

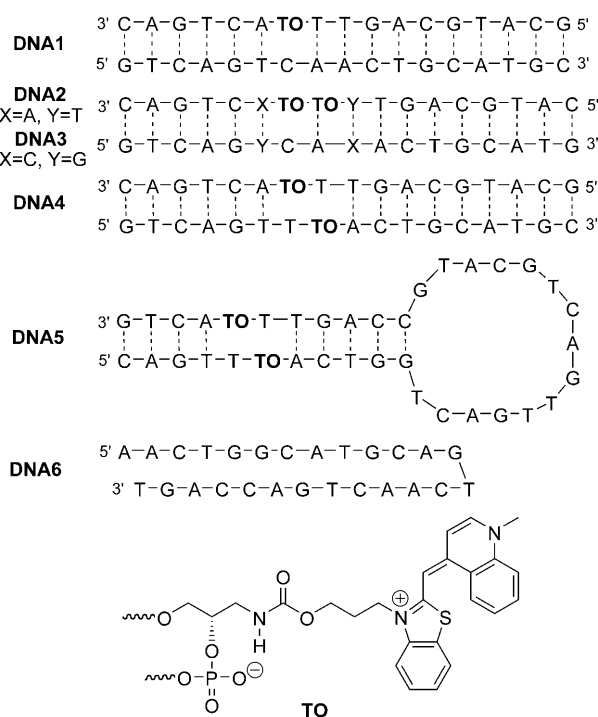
Fluoreszenz-Farbwechsel bei der DNA-Hybridisierung mit Thiazolorange als artifizieller DNA-Base**

Sina Berndt und Hans-Achim Wagenknecht*

Fluoreszierende Nucleinsäuresonden zeigen komplementäre Sequenzinformationen sowie Einzelbasenvariationen oft durch verstärkte Fluoreszenz oder Fluoreszenzlöschung an.^[1–5] Solche Unterschiede der Fluoreszenzintensität können jedoch auch von Nebeneffekten verursacht werden und dadurch Artefakte in der Fluoreszenzanalyse ergeben. Unerwünschte Fluoreszenzlöschung ist ein großes Problem insbesondere in der Zellbiologie. Deswegen sind zweifache Sonden, die ihr Emissionsmaximum (=Farbe) verändern können, prinzipiell besser geeignet für die Nucleinsäure-Bildgebung; ein Beispiel sind Molecular Beacons mit wechselnder Emissionswellenlänge.^[6] DNA-Sonden mit Intrastrang- und Interstrang-Dimeren hauptsächlich des Pyrens zeigen eine starke excimertypische Fluoreszenz^[7–11] und können auch in Molecular Beacons angewendet werden.^[12–14] Die Anregung des Pyrens erfordert jedoch hochenergetisches UV-Licht, was Anwendungen in der Bildgebung deutlich einschränkt. Deswegen wären Excimere mit Anregungswellenlängen > 450 nm in DNA sehr wünschenswert. Wir berichteten kürzlich, dass Excimere des Perylenbisimids in DNA die Fluoreszenz um ca. 100 nm verschieben, womit Einzelbasenvariationen nachgewiesen und quantifiziert werden können.^[15] Perylenbisimid ist jedoch in der Lage, Guanin zu oxidieren, weswegen in der Nähe von Guaninen niedrige Quantenausbeuten beobachtet werden.^[16,17] Thiazolorange (TO) stellt eine vielversprechende Alternative dar, da es kein ausreichendes Potenzial für die photoinduzierte Oxidation von DNA aufweist. Bisher wurde TO kovalent mit den Phosphodiesterbrücken^[19] sowie mit dem 5'-Ende^[20] von Oligonucleotiden verknüpft. Darüber hinaus wurde TO an DNA-bindende Peptide angeknüpft^[21,22] und als Basensurrogat in Peptidnucleinsäure (PNA) eingebaut, um Einzelbasenvariationen nachzuweisen.^[3,23]

Kürzlich haben wir die optischen Eigenschaften von TO als artifizieller DNA-Base und deren Modulation durch Elektronentransfer über kurze Reichweite beschrieben.^[24] Mit diesem TO-Basensurrogat konnten wir jedoch bei einer Anordnung als Interstrang-Dimer keine excimerartige Fluoreszenz nachweisen. Deswegen berichten wir hier über einen alternativen Ansatz, TO als DNA-Basensurrogat zu verwenden, das dann die gewünschten Eigenschaften aufweist. Wie zuvor diente (S)-1-Aminopropan-2,3-diol als acyclischer Linker zwischen den Phosphodiesterbrücken. Ähnliche Propandiol-Linker wurden auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet, um GNA (Glycolnucleinsäuren),^[25] TINA (gewundene (twisted) interkalierende Nucleinsäuren),^[26] und alkinmodifizierte Oligonucleotide für die Klick-artige postsynthetische Modifikation^[27] herzustellen, sowie durch unsere Arbeitsgruppe für den Einbau fluoreszierender DNA-Basensubstitutionen.^[15,28] Der Linker wurde an das Thiazol des TO-Farbstoffs angeknüpft (Schema 1). Wir synthetisierten daraus das entsprechende Phosphoramidit als DNA-Baustein, mit dem die Herstellung der TO-modifizierten Oligonucleotide für **DNA1–DNA5** durch automatisierte Synthese mit verlängerten Kupplungszeiten gelang.

DNA1 enthält eine einzelne TO-Modifikation und dient als Referenz für **DNA2–DNA4**, um deren dimere TO-Basensubstitutionen zu studieren. Die TO-modifizierte **DNA5** enthält eine Haarnadel ähnlich der in einem Molecular Beacon, die zusammen mit dem unmodifizierten Gegenstrang **DNA6** in einem ersten Experiment der Fluoreszenzanalytik



Schema 1. Sequenzen der TO-modifizierten Doppelstränge **DNA1–DNA5** und der unmodifizierten **DNA6**.

[*] S. Berndt, Prof. H.-A. Wagenknecht
Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-4617
E-Mail: achim.wagenknecht@chemie.uni-regensburg.de
Homepage:
<http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/Wagenknecht/>

[**] Für die finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, den Fonds der Chemischen Industrie und die Universität Regensburg wird gedankt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200805981> zu finden.

verwendet wurde. Die komplementäre Basensequenz zwingt die beiden TO-Chromophore miteinander wechselzuwirken, entweder benachbart im gleichen Strang (**DNA2** und **DNA3**) oder zwischen den Strängen (**DNA4** und **DNA5**). Deswegen zeigen die UV/Vis-Spektren von **DNA2–DNA5** (Abbildung 1) bei 20 °C bemerkenswerte Unterschiede im Vergleich

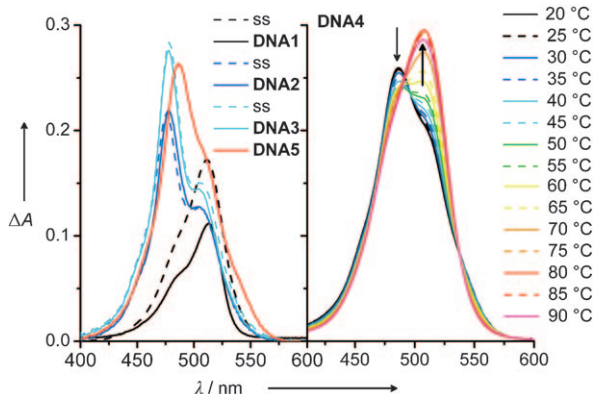


Abbildung 1. UV/Vis-Absorptionsspektren der einzel- und doppelsträngigen **DNA1–DNA3/DNA5** (links) und **DNA4** (temperaturabhängig, rechts), 2.5 μ m in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7; ss = Einzelstrang.

zu **DNA1**. Die Absorption eines einzelnen TO-Chromophors in **DNA1** zeigt Banden bei 486 nm und 507 nm, die den vibronischen 0 \rightarrow 1- und 0 \rightarrow 0-Übergängen dieses Farbstoffs zugeordnet werden können. Die Dehydridisierung dieses Doppelstrangs bei höheren Temperaturen vermindert die Absorbanz bei 507 nm nur wenig (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Im Vergleich dazu sind die beiden Hauptabsorptionsbanden der TO-Dimere in **DNA2–DNA5** nicht wesentlich verschoben, zeigen aber deutlich veränderte Intensitäten. Ein ähnliches Verhalten wurde in Aggregaten von Cyanin-Farbstoffen^[29] und mit dimeren Cyanin-Konjugaten (z. B. TOTO, TO-Dimer-Konjugat), die nicht-kovalent an DNA binden,^[30–32] beobachtet. Die Absorptionsspektren von **DNA2–DNA5** zeigen demnach starke excitonische Wechselwirkungen der beiden TO-Chromophore, die sowohl in Intrastrang-Dimeren (**DNA2/DNA3**) als auch in Interstrang-Dimeren (**DNA4/DNA5**) auftreten. Es ist jedoch wichtig hervorzuheben, dass die Farbstoff-Interaktionen sich doch ein wenig unterscheiden, was aus den geringfügigen Verschiebungen der Absorptionsmaxima (478 nm bei **DNA2/DNA3** und 486 nm bei **DNA4/DNA5**) ersichtlich wird. Die Wechselwirkung zweier benachbarter TO-Chromophore existiert auch in den Einzelsträngen von **DNA2** und **DNA3**. Demgegenüber kann die Dehydridisierung der Interstrang-Dimere in **DNA4** und **DNA5** bei 507 nm beobachtet werden, und zwar bei einer ähnlichen Temperatur wie die kooperative Dehydridisierung des gesamten Doppelstrangs (Tabelle 1 und Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Die Absorptionsbanden verändern sich dann derart, wie es für einzelne TO-Farbstoffe in einem Oligonucleotid charakteristisch ist. Dieses Ergebnis stützt die Vorstellung, dass die Wechselwirkungen der TO-Chromophore von der Doppelstrangstruktur als strukturellem Rahmen abhängen.

Tabelle 1: Schmelztemperaturen (T_m), Quantenausbeuten (Φ_F) und Helligkeit (B) von **DNA1–DNA6**.

Doppelstrang	T_m [°C]		Φ_F	$B^{[c]}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
	260 nm	507 nm		
DNA1	65.5 ^[a]	–	0.217	5800
DNA2	60.5	–	0.041	2400
DNA3	65.0	–	0.054	3800
DNA4	69.4 ^[a]	70.5	0.080	8200
DNA5	77.0	77.0	0.077	7900
DNA5-6	83.0 ^[b]	–	0.073	7000

[a] Der entsprechende unmodifizierte DNA-Doppelstrang, der G anstelle von TO enthält, wies $T_m = 67.5$ °C auf. [b] Ein zweiter Übergang wurde bei 52.0 °C beobachtet. [c] $B = \epsilon_{490nm} \Phi_F$.

Wenn die einzelsträngige **DNA1** bei 490 nm angeregt wird, zeigt das Fluoreszenzspektrum die TO-typische grüne Emission mit einem Maximum bei 530 nm (Abbildung 2). Demgegenüber werden die Spektren von **DNA4** und **DNA5**,

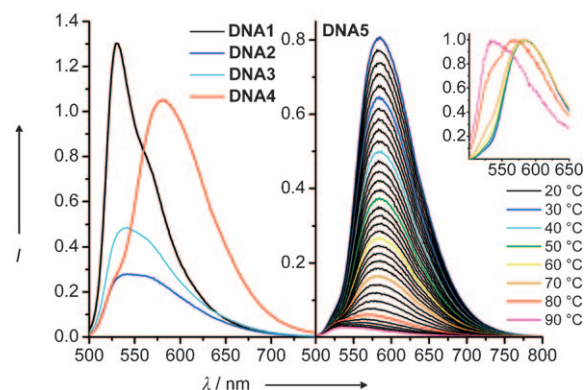


Abbildung 2. Fluoreszenzspektren der Doppelstränge **DNA1–DNA4** (links) und temperaturabhängige Spektren von **DNA5** (rechts), 2.5 μ m in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, Anregung bei 490 nm. Der Einschub zeigt die normalisierte temperaturabhängige Fluoreszenz von **DNA5**.

die beide ein TO-Interstrang-Dimer enthalten, von einer orangefarbenen Emission dominiert, deren breite Bande bei 580 nm nicht die TO-typische Feinstruktur aufweist. Außerdem ist die Lebenszeit der Fluoreszenz von **DNA4** ($\tau = 2.83$ ns) gegenüber der von **DNA1** ($\tau = 1.55$ ns) deutlich verlängert.^[33] Aufgrund dieser Beobachtungen ordnen wir die Fluoreszenz von **DNA4** und **DNA5** einer excimerartigen Emission der Interstrang-Dimere von TO zu. Gleichzeitig mit der kooperativen thermischen Dehydridisierung des Doppelstrangs (Tabelle 1) verschwindet auch die excimerartige Fluoreszenz von **DNA4** und **DNA5** und wird durch die Monomerbande ersetzt (Abbildung 2). Interessanterweise zeigt **DNA5** bei Temperaturen im Bereich des T_m -Wertes aufgrund der Koexistenz der monomeren und dimeren Form von TO eine duale (gelbe) Emission. Offensichtlich ist der intakte helikale Doppelstrang als struktureller Rahmen für die excimerartige Fluoreszenz von TO in DNA notwendig. Unseres Wissens wurde über die excimerartige Fluoreszenz des TO-

Farbstoffs in DNA bisher nicht berichtet, obwohl excitonische Wechselwirkungen mehrere Male beschrieben worden sind, wie z. B. an den nicht-kovalent bindenden TO-Konjugaten (wie TOTO).^[30–32]

Im Unterschied zu den Interstrang-Dimeren in **DNA4** und **DNA5** zeigen die Fluoreszenzspektren der TO-Dimere, die in einem Strang von **DNA2** und **DNA3** angeordnet sind, hauptsächlich Fluoreszenzlöschung, die auf die Aggregation der TO-Farbstoffe zurückzuführen ist, und keine Bildung von Excimeren. Es gibt dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen der A-T-Umgebung des TO-Dimers in **DNA2** und der G-C-Nachbarschaft in **DNA3**. Beide Doppelstränge zeigen jedoch deutliche excitonische Wechselwirkungen in den Absorptionsspektren (siehe oben). Das bedeutet, dass Grundzustandswechselwirkungen der beiden TO-Chromophore nicht automatisch auch excimerartige Fluoreszenzen ergeben. Ansonsten hätte eine excimerartige Fluoreszenz auch mit den TO-Dimer-Konjugaten (wie TOTO) beobachtet werden müssen.^[31,32]

Die Destabilisierung, die durch einen einzelnen TO-Farbstoff in **DNA1** verursacht wird, beträgt nur 2.0°C im Vergleich zum vollständig unmodifizierten Doppelstrang (Tabelle 1). Noch erstaunlicher ist die Beobachtung, dass der zweifach modifizierte Doppelstrang **DNA4** um 3.9°C stabiler ist als **DNA1**, was auf die hydrophoben Wechselwirkungen der beiden TO-Chromophore zwischen den beiden Strängen zurückzuführen ist. Das ist bemerkenswert vor dem Hintergrund, dass einzelne Glycol-Modifikationen die Doppelstrangstabilität normalerweise stark destabilisieren.^[25,28] Offensichtlich kann der Verlust der Doppelstrangstabilität, der durch den Glycol-Linker verursacht wird, durch die Stapelwechselwirkungen zwischen den beiden TO-Chromophoren wiedergewonnen werden. Das bedeutet, dass die TO-Dimere in **DNA4** und **DNA5** als hydrophob und diagonal wechselwirkende Basenpaare angesehen werden können, die von einem Fluoreszenzsignal als Resultat der Interaktion beider Stränge begleitet wird. Die hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 486 nm ergibt zusammen mit der Rotverschiebung der excimerartigen Fluoreszenz nach 580 nm eine Stokes-Verschiebung von 94 nm für **DNA4** und **DNA5**. Dies ist ein bemerkenswerter Wert für einen organischen Chromophor. Darüber hinaus ist die Helligkeit der fluoreszierenden TO-Paare vergleichbar mit einzelnen TO-Markierungen in DNA (Tabelle 1).

Als erstes analytisches Experiment wurde die Haarnadel **DNA5** für eine Titration verwendet (Abbildung 3 und S2). Die Sequenz von **DNA5** enthält kurze Abschnitte im Stammbereich, die selbstkomplementär sind und die die charakteristische orangefarbene excimerartige Emission aufweisen. Während der Titration mit der unmodifizierten **DNA6** öffnet sich die Haarnadel **DNA5**. Nach der Zugabe von 4.9 Äquivalenten **DNA6** ist die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums abgeschlossen. Die vollständig komplementäre **DNA5-6** wird dann durch den Wechsel der Emissionsfarbe von 580 nm (orange) nach 530 nm (grün), der charakteristischen Emission des TO-Monomers, sichtbar.

Zusammengefasst führt die photophysikalische Wechselwirkung zweier TO-Chromophore, die als artifizielle DNA-Basen eingesetzt werden, zu einer deutlichen Änderung ihrer

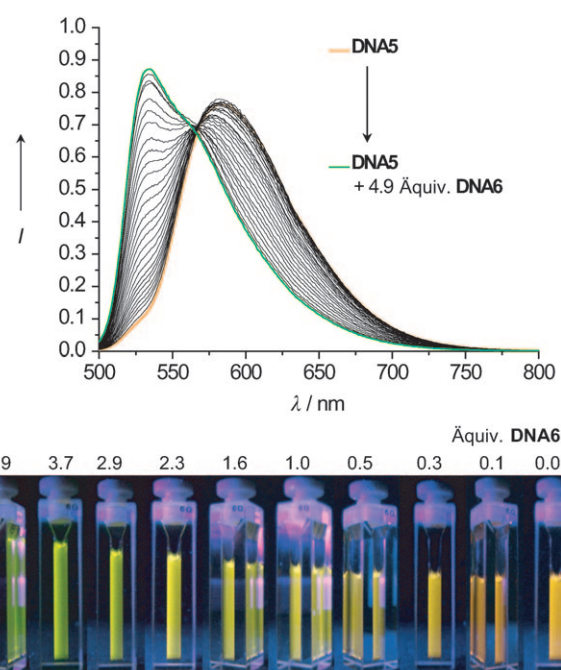


Abbildung 3. Fluoreszenzspektren der Titration von **DNA5** (2.5 μM mit sich selbst hybridisierter Doppelstrang) mit bis zu 4.9 Äquivalenten **DNA6** (bezogen auf Einzelstrang) in Teilschritten von 0.05–0.4 Äquiv., in 10 mM Na-P_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20°C, Anregung bei 490 nm.

optischen Eigenschaften. Wenn die TO-Dimere in einem Strang angeordnet sind – wie in **DNA2** und **DNA3** –, zeigen sie eine starke excitonische Wechselwirkung, die eine Fluoreszenzlöschung bewirkt. Die Interstrang-TO-Dimere in **DNA4** und **DNA5** zeigen sowohl starke excitonische Wechselwirkungen als auch rotverschobene, excimerartige Emissionen. Darüber hinaus können diese TO-Dimere als hydrophob und diagonal wechselwirkende Basenpaare angesehen werden, die den Doppelstrang stabilisieren und ein deutliches Fluoreszenzsignal bei der DNA-Hybridisierung zeigen. Die große Stokes-Verschiebung in **DNA4** und **DNA5** von fast 100 nm in Kombination mit einer Helligkeit, die derjenigen einzelner TO-Markierungen in DNA ähnlich ist, macht das TO-Paar zu einer vielversprechenden Fluoreszenzsonde für Anwendungen in der molekularen Diagnostik (z. B. auf Mikroarrays) und für die Bildgebung in der chemischen Zellbiologie, z. B. durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie oder Einzelmolekülspektroskopie.

Eingegangen am 8. Dezember 2008

Online veröffentlicht am 19. Februar 2009

Stichwörter: DNA · Excimere · Excitonen · Molecular Beacons · Thiazolorange

- [1] Siehe Übersichtsartikel: a) S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308; b) T. Heyduk, E. Heyduk, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 171–176; c) M. K. Johansson, R. M. Cook, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3466–3471; d) W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547–553.

- [2] Siehe Übersichtsartikel: a) K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1623–1633; b) R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, 5487–5502; c) M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 8052–8060; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7842–7849.
- [3] a) O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69–77; b) D. V. Jarikote, N. Krebs, S. Tannert, B. Röder, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 300–310; c) E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Röglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 318–330.
- [4] A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Ochi, K. Kanatami, I. Saito, *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 122–127.
- [5] B. Venkatesan, Y. J. Seo, B. H. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 648–663.
- [6] a) S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191–1196; b) J. R. Epstein, I. Biran, D. R. Walt, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 3–36; c) A. A. Martí, S. Jockusch, N. Stevens, J. Ju, N. J. Turro, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 402–409.
- [7] H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2006**, 2768–2770.
- [8] a) I. Trkulja, R. Häner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7982–7989; b) V. L. Malinovsky, F. Samain, R. Häner, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4548–4551; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4464–4467.
- [9] K. V. Balakin, V. A. Korshun, I. I. Mikhalev, G. V. Maleev, A. D. Malakhov, I. A. Prokhorenko, Y. A. Berlin, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 771–778.
- [10] a) K. Yamana, T. Iwai, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, H. Nakano, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1266–1273; b) K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, *Chem. Commun.* **2005**, 2509–2511.
- [11] K. Seio, M. Mizuta, K. Tasaki, K. Tamaki, A. Ohkubo, M. Sekine, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8287–8293.
- [12] K. Fujimoto, H. Shimizu, M. Inouye, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3271–3275.
- [13] Y. Chen, C. J. Yang, Y. Wu, P. Conlon, Y. Kim, H. Lin, W. Tan, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 355–359.
- [14] P. Conlon, C. J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A. A. Martí, S. Jockusch, N. J. Turro, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 336–342.
- [15] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2652–2654; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2612–2614.
- [16] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191–4194.
- [17] T. A. Zeidan, R. Carmieli, R. F. Kelley, T. M. Wilson, F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13945–13955.
- [18] Oxidationspotential ($\text{TO}^+/\text{TO}^{2+}$) von 1.4 V (vs. NHE) in Kombination mit $E_{00} = 2.4$ V, siehe: K. Hosoi, A. Hirano, T. Tani, *J. Appl. Phys.* **2001**, *90*, 6197–6204.
- [19] R. Lartia, U. Asseline, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2270–2281.
- [20] a) W. R. Algar, M. Massey, U. J. Krull, *J. Fluoresc.* **2006**, *16*, 555–567; b) U. Asseline, M. Chassignol, Y. Aubert, V. Roig, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1949–1957.
- [21] a) L. M. Wittenhagen, J. R. Carreon, E. G. Prestwich, S. O. Kelley, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2598–2602; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2542–2546; b) J. R. Carreon, K. M. Stewart, K. P. Mahon, S. Shin, S. O. Kelley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5182–5185.
- [22] J. Brunner, J. K. Barton, *Biochemistry* **2006**, *45*, 12295–12302.
- [23] N. Svanvik, J. Nygren, G. Westman, M. Kubista, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 803–809.
- [24] F. Menacher, M. Rubner, S. Berndt, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4263–4266.
- [25] a) L. Zhang, A. E. Peritz, P. J. Carroll, E. Meggers, *Synthesis* **2006**, 645–653; b) M. K. Schlegel, L.-O. Essen, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8158–8159.
- [26] a) V. V. Filichev, U. B. Christensen, E. B. Pedersen, B. R. Babu, J. Wengel, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1673–1679; b) I. Géci, V. V. Filichev, E. B. Pedersen, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6379–6386.
- [27] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3491–3493; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442–3444.
- [28] a) R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744–751; b) C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, 2051–2054; c) C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 48–50.
- [29] a) W. West, S. Pearce, *J. Phys. Chem.* **1965**, *69*, 1894–1903; b) W. J. Harrison, D. L. Mateer, G. J. T. Tiddy, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 2310–2321; c) T. Sagawa, H. Tobata, H. Ihara, *Chem. Commun.* **2004**, 2090–2091; d) A. Fürstenberg, T. G. Deligeorgiev, N. I. Gadjev, A. A. Vasilev, E. Vauthey, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8600–8609.
- [30] a) L. D. Simon, K. H. Abramo, J. K. Sell, L. B. McGown, *Bio-spectroscopy* **1998**, *4*, 17–25; b) A. Fürstenberg, M. D. Julliard, T. G. Deligeorgiev, N. I. Gadjev, A. A. Vasilev, E. Vauthey, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7661–7669.
- [31] H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, M. A. Quesada, R. P. Haugland, R. A. Thies, A. N. Glazer, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2803–3812.
- [32] S. Ikeda, T. Kubota, K. Kino, A. Okamoto, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1719–1725.
- [33] Die Abklingkurven wurden mithilfe zweier exponentieller Lebenszeiten (τ_1 , τ_2) analysiert, aus denen eine Durchschnittslebenszeit entsprechend $\tau = A_1\tau_1 + A_2\tau_2$ berechnet wurde.