cystein oder dem N-Myristoyl-Anker, sowie dem Glycosylphosphatidyl-Inositol-Rest (GPI-Anker), wobei die roten und blauen Sechsecke Mannose bzw. GlcNAc (*N*-Acetylglucosamin) und als R abgekürzte Gruppen weitere Modifikationen darstellen. **B.** In Zellmembran eingebettete lipidmodifizierte Proteine. Zu A: Modifiziert nach [63, S.364 und 64, S.312], zu B: aus Taiz und Zeiger (2010) [96, S. 7]; nach Buchanan et al. (2000) [97, S. 9].

In eukaryotischen Zellen sind jedoch viele Proteine am carboxyterminalen Ende über Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker in der Membran verankert. Die Modifizierung des Proteins mit Glycosylphosphatidylinositol am C-terminalen Ende eines fertigen Proteins erfolgt im Lumen des endoplasmatischen Reticulums. Dabei wird eine C-terminale Signalsequenz aus hydrophoben Aminosäureresten durch den bereits membranständigen GPI-Anker ersetzt und über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche befördert^[93]. Über diese Bindung wird eine Reihe von Proteinen auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran verankert, z.B. die extrazelluläre Acetylcholin-Esterase und alkalische Phosphatase. Viele lipidmodifizierte Proteine wie S-palmitoylierte oder N-myristoylierte G-Proteine und Src-Kinasen lagern sich bevorzugt in Lipid Rafts an^[77,81,83]. Aber auch GPI-verankerte Membranproteine assoziieren bevorzugt in Lipid Rafts^[81]. Im Vergleich dazu befinden sich über Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Gruppen prenylierte Proteine aufgrund ihrer verzweigten und sperrigen Struktur außerhalb von Lipid Rafts Domänen^[94,95].

3.3. Natürliche Nucleolipide

In der Zelle werden nicht nur Membranproteine lipophilisiert. Lipidmodifikationen kommen auch an diversen Molekülen für die verschiedensten Funktionen vor. So werden Pflanzen- und Bakteriochlorophylle über den acyclischen Diterpenalkohol Phytol, einer veresterten C₁₇-Seitenkette, in der biologischen Membran verankert^[98]. Dieses Diterpen ist auch ein struktureller Bestandteil der Tocopherole und Tocotrienole; zusammen werden diese Gruppen als Vitamin E bezeichnet^[64], sowie des Phyllochinons bzw. des Vitamins K₁^[ebd.]. Des Weiteren kommen in verschiedenen Mikroorganismen lipophilisierte Nucleosid-Antibiotika vor, welche den Nucleolipiden zugeordnet werden. Nucleolipide sind Konjugate aus einem Lipid und einer Nucleobase, einem Nucleosid, Nucleotid oder einem Oligonucleotid^[10, 99]. Diese natürlich vorkommenden oder synthetisch hergestellten Verbindungen besitzen mindestens einen hydrophoben und einen hydrophilen Teil und vereinen somit die Eigenschaften der Lipide sowie der Nucleoside, wodurch diese Nucleosid-Derivate in der Material- sowie in der pharmazeutischen Industrie große Bedeutung haben und vielseitige Verwendung finden. Das am häufigsten in der Natur verbreitete Nucleolipid ist das Cytidindiphosphatdiacylglycerol, welches für die Glycerophospholipidbiosynthese von essenzieller Bedeutung ist. Bei der Synthese diverser Phospholipide wie dem Phosphatidylglycerin oder dem Phosphatidylinositol überträgt dieses Nucleolipid die Diphosphatdiacylglycerolgruppe auf Zucker oder Proteine.

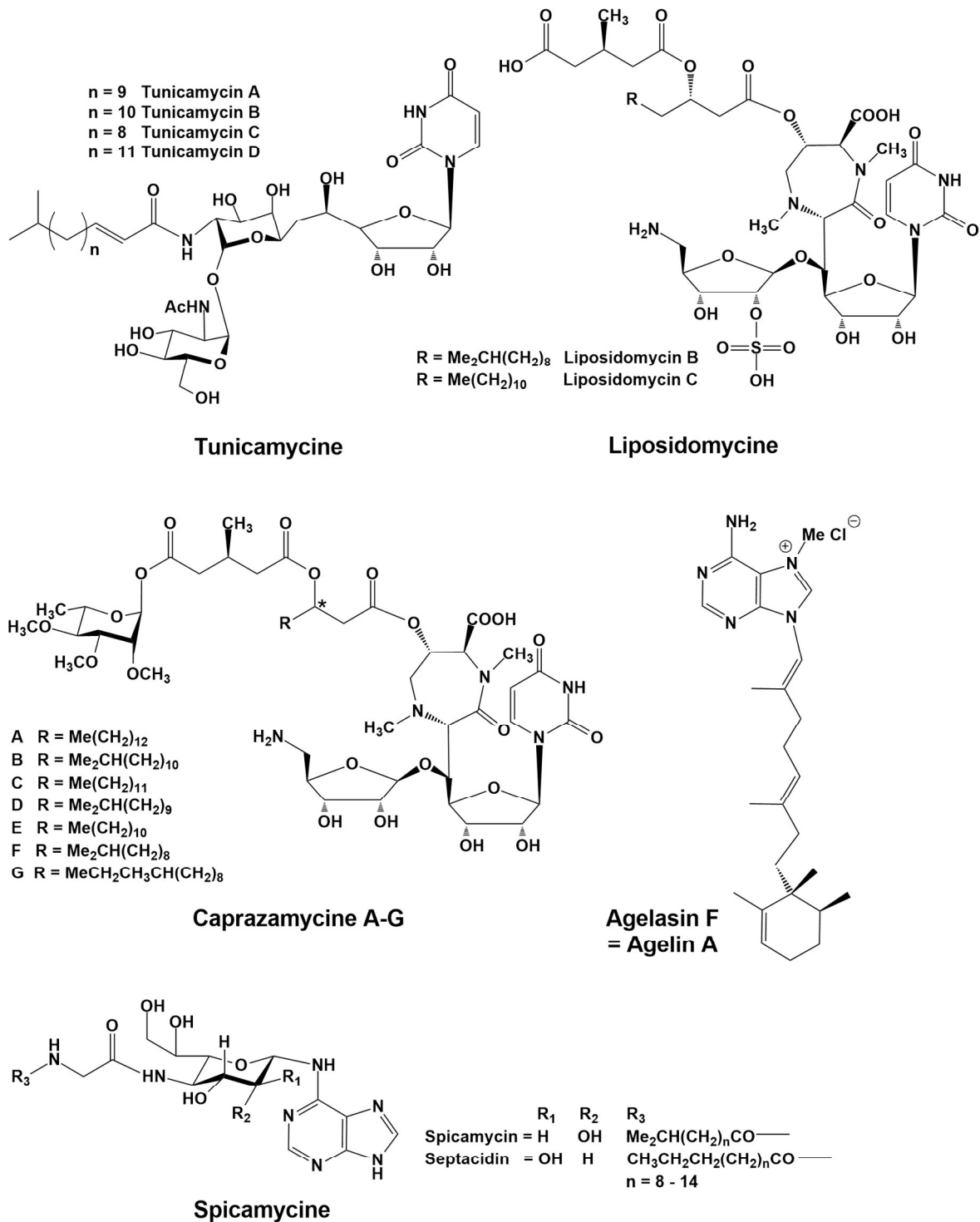
Seit den siebziger Jahren sind diverse kleine Nucleolipid-Konjugate bekannt, die aus natürlichen Quellen isoliert werden konnten (vgl. **Formelschema 1**). Viele dieser Nucleolipide haben bioaktive - antimikrobielle, antifungale, antivirale und sogar antitumorale - Eigenschaften, indem sie auf Grund ihrer lipophilen Eigenschaften in den Syntheseweg von biologischen Membranbausteinen eingreifen. So weisen die Tunicamycine A-D, die zuerst aus *Streptomyces lysosuperficus* und später auch aus anderen Mikroorganismen isoliert und charakterisiert werden konnten, antibakterielle^[100] und antivirale Wirkung auf. Tunicamycine gehören zur Gruppe der Nucleosid-Antibiotica, die aus Uridin, einem C₁₁-Disaccharid, der sogenannten Aminodesoxydialdose (Tunicamine), sowie aus unterschiedlich langen verzweigten, linearen gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bestehen^[10, 101]. Seine antibakterielle Wirkung beruht auf der spezifischen Hemmung der Peptidoglycan-Synthese, indem der Transfer von N-Acetylglycosamin-1-Phosphat (GlcNAc-1-P) auf Undecaprenyl-P (UDP) sowie die Bildung des Undecaprenyl-PP-MurNAc Pentapeptids während der

N-Glycosylierung blockiert wird ^[10, 101-102]. Weitere Nucleolipide aus der Gruppe der Nucleosid-Antibiotika sind die Liposidomycine.

Liposidomycine B und C (vgl. **Formelschema 1-Liposidomycine**) wurden 1985 aus *Streptomyces griseosporus* isoliert ^[103]. Diese Liponucleosid-Antibiotika sind selektive Inhibitoren der bakteriellen Translocase I in der Peptidoglycan-Synthese der Mikroorganismen ^[104-106]. Die komplexe Struktur der Liposidomycine setzt sich aus dem 5'-substituiertem Uridin, einem 5-Amino-5-Desoxyribose-2-Sulfat, einem N-methyliertem Perhydro-1,4-Diazepin sowie einer variierenden Lipidseitenkette an der 3-Methylglutaryl-Gruppe zusammen ^[107-108]. Caprazamycine aus der Kultur *Streptomyces* sp. MK730-62F2 ^[109-110] sind weitere Vertreter natürlicher Liponucleoside vom Typ Liposidomycin, die gegen verschiedene Mycobakterienarten aktiv sind ^[111]. Weitere Vertreter therapeutisch aktiver Liponucleosid-Derivate sind das antifungale Septacidin aus *Streptomyces fimbriatus* ^[112-114], dessen diverse Analoga eine antitumorale Wirkung gegen Leukämiezellen L1210 ^[10,115] aufweisen, sowie das strukturell verwandte Spicamycin, welches 1983 aus *Streptomyces alanosinicus* isoliert werden konnte und sich als wirkungsvolles Leukämietherapeutikum erwies ^[116-117]. Die Grundstruktur dieser Verbindungen und ihrer Analoga besteht aus einer Aminoheptose, der Purinbase Adenin, Glycin und variierenden Fettsäure-Resten.

Eine Reihe von Agelasinen A-I und/oder Agelinen A-B (vgl. **Formelschema 1 - Agelasin F**) ^[10] bilden eine weitere Gruppe natürlich vorkommender therapeutisch wirksamer Nucleolipide, die aus dem Meeresschwamm *Agelas* sp. isoliert werden konnten ^[118]. Agelasin F (= Agelin A) ist bis heute ein wichtiger Vertreter dieser bekannten 7,9-Dialkylpurinium Salze, welches eine hohe Wirksamkeit gegen den Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis* aufweist ^[119].

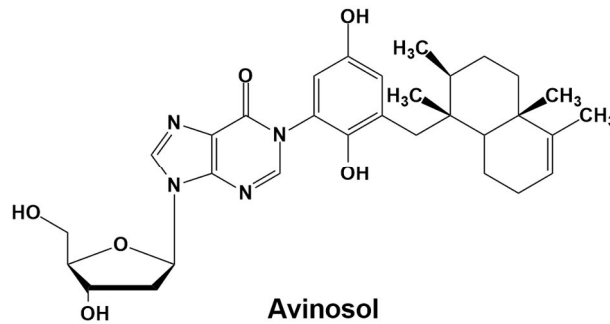
Die Grundstruktur dieser Verbindungen besteht aus einer variierenden Diterpen-Seitenkette an der N(7)-Position der Adeninbase. Ein anderes in der Natur vertretenes Nucleolipid ist das bis heute einzige bekannte natürlich vorkommende Meroterpen-Nucleosid-Konjugat, das Avinosol, welches aus dem Meeresschwamm *Dysidea* sp. bei Papua Neu Guinea 2006 isoliert wurde ^[120] (vgl. **Formelschema 2**). Meroterpene sind organisch-chemische Verbindungen mit einer terpenoiden Gruppe, die mit anderen Strukturen, wie den Phenolen, verbunden ist. Dieses N(1)-alkylierte 2'-Desoxyinosin-Derivat mit einem Benzen-1,4-diol und einer Sesquiterpen-Gruppe besitzt anti-angiogenetische und antimetastatische Eigenschaften.



Formelschema 1. Einige natürlich vorkommende Liponucleosid-Therapeutika: Tunicamycine A-D, isoliert aus dem *Streptomyces lysosuperficus*, Liposidomycine B und C aus *Streptomyces griseosporus*, Septacidin aus dem *Streptomyces fimbriatus* und das Spicamycin aus dem *Streptomyces alanosinicus*, das Agelasin F aus der Gruppe der Agelasine, isoliert aus dem Meeresschwamm *Agelas* sp. sowie die Caprazamycine aus dem *Streptomyces* sp. * (stereogenes Zentrum). Modifiziert nach [10, 110, 116-117, 121].

Mit der Entdeckung geranylierter tRNA in verschiedenen Mikroorganismen [11], konnte gezeigt werden, dass auch post-translational isoprenylierte Oligonucleotide in der Natur vorkommen und dabei eine wichtige Funktion erfüllen, so beeinflusst die Geranyl-Gruppe an der RNA die Codonerkennung und die Rasterverschiebung wäh-

rend des Translationsvorgangs. Es wird angenommen, dass in einer Zelle etwa 400 Oligonucleotide geranyliert sind ^[11].



Formelschema 2. Struktur des Avinosol, des bis heute einzigen bekannten natürlich vorkommenden Meroterpen-Nucleosid-Konjugates, welches aus dem Meeresschwamm *Dysidea* sp. (Papua Neu Guinea) 2006 isoliert wurde [10, 120].

3.4. Planare Membranmodelle

Zur Simulation und Untersuchung biologischer Membranen wird in der Forschung auf diverse physikalische und präparative Methoden zurückgegriffen (vgl. **Abbildung 10**). Dazu müssen diese Membranmodelle bestimmte Voraussetzungen erfüllen, wie eine mit der biologischen Membran vergleichbare chemische Zusammensetzung und Umgebungsfaktoren; auch die Dimensionen (z.B. Membrandicke) und die physikalischen Eigenschaften (z.B. Fluidität) müssen mit denen der biologischen Membran übereinstimmen. Es muss möglich sein, diese Membranen, z.B. durch Proteine, Lipide und lipophilisierte Moleküle, zu modifizieren. Allgemein sind festkörpergestützte Membranen sowie freistehende Lipiddoppelschichten etablierte Modellsysteme zur Untersuchung physikalischer Eigenschaften von Lipiddoppelschichten sowie membrangebundener oder eingelagerter Proteine und Moleküle. Bei den Methoden SSM (engl. solid supported membranes) und t-BLM (engl. tethered black lipid membrane) handelt es sich um festkörpergestützte und gebundene Membranen. Festkörpergestützte Membranen haben den Vorteil, dass sie sich für oberflächenanalytische Untersuchungsmethoden, z.B. durch Rasterkraftmikroskopie eignen. Sie haben aber den Nachteil, dass eine aufwändige Oberflächenchemie nötig ist, um die Lipidmembran auf einer festen Oberfläche zu verankern. Im Vergleich dazu ist die Herstellung freistehender doppelschichtiger Membran (engl. black lipid membrane - BLM), die erstmals im Jahre 1962 von P. Mueller und D. O. Rudin ^[122] experimentell entwickelt wurde. 1972 wurde diese Präparationsmethode verbessert und weiterentwickelt ^[123-125]. Heute ist die Herstellung asymmetrischer künstlicher Lipiddoppelschichten einfacher und bereits in der Automatisierungsphase. Da diese Membranen

nicht über längere Zeiträume stabil sein können, eignen sie sich wenig für analytische und biosensorische Anwendungen. Vesikuläre Membranen werden in der Regel zur Untersuchung und Simulation von Membranfusionen eingesetzt ^[30].

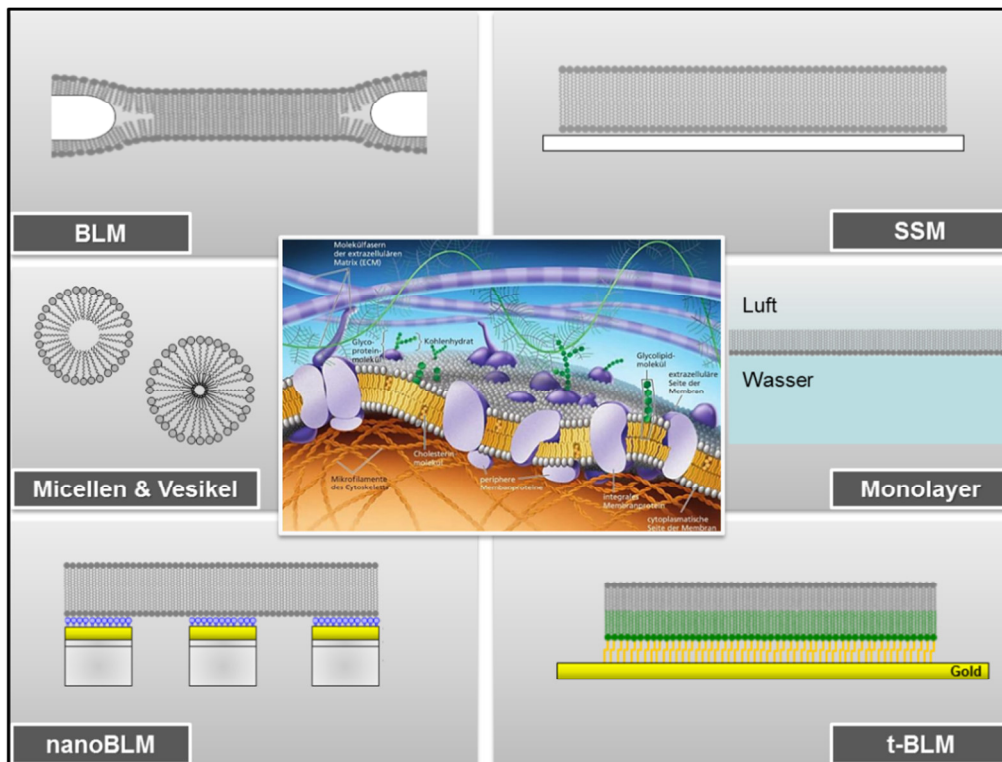


Abbildung 10. Physikalische und präparative Methoden zur Simulation und Untersuchung biologischer Membranen. **BLM** (engl. black lipid membrane) ist eine freistehende doppelschichtige Membran. Bei den Methoden **SSM** (engl. solid supported membranes) und **t-BLM** (engl. tethered black lipid membrane) handelt es sich um festkörpergestützte und gebundene planare Membranen. **nano-BLM** sind nano- oder mikroporengestützte Membranen. **Vesikel** werden zur Untersuchung und Simulation von Membranfusionen eingesetzt. An **Monolayern** und **Micellen** wird die spontane Selbstorganisation der Lipide an Phasengrenzen bzw. in der Lösung untersucht. Mitte aus [126, S. 176].

Nano-BLMs sind nano- oder mikroporengestützte Membranen - eine Kombination aus festkörpergestützten (SSM) und freistehenden Membransystemen (BLM). In diesen porengestützten Modellen überspannen die Lipidmembranen Poren/Öffnungen einer porösen Matrix, so dass die über der Matrix verankerte Membran als SSM und die porenüberspannende Membran als nano- oder micro-BLM betrachtet wird. Doch auch hier liegt der Nachteil im aufwändigen Herstellungsverfahren.

An Monolayern und Micellen wird die spontane Selbstorganisation der Lipide an Phasengrenzen bzw. in der Lösung untersucht. Die Herstellung von Monolayern ist unkompliziert und schnell, so dass sich diese Mono-Schichten für den Einsatz in der DNA/RNA-Analytik eignen könnten. Dazu ordnen sich lipophilisierte Oligomere zu Monolayern an und die Nucleinsäuren hybridisieren mit der dazu komplementären Oligonucleotid-Probe. Dieser Ansatz lässt sich erweitern, indem sich lipophilisierte

Oligonucleotide an der Phasengrenze zwischen zwei organischen Lösungsmitteln akkumulieren und mit der Proben-Oligonucleotidsequenz hybridisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit werden horizontale freistehende Lipiddoppelschichten, sogenannte Bilayer, für die Einlagerungsversuche lipophilisierter Oligonucleotide verwendet. Da planare Lipidmembranen im reflektierten Licht schwarz erscheinen, werden sie auch „schwarze Lipidfilme“ (engl. „black lipid membranes“, BLM) bezeichnet und eignen sich somit gut für optische Untersuchungen. Die Bilayer-Technik wird in der Regel zur Messung von Einzelkanal-Ionenströmen eingesetzt. Ein ca. 5 nm dicker Bilayer (100 µm Durchmesser) über einem Loch einer Teflonfolie trennt zwei mit einer Elektrolytlösung befüllte Kompartimente (cis und trans) und bildet so eine Barriere für den Stofftransport, der ausschließlich über diese Lipidmembran abläuft. Beide Kompartimente sind an eine Spannungsquelle, einen Amperemeter und zwei Ag/AgCl-Elektroden angeschlossen. Der Stromkreis wird über die künstliche Bilayermembran geschlossen. Der Ionenstrom erfolgt erst mit dem Einbau porrenbildender Proteine. Der Vorteil dieser Technik liegt darin, dass auf beiden Seiten der Membran die Elektrolytlösung perfundiert, d.h. ausgetauscht, und chemische Substanzen zugegeben werden können, um z.B. deren Wirkung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der fusionierten Ionenkanäle oder den möglichen Durchtritt lipophilisierter Substanzen durch die Membran zu untersuchen. In dieser Arbeit werden keine elektrophysiologischen, sondern optischen Untersuchungen am Lipid-Bilayer durchgeführt. Dazu wird die horizontale Bilayer-Technik auf einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop angebracht. Mehr dazu siehe Kapitel 4.6 *„Kombinierte Methode aus konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie und der Bilayer-Technik“*.

3.5. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ist eine optische Technik zur Erfassung von Fluktuationen der Fluoreszenzintensitäten und wurde erstmals in den frühen siebziger Jahren von Magde, Elson und Webb vorgestellt, um die Diffusion, Konzentration oder Wechselwirkungen fluoreszierender Moleküle im nanomolaren Bereich zu erfassen ^[127-129]. Erst in den neunziger Jahren wurde die FCS weiterentwickelt ^[130] und zum direkten Nachweis einzelner fluoreszierender Moleküle eingesetzt ^[131-134], die durch das konfokale Detektionsvolumen von ca. 10^{-15} L (einem Femtoliter) diffundieren ^[135-136]. So ermöglicht diese Technik, Echtzeitmessungen von Enzymkinetiken, Nucleinsäure-Hybridisierungen sowie die Analyse von Molekülag-

gregationen. Die Basis für die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bildet ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop mit einem Argon- oder einem Helium/Neon-Laser, je nachdem welcher Fluoreszenzmarker angeregt werden soll. Das Anregungslicht wird mit Hilfe eines Objektivs in die Probe fokussiert, so dass ein möglichst kleines Anregungsvolumen entsteht. Das Volumen, das bei der Messung von Bedeutung ist, wird durch den Laserstrahl und die konfokale Optik sowie der Lochblende, „Pinhole“, bestimmt. Das Prinzip der Pinhole ist, dass nur das Fluoreszenzlicht aus dem konfokalen Detektionsvolumen durchgelassen und detektiert wird und dass das Fluoreszenzlicht aus anderen Bereichen entweder ganz oder teilweise unterdrückt wird, da die Apparatur diese Strahlengänge blockiert ^[137].

Weitere Vorteile dieser Technik liegen in der hohen Auflösung bis zur Detektion einzelner Moleküle, in der geringen Probenmenge sowie in der kurzen Aufnahmezeit ^[138]. Im Allgemeinen entspricht es bei einer Konzentration von ca. 10^{-9} mol/L einem einzigen Teilchen im fokussierten Aufnahmebereich. Das ist eine Voraussetzung zum Detektieren von Einzelmolekülen, um die Überlagerung der Signale mehrerer Teilchen zu verhindern. Sobald ein fluoreszenzmarkiertes Molekül in das Anregungsvolumen diffundiert, absorbiert es die Anregungsphotonen und emittiert seinerseits Fluoreszenzlicht bzw. energieärmere Photonen größerer Wellenlänge. Diese emittierten Photonen passieren den für das Anregungslicht undurchlässigen Strahlenteiler und werden von der *Avalanche-Photodiode* (APD) detektiert, die im Nanosekundenbereich einzelne emittierte Photonen zählt. Die Länge des detektierten Fluoreszenzschauers korreliert mit der Verweildauer des fluoreszierenden Teilchens im konfokalen Messvolumen (vgl. **Abbildung 11A**).

Die eigentliche Messgröße bei der FCS-Methode ist die Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit $F(t)$. Jede Spitze im detektierten Photonenschauer steht für ein fluoreszierendes Teilchen, das gerade durch das Anregungsvolumen auf Grund der Brownschen Molekularbewegung diffundiert und in einer bestimmten Zeit den Fokus durchquert. Die gemessenen Intensitäten sind zeitlich korreliert (vgl. **Abbildung 11B**). Um die Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit $F(t)$ auszuwerten, werden sie mit sich selbst autokorreliert. Die normalisierte Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ ist wie folgt definiert ^[139].

$$G(\tau) = \frac{\frac{1}{J} \sum_{i=1}^J n(t_i) n(t_i + \tau)}{\left(\frac{1}{J} \sum_{i=1}^J n(t_i) \right)^2}, \quad (\text{Gleichung 1})$$

wobei J die Zeitdauer, $n(t_i)$ die zeitabhängige Photonenzählrate und τ die Korrelationszeit ist. Diffundieren die untersuchten Moleküle frei im dreidimensionalen gausförmigen Detektionsvolumen, wird die normierte Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit von der Konzentration und der Diffusionszeit an eine einzelne fluoreszierende Teilchenart angepasst ^[130-131]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right) \cdot \sqrt{1 + \frac{\tau}{K^2 \cdot \tau_{diff}}}} \right), \quad (\text{Gleichung 2})$$

Hierbei ist $\mathbf{K} = \omega_1/\omega_2$ der Strukturparameter und gibt das Verhältnis zwischen der horizontalen ω_1 und der vertikalen ω_2 Fokusachse des ellipsoidalen Detektionsvolumens an. $\mathbf{N} = c \cdot V_{eff}$ ist die durchschnittliche Teilchenzahl im effektiven Beobachtungsvolumen V_{eff} einer ellipsoidalen Form ^[136]:

$$V_{eff} = \pi^{3/2} \cdot \omega_1^2 \cdot \omega_2 \quad (\text{Gleichung 3})$$

Die mittlere laterale Diffusionszeit des beobachteten Fluorophors oder des fluoreszenzmarkierten Moleküls τ_D ist definiert als:

$$\tau_{diff} = \frac{\omega_1^2}{4D} \quad (\text{Gleichung 4})$$

und ist abhängig vom Diffusionskoeffizienten D . Hierbei kann bei bekannter Ausdehnung des beobachteten Volumens der Diffusionskoeffizient D des fluoreszierenden Moleküls bestimmt werden. Die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ beschreibt die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals zu verschiedenen Zeiten (t) und ($t + \tau$) und liefert damit Informationen über die Zeitskalen der beteiligten Prozesse. Mit der FCS-Technik ist es möglich, Prozesse zu beobachten, die mit einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaft verbunden sind. Wenn sich z.B. durch die Zusammenlagerung zweier Teilchen die Masse ändert, wird die Autokorrelationskurve nach rechts verschoben, woraus man schließen kann, dass eine Bindung stattgefunden hat. Im Rahmen dieser Arbeit wird die konfokale Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zur Visualisierung der Insertion lipophilisierter DNA in die Lipidmembran sowie ihrer Hyb-

ridisierung am horizontalen Lipid-Bilayer, als auch zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten unterschiedlich lipophilisierter DNA-Sequenzen eingesetzt.

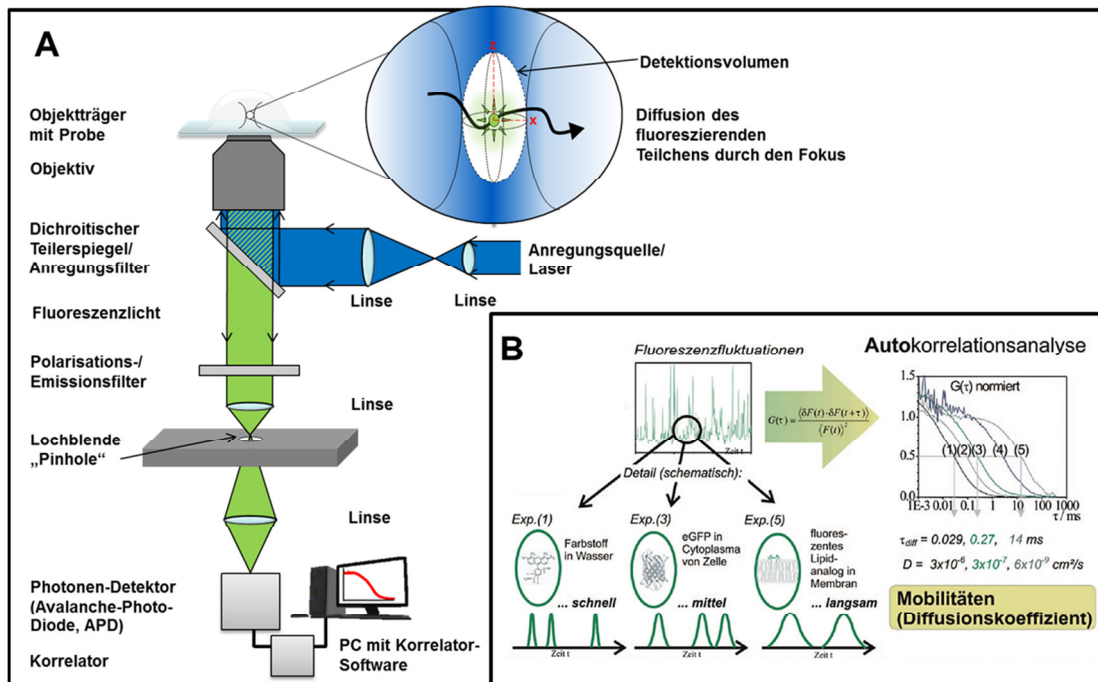


Abbildung 11. A. Schematischer Aufbau des konfokalen Mikroskops für FCS-Messungen. B. Übersicht über das Prinzip der Autokorrelationsanalyse. Zu A: überarbeitet in Anlehnung an [137, S. 168], zu B: überarbeiteter Ausschnitt aus [138, S. 5].

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalienliste

Für die synthetische Arbeit wurden folgende handelsüblichen Chemikalien und Reagenzien aus den jeweils angegebenen Quellen bezogen: Aceton (*Merck*, $\geq 99.9\%$), 2 - Cyanoethyldiisopropylchlorophosphit (*Alfa Aesar*, 95%), Deuteriochloroform (*Sigma Aldrich*, 99.8% atom % D), Dichlormethan (technisch, destilliert), Hentriacontan-16-on (*ABCR*, 90%), Heptacosan-14-on (*TCI*, $> 95\%$), Dimethyl- d_6 -Sulfoxid (*Sigma Aldrich*, 99.9 atom % D), N,N-Dimethylformamid (*Sigma Aldrich*, $\geq 99.5\%$), 4 M HCL in 1,4-Dioxan (*TCI*), Kaliumcarbonat (*Sigma Aldrich*, $\geq 99.9\%$), Methanol (*Sigma Aldrich*, p.a.), 5-Methyluridin (*Aldrich*, 97%), Natriumhydrogencarbonat (*Merck*, p.a.), Natriumsulfat (*Sigma Aldrich*, purum), N,N-Diisopropylethylamin (*Sigma Aldrich*, 99.5%), Nonadecan-10-on (*TCI*, $> 97\%$), Orthoameisensäureethylester (*Fluka*, purum, $\geq 98\%$ (GC)), Pentatriacontan-18-on (*Alfa Aesar*, 97%), *trans-trans*-Farnesylbromid (*Sigma Aldrich*, 95%), Triethylamin (*Merck*, $\geq 99\%$), Undecan-6-on (*TCI*, $> 98\%$), Uridin (*Alfa Aesar*, 99%).

Für Bilayer-Einlagerungsexperimente und Fluoreszenz-Spektroskopische Untersuchungen wurden die Lipide 1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (POPE) und 1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) von *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, Al), *n*-Decan von *Alfa Aesar* (D-Karlsruhe), Dimethylsulfoxid (DMSO), Kaliumchlorid (KCl), 3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure (MOPS) und 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (TRIS) wurden von *Roth* (D-Karlsruhe), der DNA-Interkalationsfarbstoff SYBR Green I (SG I) in DMSO von *Appl-chem* (D-Darmstadt), die Justagefarbstoffe Rhodamin 6G (Rh6G = 5-Carboxy-Rhodamin 6G) und Rhodamin Green (RhGr = 5-Carboxy-Rhodamin Green) von *Molecular Probes* (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien), ATTO 647, ATTO 647N und ATTO 655 von *ATTO TEC* (D-Siegen) und MR121 (EVOblue) und Rhodamin 110 (Rh 110) von *Evotec Technologies* (D-Hamburg) bezogen.

4.2. DNA-Modell-Sequenz

Für die Darstellung lipophilisierter Oligomere wurden folgende Dodekamer- Sequenzen ausgewählt:

5'-d(NL-TAG GTC AAT ACT)-3'; NL = Nucleolipid]

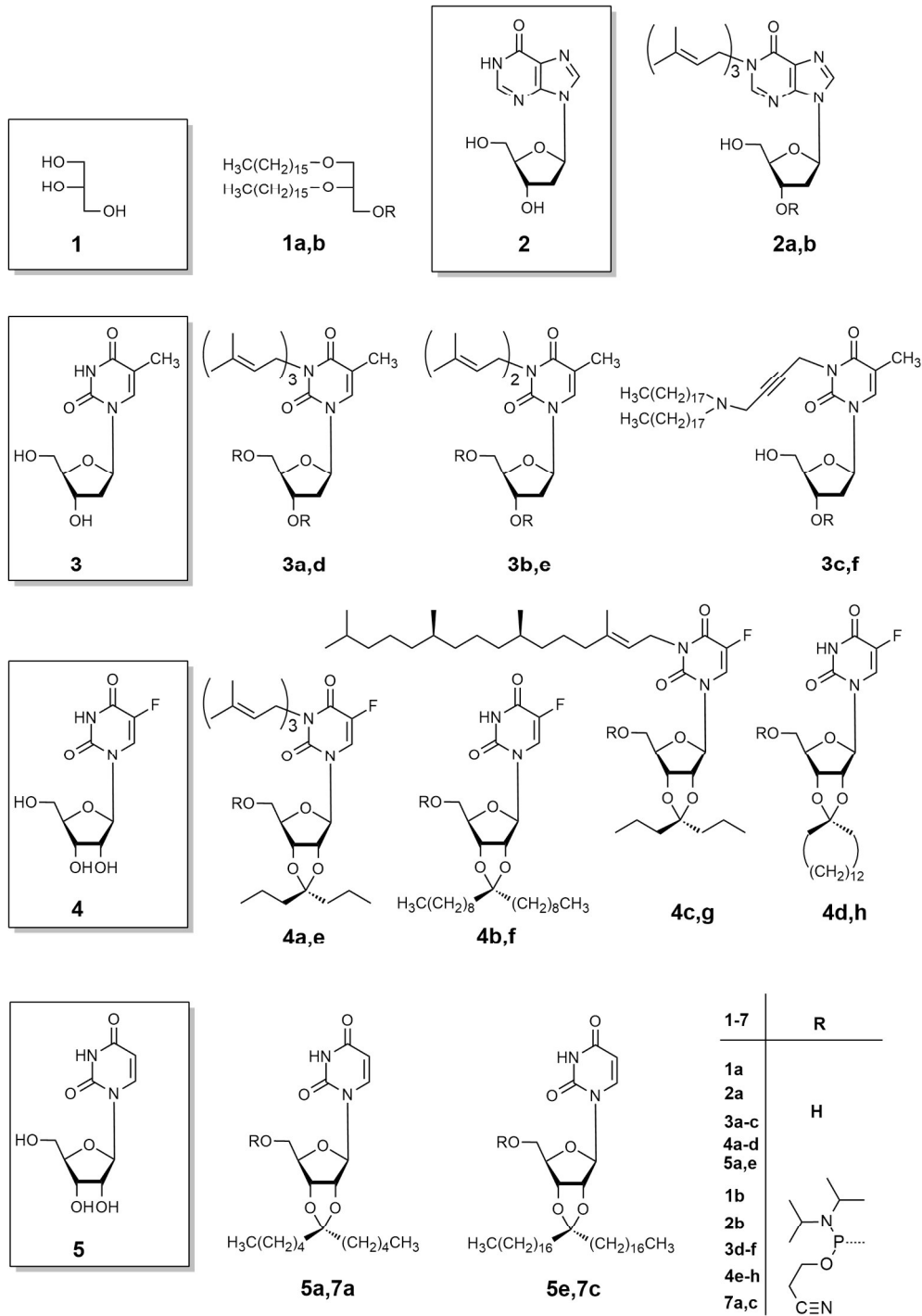
sowie

3'-d(ATC CAG TTA TGA)-5'

Diese Modellsequenzen bilden weder haarnadelförmige Strukturen noch selbst-komplementäre Duplexe^[140]. Der lipophilisierte und der komplementäre Strang enthalten die gleiche Anzahl kanonischer Nucleotide, so dass ein Gemisch beider Stränge aus je 1 A₂₆₀ Einheiten, in äquimolarer Lösung vorliegt. Darüber hinaus existieren für nahezu alle Basenpaare fast alle Nachbarkombinationen. Beide Stränge weisen dieselbe Zusammensetzung der Basen auf. Ein Duplex aus unmodifizierten Strängen weist einen Schmelzpunkt von 47°C in einem Phosphatpuffer auf^[140]. Einzelsträngige DNA-Dodekamere wurden sowohl mit verschiedenen Nucleolipid-Kopfgruppen, als auch mit Cyanin-Fluorophoren am 5'-Ende modifiziert, so dass die amphiphile Kopfgruppe verändert, die Oligonucleotidsequenz aber nicht variiert wurde.

4.3. Neue synthetische Nucleolipide

Die beschriebenen 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidite stellen reaktive Bausteine für die automatische Festphasen-Oligonucleotidsynthese dar und werden am 5'-Ende einer Oligonucleotidkette eingebaut.



Formelschema 3. Strukturformeln nucleosidischer und nicht-nucleosidischer Lipid-Derivate (**1a-5e**) sowie deren 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit Bausteine (**1b-7c**). N(3)-prenylierte und/oder 2',3'-O-ketalisierte β -D-Ribonucleosid-Pyrimidine Uridin (**5**), Thymidin (**3**) und 5-Fluoruridin (**4**) sowie das N(1)-prenylierte Purin-Inosin (**2**) und der C_{16} -doppelkettige nicht-nucleosidische Lipidbaustein ausgehend vom Glycerin (**1**).

4.4. Oligonucleotide und Lipo-Oligonucleotide

Alle Oligonucleotide wurden von Eurogentec SA, (B-Lüttig) synthetisiert und mittels MALDI TOF Massenspektrometrie charakterisiert (**Tabelle 1**):

Tabelle 1. Übersicht über die Lipo-Oligonucleotide (LONs) und Oligonucleotide (**13-32**), ihre terminalen Modifikationen (Nucleolipide (**1a-5e**) und Cyanin-Farbstoffe (Cy3 und Cy5)) sowie die Nucleinsäure-Sequenzen und die MALDI-TOF-MS Daten. Die tabellarische Reihenfolge der LONs und Oligonucleotide entspricht ihrer experimentellen Reihenfolge.

Lipo-Oligonucleotid/ Oligonucleotid	Modifikationen und 5'→3'- Sequenz	MALDI-TOF-MS (<i>m/z</i>)	
		[M+H] ⁺ gefunden	berechnet
<i>Studien zur Einlagerung einzelsträngiger Lipo-Oligonucleotide in den Lipid-Bilayer</i>			
LON 13	2a-Cy3-TAG GTC AAT ACT	4671.1	4671.6
LON 14	3a-Cy3-TAG GTC AAT ACT	4659.5	4660.6
LON 15	3b-Cy3-TAG GTC AAT ACT	4590.5	4592.5
LON 16	4a-Cy3-TAG GTC AAT ACT	4706.8	4777.7
LON 17	4b-Cy3-TAG GTC AAT ACT	4739.1	4740.7
LON 18	3c-Cy5-TAG GTC AAT ACT	5043.4	5054.4
LON 19	4b-Cy5-TAG GTC AAT ACT	4755.0	4767.8
LON 20	4c-Cy5-TAG GTC AAT ACT	4866.5	4875.9
LON 21	4d-Cy5-TAG GTC AAT ACT	4696.9	4707.6
LON 22	5a-Cy5-TAG GTC AAT ACT	4636.8	4637.8
LON 23	5e-Cy5-TAG GTC AAT ACT	4976.3	4974.4
<i>Studien zur Duplex-Bildung lipophilisierter Oligonucleotide am Lipid-Bilayer</i>			
LON 24	3a-TAG GTC AAT ACT	4152.3	4153.0
LON 25	3a-ATC CAG TTA TGA	4152.0	4153.0
26	Cy5-AGT ATT GAC CTA	4178.4	4178.1
LON 27	1a-TAG GTC AAT ACT	4247.7	4247.4
LON 28	1a-ATC CAG TTA TGA	4248.1	4247.4
29	AGT ATT GAC CTA	3645.5	3644.5
30	TCA ATT GAC GAT	3643.2	3644.5
31	TTT TAT AGT ATT GAC CTA TAT TTT	7306.4	7312.9
LON 32	1a-TTT TAT TAG GTC AAT ACT	6076.4	6077.6

4.5. Physikalisch-chemische Methoden

Alle neuen Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit dargestellt wurden, wurden durch folgende Methoden und Geräte charakterisiert:

1. **Dünnschichtchromatographie** mit DC-Aluminiumfertigplatten ALUGRAM extra SIL G/UV₂₅₄ (Merck) zur Bestimmung der R_f -Werte
2. **Präparative Säulenchromatographie** an Kieselgel 60 0.063-0.200 mm (J.T. Baker)
3. **$^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ - und $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektroskopie** mit AMX-500 Spektrometer (Bruker, Rheinstetten). Die $^1\text{H-NMR}$ Spektren wurden bei 500.14 MHz, die $^{13}\text{C-NMR}$ Spektren bei 125.75 MHz und ^{31}P -Spektren bei 101.3 MHz aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ in ppm und die Kopplungskonstanten J in Hz beziehen sich auf das Tetramethylsilan (TMS) als interne Referenzsubstanz (= 0 ppm).
4. **DEPT-135-Verfahren** mit AMX-500 Spektrometer (Bruker, D-Rheinstetten) für die Zuordnung der ^{13}C -Signale und Auswertung der ^{13}C -Spektren. Beim DEPT-135-Verfahren werden die Signale von C-Atomen in Abhängigkeit vom Impulswinkel $\theta = 135^\circ$ aufgenommen. In diesen Spekten sind nur die Signale der CH_3 -, CH_2 - oder der CH - Gruppen zu sehen. CH_3 - und CH -Gruppen zeigen ein positives, CH_2 -Gruppen ein negatives, quartäre C-Atome zeigen kein Signal.
5. **Elementaranalysen (C, H, N)** mit VarioMICRO Instrument (Elementar, D-Hanau)
6. **Schmelzpunktbestimmung** mit Stuart-SMP3 (Bibby Scientifics Limited, UK-Staffordshire)
7. **Theoretische Bestimmung der Lipophilie** über die Ermittlung der $^{10}\log P_{\text{ow}}$ -Werte auf <http://eadmet.com/de/physprop.php> mit ALOGPS v. 3.01 im ePhysChem Programm
8. **UV-Spektren** mit UV/Vis Spektrophotometer Cary 6000i (Varian, D-Darmstadt) zur Bestimmung der Absorptionsmaxima $\text{Abs}_{\lambda_{\text{max}}}$ und zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}}$ bei λ_{max} .

4.6. Kombinierte Methode aus konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie und der Bilayer-Technik

In diesem Kapitel werden die Methode sowie der Aufbau und die Gerätschaften (**Abbildung 12A-G**) zur automatisierten Bilayer-Herstellung und der Visualisierung der in den Bilayer eingelagerten farbstoff-markierten Lipo-Oligonucleotide beschrieben.

4.6.1. Horizontaler Lipid-Bilayer

Die Einlagerungsexperimente der Lipo-Oligonucleotide in Bilayermembrane wurden an künstlichen horizontalen Lipidbilayern durchgeführt. Der horizontale Lipid-Bilayer wird mit einer Lipidlösung aus 1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanol-amin (POPE) und 1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) (8:2, w/w, 10 mg/mL in *n*-Dekan) über einem Loch in der Teflonfolie des "Bilayer Slide" (*Bilayer Slides, Ionovation GmbH, D-Osnabrück*) (vgl. **Abbildung 12C**) erzeugt. Die Bilayer Slides sind spezielle Objektträger, deren Probekammer durch eine 25 µm dünne PTFE-Folie mit einer ~100 µm großen Öffnung in *cis*- und *trans*-Kompartimente unterteilt wird (vgl. **Abbildung 12F**). Sowohl der *cis*- wie auch der *trans*-Kanal der Bilayer Slide umfassen je 100 µL Pufferlösung. Die 100 µm Öffnung in der Folie ist die einzige Verbindung zwischen den einzelnen Kompartimenten. Nach dem Befüllen der Kammer mit Puffer (250 mM KCl, 10 mM MOPS/Tris pH 7) wurden die *cis*- und *trans* Kompartimente der Mess- bzw. Probekammer über Ag/AgCl-Elektroden miteinander verbunden. Zum Herstellen der Elektroden wurden Ø1 mm Silberdrähte in einer 1 M KCl-Lösung bei 5 V für 10 min chloriert. Um Grenzflächenpotentiale zu vermeiden wurden diese chlorierten Silberdrähte in Glasröhrchen mit aufgezogener und erkalteter Agarose (flüssige Agarose 2% (w/v)) eingebettet und mit einer 3 M KCl-Lösung aufgefüllt und montiert. Für den Bilayer werden ~0,2 µL Lipidlösung mit einer gebogenen Hamiltonspitze (*Hamilton Bonaduz AG, CH-Bonaduz*) auf die Öffnung in der Folie aufgetragen (**Abbildung 12E**). Ein kleiner Faraday-Käfig schirmt den Bilayer und die Elektroden vor elektrischen Störsignalen ab.

Mit dem Ionovation Explorer (*Ionovation GmbH, D-Osnabrück*) wird der Bilayer automatisch gezogen, dabei wird durch das Heben und Senken des Puffers in der Kammer das Lipid über die Öffnung im Teflon verteilt bis ein Bilayer über dem Loch hergestellt wird. Die Bildung eines stabilen Bilayers konnte optisch über Insight Cell 3D (*Evotec Technologies GmbH*) und elektronisch über Explorer V01 (*Ionovation GmbH, Osnabrück*) verfolgt werden.

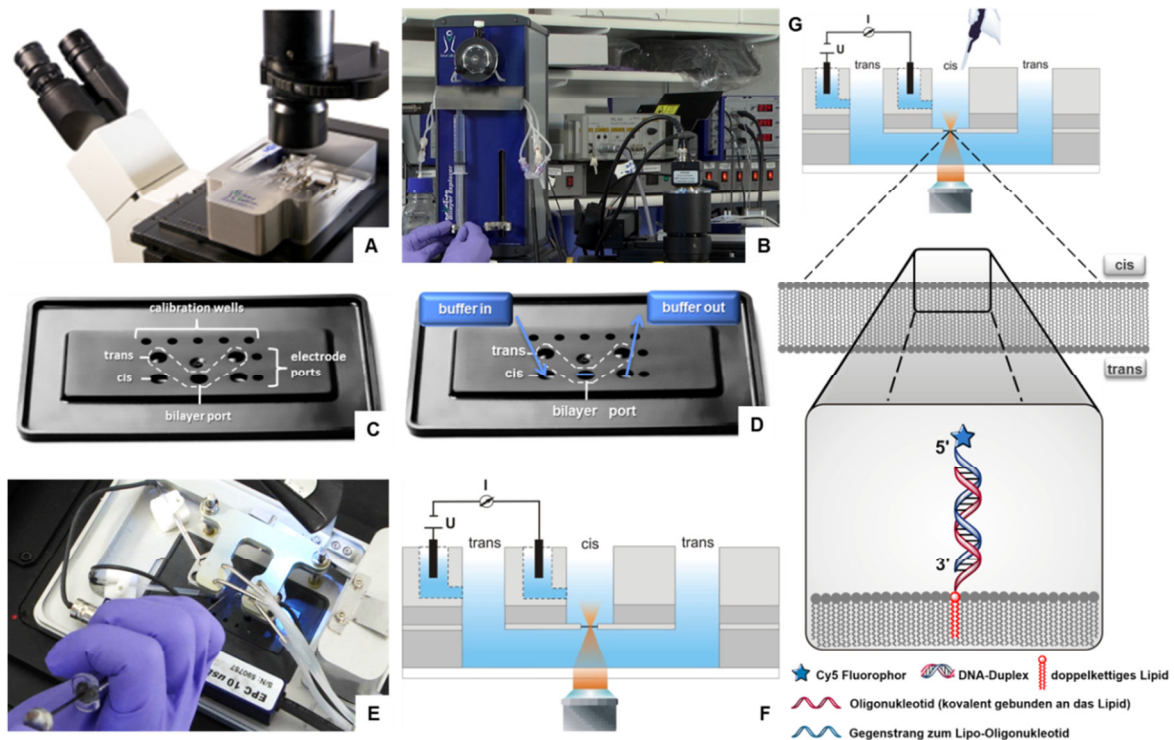


Abbildung 12. **A.** Der 'Innovation Explorer' wurde auf ein inverses Fluoreszenzmikroskop montiert. **B.** Automatisch gesteuerte hydraulische Pumpe zum Perfundieren und Bilayerziehen (links im Bild) beim Befüllen der Spritzen mit Pufferlösung. **C.** Bezeichnungen der einzelnen Kompartimente und Probenkammern des Bilayer Objektträgers ('Bilayer Slide'). Es handelt sich dabei um optisch transparente mikrofluidische Einwegplatten. **D.** Schematische Darstellung des Perfusionsvorganges des *cis*-Kompartiments. **E.** Zugabe der Lipidlösung in die Bilayer-Kammer. Links befinden sich Elektroden, die an den Verstärker angeschlossen sind und rechts befinden sich die Zu- und Ablaufschläuche, die mit dem Perfusionsaufsatz verbunden sind. **F.** Schematische Darstellung einer vertikal geschnittenen und mit Puffer befüllten 'Bilayer Slide'. Der Bilayer Objektträger enthält zwei mikrofluidische Kompartimente (*cis* und *trans*), die durch eine dünne Teflonfolie getrennt sind. Diese Folie enthält in der Mitte ein Loch mit einem ca. 100 μm großem Durchmesser und ist somit die einzige Verbindung zwischen dem *trans*- und dem *cis*-Kompartiment. Wenn diese Öffnung mit der Lipidlösung bedeckt und anschließend der Bilayer gezogen wird, wird die Verbindung zwischen den beiden Kompartimenten geschlossen. Die Elektroden messen den Widerstand und die Kapazität der Membran. **G.** Schematischer Versuchsaufbau zu den Bilayer-Einlagerungsmessreihen. Duplex-Bildung am Bilayer zwischen einem in der Membran verankerten lipophilen DNA-Strang und einem farbstoffmarkierten Gegenstrang. A-F nach [141, S. 2320], G. nach [ebd., S. 2310].

Sobald ein stabiler Bilayer gezogen werden konnte, wurden 4 μL einer 50 nM Probe in das *cis*-Kompartiment injiziert und anschließend in 5 bis 10 Minutenabständen bis zu 1.5 h lang inkubiert. Beobachtungen ergaben, dass die Kapazität eines stabilen Bilayers bei ca. 50 – 75 pF (Lochdurchmesser 100 μm) liegen sollte, damit der Bilayer während der Messreihe sich weder zusammenzieht noch platzt. Zusätzlich wurden beide Kammern oberhalb und unterhalb des Bilayers vor jeder Messung für mindestens 30 sec (1.1 mL/min) perfundiert, um zu prüfen, dass der Bilayer auch weiterhin stabil bleibt und um überschüssiges Lipid vom Teflon und aus der Lösung zu entfernen. Die elektrophysiologische Überwachungen wurden mit Hilfe eines Verstärkersystems (EPC 10 USB Patch Clamp Amplifier, HEKA Elektronik Dr. Schulze

GmbH, Lambrecht) durchgeführt und mit der Software (Patchmaster, HEKA) aufgezeichnet.

4.6.2. Fluoreszenz-Spektroskopische Untersuchungen

Die optischen Aufnahmen der Fluoreszenz-Fluktuationen wurden mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (*Insight Cell 3D, Evotec Technologies GmbH, D-Hamburg*) durchgeführt. Je nach Anregungsfarbstoff (Cy3, Cy5 oder SYBR Green I) war das Gerät entweder mit einem Helium-Neon-Laser 543 nm (*LGK 7786P, Lasos*), einem 488 nm Argon-Ionen Laser (*Multiline, 2014-25MLYVW (max. total power 50 mW), JDS Uniphase Corporation (Milpitas, CA, USA)*), einer 635 nm Laserdiode (*LDH-P-635, PicoQuant, D-Berlin*) oder einem 470 nm Laser (*P-C-470B, PicoQuant, D-Berlin*) sowie mit einem 40x Wasser-Immersion-Objektiv (*UApo 340 40x, NA 1.15, Olympus, Tokio, Japan*) und einem Avalanche-Photodioden-Detektor (*SPCM-AQR-13-FC, Perkin Elmer Optoelectronics, Fremont, CA*) ausgestattet. Die emittierten Photonen wurden auf den Detektor geleitet und korreliert.

Die Fluoreszenz-Anregung wurde mit einer Laser-Leistung von $60 \pm 5 \mu\text{W}$ (für 488 nm), $200 \pm 20 \mu\text{W}$ (für 635 nm) und $50 \pm 5 \mu\text{W}$ (für 470 nm) erreicht. Durch das 40x Objektiv wurde der Laserstrahl auf einen kleinen Punkt fokussiert. Die Aufnahmen der 2D- und 3D-Scans erfolgten durch ein Abrastern des konfokalen Punktes in XY-Richtung und durch die Bewegung des Objektivs in Z-Richtung. Beide Bewegungsrichtungen wurden durch Piezo-Elemente kontrolliert, die eine Nanometergenaue Positionierung des Fokus ermöglichten. Zur Aufnahme der Z-Scans (für die 3D-Darstellung) wurde das konfokale Volumen in 100 nm Schritten durch die Membranebenen bewegt. Aus den Fluoreszenz-Signalen einzelner Moleküle, die das angeregte konfokale Volumen passieren, kann die Diffusionszeit gemessen werden.

4.6.2.1. Messung der Fluoreszenzintensitäten im Bilayer

Die Durchführung der Messreihen zur Erfassung der Helligkeiten im Bilayer sieht vor, dass nach jeder Probenzugabe über den Bilayer in das *cis*-Kompartiment, die Probe inkubiert wird. Während des Inkubationsvorgangs werden Daten in Form von Scans und der Diffusionszeit erhoben. Nach der Inkubation der ersten Probe folgt entweder die Zugabe weiterer Proben für die Untersuchung der Duplexbildung oder der Perfusionsschritt. Dabei wird das *cis*-Kompartiment für 30 bis 60 Sekunden

(1.1 mL/min) gespült (vgl. **Abbildung 12D**). Auch die Perfusionen wurden mit Hilfe des Explorers (*Ionovation GmbH, D-Osnabrück*) durchgeführt. Auf jeden Perfusions-schritt folgt eine erneute Inkubationperiode der Probe. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis sich die Fluoreszenz im Bilayer nicht mehr signifikant änderte.

Die Auswertung der 2D- und 3D-Aufnahmen vom Bilayer erfolgte mit ImageJ v. 1.44. Dabei wird die Helligkeit im Bilayer erfasst und in Diagrammen veranschaulicht. Die mittlere Fläche eines Bilayerquerschnitts entspricht 300 - 400 Photonen pro Pixel ($N = 431$). Als nächstes wurde die Helligkeit im Bilayer bestimmt, indem die Pixelanzahl addiert wurde. Ein Pixel entspricht 1 kHz und 1 μm . Die Pixelzeit lag bei 1000 μs . Die Beschreibung der Technik, des Versuchsaufbaus sowie einiger Ergebnisse finden sich auch in einem Kurzfilm, der im RepOSitorium der Bibliothek der Universität Osnabrück hinterlegt wurde und zum freien Download zur Verfügung steht^[142], aber auch in den bereits veröffentlichten Ergebnissen^[16, 141, 144-146] beschrieben ist.

4.6.2.2. *Messung der Diffusionszeiten*

Zusätzlich zu den Helligkeitsmessungen der Einlagerung der LONs in den Lipid-Bilayer wurden Diffusionszeiten τ_D gemessen, um die Einlagerung einzelner LONs oder der DNA-Duplexe an der Lipidmembran auch physikalisch zu untersuchen. Dazu werden die Diffusionszeiten sowohl in freier Lösung und ohne die Lipidmembran, als auch in und knapp über der Lipidmembran gemessen. Für die Bestimmung der Diffusionszeiten einzelner fluoreszierender Oligomere und auch der DNA-Duplexe in reiner Lösung wurde für jedes Oligomer oder Oligomerpaar eine Lösung aus je 5 μL einer 50 nM Oligomerprobe mit 15 μL Puffer-Lösung hergestellt, so dass sich nur 1-2 fluoreszierende Teilchen im konfokalen Volumen (~ 1 fL) befinden. Jede Messung wurde 5-10 Mal für je 30 sec durchgeführt.

Um die Diffusionszeiten einzelner fluoreszierender Lipo-Oligonucleotide im Bilayer zu bestimmen, werden unter und über dem Bilayer sowie im Bilayer 5 Messpunkte festgelegt (Positionen 1-5: 1 = Puffer-Lösung im cis-Kanal, 2 = knapp über dem Bilayer, 3 = Bilayer, 4 = knapp unter dem Bilayer und 5 = Puffer-Lösung im trans-Kanal), an denen die Diffusionszeit gemessen wird. In den Ergebnissen werden nur die Diffusionszeiten an den zwei Messpunkten Position 1 (= im Bilayer) und Position 2 (= knapp über dem Bilayer; 5-10 μm) (vgl. **Abbildung 13**) beschrieben, da sich die Diffusionszeiten in der Lösung im cis- bzw. im trans-Kanal nicht von den Diffusi-

onszeiten der jeweiligen LONs in freier Lösung bzw. reiner Pufferlösung unterscheiden. Diese Vorgehensweise soll in erster Linie helfen, den Bilayer genauer zu treffen, da die Bilayermembran mehr oder weniger schwebt (floating) und sich somit über oder unter dem festgelegten Messpunkt befinden kann. An den Diffusionszeiten soll veranschaulicht werden, ob sich LONs in die Membran einlagern und damit in ihrer freien Diffusion eingeschränkt werden. Diese Werte werden mit den Diffusionszeiten, die in reiner Lösung gemessen werden, verglichen.

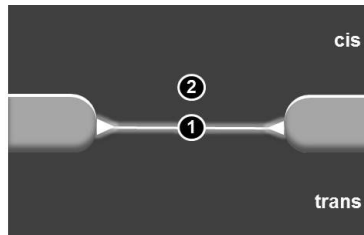


Abbildung 13. Schaubild eines xz-Schnitts durch den Lipid-Bilayer zur Darstellung der zwei Positionen, an denen die Diffusionszeiten gemessen werden. Position 1 (= Lipid-Bilayer) und Position 2 (= knapp über dem Lipid-Bilayer; ca. 5-10 µm). [141, S. 2311].

Um die Diffusionszeiten der im Bilayer eingelagerten Duplexe zu bestimmen, wurden diese ebenfalls an den zwei Positionen über und in der Bilayermembran (Position 1 = im Bilayer; Position 2 = knapp über dem Bilayer (ca. 5-10 µm)) gemessen, nachdem jedes der beiden zueinander komplementären Oligomere einzeln nacheinander in das cis-Kompartiment injiziert, für je 30 min inkubiert und einmal oder mehrmals perfundiert (30 sec, 1.1 mL/min) wurde.

4.6.2.3. **SG I-Interkalation als Nachweis der DNA-Hybridisierung am Bilayer**

Sobald eine stabile Bilayermembran gezogen werden konnte (Genaueres dazu siehe Kapitel 4.6.1 „Horizontaler Lipid-Bilayer“), wurden die einzelnen Proben nacheinander und zuletzt das SG über den Bilayer in das cis-Kompartiment gegeben. Jede Probe wurde nach der Zugabe für 30 Minuten inkubiert. Zuerst wurden 8 µL einer 500 nM-Lösung des lipophilisierten Oligonucleotids über den Bilayer in die Probenkammer injiziert und für 30 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 8 µL einer 500 nM-Lösung des Gegenstrangs hinzugegeben und ebenfalls 30 Minuten lang inkubiert. Zuletzt folgte die Zugabe des Interkalators SG (8 µL, kommerziell erworbene unverdünnte Lösung in DMSO – photometrische Konzentrationsbestimmung ergab 1.25 µg/mL) über die Membran. Nach der Zugabe des Fluorophors wurde solange inkubiert bis die Helligkeit im Bilayer nicht mehr zunahm. Währenddessen wurden

alle 5 bis 10 Minuten xz-Aufnahmen vom Bilayer gemacht. Sobald die Helligkeit im Bilayer nicht mehr zunahm, wurde der cis-Kanal 30 Sekunden lang perfundiert (1.1 mL/min). Im Anschluss daran folgte eine 10-minütige Inkubation. Dieser Vorgang der abwechselnden Perfusion der cis-Kammer und einer darauffolgenden Inkubation wurde solange wiederholt bis sich die Helligkeit im Bilayer nicht mehr änderte oder nicht mehr nachweisbar war. Der SG-Interkalationsfarbstoff wurde im Experiment A bei einer Wellenlänge von 470 nm und in den Experimenten B bis F, sowie in den Negativkontrollen bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt.

4.7. Photometrische Bestimmung der SG I – Konzentration

Da die Konzentration der käuflich erworbenen SYBR Green I - Lösung in DMSO (*Applichem, D-Darmstadt*) unbekannt war, wurde diese photometrisch durch die Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt. Die Absorptionsspektren wurden in 50 μL Quarzglasküvetten (SUPRASIL[®], Hellma; Schichtdicke 1 cm) im Bereich von 250 – 700 nm mit dem UV/Vis-Spektrophotometer SPECORD 205 (*Analytik Jena, D-Jena*) aufgenommen. Der Nullabgleich wurde mit dem reinen Lösungsmittel DMSO durchgeführt. Die photometrische Untersuchung zeigte zwei Absorptionsmaxima bei 366 nm und bei 494 nm. Mit der Absorption im Absorptionsmaximum λ_{max} bei $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$, der Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$, und dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} = 73.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [33-34] wurde eine Konzentration von 1.25 $\mu\text{g/mL}$ bestimmt.

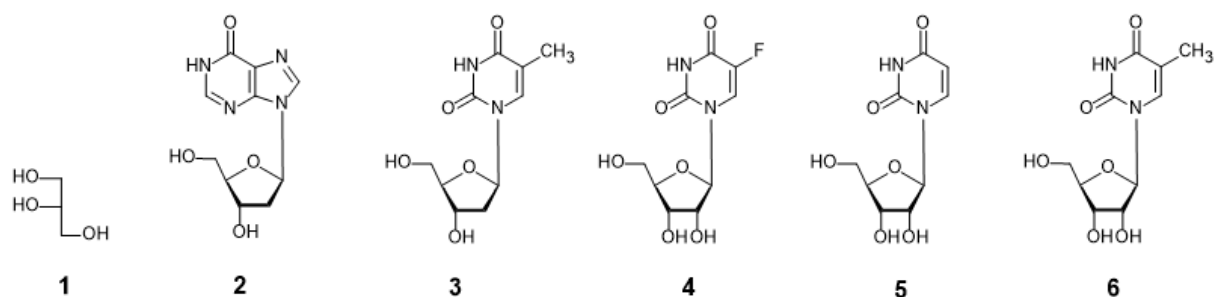
4.8. Assemblierung von Lipo-Oligonucleotiden an flüssig/flüssig-Phasengrenzen

Die spontane Assemblierung von Lipo-Oligonucleotiden an flüssig/flüssig-Phasengrenzen wurde an den Grenzflächen zwischen n-Dekan und Wasser sowie zwischen Wasser und Chloroform untersucht. Für die Proben wurden 96-Well-Mikroplatten (MC 96/30) mit einem Glasboden verwendet, jede Probenkammer umfasst maximal 30 μL Volumen. Bei dieser Messmethode musste darauf geachtet werden, dass die Volumina der Lösungsmittel so zu wählen waren, dass sich die Phasengrenze im Messbereich befand. Da aber die Phasengrenze zwischen zwei reinen Lösungsmitteln nicht deutlich zu erkennen war, wurde die Probenkammer mit 30 μL einer 0.1 μM Farbstofflösung (ATTO 655) befüllt und in kleinen Schritten wieder abgezogen, bis der Wasserspiegel im Fokus lag. Die Differenz davon ergab das Volumen des Lösungsmittels unter der späteren Phasengrenze. Aufgrund der Ober-

flächenspannungen der hier verwendeten Lösungsmittel (Wasser, Chloroform und n-Decan) war eine konkav-gewölbte Phasengrenze zu erwarten. Für diese Messungen wurden LONs gewählt, die sich schnell und fest in den Lipid-Bilayer einlagern. Die Konzentration der dafür verwendeten LONs lag bei 50 nM.

5. Darstellungen verschiedener Nucleolipide

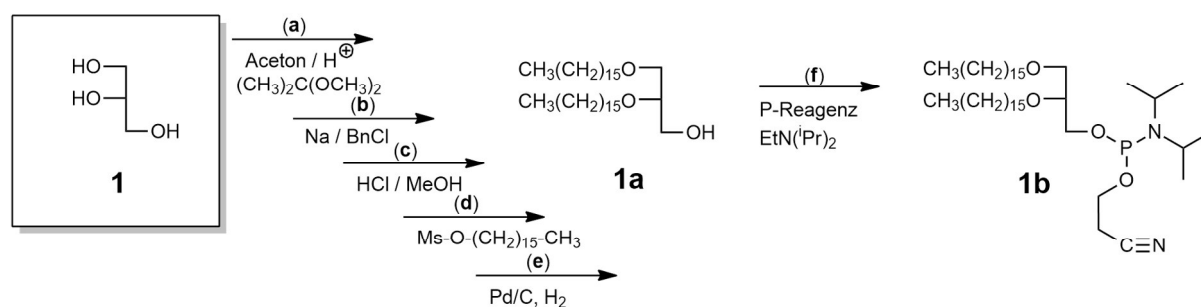
Im Folgenden wird eine Übersicht über die Nucleolipide und ihre Synthesen erstellt, welche die lipophilen Ankerbausteine der LONs in den Untersuchungen zur Einlagerung in künstliche Lipid-Membranen darstellen. Dazu wurden verschiedene nucleosidische sowie nicht-nucleosidische Moleküle (vgl. **Formelschema 4**) lipophilisiert und über ihre 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Derivate zu Oligonucleotiden mit terminalen Lipidgruppen, den sogenannten LONs, erweitert. Anschließend wurden diese LONs im Rahmen dieser Arbeit auf ihr Einlagerungsverhalten in künstliche Lipidmembrane untersucht. Alle Synthesevorschriften und chemisch-physikalische Untersuchungen zu den neuen Verbindungen sind bereits in verschiedenen Journalen veröffentlicht.



Formelschema 4. Strukturen nucleosidischer und nicht-nucleosidischer Bausteine zur Lipophilisierung und terminalem Einbau in Oligomere. Glycerin (1), Inosin (2), Thyminid (3), 5-Fluorouridin (4), Uridin (5) und 5-Methyluridin (6).

An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Darstellung der Bausteine (**3a-b**) sowie deren 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidite (**3d-e**) 2010 im Rahmen der eigenen Masterarbeit zum Thema „Terpenoid-Nucleosid Konjugate: Darstellung von DNA-Synthesebausteinen des N(3)-Farnesyl- und des N(3)-Geranyl-Thymidins“ entstanden sind^[18]. Die Bausteine (**2a**), (**3c**), (**4a-d**) sowie die jeweiligen 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidite wurden im Rahmen arbeitsgruppeninterner Bachelor- und Masterarbeiten dargestellt. Alle Synthesevorschriften und chemisch-physikalische Untersuchungen dieser lipophilen Verbindungen sind bereits in verschiedenen Veröffentlichungen erschienen.

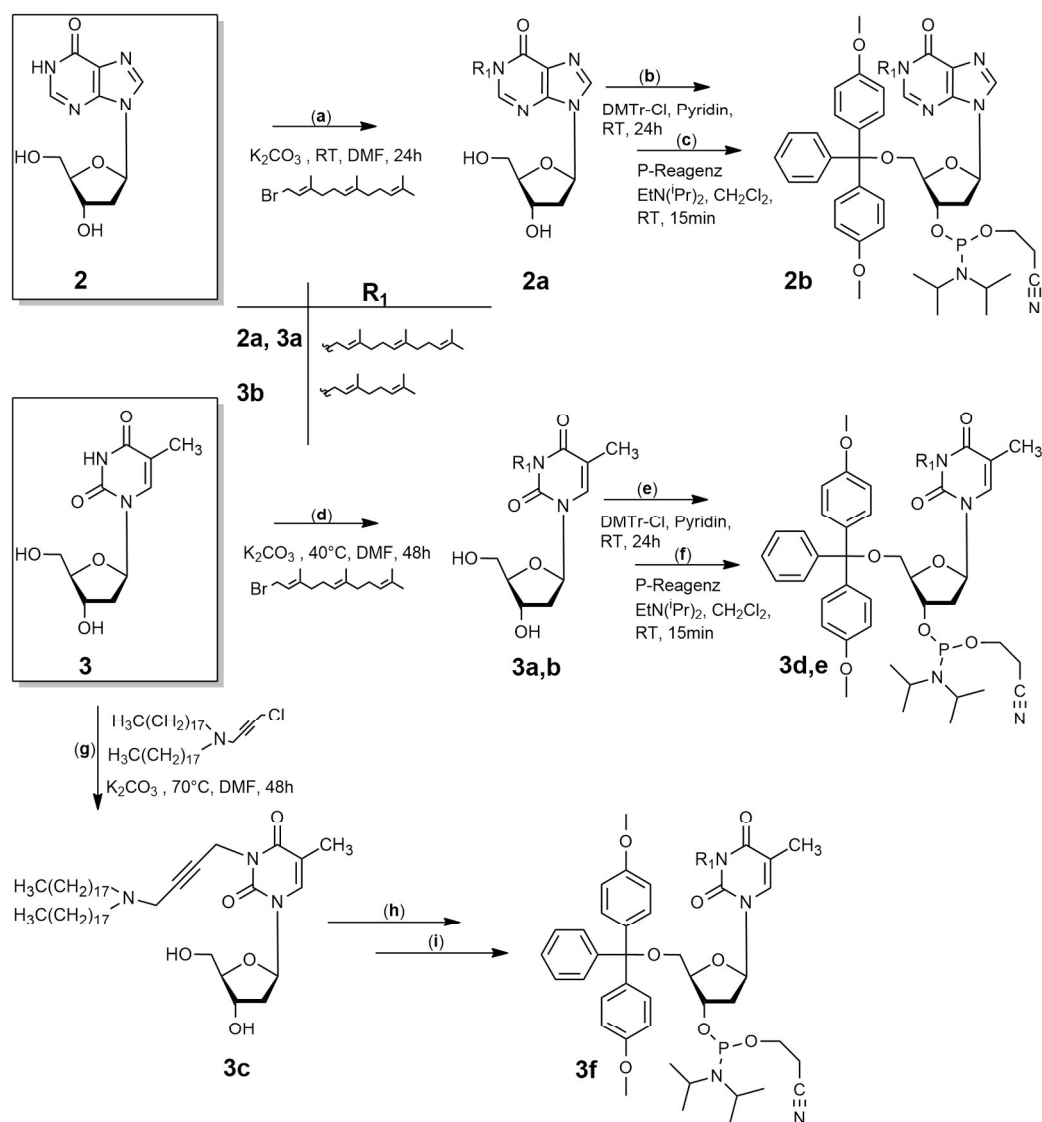
Zur Darstellung des 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidites **1b** musste das Glycerin erst über mehrere transiente Schutzgruppen geschützt werden, bevor dieses zum Di-Hexadecylglycerin verethert und schließlich nach dem Entfernen aller Schutzgruppen zum Phosphoramidit umgesetzt werden konnte (vgl. **Syntheschema 1**). Die Einführung der Isopropyliden-Schutzgruppe (a) erfolgte unter Einsatz des entsprechenden Dialkylacetals im saueren Milieu. Das Isopropylidenglycerin wurde über Natrium deprotoniert und mit Benzylchlorid (BnCl) zum 1-O-Benzyl-2,3-Isopropylidenglycerin verethert (b). Durch saure Hydrolyse wurde die Isopropyliden-Schutzgruppe entfernt (c). In basischer Lösung (KOH/Xylol) wurde das 1-Benzylglycerin schließlich mit Hexadecylmesylat zum 1-O-Benzyl-2,3-Di-O-Hexadecylglycerin umgesetzt (d), welches in der nächsten Reaktion am Pd/C-Katalysator zum 1,2-Di-O-Hexadecyl-*rac*-glycerol (**1a**) hydriert wurde. Das Di-Hexadecylglycerin wurde schließlich unter der Verwendung der Phosphit-Reagenz und der Hünigbase zum entsprechenden 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Derivat (**1b**) umgesetzt [7, 147]. Die Synthesen (a-e) sind der Doktorarbeit von H. Sigmund (1992) [148] zu entnehmen.



Syntheschema 1. Darstellung des 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidites (**1b**). (a) Einführen der Isopropyliden-Schutzgruppe über das Dialkylacetal 2,2-Dimethoxypropan. (b) Das Isopropylidenglycerin wurde mit Natrium deprotoniert und mit Benzylchlorid verethert. (c) Das vollgeschützte 1-O-Benzyl-2,3-Isopropylidenglycerin wurde unter saurer Hydrolyse zum 1-O-Benzylglycerin, (d) welches mit Hexadecylmesylat in KOH/Xylol zum 1-O-Benzyl-2,3-Di-O-Hexadecylglycerin umgesetzt wurde. (e) Hydrierung (10% Pd/C, Petrolether) des 1-O-Benzyl-2,3-Di-O-Hexadecylglycerins zum 1,2-Di-O-Hexadecyl-*rac*-glycerol (**1a**). (f) 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Derivat (**1b**) aus racemischem Gemisch (**1a**). Zu (a-e): Vgl. [148, S. 283-286]; zu (f): Vgl. [7, S. 273; modifizierte Synthese nach 147, S. 3413].

Zur Darstellung geranylierter und farnesylierter Nucleoterpene wurden die Desoxynucleoside 2'-Desoxyinosin (**2**) und Thymidin (**3**) ohne den Einsatz von Schutzgruppen direkt basen-katalytisch mit dem entsprechenden Terpenylbromid alkyliert [16] (vgl. **Syntheschema 2**). Für die direkte Alkylierung wurde die Methode nach Nawrot et al., 2001 [149] angewandt. Dabei wird das 2'-Desoxynucleosid mit einer milden Base (K_2CO_3) am N(3)- bzw. N(1)-Atom deprotoniert und mit trans, trans-Terpenylbromid alkyliert (a) bzw. (d). Vor der eigentlichen Umsetzung des Nucleolipids (**2a** und **3a-b**) zum jeweiligen 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit wurde in (b) die 5'-

Hydroxygruppe mit 4',4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid nach der Vorschrift von Ti et al., 1982^[16, 150] geschützt. Angelehnt an Ramzaeva et al., 2007^[151] wurden in der Reaktion (c) bzw. (f) (vgl. **Syntheschema 2**) das DMTr-geschützte Nucleolipid mit 2-(Cyanoethyl)-diisopropylchlorophosphit (P-Reagenz) und N,N-Diisopropylethylamin (Hünig-Base) in Dichlormethan unter Schutzgasatmosphäre (N₂) in einer 15 minütigen Reaktion zum jeweiligen 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit (**2b**) bzw. (**3d** oder **3e**) umgesetzt.



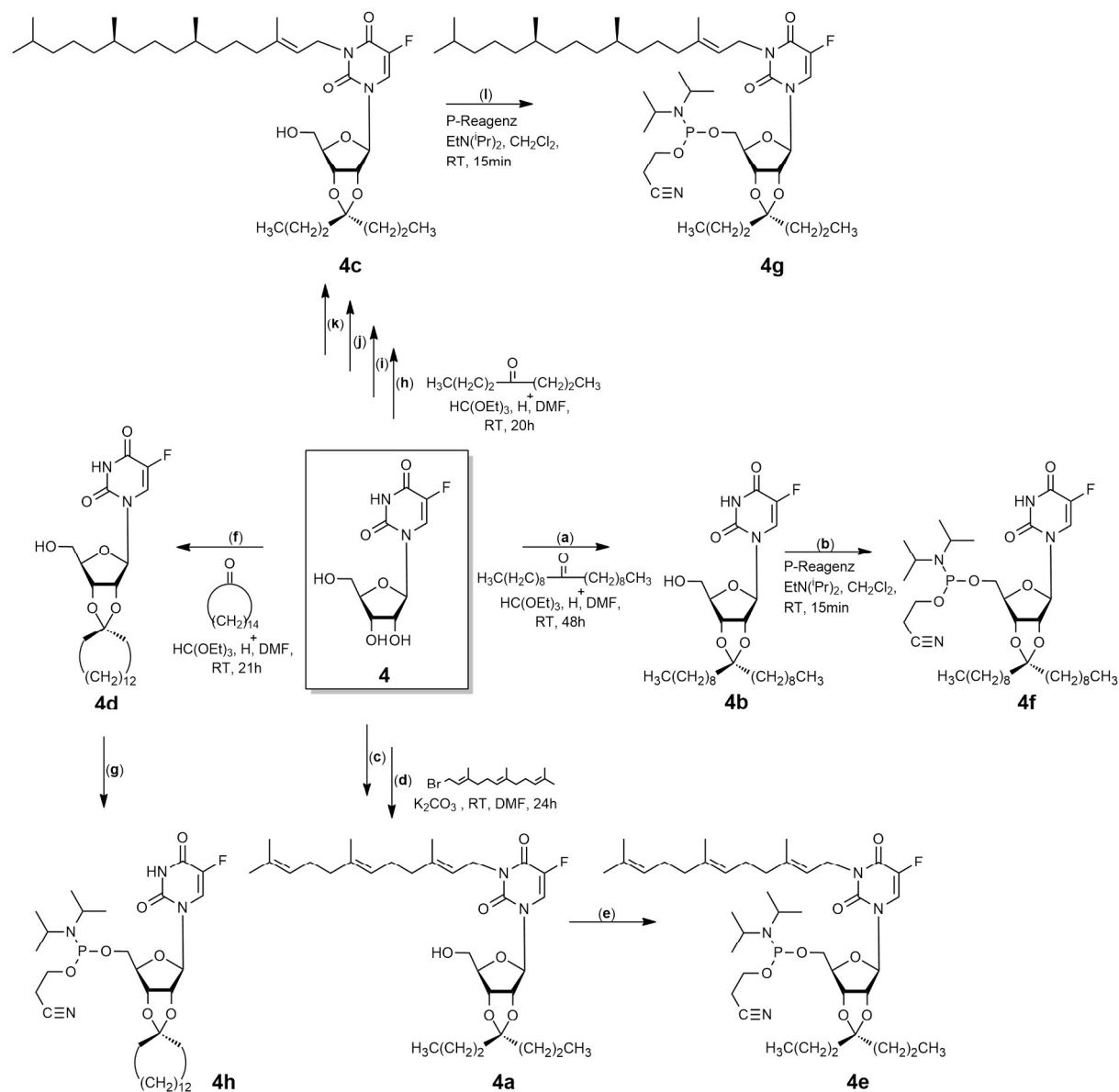
Syntheschema 2. Syntheseschritte zur Darstellung der 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Bausteine N(1)- bzw. N(3)-alkylierter Nucleosid-Derivate des 2'-Desoxyinosins (**2**) bzw. des Thymidins (**3**). Reaktionsschritt (a) bzw. (d): Direktalkylierung mit dem Terpenylbromid Farnesyl- für (**2a**) und (**3a**) oder Geranylbromid (**3b**) in DMF, K₂CO₃, RT und 24 h für das Umsetzen des 2'-Desoxyinosins (**2**) bzw. 40°C Ölbad und 48 h für das Umsetzen des Thymidins (**3**). (b) bzw. (e) DMTr-Cl in Pyridin, 24 h. (c) bzw. (f) P-Reagenz, Hünigbase, CH₂Cl₂, RT, 15 min. In (g) wurde das Thymidin an der N(3)-Position mit einem Alkylderivat des Dioctadecylamins zu **3c** umgesetzt (DMSO, K₂CO₃, 70°C, 48 h). (h) **3c** wurde mit der DMTr-Cl am 5'-OH gemäß (b) oder (e) geschützt. (i) Darstellung des 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidits **3f** gemäß (c) oder (f). Zu (a-f): [16, S. 40-42], zu (g-i): [152, S. 201-216].

In der Umsetzung des Thymidins (**3**) zum doppelkettigen C₁₇-Nucleolipid-Derivat (**3c**) (vgl. **Syntheschema 2**); Reaktion (g)) wurde das Thymidin ebenfalls nach der direkten Alkylierungsreaktion (DMF, K₂CO₃, 70°C, 48 h) mit einem Alkylderivat des Dioctadecylamins umgesetzt ^[152]. Dieser Baustein ist für weiterführende Clickchemie geeignet. Anschließend wurde das alkylierte Thymidin (**3c**) erst über das Einführen der DMTr-Gruppe am 5'-OH geschützt (h) und im nächsten Schritt (i) zum 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit (**3f**) umgesetzt ^[ebd.].

In **Syntheschema 3** wird die Darstellung diverser O-2',3'-zyklischer und azyklischer Ketale des 5-Fluorouridins (**4**) vorgestellt, von denen einige um eine Farnesyl- oder eine Phytol-Gruppe erweitert wurden. Im Allgemeinen erfolgte die O-2',3'-Ketalisierungsreaktion der im Folgenden dargestellten O-2',3'-Ketale des 5-Fluorouridins (**4**) durch die Umsetzung von Ketalen wie Nonadecan-10-on (a), Heptan-4-on (h) oder Cyclopentadecanon (f) mit 5-Fluorouridin in DMF unter Einsatz von Orthoameisensäuretriethylester und 4 M HCl in 1,4-Dioxan bei RT für 20-48 h. Zur Darstellung dieser 5-Fluorouridin-Derivate wird in Reaktion (a) 5-Fluorouridin mit Nonadecan-10-on zum azyklischen O-2',3'-Ketal-Derivat (**4b**) ^[153] und in (b) weiter zum 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Baustein (**4f**) ^[144] umgesetzt. Nach der Ketalisierung von (**4**) mit Heptan-4-on (c), wird dieses Derivat entweder wie in (d) einer direkten Alkylierung mit Farnesylbromid in Gegenwart von K₂CO₃ unter Verwendung von DMF als Lösungsmittel ^[144] oder wie in (h)-(k) einer N(3)-Alkylierung mit Phytol nach Mitsunobu ^[154] unterzogen.

Um ein N(3)-alkyliertes Produkt zu erhalten und um gleichzeitig die Bildungsmehrfach alkylierter Nebenprodukte zu unterbinden, werden vor der eigentlichen Alkylierungsreaktion die Hydroxyl-Gruppen des Nucleosids mehrfach geschützt. So werden in einer Ketalisierungsreaktion mit Heptan-4-on in Gegenwart von Orthoameisensäuretriethylester und 4 M HCl in 1,4-Dioxan erst die 2',3'-Hydroxylgruppen des 5-Fluorouridins (**4**) geschützt (h), im nächsten Schritt wird durch die Einführung der 4-Monomethoxy-triphenylmethyl-Gruppe die 5'-OH Gruppe geschützt (i). Im Zuge der Alkylierung nach Mitsunobu (j) wird das Zwischenprodukt mit Phytol und unter der Verwendung der Reagenzien PPh₃ und DEAD in THF bei 0°C zum N(3)-alkylierten-Derivat umgesetzt, welches dann im saueren Milieu am 5'-OH detrityliert (k) und im weiteren Verlauf (l) zum reaktiven 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit (**4g**) umgesetzt wird. In (f) erfolgt die O-2',3'-Ketalisierung von **4** mit Cyclopentadecanon

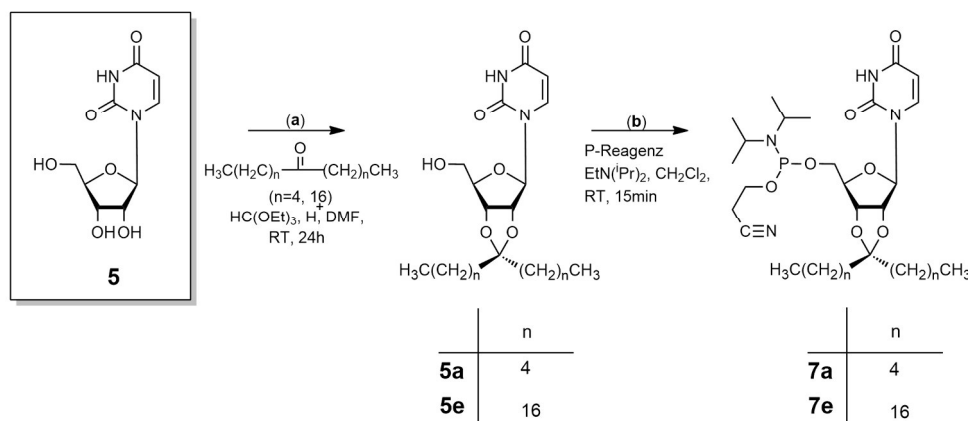
zum zyklischen Ketal des 5-Fluorouridins (**4d**), welches im nächsten Schritt zum 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit (**4h**) umgesetzt wird.



Syntheschema 3. Übersicht über die Darstellung der 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit Bausteine des N(3)-alkylierten und/oder O-2',3'-ketalisierten 5-Fluorouridins (**4**). **(a)** Ketalisierung von **4** mit Nonadecan-10-on zu **4b**. **(b)** Umsetzung von **4b** zum 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Baustein **4f**. **(c)** Ketalisierung von **4** mit Heptan-4-on. Dieses Derivat wird entweder wie in **(d)** einer direkten Alkylierung mit Farnesylbromid oder wie in **(h)-(k)** einer N(3)-Alkylierung mit Phytol nach Mitsunobu unterzogen. **(f)** O-2',3'-Ketalisierung von **4** mit Cyclopentadecanon zum zyklischen Ketal (**4d**), welches im nächsten Schritt zum 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit (**4h**) umgesetzt wurde. Zu **(a-e)**: Vgl. [144, S. 217-232]; zu **(f-g)**: [153, S. 1500-1512]; Vgl. zu **(h-l)**: Vgl. [145, S. 2209-2220].

Die Darstellung des Uridins (**5**) zum azyklischen O-2',3'-Ketal (**5a**) oder (**5e**) (vgl. **Syntheschema 4**; **(a)**) erfolgte durch die Umsetzung von Uridin mit Undecan-6-on oder mit Pentatriacontan-18-on (Näheres dazu in Kapitel **6.1.1** und **6.1.5**)^[143].

Anschließend werden diese O-2',3'-Ketal-Derivate (b) weiter zum jeweiligen 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Baustein (**7a**) bzw. (**7b**) umgesetzt. Alle neuen Verbindungen werden über die ^1H -, ^{13}C - bzw. ^{31}P -NMR-Spektroskopie, die UV/Vis-Spektroskopie sowie über die Elementaranalyse oder über die ESI-Massenspektroskopie charakterisiert.



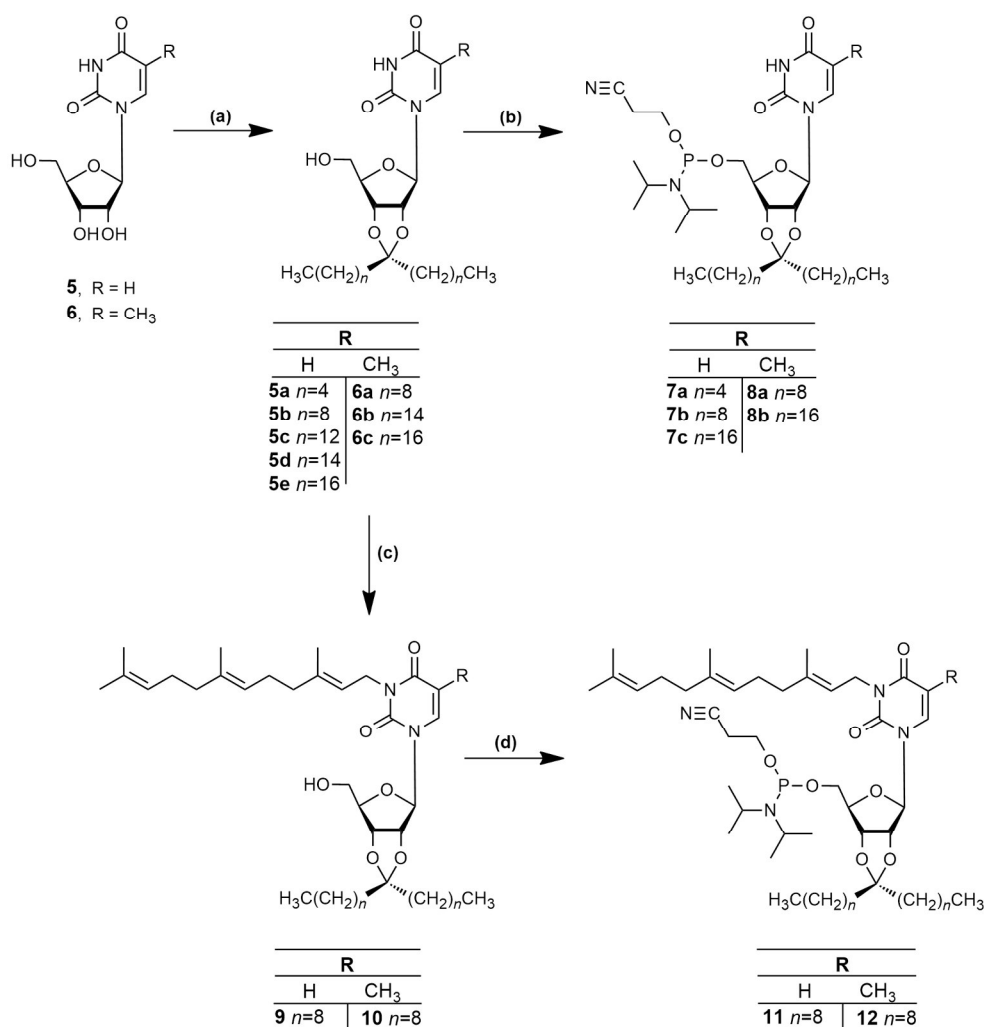
Syntheschema 4. Darstellung der 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Bausteine des O-2',3'-ketalisierten Uridins (**5**). (a) Ketalisierung von (**5**) mit Undecan-6-on zu (**5a**) bzw. mit Pentatriacontan-18-on zu (**5e**). (b) Umsetzung von (**5a**) oder (**5e**) zum 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Baustein (**7a**) bzw. (**7e**). Vgl. [143].

6. Darstellungen von Nucleolipiden des Uridins und des 5-Methyluridins sowie ihren 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Derivaten

Zwei Pyrimidinnucleoside – Uridin (**5**) und 5-Methyluridin (**6**) wurden zu amphiphilen Nucleolipiden umgesetzt. Diese Ausgangsverbindungen (**5**) und (**6**) wurden durch die Einführung symmetrischer O-2',3'-Ketalgruppen mit unterschiedlichen Kettelängen (5 – 17) lipophilisiert. Zwei dieser Ketal-Derivate wurden anschließend an der N(3)-Position durch das Einführen einer Farnesyl-Gruppe zusätzlich hydrophobisiert (**9**, **10**). Einige dieser Nucleolipide wurden nach der Ketalisierungsreaktion zum jeweiligen 2-Cyanoethylphosphoramidit umgesetzt, um anschließend eine Oligonucleotidkette terminal zu lipophilisieren.

Die Nucleoside Uridin und 5-Methyluridin werden über die Einführung langer symmetrischer Ketalgruppen sowie über die Prenylierung hydrophobisiert (vgl. **Syntheschema 5**), indem diese mit langkettigen symmetrischen Ketonen im sauren Medium (DMF) zu O-2'-3'-Ketalen (**5a-e** und **6a-c**) umgesetzt werden. Die Reaktionen erfolgten nach der Synthesevorschrift von Moreau et al., 2008 [155]. In diesem Kapitel werden die Darstellungen und die Charakterisierungen der neuen Verbindungen beschrieben. Einige dieser Nucleolipide wurden direkt zu Phosphoramiditen

(**7a-c**, **8a,b**) umgesetzt oder erst an der N(3)-Position mit *trans-trans* Farnesylbromid prenyliert (**9**, **10**)^[149] und im nächsten Schritt zum Phosphoramidit (**11** und **12**)^[151] umgesetzt. Alle Verbindungen wurden mittels der NMR und der UV/Vis-Spektroskopie sowie über die Elementaranalyse charakterisiert. Für die Auswertung der ¹³C-NMR-Spektren wurden DEPT-135-Spektren sowie NMR-Simulationsspektren herangezogen. Die lipophilisierten Verbindungen werden zu 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Derivaten umgesetzt. Diese stellen die reaktiven Bausteine für die automatische Festphasen-Oligonucleotidsynthese dar und können so am 5'-Ende einer Oligonucleotidkette eingefügt werden. Damit erwirbt die Oligonucleotidkette sowohl eine lipophile Eigenschaft, als auch Schutz gegen den enzymatischen Abbau durch die 5'-Exonukleasen.



Syntheseschema 5 über die Reaktionsschritte zur Lipophilisierung der β -D-Ribonucleoside Uridin (**5**) und 5-Methyluridin (**6**) zu Nucleolipiden (**5a-e**, **6a-c**, **9-10**) sowie ihren Phosphoramiditbausteinen (**7a-c**, **8a-b**, **11-12**). (a) Ketalisierung der Pyrimidinbase mit symmetrischen langkettigen Ketonen, 4 M HCl in 1,4-Dioxan, Orthoameisensäuretriethylester, RT, 24 h [155]. (b) P(III)-Reagenz, Hünigbase, CH₂Cl₂, RT, 15 min [151]. (c) *trans-trans* Farnesylbromid, DMF, K₂CO₃, RT, 24 h [149]. (d) siehe (b). Angelehnt an [143].

In diesem Kapitel werden die Synthesen und die physikalisch-chemischen Charakterisierungen der Nucleolipide und deren Phosphoramidit-Bausteine beschrieben. Für die Auswertung der ^1H - und der ^{13}C -NMR Spektren werden die Seitenketten und die Schutzgruppen der neuen Verbindungen wie in **Abbildung 14** nummeriert.

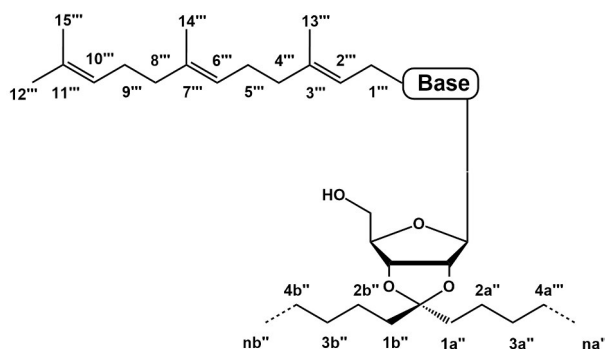


Abbildung 14. Nummerierung der Seitenketten und der Schutzgruppen der dargestellten Verbindungen für die Auswertung der ^1H - und der ^{13}C -NMR Spektren. Vgl. [143, S. 880].

6.1. 2',3'-O-Ketalisierung des Uridins und des 5-Methyluridins

6.1.1. 2',3'-O-(1-Pentahexanyliden)uridin (**5a**)

Getrocknetes Uridin (**5**; 0.76 g, 3.1 mmol) wurde in getrocknetem DMF (10 mL) gelöst und mit Undecan-6-on (0.80 mL, 3.9 mmol), 4 M HCl in 1,4-Dioxan (4 mL) sowie mit Orthoameisensäuretriethylester (1 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung zwischen CH_2Cl_2 (75 mL) und gesättigter NaHCO_3 -Lösung (50 mL) verteilt und extrahiert. Die organische Phase wurde mit destilliertem H_2O (100 mL) gewaschen und abgetrennt. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel an der Hochvakuumpumpe eingedampft. Die Aufreinigung erfolgte durch die Chromatographie an einer Kieselgelsäule (Kieselgel 60; Säule: 2 x 22 cm) schrittweise erst mit 750 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99:1, v/v) und anschließend mit 250 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5, v/v). Das isolierte und lösungsmittelfreie Produkt **5a** (1.1 g, 2.69 mmol, 87%) ist ein Öl, welches im Hochvakuum aufschäumt. UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). DC (Kieselgel 60; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5 (v/v)): R_f : 0.19. Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6$ (396.48): C, 60.59; H, 8.14; N, 7.07. Gefunden: C, 60.20; H, 8.11; N, 6.97.

^1H -NMR (500.13 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ [ppm]. 11.32 (s, H-N(3)); 7.77 (d, $^3\text{J}(\text{H-C}(6), \text{H-C}(5)) = 8.2$, H-C(6)); 5.83 (d, $^3\text{J}(\text{H-C}(1'), \text{H-C}(2')) = 2.5$, H-C(1')); 5.62 (dd, $^3\text{J}(\text{H-C}(5), \text{H-C}(6)) = 8.0$, $^4\text{J}(\text{H-C}(5), \text{H-N}(3)) = 1.7$, H-C(5)); 5.01 (t, $^3\text{J}(\text{OH-C}(5'), \text{H}_b\text{-C}(5')) = 5.04$, $^3\text{J}(\text{HO-C}(5'), \text{H}_a\text{-C}(5')) = 5.04$, OH-C(5')); 4.89 (dd, $^3\text{J}(\text{H-C}(2'), \text{H-C}(1'))$)

= 2.8, $^3J(\text{H-C}(2'), \text{H-C}(3')) = 6.6$, H-C(2')); 4.74 (*dd*, $^3J(\text{H-C}(3'), \text{H-C}(4')) = 3.5$, $^3J(\text{H-C}(3'), \text{H-C}(2')) = 6.6$, H-C(3')); 4.06 (*q*, $2x^3J(\text{H-C}(4'), \text{H}_2\text{-C}(5')) = 4.4$, $^3J(\text{H-C}(4'), \text{H-C}(3')) = 4.4$, H-C(4')); 3.56 (*m*, H₂-C(5')); 1.67 (*m*, H_{2(endo)}-C(1a'')); 1.52 (*m*, H_{2(exo)}-C(1b'')); 1.44-1.20 (*m*, $6x\text{H}_{2(endo)\text{-C}(2a''\text{-}4a'')}$, $6x\text{H}_{2(exo)\text{-C}(2b''\text{-}4b'')}$, 12H); 0.86 (*m*, $2x\text{H}_3\text{-C}(5a'', 5b'')$, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.76 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 163.06 (C(4)); 150.26 (C(2)); 141.94 (C(6)); 116.631 (C(Acetal)); 101.65 (C(5)); 91.20 (C(1')); 86.66 (C(4')); 83.79 (C(3')); 80.73 (C(2')); 61.34 (C(5')); 36.34 (C(1'')); 31.34 (C(3a'')); 31.25 (C(3b'')); 23.19 (C(2a'')); 22.51 (C(2b'')); 21.91 (C(4a'')); 21.89 (C(4b'')); 13.76 (C(5')).

6.1.2. 2',3'-O-(1-Nonadecanyliden)uridin (5b)

Getrocknetes Uridin (**5**; 0.76 g, 3.1 mmol) wurde im wasserfreien DMF (10 mL) gelöst, mit Nonadecan-10-on (1.11 g, 3.9 mmol), 4 M HCl in 1,4-Dioxan (4 mL) und Orthoameisensäuretriethylester (1 mL) versetzt und mit der Zugabe von CH₂Cl₂ (6 mL) in Lösung gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zwischen gesättigter NaHCO₃-Lösung (100 mL) und CH₂Cl₂ (100 mL) verteilt. Die org. Phase wurde mit dest. H₂O (100 mL) gewaschen, abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte durch Gradientenchromatographie an einer Kieselgelsäule (Kieselgel 60, Säule: 6.5 x 10 cm). Das Produkt wurde schrittweise erst mit 800 mL CH₂Cl₂/MeOH (99:1, v/v), dann mit 200 mL CH₂Cl₂/MeOH (95:5, v/v) von der Säule eluiert. Das isolierte und lösungsmittelfreie Produkt **5b** (1.50 g, 2.95 mmol, 95%) war im Hochvakuum ein farbloser Schaum. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (v/v)): *R_f*, 0.21. UV(MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Schmp.: 69.8°C. Elementaranalyse: berechnet für C₂₈H₄₈N₂O₆ (508.69) C, 66.11; H, 9.51; N, 5.51. Gefunden: C, 65.86; H, 9.50; N, 5.21.

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 11.33 (*s*, H-N(3)); 7.76 (*d*, $^3J(\text{H-C}(6), \text{H-C}(5)) = 8.0$, H-C(6)); 5.82 (*d*, $^3J(\text{H-C}(1'), \text{H-C}(2')) = 2.5$, H-C(1')); 5.62 (*d*, $^3J(\text{H-C}(5), \text{H-C}(6)) = 8.0$, H-C(5)); 5.02 (*m*, HO-C(5')); 4.89 (*dd*, $^3J(\text{H-C}(2'), \text{H-C}(1')) = 2.5$, $^3J(\text{H-C}(2'), \text{H-C}(3')) = 6.5$, H-C(2')); 4.73 (*dd*, $^3J(\text{H-C}(3'), \text{H-C}(4')) = 3.5$, $^3J(\text{H-C}(3'), \text{H-C}(2')) = 6.5$, H-C(3')); 4.05 (*q*, $2x^3J(\text{H-C}(4'), \text{H}_2\text{-C}(5')) = 4.2$, $^3J(\text{H-C}(4'), \text{H-C}(3')) = 4.2$, H-C(4')); 3.57 (*m*, H₂-C(5')); 1.66 (*m*, H_{2(endo)}-C(1a'')); 1.51 (*m*, H_{2(exo)}-C(1b'')); 1.30-1.20 (*m*, $7x\text{H}_{2(endo)\text{-C}(2a''\text{-}8a'')}$, $7x\text{H}_{2(exo)\text{-C}(2b''\text{-}8b'')}$, 28H); 0.85 (*m*, $2x\text{H}_3\text{-C}(9a'', 9b'')$, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.76 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]. 163.11 (C(4)); 150.28 (C(2)); 141.98 (C(6)); 116.63 (C(Acetal)); 101.67 (C(5)); 91.23 (C(1')); 86.69 (C(4')); 83.82 (C(3')); 80.70 (C(2')); 61.35 (C(5')); 36.38 (C(1a'')); 36.29 (C(1b'')); 31.21 (C(7a'')); 31.19 (C(7b'')); 29.09 (C(3a'')); 29.04 (C(3b'')); 28.86 (C(4a'')); 28.83 (C(4b'')); 28.80 (C(5'')); 28.59 (C(6a'')); 28.58 (C(6b'')); 23.52 (C(2a'')); 22.88 (C(2b'')); 22.01 (C(8a'')); 22.00 (C(8b'')); 13.85 (C(9')).

6.1.3. 2',3'-O-(1-Tridecyltetradecyliden)uridin (5c)

Heptacosan-14-on (0.40 g, 1 mmol) wurde in einer Lösung aus wasserfreiem THF (14 mL), Uridin (**5**; 1.22 g, 5 mmol), TsOH (0.19 g, 1 mmol) und Orthoameisensäuretriethylester (0.85 mL, 5.1 mmol) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei 75°C unter Rückfluss gekocht und mit Triethylamin (0.6 mL) versetzt. Anschließend wurde eine eisgekühlte 4%-ige NaHCO₃-Lösung (50 mL) dazugegeben und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit CH₂Cl₂ (100 mL) und dest. H₂O (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel eingedampft. Das Produkt wurde durch die Zugabe von eisgekühltem MeOH (15 mL) ausgefällt, abfiltriert und getrocknet. Das Produkt **5c** ist ein weißer Feststoff (0.41 g, 0.66 mmol, 65.6%). DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (v/v): *R_f*: 0.24. UV(CH₂Cl₂): λ_{max} = 260 nm (ϵ = 9.340 M⁻¹cm⁻¹). Schmp.: 90.1°C. Elementaranalyse: berechnet für C₃₆H₆₄N₂O₆ (620.90): C, 69.64; H, 10.39; N, 4.51. Gefunden: C, 69.77; H, 10.74; N, 3.92.

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]. 11.32 (*d*, $^4\text{J}(\text{H-N}(3), \text{OH-C}(5')) = 1.89, \text{H-N}(3)$); 7.76 (*d*, $^3\text{J}(\text{H-C}(6), \text{H-C}(5)) = 8.2, \text{H-C}(6)$); 5.82 (*d*, $^3\text{J}(\text{H-C}(1'), \text{H-C}(2')) = 2.5, \text{H-C}(1')$); 5.61 (*dd*, $^3\text{J}(\text{H-C}(5), \text{H-C}(6)) = 8.2, ^4\text{J}(\text{H-C}(5'), \text{H-N}(3)) = 2.2, \text{H-C}(5)$); 5.01 (*t*, $2 \times ^3\text{J}(\text{OH-C}(5'), \text{H}_2\text{-C}(5')) = 5.4, \text{OH-C}(5')$); 4.88 (*dd*, $^3\text{J}(\text{H-C}(2'), \text{H-C}(1')) = 2.5, ^3\text{J}(\text{H-C}(2'), \text{H-C}(3')) = 6.6, \text{H-C}(2')$); 4.73 (*dd*, $^3\text{J}(\text{H-C}(3'), \text{H-C}(4')) = 3.5, ^3\text{J}(\text{H-C}(3'), \text{H-C}(2')) = 6.6, \text{H-C}(3')$); 4.05 (*q*, $2 \times ^3\text{J}(\text{H-C}(4'), \text{H}_2\text{-C}(5')) = 4.4, ^3\text{J}(\text{H-C}(4'), \text{H-C}(3')) = 4.4, \text{H-C}(4')$); 3.55 (*m*, H₂-C(5')); 1.66 (*m*, H_{2(endo)}-C(1a'')); 1.51 (*m*, H_{2(exo)}-C(1b'')); 1.42-1.19 (*m*, $11 \times \text{H}_{2(endo)\text{-C}(2\text{a}''\text{-}12\text{a}'')}, 11 \times \text{H}_{2(exo)\text{-C}(2\text{b}''\text{-}12\text{a}'')}, 44\text{H}$); 0.85 (*m*, $2 \times \text{H}_3\text{-C}(13\text{a}'', 13\text{b}'')$, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.76 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]. 163.07 (C(4)); 150.26 (C(2)); 141.94 (C(6)); 116.62 (C(Acetal)); 101.66 (C(5)); 91.22 (C(1')); 86.68 (C(4')); 83.81 (C(3')); 80.68 (C(2')); 61.34 (C(5')); 36.38 (C(1a'')); 36.22 (C(1b'')); 31.21 (C(11'')); 29.05 (C(3a'')); 28.99 (C(3b'')); 28.96-28.59 (C(4'')-C(10'')); 22.48 (C(2a'')); 22.86 (C(2b'')); 22.00 (C(12'')); 13.84 (C(13'')).

6.1.4. 2',3'-O-(1-Pentadecylhexadecyliden)uridin (5d)

Uridin (**5**; 1.22 g, 5 mmol) wurde mit Hentriacontan-16-on (0.45 g, 1.0 mmol) zur Verbindung **5d** (0.36 g, 0.54 mmol, 53.7%), einem leicht gelblichen Feststoff, gemäß der Synthesevorschrift zur Verbindung **5c** umgesetzt. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (v/v)): *R_f*, 0.26. UV(CH₂Cl₂): λ_{max} = 260 nm (ε = 8.350 M⁻¹cm⁻¹). Schmp.: 93°C. Elementaranalyse: berechnet für C₄₀H₇₂N₂O₆ (677.01): C, 70.96; H, 10.72; N, 4.14. Gefunden: C, 71.08; H, 11.06; N, 3.74.

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 11.32 (s, H-N(3)); 7.77 (*d*, ³J(H-C(6), H-C(5)) = 8.0, H-C(6)); 5.83 (*d*, ³J(H-C(1'), H-C(2')) = 2.5, H-C(1')); 5.62 (*d*, ³J(H-C(5), H-C(6)) = 8.0, H-C(5)); 5.01 (*t*, 2x³J(OH-C(5'), H₂-C(5')) = 5.0, OH-C(5')); 4.88 (*dd*, ³J(H-C(2'), H-C(1')) = 2.5, ³J(H-C(2'), H-C(3')) = 6.5, H-C(2')); 4.73 (*dd*, ³J(H-C(3'), H-C(4')) = 3.5, ³J(H-C(3'), H-C(2')) = 6.3, H-C(3')); 4.05 (*q*, 2x³J(H-C(4'), H₂-C(5')) = 4.4, ³J(H-C(4'), H-C(3')) = 4.4, H-C(4')); 3.55 (*m*, H₂-C(5')); 1.66 (*m*, H_{2(endo)}-C(1a'')); 1.51 (*m*, H_{2(exo)}-C(1b'')); 1.41-1.16 (*m*, 13xH_{2(endo)}-C(2a''-14a''), 13xH_{2(exo)}-C(2b''-14a''), 52H); 0.85 (*m*, 2xH₃-C(15a'', 15b''), 6H).

¹³C-NMR (125.76 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 162.69 (C(4)); 150.03 (C(2)); 141.49 (C(6)); 116.52 (C(Acetal)); 101.45 (C(5)); 91.02 (C(1')); 86.44 (C(4')); 83.62 (C(3')); 80.50 (C(2')); 61.18 (C(5')); 36.32 (C(1a'')); 36.06 (C(1b'')); 30.90 (C(13'')); 28.77 (C(3a'')); 28.73 (C(3b'')); 28.66-28.28 (C(4'')-C(12'')); 23.18 (C(2a'')); 22.63 (C(2b'')); 21.66 (C(14'')); 13.46 (C(15'')).

6.1.5. 2',3'-O-(1-Heptadecyloctadecyliden)uridin (5e)

Uridin (**5**; 1.22 g, 5 mmol) wurde mit Pentatriacontan-18-on (0.5 g, 0.99 mmol) zur Verbindung **5e** (0.45 g, 0.61 mmol, 61.4%), einem weißen Feststoff, gemäß der Synthesevorschrift zur Verbindung **5c** umgesetzt. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (v/v)): *R_f*, 0.21. UV(CH₂Cl₂): λ_{max} = 260 nm (ε = 9.320 M⁻¹cm⁻¹). Schmp.: 89.7°C. Elementaranalyse: berechnet für C₄₄H₈₀N₂O₆ (733.12) C, 72.09; H, 11.00; N, 3.82. Gefunden: C, 71.70; H, 11.14; N, 3.81.

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-*d*₆, 60°C): δ [ppm]. 11.16 (s, H-N(3)); 7.74 (*d*, ³J(H-C(6), H-C(5)) = 8.0, H-C(6)); 5.84 (*d*, ³J(H-C(1'), H-C(2')) = 2.5, H-C(1')); 5.60 (*d*, ³J(H-C(5'), H-C(6)) = 8.2, H-C(5)); 4.88 (*m*, H-C(2') & OH-C(5'), 2H); 4.75 (*dd*, ³J(H-C(3'), H-C(4')) = 3.5, ³J(H-C(3'), H-C(2')) = 6.5, H-C(3')); 4.07 (*q*, 2x³J(H-C(4'), H₂-C(5')) = 4.3, ³J(H-C(4'), H-C(3')) = 4.3, H-C(4')); 3.53-3.63 (*m*, H₂-

C(5')); 1.68 (*m*, H₂-C(1a'')); 1.53 (*m*, H₂-C(1b'')); 1.43-1.19 (*m*, 15xH₂(endo)-C(2a''-16a''), 15xH₂(exo)-C(2b''-16b''), 60H); 0.86 (*m*, 2xH₃-C(17a'', 17b''), 6H).

¹³C-NMR (125.76 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 162.69 (C(4)); 150.03 (C(2)); 141.50 (C(6)); 116.52 (C(Acetal)); 101.45 (C(5)); 91.02 (C(1')); 86.44 (C(4')); 83.62 (C(3')); 80.50 (C(2')); 61.18 (C(5')); 36.32 (C(1a'')); 36.05 (C(1b'')); 31.19 (C(15'')); 28.76 (C(3a'')); 28.72 (C(3b'')); 28.79-28.25 (C(4'')-C(14'')); 23.17 (C(2a'')); 22.62 (C(2b'')); 21.66 (C(16'')); 13.46 (C(17'')).

6.1.6. 5-Methyl-2',3'-O-(1-nonadecanyliden)uridin (6a)

5-Methyluridin (6; 0.77 g, 3 mmol) wurde mit Nonadecan-10-on (1.13 g, 4 mmol), zur Verbindung **6a** (1.3 g, 83%), einem farblosen Öl, umgesetzt (siehe Synthesevorschrift zur Verbindung 5b). DC (Kieselgel 60, CH₂Cl₂/MeOH, 95:5, (v/v)): *R_f*, 0.31. UV(MeOH): λ_{max} = 265 nm (ε = 10.600 M⁻¹cm⁻¹). Elementaranalyse: berechnet für C₂₉H₅₀N₂O₆ (522,73): C, 66.63; H, 9.64; N, 5.36. Gefunden: C, 66.47; H, 9.272; N, 5.25.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 11.34 (*s*, H-N(3)); 7.63 (*s*, H-C(6)); 5.83 (*d*, ³J(H-C(1'),H-C(2')) = 2.5, H-C(1')); 5.02 (*t*, ³J(OH-C(5'), H₂-C(5')) = 5.0, (OH-C(5'))); 4.88 (*dd*, ³J (H-C(2'),H-C(1')) = 3.0, ³J (H-C(2'), H-C(3')) = 6.5, H-C(2')); 4.75 (*dd*, ³J(H-C(3'), H-C(2')) = 6.5; ³J(H-C(3'),H-C(4')) = 3.5, H-C(3')); 4.02 (*m*, ³J(H-C(4'), H-C(3')) = 3.5; ³J (H-C(4'), H₂C(5')) = 4.5, H-C(4')); 3.56 (*m*, H₂-C(5')); 1.76 (*s*, 3H, CH₃); 1.66 (*m*, H₂(endo)-C(1a'')); 1.52 (*m*, H₂(exo)-C(1b'')); 1.38 (*m*, H₂(endo)-C(2a'')); 1.24 (*m*, 6xH₂(endo)-C(3a''-8a''), 7xH₂(exo)-C(2b''-8b''), 26H); 0.85 (*m*, 2xH₃-C(9a'', 9b''), 6H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 163.66 (C(4)); 150.27 (C(2)); 137.50 (C(6)); 116.77 (C(Acetal)); 109.38 (C(5)); 90.52 (C(1')); 86.24 (C(4')); 83.50 (C(3')); 80.58 (C(2')); 61.31 (C(5')); 36.33 (C(1a'')); 36.28 (C(1b'')); 31.17 (C(7a'')); 31.16 (C(7b'')); 29.06 (C(3a'')); 29.01 (C(3b'')); 28.83 (C(4a'')); 28.81 (C(4b'')); 28.80 (C(5'')); 28.77 (C(6a'')); 28.55 (C(6b'')); 23.48 (C(2a'')); 22.86 (C(2b'')); 21.97 (C(8a'')); 21.96 (C(8b'')); 13.82 (C(9a'')); 13.81 (C(9b'')); 11.94 (CH₃-Base)).

6.1.7. 5-Methyl-2',3'-O-(1-Pentadecylhexadecyliden)uridin (6b)

5-Methyluridin (6; 1.29 g, 5 mmol) wurde mit Hentriacontan-16-on (0.45 g, 1.0 mmol) zur Verbindung **6b** (0.51 g, 74%), einem leicht gelblichen Feststoff, gemäß der Synthesevorschrift zur Verbindung **5c** umgesetzt. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (v/v)): *R_f*, 0.24. UV(CH₂Cl₂): λ_{max} = 263 nm (ε = 12.250 M⁻¹cm⁻¹).

Schmp.: < 70°C. Elementaranalyse: berechnet für C₄₁H₇₄N₂O₆ (691.04): C, 71.26; H, 10.79; N, 4.05. Gefunden: C, 72.39; H, 11.48; N, 3.33.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 11.09 (s, H-N(3)); 7.58 (s, H-C(6)); 5.83 (d, ³J(H-C(1'),H-C(2')) = 2.5, H-C(1')); 5.01 (t, 2x³J(OH-C(5'), H₂-C(5')) = 5.0, (OH-C(5'))); 4.89 (dd, ³J(H-C(2'),H-C(1')) = 2.8, ³J(H-C(2'), H-C(3')) = 6.6, H-C(2')); 4.77 (dd, ³J(H-C(3'), H-C(2')) = 6.6, ³J(H-C(3'),H-C(4')) = 3.5, H-C(3')); 4.05 (q, 2x³J(H-C(4'), H₂-C(5')) = 4.4, ³J(H-C(4'), H-C(3')) = 4.4, H-C(4')); 3.60 (m, H₂-C(5')); 1.79 (s, H₃-C(Base)); 1.66 (m, H_{2(endo)}-C(1a'')); 1.52 (m, H_{2(exo)}-C(1b'')); 1.43-1.19 (m, 13xH_{2(endo)}-C(2a''-14a''), 13xH_{2(exo)}-C(2b''-14b''), 52H); 0.85 (m, 2xH₃-C(15a'', 15b''), 6H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 163.14 (C(4)); 149.91 (C(2)); 136.94 (C(6)); 116.59 (C(Acetal)); 109.07 (C(5)); 90.50 (C(1')); 86.03 (C(4')); 83.31 (C(3')); 80.38 (C(2')); 61.12 (C(5')); 36.32 (C(1a'')); 36.03 (C(1b'')); 30.74 (C(13'')); 28.63 (C(3a'')); 28.61 (C(3b'')); 28.44-28.10 (C(4'')-C(12'')); 23.02 (C(2a'')); 22.52 (C(2b'')); 21.48 (C(14'')); 13.24 (C(15'')); 11.33 (CH₃-Base)).

6.1.8. 5-Methyl-2',3'-O-(1-Heptadecyloctadecyliden)uridin (6c)

5-Methyluridin (6; 1.29 g, 5 mmol) wurde mit Pentatriacontan-18-on (0.50 g, 1 mmol) zur Verbindung **6c** (0.5 g, 68%), einem weißen Feststoff, gemäß der Synthesevorschrift zur Verbindung **5c** umgesetzt. DC (Kieselgel 60, CH₂Cl₂/MeOH, 95:5, (v/v)): R_f, 0.19. UV(MeOH): λ_{max} = 263 nm (ε = 14.380 M⁻¹cm⁻¹). Schmp.: 72°C. Elementaranalyse: berechnet für C₄₅H₈₂N₂O₆ (747.14): C, 72.34; H, 11.06; N, 3.75. Gefunden: C, 72.39; H, 11.48; N, 3.33.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 11.31 (s, H-N(3)); 7.62 (s, H-C(6)); 5.84 (d, ³J(H-C(1'),H-C(2')) = 2.5, H-C(1')); 5.02 (t, 2x³J(OH-C(5'), H₂-C(5')) = 6.5, (OH-C(5'))); 4.88 (dd, ³J(H-C(2'),H-C(1')) = 2.5, ³J(H-C(2'), H-C(3')) = 6.6, H-C(2')); 4.75 (dd, ³J(H-C(3'), H-C(2')) = 6.6, ³J(H-C(3'),H-C(4')) = 3.5, H-C(3')); 4.02 (dd, 2x³J(H-C(4'), H₂-C(5')) = 4.2, ³J(H-C(4'), H-C(3')) = 4.2, H-C(4')); 3.57 (m, H₂-C(5')); 1.76 (s, H₃-C(base)); 1.66 (m, H_{2(endo)}-C(1a'')); 1.51 (m, H_{2(exo)}-C(1b'')); 1.37 (m, 2H_{endo}-C(2a'')); 1.24 (m, 14xH_{2(endo)}-C(3a''-16a''), 15xH_{2(exo)}-C(2b''-16b''), 58H); 0.85 (m, 2 x H-C(17a'', 17b''), 6H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 163.33 (C(4)); 150.04 (C(2)); 137.14 (C(6)); 116.64 (C(Acetal)); 109.18 (C(5)); 90.48 (C(1')); 86.09 (C(4')); 83.38 (C(3')); 80.44 (C(2')); 61.18 (C(5')); 36.31 (C(1a'')); 36.06 (C(1b'')); 30.90 (C(15'')); 28.75 (C(3a'')); 28.71 (C(3b'')); 28.59-28.27 (C(4'')-C(14'')); 23.17 (C(2a'')); 22.63 (C(2b'')); 21.66 (C(16'')); 13.46 (C(17'')); 11.56 (CH₃-Base)).

6.2. Alkylierung am N(3) der 2',3'-O-ketalisierten Uridin- und 5-Methyluridin-Derivate

6.2.1. 2',3'-O-(1-Nonadecanyliden)-3-[(2E, 6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-yl]uridin (9)

Verbindung **5b** (0.5 g, 0.98 mmol) wurde in wasserfreiem DMF (14 mL) gelöst und mit K_2CO_3 (1 g, 7.24 mmol) versetzt. Anschließend wurde unter Argon-Schutzatmosphäre das *trans-trans*-Farnesylbromid (0.35 mL, 1.1 mmol) tropfenweise 10 min lang dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei RT unter Ausschluss von Licht gerührt. Dann wurde das Gemisch filtriert und zwischen dest. H_2O (225 mL) und CH_2Cl_2 (150 mL) verteilt. Die org. Phase wurde abgetrennt, über Na_2SO_4 getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde eingengt und der Rückstand über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte über die Chromatographie an einer Kieselgelsäule (Kieselgel 60, Säule: 2 x 27 cm) mit einem Laufmittelgemisch aus CH_2Cl_2 und MeOH, 99:1 (v/v). Das isolierte und lösungsmittelfreie Produkt **9** (0.533 g, 0.75 mmol, 77%) war ein farbloses Öl. DC (Kieselgel 60; CH_2Cl_2 /MeOH 95:5 (v/v)): R_f , 0.59. UV(MeOH): λ_{max} = 260 nm (ϵ = $7010 M^{-1}cm^{-1}$). Elementaranalyse: berechnet für $C_{43}H_{72}N_2O_6$ (713.04): C, 72.43; H, 10.18; N, 3.93. Gefunden: C, 72.59; H, 10.58; N, 3.96.

1H -NMR (500.13 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]. 7.81 (d, $^3J(H-C(6), H-C(5))$ = 8.0, H-C(6)); 5.87 (d, $^3J(H-C(1'), H-C(2'))$ = 2.2, H-C(1')); 5.74 (d, $^3J(H-C(5), H-C(6))$ = 8.0, H-C(5)); 5.11 (t, $2x^3J(OH-C(5'), H_2-C(5'))$ = 6.5, OH-C(5')); 5.08-5.00 (m, H-C(2''', 6''', 10'''), 3H); 4.87 (dd, $^3J(H-C(2'), H-C(1'))$ = 2.5, $^3J(H-C(2'), H-C(3'))$ = 6.6, H-C(2')); 4.73 (dd, $^3J(H-C(3'), H-C(4'))$ = 3.0, $^3J(H-C(3'), H-C(2'))$ = 6.5, H-C(3')); 4.41-4.38 (m, $H_2-C(1''')$); 4.09 (q, $2x^3J(H-C(4'), H_2-C(5'))$ = 4.2, $^3J(H-C(4'), H-C(3'))$ = 4.2, H-C(4')); 3.61-3.51 (m, $H_2-C(5')$); 2.03 (m, $H_2-C(5''')$); 2.00-1.92 (m, $H_2-C(8''', 9''')$, 4H); 1.92-1.87 (m, $H_2-C(4''')$); 1.73 (s, $H_3-C(13''')$); 1.69-1.66 (m, $H_2-C(1a'')$); 1.63 (s, $H_3-C(12''')$); 1.54 (s, $H_3-C(14''')$); 1.51 (m, $H_2-C(1b'')$); 1.42-1.18 (m, $7xH_{2(endo)}-C(2a''-8a'')$, $7xH_{2(exo)}-C(2b''-8b'')$, 28H); 0.85 (m, $2xH_3-C(9a'', 9b'')$, 6H).

^{13}C -NMR (125.76 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]. 161.55 (C(4)); 150.20 (C(2)); 140.18 (C(6)); 138.81 (C(3''')); 134.45 (C(7''')); 130.47 (C(11''')); 124.01 (C(6''')); 123.49 (C(10''')); 118.69 (C(2''')); 116.56 (C(Acetal)); 100.87 (C(5)); 92.09 (C(1')); 86.79 (C(4')); 83.99 (C(3')); 80.72 (C(2')); 61.28 (C(5')); 39.04 (C(8''')); 38.74 (C(4''')); 38.17 (C(1''')); 36.36 (C(1a'')); 36.31 (C(1b'')); 31.19 (C(7a'')); 31.16 (C(7b'')); 29.07 (C(3a'')); 29.02 (C(3b'')); 28.83 (C(4a'')); 28.78 (C(4b'')); 28.58 (C(5a'')); 28.56 (C(5b'')); 28.58 (C(6a'')); 28.59 (C(6b'')); 26.09 (C(5''')); 25.62 (C(9'''));

25.34 (C(12''')); 23.48 (C(2a'')); 22.83 (C(2b'')); 21.99 (C(8'')); 17.41 (C(15''')); 16.06 (C(14''')); 15.66 (C(13''')); 13.81 (C(9'')).

6.2.2. 5-Methyl-2',3'-O-(1-Nonadecanyliden)-3-[(2E,6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-yl]uridin (10)

Verbindung **6a** (0.52 g, 1 mmol) wurde mit *trans-trans*-Farnesylbromid (0.35 mL, 1.1 mmol) zur Verbindung **10** (0.5 g, 68%), einem farblosen Öl, gemäß der Synthesevorschrift zur Verbindung **9** umgesetzt. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (v/v): *R_f*, 0.66. UV(CH₂Cl₂): λ_{max} = 266 nm (ε = 8.700 M⁻¹cm⁻¹). Elementaranalyse: berechnet für C₄₄H₇₄N₂O₆ (727.07): C, 72.69; H, 10.26; N, 3.85. Gefunden: C, 72.67; H, 9.925; N, 3.76.

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 7.68 (s, H-C(6)); 5.89 (d, ³J(H-C(1'),H-C(2')) = 2.5, H-C(1'')); 5.12 (t, ³J(OH-C(5'), H₂-C(5')) = 5.0, OH-C(5'')); 5.07-5.00 (m, H-C(2''', 6''', 10'''), 3H); 4.85 (dd, ³J(H-C(2'),H-C(1')) = 2.8, ³J(H-C(2'), H-C(3')) = 6.6, H-C(2'')); 4.76 (dd, ³J(H-C(3'), H-C(2')) = 6.6; ³J(H-C(3'),H-C(4')) = 3.5, H-C(3'')); 4.39 (m, H₂-C(1''')); 4.06 (m, H-C(4'')); 3.62-3.52 (m, H₂-C(5'')); 2.03 (m, H₂-C(5''')); 1.99-1.92 (m, H₂-C(8''', 9'''), 4H); 1.92-1.86 (m, H₂-C(4''')); 1.81 (s, H₃-C(Base)); 1.74 (s, H₃-C(13''')); 1.69-1.64 (m, H_{2(endo)}-C(1a'')); 1.63 (s, H₃-C(12''')); 1.54 (s, H₃-C(14''')); 1.52 (m, H_{2(exo)}-C(1b'')); 1.43-1.17 (m, 7xH_{2(endo)}-C(2a''-8a''), 7xH_{2(exo)}-C(2b''-8b''), 28H); 0.85 (m, 2xH₃-C(9a'', 9b''), 6H).

¹³C-NMR (125.76 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]. 162.27 (C(4)); 150.09 (C(2)); 138.71 (C(6)); 135.71 (C(3''')); 134.42 (C(7''')); 130.45 (C(11''')); 123.98 (C(6''')); 123.46 (C(10''')); 118.75 (C(2''')); 116.74 (C(Acetal)); 108.57 (C(5)); 91.42 (C(1')); 86.34 (C(4')); 83.64 (C(3')); 80.61 (C(2')); 61.25 (C(5')); 38.98 (C(8''')); 38.76 (C(4''')); 38.52 (C(1''')); 36.30 (C(1'')); 31.15 (C(7a'')); 31.13 (C(7b'')); 29.03 (C(3a'')); 28.97 (C(3b'')); 28.80 (C(4a'')); 28.74 (C(4b'')); 28.55 (C(5a'')); 28.52 (C(5b'')); 26.06 (C(6a'')); 25.55 (C(6b'')); 25.32 (C(5''')); 23.44 (C(9''')); 22.80 (C(12''')); 21.95 (C(2a'')); 21.93 (C(2b'')); 17.37 (C(8'')); 16.03 (C(15''')); 15.64 (C(14'')); 13.79 (C(13''')); 13.78 (C(9'')); 12.59 (H₃C-(Base)).

6.3. Darstellung der 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidit-Bausteine 2',3'-O-ketalisierter Uridin- und 5-Methyluridin-Derivate

6.3.1. 5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-2',3'-O-(1-pentylhexyliden)uridin (7a)

Verbindung **5a** (0.214 g, 0.3 mmol) wurde in CH₂Cl₂ (15 mL) gelöst. Unter Argon-Schutzatmosphäre wurden N,N-Diisopropylethylamin (125 µL, 0.72 mmol) und 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidit (156 µL, 0.6 mmol) hinzugegeben. Das Gemisch wurde 17 min bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe einer eisgekühlten 5%-igen NaHCO₃-Lösung (12 mL) abgebrochen und mit CH₂Cl₂ (15 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden gesammelt und 1 min über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel bis zur Trocknung evaporiert. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte chromatographisch an einer Kieselgelsäule (Kieselgel 60, Säule: 2 x 10 cm) mit einem Laufmittelgemisch aus CH₂Cl₂ und Aceton, 8:2 (v/v) mit 8 Tropfen Triethylamin pro Liter Lösungsmittelgemisch. Das isolierte und lösungsmittelfreie Produkt **7a** (0.13 g, 0.22 mmol, 71%) war ein farbloses Öl und wurde bei -20°C gelagert. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/Aceton 8:2 (v/v)): *R_f*, 0.66.

³¹P-NMR (202.45 MHz, CDCl₃): δ. 149.40 (P_R), 149.30 (P_S).

6.3.2. 5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-2',3'-O-(1-nonadecanyliden)uridin (7b)

Verbindung **5b** (0.153 g, 0.3 mmol) wurde zum Phosphoramidit **7b** gemäß der Synthesevorschrift zu **7a** umgesetzt. Ausbeute: 0.157 g (0.22 mmol, 73 %) eines farblosen Öls, welches bei -20°C gelagert wurde. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/Aceton 8:2 (v/v)): *R_f*, 0.89. ³¹P-NMR (202.45 MHz, CDCl₃): δ [ppm]. 149.46 (P_R), 149.37 (P_S).

6.3.3. 5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-2',3'-O-(1-heptadecyloctadecyliden)uridin (7c)

Verbindung **5e** (0.22 g, 0.3 mmol) wurde zum Phosphoramidit **7c** gemäß der Synthesevorschrift zu **7a** umgesetzt. Ausbeute: 0.1 g (0.17 mmol, 57%) eines farblosen Öls, welches bei -20°C gelagert wurde. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/Aceton 8:2 (v/v)): *R_f*, 0.81. ³¹P-NMR (202.45 MHz, CDCl₃): δ [ppm]. 149.46 (P_R), 149.38 (P_S).

6.3.4. 5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-5-methyl-2',3'-O-(1-nonyldecyliden)uridin (8a)

Verbindung **6a** (0.157 g, 0.3 mmol) wurde zum Phosphoramidit **8a** gemäß der Synthesevorschrift zu **7a** umgesetzt. Ausbeute: 0.155 g (71%) eines farblosen Öls, welches bei -20°C gelagert wurde. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/Aceton 8:2 (v/v)): *R_f*, 0.88. ³¹P-NMR (202.45 MHz, CDCl₃): δ [ppm]. 149.36 (P_R), 149.22 (P_S).

6.3.5. 5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-5-methyl-2',3'-O-(1-heptadecyloctadecyliden)uridin (8b)

Verbindung **6c** (0.214 g, 0.3 mmol) wurde zum Phosphoramidit **8b** gemäß der Synthesevorschrift zu **7a** umgesetzt. Ausbeute: 0.20 g (0.21 mmol, 70%) eines farblosen Öls, welches bei -20°C gelagert wurde. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/Aceton 8:2 (v/v)): *R_f*, 0.87. ³¹P-NMR (202.45 MHz, CDCl₃): δ [ppm]. 149.31 (P_R), 149.17 (P_S).

6.3.6. 5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-2',3'-O-(1-nonyldecyliden)-3-[(2E,6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1yl]uridin (11)

Verbindung **9** (0.214 g, 0.3 mmol) wurde zum Phosphoramidit **11** gemäß der Synthesevorschrift zu **7a** umgesetzt. Ausbeute: 0.253 g (0.26 mmol, 87%) eines farblosen Öls, welches bei -20°C gelagert wurde. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/Aceton 8:2 (v/v)): *R_f*, 0.97. ³¹P-NMR (202.45 MHz, CDCl₃): δ [ppm]. 149.34 (P_R), 149.31 (P_S).

6.3.7. 5'-O-[[Bis(1-methylethyl)amino](2-cyanoethoxy)phosphino]-5-methyl-2',3'-O-(1-nonadecanyliden)-3-[(2E,6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1yl]uridin (12)

Verbindung **10** (0.214 g, 0.3 mmol) wurde zum Phosphoramidit **12** gemäß der Synthesevorschrift zu **7a** umgesetzt. Ausbeute: 0.20 g (0.22 mmol, 77.9%) eines farblosen Öls, welches bei -20°C gelagert wurde. DC (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/Aceton 8:2 (v/v)): *R_f*, 0.97. ³¹P-NMR (202.45 MHz, CDCl₃): δ [ppm]. 149.28 (P_R), 149.26 (P_S).

7. Ergebnisse und Diskussion

7.1. Lipophilie

Die Lipophilie der dargestellten O-2',3'-Ketale des Uridins (**5a-e**) und des 5-Methyluridins (**6a-c**) wurde sowohl experimentell über die R_f -Werte als auch theoretisch über die $^{10}\log P_{ow}$ -Werte bestimmt. In **Abbildung 15A** werden die R_f -Werte dieser neuen Uridin- und Methyluridin-O-2',3'-Ketalverbindungen in Abhängigkeit von der Länge ihrer Kohlenstoffkette dargestellt. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die Lipophilie dieser Nucleolipide nicht allein von der Alkylkettenlänge abhängig ist - wie es zunächst zu erwarten gewesen wäre (siehe dazu $^{10}\log P_{ow}$ -Werte in **Abbildung 15B**) - sondern auch von der Anzahl ihrer lipophilen Einheiten am Gesamtmolekül. Unabhängig davon, ob es sich bei den Nucleolipiden um O-2',3'-Ketale mit zwei sehr kurzen C₅-Ketten (**5a**) oder um Nucleolipide mit zwei sehr langen C₁₇-Ketten (**5e**, **6c**) handelte, liegen die R_f -Werte bei ~ 0.25 . Zieht man die theoretischen $^{10}\log P_{ow}$ -Werte zur Einschätzung der Lipophilie dieser Nucleolipide heran (vgl. **Abbildung 15B**), so konnte mit der Zunahme der Alkylkettenlänge zunächst ein linearer Zusammenhang um einen Faktor von 1.6 bestimmt werden bis ein maximales Plateau erreicht wurde. Über die experimentell ermittelten R_f -Werte (**Abbildung 15A**) wurde dagegen ein anderer lipophiler Charakter dieser Nucleolipide beobachtet. So verdoppeln sich die R_f -Werte für die Nucleolipide mit einer 2',3'-O-Nonadecyliden-Gruppe, sobald an diesen Bausteinen zusätzlich eine trans,trans-Farnesyl-Gruppe am N(3)-Atom eingeführt wurde (**9** und **10**).

Anders als für die theoretisch bestimmten $^{10}\log P_{ow}$ -Werte, für die ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der C-Atome ihrer lipophilen Gruppen postuliert werden konnte, konnte dieser Zusammenhang für die R_f -Werte der O-2',3'-Ketale mit zunehmender Kohlenstoff-Kettenlänge nicht belegt werden. Erst wenn Nucleoside über eine Kombination aus 2',3'-O-Ketalen und einer N(3)-Alkyl-Gruppe hydrophobisiert wurden, konnten die lipophilen Eigenschaften der Nucleolipide deutlich verbessert werden. Die R_f -Werte lediglich einfach N(3)-prenylierter Nucleosid-Derivate, wie der N(3)-farnesylierter und N(3)-geranylierter Thymidine liegen bei ~ 0.3 ^[16, 18] bzw. bei ~ 0.2 (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/MeOH, 95:5 (v/v)) und weisen damit ähnliche R_f -Werte auf, wie einfach O-2',3'-ketalisierte Pyrimidine. Im Folgenden wird untersucht, welches dieser Nucleolipide besser und welches weniger effizient im Hinblick auf das Ausmaß und die Stabilität in einen Lipid-Bilayer eingebaut wird.

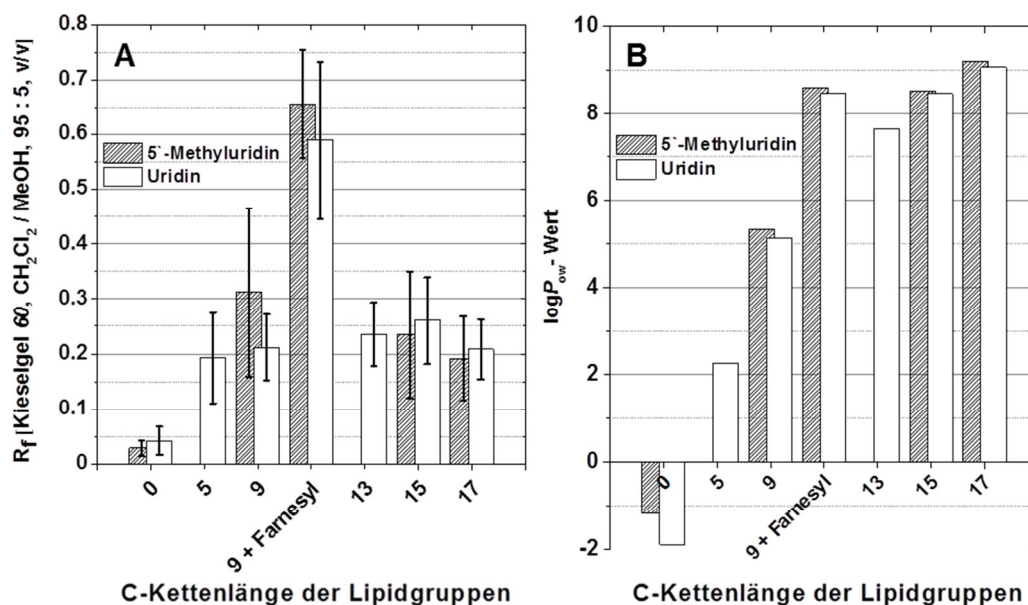


Abbildung 15. A. R_f -Werte der O-2',3'-Ketale des Uridins (**5a-e**) und des 5-Methyluridins (**6a-c**) in Abhängigkeit von der Länge einer einzelnen Kohlenstoffkette doppelkettiger lipophiler Reste. Die dargestellten R_f -Werte (Kieselgel 60; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5 (v/v)) sind Mittelwerte aus 5 - 7 Messdaten. B. Theoretische Vorhersagen der $^{10}\log P_{ow}$ -Werte zu den Verbindungen (**5a-e**) und (**6a-c**) in Abhängigkeit von der Länge einer einzelnen Kohlenstoffkette doppelkettiger lipophiler Reste. Zu A: Vgl. [143, S. 876].

Erste zytologische in-vitro Untersuchungen ergaben, dass das Nucleolipid mit dem O-2',3'-Nonadecyliden-Rest (**5b**) eine sehr hohe anti-tumorale Wirksamkeit gegen menschliche HT-29-Colonkarzinomzellen besitzt und, verglichen mit den korrespondierenden 5-Fluorouridin-Derivaten, effektiver war^[156]. Ferner wurden die Nucleolipid-Derivate des Uridins (**5a-e**, **9**) und des 5-Methyluridins (**6a-c**, **10**) sowie weitere Nucleolipide verschiedener β -D-Ribonucleoside zytologischen Untersuchungen unterzogen und auf ihre anti-tumorale Aktivität gegen verschiedene humane Tumorzelllinien untersucht^[157]. Dabei wurde festgestellt, dass Nucleolipide mit einer symmetrischen O-2',3'-Nonadecyliden-Ketalgruppe oft zytostatische oder zytotoxische Eigenschaften haben. So entfalteten die nicht-toxischen Nucleoside Uridin und 5-Methyluridin in Verbindung mit ebenfalls nicht-toxischen Lipiden signifikante anti-tumorale Aktivität. Auf diese Weise konnte auch das 5-Fluorouridin, ein Wirkstoff mit bekannter anti-tumoraler Aktivität, in seiner Wirksamkeit verbessert werden^[156].

Im Rahmen dieser Untersuchungen, konnte gezeigt werden, dass mit der Einführung lipophiler Gruppen an β -D-Ribonucleosiden, die Zellmembranpenetration der resultierenden Nucleolipide teilweise so erhöht wurde, dass diese ursprünglich nicht-toxischen Moleküle zytotoxische Eigenschaften erwarben.

7.2. $\Delta\delta$ -Werte der ^{13}C -NMR Resonanzen von C-1'' der O-2',3'-Ketale

Die Auswertung der ^{13}C -Spektren der O-2',3'-Ketale ergab eine Auffälligkeit in der chemischen Verschiebung der Atome C-1a'' und C-1b'', benachbart zum pseudo-stereogenen Acetal-C-Atom. In den Ausschnitten der ^{13}C -Spektren (vgl. **Abbildung 16A**) der O-2',3'-Ketale des Uridins ist eine Aufspaltung der Signale und eine zunehmende Verschiebung nach rechts mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge der Lipidgruppen zu beobachten.

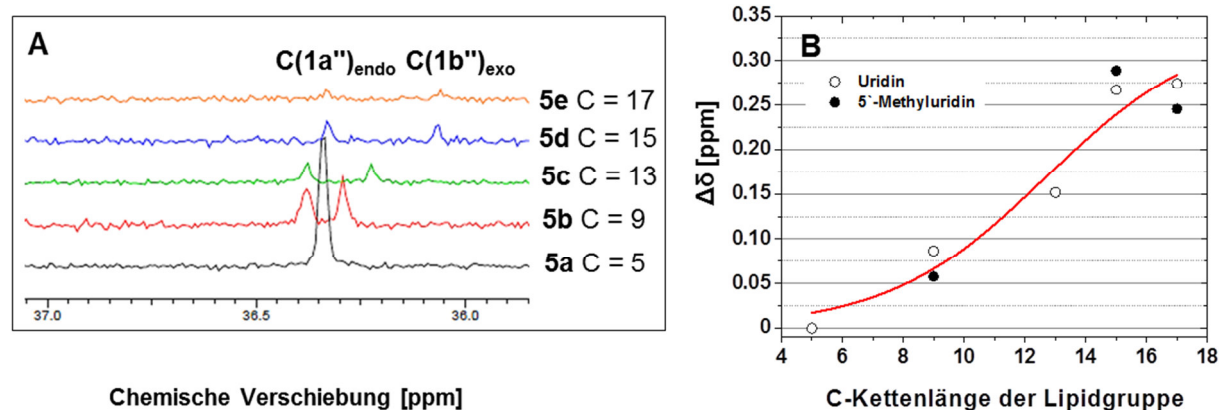


Abbildung 16. A. Ausschnitt aus den ^{13}C -Spektren der O-2',3'-Ketale des Uridins (**5a-e**). Die Intensität der Signale aus den ^{13}C -NMR-Spektren werden mit zunehmender Kettenlänge der O-2',3'-Ketale schwächer, da diese Verbindungen eine zunehmend schwächere Löslichkeit in DMSO aufweisen. C gibt die Anzahl der Kohlenstoffatome zu einer der beiden symmetrischen Lipid-Ketten am C_{Acetal} an. **B.** $\Delta\delta$ -Werte in [ppm] der ^{13}C -NMR Resonanz von C(1a'') und C(1b'') der O-2',3'-Ketale des (o) Uridins (**5a-e**) und des (●) 5-Methyluridins (**6a-c**) in Abhängigkeit von der Länge der symmetrischen Kohlenstoffketten. (—) Fitkurve zu den $\Delta\delta$ -Werten des Uridins. Zu B: Vgl. [143, S. 876].

So wurden in **Abbildung 16B** die Abstände der NMR-Signale ($\Delta\delta$) zwischen den Kohlenstoffatomen 1a'' und 1b'' des jeweiligen O-2',3'-Ketals als Funktion der C-Kettenlänge der Lipidgruppen dargestellt. Diese Abbildung veranschaulicht den Zusammenhang zwischen der zunehmenden Länge der Kohlenstoffkette und dem zunehmenden Abstand der chemischen Verschiebung der beiden Kohlenstoffatome 1a'' und 1b'', die dem pseudo-stereogenen Zentrum des Acetal-Kohlenstoffs räumlich am nächsten liegen.

Aus den ^{13}C -NMR-Spektren der O-2',3'-Ketale (**5a-e**, **6a-c**) wird an den chemischen Verschiebungen der C-1a'' und C-1b'' beobachtet, dass die zunehmenden $\Delta\delta$ -Werte aus der Resonanzverschiebung des C-1b'' (C_{exo}) in Richtung des Hochfelds resultieren, während die Resonanz des C-1a'' (C_{endo}) unverändert bleibt. Es liegt nahe, dass die sterischen Interaktionen, die aus der Berührung der *Van-der-Waals*-Radien der benachbarten Wasserstoffatome resultieren, zu einer erhöhten Abschirmung der dazugehörigen Kohlenstoffatome führen^[158] und die C-H-Bindung

beeinflussen. Dabei kommt es zu einer Ladungsverschiebung in Richtung des Kohlenstoffatoms. Die Bindungorbitale des Kohlenstoffs weiten sich aus, so dass – gemäß der *Karplus-Pople*-Gleichung^[159] – ein paramagnetischer Schild σ^{para} gebildet wird. Daraus geht hervor, dass der C-1a'' – C_{Acetal} – C-1b'' (Φ) Bindungswinkel umso kleiner wird, je länger die Alkylketten der Lipidgruppen sind und der Einfluss der *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen entlang dieser beiden Alkylketten steigt. In **Abbildung 17** wird dieser Zusammenhang in einer Skizze veranschaulicht. Zusammenfassend kann man sagen, dass sich beide Alkylketten mehr einander annähern, wenn ihre Kohlenstoffketten länger werden und dieser Effekt durch mehr *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen verstärkt wird. Diese zunehmenden sterischen Interaktionen/Abstoßungen zwischen der C_{1a''}-H und C_{1b''}-H Bindung werden an den chemischen Verschiebungen in ¹³C-NMR-Spektren sichtbar (vgl. **Abbildung 16**). Die sterische Abstoßung δ_{st} – nach dem Modell von *Grant*^[160] – ist abhängig von der Proton-Proton Abstoßungskraft $[F_{\text{HH}}(r_{\text{HH}})]$, die als eine Funktion des Proton-Proton Abstands r_{HH} und des Winkels Θ zwischen der H-H-Achse und der jeweiligen C-H Bindung formuliert wird:

$$\delta_{\text{st}} = \text{const. } F_{\text{HH}}(r_{\text{HH}}) \cos \Theta \quad (\text{Gleichung 5})$$

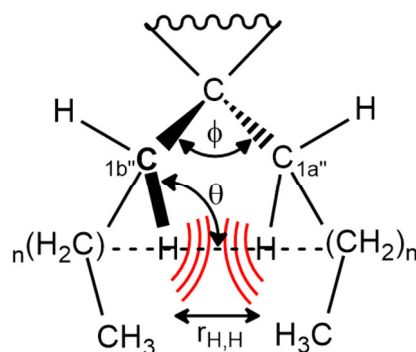


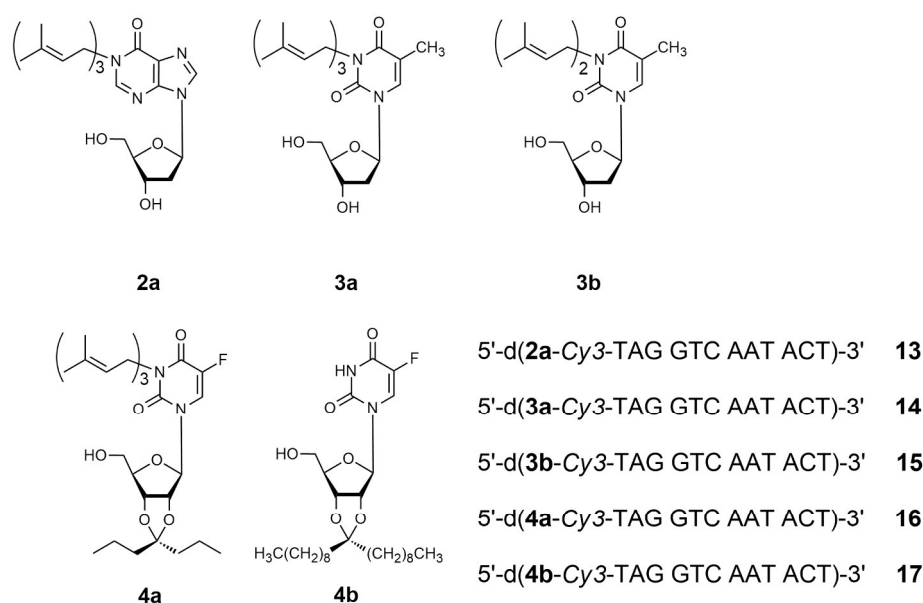
Abbildung 17. Modell zur sterischen Abstoßung zwischen H-C(1a'') und H-C(1b'') der Kohlenstoffketten der 2',3'-Ketale. [143, S. 877].

Die NMR-Spektroskopischen Untersuchungen lieferten damit erste Erkenntnisse zur Geometrie bzw. zur Anordnung hydrophober Einheiten von Nucleolipiden, die über O-2',3'-Ketale eingeführt wurden. Demnach bewegen sich die lipophilen Ketten aufeinander zu, je länger diese werden.

7.3. Einlagerung lipophiler Oligonucleotide in Lipid-Bilayer

7.3.1. Vorversuchsreihe: Wechselwirkung prenylierter und/oder ketalisierter Oligonucleotide am Lipid-Bilayer

Unter der Annahme, dass die Lipophilisierung von Oligonucleotiden mit azyklischen Mono- und Sesquiterpenen die Biomimesis und somit die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass synthetische Lipo-Oligonucleotide ähnliche Eigenschaften in Bezug auf ihre Wechselwirkung mit Membranen aufweisen, wie vergleichbare Naturstoffgruppen, denen sie nachempfunden wurden, liegt es nahe, dass auch ein terminal farnesyliertes Oligonucleotid in Membranen verankert werden kann, wie Membranproteine mit einer terminale Farnesyl-Gruppe, die dieses Protein in der Membran verankert^[161-162]. So wird in der ersten Versuchsreihe getestet, ob sich eine lipophilisierte 12-mer DNA in künstliche Lipidmembrane einlagert, dabei wird die Einlagerung einzelsträngiger farbstoffmarkierter DNA-Stränge mit unterschiedlichen prenylierten und/oder 2',3'-O-ketalisierten Nucleolipide (siehe **Formelschema 5**) untersucht.



Formelschema 5. Strukturen von Nucleolipiden **2a-4b** und von Cy3-markierten LONs **13-17**.

Bei den N(3)-alkylierten Lipo-Oligonucleotiden (**13-15**) handelt es sich um ein farnesyliertes 2'-Desoxyinosin (**2a**) sowie um ein farnesyliertes (**3a**) oder ein geranyliertes Thymidin (**3b**). Diese Nucleolipide wurden terminal über ihre Phosphoramiditbausteine in eine Cy3-markierte 12-mer DNA-Sequenz eingebaut und repräsentieren erste synthetisch hergestellte biomimetische Nucleoterpene, die - am 5'-Ende geschützt - in die jeweiligen 3'-O-Phosphoramidite umgewandelt und anschließend zur Lipophilisierung von Dodekamer-Oligonucleotiden eingesetzt wurden. 2',3'-O-

katalysierte Oligomere sind ein N(3)-farnesyliertes 5-Fluorouridin mit einer Isopropyliden- (**4a**) und ein 5-Fluorouridin mit einer Nonadecyliden-Gruppe (**4b**). Auch diese LONs tragen den Indocarbocyanin 3 - Farbstoff an der 5'(n-1) Position.

Die Einlagerung der Lipo-Oligonucleotide **13-17** in den künstlichen Bilayer wurde indirekt über die Helligkeit des Bilayers bestimmt. Dazu wurden xz-Schnitte vom Bilayer aufgenommen, die die Helligkeit des Bilayers und der Pufferlösung darstellten. Diese xz-Schnitte wurden vor und nach der Zugabe Fluorophor-markierter Lipo-Oligonucleotide sowie zwischen den einzelnen Perfusionsvorgängen aufgenommen. In **Abbildung 18-19** wurden die xz-Schnitte vom Bilayer mit den LONs **13-17** dargestellt. Um diese Daten besser miteinander vergleichen zu können, wurde in jedem dieser xz-Schnitte nur die Helligkeit im Bilayer erfasst (vgl. **Abbildung 20**). Es ist anzumerken, dass - anders als in Köstler et al., 2013 (8-Bit-Farbtiefe)^[16] - die Bilayerhelligkeit aus xz-Aufnahmen mit einer 16 Bit-Farbtiefe bestimmt wurden. Diese Vorgehensweise ermöglicht die Detektion feinerer Helligkeitsabstufungen.

Vergleicht man die Helligkeitswerte zur Bilayerinsertion des N(3)-farnesylierten Oligonucleotides LON **14** (5'-d(**3a**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3') mit den Helligkeitswerten des N(3)-geranylierten Oligonucleotides LON **15** (5'-d(**3b**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'), so ist an den Helligkeitsintensitäten im Bilayer zu erkennen, dass sich das LON **14** besser in die Membran einlagert als das LON **15**. Mit 276 MHz für LON **14** und 12 MHz für LON **15** unterscheiden sich diese Intensitäten um Faktor ~20. Nach dem 1. Perfusionsvorgang wird die Helligkeit im Bilayer für LON **14** um Faktor 100 reduziert, während der Helligkeitswert für LON **15** verdoppelt wird. Vermutlich hängt dieser Effekt damit zusammen, dass durch die Perfusion die LON-Moleküle besser in der Lösung verteilt werden und sich leichter in die Membran einlagern, oder dass die Inkubationsphase von 25 min zu kurz war. Nach dem 2. Perfusionsvorgang wird die Helligkeit im Bilayer für beide LONs halbiert, diese bleibt im Falle des LON **14** nach dem 3. Perfusionsvorgang unverändert.

Für das LON **13** (5'-d(**2a**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'), einem Oligomer mit einer terminalen Farnesyl-Gruppe am 2'-Desoxyinosin, wäre auf Grund derselben lipophilen Gruppe ein ähnliches Einlagerungsverhalten zu erwarten wie für das LON **14**. Zwar wird auch das LON **13** über das N(3)-farnesylierte Inosin (**2a**) wie über die lipophile Gruppe (**3a**) in hohem Maße in den Bilayer eingelagert, aber bereits nach dem ersten Perfusionsvorgang größtenteils aus dem Bilayer entfernt. So erreicht die Helligkeit nach der Zugabe der Probe und 25 min Einwirkzeit, mit 227 MHz einen ähnlich hohen Wert wie für LON **14**, doch wird dieser nach der 1. Perfusion erst um Fak-

tor 10 reduziert und nach nächstem Perfusionsvorgang weiter halbiert. LON **13** und LON **14** unterscheiden sich lediglich in ihrer Nucleosidbase, an der sich die terminale Farnesyl-Gruppe befindet. Obwohl experimentelle Artefakte (z.B. Pipettieren der Probe) nicht gänzlich auszuschließen sind, ist diesen Daten zu entnehmen, dass nicht nur die Länge des Lipidankers, sondern auch die Nucleosidbase, an der sich dieser Lipid-Anker befindet, die Einlagerung der LONs beeinflussen.

Nachdem die Fähigkeit der LONs, sich über eine terminale N(3)-Farnesyl-Kette in den künstlichen Lipid-Bilayer einzulagern, bewiesen werden konnte, sollte anhand weiterer hydrophober Oligonucleotide gezeigt werden, ob das Einlagerungsverhalten mit einer zusätzlichen Isopropyliden-Gruppe an der 2',3'-O-Position beeinflusst werden kann. Gemessen an den Helligkeitsintensitäten scheinen das LON **16** (5'-d(**4a**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3') über ein N(3)-farnesyliertes 5-Fluorouridin mit einer Isopropyliden- (**4a**) und das LON **17** über ein 5-Fluorouridin mit einer Nonadecyliden-Gruppe (**4b**) wesentlich effizienter in der Bilayer zu insertieren als einfache N(3)-farnesylierte oder N(3)-geranylierte Oligomere (**Abbildung 19**). Miteinander verglichen, insertiert das LON **17** mit dem doppelkettigen Nonadecyliden-Ende effizienter in den Bilayer, d.h. das Oligomer baut sich sehr schnell und sehr fest in die Membran ein im Vergleich zu LON **16**. Nach der Probenzugabe und 25 min Einwirkzeit liegt die Helligkeitsintensität des Bilayers für LON **17** bei ~1000 MHz bzw. bei ~400 für LON **16**. Während sich im Falle des LON **17** die Helligkeit nach der 1. Perfusion weiter um Faktor 1.6 erhöht und nach der 2. Perfusion etwa gleich bleibt, wird die Helligkeit im Falle des LON **16** mit jedem Perfusionsvorgang kontinuierlich um Faktor 1.45 reduziert, so dass es nach der 3. Perfusion bei 150 MHz liegt. Die Zunahme der Helligkeit für das LON **17** nach dem 1. Perfusionsvorgang könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich das lipophilisierte Oligomer noch in der Lösung und/oder an Phasengrenzen (Pufferlösung/Luft und Pufferlösung/Teflon) befunden haben könnte und weiter in den Bilayer einbaut. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich N(3)-farnesylierte und N(3)-geranylierte Oligomere in Bilayermembrane einlagern, wobei die Einlagerung farnesylierter Oligomere offensichtlich leichter und in höherem Maße abläuft als das gleiche Oligomer mit einer Geranyl-Gruppe. Damit beeinflusst die Länge der terminalen Prenyl-Gruppe die Insertion der Oligomere. Eine Pyrimidinbase scheint diesen Effekt zu begünstigen, während eine Purinbase diesem offensichtlich entgegen wirkt und somit nicht für die gewünschte Festigkeit der Verankerung sorgt.

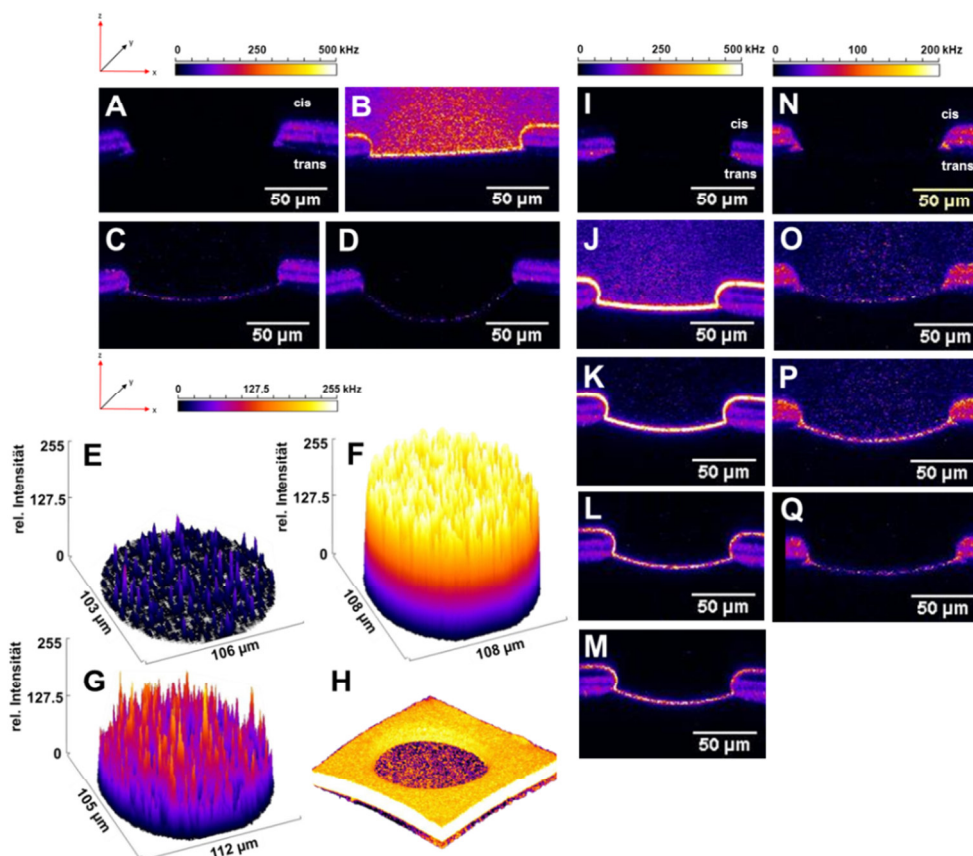


Abbildung 18. xz-Aufnahmen vom Bilayer zur Einlagerung des LON 13 [5'-d(2a-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'] (A-H), LON 14 [5'-d(3a-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'] (I-M) und LON 15 [5'-d(3b-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'] (N-Q). A. xz-Schnitt vom reinen Bilayer. B. Zugabe des LON 13 (cis-Kanal; 4 μ L, 50 nM) und 25 min Inkubation. C. 1. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min). D. 2. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min). (E-G). 3D-Darstellung der Helligkeit [in rel. Einheiten] von E. der reinen Bilayerfläche, F. von der Bilayerfläche nach der Einlagerung des LON 13 und nach der 1. Perfusion, G. von der Bilayerfläche nach der 2. Perfusion. H. 3D-Darstellung des Lipid-Bilayers nach der 1. Perfusion (25 xz-Schnitte). I. Reiner Bilayer. J. Zugabe von LON 14 (cis-Kanal, 4 μ L, 50 nM) und 25 min Inkubation. K. 1. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min) L. 2. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min). M. 3. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min). N. Reiner Bilayer. O. Zugabe von LON 15 (cis-Kanal; 4 μ L, 50 nM) und 25 min Inkubation. P. nach der 1. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min). Q. 2. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min). Modifiziert nach [16, S. 49-50].

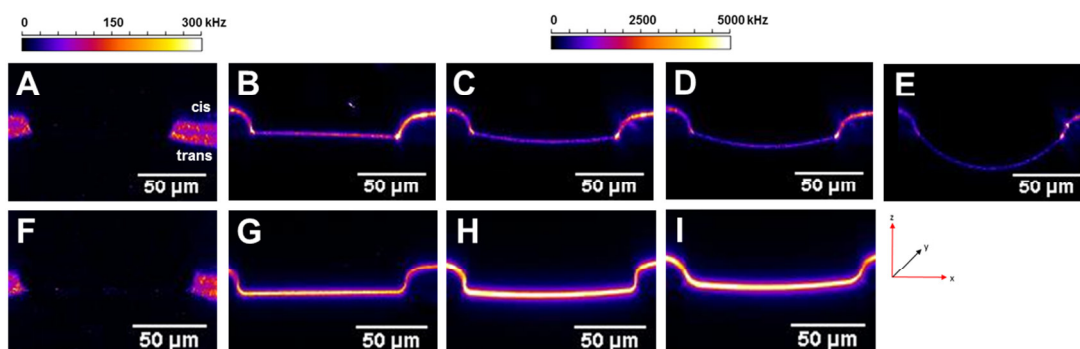


Abbildung 19. Einlagerung des LON 16 [5'-d(4a-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'] (A-E) und des LON 17 [5'-d(4b-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'] (F-I) in den Bilayer gefolgt von 2 bis 3 Perfusionen. A. Reiner Bilayer. B. Zugabe von LON 16 (cis-Kanal; 6 μ L, 50 nM) und 25 min Inkubation. C. 1. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min). D. 2. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min). E. 3. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min). F. Reiner Bilayer. G. Zugabe von LON 17 (cis-Kanal; 4 μ L, 50 nM) und 25 min Inkubation. H. 1. Perfusion (cis-Kanal, 60 s, 1.1 mL/min). I. 2. Perfusion (cis-Kanal; 60 s, 1.1 mL/min). Vgl. [144, S. 224-225].

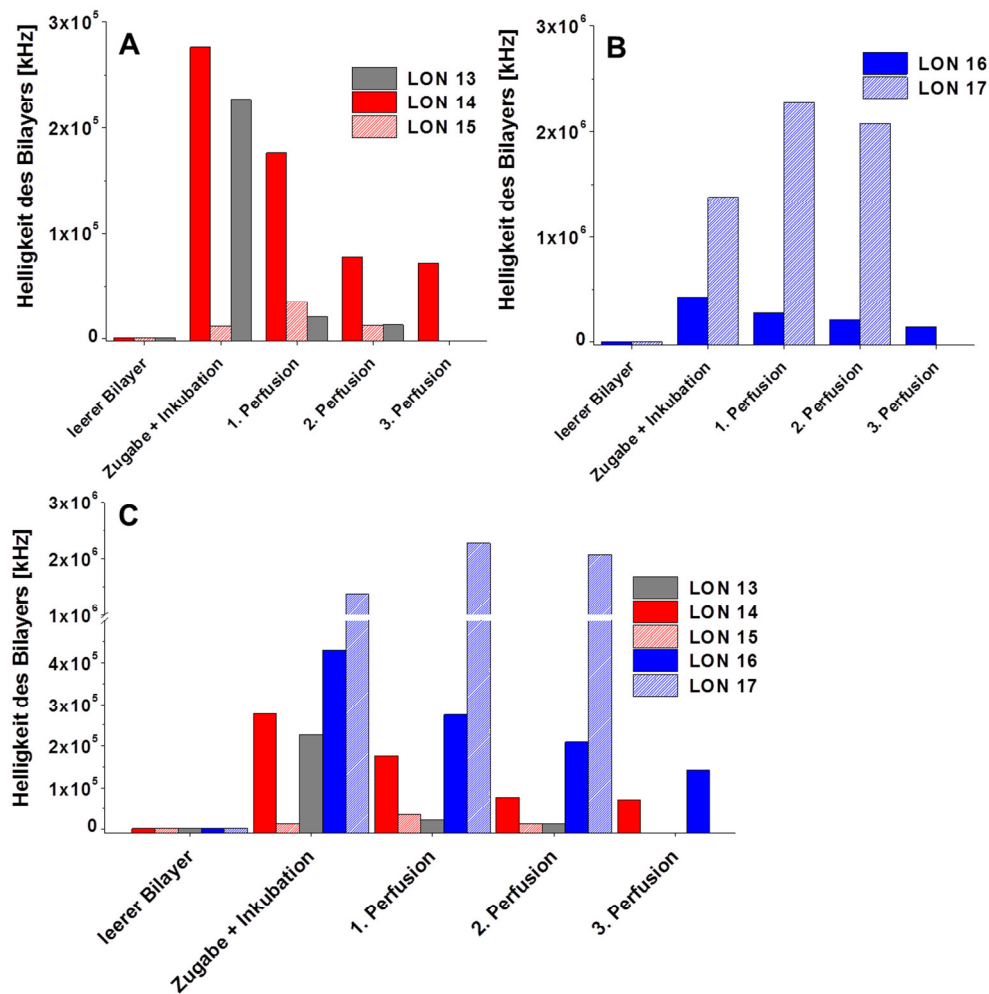


Abbildung 20. Helligkeitsintensitäten des Bilayers in kHz als Funktion zur Anzahl der Perfusionsschritte nach der Einlagerung der Lipo-Oligonucleotide **13-17**. **A.** Helligkeit des Bilayers der LONs **13** [5'-d(**2a**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'], **14** [5'-d(**3a**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'] und **15** [5'-d(**3b**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'], **B.** **16** [5'-d(**4a**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'] und **17** [5'-d(**4b**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3']. **C.** Zusammenfassung aus A. und B. Zu A: Angelehnt an [16, S. 51]; zu B: Angelehnt an [144, S. 226].

Es zeigt sich auch, dass die Verankerung der LONs im Bilayer nicht nur von der Länge der lipophilen Reste beeinflusst wird, welche das Oligomer in der Membran verankern, sondern auch von ihrer Anzahl und ihrer Position an der Nucleobase. So konnte auch gezeigt werden, dass sich 2',3'-O-ketalisierte Nucleolipide nicht nur in die Lipidmembran einlagern, sondern dass die Verankerung über eine zur N(3)-Farnesyl-Gruppe zusätzliche kurze 2',3'-O-Ketalgruppe offensichtlich das Einlagerungsverhalten erhöht, wobei eine einfache Lipophilisierung des Oligomers über eine Nonadecyliden-Gruppe noch effektiver zu sein scheint.

7.3.2. Einfluss variierender lipophiler Kopfgruppen auf das Einlagerungsverhalten im Bilayer

In dieser Versuchsreihe werden sechs Cy5-markierte Oligonucleotide (**18-23**) mit verschiedenen terminalen Nucleolipid-Kopfgruppen systematisch auf ihre Einlagerung in Lipidbilayer sowie auf ihre Stabilität der Verankerung gegenüber den Perfusionsvorgängen untersucht. **Abbildung 21** veranschaulicht die Struktur der mit einem Fluorophor markierten Lipo-Oligonucleotide und die Positionen der β -D-Ribonucleosid-Pyrimidine Thymidin (**3**, R = CH₃), 5-Fluorouridin (**4**, R = F) und Uridin (**5**, R = H), die mit verschiedenen hydrophoben Ketten lipophilisiert wurden.

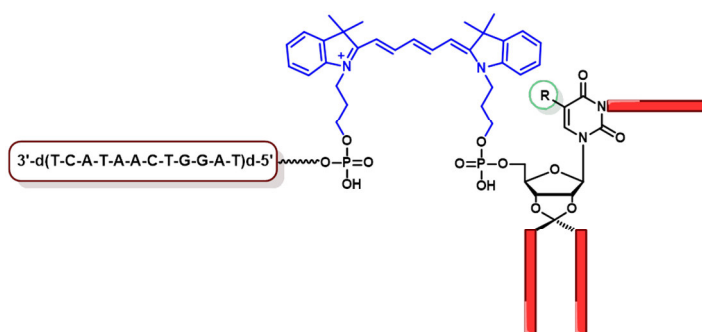
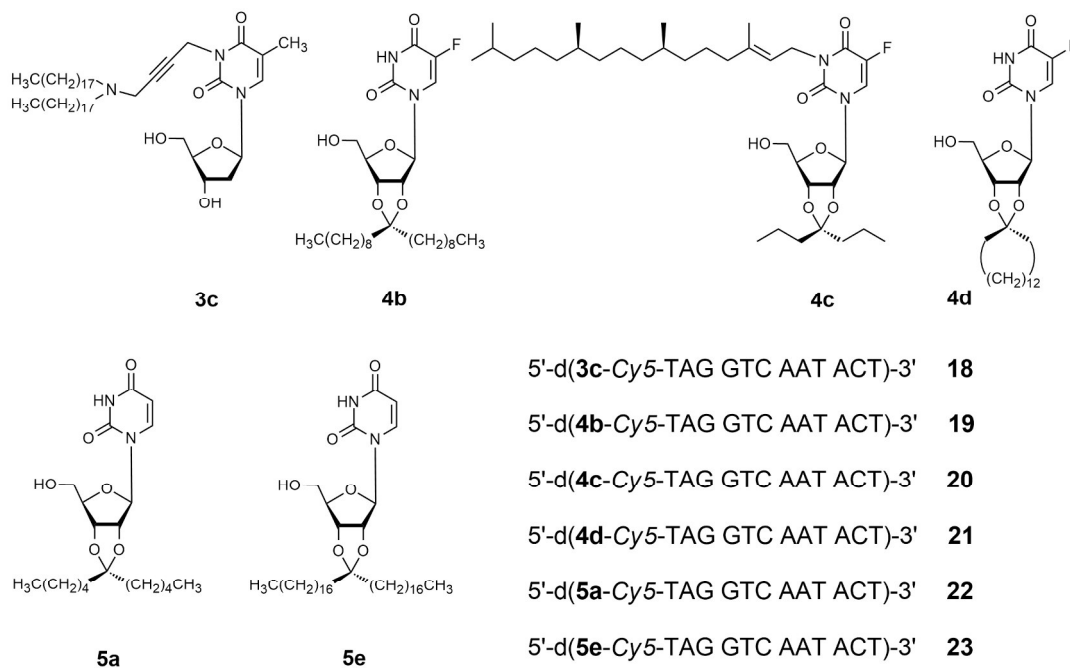


Abbildung 21. Allgemeine Struktur eines Cy5-markierten (blau) Oligonucleotids mit Positionen, an denen das terminale β -D-Ribonucleosid (R = H; Uridin, R = CH₃; Thymidin und R = F; 5-Fluorouridin) mit variierenden lipophilen Seitenketten (rot) zu einem Lipo-Oligonucleotid modifiziert ist. Vgl. [146, S. 914].

Im Folgenden wird die Bilayer-Insertion von sechs verschiedenen Nucleolipiden (**3c-5e**; **Formelschema 6**)^[143-145, 152-153] untersucht, die unter der Voraussetzung synthetisiert wurden, dass Mono-, Sesqui- und Diterpene aber auch einzel-, doppelkettige sowie zyklische Alkylketten die Pyrimidin-Nucleoside lipophilisierten. Die Energie-minimierten 3D-Strukturen dieser lipophilen Nucleosid-Kopfgruppen (**3c-5e**) sollen ihre Geometrie veranschaulichen und somit zum besseren Verständnis um diese Nucleolipide beitragen (vgl. **Abbildung 22**). Diese Nucleolipide wurden in ihre 2-Cyanoethyl-Phosphoramidite umgesetzt und über das 5'-Ende zu einem Dodekamer (5'-TAG GTC AAT ACT-3') mit einem Cy5-Fluorophor an der (n-1) Position erweitert. Die Lipo-Oligonucleotide (**18-23**) (5 μ L, 50 nM) wurden gemäß der vorgestellten Methode (Kapitel 4.5) in das cis-Kompartiment der mikrofluidischen optisch-transparenten Kammer mit einer Perfusionsvorrichtung direkt über den Bilayer gegeben und in Abständen von 5 Minuten solange inkubiert, bis die Bilayerhelligkeit ihren maximalen Wert erreicht hat und das Lipo-Oligonucleotid sich bestmöglich in der Membran verankern konnte. Darauf folgen abwechselnd Perfusions- (30 s,

1.1 mL/min) und Inkubationsschritte (10 min), gefolgt von mikroskopischen Aufnahmen durch die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. Für jedes LON wurde die Helligkeit des Bilayers in Abhängigkeit vom Ereignis (Zugabe des Lipo-Oligonucleotids, Inkubation und Perfusion) dargestellt.



Formelschema 6. Strukturen der Nucleolipide **3c-5e**. N(3)-alkylierte und/oder 2',3'-O-ketalisierte β -D-Ribonucleosid Pyrimidine Thymidin (**3**), 5-Fluorouridin (**4**) und Uridin (**5**) sowie die Sequenzen der Lipo-Oligonucleotide **18-23**. Vgl. [146, S. 915].

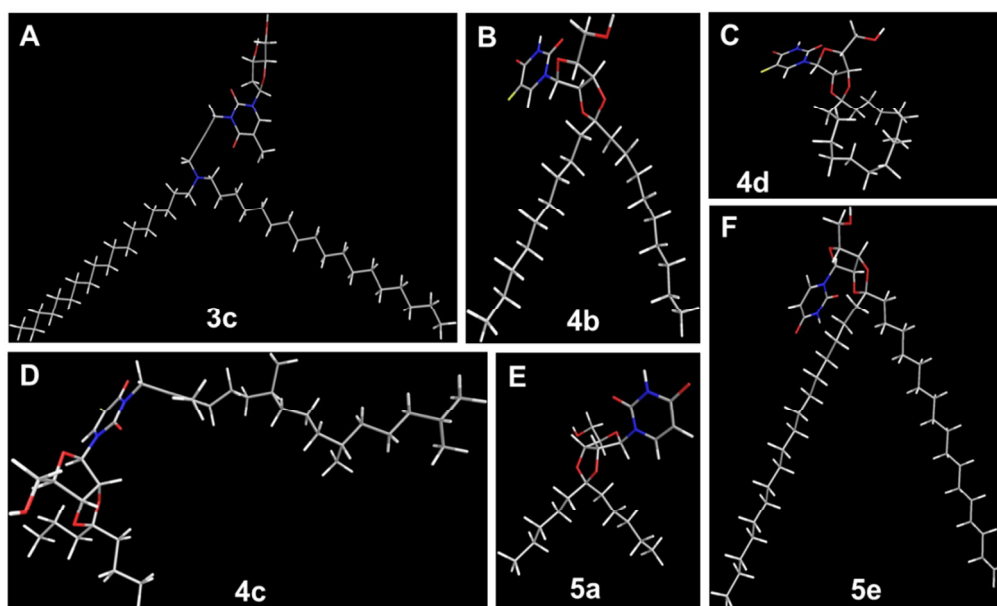


Abbildung 22. Energie-minimierte 3D-Strukturen der lipo-nucleosidischen Kopfgruppen **3c-5e**. Alle 3D-Strukturen wurden mit *ChemBio3D Ultra v. 12.0* berechnet. (Anzahl der Wiederholungen: 387 ± 147). Modifiziert nach [146, S. 916].

Das Lipo-Oligonucleotid **18** (5'-d(**3c**-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3'), welches am 5'-Ende ein über die Click-Chemie eingeführtes doppelkettiges (**3c**) Lipid an der N(3)-Position des Thymidins trägt, ist ein Nucleolipid, welches über sein O(3')-Phosphoramidit mehrfach und an jeder Position einer wachsenden Oligonucleotidkette eingebaut werden kann. Zum Einlagerungsverhalten des LON **18** wurden folgende Beobachtungen gemacht (vgl. **Abbildung 23**): Die maximale Helligkeit baute sich nach der Zugabe langsam (ca. 40 min) auf. Die Helligkeitswerte nach den Perfusionsvorgängen im cis-Kanal lassen darauf schließen, dass das Oligomer sehr fest in der Membran verankert ist. Selbst durch mehrmaliges Perfundieren bleibt das Lipo-Oligonucleotid fest in der Membran verankert und erreicht nach nur drei Perfusionen, zwischen denen drei je 10-minütige Inkubationsperioden lagen, eine stabile Helligkeit bei 60-65%, die nach mehr als 1 h und weiteren sechs Perfusions-/ Inkubationschritten weitestgehend unverändert blieb.

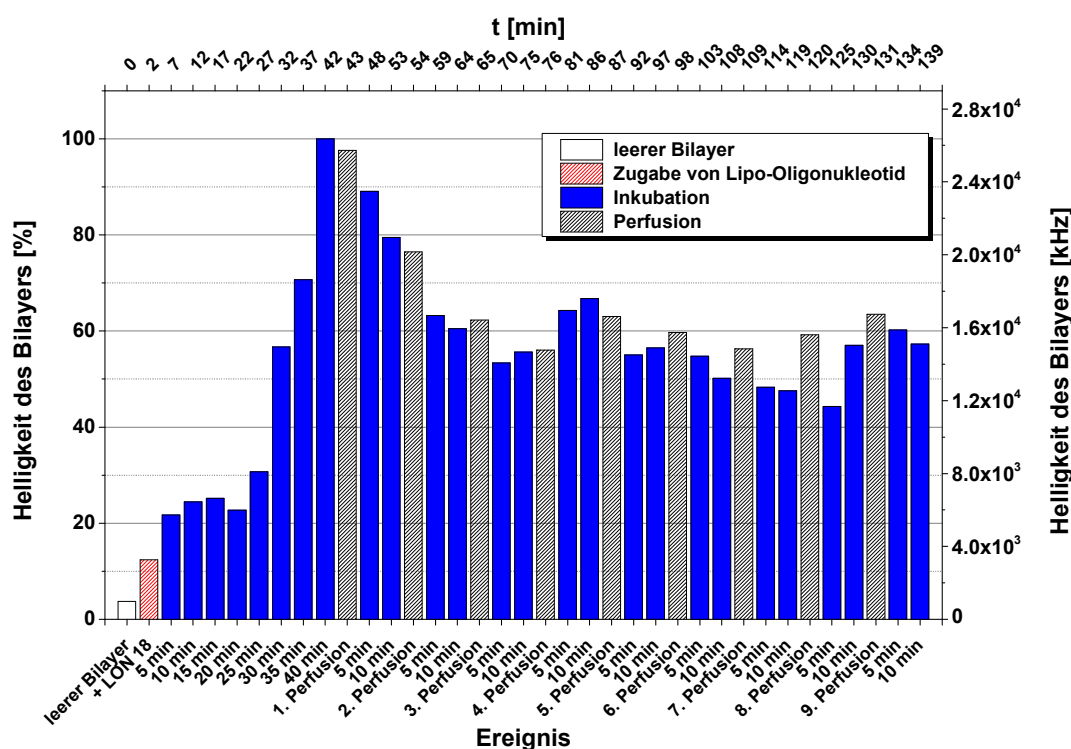


Abbildung 23. Helligkeit des Bilayers vs. Ereignis zur Bilayerinsertion des LON **18** [5'-d(**3c**-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3']. Vgl. [146, S. 917].

Abbildung 24 veranschaulicht die Adsorption und die Desorption für das LON **19** (5'-d(**4b**-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3') mit einem O-2',3'-Nonadecyliden lipophilisierten 5-Fluorouridin am 5'-Ende der Oligonucleotidkette. Das Oligomer zeigt ein besonderes Einlagerungsverhalten in die Lipidmembran. Nach 70 Minuten erreicht die Helligkeit im Bilayer seinen ersten maximalen Wert bei ca. 45%, der auch

nach zwei Perfusions- / Inkubationsschritten unverändert bleibt. Während der Inkubationsphase nach der 2. Perfusion jedoch steigt die Helligkeit um weitere 20% an. Dieses zweite maximale Plateau bleibt nicht das letzte. Die Helligkeit im Bilayer steigt weiter um 40% nach weiteren Perfusionsvorgängen und während der Inkubationsphasen an und erreicht nach der 5. Perfusion den maximalen Wert. Dieser Wert fällt um 40% während der darauffolgenden 5-minütigen Inkubation. Nach weiteren 17 Perfusions- / Inkubationsschritten nimmt die Helligkeit im Bilayer schrittweise ab bis die Helligkeit gegen Null geht. Es scheint, als ob das LON durch die Perfusionen und während der Inkubationen trotzdem weiter in den Bilayer einlagert, obwohl die Pufferlösung keine signifikante Helligkeit durch fluoreszierende Oligomere aufweist. Diese starke Zunahme der Helligkeit im Bilayer muss auf ein verfügbares Reservoir an LONs zurückzuführen sein.

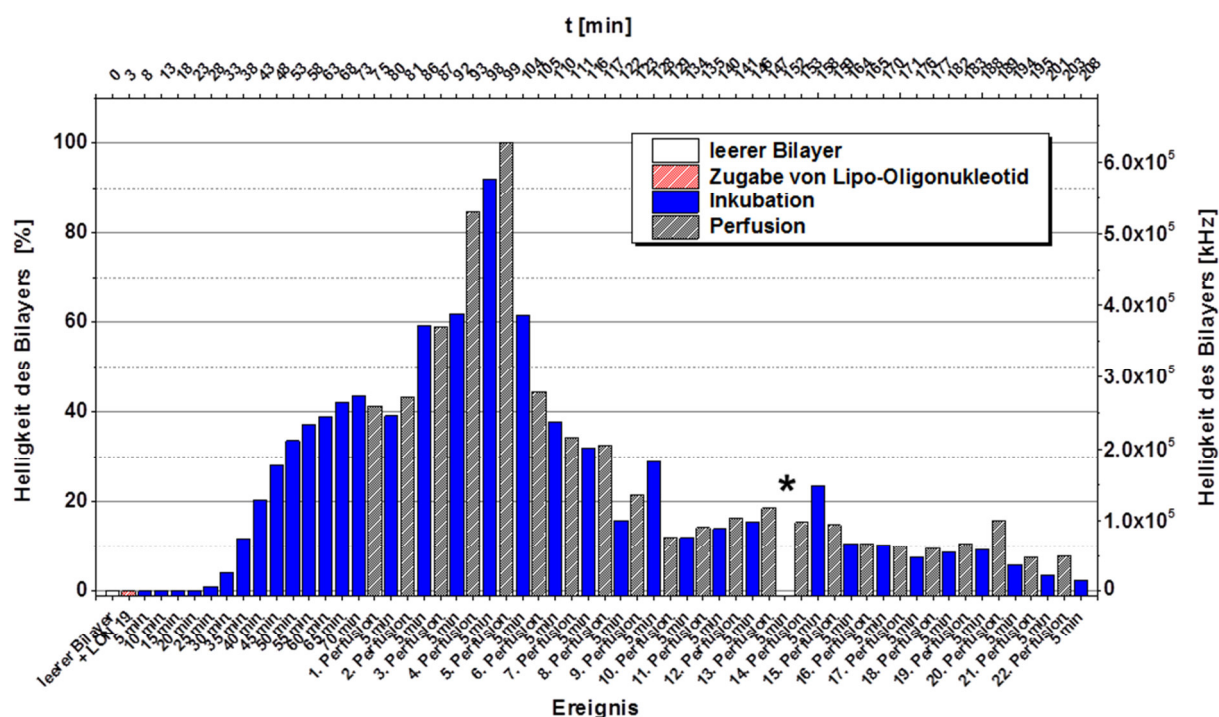


Abbildung 24. Helligkeit des Bilayers vs. Ereignis zur Bilayerinsertion des LON 19 [5'-d(4b-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3']. (*) Datenerhebung war nicht möglich. Die Bilayermembran wölbte sich sehr stark nach unten aus, so dass diese nicht mehr im Fokus war. Näheres dazu siehe **Abbildung 30D**. Vgl. [146, S. 919].

Um diesem Phänomen auf den Grund zu gehen, wurde die umliegende Teflonmembran nach Auffälligkeiten, wie fluoreszierende Ansammlungen am Teflon und in der Lösung untersucht, ohne dass solche fluoreszierenden LON-Agglomerate gefunden werden konnten. Daraufhin wurde die Pufferlösung in den Fokus abgesenkt. Die Grenze zwischen der Luft und der Pufferlösung wies eine hohe Fluoreszenz auf. Es scheint, dass diese an der Luft/Wasser-Phasengrenze anordneten LONs durch

die wiederholten Perfusionen aufgewirbelt wurden und sich während der darauf folgenden Inkubationszeit in den Bilayer einlagerten, so dass es zu einer Erhöhung der Helligkeit kam. In Kapitel 7.3.2.1 "Anreicherung des LON 19 an der Luft/Wasser-Phasengrenze" wird dieses Phänomen eingehender beschrieben. **Abbildung 25** stellt die Helligkeit des Bilayers vor und nach der Zugabe des LON 20 (5'-d(4c-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3') dar. Dieses Oligomer trug an der 5'-terminalen Base 5-Fluorouridin einen Phytlyl-Rest an der N(3)-Position und eine 2',3'-O-Heptanyl-Gruppe an der Ribose. In der Natur kommt das azyklische Diterpen Phytol als Membranlipid für pflanzliche Chlorophylle vor sowie für Bakteriochlorophylle und ist somit der häufigste veresterte Alkohol der C₁₇ Propionseitenkette^[163-164]. Das Lipo-Oligonucleotid ist charakteristisch dafür, dass es sehr schnell in den Bilayer einbaut. Bereits nach 15 min wurde die maximale Helligkeit in der Membran erreicht. Diese Helligkeit fiel nach jedem Perfusions-/ Inkubationsschritt ab, bis sie nach der 6. Perfusion einen stabilen Wert bei 32% erreichte und für weitere 14. Perfusionsdurchgänge nahezu unverändert blieb. Nach manchen Perfusionschritten stieg die Helligkeit während der Inkubation leicht an. Es könnte daran gelegen haben, dass sich das LON noch in der Lösung befand und sich wieder in die Membran einbaute.

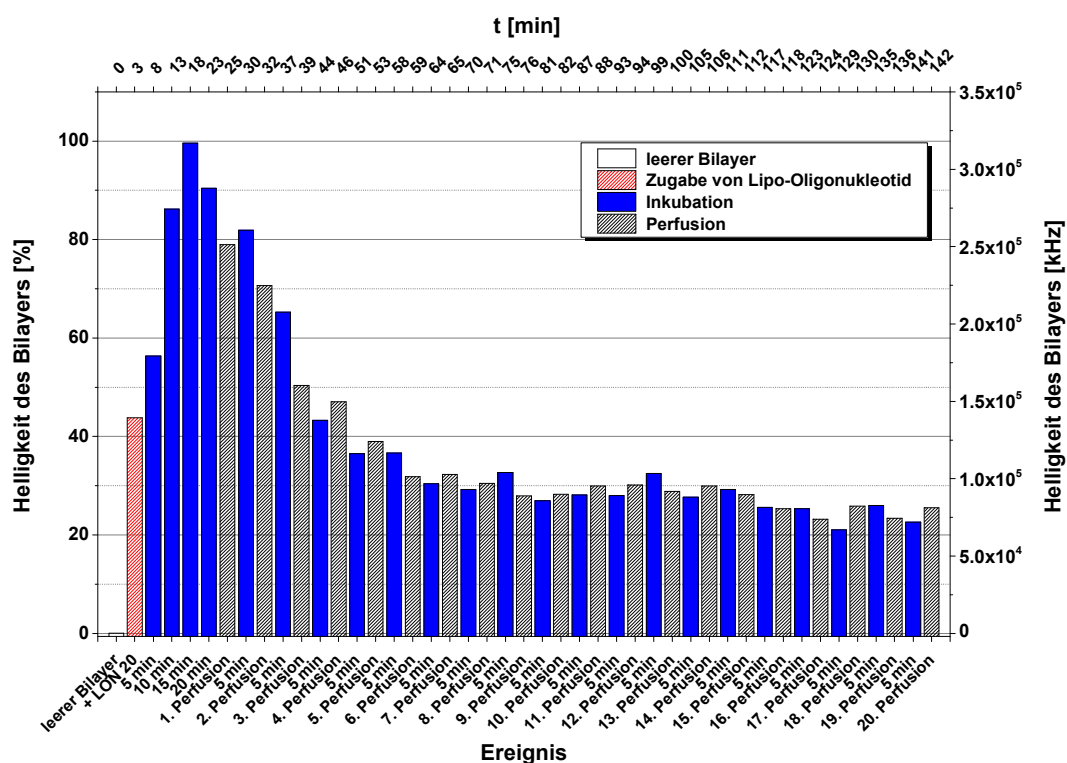


Abbildung 25. Helligkeit des Bilayers vs. Ereignis zur Bilayerinsertion des LON 20 [5'-d(4c-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3']. Vgl. [146, S. 921].

Die Einlagerungskinetik und die Stabilität der Verankerung des LON **21** (5'-d(4d-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3') wurden in **Abbildung 26** dargestellt. Als Nucleolipid enthält es einen 5-Fluorouridin mit einem alizyklischen O-2',3'-Cyclopentadecanyliden-Ring. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass sich die maximale Helligkeit im Bilayer innerhalb von 50 Minuten langsam aufbaute und nach nur einem Perfusionsschritt auf ca. 55% gesenkt wurde. Nach weiteren Perfusions-/ Inkubationsvorgängen wurde das Lipo-Oligomer komplett aus dem Bilayer herausgespült. Es liegt nahe, dass sich das Oligomer nicht richtig in den Bilayer einlagern konnte, sondern sich lediglich an der Membran anlagerte. Die 3D-Struktur der lipophilen Gruppe dieses Oligomers scheint mit seinem alizyklischen Ringsystem (**Abbildung 22C**) zu sperrig zu sein, um sich tief und fest in der Membran zu verankern, so dass dieses Oligomer nur an der Oberfläche adsorbiert wurde.

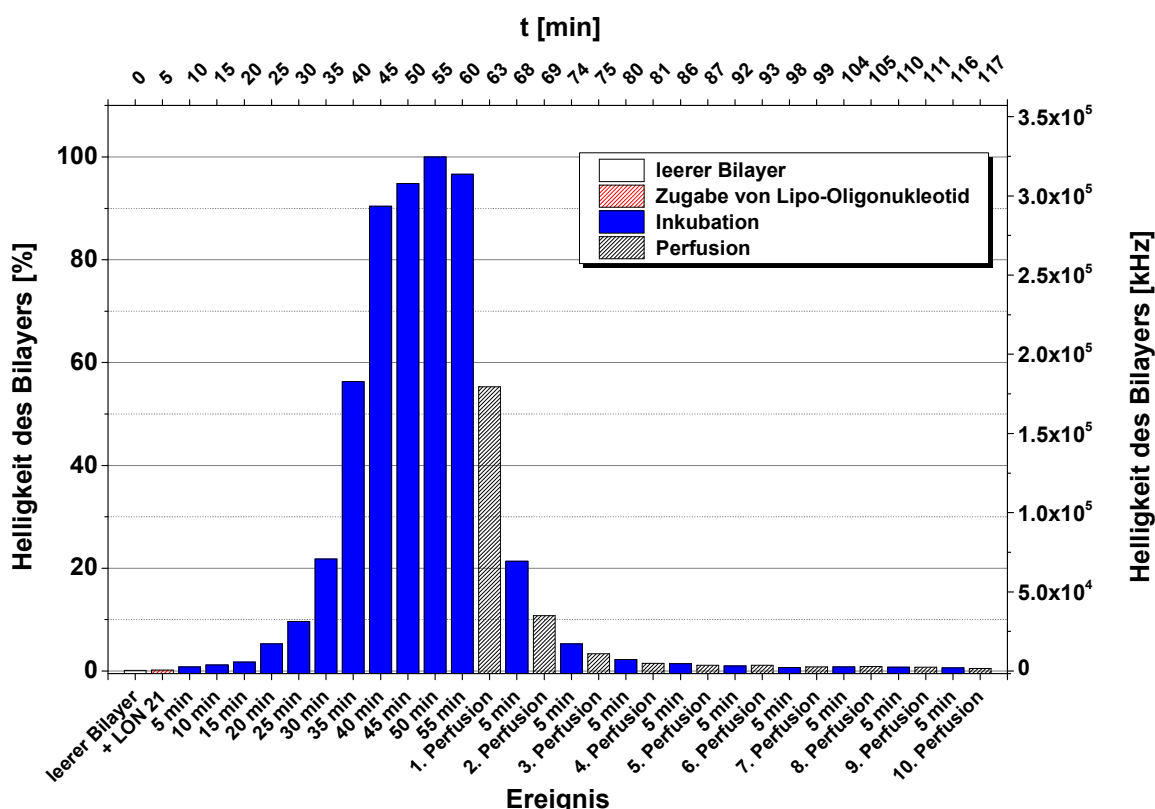


Abbildung 26. Helligkeit des Bilayers vs. Ereignis zur Bilayerinsertion des LON **21** [5'-d(4d-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3']. Vgl. [146, S. 921].

Die Helligkeit des Bilayers für das Lipo-Oligonucleotid **22** (5'-d(5a-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3') (vgl. **Abbildung 27**), einem Oligomer mit einer terminalen O-2',3'-Undecyliden-Gruppe am Uridin als lipophile Kopfgruppe, stieg die ersten 30 Minuten nach der Probenzugabe gar nicht an; erst nach 30 Minuten Inkubationszeit nahm die Helligkeit im Bilayer sprunghaft zu und erreichte damit ihren maximalen Wert. Dieser

wurde nach nur einem Perfusionsschritt auf ca. 15% reduziert. Während der darauffolgenden Inkubationszeit stieg die Helligkeit auf ca. 30% an, was darin begründet sein kann, dass sich die lipophilisierten Oligomere, die aus dem Bilayer ausgespült wurden, sich noch in Lösung befanden und sich nach kurzer Zeit erneut in den Bilayer einlagerten. Dieses Phänomen konnte auch im vorherigen Experiment mit LON **20** beobachtet werden. Durch nachfolgende Perfusions- / Inkubationsschritte wurde die Helligkeit im Bilayer auf ca. 5-10% gesenkt.

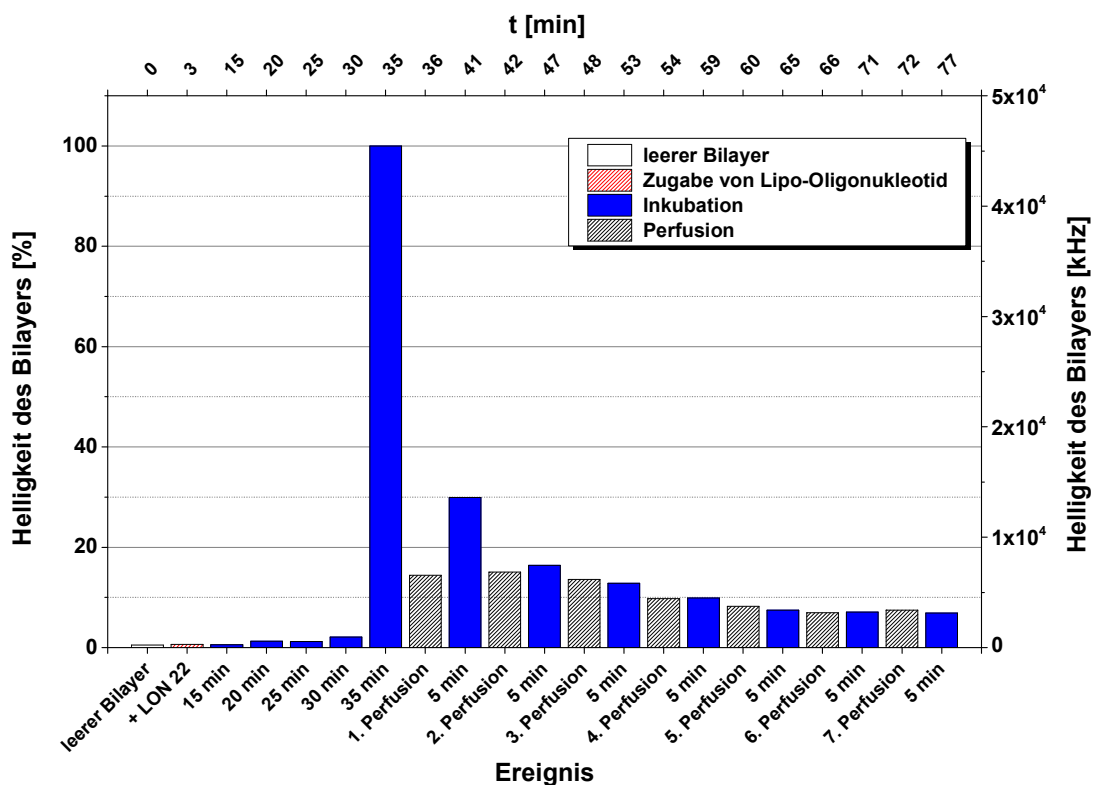


Abbildung 27. Helligkeit des Bilayers vs. Ereignis zur Bilayerinsertion des LON **22** [5'-d(5a-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3']. Vgl. [146, S. 917].

Im Vergleich dazu wurde für das Lipo-Oligonucleotid **23** (5'-d(5e-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3'), einem Oligomer mit einem O-2',3'-Pentatriacontanyliden-modifizierten Uridin als terminale lipophile Gruppe, ein anderes Einlagerungsverhalten (vgl. **Abbildung 28**) beobachtet: direkt nach seiner Zugabe in das cis-Kompartiment über den Bilayer lagert sich das LON **23** in die Membran ein und erreicht nach 5 Minuten Inkubationszeit nahezu die maximale Helligkeit. Dieses Lipo-Oligonucleotid ist sehr fest im Bilayer verankert. Nach den ersten drei Perfusions-/Inkubationsschritten liegt die Helligkeit bei 85-100%. Nach der 8. Perfusion wird ein stabiler Helligkeitswert im Bilayer um die 40% erreicht. Es zeigt sich, dass die Ketten-

länge der O-2',3'-Alkyldengruppe am Nucleolipid die Stabilität der Verankerung des LONs im Bilayer beeinflusst.

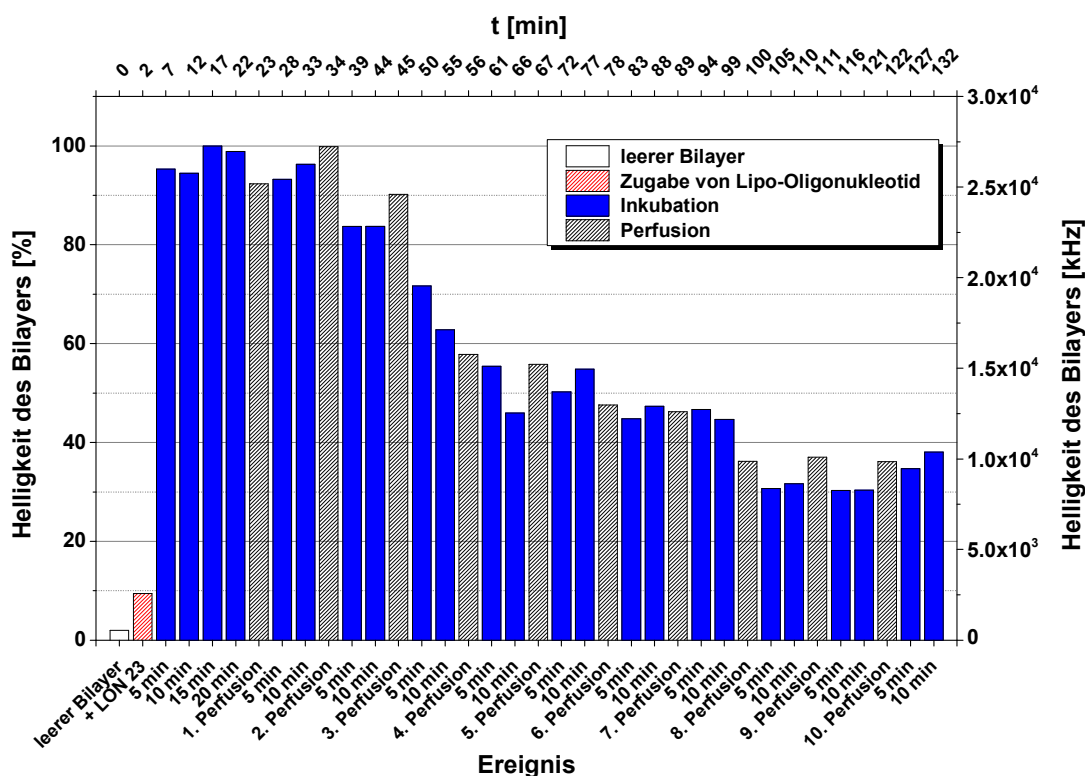


Abbildung 28. Helligkeit des Bilayers vs. Ereignis zur Bilayerinsertion des LON **23** [5'-d(5e-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3']. Vgl. [146, S. 917].

Mit Hilfe dieser Bilayer-Insertionsexperimente konnte das Einlagerungsverhalten verschiedener Lipo-Oligonucleotide mit unterschiedlichen Nucleolipid-Gruppen indirekt über die Helligkeit des Bilayers beschrieben werden. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Einlagerungsrate der Lipo-Oligonucleotide in einen künstlichen Lipid-Bilayer sowie seine Verankerung in der Membran nicht nur von der Lipophilie seiner Kopfgruppen, sondern auch von (i) deren dreidimensionalen Struktur, (ii) von der Länge der lipophilen Gruppen sowie (iii) von der Position der lipophilen Gruppe am Nucleosid abhing, so dass für jedes Lipo-Oligonucleotid ein kinetisches Verhalten dargestellt werden konnte (vgl. **Abbildung 29**). Diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass das LON **18**, ein Oligomer mit einer langen doppelkettigen Lipidgruppe an der N(3)-Position eines Thymidins, eine vergleichsweise kleine Einlagerungsrate aufwies, aber sehr resistent gegen die Perfusionsvorgänge war bzw. fest im Bilayer verankert war. Die lipophilen Kopfgruppen der LONs **19-21** führten zu einer schnellen und effizienten Einlagerung in den künstlichen Lipid-Bilayer (**Abbildung 29A**). So konnte für das Lipo-Oligonucleotid **20**, einem LON mit einer Phetyl-Gruppe am N(3) des 5-Fluorouridins und einer kurzen O-2',3'-Ketalgruppe,

sowie für das LON **19** mit einer O-2',3'-Nonadecyliden Ketalgruppe, eine sehr starke Verankerung im Bilayer beobachtet werden - viel stärker als für das LON **21**, einem LON mit einem zyklischen O-2',3'-Ketal, welches bereits nach der 3. Perfusion vollständig aus der Bilayermembran entfernt wurde (**Abbildung 26**). Für die LONs **22** und **23** konnte man feststellen, dass eine Verlängerung der C-Kette von 5 auf 17 nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Einlagerungsrate und einer verbesserten Verankerung im Bilayer führte. Auf der einen Seite lagerte sich das LON **22** sehr schnell und mit hoher Rate in den Bilayer ein, auf der anderen Seite wurde es aber durch die Scherkräfte während des Perfusionsvorgangs bereits nach der 1. Perfusion bis zu 85-90% sehr leicht aus der Membran entfernt (vgl. **Abbildung 29A-B**). Im Vergleich dazu lagerte sich das LON **23**, welches sich nur in der Länge der Kohlenstoffkette des lipophilen Restes vom LON **22** unterschied, mit einer niedrigen Rate in den Bilayer ein, blieb aber in erheblicher Menge (40-50%), sogar nach der 10. Perfusion, in der künstlichen Bilayermembran verankert (vgl. **Abbildung 28**).

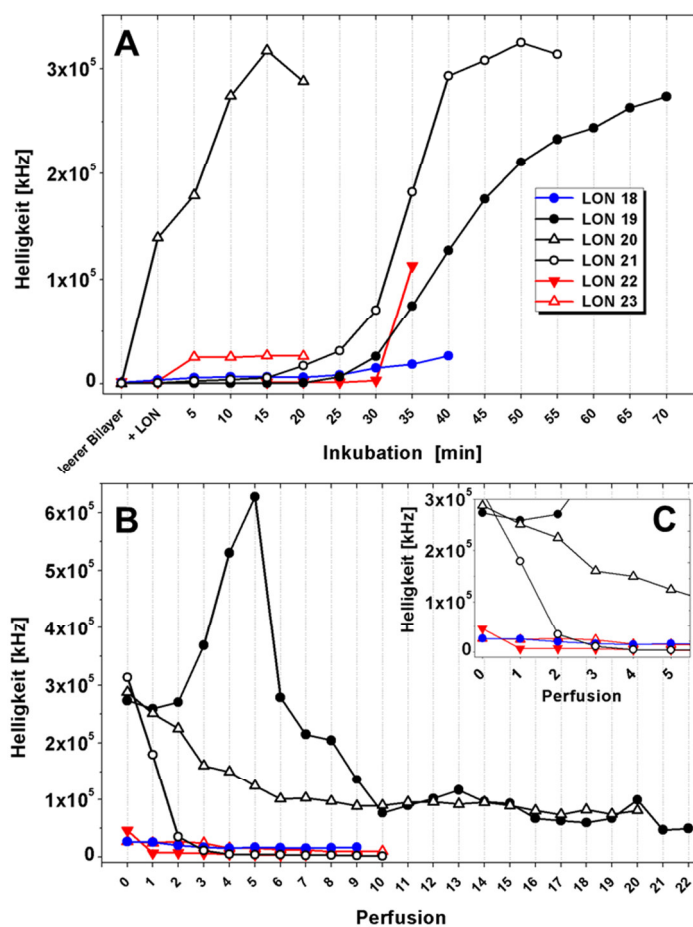


Abbildung 29. Kinetiken der LONs **18–23** zur Einlagerung in den Lipid-Bilayer, gemessen an der Helligkeit des Bilayers, **A.** während der Inkubationszeit bis zur maximal erreichten Helligkeit im Bilayer nach der Zugabe der LONs über den leeren Bilayer und **B.** nach jedem Perfusionsvorgang. **C.** Vergrößerter Ausschnitt aus **B.** Vgl. [146, S. 922].

7.3.2.1. **Anreicherung des LON 19 an der Luft/Wasser-Phasengrenze**

Im Experiment zum Einlagerungsverhalten des LON 19 (5'-d(4b-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3') konnte die Akkumulation dieses LONs an der Luft/Wasser-Phasengrenze beobachtet werden, nachdem die Pufferlösung in den Fokus herabgesenkt worden war (**Abbildung 30E**). Demnach assemblierte das LON 19 an dieser Phasengrenze und wurde nach jedem Perfusionsschritt und während der Inkubationsphasen immer wieder in der Lösung verteilt. Diese angelösten Lipo-Oligomere konnten sich schließlich in die Membran einlagern und somit nach jedem dieser Vorgänge (Perfusion, Inkubation) zum Anstieg der Helligkeit im Bilayer führen, solange dieses Reservoir an LONs bestand. Darüberhinaus könnte sich das LON auch an anderen möglichen Phasengrenzen anlagern. So liegt es nahe, dass sich das Lipo-Oligonucleotid gleichzeitig an folgenden drei Phasengrenzen anreichern könnte: (1) an der Lipid-Bilayer/H₂O-Grenze, (2) an der Luft/H₂O-Phasengrenze sowie (3) an der Teflonoberfläche (vgl. **Abbildung 30J**). So könnte der Anstieg der Helligkeit im Bilayer (vgl. **Abbildung 24** während der Inkubationszeit nach der 2. Perfusion) damit begründet werden, dass die Helligkeit aufgrund der „nachgelieferten“ Lipo-Oligonucleotide aus den Ressourcen (2) und/oder (3) weiter ansteigen konnte.

Der Transport von Lipo-Oligomeren durch die wässrige Phase findet allem Anschein nach nicht nur in monomerer Form, sondern auch in Agglomeraten statt (vgl. **Abbildung 30C**). Allem Anschein nach, sickerte das O-2',3'-Nonadecyliden-modifiziertes Oligomer (LON 19) nicht als Monomer in die Lösung und damit in den Bilayer, sondern als Agglomerat in akkumulierter Form. Darüber hinaus kann der halbkugelförmig nach unten, in den trans-Kanal ausgewölbte Bilayer (vgl. **Abbildung 30E**) damit erklärt werden, dass sich ein Donnan Effekt^[165] ausgebildet haben muss. Damit wird ein Gleichgewicht beschrieben, welches sich an einer semi-permeablen Membran einstellt, wenn nicht alle geladenen Teilchen diese passieren können und sich auf beiden Seiten der Membran in unterschiedlicher Konzentration verteilen, was sich in einer Differenz des osmotischen Drucks äußert. So konnte beobachtet werden, wie sich der Bilayer zusehends zu einer Halbkugel auswölbte und aus dem Fokus verschwand. Durch die asymmetrische Verteilung von Ionen (hier: K⁺- und Cl⁻-Ionen) bei Anwesenheit von Makromolekülen (hier: Lipo-Oligonucleotide), die nicht durch die Membran diffundieren konnten, stellte sich ein solches Donnan-Gleichgewicht ein.

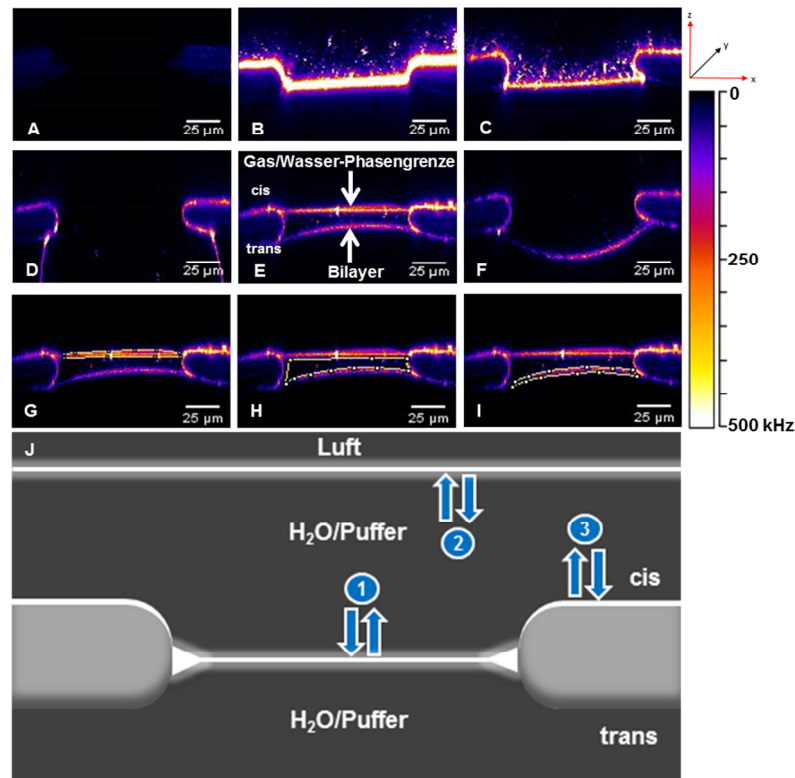


Abbildung 30. xz-Schnitte vom Bilayer aus dem Experiment zum Einlagerungsverhalten des LON 19 [5'-d(4b-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3']. **A.** Reiner Bilayer ohne Fluoreszenz. **B.** Hohe Fluoreszenzintensität des Bilayers sowie die Akkumulation fluoreszierender Aggregate/Ansammlungen über dem Bilayer in der Pufferlösung (vgl. 4. Perfusions-/ Inkubationsschritt). **C.** Abnahme der Fluoreszenzintensität im Bilayer mit zahlreichen fluoreszierenden Aggregaten in der Lösung (vgl. 9. Perfusions-/ Inkubationsvorgang). **D.** Bilayer wölbte sich stark nach unten aus (vgl. 13. Perfusions-/Inkubationsschritt). Keine Datenerhebung zur Helligkeit im Bilayer. Ausgangsposition des Bilayers (14. Perfusion; cis-Kanal; <30 sec, 1.1 ml/min). **E.** Luft/Wasser-Phasengrenze wurde knapp über den Bilayer herabgesenkt (22. Perfusions-/ Inkubationsschritt). **F.** xz-Aufnahme vom Bilayer nach dem Anheben der Luft/Wasser-Phasengrenze und anschließender Perfusion (cis-Kanal; 30 sec, 1.1 ml/min). **G.** Helligkeiten der Luft/Wasser-Phasengrenze und des Lipid-Bilayers innerhalb der betrachteten Region (engl. region of interest: ROI, —o—). Die Helligkeit der Luft/Wasser-Phasengrenze lag bei $1 \cdot 10^5$ kHz, **H.** im Bereich zwischen den beiden Grenzen bei ca. $2.8 \cdot 10^4$ kHz und im Bilayer bei ca. $5 \cdot 10^4$ kHz. **I.** Das Verhältnis der Helligkeit von der Luft/Wasser-Phasengrenze zum Lipid-Bilayer betrug 2. **J.** Darstellung der möglichen Gleichgewichte (GG) an drei Phasengrenzen im cis-Kompartiment der "Bilayer Slide". **1:** Gleichgewichte zwischen der Lipidmembran und der wässrigen Lösung, **2:** an der Phasengrenze zwischen der Luft und der wässrigen Lösung und **3:** an der Phasengrenze zwischen Teflonmembran und der wässrigen Lösung. Vgl. [146, S. 916, 920].

Neben dem Ausgleich der Ionen zur Kompensation der Ladungen des Makromoleküls durch den Ladungsüberschuss an Gegenionen auf der cis-Seite der Membran, ist auch ein Fluss von Lösungsmittelmolekülen von trans nach cis zu berücksichtigen, mit dem die Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran ausgeglichen werden sollen. Der Druck auf der cis-Seite steigt und fällt auf der trans-Seite, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Diese Druckdifferenz zwischen den beiden Seiten der Membran wird kolloidosmotischer Druck genannt. Die Eigenschaft der Lipidmembran, sich bei Druck auszuwölben, ist auf die amphiphilen Lipide zurückzuführen, die im Vergleich zu gänzlich hydrophoben Substanzen die Oberflächenspan-

nung reduzieren und damit eine wichtige Bedeutung für zelluläre Grenzflächen haben^[75]. Obwohl das Phänomen spontaner Assemblierung an der Luft/Wasser-Phasengrenze mit dem O-2',3'-Nonadecyliden-modifizierten Oligomer (LON **19**) beobachtet werden konnte, kann man nicht gänzlich auszuschließen, dass auch andere LONs an der Luft/Wasser-Phasengrenze akkumulieren können.

7.3.2.2. **Zusammenhang zwischen der Struktur der lipophilen Kopfgruppe der LONs und ihrer Stabilität im Lipid-Bilayer**

Nach den Untersuchungen der LONs auf ihr Einlagerungsverhalten in die künstliche Lipidmembran, sollen im Folgenden die verschiedenen Parameter aus diesen Messungen, wie die maximal erreichte Helligkeit sowie die finale stabile Helligkeit nach den Perfusions-/Inkubationsschritten, mit den nach Tetko's ALOGPS Methode (v. 3.01) theoretisch bestimmten $^{10}\log P_{ow}$ -Werten der Nucleolipid-Kopfgruppen in Beziehung gebracht werden (vgl. **Tabelle 2**).

Diese $^{10}\log P_{ow}$ -Werte hängen von der Anzahl der C-Atome der Lipid-Gruppen ab, über die die Oligomere im Bilayer verankert werden. Für die Nucleoside Uridin, Thymin und 5-Fluorouridin liegen diese bei -1.90, -0.96 und -1.30 (± 0.38 mit einem Konfidenzintervall von 66%). Diese sind nachweislich kleiner als die Werte ihrer jeweiligen Lipo-Oligonucleotide und geben einen ersten Aufschluss zur Argumentation des lipophilen Charakters der modifizierten Nucleoside (**3c-5e**).

Während für die Nucleolipide mit langen doppelkettigen Lipid-Gruppen (**3c** und **5e**) $^{10}\log P_{ow}$ -Werte von ~ 9.0 berechnet wurden, wurde für das Nucleolipid mit einer kurzen 2',3'-O-Ketal-Gruppe (**5a**) ein $^{10}\log P_{ow}$ -Wert von ~ 2 berechnet. Vergleicht man dazu das Bilayer-Einlagerungsverhalten der jeweiligen Lipo-Oligonucleotide (LON **18**, LON **23** und LON **22**), so erkennt man zwischen den LONs **18** und **23** viele Ähnlichkeiten in ihrem Bilayer-Einlagerungsverhalten. Mit beiden LONs konnte nahezu dieselbe maximale Helligkeit von ~ 26 MHz erreicht werden und in den anderen Parametern gibt es nur leichte Abweichungen. Im Vergleich dazu ist das Einlagerungsverhalten von LON **22** gering.

Für das Nucleolipid mit einer zyklischen 2',3'-O-Ketal-Gruppe wurde ein $^{10}\log P_{ow}$ -Wert von ~ 4.0 berechnet. Über diese lipophile Gruppe wird das Nucleolipid zwar langsam eingebaut (55 min bis zum Erreichen der maximalen Helligkeit), doch damit wurden ~ 300 MHz erreicht, und damit lag dieser Wert um einen Faktor >10 höher als die Helligkeitswerte für die LONs **18** und **23**. Doch dieser Wert wird bereits

nach nur wenigen Perfusionen auf 3 MHz reduziert. An dieser Stelle wird deutlich, dass nicht nur die Lipophilie des Nucleolipids das Einlagerungsverhalten der LONs beeinflusst, sondern auch die Struktur ihrer terminalen Lipid-Gruppe. Im nächsten Fall liegt die Lipophilie des Nucleolipids **4b** bei ~ 5 . Mit einem O-2',3'-Nonadecanyliden-Rest ist seine lipophile Gruppe länger als die des Nucleolipids **5a** aber kürzer als die des Nucleolipids **5e**. Das Einlagerungsverhalten des LONs **19** wies wie das LON **21** auch eine mit ~ 270 MHz hohe maximale Helligkeit im Bilayer auf, jedoch lag diese nach 16 Perfusions noch bei ~ 54 MHz und war damit immer noch sehr hoch. Des Weiteren akkumuliert das LON **19** an Phasengrenzen (siehe dazu Kapitel 7.3.2.1). Aus diesem Zusammenhang geht hervor, dass mit der Länge und mit der Anzahl der lipophilen Ketten die Lipophilie zwar ansteigt, doch das Einlagerungsverhalten der jeweiligen LONs im Lipid-Bilayer steigt nicht gleichermaßen mit. Ferner weisen ihre Lipo-Oligonucleotide andere Eigenschaften auf, wie das Assemblieren an Phasengrenzen.

Mit einer maximalen Helligkeit von 316.9 MHz nach 15 min Einwirkzeit, die durch die Einlagerung von LON **20** in den Bilayer erreicht wurde, und der relativ guten Stabilität gegen Perfusionsvorgänge (konstante Helligkeit von ca. 88.5 MHz nach 6 Perfusionen) sowie einem $^{10}\log P_{ow}$ -Wert von ~ 6.0 , scheint das Nucleolipid mit der Phytol-modifizierten 5-Fluorouridin-Kopfgruppe (**4c**), diejenige Nucleolipid-Gruppe zu sein, die das Oligomer optimal im Bilayer verankert. Damit könnte sich das Lipo-Oligonucleotid mit dieser Nucleolipid-Kopfgruppe für die Weiterentwicklung einer neuartigen RNA/DNA-Analytik ohne den Einsatz von festem Trägermaterial eignen und auf spontane Assemblierung an Phasengrenzen untersucht werden. Denn das jeweilige LON **20** baute sich schnell in die Lipidmembran ein, es konnte kein Herausdiffundieren aus der Membran während der Inkubationsphasen sowie keine Aggregatbildung beobachtet werden, obwohl auch die LONs **18** und **23**, dafür in Frage kommen könnten, da auch diese eine relativ stabile Verankerung aufweisen, wenngleich sich diese nicht in einem so hohen Maße in die Membran einbauten wie das LON **20**.

Tabelle 2. Ergebnisse aus den Einlagerungsexperimenten der LONs in künstliche Lipidmembrane in Bezug auf die $^{10}\log P_{ow}$ -Werte der Nucleolipid-Kopfgruppen. Vgl. [146, S. 923].

LON	18	19	20	21	22	23
Nucleolipid-Kopfgruppe (Anzahl der C-Atome der Lipid-Gruppe)	3c (36)	4b (19)	4c (20)	4d (19)	5a (11)	5e (35)
$^{10}\log P_{ow}$ ^{a)}	9.04 ^{b)}	5.34 ^{b)}	6.43 ^{b)}	3.99 ^{b)}	2.27 ^{b)}	9.07 ^{b)}
Maximal erreichte Helligkeit im Bilayer [MHz] ^{f)}	26.22	273.49 (sh)/ 627.14 ^{d)}	316.97	324.46	45.77	26.52
Zeit bis zum Einstellen max. Helligkeit im Bilayer [min]	40	70 ^{e)} / 99 ^{f)}	15	55	35	15
Perfusionen bis zum Einstellen stabiler Helligkeit im Bilayer	3	1/ 16	6	4	4	7
Finale Stabile Helligkeit [MHz]	14.87 ± 1.52	258.16 ± 1.52/ 53.95 ± 20.68	88.51 ± 9.71	2.98 ± 0.99	3.64 ± 0.56	9.78 ± 1.60
Finale normierte stabile Helligkeit im Bilayer [%]	56.73 ± 5.80	41.16 ± 2.00/ 8.60 ± 3.00	27.93 ± 3.06	0.92 ± 0.31	7.96 ± 1.22	36.88 ± 6.04

^{a)} $^{10}\log P_{ow}$ -Werte wurden auf der Seite <http://eadmet.com/de/physprop.php> mit ePhysChem berechnet, welches das Programm ALOGPS v. 3.01 zur Vorhersage physikalisch-chemischer Eigenschaften, z.B. die Lipophilie $^{10}\log P_{ow}$ enthält.

^{b)} ± 0.74 mit einem Konfidenzintervall von 66%.

^{c)} erreichter Wert nach 5 Perfusionen.

^{d)} erstes Plateau, erreicht nach 1. Perfusion.

^{e)} konstante End-Helligkeit, erreicht nach 16 Perfusionen.

sh, Schulter; neues erreichtes Plateau für maximale Helligkeit, nach zweitem Anstieg der Helligkeit

^{f)} Die Helligkeit des leeren Bilayers vor der Zugabe fluoreszierender Probe liegt bei 425 ± 300 kHz (N = 6).

Im Hinblick auf die Werte in **Tabelle 2**, wie (i) die maximale Helligkeit, die im Bilayer erreicht wird, (ii) die Bindungsrate bzw. die Zeit, in der der maximale Wert der Helligkeit erreicht wird, (iii) die Festigkeit/Stabilität der Verankerung lipophiler Oligomere im Bilayer (dargestellt als „Anzahl der Perfusionen bis sich ein konstanter Wert der Helligkeit im Bilayer einstellt) sowie (iv) der finale konstante Wert der Helligkeit im Bilayer, ist kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Lipophilie der Nucleolipide und ihrem Einlagerungsverhalten in künstliche Lipidmembranen festzustellen. Das bedeutet, dass die Lipophilie der Nucleolipide eine relativ geringe Rolle für die Effektivität der Einlagerung von Lipo-Oligonucleotiden in künstliche Lipid-Bilayer spielt.

7.4. Spektroskopische und hydrodynamische Eigenschaften der LONs

7.4.1. Diffusionskoeffizienten der Lipo-Oligonucleotide

Dieses Kapitel schließt mit der Untersuchung spektroskopischer und hydrodynamischer Eigenschaften der Lipo-Oligonucleotide für eine genauere Charakterisierung dieser modifizierten Oligomere ab. Im Folgenden wurden zuerst auf theoretischem und experimentellem Weg die Diffusionskoeffizienten der LONs ermittelt, um daraus zu erschließen, ob die LONs in der wässrigen Pufferlösung als Monomere oder als Aggregate vorliegen. Dazu bedarf es einer Simulation der dreidimensionalen Strukturen dieser Makromoleküle. Darauf folgt die Bestimmung der Hydratation dieser LONs. Für die Berechnungen der hydrodynamischen Eigenschaften der LONs **18-23** werden zuerst die 3D-Strukturen der Oligomersequenz 5'-d(TAG GTC AAT ACT)-3' mit Hilfe der Software *HyperChem* (Hypercube, Kanada) erstellt und anschließend mit den Strukturen der lipophilen Kopfgruppen am 5'-Ende verknüpft. Anschließend werden diese Strukturen unter der Verwendung von MMFF94 aus dem freiverfügbaren Programmpaket *Avogadro v 1.1.1* ^[166] einer Kraftfeldoptimierung (vgl. **Abbildung 31**) unterzogen, um die energieminimalsten Konformationen zu berechnen.

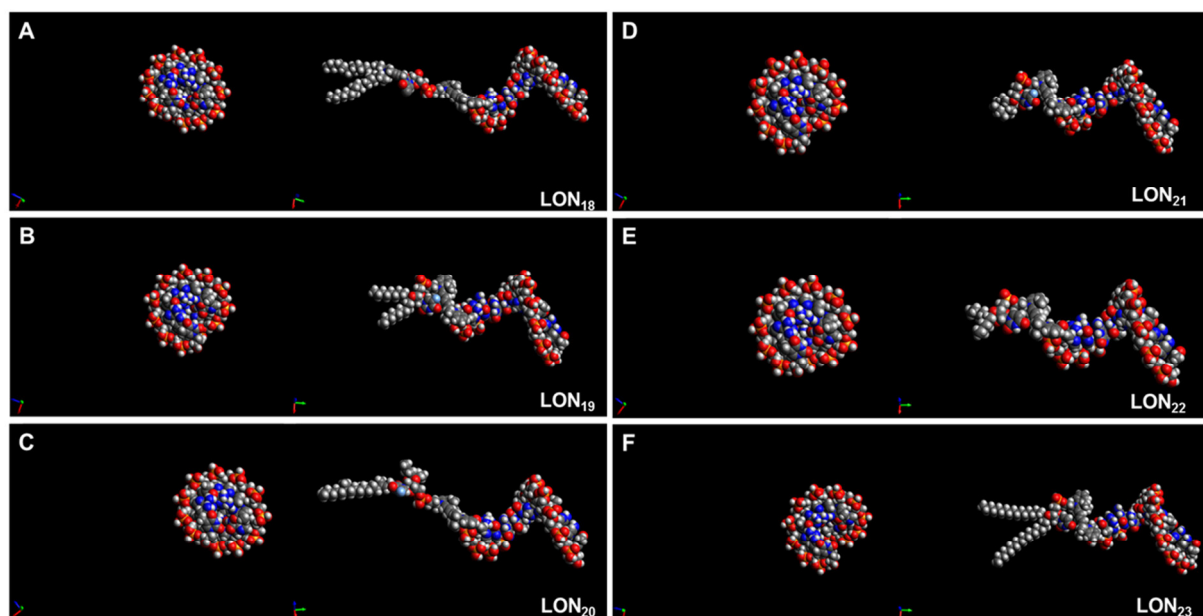


Abbildung 31. Hydrodynamische Modelle lipophiler Oligonucleotide (LONs **18 – 23**) mit der DNA-Sequenz 5'-d(TAG GTC AAT ACT)-3'. Perpendikuläre (rechts) und seitliche (links) Ansicht der helikalen Achse. Vgl. [146].

Für die Berechnungen der Reibungskoeffizienten f sowie der Diffusionskoeffizienten D der LONs **18** – **23** wurden diese Makromoleküle an die Form eines gestreckten Rotationsellipsoiden angenähert (vgl. **Abbildung 32A**), um für die 3D-Strukturen (vgl. **Abbildung 31**) die beiden Halbachsen a und b des Rotationsellipsoiden abzuleiten.

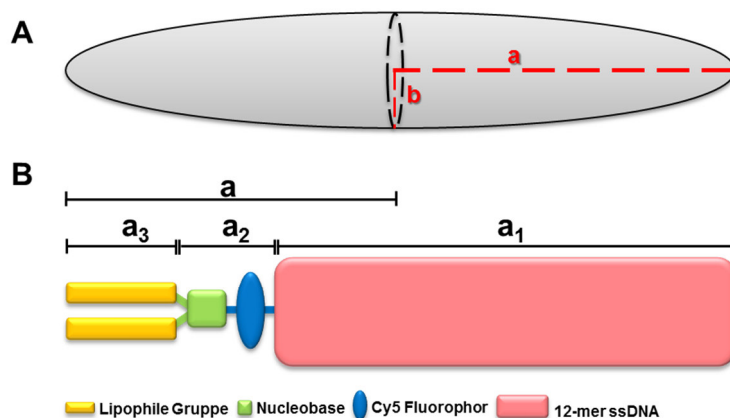


Abbildung 32. Modelle zur Annäherung an die Struktur eines Lipo-Oligonucleotids. **A.** Gestreckter Rotationsellipsoid mit den eingezeichneten Halb-Achsen a und b . **B.** Schematische Darstellung eines Cy5-markierten Lipo-Oligonucleotids für die Berechnung der längeren Halb-Achse a . Vgl. [146].

Die längere Halb-Achse a ist die Hälfte der Summe der Abschnitte a_1 bis a_3 (vgl. **Abbildung 32 B**). Die kürzere Halb-Achse b entspricht dem Radius des DNA-Stranges der LONs und wird mit Hilfe des Pythagoreischen Lehrsatzes bestimmt. Dafür wurden unter dem Einsatz von *Avogadro* oder *RasMol* die einzelnen Abstände zwischen den Phosphatgruppen P_1 und P_5 , P_5 und P_9 sowie zwischen P_9 und P_1 in der 12-mer Sequenz der 3D-modellierten LON-Strukturen gemessen, um den Durchmesser der DNA-Sequenz zu ermitteln. Der halbe Durchmesser entspricht dem kurzen Halb-Achsenabschnitt b . Ferner ist zu berücksichtigen, dass Nucleinsäuren Wassermoleküle binden und somit von einer Hydrathülle umgeben sind. Auf Grund dieser Tatsache musste der kürzere Halb-Achsenabschnitt b um 2.8 \AA , was einem Durchmesser eines Wassermoleküls entspricht, erweitert werden. Dieser Rechnung nach lag der Mittelwert für den kürzeren Halb-Achsenabschnitt b eines hydratisierten Nucleinsäurestrangs bei $12.03 \pm 0.15 \text{ \AA}$.

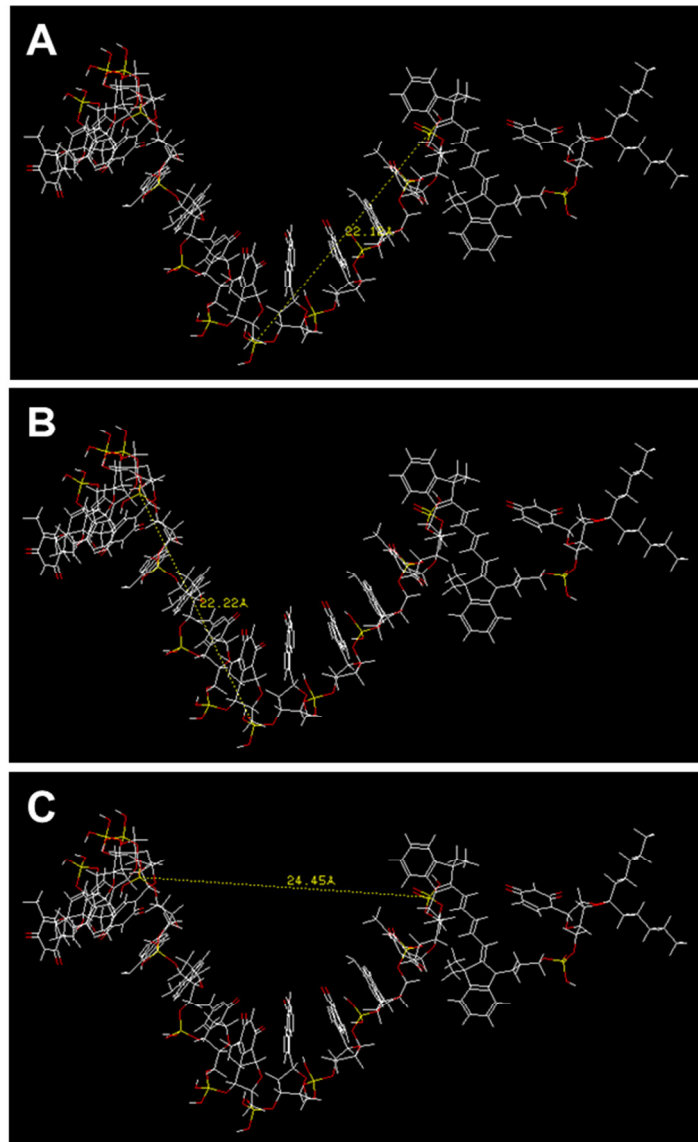


Abbildung 33. Bestimmung der Abstände (gestrichelte Linie in Gelb) zwischen den Phosphatgruppen in der 12-mer Sequenz (durchgeführt mit *RasMol*) am Beispiel des LON **22** [5'-d(5a-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3']. **A.** Abstand zwischen P₁ und P₅. **B.** Abstand zwischen P₅ und P₉ sowie **C.** Abstand zwischen P₉ und P₁.

Der Reibungskoeffizient f eines Ellipsoiden, in zufälliger Bewegung, mit den Halbachsen-Abschnitten a und b entspricht^[167]:

$$f = \frac{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot a}{\ln \frac{2a}{b}} \quad (\text{Gleichung 6})$$

Gemäß Stokes-Einstein Relation für ellipsoide Partikel wurde der Diffusionskoeffizient D wie folgt dargestellt:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{f} \quad (\text{Gleichung 7})$$

Hierbei ist $k_B T$ die thermale Energie, f der Reibungskoeffizient eines sich zufällig bewegenden Ellipsoiden und η die Viskosität des Lösungsmittels (hier: η_{H_2O} mit $0.01 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$). In **Tabelle 3** wurden die Ergebnisse zur theoretischen Berechnung der hydrodynamischen Eigenschaften der Lipo-Oligonucleotide **18 – 23** zusammengefasst. Der mittlere Diffusionskoeffizient lag bei $1.2 \cdot 10^{-6} \pm 0.08 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Tabelle 3. Hydrodynamische Eigenschaften der Lipo-Oligonucleotide **18 – 23**. Vgl. [146, S. 925].

LON	Nucleo- lipid Kopf- Gruppe ^{a)}	MW	a_1	a_2	a_3	$2 \cdot b_{\text{anh}}$	a	b_{hyd}	$f_{\text{calc}}^{\text{d)}$	$D_{\text{calc}}^{\text{e)}$
			DNA Länge	Cy5/Base Abstand	Lipid Länge	DNA Durch- messer	längere Halb- achse ^{b)}	kürzere Halb- achse ^{c)}	$\times 10^{-8}$	$\times 10^{-6}$
		[g·mol ⁻¹]	[Å]						[g·s ⁻¹]	[cm ² ·s ⁻¹]
18	3c (36) ^{a)}	5054.4	34.48	22.33	25.85	19.00	41.33	12.30	4.09	0.99
19	4b (19) ^{a)}	4767.8	33.07	13.51	11.85	18.45	29.22	12.02	3.48	1.16
20	4c (20) ^{a)}	4875.9	32.92	18.78	21.23	18.37	36.47	11.98	3.81	1.06
21	4d (15) ^{a)}	4707.6	33.68	13.59	6.31	18.29	26.49	11.94	3.36	1.20
22	5a (11) ^{a)}	4637.8	33.17	13.85	7.35	18.55	27.19	12.08	3.41	1.19
23	5e (35) ^{a)}	4974.4	33.13	13.53	22.13	18.15	34.40	11.87	3.69	1.10

^{a)} In Klammern wird die Anzahl der C-Atome der lipophilen Gruppe angegeben.

^{b)} Halb-Achsenabschnitt zur Annäherung an einen Ellipsoiden ^[167].

^{c)} b_{hyd} , kürzere Halb-Achse eines hydratisierten DNA-Stranges.

^{d)} theoretisch berechneter Reibungskoeffizient eines Ellipsoiden ^[ebd.]

^{e)} theoretisch berechneter Diffusionskoeffizient

Es ist nicht auszuschließen, dass die LONs sich zu größeren Aggregaten zusammenlagern. Unter experimentellen Bedingungen bezüglich der Konzentration und der Temperatur konnte aber keine Aggregation der LONs beobachtet werden – eine Feststellung, die durch die gute Übereinstimmung zwischen den berechneten und den experimentell bestimmten hydrodynamischen Eigenschaften belegt werden konnte. Zum Vergleich werden Diffusionszeiten der Cy5-markierten Lipo-Oligonucleotide **18 – 23** auch experimentell bestimmt. Dazu werden diese LONs in Wasser gelöst und in einem effektiven konfokalen Volumen von 0.9 fl detektiert. Die Diffusionszeit τ_D ist von der Masse und der Form des Moleküls, von den Dimensionen des Detektions-Fokus $\omega_{x,y}$ in x,y-Richtung sowie vom Diffusionskoeffizienten D abhängig (vgl. **Gleichung 8**).

$$\tau_D = \frac{\omega^2}{4 \cdot D} \quad \text{(Gleichung 8)}$$

Tabelle 4. Experimentell bestimmte hydrodynamische Daten zu den LONs **18 – 23** aus den FCS-Messungen. Vgl. [146, S. 926].

LON	Nucleo- lipid Kopf- Gruppe	MW	τ_D ^{b)}	χ^2 ^{c)}	$D_{\text{exp.}}$ ^{d)}	$D_{\text{exp.}}/D_{\text{calc.}}$ ^{e)}
		[g·mol ⁻¹]	[ms]	[ms]	[cm ² s ⁻¹]	
18	3c (36) ^{a)}	5054.4	0.16 ± 0.005	0.99	1.62	1.61
19	4b (19) ^{a)}	4767.8	0.16 ± 0.006	1.16	1.63	1.40
20	4c (20) ^{a)}	4875.9	0.16 ± 0.010	1.06	1.57	1.48
21	4d (15) ^{a)}	4707.6	0.15 ± 0.011	1.20	1.68	1.42
22	5a (11) ^{a)}	4637.8	0.16 ± 0.007	1.19	1.62	1.37
23	5e (35) ^{a)}	4974.4	0.17 ± 0.015	1.10	1.54	1.41

^{a)} In Klammern wird die Anzahl der C-Atome der lipophilen Gruppe angegeben.

^{b)} gemessene Diffusionszeit in ms

^{c)} Chi-quadrat: zeigt die Qualität der Messdaten an.

^{d)} Diffusionskoeffizient berechnet über die experimentell bestimmte Diffusionszeit τ_D .

^{e)} Experimentell ermittelter und theoretisch berechneter Diffusionskoeffizient im Verhältnis zueinander

Ausgehend vom Diffusionskoeffizienten $D = 4.3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ für den Justagefarbstoff MR121^[168-169] und der experimentell gemessenen Diffusionszeit mit $60 \pm 2.05 \text{ } \mu\text{s}$ als Mittelwert wurde für die LONs **18 – 23** ein mittlerer Diffusionskoeffizient von $1.61 \pm 0.06 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ermittelt (vgl. **Tabelle 4**). Das bedeutet, dass das Verhältnis vom experimentellen Diffusionskoeffizienten zum berechneten Diffusionskoeffizienten (vgl. **Tabelle 4**, rechte Säule) 1.45 ± 0.09 beträgt. Diese Daten sind mit denen aus der Literatur vergleichbar. So beschrieben Fernandes et al., 2002^[170] sehr ähnliche Werte für eine 12-mer DNA-Sequenz ($1.22 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und $1.45 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

7.4.2. Hydratation lipophilisierter Oligonucleotide

In wässriger Lösung liegt die DNA nie isoliert vor, denn ihre gesamte Oberfläche ist von Wassermolekülen umgeben, die sich durch Wasserstoffbrückenbindungen an die DNA binden. Dieses gebundene Wasser der Hydrathülle unterscheidet sich vom „freien“ Umgebungswasser (engl. bulk water). Es weist andere thermodynamische Eigenschaften auf als das Umgebungswasser^[171-172]. Durch die Hydratationshülle ist die Oberfläche der Nucleinsäurekette geglättet und das partielle spezifische Volumen hydratisierter DNA (V_{hyd}) um die Hydratationshülle vergrößert. Diese Volumenänderung wurde bei der Berechnung

der Diffusionskoeffizienten berücksichtigt. Durch die Bestimmung von V_{hyd} der Lipo-Oligonucleotide wird die Berechnung des Hydratationsgrades ermöglicht. Das non-hydratisierte Volumen, V_{anh} , wird dargestellt als:

$$V_{anh} = \frac{M}{N_A} \cdot \hat{v} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Hierbei ist M das molekulare Gewicht des Lipo-Oligonucleotids, N_A ist die Avogadro Konstante und \hat{v} das partielle spezifische Volumen. Für die Berechnung der Volumina V_{anh} und V_{hyd} wird das Volumen der LONs an die Form eines gestreckten Rotationsellipsoiden angenähert:

$$V_{ellipsoid} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a \cdot b^2, \quad (\text{Gleichung 10})$$

mit b als kürzere und a als längere Halb-Achse. Die Werte für a , b_{anh} und b_{hyd} sind der **Tabelle 3** zu entnehmen. Die Differenz $V_{hyd} - V_{anh}$ beschreibt das Volumen des hydrodynamisch gebundenen Wassers. Der Grad der Hydratation δ gibt an, wie viel Gramm Wasser pro Gramm Molekül gebunden wird. Diese ist proportional zum partiellen spezifischen Volumen \hat{v} sowie zur Dichte des Lösungsmittels ρ (hier: Dichte des Wassers) und wird wie folgt definiert:

$$\delta = \left(\frac{V_{hyd}}{V_{anh}} - 1 \right) \hat{v} \cdot \rho \quad (\text{Gleichung 11})$$

Aus der **Tabelle 5** ist zu entnehmen, dass sich die Werte der Hydratation von sechs verschiedenen Lipo-Oligonucleotiden durch die Berechnung der Volumina unter der Variation der Längs-Halbachse nur geringfügig unterscheiden. So entspricht die Längs-Halbachse (i) der halben Längsachse a vom gesamten Lipo-Oligomer oder (ii) nur der Längs-Halbachse der 12-mer DNA-Sequenz, die als $a_1/2$ in die Berechnung eingeht. Unter der Annahme, dass eine Vergrößerung der Hydratationshülle mit der zunehmenden Länge der LONs steigt, liegen die Werte für die Hydratationshülle bei 0.8-1.2 Gramm H_2O pro Gramm Lipo-Oligonucleotid (vgl. **Tabelle 5**). Geht man aber davon aus, dass nur die Nucleinsäurekette von einer Hydrathülle umgeben wird, so liegt diese bei 0.5 Gramm H_2O pro Gramm LON-Molekül.

Auf der Grundlage von IR-Spektroskopie-Messungen wird in der Fachliteratur postuliert, dass 20 H_2O -Moleküle ein Nucleotid innerhalb der Nucleinsäure hydratisieren^[173-174]. Das schließt auf einen Hydratationsgrad von 1 Gramm H_2O pro

Gramm Molekül. Bloomfield et al. (2000) ^[175] sowie Fernandes et al. (2002) ^[170] berichten von Hydratationsgraden von 0.35 ^[175] oder 0.3 g H₂O pro Gramm Nucleotid. Auch die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Hydratations-Werte liegen nach (i) um 1 Gramm H₂O pro Gramm LON oder nach (ii) bei 0.5. Der Hydratations-Wert ist um die Hälfte kleiner, wenn man die Länge der lipophilen Reste nicht in die Berechnung einfließen lässt. Diese Annahme ist insofern sinnvoll, als dass diese lipophilen Reste keine hydrophilen Wechselwirkungen mit den Wassermolekülen ausbilden wie die Nucleinsäuren.

Tabelle 5. Hydratisierte V_{hyd} und nicht-hydratisierte V_{anh} Volumina, das spezifische partielle Volumen \hat{v} sowie Grad der Hydratation δ der LONs **18 – 23** im Vergleich unter Einbeziehung verschiedener Längsachsen-Abschnitte (a und a_1) lipophilisierter Oligomere. Vgl. [146, S. 926].

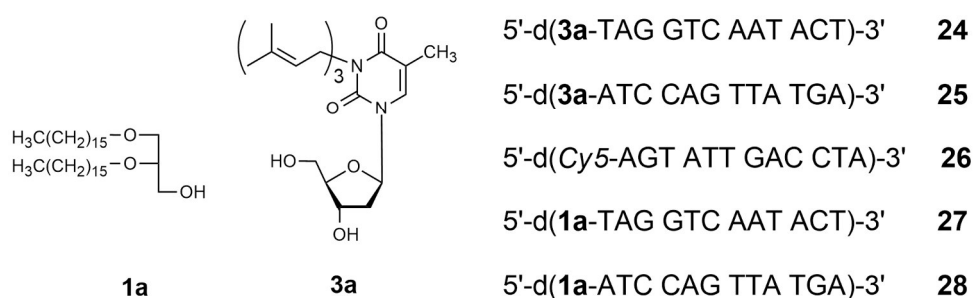
LON	Hydratation des gesamten LONs - berechnet über die Halb-Achse a					Hydratation nur der 12-mer DNA - berechnet über die Halb-Achse a_1				
	V_{anh} $\times 10^{-20}$	V_{hyd} $\times 10^{-20}$	$V_{\text{hyd}}-V_{\text{anh}}$ $\times 10^{-21}$	\hat{v}	δ	V_{anh} $\times 10^{-21}$	V_{hyd} $\times 10^{-20}$	$V_{\text{hyd}}-V_{\text{anh}}$ $\times 10^{-21}$	\hat{v}	δ
	[cm ³]			[cm ³ g ⁻¹]		[cm ³]			[cm ³ g ⁻¹]	
18	1.56	2.62	10.56	1.9	1.2	6.51	1.09	4.41	0.8	0.5
19	1.04	1.77	7.28	1.3	0.9	5.89	1.00	4.12	0.7	0.5
20	1.29	2.19	9.05	1.6	1.1	5.81	0.99	4.08	0.7	0.5
21	0.94	1.60	6.62	1.2	0.8	5.90	1.00	4.16	0.8	0.5
22	0.98	1.66	6.81	1.3	0.9	5.97	1.01	4.15	0.8	0.5
23	1.19	2.03	8.45	1.4	1.0	5.71	0.98	4.07	0.7	0.5

Die beschriebenen Simulationen und Berechnungen verschiedener physikalischer Parameter sollen nicht nur Aufschlüsse über die Struktur der Lipo-Oligonucleotide geben, sondern auch erste Einblicke in die Hydrodynamik solcher amphiphiler Makromoleküle gewähren.

7.5. DNA-Duplexbildung am Lipid-Bilayer

7.5.1. Vorversuchsreihe: Bildung von DNA-Duplexen zwischen Lipo-Oligonucleotiden und ihren Gegensträngen am Lipid-Bilayer

Nach der systematischen Untersuchung lipophiler DNA-Oligomere auf ihr Einlagerungsverhalten in künstliche Lipidmembranen sowie ihre hydrodynamischen Eigenschaften, befassen sich die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen mit der Duplex-Bildung zwischen lipophilen Oligomeren und ihren komplementären nicht-lipophilisierten Gegensträngen an künstlichen Lipidmembranen. Dabei wird schwerpunktmäßig auf die Duplex-Bildung zwischen variierenden DNA-Sequenzen eingegangen.



Formelschema 7. Strukturen der Nucleolipide **1a** und **3a** der Lipo-Oligonucleotide **24**, **25** bzw. **27**, **28**.

Das Kapitel beginnt mit vorbereitenden Messungen zur Duplex-Bildung. Dabei werden jeweils zwei Oligomere **24** (5'-d(**3a**-TAG GTC AAT ACT)-3') und **27** (5'-d(**1a**-TAG GTC AAT ACT)-3') mit den lipophilen Gruppen **1a** bzw. **3a** auf ihre Duplex-Bildung mit dem nicht-lipophilisierten Cy5-markierten Gegenstrang untersucht. Neben der Duplex-Bildung der Oligomere am Lipid-Bilayer soll auch untersucht werden, ob die jeweiligen Lipid-Anker einen Einfluss auf die Verweildauer, d.h. die Festigkeit der Verankerung des DNA-Duplex im Bilayer haben. Dazu wurden LONs mit einem Farnesyl- (**3a**) oder mit einem 1,2-Di-O-Hexadecylglycerin-Rest (**1a**) gewählt. An die Vorversuchsreihe schließt sich eine umfangreiche Studie zur Duplex-Bildung an der Bilayermembran an. Es werden DNA-Sequenzen in ihrer Länge, Komplementarität und Basenabfolge variiert und mit einem DNA-Interkalator, dem SYBR Green I markiert.

Die Oligomere **24** und **25** enthalten jeweils das Thymidininterpen **3a** am 5'-Ende während das Cy5-markierte Oligomer **26** in einer antiparallelen Strangorientierung komplementär zum Oligomer **24** aber nicht-komplementär zum Oligomer **25** ist.

Die Oligomere **27** und **28** enthalten den nicht-nucleosidischen Lipidrest **1a** am 5'-Ende des jeweiligen Oligomers und nur Oligomer **27** ist in antiparalleler Orientierung zum Gegenstrang **25** komplementär.

Alle diese Hybridisierungsexperimente mit den Lipo-Oligonucleotiden und ihren Gegensträngen wurden an künstlichen horizontalen Lipidmembranen durchgeführt. Der horizontale Lipid-Bilayer wird aus einer Lipidlösung aus 1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanol-amin (POPE) und 1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) (8:2, w/w, 10 mg/mL in *n*-Dekan) über einem Loch in der Teflonfolie des "Bilayer Slide" (*Bilayer Slides, Ionovation GmbH, D-Osnabrück*) (vgl. **Abbildung 12C**) gezogen. Die Lipo-Oligonucleotide sowie ihre komplementären und nicht-komplementären Stränge wurden nacheinander über den Bilayer in das *cis*-Kompartiment injiziert und inkubiert. Anschließend wurde der *cis*-Kanal abwechselnd für 30 Sekunden perfundiert (1.1 mL/min) und inkubiert. Der Bilayer wurde über das inverse konfokale Mikroskop auf seine Helligkeit untersucht. Dazu wird der Cy5-Farbstoff am komplementären Strang des Duplex' mit einem Laser (635 nm) angeregt. Anschließend werden die mikroskopischen Aufnahmen auf ihre Helligkeit im Bilayer untersucht und ausgewertet.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Duplex-Bildung zwischen den im Bilayer verankerten Lipo-Oligonucleotiden **24** (5'-d(**3a**-TAG GTC AAT ACT)-3') und **25** (5'-d(**3a**-ATC CAG TTA TGA)-3') mit dem Cy5-markiertem Oligomer **26** (5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3') beschrieben. Oligomer **26** ist nur komplementär zum LON **24** aber nicht zum LON **25**. In **Abbildung 34** belegen die mikroskopischen Aufnahmen die Duplex-Bildung zwischen LON **24** und Oligomer **26**. Die Negativkontrolle zwischen dem LON **25** und dem Oligomer **26** ist in **Abbildung 35** dargestellt. An der Helligkeit des Bilayers (vgl. **Abbildung 35E**) ist zu erkennen, dass sich DNA-Duplexe an der Membran bilden. Im Vergleich zur Negativkontrolle fluoresziert die Membran auch nach der Perfusion des oberen *cis*-Kanals, weil der Cy5-markierte Strang, mit dem in der Membran verankerten Lipo-Oligonucleotid Duplexe bildet und damit durch den ersten Perfusionsschritt nicht entfernt werden kann.

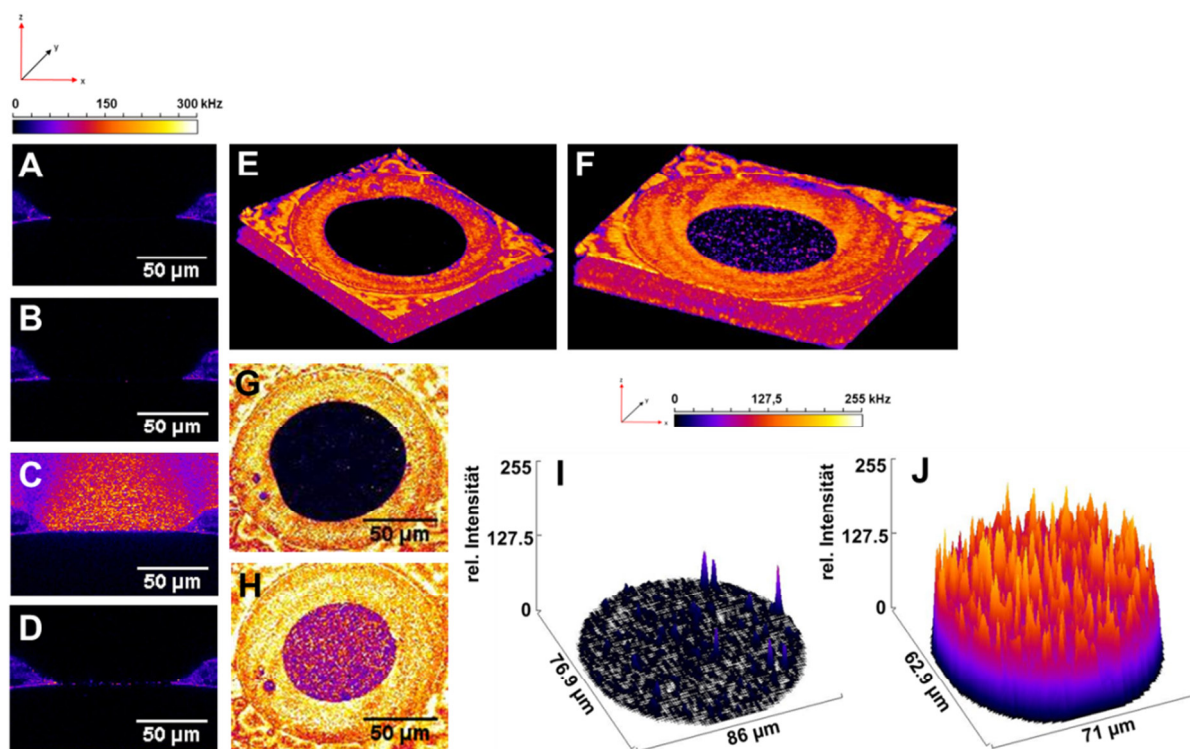


Abbildung 34. Duplex-Bildung des LON 24 [5'-d(3a-TAG GTC AAT ACT)-3'] mit dem komplementären, Cy5-markierten Oligomer 26 [5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3'] am Lipid-Bilayer. **A.** Reiner Bilayer vor der Probenzugabe. **B.** Zugabe des LON 24 (cis-Kanal, 6 µL, 500 nM) und 60 min Einwirkzeit (=Inkubation). **C.** Zugabe des Cy5-markierten Oligomers 26 (cis-Kanal, 6 µL, 50 nM), gefolgt von 60 min Inkubation. **D.** Perfusion (cis-Kanal, 30 s, 1.1 mL/min). **E.** 3D-Darstellung vom reinen Lipid-Bilayer. **F.** 3D-Darstellung vom Bilayer aus D. **G.** Sicht auf den reinen Bilayer. **H.** Sicht auf den mit den LONs beladenen Lipid-Bilayer. **I.** 3D-Darstellung der Helligkeit [in rel. Einheiten] von der Bilayeroberfläche aus A. **J.** 3D-Darstellung der Helligkeit [in rel. Einheiten] von der mit dem DNA-Duplex beladenen Bilayeroberfläche aus D. Vgl. [16, S. 52].

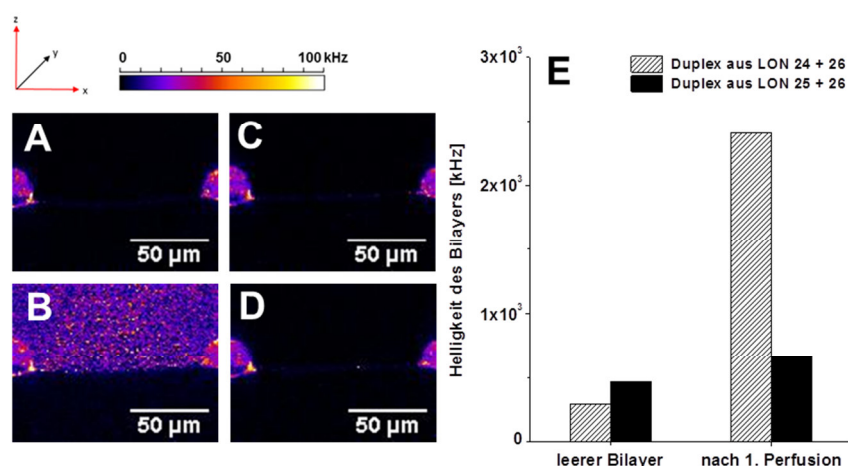


Abbildung 35. Kontrollexperiment zur Duplex-Bildung mit den nicht-komplementären Oligonucleotiden 25 [5'-d(3a-ATC CAG TTA TGA)-3'] und 26 [5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3']. **A.** Zugabe des LON 25 (cis-Kanal, 6 µL, 500 nM) über den Bilayer, gefolgt von 50 min Einwirkzeit. **B.** Zugabe des Cy5-markierten LON 26 (cis-Kanal, 6 µL, 50 nM) und 40 min Inkubation. **C.** 1. Perfusion des cis-Kanals (30 s, 1.1 mL/min). **D.** 20 min Inkubation gefolgt von zwei weiteren Perfusionen (cis-Kanal, je 60 s, 1.1 mL/min). **E.** Helligkeit im Bilayer [in kHz] zur Duplex-Bildung der zueinander komplementären Oligomer-Sequenzen 24 [5'-d(3a-TAG GTC AAT ACT)-3'] und 26 [5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3'] sowie den nicht-komplementären Sequenzen 25 [5'-d(3a-ATC CAG TTA TGA)-3'] und 26 [5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3'] jeweils vor der Oligomer-Zugabe (= reiner Bilayer) und nach der 1. Perfusion des cis-Kanals. Vgl. [16, S. 53-54].

Im nächsten Schritt wird ein weiterer Versuch zur Duplex-Bildung an der künstlichen Lipid-Membran durchgeführt. Anders als im ersten Vorversuch werden hier LONs **27** (5'-d(**1a**-TAG GTC AAT ACT)-3') und LON **28** (5'-d(**1a**-ATC CAG TTA TGA)-3') jeweils mit einem doppelkettigen nicht-nucleosidischen Lipidrest (**1a**) eingesetzt. Auf Grund der Anzahl (insgesamt zwei) und der Länge (16 C-Atome) der Lipidkette wird erwartet, dass sich die Lipo-Oligonucleotide mit dem doppelkettigen C₁₆-Rest besser in die Membran einlagern als die LONs **24** (5'-d(**3a**-TAG GTC AAT ACT)-3') und **25** (5'-d(**3a**-ATC CAG TTA TGA)-3') mit dem Farnesyl-Rest (**3a**).

Den mikroskopischen Aufnahmen zur Duplex-Bildung des LON **27** mit dem komplementären Oligomer **26** am Lipid-Bilayer (vgl. **Abbildung 36**) ist zu entnehmen, dass sich an der Grenze zwischen dem Bilayer und der Puffer-Lösung ein fluoreszierender DNA-Duplex bildete, sobald das Oligomer **26** zu dem bereits in der Membran verankerten LON **27** dazugegeben wurde^[49]. Dabei wurde beobachtet, dass die Bilayermembran nach der Zugabe des Cy5-markierten Gegenstrangs intensiver fluoreszierte als im Versuch mit LON **24** und **26**. Außerdem schien es stabiler im Bilayer einzubauen, da dieser Duplex selbst nach vier Perfusionsvorgängen immer noch in der Membran nachweisbar war. Die Helligkeit im Bilayer stieg direkt nach der Zugabe des komplementären Cy5-markierten Gegenstrangs und erreichte mit $50 \cdot 10^3$ kHz 100%. Die maximale Helligkeit im Bilayer blieb nach der 1. Perfusion der cis-Kammer nahezu unverändert, fiel aber schrittweise nach jedem Perfusionsvorgang ab, bis diese nach der 4. Perfusion nur 6% betrug (vgl. **Abbildung 36O**).

Im Kontrollexperiment wurde zum Bilayer-gebundenem LON **28** (5'-d(**1a**-ATC CAG TTA TGA)-3') die nicht-komplementäre DNA-Sequenz **26** (5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3') dazugegeben und 30 min inkubiert. Wie in **Abbildung 37B** zu erkennen ist, fluoreszierte die Pufferlösung im cis-Kanal, ohne dass sich die Fluoreszenz im Bilayer anreicherte. Dadurch, dass die beiden Oligomere nicht komplementär zueinander waren, bildeten sich an der Membran keine DNA-Duplexe. Die Cy5-markierten Oligomere diffundierten frei in der Lösung, die nach nur wenigen Perfusionsschritten (je, 30 sec, 1.1 mL/min) vollständig aus der cis-Kammer herausgewaschen werden konnten (vgl. **Abbildung 37F**).

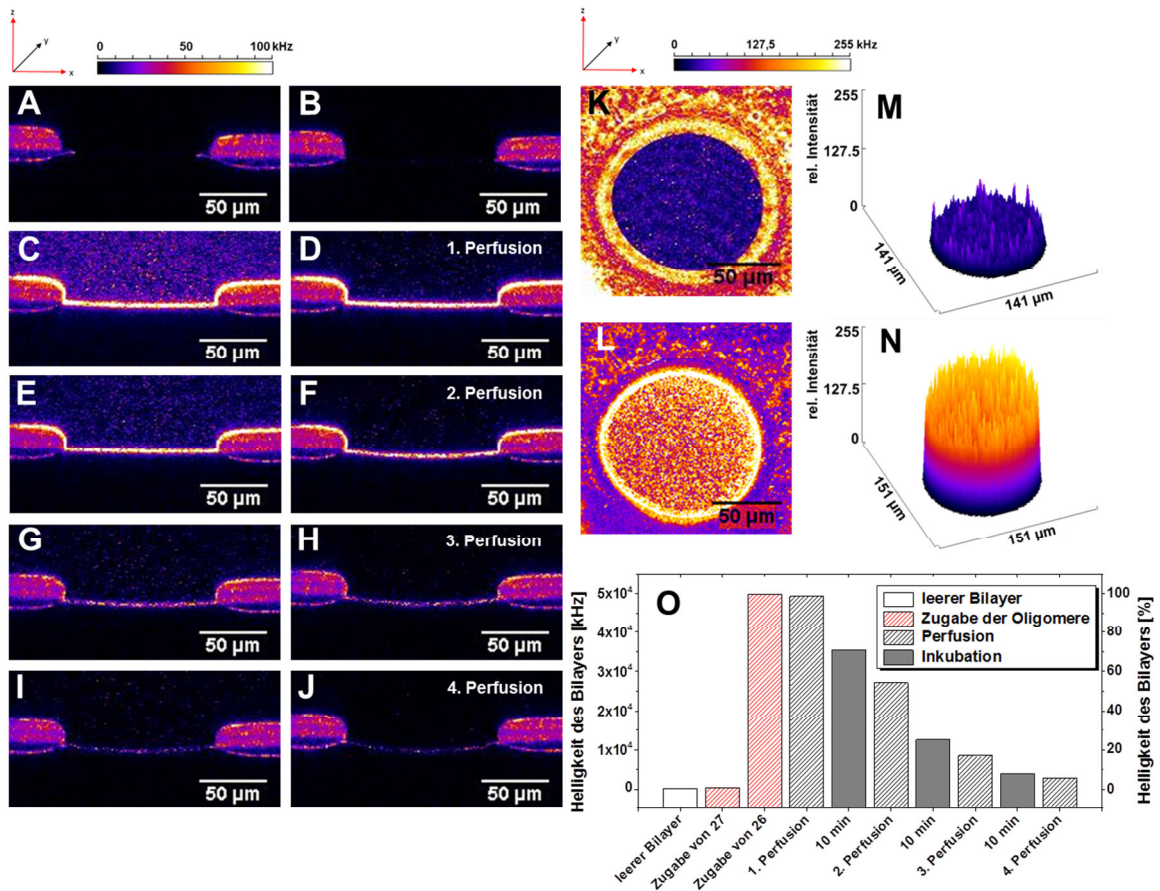


Abbildung 36. 2D- und 3D-Darstellungen zur Duplex-Bildung komplementärer Oligomere **27** [5'-d(1a-TAG GTC AAT ACT)-3'] und **26** [5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3'] am Lipid-Bilayer. **A.** Reiner Bilayer. **B.** Zugabe von LON **27** (cis-Kanal, 4 μ L, 500 nM), gefolgt von 30 min Inkubation und einer Perfusion (cis-Kanal, 30 s, 1.1 mL/min). **C.** Zugabe von Cy5-markiertem Oligomer **26** (cis-Kanal, 5 μ L, 50 nM), gefolgt von 30 min Inkubation. **D.** 1. Perfusion (cis-Kanal, 30 s, 1.1 mL/min). **E.** 10 min Inkubation. **F.** 2. Perfusion (cis-Kanal, 30 s, 1.1 mL/min). **G.** 10 min Inkubation. **H.** 3. Perfusion (cis-Kanal, 30 s, 1.1 mL/min). **I.** 10 min Inkubation. **J.** 4. Perfusion (cis-Kanal, 30 s, 1.1 mL/min). **K.** Sicht auf den reinen Bilayer. **L.** Sicht auf den mit dem Duplex aus den DNA-Sequenzen **27** und **26** beladenen Bilayer. **M.** 3D-Darstellung der Helligkeit [in rel. Einheiten] vom der Bilayeroberfläche aus **A**. **N.** 3D-Darstellung der Helligkeit [in rel. Einheiten] von der mit dem DNA-Duplex beladenen Bilayeroberfläche aus **D**. **O.** Helligkeit des Bilayers in kHz- und %-Angaben zur Duplex-Bildung der beiden zueinander komplementären Oligomere **27** und **26** als Funktion zur Anzahl der Perfusionsschritte. Zu A-N: Vgl. [7, S. 275]; zu O: angelehnt an [ebd., S. 276].

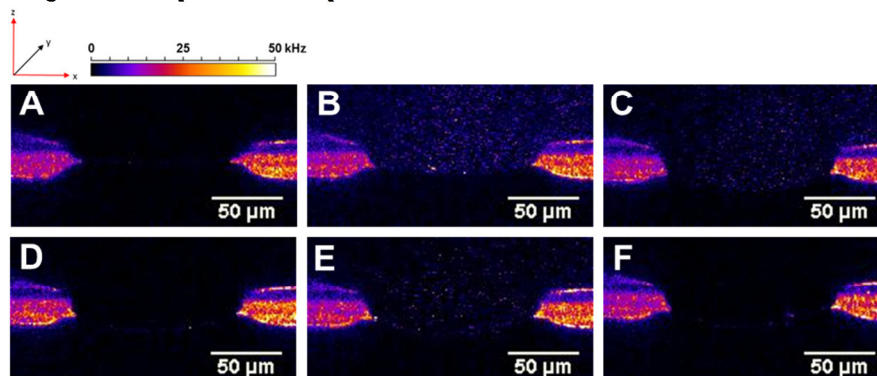


Abbildung 37. Kontrollexperiment zur Duplex-Bildung mit den nicht-komplementären Oligonucleotiden **28** [5'-d(1a-ATC CAG TTA TGA)-3'] und **26** [5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3']. **A.** Zugabe von LON **28** (cis-Kanal, 6 μ L, 500 nM), 28 min Inkubation, gefolgt von einer Perfusion (cis-Kanal, 30 s, 1.1 mL/min). **B.** Zugabe des Cy5-markierten Oligomers **26** (cis-Kanal, 6 μ L, 50 nM), 30 min Inkubation. **C.** 1. Perfusion (cis-Kanal, 30 s, 1.1 mL/min) und 10 min Inkubation. **D.** 2. Perfusion (cis-Kanal, 30 s, 1.1 mL/min). **E.** 10 min Inkubation. **F.** 3. Perfusion (cis-Kanal, 30 s, 1.1 mL/min). Vgl. [7, S. 277].

Für die DNA-Duplexe, die über das Nucleolipid **1a** im Lipid-Bilayer verankert wurden, konnten höhere Helligkeitswerte im Bilayer beobachtet werden. Diese Beobachtung kann darin begründet werden, dass sich diese lipophilisierten Oligomere effektiver in den Bilayer einlagern, d.h. sie lagern sich schneller und in größerer Anzahl in die Membran ein. An der Anzahl der Perfusionen ist zu erschließen, dass sich diese lipophile Gruppe auch stabiler im Bilayer verankern lässt, so dass die DNA-Duplexe durch die Perfusionen nicht so leicht aus der Membran zu entfernen sind. Eine doppelkettige C₁₆-Gruppe verankert das LON besser in der Membran als die Farnesyl-Gruppe (**3a**) der LONs **24** (5'-d(**3a**-TAG GTC AAT ACT)-3') und **25** (5'-d(**3a**-ATC CAG TTA TGA)-3'). Der Rückgang der Helligkeit im Bilayer wird auch durch die Dissoziation des DNA-Duplexes verursacht. Dieser Vorgang bzw. die Abnahme der Helligkeit im Bilayer lässt sich aus den Werten zu jeder Inkubationsphase sowie nach jedem Perfusionsvorgang (vgl. **Abbildung 360**) erschließen.

Die Abnahme der Helligkeit im Bilayer könnte dadurch verursacht werden, dass sich die DNA-Duplexe aus der Membran herauslösen oder dass sich der Gegenstrang vom lipophilisierten und in der Membran verankerten DNA-Strang abdissoziiert. Dieser Vorgang könnte durch die wiederholenden Perfusionen zusätzlich begünstigt werden. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass beide Vorgänge gleichzeitig ablaufen und sich Gleichgewichte an den Phasengrenzen einstellen. Obwohl der membrangebundene DNA-Duplex fest in der Membran eingelagert ist, konnten in der Pufferlösung über dem Bilayer (cis) vor und nach den Perfusionsvorgängen kleine fluoreszierende Nanopartikel beobachtet werden. Bei diesen Nanopartikeln könnte es sich um fluoreszierende Assoziate handeln, bei denen der hydrophile Teil aus Oligonucleotid-Duplexen sich zu den Wassermolekülen in die wässrige Phase richtet, wogegen der hydrophobe Teil aus Nucleolipiden sich zusammenlagert, so dass sich eine inverse Micelle ausgebildet haben könnte. Dieser Vorgang wird je nach Größen- und Längenverhältnis von hydrophilen und hydrophoben Teilen des Lipo-Oligonucleotids beeinflusst. Daher ist es möglich, dass mit der zunehmenden Länge lipophiler Gruppen bei unveränderter Länge der DNA-Sequenz von z.B. 12 Nucleotidbasen, eine größere Tendenz zur Aggregatbildung zu erwarten ist. Diese Theorie belegt die Existenz eines Gleichgewichts zwischen den membrangebundenen DNA-Duplexen und den nm-großen Aggregaten, die frei in der wässrigen Lösung über dem Bilayer diffundieren.

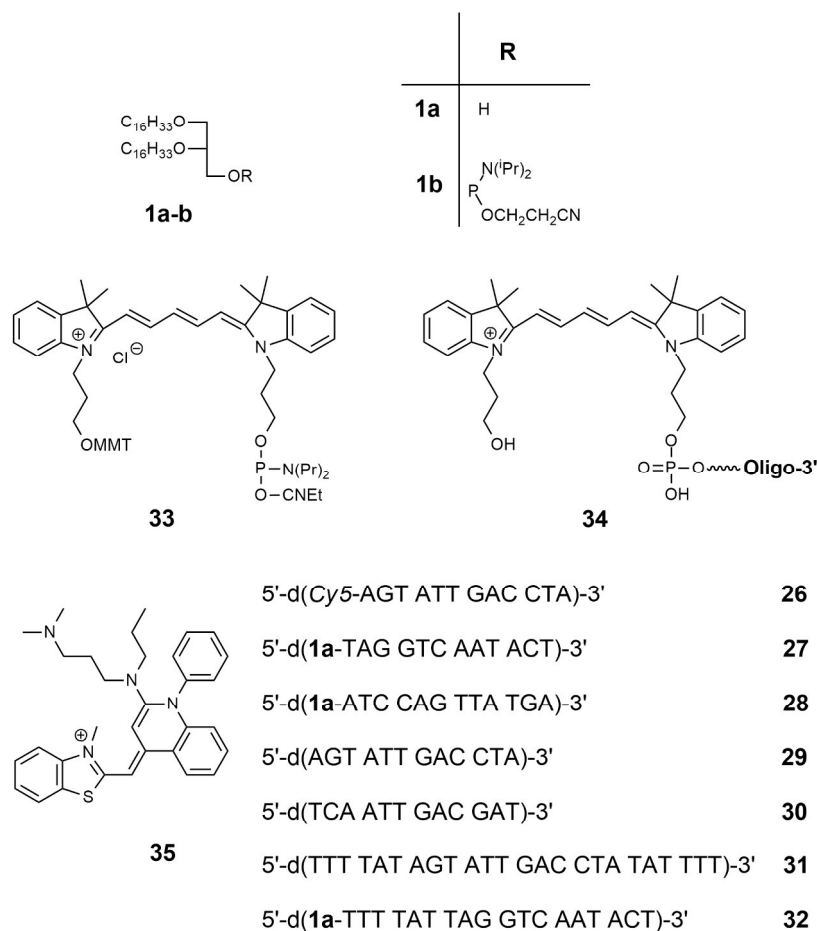
In dieser Vorversuchsreihe konnte gezeigt, dass sich membrangebundene Lipo-Oligonucleotide mit komplementären Oligomeren an der Lipidmembran zu DNA-Duplexen hybridisieren. In weiteren Experimenten wurden (I) die Stabilität und das kinetische Verhalten der Duplex-Bildung mit nur teilweise in ihrer Komplementarität übereinstimmenden Oligonucleotiden, (II) die Bedeutung kurzer Oligonucleotid-Spacer zwischen dem Lipid und der Erkennungssequenz, (III) die Rolle AT-reicher überhängender nicht-komplementärer Sequenzen der Oligomere bei der Duplex-Bildung sowie (IV) die Wechselwirkung zwischen dem DNA-Interkalator SYBR Green I und dsDNA am Lipid-Bilayer untersucht.

7.5.2. Interkalation von SYBR Green I in DNA-Duplexe am Lipid-Bilayer

In der Vorversuchsreihe wurde die Einlagerung der Lipo-Oligonucleotide mit einer racemischen Bis(hexadecyloxy)propan-1-yl-Gruppe (**1a**) am 5'-Ende in den künstlichen Lipid-Bilayer beschrieben. Diese Lipo-Oligonucleotide wurden über die Phosphoramidite (**1b**) ihrer lipophilen Verbindungen synthetisiert. Die Duplex-Bildung der komplementären Cy5-markierten DNA Stränge (**35**) – synthetisiert aus der Vorstufe **34** – wurde mittels der Fluoreszenz-Spektroskopie nachgewiesen. In diesem Kapitel wird diese Methode der DNA-Hybridisierung an Lipidmembranen durch den Einsatz unmarkierter DNA-Sequenzen und durch den Einsatz von SYBR Green I (SG) (**36**), einem DNA-Interkalationsfarbstoff, vereinfacht^[32-34]. Anstelle der kovalent gebundenen Fluorophore wird SG I als ein Indikator für die DNA-Duplexbildung verwendet. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass die Ziel-DNA – dessen An- oder Abwesenheit nachgewiesen werden soll – nicht mehr separat mit einem Fluorochrom wie Cy5 oder Cy3, weder durch chemische Synthesen, noch durch die Polymerasekettenreaktion (PCR), markiert zu werden braucht.

Das Ziel dieser Versuchsreihe ist eine genauere Untersuchung der DNA-Duplex-Bildung variierender DNA-Sequenzen im Hinblick auf Länge, Sequenz und Komplementarität. Dazu werden zuerst die bereits aus der Vorversuchsreihe bekannten komplementären Sequenzen 5'-d(**1a**-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3' (**27**) und 5'-d(Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3' (**26**) an der Lipidmembran hybridisiert und anschließend mit dem Interkalationsfarbstoff SYBR Green I (SG) markiert. An diesem bekannten Experiment soll in erster Linie gezeigt werden, ob SG mit dem DNA-Duplex wechselwirkt. Dabei werden abwechselnd beide Fluoreszenzmarker, das kovalent gebundene Cy5 und das in DNA-Duplexe interkalierende SG, bei unterschiedlicher

Wellenlänge angeregt. In den nachfolgenden Experimenten (B-F) werden die DNA-Duplexe nur mit dem SG markiert. In dieser Versuchsreihe soll untersucht werden, ob sich SG in die DNA-Duplexe an der Lipidmembran einlagert und wie lang die DNA-Sequenzen und ihre komplementären Basenpaare sein müssen, um diese mit dem Interkalator SG zu markieren.



Formelschema 8. Strukturen lipophiler Kopfgruppen (**1a-b**). Monomethoxytrityl-geschütztes Phosphoramidit-Derivat des Cy5-Farbstoffs (**33**) als Vorstufe des Cy5-markierten und entschützten Oligonucleotids (**34**). Struktur des DNA-Interkalators SYBR Green I (**35**). Vgl. [141, S. 2308].

7.5.3. FCS-Helligkeitsmessungen SYBR Green I-markierter DNA-Duplexe am künstlichen Lipid-Bilayer

In dieser Versuchsreihe wurden in den Experimenten A bis F sechs verschiedene DNA-Duplexe am künstlichen Lipid-Bilayer untersucht, die durch die Zugabe von SG visualisiert werden konnten (vgl. **Abbildung 38**). Dabei bildeten sich komplexe Strukturen aus den beiden zueinander komplementären DNA-Strängen, die über einen Lipid-Rest an einem der Stränge in der Bilayermembran eingelagert wurden sowie aus dem DNA-Interkalator SG. Alle lipophilen Oligonucleotide haben dieselbe lipophile Gruppe (**1a**). Im Folgenden werden die Ergebnisse der Experimente A bis F bezüglich ihres Einlagerungsverhaltens in den Lipid-Bilayer oder der Bildung

des Ternärkomplexes sowie der Freisetzung oder seines Zerfalls bei zunehmender Anzahl an Perfusionsvorgängen im cis-Kanal dargestellt.

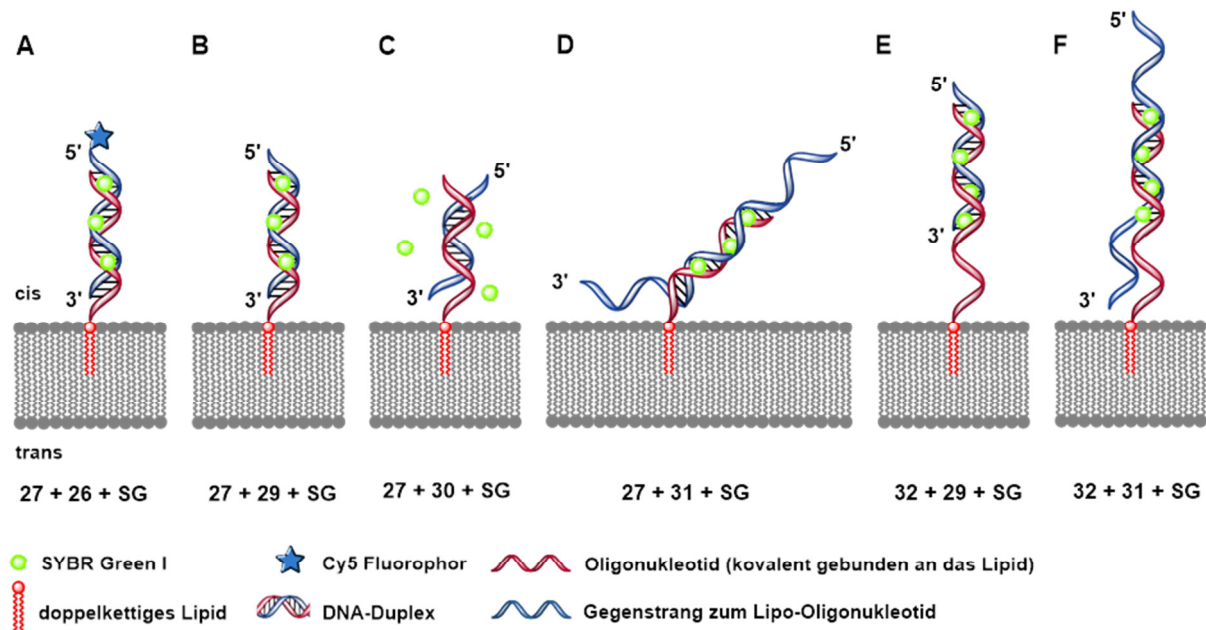


Abbildung 38. Schematische Darstellung der Experimente **A-F** zur spezifischen DNA-Duplex-Bildung am künstlichen Lipid-Bilayer verschiedener Komplexe aus membrangebundenen Nucleinsäuren und Fluoreszenzfarbstoffen. **A.** DNA-Duplex zwischen dem LON **27** [5'-d(**1a**-TAG GTC AAT ACT)-3'] und dem Gegenstrang **26** [5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3']. Anregung des kovalent-gebundenen Cy5-Fluorophors bei 635 nm und des mit dem DNA-Duplex interkalierenden SG bei 470 nm. **B.** 100%-ige Übereinstimmung der Duplex-Bildung mit dem 12 mer-Zieloligomer **29** [5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3'] zum Lipo-Oligonucleotid **27**. **C.** 50%-ige Übereinstimmung (= 6 bp) in der Mitte des DNA-Duplexes mit dem 12 mer-Zieloligomer LON **30**. **D.** 24-mer Zieloligomer **31** [5'-d(TTT TAT AGT ATT GAC CTA TAT TTT)-3'] mit AT-reichen Enden, jedes Ende mit je 6 AT-Basen. **E.** 18-mer Lipo-Oligonucleotid **32** [5'-d(**1a**-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3'] mit einem AT-reichen Ende aus 6 Basen als „Spacer“ am doppelkettigen Lipid (**1a**) zur Bildung eines Duplexes aus 12 bp mit der Zielsequenz **29**. **F.** 12 bps Duplex zwischen dem LON aus E (**32**) mit dem AT-reichen „Spacer“ aus 6 Basen am 5'-Ende und dem Zieloligomer aus D (**31**) mit den freien AT-reichen Überhängen am 5'- und am 3'-Ende mit je 6 Nucleobasen. Unterstrichene Sequenzabfolgen zeigen die Basen, die mit dem komplementären Strang an der Duplex-Bildung beteiligt sind. Vgl. [141, S. 2309].

Experiment A: 27 + 26 + SG. In der Vorversuchsreihe wurde bereits die Einlagerung des LON **27** (5'-d(**1a**-TAG GTC AAT ACT)-3') in den Bilayer und die Duplex-Bildung an dieser Membran mit dem Cy5-markierten komplementären Gegenstrang **26** (5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3') beschrieben^[7]. Wie durch die Negativkontrolle belegt werden konnte, findet keine membrangebundene Duplex-Bildung zwischen dem Lipo-Oligonucleotid **28** (5'-d(**1a**-ATC CAG TTA TGA)-3') und dem nicht-komplementären Strang **26** statt. Im Rahmen dieser Versuchsreihe soll dieses Experiment wiederholt werden, mit dem Unterschied, dass dieser DNA-Duplex zusätzlich mit SG markiert wird und jeder Farbstoff bei einer anderen Wellenlänge angeregt wird.

Aus der Vorversuchsreihe (vgl. Kapitel 7.5.1 „Vorversuchsreihe: Bildung von DNA-Duplexen zwischen Lipo-Oligonucleotiden und ihren Gegensträngen am Lipid-Bilayer“) wurde die Hybridisierung zwischen dem Lipo-Oligonucleotid (**27**) und dem Cy5-markierten Gegenstrang (**26**) belegt. Im Folgenden wurde an eben diesen hybridisierten DNA-Strängen die Interkalation von SG in DNA-Duplexe untersucht. Dabei wurde überprüft, ob SG mit diesem DNA-Duplex wechselwirkt und allgemein als Marker für DNA-Duplexe eingesetzt werden kann. Nachdem jedes dieser Oligomere einzeln über den Bilayer gegeben und 45 min inkubiert wurde, wurde durch die Anregung des Cy5-Fluorophors bei 635 nm eine xz-Ansicht vom Bilayer aufgenommen (vgl. **Abbildung 39C**). Im nächsten Schritt wurde die SG-Lösung ($\approx 1 \mu\text{g/mL}$, in DMSO) in das cis-Kompartiment über die Bilayermembran dazugegeben und ebenfalls 45 min inkubiert. Zum Vergleich wurde dieser in der Membran verankerte DNA-Komplex sowohl bei 635 nm als auch bei 470 nm angeregt (vgl. **Abbildung 39D** und **E**). Dabei zeigt die Anregung des SG-Farbstoffs bei 470 nm eine Bilayerhelligkeit, die etwas schwächer ausfällt als die vergleichbare Aufnahme bei 635 nm. Mit diesem Vorexperiment konnte gezeigt werden, dass der SG-Fluorophor in den Duplex interkalierte und somit als Marker für DNA-Duplexe eingesetzt werden kann. Außerdem konnten dabei auch die Messbedingungen in Bezug auf das Volumen und die Konzentration der einzelnen Proben optimiert werden. An dieser Stelle wurde auch untersucht, ob die nicht optimale Wellenlänge von 470 nm ausreichen würde, um den Farbstoff ausreichend anzuregen. Dabei wurde beobachtet, dass das SG bei 470 nm nicht so ausreichend angeregt wurde, wie es für diese Messreihe erforderlich wäre, so dass in den darauffolgenden Experimenten B bis F der SG-Farbstoff bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wurde, die näher am Absorptionsmaximum bei 494 nm lag^[32-34]. In **Abbildung 39I** wurde der Unterschied in den Helligkeitsintensitäten im Bilayer veranschaulicht. Diese Werte wurden bei wechselnder Anregung der Farbstoffe Cy5 (635 nm) oder SG (470 nm) erhoben.

Zusätzlich zu den Messungen der Helligkeit im Bilayer für den indirekten Nachweis der Einlagerung lipophiler Oligonucleotide in die Lipidmembran und die Duplex-Bildung an eben diesen, wurde auch die Diffusionszeit τ_D der Komplexe aus DNA-Doppelhelices und SG (i) an den Positionen 1 (Bilayer) und 2 (knapp über dem Bilayer) und (ii) in der Pufferlösung ohne Lipid-Bilayer ermittelt (vgl. Kapitel 7.6.2 „Diffusionszeiten lipophilisierter DNA-Duplexe“).

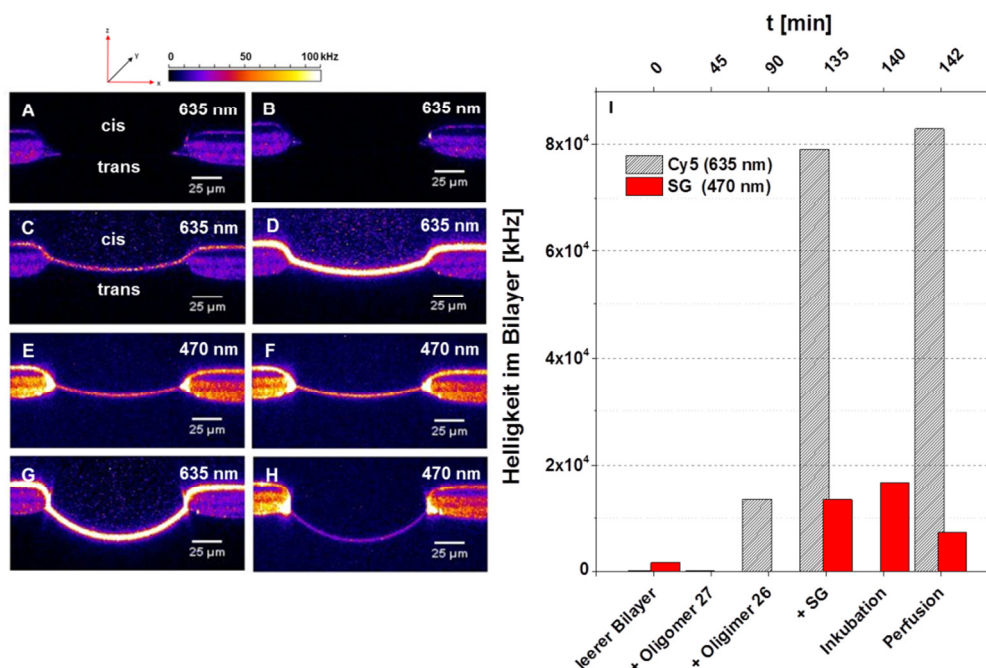


Abbildung 39. xz-Aufnahmen vom Bilayer während der Duplex-Bildung an der Bilayermembran des LON 27 [5'-d(1a-TAG GTC AAT ACT)-3'] mit dem komplementären Cy5-markierten Gegenstrang 26 [5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3'] und einer zusätzlichen Markierung des DNA-Duplexes mit dem Interkalator SG. **A.** Reine Bilayermembran (Anregung des Cy5 bei 635 nm). **B.** Zugabe des LON 27 (cis-Kanal, 8 μ L, 500 nM), Inkubation (45 min), Anregung (635 nm). **C.** Zugabe des komplementären Cy5-markierten Oligomers 26 (cis-Kanal, 8 μ L, 50 nM) direkt über dem Bilayer, 45 min Inkubation, Anregung des Cy5-Farbstoffs (635 nm). **D.** Zugabe von SG (cis-Kanal, 8 μ L), 45 min Inkubation, Anregung des Cy5-Farbstoffs (635 nm) wie auch des SG (470 nm). Letzteres dargestellt in **E.** **F.** Weitere Inkubation von 5 min und erneute Anregung (470 nm). **G.** Perfusion (cis-Kanal, 30 sec, 1.1 mL/min), Anregung bei 635 nm und **H.** bei 470 nm. **I.** Übersicht über die Helligkeiten im Bilayer aus den Aufnahmen von A bis H. Vgl. [141, S. 2310-2311].

In **Experiment B** sowie zum dazugehörigen Kontrollexperiment werden die Ergebnisse zum Ternär-Komplex **27•29•SG** bzw. **28•29•SG** beschrieben. Dazu wurde zum LON 27 (5'-d(1a-TAG GTC AAT ACT)-3') eine komplementäre DNA-Sequenz (**29**) (5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3') ohne kovalent gebundenem Fluorophor für die Duplex-Bildung am Lipid-Bilayer eingesetzt. Anschließend wird diese DNA-Doppelhelix mit SG (SYBR Green I in DMSO) inkubiert. In **Abbildung 40** ist die Hybridisierung des unmarkierten Stranges (**29**) mit dem Lipo-Oligonucleotid (**27**) ab der Zugabe des SG-Fluorophors und einer anschließenden Anregung des interkalierenden SG dargestellt. Im Falle des Negativkontrollexperimentes, in dem zum eingelagerten LON 28 das nicht-komplementäre und unmarkierte Oligonucleotid **29** dazugegeben wurden, konnte keine Duplex-Bildung und damit auch keine Komplex-Bildung beobachtet werden (Daten nicht abgebildet).

Für die Duplex-Bildung am Lipid-Bilayer wurden das LON 27 und das Oligonucleotid **29** einzeln nacheinander über die Bilayermembran gegeben und für 43 min bzw. für 41 min inkubiert und erst im nächsten Schritt mit SG markiert, womit

eine Helligkeit im Bilayer von $1.1 \cdot 10^5$ kHz bzw. 74% erreicht werden konnte. Nach zwei weiteren Inkubationsperioden von insgesamt 40 min konnte eine Helligkeit von ca. $1.4 \cdot 10^4$ kHz erreicht werden. Auffallend ist, dass die Helligkeit im Bilayer nach der SG-Zugabe erst auf $1.1 \cdot 10^5$ kHz steigt, nach 13 min Einwirkzeit auf 30% ($4.6 \cdot 10^4$ kHz) abfällt und nach weiteren 14 min auf $1.4 \cdot 10^5$ kHz steigt. Es scheint, dass sich SG erst schwach an den DNA-Duplex anlagert, was den sofortigen Anstieg der Helligkeit im Bilayer und dem Abklingen der Helligkeit innerhalb der ersten 13 min Inkubation erklären würde. Dass SG erst später fester mit dem DNA-Duplex wechselwirkt, wird dadurch deutlich, dass die Helligkeit im Bilayer erst nach ca. weiteren 14 min Inkubation um mehr als 40% ansteigt; sie erreicht sogar einen höheren Wert als nach der Zugabe von SG.

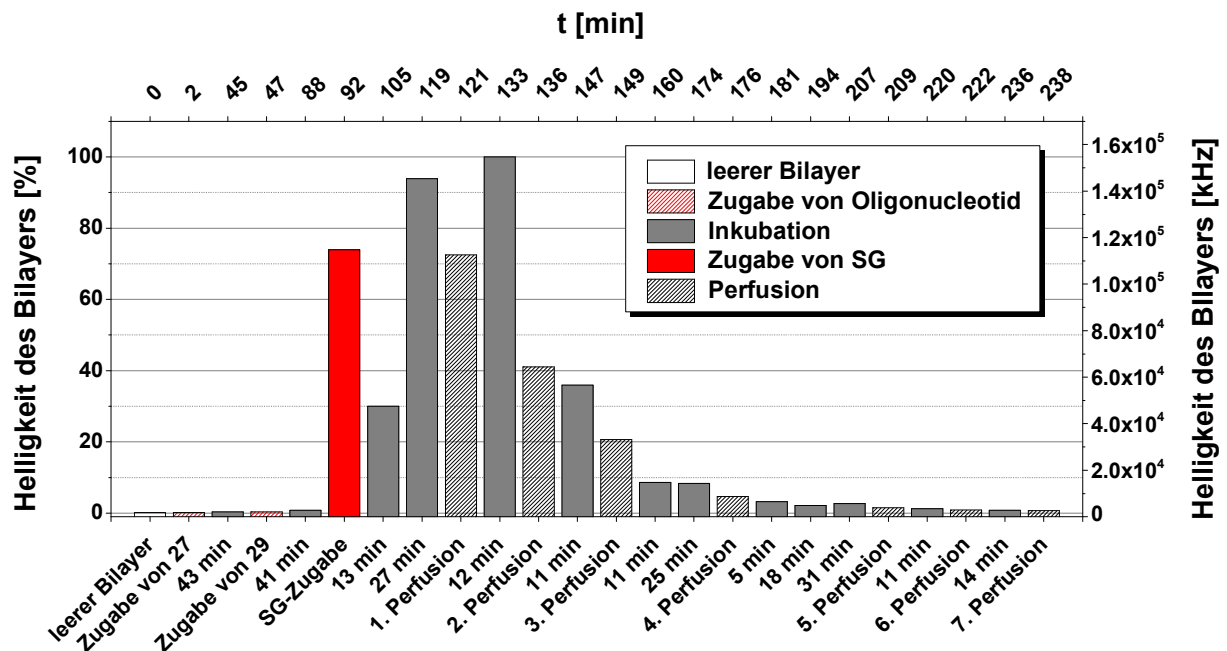


Abbildung 40. Experiment B zum Ternär-Komplex **27•29•SG**. Helligkeitsintensitäten des Bilayers in kHz als Funktion zur Anzahl der Perfusions-/Inkubationsschritte, nachdem die im Bilayer eingelagerten Duplexe aus LON 27 [5'-d(1a-TAG GTC AAT ACT)-3'] und dem komplementären Gegenstrang 29 [5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3'] mit SG markiert wurden. Vgl. [141, S. 2312].

Die maximale Helligkeit von $1.5 \cdot 10^5$ kHz konnte erst nach dem 1. Perfusionsschritt und 12 min Inkubation erreicht werden, obwohl die Helligkeit nach der 1. Perfusion erst auf $1.1 \cdot 10^5$ kHz (72.5%) abfiel. Es lag nahe, dass nach der 1. Perfusion lediglich der SG-Farbstoff aus dem DNA-Duplex herausgelöst wurde, der nach einer kurzen Inkubationsphase (12 min) wieder in den DNA-Duplex einbaute. Während der darauffolgenden 6 Perfusionsvorgängen, zwischen denen mehrere Inkubationsintervalle eingebaut wurden, konnte die Helligkeit im Bilayer nach ca. 2 h Perfusions-/Inkubationsvorgängen nahezu vollständig entfernt werden. Die Abnahme

der Helligkeit kann entweder auf das Herauslösen des SG-Fluorophors aus dem DNA-Duplex, das Herauslösen des DNA-Duplexes oder des gesamten Ternär-Komplexes, bestehend aus der DNA-Doppelhelix und SG, zurückgeführt werden. In weiteren Experimenten wurden diese Annahmen näher untersucht.

In **Experiment C** wurde die Duplex-Bildung und das Einlagern des SG-Farbstoffs zum Ternär-Komplex **27•30•SG** untersucht. Zwischen dem im Bilayer eingelagerten LON **27** (5'-d(**1a**-TAG GTC AAT ACT)-3') und dem Dodecamer (**30**) (5'-d(TCA ATT GAC GAT)-3') war nur die Basenabfolge 5'-ATT GAC-3' innerhalb der Sequenz komplementär zu der 6-mer Abfolge des LON **27**. So bildete sich am Bilayer ein DNA-Duplex, welcher mit 6 bp nur eine 50%-ige Übereinstimmung in der Mitte des DNA-Duplexes mit dem 12 bp-Zieloligonucleotid LON **27** aufwies. Durch die Zugabe von SG war keine Fluoreszenz im Bilayer festzustellen. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass, anders als 12 bp mit 100% Übereinstimmung der komplementären Sequenzen (vgl. **Experiment B**), 6 bp zu kurz für einen Nachweis mit dem Interkalationsfarbstoff SYBR Green I waren.

In **Experiment D** wurde die Duplex-Bildung am Lipid-Bilayer zum Ternär-Komplex **27•31•SG** untersucht. Dazu wurden erst das LON **27** (5'-d(**1a**-TAG GTC AAT ACT)-3') und anschließend das Oligomer **31** (5'-d(TTT TAT AGT ATT GAC CTA TAT TTT)-3') am Bilayer inkubiert, so dass sich zwischen den komplementären Basen eine DNA-Doppelhelix bildete. Das 24-mer Oligomer (**31**) war mit den 12 Basen innerhalb der Sequenz zu 100% komplementär zum lipophilisierten Oligomer **27**. Es enthielt aber an beiden Oligomerenden überhängende AT-reiche Hexamere. Die DNA-Duplexe an der Bilayer/Wasser-Phasengrenze wurden mit SG nachgewiesen. Nachdem das DNA-Duplex zwischen dem in der Bilayermembran eingelagerten LON **27** und der dazu komplementären Sequenz des 24-mer Oligomers (**31**) mit SG versetzt worden war, konnte ein langsamer Anstieg der Helligkeit im Bilayer beobachtet werden. Erst nach 70 min Inkubationszeit erreichte die Helligkeit im Bilayer ihren maximalen Wert ($5.6 \cdot 10^4$ kHz). Der Ternär-Komplex **27•31•SG** wurde ab dem Zeitpunkt der SG-Zugabe langsamer gebildet als mit DNA-Duplexen ohne frei-überhängenden Sequenzen an den Enden (vgl. Experiment B). Darüber hinaus schien der **27•31•SG**-Komplex labil zu sein, denn bereits nach dem 1. Perfusionsvorgang fiel der Helligkeitswert erst auf ca. 27% ($1.5 \cdot 10^4$ kHz) und während der darauffolgenden Inkubationsphase (10 min) weiter auf 14% ($8.0 \cdot 10^3$ kHz) ab. Nach der 2. Perfusion fiel der Wert weiter ab auf ca. 8% ($4.3 \cdot 10^3$ kHz). Um zu

untersuchen, ob nur SG aus dem Duplex durch die Spülvorgänge entfernt wurde oder der Komplex, wurde erneut die gleiche Menge an SG über den Bilayer injiziert. Die wiederholte Zugabe von SG führte zu einer Zunahme der Helligkeit im Bilayer erst auf ca. 9.3% ($5.2 \cdot 10^3$ kHz) und nach 30 min auf 72% ($4.0 \cdot 10^4$ kHz), während der nächsten 20 min Inkubationszeit blieb dieser Wert nahezu unverändert. Erst durch den nächsten Perfusionsvorgang fiel die Fluoreszenzintensität im Bilayer auf ca. 18% ($1.0 \cdot 10^4$ kHz) und nach 10 min Inkubation weiter auf 15.5% ($8.7 \cdot 10^3$ kHz) ab. Damit konnte gezeigt werden, dass ein Teil des ternären Komplexes durch eine erneute SG-Zugabe wiederhergestellt werden konnte. Es sieht so aus, dass in diesem Fall, vor allem das SG, durch die Perfusions- und Inkubationsschritte aus dem Duplex herausgelöst werden konnte, da der Komplex, wenn auch erst nach 30 min Einwirkzeit, bis zu 72% wiederhergestellt werden konnte. Das Herauslösen des DNA-Duplexes und/oder die Dissoziation der komplementären Stränge führten etwa zu 30% des Helligkeitsverlustes im Bilayer.

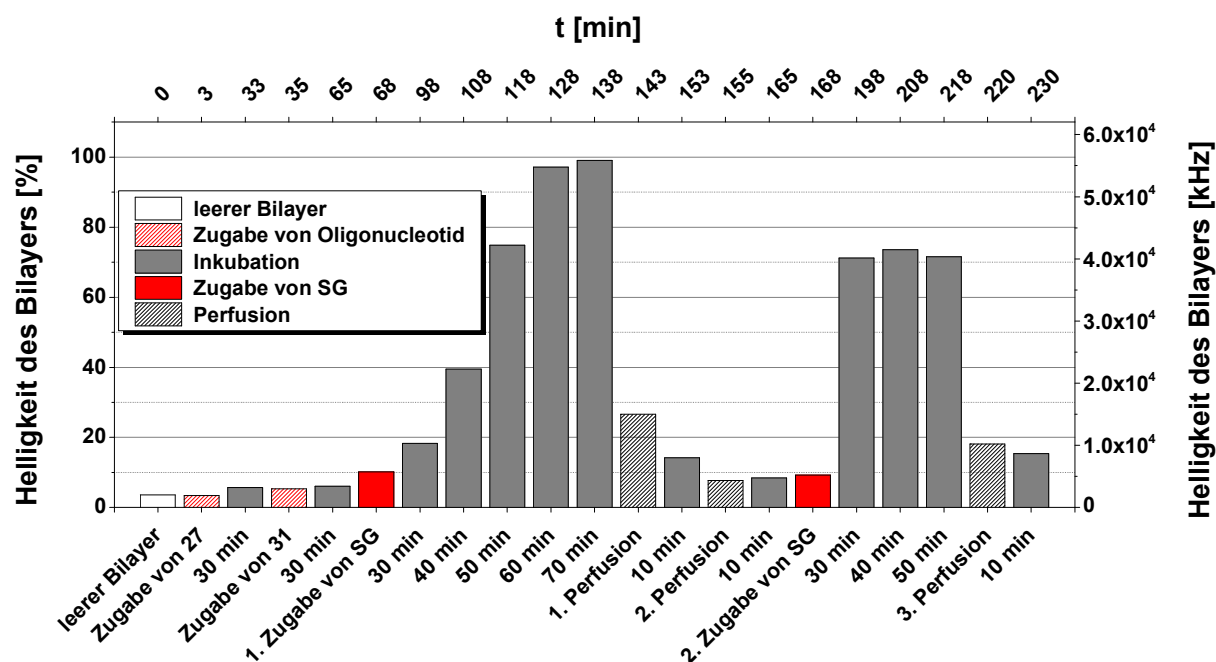


Abbildung 41. Experiment D zum Ternär-Komplex **27•31•SG**. Helligkeitsintensitäten des Bilayers in kHz als Funktion zur Anzahl der Perfusions-/Inkubationsschritte, nachdem die im Bilayer eingelagerten Duplexe aus LON **27** [5'-d(1a-TAG GTC AAT ACT)-3'] und dem 24-mer Oligonucleotid **31** [5'-d(TTT TAT AGT ATT GAC CTA TAT TTT)-3'] mit AT-reichen Enden, jedes mit 6 AT-Basen durch zweimalige Zugabe (zum Zeitpunkt $t=68$ min und $t=168$ min) von SG markiert wurden. Vgl. [141, S. 2313].

Diese Ergebnisse ermöglichen noch eine weitere Interpretationsfreiheit. Das Zieloligomer **31** besaß einen freien Überhang aus 6 AT-Nucleotiden am 3'-Ende zur Erkennungssequenz des LON **27**. Demzufolge führte eine Duplex-Bildung zwischen dem lipophilisierten 12-mer Oligonucleotid (**27**) und dem 24-mer Oligonucleotid (**31**)

über die 12 bp zu einer sterischen Hinderung zwischen dem freien AT-reichen Überhang und der Oberfläche der Lipidmembran. Da die Oberfläche des Lipid-Bilayers durch die Lipide POPC und POPE positiv geladen war und die Internucleotid-Reste der überhängenden Oligonucleotide negativ geladen waren, bildeten sich starke Coulomb-Anziehungskräfte, welche nur durch die Solvatisierung der Lipid-Kopfgruppen und der Phosphodiester-Gruppen der Nucleinsäure, als auch durch die umgebenden Kationen aus der Puffer-Lösung abgeschirmt werden konnten. Diese supra-molekulare Anordnung der drei Reaktionspartner könnte so vorliegen wie in **Abbildung 42**.

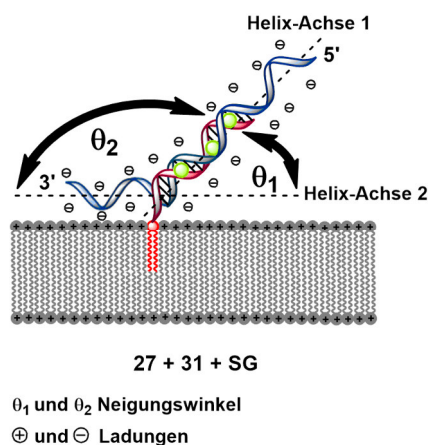


Abbildung 42. Hypothetische Geometrie des **27•31•SG**-Komplexes an der Oberfläche des Bilayers mit den Neigungswinkeln θ_1 und θ_2 . Vgl. [141, S. 2313].

Aus dieser hypothetischen geometrischen Anordnung des Ternär-Komplexes (vgl. **Abbildung 42**) können zwei Neigungswinkel (θ_1 und θ_2) abgeleitet werden, die sich zwischen der Oberfläche des Bilayers und dem doppelt helikalen Teil (θ_1) sowie zwischen der ssDNA und der Oberfläche der Membran (θ_2) befinden. Eine ausgestreckte und parallele Anordnung der gesamten Länge der DNA an der Oberfläche des Bilayers kann höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden. In dem Fall würde eine konformationelle Einschränkung zwischen der lipophilen Kopfgruppe und dem anhängenden Oligonucleotid entstehen. Andernfalls würde ein Cy5-markiertes Oligonucleotid wie das Oligonucleotid **26** fest an die Oberfläche des Bilayers gebunden werden und zu einer intensiven und gegenüber Perfusionen stabilen Fluoreszenz des Bilayers führen, was nicht beobachtet werden konnte. Dennoch ist evident, dass während der Komplex-Bildung sowohl zwischen dem Proben-Oligomer **27** und dem Ziel-Oligomer **31** und/oder der Einlagerung des SG-Farbstoffs durch die überhängende Sequenz starke Abstoßungskräfte vorlagen und der Grund für die instabile Anordnung des **27•31•SG**-Komplexes am Lipid-Bilayer waren.

In **Experiment E** wurde die DNA-Duplex-Bildung zum Ternär-Komplex **32•29•SG** beschrieben, zusätzlich wird der Einfluss einer veränderten Reihenfolge der Proben-Zugabe (**SG** + **32** + **29**) zur Bildung desselben Komplexes untersucht. Das 18-mer Lipo-Oligonucleotid **32** (5'-d(**1a**-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3') mit einem AT-reichen Ende aus 6 Basen als „Spacer“ am doppelkettigen Lipid (**1a**) wurde über diesen lipophilen Rest im Bilayer verankert. Anschließend bildete diese DNA-Sequenz mit einer aus 12 Basen bestehenden Zielsequenz **29** (5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3') eine 12 bp DNA-Doppelhelix aus. Die Erkennungssequenz aus 12 Nucleobasen wurde durch einen Oligonucleotid-Spacer aus 6 AT-Nucleobasen von dem lipophilen Anker-molekül (**1a**) getrennt. In **Abbildung 43A-H** wurden einige xz-Ausschnitte des Bilayers aus dem Experiment E in chronologischer Reihenfolge dargestellt, an denen die Helligkeit des Bilayers vor und nach der SG-Zugabe zu erkennen ist. Den **Abbildung 43B** und **I** ist zu entnehmen, dass sich das SG spontan und sofort nach der ersten Zugabe an den **32•29**-Duplex anlagerte und zu einer hohen Fluoreszenz im Bilayer führte. Direkt nach der ersten SG-Zugabe stieg die Helligkeit im Bilayer auf $6.6 \cdot 10^5$ kHz an und erreichte damit den maximalen Wert. Diese blieb nicht im Bilayer bestehen. Nach nur 6 min fiel die Helligkeit auf 20% ab und nach weiteren 24 min weiter auf 17%, ohne dass ein Perfusionsvorgang durchgeführt wurde. Es scheint, als ob sich SG nach der Zugabe erst *an* den DNA-Duplex anlagert, womit der hohe Helligkeitswert im Bilayer erreicht wurde und sich dann (bereits nach wenigen Minuten) *in* die DNA-Doppelhelix einlagert. Das Ausmaß an gebildetem Ternär-Komplex **32•29•SG** war erst zu erkennen, wenn sich der angelagerte SG-Farbstoff entfernte. Da das LON **32** einen AT-reichen Spacer zwischen der lipophilen Kopfgruppe (**1a**) und der Erkennungssequenz enthielt, könnte dieses Zwischenstück den hohen und spontanen Helligkeitsanstieg mitbeeinflusst haben. Dieses LON war länger als die 12-mer Modellsequenz, welche als ssDNA keine Fluoreszenz mit SG aufwies, und enthielt eine AT-reiche Sequenz, an die sich SG bevorzugt binden oder anlagern konnte. Folglich könnte sowohl die Länge des Oligomers **32** als auch die AT-Basen zur verstärkten An- und Einlagerung von SG an die ssDNA-Helix und an den **32•29**-Doppelhelix beigetragen haben.

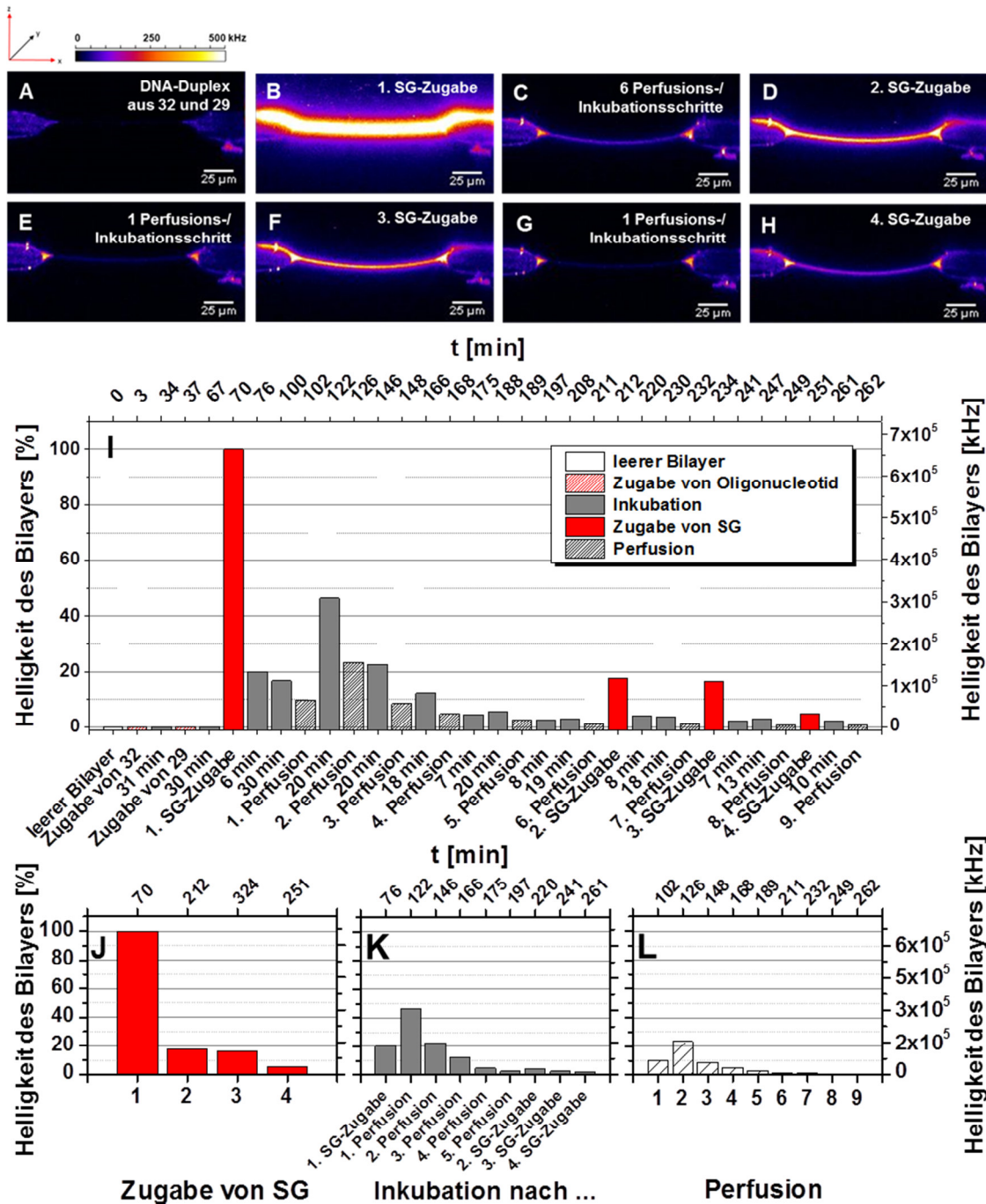


Abbildung 43. Experiment E zum Ternär-Komplex **32·29·SG**. **A-H.** xz-Ansichten des Bilayers aus dem Experiment E. **A.** Zugabe und Inkubation von je 8 µL (500 nM) des LON **32** [5'-d(1a-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3'] und des Zieloligomers **29** [5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3']; keine Fluoreszenz des Bilayers. **B.** Ab der 1. Zugabe von SG nimmt die Helligkeit im Bilayer zu. **C.** Nach 6 Perfusions-/Inkubationsschritten; Helligkeit im Bilayer nimmt nahezu vollständig ab. **D.** 2. Zugabe von SG; Helligkeit im Bilayer steigt. **E.** In einem Perfusions-/Inkubationsschritt wird die Helligkeit im Bilayer vollständig entfernt (1.1 mL/min). **F.** 3. Zugabe von SG; Helligkeit im Bilayer steigt. **G.** Im weiteren Perfusions-/Inkubationsschritt wird die Helligkeit im Bilayer erneut vollständig entfernt. **H.** Mit der 4. SG-Zugabe steigt aber die Helligkeit im Bilayer nur geringfügig an. **I.** Helligkeitsintensitäten des Bilayers in kHz als Funktion zur Anzahl der Perfusions-/Inkubationsschritte, nachdem die im Bilayer eingelagerten Duplexe aus dem 18-mer Lipo-Oligonucleotid **32** mit einem AT-reichen „Spacer“ aus 6 Basen an doppelkettiger Lipid-gruppe (**1a**) zur Bildung eines Duplexes aus 12 bp mit der Zielsequenz **29**. Helligkeitsintensitäten des Bilayers in kHz als Funktion zur Anzahl der **J.** Zugaben von SG, **K.** Inkubationen und **L.** Perfusionen. Vgl. [141, S. 2314-2315].

Nach 6 Perfusions-/Inkubationsschritten (vgl. **Abbildung 43C**) fiel die Helligkeit des Bilayers nahezu vollständig ab ($8 \cdot 10^3$ kHz; 1.3%), jedoch stieg diese mit der 2. Zugabe von SG auf $1.2 \cdot 10^5$ kHz (17.6%) an und fiel innerhalb von 36 min auf ca. 4% ab. Nach dem nächsten Perfusionsvorgang (Perfusion 7) fiel die Helligkeit im Bilayer weiter auf 1.2% ab, stieg aber wieder mit der 3. Zugabe von SG auf erneut ca. 17% an und erreichte damit denselben Wert wie nach der 2. SG-Zugabe. Dieser Wert fiel während der nächsten Inkubationsphase auf ca. 2% ab und nach der 8. Perfusion auf Null. Nach der 4. SG-Zugabe konnte der Wert von ca. 17% (wie nach der 2. und der 3. SG-Zugabe) nicht mehr erreicht werden. Der neue Helligkeitswert im Bilayer lag bei $3.3 \cdot 10^4$ kHz und entsprach nur 5% von dem maximalen Wert ($6.6 \cdot 10^5$ kHz). Die Helligkeit im Bilayer konnte nicht mehr signifikant ansteigen oder der Helligkeitswert, verglichen mit dem nach der 2. oder der 3. SG-Zugabe, konnte nicht reproduziert werden. Der Anstieg der Bilayerhelligkeit nach der 2. und 3. SG-Zugabe zeigte, dass entweder noch intakte DNA-Duplexe und/oder lipophilisierte 18-mer Oligonucleotide (LON **32**) ohne die komplementäre Sequenz (Oligomer **29**) im Bilayer vorhanden waren, welche die Ein- und Anlagerung von SG beeinflussen konnten.

Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß SG mit dem einzelsträngigen LON **32** wechselwirkte, wurde die Reihenfolge der Probenzugabe der drei Komponenten für den Ternär-Komplex **32•29•SG** aus dem Experiment E so verändert, dass erst das SG, dann das LON **32** und anschließend der zur Erkennungssequenz komplementäre 12-mer Oligomer **29** in die Pufferlösung über den Lipid-Bilayer hinzugegeben wurde. Nach der Zugabe von SG war weder im Bilayer, noch in der Pufferlösung Fluoreszenz zu beobachten. Damit war sicher, dass das SG allein nicht im Beisein des Lipid-Bilayers fluoresziert. Nach einer kurzen Inkubationsphase wurde das lipophilisierte Oligonucleotid (**32**) dazugegeben. Bereits zum Zeitpunkt der Zugabe stieg die Helligkeit im Bilayer auf ca. $4.0 \cdot 10^4$ kHz (vgl. **Abbildung 44**) an. Diese konnte nur im Bilayer festgestellt werden, aber nicht in der freien Puffer-Lösung über dem Bilayer. Innerhalb der ersten 4 min fiel diese um 30% ab, blieb aber bis zur 1. Perfusion bei ca. $2.0 \cdot 10^4$ kHz konstant. Damit war bewiesen, dass das SG mit dem lipophilisierten 18-mer DNA-Strang 5'-d(**1a**-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3' (**32**) wechselwirkte^[33] und dass dieser DNA-Strang die Fluoreszenzintensität im Bilayer beeinflusste, obwohl diese bereits nach wenigen Minuten ohne äußere Einwirkungen (z.B. Perfusion) abnahm. Diese Wechselwirkung konnte nicht zwischen dem SG und

dem 12-mer Lipo-Oligonucleotid **27** (5'-d(1a-TAG GTC AAT ACT)-3') beobachtet werden (siehe Experiment B).

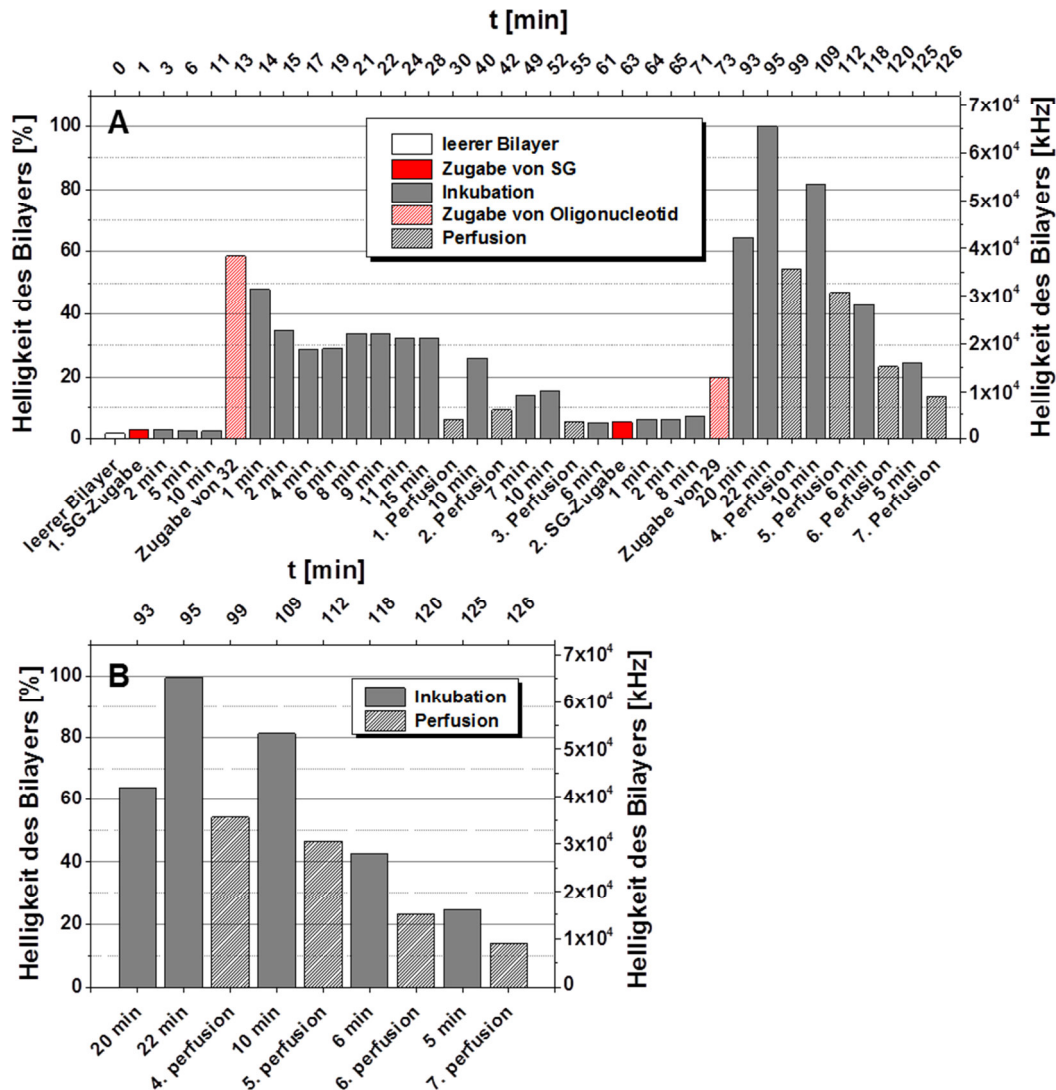


Abbildung 44. Experiment E zum Ternär-Komplex **32•29•SG**. Helligkeitsintensitäten des Bilayers in kHz als Funktion zur Anzahl der Perfusions-/Inkubationsschritte bei veränderter Reihenfolge der Probenzugabe (SG + 32 + 29). **A.** Zugabe und Inkubation von je 8 μ L (500 nM) des LON **32** [5'-d(1a-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3'] und des Zieloligomers **29** [5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3']. **B.** Ausschnitt aus A. Unterstrichene Sequenzabfolgen deuten die Basen an, die an der Duplex-Bildung beteiligt waren. Vgl. [141, S. 2317].

Nach dem 1. Perfusionsvorgang des cis-Kanals fiel die Helligkeit im Bilayer auf ca. $4.0 \cdot 10^3$ kHz ab, stieg aber innerhalb von 10 min auf ca. $1.70 \cdot 10^4$ kHz an. Dieses Phänomen konnte auch nach der 2. Perfusion beobachtet werden, wenngleich die Helligkeit im Bilayer nach 8 min nur auf $4.0 \cdot 10^3$ kHz anstieg. Wie bereits in den Experimenten B und E beobachtet wurde, stieg nach dem Perfusionsvorgang die Helligkeit im Bilayer während der Inkubationsphase wieder etwas an. Dies könnte damit zusammenhängen, dass durch die Perfusion das SG aus dem Duplex herausgelöst wurde, aber während der Inkubationsphase wieder mit der DNA-Helix in

Wechselwirkung trat. Dieser Vorgang konnte solange wiederholt werden, solange die Konzentration von SG dafür ausreichte. Nach dem 3. Perfusionsvorgang fiel die Helligkeit noch stärker ab ($3.6 \cdot 10^3$ kHz), änderte sich aber während der Inkubation nicht. Es scheint, dass entweder das LON **32** aus der Lipidmembran entfernt wurde oder dass das SG vollständig aus der Puffer-Lösung herausgespült wurde. Nach der 2. SG-Zugabe blieb die Helligkeit im Bilayer über 8 min unverändert. So könnte es sein, dass das lipophilisierte Oligonucleotid vollständig aus dem Bilayer entfernt wurde. Die Zugabe der komplementären Sequenz (**29**) bewies aber, dass das LON **32** noch in ausreichender Menge im Bilayer vorhanden sein musste, da die Helligkeit im Bilayer bereits während der Zugabe des Oligomers **29** erst um 13% auf $1.3 \cdot 10^4$ kHz, nach 20 min um 44% auf $4.2 \cdot 10^4$ kHz und nach weiteren 2 min um weitere 40% anstieg, wobei ein Wert von $6.5 \cdot 10^4$ kHz erreicht wurde. Nach insgesamt 4 Perfusions-/Inkubationsschritten wurde die Bilayerhelligkeit auf ca. 14% ($9 \cdot 10^3$ kHz) reduziert. Auch in **Abbildung 44B** ist zu erkennen, dass die Helligkeit im Bilayer während der Inkubationsphase wieder regenerierte. Mit zunehmender Perfusionsanzahl fiel dieser Regenerationsprozess schwächer aus. Offensichtlich wurde hier die Helligkeit in Bilayer durch die SG-Konzentration im cis-Kanal beeinflusst, die mit jedem Perfusionsvorgang reduziert wurde.

In **Experiment F** wurde die Duplex-Bildung zum **32•31•SG**-Komplex zwischen dem lipophilen 18-mer Oligonucleotid **32** (5'-d(**1a**-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3') mit dem AT-reichen „Spacer“ aus 6 Basen am 5'-Ende und dem 24-mer Zieloligomer **31** (5'-d(TTT TAT AGT ATT GAC CTA TAT TTT)-3') mit den freien AT-reichen Überhängen am 5'- und am 3'-Ende mit je 6 Nucleobasen untersucht. Die Besonderheit dieses Duplexes bestand darin, dass zwischen diesen Oligomeren nur eine Erkennungssequenz aus 12 bp zur Duplex-Bildung beitrug. Nachdem sich beide DNA-Stränge, die einzeln (je 8 μ L, 500 nM) über den Bilayer injiziert und inkubiert wurden, zu einer Helix hybridisierten, wurden 8 μ L SG dazugegeben und die Probe inkubiert. Dieses Experiment wurde insgesamt 3 Mal durchgeführt, die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Da nicht jede Messung von gleichem Umfang war, konnten nicht alle dargestellten Werte gemittelt werden. **Abbildung 45** veranschaulicht die Helligkeitsintensitäten des Bilayers in kHz als Funktion zur Anzahl der Perfusions- und Inkubationsschritte. Nachdem SG als dritte Komponente zu den bereits im Bilayer eingelagerten DNA-Duplexen aus dem LON **32** (5'-d(**1a**-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3') und dem Zieloligomer **31** (5'-d(TTT TAT AGT ATT GAC CTA TAT TTT)-3') hinzugegeben wurde, baute sich die maximale Hellig-

keit ($2.2 \cdot 10^5$ kHz) im Bilayer langsam auf (90 min). Es folgten sich wiederholende Perfusions- und Inkubationsphasen. An den hohen Standardabweichungen um den maximalen Wert wurde deutlich, dass es sich hier um ein sehr dynamisches System handelte. Denn erst, wenn alle 3 Komponenten an der Bilayermembran aufeinander trafen, bildete sich der Ternär-Komplex aus lipophilisierter DNA, dem komplementären Gegenstrang und dem SG-Farbstoff. Insgesamt wurden 18 Perfusions- (je 1.1 mL/min) und Inkubationsschritte (je 10 min) vorgenommen.

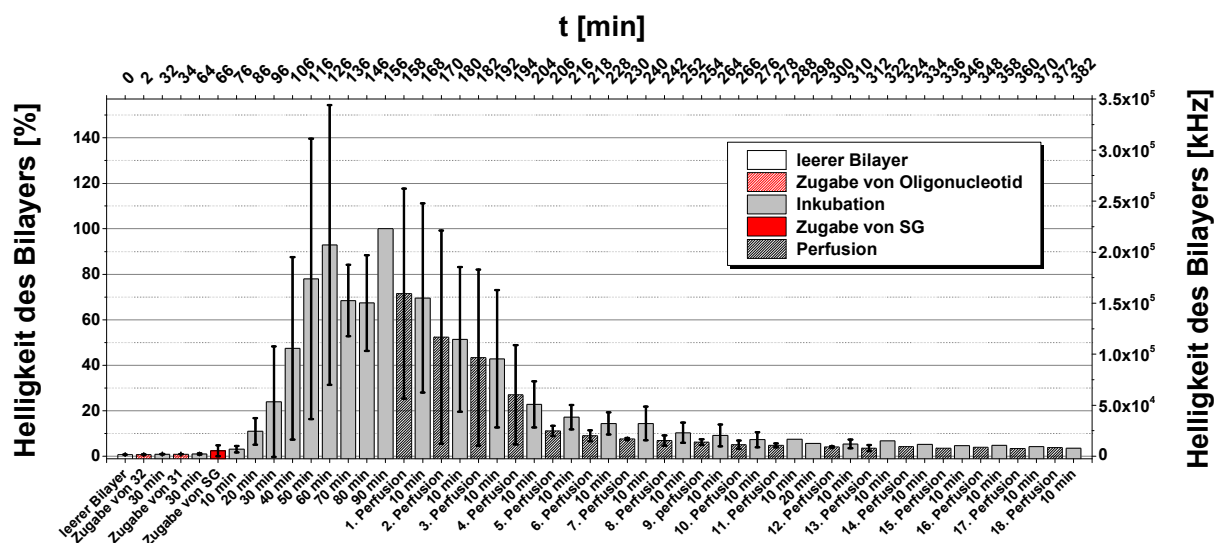


Abbildung 45. Experiment F zum Ternär-Komplex **32•31•SG**. Helligkeitsintensitäten des Bilayers in kHz als Funktion zur Anzahl der Perfusions-/Inkubationsschritte, nachdem die im Bilayer eingelagerten Duplexe aus dem LON **32** [5'-d(1a-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3'] und dem Zieloligomer **31** [5'-d(TTT TAT AGT ATT GAC CTA TAT TTT)-3'] mit SG markiert wurden, folgen wiederholende Perfusions- und Inkubationsphasen. 12 bps Duplex zwischen dem LON **32** mit dem AT-reichen „Spacer“ aus 6 Basen am 5'-Ende und dem Zieloligomer (**31**) mit den freien AT-reichen Überhängen am 5'- und am 3'-Ende mit je 6 Nucleobasen. Dieses Experiment wurde insgesamt 3 Mal durchgeführt. In dieser Abbildung sind die Ergebnisse dieser drei Messungen als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Da nicht alle Messungen von gleichem Umfang waren, konnten nicht alle dargestellten Werte gemittelt werden (keine Standardabweichung). Unterstrichene Sequenzabfolgen deuten die Basen an, die an der Duplex-Bildung beteiligt waren. Vgl. [141, S. 2318].

Nach den ersten fünf Perfusionen fiel die Helligkeit im Bilayer auf 11% ($2.5 \cdot 10^4$ kHz) ab, in den darauffolgenden Perfusions-/Inkubationsschritten wurde die Helligkeit nur in kleineren Schritten reduziert. So konnte ab der 11. Perfusion ein gleichbleibender Wert von $1.1 \cdot 10^4$ kHz (4%) beobachtet werden. Anzumerken ist, dass ab der 5. Perfusion nach jedem weiteren Perfusionsschritt während der Inkubationsphasen ein Helligkeitsanstieg von ca. 5% zu verzeichnen war. Um die Kinetiken zur Bildung der Ternär-Komplexe aus lipophilierter DNA, DNA und SG aus den Experimenten B bis F zu vergleichen, wurde die einzelnen Inkubationsphasen nach der Zugabe bis zur ersten Perfusion gegeneinander aufgetragen (vgl. **Abbildung 46**).

Zum Zeitpunkt Null wurde zur DNA-Doppelhelix im Bilayer (Werte vor $t = 0$ min) der Interkalationsfarbstoff SG dazugegeben.

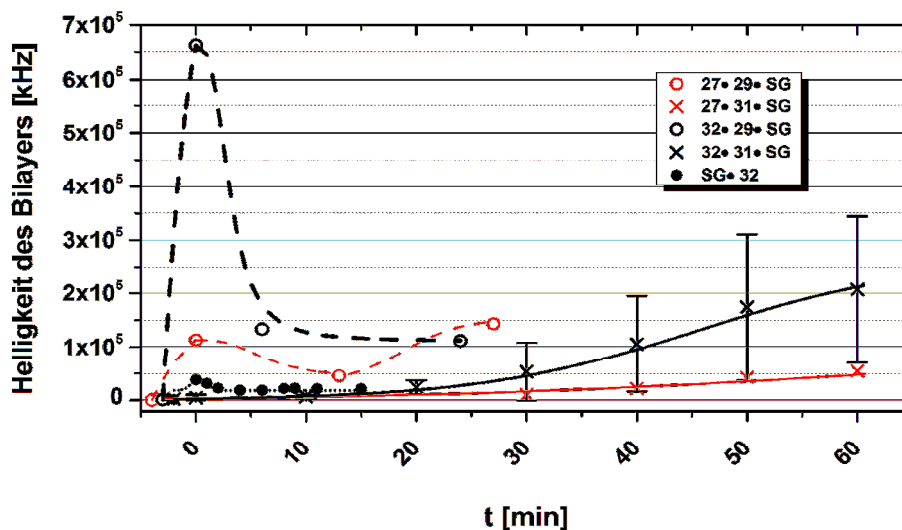


Abbildung 46. Übersicht über die Kinetiken zur Bildung der Ternär-Komplexe bestehend aus lipophiler DNA, DNA und SG aus den Experimenten B-F während der Inkubationszeit t [min] in Minuten ab dem Zeitpunkt der SG-Zugabe ($t=0$ min) bis zum 1. Perfusionsvorgang. Mit SG markierte Lipid-DNA/DNA-Duplexe ($--\circ--$) zum Experiment B: **27•29** zwischen dem LON 27 [5'-d(1a-TAG GTC AAT ACT)-3'] und dem komplementären Gegenstrang 29 [5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3'], ($--\times--$) zum Experiment D: **27•31** zwischen dem LON 27 [5'-d(1a-TAG GTC AAT ACT)-3'] und dem 24-mer Oligonucleotid 31 [5'-d(TTT TAT AGT ATT GAC CTA TAT TTT)-3'], ($--\circ--$) zum Experiment E: **32•29** zwischen dem LON 32 [5'-d(1a-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3'] und dem Zieloligomer 29 [5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3'], ($--\times--$) zum Experiment F: **32•31** zwischen dem LON 32 [5'-d(1a-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3'] und dem Zieloligomer 31 [5'-d(TTT TAT AGT ATT GAC CTA TAT TTT)-3'], ($\cdots\bullet\cdots$) Einzelstrang-Nachweis aus dem Experiment E (veränderte Reihenfolge): LON 32 [5'-d(1a-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3']. Unterstrichene Sequenzabfolgen deuten die Basen an, welche an der Duplex-Bildung beteiligt waren. Vgl. [141, S. 2318].

Die Kinetiken zur Bildung der Ternär-Komplexe geben Informationen darüber, welche Komplexe sich wie schnell bildeten und ob diese bereits in der Phase der Komplex-Bildung dissoziierten. So formte sich der Ternär-Komplex **32•29•SG** aus dem **Experiment E** am schnellsten. Diese Komplex-Bildung fand in einem Abstand von einem Hexamer-Spacer zwischen der Oberfläche des Lipid-Bilayers und der DNA-Doppelhelix statt. In diesem Fall lag der Helligkeitswert im Bilayer bei $6.6 \cdot 10^5$ kHz, fiel innerhalb von 10 min auf ca. $1.0 \cdot 10^5$ kHz ab und blieb für weitere 15 min unverändert.

Fehlte dieser Hexamer-Spacer wie in **Experiment B** (**27•29•SG**-Komplex), lief die Komplex-Bildung bedeutend langsamer ab. Direkt nach der Zugabe von SG stieg die Helligkeit im Bilayer nur langsam an ($1.1 \cdot 10^5$ kHz), nach weiteren zwei Inkubationsperioden von insgesamt 40 min konnte eine Helligkeit von ca. $1.4 \cdot 10^4$ kHz erreicht werden. Nach der SG-Zugabe stieg der Helligkeitswert erst auf $1.1 \cdot 10^5$ kHz an, fiel nach 13 min Einwirkzeit auf $4.6 \cdot 10^4$ kHz ab und stieg nach weiteren 14 min auf

$1.4 \cdot 10^5$ kHz an. Es scheint, dass SG erst schwach an die DNA-Helix anlagerte, was zu Folge hatte, dass die Helligkeit im Bilayer erst anstieg und innerhalb der ersten 13 min Inkubation wieder abfiel. Dass sich SG erst später fester mit der DNA-Helix wechselwirkte, wurde dadurch deutlich, dass die Helligkeit im Bilayer erst nach weiteren 14 min Inkubation um mehr als 40% anstieg und damit sogar einen höheren Wert als den nach der Zugabe von SG erreichte.

Verglichen mit den Komplexen aus den Experimenten B und E baute sich der **32•31•SG**-Komplex in **Experiment F** noch langsamer auf. Erst nach 20 min wurde die Komplex-Bildung sichtbar. Diese stieg nach 10 min nur langsam auf $5.4 \cdot 10^4$ kHz an und ab dem Zeitpunkt $t=30$ min stieg die Helligkeit im Bilayer mit 5000 kHz pro Minute linear an und erreichte nach 30 min zum Zeitpunkt $t=60$ min eine Helligkeit von $2.1 \cdot 10^5$ kHz. Dieser Wert war um Faktor 1.5 höher als der Wert in Experiment E mit $1.4 \cdot 10^5$ kHz. Noch langsamer baute sich nur der **27•31•SG**-Komplex aus dem Experiment E auf. Eine sterische Abstoßung zwischen den überhängenden DNA-Sequenzen und der Bilayeroberfläche trugen dazu bei, dass der Komplex nicht stabil war und leicht dissoziierte (vgl. **Abbildung 42**). Die Geometrie des **27•31•SG**-Komplexes hatte auch zur Folge, dass der Komplex nach der 1. Perfusion dissoziierte. Auch zeigte sich, dass der **32•31•SG**-Komplex stabiler gegenüber den Perfusionsvorgängen war als der **27•31•SG**-Komplex, denn nach der 1. Perfusion fiel die Helligkeit um 77% auf $1.5 \cdot 10^4$ kHz ab, während die Helligkeit des **32•31•SG**-Komplexes nur um 29% auf $1.6 \cdot 10^5$ kHz während des 1. Perfusionsvorgangs reduziert wurde.

Des Weiteren wurden diverse Kontrollexperimente durchgeführt. So war im Falle der nicht zueinander komplementären Stränge LON **28** (5'-d(**1a**-ATC CAG TTA TGA)-3') und Oligomer **29** (5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3') und SG keine Fluoreszenz zu verzeichnen. Im Falle der beiden nicht-komplementären Oligomere **28** (5'-d(**1a**-ATC CAG TTA TGA)-3') und **26** (5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3') mit SG fluoreszierten bei der Anregung des Cy5-Farbstoffs nur die in der Puffer-Lösung diffundierenden LONs **26**. Bei einer Anregung des SG-Farbstoffs wurde keine Fluoreszenz beobachtet. Das SG allein führte nicht zu einem fluoreszierenden Bilayer, erst sobald das einzelsträngige 18-mer LON **32** (5'-d(**1a**-TTT TAT TAG GTC AAT ACT)-3') (vgl. **Abbildung 44A**) dazugegeben wurde, fluoreszierte die Bilayermembran. Das SG haftete am einzelsträngigen 18-mer Lipo-Oligonucleotid **32**. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass das SG nicht nur mit DNA-Helices in Wechselwirkung trat. Jedoch war diese Wechselwirkung schwach und erreichte nicht die Fluores-

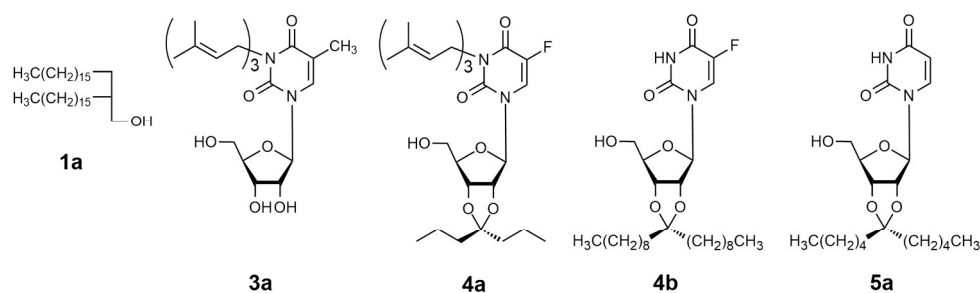
zenzwerte, die über eine SG-Interkalation in eine DNA-Doppelhelix erreicht wurden. Mit $6.5 \cdot 10^4$ kHz war die Fluoreszenz von Ternär-Komplexen aus dsDNA/SG um mehr als das Dreifache höher (vgl. **Abbildung 44A**) als die Fluoreszenz ($2.0 \cdot 10^4$ kHz) anhaftender SG-Moleküle an das 18-mer Oligonucleotid.

Mit SG lassen sich DNA-Duplexe am Lipid-Bilayer nachweisen. Dieser Nachweis gilt aber nicht für Duplexe aus sechs, sondern aus mindestens 12 Basenpaaren. Ob diese Nachweisgrenze bei genau sechs oder doch mehr Basenpaaren liegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Die Detektion von SG in DNA-Doppelhelices war bei 488 nm wesentlich effizienter als bei 470 nm. SG weist aber nicht nur DNA-Doppelhelices, sondern auch einzelsträngige 18-mer und 24-mer DNA-Helices nach, wobei bei diesen untersuchten Oligonucleotiden eine AT-Präferenz nicht ausgeschlossen werden kann. Weitere Negativkontrollen ergaben keine SG-Detektion in einzelsträngigen 12-mer Lipo-Oligonucleotiden.

7.6. Diffusionszeiten von Lipo-Oligonucleotiden und DNA-Duplexen im und um den Bilayer

Neben den Messungen der Bilayerhelligkeiten für den indirekten Nachweis der Einlagerung lipophiler Oligonucleotide in die Lipidmembran sowie für die Duplex-Bildung an eben dieser wurden auch Diffusionszeiten τ_D einzelsträngiger fluorophormarkierter Oligonucleotide, der DNA-Duplexe sowie der Ternär-Komplexe aus DNA-Duplexen und SYBR Green I im Bilayer (Position 1) sowie knapp über der Bilayermembran (Position 2) (vgl. **Abbildung 13**) und in der Pufferlösung ohne Bilayer gemessen. Das Ziel dieser Messreihe war, die Verankerung lipophilisierter Oligonucleotide sowie ihrer Duplexe (vgl. **Formelschema 9**) im Bilayer nicht nur über die Helligkeitsmessungen, sondern auch über die Diffusionszeiten zu belegen.

Mit Hilfe der Diffusionszeiten wurde überprüft, ob sich das lipophilisierte Oligonucleotid in den Bilayer einlagerte und im Vergleich zum freien Oligomer um ein Vielfaches langsamere Diffusionszeit aufwies. Demzufolge müssen die Diffusionszeiten der im Bilayer verankerten Lipo-Oligonucleotide, verglichen mit den Diffusionszeiten der in der Lösung frei diffundierenden Lipo-Oligonucleotide oder ihrer Duplexe wesentlich langsamer sein. Für die Bestimmung der freien Diffusionszeit der LONs (50 nM) in der Pufferlösung wurden die Proben so verdünnt, dass ein bis zwei fluoreszierende Teilchen im konfokalen Volumen ($\sim 10^{-15}$ L) vorhanden waren. Die Diffusionszeiten wurden nach jedem Perfusionsvorgang aufgenommen.



5'-d(4a -Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'	16	5'-d(3a -TAG GTC AAT ACT)-3'	24
5'-d(4b -Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'	17	5'-d(Cy5 -AGT ATT GAC CTA)-3'	26
5'-d(5a -Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3'	22	5'-d(1a -TAG GTC AAT ACT)-3'	27
		5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3'	29

Formelschema 9. Strukturen von Nucleolipiden **1a-5a** sowie von Oligonucleotiden und Lipo-Oligonucleotiden **16-29** zur Duplex-Bildung.

7.6.1. Diffusionszeiten einzelsträngiger Lipo-Oligonucleotide

Aus den Messungen der Bilayerhelligkeiten haben sich die Lipo-Oligonucleotide **16** (5'-d(**4a**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3') und **17** (5'-d(**4b**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3') für eine Bilayerinsertion als besonders effizient erwiesen. Ihre Nucleolipid-Gruppen – das 5-Fluorouridin mit einer Nonadecyliden-Gruppe (**4b**) bzw. mit einer Isopropyliden- und einer N(3)-Farnesyl-Gruppe (**4a**) – waren den Helligkeitsmessungen zufolge effiziente Lipidanker, die das Oligonucleotid schnell und fest im Bilayer verankerten. Daher wurden diese LONs ausgewählt, um erste Diffusionszeiten eingelagerter LONs im Bilayer zu messen. Die Diffusionszeiten wurden sowohl in der Pufferlösung als auch im Bilayer gemessen (vgl. **Tabelle 6**).

Tabelle 6. Diffusionszeiten τ_D [ms] von den LONs **16** [5'-d(**4a**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'] und **17** [5'-d(**4b**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3'] in der Pufferlösung (ohne Lipid-Bilayer) und im Bilayer. Vgl. [144, S. 223].

LON	Position	Perfusion	τ_D [ms]
16	<i>in der Pufferlösung - ohne Bilayer</i>	-	0.39 ± 0.3
17		-	0.28 ± 0.1
16	<i>im Bilayer</i>	1.	75.6 ± 8.2
		2.	53.9 ± 11.6
		3.	19.9 ± 3.3
17		1.	33.5 ± 16.8
		2.	12.9 ± 1.4

Aus diesen Messungen ging hervor, dass die Diffusionszeiten der LONs **16** und **17** in freier Lösung um 0.4 bzw. 0.3 ms lagen. Im Bilayer jedoch wiesen diese LONs hohe Diffusionszeiten auf, die zwischen 13 und 76 ms lagen. Demzufolge mussten diese LONs im Bilayer eingelagert sein. Doch anders als erwartet, nahmen die Diffusionszeiten nach jedem Perfusionsvorgang etwa um die Hälfte ab.

Am Beispiel des LON **22** (5'-d(5a-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3') wurde untersucht, ob die Entfernung des Messpunktes zum Bilayer die Diffusionszeit eines LONs beeinflusst. Dazu wurden die Diffusionszeiten um und im Bilayer an den Positionen 1 (in freier Lösung), 2 (knapp über dem Bilayer) und 3 (im Bilayer) gemessen (vgl. **Abbildung 47A-C**). Aus den Ergebnissen in **Tabelle 7** ging hervor, dass die Diffusionszeit knapp über dem Bilayer (Position 2) verglichen mit der Diffusionszeit in der Pufferlösung (Position 1) bereits verlangsamt war. Entsprechend der normierten Fluoreszenz-Korrelationskurven (**Abbildung 47C**) besteht ein Zusammenhang zwischen der zunehmenden Nähe lipophilisierter Oligomere zum Bilayer und der Zunahme ihrer Diffusionszeit. Die reduzierte Bewegung der Oligomere zeigte aufsteigend von Position 1 < Position 2 < Position 3 eine lockere Adsorption am Bilayer (Position 2) gefolgt von einer Einlagerung in den Bilayer (Position 3). Offensichtlich existieren an der Position 2, nur wenige Mikrometer ($\sim 5\text{-}10\ \mu\text{m}$) vom Bilayer entfernt, attraktive Wechselwirkungen zwischen LONs und den Lipiden der Lipidmembran, die zur Verlangsamung der Diffusion führten.

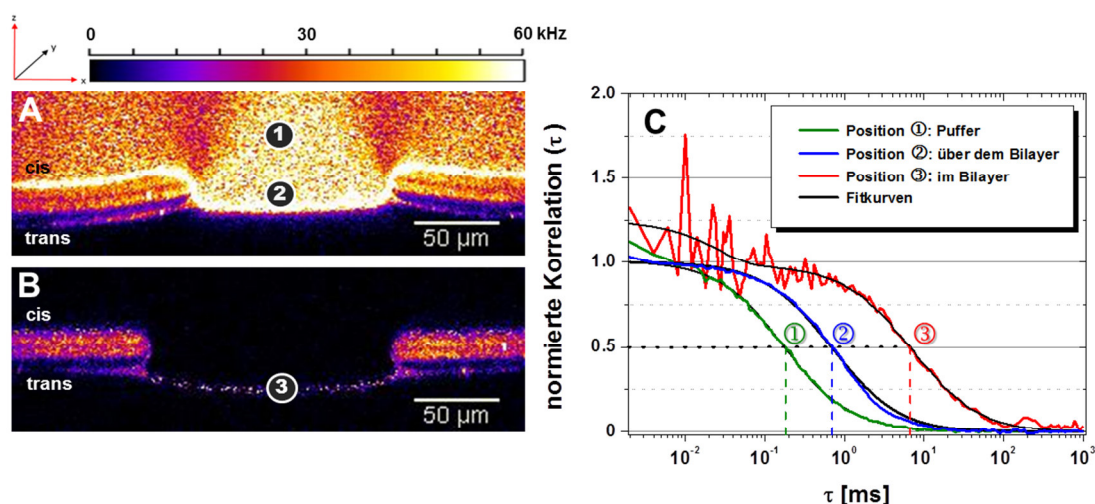


Abbildung 47. Diffusionszeitmessungen des LON **22** [5'-d(5a-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3'] (cis-Kanal; 5 μL , 50 nM). **A.** xz-Aufnahme durch den Bilayer direkt nach der Zugabe der Oligomerprobe in das cis-Kompartiment der „Bilayer Slide“. **B.** xz-Aufnahme nach dem 7. Perfusions-/ Inkubationsvorgang. Pufferlösung ohne frei diffundierende Oligomermoleküle, damit die Diffusionszeit des im Bilayer gebundenen LON **22** bestimmt werden kann. **C.** Normierte Korrelationsfunktionen und deren Anpassung (schwarz) sowie die Diffusionszeiten an den Positionen 1 (grün), 2 (blau) und 3 (rot). Vgl. [146, S. 922].

Tabelle 7. Diffusionszeit τ_D [ms] des LON 22 [5'-d(5a-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3'] im Puffer über dem Bilayer (Position 1), wenige Mikrometer über dem Bilayer (Position 2) und im Bilayer (Position 3). Anzahl der Messungen an einem Messpunkt N = 5. Vgl. [146, S. 922].

Position	τ_D [ms]
1 (im Puffer über dem Bilayer)	0.25 ± 0.08
2 (über dem Bilayer)	0.73 ± 0.01
3 (im Bilayer)	4.25 ± 0.98

Die Abnahme der Diffusionszeiten nach jedem Perfusionsvorgang könnte damit erklärt werden, dass durch den Perfusionsvorgang mehr Moleküle aus der Membran herausgelöst wurden und frei in der Lösung diffundierten. Da sich der Anteil schnell diffundierender Teilchen erhöhte, wurde auch die effiziente Diffusionszeit kleiner. Demzufolge stellte sich nach jedem Perfusionsvorgang ein neues Gleichgewicht am Lipid-Bilayer ein. Hinzu kommt, dass der fokussierte Anregungsbereich größer war als die Dicke des Bilayers (~5 nm) (vgl. **Abbildung 48**), so dass ein größerer Messbereich erfasst wurde, in dem mehr frei diffundierende Teilchen detektiert werden konnten.

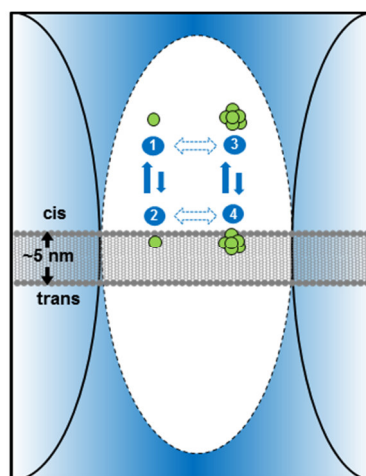


Abbildung 48. Gleichgewichte am Lipid-Bilayer nach der Perfusion. Der fokussierte Anregungsbereich war größer als die Dicke des Bilayers (~5 nm), damit wurde ein größerer Messbereich erfasst. Da der Anteil diffundierender Teilchen im Fokus nach jeder Perfusion erhöht wurde, stellte sich das Gleichgewicht verankerter LONs (1 und 2) oder LON-Aggregate (3 und 4) wieder neu ein.

Ob diese aus dem Bilayer herausgelösten Teilchen als monomere Einheiten (vgl. **Abbildung 48**; 1 und 2) oder als Aggregate (ebd.; 3 und 4) im Bilayer und in der Pufferlösung vorlagen, konnte nicht auf diese Weise ermittelt werden. Diese Teilchen konnten bereits im Bilayer als Monomere und/oder als Aggregate vorliegen und sich erst in der Lösung zu solchen zusammenlagern oder dissoziieren (vgl. **Abbil-**

Abbildung 48; gestrichelte Pfeile). Die erfassten Diffusionszeiten an den Positionen 1 und 2 waren mittlere Werte aus detektierten Teilchen im Fokus, die sich sowohl im Bilayer als auch in der Pufferlösung befanden. Während die frei diffundierenden Teilchen im dreidimensionalen Raum erfasst wurden, bewegen sich die im Bilayer verankerten LONs in einem zweidimensionalen Raum und haben demzufolge weniger Freiheitsgrade. Mit der Anzahl der möglichen Komponenten im gemessenen System erschwerte sich auch die Bestimmung der Diffusionszeiten. Je mehr Komponenten sich in dem Messbereich befinden, umso schwieriger und ungenauer sind die Aussagen zu den Diffusionszeiten.

7.6.2. Diffusionszeiten lipophilisierter DNA-Duplexe

Die Verankerung von DNA-Duplexen hybridisierter LONs im Lipid-Bilayer wurde an den Diffusionszeiten dieser Duplexe zwischen den Oligomeren **24** (5'-d(**3a**-TAG GTC AAT ACT)-3') und **26** (5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3') sowie zwischen den Oligomeren **27** (5'-d(**1a**-TAG GTC AAT ACT)-3') und **26** untersucht. Diese Diffusionszeiten wurden sowohl in freier Lösung und ohne die Lipidmembran, als auch in und knapp über der Lipidmembran gemessen (vgl. **Abbildung 49**; Position 1 und 2).

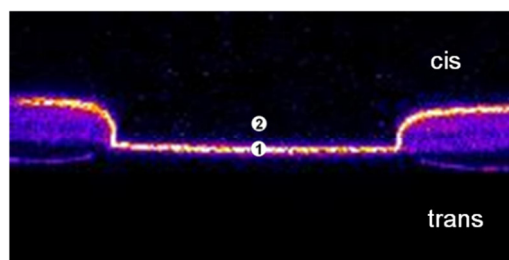


Abbildung 49. xz-Schnitt durch den Lipid-Bilayer aus dem Versuch zur Duplex-Bildung zwischen dem LON **27** [5'-d(**1a**-TAG GTC AAT ACT)-3'] und dem Oligomer **26** [5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3'] mit den veranschaulichten Positionen 1 (= Lipid-Bilayer) und 2 (= knapp über dem Lipid-Bilayer; ca. 5-10 μm), an denen die Diffusionszeiten gemessen werden. [7, S. 278; 16, S. 54].

In freier Lösung wurden für diese DNA-Duplexe sowie für das Cy5-markierte Oligomer **26** (5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3') Diffusionszeiten zwischen 0.1-0.2 ms gemessen. Diese Werte unterscheiden sich nur geringfügig von den Werten, die für einzelsträngige LONs in reiner Pufferlösung gemessen wurden (vgl. **Tabelle 6**). Die Diffusionszeiten einzelsträngiger LONs unterscheiden sich nicht von den Werten, die für DNA-Duplexe gemessen wurden. Diese Tatsache hängt damit zusammen, dass die Masse eines Moleküls mit der dritten Wurzel in die Berechnung der Diffusionszeit

eingeht^[136], d.h., dass die Masse der LONs erst um das Achtfache vergrößert werden muss (vorausgesetzt das Volumen des Partikels verhält sich linear zur Masse), damit sich der Wert der Diffusionszeit verdoppelt. Dass diese LONs zu Duplexen hybridisieren, war erst an der Fluoreszenz im Bilayer zu messen, sobald der komplementäre Cy5-markierte Gegenstrang dazugegeben wurde.

Die Werte für die Diffusionszeiten der im Bilayer (Position 1) eingelagerten DNA-Duplexe waren mit 17-26 ms um Faktor 100 höher als die Diffusionszeiten in freier Lösung (vgl. **Tabelle 8**). Auffällig war, dass die knapp über dem Bilayer (Position 2) gemessenen Diffusionszeiten für die DNA-Duplexe, die sich aus den Oligomeren **24** und **26** sowie aus den Oligomeren **27** und **26** zusammensetzten, mit ca. 2.5 ms um den Faktor 10 kleiner waren als die Diffusionszeiten derselben DNA-Duplexe im Lipid-Bilayer. Es ist anzunehmen, dass die LONs bereits in der Nähe der Lipidmembran langsamer diffundierten, bevor sich diese in den Bilayer einlagerten. Es deutet darauf hin, dass es eine Wechselwirkung zwischen dem Bilayer und den LONs und/oder DNA-Duplexen geben muss, bevor sich diese in die Membran einlagern. Da das LON erst in die Lipidmembran eingelagert wurde und erst dann der komplementäre Strang in das System hinzugegeben wurde, könnten die langsamere Diffusionszeiten knapp über dem Bilayer durch die spezifischen Basenpaarungen an der Grenzfläche zwischen der Lipidmembran und der wässrigen Lösung verursacht werden. Die DNA-Hybridisierung fand in erster Linie an der Membran und nicht in der Pufferlösung weit über dem Bilayer statt.

Tabelle 8. Diffusionszeiten, τ_D [ms], der Duplexe aus LON **24** [5'-d(**3a**-TAG GTC AAT ACT)-3'] mit dem Oligomer **26** [5'-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3'] sowie der Duplexe aus LON **27** [5'-d(**1a**-TAG GTC AAT ACT)-3'] mit dem Oligomer **26** in freier Lösung ohne Bilayer und über dem Bilayer an den Positionen 1 (= Bilayer) und 2 (= Pufferlösung knapp über dem Bilayer). Vgl. [7, S. 278] und [16, S. 54].

Oligomer/ Duplex	Position	τ_D [ms]
26	<i>Diffusion in Lösung ohne Bilayer</i>	0.24 ± 0.1
24•26		0.12 ± 0.1
27•26		0.23 ± 0.1
24•26	1 (<i>im Bilayer</i>)	26.6 ± 2.0
	2 (<i>im Puffer über dem Bilayer</i>)	2.39 ± 0.3
27•26	1 (<i>im Bilayer</i>)	17.23 ± 2.0
	2 (<i>im Puffer über dem Bilayer</i>)	2.47 ± 0.3

Im Folgenden wurden die Diffusionszeiten der Komplexe **27•26•SG** und **27•29•SG** beschrieben, die nicht nur über das kovalent gebundene Cy5, sondern auch über das SG detektiert wurden. Diese Komplexe setzten sich aus dem gleichen lipophilisierten Oligonucleotid LON **27** (5'-d(1a-TAG GTC AAT ACT)-3') und den komplementären Sequenzen der Gegenstränge (5'-d(AGT ATT GAC CTA)-3') zusammen wie der bereits vorgestellte DNA-Duplex **27•26**. Diese Komplexe unterschieden sich lediglich in der zusätzlichen Farbstoff-Markierung des Oligomers **26**. Das Oligomer **29** enthielt keinen kovalent gebundenen Cy5-Fluorophor am 5'-Ende. Während im Komplex **27•26•SG** beide Fluorophore angeregt wurden, wurde im Komplex **27•26•SG** nur der in den DNA-Duplex eingelagerte SG-Fluorophor angeregt. Die Diffusionszeiten dieser dsDNA/SG-Komplexe unterschieden sich (i) je nachdem, ob der Cy5 oder SG im DNA/SG-Komplex angeregt wurde, ob (ii) ein Perfusionsvorgang durchgeführt wurde oder ob (iii) die Diffusionszeit an der Position 1 oder 2 gemessen wurde (vgl. **Tabelle 9**).

In Bezug auf die sich wiederholenden Perfusionsvorgänge wiesen die Ergebnisse das gleiche Muster auf, wie die beschriebenen Diffusionszeiten zu Cy5-markierten DNA-Duplexen. So waren die Diffusionszeiten des Komplexes **27•26•SG** im Bilayer nach der 1. Perfusion um das 2-fache kleiner als vor der Perfusion, wenn der Cy5-Fluorophor angeregt wurde. Knapp über dem Bilayer unterschieden sich diese Werte vor und nach der ersten Perfusion um Faktor 3.5, waren aber mit ca. 2.5 und 1.3 ms um Faktor 7 bzw. um Faktor 8 kleiner als die vergleichbaren Werte gemessen an der Position 1 (= Bilayer) (vgl. **Tabelle 9**; Cy5_(635 nm)). Vergleicht man diese Werte mit denen, die bei 470 nm (Anregung des in die DNA-Helix interkalierenden SG) für die Komplexe **27•26•SG** und **27•29•SG** erhoben wurden, so stellt man fest, dass diese Diffusionszeiten für die dsDNA/SG-Komplexe mit 0.07 - 1.56 ms um ca. Faktor 10 kleiner waren. Bis auf zwei Ausnahmen war auch in dieser Messreihe die Tendenz zu erkennen, dass die Diffusionszeiten vor der Perfusion höher waren als nach der Perfusion. Im Falle des **27•26•SG**-Komplexes verdoppelte sich der Wert (Position 1 nach der 1. Perfusion) von 0.6 auf 1.2 ms (vgl. **Tabelle 9**; SG_(470 nm)). Im Falle des **27•29•SG**-Komplexes ist die Diffusionszeit in Position 1 nach dem 2. Perfusionsvorgang um Faktor 1.2 höher als nach der 1. Perfusion. Betrachtet man die Abweichungen, die um 0.36 bzw. um 0.22 liegen, könnte es sich hier um unveränderte Diffusionszeiten handeln, da sich die Werte der Diffusionszeiten nur geringfügig unterschieden. Unklar ist, warum die Diffusionszeit an der Position 1 nach der

ersten Perfusion zunahm. Da es sich hier um ein sehr komplexes System aus drei Komponenten handelte, die sich alle drei am Lipid-Bilayer zu einem Ternär-Komplex aus einem DNA-Duplex und dem interkalierenden SG-Farbstoff zusammensetzen, unterlag dieses komplexe System vor und nach den Perfusionsvorgängen neuen Gleichgewichtseinstellungen. Nicht zuletzt wurden diese Schwankungen auch vom SG beeinflusst. Dieser Farbstoff war nicht kovalent gebunden, seine Wechselwirkung mit der DNA-Doppelhelix wurde durch die Perfusionen geschwächt.

Für beide dsDNA/SG -Komplexe (**27•26•SG** und **27•29•SG**; SG_(470 nm)) lagen die Diffusionszeiten vor und nach den Perfusionsvorgängen sowie zwischen den Perfusionen zwischen 0.6 und 1.56 ms in Position 1 sowie zwischen 0.07 und 0.72 in Position 2. An der Position 2 wurden keine dsDNA/SG-Komplexe detektiert. Obwohl diese Messwerte mit jedem Perfusionsvorgang kleiner wurden, waren diese bereits vor dem 1. bzw. 2. Perfusionsschritt < 1 und gingen nach der Perfusion gegen Null. Vergleicht man die Diffusionszeiten zum **27•26•SG**-Komplex, die an Position 2 aufgenommen wurden, so ist festzustellen, dass auch an dieser Position die Werte, die bei 470 nm aufgenommen wurden, um Faktor 3.4 bzw. um etwa Faktor 10 kleiner waren als die Werte, die bei 635 nm erhoben wurden. Verglichen mit dem **27•26•SG**-Komplex sind die Diffusionszeiten für den **27•29•SG**-Komplex bis auf die oben beschriebene Ausnahme sehr ähnlich.

Tabelle 9. Diffusionszeiten τ_D [ms] zu Ternär-Komplexen (**27•26•SG** und **27•29•SG**) im Bilayer (Position 1) und knapp über dem Lipid-Bilayer (Position 2) vor und nach der 1. Perfusion (cis-Kanal; 30 sec, 1.1 mL/min). Anregung der Fluorophore Cy5- und SYBR Green I im Wechsel oder einzeln. Vgl. [141, S. 2310-2311].

Komplex	27•26•SG				27•29•SG ^{b)}	
	Cy5 _(635 nm)		SG _(470 nm)		SG _(470 nm)	
Perfusion	keine	1.	keine	1.	1.	2.
τ_D in Position 1 [ms]	17.23 ± 2.0 ^{a)}	10.33 ± 2.0	0.60 ± 0.09	1.20 ± 0.36	1.30 ± 0.28	1.56 ± 0.22
τ_D in Position 2 [ms]	2.47 ± 0.3 [*]	1.28 ± 0.05	0.72 ± 0.11	0.13 ± 0.05	0.48 ± 0.71	0.07 ± 0.03

^{a)} Messwert aus [7].

^{b)} τ_D in freier Lösung ohne Lipid-Bilayer lag bei 0.03 ± 0.002 ms.

Diese kaum messbaren und schwankenden Diffusionszeiten hingen nicht zuletzt damit zusammen, dass der Fluoreszenzfarbstoff SG nicht an die DNA kovalent gebunden war wie der Cy5-Fluorophor. Zusätzlich konnte es auch damit zusammen-

hängen, dass das SG bei einer Wellenlänge von 470 nm nicht optimal angeregt werden konnte, da das Anregungsmaximum für SG bei 494 nm liegt. Diese Tatsache könnte auch die schwache Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm im Bilayer erklären, die im Vergleich zu den Intensitäten bei 635 nm um das Vierfache kleiner sind (**Abbildung 39 I**). Nichts desto trotz konnte mit Hilfe der Diffusionszeiten die Einlagerung lipophilisierter Oligonucleotide und ihrer DNA-Duplexe bestätigt werden. Diese Untersuchungsmethode scheint aber nicht dafür geeignet zu sein, wenn in einem System mehrere Komponenten untersucht werden sollen. Es konnte gezeigt werden, dass die im Bilayer gemessenen Diffusionszeiten für dsDNA/SG-Komplexe länger waren als die, die über der Membran gemessen wurden. Damit wurde bestätigt, dass das immobilisierte bzw. eingelagerte DNA-Duplex über die lipophile Kopfgruppe in der Membran verankert wurde. Die kurzen Diffusionszeiten, die über dem Bilayer gemessen wurden, waren ein Indiz dafür, dass die dsDNA/SG-Komplexe, wenn sie denn noch in der Lösung vorhanden waren und nicht vollständig herausgespült werden konnten, frei im Puffer diffundieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass das SG in den DNA-Duplex interkalierte und als Marker für den DNA-Duplex eingesetzt werden konnte. Anders als in diesen Experimenten wurden dsDNA/SG-Komplexe in Kapitel 7.5.2 „*Interkalation von SYBR Green I in DNA-Duplexe am Lipid-Bilayer*“ bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Diese Wellenlänge lag näher am Absorptionsmaximum von SG (494 nm) und ermöglichte bessere bzw. hellere Bilayeraufnahmen.

7.7. Assemblierung lipophiler Oligomere an flüssig/flüssig Phasengrenzen ohne Lipid-Bilayer

Nachdem das Einlagerungsverhalten verschiedener Lipo-Oligonucleotide mit unterschiedlichen terminalen Nucleolipid-Kopfgruppen eingehend am Lipid-Bilayer untersucht wurde, wurden zwei Lipo-Oligonucleotide ausgewählt, die auf ihre Assemblierung an flüssig/flüssig-Phasengrenzflächen untersucht werden sollen. In diesem abschließenden Experiment soll überprüft werden, ob sich diese lipophilen Oligonucleotide spontan an zwei flüssig/flüssig-Phasengrenzen assemblieren. Die dafür geeigneten Lipo-Oligonucleotide müssen in erster Linie zwei Voraussetzungen erfüllen: sie müssen sich schnell an der Phasengrenze anreichern und dürfen sich kaum bis gar nicht aus dieser herauslösen und in der Lösung frei diffundieren. Damit soll innerhalb kürzester Zeit eine scharfe fluoreszierende Phasengrenze erreicht werden, die dann im konfokalen Fokus fluoreszenz-spektroskopisch betrachtet werden kann.

tet. Die LON-Probe wurde zuletzt (knapp über dem Flüssigkeitsspiegel) dazugegeben. Im Folgenden werden drei verschiedene Probenzusammensetzungen vorgestellt. Für die erste Messung wurden 2 μL einer 50 nM LON **20** zu einer geschichteten Lösung aus 4 μL Wasser und 15 μM n-Dekan dazugegeben. In der zweiten Messung wurden ebenfalls 2 μL einer 50 nM LON **20**-Lösung über 4 μL Wasser und 10 μL Chloroform eingesetzt. In der dritten Messung wurden 2 μL einer 50 nM LON **23**-Probe auf 8 μL Wasser und 8 μL n-Dekan dazugegeben. Die verwendeten Lösungsmittel wurden so gewählt, dass auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichten (n-Dekan < Wasser < Chloroform), die wässrige Phase unterhalb (n-Dekan/Wasser) oder oberhalb (Wasser/Chloroform) der Phasengrenze geschichtet werden konnte.

In allen drei Experimenten konnte direkt nach der Zugabe der Probe beobachtet werden, dass sich Lipo-Oligonucleotide an der Phasengrenze zwischen n-Dekan/Wasser sowie zwischen Wasser/Chloroform anreichern lassen (vgl. **Abbildung 50**). Die xz-Schnitte in der **Abbildung 50A-D** sind Ausschnitte aus insgesamt 61 aufeinanderfolgenden xz-Aufnahmen, die in gestapelter Form eine Filmsequenz ergeben ^[176]. Zwischen den Lösungsmitteln n-Dekan und Wasser konnte eine gekrümmte Phasengrenze beobachtet werden, während die Phasengrenze zwischen den Lösungsmitteln Wasser und Chloroform einen weitgehend waagerechten Phasenübergang ausbildete.

Diese Beobachtung geht auf die unterschiedlichen Oberflächenspannungen dieser Lösungsmittel zurück. Die Oberflächenspannung des Wassers ist mit 72.8 mN/m höher als die Oberflächenspannung von Chloroform (27.1 mN/m) oder n-Dekan (23.8 mN/m) ^[177], so dass sich zwischen n-Dekan und Wasser eine konkave Phasengrenze bildet, wo sich n-Dekan (Dichte 0.73 g/cm³ bei 20°C) ^[ebd.] über der Wasserschicht (Dichte 0.99 g/cm³ bei 20°C) befindet und nicht gegen den Kapillaranstieg des Wassers entgegenwirken kann. Betrachtet man das System aus Chloroform und Wasser, so stellt man fest, dass das Chloroform mit seiner Dichte von 1.49 g/cm³ bei 20°C höher ist als die Dichte des Wassers, so dass sich die Wasserphase über der Chloroformphase schichtet und mit einer Grenzflächenspannung von 32.8 mN/m (Chloroform gegen Wasser) ^[ebd.] für eine nahezu gerade Phasengrenze sorgt.

Es konnte gezeigt werden, dass lipophilisierte Dodekamere nicht nur in Lipid-Bilayer insertieren, sondern sich auch an Gas/flüssig- oder an flüssig/flüssig-Phasengrenzen anordnen und so den Einsatz dieser Systeme in der Biosensorik von

Nucleinsäuren ermöglichen. In nächster Zukunft werden an diesen Systemen DNA-Hybridisierungen in Kombination mit dem Interkalator SYBR Green I untersucht.

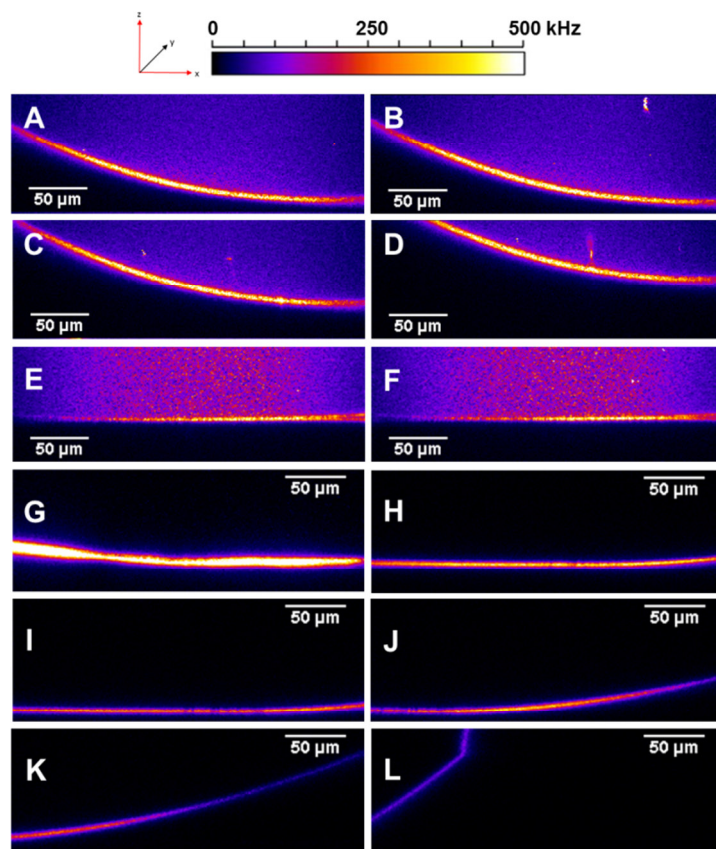


Abbildung 50. xz-Schnitte zur Akkumulation von Lipo-Oligonucleotiden an flüssig/flüssig-Phasengrenzen. **A-D.** LON **20** [5'-d(**4c**-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3'] an der Phasegrenze zwischen n-Dekan/Wasser. Aufnahme von Schnittstapeln (hier nur 4 von 61 aufeinanderfolgende Aufnahmen, die in gestapelter Form eine Filmsequenz ergeben [176]). **E-F.** Das LON **20** akkumuliert an der Phasegrenze zwischen Wasser und Chloroform (gemessen im Abstand von 2 Minuten). **G-L.** LON **23** [5'-d(**5e**-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3'] an der Phasegrenze zwischen n-Dekan und Wasser. Aufnahmen von der Phasegrenze entlang der x-Achse bis zur Kammerbegrenzung in L.

8. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese von Nucleolipiden zur Lipophilisierung von Oligonucleotiden sowie deren Untersuchung im Hinblick auf ihre Wechselwirkung und Duplex-Bildung an horizontalen Lipidmembranen und verschiedenen Phasengrenzen zur Entwicklung eines neuartigen Bio-Chips zur RNA/DNA-Analytik.

Der zentrale Aspekt der synthetischen Arbeit war die Lipophilisierung von Uridin und 5-Methyluridin. So konnte mit der Einführung verschiedener lipophiler Gruppen an die Pyrimidinbasen der lipophile Charakter Letzterer erhöht werden. Die Tatsache, dass der lipophile Charakter 2',3'-O-ketalisierter und/oder N(3)-farnesylierter Pyrimidinbasen höher war als die ihrer Nucleoside, konnte nicht nur an R_f und an

$^{10}\log P_{ow}$ -Werten der Produkte gezeigt werden; die Lipophilie 2',3'-O-ketalisierter Nucleolipide in Kombination mit einem Farnesyl-Rest an der N(3)-Position der Nucleosidbase konnte sogar verdoppelt werden.

Zytologische *in vitro* Untersuchungen an verschiedenen humanen Tumorzelllinien ergaben, dass 2',3'-O-ketalisierte und/oder N(3)-farnesylierte Nucleoside eine ausgeprägte anti-tumorale Wirksamkeit besitzen. Hierdurch wurde bewiesen, dass derartige Nucleolipide durch die Zellmembran penetrieren und so an ihren Wirkort im Zellinneren gelangen können. Auf diese Weise konnten die nicht-toxischen Nucleoside Uridin und 5-Methyluridin in Verbindung mit ebenfalls nicht-toxischen Lipiden wie der Farnesyl-Gruppe überraschend signifikante anti-tumorale Aktivität erwerben.

Mit der Synthese N(3)-prenylierter und 2',3'-O-ketalisierter Pyrimidinbasen Uridin und Methyluridin wurden Nucleolipid-Bausteine dargestellt, die auch als terminale Kopfgruppen eines Oligonucleotid-Dodecamers den lipophilen Charakter dieser Oligonucleotid-Sequenz erhöhen konnten. Für den Einsatz solcher LONs (Lipo-Oligonucleotide) in einer vereinfachten RNA/DNA-Analytik wurde eine Vielzahl von Lipo-Oligonucleotiden mit diversen Nucleolipid-Kopfgruppen synthetisiert und auf ihr Einlagerungsverhalten in künstliche Lipid-Bilayer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Lipo-Oligonucleotide in der Lage sind, sich in künstliche Lipid-Bilayer einzulagern. Abhängig von der Struktur, der Länge und der Anzahl der C-Atom-Ketten dieser lipophilen Anker-Bausteine wurden die Geschwindigkeit und die Festigkeit der Verankerung im Lipid-Bilayer beeinflusst.

Über die hohen Diffusionszeiten der LONs im Bilayer, die vor den Perfusionsvorgängen gemessen wurden, konnte die Einlagerung der LONs erschlossen werden, jedoch nahmen diese mit jedem Perfusionsvorgang ab, was damit zu erklären ist, dass es sich hier um ein sehr dynamisches System handelt. LONs wechselwirken nicht nur an der Bilayermembran, sondern auch an anderen Phasengrenzen. Nach jedem Perfusionsvorgang stellten sich neue Gleichgewichte ein. Am Beispiel des LON **19** konnte eine Akkumulation an der Phasengrenze zwischen der Luft und dem Lösungsmittel beobachtet werden.

Des Weiteren wurde die Hybridisierung von LONs mit komplementären Oligomeren an Lipid-Bilayern untersucht. In einer Versuchsreihe wurde systematisch der Einfluss der Länge der Nucleotidsequenzen zur Detektion mit dem SYBR Green I-Interkalator untersucht. So konnte gezeigt werden, dass die im Bilayer ver-

ankerten Lipo-Oligonucleotide mit komplementären Oligomeren DNA-Duplexe bilden. Die hybridisierte DNA wurde nicht nur über einen kovalent gebundenen Cy5-Fluorophor am Gegenstrang nachgewiesen, sondern auch über den DNA-Interkalator SYBR Green I (SG). Nähere Untersuchungen ergaben, dass sich SG zwar gut in DNA-Duplexe einlagerte, es konnten aber auch Effekte beobachtet werden, die auf das Anhaften des SG zurückzuführen waren. Folglich haftete das SG auch an einzelsträngige 18-mer und 24-mer Lipo-Oligonucleotide an, die 6 bzw. 12 Basen länger waren, als die Dodekamer-Modellsequenz. Da diese längeren Sequenzen AT-reiche Überhänge oder Spacer zwischen der Lipid-Gruppe und der Erkennungssequenz besaßen, konnte eine AT-Präferenz von SG nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass DNA-Duplexe aus nur 6 Basenpaaren nicht über SG-Interkalation nachgewiesen werden können.

Mit der Bestimmung hydrodynamischer Eigenschaften von sechs verschiedenen LONs (LON **18-23**) wurden erstmals Dodekamere mit unterschiedlichen lipophilen Kopf-Gruppen biophysikalisch charakterisiert. Damit wurden die Parameter wie Reibungs- und Diffusionskoeffizienten und Hydratation sowohl experimentell als auch theoretisch bestimmt, um für ein besseres Verständnis über die Struktur und damit über die Dynamik der LONs in wässriger Lösung zu bekommen. Daraus folgt, dass LONs in einer 50 nM Lösung als monomere Einheiten mit einem Diffusionskoeffizienten von ca. $1.61 \pm 0.06 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ($N = 6$) vorliegen.

Nachdem die Assemblierung des LONs **19** an der Luft/Wasser-Phasengrenze beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, ob LONs auch an Phasengrenzen zwischen zwei nicht mischbaren Lösungsmitteln akkumulieren können. Am Beispiel von zwei Lipo-Oligonucleotiden (LON **20** und **23**), die sich schnell und fest in der Bilayermembran verankern, konnte eine spontane Akkumulation dieser LONs an $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ sowie $\text{H}_2\text{O}/n$ -Dekan Grenzflächen direkt nach der Probenzugabe beobachtet werden. Damit wäre der Einsatz von Lipo-Oligonucleotiden als Ziel-Oligomere in einem neuartigen RNA/DNA-Nachweisverfahren möglich.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die in dieser Arbeit beschriebene Bilayer-Technik, die zur Untersuchung von Lipo-Oligonucleotiden auf ihr Einlagerungsverhalten sowie auf ihre Hybridisierung an der künstlichen Lipidmembran eingesetzt wurde, zwar ohne eine komplizierte kovalente Oberflächenchemie auskommt – so wie sie heute in der RNA/DNA-Analytik verwendet wird – jedoch noch weit von einem routinemäßigen Einsatz in der RNA/DNA-Analytik entfernt ist. Es besteht ein drin-

gender Bedarf nach Verfahrensvereinfachung durch Automatisierung. Bislang konnten mit dieser Technik erste experimentelle Untersuchungen mit Lipo-Oligonucleotiden durchgeführt werden, die für die angestrebte RNA/DNA-Analytik von essentieller Bedeutung sind.

9. Summary

The aim of this work was the synthesis of nucleolipids for the lipophilization of oligonucleotides as well as the analysis for the interaction and duplex formation both, at a horizontal lipid bilayer and at various phase boundaries, developing a novel bio-chip RNA/DNA-assay. The main aspect of the syntheses was the lipophilization of uridine and 5-methyluridine. Attachment of different lipophilic tails to these pyrimidine bases leads to an increase of their lipophilic character. The lipophilic character of 2',3'-O-ketalized and/or N(3)-farnesylated nucleosides was higher compared to their nucleosides. This could be demonstrated not only by R_f - but also by $^{10}\log P_{ow}$ values of the synthesized products; the lipophilicity of 2',3'-O-ketalized nucleolipids in combination with a farnesyl-tail at the N(3)-position could be duplicated.

Cytological in-vitro tests at different human carcinoma cells resulted in a significant anti-tumor activity of 2',3'-O-ketalized and/or N(3)-farnesylated nucleosides. As it turned out, such nucleolipids penetrate through the cell membrane, to reach the target location. By this way the non-toxic nucleosides uridine and 5-methyluridine, combined with non-toxic lipids as farnesyl moiety, could achieve high anti-tumor activity.

Preparing nucleolipid molecules, pyrimidine bases - both uridine and methyluridine - were N(3)-prenylated and 2',3'-O-ketalized, and then used as terminal lipid head groups of an oligonucleotide dodecamer, increasing the lipophilicity of this oligonucleotide sequence. For application in a simplified RNA/DNA assay a wide range of such LONs (lipo-oligonucleotides) with various nucleolipid head groups were prepared. Bilayer insertion experiments displayed that all of LON probes are able to snake into the artificial lipid bilayer. Depending on the structure, length as well as the number of the C-atom chains of these lipophilic anchor-molecules, the rate and the stability of the anchoring in the lipid bilayer were affected.

High diffusion times of LONs in the lipid bilayer measured before perfusing the cis-camber indicated the insertion of the LONs. However, the diffusion time decreased with increasing perfusion steps. By all appearances it might be a dynamic

system. LONs interacted not only with the lipid bilayer, but also with another phase boundaries. After each perfusion step new equilibria were balanced. Using the example of LON **19** an accumulation at a phase boundary between air and buffer could be observed.

Furthermore, the hybridization of LONs and complementary oligonucleotides at a lipid bilayer membrane was studied. Test series determined systematically the influence of the length of the nucleotide sequences for fluorescence detection of DNA-duplexes inserted in the bilayer using SYBR Green I (SG) as a DNA intercalator. It turned out that bilayer-anchored lipo-oligonucleotides hybridized with complementary oligonucleotides form DNA duplexes. Hybridized DNA was not only proved by Cy5-labelled complementary strands, but also by SYBR Green I intercalation. Further investigations indicated that SG intercalated into the DNA duplexes, but effects could be observed indicating an attachment at the outer side of SG. Thus, SG attached both, a single-stranded 18-mer and 24-mer lipo-oligonucleotides, which were 6 and 12 bases longer as the dodecamer model sequence, respectively. Because of the AT-rich overhanging sequences or spacer between the lipid-group and the probe oligomer, covalently linked to the lipid, an AT-preference of SG could not be excluded. Moreover, DNA duplexes with a 50%-match in the middle or 6 bp of the 12 bp-target oligonucleotide could not be detected by SG.

Determination of the hydrodynamic properties von six LONs (LON **18-23**) dodecameres with different lipophilic head-groups were initially characterized biophysically. Thereby, the parameters such as viscous drag coefficients, diffusion coefficients and hydration were determined experimentally as well as theoretically for a better understanding of the structure and the dynamic of the LONs in aqueous solution. As a consequence, LONs existed in a 50 nM solution as monomeric units with a diffusion coefficient of about $1.61 \pm 0.06 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ($N = 6$).

After having observed the assembly of LON **19** at an air/water-phase boundary, the question arose whether LONs are able to accumulate between two immiscible solvents. Using the example of two lipo-oligonucleotides (LON **20** and **23**), which inserted fast and stable into the bilayer membrane, a spontaneous accumulation of these LONs could be observed after probe addition at a phase boundary $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ and $\text{H}_2\text{O}/n\text{-decane}$, respectively.

Finally, the bilayer-technique, described in this work and used for studying the insertion of lipo-oligonucleotides as well as the hybridization at the lipid bilayer, does

not need any complicated surface chemistry, used until now for RNA/DNA assays, but it is still far apart from routine application for an analytical assay. There is a need for simplification of procedures as well as for automatization. Until now, initial experiments with lipo-oligonucleotides could be realized, having essential importance for the development of the intended RNA/DNA assay.

10. Резюме

Целью данной работы был синтез нуклеолипидов для липофилизации олигонуклеотидов, а также изучение их взаимодействия и образование дуплексов на горизонтальных мембранах из липидов и на различных фазовых границах для создания инновационного био-чипа для РНК/ДНК-анализа.

Центральным аспектом синтеза была липофилизация уридина и 5-метилуридина. В результате введения различных липофильных групп в пиримидиновые основания повысились липофильные свойства последних. Факт того, что липофильные свойства 2',3'-*O*-кетализированных и/или N(3)-фарнезилированных пиримидиновых оснований стали выше, чем их нуклеозидов, был продемонстрирован на примере R_f и $^{10}\log P_{ow}$ – показателей. Так, липофильность 2',3'-*O*-кетализированных нуклеозидов в комбинации с фарнезильной группой в N(3)-позиции нуклеозидных оснований была увеличена вдвое.

Цитологические *in vitro* исследования на различных линиях человеческих опухолевых клеток показали, что 2',3'-*O*-кетализированные и/или N(3)-фарнезилированные нуклеозиды имеют ярко выраженную противоопухолевую активность. Этим было доказано, что подобные нуклеолипиды проникают через клеточную мембрану и попадают на место своего воздействия в клетках. Этим способом нетоксичные нуклеозиды уридин и 5-метилуридин, в сочетании с такими нетоксичными липидами, как фарнезильная группа, неожиданно приобретают значимую противоопухолевую активность.

Синтезом N(3)-пренилированных и 2',3'-*O*-кетализированных пиримидиновых оснований - уридина и 5-метилуридина - были созданы нуклеолипидные компоненты, которые, в качестве терминальной группы олигонуклеотид-додекамера, смогли повысить липофильные свойства этой секвенции. Для применения таких ЛОНов (липо-олигонуклеотидов) в упрощённом РНК/ДНК-

анализе было синтезировано множество липо-олигонуклеотидов с различными нуклеолипидными группами и проверена их интеграция в искусственный липидный бислои. Этим было доказано, что все исследованные липо-олигонуклеотиды в состоянии интегрируются в искусственный липидный бислои. В зависимости от структуры, длины и количества углеродных цепей в этих липофильных якорных компонентах, менялось воздействие на скорость и прочность закрепления их в липидном бислое.

Продолжительность диффузии ЛОНов в бислое, которая была измерена перед процессом перфузии, свидетельствует об интеграции ЛОНов, однако время диффузии уменьшалось с каждой перфузией, что можно объяснить наличием очень динамичной системы. ЛОНЫ взаимодействуют не только по липидному бислою, но и по другим фазовым границам. При каждой перфузии устанавливались новые равновесия. На примере ЛОНа **19** наблюдалась его аккумуляция на фазовой границе между воздухом и растворителем.

Далее исследовалась гибридизация ЛОНов с олигомерами на липидных бислоях. В ряде опытов было систематически исследовано влияние длины нуклеотидной секвенции на её детекцию с SYBR Green I (SG) интеркалатором. Этим было показано, что закреплённые в бислое липо-олигонуклеотиды формируют ДНК-дуплексы с комплементарными олигомерами. Наличие гибридизованной ДНК было подтверждено не только ковалентно связанным Су5-флуорофором в противоположной цепи, но и ДНК-интеркалатором SYBR Green I. Уточняющие исследования показали, что SG может хорошо интегрироваться в ДНК-дуплексы, но также наблюдались и эффекты прилипания. Так, SG образовывал комплекс с одноцепочечными олигонуклеотидами длиной 18 и 24 основания, которые были на 6 и 12 оснований длиннее, чем модельная нуклеозидная последовательность с длиной 12. Не исключено, что секвенции с повышенным содержанием АТ или с дистанционным разделителем между липидной группой и контактным олигомером, ковалентно связанным с липидом, могут иметь преимущественное сродство к SG. Кроме того было установлено, что ДНК-дуплексы всего из шести пар оснований не могут быть обнаружены с помощью SG-интеркаляции.

Определением гидродинамических свойств шести различных ЛОНов (ЛОН **18-23**) были впервые биофизически охарактеризованы додекамеры с

различными липофильными головными группами. Например, были как теоретически, так и экспериментально определены значения коэффициентов трения, коэффициентов диффузии и гидратация, для того чтобы лучше понять структуру и динамику ЛОНов в водном растворе. Установлено, что ЛОНЫ находились в 50 нмоль/л растворе как мономерные блоки с коэффициентом диффузии $\sim 1.61 \pm 0.06 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ($N = 6$).

После того, как на фазовой границе между воздухом и водой наблюдалось накопление ЛОНа **19**, возник вопрос, могут ли ЛОНЫ аккумулироваться на фазовых границах между двумя несмешиваемыми растворителями. На примере двух липо-олигонуклеотидов (ЛОН **20** и **23**), которые быстро и крепко закрепляются в липидном бислое сразу же после добавления пробы, наблюдалась спонтанная аккумуляция этих ЛОНов на границе раздела фаз $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$, а также $\text{H}_2\text{O}/n$ -декан. Этим открывается возможность применения липо-олигонуклеотидов в качестве ДНК-мишеней в инновационном методе обнаружения РНК/ДНК.

Заключительно делается вывод, что описанный в этой работе метод использования бислоя для исследования липо-олигонуклеотидов при их интеграции и гибридизации на искусственной липидной мембране хотя и обходится без сложной ковалентной химии в поверхностном слое (как она используется в ДНК/РНК-анализе на сегодняшний день), он всё-таки далёк от рутинного использования в РНК/ДНК-анализе. Существует острая необходимость упрощения этого процесса путём автоматизации. Пока этим методом производились только первые экспериментальные исследования липо-олигонуклеотидов, которые имеют существенное значение для желаемого ДНК/РНК-анализа.

11. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse und Methoden zur Wechselwirkung lipophilisierter Oligonucleotide am Lipid-Bilayer bilden die Grundlage für die Entwicklung eines auf Lipo-Oligonucleotiden (LONs) basierenden neuartigen Bio-Chips zur RNA/DNA-Analyse ohne den Einsatz von festem Trägermaterial sowie einer kovalenten Chemie an festen Oberflächen.

Obwohl die experimentellen Untersuchungen zur DNA-Hybridisierung sowie zum Nachweis der Bindung von DNA-Duplexen mit dem DNA-Interkalator SYBR

Green I an flüssig/flüssig-Phasengrenzen noch ausstehen, bilden die bisherigen Ergebnisse zur Untersuchung von LONs eine solide und viel versprechende Grundlage für weitere Untersuchungen.

Die möglichen Einsatzgebiete von Lipo-Oligonucleotiden in der Nucleinsäureanalytik sind sehr vielfältig. So könnten diese in DNA/RNA-Microarrays sowohl in der Genomanalyse zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Onkogenen bzw. Onkogenfragmenten, als auch in der Pränataldiagnostik oder in der Geflügelzucht zur Geschlechtsidentifizierung Anwendung finden. Auf diese Weise könnten bisher angewandte Verfahren vereinfacht, beschleunigt und kostengünstiger werden.

Lipo-Oligonucleotide können aber auch anderweitige Verwendung finden: so könnten LONs siRNA in das Zellinnere einschleusen, die die Expression bestimmter Gene unterdrücken kann ^[24] (vgl. **Abbildung 51**). Obwohl im Rahmen dieser Arbeit keine Transfektion von LONs durch die künstliche Doppelschicht-Membran beobachtet werden konnte, könnte durch das Anlegen geringer Spannung von (+50 bis -50 mV) die Integrität des Bilayers soweit gestört werden, dass das Lipo-Oligonucleotid transfektiert wird (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. R. Wagner).

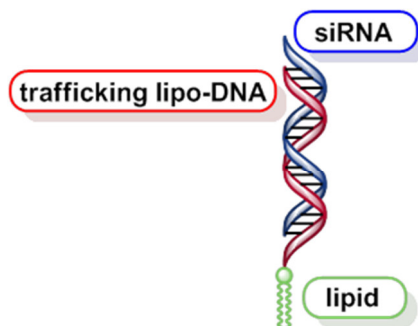


Abbildung 51. Mögliches Einsatzgebiet von Lipo-Oligonucleotiden. Einschleusen von siRNA mit Hilfe lipophilisierter DNA. [141, S. 2318].

12. Literaturverzeichnis

- [1] Bertling, J. (2014): „Bionik als Innovationsstrategie“. In: Herstatt, C.; Kalogerakis, K.; Schulthess, M. (Hg.): *Innovationen durch Wissenstransfer: Mit Analogien schneller und kreativer Lösungen entwickeln*. Wiesbaden, Springer. 152.
- [2] BIONIKON: „BIONIKON-Das Bionikkompetenznetz“.
URL: <http://www.biokon.de/bionik/was-ist-bionik/> [Zugriff am 28. August 2015].
- [3] Fodor, S. P.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D. „Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis“. *Science*. **1991**, *251*, 767-773. doi:10.1126/science.1990438.
- [4] Lockhart, D. J.; Dong, H.; Byrne, M. C.; Follettie, M. T.; Gallo, M. V.; Chee, M. S.; Mittmann, M.; Wang, C.; Kobayashi, M.; Norton, H.; Brown, E. L. „Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays“. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1675-1680. doi:10.1038/nbt1296-1675.
- [5] Lennon, G. G.; Lehrach, H. „Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries“. *Trends in Genetics*. **1991**, *7*, 314-317. doi:10.1016/0168-9525(91)90420-U.
- [6] Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O. „Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray“. *Science*. **1995**, *270*, 467-470. doi:10.1126/science.270.5235.467
- [7] Werz, E.; Korneev, S.; Montilla-Martinez, M.; Wagner, R.; Hemmler, R.; Walter, C.; Eisfeld, J.; Gall, K.; Rosemeyer, H. „Specific DNA duplex formation at an artificial lipid bilayer: towards a new DNA biosensor technology“. *Chem. Biodiversity*. **2012**, *9*, 272-281. doi:10.1002/cbdv.201100298.
- [8] Maskos, U.; Southern, E. M. „Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ“. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 1679-1684. doi:10.1093/nar/20.7.1679.
- [9] Rosemeyer, H. „Nucleolipids and use thereof, and devices for nucleic acid analysis“. U.S. Patent 7,914,991 B2, March 29, **2011**.
- [10] Rosemeyer, H. „Nucleolipids: Natural occurrence, synthesis, molecular recognition, and supramolecular assemblies as potential precursors of life and bioorganic materials (Review)“. *Chem. Biodiversity*. **2005**, *2*, 977-1063. doi:10.1002/cbdv.200590082.
- [11] Dumelin, C. E.; Chen, Y.; Leconte, A. M.; Chen, Y. G.; Liu, D. R. „Discovery and biological characterization of geranylated RNA in bacteria“. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 913-919. doi:10.1038/nchembio.1070.
- [12] PETA Deutschland, e. V.: „50 Millionen Eintagsküken landen in Deutschland jährlich auf dem Müll-Küken in der Eierindustrie“. Stand Februar 2015.
URL: <http://www.peta.de/eier#.VeCQKhsVipo> [Zugriff am 28. August 2015].
- [13] Wilstacke, D. L. „Nachhaltige Tierhaltung in Nordrhein-Westfalen: Hierauf kommt es uns an“. In: Frühjahrstagung der Agrarsozialen Gesellschaft e.V. "Die landwirtschaftliche Nutztierhaltung hat Zukunft! Aber welche?", Münster, 21.-22. Mai 2014.

- [14] v. Schwerin, A. „Pränataldiagnostik: Kommerzieller Bluttest“. *GiD: Gen-ethischer Informationsdienst*. **2011**, *207*, 38-39.
- [15] Gissot, A.; Camplo, M.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. „Nucleoside, nucleotide and oligonucleotide based amphiphiles: a successful marriage of nucleic acids with lipids“. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1324-1333. doi:10.1039/b719280k.
- [16] Köstler, K.; Werz, E.; Malecki, E.; Montilla-Martinez, M.; Rosemeyer, H. „Nucleoterenes of thymidine and 2'-deoxyinosine: Synthons for a biomimetic lipophilization of oligonucleotides“. *Chem. Biodiversity*. **2013**, *10*, 39-61. doi:10.1002/cbdv.201100338.
- [17] Roskoski, R. J. „Protein prenylation: a pivotal posttranslational process“. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303*, 1-7. doi:10.1016/S0006-29X(03)00323-1.
- [18] Werz, E. (2010): „Terpenoid-Nucleosid Konjugate: Darstellung von DNA-Synthesebausteinen des N(3)-Farnesyl- und des N(3)-Geranyl-Thymidins“. Masterarbeit, Universität Osnabrück, Deutschland. 1-71.
- [19] Rosemeyer, H. „Nucleolipide und deren Verwendung, sowie Vorrichtung zur Nucleinsäureanalytik“. Europa Patent 1,893,773 B1, Januar 23, 2013.
- [20] Pokcholenko, O.; Gissot, A.; Vialet, B.; Bathany, K.; Thiéry, A.; Barthélémy, P. „Lipid oligonucleotide conjugates as responsive nanomaterials for drug delivery“. *J. Mater. Chem. B*. **2013**, *1*, 5329-5334. doi:10.1039/c3tb20357c.
- [21] Schade, M.; Berti, D.; Huster, D.; Herrmann, A.; Arbuzova, A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *208*, 235-251. doi:10.1016/j.cis.2014.02.019.
- [22] Gangadhara, K. L.; Srivastava, P.; Rozenski, J.; Mattelaer, H.-P.; Leen, V.; Dehaen, W.; Hofkens, J.; Lescrinier, E.; Herdewijn, P. „Design and synthesis of nucleolipids as possible activated precursors for oligomer formation via intramolecular catalysis: stability study and supramolecular organization“. *J. Syst. Chem.* **2014**, *5*, 1-23. doi:10.1186/s13322-014-0005-3.
- [23] Peer, D.; Liebermann, J. „Special delivery: targeted therapy with small RNAs“. *Gene Ther.* **2011**, *18*, 1127-1133. doi: 10.1038/gt.2011.56.
- [24] Wolfrum, C.; Shi, S.; Jayaprakash, K. N.; Jayaraman, M.; Wang, G.; Pandey, R. K.; Rajeev, K. G.; Nakayama, T.; Charrise, K.; Ndungo, E. M.; Zimmermann, T.; Koteliensky, V.; Manoharan, M.; Stoffel, M. „Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs“. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1149-1157. doi:10.1038/nbt1339.
- [25] Kurz, A.; Bunge, A.; Windeck, A.-K.; Rost, M.; Flasche, W.; Arbuzova, A.; Strohbach, D.; Müller, S.; Liebscher, J.; Huster, D.; Herrmann, A. „Lipid-anchored oligonucleotides for stable double-helix formation in distinct membrane domains“. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4440-4444. doi:10.1002/anie.200600822.
- [26] Honigsmann, A.; Walter, C.; Erdmann, F.; Eggeling, C.; Wagner, R. „Characterization of horizontal lipid bilayers as a model system to study lipid phase separation“. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 2886-2894. doi:10.1016/j.bpj.2010.03.033.

- [27] Langecker, M.; Arnaut, V.; List, J.; Simmel, F. C. „DNA nanostructures interacting with lipid bilayer membranes“. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1807-1815. doi: 10.1021/ar500051r.
- [28] Taib, N.; Aimé, A.; Houmadi, S.; Castano, S.; Barthélémy, P.; Laguerre, M.; Bestel, I. „Chemical details on nucleolipid supramolecular architecture: molecular modeling and physicochemical studies“. *Langmuir*, **2012**, *28*, 7452-7460. doi: 10.1021/la300744x.
- [29] Rode, A. B.; Endoh, T.; Tateishi-Karimata, H.; Takahashi, S.; Sugimoto, N. „Real-time monitoring of DNA hybridization kinetics on living cell surfaces“. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8444-8446. doi:10.1039/c3cc42990c.
- [30] Chan, Y.-H. M.; van Lengerich, B.; Boxer, S. G. „Effects of linker sequences on vesicle fusion mediated by lipid-anchored DNA oligonucleotides“. *PNAS*, **2009**, *106*, 979-984. doi:10.1073/pnas.0812356106
- [31] van Lengerich, B.; Rawle, R. J.; Bendix, P. M.; Boxer, S. G. „Individual vesicle fusion events mediated by lipid-anchored DNA“. *Biophys. J.* **2013**, *105*, 409-419. doi:10.1016/j.bpj.2013.05.056.
- [32] Dragan, A. I.; Pavlovic, R.; McGivney, J. B.; Casas-Finet, J. R.; Bishop, E. S.; Strouse, R. J.; Schenerman, M. A.; Geddes, C. D. „SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA“. *J. Fluorec.* **2012**, *22*, 1189-1199. doi:10.1007/s10895-012-1059-8.
- [33] Zipper, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J.; Vitzthum, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications“. *Nucl. Acids Res.* **2004**, *32* e103, 1-10. doi: 10.1093/nar/gnh101.
- [34] Zipper, H. „*Entwicklung analytisch-molekularbiologischer Verfahren zur Konstruktion einer Plasmid-Gendatenbank aus Boden-DNA in Escherichia coli und deren Durchmusterung nach neuen Enzymen für die technische Anwendung*“, Dissertation, Universität Stuttgart, Deutschland, **2004**, 17-30.
- [35] Anaya, M.; Kwak, M.; Musser, A. J.; Müllen, K.; Herrmann, A. „Tunable hydrophobicity in DNA micelles: Design, synthesis, and characterization of a new family of DNA amphiphiles“. *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 12852-12859. doi:10.1002/chem.201001816.
- [36] Desbat, B.; Arazam, N.; Khiati, S.; Tonelli, G.; Neri, W.; Barthélémy, P.; Navailles, L. „Unexpected bilayer formation in Langmuir films of nucleolipids“. *Langmuir*. **2012**, *28*, 6816–6825. doi:10.1021/la2047596.
- [37] Loew, M.; Springer, R.; Scolari, S.; Altenbrunn, F.; Seitz, O.; Liebscher, J.; Huster, D.; Herrmann, A.; Arbuzova, A. „Lipid domain specific recruitment of lipophilic nucleic acids: A key for switchable functionalization of membranes“. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16066-16072. doi:10.1021/ja105714r.
- [38] Johnson-Buck, A.; Jiang, S.; Yan, H.; Walter, N. G. „DNA-cholesterol barges as programmable membrane-exploring agents“. *ACS Nano* **2014**, *8*, 5641-5649. doi:10.1021/nn500108k.
- [39] Montis, C.; Baglioni, P.; Berti, D. „Monitoring the interaction of nucleolipoplexes with model membranes“. *Soft Matter* **2014**, *10*, 39-43. doi:10.1039/c3sm52254g.

- [40] Bunge, A.; Loew, M.; Pescador, P.; Arbusova, A.; Brodersen, N.; Kang, J.; Dähne, L.; Liebscher, J.; Herrmann, A.; Stengel, G.; Huster, D. J. „Lipid membranes carrying lipophilic cholesterol-based oligonucleotides -characterization and application on layer-by-layer coated particles“. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16425-16434. doi: 10.1021/jp9067747.
- [41] Gryaznov, S. M.; Lloyd, D. H. „Modulation of oligonucleotide duplex and triplex stability via hydrophobic interactions“. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5909-5915. doi:10.1093/nar/21.25.5909.
- [42] Krützfeldt, J.; Rajewsky, N.; Braich, R.; Rajeev, K. G.; Tuschl, T.; Manoharan, M.; Stoffel, M. „Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’“. *Nature Letter.* **2005**, *438*, 685-689. doi:10.1038/nature04303.
- [43] Barthélémy, P.; Lee, S. J.; Grinstaff, M. „Supramolecular assemblies with DNA“ *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 2133-2148. doi:10.1351/pac200577122133.
- [44] Barthélémy, P.; Prata, C. A. H.; Filocamo, S. F.; Immoos, C. E.; Maynor, B. W.; Hashmi, S. A. N.; Lee, S. J.; Grinstaff, M. W. „Supramolecular assemblies of DNA with neutral nucleoside amphiphiles“. *Chem. Commun.* **2005**, *10*, 1261-1263. doi:10.1039/B412670J.
- [45] Godeau, G.; Bernard, J.; Staedel, C.; Barthélémy, P. „Glycosyl–nucleoside–lipid based supramolecular assembly as a nanostructured material with nucleic acid delivery capabilities“. *Chem. Commun.* **2009**, *34*, 5127-5129. doi: 10.1039/B906212B.
- [46] Arigon, J.; Prata, C. A. H.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. „Nucleic acid complexing glycosyl nucleoside-based amphiphile“. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 864-872. doi:10.1021/bc050029y.
- [47] Gissot, A.; Di Primo, C.; Bestel, I.; Giannone, G.; Chapuis, H.; Barthélémy, P. „Sensitive liposomes encoded with oligonucleotide amphiphiles: a biocompatible switch“. *Chem. Commun.* **2008**, *43*, 5550-5552. doi:10.1039/b812398e.
- [48] Godeau, G.; Barthélémy, P. „Glycosyl-nucleoside lipids as low-molecular-weight gelators“. *Langmuir Letter*, **2009**, *25*, 8447-8450. doi:10.1021/la900140b.
- [49] Borisenko, G. G.; Zaitseva, M. A.; Chuvilin, A. N.; Pozmogova, G. E. „DNA modification of live cell surface“. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e28. doi:10.1093/nar/gkn1034.
- [50] Flasche, W.; Cismas, C.; Herrmann, A.; Liebscher, J. „Lipophilic nucleosides by sonogashira coupling“. *Synthesis* **2004**, *14*, 2335-2341.
- [51] Holger, H.; Scheidt, H. A.; Flasche, W.; Cismas, C.; Rost, M.; Herrmann, A.; Liebscher, J.; Huster, D. „Design and application of lipophilic nucleosides as building blocks to obtain highly functional biological surfaces“. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 16279-16287. doi:10.1021/jp046606h.
- [52] Bunge, A.; Kurz, A.; Windeck, A.-K.; Korte, T.; Flasche, W.; Liebscher, J.; Herrmann, A.; Huster, D. „Lipophilic oligonucleotides spontaneously insert into lipid membranes, bind complementary DNA strands, and sequester into lipid-disordered domains“. *Langmuir*. **2007**, *23*, 4455-4464. doi:10.1021/la063188u.

- [53] Kurz, A.; Bunge, A.; Windeck, A.-K.; Rost, M.; Flasche, W.; Arbuzova, A.; Strohbach, D.; Müller, S.; Liebscher, J.; Huster, D.; Herrmann, A. „Lipidverankerte Oligonucleotide zur Bildung stabiler Doppelhelices in Membrandomänen“. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4550-4554. doi:10.1002/ange.200600822.
- [54] Pfeiffer, I.; Höök, F. „Bivalent cholesterol-based coupling of oligonucleotides to lipid membrane assemblies“. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10224-10225. doi:10.1021/ja048514b.
- [55] Berti, D.; Baldelli Bombelli, F.; Fortini, M.; Baglioni, P. „Amphiphilic self-assemblies decorated by nucleobases“. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11734-11744. doi:10.1021/jp0744073.
- [56] Banchelli, M.; Berti, D.; Baglioni, P. „Molecular recognition drives oligonucleotide binding to nucleolipid self-assemblies“. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3070-3073. doi:10.1002/anie.200604826.
- [57] Milani, S.; Baldelli Bombelli, F.; Berti, D.; Dante, S.; Hauß, T.; Baglioni, P. „Nucleolipid membranes: structure and molecular recognition“. *J. Phys. Condens. Matter* **2008**, *20*, 104-212. doi:10.1088/0953-8984/20/10/104212.
- [58] Czech, M. P. „MicroRNAs as therapeutic targets“. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 1194-1195. doi:10.1056/NEJMcibr060065.
- [59] Broderick, J. A.; Zamore, P. D. „MicroRNA therapeutics“. *Gene Ther.* **2011**, *18*, 1104-1110. doi:10.1038/gt.2011.50.
- [60] Medina, P. P.; Slack, F. J. „MicroRNAs and cancer: An overview“. *Cell Cycle.* **2008**, *7*, 2485-2492. doi:10.4161/cc.7.16.6453.
- [61] Petrocca, F.; Lieberman, J. „Micromanipulation cancer: microRNA-based therapeutics?“. *RNA Biol.* **2009**, *6*, 335-340. doi:10.4161/rna.6.3.9013.
- [62] Manoharan, M.; Tivel, K. L.; Condon, T. P.; Andrade, L. K.; Barber-Peoch, I.; Inamati, G.; Shah, S.; Mohan, V.; Graham, M. J.; Bennett, C. F.; Crooke, S. T.; Cook, P. D. „Conjugated antisense oligonucleotides“. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1129-1138. doi:10.1080/07328319708006147.
- [63] Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. (2003): *Biochemie*. 5. Aufl. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 350-360.
- [64] Nuhn, P. (2006): *Naturstoffchemie. Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*. 4., neu bearb. Aufl., Stuttgart: S. Hirzel Verlag. 183-225, 291, 299, 358, 360.
- [65] Breitmaier, E.; Jung, G. (2001): *Organische Chemie. Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Kozepte, Molekülstruktur*. 4., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag. 902, 905, 1340-1352.
- [66] Bruice, P. Y. (2007): *Organische Chemie*. 5., aktual. Aufl. München: Pearson Studium. 1340-1352, 890.
- [67] Bodoprost, J.; Rosemeyer, H. „Analysis of Phenacyl ester Derivatives of Fatty Acids from Human Skin Surface Sebum by Reversed-Phase HPLC: Chromatographic Mobility as a Function of Physico-Chemical Properties“. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 1111-1124. doi:10.3390/i8111111.

- [68] Overton, C. E. „Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Tierzellen“. *Vierteljahrschr. Naturforsch. Ges. Zürich*. **1895**, 40 (Heft 2), 159-201.
- [69] Langmuir, I. „The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. II. Liquids“. *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, 39, 1848-1906.
doi:10.1021/ja02254a006.
- [70] Gorter, E.; Grendel, F. „On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood“, *J. Exp. Med.*, **1925**, 41, 439-443. doi:10.1084/jem.41.4.439.
- [71] Danielli, J. D.; Davson, H. „A contribution to the theory of permeability of thin films“. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1935**, 5, 495-508. doi:10.1002/jcp.1030050409.
- [72] Singer, S. J.; Nicolson, G. L. „The fluid mosaic model of the structure of cell membranes“. *Science*. **1972**, 175, 720-731. doi:10.1126/science.175.4023.720
- [73] Frye, L. D.; Edidin, M. „The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons“. *J. Cell Sci.* **1970**, 7, 319-335.
- [74] Kornberg, R. D.; McConnell, H. M. „Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. Spin-labeled phosphatidylcholine/nuclear resonance“. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1971**, 68, 2564-2568.
doi:10.1073/pnas.68.10.2564.
- [75] Adam, G.; Läger, P.; Stark, G. (2003): *Physikalische Chemie und Biophysik*. 4., vollst. überarb. erw. Aufl., Berlin: Springer Verlag. 358
- [76] McConnell, H. M.; Kornberg, R. D. „Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes“. *Biochemistry*. **1971**, 10, 1111-1120.
doi:10.1021/bi00783a003.
- [77] Simons, K.; Toomre, D. „Lipid rafts and signal transduction (Review)“. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, 1, 31-39. doi:10.1038/35036052.
- [78] Vereb, G.; Szöllösi, J.; Matkó, J.; Nagy, P.; Farkas, T.; Vígh, L.; Mátyus, L.; Waldmann, T. A.; Damjanovich, S. „Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model (Review)“. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2003**, 100, 8053-8058. doi:10.1073/pnas.1332550100.
- [79] Horton, R. H.; Moran, L. A.; Scrimgeour, K. G.; Perry, M. D.; Rawn, J. D. (2008): *Biochemie*. München: Pearson Studium. 351, 361, 367-369.
- [80] Gossauer, A. (2006): *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle. Eine Einführung in die organische Chemie*. Zürich: Helv. Chim. Acta 124-129, 403, 406.
- [81] Simons, K.; Ikonen, E. „Functional rafts in cell membranes“. *Nature*. **1997**, 387, 569-572. doi:10.1038/42408.
- [82] Silverthorn, D. U. (2009): *Physiologie*. 4. Aufl., München: Pearson Studium. 90.
- [83] Krämer, E.-M.; Trotter, J. „Axon-Glia-Interaktion und Myelinisierung - oder wie ein erster Kuss in Umhüllung resultiert“. *Neuroforum*. **2004**, 4, 268-275.
- [84] Simons, K.; Ikonen, E. „How cells handle cholesterol (Review)“. *Science*. **2000**, 290, 1721-1726. doi:10.1126/science.290.5497.1721.

- [85] Großmann, G.; Tanner, W. „Kompartimente der Plasmamembran-Inseln der Ruhe in rauher See“. *Biospektrum*. **2008**, *7*, 695-697.
- [86] Bagnat, M.; Keränen, S.; Shevchenko, A.; Shevchenko, A.; Simons, K. „Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast“. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2000**, *97*, 3254-3259. doi:10.1073/pnas.97.7.3254.
- [87] Michel, H. „Three-dimensional crystals of a membrane protein complex: The photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*“. *J. Mol. Biol.* **1982**, *158*, 567–572. doi:10.1016/0022-2836(82)90216-9.
- [88] Deisenhofer, J.; Epp, O.; Miki, K.; Huber, R.; Michel, H. „Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution“. *Nature* **1985**, *318*, 618-624. doi:10.1038/318618a0.
- [89] Bijlmakers, M.-J.; Marsh, M. „The on-off story of protein palmitoylation (Review)“. *Trends Cell Biol.* **2003**, *13*, 32-42. doi:10.1016/S0962-8924(02)00008-9
- [90] Resh, M. D. „Fatty acylation of proteins: New insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins (Review)“. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451*, 1-16. doi:10.1016/S0167-4889(99)00075-0.
- [91] Boutin, J. A. „Myristoylation“. *Cell. Signal.* **1997**, *9*, 15-35. doi:10.1016/S0898-6568(96)00100-3.
- [92] Johnson, D. R.; Bhatnagar, R. S.; Knoll, L. J.; Gordon, J. I. „Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation (Review)“. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 869-914. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.004253.
- [93] Taiz, L.; Zeiger, E. (2010): *Plant Physiology*. 5. Aufl., Sunderland, Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates Inc.
- [94] Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, L. J. (2000): *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists.
- [95] Sharom, F. J.; Lehto, M. T. „Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C“. *Biochem. Cell Biol.* **2002**, *80*, 535-549. doi: 10.1139/o02-146.
- [96] Melkonian, K. A.; Ostermeyer, A. G.; Chen, J. Z.; Roth, M. G.; Brown, D. A. „Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts: Many raft proteins are acylated, while few are prenylated“. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3910-3917. doi:10.1074/jbc.274.6.3910.
- [97] Zacharias, D. A.; Violin, J. D.; Newton, A. C.; Tsien, R. Y. „Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells“. *Science* **2001**, *296*, 913-916. doi:10.1126/science.1068539.
- [98] Kadereit, J. W.; Körner, C.; Kost, B.; Sonnewald, U. (2014): *Strasburger-Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften*. 37., vollst. überarb. aktual. Aufl. Heidelberg: Springer Spektrum.
- [99] Smrt, J.; Hynie, S. „Synthesis of some nucleolipids“. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1980**, *45*, 927-932. doi:10.1135/cccc19800927.

- [100] Takatsuki, A.; Arima, K.; Tamura, G. „Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin,“ *J. Antibiot. (Tokyo)* **1971**, *24*, 215-223. doi:10.7164/antibiotics.24.215.
- [101] Esko, J. D.; Bertozzi, C. R. (2009) „Chemical Tools for Inhibiting Glycosylation“, In: Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W.; Etzler, M. E.: *Essentials of glycobiology*. 2. Aufl. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 705-718.
- [102] Tamura, G.; Sasaki, T.; Matsushashi, M.; Takatsuki, A.; Yamasaki, M. „Tunicamycin inhibits the formation of lipid intermediate in cell-free peptidoglycan synthesis of bacteria“. *Agric. Biol. Chem.* **1976**, *40*, 447-449. doi:10.1080/00021369.1976.10862071.
- [103] Isono, K.; Uramoto, M.; Kusakabe, H.; Kimura, K.; Isaki, K.; Nelson, C. C.; McKloskey, J. A. „Liposidomycins: novel nucleoside antibiotics which inhibit bacterial peptidoglycan synthesis“. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1985**, *38*, 1617-1621. doi:10.7164/antibiotics.38.1617.
- [104] Muroi, M.; Kimura, K.; Osada, H.; Inukai, M.; Takatsuki, A. „Liposidomycin B inhibits in vitro formation of polyprenyl (pyro)phosphate N-acetylglucosamine, an intermediate in glycoconjugate biosynthesis“. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1997**, *50*, 103-104. doi:10.7164/antibiotics.50.103.
- [105] Kimura, K.; Ikeda, Y.; Kagami, S.; Yoshihama, M.; Suzuki, K.; Osada, H.; Isono, K. „Selective inhibition of the bacterial peptidoglycan biosynthesis by the new types of liposidomycins“. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1998**, *51*, 1099-1104. doi:10.7164/antibiotics.51.1099.
- [106] Kagami, S.; Kimura, K. I. Y.; Takahashi, H.; Kusakabe, H.; Osada, H.; Isono, K.; Yoshihama, M. „New types of liposidomycins which inhibit bacterial peptidoglycan synthesis produced by *Streptomyces*“. *Actinomycetol.* **1998**, *12*, 110-119. doi:10.3209/saj.12_110.
- [107] Ubukata, M.; Isono, K.; Kimura, K.; Nelson, C. C.; McCloskey, J. A. „The structure of liposidomycin B, an inhibitor of bacterial peptidoglycan synthesis“. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4416-4417. doi:10.1021/ja00221a052.
- [108] Ubukata, M.; Kimura, K.; Isono, K.; Nelson, C. C.; Gregson, J. M.; McCloskey, J. A. „Structure elucidation of liposidomycins, a class of complex lipid nucleoside antibiotics“. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6392-6403. doi:10.1021/jo00050a009.
- [109] Igarashi, M.; Nakagawa, N.; Doi, N.; Hattori, S.; Naganawa, H.; Hamada, M. „Caprazamycin B, a novel anti-tuberculosis antibiotic, from *Streptomyces* sp.“ *J. Antibiot. (Tokyo)* **2003**, *56*, 580-583. doi:10.7164/antibiotics.56.580.
- [110] Igarashi, M.; Takahashi, Y.; Shitara, T.; Nakamura, H.; Naganawa, H.; Miyake, T.; Akamatsu, Y. „Caprazamycins, novel lipo-nucleoside antibiotics, from *Streptomyces* sp. II. Structure elucidation of caprazamycins“. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2005**, *58*, 327-337. doi:10.1038/ja.2005.41.
- [111] Takeuchi, T.; Igarashi, M.; Naganawa, H.; Hamada, M. „Antibiotic caprazamycins and process for producing the same“. US Patent 6780616 B1, August 24, 2004.

- [112] Dutcher, J. D.; von Saltza, M. H.; Pansy, F. E. „Septacidin, a new antitumor and antifungal antibiotic produced by *Streptomyces fimbriatus*“. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1963**, *161*, 83-88.
- [113] Dutcher, J. D.; Pansy, F. E.; von Saltza, M. H. „Septacidin and derivatives thereof“. US Patent 3,155,647 A, November 3, 1964.
- [114] Suchadolnik, R. J. (1970): „Nucleoside antibiotics“. New York: Wiley-Interscience, 256-261.
- [115] Acton, E. M.; Kenneth, J. R.; Luetzow, A. E. „Antitumor septacidin analogues“. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 1362-1371. doi:10.1021/jm00221a002.
- [116] Hayakawa, Y.; Nakagawa, M.; Kawai, H.; Tanabe, K.; Nakayama, H.; Shimazu, A.; Seto, H.; Otake, N. „Studies on the differentiation inducers of myeloid leukemic cells III. Spicamycin, a new inducer of differentiation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells“. *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 934-937. doi:10.7164/antibiotics.36.934.
- [117] Hayakawa, Y.; Nakagawa, M.; Kawai, H.; Tanabe, K.; Nakayama, H.; Shimazu, A.; Seto, H.; Otake, N. „Spicamycin, a new differentiation inducer of mouse myeloid leukemia cells (M1) and human promyelocytic leukemia cells (HL-60)“. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2685-2691. doi:10.1271/bbb1961.49.2685.
- [118] Nakamura, H.; Wu, H.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. „Agelasine-A, -B, -C and -D, novel bicyclic diterpenoids with a 9-methyladeninium unit possessing inhibitory effects on Na,K-ATPase from the okinawa sea sponge *Agelas sp.*“ *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2989-2992. doi:10.1016/S0040-4039(01)81345-9.
- [119] Mangalindan, G. C.; Talaue, M. T.; Cruz, L. J.; Franzblau, S. G.; Adams, L. B.; Richardson, A. D.; Ireland, C. M.; Concepcion, G. P. „Agelasine F from a Philippine *Agelas sp.* Sponge exhibits in vitro antituberculosis activity“. *Planta. Med.* **2000**, *66*, 364-365. doi:10.1055/s-2000-8554.
- [120] Diaz-Marrero, A. R.; Austin, P.; Van Soest, R.; Matainaho, T.; Roskelley, C. D.; Roberge, M.; Andersen, R. J. „Avinosol, a meroterpenoid-nucleoside conjugate with antiinvasion activity isolated from the marine sponge *Dysidea sp.*“ *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3749-3752. doi:10.1021/ol061333p.
- [121] Wyszynski, F. J.; Lee, S. S.; Yabe, T.; Wang, H.; Gomez-Escribano, J. P.; Bibb, M. J.; Lee, S. J.; Davies, G. J.; Davis, B. G. „Biosynthesis of the tunicamycin antibiotics proceeds via unique exo-glycal intermediates“. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 539-546. doi:10.1038/NCHEM.1351.
- [122] Mueller, P. M.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C. „Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system“. *Nature* **1962**, *194*, 979-980. doi:10.1038/194979a0.
- [123] Montal, M.; Mueller, P. „Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties“. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, *69*, 3561-3566. doi:10.1073/pnas.69.12.3561.
- [124] White, S. H.; Petersen, D. C.; Simon, S.; Yafuso, M. „Formation of planar bilayer membranes from lipid monolayers. A critique“. *Biophys. J.* **1972**, *16*, 481-489. doi:10.1016/S0006-3495(76)85703-7.

- [125] Niles, W. D.; Levis, R. A.; Cohen, F. S. „Planar bilayer membranes made from phospholipid monolayers form by a thinning process“. *Biophys. J.* **1988**, *53*, 327-335. doi:10.1016/S0006-3495(88)83110-2.
- [126] Campbell, N. A.; Reece, J. B. (2009): „Biologie“. 8., aktual. Aufl. München: Pearson Studium. 176.
- [127] Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. „Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy“. *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 705-708. doi:10.1103/PhysRevLett.29.705.
- [128] Elson, E. L.; Magde, D. „Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory“. *Biopolymers.* **1974**, *13*, 1-27. doi:10.1002/bip.1974.360130102.
- [129] Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. „Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization“. *Biopolymers.* **1974**, *13*, 29-61. doi:10.1002/bip.1974.360130103.
- [130] Rigler, R.; Mets, Ü.; Widengren, J.; Kask, P. „Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion“. *Eur. Biophys. J.* **1993**, *22*, 169-175. doi:10.1007/BF00185777.
- [131] Mets, Ü.; Rigler, R. „Submillisecond detection of single rhodamine molecules in water“. *J. Fluoresc.* **1994**, *4*, 259-264. doi:10.1007/BF01878461.
- [132] Rigler, R. „Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening applications in biotechnology“. *J. Biotechnol.* **1995**, *41*, 177-186. doi:10.1016/0168-1656(95)00054-T.
- [133] Nie, S.; Chiu, D. T.; Zare, R. N. „Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy“. *Science.* **1994**, *266*, 1018-1021. doi:10.1126/science.7973650.
- [134] Nie, S.; Chiu, D. T.; Zare, R. N. „Real-time detection of single molecules in solution by confocal fluorescence microscopy“. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2849-2857. doi:10.1021/ac00113a019.
- [135] Földes-Papp, Z.; Demel, U.; Tiliz, G. P. „Ultrasensitive detection and identification of fluorescent molecules by FCS: Impact for immunobiology“. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11509-11514. doi:10.1073/pnas.181337998.
- [136] Lakowicz, J. R. (2006): „Principles of fluorescence spectroscopy“. 3. Aufl. New York: Springer US. 798, 804-806.
- [137] Walla, P. J. (2009): „Modern biophysical chemistry. Detection and analysis of biomolecules“. Weinheim: Wiley-VCH. 168, 171.
- [138] Schwille, P.; Bacia, K. „Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Messung von Proteininteraktionen in situ“. *Zellbiologie aktuell* **2003**, *3*, 4-6.
- [139] Aragón, S. R.; Pecora, R. „Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics“. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 1791-1803. doi:10.1063/1.432357.

- [140] Seela, F.; Münster, I.; Löchner, U.; Rosemeyer, H. „8-Azaadenosine and its 2'-deoxyribonucleoside: Synthesis and oligonucleotide base-pair stability“. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 1139-1155. doi:10.1002/hlca.19980810527.
- [141] Werz, E.; Rosemeyer, H. „Specific DNA duplex formation at an artificial lipid bilayer: fluorescence microscopy after Sybr Green I staining“. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2307-2321. doi:10.3762/bjoc.10.240.
- [142] Werz, E.; Rosemeyer, H.; Brending, N.; Könemann M.; Leimann, M.; Hodge, A. (2014): „Incorporation of lipophilic single strands with different nucleolipid head groups into an artificial lipid bilayer“. [MPEG4-Video]. Zentrum virtUOS für Informationsmanagement und virtuelle Lehre, Universität Osnabrück. URL: <https://repositorium.uni-osnabrueck.de/handle/urn:nbn:de:gbv:700-2014091012807>. [Stand: 10. September 2014]
- [143] Werz, E.; Viere, R.; Gaßmann, G.; Korneev, S.; Malecki, E.; Rosemeyer, H. „Synthesis of thymidine, uridine, and 5-methyluridine nucleolipids: Tools for a tuned lipophilization of oligonucleotides“. *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96*, 872-888. doi:10.1002/hlca.201200573.
- [144] Malecki, E.; Ottenhaus, V.; Werz, E.; Knies, C.; Montilla-Martinez, M. Rosemeyer, H. „Nucleolipids of the cancerostatic 5-fluorouridine: Synthesis, adherence to oligonucleotides, and incorporation in artificial lipid bilayers“. *Chem. Biodiversity* **2014**, *11*, 217-232. doi:10.1002/cbdv.201300127.
- [145] Malecki, E.; Knies, C.; Werz, E.; Rosemeyer, H. „Mitsunobu reactions of 5-fluorouridine with the terpenols phytol and nerol: DNA building blocks for a biomimetic lipophilization of nucleic acids“. *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 2209-2220. doi:10.1002/cbdv.201300107.
- [146] Werz, E.; Rosemeyer, H. „Terminal lipophilization of a unique DNA dodecamer by various nucleolipid headgroups: Their incorporation into artificial lipid bilayers and hydrodynamic properties“. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 913-929. doi:10.3762/bjoc.11.103.
- [147] MacKellar, C.; Graham, D.; Will, D. W.; Burgess, S.; Brown, T. „Synthesis and physical properties of anti-HIV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups“. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3411-3417. doi:10.1093/nar/20.13.3411.
- [148] Sigmund, H. „Nucleosid-Farbstoff-Konjugate: Synthese und Anwendung als DNA-Sonde“, Dissertation, Universität Konstanz, Deutschland, **1992**, 52-55, 282-287.
- [149] Nawrot, B.; Michalak, O.; Olejniczak, S.; Wieczorek, M. W.; Lis, T.; Stec, W. J. „Alkylation of thymine with 1,2-dibromoethane“. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3979-3985. doi:10.1016/S0040-4020(01)00277-0.
- [150] Ti, G. S.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. „Transient protection: efficient one-flask syntheses of protected deoxynucleosides“. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316-1319. doi:10.1021/ja00369a029.
- [151] Ramzaeva, N.; Michalek, E.; Kazimierczuk, Z.; Seela, F.; Rosemeyer, H. „Hoogsteen vs. Watson-Crick base pairing: Incorporation of 2-substituted adenine- and 7-deazaadenine 2'-deoxy-β-D-ribonucleosides into oligonucleotides“. *Chem. Biodiversity* **2007**, *12*, 2725-2744. doi:10.1002/cbdv.200790222.

- [152] Korneev, S.; Rosemeyer, H. „Synthesis of functionalized lipids, and their use for a tunable hydrophobization of nucleosides and nucleic acids“. *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96*, 201-216. doi:10.1002/hlca.201100410.
- [153] Malecki, E.; Rosemeyer, H. „O-2',3'-ketal-nucleolipids of the cytostatic 5-fluorouridine: Synthesis, lipophilicity, and acidic stability“. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 1500-1512. doi:10.1002/hlca.201000121.
- [154] Mitsunobu, O.; Yamada, M. „Preparation of esters of carboxylic and phosphoric acid via quaternary phosphonium salts“. *Bull. Chem. Soc. Japan* **1967**, *40*, 2380-2382. doi:10.1246/bcsj.40.2380.
- [155] Moreau, L.; Camplo, M.; Wathier, M.; Taib, N.; Laguerre, M.; Bestel, I.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. „Real time imaging of supramolecular assembly formation via programmed nucleolipid recognition“. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14454-14455. doi:10.1021/ja805974g.
- [156] Malecki, E.; Farhat, A.; Bonaterra, G. A.; Röthlein, D.; Wolf, M.; Schmitt, J.; Kinscherf, R.; Rosemeyer, H. „Synthesis of 5-fluorouridine nucleolipid derivatives and their cytostatic/cytotoxic activities on human HT-29 colon carcinoma cells“. *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 2235-2246. doi:10.1002/cbdv.201300219.
- [157] Knies, C.; Bonaterra, G. A.; Hammerbacher, K.; Cordes, A.; Kinscherf R.; Rosemeyer, H. „Ameliorated or acquired cytostatic/cytotoxic properties of nucleosides by lipophilization“. [accepted for publication in *Chem. Biodiversity*]. doi:10.1002/cbdv.201500036.
- [158] Breitmaier, E.; Voelter, W. (1978): „¹³C-NMR Spectroscopy. Monographs in modern chemistry“, 2. Aufl., Bd. 5, Weinheim, New York: Verlag Chemie, 72-74.
- [159] Karplus, M.; Pople, J. A. „Theory of carbon NMR chemical shifts in conjugated molecules“. *J. Chem. Phys.* **1963**, *38*, 2803-2807. doi:10.1063/1.1733605.
- [160] Grant, D.; Cheney, B. „Carbon-13 magnetic resonance. VII. Steric perturbation of the carbon-13 chemical shift“. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5315-5318. doi:10.1021/ja00997a001.
- [161] Staechelin, L.; Newcomb, E. (2000): „Membrane Structure and Membraneous Organelles“. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (Hrsg.): *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville: MD, Amer. Soc. Plant Physiologists. 8-9.
- [162] Taiz, L.; Zeiger, E. (2002): „Plant Physiology“, 3. Aufl. Sunderland, Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates Inc., Publishers. 6-8.
- [163] Scheer, H. (1999): „Pigmente und Antennenkomplexe“. In: Häder, D.-P. (Hrsg.): *Photosynthese*. Stuttgart, New York: Thieme Verlag. 71-73.
- [164] Breitmaier, E. (2005): „Terpene. Aroma, Düfte, Pharmaka, Pheromone“. Weinheim: Wiley VCH Verlag. 51.
- [165] Donnan, F. G. „The theory of membrane equilibria“. *Chem. Rev.* **1924**, *1*, 73-90. doi:10.1021/cr60001a003.
- [166] Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. „Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform“. *J. Cheminform.* **2012**, *4*, 1-17. doi:10.1186/1758-2946-4-17.

- [167] Berg, C. H. (1983): „Random walks in biology“. Princeton: Princeton University Press. 51-58.
- [168] Bollmann, S.; Löllmann, M.; Sauer, M.; Doose, S. „Dimer formation of organic fluorophores reports on biomolecular dynamics under denaturing conditions“. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 12874-12882.
doi:10.1039/c1cp21111k.
- [169] Doose, S.; Barsch, H.; Sauer, M. „Polymer properties of polythymine as revealed by translational diffusion“. *Biophysical Journal*, **2007**, *93*, 1224-1234.
doi:10.1529/biophysj.107.107342.
- [170] Fernandes, M. X.; Ortega, A.; López Martínez, M. C.; García de la Torre, J. „Calculation of hydrodynamic properties of small nucleic acids from their atomic structure“. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1782-1788. doi: 10.1093/nar/30.8.1782.
- [171] Khesbak, H.; Savchuk, O.; Tsushima, S.; Fahmy, K. „The role of water H-bond imbalances in B-DNA substate transitions and peptide recognition revealed by time-resolved FTIR spectroscopy“, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5834-5842.
doi:10.1021/ja108863v.
- [172] Saenger, W. (1984): „Principles of Nucleic Acid Structure“. New York: Springer-Verlag. 368-384.
- [173] Falk, M.; Hartman, K. A. Jr. ; Lord, R. C. „Hydration of deoxyribonucleic acid. II. An infrared study“. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 387-391.
doi:10.1021/ja00887a004.
- [174] Wolf, B.; Hanlon, S. „Structural transitions of deoxyribonucleic acid in aqueous electrolyte solutions. II. The role of hydration“. *Biochemistry*, **1975**, *14*, 1661-1670.
doi:10.1021/bi00679a018.
- [175] Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, I. Jr. (2000): „Nucleic acids. Structures, properties and functions“. Sausalito, CA: University Science Books. 475-528.
- [176] Werz, E.; Rosemeyer, H. (2015): „Spontaneous accumulation of lipophilic oligonucleotides at a fluid/fluid-phase boundary“. Osnabrück: University of Osnabrück [Video; 00:19 min]. urn:nbn:de:gbv:700-2015100613602. Link:
<https://repositorium.uni-osnabrueck.de/handle/urn:nbn:de:gbv:700-2015100613602>
- [177] Mollet, H.; Grubenmann, A. (2004): „Formulierungstechnik. Emulsionen, Suspensionen, feste Formen“. 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH. 22-27.

13. Anhang

13.1. Publikationsliste und andere wissenschaftliche Arbeiten

- 2012** Werz, E.; Korneev, S.; Montilla-Martinez, M.; Wagner, R.; Hemmler, R.; Eisfeld, J.; Gall, K.; Rosemeyer, H. *Chem. Biodiversity* **2012**, *9*, 272-281, Specific DNA duplex formation at an artificial lipid bilayer: towards a new DNA biosensor technology. doi:10.1002/cbdv.201100298
- 2013** Köstler, K.; Werz, E.; Montilla-Martinez, M.; Rosemeyer, H. *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 39-61, Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides. doi:10.1002/cbdv.201100338
- Werz, E.; Viere, R.; Gassmann, G.; Korneev, S.; Malecki, E.; Rosemeyer, H. *Chem. Biodiversity* **2013**, *96*, 872-888, Synthesis of Thymidine, Uridine, and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides. doi:10.1002/hlca.201200573
- Malecki, E.; Knies, C.; Werz, E.; Rosemeyer, H. *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 1821-1848, Mitsunobu reactions of 5-fluorouridine with the terpenols phytol and nerol: DNA building blocks for a biomimetic lipophilization of nucleic acids. doi: 10.1002/cbdv.201300107
- 2014** Malecki, E.; Ottenhaus, O.; Werz, E.; Knies, C.; Montilla Martinez, M.; Rosemeyer, H. *Chem. Biodiversity* **2014**, *11*, 217-232, Nucleolipids of the cancerostatic 5-fluorouridine: synthesis, adherence to oligonucleotides, and incorporation in artificial lipid bilayers. doi:10.1002/cbdv.201300127
- Werz, E.; Rosemeyer, H. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2307-2321, Specific DNA duplex formation at an artificial lipid bilayer: fluorescence microscopy after Sybr Green I staining. doi:10.3762/bjoc.10240
- 2015** Werz, E.; Rosemeyer, H. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 913-929, Terminal Lipophilization of a Unique DNA Dodecamer by Various Nucleolipid Headgroups: Their Incorporation into Artificial Lipid Bilayers and Hydrodynamic Properties. doi:10.3762/bjoc.11.103

Videomaterial

- 2014** Werz, E.; Brending, N.; Könemann, M.; Rosemeyer, H. (2014): "Incorporation of lipophilic nucleic acid single strands with different nucleic head groups into an artificial lipid bilayer", Institut für Chemie Neuer Materialien und Zentrum für Informationsmanagement und virtuelle Lehre (virtUOS), Universität Osnabrück. FB05-Hochschulschriften. 2014-09-10T07:01:44Z [Video; 08:32 min]. urn: nbn: de: gbv: 700-2014091012807, Link: <https://repositorium.uni-osnabrueck.de/handle/urn:nbn:de:gbv:7002014091012807>.
- 2015** Werz, E.; Rosemeyer, H. (2015): "Spontaneous Accumulation of Lipophilic Oligonucleotides at a fluid/fluid-Phase Boundary". Institut für Chemie Neuer Materialien. Universität Osnabrück, FB05-Hochschulschriften 2015-10-06T06:35:06Z [Video; 00:19 min]. urn:nbn:de:gbv:700-2015100613602. Link: <https://repositorium.uni-osnabrueck.de/handle/urn:nbn:de:gbv:700-2015100613602>

Patent

- 2012** Helmut Rosemeyer, Edith Malecki, Sergej Korneev, Emma Werz, Karsten Gall, “*Reactive, lipophilic nucleoside building blocks for the synthesis of hydrophobic nucleic acids*”. Europäische Patentanmeldung, EP 12186576.0, September, 28, 2012.

Vorträge und Posterbeiträge

- 2011** Statusberichte zum Projekt “*Nucleic acid detection and isolation utilizing nucleolipids*” Ionovation GmbH, 11.04.2011; 08.11.2011; 05.12.2011
- 2012** Statusbericht zum Projekt “*Nucleic acid detection and isolation utilizing nucleolipids*” Ionovation GmbH, 19.03.2012
- 2013** Statusbericht zum Projekt “*Nucleic acid detection and isolation utilizing nucleolipids*”, Ionovation GmbH, 11.04.2013
- “*Specific DNA duplex formation at artificial lipid membranes - DNA biosensor technology, fluorescence microscopy, single molecule spectroscopy*”. Vortrag und Poster auf dem VI. Nucleinsäurechemie-Treffen, Institut für Biochemie, Universität Greifswald, 19.-20.09.2013.
- 2015** “*DNA-synthons of nucleolipids: Synthesis and incorporation of nucleic acid single strands and duplex formation of lipo-oligonucleotides at an artificial lipid-bilayer*”. Vortrag zum Instituts-Seminar, Institut für Chemie neuer Materialien, Universität Osnabrück, 12.05.2015.

13.2. Lebenslauf

Persönliche Angaben: Emma Werz
21.12.1981 in Prochladnyj (Russland)

Akademischer Werdegang:

- seit 04/2011** **Promotionsstudium** - Universität Osnabrück
Institut für Chemie neuer Materialien, Arbeitsgruppe „Bioorganische Chemie“ der Abteilung „Organische Chemie I“.
Betreuer: apl. Prof. Dr. H. Rosemeyer

Thema: „Darstellung und Verwendung von Nucleolipiden zur Lipophilisierung von Nucleinsäuren sowie deren Wechselwirkung und Duplex-Bildung an horizontalen Lipid-Bilayers und Phasengrenzen zur Entwicklung einer neuartigen RNA/DNA-Analytik“
- 03/2015 – 08/2015** **Stipendium** - Abschlussstipendium/ Promotionsstipendium der Universität Osnabrück
- 10/2006 – 02/2011** **Lehramtstudium** - Universität Osnabrück
Studiengang: Biologie und Chemie
Abschluss: Master of Education (Gymnasium).
Note: „Sehr gut“

Masterarbeit im Fach Bioorganische Chemie zum Thema:
„Terpenoid-Nucleosid Konjugate: Darstellung von DNA-Synthese-Bausteinen des N(3)-Farnesyl- und des N(3)-Geranyl-Thymidins“ Note: „Sehr gut“
Abschluss: 2-Fächer-Bachelor (Biologie/Chemie).
Note: „Gut“
- 10/2003 – 07/2006** **Biologiestudium** - Universität Osnabrück
Studiengang: Biologie der Zellen
Abschluss: Bachelor of Science.
Gesamtnote: „Gut“

Bachelorarbeit im Fach Biophysik zum Thema:
„pH-Abhängigkeit der photosynthetischen Wasser-oxidation“ Note: „Gut“
- Schulbildung:
- 04/1997 – 06/2003** Burg-Gymnasium, Bad Bentheim
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife. Gesamtnote: „Gut“

13.3. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen verwendet habe. Ich habe keine früheren Promotionsversuche unternommen und erkläre, dass diese Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Osnabrück, 23.11.2015

(Emma Werz)