



Entwicklung Zweiphotonen-spaltbarer Linker zur Erzeugung von  
lichtinduzierten Strangbrüchen in Oligonukleotiden und deren biologische  
Anwendung

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Xenia Maria Magdalena Weyel**

Frankfurt am Main, 2018  
(D30)



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

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Grininger

Datum der Disputation: 05.07.2018



*„Ich habe gelernt, dass der Weg des Fortschritts weder kurz noch unbeschwerlich ist“*

*Marie Curie (1867 – 1934)*

*polnisch-französische Physikerin und Chemikerin*

*Meiner Familie*



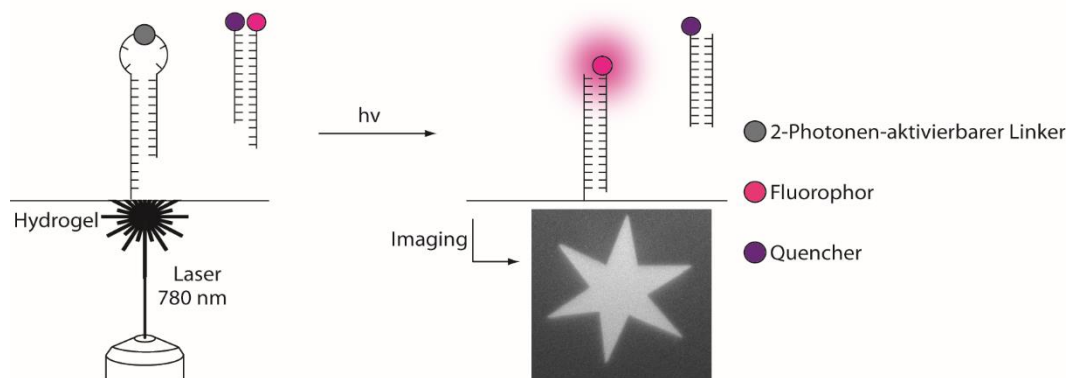
## Zusammenfassung

Um molekulare Mechanismen in biologischen Prozessen zu verstehen, ist es unerlässlich biologisch aktive Verbindungen zu kontrollieren. Dabei spielt besonders die Aktivierung bzw. Desaktivierung von Genabschnitten eine zentrale Rolle in der gegenwärtigen chemischen, biologischen und medizinischen Forschung. Nukleinsäuren sind dabei offenkundige Zielmoleküle, da sie die Genexpression auf unterster Ebene regulieren und auf vielfältige Art und Weise an biologischen Prozessen beteiligt sind. Um solch eine genaue Steuerung zu erreichen, werden Nukleinsäuren häufig photolabil modifiziert und unter die Kontrolle von Licht gebracht. Da hochentwickelte Technologien es erlauben Photonen bestimmter Energie unter präziser räumlicher und zeitlicher Auflösung zu dosieren, ist Licht als nicht invasives Triggersignal ein besonders geeignetes Werkzeug um molekulare Prozesse zu kontrollieren.

Die Verwendung photolabiler Schutzgruppen („cage“)<sup>1</sup> ermöglicht es, diese lichtaktivierbaren Nukleinsäuren („caged compound“) herzustellen. Üblicherweise werden Oligonukleotide damit an funktionsbestimmenden Stellen versehen, woraufhin die Funktion der Oligonukleotide unterdrückt wird. Die biologische Aktivität kann durch Bestrahlung mit Licht wieder hergestellt werden, da die photolabile Schutzgruppe durch den Lichtimpuls abgespalten wird. Neben der zeitweiligen Maskierung der Nukleinsäureaktivität existiert auch eine Methode, die als „photoaktivierbarer Strangbruch“ („caged strand break“) bezeichnet wird. Dabei werden mit Hilfe von photolabilen Linkern („Verknüpfers“) lichtinduzierte Strangbrüche in Oligonukleotiden ausgelöst, um so beispielsweise die Struktur eines Nukleinsäurestrangs zu zerstören. Die Idee der photoaktivierbaren Strangbrüche ist nicht neu, dennoch werden photolabile Schutzgruppen überwiegend nach der erstgenannten Strategie verwendet. Im Rahmen dieses Promotionsvorhabens wurden neue photosensitive Linkerbausteine für Oligonukleotide entwickelt und hergestellt, welche sich vor allem im Hinblick auf die Anwendbarkeit in lebenden biologischen Systemen von den bisherigen photolabilen Linkern unterscheiden.

Im ersten Projekt wurde ein nicht-nukleosidischer, photolabiler Linker, basierend auf dem Cumaringrundgerüst, entwickelt. Das Ziel war hier, vor allem, einen zweiphotonenaktiven Linker für biologische Anwendungen und Zweiphotonen-Fragestellungen nutzbar zu machen. Bisherige Zweiphotonen-Linker konnten hauptsächlich nur für Proteinverknüpfungen<sup>2-4</sup> bzw. Neurotransmitter<sup>5-7</sup> verwendet werden oder mussten chemisch umständlich (z.B. Click-Chemie) und postsynthetisch in Oligonukleotide eingeführt werden. Der neu entwickelte Zweiphotonen-Linker wurde als Phosphoramiditbaustein für die Oligonukleotid-Festphasensynthese synthetisiert, was einen problemlosen und automatisierten Einbau garantiert. Mit einem modifizierten

Oligonukleotide konnten die photochemischen Eigenschaften des Linkers bestimmen und mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Verdrängungsassays und Lasertechniken der Zweiphotonen-Effekt visualisiert werden. Dazu wurde ein Hairpin-DNA-Strang hergestellt, welcher eine Linkermodifikation im Bereich der Loopregion enthält. Durch eine Thiolmodifikation am 5'-Ende des Oligonukleotidstranges war es möglich, diesen in einem Maleimid-funktionalisierten Hydrogel zu fixieren. Ein DNA-Duplex mit einem Fluorophor/Quencherpaar und einer korrespondierenden Sequenz zum modifizierten Hairpin-Strang wurde ebenfalls dem System zugegeben, allerdings wurde dieser nicht fixiert, um Diffusion zu ermöglichen. Durch die räumliche Nähe des Fluorophors zum Quencher konnte im unbelichteten Zustand zunächst keine Fluoreszenz gemessen werden. Mit einem (Femtosekunden-)gepulsten Laser und dem damit verbundenen Bindungsbruch im Hairpin-Strang durch Zweiphotonen-Effekte wurde es dem fluoreszierenden Strang des DNA-Duplex ermöglicht, sich vom Quencher-Strang zu lösen und an den fixierten Strang zu hybridisieren. Das Photolyse-Ereignis konnte so in ein lokales Fluoreszenzsignal übersetzt und detektiert werden (Abb1).



**Abbildung 1.** Visualisierung des Zweiphotonen-Effekts im Hydrogel

Der eindeutige Beweis, dass es sich tatsächlich um ein Zweiphotonen-induziertes Ereignis handelt, konnte durch die dreidimensional aufgelöste Photolyse und über die quadratische Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der eingestrahelten Laserleistung erbracht werden.

Die generelle Kompatibilität des Cumarin-Linkers mit biologischen Systemen konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden. Dazu wurde eine Transkriptionsfaktor-DNA Decoy-Strategie entwickelt, in der Linker-modifizierte DNA Decoys an regulatorische Transkriptionsfaktoren binden und diese aber auch photochemisch wieder freisetzen können („catch and release-Strategie“). Zellkulturexperimente, um mit dieser Methode das Transkriptionsfaktor-gesteuerte und endogene Gen für Cyclooxygenase-2 (COX2) zu regulieren,

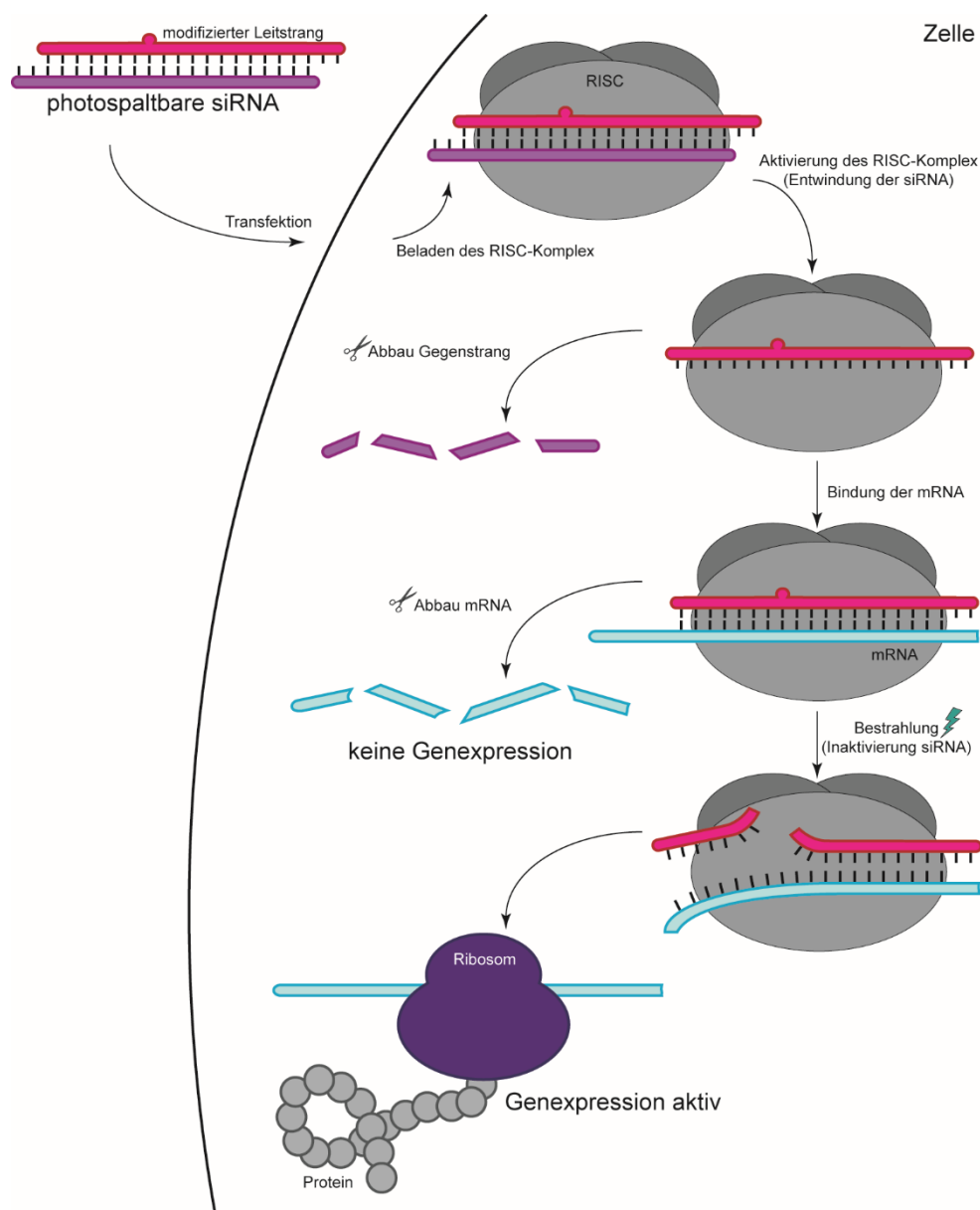


lieferten keine aussagekräftigen Ergebnisse. Daher wurden die verwendeten Zellen dahingehend manipuliert, sodass sie das Protein GFP (grün fluoreszierendes Protein) in Abhängigkeit von der Anwesenheit eines Transkriptionsfaktors exprimieren. Das so durch die Zellen verursachte Fluoreszenzsignal steht in direkter Abhängigkeit zur Decoy-Aktivität. Mit Hilfe modifizierter GFP-Decoys konnte hierbei eine Regulation auf Transkriptionsebene in biologischen Organismen erreicht werden. Mit dem Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA), einer molekularbiologischen *in vitro*-Analysetechnik, wurden die Interaktionen zwischen modifizierten Decoys und dem Transkriptionsfaktor untersucht.

Die Vorteile des Cumarin-Linkers sind besonders die simple Handhabung in der Herstellung modifizierter Oligonukleotide und die Zweiphotonen-Aktivierbarkeit. Allerdings sind nicht-nukleosidische Linker *per se* ungeeignet für Oligonukleotid-gesteuerte Erkennungsprozesse, die auf der spezifischen Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Nukleobasen oder des Zucker-Phosphat-Rückgrats beruhen. Dussy *et al.* entwickelten einen photospaltbaren Nukleotidbaustein, welcher einerseits eine Nukleinsäurestruktur aufweist, aber gleichzeitig, aufgrund der Photochemie eines *ortho*-Nitrobenzylesters, Strangbrüche in DNA erzeugen kann („caged DNA strand break“).<sup>8</sup> Trotz zahlreicher, möglicher Anwendungen sind keine weiteren nukleosidischen Linker bekannt und die vorangegangene Forschung fokussierte sich vornehmlich auf DNA-Applikationen. Daher sollte im zweiten Projektteil dieses Promotionsvorhabens ein nukleosidischer und photospaltbarer Linkerbaustein, speziell auf die Erfordernisse von RNA-Anwendungen angepasst, entwickelt werden („caged RNA strand break“). Aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften des Zweiphotonen-Effekts sollte auch dieser Linker Zweiphotonen-Aktivität aufweisen. Daher wurde der lichtsensitive Baustein aufgebaut aus der Zweiphotonen-aktiven Nitrodibenzofuran-Schutzgruppe (NDBF), verknüpft mit der 5'-Position des Zucker-Phosphat-Rückgrats eines 2'-OMe-Uridins. Ziel dieses Projektteils war es, mit diesem Baustein eine photospaltbare siRNA zu entwickeln, mit deren Aktivität der Prozess der RNA-Interferenz (RNAi) kontrolliert, bzw. zeitlich terminiert werden kann.

Um eine einfache Einführung der Modifikation zu gewährleisten, wurde der RNA-Baustein als Phosphoramidit entwickelt. Dieser konnte anschließend erfolgreich in eine gegen das *AcGFP*-Gen gerichtete siRNA-Sequenz eingeführt werden. Einzelmodifikationen wurden dabei an unterschiedliche Positionen des Leitstrangs (im engl. „antisense-strand“) der siRNA eingebaut. Ziel dieses Vorgehens war es, RNA-Interferenz mit Hilfe der photolabil modifizierten siRNA innerhalb eines Organismus zu regulieren. Die aktive siRNA sollte mittels Lichtbestrahlung inaktiviert und eine zuvor inhibierten *AcGFP*-Expression in Gang gebracht werden. Im Vorfeld wurden einige *AcGFP*-

siRNA-Sequenzen mit Hilfe des „siRNA Design Leitfadens“<sup>9</sup> bestimmt und in Zellkultur getestet. Die effektivste Sequenz wurde in allen anschließenden Zellkultur-Experimenten verwendet. Schmelzpunkt- und CD-Studien der modifizierten siRNA-Doppelstränge ergaben einen geringen Einfluss der Modifikation auf Duplexstruktur und -stabilität. Eine RP-HPLC-Analyse der belichteten siRNA-Einzelstränge zeigte eine saubere Photolyse, während durch anschließende massenspektroskopische Untersuchungen die Photolyseprodukte bestimmt werden konnten. In Zellkultur wurden die an unterschiedlichen Positionen modifizierten siRNA-Sequenzen getestet. Die folgende Abbildung 2 verdeutlicht das Prinzip der kontrollierbaren RNA-Interferenz mittels photospaltbarer siRNA.



**Abbildung 2.** Termination der RNA-Interferenz mittels photospaltbarer siRNA: Der mit dem photospaltbaren Baustein modifizierte siRNA-Leitstrang hybridisiert mit einem komplementären Gegenstrang und bildet so die reife siRNA. Diese

wird nach Transfektion in die Zelle von Proteinen der Argonaut-Familie erkannt und aufgenommen. Der sich dabei bildende Protein-RNA-Komplex wird als „RNA-induced silencing complex“ (RISC) bezeichnet. Die Aktivierung des RISC-Komplexes geschieht durch die Entwindung der siRNA. Während der unmodifizierte siRNA-Gegenstrang den Komplex verlässt und abgebaut wird, verbleibt der modifizierte siRNA-Leitstrang im Komplex. Der aktive RISC erkennt die zum Leitstrang komplementäre Sequenz der Ziel-mRNA, nimmt diese durch Hybridisierung auf und baut sie letztendlich ab. Dadurch wird die Produktion des von der mRNA codierenden Gens ausgeschaltet („Gen-Knockdown“). Wird dieses System nun mit Licht bestrahlt, so führt dies zu einem Strangbruch innerhalb des modifizierten siRNA-Leitstrangs und schlussendlich zu dessen Desaktivierung. Die Ziel-mRNA wird aus dem RISC entlassen und steht der ribosomalen Translation zur Verfügung. Die zuvor inhibierte Produktion des Proteins beginnt.

In Zellkulturexperimenten diente ein *AcGFP/RFP*-Reportergenassay als Modellsystem (GFP: grün fluoreszierendes Protein, RFP: rot fluoreszierendes Protein). Dabei wurden entsprechende Plasmide mit der siRNA in HeLa-Zellen kotransfiziert. Die gegen *AcGFP*-gerichtete siRNA regulierte dabei lediglich die *AcGFP*-mRNA, während die *RFP*-mRNA unbeeinflusst blieb. Die durch das RFP verursachte Fluoreszenz konnte somit als Normierung verwendet werden.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Einführung der photospaltbaren Modifikation an spezifischer Position, den katalytische Schritt der RNA-Interferenz, die mRNA-Spaltung, nicht unterbindet. Die Aktivität der modifizierten siRNA entsprach dabei in etwa der der nativen Form. Unbestrahlte HeLa-Zellen zeigten keine bzw. geringe Produktion von GFP. Bestrahlte HeLa-Zellen (365 nm, 5 Minuten, 9  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) hingegen wiesen eine drastisch gesteigerte GFP-Produktion auf. Die Ergebnisse des Experiments konnten mit Fluoreszenz-Mikroskopie visualisiert und durch Fluoreszenzmessungen im Zelllysat quantifiziert werden.

Da der im photospaltbaren Baustein verwendete NDBF-Chromophor für Zweiphotonen-Aktivität bekannt ist, wurde in einem zusätzlichen Experiment die Zweiphotonen-Desaktivierung der RNA-Interferenz in Zellkultur gezeigt. Die mit Plasmid und siRNA transfizierten Zellen wurden innerhalb eines definierten Bereichs mit einem Zweiphotonen-Laser (800 nm, 10 mW) bestrahlt. Innerhalb von 18 Stunden konnte eine immer stärker werdende GFP-Fluoreszenz im bestrahlten Bereich beobachtet werden.

## Summary

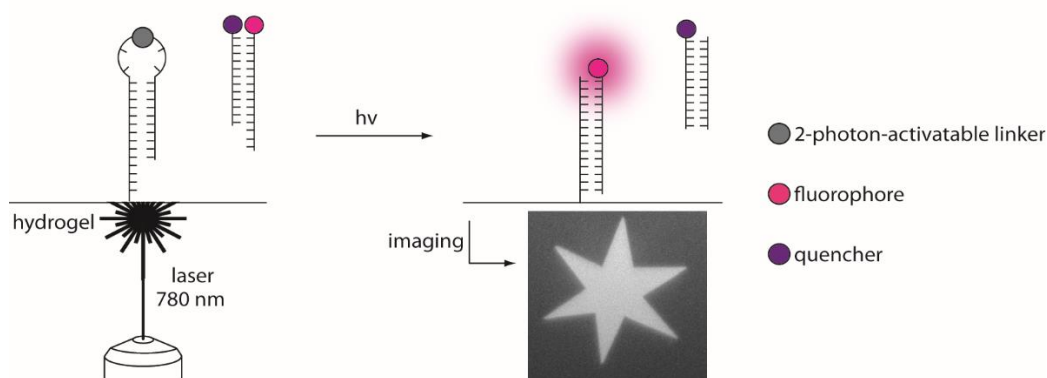
In order to understand molecular mechanisms in biological processes, it is indispensable to make biologically active compounds controllable. Especially the activation and deactivation respectively plays an important role in the present chemical, biological and medicinal research. For this, nucleic acids are apparent target molecules, because they regulate gene expression on the lowest level and participate in biological processes in multiple ways. To achieve this precise regulation, nucleic acids were usually modified photolabile for light control. As highly developed techniques enable us to dose photons of precise energy under exact spatial and temporal resolution, light, as a non-invasive trigger signal, is a suitable tool for controlling molecular processes.

The utilization of photolabile protecting groups ("cage") enables to produce such light activating nucleic acids ("caged compounds"). Oligonucleotides were typically provided with these caged compounds on function-determining positions, and consequently the function of oligonucleotides gets suppressed. The biological activity can be reactivated after irradiation with light, because the photolabile protecting group split off by the light impulse. Besides the temporary masking of nucleic acid activity, a second method, which is called "caged strand breaks", exists. Strand scissions are photochemically induced by photolabile linkers, to disturb the structure of a nucleic acid strand, for instance. The idea of photoactivatable strand breaks is not new, however, photolabile protecting groups are mostly used with the former strategy. In the course of this doctoral thesis new photosensitive linker building blocks for oligonucleotides were developed and produced, which distinguish from previous photolabile linkers especially in terms of applicability in living biological systems.

In the first project, a non-nucleosidic, photolabile linker, based on a coumarin structure, was developed. The major aim was to produce a two-photon active linker for the usage in biological applications and two-photon questions. Former two-photon linkers could mainly be used for protein linkages only or had to be introduced to oligonucleotides chemically circuitous (e.g. click chemistry) and post synthetically.

The newly developed two-photon linker was synthesized as a phosphoramidite building block for oligonucleotide solid phase synthesis to guarantee a smooth integration. The photochemical properties of the linker have been determined by a modified oligonucleotide and the two-photon effect has been visualized in a fluorescence-based strand displacement assay. For that, a hairpin DNA strand was synthesized, which included a linker modification in the loop region area. Due to a thiol modification on the 5'-end of the oligonucleotide strand it was possible to fix it in a maleimide-based hydrogel. A DNA duplex, which contained a fluorophore/quencher pair and a corresponding

sequence to the modified hairpin strand, was added to the system as well. However, it was not fixed on the hydrogel to allow diffusion. Due to the spatial proximity of the fluorophore to the quencher, no fluorescence has been detected in the unirradiated state. After the irradiation of the hydrogel and the associated strand break in the hairpin strand by a (femtosecond) pulsed laser, the fluorescent strand of the DNA duplex has been separated from the quencher strand and was able to hybridize with the fixed strand. Thus, the results of photolysis could be translated into a detectable local fluorescence signal.



**Figure 1.** Visualization of the two-photon effect in a hydrogel

The proof of a real two-photon induced event was provided by the three-dimensional resolution of the photolysis and by the quadratic dependence of the generated fluorescence signal over the irradiated laser power.

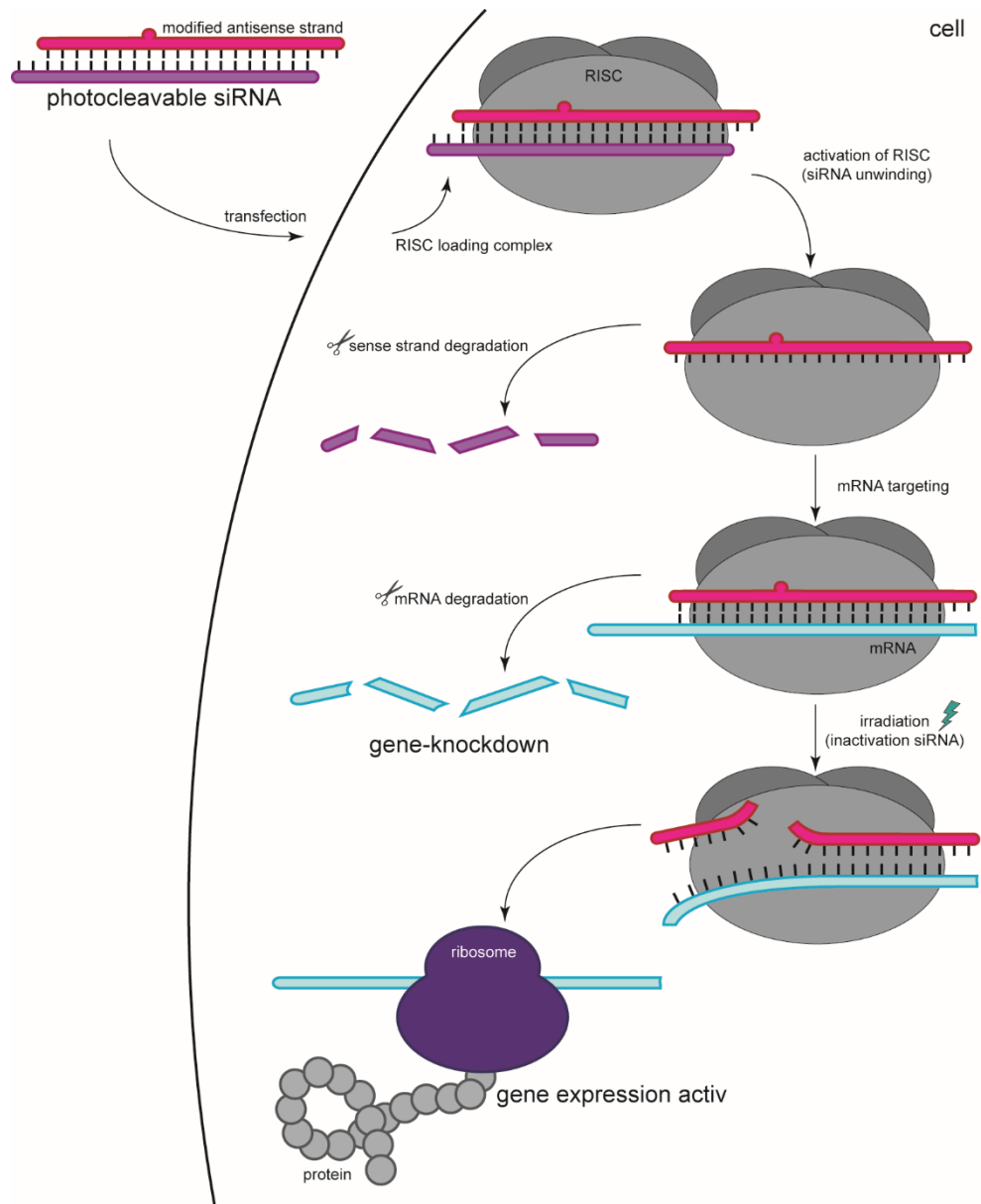
The general compatibility of the coumarin linker in biological systems could be shown in cell culture experiments. For that, a transcription factor-DNA decoy strategy has been developed, in which the linker modified DNA decoys bind to regulatory transcription factors and deliver photochemically as well (“catch and release strategy”). The first results of cell culture experiments to regulate the transcription factor-mediated and endogenous gene for cyclooxygenase-2 (COX2) were not significant. Therefore, the used cells were manipulated in such way, that they were expressing the protein GFP (green fluorescent protein) in dependency of the presence of a transcription factor. The fluorescence signal, generated by the cells, is in direct dependency to the decoy activity. By means of modified GFP decoys a regulation on the transcriptional level in the biological organism could be achieved. With EMSA (“Electrophoretic mobility shift assay”), a biomolecular *in vitro* analysis technique, DNA-protein interactions between modified decoys and transcription factors were investigated.

The advantages of the coumarin linker are especially the simple handling at the synthesis of modified oligonucleotides and the two-photon activity. However, non-nucleosidic linkers are *per se*

inapplicable to oligonucleotide-mediated relation processes, which are based on the specific formation of hydrogen bonds of the nucleobases or the sugar-phosphate-backbone. Dussy *et al.* designed a photocleavable building block, which has a nucleic acid structure on the one hand and induces strand breaks based on the photochemistry of *ortho*-nitrobenzyl esters on the other hand (“caged DNA strand breaks”).<sup>8</sup> Despite numerous application areas no other nucleosidic linkers are known and former research was mainly focused on DNA applications. Due to this fact, in the second project of these doctoral thesis a nucleosidic and photocleavable linker should be developed, which adapts to RNA applications (“caged RNA strand break”). Because of the advantageous properties of the two-photon effect, the new linker should be two-photon activatable as well. Thus, the light sensitive building block has been designed of the two-photon sensitive nitrodibenzofuran-protecting group (NDBF), coupled to the 5'-position of the sugar-phosphate-backbone of a 2'-OMe-uridine. The aim of this project part was the development of a photocleavable siRNA, which allows the control and termination of the RNA interference process.

To ensure a simple introduction of the modification, the RNA building block was designed as a phosphoramidite. This was successfully introduced into a siRNA against the *AcGFP* gene. Single modifications were incorporated at different positions of the antisense strand of the siRNA. The aim of this approach was to regulate RNA interference with photolabile modified siRNA in a living organism. The active siRNA was supposed to be inactivated by light irradiation and a previous inhibited *AcGFP* expression was supposed to be started. In advance some *AcGFP*-siRNA sequences were designed with the help of “siRNA Design Guidelines”<sup>9</sup> and tested in cell culture. The most effective sequence was used for all following cell culture experiments.

Melting point and CD studies of the modified siRNA double strands demonstrated a low influence of the modification to the duplex structure and –stability. A RP-HPLC analysis of the irradiated siRNA single strands showed a clean photolysis. Photolysis products were determined by mass spectrometry. Finally siRNA sequences, which were modified at different positions, were tested in cell culture. The following figure 2 illustrates the principle of controllable RNA interference through photocleavable siRNA.



**Figure 2.** Termination of RNA interference by photocleavable siRNA: The siRNA antisense strand, which was modified with the photocleavable building block, hybridizes with a complementary sense strand and forms mature siRNA. After transfection into cells, modified siRNA is identified and received from argonaut proteins. The formed protein-RNA-complex is called “RNA-induced silencing complex” (RISC). The activation of RISC occurs by unwinding of the siRNA duplex. The unmodified siRNA sense strand leaves the complex and is degraded, the modified antisense strand remains in the complex. The active RISC identifies target mRNA, hybridizes to complementary sequence and degrades it finally. Thereby the production of the gene, which is coded on the mRNA, is switched off (“gene knockdown”). Irradiation of this system with light, leads to a strand break within the siRNA antisense strand and finally to its deactivation. Targeted mRNA leaves the RISC and is available for translation by ribosomes. The previously inhibited production of proteins begins.

In cell culture experiments an *AcGFP/RFP* reporter gene assay served as a model system (GFP: green fluorescent protein, RFP: red fluorescent protein). Appropriate plasmids and siRNA were cotransfected into HeLa cells. The siRNA directed against *AcGFP* regulated only the *AcGFP*-mRNA, the *RFP*-mRNA remained unaffected. With this, the *RFP*-caused fluorescence could be used for normalization.

First of all it could be demonstrated that the introduction of the photocleavable modification on specific positions does not prevent the catalytic part of RNA interference, the mRNA degradation. The modified siRNA activity was roughly equivalent to the native siRNA activity. Not irradiated HeLa cells showed no or low *GFP* expression. However, irradiated HeLa cells (365 nm, 5 minutes, 9  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) offered a dramatically increased *GFP* production. The result of this experiment could be visualized through fluorescence microscopy and quantified through the fluorescence measurements of the cell lysate.

Based on the fact, that the NDBF chromophore, used in the photocleavable building block, is well-established for two-photon applications, an additional experiment for the two photon deactivation of RNA interference in cell culture was conducted. Cells, transfected with plasmid and siRNA, were irradiated within a defined region with a two photon laser (800 nm, 10 mW). Increasing GFP fluorescence could be observed within 18 hours in the irradiated section



Beiträge (Vortrag und/oder Posterpräsentation) auf folgenden wissenschaftlichen Tagungen:

DNG Doktorandenseminar, 29.-30.9.2014, Bad Herrenalb.

DNG Nukleinsäurechemie-Treffen, 19.-20.09.2015, Berlin

Indo-German Conference, 10.12.2013, Kloster Banz, Bad Staffelstein

Teile dieser Doktorarbeit sind in folgenden Publikationen erschienen:

X. M. M. Weyel, M. A. H. Fichte and A. Heckel, ACS Chem. Biol., 2017, 12, 2183–2190.



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Photolabile Schutzgruppen	2
1.1.1 Cumarin-Schutzgruppen	4
1.1.2 Nitrodibenzofuran-Schutzgruppe	8
1.1.3 Zweiphotonen-Aktivierung von photolabilen Schutzgruppen	9
1.1.4 Photolabile geschützte Oligonukleotide zur Regulation der Genexpression	12
1.2 Photospaltbare Linker zur Erzeugung lichtinduzierter Strangbrüche	18
1.3 Transkriptionsfaktoren	25
1.3.1 Der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor	26
1.3.2 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg	30
1.3.3 Die Regulation NF- $\kappa$ B-abhängiger Transkription mit Decoy-Oligonukleotiden	32
1.4 RNA-Interferenz	34
1.4.1 Mechanismus der RNA-Interferenz	34
1.4.2 Modifikationen an siRNA und lichtgesteuerte Genregulation	38
2. Motivation	40
3. Ergebnisse und Diskussion	44
3.1 Entwicklung und Anwendung eines nicht-nukleosidischen und Zweiphotonen-aktiven photospaltbaren Linkers	44
3.1.1 Design und Synthese eines photospaltbaren Bausteins für die Oligonukleotid-Festphasensynthese	44
3.1.2 Synthese Linker-modifizierter Oligonukleotide und deren Einphotonen-Charakterisierung	52
3.1.3 Zweiphotonen-Charakterisierung von Linker-modifizierten Oligonukleotiden mit Hilfe eines Verdrängungsassays im Hydrogel	61
3.1.3.1 Vorarbeiten	62
3.1.3.2 Entwicklung eines Hydrogellassays mit Linker-modifizierter Einzelstrang-DNA	63
3.1.3.3. Hydrogellassay mit Linker-modifizierter Doppelstrang-DNA und intramolekularem Schleifenmotiv	68
3.1.4 Lichtregulierte Genexpression mit Hilfe Linker-modifizierter Oligonukleotide	76
3.1.4.1 Entwicklung einer DNA-Decoy-Strategie zur Regulation von NF $\kappa$ B-kontrollierter Genexpression mit Licht	76
3.1.4.2 Design und Synthese Linker-modifizierter DNA-Decoys zur Regulation eines NF $\kappa$ B-kontrollierten Gens für GFP	77
3.1.4.3 Zellkulturexperimente mit GFP-DNA-Decoys	82

3.1.4.4. <i>In vitro</i> -Bindung der GFP-Decoys und NF- $\kappa$ B	93
3.1.4.5 DNA-Decoys zur Regulation eines NF $\kappa$ B-kontrollierten endogenen Gens für COX2	95
3.1.5 Zusammenfassung und Ausblick	100
3.2 Lichtregulierte RNA-Interferenz mit photospaltbaren RNA-Bausteinen	102
3.2.1 Motivation	102
3.2.2 Synthese eines photospaltbaren RNA-Bausteins für die Oligonukleotid-Festphasensynthese	103
3.2.3 Anwendung in der Zelle	116
3.2.3.1 Assayentwicklung	116
3.2.3.2 Design der Anti-AcGFP-siRNA	117
3.2.3.3 Festphasensynthese von NDBF-modifizierter siRNA	120
3.2.3.4 Charakterisierung des NDBF-rU-Bausteins in RNA	123
3.2.3.5 Zelleexperimente mit NDBF-modifizierter siRNA	127
3.2.4 Zusammenfassung und Ausblick	131
4. Material und Methoden	133
4.1 Organische Synthese	137
4.2 Präparative und analytische Methoden für Nukleinsäuren	155
4.2.1 Oligonukleotidsynthese	155
4.2.2 Einphotonen-Charakterisierung	159
4.2.3 Zweiphotonen-Charakterisierung	161
4.3 Zellbiologische Methoden	163
4.3.1 Kultivierung von HeLa-Zellen	163
4.3.2 Transfektion von DNA-Decoys mit Attractene	165
4.3.3 Transfektion von siRNAs mit Metafectene	166
4.3.4 Isolierung von Proteinen aus HeLa-Zellen	167
4.3.5 Isolierung von Zellkernproteinen	167
4.4 Molekularbiologische Methoden	168
4.4.1 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	168
4.5 Proteinchemische Methoden	169
4.5.1 Western Blot	169
4.6 Methoden zur Vervielfältigung und Gewinnung von Plasmid-DNA	171
4.6.1 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen	171
4.6.2 Transformation von Plasmid-DNA in E.coli	172
4.6.3 Gewinnung von Plasmid-DNA aus E.coli	172

4.7 Fluoreszenzassay	175
5. Anhang	176
5.1 Oligonukleotidsequenzen	176
5.2 Vektorkarten der Plasmide	177
5.3 Literaturverzeichnis	178
5.4 Abkürzungsverzeichnis	192
5.5 Danksagung	198
5.6 Lebenslauf	200



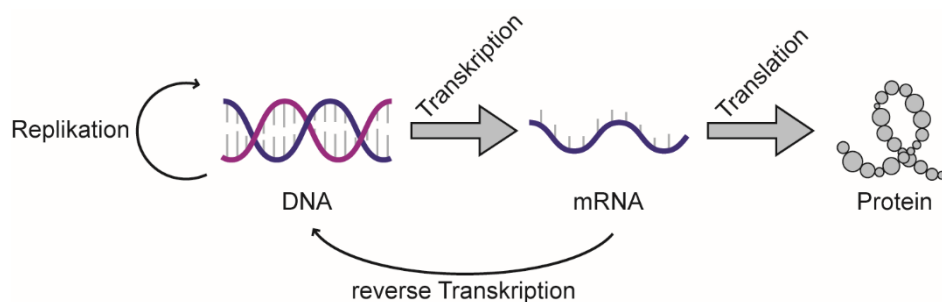






## 1. Einleitung

Eines der wichtigsten Makromoleküle des Lebens stellen die Nucleinsäuren dar. 1869 wurden sie erstmals vom Schweizer Mediziner Friedrich Miescher beschrieben. Er isolierte aus den Kernen weißer Blutkörperchen eine unbekannte Substanz und nannte sie *Nuclein*, nach dem lateinischen Wort *nucleus* (Kern). Aufgrund seiner Untersuchungen vermutete er, dass die Nucleinsäuren an der Vererbung beteiligt sind.<sup>10</sup> Wenig später erkannte Albrecht Kossel, dass das Nuclein aus vier unterschiedlichen Bausteinen und Zuckermolekülen aufgebaut ist.<sup>11</sup> 1919 konnten diese Bestandteile genauer spezifiziert werden: die Desoxyribose, Phosphorsäureester und die vier organischen Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C).<sup>12</sup> Oswald Avery wies 1944 nach, dass die Nucleinsäuren die Träger der Erbinformation sind.<sup>13</sup> Der entscheidendste Meilenstein war die Aufklärung der Struktur der DNA-Doppelhelix durch James Watson und Francis Crick im Jahre 1953.<sup>14</sup> Im gleichen Jahr entschlüsselte Frederick Sanger die Aminosäuresequenz des Insulins. Daraus resultierte die Erkenntnis, dass die Aminosäuresequenz eines Proteins durch den genetischen Code, also der Nucleinsäuresequenz, bestimmt ist.<sup>15,16</sup> 1970 formulierte Francis Crick das „zentrale Dogma der Molekularbiologie“<sup>17</sup> und beschrieb damit den allgemeinen Ablauf des Informationstransfers vom Gen bis zum Protein: Im ersten Schritt wird die DNA in RNA übersetzt (Transkription)<sup>18</sup>. Die resultierende *messenger*-RNA (mRNA) wird zunächst aus dem Zellkern geschleust und bindet anschließend an die Ribosomen im Zytoplasma, welche umgehend mit der Proteinbiosynthese beginnen (Translation). Dabei wird die Basenabfolge der mRNA in eine Aminosäuresequenz übersetzt, indem Basentriplets (Codon) erkannt werden, die jeweils für eine der 20 proteinogenen Aminosäuren codieren.<sup>19,20</sup>



**Abbildung 3.** Das „zentrale Dogma der Molekularbiologie“

Das „zentrale Dogma der Molekularbiologie“ ist in allen Zellen gültig. Eine Ausnahme bilden einige Viren, da sie keine DNA besitzen und der Informationsfluss von der RNA ausgeht. Retroviren kehren das Dogma um, welche ihre genetische Information von der RNA mittels reverser Transkription auf DNA übertragen.

Die Erkenntnisse, die wir durch dieses Prinzip gewinnen, ermöglichen die Identifikation von Genen aber auch die Analyse regulatorischer Mechanismen. Phänotypische Erscheinungen können bis zu ihrem Ursprung im Genom analysiert werden. Dies ist ausschlaggebend für die Idee synthetische Oligonukleotide als Therapeutika einzusetzen. Ebenso lassen sich mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide Gene und transkriptionelle oder translatorische Prozesse spezifisch regulieren. Dadurch wird die Erforschung genexpressorischer Systeme über die gezielte Kontrolle der Genexpression ermöglicht. Die in den 1980er Jahren entwickelte automatisierte Festphasensynthese von Oligonukleotiden ermöglicht einen einfachen Zugang zu synthetischer DNA und RNA und trägt somit maßgeblich zum Verständnis des komplexen Zusammenspiels zwischen Gen, Protein und den dazwischen liegenden Prozessen bei.

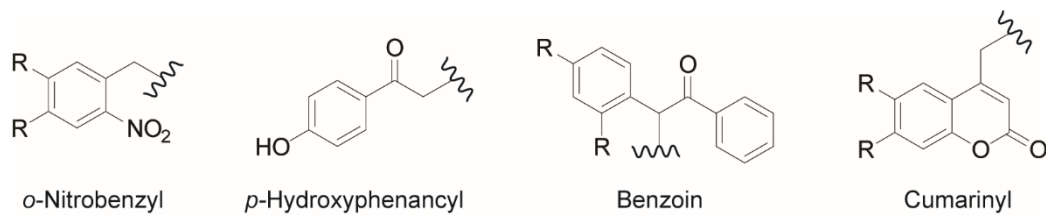
## 1.1 Photolabile Schutzgruppen

Schutzgruppen werden verwendet, um die Funktion von Molekülen zu schützen und chemische oder biochemische Akteure daran zu hindern mit den Molekülen zu interagieren. Sie können unter gewissen Bedingungen abgespalten werden und so das aktive Molekül wieder freigeben. Während die klassischen Schutzgruppen der Chemie, wie z.B. Silyl- oder Tritylschutzgruppen, einen chemischen Reaktionspartner für den Abspaltungsprozess benötigen, wird die Abspaltung im Falle photolabiler Schutzgruppen durch Licht bestimmter Wellenlänge ausgelöst. Licht ist für biologische Anwendungen besonders gut geeignet, da es über die Leistung der Lichtquelle leicht zu dosieren ist, die Fokussierung durch Linsen zu einer exakten Ortsauflösung führt und für die meisten Zellen unschädlich ist. Bei Wellenlängen größer als 300 nm werden Zellschäden oder Photoschäden (z.B. Pyrimidin-Dimere in DNA) minimiert. Wird die Wellenlänge also optimal gewählt kann durch die Penetration von Zellen oder Gewebe hauptsächlich die Photolysereaktion ausgelöst werden. Dadurch spielt der Einsatz von photolablen Schutzgruppen in der Chemie und Biochemie eine immer wichtigere Rolle. Auch die Tatsache, dass sie orthogonal zu den herkömmlichen Schutzgruppen eingesetzt werden können, ist ein Grund dafür. Orthogonalität bedeutet in diesem Zusammenhang, dass zwei Schutzgruppen unabhängig voneinander unter verschiedenen Reaktionsbedingungen abgespalten werden. Im Optimalfall heißt das für photolabile Schutzgruppen, dass sie chromatisch orthogonal sind und zwei photolabile Schutzgruppen durch die Wahl der Wellenlänge unabhängig voneinander abgespalten werden können.

Im biochemischen Kontext schützen photolabile Schutzgruppen in der Regel funktionelle Biomoleküle, wie Proteine oder Oligonukleotide. Es entstehen sogenannte „caged Verbindungen“ („caged compounds“). Nach Bestrahlung mit Licht wird die Schutzgruppe irreversibel abgespalten und die biologische Funktion des Biomoleküls wird wieder hergestellt. Erstmals wurden photolabile

Schutzgruppen von Engels *et al.*<sup>21</sup> bei der Synthese und Anwendung von, durch Licht freigesetztes, cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat) beschrieben. Die Photolysereaktion konnte über die Aktivität einer Proteinkinase nachgewiesen werden. Seither hat sich ein breites Anwendungsspektrum entwickelt: Prozesse, wie die Proteinbiosynthese<sup>22</sup>, aber auch neuronale Aktivität oder DNAzym-Aktivität<sup>23,24</sup> können mit Licht kontrolliert werden. Funktionen biologischer Moleküle, wie Nukleinsäuren und Neurotransmitter, können untersucht und biochemische Mechanismen aufgeklärt werden. Mit auf Fluoreszenz-basierten lichtsensitiven Systemen können Kinaseaktivitäten in Echtzeit visualisiert werden<sup>25</sup>, um so phosphorylierungs-gesteuerte Signalwege besser zu verstehen. In der Therapie von Krankheiten werden Wirkstoffe mit photolabilen Schutzgruppen versehen, um diese am Bestimmungsort präzise dosiert freizusetzen. In der DNA-Chip-Technologie (DNA-Mikroarrays) wird ein photolithographisches Verfahren angewendet, bei dem Oligonukleotide mit hoher räumlicher Präzision schrittweise aus photolabil geschützten Nukleosidphosphitamidinen aufgebaut werden.<sup>26</sup>

Abhängig von der gewählten Anwendung ergeben sich für photolabile Schutzgruppen bestimmte Anforderungen. Zunächst ist die Photolyse-Effizienz  $\epsilon(\lambda) \cdot \phi$  von besonderer Bedeutung, die für biologische Anwendungen bei Wellenlängen größer 300 nm möglichst groß sein sollte. Sie charakterisiert photolabile Schutzgruppen und wird durch das Produkt des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon(\lambda)$  und der Quantenausbeute  $\phi$  beschrieben. Die Quantenausbeute  $\phi$  ergibt sich aus der Anzahl, der an der Photolysereaktion beteiligten Photonen pro Anzahl absorbierter Photonen und ist somit üblicherweise  $\leq 1$ . Des Weiteren sollte die photolabile Schutzgruppe die teilweise harschen Bedingungen an einem Oligonukleotid-Synthesizer, die nötig sind um die Bausteine für die Kupplungen zu aktivieren, überstehen. Ebenso sollte das geschützte Biomolekül im Medium (z.B. in der Zelle) stabil sein, also z.B. nicht hydrolysiert oder durch andere Bedingungen entschützt werden. Bioorthogonalität ist eine wichtige Voraussetzung. Bei der Photolysereaktion sollten keine Nebenreaktionen auftreten und das Photolyseprodukt sollte nicht toxisch und im Idealfall löslich im zu untersuchenden Medium sein. Je nach Anwendung kann auch der Transport der Photoprodukte eine wichtige Rolle spielen, weshalb schon bei der chemischen Synthese auf entsprechend hydrophobe und hydrophile Reste geachtet werden muss. Werden schnelle biologische Prozesse untersucht, so muss die Kinetik des Abspaltungsprozesses schneller als die des zu untersuchenden Prozesses sein. Erfordern Anwendungen eine hohe Eindringtiefe ins Medium oder eine hohe Ortsauflösung, so kann sich der Zweiphotonen-Effekt zu Nutze gemacht werden. Hierzu müssen photolabile Schutzgruppen mit einem großen Zweiphotonen-Einfangquerschnitt  $\delta_a$  verwendet werden. Er beschreibt, analog zum Extinktionskoeffizienten  $\epsilon(\lambda)$  der Einphotonen-Absorption, die Wahrscheinlichkeit von Zweiphotonen-Absorption.

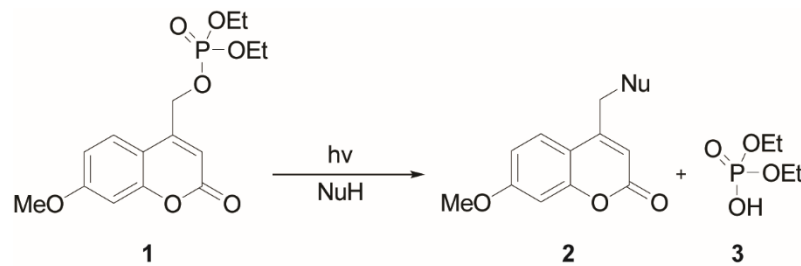


**Abbildung 4.** Übersicht verschiedener photolabiler Schutzgruppen

Die am häufigsten verwendete photolabile Schutzgruppe, die *o*-Nitrobenzyl-Gruppe und ihre Derivate, wurden 1966 von Barltrop *et al.* eingeführt.<sup>27</sup> Sie eignet sich zum Schützen von Säuren<sup>27</sup>, Aminen<sup>28</sup>, (Thio-)Alkoholen<sup>29</sup> und Carbonylverbindungen. Obwohl der Nitrobenzyl-Chromophor oberhalb einer Wellenlänge von 300 nm nur einen geringen Extinktionskoeffizienten aufweist, erfolgt die Photolysereaktion für eine Vielzahl von Anwendungen ausreichend effektiv (Diskussion des Photolysemechanismus in Kapitel 1.1.2). Der große Vorteil dieser Schutzgruppe liegt vor allem in der einfachen Zugänglichkeit, weswegen diese, trotz der Bildung des toxischen Photolyseprodukts Nitrosobenzaldehyd, immer noch häufig in zahlreichen Studien eingesetzt wird.<sup>30</sup> Durch die Einführung einer Methylgruppe in benzylicher Position entsteht die 1-(2-Nitrophenyl)ethylgruppe (NPE). Bei der Photolyse entsteht das Nebenprodukt Nitrosoketon, welches eine geringere Reaktivität aufweist als Nitrosobenzaldehyd. Allerdings besitzt es ein zusätzliches stereogenes Zentrum. Bei der Kupplung mit chiralen Biomolekülen entstehen Diastereomere, die sich nur schwer voneinander trennen lassen und unterschiedliche photochemische und biologische Eigenschaften besitzen können. In den folgenden Unterkapiteln wird auf die in dieser Arbeit verwendeten photolabilen Schutzgruppen näher eingegangen.

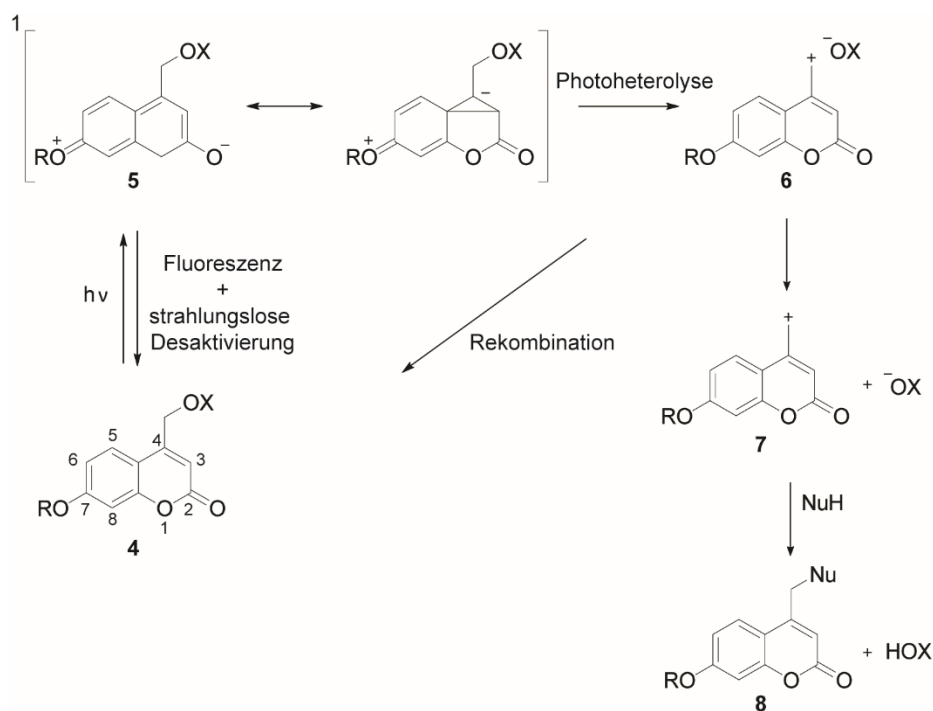
### 1.1.1 Cumarin-Schutzgruppen

Der natürlich vorkommende Pflanzenfarbstoff Cumarin wurde 1822 aus Tonkabohnen isoliert. Seine Derivate werden unter anderem als Duft- und Aromastoffe, als Fluoreszenzfarbstoffe (7-Aminocumarine) und als blutgerinnungshemmende Arzneistoffe (z.B. Phenprocoumon oder Warfarin) verwendet. 1984 wurde er erstmals von Givens *et al.*<sup>31</sup> im Sinne einer photolabilen Schutzgruppe verwendet, indem aus (7-Methoxycumarin-4-yl)methyldiethylphosphat durch Belichtung Diethylphosphat freigesetzt wurde (Abbildung 5).



**Abbildung 5.** 7-Methoxycoumarin-geschütztes Diethylphosphat und dessen Hydrolyse (NuH = Nukleophil-H)

Coumarin-Schutzgruppen weisen eine gute Wasserlöslichkeit, eine geringe Hydrolyseempfindlichkeit und eine hohe Fluoreszenz auf. Die Eigenfluoreszenz kann genutzt werden, um die Photofreisetzung des Substrats zu beobachten. Allerdings stellt die Fluoreszenz auch immer eine Konkurrenzreaktion zu Abspaltung dar. Des Weiteren zeichnen sie sich durch ihre guten Absorptionseigenschaften aus. Ihr Absorptionsmaximum ist durch eine geeignete Wahl der Substituenten leicht justierbar. Im Vergleich zu Nitrobenzyl-Schutzgruppen zeigen sie eine höhere Quantenausbeute und eine schnellere Photolysegeschwindigkeit (im Nanosekundenbereich). Schade *et al.* untersuchte den Mechanismus der Photolyse für Coumarin-geschützte Verbindungen (Carboxylsäuren, Methansulfonsäuren und Phosphorsäuren), welcher in der folgenden Abbildung dargestellt ist.<sup>32</sup> Beschrieben wurde eine lösungsmittelunterstützte Photoheterolyse.



**Abbildung 6.** Photolysemechanismus der Coumarin-Schutzgruppe<sup>32</sup>

Zunächst wird durch Lichtabsorption das Cumarin **4** in den S1- Zustand angeregt. Substituenten in 7-Position verschieben dabei Ladungsdichte in den benzylicischen Ring. Im angeregten Zustand kommt es zur heterolytischen Spaltung zwischen der Abgangsgruppe und C-4 in zwei Ionenpaare. Das Cumarin-Kation wird dabei durch die erhöhte Ladungsdichte stabilisiert. Das Ionenpaar ist zunächst noch von Lösungsmittelmolekülen solvatisiert (Kontaktionenpaar), anschließend geht es in ein freies Ionenpaar über. Diese werden direkt von Lösungsmittelmolekülen (oder einem alternativen Nukleophil) abgefangen, was schlussendlich zur Bildung der freien Cumarin-Produkts **8** und zur Freisetzung des zuvor geschützten Substrats führt. Anders als bei den Nitrobenzyl-Schutzgruppen ergibt sich für die Bindungsspaltung eine starke Lösungsmittelabhängigkeit. In unpolaren Lösungsmitteln überwiegt die Relaxation aus dem angeregten Zustand, während in polaren Lösungsmitteln die Photolyse dominiert. Daraus lässt sich auf eine gute Eignung der Cumarin-Schutzgruppe für zellbiologische Anwendungen (wässriges Medium) schließen.

Cumarin-Schutzgruppen werden zum Schützen funktioneller Gruppen, wie Carboxylate, Alkohole, Phenole und Carbonylverbindungen verwendet. Amine und Thiole hingegen erwiesen sich lange Zeit als ungeeignet, da die Photolyse bzw. der heterolytische Bindungsbruch zwischen C-N und C-S nicht ausgelöst wird. Dieses Problem kann in einigen Fällen umgangen werden, indem entsprechende Carbamate- oder Thiocarbonate-Derivate eingesetzt werden. Allerdings kommt es dann häufig zur Bildung von Photolyse-Nebenprodukten. Beispielsweise konnten lichtinduzierte Umlagerungsreaktionen von der C-4 in die C-3-Position (S-S-Shift) von Thioether-Abgangsgruppen<sup>33</sup> beobachtet werden. Yamaji *et al.* konnten mit Hilfe der Laserblitzlicht-Photolyse zeigen, dass nach Bestrahlung von 4-Methylcumarin-geschützten Thiolen eine homolytische C-S-Bindungsspaltung auftrat, indem sie die entsprechenden reaktiven Thiyl-Radikale (reaktive Schwefelspezies, welche sich von Thiolen ableitet) nachwiesen,<sup>34</sup> welche die C-3-Position des Cumarin-Gerüsts angreifen. Dies erklärt zum einen die von Hagen *et al.*<sup>33</sup> beobachtete Photoisomerisierung der Thioether-Abgangsgruppen aber auch die ausbleibende Photolyse der Cumarin-geschützten Thiole. Erst kürzlich konnten Mahmoodi *et al.* eine Cumarin-Schutzgruppe für Thiole entwickeln, die durch eine Methylgruppe an der C-3-Position, die Photoisomerisierung unterdrückt und folglich keine Photolyse-Nebenprodukte erzeugt.<sup>35</sup> Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über wichtige Cumarin-Schutzgruppen.

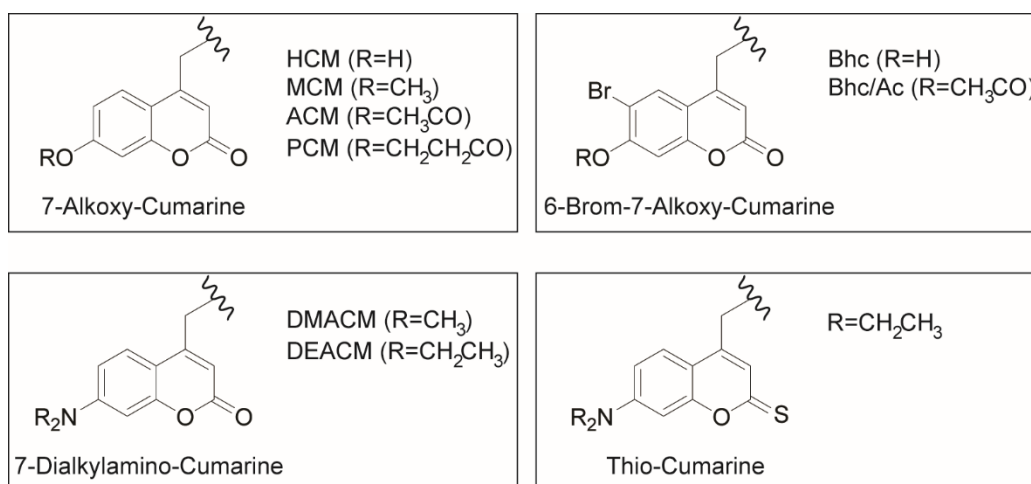
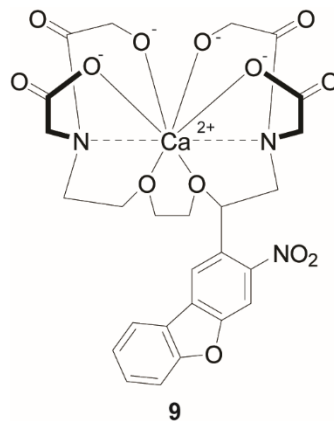


Abbildung 7. Wichtige Cumarin-Derivate

Die ersten entwickelten Cumarin-Schutzgruppen waren die 7-Alkoxy-Cumarine. Die Absorption dieser befindet sich im UV-Bereich und zudem weisen sie eine geringe Wasserlöslichkeit auf. Trotz eines guten Photolyseverhaltens wurden daher verbesserte Cumarin-Schutzgruppen entwickelt. Eine höhere Löslichkeit konnte mit dem Cumarin-Derivat Bhc (Abb. 7) erreicht werden, dass durch den zusätzlichen Brom-Substituenten in 6-Position eine stärker azide Hydroxygruppe aufweist, welche unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt. Die Bhc/Ac-Schutzgruppe dagegen zeichnet sich durch eine gesteigerte Membrangängigkeit aus und eignet sich daher hervorragend für zellbiologische Anwendungen.<sup>36</sup> Der Brom-Substituent führt außerdem bei beiden Schutzgruppen zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums. Hagen *et al.* entwickelten sehr effiziente und langwellig anregbare 7-Dialkylamino-Cumarine ([7-(Dimethylamino)cumarin-4-yl]methyl-(DMACM)<sup>37</sup> und [7-(Diethylamino)cumarin-4-yl]methyl-(DEACM)<sup>38</sup>). Die Anregung kann teilweise mit Wellenlängen höher 400 nm erfolgen und die Quantenausbeuten dieser Schutzgruppen sind sehr hoch. Die Funktionalität, z.B. Wasserlöslichkeit, kann über das Einführen entsprechender Reste an der 7-Aminogruppe erzielt werden. Zusätzlich kann die Spaltung DMACM- und DEACM-geschützter Verbindungen über Zweiphotonen-Anregung erfolgen. Fournier *et al.* tauschten die Carbonylgruppe in 2-Position durch eine Thiocarbonylgruppe aus und erreichten damit eine weitere bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums<sup>39</sup> ( $\approx 470$  nm).

### 1.1.2 Nitrodibenzofuran-Schutzgruppe

Der Nitrodibenzofuran-Chromophor kann als Derivat der NPE-Schutzgruppe angesehen werden. Er zeichnet sich durch einen hohen Extinktionskoeffizienten im nahen UV-Bereich und einer hohen Quantenausbeute bei Photolysereaktionen aus. Momotake *et al.* führten diesen in Verbindung mit dem Calciumchelator Ethylenglykolessigsäure (EGTA) ein.<sup>40</sup> NDBF-geschütztes EGTA (NDBF-EGTA, Abb. 8) setzt nach Photolyse Calcium-Ionen frei, welche im biologischen Testsystem die Kontraktion von Muskelfasern auslöste.



**Abbildung 8.** NDBF als photolabile Schutzgruppe für den achtzähligen Chelatliganden EGTA<sup>40</sup>

NDBF zeigte eine 16-160-fach gesteigerte Photolyseeffizienz als bisher verwendete photolabile Schutzgruppen. Zudem war die Quantenausbeute mit 0.7 erheblich höher. Der Zweiphotonen-Einfangsquerschnitt  $\delta$  betrug 0.6 Göppert-Meyer (GM; 710 nm).

Für die NDBF-Schutzgruppe kann der Photolysemechanismus der *o*-Nitrobenzylgruppen betrachtet werden: Die Photolysereaktion wird üblicherweise mit einer Wellenlänge von  $\approx 365$  nm ausgelöst, welche dann unter einem Norrish-Typ II-Mechanismus abläuft. Dabei wird zunächst die Nitrogruppe angeregt und es kommt zur photochemischen Erzeugung eines Biradikals **11**. Dies führt zur intramolekularen Abstraktion eines Wasserstoffradikals und zur anschließenden Entstehung eines biradikalischen Alkohols **12**.<sup>41</sup> Dieses steht im Gleichgewicht mit der *aci*-Nitroverbindung **13**, welche anschließend zum Benzisoxazolidin **14** zyklisiert. Dieses zerfällt in ein Halbacetal **15** und bei der folgenden Umlagerung in ein Nitrosoaldehyd kommt es zum Bindungsbruch.<sup>42</sup>



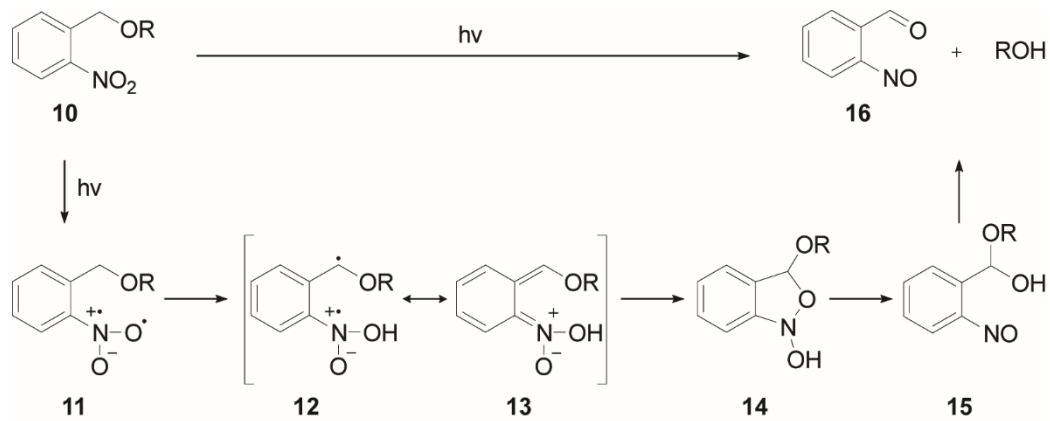


Abbildung 9. Photolysemechanismus der Nitrobenzyl-artigen Schutzgruppen

Die NDBF-Schutzgruppe eignet sich ebenfalls zur wellenlängenselektiven Photolyse photolabil geschützter Verbindungen. Wellenlängenselektiv bedeutet, dass mehrere Schutzgruppen in einer bestimmten Reihenfolge photolysiert werden können. Entgegen dieser Reihenfolge findet oft keine Selektivität statt, daher darf die wellenlängenselektive Entschützung nicht mit dem Begriff der Orthogonalität verwechselt werden, welche eine voneinander unabhängige Photolyse voraussetzt. Schäfer *et al.* photolysierten ein NDBF-geschütztes Oligonukleotid mit 440 nm, ohne dabei ein gleichzeitig anwesendes NPE-geschütztes Oligonukleotid zu adressieren.<sup>43</sup>

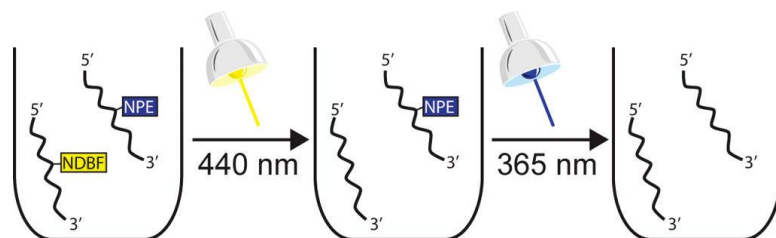


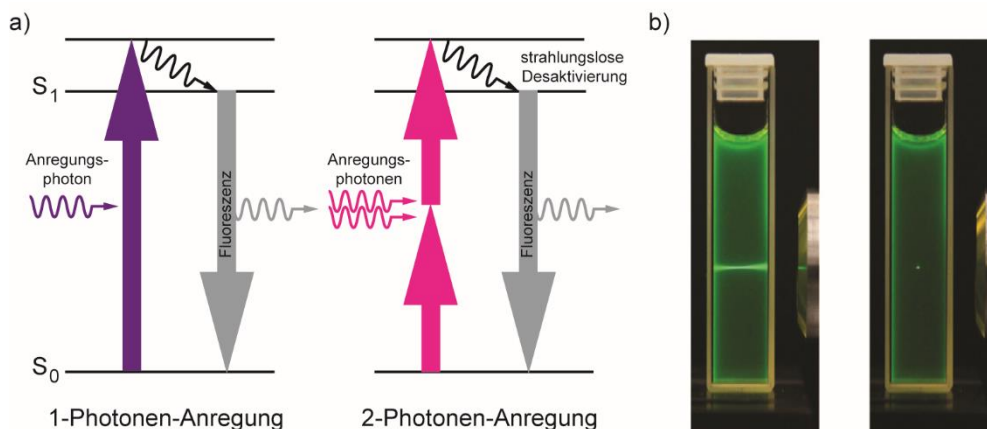
Abbildung 10. Wellenlängenselektive Photolyse NDBF- und NPE-geschützter DNA. Abbildung entnommen aus Schäfer *et al.*<sup>43</sup>

### 1.1.3 Zweiphotonen-Aktivierung von photolabilen Schutzgruppen

Bereits 1931 postulierte Maria Göppert-Mayer in ihrer Dissertation die Existenz eines Zweiphotonen-Effekts. Sie sagte theoretisch vorher, dass ein Atom durch die simultane Absorption zweier energieglicher Photonen in einen angeregten Zustand versetzt wird, welcher typischerweise durch die Absorption eines einzelnen Photons doppelter Energie, also der halben Wellenlänge, erreicht wird.<sup>44</sup> „Simultan“ ist in diesem Fall quantenmechanisch als kurze Zeitspanne zu verstehen. Innerhalb dieser Zeitspanne müssen zwei Photonen zur Verfügung stehen, um den Übergang zu realisieren.<sup>45</sup>

Erst durch die Entwicklung gepulster Laser war es möglich diese Theorie 1960 experimentell zu bestätigen.<sup>46</sup> Kaiser *et al.* beobachteten erstmalig eine durch Zweiphotonen-Absorption verursachte Fluoreszenz in einem  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ -Kristall. Aufbauend auf diesem Effekt wurde die Zweiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie<sup>47</sup> entwickelt. Weiteren Einsatz findet die Zweiphotonen-Technik beispielsweise in der Stereo- oder Zweiphotonen-Lithographie<sup>48</sup>, der Mikroskopie<sup>49</sup> und der photodynamischen Therapie<sup>50,51</sup>. Im Forschungsgebiet der Zweiphotonen-Farbstoffe<sup>52</sup> sind mittlerweile Materialien mit mehreren Tausend GM bekannt (im Vergleich: für biologische Anwendungen ist ein GM von 0.1 ausreichend<sup>53</sup>). Die Zweiphotonen-Absorption kann ebenfalls zur lokalen Freisetzung biologisch aktiver Substanzen eingesetzt werden. 1994 konnte sie sich erstmalig zur photolytischen Freisetzung eines Neurotransmitters<sup>54</sup> zunutze gemacht werden.

Im Vergleich zur Einphotonen-Anregung ist die Zweiphotonen-Anregung sehr unwahrscheinlich. Deswegen erfordert die Anregung eine hohe instantane Photonenflussdichte, für die heutzutage häufig gepulste Titan-Saphir-Laser (kurze Pulse:  $\approx 100$  fs, hohe Wiederholungsrate: 80 -100 Hz) verwendet werden. Die Anregungswahrscheinlichkeit bei der Zweiphotonen-Anregung hängt, nicht wie beim Einphotonen-Prozess linear, sondern quadratisch von der Lichtintensität ab. Die für diesen Prozess benötigte hohe Lichtintensität wird nur im Fokus des Laserstrahls erreicht, daher kann man mit Zweiphotonen-Anregung eine dreidimensionale Auflösung erreichen (Abbildung 11). Dies erlaubt außerdem die Anregung von Molekülen in Volumina kleiner als 1 Femtoliter.<sup>45</sup>



**Abbildung 11.** a) vereinfachtes Jablonski-Diagramm: Vergleich der Zweiphotonen-Anregung (rechts) im Vergleich zur Einphotonen-Anregung (links) b) Ortsauflösung des Zweiphotonen-Effekts: Anregung einer Fluoresceinlösung mit einem UV-Laser (365 nm, links) und einem Zweiphotonen-Laser (730 nm, rechts). Die Einphotonen-Anregung führt zu einem zylinderförmigen Anregungsprofil. Die Zweiphotonen-Anregung hingegen führt zu einem fluoreszierenden Punkt, da nur im Fokus des Laserstrahls die Energiedichte ausreichend hoch ist. Grafik b) entnommen aus Brieke *et al.*<sup>55</sup>

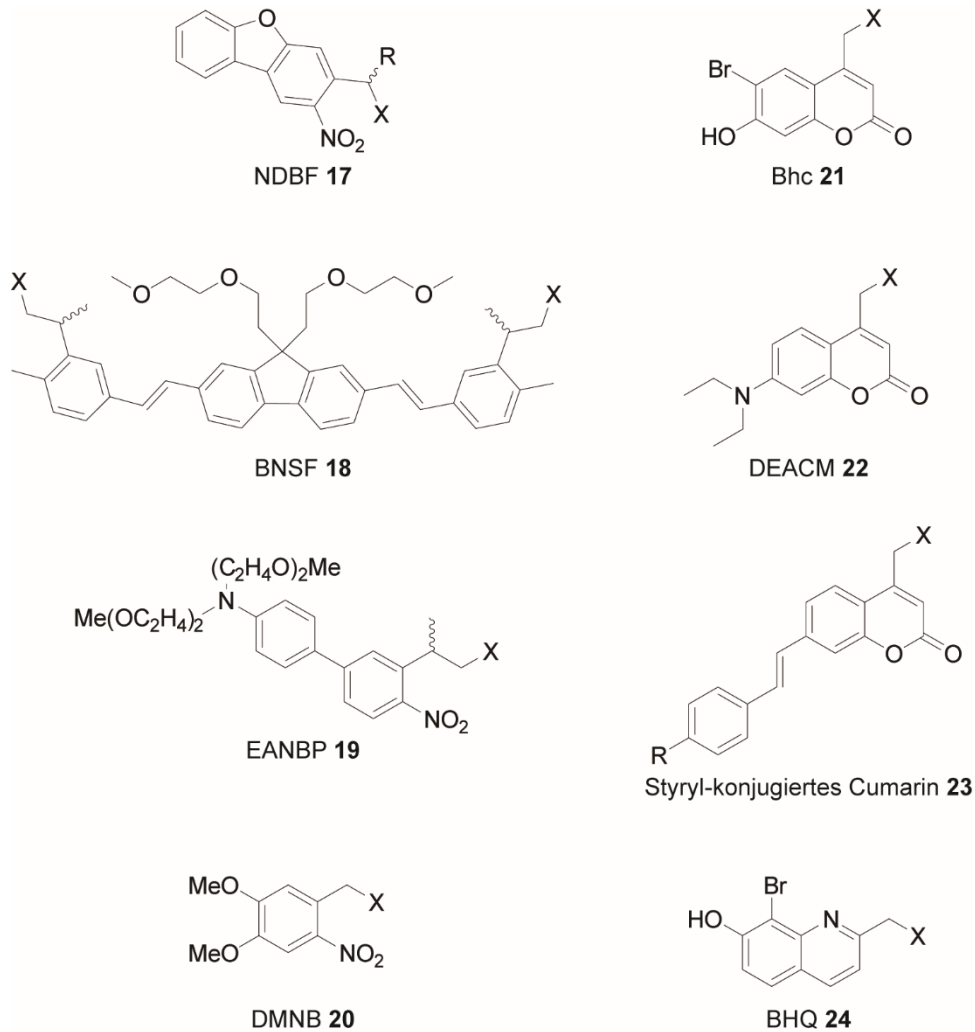
Ein weiterer Vorteil der Zweiphotonen-Anregung ist die Anregung von Molekülen mit nahem IR-Licht. Biologische Proben adsorbieren Licht dieser Wellenlänge nicht und sind daher dafür weitestgehend transparent.<sup>56</sup> Durch die geringere Streuung des Lichts dieser Wellenlänge sind weite Eindringtiefen in biologisches Gewebe möglich. Das bei dem Prozess entstehende Fluoreszenzlicht kann durch entsprechende Filter vollständig vom Anregungslicht getrennt werden, da sie spektral weit auseinander liegen.

Prinzipiell können auch mehr als zwei Photonen gleichzeitig absorbiert werden (Multiphotonen-Anregung). Die Wahrscheinlichkeit dazu ist allerdings nochmal deutlich geringer. Dennoch findet sie Anwendung beispielsweise in der Mikroskopie<sup>57</sup> oder bei Fertigungsverfahren in der Mikrosystemtechnik (Mikrofabrikation).<sup>48</sup>

Die Zweiphotonen-Photolyse photolabiler Schutzgruppen vollzieht einen alternativen Weg zu der, in Abbildung 11 gezeigten, Fluoreszenzstrahlung. Wie gut eine photolabile Schutzgruppe durch Zweiphotonen-Anregung freigesetzt wird, kann durch den Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt  $\delta_u$  beschrieben werden. Dieser wird in der Einheit „Göppert-Meyer“ GM, in Anlehnung an die Entdeckerin, angegeben. 1 GM entspricht  $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s Photon}^{-1} \text{ Moleküle}^{-1}$ . Der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt ergibt sich, analog zur Photolyse-Effizienz der Einphotonen-Absorption, aus dem Produkt von Zweiphotonen-Einfangsquerschnitt  $\delta_a$  und der Zweiphotonen-Quantenausbeute  $\phi$  ( $\delta_u = \delta_a \cdot \phi$ ). Der Zweiphotonen-Einfangsquerschnitt  $\delta_a$  ist, genau wie der Extinktionskoeffizient  $\lambda$  der Einphotonen-Anregung, stark abhängig von der verwendeten Wellenlänge, damit ergibt sich für die Effizienz des Zweiphotonen-Uncagings eine hohe Wellenlängenspezifität. Geeignete photolabile Schutzgruppen besitzen ein  $\delta_u$  von mindestens 0.1 GM.<sup>53</sup> Daher sind die für Einphotonen-Experimente häufig verwendeten *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppen nicht für Zweiphotonen-Anwendungen geeignet, da sie, je nach Substituent, lediglich nur 0.01-0.05 GM<sup>58</sup> erreichen. Durch die Anwesenheit von Sensitizern kann der Wirkungsquerschnitt jedoch soweit verbessert werden<sup>59</sup>, dass eine Vielzahl von Anwendungen möglich sind. Ellis-Davies *et al.* und Goeldner *et al.* entwickelten einige Zweiphotonen-aktive Nitrobenzyl-Derivate, die durch die Erweiterung des konjugierten  $\pi$ -Systems oder durch die Einführung von Donor- und Akzeptorgruppen die Zweiphotonen-Eigenschaften verbesserten. Zu diesen verbesserten Derivaten zählen beispielsweise das in dieser Studie verwendete NDBF **17** (0.6 GM)<sup>40</sup>, 2,7-bis-{4-nitro-8-[3-(2-propyl)-styryl]}-9,9-bis-[1-(3,6-dioxaheptyl)]-fluoren BNSF **18** (5 GM)<sup>60</sup> und das *p*-Bisalkylaminonitrobiphenylpropyl-Derivat EANBP **19** (11 GM). Das EANBP erreichte in Studien zu EANBP-geschützter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (EANBP-GABA) den bisher besten gemessenen  $\delta_u$ -Wert für photolabile Schutzgruppen.<sup>61</sup>

Verschiedene Cumarin-Derivate sind ebenfalls Zweiphotonen-sensitiv. Bhc **21** weist einen  $\delta_u$ -Wert von etwa 1 GM auf. Furuta *et al.* konnten zeigen, dass Bhc-geschütztes Glutamat (Bhc-glu) in Neuronen durch Zweiphotonen-Anregung photolysiert werden kann. Dadurch ergab sich erstmalig

eine dreidimensional aufgelöste Kartierung des Ansprechverhaltens von Glutamat in Neuronen.<sup>53</sup> Die Arbeitsgruppe um Jullien verwendete DEACM **22** (0.12 GM<sup>62</sup>) um Proteinaktivität in Zebrafischen mit der Zweiphotonen-Anregung zu kontrollieren.<sup>4</sup> Zhu *et al.* verbesserten die Zweiphotonen-Eigenschaften des DEACMs, indem sie das aromatische System mit einer Styryl-Gruppe<sup>62</sup> (0.26 GM, Verbindung **23** in Abbildung 12) erweiterten.



**Abbildung 12.** Übersicht verschiedener photolabiler Schutzgruppen mit literaturbekanntem Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt  $\delta_u$ , X = Abgangsgruppe

#### 1.1.4 Photolabile geschützte Oligonukleotide zur Regulation der Genexpression

Das Makromolekül Nukleinsäure spielt eine essentielle Rolle bei der Speicherung und Verarbeitung der genetischen Information. Die Fähigkeit zur spezifischen Basenpaarung ist dabei von entscheidender Bedeutung. Die DNA ist der Träger der genetischen Erbinformation und das zentrale

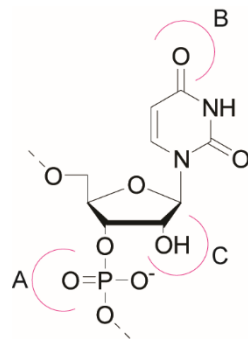
Element bei der Weitergabe des genetischen Codes. Als Informationsübermittler spielt die mRNA bei der Transkription eine wichtige Rolle. Die tRNA übernimmt bei der Translation den Aufbau der Aminosäurekette in der Proteinbiosynthese. Nicht codierende microRNAs<sup>63</sup> (miRNA) und „small interfering RNAs“ (siRNA)<sup>64</sup> hingegen haben regulatorischen Einfluss. Sie haben die Fähigkeit an mRNA zu binden und dadurch die Translation temporär zu verhindern oder sogar deren enzymatischen Abbau auszulösen. Riboswitches<sup>65</sup> vermögen ebenfalls die Genexpression zu regulieren. Sie sind untranslatierte Regionen innerhalb der mRNA, die durch ihre Sekundär- oder Tertiärstruktur die Erkennung und Bindung von Liganden (z.B. Adenin oder Guanin) ermöglichen. Durch die Ligandenbindung kommt es bei Riboswitches zur konformationellen Änderung der RNA-Struktur, woraufhin die Shine-Dalgarno-Sequenz, eine ribosomale Bindestelle und der Startpunkt der Translation, für Ribosomen unzugänglich wird.<sup>66</sup>

Die Funktion der Nukleinsäuren wird durch die Fähigkeit stabile Doppelhelix-Strukturen auszubilden bestimmt. Die Stabilität dieser beruht hauptsächlich auf den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den  $\pi$ -Elektronensystemen aufeinanderfolgender Basen. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren leisten einen zusätzlichen Stabilitätsbeitrag. Des Weiteren kommt es auch teilweise zu Nukleinsäure-Protein-Interaktionen, so beispielsweise im RNA-induced silencing complex (RISC) der RNA-Interferenz (RNAi).<sup>64,67</sup>

Das Caging von Nukleinsäuren ist eine Methode zur gezielten Steuerung der Genexpression. Die Möglichkeit diese zu kontrollieren, gibt uns Erkenntnisse über das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren, Prozessierungsmechanismen, Translationsprozessen aber auch von posttranskriptionellen Abläufen. Es eröffnet uns zusätzlich die Möglichkeit, in fehlregulierte Prozesse also z.B. der ausbleibenden oder unvollständigen Genexpression oder der Expression fehlerhafter Gene, einzugreifen. Der Einbau photolabiler Schutzgruppen in Oligonukleotide erlaubt eine genaue Kontrolle über deren Aktivität und erweist sich somit als geeignetes Mittel zur Erforschung der Funktionsweise von Oligonukleotiden in einem biologischen Kontext. Prinzipiell kann die Modifikation der Nukleinsäuren mit photolabilen Schutzgruppen auf verschiedene Weisen erfolgen: Zum einen können Nukleinsäuren statistisch photolabil geschützt werden. Dabei findet die Modifikation meist am Phosphatrückgrat statt. Monroe *et al.* machten 1999 erstmalig auf diese Art Experimente mit photolabil geschützten Nukleinsäuren.<sup>68</sup> Sie modifizierten Luciferase-codierende Plasmide statistisch mit 1-(4, 5-dimethoxy-2-nitrophenyl)diazoethan (DMNPE) am Phosphatrückgrat und bestrahlten dieses mit UV-Licht (355 nm) in Rattenhaut. Danach konnte die Expression der Luciferase in Abhängigkeit der Lichtmenge beobachtet werden, wenn auch eine vollständige Aktivierung des Plasmids nicht erreicht werden konnte. Ando *et al.* schützten GFP-mRNA mit 6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycumarin (Bhc-diazo) auf die gleiche Weise<sup>69</sup> und kontrollierten die GFP-Expression in Zebrafischembryonen mit UV-Licht (350-365 nm).

Der synthetisch geringe Aufwand ist einer der großen Vorteile der statistischen Schützung. Zur Herstellung werden lediglich die Nukleinsäuren und die reaktiven, photolabilen Vorläufer, welche meist kommerziell erhältlich sind, inkubiert. Allerdings sind bei der statistischen Methode sowohl die Anzahl, wie auch die genauen Positionen der photolabilen Schutzgruppe unbekannt. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass zur vollständigen Desaktivierung das Verhältnis zwischen photolabiler Schutzgruppe und Nukleotidanzahl unverhältnismäßig hoch ist und dadurch hohe Bestrahlungsdosen zur Entschützung notwendig werden. Es resultiert oft eine unvollständige Photoentschützung oder Restaktivität im biologischen System vor Bestrahlung.

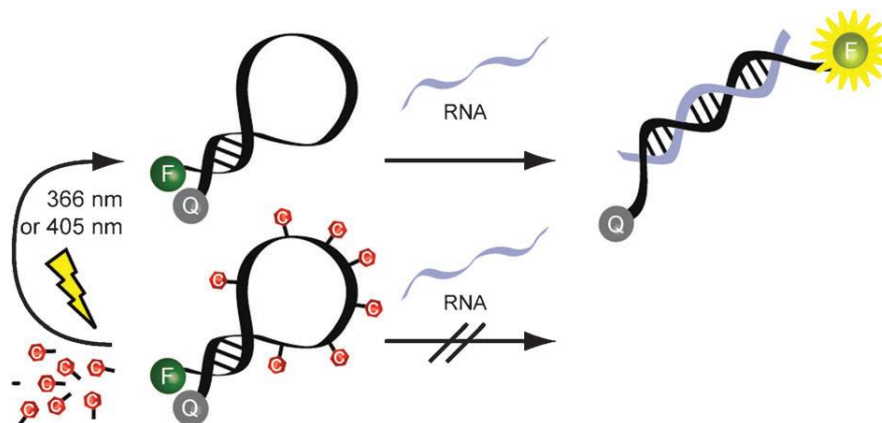
Weitaus eleganter und kontrollierbarer, aber auch synthetisch anspruchsvoller, ist die ortsspezifische Schützung. Meist werden dazu entsprechend modifizierte Monomer-Bausteine in der Oligonukleotid-Festphasensynthese verwendet. Je nach Anwendung werden strategisch sinnvolle Positionen selektiv modifiziert, um die Funktion des Oligonukleotids gezielt zu blockieren. Dafür haben sich mehrere Strategien etabliert (Abbildung 13).



**Abbildung 13.** Strategien zum Caging von Nukleinsäuren am Beispiel eines Uridinnukleotids

Die am meisten verwendete Methode ist das Anbringen photolabiler Schutzgruppen an die Nukleobase eines Nukleosids (Strategie B in Abb. 13). Im Optimalfall wird durch sterische Hinderung die Watson-Crick-Basenpaarung im Doppelstrang verhindert und die Stabilität der Doppelhelix lokal verringert. Sofern es sich um RNA-Nukleoside handelt, kann auch die 2'-OH-Position (Strategie C) photolabil markiert werden. In Hinblick auf Genregulation spielen photolabile Schutzgruppen an dieser Position allerdings eine untergeordnete Rolle. Sie finden gelegentlich als orthogonale Schutzgruppe in der Oligoribonukleotid-Festphasensynthese Anwendung.<sup>70</sup> Photolabile Schutzgruppen können ebenfalls als photospaltbare Linker zwischen zwei Nukleosiden angebracht werden. Da photospaltbare Linker Gegenstand dieses Promotionsvorhabens waren, werden auf diese gesondert in Kapitel 1.2 eingegangen. In den folgenden Abschnitten soll veranschaulicht werden, wie mit photoregulierbaren Nukleinsäuren und mit welchen Methoden Genexpression gesteuert und unter die Kontrolle von Licht gebracht werden kann. Es sei darauf hingewiesen, dass

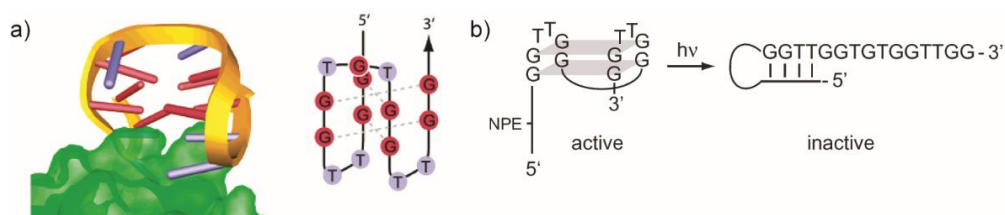
dies ein weites und umfassendes Forschungsgebiet ist, das sich gerade innerhalb der letzten Jahre rasant entwickelt hat. Alle Forschungsinhalte wiederzugeben würden den Rahmen dieser Arbeit übersteigen. Daher werden hier lediglich einige exemplarische „Pionierarbeiten“, aber auch aktuelle Forschungsergebnisse behandelt. Selbstverständlich werden photolabile Schutzgruppen nicht nur auf dem Gebiet der Genregulation verwendet. Methoden wie die PCR<sup>71</sup>, Echtzeitsequenzierung und Microarray<sup>72</sup> sind nur Beispiele, die ebenfalls von photoaktivierbaren Nukleinsäuren profitieren. Mit Hilfe von photolabil geschützten „Molecular Beacons“<sup>73</sup>, Oligonukleotide mit einer Stamm-Schleife-Struktur und einer Fluorophor- und Quenchermodifikation, kann mRNA in Zellen detektiert werden.



**Abbildung 14.** Die Strategie photoaktivierbarer Molecular Beacons: Die photolabil geschützte Schleifenstruktur der Molecular Beacons ist komplementär zu der Sequenz einer Ziel-RNA. In der Stammregion befinden sich Fluorophor und Quencher, welche ein FRET-Paar bilden. In diesem Zustand ist keine Fluoreszenz detektierbar. Im unbelichteten Zustand kann der Molecular Beacon nicht mit der Ziel-RNA wechselwirken. Wird nach Belichtung die Schleifenstruktur entschützt, bindet die Ziel-RNA unter Öffnung der Stamm-Schleife-Struktur daran. In der resultierenden Beacon/RNA-Doppelhelix liegen Fluorophor und Quencher räumlich getrennt voneinander vor. Fluoreszenz ist nun detektierbar. Abbildung entnommen aus Joshi *et al.* <sup>73</sup>.

Kröck und Heckel<sup>74</sup> berichteten von einem photolabil geschützten Nukleosid. Sie entwickelten 2-(2-Nitrophenyl)propyl (NPP)-modifizierte Thymidin-Monomere und bauten diese in DNA-Stränge ein, welche als kodierende Stränge für DNA-Template mit T7-Promotorregion dienten. Damit konnten sie die Transkriptionsreaktion temporär blockieren und mit Hilfe von Lichtbestrahlung induzieren. Mayer und Heckel<sup>75</sup> entwickelten ein photoaktivierbares  $\alpha$ -Thrombin-Aptamer. Aptamere sind einzelsträngige Nukleinsäuren, die durch ihre genau definierte dreidimensionale Struktur, spezifisch und hochaffin an ihre Zielstruktur binden und so als potente Inhibitoren eingesetzt werden können. Das in der erwähnten Studie verwendete Antithrombinaptamer HD1 liegt unter physiologischen Bedingungen als stabiles G-Quartett vor und besteht aus sechs Thymidin- und neun Guanosineinheiten. Als photolabil geschütztes Aptamer konnte es nicht mehr an Thrombin binden und verlor seine antikoagulatorische Wirkung. Diese konnte allerdings nach Bestrahlung mit UV-

Licht wieder hergestellt werden. Der entgegengesetzte Prozess, die Inaktivierung des Aptamers HD1, konnte von Buff *et al.* demonstriert werden. In dieser Studie wurde angenommen, dass Aptamersequenzen, welche am 5'-Ende mit zu sich selbst komplementären Regionen (Gegenstrangdomäne) verlängert werden, inaktiv sind, da sie bevorzugt eine Haarnadelkonformation, statt der eigentlich aktiven G-Quadruplex-Struktur, einnehmen. Diese Gegenstrangdomänen wurden mit photolabilen Schutzgruppen modifiziert und damit vorübergehend inaktiviert bzw. das Aptamer in seiner aktiven Form beibehalten. Die inaktive Haarnadelstruktur wurde erst nach Bestrahlen des Moleküls gebildet. Es wurde ein Oligonukleotid entwickelt, welches sowohl als Antikoagulans als auch als dessen Antidot verwendet werden kann.<sup>76</sup>



**Abbildung 15.** a) schematische Darstellung der Kristallstruktur des HD1-Aptamers gebunden an Thrombin<sup>75</sup> b) Das HD1-Aptamer mit seinem eigenen –zunächst inaktivierten– Antidot.<sup>76</sup> Die Aktivierung erfolgt durch Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm); Abbildungen aus den entsprechenden Veröffentlichungen entnommen

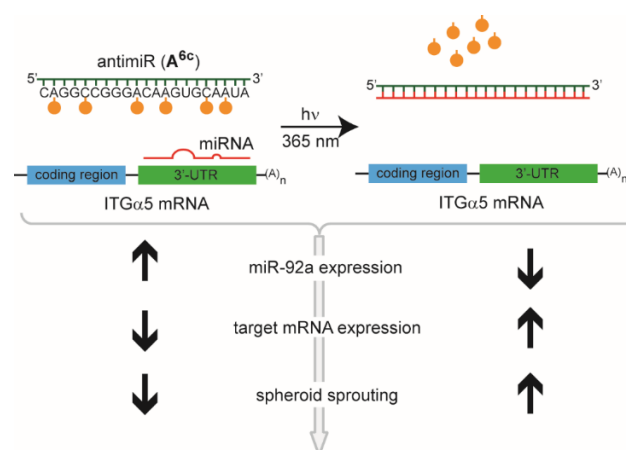
Zahlreiche Studien zur lichtgesteuerten Genregulation beschäftigen sich mit Antisense-Oligonukleotiden. Diese besitzen eine dem Zielmolekül (z.B. ein überreguliertes Gen) gegenüber komplementäre Sequenz. Die Bindung des Antisense-Oligonukleotids an das Zielgen führt zur Inhibierung der Transkription oder Translation. Deiters *et al.* gelang die Kontrolle der Genexpression mittels photoaktivierbaren Antisense-Oligonukleotiden, indem sie die photolabile Nitropiperonyloxymethyl- (NPOM-)Gruppe in eine Phosphorthioat-DNA einbrachten und damit im unbelichteten Zustand die Aktivität einer Luciferase auf 30% herab senkten. Nach Belichten konnte die Aktivität vollständig wieder hergestellt werden.<sup>77</sup> Die gleiche Forschungsgruppe beschäftigte sich außerdem mit photoaktivierbaren „DNA-Decoys“<sup>78</sup>, welche in der Lage sind an Transkription-auslösende Proteine (in diesem Fall NF- $\kappa$ B) zu binden und Transkription zu inhibieren. NF- $\kappa$ B bindet in Anwesenheit des geschützten DNA-Decoys an seine natürliche DNA-Bindestelle und initiiert damit die Transkription des Genes SEAP („secreted alkaline phosphatase“). Nach der Photoentschützung des Decoys, löst NF- $\kappa$ B seine native Bindung und interagiert mit dem aktiven Decoy. Die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription von SEAP wird unterbunden. Decoy-Oligonukleotide sind Bestandteil dieser Arbeit und werden daher in Kapitel 1.3 ausführlicher behandelt.

Eine neue Entwicklung ist die lichtgesteuerte Regulation der miRNA-Aktivität. miRNAs (miR) sind kurze, nichtkodierende RNA-Stränge, die an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) einer mRNA des



Zielgens binden und diese, je nach Komplementarität der Bindesequenz, abbauen (perfekte Basenpaarung) oder die Translation hemmen (partielle Basenpaarung).<sup>79</sup> Da eine perfekte spezifische Komplementarität der miRNA zu ihrer Zielsequenz keine zwingende Voraussetzung ist, kann eine miRNA unterschiedliche mRNAs ansprechen. Auf post-transkriptioneller Ebene sind sie somit entscheidend an der Genregulation beteiligt.<sup>80</sup> Eine fehlerhafte Genregulation durch miRNA kann an der Pathogenese einiger Krankheiten, wie der Fettleberhepatitis<sup>81</sup> oder der diabetischen Nephropathie<sup>82</sup> und der Tumorentstehung<sup>83,84</sup> beteiligt sein. Andererseits sind miRNAs bekannt, die an der Unterdrückung von Krankheiten maßgeblich beteiligt sind (z.B. hemmt die miRNA miR-4782-3p das Wachstum von Lungenkarzinomen<sup>85</sup>). Die miRNA-Forschung erlaubt neue Einsichten in die Pathogenese von Krankheiten, erhöht aber auch die diagnostische Bedeutung von miRNA, beispielsweise als „Fingerprint“-Biomarker“.<sup>86</sup> Brandaktuelle miRNA-Studien beschäftigen sich mit der Entwicklung miRNA-basierter Therapieformen.<sup>87,88</sup> Einige miRNA-basierte Therapeutika befinden sich mittlerweile in prä-klinischen oder klinischen Stadien.<sup>89</sup>

Schäfer *et al.* beschäftigten sich mit der Regulation der Angiogenese durch die miRNA miR-92a<sup>90</sup>, welche bei einer Minderdurchblutung des Gehirns (Ischämie) die Bildung neuer Blutgefäße verhindert (antiangiogene Wirkung). Da die Hochregulation der entsprechenden mRNA-Aktivität die gewünschte Neovaskularisation auslöst musste folglich die miR-92a-Aktivität herabgesetzt werden. Eine Möglichkeit, mRNAs, die durch miRNAs reguliert werden, zu aktivieren, sind die sogenannten AntimiRs. AntimiRs besitzen eine Gegensequenz zur jeweiligen miRNA und sind damit *per se* spezifische Antisense-Oligonukleotide. Aufgrund der Unspezifität der miRNAs können dadurch allerdings eine Vielzahl von Genen beeinflusst werden. Dies ist ein Effekt, der bei einer systemischen Verabreichung von Therapeutika unerwünscht ist. Schäfer *et al.* verwendeten daher photoaktivierbares AntimiR-92a und nutzen die räumliche und zeitliche Kontrolle der photolabilen Schutzgruppen.



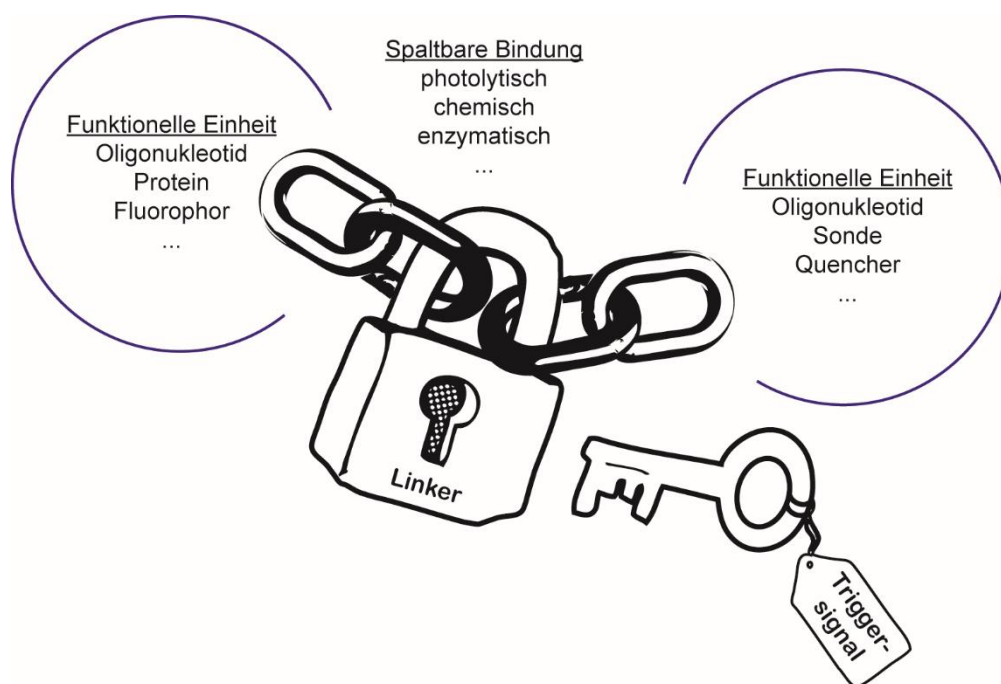
**Abbildung 16.** Lichtregulation von miR-92a durch das von Schäfer *et al.* entwickelte photoaktivierbare AntimiR-92a, welches nach Belichtung an die miRNA bindet und damit Genexpression erlaubt. Abbildung wurde entnommen aus Schäfer *et al.*<sup>90</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass die Photolyse des photolabil geschützten AntimiRs die Funktion der miR-92a inaktiviert und die zuvor durch miR-92a inhibierte Genexpression aktiviert (Abbildung 16). Die angiogene Wirkung konnte anhand der Keimung von Sphäroiden in Endothelzellen demonstriert werden. In einer anschließenden Studie<sup>91</sup> wurde dieses System auf die Wundheilung bei diabetischen Mäusen angewendet. Zuvor wurde festgestellt, dass miR-92a in chronischen Wunden bei Diabetikern hochreguliert vorliegt. Die Verwendung des photolabil geschützten AntimiRs-92a, in Verbindung mit einer lokalen Belichtung der Mäusehaut, führte zu einer schnelleren Wundheilung. Die durch die miRNA ausgelöste Stilllegung von Genen ist Teil eines Prozesses, der als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet wird. Auch siRNAs („small interfering RNAs) vermögen RNAi auszulösen. Beide „Auslöser“ besitzen eine Gemeinsamkeiten: Sie werden beide innerhalb der Zelle aus einem langen RNA-Vorläufer durch ein Enzym namens Dicer prozessiert, bevor sie beide Teil eines Proteinkomplexes namens RISC werden. Während allerdings die miRNA ihren Ursprung in endogener, nicht-codierender RNA hat, so stammt die siRNA aus exogener, doppelsträngiger RNA, welche beispielsweise durch virale Vektoren in die Zelle eingebracht wird. Die durch siRNA ausgelöste RNAi legt demnach exogene (virale) Gene still und kann als Abwehrmechanismus gegen Fremd-RNA betrachtet werden. Ein weiterer Unterschied ist, dass siRNAs eine perfekte Basenkomplementarität zu den Ziel-mRNAs erfordern und folglich hochspezifisch nur ein Zielgen ansprechen. Die RNA-Interferenz ist ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit und wird ausführlich in Kapitel 1.4 behandelt. Studien zu lichtregulierter siRNA werden ebenfalls gesondert in Kapitel 1.4 erwähnt.

## 1.2 Photospaltbare Linker zur Erzeugung lichtinduzierter Strangbrüche

Spaltbare Linker werden in der organischen Chemie und chemischen Biologie verwendet, um mindestens zwei molekulare Einheiten zeitweise miteinander zu verbinden. Sie können zwischen funktionellen Zielmolekülen kovalente Bindungen ausbilden, welche durch spezielle Bedingungen gebrochen werden können. Ihren Ursprung haben spaltbare Linker in der organischen und kombinatorischen Synthese an fester Phase (SPOS)<sup>92</sup>, bei der organische Moleküle mittels Linker an Harze gekoppelt werden um beispielsweise niedermolekulare Wirkstoffe zu therapeutischen Zwecken herzustellen.<sup>93</sup> Auf diesem Prinzip aufbauend, wurden seither eine große Vielzahl von Linker für die unterschiedlichsten Anwendungsbereiche der Naturwissenschaften entwickelt. Eine bedeutende Anwendung ist die reversible Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden<sup>94</sup> z.B. für die DNA-Sequenzierung.<sup>95</sup> „Prodrugs“ (inaktive Vorstufe von Arzneimitteln) werden mittels Linker an einen Träger („carrier“) gebunden und werden an ihrem Wirkort durch enzymatische Hydrolyse des

Linkers aktiviert.<sup>96</sup> Erreicht ein Arzneimittel aufgrund mangelnder Durchdringung biologischer Barrieren seinen Zielort nicht ausreichend, so kann mit Hilfe von spaltbaren Linkern der Transport zum Wirkort verbessert werden. So konnte beispielsweise ein Krebswirkstoff an ein Peptid, das die Zellmembran von Tumorzellen durchdringt, gekoppelt und ortsspezifisch unter hydrolytischen, reduktiven oder enzymatischen Bedingungen freigesetzt werden.<sup>97</sup> In der Proteomik erleichtern spaltbare Linker die Identifizierung von Zielproteinen molekularer Wirkstoffe. Dabei werden molekulare Sonden verwendet, die den Wirkstoff enthalten und mit einem Trägermaterial verbunden sind. Unspezifische Bindungen anderer Proteine mit dem Trägermaterial verfälschen oft die Analyseergebnisse. Daher befinden sich zwischen Sonde und Trägermaterial spaltbare Linker, um die an der Sonde gebundenen Zielproteine von unspezifisch gebundenen Proteinen abzutrennen. Bei der anschließenden massenspektrometrischen Untersuchung wird somit das „Hintergrundrauschen“ reduziert und die Auswertung erleichtert. Eine vergleichbare Anwendung finden spaltbare Linker bei der Anreicherung und Aufreinigung von Zielproteinen mittels der Streptavidin-Biotin-Affinitätschromatographie.<sup>98,99</sup>



**Abbildung 17.** Schematische Darstellung des Prinzips der spaltbaren Linker

Die Abspaltung des Linkers vom gekoppelten Molekül oder der festen Phase wird durch ein Triggersignal initiiert (Abb. 17) und kann, je nach gewünschter Anwendung, unter verschiedenen Bedingungen stattfinden. So kann der Prozess beispielsweise durch Enzyme, Oxidationsmittel, Reduktionsmittel, elektrophile bzw. nukleophile Reagenzien oder organometallische Katalysatoren ausgelöst werden (einen ausführlichen Übersichtsartikel liefern Bradley *et al.*<sup>100</sup> und Leriche *et al.*<sup>101</sup>).

Abhängig von den Umständen, die zu einem Bindungsbruch führen, werden spaltbare Linker in Klassen eingeteilt. Die meisten dieser Klassen können allerdings, aufgrund der harschen Spaltbedingungen, nicht für biologische Anwendungen verwendet werden. Vor allem die biochemische und biologische Forschung beschäftigte sich daher intensiv mit der Entwicklung neuer spaltbarer Linker, welche sich unter biologischen Bedingungen stabil erweisen und unter biokompatiblen Bedingungen spaltbar sind.

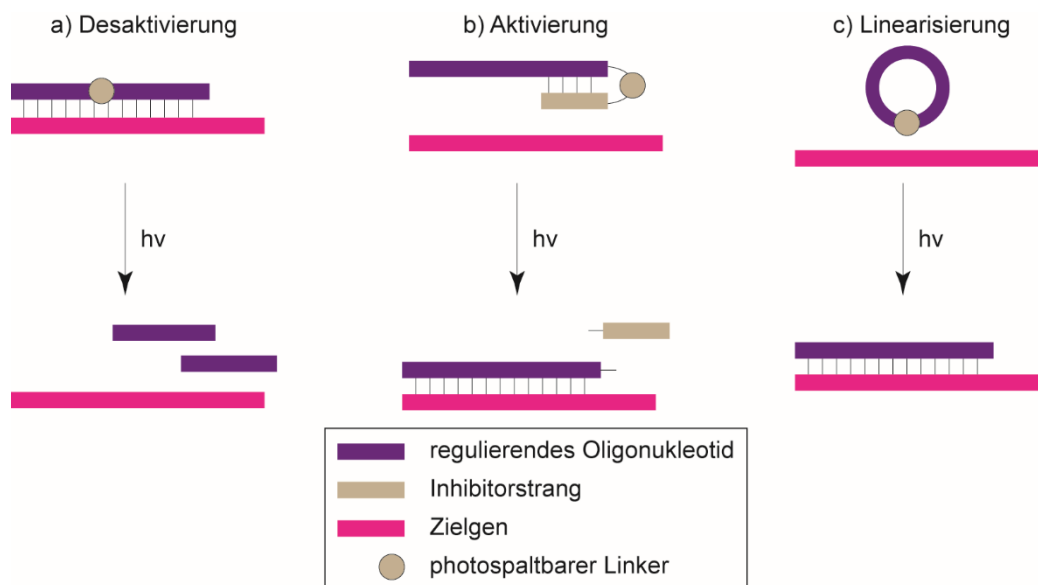
Ein biokompatibles Triggersignal stellt Licht dar (Vorteile wurden bereits in Kapitel 1.1 diskutiert). Photospaltbare Linker können verwendet werden, um Biomoleküle oder biologische Prozesse gezielt zeitlich und räumlich zu kontrollieren. Sie basieren auf der Photochemie von photolabilen Schutzgruppen, welche üblicherweise verwendet werden, um die Funktion von Biomolekülen temporär zu maskieren. Das Anwendungsspektrum photospaltbarer Linker ist vielseitig. Zum Beispiel verknüpfen sie biologisch aktive Verbindungen temporär oder markieren Biomoleküle zeitweise (mit fluoreszierenden Markern oder Farbstoffen). Die Gemeinsamkeit aller photospaltbaren Linkern ist jedoch, dass nach Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge lichtinduzierte Bindungsbrüche erzeugt werden, die sich auf die Funktionalität der jeweiligen modifizierten Verbindung auswirken. Zielmoleküle können beispielsweise Oligonukleotide<sup>102–104</sup>, Proteine<sup>105</sup>, Fluorophore<sup>106</sup> oder kleine molekulare Sonden<sup>98</sup> sein. Die Anforderungen an photospaltbare Linker entsprechen denen der photolabilen Schutzgruppen (diskutiert in Kapitel 1.1).

Durch die hohe Designvielfältigkeit photospaltbarer Linker werden sie in fast allen Bereichen der angewandten Naturwissenschaften verwendet. Die Anwendungen reichen von organischer Festphasensynthese<sup>100,107,108</sup> über „DNA sequencing by synthesis“-Methoden<sup>109,110</sup> bis hin zu verschiedensten Proteinanwendungen.<sup>111,112</sup> Beispielsweise konnte 1995 ein photospaltbares Biotin-Derivat, basierend auf den photochemischen Eigenschaften einer 1-(2-nitrophenyl)ethyl-Einheit, entwickelt werden, welches an Biomoleküle binden kann. Bestrahlung mit UV-Licht führte zu einer vollständigen Photolyse des Systems.<sup>113</sup>

Aufgrund der hohen Vielfältigkeit und Komplexität dieses Themengebietes würde eine vollständige Auflistung aller Anwendungsmöglichkeiten den Rahmen dieser Arbeit übersteigen. Diese Arbeit fokussierte sich auf die lichtinduzierte Erzeugung von Strangbrüchen in Oligonukleotiden, daher wird nun im Folgenden ausschließlich auf diesen Themenkomplex eingegangen. Der Übersichtsartikel „*Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology*“ von Klan *et al.* diskutiert, neben der Anwendung in Oligonukleotiden, weitere Anwendungsmöglichkeiten photospaltbarer Linker.<sup>30</sup>

Im Jahr 1995 beschrieben Ordoukhanian and Taylor erstmals die Anwendung eines photolabilen *ortho*-Nitrobenzyllinkers in Oligonukleotiden.<sup>114</sup> Daraufhin folgten weitere Anwendungen wie beispielsweise die Markierung des 5'-Endes von DNA mit Fluorophoren<sup>115</sup> für biologische Analysemethoden in der Genomik. Im Allgemeinen kann man zwischen drei Strategien, bei denen

lichtinduzierte Strangbrüche für die Kontrolle der Oligonukleotidfunktion verwendet werden, unterscheiden (Abbildung 18).



**Abbildung 18.** Linkerstrategien zur Regulation der Oligonukleotidaktivität mit Licht

Bei der ersten Methode (Abb. 18 a) können Antisense-Oligonukleotide durch die Spaltung in kleinere Fragmente desaktiviert werden. Ein Beispiel dazu lieferte die Arbeitsgruppe um Dmochowski. Im Fokus ihrer Forschung stand das 10-23 DNAzym, ein DNA-Strang mit  $Mg^{2+}$ -abhängiger, enzymatischer Funktion, welches den katalytischen Abbau komplementärer RNAs auslöst. Mit Hilfe eines lichtinduzierten Strangbruches gelang es, das aktive DNAzym in eine desaktivierte Form zu überführen.<sup>116</sup> Bei der zweiten Strategie (Abb. 18 b) können Oligonukleotide durch die Dissoziation eines intramolekularen Inhibitorstranges aktiviert werden. Ein, nach dieser Strategie funktionierendes Morpholino (ein Nukleinsäure-Analogon, welches durch die Bindung an mRNA die Translation hemmt) wurde von Ouyang *et al.* beschrieben. Sie verwendeten einen DMNB-basierten bifunktionalen Linker, um einen Inhibitorstrang zu koppeln, wodurch das Morpholino in seiner inaktivierten Form vorlag, welches durch Bestrahlung aktiviert werden konnte.<sup>117</sup> Die dritte Methode (Abb. 18 c) verwendet Linker-modifizierte, „end-to-end“ zyklisierte Oligonukleotide. Ist die Ringgröße optimal gewählt, so findet keine Hybridisierung an das Zielmolekül statt. Nach Bestrahlung gehen sie in ihre aktive, linearisierte Form über. Mit Hilfe zirkulärer Antisense-DNA konnte beispielsweise die Photoregulation der Genexpression *in vitro* gezeigt werden.<sup>118</sup>

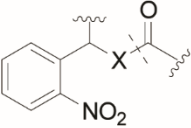
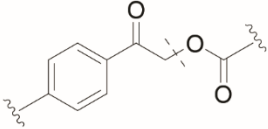
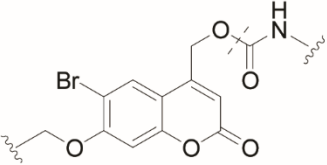
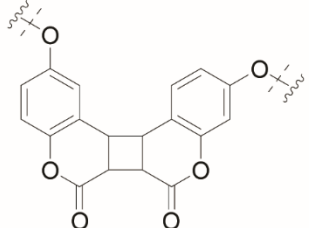
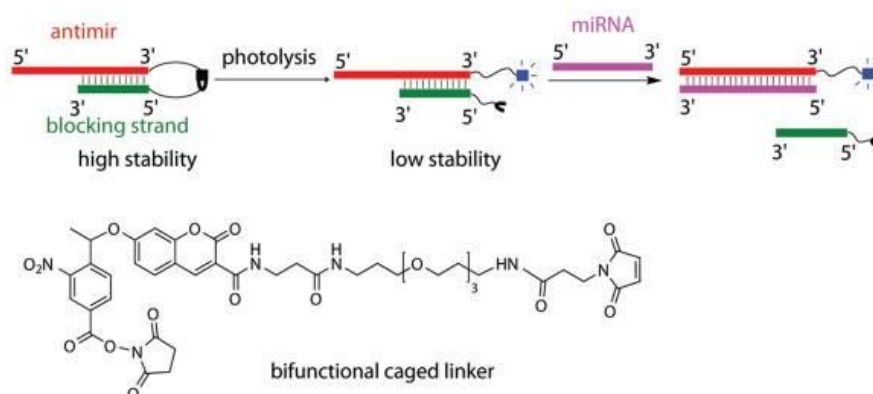
<u>Linker</u>	<u>Struktur</u>	<u>Photolysewellenlänge</u>
<i>ortho</i> -Nitrobenzyllinker		300 - 365 nm
Phenacyl-esterlinker		254 nm
BHC-basierter Linker (6-Brom-7-Alkoxycumarin-4-yl-methoxycarbonyl)		330 nm
Dicumarin-Linker		532 nm

Abbildung 19. Übersicht einiger photospaltbarer Linker

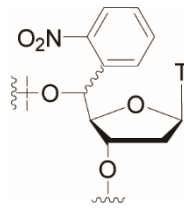
Abbildung 19 zeigt eine kleine Auswahl populärer photospaltbarer Linker. Der mit Abstand am häufigsten verwendete photolabile Linker ist der *ortho*-Nitrobenzyllinker und seine Derivate. Neben seiner guten synthetischen Zugänglichkeit zeichnet er sich durch seine hohe chemische Stabilität und einer schnellen Photolyserate aus. Die Photolyserate kann durch das Einführen von Alkoxy- oder Methylgruppen am benzylicen Ring zusätzlich um ein Vielfaches erhöht werden.<sup>119</sup> Die Freisetzung der Nitrosoverbindung bei Photolyse stellt eines der größten Nachteile der photolabilen *ortho*-Nitrobenzyleinheit dar, da sie in biologischen Medien schädlich ist und unerwünschte Nebenreaktionen verursachen kann.<sup>120</sup> Nichtsdestotrotz findet dieser Photolinker Verwendung in Oligonukleotidanwendungen, so beispielsweise als PCMMs („Photocleavable mass marker“). Olejnik *et al.*<sup>113</sup> markierten DNA bekannter Sequenz mit Proteinen definierter molarer Masse (z.B. Biotin). Verschiedene dieser Protein-DNA-Konjugate wurden mit immobilisierter Ziel-DNA/RNA in Kontakt gebracht. Bei komplementärer Sequenz konnten Ziel-DNA/RNA und Konjugat hybridisieren. Die Proteinmarker der hybridisierten PCMMs wurden mit Licht abgespalten und per Flugzeitmassenspektrometrie („time-of-flight mass spectrometry“) analysiert. Aus dem Masseergebnis konnte auf die Sequenz der Ziel-DNA/RNA zurück geschlossen und somit detektiert werden.<sup>121</sup>

Zheng *et al.* verwendeten einen bifunktionalen Photolinker, auf Basis des Cumarin-Gerüsts zur Herstellung eines photoaktivierbaren Antisense-Reagenz<sup>122</sup>. Ein gegen *lys-6*-miRNA gerichtetes AntimiR wurde dazu mit einem NPE-geschützten Cumarinlinker an einen komplementären Gegenstrang kovalent gebunden. Dies hatte zur Folge, dass das AntimiR erst nach Belichtung an seine Ziel-mRNA binden konnte. Damit konnte die Inhibierung von miRNA –Aktivität *in vivo* gezeigt werden. Durch die photolabile Schützung mit einer NPE-Gruppe erhielt der Linker eine zusätzliche Funktion: das Cumarin zeigte im unbelichteten und damit geschützten Zustand keine Cumarin-typische Fluoreszenz. Diese konnte erst nach Photolyse beobachtet und als Detektionssignal verwendet werden.



**Abbildung 20.** Der bifunktionale Cumarin-Linker verbindet AntimiR und Inhibitorstrang kovalent. In diesem Zustand kann keine Fluoreszenz detektiert werden. Nach Photospaltung des Linkers kann der Inhibitorstrang in Anwesenheit der Ziel-mRNA verdrängt werden. Zeitgleich wird die NPE-Schutzgruppe am Cumarin abgespalten, was die cumarin-typische Fluoreszenz zur Folge hat. Abbildung wurde entnommen aus Zheng *et al.*<sup>122</sup>

Dussy *et al.* verwendeten erstmalig einen nukleosidischen Linker zur Verwendung in DNA.<sup>8</sup> Sie entwickelten einen *o*-Nitrobenzyl-basierten Thymidin-Baustein, der in Lage war, die übliche Watson-Crick-Basenpaarung auszubilden und daher die Fähigkeit besaß stabile DNA-Duplexe zu formen. Gleichzeitig konnte er photochemisch Strangbrüche, sowohl in einzelsträngiger wie auch in doppelsträngiger DNA induzieren, welche als „caged DNA strand breaks“ bezeichnet werden. Im Vergleich zu nicht-nukleosidischen Linkern hatte dieser den Vorteil, dass er potentiell nutzbar war für Anwendungen, die auf die spezifische Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Nukleobasen oder des Zucker-Phosphat-Rückgrat beruhen. Vor allem Oligonukleotid-gesteuerte Umwandlungs- und Erkennungsprozesse scheinen dadurch für die lichtgesteuerte Regulation zugänglich zu werden. In der erwähnten Studie konnte gezeigt werden, dass dieser DNA-Linker kompatibel ist mit der, durch das Enzym *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA Polymerase angetriebenen, enzymatischen DNA Synthese. Abbildung 21 zeigt den von Dussy *et al.* entwickelten nukleosidischen Linker.

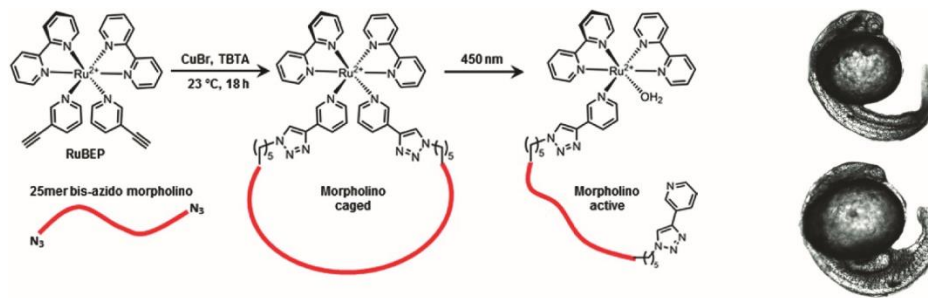


**Abbildung 21.** Der nukleosidische DNA-Linker, bestehend aus einer photolabilen *o*-Nitrobenzyl-Einheit an der 5'-Position des Zucker-Rückgrats, bildet stabile DNA Duplexe und induziert Strangbrüche in Oligonukleotiden<sup>8</sup>

Abschließend sollen noch einige Beispiele für die gezielte Kontrolle der Genexpression mittels lichtinduzierter Strangbrüche in Oligonukleotiden beschrieben werden. Es ist ein weiteres effektives Werkzeug der lichtgesteuerten Genregulation und ist vor allem für die Regulation durch synthetische Oligonukleotide (z.B. siRNA, miRNA, Antisense-Oligonukleotide) besonders wertvoll.

Zur Regulation der Geneexpression wurden beispielsweise ringförmige Antisense-Oligonukleotide mit einer photolabilen 1-(2-nitrophenyl)-1,2-ethanediol- Einheit entwickelt, die nach Photolyse in ihrer linearen Form an komplementäre RNA hybridisiert und den RNA-Verdau durch RNase H aktiviert.<sup>123</sup> Eine andere Methode zur Genregulation wurde von Tang *et al.* in Zebrafischen beschrieben. Dabei wurden Peptid-Nukleinsäuren (PNAs) mittels photolabiler Linker kovalent an komplementäre 2'OMe-RNA-Stränge gebunden, was in einer doppelsträngigen Haarnadelstruktur resultierte. Nach Photolyse wurde der PNA-Strang frei gegeben, welcher nun an mRNA hybridisiert. Aufgrund dessen wurde die Proteinsynthese bei embryonalen Zebrafischen herunter reguliert.<sup>124</sup> Dmochowski *et al.* kontrollierten die *in vitro* Translation einer GFP-mRNA, indem sogenannte „RNA bandages“, zwei durch einen photolabilen Linker gekoppelte Antisense-Oligonukleotide, verwendet wurden<sup>125</sup>. Die Affinität des gekoppelten Oligonukleotids zu einer komplementären RNA war um einiges höher als die der einzelnen Antisense-Stränge. Dies hatte zur Folge, dass nach Photospaltung die Bindung zur mRNA so schwach wurde, dass die zuvor verhinderte Translation aktiviert wurde. Die gleiche Arbeitsgruppe inaktivierte ein Morpholino-Oligonukleotid<sup>126</sup> mit einem photolabilen Ruthenium-Linker nach dem Prinzip der „end-to-end“-Zyklisierung (Abbildung 18 c). Dieses zirkuläre Morpholino war gegen zwei für die Embryonalentwicklung relevanten Zebrafisch-Gene gerichtet. Zebrafisch-Embryos mit inaktiverter Morpholino-Aktivität entwickelten sich normal. Belichtung hingegen führte zur Freisetzung des Morpholino-Oligonukleotids und zum Gene-Knockdown der entwicklungsrelevanten Proteine, was wiederum zu Missbildungen der Embryos führte.





**Abbildung 22.** Die Desaktivierung eines Morpholino-Oligonukleotids durch einen Ruthenium-basierten Photolinker und dessen Lichtaktivierung (links); Zebrafisch-Embryonen erhielten durch Mikroinjektion das durch Zyklisierung inaktivierte Morpholino, welches die Bildung des für die Embryonalentwicklung relevanten Proteins Chordin reguliert. Unbelichtete Zebrafisch-Embryonen (rechts oben) produzierten das Protein und zeigten einen normalen Entwicklungsverlauf. Belichtete Proben hingegen wiesen durch die inhibierte Proteinbiosynthese Missbildungen auf (rechts unten). Abbildungen wurden entnommen aus Griepenburg *et al.*<sup>126</sup>

### 1.3 Transkriptionsfaktoren

Prokaryoten haben die Möglichkeit sich an eine Vielzahl von Umgebungsbedingungen anzupassen. Ihre Gene können als Reaktion auf beispielsweise Temperaturänderung oder Nährstoffverfügbarkeit reguliert werden. Bei Eukaryoten muss zudem der Entwicklungsverlauf des gesamten Organismus kommuniziert und so die Morphologie und Funktion jeder einzelnen Zelle festgelegt werden. Durch die Regulation der Genexpression wird diese Zelldifferenzierung ermöglicht. Innerhalb einer Zelle sorgen unterschiedlichste Prozesse dafür, dass die richtigen Proteine zur richtigen Zeit und in einer bestimmten Menge zur Verfügung gestellt werden. Diese Prozesse haben unter anderem Einfluss auf die Regulation der Transkription, der Translation oder der Proteinaktivität, den RNA-Transport und den mRNA-Abbau. Bei der eukaryotischen Transkription ist die basale Transkriptionsrate eher gering. Meist sind daher zusätzlich Proteine involviert, die die Initiation, die Geschwindigkeit und die Expressionsstärke eines Gens bestimmen. Diese Proteine werden als Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Sie binden an Erkennungssequenzen der DNA und interagieren mit der RNA-Polymerase. DNA-bindende Transkriptionsfaktoren beeinflussen sowohl die Genexpression bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten. Prokaryotische Transkriptionsfaktoren wechselwirken meist direkt mit der RNA-Polymerase. Ein Transkriptionsfaktor reguliert dabei häufig die simultane Expression mehrerer verschiedener Gene. In eukaryotischen Zellen hingegen wird die Aktivität eines einzelnen Gens meist von einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren bestimmt. Diese können auch in großer Entfernung zur Promotorregion an die DNA binden oder auch nur indirekt über Protein-Protein-Interaktionen mit der RNA-Polymerase interagieren.<sup>127,128</sup>

Prinzipiell unterscheidet man bei Transkriptionsfaktoren zwischen „Generellen Transkriptionsfaktoren“ (GTFs) und „Regulatorischen Transkriptionsfaktoren“ (RTFs). GTFs bilden durch die Assoziation mit dem Promotor einen Präinitiationskomplex. Dabei wird die RNA-Polymerase zur Promotorregion dirigiert, um so den Zugang zum DNA-Matrizenstrang zu gewährleisten. Nach Bindung des Komplexes mit der RNA-Polymerase geht dieser in einen Initiationskomplex über. Für die Initiation der Transkription ist die Anwesenheit von GTFs mindestens erforderlich. Sie sind verantwortlich für die basale Transkriptionsaktivität aller Gene. RTFs hingegen übernehmen eine zeitliche und zelltypspezifische Regulation. Sie sind in der Lage Promotoren über die basale Transkriptionsaktivität hinaus zu kontrollieren, also die Transkription um ein Vielfaches zu verstärken oder die genetische Information zu reprimieren. RTFs sind modular aus verschiedenen Domänen aufgebaut: Die DNA-Bindungsdomäne erkennt regulatorische Sequenzen innerhalb der DNA, wie beispielsweise die distalen *cis*-Elemente „Silencer“ und „Enhancer“ (benannt nach ihrer Wirkung). Die Aktivierungsdomäne sorgt für eine Interaktion von RTFs mit GTFs. Dadurch kann die Transkriptionsinitiation beeinflusst werden. Die Repressordomäne rekrutiert weitere Proteine, die durch Veränderung der Chromatinstruktur in direkter Umgebung des Promotors die Transkription regulieren. Eine beispielsweise verdichtete Chromatinstruktur kann von den RNA-Polymerasen nicht ungehindert abgelesen werden.<sup>128</sup>

Die Aktivität regulatorischer Transkriptionsfaktoren wiederum wird von Mechanismen der Signaltransduktion bestimmt. Einige Transkriptionsfaktoren werden erst nach einem bestimmten Stimulus transkribiert, während ihre eigene Transkription von konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Anderen Transkriptionsfaktoren werden nach zellulärer Stimulation durch Kinasen oder Phosphatasen posttranslational phosphoryliert bzw. dephosphoryliert und dadurch aktiviert. Weitere Mechanismen zur Aktivitätsregulation sind die Freisetzung eines Inhibitors, die Bindung eines Liganden oder die Reifung des Faktors aus einem Vorläufer-Molekül.

### 1.3.1 Der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor

Im Jahre 1986 wurde der Transkriptionsfaktor „*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*“, kurz NF- $\kappa$ B von Baltimore *et al.* in Zellkernen von B-Lymphozyten als Aktivator für Immunglobulingene entdeckt.<sup>129</sup> Heute weiß man, dass dieser spezifische Transkriptionsfaktor in praktisch allen tierischen Zellen vorkommt und meist in einer latenten Form im Zytoplasma vorliegt.<sup>130</sup> Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B erfolgt durch äußere Reize (z.B. Zytokine, Virusinfektionen, UV-Strahlung), die auf Rezeptoren der Zelloberfläche wirken. Der an einen Inhibitor gebundene NF- $\kappa$ B-Komplex wird freigesetzt und transloziert in den Zellkern.<sup>131</sup> Die Induzierung der Genexpression

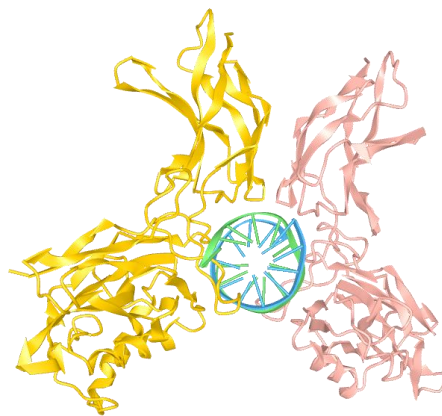
geschieht durch die Bindung des NF- $\kappa$ B an eine spezifische DNA-Sequenz, dem sogenannten  $\kappa$ B-Motiv, welches aus etwa zehn Basenpaaren besteht. In seltenen Fällen wird dadurch auch eine Repression der Transkription beobachtet. Derzeit geht man davon aus, dass etwa 500 verschiedene Gene von NF- $\kappa$ B reguliert werden.<sup>132</sup> Darunter fallen Zelladhäsionsmoleküle und Zytokine, die vor allem bei der Regulation des Immunsystems beteiligt sind. Weiterhin spielt es eine bedeutende Rolle beim Zellwachstum, der Proliferation und des programmierten Zelltods (Apoptose). Daher wird NF- $\kappa$ B auch mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Eine Dysregulation kann zu unterschiedlichen Krebsarten und zu chronischen Entzündungskrankheiten führen.<sup>133</sup> Des Weiteren wird die Aktivierung von NF- $\kappa$ B mit Krankheiten wie Diabetes, Schizophrenie, Multipler Sklerose und weiterer Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Inwieweit die Aktivierung von NF- $\kappa$ B dabei in den Krankheitsprozess eingreift, ist heutzutage noch häufig ungeklärt. Dennoch ist der NF- $\kappa$ B-Signalweg eine wichtige Zielstruktur für die Entwicklung neuer Medikamente. Ein bekannter NF- $\kappa$ B-regulierender Wirkstoff ist das Cortisol, das durch die Bindung an NF- $\kappa$ B dessen Aktivität inhibiert und somit die immunsuppressive Wirkung induziert.<sup>134,135</sup> Acetylsalicylsäure (ASS) und andere Salicylate greifen in die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade ein, indem diese an den Kinase-Komplex IKK binden, welcher für die Freisetzung des NF- $\kappa$ B im Zytoplasma maßgeblich verantwortlich ist. NF- $\kappa$ B verbleibt inhibiert im Zytoplasma und kann folglich keine Expression entzündungsfördernder Gene aktivieren.<sup>136</sup>

Bei NF- $\kappa$ B handelt es sich um einen Oberbegriff für mehrere, strukturell ähnliche Proteinkomplexe. Jeweils eine Untereinheit der Rel-Protein-Familie und der NF- $\kappa$ B-Protein-Familie, welche immer eine sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD) aufweisen, bilden einen heterodimeren Komplex. In Mammalia sind zurzeit fünf verschiedene Untereinheiten bekannt: p50, p52, Rel A (bzw. p65), Rel B und c-Rel. Des Weiteren existieren zwei weitere inaktive Proproteine p105 bzw. p100, welche in ihre kleineren reifen Fragmente p50 bzw. p52 posttranslational prozessiert werden.<sup>137,138</sup> Die Bezeichnung Rel geht auf v-Rel zurück, ein Onkogen des Vogel-Reticuloendotheliosis-Virus REV-T, welches Leukämie bei verschiedenen Vogelarten verursacht und in welchen diese Struktur erstmals entdeckt wurde.<sup>139,140</sup> Die Proteine der Rel-Subfamilie besitzen eine N-terminale RHD, bestehend aus der DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne sowie eine C-terminale Serin-reiche Transaktivierungsdomäne, die die Transkription im Zellkern aktiviert.<sup>141,142</sup> Die Proteine der NF- $\kappa$ B-Subfamilie p52 und p50 zeigen ebenfalls die RHD, allerdings fehlt ihnen die Transaktivierungsdomäne, da diese bei der Prozessierung aus den Proproteinen durch Proteasen abgespalten wird.<sup>143</sup>

Prinzipiell können aus den Proteinen der Rel-Familie und der NF- $\kappa$ B-Familie viele verschiedene Dimere kombiniert werden. Tatsächlich aber treten einige Kombinationen häufiger auf als andere. Ein klassisches Beispiel ist das p50/p65-Heterodimer, welches aufgrund der

Transaktivierungsdomäne des Rel-Proteins aktivierend auf die Transkription wirkt. In seltenen Fällen kommen Homo- und Heterodimere der NF- $\kappa$ B-Familie (z.B. p50/p50), ohne Beteiligung der Rel-Familie, vor. Diese können an die NF- $\kappa$ B-Aktivierungssequenz der Zielgene binden, allerdings aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne keine Transkription auslösen. Damit blockieren sie die DNA-Bindung der Rel-Protein-enthaltenden Dimere kompetitiv<sup>144,145</sup> und verhindern dessen Transkriptionsaktivität. Sie wirken daher als Repressor. Alle NF- $\kappa$ B-Untereinheiten, mit Ausnahme des Rel B, sind in der Lage sowohl Homo- als auch Heterodimere untereinander auszubilden. Rel B dimerisiert ausschließlich mit p50 oder p52.

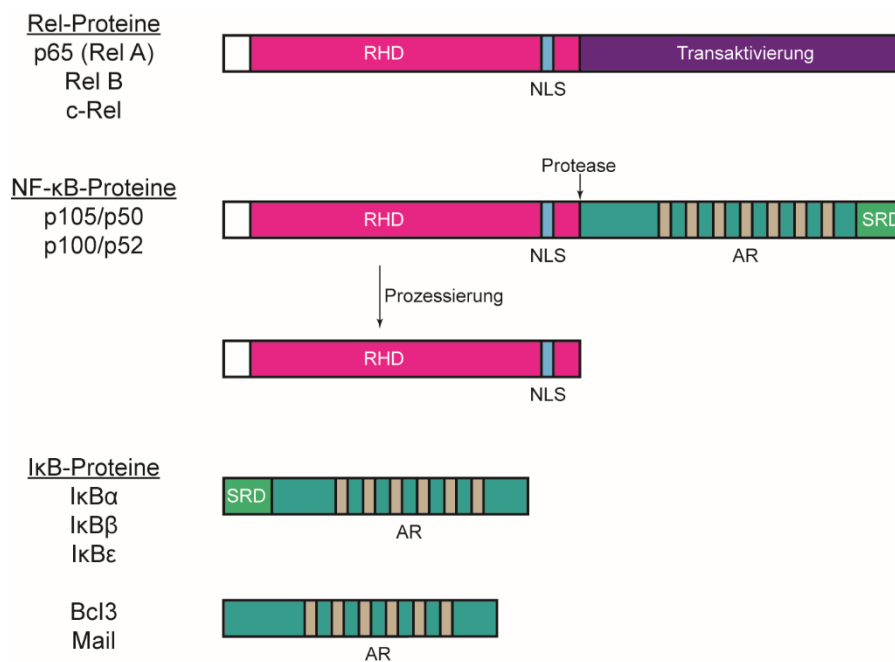
Die Fähigkeit zur sequenzspezifischen Erkennung der DNA-Bindestelle erhält das NF- $\kappa$ B durch ein spezielles Strukturmotiv<sup>146,147</sup>, welches von nur wenigen Transkriptionsfaktoren verwendet wird. Es handelt sich um das Schleifenmotiv, welches die Interaktion von DNA und Protein durch sogenannte „Loops“ (Schleifenstrukturen) ermöglicht. Die „Loops“ sind eine Folge der Dimerisierung der Untereinheiten des Proteins und ragen in die große Furche der DNA rein<sup>148</sup>, wo die Aminosäuren spezifisch an die Konsensussequenz ( $\kappa$ B-Motiv) binden. Die Konsensussequenz besitzt die allgemeine Form: 5'- GGGRNNYYCC-3' (R = Purinbase, Y = Pyrimidinbase, N = beliebiges Nukleotid). Je nach Sequenz variieren die Wechselwirkungen zwischen  $\kappa$ B-Motiv und Dimer, was sich wiederum in der leicht unterschiedlichen Zielsequenzaffinität der verschiedenen Transkriptionsfaktoren äußert.<sup>131</sup> Abbildung 23 zeigt die 3-dimensionale Struktur eines NF- $\kappa$ B-DNA-Komplexes.



**Abbildung 23.** Kristallstruktur des p50/p65-Heterodimers gebunden an DNA. Die Dimerisierungsdomäne, im oberen Teil der Moleküle, besteht aus  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen und erreicht die Interaktion zwischen den Monomeren. Im mittleren Teil befindet sich die Schleifenstruktur über die die DNA gebunden wird. Kristallstruktur gelöst von Chen *et al.*<sup>149</sup>

Die Aktivität der NF- $\kappa$ B-Dimere wird durch Proteine der I $\kappa$ B-Familie reguliert. In nicht stimulierten Zellen werden die Dimere durch das I $\kappa$ B (Inhibitor des NF- $\kappa$ B) komplexiert und dadurch in einer inaktiven Form gelagert. Tatsächlich existieren für die unterschiedlichen NF- $\kappa$ B-Signalwege (Kapitel 1.3.2) jeweils passende I $\kappa$ B-Komplexe. Aufgrund ihrer Lokalität lassen sie sich in zytoplasmatische (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$ ) und nukleäre Vertreter (Bcl1 und Mail) einteilen. Klassische, zytoplasmatische

I $\kappa$ Bs interagieren mit den NF- $\kappa$ B-Proteinen im Zytoplasma. Die atypischen, nukleären I $\kappa$ Bs werden nicht konstitutiv, sondern induziert exprimiert und regulieren die nukleäre NF- $\kappa$ B-Aktivität. Alle I $\kappa$ B-Proteine weisen als strukturelles Merkmal die sogenannte „Ankyrin repeat“-Domäne (AR) auf, welche mit der RHD der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten interagiert und so für die Assemblierung des Inhibitor-Komplex verantwortlich ist. Außerdem verhindert es den Kernimport des NF- $\kappa$ Bs und die DNA-Bindung.<sup>150</sup> Die NF- $\kappa$ B-Proteine p105 und p100 weisen neben der RHD, ebenfalls ein zusätzliches AR-Motiv auf, wodurch diese als Vorläufer inaktiviert werden und erst nach Prozessierung in reife Transkriptionsfaktoren überführt werden.



**Abbildung 24.** Struktur der verschiedenen Domänen der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten und der I $\kappa$ B-Proteinfamilie. Alle NF- $\kappa$ B-Untereinheiten weisen eine Rel-Homologie-Domäne (RHD) auf, die die Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren und die DNA-Bindung auslöst. Am C-terminalen Ende der RHD befindet sich das Kernlokalisierungssignal (NLS). Die Untereinheiten der Rel-Familie besitzen eine Transaktivierungsdomäne, welche die Transkription im Zellkern aktiviert. Die Untereinheiten p105 und p100 sind Vorläuferproteine der reifen Untereinheiten p52 bzw. p50, welche proteolytisch prozessiert werden. Die Vorläufer- und I $\kappa$ B-Proteine besitzen eine „Ankyrin-repeat“-Domäne (AR), die mit der RHD interagieren kann und somit die DNA-Bindung als auch den Kernimport unterdrückt. Die „signal response“-Domäne (SRD) ist eine Phosphorylierungsstelle, die von dem I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK) angegriffen werden kann und das Proteine für den Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom markiert.

### 1.3.2 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg

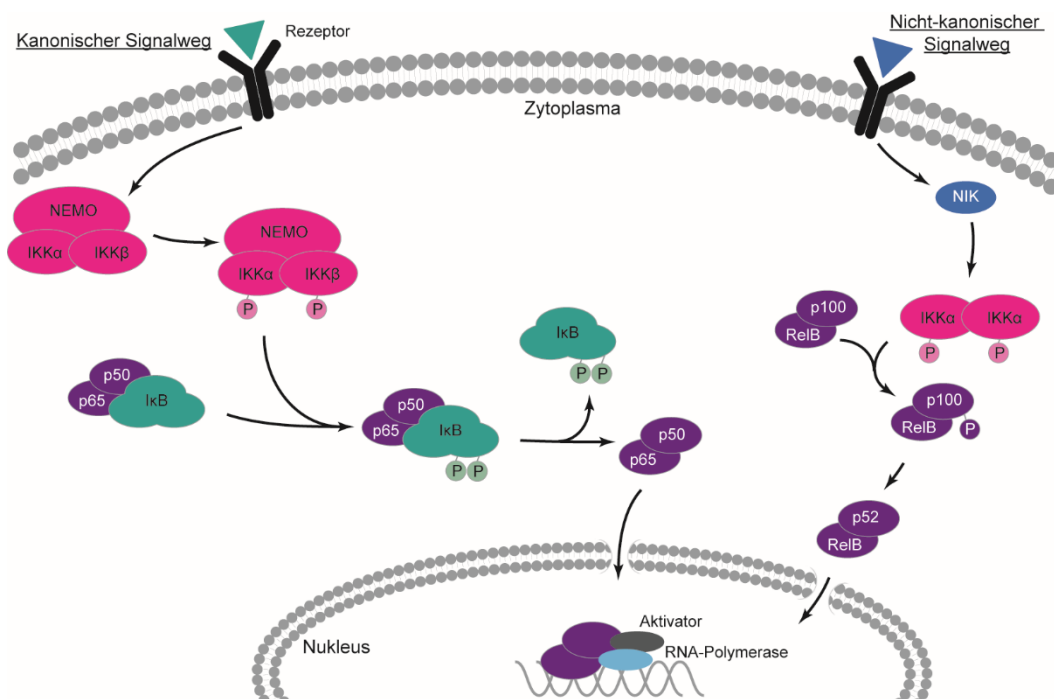
Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird posttranskriptionell reguliert. Es liegt, wie bereits erwähnt, präformiert in der Zelle vor und muss nach Aktivierung nicht neu synthetisiert werden. Das NF- $\kappa$ B wird in den meisten Zellen durch die Bindung an seine Inhibitorproteine im Zytoplasma deaktiviert. Ausnahmen bilden Antikörper-produzierende B-Zellen, aktivierte T-Zellen und Makrophagen, bei denen NF- $\kappa$ B dauerhaft aktiviert vorliegt.<sup>130</sup>

Die Aktivierung des zytoplasmatischen NF- $\kappa$ Bs erfolgt üblicherweise durch pathogene Signale, die die Zelle stimulieren. Sie reichen von zellulären Botenstoffen (wie die proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin 1 (IL-1)) über infektiöse Faktoren (z.B. Viren und Bakterien) bis hin zu Stresssignalen wie beispielsweise ionisierende Strahlung.<sup>151</sup> Heutzutage sind zwei rezeptorvermittelte Mechanismen der Signaltransduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung bekannt, obwohl zweifelsfrei weitere existieren, welche allerdings bisher in ihren Abläufen noch kaum verstanden werden. Bei dem klassischen (kanonischen) Signalweg<sup>152</sup> erfolgt die Einwirkung der Stimuli über verschiedene Rezeptoren der Toll-like-Rezeptor- (TLR), der Tumornekrose-Rezeptor- (TNFR) und der Interleukin-1-Rezeptor (IL1R)-Familie. Sie induzieren eine Signalkaskade, bei der der Abbau des I $\kappa$ B durch Phosphorylierung an zwei spezifischen Serinresten und einer folgenden Multiprotein-Ubiquitinierung eingeleitet wird.<sup>153–155</sup> Dadurch wird zusätzlich die Phosphorylierung von p65 induziert, welche unverzichtbar ist für die NF- $\kappa$ B-Aktivität im Zellkern.<sup>156</sup>

Verantwortlich dafür ist die Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes (IKK), welcher aus drei Einheiten aufgebaut ist<sup>157</sup>: die katalytischen Komponenten I $\kappa$ B-Kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) und I $\kappa$ B-Kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ) und die regulatorische Komponente I $\kappa$ B-Kinase  $\gamma$  (IKK $\gamma$ , auch bezeichnet als „NF- $\kappa$ B essential modifier“ (NEMO)).<sup>158</sup> Die Aktivierung des IKK erfolgt durch Autophosphorylierung der beiden katalytischen Untereinheiten, wobei nur die Stimulation von IKK $\beta$  für die Phosphorylierung von I $\kappa$ B notwendig ist.<sup>159</sup> Zandi *et al.*<sup>160</sup> konnten zwar zeigen, dass IKK $\alpha$  I $\kappa$ B $\beta$  an den Serinen 19 und 23 phosphoryliert, diese Aktivierung allerdings nicht essentiell ist. IKK $\beta$  phosphoryliert I $\kappa$ B $\alpha$  an den Serinen 32 und 36.<sup>161</sup> Dadurch entsteht eine Bindestelle, an der Ubiquitin anlagert. Das I $\kappa$ B wird dadurch markiert und von Proteasomen zu Fragmenten abgebaut. Das dadurch freiwerdende NF- $\kappa$ B kann in den Zellkern translozieren und verschiedene Gene aktivieren. IKK $\gamma$  enthält keine katalytische Einheit. Allerdings rekrutiert es den IKK-Komplex an IKK $\beta$  aktivierende Kinasen und ist daher für die Aktivierung des Gesamtkomplex unverzichtbar.<sup>162</sup>

Der TNF- $\alpha$ -Signalweg ist das klassische Beispiel für den kanonischen Signalweg. Im Allgemeinen hängt dieser nicht von der Proteinbiosynthese ab und reagiert schnell auf eine Vielzahl von Reizen. Der alternative, sogenannte „nicht-kanonische“ Signalweg wird in Abhängigkeit des Zelltyps und der Art des Reizsignals ausgelöst. Er verläuft ebenfalls über die Aktivierung eines I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes,

reagiert aber vergleichsweise langsam und andauernd. Bei diesem Signalweg spielen hauptsächlich die im Zytoplasma inaktiv vorliegenden RelB/p100-Komplexe eine entscheidende Rolle. Der Hauptregulator, die NF- $\kappa$ B-induzierte Kinase (NIK), wird über entsprechende Rezeptoren (beispielsweise CD40 oder LT $\beta$ R) aktiviert, welche wiederum einen IKK-Komplex aktiviert, der aus zwei IKK $\alpha$ -Untereinheiten besteht. Diese phosphorylieren die C-terminale Reste im RelB/p100-Komplex, was zu dessen Ubiquitinierung und Prozessierung zu RelB/p52-Komplexen führt. Die anschließende Kernlokalisierung des reifen Dimers induziert die gezielte Genexpression.<sup>159,163</sup>



**Abbildung 25.** Im kanonischen (klassischen) Signalweg (links) werden NF- $\kappa$ B/Rel-Proteine von I $\kappa$ B komplexiert und dadurch inaktiviert. Eine Vielzahl von Rezeptoren können einen IKK-Komplex (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und NEMO) aktivieren, der wiederum I $\kappa$ B phosphoryliert. Dies führt zu dessen Ubiquitinierung und dem anschließenden Abbau durch Proteasomen. Dadurch werden die NF- $\kappa$ B/Rel-Proteine freigesetzt, posttranslational modifiziert und in den Zellkern transloziert. Im nicht-kanonischen (alternativen) Signalweg (rechts) aktiviert die Kinase NIK IKK $\alpha$ -Komplexe, die im Zytoplasma inaktiviert vorliegende RelB/p100-Komplexe phosphorylieren. Diese werden durch Proteasomen zu reifen RelB/p52-Proteinen prozessiert, welche in den Zellkern translozieren.

### 1.3.3 Die Regulation NF- $\kappa$ B-abhängiger Transkription mit Decoy-Oligonukleotiden

NF- $\kappa$ B ist bei der Expression einer großen Anzahl von Genen involviert. Vor allem durch seine Beteiligung bei Entzündungsprozessen und der Immunantwort birgt die Regulation von NF- $\kappa$ B ein gewisses therapeutisches Potential. Durch seine komplexen Interaktionen bei vielen physiologischen Vorgängen ist es ein offensichtlicher Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Behandlungsformen. Einige Viren, so beispielsweise auch das menschliche Immunschwächevirus HIV-1 (Humanes Immundefizienzvirus Typ 1),<sup>164</sup> verwenden NF- $\kappa$ B zur Aktivierung ihrer eigenen Gene oder zur Stimulation der Proliferation. Bei der Krebstherapie ist es besonders vielversprechend, in fehlreguliertes Zellwachstum einzugreifen oder eine übermäßige Zytokin-Produktion zu hemmen. Die Regulation NF- $\kappa$ B-abhängiger Genexpression gewinnt daher immer mehr an Bedeutung.

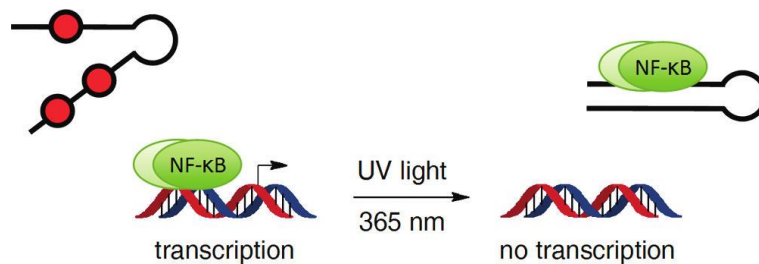
Eine Möglichkeit der Regulation zellulärer oder viraler Transkription stellen die Desoxyribonukleinsäure-Decoys (ODNs) dar.<sup>165,166</sup> Sie binden freigesetzte Transkriptionsfaktoren und reduzieren damit deren Verfügbarkeit für die Interaktion mit der endogenen DNA-Bindestelle und der RNA-Polymerase. Die Decoys werden dementsprechend so aufgebaut, dass sie die kurze Konsensussequenz für Transkriptionsfaktoren beinhalten, mit der sie die natürliche Bindestelle nachahmen. Befinden sich Decoys in der Zelle überschüssig, binden Transkriptionsfaktoren bevorzugt daran und lassen die natürliche DNA-Bindestelle unbesetzt. Folglich wird die Transkription inhibiert. Daher werden Decoys auch gelegentlich als „Ködermoleküle“ bezeichnet. Diese Methode erlaubt prinzipiell die Regulation kompletter „Sets von Genen“, welche von der Anwesenheit des entsprechenden Transkriptionsfaktors abhängig sind. Im Vergleich dazu sprechen RNAi oder Antisense-Methoden lediglich ein einzelnes Gene an, indem bei ihnen transkribierte mRNA blockiert wird.

Erstmalig zeigten Bielinska *et al.*, dass doppelsträngige Phosphorothioat-Oligonukleotide mit einer  $\kappa$ B-Konsensussequenz NF- $\kappa$ B binden und als DNA-Decoy interagieren können.<sup>167</sup> Den ersten erfolgreichen *in vivo*-Transfer (Lipidvermittelter Gentransfer mittels des Sendai Virus) von NF- $\kappa$ B-Decoys zeigten Morishita *et al.*<sup>168</sup> an Koronararterien. Transfizierte Decoys zeigten eine hohe Affinität zu NF- $\kappa$ B und blockierten die Aktivierung von Interleukin 6 (IL-6) und dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül (VCAM), welche an der Entstehung von Myokardinfarkten beteiligt sind. Diese Decoys stellen demnach eine effektive Therapiegrundlage dar. In einer weiteren Studie wurden NF- $\kappa$ B-Decoys als therapeutisches Mittel gegen Intimahyperplasie verwendet.<sup>169</sup>

Deiters und Mitarbeiter erweiterten dieses Konzept und entwickelten Licht-aktivierbare, photolabil geschützte DNA-Decoys, um NF- $\kappa$ B-gesteuerte Genexpression zu regulieren. Sie zeigten, dass sich NF- $\kappa$ B in Anwesenheit der geschützten Decoys an seine endogene DNA-Bindestelle anlagert und somit Transkription initiiert. Nach Bestrahlung bzw. Entschützung der Decoys war es möglich, die NF-



$\kappa$ B-abhängige Genexpression effektiv zu stoppen, da die nun freien Decoys das NF- $\kappa$ B von ihrem eigentlichen Zielpromotor entfernen und aufgrund der höheren Affinität binden.<sup>78</sup>



**Abbildung 26.** Mehrere photolabile Schutzgruppen am DNA-Decoy verhindern die Watson-Crick-Basenpaarung, die Ausbildung einer stabilen Doppelstrangstruktur und die Bindung des NF- $\kappa$ Bs. Der photolabil geschützte Decoy liegt inaktiv vor. Folglich bindet NF- $\kappa$ B an seine native Bindestelle und initiiert die Transkription (links). Nach Bestrahlung mit UV-Licht werden alle photolablen Schutzgruppen entfernt, woraufhin der Decoy eine stabile doppelsträngige Haarnadelstruktur ausbildet und die natürliche NF- $\kappa$ B-Bindestelle nachahmt (rechts). Die Konsequenz daraus ist die Inhibition der Genexpression. Grafik entnommen aus Govan *et al.*<sup>78</sup>

Während es sich bei dieser Studie um „off-to-on“-Decoys handelte zeigten Harki *et al.* den gegenteiligen Effekt. Sie entwickelten die sogenannten „catch and release“-Decoys (CRDD), welche eine 7-Nitroindol-Einheit enthielten und ihr Zielprotein NF- $\kappa$ B binden konnten. In *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass UV-Licht-Bestrahlung zur Depurinierung des modifizierten Nukleotids und der Entstehung einer abasischen Stelle führte, woraufhin der Decoy seine Affinität zu NF- $\kappa$ B verlor.<sup>170</sup>

## 1.4 RNA-Interferenz

Im Jahre 1998 stellten Andrew Fire und Craig Mello erstmal einen Mechanismus vor, der als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet wird.<sup>171</sup> Er beschreibt die zielgerichtete Stilllegung von Genen durch kurzsträngige regulatorische RNAs. Es handelt sich bei dem Mechanismus um einen hochkonservierten, natürlichen, eukaryotischen Prozess, welcher sich allerdings zu einem der wichtigsten Werkzeuge der Zell- und Molekularbiologie entwickelt hat. Einer der größten Vorteile ist, dass zur funktionellen Untersuchung von Genen, diese nicht genetisch aufwendig, sondern mittels RNAi spezifisch, inaktiviert werden können. Für diese revolutionäre Entdeckung wurde im Jahre 2006 der Nobelpreis verliehen.

Im Zentrum der RNAi stehen lange doppelsträngige RNAs, welche innerhalb der Zelle zu kurzen siRNAs (*small interfering RNAs*) prozessiert werden. Fire und Mello zeigten im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), dass die Genexpression durch diese doppelsträngigen RNAs besser inhibiert wird (ca. 100-fach stärker), als durch einzelsträngige Antisense-Oligonukleotide, die zur entsprechenden mRNA komplementär sind. Dahinter steckt ein Vorgang, bei dem die siRNA entwunden und einer der beiden Stränge in einen Proteinkomplex aufgenommen wird, der als „RNA-induzierter Silencing-Komplex“ (RISC, *RNA-induced silencing complex*) bezeichnet wird. Der RISC-Komplex lokalisiert über Basenpaarung das komplementäre mRNA-Transkript und induziert dessen Abbau.

Bei dem Versuch, die Entdeckungen der RNAi in Fadenwürmer auf Säugerzellen zu übertragen, wurde schnell klar, dass lange doppelsträngige RNAs (dsRNAs) nicht toleriert werden. Sie aktivieren in den verwendeten Zellen eine unspezifische Interferonantwort<sup>172</sup> und die RNA-abhängige Proteinkinase (PKR), die den Translationsfaktor eIF2 phosphoryliert<sup>173</sup> und somit die Translation der Zelle inhibiert. Schlussendlich lenken sie die Zellen in den programmierten Zelltod (Apoptose).<sup>128</sup> Erst im Jahre 2001 zeigten Elbashir *et al.*, dass kurze doppelsträngige RNAs mit 21 Nukleotiden (synthetische siRNAs) auch in humanen Zelllinien zum „Gensilencing“ verwendet werden können.<sup>174</sup>

### 1.4.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Lange doppelsträngige RNA, wie sie beispielsweise bei der Vervielfältigung viraler RNA anfällt, ist zwar der Auslöser der RNAi, aber nicht deren Effektor. Der zentrale Schritt der RNA-Interferenz ist die Bildung interferierender RNA. Dabei wird die lange dsRNA an das ATP-abhängige RNase-III-Enzym Dicer<sup>175</sup> gebunden und zu kurzen dsRNA-Fragmenten aus ca. 21 bp abgebaut, welche an den 3'-Enden ungepaarte Überhänge von zwei Nukleotiden und an den 5'-Enden Phosphatgruppen aufweisen<sup>176</sup>: die siRNAs. Besonders entscheidend bei der Hybridisierung der siRNA an die mRNA

sind die Nukleotide 3-8, da sie einen besonders großen Beitrag zur Bindungsenergie des Doppelstranges leisten. Dieser Bereich wird als seed-Region bezeichnet (Abb. 27).

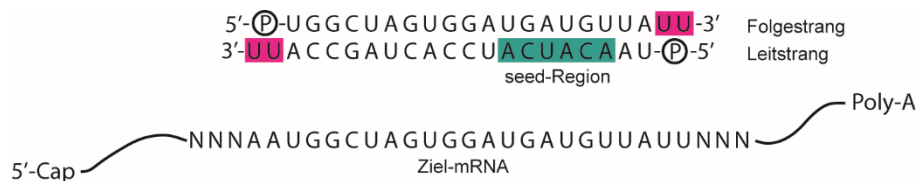


Abbildung 27. Struktur einer siRNA mit beispielhafter Sequenz

Bei den siRNAs handelt es sich um die eigentlichen Effektormoleküle. Diese werden von verschiedenen Proteinen der Argonaut-Familie gebunden, welche den Doppelstrang entwinden und die Einzelstränge voneinander trennen. Während der sogenannte Folgestrang (*passenger strand*) durch zelluläre Abbauprozesse zerlegt wird, verbleibt der Leitstrang (*guide strand*) am Protein gebunden und bildet den RISC-Komplex. Welcher der beiden Stränge als Leitstrang im Komplex verbleibt, erfolgt nach der Asymmetrie-Regel, welche die Bindungsstärke der komplementären Basen an den Enden der siRNA betrachtet.<sup>177</sup> Der Strang mit dem schwächer gepaarten 5'-Ende, also mehr A-U-Paarungen, gilt als Leitstrang und wird von RISC gebunden.

Die Argonaut-Proteine werden in zwei Unterfamilien eingeteilt: die Ago- und die PIWI-Gruppe. In erster Linie sind Proteine der Ago-Gruppe an den Reaktionen der RNA-Interferenz beteiligt, indem sie als Bindungsmodul der siRNA dienen. Im Prinzip bestehen sie aus drei funktionellen Domänen. Die PAZ-Domäne interagiert mit dem 3'-Ende der siRNA (oder im Allgemeinen: eines kurzen RNA-Strangs).<sup>178</sup> Die Mid-Domäne enthält eine Bindetasche für den 5'-Phosphatüberhang des Leitstranges.<sup>179,180</sup> Dadurch werden die RNA-Stränge so gebunden, dass sie über das Zucker-Phosphat-Rückgrat mit dem Argonaut-Protein interagieren und dementsprechend die Basen nach außen hin mit komplementären RNAs Basenpaarungen eingehen können. Der RISC-Komplex nutzt demnach die Sequenzinformation der siRNA, um zu komplementären mRNAs zu dirigieren. Die PIWI-Domäne enthält die Endonukleaseaktivität und spaltet die Ziel-mRNA sequenzspezifisch, wenn sie vollständig komplementär zum gebundenen siRNA-Leitstrang ist. Durch die Anordnung des Leitstrangs im Komplex lagert sich die mRNA so an, dass sich dessen Phosphatgruppe zwischen dem 10. und 11. Nukleotid an der katalytischen RNase-Einheit der PIWI-Domäne befindet und sich somit immer ein gleiches Schnittmuster ergibt.<sup>181</sup> Die zerschnittene mRNA wird im Anschluss von zelleigenen Nukleasen abgebaut. In menschlichen Zellen ist allerdings lediglich das Ago2-Protein endonukleotisch aktiv.<sup>182</sup>

Um RNAi durch siRNA auszulösen zeigten Chiu und Rana die Notwendigkeit einer vollständigen A-Helix des RNA/RNA-Doppelstranges.<sup>183</sup> 11 Nukleotide (eine Windung einer RNA-A-Helix umfasst 11,6

Nukleotide) werden als Minimalkonsens für die Aktivierung der RNAi beschrieben.<sup>184</sup> Die Selektivität einer siRNA gegenüber des komplementären Gegenstranges ist allerdings nicht immer ausreichend vorhanden. Fehlpaarungen innerhalb der siRNA-Sequenz reduzieren deren Aktivität nicht zwingend. Eine siRNA muss folglich nicht immer vollständig komplementär sein um RNAi auszulösen. Somit besteht zumindest eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass auch eine andere mRNA als die gewünschte abgebaut wird. Zudem kann die alleinige Bindung der seed-Region an Abschnitte des 3'-untranslatierten Bereiches einer mRNA zu dessen Abbau führen („off-target-Effekt“).<sup>185</sup> Um keine ungewollte Inhibierung anderer mRNAs auszulösen, sollte eine Übereinstimmung zum 3'-untranslatierten Bereich daher ausgeschlossen werden.

Neben der siRNA wurde auch eine weitere RNA-Spezies identifiziert, die für den sequenzspezifischen Gen-Knockdown verantwortlich ist. Es handelt sich um die sogenannte microRNA (miRNA), eine einzelsträngige, hoch konservierte, nicht codierende und endogene RNA mit einer Länge von etwa 21 Nukleotiden.<sup>80,186</sup> Ihre Gene sind im Genom auf den Chromosomen zwischen anderen Genen lokalisiert und werden von der RNA-Polymerase II<sup>187</sup> transkribiert, wobei zunächst ein Primärtranskript (*primary micro RNA*, pri-miRNA) mit einer Länge von bis zu 3000 Nukleotiden vorliegt. Die pri-miRNA, welche über den üblichen Poly-A-Schwanz und der 5'-Cap-Struktur verfügt, bildet im Nukleus aufgrund elektrochemischer Eigenschaften eine Haarnadelstruktur mit flankierenden Sequenzen. Aus dem doppelsträngigen Stamm der Haarnadel resultiert später die reife miRNA. Doch zunächst erfolgt noch im Zellkern die Spaltung der pri-miRNA durch das Enzym Drosha, einer RNase III. In humanen Zellen benötigt Drosha zusätzlich das RNA-Bindeprotein DGCR 8 (*DiGeorge syndrome chromosomal region 8*)<sup>188,189</sup>, in *Drosophila melanogaster* und *C.elegans* auch bekannt als Pasha, als Kofaktor. Drosha erkennt den doppelsträngigen Bereich der Schleifenstruktur und entfernt die flankierenden Sequenzen. Daraus resultiert die etwa 70 Nukleotid lange pre-miRNA (*precursor miRNA*). Der Exportrezeptor Exportin-5 transportiert nun die pre-miRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma, wo das Enzym Dicer, genauso wie bei der siRNA, 21 Nukleotid-lange miRNA prozessiert. Auch hier wird im Anschluss die doppelsträngige RNA entwunden und der reife miRNA-Strang entsprechend der Asymmetrieregeln ausgewählt. In seltenen Fällen, wie beispielsweise bei der miRNA miR-9<sup>190,191</sup>, zeigen beide Stränge eine regulatorische Wirkung. Die reifen miRNAs werden in einen Ribonukleoproteinkomplex (miRNP) eingebaut, der große Ähnlichkeit zum RISC-Komplex aufweist. Hier wird, ähnlich wie bei der siRNA, die Sequenzinformation der miRNA verwendet um den Komplex zu komplementären mRNA-Bereichen zu dirigieren. Die miRNA/mRNA-Bereiche müssen dabei nicht zwingen vollständig komplementär zueinander sein. Ausschlaggebend ist die seed-Region. Meist zeigt die seed-Region volle Komplementarität zur Ziel-mRNA, während die restlichen Bereiche weniger stark gepaart sein können. Der Grad der Komplementarität bestimmt nun den weiteren Ablauf. Ist die Ziel-mRNA vollständig oder nahezu vollständig komplementär, so

wird die Zielsequenz, wie bei der klassischen RNAi, durch das Ago-Protein spezifisch zerschnitten. Ist die Zielsequenz nur teilweise komplementär, bindet das Ago-Protein ein sogenanntes GW-Protein (besteht aus einer wiederholenden Glycin (G)-Tryptophan(W)-Abfolge). Dieses interagiert mit Poly(A)-bindenden Proteinen, welche sich am Poly(A)-Ende der Ziel-mRNA befinden. Durch die Rekrutierung eines CCR4-NOT-Komplexes wird der Poly(A)-Schwanz teilweise deadenyliert, wodurch die mRNA nicht mehr translatiert werden kann. Die Translation wird inhibiert ohne dass die mRNA abgebaut wird. Alternativ dazu kann ein verkürzter Poly(A)-Schwanz ein Enzymsystem aktivieren, welches die 5'-Cap-Struktur der mRNA entfernt. Dadurch können 5'-3'-Exoribonukleasen die mRNA vom 5'-Ende her abbauen.

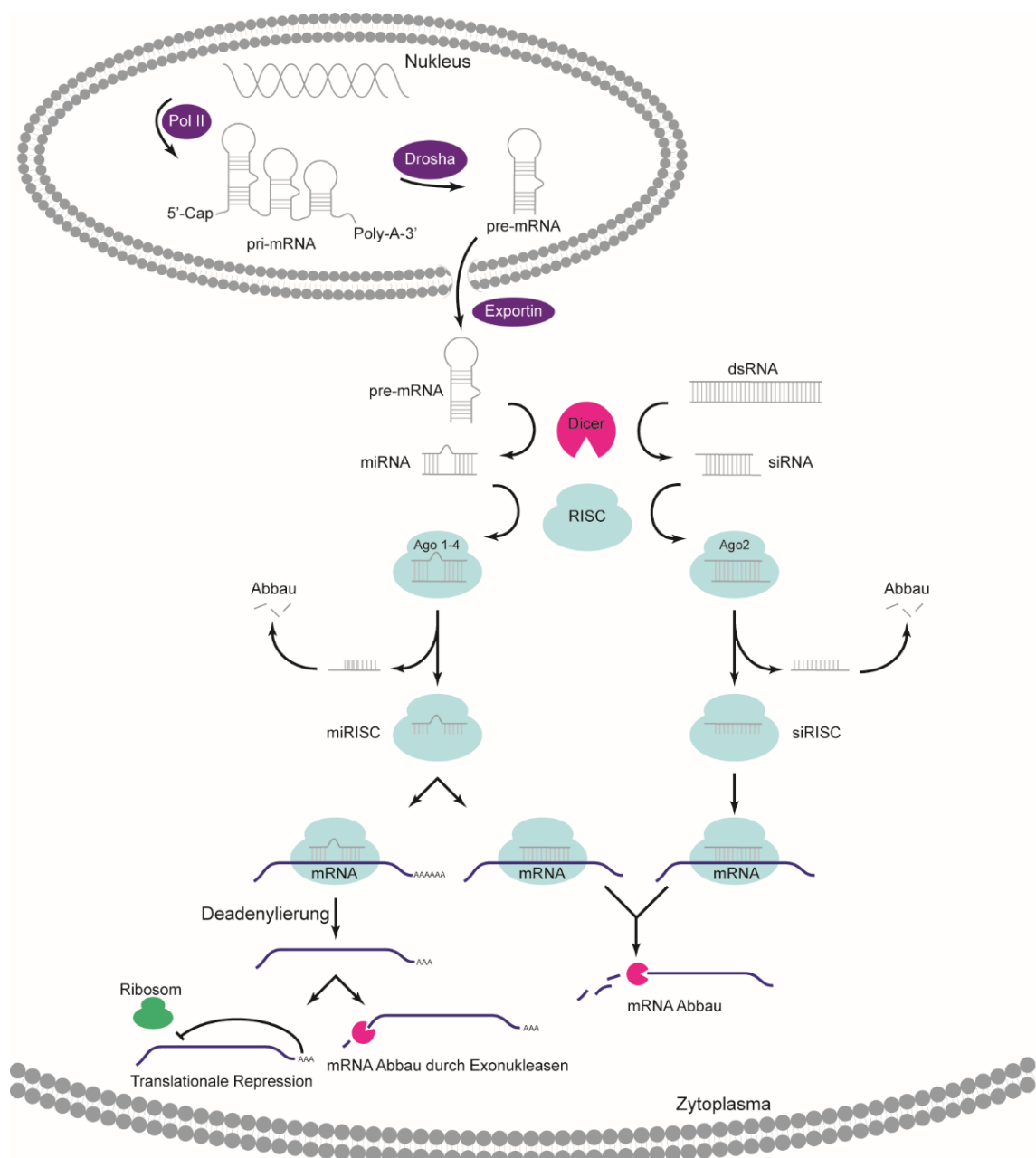


Abbildung 28. Vereinfachter „Gene silencing“-Mechanismus von siRNA (rechts) und miRNA (links)

### 1.4.2 Modifikationen an siRNA und lichtgesteuerte Genregulation

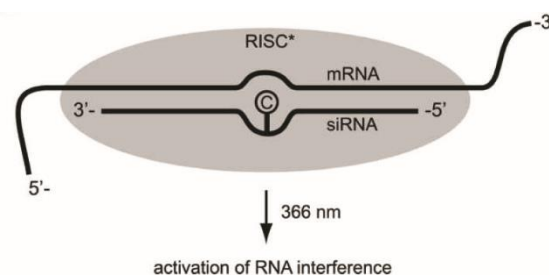
RNA-Duplexe sind stabil genug und die chemische Modifikation von siRNA ist für die Inhibierung der Genexpression in Zellkulturen nicht notwendig. In *in vivo*-Anwendungen allerdings ist die Aktivität oft reduziert. Um die Stabilität der siRNA *in vivo* zu verbessern, werden sie oftmals chemisch modifiziert. Eine beliebte Position ist die 2'-OH-Gruppe der siRNA, da sie nicht am Mechanismus der RNA-Interferenz beteiligt ist. Modifikationen können hier problemlos eingeführt werden, solange sie nicht die A-Helixstruktur des siRNA/mRNA-Doppelstranges in den entscheidenden Bereichen beeinflussen. Die 2'-F-Modifikation ist besonders gängig, da das Fluorid aufgrund seiner geringen Größe die Gesamtstruktur der siRNA nicht wesentlich verändert. 2'-OMe-Modifikationen werden ebenfalls häufig verwendet, auch wenn mit ihnen eine komplette Substitution aller 2'-OH-Gruppen nicht möglich ist, da dadurch die Inaktivierung der siRNA einhergeht. Daher werden üblicherweise vereinzelt Nukleotide innerhalb der Sequenz oder 2 bis 3 Nukleotide an den beiden Enden zum Schutz gegen RNasen substituiert. Jackson *et al.* konnten außerdem zeigen, dass eine 2'-OMe-Modifikation am zweiten Nukleotid der siRNA die Bindung zum 3'-untranslatierten Bereich der mRNA verringert<sup>192</sup> und dadurch *off-target*-Effekte deutlich reduziert werden. Um die Nukleasestabilität der siRNAs zu erhöhen werden auch gelegentlich Phosphorthioate anstelle der Phosphordiester-Bindung eingeführt.

Die Affinität der siRNA gegenüber ihrer Ziel-mRNA kann mit LNA-Nukleotiden verbessert werden. Diese enthalten zwischen der 2'- und 4'-Position eine Methylen-Brücke, die den Ribosering in einer Konformation stabilisiert, welche für die Bindung an komplementäre Sequenzen optimal ist. Dadurch wird auch die Spezifität erhöht. Allerdings gilt auch hier die Einschränkung, dass die Gesamtstruktur (A-Helix) nicht drastisch verändert werden darf. Die vollständige Substitution von RNA gegen LNA und die damit verbundene Strukturänderung wird oftmals in siRNA-Gegensträngen verwendet um diese gänzlich zu inaktivieren und den fälschlichen Einbau in den RISC-Komplex zu reduzieren.<sup>193</sup>

Durch den Einsatz photolabil modifizierter siRNAs ergibt sich die Möglichkeit der lichtgesteuerten Genregulation. Lichtaktivierbare siRNAs wurden anfänglich nach der Methode des statistischen „Cagings“ gewonnen, indem eine unmodifizierte siRNA mit einer Diazo-Spezies der photolabilen Schutzgruppe umgesetzt wurde. Friedman *et al.* gewannen mit dieser Methode siRNA-Duplexe gegen eine GFP-mRNA die im Schnitt 1,4 photolabile Schutzgruppen enthielten, allerdings in Zellkulturexperimenten noch eine hohe Restaktivität zeigten. Nach Bestrahlung der siRNAs konnte die Aktivität vollständig wiederhergestellt werden.<sup>194</sup> In einer anderen Studie wurde das 5'-Ende des Leitstrangs mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen, da man zu diesem Zeitpunkt noch davon ausging, dass dies zu einer kompletten Inaktivierung führt. Dies konnte allerdings nicht bestätigt werden, da kein vollständiges Aus/An-Verhalten beobachtet werden konnte. Dieses Problem konnte

erst durch eine sterisch sehr anspruchsvolle Schutzgruppe (Cyclododecyl-DMNPE) gelöst werde, indem diese die Wechselwirkungen zwischen siRNA und den an der RNAi beteiligten Proteinen verhindert.<sup>195</sup> Blidner *et al.* konnten in Zebrafischen eine lichtaktivierbare siRNA erfolgreich anwenden. Sie verwendeten eine 2'-F-modifizierte siRNA gegen GFP und schützten sie statistisch mit der DMNPE-Schutzgruppe.<sup>196</sup>

Mikat und Heckel verwendeten photolabil geschützte Nucleobasen innerhalb der siRNA-Sequenz. Sie machten sich den Umstand zu Nutze, dass die mRNA im RISC-Komplex immer nach dem gleichen Schnittmuster, zwischen dem 10. und 11. Nucleotid gezählt vom 5'-Ende der siRNA, gespalten wird. Innerhalb dieses Bereichs wurden die Nucleobasen photolabil geschützt, um so die Basenpaarung zur mRNA an strategisch günstigen Stellen zu stören. In einem eGFP-Reporterassay in Zellkultur konnte eine stark verminderte RNAi-Aktivität gezeigt werden, welche nach UV-Bestrahlung (366 nm) wieder vollständig hergestellt werden konnte. Die Ursache für die verminderte RNAi-Aktivität wird in der Inhibierung der Endonukleaseaktivität der mRNA-schneidenden Proteineinheiten vermutet.<sup>197</sup>



**Abbildung 29.** Die photolabile Schutzgruppe verhindert die Watson-Crick-Basenpaarung der komplementären Nucleobasen und erzeugt dadurch eine örtlich begrenzte Störung des siRNA/mRNA-Duplex. Nach Belichtung mit UV-Licht wird die Schutzgruppe komplett entfernt und die native Struktur des Duplex wiederhergestellt. RNAi wird dadurch aktiviert. Grafik entnommen aus Mikat *et al.*<sup>197</sup>

## 2. Motivation

Als Träger der genetischen Information spielen Nucleinsäuren eine zentrale Rolle bei allen zellbiologischen Prozessen. Das Wissen über deren chemische Struktur ist Voraussetzung für das Verständnis der Funktion von DNA, aber auch der RNA als Schlüsselmolekül bei der Genexpression. Eine Vielzahl genregulatorischer Mechanismen konnten in den letzten Jahrzehnten dadurch aufgeklärt oder zumindest im Ansatz verstanden werden. Entscheidend daran beteiligt war die Entwicklung molekularbiologischer Methoden, wie beispielsweise die automatisierte Oligonucleotid-Festphasensynthese<sup>198</sup>, die Polymerasekettenreaktion<sup>199</sup> (PCR) und die DNA-Sequenzierung nach Sanger.<sup>200</sup> Diese Methoden spielen außerdem eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung therapeutischer Oligonucleotide oder Oligonucleotidsonden. Ein besonderer Meilenstein war die Aufklärung des RNA-Interferenz-Mechanismus durch Fire und Mello.<sup>171</sup> Dieser lieferte eine Vielzahl therapeutischer Ansätze, um Krankheiten auf Transkriptionsebene zu behandeln.

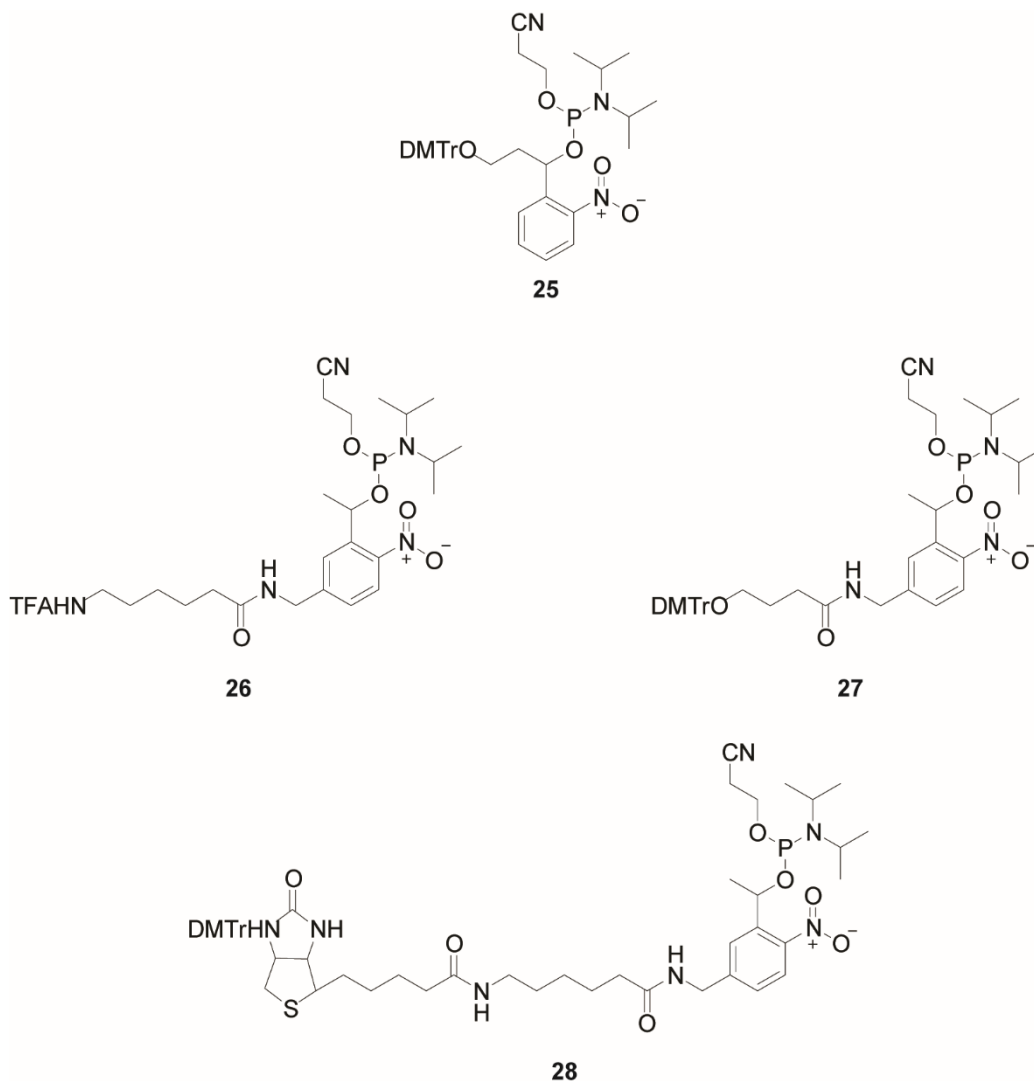
Mit der Technik des „Caging“ gelang ein weiterer Durchbruch auf dem Gebiet der Genregulation. Basierend auf der Chemie photolabiler Schutzgruppen beschreibt sie die räumlich und zeitlich kontrollierte Freisetzung aktiver Biomoleküle (Kapitel 1.1). Mit der Möglichkeit synthetische Oligonucleotide kostengünstig herzustellen, ermöglicht das „Caging“ eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. Durch das Anbringen photolabiler Schutzgruppen an Nucleobasen in funktionalisierender Position können Nucleinsäuren reversibel inaktiviert und durch Licht dosis-, raum- und zeitdefiniert aktiviert werden. Dies ermöglicht Nucleinsäure-gesteuerte, biologische Prozesse präzise zu untersuchen, zu verstehen und gezielt zu kontrollieren. Dem Arbeitskreis Heckel gelang es bereits, diese Technik zu etablieren und die Funktion verschiedener Nucleinsäuren wie siRNAs<sup>197</sup>, Aptamere<sup>75,76,201</sup> oder Molecular Beacons<sup>73,202</sup> mit photolablen Schutzgruppen und Licht zu regulieren. Für biologische Anwendungen eignen sich vor allem Zweiphotonen-aktive photolabile Schutzgruppen, da das bei dieser Methode verwendete Zweiphotonen-Licht das biologische Gewebe, aufgrund der bathochrom-verschobenen Wellenlängen, nicht schädigt und die Eindringtiefe wesentlich größer ist als bei Einphotonen-Anregung. Dr. Manuela Fichte entwickelte einen Fluoreszenz-basierten Assay, mit dem erstmalig die Photolyse einer photolabil geschützten DNA durch Zweiphotonen-Absorption gezeigt werden konnte.

Neben der zeitweiligen Maskierung der Aktivität von Biomolekülen, werden photolabile Schutzgruppen auch als photolabile Linker eingesetzt (Kapitel 1.2). Sie haben meist die Aufgabe, Biomoleküle zeitweise zu markieren (beispielsweise mit einem Fluorophor zur Erzeugung eines Detektionssignals) oder im Falle der Nucleinsäuren, wie eine Klammer zwei Strangenden inter- (beispielsweise „sense“ und „antisense“-Strang) oder intramolekular miteinander zu verbinden.



Therapeutische Oligonukleotide werden auch gerne über einen photospaltbaren Linker an Transportproteine gekuppelt, welche den aktiven Transport durch die Membran vermitteln.<sup>203</sup>

Photospaltbare Linker sind für den Einsatz in der Oligonukleotid-Festphasensynthese kommerziell erhältlich und beruhen auf der Photochemie der Nitrobenzyl-Schutzgruppe.



**Abbildung 30.** Kommerziell erhältliche photospaltbare Linker

Linker **26** wird für die Konjugation von Peptiden an Oligonukleotide verwendet. Sinnvoll ist dies beispielsweise, wenn das Peptid als Masse-Marker für die massenspektrometrische Detektion verwendet wird. Linker **28** enthält, neben der photolabilen Einheit, ein kovalent gebundenes Biotin, sodass dieser bei Biotin-Streptavidin-Interaktionsmethoden Anwendung findet. Linker **25** und **27** werden für die Inkorporation in Oligonukleotidsequenzen verwendet. Dies ist sinnvoll, wenn eine Modifikation (z.B. Cholesterol, Farbstoff) oder ein komplementärer Gegenstrang zu einem späteren Zeitpunkt entfernt werden soll. Der photospaltbare Linker **25** ahmt ein Nukleosid nach und

verursacht innerhalb der Oligonukleotidsequenz eine abasische Stelle, sodass von einem Einfluss auf den Schmelzpunkt des DNA-Duplex nach Hybridisierung ausgegangen werden kann. Die Photolyse aller dargestellten Linker wird bei einer Wellenlänge von  $\approx 360$  nm ausgelöst. Wie bereits in Kapitel 1.1 erörtert, ist diese Wellenlänge nur bedingt nutzbar für biologische Anwendungen. Optimaler wären Linker mit einer bathochrom verschobenen Photolyse innerhalb des sogenannten „optischen Fensters“ von Gewebe („*tissue optical window*“). Biologisches Gewebe streut und absorbiert weniger Licht zwischen einer Wellenlänge von 700 – 1100 nm<sup>204</sup> und wird wesentlich effizienter penetriert als durch sichtbares Licht.<sup>205</sup> Das optische Fenster ist bei geringerer Wellenlänge durch die Lichtabsorption des Hämoglobins im Blut begrenzt. Oberhalb von 1000 nm beginnt Wasser zu absorbieren und definiert somit das obere Limit des optische Fensters.<sup>206,207</sup> Aufgrund dieser Tatsachen eignet sich die Zweiphotonen-Absorption (Kapitel 1.1.3) besonders gut, um die Photolyse eines Linkers in biologischen Systemen auszulösen. Nichtsdestotrotz sind Zweiphotonen-aktive Linker bisher kaum bekannt. Vor allem für Oligonukleotidanwendungen sind die wenig erforschten Linker unhandlich und nur eingeschränkt nutzbar, da diese zu lang und zu flexibel sind und umständlich beispielsweise über Click-Chemie eingebaut werden müssen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte ein Zweiphotonen-aktiver Linker entwickelt werden, welcher durch eine einfache Handhabung in Oligonukleotide eingebaut werden kann. Offensichtlich erscheint der Einbau des photolabilen Linkers über die automatisierte Oligonukleotid-Festphasensynthese sinnvoll. Die Struktur des kommerziell erhältlichen Linkers **25** sollte daher als Vorbild dienen, da dieses als Phosphoramidit einen komfortablen Gebrauch verspricht. Im Anschluss sollte der neu entwickelte Linker photochemisch charakterisiert und ein Assay zum Nachweis der Zweiphotonen-Aktivität entwickelt werden. Abschließend sollte die biologische Kompatibilität des Linkers in einem biologischen Modellsystem gezeigt werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit greift die Tatsache auf, dass einige biologische Prozesse ausschließlich bei einer fehlerfreien und spezifischen Basenpaarung und einer exakten räumlichen Struktur eines DNA- oder RNA-Duplex ablaufen. Ein Beispiel dazu ist die RNA-Interferenz. Der Abbau der mRNA erfolgt nur, wenn der entscheidende Schritt, die Hybridisierung des siRNA-Stranges an die mRNA, exakt und ohne geringste Abweichungen erfolgt. Kleinste Modifikationen oder gar das Fehlen eines komplementären Basenpaares führen meist zur Inaktivierung der RNAi. Dies kann man sich zunutze machen und, wenn eine Inaktivierung erwünscht ist, photolabile Schutzgruppen an funktionsbestimmenden Positionen der siRNA einbauen. Mit Licht ist somit ein Aus-zu-An-Verhalten regulierbar. Der An-zu-Aus-Effekt kann theoretisch mit photoaktivierbaren Linkern realisiert werden, aber der im ersten Projektteil entwickelte nicht-nukleosidische Linker führt mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu einer Inaktivierung der RNAi, noch bevor durch Photolyse ein gewünschter Effekt beobachtet werden kann. Dies macht die kontrollierte Genregulation, vor allem in Hinblick auf

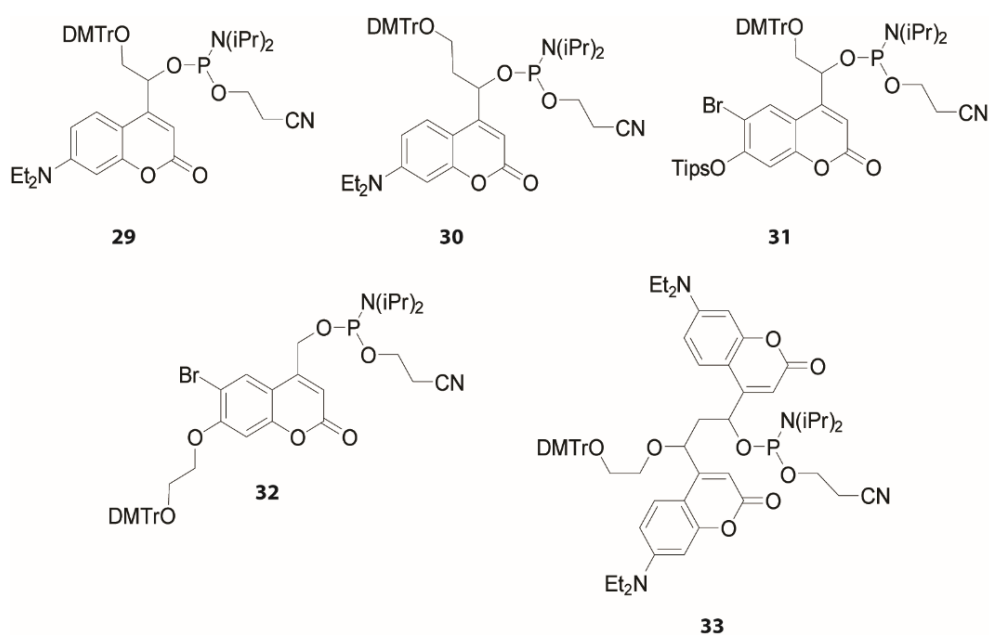
die Verwendung photoaktivierbarer Linker, nicht einfach. Die wichtigsten Voraussetzungen, die ein photoaktivierbarer Linker für solche und ähnliche Anwendungen erfüllen muss, ist zum einen die Möglichkeit der spezifischen Ausbildung von Wasserstoffbrücken im Duplex, die sich von der der Nucleobasen nicht unterscheidet und zum Anderen einen geringeren Einfluss der photolabilen Einheit auf die räumliche Gesamtstruktur. Für DNA-Anwendungen existiert ein solcher Linker in Form eines photoaktivierbaren DNA-Bausteins.<sup>8</sup> Ein entsprechender RNA-Baustein ist allerdings noch nicht bekannt. Ziel des zweiten Teils war es deshalb, einen photospaltbaren RNA-Baustein zu entwickeln, der die oben genannten Anforderungen erfüllt und diesen in einem biologischen Modellsystem anzuwenden. Auch in diesem Projekt sollte die Möglichkeit der Zweiphotonen-Aktivierung gegeben sein.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Entwicklung und Anwendung eines nicht-nukleosidischen und Zweiphotonen-aktiven photospaltbaren Linkers

##### 3.1.1 Design und Synthese eines photospaltbaren Bausteins für die Oligonukleotid-Festphasensynthese

Die in den 80er Jahren von Khorana entwickelte Oligonukleotid-Festphasenmethode zur schnellen Synthese von DNA löste bisher bekannte, zeitaufwendige Verfahren ab und war der Ursprung der heute verwendeten automatisierten DNA-Festphasensynthese (1981, Caruthers<sup>198</sup>). Mit dieser wurden synthetische Oligonukleotide schnell, kostengünstig und unkompliziert verfügbar. Heute wird vor allem die Phosphoramidit-Methode verwendet. Dazu sind lediglich (Nukleosid)-Phosphoramidite als Oligonukleotidbausteine und einige hochentwickelte, kommerziell erhältliche, Reagenzien notwendig. Demnach ist es offensichtlich, dass der neue photospaltbare Baustein für Oligonukleotide als Phosphoramidit entwickelt werden sollte. Aufgrund der guten Zweiphotonen-Eigenschaften bekannter Cumarin-Derivate wurde der Fokus auf die Cumarin-Schutzgruppe als Grundgerüst des photospaltbaren Linkers gelegt. Prinzipiell existieren so mehrere potentielle Positionen zur Einführung der Schutzgruppen und reaktiven Phosphatgruppen. Im Gedankenexperiment wurden so einige möglicherweise in Frage kommende Linker-Bausteine entworfen, welche in der folgenden Abbildung dargestellt sind.



**Abbildung 31.** Hypothetische Zielstrukturen für photospaltbare Zweiphotonen-Linker auf Basis des Cumaringerüsts

In dieser Arbeit wurde die Synthese der Linker **29** und **31** näher untersucht, wobei sich Linker **29** als die optimale Endverbindung herausstellte. Die Verbindungen **32** und **33** wurden verworfen, da aufgrund der Struktur und Sterik anzunehmen ist, dass diese die Oligonukleotidstruktur stark beeinflussen.

### Synthese eines photospaltbaren Linker-Phosphoramidits auf Basis des DEACMs

Für die Synthese des DEACM-Linkers **29** wurde zunächst DEACM-Aldehyd **36** ausgehend von 7-Diethylamino-4-methylcumarin **34** hergestellt. Die ursprüngliche Synthese wurde von Schönleber *et al.*<sup>208</sup> bereits in der Literatur beschrieben (Abb. 32 b)). Die Ausgangsverbindung **34** wird dabei direkt mit Selendioxid in *p*-Xylol oxidiert. Eigene Erfahrungen zeigten allerdings, dass die in der Literatur angegebenen Ausbeuten nicht annähernd erreicht werden konnten, da neben anderen Verunreinigungen DEACM-Alkohol als Nebenprodukt auftrat. Meist lagen die Ausbeuten bei rund 20%, wenn die Reaktion in einem kleinen Maßstab durchgeführt wurde. Das Vergrößern auf einen größeren Maßstab war immer mit einem deutlichen Ausbeuteverlust verbunden.

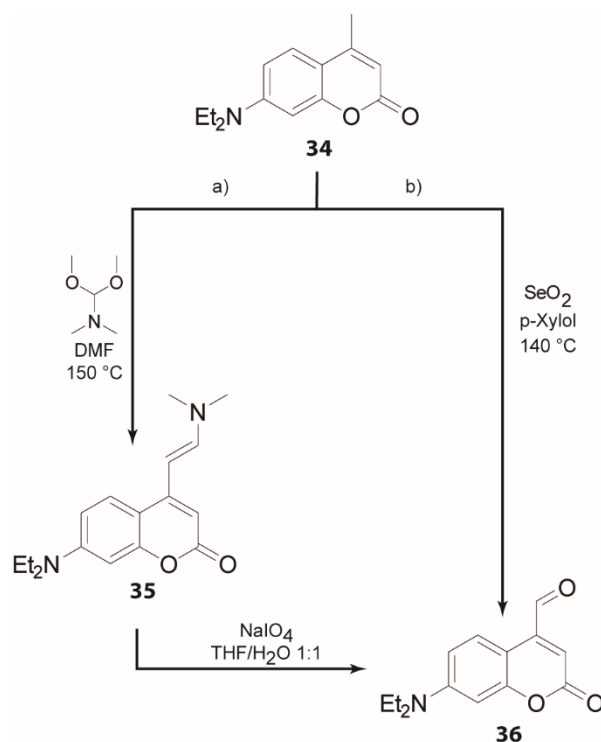


Abbildung 32. Synthese von DEACM-Aldehyd **36** nach a) Weinrich *et al.*<sup>209</sup> und b) Schönleber *et al.*<sup>208</sup>

Während dieser Dissertation entwickelte Weinrich *et al.*<sup>209</sup> einen optimierten Syntheseweg (Abb. 32 a)), welcher deutlich höhere Reaktionsausbeuten zeigte ( $\geq 90\%$ ). Das Startmaterial **34** wird dabei mit DMF-Dimethylacetal zum Enamin-Derivat **35** umgesetzt, welches anschließend mit Natriumperiodat oxidativ zum Aldehyd **36** gespalten wird. Dieser konnte durch Reduktion mit

Natriumborhydrid in den primären Alkohol **37** überführt werden. Die Hydroxygruppe wurde anschließend mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (TsCl) substituiert, wobei statt dem Tosylat **38** das Chlor-substituierte Endprodukt **39** entsteht (Abbildung 33). Ding *et al.* konnten an Benzylalkoholen mit elektronenziehenden Substituenten zeigen, dass bei der Reaktion mit TsCl das korrespondierende Tosylat *in situ* gebildet wird, welches von dem schlechteren Nukleophil Cl<sup>-</sup> erneut angegriffen wird.<sup>210</sup> Für die Chlorierung des Cumarin-Alkohols **37** in Anwesenheit von Pyridin wird ein vergleichbarer Mechanismus angenommen. Die als Nebenprodukt entstehende Salzsäure HCl koordiniert an das Pyridin, wobei das Chlorid-Ion anschließend nukleophil am Tosylat **38** angreift und das Chlor-substituierte Produkt **39** liefert.

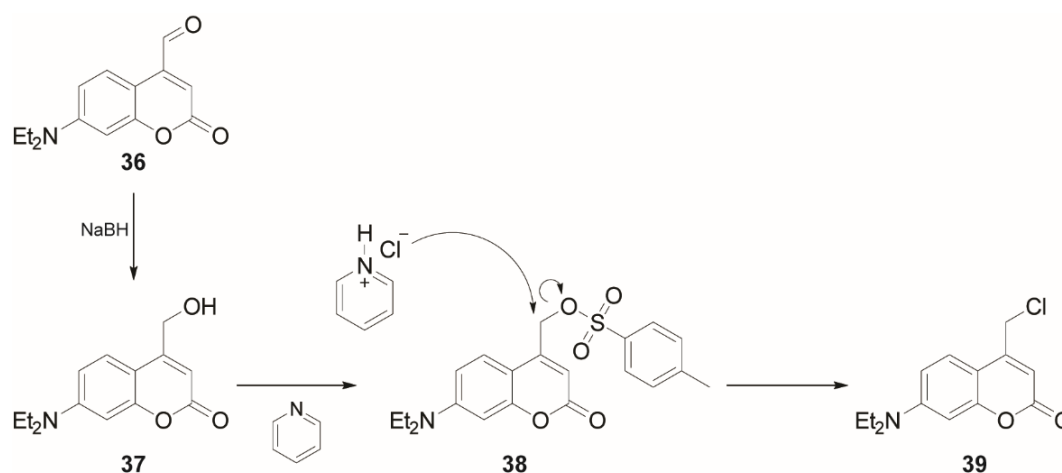
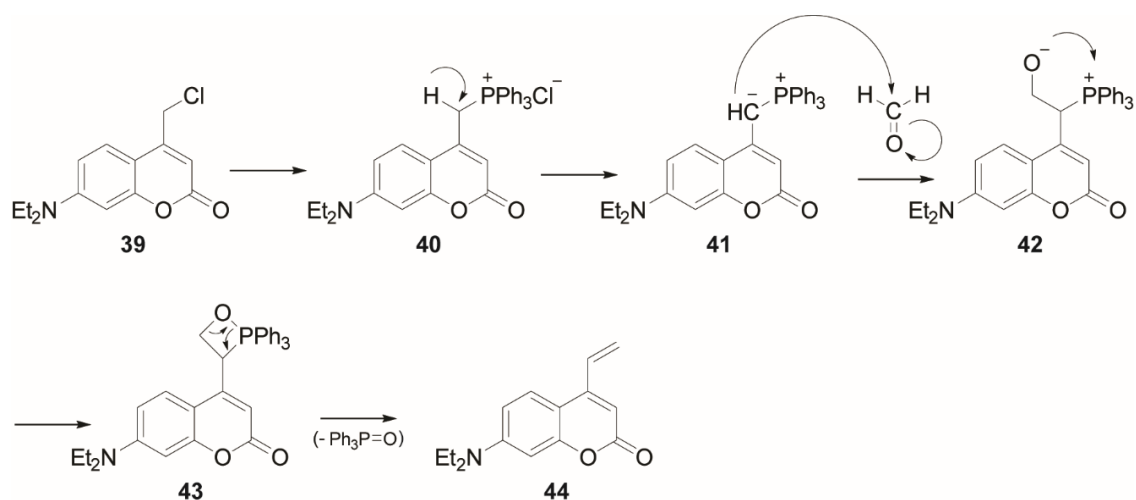


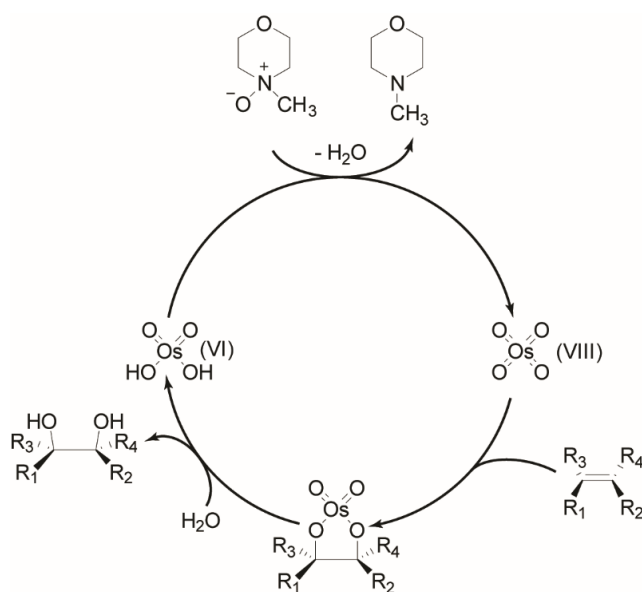
Abbildung 33. Mögliche Chlor-Substitution von Cumarin-Alkohol **37** mit TsCl nach Ding *et al.*<sup>210</sup>

Verbindung **39** wurde anschließend mit Triphenylphosphan in ein Phosphoniumsalz **40** überführt. Daraufhin erfolgte die Olefinierung durch eine Wittig-Reaktion. Dabei wird zunächst das in direkter Nachbarschaft zum Phosphonium liegende azide Proton durch eine starke Base abgespalten, sodass ein stabilisiertes Ylid **41** erzeugt wird. Der Reaktion nun zugesetzte Formaldehyd wird von dem negativ geladenen Kohlenstoffatom des Ylids an der Carbonylverbindung angegriffen. *In situ* bildet sich nun ein zyklisches Oxaphosphetan **43**, welches sofort zum tertiären Phosphinoxid und Verbindung **44** zerfällt.



**Abbildung 34.** Die Wittig-Reaktion mit einem stabilisierten Ylid **41** führt über ein Phosphor-Betain **42** und einem viergliedrigen Übergangszustand **43** zu dem gewünschten Produkt **44**.

Verbindung **44** sollte anschließend mit Osmiumtetroxid umgesetzt werden, wobei dabei zwei vicinale Hydroxylgruppen an die Doppelbindung addiert werden. Osmiumtetroxid als Reagenz ist allerdings teuer und sehr toxisch. VanRheenen *et al.* entwickelte daher die sogenannte Upjohn-Dihydroxylierung<sup>211</sup>, bei der Osmiumtetroxid aufgrund der Verwendung von Methylmorpholin-N-Oxid (NMO) nur in katalytischen Mengen zugesetzt werden muss. Dieses überführt die bei der Reaktion entstehende Osmium(VI)-säure  $\text{OsO}_2(\text{OH})_2$  wieder in das achtwertige Osmiumtetroxid (Abb. 35)



**Abbildung 35.** Mechanismus der Upjohn-Dihydroxylierung mit  $\text{OsO}_4$  und NMO: Der erste Schritt ist eine 1,3-Cycloaddition des  $\text{OsO}_4$  an die Doppelbindung. Der entstehende fünfgliedrige Ring hydrolysiert in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}$  und setzt das Endprodukt frei. Dieses ist aufgrund des Fünfringintermediats immer das *cis*-Additionsprodukt. NMO überführt nun die entstandene Osmiumsäure in das ursprüngliche Osmiumtetroxid.

Für Permanganat und Rutheniumtetroxid wird ein analoger Mechanismus angenommen. Als starkes Oxidationsmittel kann Permanganat das entstandene Diol weiter zu Diketonen oxidieren und unter Spaltung der ursprünglichen Doppelbindung Dicarbonsäuren bilden. Daher sind die Diol-Ausbeuten meist sehr gering. RuO<sub>4</sub> kann als einziges Reagenz Doppelbindungen in einem Aromaten selektiv dihydroxylieren.

Verbindung **44** wurde in einem Aceton/Wasser-Gemisch mit NMO versetzt. Das katalytische Osmiumtetroxid wurde in Form einer 2%-igen wässrigen Lösung zugegeben, allerdings, aufgrund der hohen Toxizität, in einer kleinen undefinierten Menge von wenigen hundert Mikrolitern. Nach 18 Stunden Reaktionszeit konnte der vollständige Ablauf der Reaktion per Dünnschichtchromatographie nachgewiesen und das gewünschte 1,2-Diol **45** quantitativ gewonnen werden.

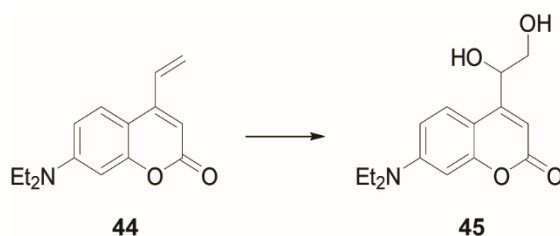


Abbildung 36. Synthese von 4-(1,2-Dihydroxyethyl)-7-diethylaminocoumarin **45** mit der Upjohn-Dihydroxylierung

Dialkohol **45** wurde daraufhin mit Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) in Pyridin selektiv am primären Alkohol geschützt. Die resultierende Verbindung **46** wurde schließlich durch die Reaktion mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-Diisopropylchlorphosphoramidit zum Phosphoramidit **47** umgesetzt. Die Verwendung dieses Bausteins in der automatisierten Oligonukleotid-Festphasensynthese und der angenommene Entschützungsmechanismus werden in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

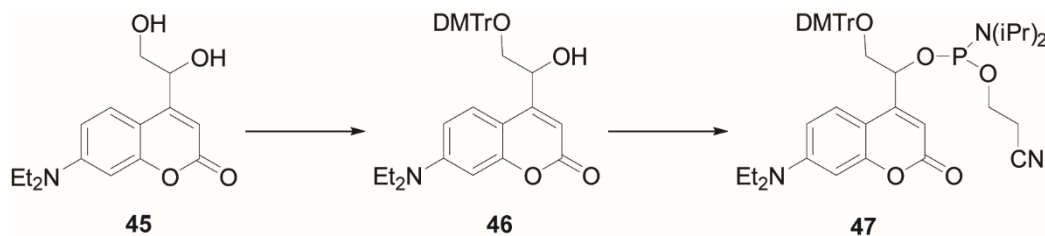


Abbildung 37. Synthese des fertigen DEACM-Linkers **47** für die Oligonukleotid-Festphasensynthese ausgehend von Diol **45** und dem DMTr-geschützten Zwischenprodukt **46**



### Synthese eines photospaltbaren Linkers auf Basis des Bhcs

Die Synthesen der Verbindungen **31** und **29** wurden zeitlich parallel verfolgt. Phosphoramidit **29** konnte frühzeitig synthetisiert und, wie sich im Laufe dieser Arbeit herausstellte, erfolgreich in ein Oligonukleotid eingebaut und charakterisiert werden. Der Abschluss der Synthese von Phosphoramidit **31** wurde daher nicht mehr notwendig und aufgrund dessen eingestellt. Trotzdem soll hier die erfolgte Synthese der Phosphoramiditvorläufer und die erhaltenen Erkenntnisse diskutiert werden.

Verbindung **31** beruht auf der Struktur des 6-Brom-4-methyl-7-hydroxycumarins (Bhc), welches von Furuta *et al.* eingeführt und auf deren Zweiphotonen-Photolyse hin untersucht wurde.<sup>53</sup> Die gleiche Arbeitsgruppe entwickelte außerdem eine Bhc-Linker zur Herstellung photospaltbarer Peptide und Proteine.<sup>212</sup>

Die folgende Abbildung 38 zeigt die durchgeführte Syntheseroute bis zum Bhc-1,2-Diol **51**, welche sich an der von Lu *et al.* publizierten Synthese<sup>213</sup> orientiert.

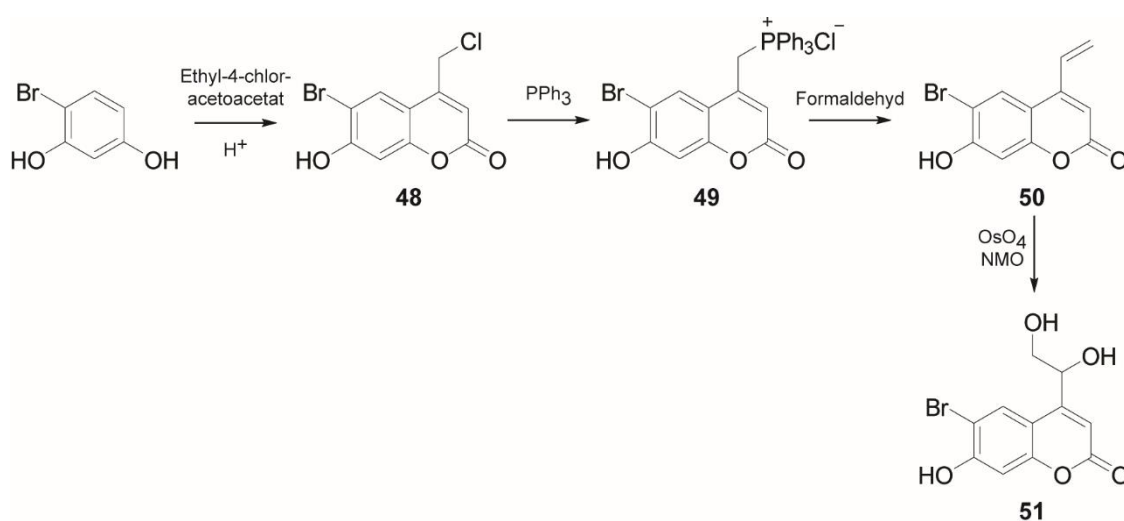


Abbildung 38. Durchgeführte Synthese des Bhc-Diols **51**

Zunächst musste das Cumarin-Gerüst mittels Pechmann-Kondensation durch die Reaktion eines Phenols mit einem  $\beta$ -Ketoester aufgebaut werden. Dazu wurde 4-Bromresorcin mit Ethyl-4-chloroacetoacetat in Methansulfonsäure umgesetzt. Methansulfonsäure katalysiert die ersten Teilschritte, die Umesterung und die Keto-Enol-Tautomerisierung, der Pechmann-Kondensation. Entsprechend der zuvor beschriebenen Synthese wurde das erhaltene Bhc-Chlorid **48** in ein Phosphoniumsalz **49** und in einer Wittig-Reaktion mit Formaldehyd zum entsprechenden Alken **50** umgesetzt. Anschließend erfolgt eine Upjohn-Dihydroxylierung zum 1,2-Diol **51**. Die Hydroxylgruppe an der 7-Position des Bhc-Gerüsts muss mit einer Schutzgruppe versehen werden, da die freie

Hydroxylgruppe in der Festphasensynthese eine hohe Reaktivität aufweisen würde. Mit einer Vielzahl falsch verknüpfter Oligonukleotide wäre zu rechnen. Eine OH-Schutzgruppe, welche gegenüber den Bedingungen der Festphasensynthese stabil ist, ist die Triisopropylsilyl-Schutzgruppe (TIPS). Die beiden OH-Gruppen der 1,2-Dihydroxyethyl-Gruppe wurden daher zunächst maskiert, indem sie durch eine Acetalisierung mit Benzaldehyd geschützt wurden (Abb. 39).

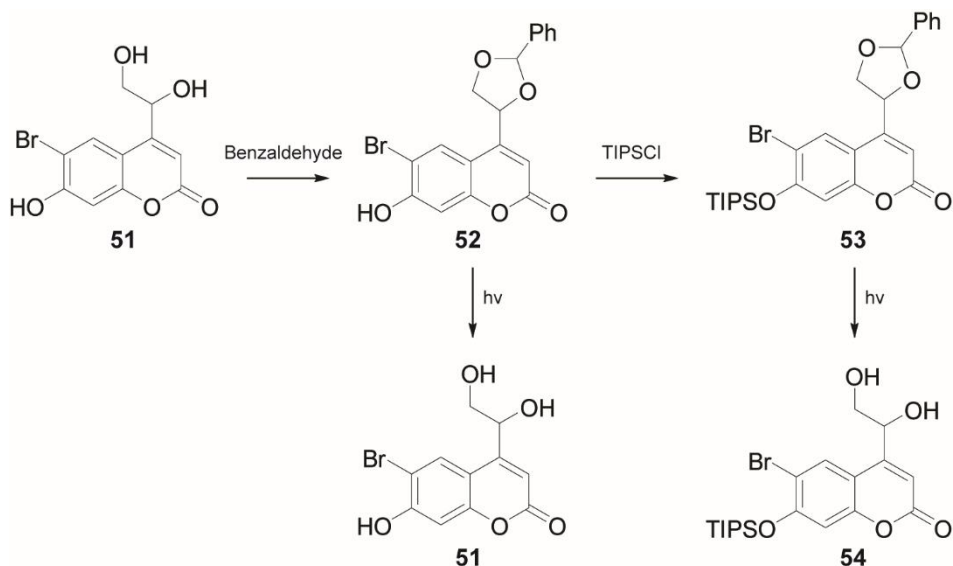
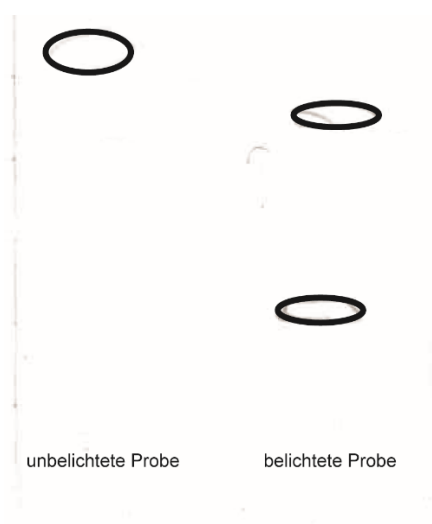


Abbildung 39. Schutzgruppenchemie am Diol 51

Anhand der entstandenen Acetal-geschützten Verbindungen 52 wurden erste Belichtungstests durchgeführt. Es wurde vermutet, dass dieses nach Belichtung über ein Halbacetal-Intermediat zurück in die ursprüngliche Alkohol-Verbindung 51 und Aldehyd zerfällt.

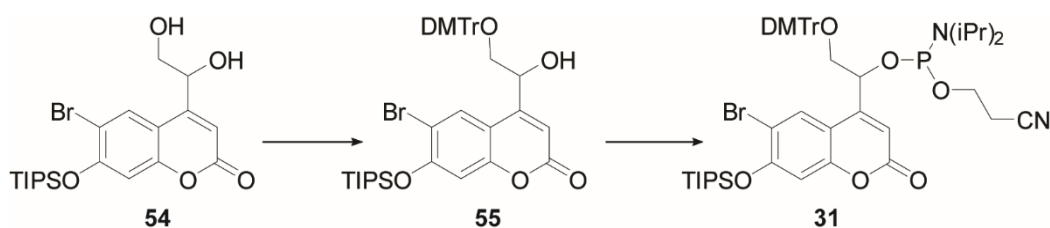
Die Probe wurde in einigen Tropfen Aceton gelöst und mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, engl. phosphate buffered saline) verdünnt. Belichtet wurde mit einer 365 nm-LED mit einer Leistung von 8.5 Watt für 3 Minuten. Anhand einer Dünnschichtchromatographie wurden unbeleuchtete und beleuchtete Proben verglichen. Nach Bestrahlung konnten zwei Belichtungsprodukte auf der DC-Platte nachgewiesen werden. Lu *et al.* machten vergleichbare Belichtungstest mit unterschiedlich acetalisierten Bhc's in 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure-Puffer (MOPS).<sup>213</sup> Ausgehen von dieser Studie und dem von Schade *et al.* vorgeschlagenen Mechanismus zur Photospaltung von (7-Methoxycumarin-4-yl)methyl-geschützter Säuren<sup>32</sup> wird eine erfolgreiche Photoreaktion an der Acetalgruppe angenommen.



**Abbildung 40.** Vergleichs-DC von belichteter und unbelichteter Probe **52**. Dargestellt ist die graphisch bearbeitete Original-DC-Platte

Die Synthese wurde daraufhin mit der Einführung einer TIPS-Schutzgruppe an Position 7 des Bhc fortgesetzt um TIPS-geschütztes Bhc **53** zu erhalten. Prinzipiell ist die Einführung der TIPS-Schutzgruppe an früherer Stelle der Syntheseroute möglich und auch sinnvoll, da sich damit die Acetal-Schutzgruppen-Strategie umgehen ließe. Dieser Ansatz wurde jedoch nicht verfolgt, da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit bereits der DEACM-Linker-Baustein **29** erfolgreich in Oligonukleotide einbauen ließ. Trotzdem wurde erneut ein Belichtungstest an Probe **53**, analog zu der vorherigen Prozedur, durchgeführt. Auch hier konnte auf der Vergleichs-DC eine Photoreaktion bei der belichteten Probe festgestellt werden.

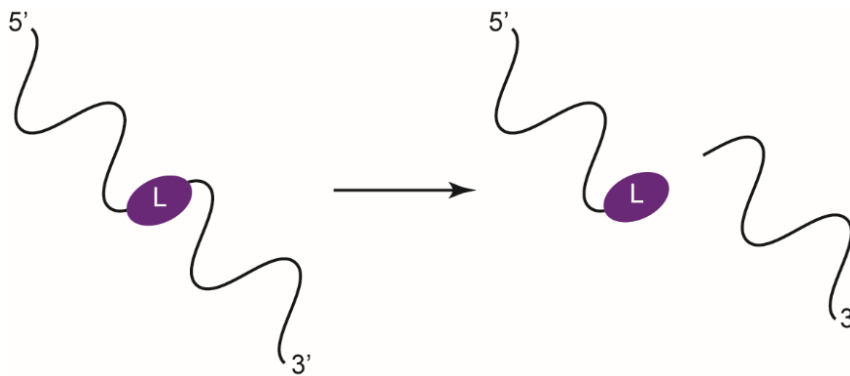
Dass Verbindung **54** nach Belichtung vorliegt, wurde nicht zweifelsfrei bestätigt und die Syntheseroute, wie oben begründet, nicht weiter verfolgt. Die folgenden Syntheseschritte zum Erhalt des Bhc-Linker-Bausteins **31** sind daher nur hypothetisch. Verbindung **54** sollte prinzipiell photochemisch durch Belichtung, aber auch chemisch über säurekatalysierte Hydrolyse gewonnen werden können. Der freigesetzte primäre Alkohol wird anschließend selektiv mit der DMTr-Schutzgruppe geschützt und der sekundäre Alkohol schlussendlich mit einem  $\beta$ -Cyanoethyl-geschützten Phosphor funktionalisiert.



**Abbildung 41.** Hypothetische Synthese von Bhc-Linker-Phosphoramidit **31**

### 3.1.2 Synthese Linker-modifizierter Oligonukleotide und deren Einphotonen-Charakterisierung

Im Arbeitskreis Heckel hat sich eine Methode etabliert, um neue photolabile Schutzgruppen zu charakterisieren und beispielsweise auf Eigenschaften, wie die Duplexstabilität, systematisch zu untersuchen. Dabei wird eine einheitliche Oligonukleotidsequenz, die sogenannte „Benchmark-Sequenz“ verwendet, welche aus 15 Nukleotiden besteht (5′-GCA TAA AXA AAG GTG-3′) und üblicherweise im Zentrum der Sequenz die zu charakterisierende Schutzgruppe X enthält. Diese Sequenz wurde schon in vielen Studien<sup>43,214–216</sup> verwendet, um photolabile Schutzgruppen untereinander besser vergleichen zu können. Zur Untersuchung des photospaltbaren DEACM-Linkers **29** wurde ebenfalls die Benchmark-Sequenz als erstes Modellsystem gewählt.



**Abbildung 42.** Schematische Darstellung des Konzeptes des photospaltbaren DEACM-Linkers in Oligonukleotiden

Zunächst musste überprüft werden, ob und unter welchen Bedingungen der Linker-Baustein **29** in der automatisierten Oligonukleotid-Festphasensynthese verwendet werden kann. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Abspaltung des fertigen Oligonukleotids von der festen Phase (CPG, „Controlled Pore Glass“) gelegt, da aus den praktischen Tätigkeiten der Masterarbeit bekannt war, dass Cumarin-Schutzgruppen auf Nukleobasen basenlabile Eigenschaften besitzen können, welche zu Ausbeuteverlusten nach der Festphasenabspaltung führen. Bei der standardmäßig verwendeten Schutzgruppenstrategie (Acyl-Schutzgruppen an den exozyklischen Aminofunktionen von Guanosin, Cytidin und Adenosin) für die DNA-Festphasensynthese wird die Festphasenabspaltung (und das gleichzeitige Entfernen der Schutzgruppen an den Nukleobasen) durch Inkubation mit 32%-iger Ammoniak-Lösung bei Raumtemperatur über Nacht durchgeführt. Die UltraMild<sup>®</sup>-Strategie verwendet geschützte Phosphoramidit-Bausteine ( $dG^{iPrPac}$ ,  $dA^{Pac}$  und  $dC^{Pac}$ ), bei denen die simultane Entschützung und Abspaltung vom Festphasenmaterial unter milderer Bedingungen durchgeführt werden kann. So kann die  $NH_3$ -Inkubationszeit auf 2 Stunden verkürzt oder stattdessen 10 mM  $K_2CO_3$

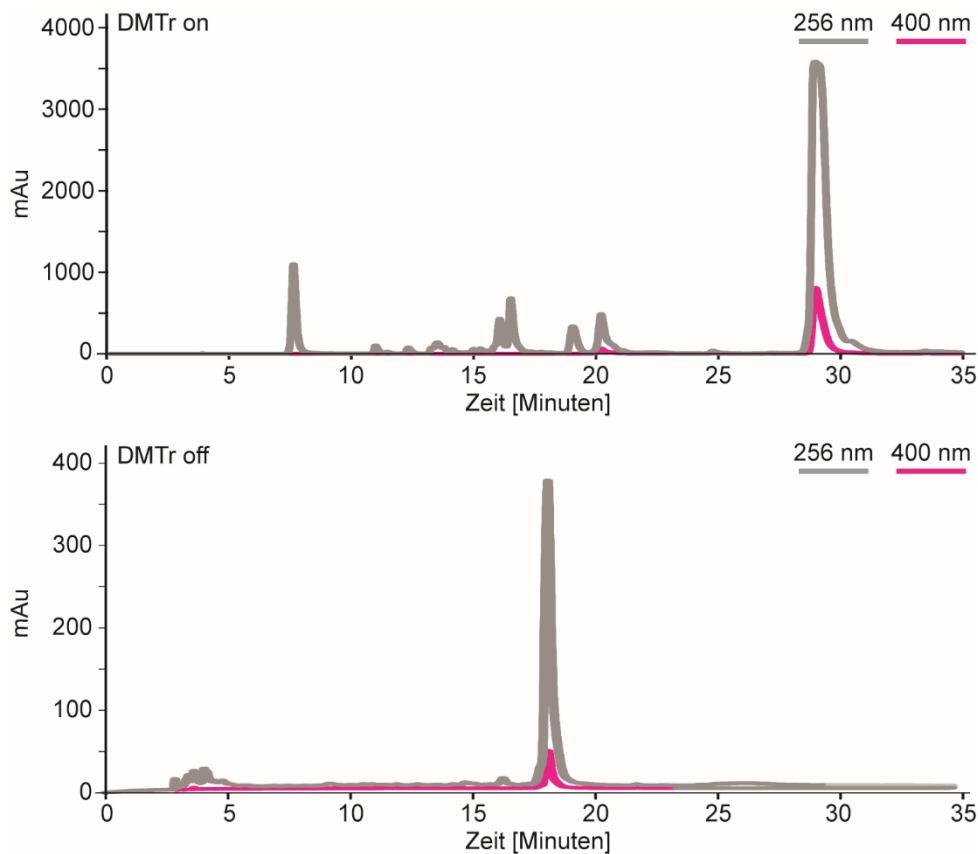
in Methanol für 4 Stunden verwendet werden. Für alle folgenden Oligonukleotidsynthesen wurde demnach die UltraMild<sup>®</sup>-Methode verwendet.

Die Synthese der Linker-modifizierten Benchmark-Sequenz **DNA1** (Abbildung 43) wurde an einem ABI-DNA/RNA-Synthesizer im „DMTr-On“-Modus durchgeführt. Entsprechend dem UltraMild<sup>®</sup>-Protokoll wurde das Standard-„Capping“-Reagenz durch Phenoxyacetanhydrid (Pac<sub>2</sub>O) ausgetauscht, um die Gefahr von Umacetylierungen zu umgehen. Für die Kupplung der Nukleosid-Phosphoramidite wurden Standard-Protokolle verwendet. Die Kupplungszeit des Linker-Phosphoramidits wurde auf 15 Minuten erhöht. Damit wurde eine vergleichbar hohe Einbau-Effizienz wie für die Standard-Phosphoramidite erreicht. Die Festphasen- und Schutzgruppenabspaltung erfolgte unter UltraMild<sup>®</sup>-Bedingungen mit 32%-iger NH<sub>3</sub>-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur.



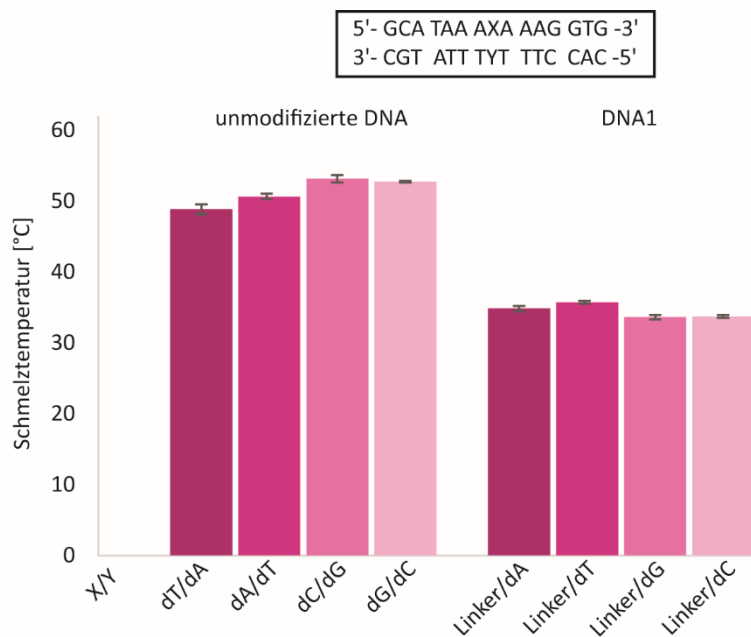
**Abbildung 43.** Die Benchmark-Sequenz mit eingebauten DEACM-Linker (**DNA1**)

Bei der folgenden Aufreinigung via RP-HPLC erleichterte die Synthese im DMTr-On-Modus die Abtrennung des erwünschten Volllängenprodukts von den Abbruchsequenzen. Zur Detektion des modifizierten Oligonukleotids wurden zwei verschiedene Wellenlängen verwendet: 256 nm, aufgrund der für Nukleinsäuren charakteristische Absorption bei 260 nm und 400 nm, aufgrund der Absorption des Cumarin-Chromophors. Mit Hilfe der Absorption bei 400 nm konnten unmodifizierte und modifizierte Oligonukleotide leicht voneinander unterschieden werden. Anschließend wurde die endständige DMTr-Schutzgruppe mit 80%-iger Essigsäure entfernt und das Oligonukelotid erneut über RP-HPLC aufgereinigt. Mit dieser Methode konnte aus einer Synthese im 200 nmol-Maßstab 6,2 nmol sauberes Oligonukleotid gewonnen werden.



**Abbildung 44.** RP-HPLC-Spektren der Linker-modifizierten **DNA1** nach der Festphasenabspaltung (DMTr-on) und nach Detritylierung mit Essigsäure und Aufreinigung (DMTr-off)

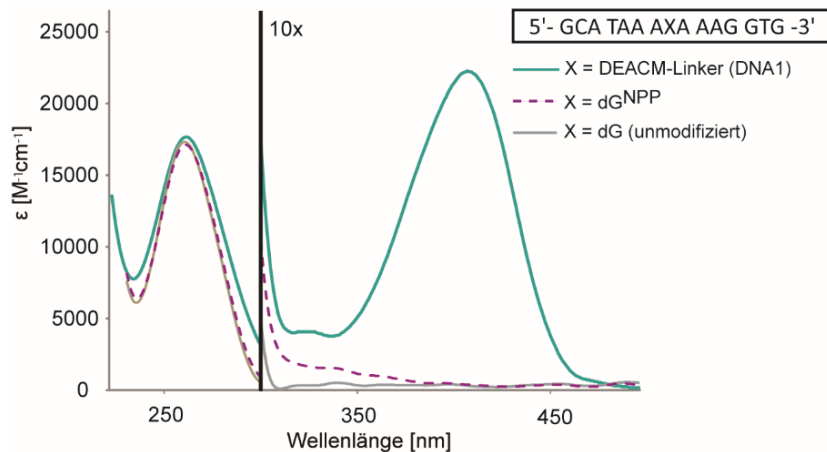
Zur Charakterisierung des DEACM-Linkers wurde zunächst der destabilisierende Effekt innerhalb eines DNA-Duplex bestimmt. Erwartungsgemäß ist der destabilisierende Effekt, aufgrund der fehlenden lokalen Basenpaarung zum Gegenstrang, größer oder in der gleichen Größenordnung wie bei photolabil geschützten Nukleobasen. Um die Anwendungsmöglichkeiten des Linkers einzuschätzen, ist es dennoch hilfreich zu wissen, wie stark dieser Effekt wirklich ist. Es wurden die Schmelzpunkte der modifizierten **DNA1** mit 4 verschiedenen komplementären Strängen (jeweils eine andere Nukleobase an der komplementären Position des Linkers) in PBS-Puffer vermessen und mit unmodifizierter DNA verglichen. Dabei kommt ein UV-Vis-Spektrometer zum Einsatz, welches den DNA-Duplex über mehrere Zyklen hinweg mit einem gleichmäßigen Gradienten erhitzt und wieder abkühlt. Dabei wird die Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 260 nm verfolgt. Aufgrund des hyperchromen Effekts kommt es beim Aufschmelzen des DNA-Duplex zu einer Zunahme der UV-Absorption. Wird die Änderung der Absorption in Abhängigkeit von der Temperatur graphisch aufgetragen, so erhält man eine sigmoidale Schmelzkurve, an deren Wendepunkt die Schmelztemperatur liegt. An diesem Punkt liegt die Hälfte der Probe als Einzelstrang und die andere Hälfte als Doppelstrang vor. In der folgenden Abbildung 45 sind die Schmelztemperaturen der vermessenen DNA-Duplexes graphisch dargestellt.



**Abbildung 45.** Die in dieser Arbeit gemessenen Schmelzpunkte verschiedener unmodifizierter und Linker-modifizierter DNA-Duplexe

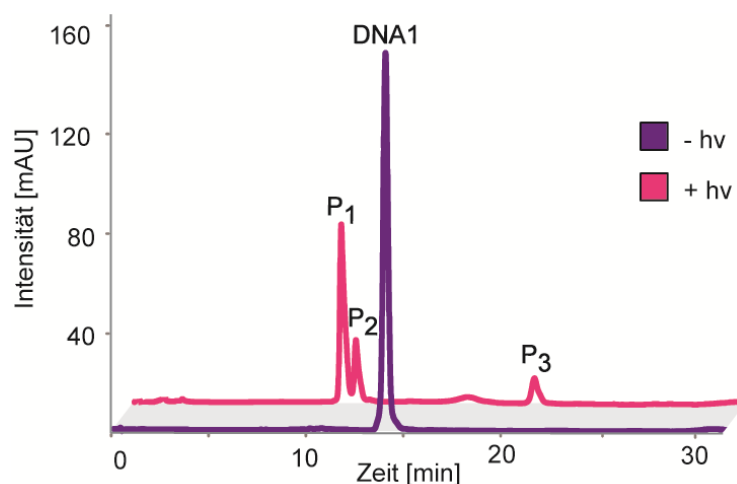
Wie zu erwarten, zeigten die Linker-modifizierten DNA-Duplexe im Vergleich zu den unmodifizierten Duplexen erniedrigte Schmelzpunkte ( $\approx 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\Delta T_m \approx 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die Ursache liegt darin begründet, dass an der Linker-Position quasi eine abasische Stelle entsteht, welche im Duplex keine Wasserstoffbrückenbindung zur komplementären Nukleobase eingehen kann. Zur Verwendung des Linkers sind Anwendungsbereiche mit einzelsträngigen oder teil-einzelsträngigen Oligonukleotiden daher denen der doppelsträngigen vorzuziehen. Werden Duplex-Stränge ausreichend lang gewählt und der Linker optimal positioniert, sodass die lokale destabilisierende Wirkung kaum Einfluss auf die Gesamtstruktur der Nukleinsäure ausübt, erscheint auch die Anwendung im Doppelstrang durchaus möglich. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte dies bestätigt werden, indem mit einem Linker-modifizierten, doppelsträngigen Oligonukleotid Genexpression mit Licht reguliert werden konnte. Zumindest zeigt der neue Linker **29** im Vergleich zu dem kommerziell erhältlichen photospaltbaren *o*-Nitrobenzyl-Linker **25** keine nennenswerten Nachteile.

Eines der Vorteile des DEACM-Linkers **29** im Vergleich zu Linker **25** ist die bathochrom verschobene Absorption, wie am folgenden UV-Vis-Spektrum (Abbildung 46) gezeigt wird. Dadurch ist dieser wesentlich besser geeignet für biologische Anwendungen, bei denen üblicherweise keine UV-Schäden auftreten sollen. Der bathochrome Effekt des DEACM-Linkers bietet, zusammen mit dem hypsochrom absorbierenden Nitrobenzyl-Linker **25** oder einer anderen photolabilen Schutzgruppe (z.B. NPP), zusätzlich die Möglichkeit der wellenlängenselektiven Spaltung.



**Abbildung 46.** Absorptionsspektren von Linker-modifiziertem DNA-Strang **DNA1** und, zu Vergleichszwecken, einer nativen und einer NPP-geschützten Benchmark-Sequenz. Oberhalb von 300 nm wurden die vermessenen Proben 10-fach stärker konzentriert, um die Absorption der Schutzgruppen zu verstärken. Wie aus der Grafik ersichtlich wird, kann zur wellenlängenselektiven Spaltung/Entschützung zunächst der DEACM-Linker ungefähr mit einer Wellenlänge von 400 - 460 nm angeregt werden, während die NPP-Schutzgruppe nicht photolysiert. Durch eine weitere Belichtung mit beispielsweise einer Wellenlänge von 365 nm kann die Photolyse der NPP-Schutzgruppe ausgelöst werden. Das Verhalten der NPP-Schutzgruppe steht in diesem Fall repräsentativ für die Schutzgruppen des *o*-Nitrobenzyl-Typs und kann auf den entsprechenden photospaltbaren Linker **25** übertragen werden.

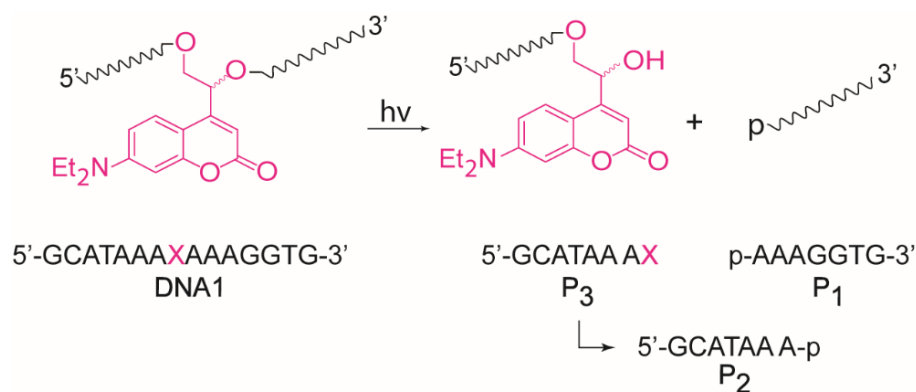
Zur Untersuchung der Photospaltung wurden unbelichtete und belichtete Proben von **DNA1** über RP-HPLC miteinander verglichen. Zunächst wurde unter physiologischen Bedingungen mit 365 nm belichtet. Kurze Belichtungszeiten von 1 Minute resultierten in einer vollständigen Abnahme des photospaltbaren Ausgangsproduktes und in der Bildung drei neuer Produktsignale (Abbildung 47).



**Abbildung 47.** HPLC-Chromatogramm der unbelichteten Linker-modifizierten Benchmark-Sequenz **DNA1** (lila) und der entsprechenden belichteten Probe (rosa). Belichtet wurde mit 365 nm bei physiologischem pH-Wert (pH 7.4).



Die Bildung der drei Produktsignale erschien zunächst ungewöhnlich, da ursprünglich von nur zwei Photolyseprodukten ausgegangen wurde (siehe dazu Abbildung 42). Um die pH-abhängige Bildung eines Nebenproduktes, wie es beispielsweise bei NPP-geschützten Oligonukleotiden vorkommt<sup>75</sup>, auszuschließen, wurde der Belichtungstest in Phosphatpuffer pH 4 und pH 8 wiederholt. Dennoch blieben die HPLC-Chromatogramme unverändert. Die Photolyseprodukte wurden daher mit Massenspektrometrie analysiert. Die Produkte **P**<sub>1</sub> (Minute 11) und **P**<sub>3</sub> (Minute 22) konnten als die erwarteten Photolyseprodukte identifiziert werden. Nach Anregung des Cumarin-Chromophors kommt es zwischen dem Sauerstoff und dem 3'-seitigen Oligonukleotidstrang zum Bindungsbruch, wobei der 3'-seitige Oligonukleotidstrang **P**<sub>1</sub> mit einem phosphoryliertem Ende freigesetzt wird. Der Cumarin-Linker bleibt vorerst am 5'-seitigen Oligonukleotidstrang gebunden und bildet damit Photolyseprodukt **P**<sub>3</sub>. Die zusätzlich gebildete Spezies **P**<sub>2</sub> (Minute 12) resultiert aus der Linker-Abspaltung von **P**<sub>3</sub> (Abbildung 48). Dabei wird der 5'-seitige Oligonukleotidstrang ebenfalls mit phosphoryliertem Ende freigesetzt.



**Abbildung 48.** Bei der Photolysereaktion des photospaltbaren Cumarin-Linkers innerhalb einer Oligonukleotidsequenz kommt es zur Bildung von drei Photolyseprodukten, welche mit massenspektrometrischen Methoden identifiziert werden konnten.

Aufgrund der Ergebnisse wird folgender Photolysemechanismus formuliert: Dem Photolysemechanismus von Schade *et al.*<sup>32</sup> (siehe Kapitel 1.1.1) entsprechend wird der Cumarin-Chromophor durch Belichtung in einen angeregten Zustand **57** gebracht, woraufhin es zur heterolytischen Spaltung in ein Ionenpaar **58** und **59** kommt. Diese Ionen werden durch Wassermoleküle abgefangen und der 3'-seitige Oligonukleotidstrang **61** wird freigesetzt. Der Cumarin-Linker ist zunächst noch an den anderen Oligonukleotidstrang **60** gebunden. Dieser hydrolysiert unter Bindungsspaltung zu Strang **63** und freiem Cumarin **62**. Schlussendlich entstehen bei der Photolyse 3'- und 5'-phosphorylierte Einheiten (Abb. 49).

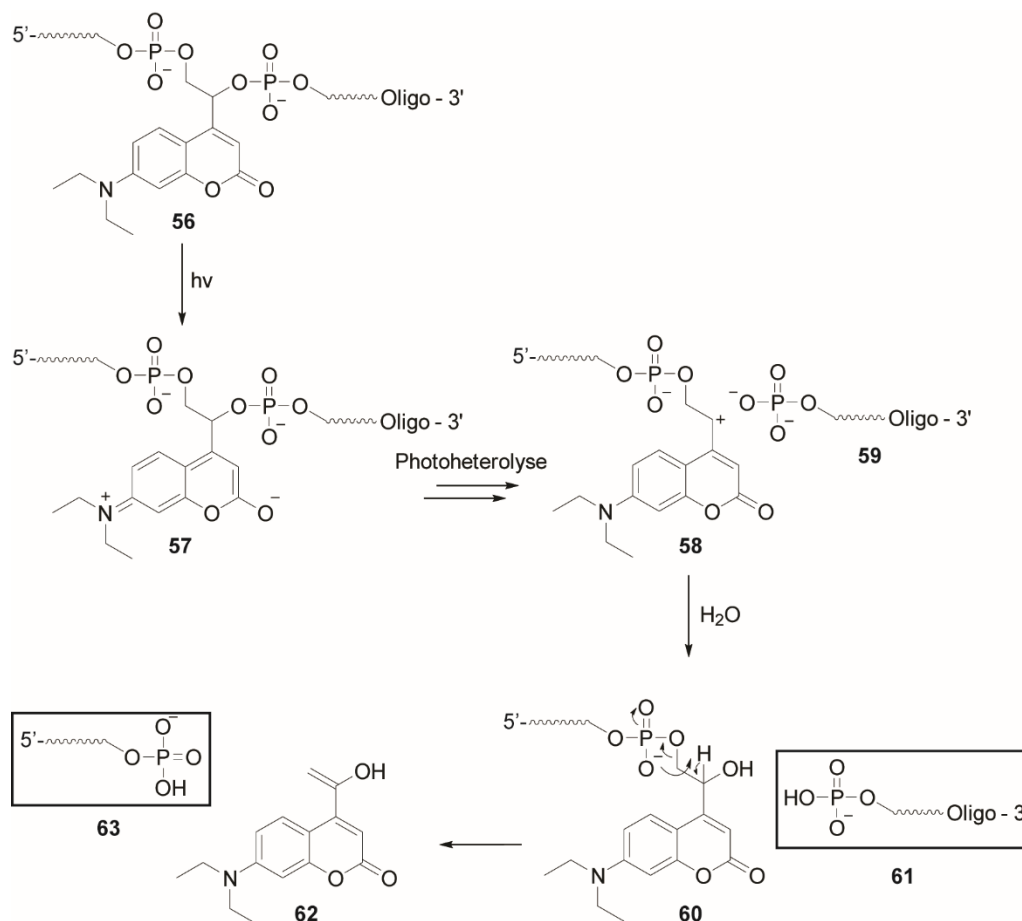
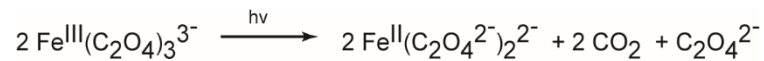


Abbildung 49. Photolysemechanismus des Cumarin-Linkers in einem Oligonukleotid

Zur vollständigen Charakterisierung des DEACM-Linkers gehört die Bestimmung des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ , welcher direkt am Absorptionsspektrum (Abbildung 46) abgelesen werden kann. Dieser beträgt für den DEACM-Linker bei 356 nm  $\epsilon = 9100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Der Extinktionskoeffizient allein sagt allerdings noch nichts über die Photolyse-Effizienz aus. Er ist lediglich ein erster Hinweis, aber keine Garantie, auf eine geeignete Photolyse-Wellenlänge. Die Quantenausbeute gibt den Anteil der absorbierenden Photonen, die in einer Photolyse-reaktion münden, an und ist ebenfalls wellenlängenabhängig. Das Produkt aus der Quantenausbeute  $\phi$  und des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  ist ein Maß für die Photolyse-Effizienz. Zur Bestimmung der Quantenausbeute einer photochemischen Reaktion muss zunächst die gelieferte Photonenzahl der für das Experiment verwendeten LED bestimmt werden. Dies geschieht in der Regel mit einem Referenzsystem bekannter Quantenausbeute nach dem Prinzip der Aktinometrie. In früheren Arbeiten des Arbeitskreises Heckel wurde für die Bestimmung der Quantenausbeute ein DMNB-Aktinometer verwendet. In dieser Arbeit wurde die Ferrioxalat-Aktinometrie verwendet, da dessen Wellenlängenbereich breiter (bis über 500 nm) als das des DMNB-Aktinometers ist. Das Ferrioxalat-Aktinometer basiert auf folgender Photoreaktion:



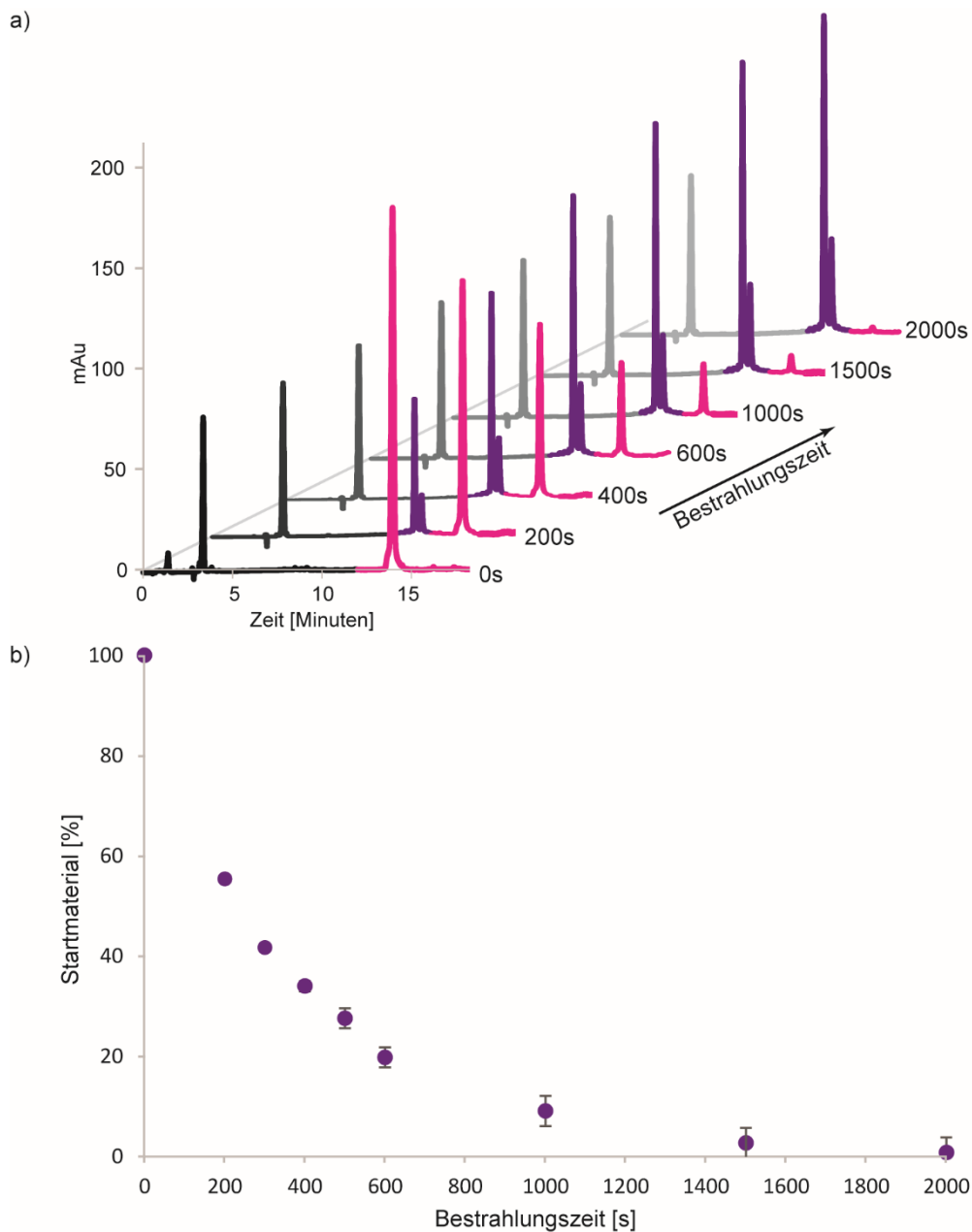
**Abbildung 50.** Nettogleichung der Photoreaktion von Ferrioxalat. Dabei wird Eisen(III) zu Eisen(II) reduziert und Oxalat zu  $\text{CO}_2$  oxidiert.

Das nach Belichten gebildete Eisen(II) bildet mit Phenanthrolin einen farbigen Komplex, welcher bei der Messung der Absorption bei 509 nm quantifiziert wird. Folgende Gleichung (1) wird anschließend zur Berechnung der emittierten Photonenzahl  $q$  herangezogen.

$$\varphi = \frac{dn_s}{q(1 - 10^{-A})dt} \quad (1)$$

Die Quantenausbeute der Photoreaktion von Ferrioxalat ist bei verschiedenen Wellenlängen bekannt. Bei der hier verwendeten Wellenlänge von 365 nm beträgt sie  $\varphi = 1.22$ .<sup>217</sup> Durch Umstellen der Gleichung (1) kann die emittierte Photonenzahl  $q$  direkt bestimmt werden. Die gemessene Absorption des Eisen(II)-Phenanthrolin-Komplexes entspricht dem Wert für  $dn_s$  (Abnahme des Startmaterials). Die relative Absorption ( $1 - 10^{-A}$ ) kann, aufgrund der hohen Konzentration der Ferrioxalat-Lösung, 1 gesetzt werden. Der Wert  $dt$  entspricht dem Zeitintervall der Belichtung.

Nach Bestimmung der Photonenzahl wurde das Linker-modifizierte Oligonukleotid (in PBS) mit einem internen Standard aus Uridin/Uracil versetzt und für verschiedene Zeitintervalle bestrahlt. Bei der anschließenden HPLC-Analytik kann die Abnahme des Startmaterials beobachtet und gegen die Belichtungszeit graphisch aufgetragen werden (Abbildung 51). Der interne Standard dient der Normierung der gemessenen HPLC-Werte.



**Abbildung 51.** Photolyse des Linker-modifizierten Oligonukleotids **DNA1** zur Bestimmung der Quantenausbeute. a) RP-HPLC-Chromatogramme von **DNA1** zu unterschiedlich langen Belichtungszeiten. Belichtet wurden jeweils 13  $\mu\text{l}$  einer 20  $\mu\text{M}$  Oligonukleotid-Lösung und interner Standard in 1 x PBS-Puffer mit einer Thorlabs-LED bei 365 nm. b) Zeitliche Auftragung der Abnahme des Startmaterials **DNA1** bei Belichtung.

Durch den exponentiellen Fit der obigen Abbildung 51 b) und dessen Ableitung nach  $t_0$  erhält man aus der Anfangssteigung ( $x=0$ ) die Abnahme des Startmaterials nach der Zeit. Nach der folgenden Formel (2) wird dann die Quantenausbeute bestimmt:

$$\varphi = \frac{dn_s}{q \cdot A_{rel}} \quad (2)$$

$\phi$  bezeichnet die Quantenausbeute,  $dn_s$  die Abnahme des Startmaterials,  $q$  die Photonenzahl und  $A_{rel}$  die relative Absorption. In der folgenden Tabelle 1 sind der Extinktionskoeffizient, die berechnete Quantenausbeute und deren Produkt der modifizierten Benchmark-Sequenz dargestellt.

**Tabelle 1.** Übersicht der photochemischen Eigenschaften des Linker-modifizierten Oligonukleotids **DNA1**

Sequenz	$\lambda$ [nm]	$\phi$	$\epsilon$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	$\epsilon \cdot \phi$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]
5'-GCA TAA A-Linker-A AAG GTG-3'	365	0.007	9100	63

Die Quantenausbeute des DEACM-Linkers ist mit  $\phi = 0.007$  nicht sonderlich hoch. Der hohe Extinktionskoeffizient allerdings ist schlussendlich ausschlaggebend für die Photolyse-Effizienz, die sich in einem nutzbaren Bereich befindet.

### 3.1.3 Zweiphotonen-Charakterisierung von Linker-modifizierten Oligonukleotiden mit Hilfe eines Verdrängungsassays im Hydrogel

Die Zweiphotonen-Sensitivität der Cumarin-Schutzgruppe war eine der Hauptgründe für dessen Verwendung als Zweiphotonen-spaltbarer Linker. Der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt des DEACM-Chromophors wurde bereits auf 0.12 GM bei 800 nm bestimmt.<sup>62,218</sup> Dieser Wert ist wesentlich höher als der der meisten anderen gängigen Phototrigger und zusätzlich ausreichend hoch, um ihn in biologischen Zellanwendungen verwenden zu können. Zum Vergleich, liegt der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt des 2-Nitrobenzyl-Phototrigger, welcher meist für photospaltbare Linker verwendet wird, bei lediglich 0.01 GM bei 800 nm.<sup>53</sup> Die Zweiphotonen-Anregung ist damit wesentlich geringer und die Zweiphotonen-Photolyse ineffizienter. Dass sich einige Schutzgruppen mit der Zweiphotonen-Technik quasi nicht abspalten lassen, ist auch hinsichtlich der wellenlängenselektiven Photolyse von großem Interesse. Die Hauptziele des neuen Zweiphotonen-spaltbaren Linkers waren demnach eine geringere Belichtungsdauer und die Möglichkeit weniger intensive Lichtquellen zu verwenden, um die Verträglichkeit in biologischem Gewebe zu erhöhen. Zunächst sollten die Zweiphotonen-Eigenschaften des DEACM-Linkers in einem Oligonukleotid bewiesen und charakterisiert werden

## 3.1.3.1 Vorarbeiten

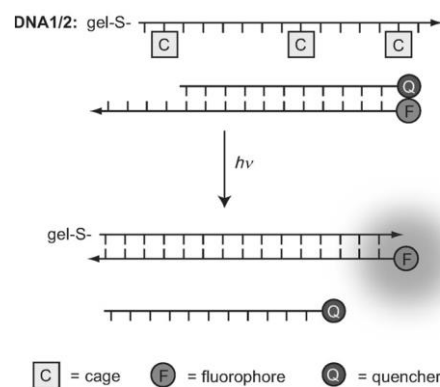
Dr. Florian Schäfer zeigte in seiner Doktorarbeit, dass Oligonukleotide, geschützt mit der Zweiphotonen-sensitiven Schutzgruppe NDBF, mittels eines gepulsten IR-Lasers (710 nm, 1.2 W) photolysiert werden. Dazu wurde eine entsprechende Lösung in einer Küvette bestrahlt und anschließend unter Verwendung der RP-HPLC analysiert und quantifiziert. Tatsächlich zeigte sich nach 60 minütiger Bestrahlung eine Abnahme des Startmaterials um 40%. Mit MNI-Glutamat, einem Referenzsystem mit bekanntem Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt (0.06 GM bei 730 nm<sup>219</sup>), wurde der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt  $\delta_u$  der NDBF-geschützten Oligonukleotid-Probe, analog zum Vorgehen der Quantenausbeute, bestimmt. Dazu wurde folgende Formel nach Furuta *et al.*<sup>53</sup> verwendet:

$$\delta_u = \frac{N_P \cdot \delta_{uR} \cdot c_R}{N_R \cdot c_P} \quad (3)$$

Dabei bezeichnet  $N_P$  die Photolyserate der Probe,  $\delta_{uR}$  den Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt der Referenz,  $c_R$  die Konzentration der Referenz,  $N_R$  die Photolyserate der Referenz und  $c_P$  die Konzentration der Probe.

Um einen eindeutigen Beweis der Zweiphotonen-Absorption zu erhalten, musste gezeigt werden, dass der photolytische Umsatz quadratisch von der eingestrahlten Laserintensität abhängt. Bei dem Versuch von Dr. Florian Schäfer diese Abhängigkeit an dem NDBF-geschützten Oligonukleotid zu zeigen, scheiterte die HPLC-Messtechnik. Infolgedessen musste auch der ermittelte Wert für den Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt in Frage gestellt werden. Dr. Manuela Fichte beschäftigte sich daher in ihrer Doktorarbeit mit der Fragestellung, wie hoch die Glaubwürdigkeit der Zweiphotonen-Einfangsquerschnitte von photolabil geschützten Oligonukleotiden ist und entwickelte eine besser geeignete Methode. Aus den Arbeiten von Dr. Florian Schäfer konnte die Erkenntnis gezogen werden, dass die Detektionsmethode per HPLC nur bedingt geeignet ist, da der Zweiphotonen-Effekt räumlich begrenzt ist und die Photolyse daher nur in einem kleinen Bereich des Küvettenvolumens stattfindet (aufgrund der Nichtlinearität nur im Fokus des Laserstrahls). Bei kurzen Bestrahlungszeiten liegt der photolytische Umsatz unterhalb der HPLC-Detektionsgrenze, sodass keine quantitative Aussage getroffen werden kann. Bei längeren Bestrahlungszeiten kommen Diffusionseffekte in Spiel, die die quadratische Abhängigkeit des Zweiphotonen-Effekts überlagern. Die korrekte Darstellung des Photolyse-Effekts, welcher nur in einem winzigen Bereich der Probe stattfindet, erwies sich daher als nicht trivial. Dr. Manuela Fichte entwickelte eine sensitivere

Methode, die auf der Fluoreszenzzunahme photolysierter Oligonukleotide beruht, und konnte damit die Photolyse photolabil geschützter DNA mittels der Zweiphotonen-Technik zeigen. Dazu wurde ein 3-fach DEACM-geschützter DNA-Strang über eine 5'-Thiol-Modifikation in einem Maleimid-basierten Hydrogel immobilisiert. Dieses wiederum wurde mit einer Lösung umgeben, welche eine Doppelstrang-Sonde enthielt. Diese Sonde bestand aus einem Fluoreszenz-markierten Gegenstrang (zur photolabil geschützten DNA) und einem komplementären, verkürzten Quencher-markierten Strang gemäß folgender Abbildung.



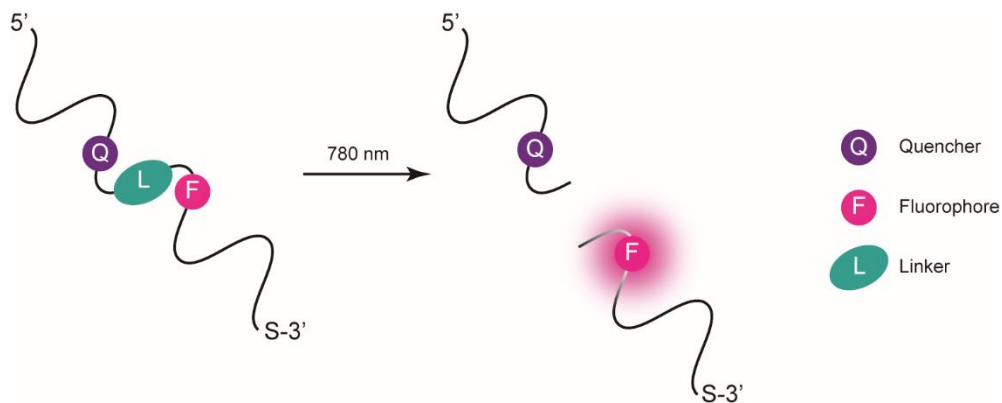
**Abbildung 52.** Darstellung des Verdrängungsassays immobilisiert im Hydrogel. Graphik entnommen aus Fichte *et al.*<sup>220</sup>

Dahinter stand die Idee, dass photolabil geschützte Oligonukleotide, aufgrund der ausschließlichen Zweiphotonen-Absorption im Fokus des Laserstrahls, räumlich differenziert photolysiert werden können. An der Photolyseposition verdrängt die freigesetzte DNA den Quencher-markierten Strang der Sonde und bindet an den Fluoreszenz-markierten Strang, wodurch folglich eine detektierbare Fluoreszenzzunahme erfolgt. Dr. Manuela Fichte gelang damit die Visualisierung des Zweiphotonen-Effektes an einem Oligonukleotid und konnte mit dem gleichen Assay durch unterschiedlich stark bestrahlte Bereiche ebenfalls die quadratische Abhängigkeit des photolytischen Umsatzes von der Intensität zeigen.

### 3.1.3.2 Entwicklung eines Hydrogellassays mit Linker-modifizierter Einzelstrang-DNA

Die Erkenntnisse der Arbeiten von Dr. Manuela Fichte waren wegweisend die Zweiphotonen-Photolyse des DEACM-Linkers ebenfalls in einem Fluoreszenz-basierten Hydrogell assay zu zeigen. Aufgrund der Fähigkeit des Linkers, einen Oligonukleotidstrang bei Photolyse zu spalten entstand zunächst die Idee, die Verdrängungsstrategie des ursprünglichen Systems zu verwerfen und die Trennung des Fluorophor-Quencher-Paares und damit die entstehende Fluoreszenzzunahme über

eine Photospaltung zu erreichen. Prinzipiell würde dafür ein einzelner Oligonukleotidstrang ausreichen.



**Abbildung 53.** Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Assays mit einem einzelnen Oligonukleotidstrang. Ein DNA-Strang wird mit einem Fluorophor/Quencher-Paar modifiziert. Zwischen ihnen liegt der Zweiphotonen-spaltbare Linker, der nach Photolyse das Fluorophor/Quencher-Paar trennt und somit eine Fluoreszenzzunahme auslöst.

Zur Durchführung des Assays wurde ein 15mer DNA-Strang mit einer Thiol-Modifikation am 3'-Ende des Stranges synthetisiert, um diesen im Hydrogel immobilisieren zu können. Als Fluorophor/Quencher-Paar wurde Atto565 und BHQ2 gewählt, da diese bereits für eine Vielzahl von Oligonukleotidanwendungen etabliert sind und diese von den photochemischen Eigenschaften zu denen des DEACM-Linkers passen. Zu beachten war hier beispielsweise, dass die Anregung des Fluorophors weder zu einer photolytischen Spaltung noch zur Anregung der Eigenfluoreszenz des Linkers führt. Der Abstand des Paares wurde so gewählt, dass er im Optimalbereich der Fluoreszenzauslöschung liegt ( $10 - 100 \text{ \AA}$ )<sup>221</sup>. Die erste verwendete Sequenz für den Hydrogelassay ist in folgender Tabelle dargestellt.

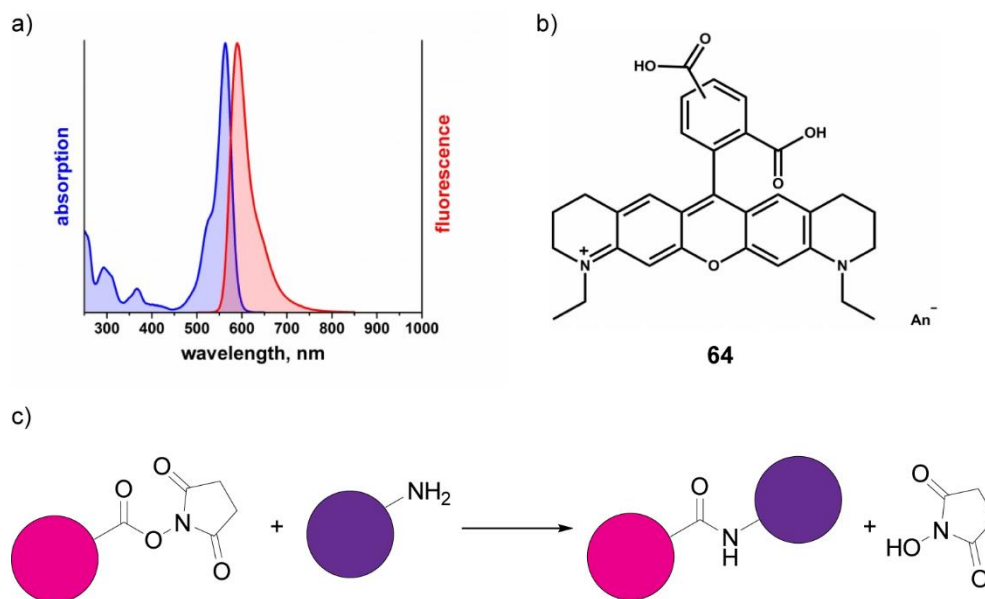
**Tabelle 2.** Im Hydrogelassay verwendete Sequenz von DNA2

DNA	Sequenz
DNA2	5'-GCA T <sup>BHQ2</sup> AA A-Linker-A A <sup>Atto565</sup> AG GTG-S-3'

Der Quencher BHQ2 konnte über ein entsprechend modifiziertes dT-Phosphoramidit direkt in der Festphasensynthese mit guter Ausbeute in die Sequenz eingebaut werden. Der Farbstoff Atto565 ist als NHS-Ester kommerziell erhältlich und wurde über eine reaktive, primäre Aminogruppe problemlos in die DNA-Sequenz integriert (Abbildung 54). Als Festphasenmaterial wurde ein 3'-Dithiol-Modifizier gewählt. Um für die Immobilisierung im Hydrogel ein freies reaktives Thiol zu



erhalten, wurde die DNA-Probe mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) reduziert und über RP-HPLC aufgereinigt.



**Abbildung 54.** a) Anregungs- und Emissionsspektrum von Atto565 b) Strukturformel von Atto565 c) NHS-Konjugationsreaktion an ein primäres Amin; Abbildung a) und b) entnommen von AttoTec (<http://www.atto-tec.com>)

Beim diesem Arbeitsschritt erwies sich jedoch das BHQ2 unter den reduktiven Bedingungen als nicht besonders stabil, sodass keine verwendbare Menge der gewünschten **DNA2** gewonnen werden konnte. Auch bei einem vergleichbaren Versuch mit DTT als Reduktionsmittel konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Die Ursache liegt in der Struktur des BHQs, welche zwei Azoverbindungen enthält und diese unter den reduktiven Bedingungen instabil sind. Aufgrund dessen musste das System verändert werden. Da Atto565 gut kompatibel ist mit den photochemischen Eigenschaften des Linkers, wurde an diesem festgehalten und lediglich der Quencher verändert. Der kommerziell erhältliche TideQuencher4 (TQ4) bildet mit Atto565 ein ebenso gutes Fluorophor/Quencher-Paar wie BHQ2. Von der **DNA2**-Sequenz ausgehend, wurde **DNA3** (Tabelle 3) synthetisiert. Da hier allerdings die Struktur des TideQuenchers von Hersteller nicht angegeben wird, konnten nur spekuliert werden, ob dieser die Reaktionsbedingungen der Disulfidspaltung übersteht.

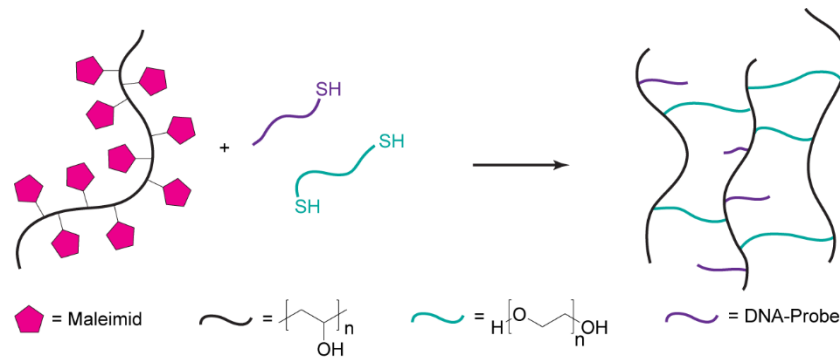
**Tabelle 3.** Im Hydrogelassay verwendete Sequenz von **DNA3**

DNA	Sequenz
DNA3	5'-GCA T <sup>TQ4</sup> AA A-Linker-A A <sup>Atto565</sup> AG GTG-S-3'

Atto565 wurde wie zuvor bei **DNA2** als NHS-Ester über eine Reaktion mit einem reaktiven Amin in die DNA eingeführt. Im Anschluss wurde TQ4, funktionalisiert mit einer Azid-Gruppe, über eine Click-Reaktion (Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition) an ein entsprechend Alkin-modifiziertes Nukleotid konjugiert. Standardmäßig wurde dazu das Oligonukleotid in TEAA-Puffer vorgelegt und das TQ4-Azid zugegeben. Ein Cu(II)-TBTA-Komplex (10 mM in 55 vol% DMSO, TBTA= Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)) wurde ebenfalls zugegeben und anschließend mit Ascorbinsäure-Lösung zum reaktiven Cu(I)-TBTA reduziert. Nach 24 Stunden wurde die DNA in kaltem Ethanol ausgefällt und über RP-HPLC aufgereinigt. Die Click-Reaktion im Oligonukleotid verlief allerdings mit schlechter Ausbeute. Nicht reagiertes Startmaterial konnte aber isoliert werden. Durch das mehrmalige Durchführen der Click-Reaktion konnte somit eine brauchbare Menge an Quencher-markierter DNA gewonnen werden. Wie sich in massenspektroskopischen Untersuchungen zeigte, erreichten die Reaktionsbedingungen der Click-Reaktion zusätzlich die gewünschte Spaltung des Dithiols zum freien Thiol.

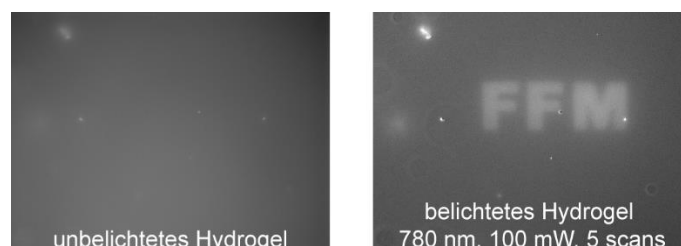
Obwohl sich nun der TideQuencher als prinzipiell geeignet erwies, gestaltete sich die Herstellung nutzbarer Mengen von **DNA3** mühselig. Daher wurde ein verbessertes System entwickelt, das sich mehr an dem Verdrängungsassay von Dr. Manuela Fichte orientierte. Die Idee dahinter war, einen Fluorophor/Quencher-markierten DNA-Strang unabhängig von einem zweiten Linker-modifizierten Strang, welcher im Hydrogel immobilisiert werden sollte, herzustellen. Dadurch war zwar nun die Synthese zweier DNA-Stränge notwendig, allerdings konnten dadurch die Probleme der ersten beiden Versuchsreihen umgangen werden. Doch zunächst wurde mit der kleinen Menge an gewonnener **DNA3** ein erstes Zweiphotonen-Experiment im Hydrogel durchgeführt, um erste Hinweise auf die Zweiphotonen-Eigenschaften des DEACM-Linkers zu erhalten.

Die in allen Experimenten verwendeten Hydrogele stammen von der Firma Cellendes und basieren auf einem Polyvinylalkohol (PVA)-Polyethylenglycol (PEG)-Netzwerk, welches sich durch das Mischen von PVA-Maleimid und PEG-Thiol bildet. Zur Immobilisierung der DNA im Hydrogel wurde die DNA-Probe, mit der freien Thiolgruppe, zunächst mit einem Überschuss PVA-Maleimid umgesetzt. Nicht abgesättigte, noch freie Maleimidfunktionen wurden im Anschluss mit PEG-Thiol umgesetzt, welches schlussendlich für die Vernetzung des Hydrogels sorgte. Die DNA wurde somit in das Hydrogelnetzwerk eingearbeitet (Abbildung 55). Damit die Hydrogele nicht austrocknen konnten, wurden sie mit 1 x PBS-Puffer umgeben. Für die Herstellung, Lagerung und Belichtung der Hydrogele haben sich „Coverglass“-Kammern angeboten, welche sich durch ihre geringe Bodendicke auch für ein inverses Mikroskop gut eignen.



**Abbildung 55.** Schematische Darstellung der Hydrogel-Polymerisation und der gleichzeitigen Immobilisierung einer DNA. Graphik frei abgeändert nach Cellendes.

**DNA3** wurde zur Untersuchung im Hydrogel immobilisiert und anschließend auf dem Mikroskop mit einem Titan-Saphir-Laser bei 780 nm belichtet. Der Laserstrahl wurde dabei durch eine Pockelszelle geleitet, um einen gepulsten Laserstrahl mit besonders hoher Leistung pro Puls zu erhalten. Über zwei motorisierte Spiegel konnte dieser Strahl nun in einem Galvosystem der Firma *Rapp OptoElectronics* so abgelenkt und bewegt werden, dass mit dem Laserstrahl festgelegte Strukturen im Hydrogel abgescannt werden konnten. Die Formen (z.B. Quadrate, Kreise) wurden über die zugehörige Software bestimmt oder selbst entworfen. Die Anzahl der Scans wird ebenfalls über die Software festgelegt. Schlussendlich wurde der Laserstrahl durch einen weiteren Spiegel in das Mikroskop geleitet, wo es über einem Ölimmersions-Objektiv fokussiert wurde. Die nach Belichtung entstandene Fluoreszenz wurde mit einer Uvico-Lampe angeregt und mit entsprechenden Filterwürfeln direkt am Mikroskop in Form von Weitfeldfluoreszenzaufnahmen visualisiert. Erfreulicherweise konnten bei den ersten Zweiphotonen-Experimenten an **DNA3** erste erfolgreiche Ergebnisse erzielt werden. Diese sind exemplarisch in folgender Abbildung 56 dargestellt.



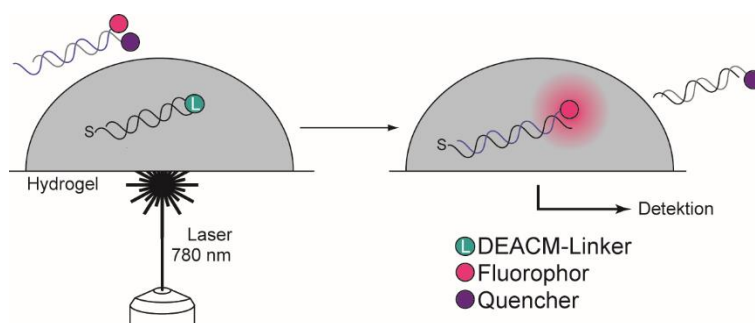
**Abbildung 56.** Erste Zweiphotonen-Belichtungsexperimente an **DNA3** im Hydrogel. Belichtet wurde mit 780 nm. Das linke Bild zeigt das unbelichtete Hydrogel zu Vergleichszwecken. Im rechten Bild wurde an gleicher Stelle im Hydrogel der Schriftzug „FFM“ photolysiert. (Weitfeldfluoreszenzaufnahmen)

Das erste Testexperiment deutet auf die Tatsache hin, dass der DEACM-Linker prinzipiell mit Zweiphotonen-Absorption photolysiert werden kann. Im weiteren Verlauf dieser Studie wurde nun

der Hydrogell assay dahingehend optimiert, dass eine Synthese der benötigten DNA-Stränge in guter Ausbeute sichergestellt wurde, um ausreichend Zweiphotonen-Experimente durchführen zu können. In den folgenden Experimenten sollte gezeigt werden, dass der in Abbildung 56 visualisierte Effekt tatsächlich auf der Zweiphotonen-Absorption beruht und nicht beispielsweise durch thermische Einwirkung entstanden ist.

### 3.1.3.3. Hydrogell assay mit Linker-modifizierter Doppelstrang-DNA und intramolekularem Schleifenmotiv

Zur Optimierung des Hydrogell assays wurde die Idee, dass ein Strang einen Anderen im DNA-Duplex verdrängt und der neue DNA-Duplex eine höhere Fluoreszenz aufweist als der Ursprüngliche, aufgegriffen. Damit sollten die Probleme der ersten beiden Versuchsreihen mit einem einzelsträngigen Linker-System dezimiert werden. Der neue Fluoreszenz assay basierend auf einer DNA-Verdrängung immobilisiert in einem Hydrogel ist in folgender Abbildung 57 dargestellt.



**Abbildung 57.** Schematische Darstellung des Fluoreszenzassays mit einer Linker-modifizierten Hairpin-DNA immobilisiert im Hydrogel und einer Fluorophor/Quencher-Sonde in der Hydrogel-umgebenden Lösung. Nach Belichtung kommt es zur Spaltung der „Hairpin-DNA“, wobei der Sense-Strang weiterhin immobilisiert bleibt. Der freigesetzte Gegenstrang jedoch hat die Möglichkeit aus dem Hydrogel zu diffundieren. Die Sonde ist so designt, dass der Fluorophor-markierte Strang die komplementäre Sequenz zum immobilisierten Sense-Strang aufweist und eine höhere Affinität dazu besitzt, als der ursprünglich gebundene Gegenstrang. Dieser wird demnach, unter Aufwinden der Sonden-Helix, verdrängt und es kommt zu einer detektierbaren Fluoreszenzzunahme.

Dieser Fluoreszenz assay sieht eine DNA mit Haarnadelstruktur (Hairpin-DNA) vor, welche innerhalb des Schleifenmotivs den DEACM-Linker enthält. Durch die intramolekulare Struktur liegt die Hybridisierung des Sense- und Antisense-Stranges im energetischen Minimum. Der Gegenstrang soll nach Photolyse bereitwillig verdrängt werden, daher muss dieser etwas kürzer sein als der Sense-Strang. Der Sense-Strang hingegen soll nach Photolyse weiterhin am Hydrogel gebunden bleiben,

daher muss die Thiol-Gruppe zur Immobilisierung am Sense-Ende der Hairpin-DNA angebracht werden. Des Weiteren wird eine sogenannte DNA-Sonde (ein DNA-Duplex markiert mit einem Fluorophor/Quencher-Paar) benötigt. Eine der beiden Sonden-Stränge ist komplementär zum immobilisierten Sense-Strang und trägt die Fluorophor-Markierung. Der andere Strang ist mit dem entsprechenden Quencher versehen. Im Sonden-Duplex liegen Fluorophor und Quencher so nah beieinander, dass es zur Fluoreszenzauslöschung kommt. Nach Photolyse soll der Fluorophor-Strang eine höhere Affinität zum immobilisierten Sense-Strang aufweisen als der ursprüngliche Hairpin-Gegenstrang und diesen folglich verdrängen. Dabei werden Fluorophor und Quencher räumlich getrennt und es kommt zu einem Fluoreszenzanstieg. Genau diesen Prozess gilt es vor Belichtung zu verhindern und stellt die Schwierigkeit dieses Assaysystems dar. Dabei wird sich der Effekt zunutze gemacht, dass intramolekulare Hybridisierungen meist stabiler (höherer Schmelzpunkt) sind, als die entsprechende Hybridisierung der Einzelstränge. Vor Photolyse hält also der „intramolekulare Bonus“ die Hairpin-DNA, aber auch indirekt die DNA-Sonde, in der gewünschten Form. Nach Photolyse kommt es zur Umlagerung der Hybridisierungspartner, da die zwei einzelnen Stränge der ursprünglichen Hairpin-DNA mit den jeweils komplementären Strängen der DNA-Sonde stabilere Duplexe bildet. Nichtsdestotrotz erfordert dieses System eine wohlüberlegte Wahl der Sequenzlänge jedes einzelnen Stranges, um einen maximalen Effekt zu erzielen. In dieser Arbeit wurde dies durch theoretische Schmelzpunktberechnungen und empirische Vortests ermittelt. In der folgenden Tabelle 4 sind die verwendeten DNA-Sequenzen dargestellt, mit denen die optimale DNA-Längen und -Zusammensetzung bestimmt wurden.

**Tabelle 4.** Verwendete Sequenzen zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenzzunahme nach Photolyse

<b>Hairpin-DNA mit DEACM-Linker</b>		
DNA	Länge	Sequenz
DNA4	30 mer	5'-S-GCA TAA ATA AAG GTG T-Linker-T CAC CTT TAT TTA-3'
DNA5	29 mer	5'-S-GCA TAA ATA AAG GTG T-Linker-T CAC CTT TAT TT-3'
DNA6	28 mer	5'-S-GCA TAA ATA AAG GTG T-Linker-T CAC CTT TAT T-3'
DNA7	27 mer	5'-S-GCA TAA ATA AAG GTG T-Linker-T CAC CTT TAT -3'

<b>Fluorophor-Strang (Atto565)</b>		
DNA	Länge	Sequenz
DNA8	15 mer	5'-Atto565-CAC CTT TAT TTA TGC-3'

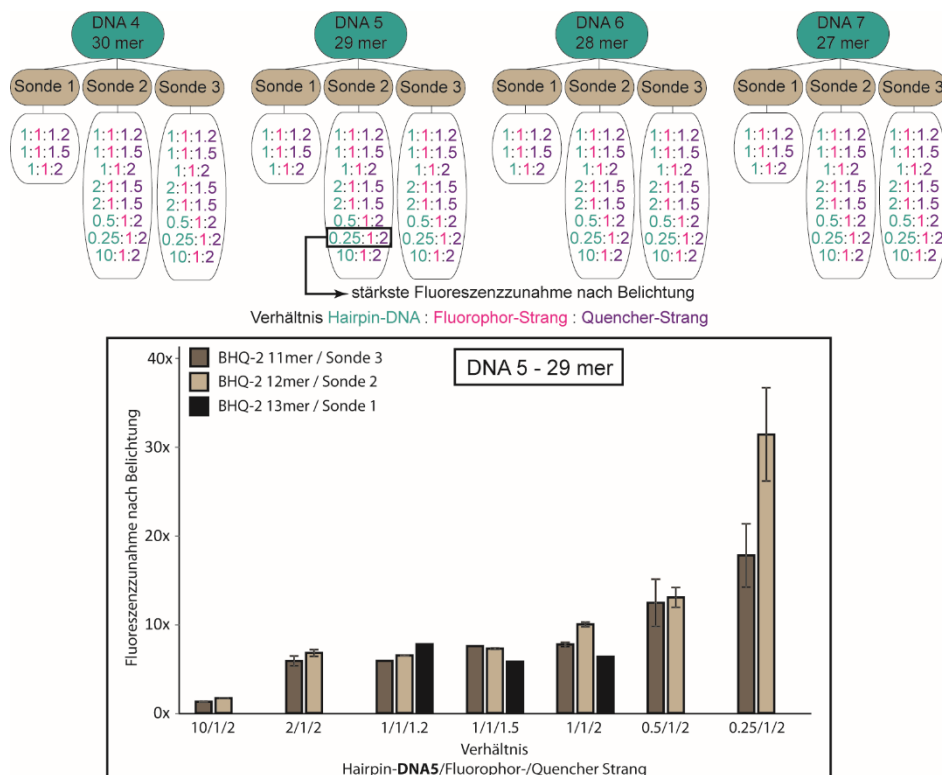
  

<b>Quencher-Strang (BHQ2)</b>		
DNA	Länge	Sequenz
DNA9	13 mer	5'-A TAA ATA AAG GTG-BHQ2-3'
DNA10	12 mer	5'-TAA ATA AAG GTG-BHQ2-3'
DNA11	11 mer	5'-AA ATA AAG GTG-BHQ2-3'

Als Grundsequenz der Hairpin-DNA wurde die schon vorher verwendete 15 mer-lange Benchmark-Sequenz gewählt. Über einen intramolekularen Ring („Loop“), in welchem der DEACM-Linker liegt,

kommt es zur Hybridisierung mit dem komplementären Gegenstrang. Die Länge des Gegenstranges wurde variiert von 9 – 12 Basenpaaren. Der Fluorophor-Strang enthält die komplementäre Sequenz zum Hairpin-Sense-Strang und wurde als 15 mer hergestellt. Dieser Strang ist komplementär über die gesamte Länge des Sense-Stranges, um nach Photospaltung die Triebkraft zur Verdrängung des kürzeren Hairpin-Gegenstrangs zu maximieren. Damit wird auch klar, warum die Länge des intramolekularen Gegenstrangs in der Hairpin-DNA einen so großen Einfluss auf dieses System hat. Im unbelichteten Zustand muss der Stabilitätsgewinn durch die intramolekulare Hybridisierung größer sein, als der Stabilitätsverlust durch den verkürzten Gegenstrang. Nur so kann eine vorzeitige, d.h. vor Belichtung, Verdrängung des Gegenstranges durch den Fluorophor-Strang ausgeschlossen werden. Im Umkehrschluss darf der Hairpin-Gegenstrang nicht zu lang gewählt werden, da dieser sonst nach Photolyse nicht verdrängt werden kann. Der zum Fluorophor-Strang komplementäre Quencher-Strang wurde ebenfalls in der Länge variiert, sodass letztendlich 3 verschiedene Sonden für die Vortests verwendet wurden.

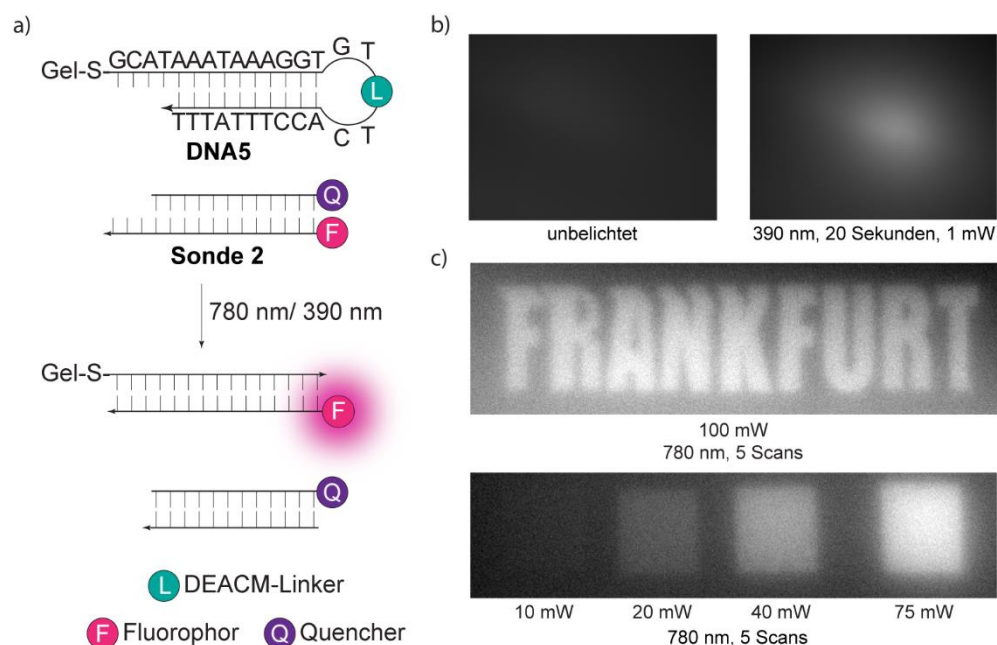
Für die Vortests wurden jeweils die unterschiedlich langen Hairpin-DNAs **DNA4** – **DNA7** in Puffer mit den drei verschiedenen Sonden versetzt, wobei zusätzlich die Verhältnisse von Hairpin-, Fluorophor- und Quencher-Strang variiert wurden. Die Fluoreszenzintensitäten der Lösungen wurden vor und nach Belichtung an einem Mikrotiterplatten-Leser vermessen und die Fluoreszenzzunahme bestimmt. Die Messungen und Ergebnisse sind in Abbildung 58 übersichtlich dargestellt.



**Abbildung 58.** Fluoreszenzzunahme nach Belichtung (365 nm, 1 Min.) verschiedener Hairpin/ Fluorophor/ Quencher-Verhältnisse. Das beste Ergebnis lieferte **DNA5/ DNA8/ DNA10** in einem Verhältnis von 0.25/ 1/ 2

**DNA5** und **Sonde 2** (**DNA8** und **DNA10**) wurden in dem ermittelten Verhältnis für das Hydrogelexperiment verwendet. Die Thiolgruppe von **DNA5** wurde wie zuvor durch Reduktion mit TCEP generiert und über RP-HPLC gereinigt. „Thiolproben“ wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert, um die Dimerisierung der Thiole zu verhindern. Nach längerer Lagerung wurden die Proben erneut einer Reduktion mit TCEP unterzogen.

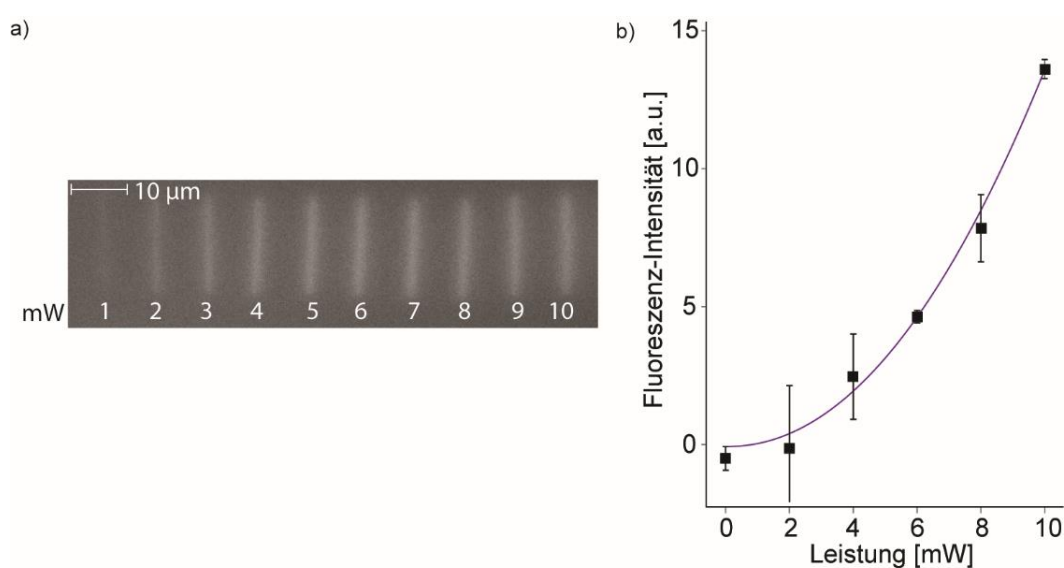
**DNA5** wurde im Hydrogel, nach der zuvor beschriebenen Prozedur, immobilisiert. Dieses Hydrogel wurde mit einer  $1 \times$  PBS-Puffer-Lösung, welche **Sonde 2** enthält, umgeben. **Sonde 2** kann daher ungehindert im Hydrogel diffundieren. Belichtet wurde mit dem zuvor beschriebenen Laseraufbau bei  $780\text{ nm}$  (Zweiphotonen-Anregung) und  $390\text{ nm}$  (Einphotonen-Anregung). Das Einphotonen-Anregungslicht wurde aus  $780\text{ nm}$ -Laserlicht mit Hilfe eines Frequenzverdopplers generiert, welches vor eine Pockelszelle geschaltet wurde.



**Abbildung 59.** Fluoreszenzbasierter Verdrängungsassay im Hydrogel. a) Schematische Darstellung des Assays mit **DNA5** und **Sonde 2** b) Belichtung im Hydrogel mit  $390\text{ nm}$  (Einphotonen-Anregung). Links ist die unbelichtete Probe dargestellt. Das rechte Bild zeigt die Aufnahme der gleichen Position im Hydrogel nach Belichtung für 20 Sekunden. Belichtet wurde eine kreisrunde Fläche. Aufgrund des zylinderförmigen Anregungsprofils der Einphotonen-Anregung kann allerdings keine klar definierte Form visualisiert werden. c) Weitfeldfluoreszenzaufnahmen von belichteten Formen ( $780\text{ nm}$ , Zweiphotonen-Anregung) in einem **DNA5**-enthaltenen Hydrogel. Aufgrund der fokussierten Anregung durch den Laserstrahl kommt es nur innerhalb der Scan-Ebene zur Photolyse. Daher sind klare Strukturen (Buchstaben, Bild oben) erkennbar. Die untere Aufnahme zeigt die Photolyse in Abhängigkeit der eingestrahlten Leistung. Es wurden jeweils 5 Scans durchgeführt, d.h. dass der Laser jede Form 5-mal abstrahlte.

Erfreulicherweise konnten mit dem fluoreszenzbasierten Verdrängungsassay im Hydrogel positive Ergebnisse erzielt werden. Sowohl die Einphotonen-, wie auch die Zweiphotonen-Anregung, führten

zur gewünschten Fluoreszenzzunahme. Wie die Abbildung 59 zeigt, ist die Präzision der Visualisierung allerdings von der Natur des verwendeten Lasterstrahls abhängig. Bei der Einphotonen-Anregung wurde kreisförmig im Hydrogel angeregt. Zwar ist eine Fluoreszenzzunahme in dem Belichtungsbereich sichtbar, doch nur sehr schemenhaft und auf gar keinen Fall als kreisrunde Form erkennbar. Wie bei der Einphotonen-Anregung üblich, weist der Laserstrahl ein zylinderförmiges Anregungsprofil auf, sodass die gezielte Photolyse in einer definierten Hydrogelebene nicht möglich ist. Zwar befindet sich der Fokus des Laserstrahls in dieser Ebene, aber es wird zwangsläufig auch immer oberhalb und unterhalb dieser Ebene angeregt. Bei der Zweiphotonen-Anregung ist nur im Fokus des Laserstrahls die Energie ausreichend hoch, um den Prozess der Photolyse auszulösen. Die Anregung findet daher räumlich klar definiert und mit hoher 3-dimensionaler Auflösung statt. Dies ermöglicht uns, Formen und Figuren im Hydrogel darzustellen. Die 3-dimensionale Auflösung sollte im Folgenden genauer gezeigt werden. Da dies allein aber noch kein ausreichender Beweis für die Zweiphotonen-Anregung ist, wurde zunächst überprüft, ob sich die Zweiphotonen-Photolyse tatsächlich quadratisch zur eingestrahlten Intensität verhält. Dr. Manuela Fichte hat in ihrer Arbeit dafür eine Prozedur entwickelt, welche hier Verwendung findet. In einem Hydrogel wurden mehrere Striche mit zunehmender Intensität photolysiert. Die Anregung im Hydrogel geschah zunächst in Abwesenheit der Sonde, damit es nicht zur Photobleichung des Fluorophors und Verfälschung der Messwerte kommt. Die Sonde wurde nach Belichtung zugegeben und Fluoreszenzaufnahmen wurden angefertigt. Mit Hilfe der „Zen Imaging Software“ (Zeiss) wurden die Intensitäten der einzelnen Striche bestimmt und ein Intensitätsprofil erstellt. Dieses wurde mit dem „Origin Peak-Analyzer“ integriert und ausgewertet. Die Probe wurde als Triplikat vermessen.

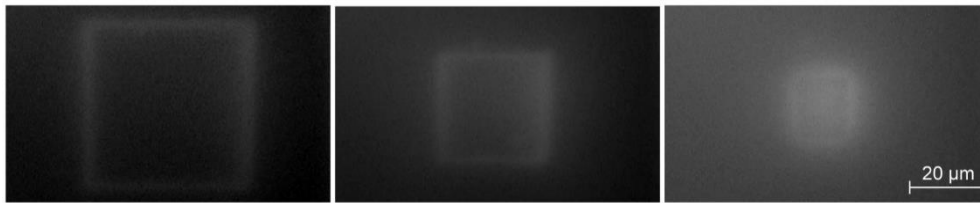


**Abbildung 60.** Mehrere Striche wurden mit zunehmender Leistung in einem DNAs5-enthaltenen Hydrogel photolysiert. Anschließend wurde **Sonde 2** zugegeben und a) ein Weitfeldfluoreszenzbild aufgenommen. Anschließend wurde das Bild aus a) ausgewertet und b) die Fluoreszenzintensität als Funktion der eingestrahlten Leistung aufgetragen.



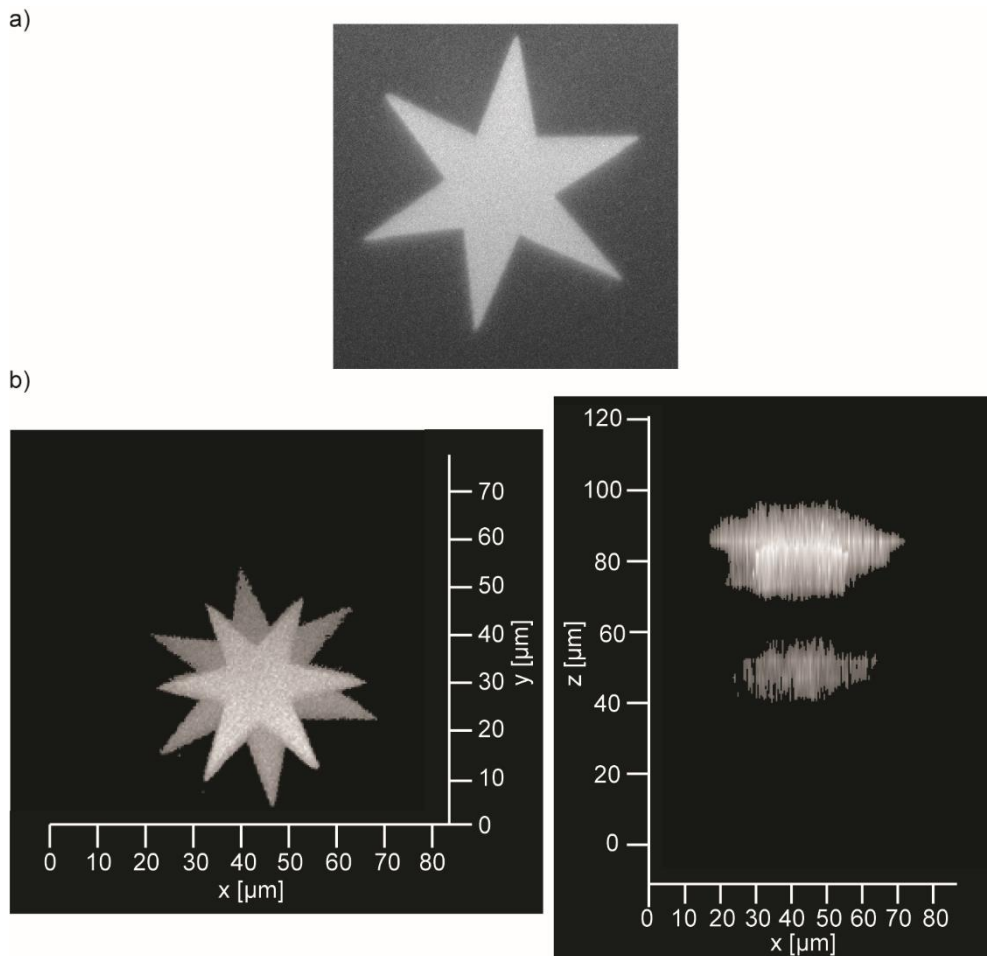
Der Fit von  $y = a + bx^c$  über die Werte aus Abbildung 60b lieferte für  $c$  den Wert  $2.1 \pm 0.1$ . Damit kann davon ausgegangen werden, dass die Photolyse quadratisch von der eingestrahnten Leistung abhängt und der visualisierte Effekt tatsächlich auf der Zweiphotonen-Anregung beruht.

Im Anschluss sollte nun die 3-dimensionale Auflösung der Zweiphotonen-Anregung genauer untersucht werden. Dafür wurde eine 3-dimensionale Figur im Hydrogel erzeugt. Die Visualisierung der 3-D-Figur erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mike Heilemann (Universität Frankfurt), welches die einzelnen Ebenen des Hydrogels abrastert und so z-Scan-Aufnahmen erzeugt. Zunächst allerdings sollte die Photolysebreite bestimmt werden. Die Frage war, wie weit strahlt die photolysierte Figur in die obere und untere Ebene und ab wann ist kein Photolyseeffekt mehr sichtbar. Es wurden 3 Quadrate übereinander im Abstand von  $30 \mu\text{m}$  im Hydrogel photolysiert. Da die Photolysebreite auch von der eingestrahnten Leistung des Laserlichts abhängt, wurde diese auf  $10 \text{ mW}$  festgelegt und für die weiteren Experimente beibehalten. Am Mikroskop wurde optisch überprüft, ob der Abstand der einzelnen Ebenen weit genug gewählt wurde, sodass die einzelnen photolysierten Ebenen unabhängig voneinander visualisiert werden können. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 61.** Konfokale Fluoreszenzaufnahmen eines DNA5-markierten Hydrogels, in das in verschiedene Ebenen mit einem Abstand von  $30 \mu\text{m}$  Rahmenquadrate photolysiert wurden ( $780 \text{ nm}$ ,  $10 \text{ mW}$ ). Links ist die unterste Ebene und rechts die oberste Ebene dargestellt.

Die Abbildungen zeigen, dass ein Abstand von  $30 \mu\text{m}$  zwischen den Photolyse-Ebenen ausreichend ist, um die einzelnen Ebenen unabhängig voneinander zu visualisieren. In keiner der abgebildeten Aufnahmen sind die jeweils benachbarten Ebenen sichtbar. Der nächste schlussfolgende Arbeitsschritt war die Darstellung einer 3-dimensionalen Figur. Im Laufe der Arbeit stellte sich allerdings heraus, dass Fluoreszenzaufnahmen an einem konfokalen LSM eine deutlich bessere Auflösung besitzen und eine deutlich geringere Hintergrundfluoreszenz aufweisen, als Aufnahmen an einem im Arbeitskreis Heckel vorhandenen Spinning-Disk-System. Daher wurden im Folgenden die 3-dimensional erzeugten Photolyse-Figuren an einem konfokalen LSM dargestellt. Es wurden zwei 6-zackige Sterne an gleicher Position, aber in unterschiedlichen Höhen, des Hydrogels photolysiert.

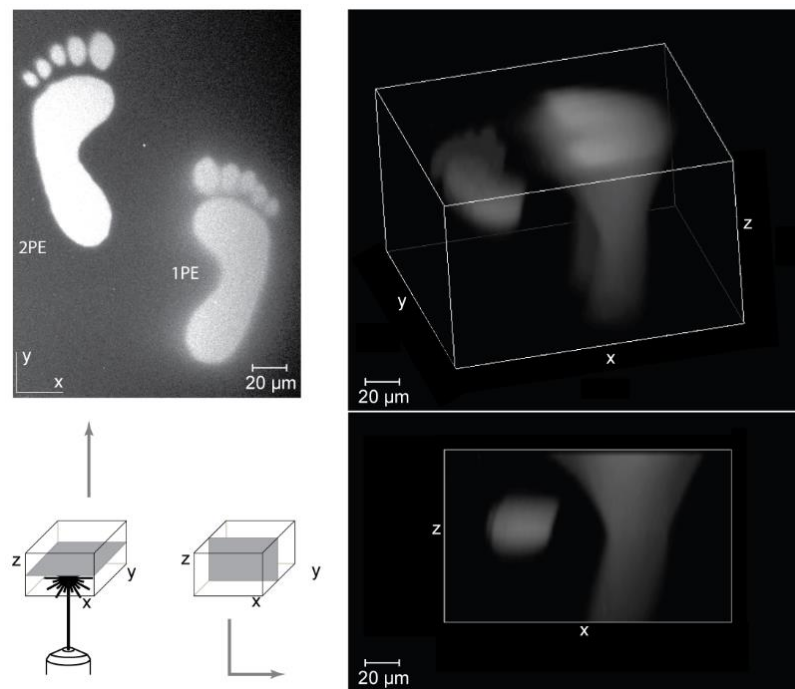


**Abbildung 62.** Fluoreszenzaufnahmen der photolysierten Sterne a) Weitfeld-Fluoreszenzaufnahme in 2-dimensionaler Ansicht b) 3-dimensionale Ansicht der photolysierten Sterne aufgenommen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Die Aufnahme der beiden Sterne zeigt die 3-dimensionale räumliche Ausdehnung des Photolyseeffekts. Wie zuvor in der 2-dimensionalen Ansicht der Quadrate schon angedeutet wurde, ist die erzeugte Fluoreszenz der Sterne räumlich voneinander getrennt. Leider zeigt die x-y-Projektion, dass die beiden Sterne nicht exakt übereinander photolysiert wurden, obwohl der Laser entsprechend im Hydrogel platziert wurde. Die ursprüngliche Idee war, in der x-y-Projektion einen 12-zackigen Stern, durch übereinander legen der beiden 6-zackigen Sterne, darzustellen. Vermutlich liegt die Ursache in einem nicht perfekt kalibrierten Laserstrahl, der in der Theorie rechtwinklig auf die entsprechende Photolyse-Ebene treffen soll. Abweichungen vom rechten Winkel führen zur Ablenkung des Laserstrahls und dazu, dass dieser nicht vertikal durch das Hydrogel hindurch geht. Starke Abweichungen führen zu Verzerrungen der photolysierten Figur innerhalb der Photolyse-Ebene, und sind schon in der 2-dimensionalen Darstellung sichtbar. Dies scheint hier allerdings nicht der Fall zu sein. Geringe Abweichungen können aber dazu führen, dass einzelnen Photolyse-Ebenen versetzt zueinander photolysiert werden. Dies scheint hier passiert zu sein. Schlussendlich ist dieser

Effekt aber nur ein Schönheitsfehler in der Darstellung und spiegelt die tatsächlichen, photolytischen Eigenschaften des untersuchten Systems wahrheitsgetreu wieder.

Abschließend sollte noch der Unterschied der 3-dimensionalen Auflösung der Einphotonen- und der Zweiphotonen-Photolyse gezeigt werden. Dazu wurden zwei Fußabdrücke photolysiert und das Photolyseprofil in z-Ebene am LSM aufgenommen. Eines der Fußabdrücke wurde mit Zweiphotonen-Anregung bei 780 nm (10 mW, 10 Scans) erzeugt, während der andere Fußabdruck mit Einphotonen-Belichtung (390 nm, 0.3  $\mu$ W, 5 Scans) generiert wurde. Die Leistung der Einphotonen-Belichtung wurde bewusst sehr niedrig gewählt, um sowohl eine Überbelichtung des Hydrogels zu vermeiden, als auch ein klar definierte Photolysefigur zu erhalten. Abbildung 63 zeigt eine direkte Gegenüberstellung der Ein- und Zweiphotonen-Photolyse. In der 2-dimensionalen Projektion (x-y-Aufnahme, links) sind die Präzisionsunterschiede der beiden Belichtungsarten schon leicht zu sehen: Das durch Einphotonen-Anregung erzeugte Bild (rechter Fußabdruck) zeigt etwas diffusere und unschärfere Konturen. Aber erst in der x-z-Projektion (rechts) werden die Unterschiede deutlich. Während der Laserstrahl der Zweiphotonen-Anregung lediglich im Fokus des Strahls photolysiert, kommt es bei der Einphotonen-Anregung innerhalb des kompletten zylinderförmigen Laserstrahlprofils zur Photolyse. Die Zweiphotonen-Photolyse besitzt daher ein wesentlich schmaleres Photolyseprofil ( $\approx 20 - 25 \mu\text{m}$  bei 10 mW) als die Einphotonen-Photolyse.



**Abbildung 63.** Zweiphotonen-Aktivierung eines DEACM-Linker-modifizierten Oligonukleotids (DNA5) im Hydrogel verglichen mit der Einphotonen-Aktivierung. Der linke Fußabdruck wurde mit Zweiphotonen-Anregung (780 nm) erzeugt, während der rechte Fußabdruck durch Einphotonen-Anregung (390 nm) entstand. Das linke Bild zeigt die 2-dimensionale Projektion in x-y-Richtung. Rechts sind die 3-dimensionale Aufnahme und die x-z-Projektion zu sehen. Aufgenommen und erstellt wurden die Bilder an einem konfokalen LSM.

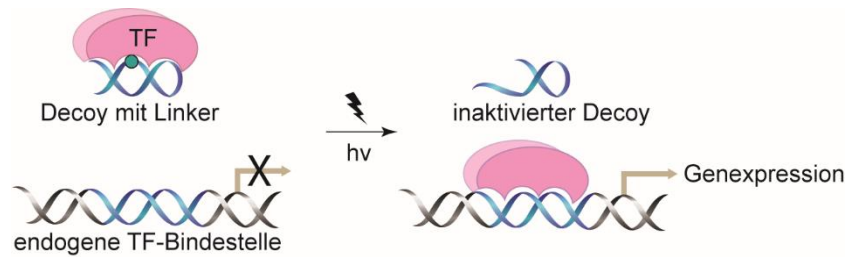
### 3.1.4 Lichtregulierte Genexpression mit Hilfe Linker-modifizierter Oligonukleotide

#### 3.1.4.1 Entwicklung einer DNA-Decoy-Strategie zur Regulation von NF $\kappa$ B-kontrollierter Genexpression mit Licht

In Zellkulturexperimenten sollte nun die biologische Anwendbarkeit des DEACM-Linkers gezeigt werden. Dazu wurde eine Transkriptionsfaktor-Decoy-Strategie entwickelt. DNA-Decoys (ODNs) werden verwendet, um virale oder zelluläre Transkription zu regulieren. Sie binden regulatorische Proteine (Transkriptionsfaktoren) und verhindern dadurch deren Bindung an die endogene DNA-Bindestelle. Dadurch, dass sie die Wechselwirkungen zwischen Protein und der Promotorregion eines Zielgens unterbinden, findet keine Transkription statt.<sup>222</sup> DNA-Decoys ahmen die kurze Konsensussequenz von Transkriptionsfaktoren nach. Befinden sie sich in der Zelle im Überschuss, so binden Transkriptionsfaktoren bevorzugt an diese, statt an die natürliche Bindestelle im Gen. Dementsprechend sind sie ein hervorragendes Werkzeug zur Manipulation der Genexpression in lebenden Organismen mit einem hohen therapeutischen Potential.

Diverse Anwendungsbeispiele zu DNA-Decoys wurden bereits in Kapitel 1.3.2 behandelt. Hervorzuheben sind noch einmal die Studien von Deiters *et al.*, bei denen erstmalig die photochemische Regulation der Genexpression durch DNA-Decoys gezeigt wurde<sup>78</sup>, und die von Struntz und Harki, bei denen die Affinität eines „Catch and release“-Decoys (CRDD) zum Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B mittels UV-Licht *in vitro* reguliert wurde.<sup>170</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die lichtgesteuerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch DEACM-Linker-modifizierte „Catch and release“-Decoys in Zellexperimenten untersucht. Die an einen zytoplasmatischen Inhibitor-Komplex gebundenen Transkriptionsfaktoren werden durch Zytokine freigesetzt und in den Zellkern transloziert, wo sie sofort durch den modifizierten Decoy blockiert werden. Durch Bestrahlung der Zellen wird im Decoy ein Strangbruch verursacht, sodass dessen Aktivität verloren geht. Der Transkriptionsfaktor wird freigesetzt und kann nun mit seiner endogenen Bindestelle wechselwirken und die Genexpression aktivieren. In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass der modifizierte CRDD die Fähigkeit besitzt an das Zielprotein zu binden und dieses erst nach Bestrahlung wieder freigibt. Damit sollte eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt Decoyaktivität *in vivo* durch Licht zu steuern (Abb. 64).



**Abbildung 64.** Photochemische Kontrolle der Aktivität von Transkriptionsfaktoren mit DEACM-Linker-modifizierten DNA-Decoys. Durch Stimulation transloziert der Transkriptionsfaktor in den Nukleus und bindet an den modifizierten CRDD statt an die natürlich Bindestelle. Es findet somit keine Transkription statt. Nach Bestrahlung mit Licht kommt es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors, welcher an die genomische Bindestelle bindet und Genexpression induziert.

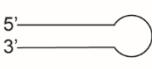
Ein häufig vorkommender Transkriptionsfaktor ist das NF- $\kappa$ B. Es ist sehr spezifisch und kontrolliert eine Vielzahl von Genen. Die Konsensussequenzen davon sind meist bekannt und zudem ist es für verschiedene Zellkulturanwendungen gut geeignet, da einige NF- $\kappa$ B-abhängige Reporter-gen-Plasmide dafür existieren. In dieser Arbeit wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde das NF- $\kappa$ B-regulierte Gen für GFP, welches über ein Plasmid in Zellen transfiziert wurde, mit modifizierten Decoys kontrolliert. Das GFP eignet sich besonders gut für Zellanwendungen, da die Stärke der Genexpression direkt mit einem Fluoreszenzsignal korreliert und die Auswertung so unkompliziert ist. In der zweiten Versuchsreihe sollte ein durch NF- $\kappa$ B-reguliertes, endogenes Gen (COX2) durch modifizierte Decoys reguliert werden. Offensichtlich konnte hier kein direkt entstehendes Fluoreszenzsignal zur Auswertung herangezogen werden. Für COX2 existieren jedoch einige etablierten, quantitativen Nachweismethoden, welche hauptsächlich auf der Verwendung von verschiedenen Antikörper beruhen. Beide Versuchsreihen wurden zeitlich parallel durchgeführt. Dabei profitierte die eine Versuchsreihe von den Ergebnissen der jeweils anderen.

#### 3.1.4.2 Design und Synthese Linker-modifizierter DNA-Decoys zur Regulation eines NF $\kappa$ B-kontrollierten Gens für GFP

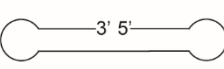
Alle designten Decoys dieser Studie müssen die Konsensussequenz für NF- $\kappa$ B enthalten. Meist handelt es sich dabei um Variationen folgender Sequenz: 5'- GGGRNNYYCC-3'<sup>223</sup> (R = Purinbase, Y = Pyrimidinbase, N = beliebiges Nukleotid). Das in dieser Studie verwendete GFP-Reporter-gen-Plasmid trägt folgendes NF- $\kappa$ B-Motiv: 5'- GGGACTTCC-3'. In Anlehnung an die Studien von Deiters *et al.* wurden die in Tabelle 5 dargestellten Sequenzen synthetisiert.

**Tabelle 5.** Die für diese Studie synthetisierten GFP-Decoys. Das NF- $\kappa$ B-Motiv ist eingefärbt. X bezeichnet den photospaltbaren DEACM-Linker

Hairpin-Decoy

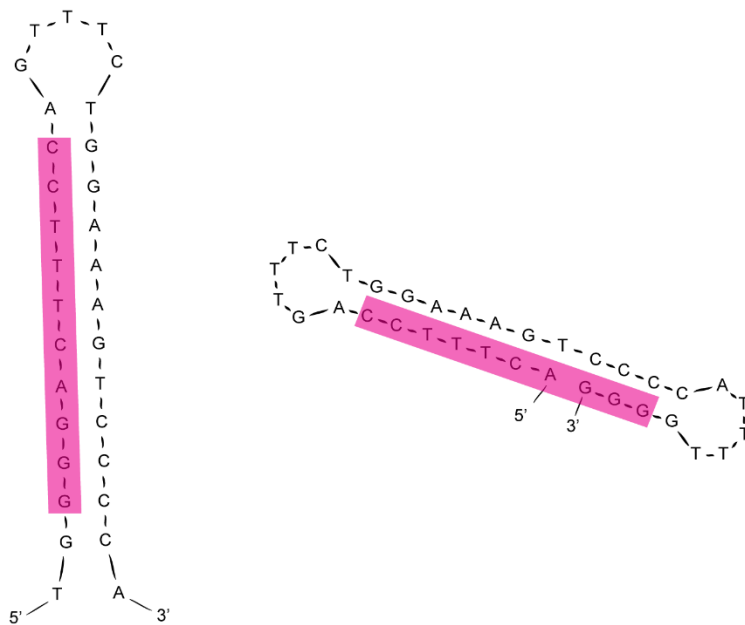


Dumbbell-Decoy



DNA	Sequenz	
DNA12	5'-TTG CCG TAC CTG ACT-3'	} Negativkontrolle
DNA13	5'-AGT CAG GTA CCG CAA-3'	
GFP-Decoy 1 (GD1)	5'-TGG <b>GGA CTT TCC</b> AGT TTC TGG AAA GTC CCC A-3'	Hairpin-Decoy Positivkontrolle
GFP-Decoy 2 (GD2)	5'-TGG <b>GGA CTT XCC</b> AGT TTC TGG AAA GTC CCC A-3'	Hairpin-Decoy modifiziert
GFP-Decoy 3 (GD3)	5'-TGG <b>GGA CTT TXC</b> AGT TTC TGG AAA GTC CCC A-3'	Hairpin-Decoy modifiziert
GFP-Decoy 4 (GD4)	5'-TGG <b>GGA CTT TXC</b> AGT TTC TGX AAA GTC CCC A-3'	Hairpin-Decoy modifiziert
GFP-Decoy 5 (GD5)	5'- <b>ACT TTC CAG</b> TTT CTG GAA AGT CCC CAT TTT <b>GGG G</b> -3'	Dumbbell-Decoy Positivkontrolle
GFP-Decoy 6 (GD6)	5'- <b>ACT TTX CAG</b> TTT CTG GAA AGT CCC CAT <b>TXT GGG G</b> -3'	Dumbbell-Decoy modifiziert

Neben den modifizierten Decoys (**GD2**, **GD3**, **GD4**, **GD6**) wurden unmodifizierte Decoys als Positivkontrolle (**GD1** und **GD5**) hergestellt. Ein linearer Decoy ohne NF- $\kappa$ B-Motiv diente als Negativkontrolle (Duplex aus **DNA12** und **DNA13**). Zum Einbau des DEACM-Linkers in die Decoys wurden, wie zuvor, Festphasensynthesen mit Ultramild®-Phosphoramiditen und –Bedingungen durchgeführt, welche mit guten Kupplungsausbeuten verliefen. **GD4** und **GD6** enthielten den Linker zweimal.



**Abbildung 65.** Strukturen der Hairpin- und Dumbbell-Decoys mit NF- $\kappa$ B-Erkennungssequenz

In dieser Studie wurde sich für eine Stamm-Schleife-Struktur (Hairpin-Decoys) und zirkuläre, hantelförmige Decoys (Dumbbell-Decoys) entschieden. Frühere Studien zeigten, dass diese, im Vergleich zu linearen Decoys, eine höhere Nuklease-Resistenz und eine verbesserte Aufnahme in

Zellen<sup>224</sup> aufwiesen. Die Positionen der DEACM-Linker wurden, unter Berücksichtigung der Photolyseprodukte, bestimmt. Diese mussten so positioniert werden, dass nach Photospaltung die Oligonukleotid-Fragmente dissoziieren. Fände keine Dissoziation statt, bestünde die Möglichkeit, dass trotz Strangbruch die bestehenden Duplexe als NF- $\kappa$ B-Motiv erkannt werden und weiterhin die natürliche Bindung des NF- $\kappa$ Bs verhindern. Zunächst sollten die Linker außerhalb der NF- $\kappa$ B-Erkennungssequenz positioniert werden, um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Proteinbindung nicht zu reduzieren. Die Konsensussequenz sollte demnach nach Photolyse komplett abgetrennt werden. Um sicher zu gehen, dass die entstehenden Fragmente wirklich dissoziieren, wurden die Schmelzpunkte dieser theoretisch vorhergesagt. Bei den meist ca. 12-13 Nukleotid-langen Fragmenten wurden Schmelzpunkte von  $\approx 40 - 44$  °C bestimmt. Allerdings ist bei *in vivo*-Experimenten für die entstehenden Fragmente eine Schmelztemperatur geringer als 37°C Voraussetzung. Dies konnte demnach so nicht erreicht werden. Die Gefahr, viel Material und Zeit in ein System zu investieren, welches von vornherein zum Scheitern verurteilt war, war in diesem Falle zu hoch. Die Linker wurden daher innerhalb der NF- $\kappa$ B-Sequenz positioniert. Dies hatte den Vorteil, dass nach erfolgter Photolyse keine intakte Erkennungssequenz vorliegt, welche erkannt werden könnte. Allerdings führt der Linker innerhalb der Erkennungssequenz zu einer lokalen Störung, welche dazu führen könnte, dass das Protein erst gar nicht daran bindet. Somit wäre der Decoy deaktiviert. Andererseits wurde der Linker gerade deswegen so entwickelt, um eine möglichst geringe lokale Störung innerhalb eines Duplex zu verursachen. Die Bindung des NF- $\kappa$ Bs an den Decoy ist daher schwer vorherzusagen und muss im Experiment überprüft werden. Meiner Ansicht nach, erschien dies aber die aussichtsreichere Methode, um Genexpression mit modifizierten DNA-Decoys zu regulieren. Die endgültigen Positionen der Linker wurden mit Hilfe theoretischer Schmelzpunktvorhersagen (Online-Tool OligoAnalyzer 3.1 von Integrated DNA Technologies) bestimmt. Da sich die Vorhersagen lediglich auf unmodifizierte Oligonukleotide beziehen, können die ermittelten Schmelzpunkte selbstverständlich nur als Richtwert angesehen werden. Um das Hybridisierungsverhalten und die Stabilität *in vivo* beurteilen zu können, wurden die Schmelzpunkte mittels UV-Absorptionsmessungen bestimmt. Modifizierte und unmodifizierte Decoys wurden verglichen, um den Einfluss des Linkers auf die Decoy-Stabilität zu ermitteln.

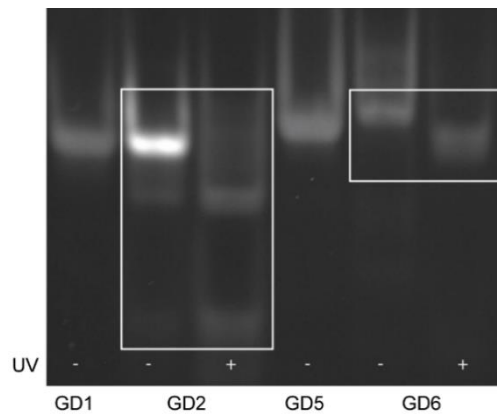
**Tabelle 6.** Gemessene Schmelzpunkte der synthetisierten GFP-Decoys

DNA	Beschreibung	T <sub>m</sub> [°C]
DNA12 +13	Negativkontrolle	63.2 ± 0.4
GD1	Hairpin unmodifiziert	73.4 ± 0.7
GD2	Hairpin modifiziert	69.2 ± 1.7
GD4	Hairpin 2-fach modifiziert	57 ± 1.3
GD5	Dumbbell-Decoy unmodifiziert	72.9 ± 0.2
GD6	Dumbbell-Decoy 2-fach modifiziert	70.6 ± 0.3

Der Schmelzpunkt des 1-fach modifizierten Hairpin-Decoys **GD2** befindet sich in der gleichen Größenordnung wie der des unmodifizierten Hairpin-Decoys **GD1**. Die Schmelzpunktniedrigung beträgt lediglich  $\Delta T_m = 4.2$  °C. Der Einfluss des eingeführten Linkers auf die thermische Stabilität des Decoys ist somit sehr gering. Das Einführen zweier Linker in die Dumbbell-Decoy-Sequenz (**GD6**) führt im Vergleich zur unmodifizierten Form **GD5** zu einer Schmelzpunktniedrigung von  $\Delta T_m = 2.3$  °C. Auch hier wird nur eine insignifikante Destabilisierung durch die Linker auf die DNA ausgeübt. Vergleicht man dies nun mit den Schmelzpunktniedrigungen der modifizierten Benchmarksequenzen (Kapitel 3.1.2), so fällt auf, dass bei kurzen 15mer Oligonukleotiden der destabilisierende Effekt deutlich größer ist ( $\Delta T_m \approx 15$  °C). Vermutlich wirken sich die größere Sequenzlänge und die intramolekularen Wechselwirkungen positiv auf die Stabilität der Decoys aus. Die Schmelzpunkte der belichteten Decoys **GD2** und **GD6** wurden ebenfalls vermessen. Innerhalb des messbaren Temperaturbereichs ( $\approx 20 - 90$  °C) konnte kein Schmelzverhalten der DNA beobachtet werden. Dies liegt vermutlich an den kurzen, licht-generierten, DNA-Strängen (Photoprodukte), deren Schmelzpunkte sehr niedrig sind. Grundsätzlich lassen die Messwerte aber die Aussage zu, dass die Schmelztemperaturen der belichteten Stränge wesentlich niedriger als 37 °C liegen und die Decoys damit prinzipiell für *in vivo*-Anwendungen geeignet sind.

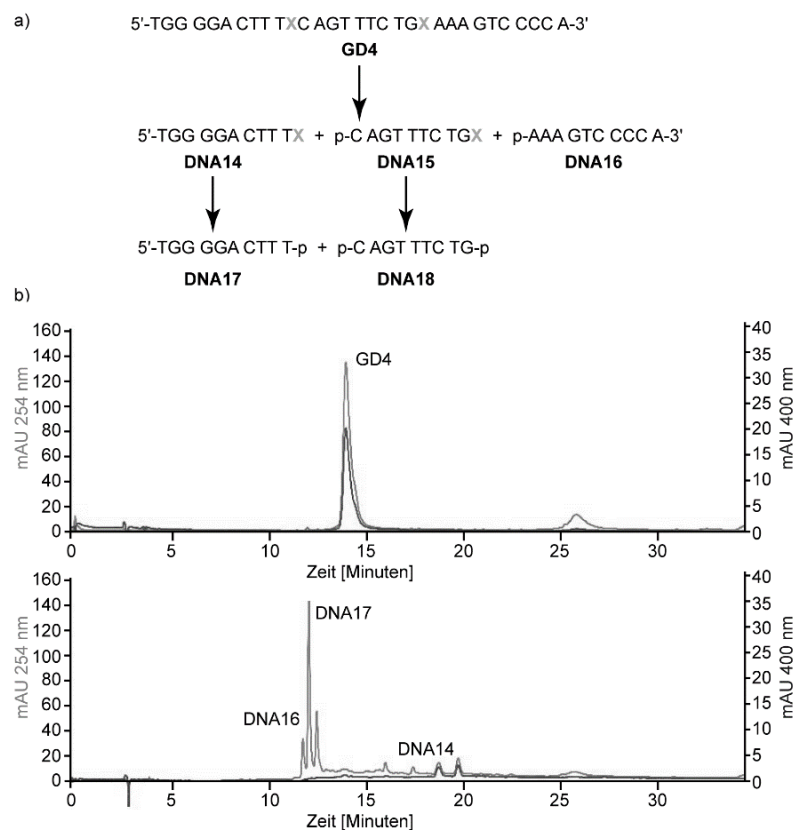
Um das Photolyseverhalten der Decoys einschätzen zu können wurde dieses auf einem nativen Polyacrylamid-Gel mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) verfolgt. Decoys **GD2** und **GD6** wurden belichtet (365 nm) und mit den entsprechenden unbelichteten Proben und den unmodifizierten Decoys verglichen. Beim Vergleich der belichteten und unbelichteten Proben (Abbildung 66, weiße Rechtecke), erkennt man, wie erwartet, eine Verschiebung der Banden nach unten hin. Tiefere Banden bedeuten kürzere Stränge. Daraus kann geschlossen werden, dass die Belichtung mit UV-Licht zu einem Strangbruch und Spaltung der Decoys führt. Auf eine genaue massenspektrometrische Analytik konnte hier verzichtet werden, da das Photolyseverhalten des Linkers bereits in Kapitel 1.3.2 aufgeklärt werden konnte.





**Abbildung 66.** Belichtete und unbelichtete Decoys verglichen auf einem nativen Polyacrylamid-Gel. Belichtet wurde mit 365 nm für 3 Minuten ( $500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ). Jede Ladetasche wurde mit 600 ng Decoy beladen.

Die Photolyse des zweifach Linker-modifizierten Hairpin-Decoys **GD4** wurde noch einmal exemplarisch mittels HPLC-Analytik untersucht. **GD4** wurde mit 365 nm belichtet (10 Minuten, 250 mW). Die Oligonukleotide wurden an der HPLC mit den Wellenlängen 254 nm und 400 nm detektiert. Auf Grundlage des in Kapitel 1.3.2 ermittelten Photolysemechanismus (Abbildung 49) wurden 5 Photolyseprodukte erwartet, welche in Abbildung 67a dargestellt sind. Abbildung 67b zeigt die gemessenen HPLC-Chromatogramme der belichteten und unbelichteten Probe.



**Abbildung 67.** Photolyse des zweifach modifizierten DNA-Decoys **GD4** a) Die bei Photolyse erwarteten Produkte b) HPLC-Chromatogramme des belichteten und unbelichteten Decoys

Das Chromatogramm der belichteten Probe zeigt im Vergleich zur unbelichteten Probe mehrere neue Signale. Das Signal des Startmaterials (Minute 14.8) ist komplett verschwunden. Drei Hauptsignale (Minuten 12.1 – 12.3) besitzen eine geringere Retentionszeit und zeigen kein entsprechendes Signal bei 400 nm. Daher kann man schließen, dass diese zu Strängen ohne Cumarin-Modifikation gehören. Bei höheren Retentionszeiten konnten zwei Hauptsignale mit „Cumarinsignal“ bei 400 nm detektiert werden. Dies entspricht der Vorhersage aus Abbildung 67a und dem ermittelten Photolyseverhalten aus Kapitel 1.3.2. Die einzelnen Fragmente wurden massenspektrometrisch untersucht. Aufgrund der geringen Probenmenge konnten allerdings nur einige Oligonukleotidfragmente nachgewiesen werden. Diese sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 7.** Massenspektrometrische Messwerte der Photolyseprodukte von **GD4**

Retentionszeit [Min.]	DNA	Sequenz	m/z berechnet	m/z gefunden
12.2	DNA16	p-AAA GTC CCC A-3'	2979.6	2979.8
12.1	DNA17	5'-TGG GGA CTT T-p	3072.5	3072.8
18.8	DNA14	5'-TGG GGA CTT TX	3411.6	3412.0

Die beiden übrigen Photolyseprodukte **DNA15** und **DNA18** konnten zwar keinem Signal zugeordnet werden, doch liegt die Vermutung nahe, dass sie zu den beiden übrigen Signalen im Chromatogramm gehören. **DNA15** trägt den Cumarin-Linker und kann daher vermutlich dem Signal bei Minute 19.9 zugeordnet werden. Dementsprechend wird das Signal bei Minute 12.3 durch **DNA18** hervorgerufen. Auf eine erneute Messung zur Bestimmung der restlichen Massen wurde verzichtet, da die Photolyse des Cumarin-Linkers bereits untersucht wurde und bekannt ist.

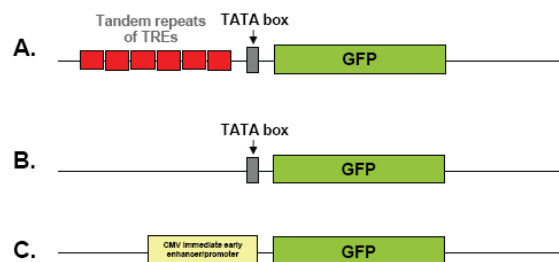
### 3.1.4.3 Zellkulturexperimente mit GFP-DNA-Decoys

Die hier verwendeten DNA-Stränge durchlaufen einen Reinigungsprozess, der üblicherweise mit der Aufreinigung über RP-HPLC beendet wird. Da sich aber dadurch für Zellen toxisches TEAA bzw. Triethylamin im Produkt befinden, wird vor dem Zellexperiment ein weiterer Reinigungsschritt, die Ethanol-fällung, notwendig. Einzelheiten dazu werden im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben.

Die photochemische Kontrolle der Decoy-Aktivität wurde in HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) durchgeführt. NF- $\kappa$ B induziert in menschlichen Zellen die Geneexpression eine Vielzahl verschiedener Gene. Für die Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivität wird die Analyse daher schwer überschaubar. Fluoreszenz eignet sich für die Beobachtung der gewünschten Effekte

allerdings besonders gut, sodass die Zellen entsprechend modifiziert wurden. Daher wurde ein NF- $\kappa$ B-induziertes GFP-Gen in Form eines Reportergens eingeführt.

Die Firma *Qiagen* bietet das sogenannte „Signal NF- $\kappa$ B Reporter Kit“ kommerziell an, welches die kontrollierte, NF- $\kappa$ B-induzierte Expression von Monster-GFP erlaubt. Es besteht aus 3 verschiedenen Plasmiden: Das Reporterplasmid kontrolliert die GFP-Expression über einen Minimalpromotor (TATA-Box) und mehrere Wiederholungen eines NF- $\kappa$ B-Transkriptions-Response Elements (TRE), über die die Signaltransduktionskette aktiviert wird. Eine Plasmidkarte wird vom Hersteller nicht zur Verfügung gestellt, aber die NF- $\kappa$ B-Konsensussequenz angegeben.



**Abbildung 68.** Schematische Darstellung der Reporter Gene des „Signal NF- $\kappa$ B Reporter Kits“. A) Der Signal Reporter exprimiert NF- $\kappa$ B-abhängig das Protein GFP über TREs. B) Die Negativkontrolle exprimiert GFP über einen Minimalpromotor. C) Die Positivkontrolle exprimiert GFP konstitutiv. Graphik entnommen aus dem „Signal Reporter-Assay“-Handbuch (Version Januar 2011) von Qiagen.

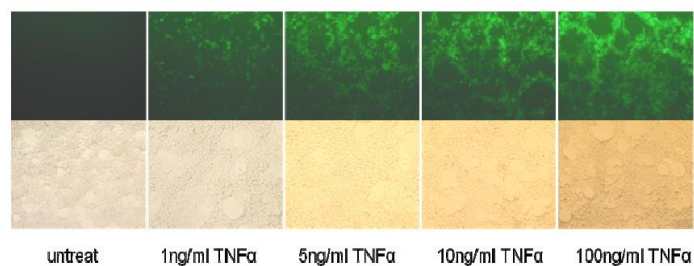
Zwei weitere Plasmide dienen als Positiv- beziehungsweise Negativkontrolle. Der „Signal Positiv Reporter“ (Positivkontrolle) exprimiert GFP konstitutiv über einen NF- $\kappa$ B-unabhängigen CMV-Promotor und dient als Transfektionskontrolle. Der „Signal Negativ Reporter“ (Negativkontrolle) beinhaltet ebenfalls die TATA-Box und bestimmt die Hintergrundaktivität des Reporters. Außerdem identifiziert es Signalweg-spezifische Effekte. Zytokine, welche eingesetzt werden um den NF- $\kappa$ B-Signalweg zu induzieren, dürfen innerhalb der Zelle keine Wechselwirkungen eingehen, welche die GFP-Expression beeinflussen. Um dies sicherzustellen, werden in allen Experimenten jeweils zwei Zellproben mit der Negativkontrolle transfiziert und eine davon mit Zytokinen behandelt. Die GFP-Expression der Zytokin-induzierten Probe darf sich nicht signifikant von der nicht-induzierten Zellprobe unterscheiden.

### Induzierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs und Transfektion/ Optimierung der Transfektionsbedingungen

Bevor die eigentlichen Decoy-Experimente durchgeführt wurden, mussten zunächst die Bedingungen der Reporter-gen-Transfektion bestimmt und die Induzierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch ein Zytokin optimiert werden.

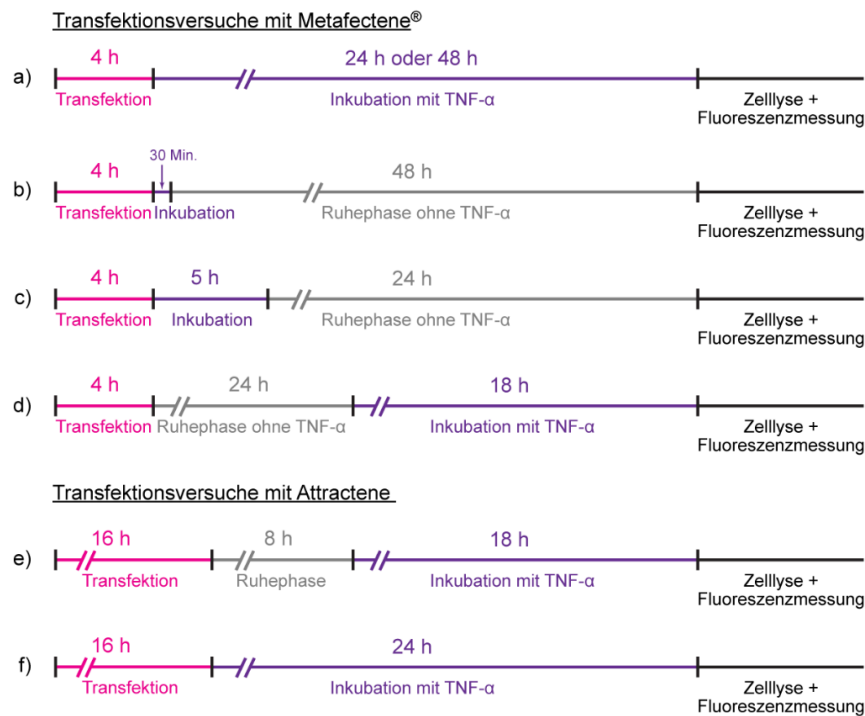
Für die Transfektion wurden zwei Transfektionsreagenzien getestet: Metafectene<sup>®</sup> (Biontex Laboratories) konnte im zweiten Projektteil dieser Arbeit (Kapitel 3.2) erfolgreich eingesetzt werden. Es ist ein auf Lipiden basierendes Transfektionsreagenz für Säugerzellen, das aus einem Gemisch von polykationischen und neutralen Lipiden besteht. Attractene (Qiagen) wird vom Hersteller für das NF- $\kappa$ B-Reporter-gen empfohlen und ist ein nicht-liposomal vorliegendes kationisches Lipid. Beide Transfektionsreagenzien bilden in Anwesenheit von DNA DNA-Lipid-Vesikel, welche mit der Zellmembran fusionieren und so in die Zellen eingeschleust werden. Metafectene<sup>®</sup> benötigt zur Bildung des DNA-Lipid-Komplexes ca. 15 – 30 Minuten und etwa 4 Stunden für die eigentliche Transfektion. Zu beachten war hierbei, dass die entstehenden Lipid-Komplexe sehr empfindlich sind und daher vorsichtig gehandhabt werden müssen (kein unnötiges Pipettieren, starke Bewegung vermeiden). Wie vom Hersteller empfohlen wurde für die folgenden Transfektionen für jeweils 1000 ng Oligonukleotid 4  $\mu$ l Metafectene verwendet. Bei Attractene geschieht die Bildung des Lipid-DNA-Komplexes innerhalb von 15 Minuten. Für die Transfektion muss es allerdings ca. 16 Stunden auf die Zellen einwirken. Für 1000 ng zu transfizierendes Oligonukleotid wurden jeweils 1.3  $\mu$ l verwendet.

Für die Induzierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in HeLa-Zellen hat sich in der Praxis TNF- $\alpha$  bewährt. In der Literatur wird angegeben, dass eine TNF- $\alpha$ -Konzentration von 10 ng/ml im Zellmedium ausreichend ist, um die Aktivierung auszulösen. Ab dieser Konzentration soll sich ein Sättigungsverhalten der NF- $\kappa$ B-induzierten Geneexpression einstellen.<sup>225</sup>



**Abbildung 69.** Darstellung der TNF- $\alpha$ -induzierten GFP-Expression in einer GFP-modifizierten Zelllinie. Zellen wurden für 18 Stunden mit TNF- $\alpha$  versetzt. Graphik entnommen aus dem „NF- $\kappa$ B/293/GFP-Luc<sup>™</sup> Transcriptional Reporter Cell Line“-Handbuch (Version 1-070206) von SBI System Biosciences.

Erste Transfektionsversuche wurden nach dem unten dargestellten Schema (Abbildung 70) mehrmals durchgeführt, um die optimalen Transfektionsbedingungen zu ermitteln. Die TNF- $\alpha$ -Konzentration variierte dabei von 10 – 40 ng/ml im Zellmedium. Das GFP-Reportergen, die Positiv- und die Negativkontrolle wurden transfiziert und entweder mit TNF- $\alpha$  induziert oder, zu Vergleichszwecken, nicht behandelt.

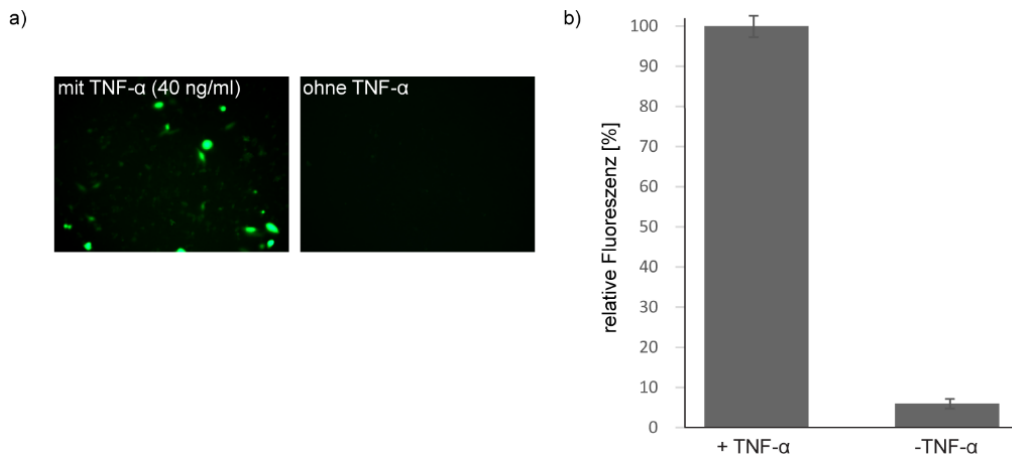


**Abbildung 70.** Schematische Darstellung der getesteten Transfektionsbedingungen in HeLa-Zellen

Verwendet wurden adherente HeLa-Zellen, bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Zell-Nr.: ACC57). Diese wurden kultiviert, passagiert (subkultiviert, umgangssprachlich: „gesplittet“) und in Suspension kryokonserviert, wodurch sie nahezu unbegrenzt unter Erhalt der Zellvitalität gelagert werden können. Für die Zellexperimente wurden die HeLa-Zellen in „Dulbecco’s modified Eagle’s Medium“ (DMEM) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen in einem Brutschrank kultiviert. DMEM wurde grundsätzlich mit 10% hitze-inaktiviertem, fetalem Rinderserumalbumin (BSA) supplementiert. Die verwendeten Zellkulturen wurden regelmäßig subkultiviert. Standardmäßig wurden 24 Stunden vor Transfektion die Zellen in 96-Mikrotiterplatten (im Weiteren als „well-Platten“ bezeichnet) passagiert ( $\approx 10^4$  Zellen in 200  $\mu$ l DMEM pro Nöpfchen (im Weiteren als „well“ bezeichnet)). Nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Lysat zur Bestimmung der GFP-Menge (Fluoreszenz) vermessen. Die spektralen Eigenschaften des hier exprimierten Monster-GFPs sind etwas rot-verschoben im Vergleich zu herkömmlichen GFP. Die Anregung erfolgte bei 475 nm und die Emission bei 515 nm.

Bei den ersten Zelltests konnte zunächst keine Aktivierung des NF- $\kappa$ Bs durch TNF- $\alpha$  erreicht werden. Aufgrund der transfizierten Positivkontrolle konnte aber von einer erfolgreichen Transfektion ausgegangen werden. Da TNF- $\alpha$  ein in der Handhabung empfindliches Enzym ist, wurde die durch TNF- $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung als mögliche Ursache in Betracht gezogen. Durch Recherche konnte in Erfahrung gebracht werden, dass TNF- $\alpha$  gerne an den Oberflächen von Reaktionsgefäßen adsorbiert. Sollte dies der Fall gewesen sein, so wurde eine wesentlich geringere, wohlmöglich nicht effektive, Konzentration zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung verwendet. Die tatsächlich zur Inkubation verwendete Konzentration konnte aufgrund der geringen Menge, mit welcher hier gearbeitet wurde, schlecht überprüft werden, da man beispielsweise unter die Detektionsgrenze der vorhandenen Spektralphotometer gelangte. Das Problem konnte behoben werden, indem für alle weiteren Experimente, der TNF- $\alpha$ -Lösung 0.1 % BSA zugesetzt wurde, um die unspezifische Adsorption zu verhindern. Es wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 ng/ $\mu$ l hergestellt, welche in kleinen Portionen bei -80 °C gelagert wurden. Dadurch konnten vermehrte Einfrier- und Auftauzyklen vermieden werden. Aufgrund der Empfindlichkeit des TNF- $\alpha$  wurde auf starkes Mischen und häufiges Pipettieren verzichtet.

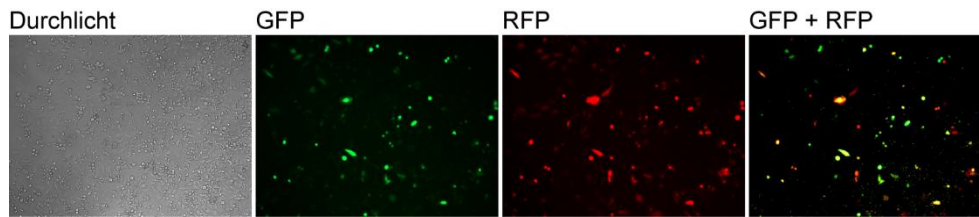
Reproduzierbare Ergebnisse lieferten die Transfektionsbedingungen von Variante d) und f) (Abbildung 70). Bei Variante d) erhielten die Zellen nach der Transfektion mit Metafectene eine 24-stündige „Erholungsphase“, da bei den vorherigen Varianten a) – c) lediglich eine geringe und unstete GFP-Expression induziert werden konnte. Dass die Transfektion prinzipiell nach 4-stündiger Inkubationszeit mit Metafectene funktionierte, konnte anhand der Positivkontrolle gezeigt werden. Die Vermutung war, dass die recht kurze Transfektionsdauer von 4 Stunden kaum ausreicht, um die zelluläre Transkriptionsmaschinerie zu starten. Hinzu kommt, dass sowohl Transfektion als auch Induzierung zellulären Stress bedeutet. Diese beiden, kurz hintereinander durchgeführten, Stressbedingungen könnten ebenfalls die Ursache der nicht funktionierenden NF- $\kappa$ B-Aktivierung sein. Die eingeführte Ruhephase zwischen Transfektion und Inkubation mit TNF- $\alpha$  führte zu positiven Ergebnissen. Variante f) zeigte ebenfalls den gewünschten Effekt mit reproduzierbaren Ergebnissen. Diese Transfektionsbedingungen wurden letztendlich für die abschließenden Decoy-Experimente in Zellen verwendet. Zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde eine TNF- $\alpha$ -Konzentration von 40 ng/ml im Zellmedium verwendet. Die folgende Abbildung 71 zeigt den Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die GFP-Expression von HeLa-Zellen transfiziert mit NF- $\kappa$ B-GFP-Reportergen mittels Attractene.



**Abbildung 71.** HeLa-Zellen wurden mit dem NF-κB-GFP-Reporter gen transfiziert und entweder mit 40 ng/ml TNF-α induziert oder nicht behandelt (ohne TNF-α). a) Fluoreszenzaufnahme der transfizierten HeLa-Zellen im Vergleich. b) Transfizierte Zellen wurden lysiert und die GFP-Fluoreszenz im Zellysate am Tecan Plate Reader vermessen. Die GFP-Fluoreszenz der TNF-α-induzierten Zellen wurde auf 100 % festgelegt.

Das verwendete Plasmid-Kit ist prinzipiell für die direkte Anwendung in Zellen verwendbar. Da aber die Transfektionseffizienz von Zelle zu Zelle bzw. Zellpassage schwanken kann, ist die Quantifizierung der NF-κB-Aktivität nicht eindeutig bestimmbar. Das Assay wurde um ein weiteres Plasmid (pCMV-DsRed-Express) erweitert, welches über einen CMV-Promotor ein rot fluoreszierendes Protein (RFP) konstitutiv exprimiert und mit dem GFP-Reporter gen kotransfiziert wird. Für die Auswertung der Experimente stehen somit zwei Fluoreszenzkanäle zu Verfügung: Die grüne Fluoreszenz des GFPs ist abhängig von der NF-κB-Aktivität und ist Gegenstand der Untersuchung. Die rote Fluoreszenz ist NF-κB-unabhängig und wird dauerhaft, d.h. auch gleichbleibend, exprimiert. Sie dient der Normierung der Werte und kann damit Schwankungen im Experiment, beispielsweise ausgelöst durch eine unstete Transfektionsrate oder Pipettier-Ungenauigkeiten, abfangen. Für die Ermittlung eines normalisierten Effekts, muss vorausgesetzt werden, dass die Kotransfektion der Plasmide immer mit einem gleichbleibenden Mengenverhältnis abläuft.

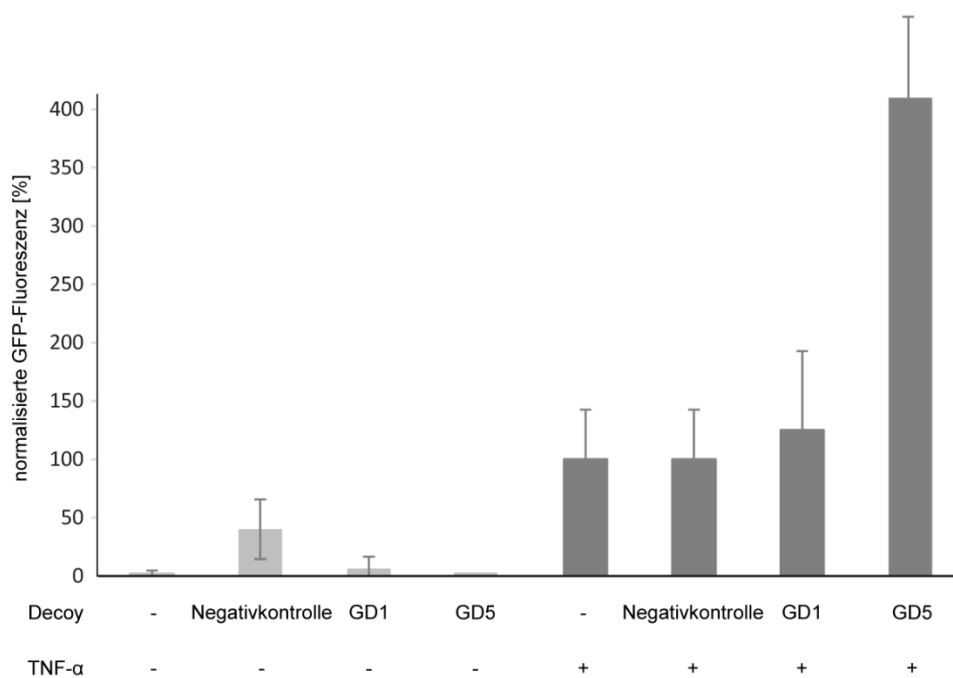
Nach den ermittelten Transfektionsbedingungen wurde zunächst eine Kotransfektion, der Einfachheit halber mit der GFP-Positivkontrolle, durchgeführt und dessen Erfolg fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Da die Transfektionseffizienz des RFP besser erschien als die des GFPs wurde das Verhältnis GFP/RFP auf 2:1 festgelegt. Dies entspricht 200 ng GFP-Plasmid und 100 ng RFP-Plasmid pro Zellexperiment und well einer 96-er well-Platte. Um das Verhältnis für jedes well konstant zu halten, wurde eine Plasmid-Stammlösung verwendet.



**Abbildung 72.** Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen kotransfiziert mit GFP- und RFP-Plasmid. Transfiziert wurden 200 ng GFP-Plasmid (Positivkontrolle) und 100 ng RFP-Plasmid. Fluoreszenzaufnahmen erstellt 24 h nach Transfektion.

### Transfektionen der Decoys in HeLa-Zellen

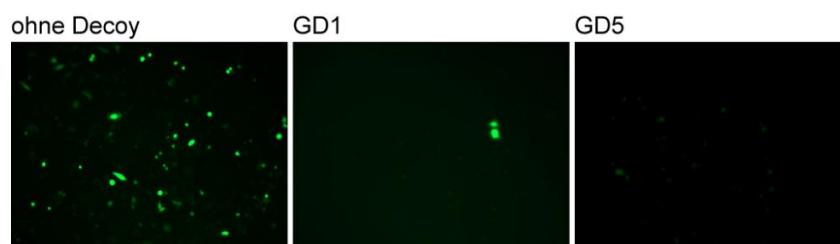
Im Anschluss an die Optimierung der Transfektions- und Aktivierungs-Bedingungen wurden erstmalig Zellexperimente durchgeführt. Testweise wurden zunächst die unmodifizierten Decoys **GD1** und **GD5** verwendet, da von ihnen ohne Zweifel ein NF- $\kappa$ B-regulierender Einfluss ausgeht. Die im vorigen Abschnitt optimierten Bedingungen wurden zur Kotransfektion verwendet. Für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurden 40 ng/ml TNF- $\alpha$  verwendet. Pro Zelltest (well) wurden 200 ng DNA-Decoy eingesetzt.



**Abbildung 73.** Normalisierte GFP-Fluoreszenz von HeLa-Zellen. Zellen wurden kotransfiziert mit NF- $\kappa$ B-abhängigen GFP-Reporter gen (200 ng) und DsRed-Express (100 ng). Mit DNA Decoys **GD1** und **GD5** (jeweils 200 ng) sollte die NF- $\kappa$ B-Aktivität und folglich die GFP-Expression reguliert werden. Messwerte wurden normalisiert über das exprimierte RFP.

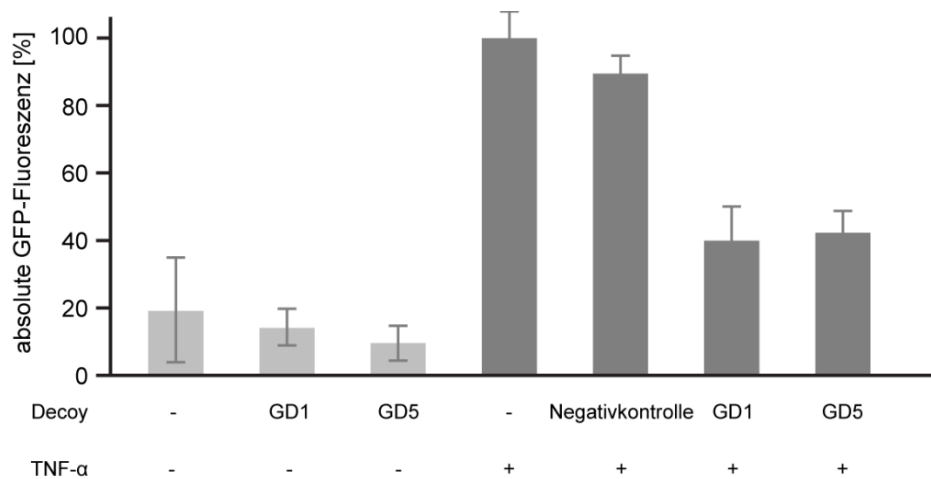


Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz des GFPs wurden GFP-Reporter-gen-transfizierte Zellen ohne TNF- $\alpha$ -Induzierung verwendet. Die ermittelten Werte dienten der Festlegung des Nullpunktes der Transfektion. Der Maximalwert der Fluoreszenz (100 %) wurde durch GFP-Reporter-gen-transfizierte Zellen mit TNF- $\alpha$ -Induzierung festgelegt. Der Expressions-Nullpunkt des RFPs wurde über untransfizierte Zellen bestimmt. Für die Normierung wurde die gemessenen Werte der GFP-Fluoreszenz ins Verhältnis zur RFP-Fluoreszenz gesetzt. Alle berechneten Verhältnisse wurden wiederum mit dem GFP-RFP-Verhältnis des Maximalwertes der GFP-Fluoreszenz gesetzt, um die normalisierte GFP-Fluoreszenz in % zu erhalten. Das Experiment wurde als Triplikat durchgeführt. Die Experimente aus Abbildung 73 lieferten nicht die erwarteten Ergebnisse. Zwar zeigten die TNF- $\alpha$  unbehandelten Zellen keine starke Fluoreszenz (hellgraue Balken), jedoch stieg die Fluoreszenz sehr stark an, sobald die NF- $\kappa$ B-Aktivität induziert wurde (dunkelgraue Balken). Wiederholungen des Experimentes lieferten allerdings auch keine besseren Ergebnisse. Da aber davon ausgegangen werden konnte, dass die unmodifizierten Decoys die GFP-Expression unterdrücken, musste hier von einem experimentellen Fehler ausgegangen werden. Auffallend waren die starken Schwankungen innerhalb der normalisierten Messwerte und auch die großen Fehlerbalken. Seltsam erschien auch, dass Decoy-transfizierte Zellen eine vielfach stärkere Fluoreszenz aufwiesen, als Zellen, die lediglich mit dem GFP-Reporter-gen transfiziert wurden. Diese sollten eigentlich die maximale Fluoreszenzkraft angeben. Dass es sich bei diesem Problem nicht um einen systematischen Fehler des Assay handelte, sondern die Ursache wohl eher bei der mathematischen Normalisierung mittels der RFP-Werte lag, konnte anhand von Fluoreszenzaufnahmen gezeigt werden (Abbildung 74). Diese zeigten, eine stark reduzierte GFP-Fluoreszenz bei Anwesenheit der Decoys in Zelle und widersprachen damit den normalisierten Werten aus Abbildung 73. Demnach konnten den Werten des Experimentes nicht vertraut werden.



**Abbildung 74.** Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen kotransfiziert mit GFP-Reporter-gen, RFP-Plasmid und Decoys **GD1** oder **GD5**. HeLa-Zellen wurden mit 40 ng/ml TNF- $\alpha$  für 24 h inkubiert. Danach erfolgte die Fluoreszenzaufnahme am Mikroskop. Obwohl die mathematische Auswertung andere Daten lieferte, konnte mit Hilfe der Aufnahmen gezeigt werden, dass die Decoys die GFP-Expression inhibieren.

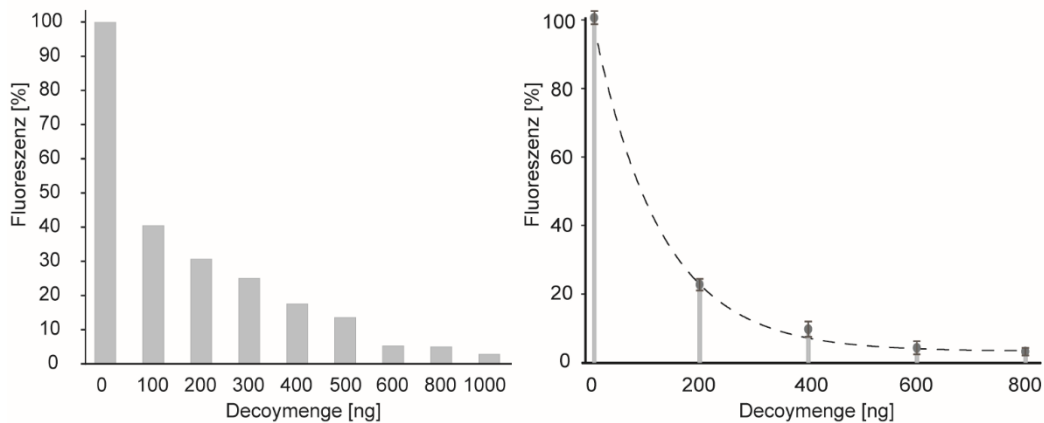
Bei erneuter Betrachtung der Rohdaten viel auf, dass lediglich die Werte der RFP-Fluoreszenz starken Schwankungen ausgesetzt waren. Die Werte der GFP-Fluoreszenz waren stabil und zeigten, je nach Transfektion, das erwartete Verhalten. Tatsächlich zeigte sich bei erneuter Berechnung der Daten ohne RFP-Normalisierung, dass der gewünschte Effekt, die Inhibierung der GFP-Expression durch die Decoys, eintrat. Die Vermutung liegt nahe, dass die Decoys einen unvorhergesehen Effekt auf das RFP-Plasmid ausüben. Auch wenn die NF- $\kappa$ B-Erkennungssequenz im RFP-Plasmid nicht vorkommt, so kann es zu unspezifischen Bindungen kommen, die die RFP-Expression beeinflussen.



**Abbildung 75.** Absolute GFP-Fluoreszenzen ohne RFP-Normalisierung in HeLa-Zellen, kotransfiziert mit NF- $\kappa$ B-abhängigen GFP-Reportergen (200 ng), DsRed-Express (100 ng) und 200 ng Decoy **GD1** oder **GD5**. Die Fluoreszenz von Zellen, transfiziert ohne Decoy, wurde auf 100 % gesetzt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Transfektion von einem zusätzlichen RFP-codierenden Plasmid verworfen. Das Assay wurde für die folgenden Experimente ausschließlich mit den Reportergenen des Signal NF- $\kappa$ B Reporter Kits verwendet. Um eine repräsentative und quantitative Aussage über die NF- $\kappa$ B-Aktivität treffen zu können, wurden die Experimente teilweise statt in Triplikaten, in 5-facher Ausfertigung, durchgeführt.

Die Experimente aus Abbildung 75 wurden zunächst willkürlich mit einer Decoymenge von 200 ng durchgeführt. Damit konnte gezeigt werden, dass eine prinzipielle Inhibierung der GFP-Expression erreicht werden konnte und der Assay, nach den ermittelten Bedingungen, nutzbare und rekonstruierbare Messwerte lieferte. Im folgenden Experiment wurde eine Transfektionsmengentest durchgeführt. Die Menge der Decoys, welche in den nachfolgenden Assays standardmäßig verwendet werden sollte, wurde optimiert. Vor allem im Hinblick darauf nicht unnötig Material zu verbrauchen, sollte ein maximaler Inhibierungseffekt erreicht werden. Die Zellen wurden mit 100 ng GFP-Reportergen und einer ansteigenden Menge DNA-Decoy **GD1** transfiziert.

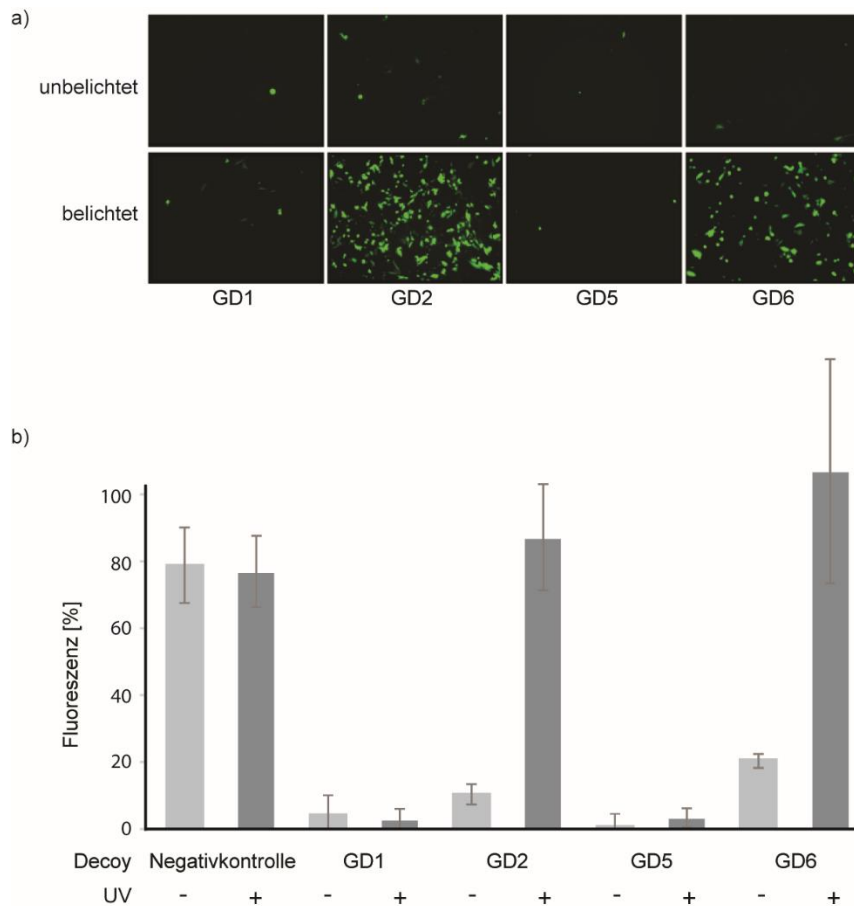


**Abbildung 76.** Optimierung der Transfektionsbedingungen: HeLa-Zellen wurden mit 100 ng NF- $\kappa$ B-GFP-Reporter gen und einer ansteigenden Decoy-Menge **GD1** transfiziert. Links ist die erste Testreihe dargestellt, welche zur groben Orientierung der Decoy-Menge dienen sollte. Daher wurde diese als Einzelmessung durchgeführt. Rechts sind die Ergebnisse des zweiten Mengentest, welches als Triplikat durchgeführt wurde.

Bereits bei 600 ng Decoymenge erreicht die Fluoreszenz-Inhibierung einen nahezu maximalen Effekt (4.4 % im Vergleich zur Maximalfluoreszenz bei 0 ng Decoy), welcher durch eine höhere Decoymenge nur minimalst verbessert werden kann. Bei 800 ng wurden noch 3.3 %, und bei 1000 ng noch 2.8 % (Einzelmessung) Restfluoreszenz bestimmt. Um den Verbrauch der Decoys nicht unnötig hoch zu halten, wurde in den weiteren Assays jeweils 600 ng Decoymenge verwendet.

Da nun alle Transfektionsbedingungen bestimmt wurden, konnte erstmalig das Assay mit modifizierten Decoys durchgeführt werden. Alle hier synthetisierten modifizierten Decoys **GD2** – **GD4** und **GD6** wurden transfiziert. Die unmodifizierten Decoys **GD1** und **GD5** wurden ebenfalls transfiziert, um die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-gesteuerten Genexpression zu kontrollieren und die basale Transkriptionsrate zu bestimmen. Das Experiment wurde in doppelter Ausführung durchgeführt: Eine Hälfte der Zellen wurde belichtet (365 nm, 5 Minuten,  $9 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ), die Andere wurde unbelichtet weiter verarbeitet. Auch die unmodifizierten Decoys wurden belichtet, um unspezifische Effekte auszuschließen. Nach Belichtung wurde TNF- $\alpha$  zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung in das Zellkulturmedium gegeben (40 ng/ml). Nach 24 Stunden wurde zunächst die entstandene GFP-Fluoreszenz am Mikroskop aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zur quantitativen Bestimmung der Fluoreszenz lysiert. Positive Ergebnisse lieferten die modifizierten Decoys **GD2** und **GD6** (Abbildung 77). Das Experiment wurde mehrmals wiederholt und dabei konnte festgestellt werden, dass für die erfolgreiche Expressions-Inhibierung die Reinheit der Decoys von absoluter Wichtigkeit ist. Nach längerer Lagerung der Decoys, war die Funktionalität dieser meist eingeschränkt, vermutlich ausgelöst durch spontane Photolyse. Erst durch erneute RP-HPLC-Reinigung und Ethanol-Fällung konnte der maximale Effekt der NF- $\kappa$ B-Inhibierung erreicht werden.

**GD3** und **GD4** führten in unbelichteten Zustand zu keiner Inhibierung der GFP-Expression. Die Ursache liegt vermutlich an der Linker-Position im Decoy-Strang, welche durch die geringe lokale Strukturstörung die Bindung zum NF- $\kappa$ B verhindert. In Abbildung 77 sind die Ergebnisse des abschließenden Experiments dargestellt. Gezeigt werden lediglich die modifizierten Decoys, welche erfolgreich die GFP-Expression unterbinden konnten und nach Belichtung den gewünschten Fluoreszenzanstieg durch Aktivierung der Genexpression auslösten.



**Abbildung 77.** Photochemische Kontrolle der NF- $\kappa$ B-induzierten GFP-Expression: HeLa-Zellen wurden mit NF- $\kappa$ B-GFP-Reportergen und un-/modifizierten Decoys mittels Attractene transfiziert. Nach 16 Stunden Transfektion wurde das Zellmedium durch DMEM ausgetauscht. Zellen wurden belichtet (365 nm, 5 Min., 9  $\mu$ W/cm<sup>2</sup>) oder unbelichtet gelassen. Anschließend wurden sie mit 40 ng/ml TNF- $\alpha$  versetzt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden a) Fluoreszenzaufnahmen der Zellen aufgenommen und anschließend b) das Zelllysate zur quantitativen Bestimmung der GFP-Fluoreszenz verwendet (Fluoreszenzwert der Transfektion ohne Decoy wurde auf 100 % gesetzt)

Nicht nur die unmodifizierten Decoys **GD1** und **GD5**, sondern auch die Linker-modifizierten Decoys **GD2** und **GD6** zeigten einen starken Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-abhängige GFP-Expression. Der Linker-modifizierte Dumbbell-Decoy **GD6** reduzierte die Reportergen-Aktivität um 80 % verglichen mit den Zellen transfiziert ohne Decoy (Abbildung 77 b)). Der modifizierte Hairpin-Decoy **GD2** ermöglicht eine

Reduktion der Genexpression um 91% und ist damit, im Rahmen der Fehlertoleranz, vom entsprechenden unmodifizierten Hairpin-Decoy **GD1** (96% Reduktion der Gen-Aktivität) kaum zu unterscheiden. Wir können davon ausgehen, dass die modifizierten Decoys das NF- $\kappa$ B-Protein, trotz enthaltenen Linker, *in vivo* gebunden haben. Nach Belichtung und Strangbruch im Oligonukleotid zeigten beide modifizierten Decoys eine stark reduzierte Decoy-Aktivität. Belichtete Decoy-transfizierte Zellen zeigten eine stark reduzierte GFP-Expression von mehr als 88%, verglichen mit Zellen transfiziert ohne Decoys. Beide Decoy **GD2** und **GD6** besitzen daher ein effizientes Aus/An-Verhalten.

Die Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 77 a)) der transfizierten belichteten bzw. unbelichteten Zellen visualisieren und bestätigen diese Ergebnisse. Zellen transfiziert mit unmodifizierten oder modifizierten Decoys zeigten zunächst kaum GFP-Expression. Zellen transfiziert mit modifizierten Decoys zeigten jedoch nach Belichtung (365 nm, 5 Minuten, 9  $\mu$ W/cm<sup>2</sup>) eine stark gesteigerte Fluoreszenz.

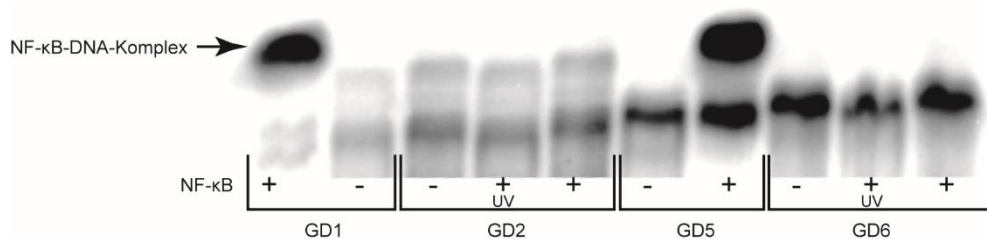
#### 3.1.4.4. *In vitro*-Bindung der GFP-Decoys und NF- $\kappa$ B

Die Experimente in Zellkultur lassen vermuten, dass die modifizierten Decoys das NF- $\kappa$ B-Protein binden und nach Belichtung freisetzen. Einen eindeutigen Beweis stellen die Experimente jedoch noch nicht dar. Aufgrund der Komplexität biologischer Zellvorgänge, müssen unspezifische und unvorhersehbare Vorgänge ausgeschlossen werden. Dazu wurden *in vitro*-Bindungsstudien durchgeführt. Um die Bindung des NF- $\kappa$ B-Protein an die unbelichteten Decoys und deren Freisetzung nach Photolyse zu zeigen, wurde die Affinitätselektrophorese (Electrophoretic Mobility Shift Assay; EMSA) gewählt.

Bei einem EMSA-Experiment werden im Allgemeinen DNA-Fragmente, beispielsweise regulatorische Bereiche eines Gens, mit Proteinen inkubiert. Diese Mischung wird dann auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Bei einem Protein-DNA-Komplex tritt im Vergleich zur reinen DNA-Bande eine Verschiebung der Laufweite, abhängig von der Größe, Konformation und Ladung des Komplex, („band shift“) auf. Protein-DNA-Komplexe wandern langsamer über das Gel als ungebundene DNA.<sup>226</sup>

Zur Vorbereitung des EMSA-Experiments wurden HeLa-Zellen zur Freisetzung des NF- $\kappa$ B mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Das nukleare Extrakt der Zellen, in welchem sich NF- $\kappa$ B befindet, wurde isoliert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Die korrekte Struktur der NF- $\kappa$ B-Decoys wurden durch Erhitzen auf 90 °C für 2 Minuten und langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur sichergestellt. Anschließend wurden die Decoys mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP und T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende radioaktiv

markiert („ $^{32}\text{P}$ -Labeling“). Modifizierte Decoys wurden entweder belichtet oder im Dunklen aufbewahrt. Das nukleare Extrakt und die DNA-Decoys wurden für 30 Minuten inkubiert und anschließend deren Bindung auf einem nativen Polyacrylamid-Gel dargestellt. Das Gel wurde mit Whatman-Papier auf einem Vakuum-Geltrockner getrocknet und mit einer „Phosphoimager“-Platte in einer Kassette exponiert. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie von der Phosphoimager-Platte.

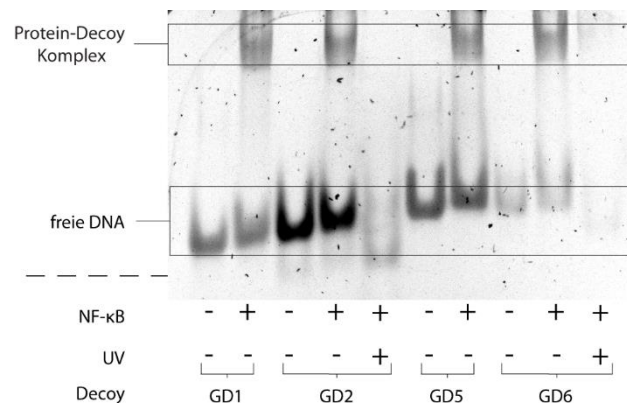


**Abbildung 78.** Bindung der Decoys an NF- $\kappa$ B-Protein in vitro. Nukleares Extrakt wurde aus TNF- $\alpha$ -stimulierten HeLa-Zellen isoliert und mit radioaktiv-markierten Decoys (200 ng pro Gelbande) inkubiert. Proben wurden auf einem 16%-igen nativen Polyacrylamid-Gel analysiert. Die Detektion erfolgte über Radioaktivität

Mit der radioaktiven EMSA-Methode konnten lediglich die Bindungen des NF- $\kappa$ Bs an die unmodifizierten Decoys **GD1** und **GD5** eindeutig gezeigt werden. Linker-modifizierte Decoys, egal ob belichtet oder unbelichtet, zeigten ein seltsames Verhalten. Auch bei mehreren Wiederholungen des Experimentes konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Meist zeigten die modifizierten Decoys nach der Radioaktiv-Markierung eine Leiter-Struktur auf dem Gel, welche sich nicht erklärt werden konnte. Sowohl die Kinasierung als auch die NF- $\kappa$ B-Bindungsreaktion erforderten die Zugabe einiger Reagenzien, wie DTT, Poly-dIdC und BSA (eine genaue Beschreibung dazu befindet sich im experimentellen Teil). Wohlmöglich erwies sich der DEACM-Linker gegenüber einer diesen Reaktionsbedingungen oder Reagenzien als nicht stabil. Einen Fehler in der Handhabung konnte ausgeschlossen werden, da unmodifizierte Decoys problemlos markiert werden konnten und das erwartete Verhalten im EMSA-Experiment zeigten.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde sich die Fluoreszenz des Cumarin-Linkers zunutze gemacht. Das Experiment wurde „unmarkiert“ auf einem Polyacrylamid-Gel wiederholt. Gelbanden der fluoreszierende Decoys, an NF- $\kappa$ B gebunden und ungebunden, konnten direkt auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden. Um die Banden der unmodifizierte Decoys und der nicht-fluoreszierende Photoprodukte sichtbar zu machen, wurde das Polyacrylamid-Gel mit SYBR Gold, einem fluoreszierende DNA-Färbemittel, behandelt und ebenfalls unter einem UV-Transilluminator betrachtet. Was die Detektion betrifft, besitzt Fluoreszenz bei EMSA-Experimenten zwar eine

wesentlich geringere Empfindlichkeit als Radioaktivität, dennoch konnten damit brauchbare Gelbilder erzeugt werden.



**Abbildung 79.** Bindung der Decoys an NF-κB-Protein in vitro. Nukleares Extrakt wurde aus TNF-α-stimulierten HeLa-Zellen isoliert und mit Decoys (200 ng pro Gelbande) inkubiert. Proben wurden auf einem 16 %-igen nativen Polyacrylamid-Gel analysiert. Die Detektion erfolgte über Fluoreszenz.

Das fluoreszenzbasierte EMSA-Experiment konnte die Bindung der unmodifizierten, als auch der Linker-modifizierten DNA-Decoys, an NF-κB zeigen. Bei belichteten Proben der modifizierten Decoys konnten keine Proteinbindung beobachtet werden. Mit diesem Experiment konnte demnach gezeigt werden, dass die in Zellkultur beobachteten Effekte tatsächlich auf einer Decoy-NF-κB-Wechselwirkung beruhen.

### 3.1.4.5 DNA-Decoys zur Regulation eines NFκB-kontrollierten endogenen Gens für COX2

Neben den Versuchen zur Regulation der NF-κB-abhängigen GFP-Expression mittel Decoys, wurden auch Versuche zur Regulation eines endogenen NF-κB-vermittelten Gens durchgeführt. Die Versuchsreihe wurde nicht abgeschlossen, da bereits in einem frühen Stadium der Voruntersuchungen zeitgleich der GFP-Assay zu erfolgreichen Ergebnissen führte. Dennoch soll hier kurz auf das Konzept, die Erkenntnisse und Probleme eingegangen werden.

Als NF-κB-stimuliertes, endogenes Gen wurde die Cyclooxygenase-2 (COX2, auch Prostaglandinsynthase-2 PGHS-2) gewählt. Es ist ein Enzym, das ebenso wie die Cyclooxygenase-1 (COX1), Arachidonsäure zu Prostaglandin H<sub>2</sub> oxidiert und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Prostaglandinsynthese. Prostaglandine wirken als Gewebshormone und werden, je nach ihrer Wirkung, in 3 verschiedene Typen eingeteilt. Serie-1-Prostaglandine haben eine stark entzündungshemmende Wirkung und verringern die Blutgerinnung. Prostaglandine der Serie 2

bewirken das Gegenteil und verursachen Entzündungen und Verstärken die Blutgerinnung und die Schmerzwahrnehmung. Verletzungen und Entzündungsprozesse induzieren durch Zytokine die Transkription des COX2, welches wiederum Serie-2-Prostaglandine produziert, welche die entsprechenden Maßnahmen in Körper auslösen. Serie-3-Prostaglandine verringern die Synthese der Serie-2-Prostaglandine. Daher wird ihnen häufig eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben.<sup>227,228</sup>

Da die Prostaglandine der Serie 2 für Schmerz und Entzündungen verantwortlich sind, beschäftigt sich die Pharmaforschung mit Medikamenten, die hauptsächlich in die Signalkaskade und Entstehung dieser Prostaglandine eingreifen (z.B. Acetylsalicylsäure ASS). Medikamente, welche die Prostaglandin-Serie 2 hemmen, hemmen allerdings auch immer deren natürliche Antagonisten, die Prostaglandine der Serie 1 und 3. NF- $\kappa$ B-Decoys, welche auf die Inhibierung der COX-2-Expression gerichtet sind, bieten die Möglichkeit, die Entstehung der Serie-2-Prostaglandine am Anfang der Signalkaskade zu hemmen, wodurch eine gegensätzliche Wirkung auf andere Prostaglandine unterbunden wird.<sup>229,230</sup>

### Design der COX2-Decoys

Zunächst musste die NF- $\kappa$ B-Bindestelle des COX2-Genes ermittelt werden. Tazawa *et al.* charakterisierten die Nukleotidsequenz der menschlichen COX2-Promotorregion und lokalisierte potentielle Response Elemente.<sup>231</sup>

```

GCCCCAGTCTGTCCCGACGTGACTTCTCCGACCCCTCTAAAGACCTACAGACCAGACACGG -464
CCGCGGGCGGGGAGAGGGGATTCCCCTGGCCGCCCGGACCTCAGGGCCGCACAGATTCT -404
      NF- $\kappa$ B
GGAGATGAAACCAAGTGTCTTCTGCCCCTCCCGGTATCCCATCCAAGGGGATCAGTCC -344
      PEA-3
ACAACTGGCTCTCGGAAGCACTCGGGCAAAGACTGCGAAGAAGAAAAGACATCTGGCGGA -284
AACCTGTGCGCCTCGGGCCGTGGAACTCGGGGAGGAGGGAGGGATCAGACAGGAGAGT -224
      Sp-1
GGGCACTACCCCTCTGCTCCCAAATGGGGCAGCTTCTGCGGTTCGGATTTCTCATT -164
      NF- $\kappa$ B
TCCGTGGGTAAAAAACCCCTGCCTCCACCGGCTTACGGCAATTTTTTAAGGGGAGAGGAGG -104
      AP-2      C/EBP NF-IL6
GAAAAATTTGTGGGGGTACGAAAAGGGCGAAGAAACAGTCACTTCCTCCATGGGCTT -44
      CRE
GGTTTTTCAGTCTTATGAAAGGAAGGTCTCTCGGTTAGCGACCAATGTCTATACGACTT +17
      TATA box
GCAGTGAGCGTCAGGAGCACGTCCAGGAACCTCTCAGCAGCGCCTCCITCAGCTCCACAG +77

```

Abbildung 80. Nukleotidsequenz der COX2-Promotorregion mit Response-Elementen. Graphik aus Tazawa *et al.*<sup>231</sup>

Zwei verschiedene NF- $\kappa$ B-Erkennungssequenzen sind dargestellt. Rafati *et al.* verwendeten in ihrer Studie mit COX2-Decoys die Konsensussequenz 5'- GGGATTCCC-3' und bezeichneten sie als die NF- $\kappa$ B-Bindestelle für das p65/p50-Heterodimer.<sup>232</sup> Auf Grundlage dessen wurden 4 verschiedene



Sequenzen designt (Tabelle 8), welche zunächst in unmodifizierter Form in Zellexperimenten überprüft werden sollten.

**Tabelle 8.** Die für diese Studie designten COX2-Decoys. Das NF- $\kappa$ B-Motiv ist eingefärbt. DNA-Stränge wurden HPLC-rein bei Biomers.net GmbH bestellt. Doppelstränge wurden aus den entsprechenden komplementären Einzelsträngen über „Annealing“ hybridisiert

DNA	Sequenz	
DNA18	5'-ATC ATA GTA TCT GCA-3'	Negativkontrolle
DNA19	5'-TGC AGA TAC TAT GAT-3'	
DNA20	5'-AAG GGG ATT CCC TTA-3'	CD1/ Decoy kurz
DNA21	5'-TAA GGG ATT CCC CTT-3'	
DNA22	5'-GGC AAG GGG ATT CCC TTA GT-3'	CD2/ Decoy lang
DNA23	5'-ACT AAG GGA ATC CCC TTG CC-3'	
CD3	5'-AGG GGA TTC CCT TAT TTT AAG GGA ATC CCC T-3'	Hairpin-Decoy
CD4	5'-ATT CCC TTA TTT TAA GGG AAT CCC CTT TTA GGG G-3'	Dumbbell-Decoy

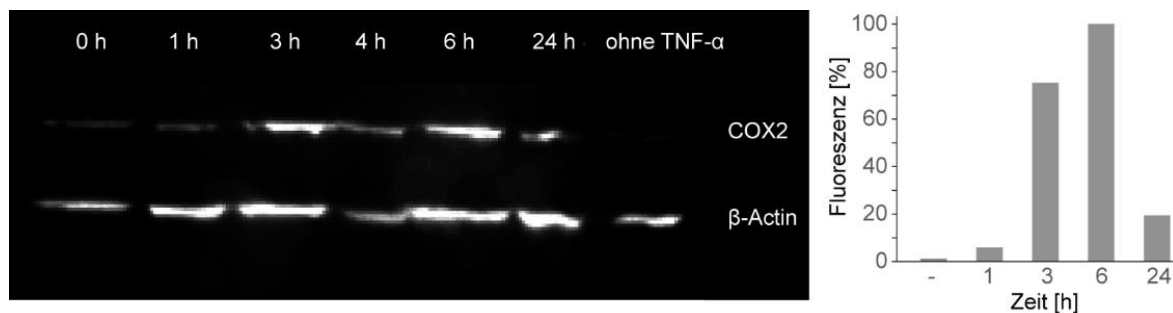
Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit der DEACM-Linker schon vollständig charakterisiert wurde, sollten zunächst die unmodifizierten Decoys in Zellkultur getestet werden. Auch die Handhabung bei den, für mich neuen, proteinbiochemischen Methoden sollte erst erlernt und etabliert werden, bevor modifizierte Linker hergestellt werden.

### Zellexperimente mit COX2-Decoys/ COX2-Assay

Das Vorgehen bei dieser Testreihe ist ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen GFP-Decoys. Zunächst werden die Zellen transfiziert und anschließend lysiert. Im Zelllysate sollte sich, abhängig von der NF- $\kappa$ B-Aktivität, COX2-Protein befinden. Aber anders als das vorher beschriebene GFP, besitzt COX2 keine Eigenfluoreszenz. Zur Detektion müssen daher spezielle biochemische Methoden angewendet werden. Der „Western Blot“ ist eine Technik zur Identifizierung eines Proteins aus einem Proteingemisch. Dabei werden die Proteine anhand ihres Molekulargewichts gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Zielprotein, in diesem Fall COX2, wird anschließend mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert.

Zur Bestimmung der Bedingungen der maximale COX-2-Expression wurden in der ersten Testreihe zunächst untransfizierte HeLa-Zellen für unterschiedlich lange Zeit (0 bis 24 h) mit TNF- $\alpha$  (40 ng/ml), bzw. zur Kontrolle auch ohne TNF- $\alpha$ , inkubiert. 0 Stunden Inkubation bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Zelllyse direkt im Anschluss der TNF- $\alpha$ -Zugabe durchgeführt wurde und ist damit von der Messung ohne TNF- $\alpha$  zu unterscheiden. Nach Zelllyse und Western Blot wurden für die Immundetektion COX2-Antikörper (COX2 Antibody Mouse IgG1) als Primär-Antikörper und AntiMaus IgG (AntiMouse IgG secondary antibody) als Sekundär-Antikörper verwendet. Die

Detektion erfolgte mittels einer HRP-Detektionslösung.  $\beta$ -Actin diene als Ladekontrolle. Zur Auswertung des Gels wurde die Software LabImage 1D von Kapelan Bio-Imaging verwendet.

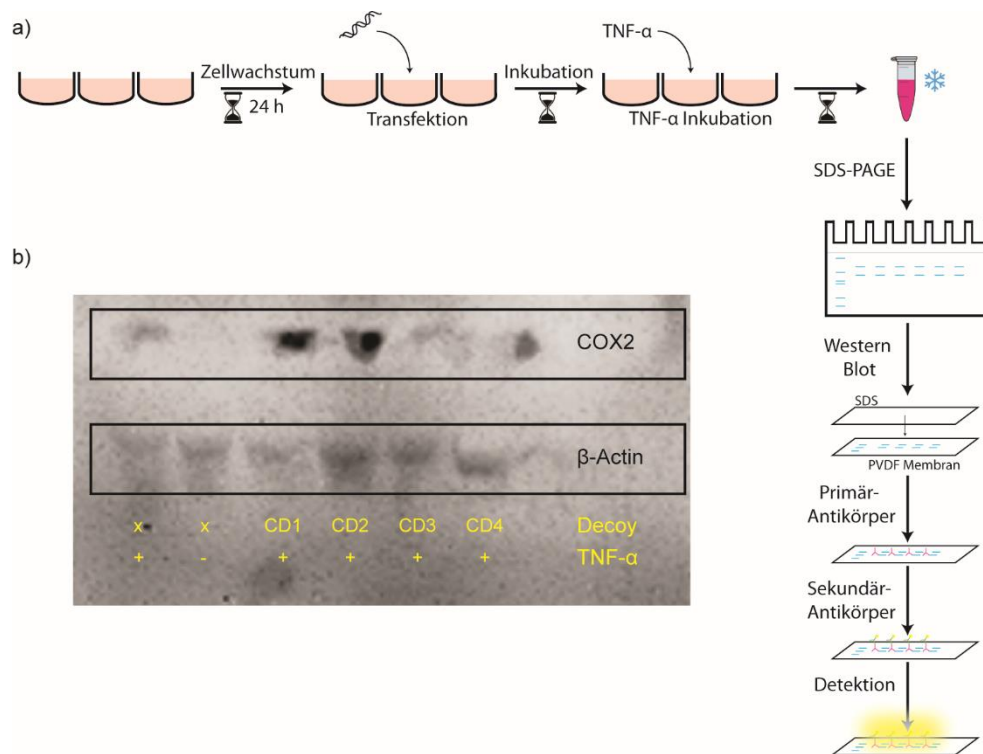


**Abbildung 81.** Zeitliche Testreihe zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der COX2-Detektion. Zur Auswertung wurde das Programm LabImage 1D verwendet. Die Intensität der COX2-Signale wurde auf die Intensität der  $\beta$ -Actin-Signale normalisiert. Die 6 Stunden-Messung zeigte dem maximalen Wert und wurde auf 100 % gesetzt.

Innerhalb der ersten 6 Stunden nach Inkubation konnte ein stetiger Anstieg der COX-2-Expression ermittelt werden. Nach 24 Stunden Inkubationszeit sank bereits wieder die Menge des vorhandenen COX2 im Zelllysate (19,4 % des Maximalwertes nach 6 Stunden). Zellen ohne TNF- $\alpha$ -Inkubation zeigten tatsächlich keine COX2-Entwicklung. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Experimenten eine TNF- $\alpha$ -Inkubationszeit von 6 Stunden eingehalten.

Nach folgendem Prinzip wurden die Experimente mit den unmodifizierten COX2-Decoys durchgeführt (Abbildung 82): HeLa-Zellen wurden mit COX2-Decoys transfiziert. Anschließend wurde mittels TNF- $\alpha$  die NF- $\kappa$ B-Freisetzung induziert. Zur Kontrolle des Experimentes wurden ebenfalls untransfizierte Zellen mit TNF- $\alpha$  aktiviert. Nach 6-stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert. Das nukleare Extrakt wurde denaturiert, um tertiäre und quartäre Strukturen der Proteine zu zerstören. Das Proteingemisch wurde anschließend über eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Beim eigentlichen „Blotten“ wurden die Proteine nun auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen. Dabei werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes im gleichen Muster wie auf dem Gel transferiert. Auf der Transfermembran erfolgte nun die Immundetektion. Die Inkubation mit dem primären COX2-Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Danach fand die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper statt. In Kombination mit einem ECL-Detektionskit katalysiert die HRP eine Chemilumineszenzreaktion, welche mit kamerabasierten Methoden sichtbar gemacht werden kann. Als Positivkontrolle wurde kommerziell erhältliches COX2-Lysat verwendet. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin gewählt, ein Protein mit einem hohen und ubiquitären Expressionslevel, welches unabhängig von den experimentellen Bedingungen gleichbleibend exprimiert wird. Ladekontrollen werden verwendet um Expressionslevel zu normalisieren und eine

gleichmäßige Verteilung der Proteinmenge sicherzustellen. Für die  $\beta$ -Actin-Kontrolle wurde ein entsprechender Primär-Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem gleichen Sekundär-Antikörper, wie für die COX-2-Detektion. Mit Hilfe einer Proteinleiter konnten  $\beta$ -Actin (43 kD) und COX2 (70 kD) auf dem Gel unterschieden werden.



**Abbildung 82.** Schematische Darstellung der Handlungsabläufe im COX2-Assay (a)) und Ergebnisse des COX2-Assays mit unmodifizierten Decoys **CD1 – CD4**

Abbildung 82 b) zeigt die Ergebnisse der Decoys-Transfektion. Obwohl die Graphik von einer minderen Qualität ist, lassen sich einige Aussagen treffen. Die ersten beiden Banden enthielten das Zelllysate von unmodifizierten Zellen. In einer Probe wurde die NF- $\kappa$ B-Freisetzung induziert, die andere Probe blieb unbehandelt. Die Probe der unbehandelten Zellen sollte keine COX2-Expression zeigen, die andere Probe hingegen schon. Die Funktionsfähigkeit des Assays wurde so sichergestellt. Die folgenden vier Banden enthielten Zelllysate von Zellen transfiziert mit den Decoys **CD1** bis **CD4**. In den Banden **CD1** und **CD2** konnte, entgegen des gewünschten Verhaltens, eine nach Augenmaß hohe COX2-Proteinmenge nachgewiesen werden. Die Banden **CD3** und **CD4** zeigten eine wesentlich geringere COX2-Expression. Wie stark diese ist, lässt sich aufgrund der schlechten Bildqualität schlecht einschätzen. Trotzdem kann eine bessere Funktionsfähigkeit der beiden Decoys im Vergleich zu **CD1** und **CD2** angenommen werden. Weshalb **CD1/CD2** ein schlechteres Ergebnis liefern, kann an dieser Stelle nur vermutet werden. Es ist bekannt, dass Decoys mit Haarnadel- oder Hantelstruktur (**CD3/CD4**) bei Transfektionen eine wesentlich bessere Zellaufnahme besitzen als

lineare Decoy. Sollten die linearen Decoys **CD1** und **CD2** unter den bisherigen Transfektionsbedingungen kaum von der Zelle aufgenommen worden sein, so resultiere dies in einer hohen COX2-Expression. Eine genaue Analyse dazu fand im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr statt. Wie bereits erwähnt, fanden die Experimente der GFP-Decoys zeitlich parallel statt und führten bereits zu positiven Ergebnissen. Der COX2-Assay wurde daher nicht mehr weiter verfolgt. Es kam daher auch nicht zur Synthese Linker-modifizierter COX2-Decoys. Nichtsdestotrotz bedeutet dies nicht, dass Linker-modifizierte Decoys nicht zur Regulation der NF- $\kappa$ B-stimulierten COX2-Expression geeignet sind. Auf Grundlage der Tests mit unmodifizierten Decoys scheint eine Regulation prinzipiell möglich und die Durchführung des hier beschriebenen COX2-Assays, evtl. mit einigen Optimierungen, als zielführend. Im GFP-Assay konnte gezeigt werden, dass der DEACM-Linker innerhalb einer Oligonukleotidsequenz eine solch geringe lokale Störung verursacht, dass die Bindung von Proteinen an die DNA prinzipiell möglich ist. Diese Erkenntnisse ließen sich zunutze machen für die Synthese von Linker-modifizierten Decoys und es erscheint nicht ausgeschlossen, dass diese Testreihe damit erfolgreich abgeschlossen werden könnte.

### 3.1.5 Zusammenfassung und Ausblick

Ein Zweiphotonen-photospaltbarer Linker auf Basis der Cumarin-Struktur, welcher Strangbrüche in Oligonukleotiden verursacht, konnte erfolgreich entwickelt werden. Die Photolyse des Linkers wurde mittels Einphotonen- und Zweiphotonen-Anregung demonstriert. Der Photolysemechanismus und die Photolyseprodukte konnten bei der Einphotonen-Photolyse mit Hilfe der HPLC-Analytik und der Massenspektrometrie aufgeklärt werden. Darüber hinaus wurde der Linker vollständig photochemisch charakterisiert. Anhand einer standardisierten Sequenz, der Benchmark-Sequenz, wurde der destabilisierende Einfluss des Linkers mittels Schmelzpunktstudien bestimmt. Mit Hilfe der Ferrioxalat-Aktinometrie und der HPLC-Technik wurde die Quantenausbeute bestimmt. Diese ist nicht besonders hoch, doch wird die Effizienz der Entschützung über das Produkt aus Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient bestimmt. Die Berechnung dieses Parameters ergab eine akzeptable Effizienz. Die Zweiphotonen-Photolyse wurde in einem fluoreszenzbasierten Verdrängungsassay gezeigt. Die Visualisierung erfolgte in einem Hydrogel, welches mit einem Zweiphotonen-Laserstrahl bestrahlt wurde. Die Abhängigkeit der Photolyse von der eingestrahlten Laserleistung sowie die 3-dimensionale räumliche Auflösung des Effekts konnte so ebenfalls nachgewiesen werden. Die Zweiphotonen-Fähigkeit, in Verbindung mit der leichten Einführbarkeit in Oligonukleotide, ermöglicht eine Vielzahl an Anwendungen in der chemischen und biochemischen Forschung. Im Gegensatz zu den bisher kommerziell erhältlichen photospaltbaren Linkern eignet sich

dieser neue Linker besonders für Untersuchungen in biologischem Gewebe. Die generelle Anwendbarkeit und Verträglichkeit des Linkers in lebenden Systemen, wurde anhand modifizierter „Catch-and-Release“-Decoys (CRDDs) demonstriert. Dabei binden modifizierte CRDDs an den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und inhibieren damit die NF- $\kappa$ B-stimulierte Genexpression. Die DNA-Decoy-Bindung wird photochemisch gelöst und die Transkription damit aktiviert. Dadurch gelang es, die Genexpression mit einem Aus/An-Verhalten mittels Licht zu regulieren. Dabei wurden Zellen mit NF- $\kappa$ B-regulierten GFP-Plasmiden transfiziert und entsprechend modifizierte GFP-Decoys, mit der NF- $\kappa$ B-Erkennungssequenz, synthetisiert. Abhängig von der Linker-Position im Decoy, zeigten diese einen vergleichbar starken Inhibierungseffekt auf die GFP-Expression, wie die sequenzgleichen, unmodifizierten Decoys. Der nach Photolyse starke Anstieg der GFP-Expression konnte auf den Strangbruch im Decoy zurückgeführt werden. Mit Hilfe einer *in vitro*-Analysetechnik, dem EMSA, wurde bestätigt, dass der in Zellkultur beobachtete Effekt tatsächlich auf der DNA-Protein-Wechselwirkung von Decoy und NF- $\kappa$ B, beruht.

Diese Studie zeigte erstmalig die Untersuchung photosensitiver DNA-Decoys in lebenden Organismen. Die in diesem Experiment reaktionsbestimmende Photolyse wurde dabei lediglich mit der Einphotonen-Anregung verursacht. Da der Cumarin-Linker eine gute Zweiphotonen-Aktivierbarkeit zeigt, ist eine entsprechendes Zweiphotonen-Experiment in der Zelle die nächstmögliche Schlussfolgerung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Versuche dazu unternommen, allerdings konnten leider keine positiven Resultate erzielt werden. Dies war allerdings hauptsächlich der Tatsache geschuldet, dass der Zugang zu zellkulturgeeigneten Laseraufbauten nicht bestand. Die Zweiphotonen-Technik wurde bereits vielfach in der Zelle angewendet und in der Literatur behandelt. Daher sollte ein DEACM-Linker-basiertes Zweiphotonen-Experiment in biologischem Milieu in einer zellkulturgeeigneten Umgebung durchaus realisierbar sein. Im Zusammenhang mit photoregulierten Zellmechanismen ist die Photolyse auf Einzelzell-Ebene eine besondere Anwendung der Zweiphotonen-Technik.

## 3.2 Lichtregulierte RNA-Interferenz mit photospaltbaren RNA-Bausteinen

### 3.2.1 Motivation

Ein mächtiges Werkzeug für die posttranskriptionelle Genabschaltung ist die RNA-Interferenz. Dabei handelt es sich um einen konservierten Antwortmechanismus auf doppelsträngige RNA, welcher eine Resistenz (im Sinne von Abwehr) gegen endogene und exogene Nukleinsäuren vermittelt, indem es eine Ziel-mRNA inaktiviert und damit die Genexpression inhibiert. Der Prozess der Genabschaltung wird durch kurze doppelsträngige RNA, auch bezeichnet als „small interfering RNA“ (siRNA), ausgelöst. Diese hat ihren Ursprung in viraler, doppelsträngiger Vorläufer-RNA, welche mittels der Endonuklease Dicer in 21-25 kurze Duplexe prozessiert wird. Die reife siRNA besitzt 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden. Im RISC-Komplex wird doppelsträngige siRNA in einzelsträngige RNA entwunden, welche im Anschluss mit komplementärer Ziel-mRNA hybridisiert. Diese mRNA wird vom RNase H-Enzym Argonaut geschnitten, was wiederum in der Genabschaltung resultiert. Dabei handelt es sich um einen katalytischen Prozess, bei dem eine einzelne siRNA die Spaltung von vielen mRNA-Kopien induziert. Ein ausführlicher Mechanismus wurde in Kapitel 1.4 beschrieben.

Eine der entscheidenden Prozesse der RNAi ist die Prozessierung der langen dsRNA in siRNA. Für gezielte Anwendungen kann alternativ reife, synthetische siRNA direkt in die Zelle eingebracht werden. Dadurch können siRNAs dahingehend gestaltet werden, dass sie spezifische Gene ansprechen und stilllegen. In der Regel tritt die Genabschaltung kurz nach Eintritt der siRNA in die Zelle ein. Um die genregulatorischen Prozesse zu verstehen, ist eine zeitliche und räumliche Kontrolle der Geneexpression von Vorteil. Viele Anwendungen sind denkbar, wenn ein präziser Start- oder Endpunkt der Genabschaltung definiert wird oder wenn die RNAi mit hoher räumlicher Auflösung reguliert werden kann. In Hinblick auf kontrollierbare Genexpression besitzen photolabile Schutzgruppen ein hohes Potential um siRNA-Funktion auf Oligonukleotid-Ebene zu untersuchen. Photolabile Schutzgruppen wurden bereits eingesetzt, um siRNAs zeitweise zu inaktivieren. Beispiele dazu wurden ebenfalls in Kapitel 1.4 beschrieben.

Wie bereits erwähnt, gelang Dr. Vera Mikat aus dem Arbeitskreis Heckel in der Vergangenheit die Inaktivierung der siRNA, indem im Bereich der mRNA-Spaltung mit photolabilen Schutzgruppen eine lokale Deformierung der RNA-Duplexstruktur verursacht wurde. Die volle Reaktivierung der siRNA-Funktion konnte dann mit Lichtbestrahlung erreicht werden. Die siRNA-Funktion zeigte demnach ein Aus/An-Verhalten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die vorangegangene Studie zu vervollständigen, indem ein Prinzip entwickelt wird, mit welchem die siRNA-Funktion mittels Licht „ausgeschaltet“ werden kann. Zur Realisierung des Vorhabens sollten Strangbrüche erzeugt werden, die die Struktur der siRNA nach

Belichtung zerstören. Die Schwierigkeit darin bestand, eine photospaltbare Modifikation zu verwenden, welche die Struktur der aktiven siRNA nicht verändert und die Bildung des RISC-Komplexes nicht verhindert. Modifizierte siRNAs werden durch den RISC-Mechanismus selten toleriert und es kommt häufig zu starken Störungen bei der Interaktion mit RISC.<sup>233</sup> Bei der RNA-Interferenz kommt es zu einer räumlich definierten Wechselwirkung zwischen RNA-Duplex und Protein-Komplex, bei der die spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen der Nucleobasen, aber auch des Zucker-Phosphat-Rückgrats, unverzichtbar sind. Der Einsatz von nicht-nucleosidischen Linkern, wie beispielsweise im ersten Projektteil entwickelt, ist daher für solch eine Anwendung nicht sehr vielversprechend, da es an der Linkerposition immer zu einer nicht stattfindenden Basenpaarung mit dem komplementären Gegenstrang kommt. Dussy *et al.* entwickelten einen photospaltbaren, nucleosidischen Baustein, welcher bei Einsatz in Oligonucleotiden dessen Nucleinsäurestruktur beibehält und zuverlässig bei Photolyse Strangbrüche in Oligonucleotiden erzeugt („caged DNA strand break“).<sup>8</sup> Allerdings wurde diese Modifikation als DNA-Baustein hergestellt. Auf Grundlage dieser Forschung sollte ein nucleosidischer RNA-Baustein entwickelt werden, der die Modifizierung von RNA-Oligonucleotiden und die Erzeugung spezifischer Strangbrüche nach Belichtung („caged RNA strand break“) ermöglicht. Des Weiteren sollte die Anwendung in lichtregulierbarer siRNA gezeigt werden.

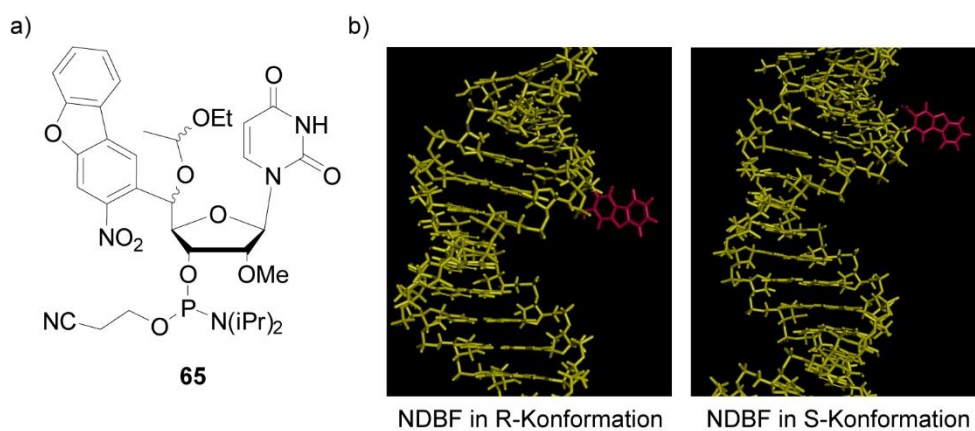
### 3.2.2 Synthese eines photospaltbaren RNA-Bausteins für die Oligonucleotid-Festphasensynthese

Die Idee dieses Projektes war es, einen RNA-Baustein (Uridin) mit der photolabilen Schutzgruppe NDBF zu modifizieren. Die photolabile Schutzgruppe sollte sich dabei am Phosphatrückgrat des Nucleosids befinden, um so einen störenden Effekt auf die Basenpaarung des siRNA-Duplex möglichst gering zu halten. Der NDBF-Chromophor ist als photolabile Schutzgruppe sehr gut etabliert und wurde bereits erfolgreich in Oligonucleotide eingeführt.<sup>43</sup> Es besitzt eine Quantenausbeute  $\phi$  von 0,7, einen Extinktionskoeffizienten von  $18400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und einen Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt von  $\approx 0,6 \text{ GM}$ . Dadurch ist es auch für die Zweiphotonen-Photolyse und für biologische Anwendungen sehr attraktiv.

Die NDBF-Schutzgruppe wurde an die 5'-Position eines 2'-O-Methoxy-Uridins gekuppelt. Diese Position wurde gewählt, um die natürliche Anordnung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Leit- und Folgestrang der siRNA und dem Leitstrang und der mRNA sicher zu stellen. Die Vermutung war, dass dadurch der RISC-Komplex die siRNA wie eine entsprechend unmodifizierte akzeptiert. 2'-OMe-Uridin wurde als Grundbaustein der Synthese gewählt, um die synthetische

Komplexität möglichst gering zu halten. Zudem enthält die hier verwendete siRNA-Sequenz, auf die im folgenden Unterkapitel eingegangen wird, eine große Menge an Uridinen, sodass eine Vielfalt an Modifikationsmöglichkeiten bestand. Frühere Studien zeigten, dass 2'-OMe-Modifikationen kompatibel waren mit der siRNA-Aktivität.<sup>234</sup>

Folgende Abbildung 83 a) zeigt die Struktur des photospaltbaren RNA-Bausteins **65**. Da die Einführung in den siRNA-Strang über Oligonukleotid-Festphasensynthese erfolgen sollte, wurde der Baustein als Phosphoramidit geplant. Desweiteren wurden theoretische Berechnungen zur Struktur des Bausteins innerhalb eine Oligonukleotids durchgeführt. Damit sollten im Vorfeld Hinweise darauf gegeben werden, wie sich die photolabile Modifikation im Duplex verhält.



**Abbildung 83.** Die Struktur des photospaltbaren RNA-Phosphoramidits a) und die räumliche Anordnung der photospaltbaren Modifikation im Oligonukleotid (theoretische Berechnungen). Die NDBF-Schutzgruppe ist rosa eingefärbt. Die gelbe Struktur stellt die siRNA dar.

Da die photospaltbare Modifikation aufgrund eines stereogenen Zentrums in zwei Konformationen vorliegen kann, wurden die Strukturberechnungen zweifach durchgeführt. Diese besagen, dass die Schutzgruppe, sowohl als R- als auch als S-Konformation, aus dem RNA-Duplex heraus zeigt. Zumindest theoretisch scheinen beide Konformationen einen sehr geringen Einfluss auf die Duplex-Struktur auszuüben. Für die Anwendbarkeit in einem RNA-Interferenz-basierten Experiment sind dies positive Ergebnisse. Dennoch muss beachtet werden, dass in einem biologischen System Proteinkomplexe des RISC ebenfalls mit der siRNA interagieren. Eine nach außen zeigende Modifikation kann diese Wechselwirkungen selbstverständlich behindern. Vermutlich wird eine funktionierende siRNA von der Sequenz, der Position der Modifikation und der Konformation der Schutzgruppe abhängen.

Die einzelnen Reaktionen der Synthese des photospaltbaren RNA-Phosphoramidits **65** sind in der folgenden Abbildung 84 dargestellt.



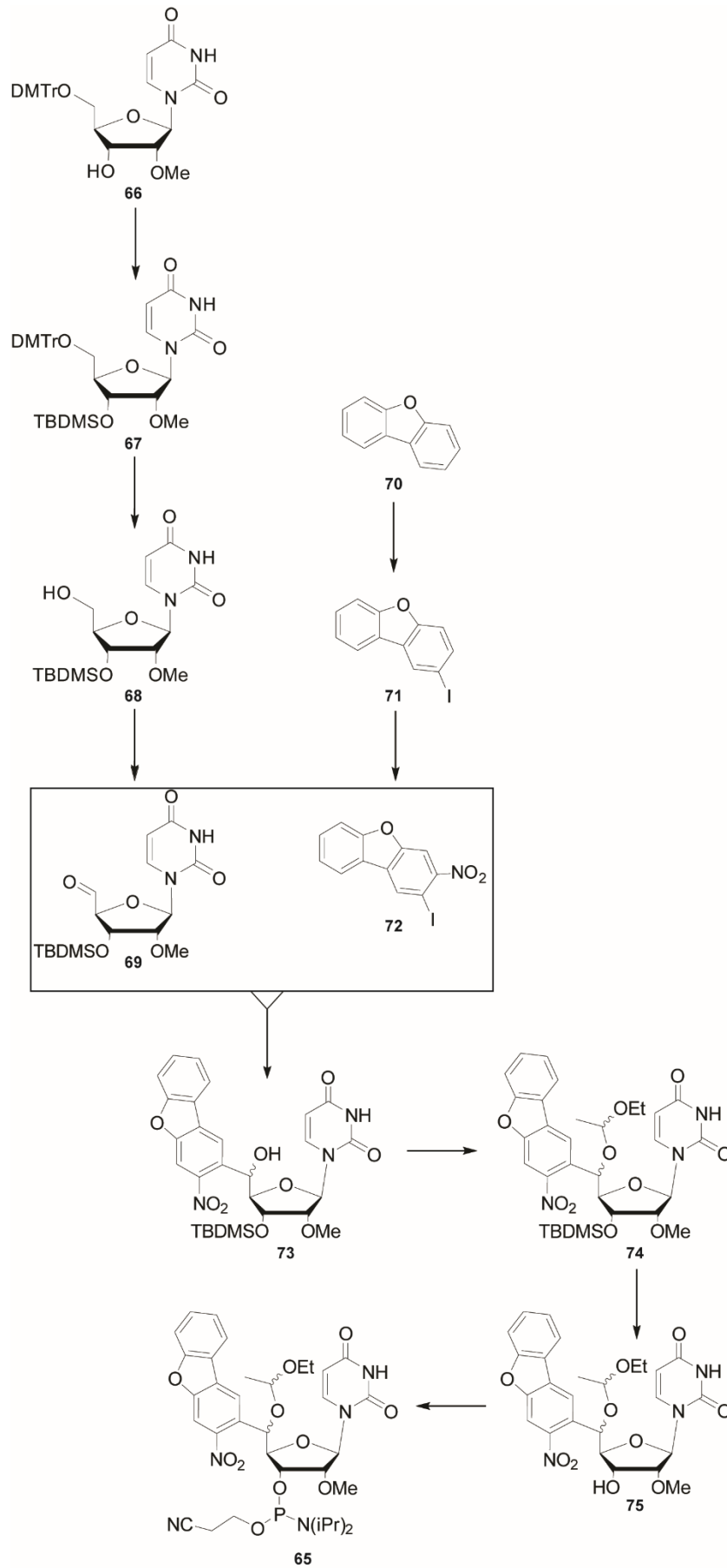


Abbildung 84. Syntheseroute des photospaltbaren RNA-Bausteins **65** für die RNA-Festphasensynthese

Für die Synthese mussten zunächst zwei Komponenten, rU-Aldehyd **69** und Iod-NDBF (I-NDBF) **72** dargestellt werden. In einer Grignard-Reaktion konnten beide Elemente über eine C-C-Einfachbindung gekuppelt werden. Im Folgenden wird zunächst die Synthese der beiden einzelnen Komponenten beschrieben.

### Synthese des Uridin-Bausteins **69**

Ausgehend von kommerziell erhältlichen 5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-methyluridin **66** wurde Verbindung **67** durch TBDMS-Schätzung der 3'-OH-Gruppe der Zuckereinheit dargestellt. Es handelt sich dabei um eine DMF-katalysierte Substitutionsreaktion, bei der zunächst die TBDMS-Schutzgruppe an den Stickstoff des DMFs addiert wird. Im Anschluss greift das Sauerstoffatom der 3'-OH-Gruppe nukleophil am Siliziumatom des TBDMS an, während das DMF in deprotonierter Form freigesetzt wird. Das „fehlende“ Proton wird von zugesetzten Imidazol übertragen. Bei dieser Reaktion kam es in geringen Mengen zur DMTr-Entschätzung des gewünschten Produktes. Da diese Verbindung im nächsten Reaktionsschritt hergestellt wurde, wurde das Nebenprodukt isoliert und bis zu Weiterverwendung aufbewahrt. Die DMTr-Schutzgruppe von Verbindung **67** wurde anschließend entfernt. Da diese säurelabil ist, wurde die Entschätzung zunächst mit Essigsäure durchgeführt. Der in Verbindung **67** enthaltenen Methoxyether und die TBDMS-Schutzgruppe blieben unter den Reaktionsbedingungen stabil. Da, das im Falle der DMTr-Schutzgruppe, abgespaltenen Carbeniumion durch die Phenylringe gut stabilisiert wird, kann die Abspaltung nach einem  $S_N1$ -Mechanismus erfolgen. Die Abspaltung der Methoxy-Gruppe erfolgt nur über einen  $S_N2$ -Mechanismus, für diesen allerdings eine geeignetes Nukleophil anwesend sein müsste. Da dies nicht der Fall war, sollte die Entschätzung selektiv an der 5'-Position erfolgen. Die Abspaltung der prinzipiell säurelabilen TBDMS-Schutzgruppe wird durch die sterische Abschirmung des Sauerstoffs durch die *tert*-Butylgruppen verhindert. Dennoch sollten geringe Reaktionszeiten eingehalten werden. Letztendlich zeigten sich aber geringe Ausbeuten bei dieser Reaktion. Nach einigen Versuchen konnte eine maximale Ausbeute von ca. 30% ermittelt werden. Das Startmaterial konnte dabei reisoliert werden. Eine Erhöhung der Reaktionszeit führte tatsächlich zur Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe und war daher keine geeignete Alternative. Die Durchführung der Reaktion mit Trifluoressigsäure führte zu vielen Nebenprodukten. Etwas höhere Ausbeuten (54%) konnte durch die Reaktion von Verbindung **67** in einer 1%-igen Jod-Methanol-Lösung<sup>235</sup> erreicht werden. Jod ist in der Lage Methanol zu oxidieren, wobei Jodwasserstoffsäure entsteht. Das nukleophile Iodid kann nun die DMTr-Gruppe abspalten. Wie bereits erwähnt, kann dieses allerdings ebenfalls die Methoxy-Schutzgruppe angreifen, was die Ausbeuteverlust erklärt. Reaktionszeiten wurden auch

hier zum Schutz der TBDMS-Schutzgruppe gering gehalten. Eine hohe Reaktionstemperatur (über 45 °C) begünstigte die Entschützung der 3'-Position, sodass diese ebenfalls kontrolliert werden musste. Verbindung **68** wurde anschließend in der Pfitzner-Moffat-Reaktion zu rU-Aldehyd **69** umgesetzt. Dabei wurde der 5'-Alkohol mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und einem Trifluoressigsäure (TFA)/Triethylamin (TEA)-Gemisch in Dimethylsulfoxid (DMSO) umgesetzt. DMSO diente dabei als Lösungsmittel und Reaktant. Zunächst kommt es zur Protonierung eines Stickstoffatoms des DCCs (durch TFA), wodurch dieses vom DMSO-Sauerstoffatom nukleophil angegriffen wird. Das partial positiv geladene Schwefelatom wird anschließend vom 5'-Sauerstoff des Uridins nukleophil angegriffen. Als Folge darauf entsteht durch Umlagerung und Abspaltung von Dicyclohexylharnstoff ein mesomer stabilisiertes Alkoxysulfonium-Ylid. Das negativ geladene Kohlenstoffatom deprotoniert den 5'-Alkohol in  $\alpha$ -Position, woraufhin die Carbonylgruppe unter Abspaltung von Dimethylsulfid gebildet wird.<sup>236</sup> In Abbildung 85 ist der Reaktionsmechanismus schematisch dargestellt.

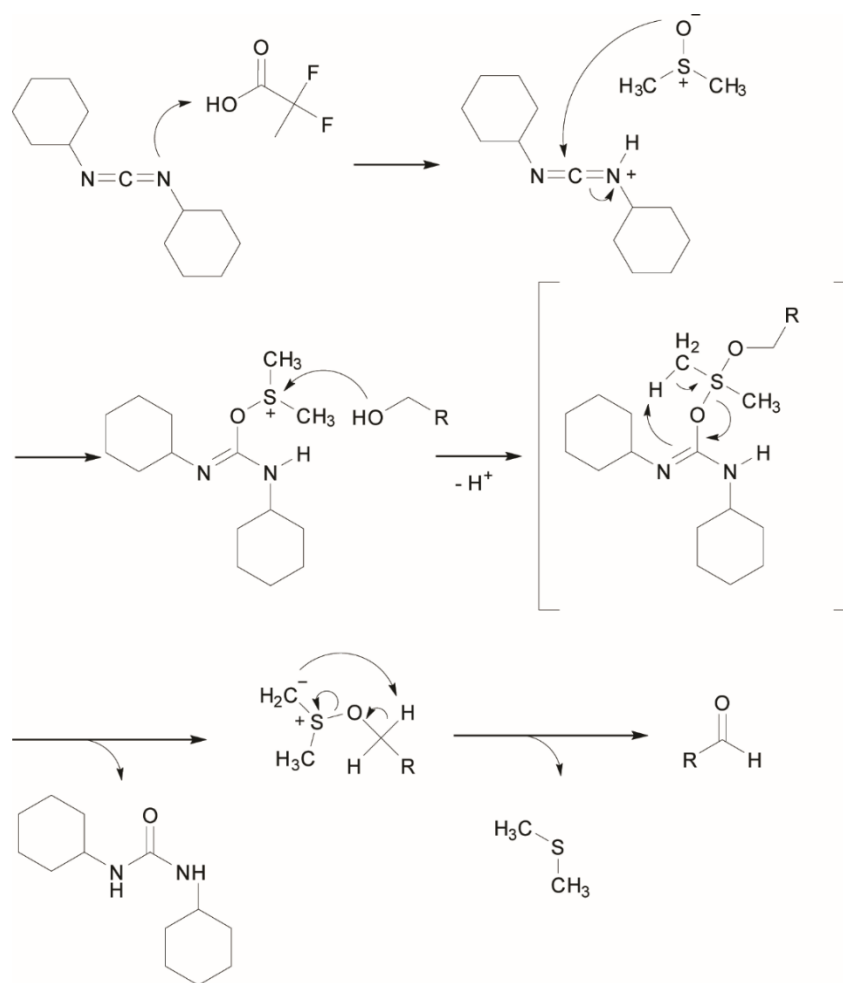


Abbildung 85. Schematische Darstellung der Pfitzner-Moffat-Oxidation von Alkoholen

Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung der Verbindung **69** musste darauf geachtet werden, dass das Laufmittel keinen Alkohol enthält. Bei einem DCM/Methanol Laufmittelgemisch kam es, in Verbindung mit der Kieselsäure der festen Phase, zur Bildung des entsprechenden Acetals. Das Halbacetal wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Die Rückgewinnung von Verbindung **69** gelang selbstverständlich durch Säurebehandlung. Obwohl dieses Laufmittelgemisch ein sehr gutes Trennverhalten der Reaktionsmischung zeigte, musste darauf verzichtet werden. Stattdessen wurde ein Cyclohexan/Etylacetat-Gemisch gewählt, welches zwar ein etwas schlechteres Trennverhalten zeigte, aber dennoch problemlos verwendet werden konnte.

### Synthese des NDBF-Bausteins **72**

Die Synthese des I-NDBFs **72** nach Abbildung 86 war im Arbeitskreis Heckel bereits etabliert.

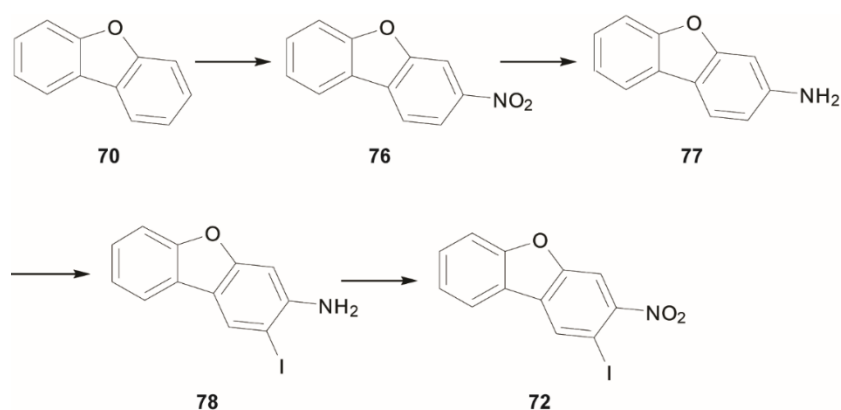


Abbildung 86. Ursprünglicher Syntheseweg zur Herstellung von I-NDBF **72**

Ausgehend von Dibenzofuran (DBF) **70** wurde das Nitrodibenzofuran (NDBF) **76** durch regioselective Nitrierung dargestellt. Keumi *et al.* untersuchten die Gründe für die hohe Regioselectivität und zeigten, dass diese stark abhängt vom Lösungsmittel sowie von der nitrierenden Spezies.<sup>237,238</sup> So zeigte die Reaktion in Trifluoressigsäure (TFA) das gewünschte, an C3 nitrierte, Produkt. Bei Verwendung der deutlich günstigeren Essigsäure entfällt die Selektivität und es kommt zur Entstehung von Gemischen aus mono-, di- und trinitriertem Dibenzofuran. Da allerdings eine große Menge an TFA verwendet werden musste und dieses sehr teuer ist, wurden geringe Ausbeuteverluste durch die Verwendung eines Gemischs aus TFA und Essigsäure akzeptiert. Das gewünschte Produkt **76** konnte so mit einer Ausbeute von 76% synthetisiert werden.

Die direkte Iodierung von Verbindung **76** zu I-NDBF **72** wurde im Arbeitskreis Heckel von Felix Hennig im Rahmen seiner Bachelorarbeit genauer untersucht. Trotz mehrere Versuche konnte dies allerdings nicht erreicht werden. Um die negativen elektronischen Einflüsse der Nitrogruppe zu umgehen, wurde diese daher zunächst reduziert. Die *meta*-dirigierende Nitrogruppe wurde in einer palladiumkatalysierten Reduktion mit elementarem Wasserstoff bei erhöhtem Druck in einem Reaktionsautoklaven in die *ortho*-dirigierende Aminogruppe überführt. Alternativ wurde die Reaktion mit Natriumborhydrid und NiCl<sub>2</sub> durchgeführt, da die Reduktion von aromatischen Nitroverbindungen mit Hydroborat-Übergangsmetallsystemen hinreichend untersucht wurde. Die Verwendung von Nickelsalzen ist im Vergleich zu Eisen- oder Cobaltsalzen dabei besonders geeignet und wurde daher hier verwendet.<sup>239,240</sup> Eine Ausbeute von 46% konnte damit erreicht werden.

Die Iodierung von DBF-Amin **77** zu Verbindung **78** erfolgte mit elementarem Iod und Silberacetat. Das I<sub>2</sub> wird dadurch aktiviert, da die Bildung des besonders stabilen Silberiodids die heterolytische Spaltung begünstigt.<sup>241</sup> Die Effektivität dieser Reaktion war allerdings sehr gering. Zum einen lief die Reaktion nicht vollständig ab. Große Mengen an Startmaterial konnten reisoliert werden. Zum anderen verlief die Reaktion nicht selektiv. Sowohl das 7-Iod-Aminodibenzofuran als auch das 2,7-Iod-Aminodibenzofuran wurden nachgewiesen. Lediglich 11% gewünschtes 2-Iod-Aminodibenzofuran **78** konnte isoliert werden. Die Reoxidation der Aminogruppe zu Verbindung **72** erfolgt unter besonders milden Reaktionsbedingungen mit Kaliumiodid und *tert*-Butylhydroperoxid, welche speziell für die selektive Oxidation von Arylaminen<sup>242</sup> entwickelt wurde. Die Ausbeute lag bei 28%.

Da vor allem die beiden letzten Reaktionsschritte dieser Syntheseroute ineffektiv abliefen, belief sich die Gesamtausbeute leider meist im einstelligen Prozentbereich. Eine Möglichkeit besteht in der Verwendung großer Startmaterialmengen, um eine ausreichend hohe Menge an Zielmaterial zu erhalten. Die ökonomisch interessantere Möglichkeit besteht in der Einführung der beiden DBF-Substituenten in entgegengesetzter Reihenfolge. Gilman *et al.* lieferten dafür die Grundlage der Idee, da sie beschrieben, wie *ortho*- bzw. *para*-dirigierende Substituenten in einem Dibenzofuran einen zweiten Substituenten selektiv an den bereits substituierten Aromaten dirigieren.<sup>243</sup> Eine Synthese nach Abbildung 87 sollte demnach selektiv möglich sein.

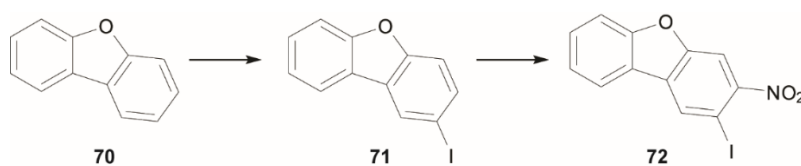


Abbildung 87. Optimierte Syntheseroute von I-NDBF **72**

Wiederum ausgehend von Dibenzofuran **70** wurde zunächst mit Iodbenzoldiacetat und Iod Verbindung **71** dargestellt. Um das gewünschte Produkt zu erhalten muss penibel auf die Äquivalenzmenge des Halogens geachtet werden. Bei Überschuss von Iod entstehen di-, tri- und polyiodierte Endverbindungen, die kaum voneinander getrennt werden können (Abbildung 88). Bei Zugabe von 0.33 Äquivalenten Iod, entsteht das gewünschte monoiodierte Produkt **71**.

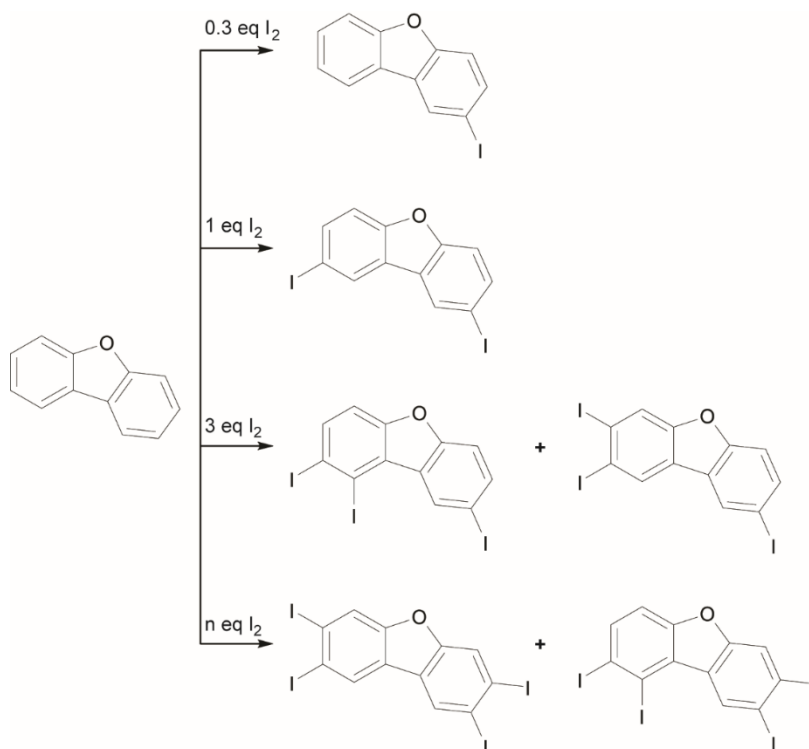


Abbildung 88. Synthese von mono-, di-, tri- und polyiodiertem Dibenzofuran<sup>244</sup>

Die elektrophile Substitution erfolgt bevorzugt in 2-Position. Sie folgt der Reihenfolge: 2 > 3 > 4 > 1. Die Trennung des monoiodierten Produktes **71** vom Startmaterial erfolgte durch Rekristallisation in Ethanol und konnte mit einer Ausbeute von 46% erhalten werden. Die Nitrierung zu Verbindung **72** erfolgte, wie beim ursprünglichen Reaktionsschema, nach Keumi *et al.* in Trifluoressigsäure und lieferte eine Ausbeute von 44%. Die Aufreinigung erwies sich jedoch als nicht trivial. Das Produkt zeigte nach säulenchromatographischer Reinigung in den NMR-Spektren noch zu starke Verunreinigung, um es weiter verwenden zu können. Letztendlich konnte eine zweifache Rekristallisation, zuerst in Methanol, dann in Ethanol, ein verwendbares Endprodukt liefern. Die Gesamtausbeute der zweistufigen Alternativreaktion beläuft sich auf  $\approx 20\%$ . Damit ist sie wesentlich höher, als die Gesamtausbeute der ursprünglichen vierstufigen Synthese.

### Addition von 2-Iod-3-nitrobenzofuran **72** an 5'-Carbonyl-2'-O-methyl-3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-uridin **69** und Synthese von Phosphoramidit **65**

Bei der Synthese des DNA-Bausteins realisierte Dussy *et al.* die Kupplung der photolabilen Schutzgruppe als Lithiumspezies, welches über eine Metall-Halogen-Austausch generiert wurde. Dabei fungiert die Schutzgruppe als Nukleophil und das Nucleosid als Elektrophil. Entsprechend dieser Vorschrift, probierte Julian Scherr im Rahmen seines Forschungspraktikums im Arbeitskreis Heckel die Lithiierung von 2-Brom-3-Nitrodibenzofuran. Dabei konnten allerdings keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Auch wenn Dussy *et al.* die Lithiierung des Nitroaromaten gelang, muss diese als problematisch beurteilt werden. Nitrogruppen werden in der Regel beim Metall-Halogen-Austausch mit Alkylolithium- oder Alkylmagnesiumreagenzien zur Nitrosogruppe reduziert.<sup>245</sup> Als Konsequenz daraus wurde in dieser Arbeit ein weniger reaktives Organometallreagenz verwendet.

2-Iod-3-Nitrodibenzofuran **72** wurde bei tiefen Temperaturen mit Phenylmagnesiumchlorid umgesetzt. Es zeigte sich, dass bei dieser Reaktion eine Temperatur von  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  exakt eingehalten werden musste, da sonst der Halogen-Metall-Austausch nicht stattfand. Selbst Temperaturschwankungen von  $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  zeigten einen ineffektiven Reaktionsverlauf. Die Verwendung einer Reaktionskyrostaten wurde daher erforderlich. Da so gewonnene Grignard-Reagenz wurde anschließend mit der reaktiven Aldehydgruppe des Nucleosids **69** umgesetzt.

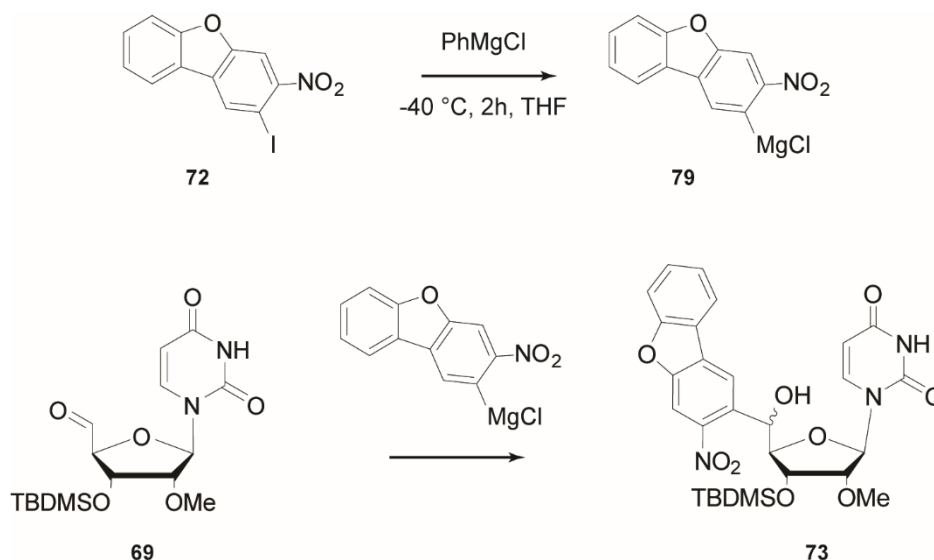
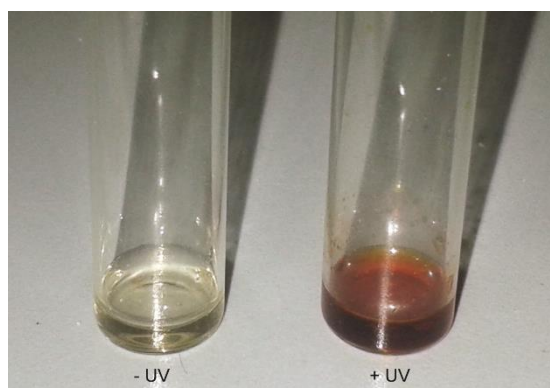


Abbildung 89. Darstellung des NDBF-modifizierten Uridins **73** mittels Grignard-Reaktion

Phenylmagnesiumchlorid und Uridin-Aldehyd **69** gehen miteinander ebenfalls eine Grignard-Reaktion ein. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, dass der vorherige Metall-Halogen-Austausch mit I-NDBF **72** vollständig abgelaufen ist und die Stöchiometrie der beteiligten Reaktanden

genau eingehalten wird. Das optimale Stöchiometrieverhältnis war gegeben bei 3.4 Äquivalenten I-NDBF **72** und 3.3 Äquivalenten Phenylmagnesiumchlorid bezogen auf 1 Äquivalent Uridin-Aldehyd **69** und lieferte eine Ausbeute von 66%. Bei der Reaktion entsteht an der 5'-Position ein stereogenes Zentrum. Für die weiteren Synthesevorschriften wird dies zunächst vernachlässigt. Im Unterkapitel „Trennung der Diastereomere“ wird darauf eingegangen.

Verbindung **73** kann nun für die Festphasensynthese vorbereitet werden. Standardmäßig wird die 5'-OH-Gruppe dafür mit einer säurelabilen Schutzgruppe, der DMTr-Schutzgruppe, versehen. Aufgrund des hohen sterischen Anspruchs ist die Einführung der DMTr-Schutzgruppe an Verbindung **73** nicht möglich. In Anlehnung an Dussy *et al.* wurde daher die weniger sperrige Ethoxyethyl-Schutzgruppe eingeführt. Die Reaktionszeiten bei der RNA-Festphasensynthese müssen dafür etwas angepasst werden. Abgesehen von der Tatsache, dass die Kupplungseffizienz des modifizierten Bausteins, welche üblicherweise mittels Tritylionen bestimmt wird, nicht überprüft werden kann, werden Ethoxyethyl-geschützte Nucleoside nicht anders behandelt wie DMTr-geschützte Nucleoside. Die Einführung der Ethoxyethyl-Schutzgruppe erfolgte mit Ethylvinylether und einer Reaktionszeit von 5 Tagen. Trotz des geringeren sterischen Anspruchs der Ethoxyethyl-Schutzgruppe, ist die Sterik vermutlich hauptsächlich für die lange Reaktionszeit verantwortlich. Verbindung **74** konnte mit einer Ausbeute von 76% gewonnen werden. Bei dieser Verbindung handelte es sich, erstmalig im Reaktionsverlauf, um eine photolabile Spezies. Daher wurden Proben testweise belichtet und das Ergebnis mittel Dünnschichtchromatographie überprüft. Belichtung bei 365 nm für 1 Minute führte auf der DC-Kontrolle zur Bildung einer neuen Spezies. Die ursprüngliche Verbindung konnte nicht mehr visualisiert werden. Mit bloßem Auge konnte eine Farbveränderung der Testlösung erkannt werden (Abbildung 90), welche bereits früher ähnlich bei der Entschützung von NDBF-modifizierten Oligonucleotiden beobachtet werden konnte.



**Abbildung 90.** Farbliche Veränderung einer Testlösung von Verbindung **74** nach Belichtung bei 365 nm (1 Minute)

Im Anschluss wurde die 3'-OH-Gruppe mittels Tetrabutylammoniumfluorid entschützt (91% Ausbeute). Die daraus resultierende Verbindung **75** konnte dann mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-



Diisopropylchlorphosphoramidit zum fertigen Phosphoramidit **65** (68% Ausbeute) umgesetzt werden.

### Trennung der Diastereomere und Bestimmung der absoluten Konfiguration

Bei der Einführung der NDBF-Schutzgruppe an den Nucleosid-Baustein entsteht an der 5'-Position ein stereogenes Zentrum, sodass die photolabile Schutzgruppe in zwei verschiedenen, räumlichen Anordnungen vorliegen kann. Da die beiden entsprechenden Diastereomere unterschiedliche Einflüsse auf die geplanten RNAi-Experimente haben können, sollten diese getrennt werden. Die Trennung gelang schlussendlich bei Verbindung **74**, also nach der Einführung der Ethoxyethyl-Schutzgruppe. Es wurden ebenso Versuche unternommen, die beiden Spezies schon bei Verbindung **73**, nach der Grignard-Reaktion, zu separieren, welche allerdings nicht zum Erfolg führten.

Eine säulenchromatographische Trennung, sowie die Trennung über eine chirale HPLC führten leider nicht zum Erfolg. Letztendlich führte die Verwendung der RP-HPLC (MultoKrom RP C-18-Säule) und einem isokratischen Laufmittelgemisch von Acetonitril/0.1 M TEAA-Puffer im Verhältnis 4:1 zu einer Basislinien-getrennten Separierung von zwei Signalen (Abbildung 91) innerhalb von 20 Minuten. Durch die Verwendung eines Gradienten im Laufmittelgemisch gelang ebenfalls eine Trennung, welche allerdings wesentlich mehr Zeit ( $\approx 60$  Minuten) in Anspruch nahm.

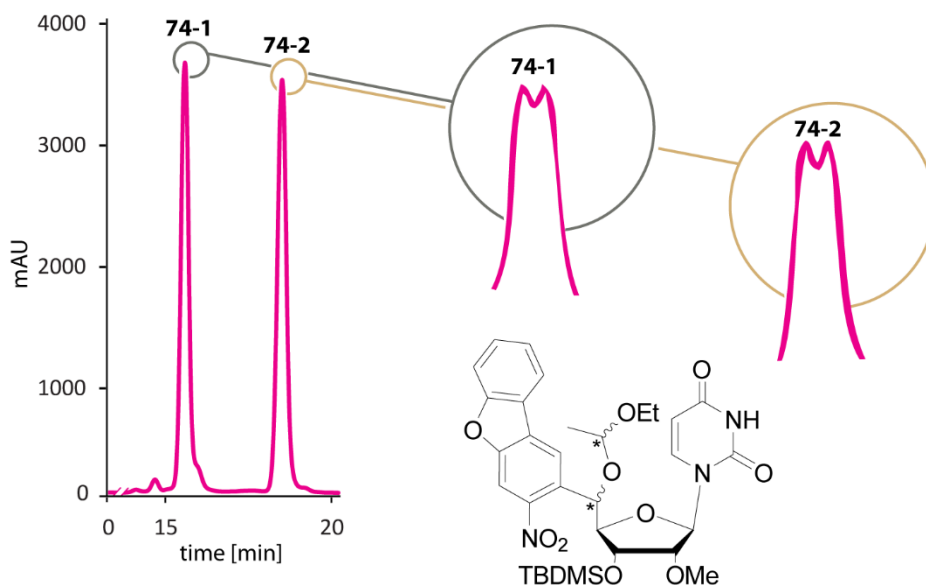
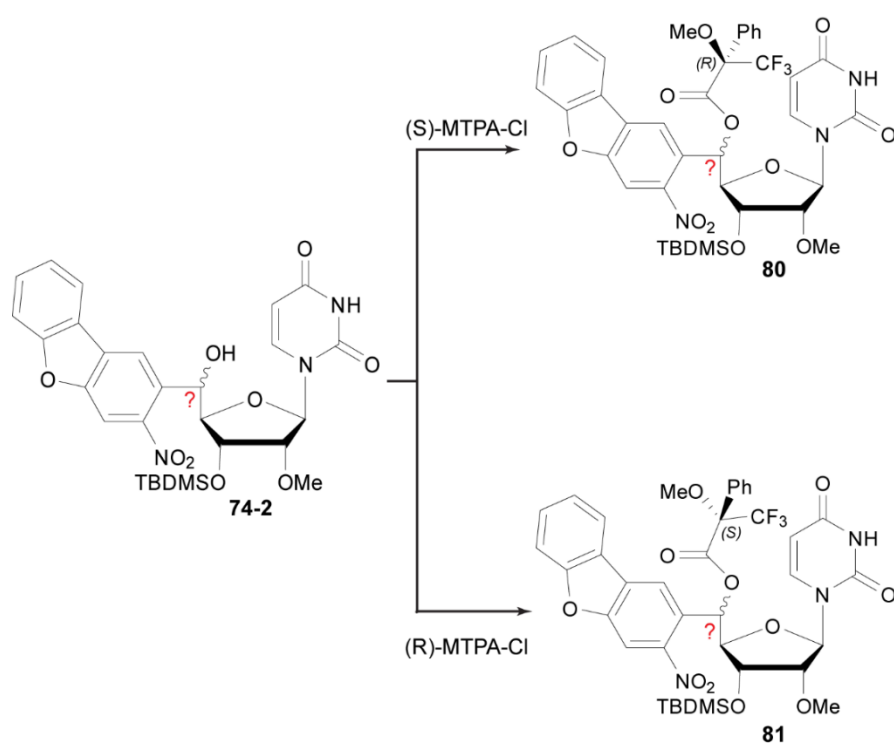


Abbildung 91. Trennung der Diastereomere mittels RP-HPLC

Verbindung **74** besitzt durch die Einführung der Ethoxyethyl-Schutzgruppe im Vergleich zu Verbindung **73** ein zusätzliches stereogenes Zentrum, sodass theoretisch 4 verschiedene Signale im HPLC-Chromatogramm sichtbar werden können. Tatsächlich konnten 2 Doppelsignale getrennt werden. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, dass die getrennten Signale zu den beiden Konformationen der Ethoxyethyl-Schutzgruppe gehören und beiden Konformationen der 5'-Position lediglich die Doppelsignale verursachen. Allerdings ist ebenso der gegenteilige Fall denkbar. Welches der beiden stereogenen Zentren hierbei Basislinien-getrennt vorlag, musste demnach bestimmt werden.

Zur Bestimmung wurde die Mosher-Ester-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die beiden Spezies der RP-HPLC **74-1** und **74-2** in ausreichender Menge voneinander getrennt und die Ethoxyethyl-Schutzgruppe säureinduziert entfernt. Im Anschluss wurde die absolute Konfiguration nach dem Protokoll von Hoyer *et al.*<sup>246</sup> bestimmt. Das später eluierte und entschützte Doppelsignal **74-2** wurde sowohl mit einem (*S*)-, als auch mit eine (*R*)-Mosher-Säurechlorid zu den Mosher-Estern **80** und **81** umgesetzt.



**Abbildung 92.** Darstellung der (*R*)- und (*S*)-Mosher-Ester **80** und **81** unter Verwendung des chiralen Mosher-Säurechlorids

Die Mosher-Ester-Reaktion verlief aufgrund der sterischen Hinderung, welche bereits bei der Ethoxyethyl-Schützung problematisch war, sehr langsam und mit geringen Ausbeuten. Die gewonnenen Mosher-Ester wurden mit <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie untersucht. Wenn die Signale der RP-HPLC die beiden Konformationen der 5'-Position repräsentieren, dann sollte die entschützte Form

nach Mosher-Ester-Analyse zwei unterschiedliche NMR-Spektren aufweisen. Im anderen Fall ergäben beide Spezies ein Diastereomergemisch und somit ein identisches NMR-Spektrum.

Die Mosher-Ester-Analyse beruht auf der Tatsache, dass bei der stabilsten Konfiguration die Estercarbonylgruppe, die Trifluormethylgruppe und das Proton am  $\alpha$ -C-Atom des ursprünglichen Alkohols in der sogenannten MTPA-Ebene liegen.

Aufgrund des diamagnetischen Effektes des Phenylrings werden die  $^1\text{H}$ -NMR-Signale des Substituenten am chiralen Zentrum, welche auf derselben Seite wie der Phenylrest liegen, im NMR-Spektrum hochfeldverschoben (Abbildung 93).

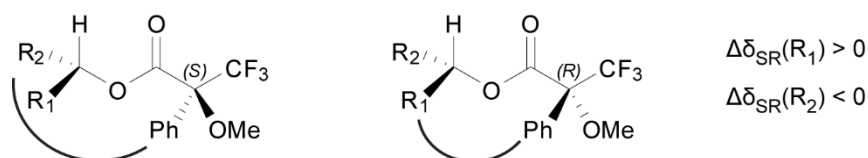


Abbildung 93. Prinzip der Mosher-Ester-Analyse zur Bestimmung der absoluten Konfiguration

Wird nun zwischen den chemischen Verschiebungen  $\delta$  der Protonen der Reste  $R_1$  und  $R_2$  des (*S*)- und (*R*)-Mosher-Esters die Differenz gebildet ( $\Delta\delta_{SR} = \delta_S - \delta_R$ ), so erhalten Protonen am Rest  $R_1$  ein positives und Protonen des Rests  $R_2$  ein negatives Vorzeichen. Für den vorliegenden Fall bedeutet dies, dass die Reste  $R_1$  und  $R_2$  der NDBF-Schutzgruppe und dem Zuckerbaustein zugeordnet werden müssen. Anhand der Zuordnung lässt sich im Anschluss die absolute Konfiguration der chiralen Position ermitteln.

Tabelle 9. Repräsentative chemische Verschiebungen der gemessenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Mosher-Ester **80** und **81**

	<u>chemische Verschiebung</u>			
	NDBF-H <sub>1</sub>	NDBF-H <sub>4</sub>	3'-H	4'-H
80 ( <i>R</i> -MTPA)	8.1	8.05	5.87	4.57
81 ( <i>S</i> -MTPA)	8.32	8.23	5.79	4.54
$\Delta\delta_{SR}$	+	+	-	-

Anhand der gemessenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren und den chemischen Verschiebungen erhielten die NDBF-Protonen einen positiven und die Nucleosid-Protonen einen negativen  $\Delta\delta_{SR}$ -Wert (Tabelle 9). Zur Bestimmung wurden lediglich signifikante  $\Delta\delta_{SR}$ -Werte berücksichtigt. Üblicherweise werden die absoluten  $\Delta\delta_{SR}$ -Werte mit zunehmenden Abstand zur MTPA-Gruppe kleiner und wesentlich weniger aussagekräftig. Demzufolge entspricht der Rest  $R_1$  der NDBF-Schutzgruppe und der Rest  $R_2$  dem Zuckerbaustein. Daraus ergibt sich eine (*R*)-Konfiguration für Verbindung **74-2**, welche bei der RP-HPLC-Trennung als zweites eluierte. Getrennt Diastereomere **74-R** und **74-S** wurden, entsprechend der erwähnten Reaktionen, zu Phosphoramidit **65-R** und **65-S** umgesetzt.

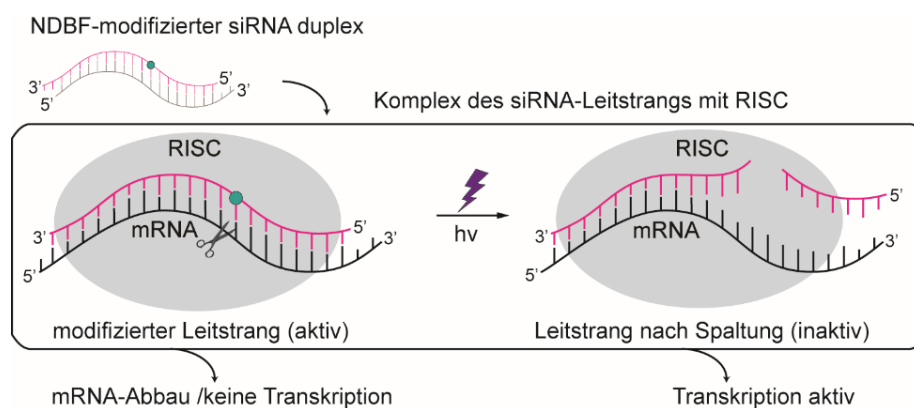
### 3.2.3 Anwendung in der Zelle

#### 3.2.3.1 Assayentwicklung

Heutzutage weiß man, dass die in den RISC eingebauten Oligonukleotide aus langen dsRNAs prozessiert werden und 21 Nukleotide lang sind. Während die Transfektion langer dsRNA in *Drosophila*-Zellen möglich ist, führt sie in Säugerzellen zu einer Interferonantwort, welche unspezifische RNAs in der Zelle abbaut. 2001 gelang es Tuschl *et al.*<sup>174</sup> auch in Säugerzellen eine RNA-Interferenz auszulösen, indem sie reife 21-Nukleotide lange siRNAs transfizierten. Ebenso konnten sie zeigen, dass ein 2-Nukleotide langer 3'-Überhang wichtig ist für die Regulationsstärke einer siRNA. Obwohl Dicer eine reife siRNA nicht mehr schneiden muss, so bindet es die 3'-Enden einzelsträngiger RNA mit seiner PAZ-Domäne und belädt, innerhalb des RISC-Loading-Komplex (RCL), damit das Ago-Protein.

Eine siRNA-Sequenz zur Inhibierung eines bestimmten Gens zu wählen, erscheint daher zunächst eine leichte Aufgabe, wenn die Sequenz der transkribierten mRNA bekannt ist. Allerdings leitet nicht jede siRNA, die komplementär ist zur Ziel-mRNA, zuverlässig die RNAi ein. Ausschlaggebend ist auch die Sekundärstruktur einer siRNA, welche entscheidet, ob sie für den RISC-Komplex zugänglich ist. Durch theoretische Berechnungen kann dieses Problem allerdings minimiert werden.

Im Rahmen dieses Projektes sollte die Expression eines Gens über das „Ausschalten“ einer siRNA durch Ein- und Zweiphotonen-Anregung reguliert werden. Die folgende Abbildung zeigt das Konzept der Regulation der siRNA-Funktion mittels lichtinduzierten Strangbrüchen.



**Abbildung 94.** Schematische Darstellung der photochemischen Kontrolle der RNA-Interferenz mit modifizierter siRNA. Vor Bestrahlung mit Licht geht die siRNA die natürliche RNA/RNA- und RNA-Protein-Wechselwirkung ein, welche in einer inhibierten Transkriptionsrate resultiert. Nach Belichtung wird in ein Strangbruch im siRNA-Leitstrang induziert und somit die ursprüngliche Struktur zerstört. Die Genexpression wird dadurch aktiviert.

Die Inaktivierung der siRNA-Funktion sollte mit lichtinduzierten Strangbrüchen realisiert werden, welche durch die Photolyse des NDBF-modifizierten Bausteins ausgelöst werden sollte. Im Unterschied zu nicht-nukleosidischen Linkern, sollte das modifizierte Uridin-Derivat die Eigenschaft stabile Wechselwirkungen zwischen den Nukleobasen komplementärer Stränge auszubilden, beibehalten. Somit sollte es möglich sein, eine photoregulierbare, aber dennoch aktive siRNA zu erhalten.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die aktive, modifizierte siRNA vergleichbar gut vom RISC-Komplex erkannt und aufgenommen wird, wie eine entsprechend unmodifizierte siRNA. Die Stimulation mit Licht führt zu einem Strangbruch und einer nicht-funktionalen siRNA – gefolgt von der Expression des Zielproteins. Um die Hypothese zu bestätigen wurden Experimente in HeLa-Zellen durchgeführt.

Für die Untersuchung der RNAi in Zellen hat sich die Verwendung von Reporterensystemen etabliert. Dabei wird ein Plasmid, welches für ein fluoreszierendes Gen codiert, in die Zelle eingebracht. Die Menge des exprimierten Proteins korreliert direkt mit der ausgehenden Fluoreszenz und kann daher, ohne aufwändige Proteinextraktion, quantifiziert werden. In diesem Fall wurde ein duales Fluoreszenz-Assay, mit *Aequorea coerulea* GFP (AcGFP) und *Discosoma striata* RFP (DsRed), verwendet. Es kommen zwei Plasmide, eines codierend für GFP und eines für RFP, zum Einsatz. Bei gleichzeitiger Transfektion ermöglicht die Normierung der einen Fluoreszenzintensität (GFP) auf die andere Intensität (RFP), die Quantifizierung des Proteins (GFP) ohne die Bestimmung der Zellzahl oder der Transfektionseffizienz. In den folgenden Experimenten sollte die siRNA lediglich einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von AcGFP ausüben, wohingegen die Expression von RFP (DsRed) unbeeinträchtigt bleiben sollte. Zur Quantifizierung der AcGFP-Expressionstärke wurde demnach AcGFP auf RFP normiert.

Die Plasmide wurden einmalig kommerziell erworben und anschließend in *E.coli*-Bakterien amplifiziert. Die Prozedur beinhaltet die Erzeugung kompetenter Bakterien, die Transformation, die Plasmidpräparation und die Sequenzierung. Arbeitsvorschriften dazu befinden sich im Kapitel 4 „Material und Methoden“

### 3.2.3.2 Design der Anti-AcGFP-siRNA

Bei den in den Zellexperimenten verwendeten Plasmiden handelte es sich um AcGFP1-N1 (Clontech; AcGFP-Reporter-Gen-Plasmid) und pDsRed Express (Clontech; RFP-Plasmid). Die Expression der Proteine beider Plasmide unterliegen der Aktivität eines CMV-Promotors. Die hier verwendete siRNA sollte gegen AcGFP gerichtet sein. Ist die mRNA-Sequenz des Zielproteins bekannt (in diesem Fall durch die Plasmidkarte des Herstellers), so lassen sich, unter Anwendung von siRNA

Design-Richtlinien<sup>9</sup>, effektive siRNAs entwickeln. Heutzutage existieren dazu verschiedene Onlinetools, welche nach bestimmten Algorithmen siRNA-Sequenzen berechnen und die händische Bearbeitung der Plasmid-Sequenz und der Richtlinien abgelöst haben. Folgende Voraussetzungen fließen weitestgehend in die Designauswahl der siRNAs ein:

1. Die Zielsequenz ist 50 -100 Nukleotide nach dem Startcodon (ATG) lokalisiert
2. Jedes AA-Dinukleotid und die 19 weiteren Nukleotide sind potentielle siRNA-Ziel-Sequenzen. Diese Strategie beruht auf den Untersuchungen von Elbashir *et al.*<sup>247</sup>, welche besagen, dass siRNAs mit 3'-UU-Überhängen besonders effektiv sind. Erweitert wird dieses Motiv häufig auf: AA(N<sub>19</sub>)TT, NA(N<sub>21</sub>) oder NAR(N<sub>17</sub>)YNN (N = beliebige Nukleotid, R = Nukleotid mit Purinbase, Y = Nukleotid mit Pyrimidin-Base).
3. Die Zielsequenz besitzt eine GC-Gehalt von 35 – 60%
4. Wiederholungen von 4 oder mehr gleichen Nukleotiden soll vermieden werden
5. Der 3'- und 5'-untranslatierte Bereich soll vermieden werden
6. Sequenzen mit einer hohen Homologie zu anderen verwandten Gene soll vermieden werden

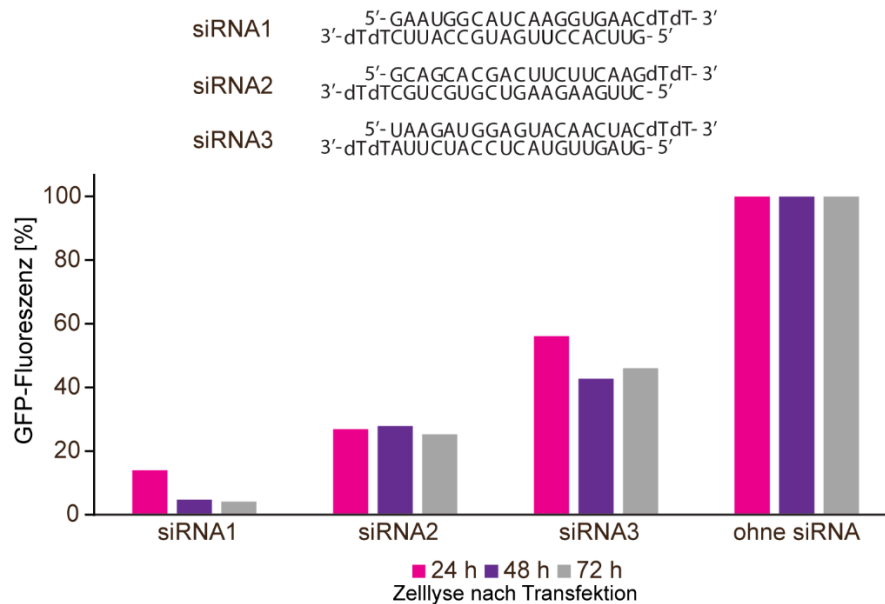
Unter Verwendung des Onlinetools „siDesign Center“ von Dharmacon™<sup>248</sup> und der AcGFP-Sequenz der Plasmidkarte des Herstellers wurden mehrere siRNA-Sequenzen berechnet, wovon die drei potentiell wirksamsten gewählt und in ersten Zellkulturexperimenten auf Effektivität untersucht wurden. Zeitgleich konnten so die Transfektionsbedingungen für die späteren Experimente mit modifizierter siRNA ermittelt werden. Verwendete siRNA-Sequenzen sind in der folgenden Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10.** siRNA-Sequenzen berechnet nach den siRNA Design-Richtlinien

RNA	Sequenz	siRNA
RNA1	5'- GAA UGG CAU CAA GGU GAA CdTdT -3'	Folgestrang
RNA2	5'- GUU CAC CUU GAU GCC AUU CdTdT -3'	Leitstrang
RNA3	5'- GCA GCA CGA CUU CUU CAA GdTdT -3'	Folgestrang
RNA4	5'- CUU GAA GAA GUC GUG CUG CdTdT -3'	Leitstrang
RNA5	5'- UAA GAU GGA GUA CAA CUA CdTdT -3'	Folgestrang
RNA6	5'- GUA GUU GUA CUC CAU CUU AdTdT -3'	Leitstrang

Nach folgender beschriebener Prozedur wurden die siRNA-Sequenzen getestet. Optimierte Bedingungen wurden von Mikat *et al.* übernommen<sup>197</sup>: Adherente Hela-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in 24-well-Platten ( $\approx 0.05 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu$ l DMEM per well) passagiert. Die Zellen wurden mit 200 ng pAc-GFP-N1, 300 ng pDsRed Express und 25 pmol siRNA transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Metafectene® verwendet. Die Transfektionsdauer betrug 4 Stunden, danach wurde das Transfektionsmedium mit DMEM ausgetauscht. 24, 48 und 72 Stunden nach Mediumswechsel wurde jeweils ein Set der Zellen lysiert, um die Transfektionsbedingungen zu

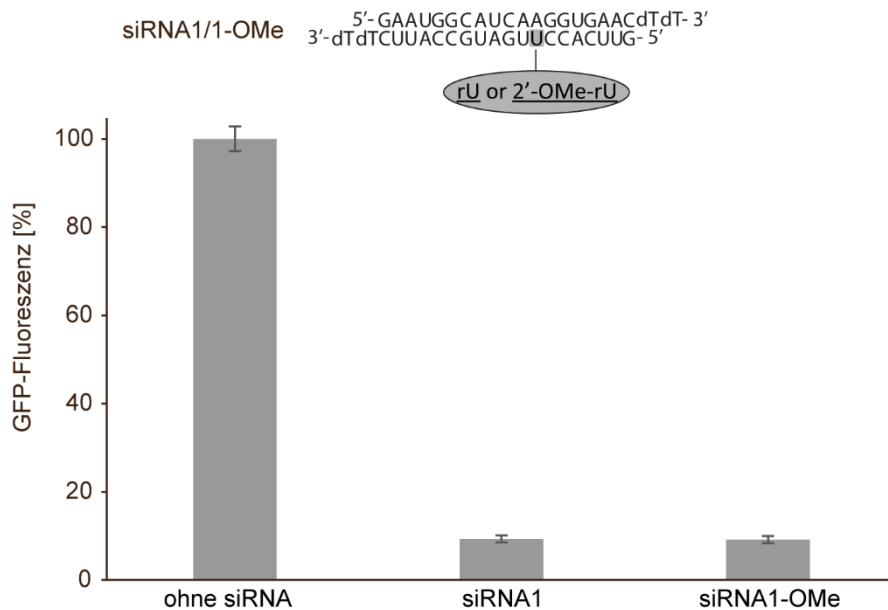
optimieren. Das Zelllysat wurde zur Fluoreszenzmessung verwendet. Die AcGFP-Fluoreszenz wurde mit 475 nm angeregt und bei 505 nm detektiert. Die RFP-Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm angeregt und bei 583 nm detektiert. Die Fluoreszenzwerte von Zellen transfiziert ohne siRNA (nur beide Plasmide) wurden auf 100% festgelegt. SiRNA-Positiv- und Negativkontrollen wurden käuflich erworben (*silencer*<sup>TM</sup> GFP siRNA von *ThermoFisher*) und ebenfalls beim Experiment verwendet. Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 95.** Verschiedene Anti-AcGFP-siRNA-Sequenzen getestet in HeLa-Zellen. Nach Transfektion wurden die Zellen unterschiedlich lange kultiviert, um den Zeitpunkt der maximalen GFP-Inhibierung zu bestimmen. Das Experiment wurde als Einfachbestimmung durchgeführt, sodass keine Fehlerbalken angegeben werden konnten. Die Ergebnisse wurden allerdings als aussagekräftig eingestuft.

Die Sequenz der **siRNA1** konnte als am effektivsten ermittelt werden (4% Restfluoreszenz nach 48 bzw. 72 Stunden). Auf Grundlage dessen wurde diese Sequenz mit dem NDBF-Uridin-Baustein modifiziert und für alle weiteren Tests verwendet. Die Zellyse nach Transfektion wurde auf 48 Stunden bestimmt. Die Bestimmung des Zeitpunktes des Fluoreszenzassays ist wichtig, da bekannt ist, dass der inhibierende Effekt der siRNA in Säugerzellen zeitlich limitiert ist. Nach Chiu und Rana sinkt der Effekt üblicherweise 66 Stunden nach Induzierung.<sup>249</sup>

Auf Grundlage der von Allerson *et al.* publizierten Untersuchungen, dass 2'-OMe-geschützte siRNAs im RISC-Komplex kompatibel sind<sup>234</sup>, wurde die neue Modifikation als 2'-OMe-Baustein synthetisiert. Um dies zu bestätigen, wurde ein Uridin der **siRNA1** an einer Position durch ein 2'-OMe-Uridin getauscht (**siRNA1-OMe**) und mit der ursprünglichen Sequenz verglichen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 96.** Vergleich der Inhibierungseffizienz von **siRNA1** und **siRNA1-OMe**. Experiment als Triplikat durchgeführt

Tatsächlich zeigte sich an der Test-siRNA-Sequenz, dass die 2'-Methoxygruppe keinen Einfluss auf die Effizienz der siRNA-Funktion zeigte. **SiRNA1-OMe** zeigte 48 Stunden nach Transfektion eine GFP-Restfluoreszenz von unter 10%, ebenso wie die unmodifizierte Variante **siRNA1**.

### 3.2.3.3 Festphasensynthese von NDBF-modifizierter siRNA

Zunächst wurde Phosphoramidite **65** (als Diastereomerenmischung) zur RNA-Festphasensynthese des Leitstrangs von **siRNA1**, unter Verwendung der Standardprotokolle, verwendet. Die Kupplungseffizienz der einzelnen Nucleoside wurde dabei standardmäßig über das, bei der Reaktion abgespaltene, Trityl-Anion ermittelt. Da Phosphoramidit **65** keine DMTr-Schutzgruppe enthielt, konnte dementsprechend keine Kupplungseffizienz beobachtet werden. Von einer erfolgreichen Synthese wurde jedoch ausgegangen, wenn die folgenden Nucleoside eine erfolgreiche Kupplung zeigten. Der schlussendliche Beweis für den erfolgreichen Einbau lieferte die Massenspektrometrie. Die Abspaltung vom Festphasenmaterial und die Basenentschützung erfolgte mit wässriger Ammoniak-Lösung und Ethanol (3:1) für 24 Stunden bei 40°C. Für die Entschützung der 2'-OH-Funktion wurde das Oligonucleotid in einem N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)/TEA/Et<sub>3</sub>N-3HF-Gemisch für 90 Minuten bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Entsalzung mittels Butanol-Ausfällung. Das Oligonucleotid wurde erst über Ionenaustausch-Chromatographie (AE-HPLC) und anschließend über RP-HPLC gereinigt. Anschließend erfolgte eine erneute Ausfällung in Ethanol, um, für Zellen toxische, TEAA-Reste zu entfernen. Um den evtl. störenden Effekt durch die NDBF-Schutzgruppe



möglichst gering zu halten, wurde die Sequenz jeweils mit nur einer Modifikation an unterschiedlichen Positionen synthetisiert. Folgende Sequenzen wurden hergestellt:

**Tabelle 11.** In dieser Arbeit hergestellte NDBF-modifizierte RNA-Sequenzen. **RNA7 – RNA 11** wurden mit **RNA1** zu doppelsträngigen siRNAs hybridisiert.

RNA	Sequenz
RNA7	5'-GUU CAC CUU GAU GCC AUU CdTdT -3'
RNA8	5'-GUU CAC CUU GAU GCC AUU CdTdT -3'
RNA9	5'-GUU CAC CUU GAU GCC AUU CdTdT -3'
RNA10	5'-GUU CAC CUU GAU GCC AUU CdTdT -3'
RNA11	5'-GUU CAC CUU GAU GCC AUU CdTdT -3'

5'- GAAUGGCAUCAAGGUGAACdTdT -3' siRNA4  
 3'- dTdTTCUUACCGUAGUCCACUUG -5'

5'- GAAUGGCAUCAAGGUGAACdTdT -3' siRNA5  
 3'- dTdTTCUUACCGUAGUCCACUUG -5'

5'- GAAUGGCAUCAAGGUGAACdTdT -3' siRNA6  
 3'- dTdTTCUUACCGUAGUCCACUUG -5'

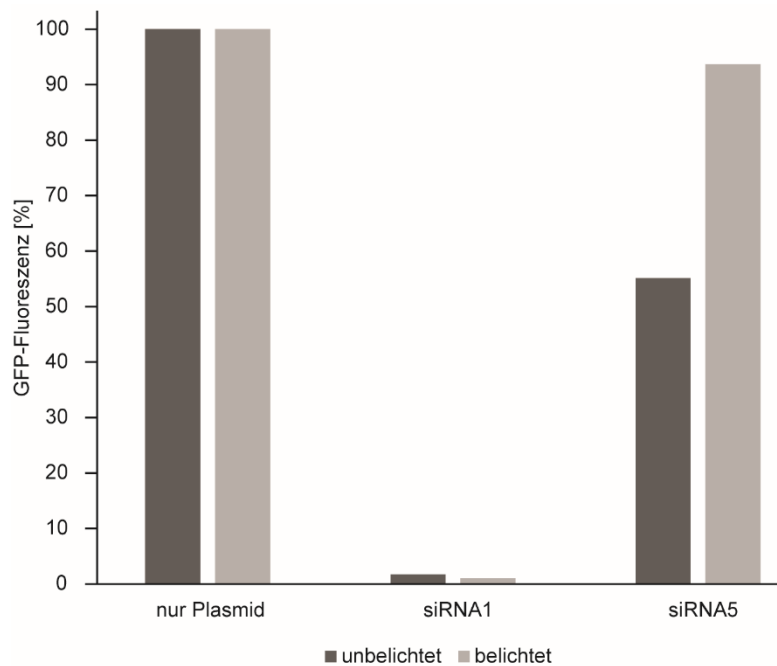
5'- GAAUGGCAUCAAGGUGAACdTdT -3' siRNA7  
 3'- dTdTTCUUACCGUAGUCCACUUG -5'

5'- GAAUGGCAUCAAGGUGAACdTdT -3' siRNA8  
 3'- dTdTTCUUACCGUAGUCCACUUG -5'

**U** = NDBF-modifiziertes rU    **■** = Schnittstelle an komplementärer mRNA    **■** = Seed-Region

Um reife, doppelsträngige siRNAs zu erhalten, wurden die modifizierten siRNA-Leistränge **RNA7 – RNA11** mit dem komplementären siRNA-Folgestrang **RNA1**, durch gemeinsames Aufheizen auf 90 °C für 1 Minute und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur, hybridisiert.

In Hinblick auf die RNA-Festphasensynthese mit den diastereomerenreinen NDBF-rU-Phosphoramiditen und Ressourcenschonung wurde ein erstes Zellexperiment durchgeführt. Damit sollte der Einfluss des modifizierten rU-Bausteins auf die siRNA-Funktion geklärt und überprüft werden, ob grundsätzlich die Inhibierung der Genexpression auf diesem Wege realisierbar ist. Die Zellexperimente wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden Belichtungstests eingeführt. Dafür wurden die Experimente in doppelter Ausführung durchgeführt und die eine Hälfte der Zellen nach 4-stündiger Transfektion belichtet (365 nm, 5 Minuten, 9  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ). Die Fluoreszenz wurde nach Zellyse quantifiziert. **siRNA4, 6, 7** und **8** zeigten keinerlei Inhibierungseffekt in Bezug auf die GFP-Expression. Lediglich **siRNA5** konnte die GFP-Expression auf ca. die Hälfte reduzieren (Abbildung 97).



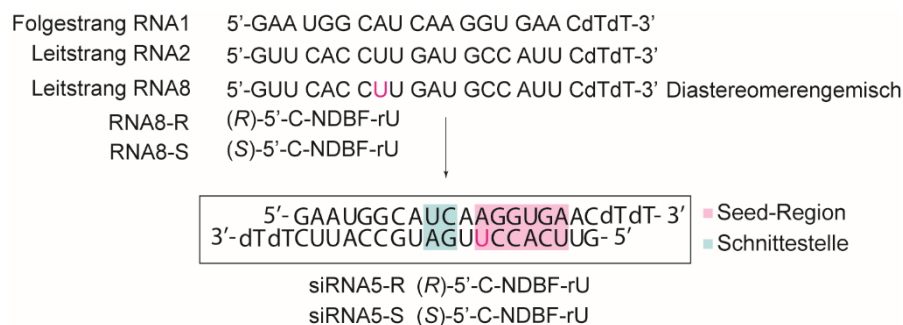
**Abbildung 97.** Inhibierung der AcGFP-Expression in HeLa-Zellen mit modifizierter **siRNA5**. Die GFP-Fluoreszenz wird durch **siRNA5** um ca. 50% reduziert. **SiRNA4, 6, 7** und **8** zeigen keinen inhibierenden Effekt auf die GFP-Expression und wurden daher nicht dargestellt. GFP-Werte wurden normalisiert auf die RFP-Fluoreszenz von DsRed.

Zunächst erscheinen die Ergebnisse nicht überragend gut. Doch sind sie keinesfalls überraschend. Das einige siRNA-Sequenzen, in Anhängigkeit der Modifikations-Position, keine ausreichend Aktivität zeigen, war zu erwarten. Die Modifikation, der NDBF-Chromophor, ist nicht besonders klein und kann daher einen störenden Effekt auf die RNA-Protein-Interaktionen, welche meist nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip funktionieren, ausüben. **SiRNA5** vermag die GFP-Fluoreszenz um  $\approx 50\%$  zu reduzieren. Damit ist sie zwar nicht annähernd so effizient, wie die entsprechend unmodifizierte Sequenz **siRNA1**, aber es gilt zu bedenken, dass es sich hierbei, in Bezug auf die Modifikation, um ein Diastereomergemisch handelt. (*R*)-NDBF- und (*S*)-NDBF-siRNA können, aufgrund ihrer unterschiedlichen räumlichen Orientierung, eine unterschiedlich starke Effizienz aufweisen. Davon muss sogar ausgegangen werden, da die anderen modifizierten siRNAs zeigen, wie empfindlich sich die Aktivierung der RNA-Interferenz auf unterschiedliche Modifikationen verhält. Zusätzlich gilt zu bedenken, dass die (*R*)- und (*S*)-Konformation des Phosphoramidits **65** einer unterschiedlich starken Kupplungseffizienz unterliegen können.

Dass ausgerechnet eine siRNA-Sequenz, mit Modifikation innerhalb der funktionsbestimmenden Seed-Region (Position U-8 des siRNA-Leitstrangs), die Inhibierung der Expression auslöst, ist erstaunlich. Wie bereits im Theorieteil erwähnt, hat sich in früheren Studien vor allem die Seed-Region als unflexibel gegenüber Modifikationen erwiesen. Häufig führten selbst kleine Modifikationen zu einer kompletten Inaktivierung der siRNA-Funktion. Meist waren diese aber Teil

der Duplex-Struktur der siRNA. Der hier entwickelte Nucleosid-Baustein sollte aufgrund der Fähigkeit stabile Duplexe auszubilden, keinen Einfluss auf die Struktur ausüben. Er ragt aus der Duplex-Struktur heraus. Vorausgesetzt die Schutzgruppe verhindert nicht die Protein-Wechselwirkung im RISC-Komplex, so ist eine funktionsfähige siRNA, auch mit Modifikation in der Seed-Region, denkbar. Interessant erscheint die Position, wenn man die geplante Photolyse miteinbezieht. Der lichtinduzierte Strangbruch an dieser Position führt zu einer Spaltung der Seed-Region, wodurch ein wichtiger funktionsbestimmender Teil der RNA-Interferenz gestört wird.

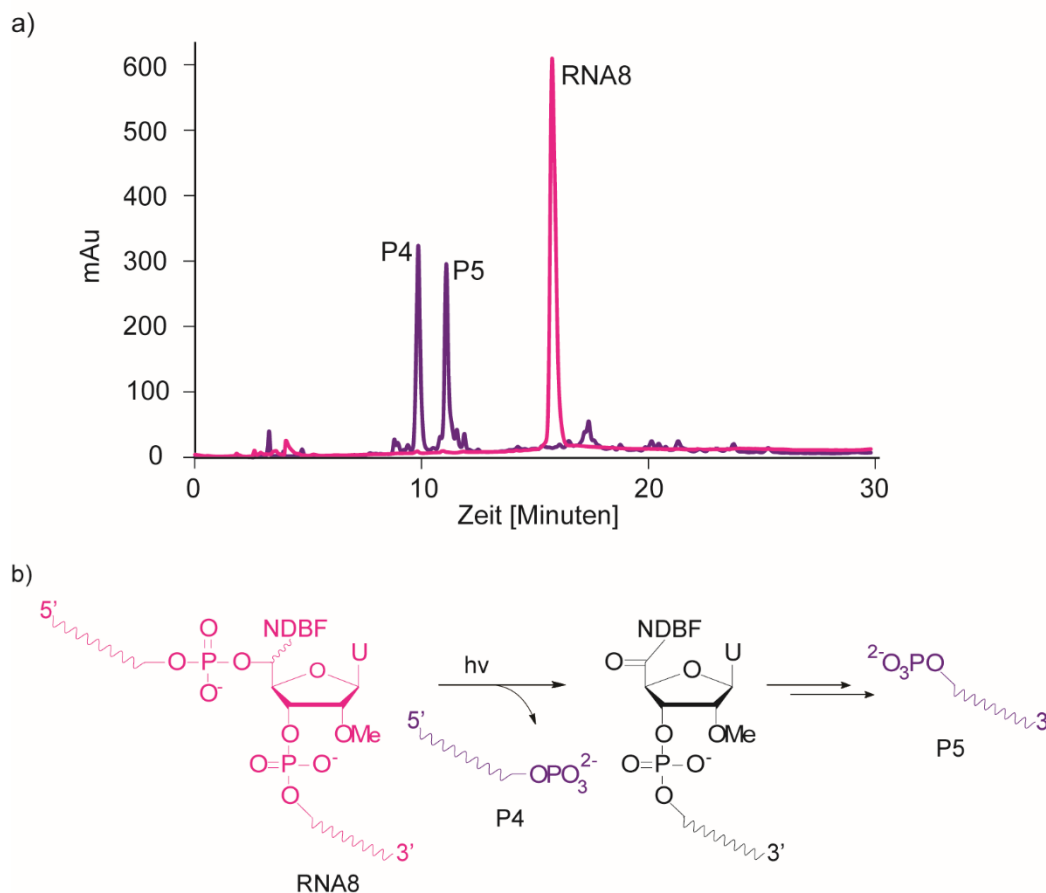
**siRNA5** besitzt das Potential, eine ausreichend hohe Inhibierung der Genexpression des Zielgens zu erreichen. Im weiteren Verlauf dieses Projektes wurden daher die Diastereomeren-getrennten Phosphoramidite **65-R** und **65-S** ebenfalls mittels Festphasensynthese in siRNA integriert (Abbildung 98). Der Einbau und die Aufreinigung erfolgten entsprechend vorher beschriebener Prozedur.



**Abbildung 98.** Inkorporation der diastereomerenreinen NDBF-rU-Bausteine in siRNA5 zu siRNA5-R und siRNA5-S

#### 3.2.3.4 Charakterisierung des NDBF-rU-Bausteins in RNA

Anhand einzelsträngiger modifizierter RNA wurde das Photolyseverhalten des NDBF-rU-Bausteins untersucht. **RNA8** wurde dafür repräsentativ für alle anderen Sequenzen gewählt. Die RNA-Proben wurden unter physiologischen Bedingungen bei 365 nm belichtet (3 Minuten) und anschließend über RP-HPLC mit unbelichteten Proben verglichen (Abbildung 99 a)). Die Belichtung resultierte in einer kompletten Abnahme des Startmaterials (Minute 16) und der Entstehung zwei neuer Signale (Minute 10 und 11). Die beiden Photoprodukte **P4** und **P5** wurden massenspektrometrisch untersucht und identifiziert. Die Photolyse des NDBF-rU-Bausteins verhält sich nach dem in Abbildung 99 b) dargestellten Reaktionspfad.



**Abbildung 99.** Photolyse des NDBF-rU-Bausteins. a) HPLC-Chromatogramme belichteter und unbelichteter **RNA8**-Proben (365 nm, 3 Minuten) b) Photolysereaktion von NDBF-rU, ermittelt anhand massenspektrometrisch bestimmter Photolyseprodukte **P4** und **P5**

Nach Anregung des NDBF-Chromophors kommt es zwischen dem 5'-Sauerstoff und dem 3'-seitigen RNA-Strang zum Bindungsbruch. Der 3'-seitige Oligonukleotidstrang wird dabei mit einem phosphorylierten Ende freigesetzt. Aufgrund den Erfahrungen, die beim Photolyseverhalten des Cumarin-Linkers aus dem ersten Projektteil gesammelt werden konnten, wird angenommen, dass der NDBF-Chromophor zunächst am restlichen Oligonukleotidstrang gebunden bleibt, bevor dieser ebenfalls abgespaltet wird und einen 5'-seitigen Oligonukleotidstrang mit phosphoryliertem Ende (**P5**) freisetzt. Dieses Verhalten konnten Dussy *et al.* ebenfalls an ihrem Nitrobenzyl-modifizierten DNA-Baustein beobachten und die Nitrobenzyl-modifizierte Oligonukleotid-Zwischenstufe, sowohl über HPLC als auch massenspektrometrisch, nachweisen. In diesem Projekt ist die NDBF-modifizierte Oligonukleotid-Zwischenstufe im HPLC-Chromatogramm nicht detektierbar. Vermutlich ist diese wesentlich instabiler und kurzlebiger als die entsprechende Nitrobenzyl-DNA-Variante.

Um den Einfluss der eingeführten Modifikation besser beurteilen zu können, wurde eine Schmelzpunktstudie angeschlossen. Dazu wurden die, in Bezug auf die Schutzgruppe, diastereomerenreinen siRNA-Sequenzen verwendet, um einen eventuellen destabilisierenden

Effekt, verursacht durch die räumliche Anordnung des NDBFs, zu erkennen. **siRNA5-R** und **5-S** wurden in PBS-Puffer vermessen und mit der entsprechenden unmodifizierten **siRNA1** verglichen. Wie bereits im ersten Projektteil (Kapitel 3.1.2) wurde dafür ein UV-Vis-Spektrometer verwendet, welches die Adsorptionsänderung des RNA-Duplex bei Temperaturveränderung aufzeichnet. Die folgende Tabelle zeigt die gemessenen Schmelzpunkte.

**Tabelle 12.** Schmelzpunkte der unmodifizierten **siRNA1** und der NDBF-rU-modifizierten **siRNA5-R** und **siRNA5-S**

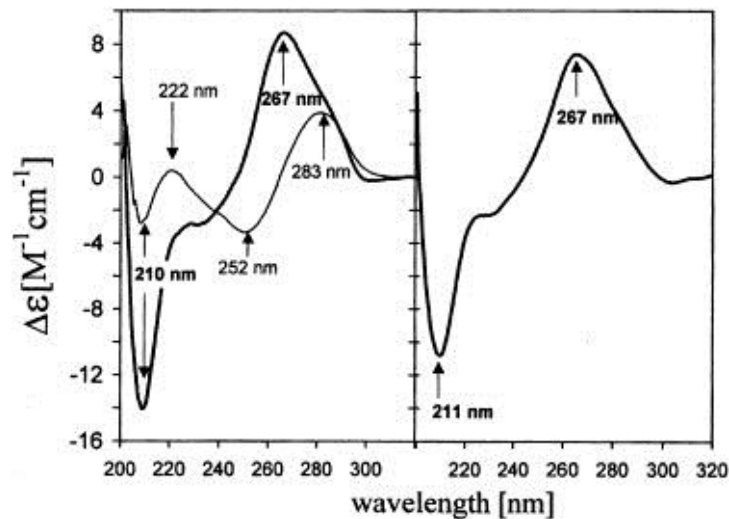
RNA	T <sub>m</sub> [°C]	ΔT <sub>m</sub> [°C]
siRNA1	64.7 ± 1.6	
siRNA5-R	58.6 ± 1.7	6.1
siRNA5-S	59.4 ± 3.6	5.3

Beide NDBF-modifizierten siRNA-Sequenzen weisen lediglich eine geringe Schmelzpunktniedrigung im Vergleich zur entsprechenden unmodifizierten siRNA auf. Dies zeigt, dass die NDBF-Modifikation, sowohl in der (*R*)- als auch der (*S*)-Konformation, einen geringen destabilisierenden Effekt auf die siRNA-Doppelhelix Struktur ausübt. Der geringe Einfluss auf die Struktur ist vermutlich eine Konsequenz aus der Möglichkeit, Wasserstoffbrückenbindungen zu komplementären Basen auszubilden. Dadurch wird nur eine minimale, lokale Störung verursacht, welche sich kaum auf die Duplexstabilität auswirkt.

Die Sekundärstruktur der NDBF-modifizierten siRNA wurde mittels CD-Spektroskopie näher untersucht. Mit dieser Methode kann die Helixformation von Nukleinsäuren bestimmt werden. Dabei wird linear polarisiertes Licht verwendet, das durch Überlagerung zweier gegenläufiger, rechts und links zirkular polarisierter Komponenten mit gleicher Phase und Frequenz entsteht. Wenn dieses Licht auf eine optisch aktive (chirale) Substanz trifft, so werden beide Komponenten des Lichts unterschiedlich adsorbiert und es kommt zur Entstehung von elliptisch polarisiertem Licht. Die Elliptizität ist die eigentliche Messgröße der CD-Spektroskopie. Sie verhält sich proportional zur Absorptionsdifferenz der rechts und links zirkular polarisierten Lichtwellen und wird in Abhängigkeit der Wellenlänge dargestellt. Eine positive Bande im Spektrum bedeutet, dass die linke Komponente stärker absorbiert. Umgekehrt führt eine stärkere Absorption der rechten Komponente zu einer negativen Bande.

Die Hauptursache der optischen Aktivität von Nukleinsäuren liegt in der asymmetrischen Positionierung der Purin- und Pyrimidinreste. Üblicherweise werden CD-Spektren für Nukleinsäuren in einem Wellenlängenbereich von 200-280 nm aufgenommen, da die Basen in diesem Bereich adsorbieren. Daher geben diese die Art der Basenstapelung wieder, welche vor allem von der Konformation des Stranges, aber auch vom Nukleinsäuretyp und der Anzahl der Stränge (Einzel- oder

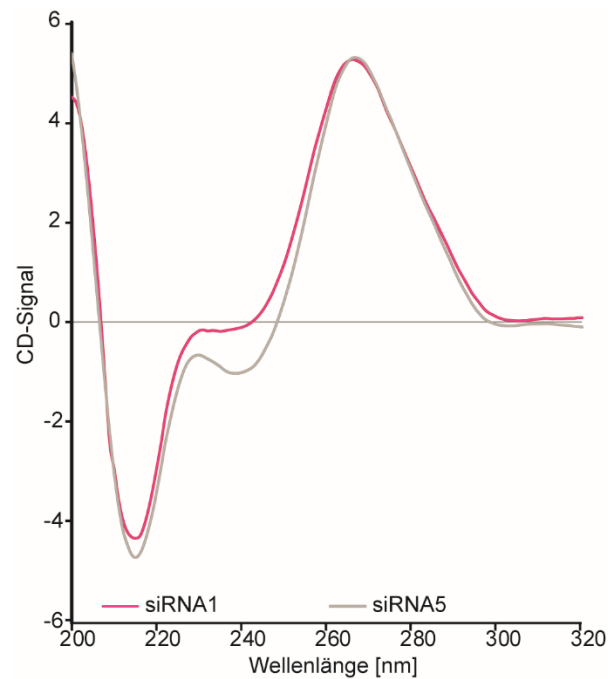
Doppelstrang), abhängt. Die rechtsgängigen A- und B-Helices von Nukleinsäuren können im CD-Spektrum erkannt und auseinander gehalten werden. Die unterschiedlichen Kurvenverläufe sind in der folgenden Abbildung<sup>250</sup> gegenüber gestellt



**Abbildung 100.** CD-Spektrum von DNA-A- und B-Helix (links) und RNA-A-Helix (rechts). Der Kurvenverlauf der A-Helix weist ein Maximum bei 267 nm und ein Minimum bei 210 nm auf. Das Maximum der B-Helix liegt bei 283 nm. Abbildung entnommen aus Kypr et al.<sup>250</sup>

Üblicherweise liegt der siRNA/mRNA-Duplex in der A-Form vor, welche allerdings für die Funktion der RNA-Interferenz nicht zwingend erforderlich ist.<sup>249</sup> Bei dieser Untersuchung sollte der Einfluss der NDBF-Modifikation auf die Sekundärstruktur untersucht werden. Zur Bestimmung wurde eine 1  $\mu$ M **siRNA5**-Lösung verwendet und mit **siRNA1** verglichen.

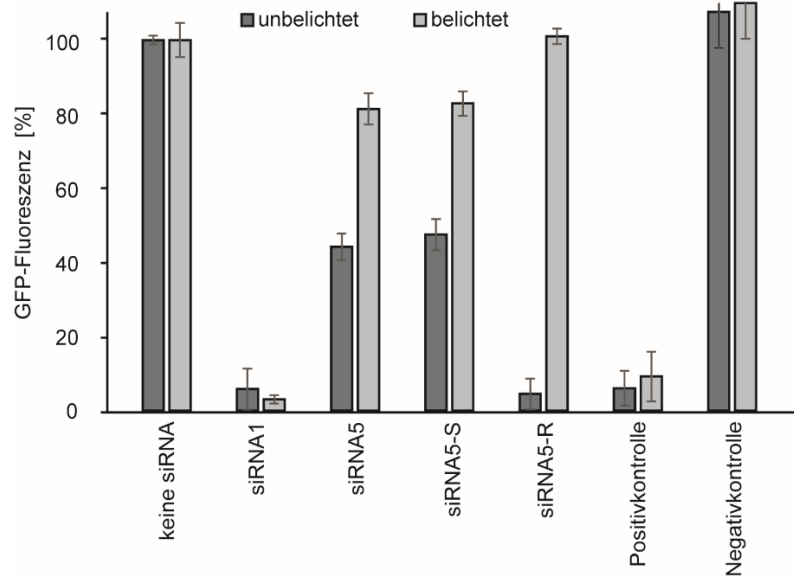
Abbildung 101 gibt die aufgenommenen Daten wieder. Es zeigte sich, dass die beiden siRNAs, abgesehen von der kleinen Abweichung im Wellenlängenbereich von  $\approx 230$  nm, ein nahezu identisches CD-Signal lieferten. Die NDBF-modifizierte siRNA zeigte den typischen Kurvenverlauf einer RNA-A-Helix. Die Modifikation übt lediglich einen geringen Einfluss auf die Gesamtstruktur des siRNA-Duplex aus. Eine lokale Störung der Modifikation oder die RNA-Protein-Wechselwirkungen könne mit dieser Methode nicht beurteilt werden.



**Abbildung 101.** CD-Spektrum von NDBF-modifiziertem siRNA Duplex **siRNA5** verglichen mit unmodifizierter **siRNA1**

### 3.2.3.5 Zellexperimente mit NDBF-modifizierter siRNA

Abschließend wurde die Funktion der Diastereomeren-reinen siRNAs in Bezug auf RNAi-Regulation in HeLa-Zellen getestet. Die zuvor beschriebenen Assay-Bedingungen wurden verwendet. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Die AcGFP-Fluoreszenz wurde auf die RFP-Fluoreszenz normiert. Die Positivkontrolle (*silencer*<sup>TM</sup> GFP siRNA von *ThermoFisher*) diente der Transfektionskontrolle. Die Transfektion unmodifizierter **siRNA1** diente zur Bestimmung der maximal, möglichen Inhibierungsstärke. Zellen, welche ohne siRNA-transfiziert wurden, lieferten die maximalen Fluoreszenzwerte, die auf 100% gesetzt wurden. Unbelichtete Zellen wurden, bis auf die Belichtung selbst, der gleichen Prozedur wie belichtete Zellen unterworfen. Eine ausführliche Arbeitsvorschrift befindet sich in Kapitel 4 „Material und Methoden“.



**Abbildung 102.** Photochemische Kontrolle der siRNA-regulierten AcGFP-Expression. HeLa-Zellen wurden unter Verwendung von Metafectene mit AcGFP-N1, pDsRed Express und modifizierten oder unmodifizierten siRNAs transfiziert. 4 Stunden nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch DMEM getauscht. Zellen wurden entweder belichtet (5 Minuten, 365 nm, 9  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) oder unbehandelt gelassen. 48 Stunden später wurden die Zellen lysiert und die Fluoreszenz im Zellysate bestimmt.

Die in Abbildung 102 dunkelgrauen Balken zeigen die Ergebnisse der nicht belichteten Proben. Wie vorher schon gezeigt werden konnte, führte **siRNA1** eine zuverlässige und effektive Genabschaltung durch RNA-Interferenz aus. Die AcGFP-Fluoreszenz konnte auf 5% minimiert werden. **siRNA5** (Diastereomeregemisch) führt zu einer Absenkung der GFP-Fluoreszenz auf 44%. Interessant erscheint das unterschiedliche, aber vermutete Verhalten der beiden diastereomerenreinen siRNAs **siRNA5-R** und **siRNA5-S**. Beide siRNAs besitzen die gleiche Sequenz und unterscheiden sich lediglich in der räumlichen Anordnung der eingeführten photospaltbaren NDBF-Schutzgruppe. **siRNA5-R** zeigt eine effektive Genabschaltung, vergleichbar mit der unmodifizierten Sequenz **siRNA1**. Im Gegensatz dazu ist die Funktion von **siRNA5-S** wesentlich weniger effektiv. Die GFP-Fluoreszenz konnte nur auf 48% reduziert werden. Dies bestätigt die Vermutung, dass eine der Diastereomerenformen besser und einfacher von den Argonaut-Proteinen des RISC akzeptiert und aufgenommen wird, als die andere Form. In diesem vorliegenden Fall liegt die Vermutung nahe, dass die NDBF-Modifikation mit der R-Konformation an der Position U-8 der siRNA-Sequenz perfekt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip in die Protein-Bindetasche des RISC-Komplexes passt. Die S-Konformation scheint weniger gut zu passen, führt aber dennoch zu keiner vollständigen Inaktivierung der siRNA-Sequenz. Man kann daher davon ausgehen, dass auch die Schutzgruppe in (S)-Konformation mit dem RISC-Komplex interagieren kann. Vermutlich passiert die Bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip nicht optimal, dennoch interagieren Protein und siRNA mit schwächeren Wechselwirkungen unter einem anteiligen Verlust der Funktion. Daraus kann geschlossen werden, dass je nach Sequenz und

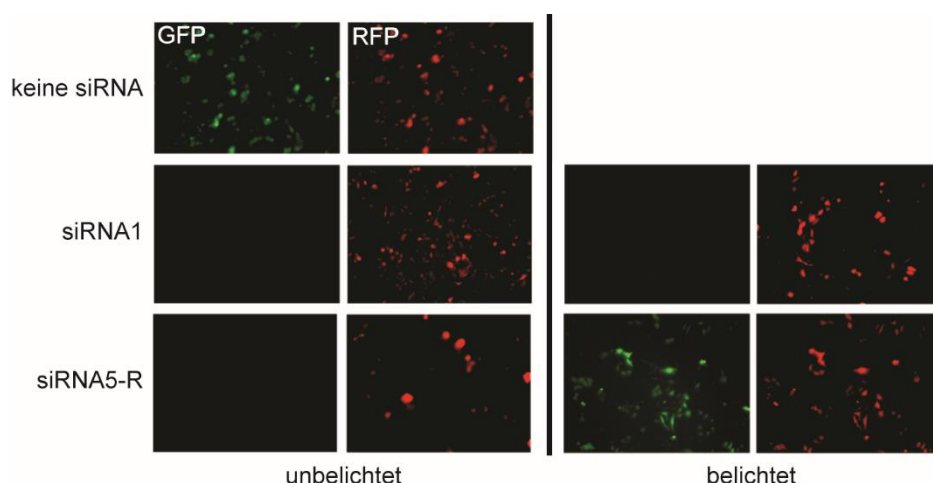


Anwendung eine systematische Überprüfung der optimalen Position und Schutzgruppen-Konformation notwendig wird.

Nach Belichtung (hellgraue Balken) mit Licht bei 365 nm zeigen beide NDBF-modifizierten siRNAs einen Anstieg der GFP-Fluoreszenz. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Lichtstimulus einen RNA-Strangbruch verursacht, welcher die siRNA-Funktion inaktiviert. Wie bereits in Abschnitt 3.2.3.3 erörtert, führt die Photolyse zu einem Strangbruch innerhalb der Seed-Region, welche für die Funktionsfähigkeit der siRNA eine entscheidende Rolle spielt. **siRNA5-R** konnte durch Belichtung so effizient deaktiviert werden, dass die maximale GFP-Fluoreszenz (100%) beobachtet werden konnte. **siRNA5-S** zeigte nach Photolyse eine Fluoreszenz von 83%. Nichtsdestotrotz hat **siRNA5-R** das bessere An/Aus-Verhalten.

Abschließend wird noch darauf hingewiesen, dass diese guten Resultate nur mit siRNAs von hohem Reinheitsgrad ermittelt werden konnten. Diese Experimente wurden mehrfach durchgeführt, aber erst nach mehrmaliger Aufreinigung der siRNAs (HPLC und Ausfällung) konnten gute regulatorische Effekte erzielt werden. Verunreinigungen in den siRNA-Proben führten zu gesenkten siRNA-Effizienzen und einem wesentlich schlechteren An/Aus-Verhalten. Vor allem Langzeit-gelagerte siRNA-Proben zeigten diese Eigenschaften und mussten nochmals aufgereinigt werden.

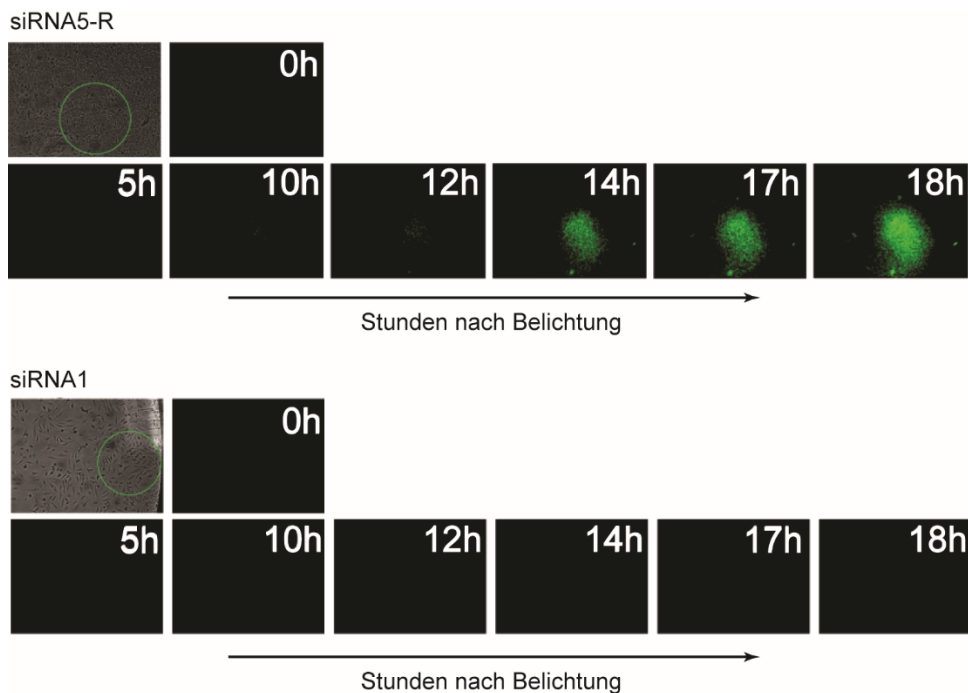
Um die gezeigten Ergebnisse zu visualisieren, wurden zusätzlich Fluoreszenzaufnahmen der siRNA-transfizierten HeLa-Zellen gemacht. Es wurden sowohl belichtete als auch unbelichtete Zellen miteinander verglichen. Die Aufnahmen wurden 48 Stunden nach Transfektion aufgenommen. Transfiziert wurde **siRNA1** und **siRNA5-R**. Die visualisierten Daten bestätigten die Ergebnisse der Zelllyse.



**Abbildung 103.** Fluoreszenzaufnahmen von siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. Zellen wurden unter Verwendung von Metafectene mit AcGFP-N1, pDsRed Express und modifizierten oder unmodifizierten siRNAs transfiziert. 4 Stunden nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch DMEM getauscht. Zellen wurden entweder belichtet (5 Minuten, 365 nm, 9  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) oder unbehandelt gelassen. 48 Stunden später wurden die Fluoreszenzaufnahmen der Zellen aufgenommen.

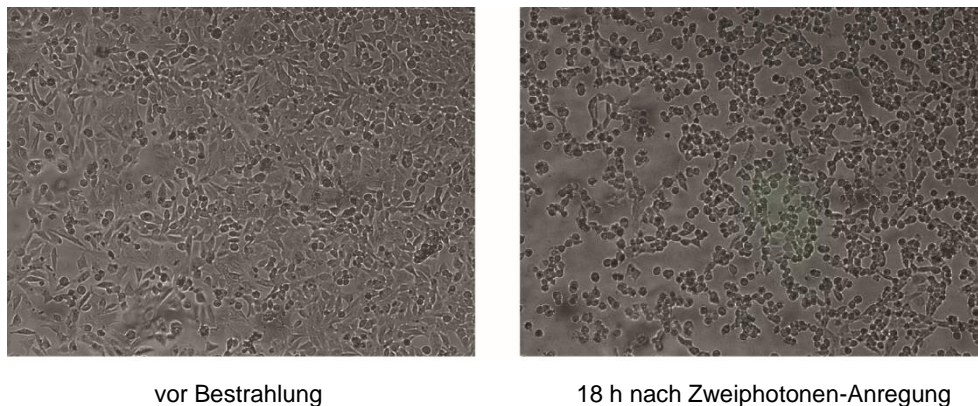
Abschließend soll noch ein kleines Experiment zur Zweiphotonen-Anregung *in vivo* gezeigt werden. Wie bereits im ersten Projektteil erwähnt, waren die verwendeten Laseraufbauten nicht geeignet, um Zellen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren und zu beobachten. Dies lag vor allem daran, dass die Zellbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) in den Räumlichkeiten nicht zur Verfügung standen. Zwar konnten die Zellen für kurze Zeit belichtet oder Aufnahmen genommen werden, doch eine Langzeituntersuchung unter dem Mikroskop war nur unter Verminderung der Zellvitalität durchführbar. Die Zellen mussten daher zur Lagerung in den Brutschrank und konnten lediglich zur Aufnahme der Fluoreszenz auf das Mikroskop gelegt werden. Darauf soll hier explizit hingewiesen werden, um klar zu stellen, dass die experimentellen Bedingungen der folgenden Untersuchung nicht optimal waren. Die Schwierigkeit dabei bestand im Wiederauffinden der gleichen, belichteten Stelle. Um dies zu vereinfachen wurden Markierungen in die Zellkulturgefäße geritzt, welche bei Aufnahme immer gleich positioniert wurden. So konnte sichergestellt werden, dass bei jeder Aufnahme der gleiche Zellbereich erfasst wurde.

Zur Zweiphotonen-Aktivierung der RNA-Interferenz *in vivo* wurden HeLa-Zellen mit AcGFP-N1 und modifizierter **siRNA5-R** transfiziert. Als Kontrollexperiment wurden Zellen mit **siRNA1** transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit einem Titan-Saphir-Laser mit 800 nm (10 mW) in einem kreisrunden Ausschnitt bestrahlt. Anschließend wurden in stündlichen Abständen Fluoreszenzaufnahmen genommen, um den Anstieg der AcGFP-Fluoreszenz zu verfolgen. Diese sind in Abbildung 104 dargestellt.



**Abbildung 104.** Zweiphotonen-Desaktivierung der RNA-Interferenz und Induzierung der AcGFP Expression. **siRNA5-R** wurde in Zellen transfiziert und anschließend mit einem Laser (800 nm, 10 mW) desaktiviert. Innerhalb der belichteten Region konnte ein Ansteigen der AcGFP-Fluoreszenz ermittelt werden.

Innerhalb des bestrahlten Bereichs ist eine eindeutige Fluoreszenzzunahme erkennbar. Außerhalb des Bereichs konnte keine neu entstandene Fluoreszenz detektiert werden. Anhand der Negativkontrolle **siRNA1** wurden Nebeneffekte, beispielsweise die Inaktivierung der siRNA durch thermische Energie, ausgeschlossen. Wir können daher davon ausgehen, dass die siRNA-Desaktivierung durch regionale Zweiphotonen-Anregung ausgelöst wurde. Trotz der eingeschränkten experimentellen Bedingungen konnte die Zweiphotonen-Aktivierung *in vivo* gezeigt werden. Die Bedingungen sind aber durchaus optimierbedürftig. Aufgrund der Handhabung mit den Zellen, diese zur Fluoreszenzaufnahme regelmäßig aus dem Brutschrank zu nehmen, kommt es zu plötzlichen Temperaturschwankungen und zu Stressreaktionen. Innerhalb der 18 Stunden konnte eine abfallende Zellvitalität beobachtet werden. Diese ist in Abbildung 105 dargestellt.



**Abbildung 105.** Darstellung der Zellen im Durchlicht vor und 18 Stunden nach Belichtung

Um die gezeigten Ergebnisse zu bestätigen erscheint, für zukünftige Experimente, eine Wiederholung unter optimierten Bedingungen sinnvoll.

### 3.2.4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit gelang die diastereomerenreine Synthese eines neuen photospaltbaren RNA-Bausteins, welcher die Fähigkeit besitzt, stabile Duplexe zu bilden und spezifische Strangbrüche nach Belichtung auszulösen. Die Modifikation bestand aus der Zweiphotonen-aktiven Schutzgruppe NDBF, welche an der 5'-O-Position eines Ribo-Uridins gekuppelt wurde. Als Phosphoramidit konnte der neue Baustein problemlos in mehrere siRNA-Sequenzen integriert werden. Anhand von Schmelzpunkt und CD-Studien wurde der geringe Einfluss der Modifikation auf Duplexstruktur und -stabilität nachgewiesen. In Belichtungsexperimenten konnte mittels RP-HPLC eine saubere Photolyse innerhalb kurzer Bestrahlungszeiten gezeigt werden. In Zellkulturexperimenten wurden

die modifizierten siRNA-Sequenzen eingesetzt, um den Prozess der RNAi mit Licht zu kontrollieren. Dabei sollten die modifizierten siRNA-Sequenzen zunächst aktiv vorliegen und nach Photolyse durch einen Strangbruch deaktiviert werden. Zur Durchführung und Auswertung wurde ein duales Fluoreszenz-Reportergen-Assay verwendet. Dazu wurden zwei Plasmide verwendet. Die Expression des einen Vektors (AcGFP-N1) wurde durch siRNAs reguliert. Das Gen des anderen Vektors (pDsRed-Express) sollte unabhängig davon und immer gleichbleibend exprimiert werden, sodass eine Normierung darauf erfolgen konnte.

*In vivo*-Experimente zeigten, dass die Regulation der RNAi mittels Licht und dem neuen RNA-Baustein stark von der Modifikations-Position und der –Konformation anhängig ist. Lediglich mit einer siRNA-Sequenz, welche die Modifikation an Position 8 (innerhalb der Seed-Region) trägt, konnte der gewünschte Effekt realisiert werden. Wurde die Modifikation an anderen Positionen der siRNA integriert, so resultierte dies in einer Inaktivierung der siRNA-Sequenz noch vor Photolyse. Ebenfalls wurde gezeigt, dass auch die räumliche Orientierung der Modifikation (Konformation) eine entscheidende Rolle spielt. Die beiden Konformationen (*R*)- und (*S*)-5'-*O*-NDBF-rU zeigten eine unterschiedlich starke siRNA-Aktivität. Mit der (*R*)-Konformation konnte eine Effizienz, vergleichbar mit der unmodifizierten siRNA, erreicht werden. Die Ergebnisse sind allerdings nicht ungewöhnlich. Im Zusammenspiel von siRNA, mRNA und RISC-Komplex sind exakte, teilweise räumlich passgenaue, Interaktionen notwendig, um die RNAi zu induzieren. Die Modifikation kann hier als Störung angesehen werden und je nach Lage und räumlicher Ausrichtung das komplette RNAi-System inhibieren. Lediglich bei einer genauen räumlichen Einfügung der Modifikation in die RISC-RNA-Wechselwirkungen wird ein funktionierendes System erreicht. Sicherlich sind die Ergebnisse nicht pauschal auf andere siRNA-Sequenzen übertragbar, sodass vor Anwendung genaue Studien über Modifikations-Position und –Konformation unerlässlich sind.

Mit der ermittelten modifizierte siRNA konnte ein An/Aus-verhalten der siRNA-Aktivität erreicht werden, sodass der die genaue Termination der RNAi möglich wird. Der Startpunkt der RNAi konnte bereits in früheren Studien durch Licht und photolabilen Schutzgruppen festgelegt werden.<sup>197</sup> In zukünftigen Studien wäre eine Kombination beider Projekte interessant, da sowohl Start- als auch Terminationspunkt unter Lichtkontrolle gebracht werden könnten. Besonders für therapeutische Anwendungen erscheint die sinnvoll.

## 4. Material und Methoden

### Allgemeine Arbeitstechniken der organischen Synthese

Reaktionen unter Inertbedingungen wurden unter Argonatmosphäre und mit wasserfreien Lösungsmitteln (gelagert unter 4 Å Molekularsieb) durchgeführt. Diese wurden mit einem Septum verschlossen, welche mit einem aufgesetzten Argon-gefüllten Ballon bestückt wurden. Alle hergestellten Verbindungen wurden bei -20 °C unter Argonatmosphäre gelagert.

### Reagenzien, Lösungsmittel und Puffer

Alle verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel für die chemische Synthese wurden über die Chemikalienausgabe der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt bezogen. Lösungsmittel wurden in der Qualität pro analysi (p.a.) verwendet. Lösungsmittel für die Oligonukleotidsynthesen wurden von der Firma *J.T.Baker* oder *Applied Biosystems* bezogen. Sämtliche wässrige Lösungen bzw. Puffer wurden mit Reinstwasser aus einer MilliQ-Plus der Firma *Merck Millipore* angesetzt.

Puffer wurden in folgenden Zusammensetzungen hergestellt und immer mit Reinstwasser auf das Endvolumen aufgefüllt:

#### PBS-Puffer 1 L

8 g NaCl (137 mM)  
 200 mg KCl (2.7 mM)  
 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100 mM)  
 240 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 mM)

#### TBE-Puffer 1 L

10.8 g Tris-Base (89 mM)  
 5.5 g Borsäure (89 mM)  
 700 mg EDTA-Na<sub>2</sub> (2 mM)

#### 10 x TBS-Puffer pH 7.6, 1 L

24 g Tris-HCl  
 5.6 g Tris-Base (Tris-Endkonzentration 20 mM)  
 88 g NaCl (150 mM)

pH-Wert einstellen mit konz. HCl oder NaOH

#### TBST-Puffer (0.1% Tween) 100 ml

10 ml TBS 10x  
 100 µl Tween 20

10 x Transfer-Puffer 1 L (Western-Blot)

30.3 g Tris-Base

144.1 g Glycin

1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 100 ml

18.15 g Tris-Base

pH-Wert einstellen mit 6N HCl

1x Transfer-Puffer 100 ml (Western-Blot)

10 ml 10 x Transfer-Puffer

10 ml Isopropanol

0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 100 ml

6 g Tris-Base

pH-Wert einstellen mit 6N HCl

5 x Laemmli Lade-Puffer 20 ml

2 g SDS

10 ml Glycerol

4 ml 1.5M Tris-Cl pH 6.8

5 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol

1 ml 1%-iges Bromphenolblau

10 x PAGE-Laufpuffer pH 8.3, 1 L

30 g Tris-Base

144 g Glycin

10 g SDS

EMSA-Bindungs-Puffer 10 ml

0.5 ml 1M Tris-HCl pH 8 (50 mM)

3 ml 2.5 M KCl (750 mM)

50  $\mu$ l 0.5 M EDTA pH 8 (2.5 mM)50  $\mu$ l Triton-X 100 (0.5%)

7.87 g Glycerol (62.5%)

DTT (1mM, Zugabe immer frisch kurz vor Verwendung)

LB-Medium

10 g Trypton/Pepton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

LB-Medium mit Kanamycin

1% Glucose

50  $\mu$ g/ml Kanamycin

TFB1-Puffer

30 mM Kaliumacetat  
 50 mM Manganchlorid  
 100 mM Rubidiumchlorid  
 15% (v/v) Glycerin  
 Essigsäure bis pH 7.5

TFB2-Puffer

10 mM MOPS  
 75 mM Calciumchlorid  
 10 mM Rubidiumchlorid  
 15% (v/v) Glycerin  
 Natriumhydroxid bis pH 6.5

**Säulenchromatographie**

Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 der Firma *Machery-Nagel* (Korngröße 0.04-0.063 mm) verwendet. Lösungsmittel wurden in technischer Qualität verwendet, es sei denn es handelte sich um Phosphoramidite. In diesen Fällen wurden Lösungsmittel der Qualität p.a. benutzt.

**Dünnschichtchromatographie**

Die analytische Dünnschichtchromatographie diente zur Verfolgung des Reaktionsfortschritts bei der organischen Synthese. Dafür wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminium-Fertigfolien mit Fluoreszenzindikator (ALUGRAM Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>) der Firma *Machery-Nagel* oder *Merck* verwendet. Die Detektion erfolgte mit einer UV-Lampe und einer Wellenlänge von 254 oder 366 nm. Nukleosidbausteine wurden mit schwefelsaurer Anisaldehyd-Lösung (0.5 ml Anisaldehyd in 50 ml Essigsäure und 1 ml Schwefelsäure) angefärbt. Anschließend wurden die DC-Platten mit einem Heißluftfön erhitzt. Dabei verfärbte sich die Zuckereinheit blau bis braun.

**NMR-Spektroskopie**

Die hergestellten Verbindungen wurden mit 1D-NMR-Spektren charakterisiert. Teilweise erfolgte die Zuordnung der Signale mit Hilfe von 2D-NMR. Es wurden Spektren der Kerne <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (<sup>1</sup>H-Breitbandentkoppelt) und <sup>31</sup>P aufgenommen. Die Messungen der Spektren erfolgten an folgenden Spektrometern der Firma *Bruker*:

Bruker AM 250 (<sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz)

Bruker AV 400 (<sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz; <sup>13</sup>C-NMR: 101 MHz)

Bruker AV 500 (<sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz; <sup>13</sup>C-NMR: 126 MHz, <sup>31</sup>P-NMR: 203 MHz)

Als Lösungsmittel wurden DMSO-d<sub>6</sub> und CDCl<sub>3</sub>-d verwendet. Die Spektren wurden auf das Protonensignal des jeweiligen Lösungsmittels kalibriert. Chemische Verschiebungen werden in ppm relativ zum internen Standard Tetramethylsilan angegeben. Die Verschiebungen der <sup>31</sup>P-NMR-

Signale sind relativ zu 85%-iger Phosphorsäure angegeben. Die Multiplizitäten werden als s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), dt (Dublett vom Triplet), q (Quartett), pt (Pseudo-Triplet), pq (Pseudo-Quartett) und m (unbestimmtes Multiplet) abgekürzt.

### Massenspektrometrie

Für die ESI-Massenspektrometrie wurde ein Surveyor MSQ ESI Massenspektrometer der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Hochauflösende Massenspektrometrie wurde an einem MALDI LTQ Orbitrap XL der Firma *Thermo Fisher Scientific* durchgeführt. Als Matrix diente hierbei  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure. Oligonukleotide (200 pmol) wurden an einem microTOF-Q mit ESI-Quelle der Firma *Bruker* vermessen.

### UV-Vis-Spektroskopie

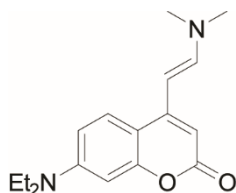
UV-Vis-Spektren wurden an einem Evolution 300 Spektrometer der Firma *Thermo Fisher Scientific* aufgenommen. Die Konzentrationen von Oligonukleotid-Lösungen wurden an einer NanoDrop 2000 der Firma *Thermo Fisher Scientific* durch Absorptionsmessungen bei 260 nm bestimmt.

### Fluoreszenzmessung

Die Fluoreszenz in Lösungen wurde in schwarzen Mikrotiterplatten an einem Infinite® 200 Pro Plate Reader der Firma *Tecan Trading AG* gemessen. Dazu wurde die Software Infinite® i-control V 3.22 verwendet.



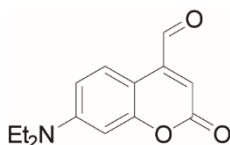
## 4.1 Organische Synthese

Synthese von 7-(Diethylamino)-4-[(E-2-(dimethylamino)vinyl)]cumarin **35****35**

$C_{17}H_{22}N_2O_2$   
286,38 g/mol

7-Diethylamino-4-methylcumarin (50 g, 216 mmol, 1eq.) wurde unter Argonatmosphäre in 200 ml abs. Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit DMF-Dimethylacetal (43.1 ml, 324 mmol, 1.5 eq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 8 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und für weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene gelbe Feststoff enthielt das reine Produkt. Dieser wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde direkt weiter verwendet.

Ausbeute: 61.1 g (214 mmol, 99%)

Synthese von 7-Diethylaminocumarin-4-carbaldehyd **36****36**

$C_{14}H_{15}NO_3$   
245,28 g/mol

Verbindung **35** (61.1 g, 214 mmol, 1 eq.) wurde in 800 ml THF/H<sub>2</sub>O (1:1) suspendiert. Natriumperodat (137 g, 641 mmol, 3 eq.) wurde zugegeben und die Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Kieselgel abfiltriert und

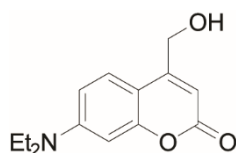
dieses mit Ethylacetat nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde aufgrund hoher Reinheit ohne weitere Aufreinigung für Folgereaktionen verwendet.

Ausbeute: 40.3 g (165 mmol, 77%)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10.08 (s, 1H, CHO), 8.20 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz, H5), 6.77 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz, <sup>4</sup>J = 2.7 Hz, H6), 6.63 (s, 1H, H3), 6.60 (d, 1H, <sup>4</sup>J = 2.7 Hz, H8), 3.44 (q, 4H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2 x CH<sub>2</sub>), 1.12 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2 x CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 194.3, 161.1, 156.8, 150.6, 143.8, 126.6, 115.9, 109.5, 103.3, 97.0, 44.0, 12.3 ppm.

### Synthese von 7-Diethylamino-4-methylhydroxycumarin 37



**37**

C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>  
247,29 g/mol

Verbindung **36** (33 g, 135 mmol, 1 eq.) wurde in Ethanol gelöst. Natriumborhydrid (2.6 g, 67.3 mmol, 0.5 eq.) wurde portionsweise unter starkem Rühren zugegeben. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 ml 2 M wässriger HCl-Lösung beendet. Das Reaktionsgemisch wurde mit H<sub>2</sub>O und Dichlormethan (DCM) verdünnt. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

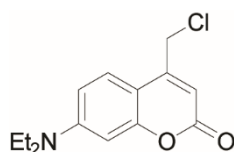
Ausbeute: 31.1 g (126 mmol, 94%)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.42 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, H5), 6.65 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J = 2.6 Hz, H6), 6.51 (d, 1H, <sup>4</sup>J = 2.6 Hz, H8), 6.06 (t, 1H, <sup>4</sup>J = 1.3 Hz, H3), 4.66 (d, 2H, <sup>4</sup>J = 1.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.41 (q, 4H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2 x CH<sub>2</sub>), 1.12 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2 x CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 161.2, 156.9, 155.6, 150.2, 125.1, 108.5, 105.7, 103.9, 96.8, 59.0, 44.0, 12.3 ppm.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 248.12812, gefunden 248.12843 (Δ*m* = 0.00031; Fehler: 1.25 ppm)

## Synthese von 7-Diethylamino-4-methylchlorcumarin 39



39

$C_{14}H_{16}ClNO_2$   
265,74 g/mol

Verbindung **37** (10 g, 40.4 mmol, 1 eq.) und Pyridin (4.3 ml, 52.6 mmol, 1.3 eq.) wurden in abs. DCM gelöst. *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (23.1 g, 121 mmol, 3 eq.) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O gestoppt und anschließend mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 1:1) aufgereinigt.

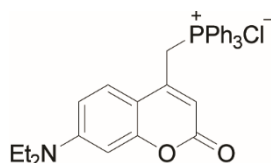
Ausbeute: 4.5 g (17.1 mmol 42%)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.58 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, H5), 6.74 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, <sup>4</sup>J = 2.6 Hz, H6), 6.54 (d, 1H, <sup>4</sup>J = 2.6 Hz, H8), 6.19 (s, 1H, H2), 4.9 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.43 (q, 4H, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2 x CH<sub>2</sub> NEt<sub>2</sub>), 1.12 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2 x CH<sub>3</sub> NEt<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 161.1, 156.5, 151.5, 151.0, 126.5, 109.2, 108.4, 105.9, 97.3, 44.4, 41.8, 12.7 ppm.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>ClNO<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 266.09423, gefunden 266.09452 (Δ*m* = 0.00029; Fehler: 1.09 ppm)

## Synthese von 7-Diethylaminocumarin-4-methylphosphoniumchlorid 40



40

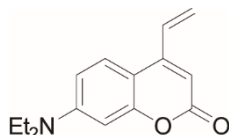
$C_{32}H_{31}ClNO_2P$   
528,03 g/mol

Verbindung **39** (4.5 g, 17.1 mmol, 1 eq.) und Triphenylphosphan (9 g, 34.2 mmol, 2 eq.) wurden in Acetonitril bei 85 °C für 12 Stunden erhitzt. Während dessen präzipitierte das Phosphoniumsalz. Die

abgekühlte Reaktionsmischung wurde filtriert und der Rückstand mit heißem Benzol zweimal gewaschen. Das gelbe Phosphoniumsalz wurde ohne weitere Aufreinigung für Folgereaktionen verwendet.

Ausbeute: 6.7 g (12.8 mmol, 75%)

#### Synthese von 4-Vinyl-7-diethylaminocumarin **44**



**44**

$C_{15}H_{17}NO_2$   
243,31 g/mol

Phosphoniumsalz **40** (6.7 g, 12.8 mmol, 1 eq.) wurde in 80 ml wässriger 37%-iger Formaldehyd-Lösung gelöst und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 10 ml einer wässrigen 15%-igen  $Na_2CO_3$ -Lösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 4:1) aufgereinigt.

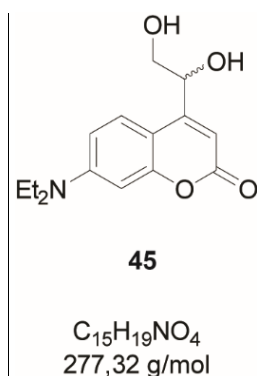
Ausbeute: 3.1 g (12.8 mmol, quantitative Umsetzung)

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 7.63 (d, 1H,  $^3J$  = 9.1 Hz, H5), 7.13 (dd, 1H,  $^3J$  = 11.0 Hz and 17.2, CH), 6.68 (dd, 1H,  $^3J$  = 9.1 Hz,  $^4J$  = 2.5 Hz, H6), 6.53 (d, 1H,  $^4J$  = 2.5 Hz, H8), 6.15 (s, 1H, H2), 6.12 (d, 1H,  $^3J$  = 17.2 Hz, H (CH<sub>2</sub>)), 5.7 (d, 1H,  $^3J$  = 11.0 Hz, H (CH<sub>2</sub>)), 3.42 (q, 4H,  $^3J$  = 7.0 Hz, 2 x CH<sub>2</sub> NEt<sub>2</sub>), 1.11 (t, 6H,  $^3J$  = 7.0 Hz, 2 x CH<sub>3</sub> NEt<sub>2</sub>) ppm.

$^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 161.5, 156.5, 150.9, 150.8, 130.8, 126.3, 123.6, 109.1, 103.3, 97.5, 44.4, 12.7 ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $C_{14}H_{18}NO_2^+$   $[M+H]^+$  244.13321, gefunden 244.13357 ( $\Delta m$  = 0.00036; Fehler: 1.47 ppm)

## Synthese von 4-(1,2-Dihydroxyethyl)-7-diethylaminocoumarin 45



Verbindung **44** (237 mg, 0.95 mmol, 1 eq.) und 4-Methylmorpholin-*N*-oxid (111 mg, 0.95 mmol, 1 eq.) wurden in einem H<sub>2</sub>O/Aceton-Gemisch (2:1) gelöst. Osmiumtetroxid (2% in H<sub>2</sub>O) wurde zugegeben. Aufgrund der hohen Toxizität des Osmiumtetroxids und der Tatsache dass dieses bei der Reaktion nur in katalytischen Mengen gebraucht wird, wurde auf eine genaue Dosierung verzichtet und pauschal 100 µl zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit konzentrierter Schwefelsäure neutralisiert. Das Aceton wurde unter Vakuum entfernt und die zurück gebliebene wässrige Lösung mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 1:1) aufgereinigt.

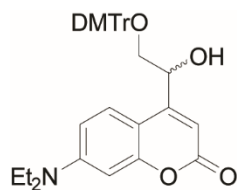
Ausbeute: 263 mg (0.95 mmol, quantitative Umsetzung)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 7.59 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 9.0 Hz, H5), 6.69 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J* = 9.0 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.4 Hz, H6), 6.52 (d, 1H, <sup>4</sup>*J* = 2.4 Hz, H8), 6.05 (s, 1H, H2), 5.56 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 4.4 Hz, CH), 4.88 (d, 2H, <sup>3</sup>*J* = 5.4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.42 (q, 4H, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 2 x CH<sub>2</sub> NEt<sub>2</sub>), 1.12 (t, 6H, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 2 x CH<sub>3</sub> NEt<sub>2</sub>) ppm

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 161.1, 157.3, 155.8, 150.0, 125.8, 108.4, 106.1, 105.3, 96.8, 70.0, 65.9, 63.4, 43.8, 12.3 ppm

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 278.13868, gefunden 278.13876 (Δ*m* = 0.00008; Fehler: 0.02 ppm)

## Synthese von 4-(1-Hydroxy-2-(O-DMTr)ethyl)-7-diethylaminocumarin 46



46

 $C_{36}H_{37}NO_6$   
579,69 g/mol

Verbindung **45** (710 mg, 2.6 mmol, 1 eq.) wurde in abs. Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl, 1 g, 3 mmol, 1.2 eq.) zugegeben. Nachdem die Reaktionslösung für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Reaktion durch die Zugabe von Ethanol beendet. Das Reaktionsgemisch wurde noch für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung nacheinander mit wässriger 5%-iger Zitronensäure und gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde daraufhin über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 6:1) aufgereinigt.

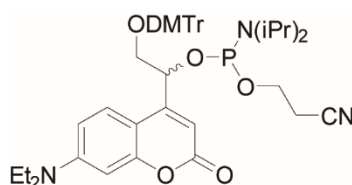
Ausbeute: 965 mg (1.67 mmol, 65%)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.37 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, H5), 7.31 – 7.17 (m, 5H, Ph), 7.16 – 7.14 (m, 4H, *arom. H* Ph-OMe), 6.82 – 6.78 (m, 4H, *arom. H* Ph-OMe), 6.56 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, <sup>4</sup>J = 2.5 Hz, H6), 6.51 (d, 1H, <sup>4</sup>J = 2.5 Hz, H8), 6.07 (s, 1H, H2), 5.78 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, OH), 5.05 (*pseudo-q*, 1H, <sup>3</sup>J = 5 Hz, CH), 3.69 (s, 6H, 2 x OMe), 3.41 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub> NEt<sub>2</sub>), 3.22 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 9.3 Hz, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, 1 x H CH<sub>2</sub>), 3.13 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 9.3 Hz, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, 1 x H CH<sub>2</sub>), 1.11 (t, 6H, 22 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2 x CH<sub>3</sub> NEt<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 161.0, 158.0, 157.9, 157.4, 155.8, 150.0, 144.8, 135.4, 129.7, 127.6, 126.5, 125.9, 113.0, 108.3, 106.0, 105.3, 96.8, 85.5, 68.0, 67.6, 59.7, 54.9, 43.9, 26.3, 20.7, 14.0, 12.3 ppm.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 580.26936, gefunden 580.26662 (Δ*m* = 0.00274; Fehler: 4.72 ppm)

Synthese von 2-(O-DMTr)-1-(7-(diethylamino)cumarin-4-yl)ethyl-(2-cyanoethyl)-diisopropylphosphoramidit **47**

**47**

$C_{45}H_{54}N_3O_7P$   
779,91 g/mol

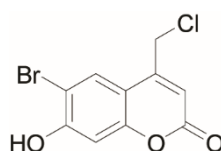
Das DMTr-geschützte Cumarin **46** (105 mg, 0.18 mmol, 1 eq.) wurde in abs. DCM gelöst. Diisopropylethylamin (DIPEA, 189  $\mu$ l, 1 mmol, 6 eq.) und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (120  $\mu$ l, 0.54 mmol, 3 eq.) wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung beendet. Die organische Phase wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 2:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelber Schaum isoliert.

Ausbeute: 114 mg (0.14 mmol, 81%)

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 7.41 (d, 1H,  $^3J$  = 9 Hz, H5), 7.35 – 7.19 (m, 5H, Ph), 7.19 – 7.15 (m, 4H, *arom. H* Ph-OMe), 6.83 – 6.78 (m, 4H, *arom. H* Ph-OMe), 6.56 (m, 1H, H6), 6.51 (m, 1H, H8), 6.07 (m, 1H, H2), 5.21 (m, 1H, CH), 3.70 (m, 6H, 2 x OMe), 3.41 (m, 4H, 2 x  $CH_2$ ), 2.77 (m, 1H, CH), 2.67 (m, 1H, CH), 1.15 – 1.09 (m, 12H, *iPr*- $CH_3$ ), 0.99 (m, 4H, 2 x  $CH_3$   $NEt_2$ ) ppm.

$^{31}P$ -NMR (200 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 148.6

Synthese von 6-Brom-4-(chloromethyl)-7-hydroxycumarin **48**

**48**

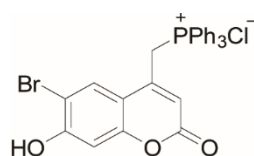
$C_{10}H_6BrClO_3$   
289,51 g/mol

4-Bromresorcinol (7.3 g, 38.4 mmol, 1 eq.) und Ethyl-4-chloracetoacetat (7.8 ml, 57.5 mmol, 1.5 eq.) wurden in 60 ml Methansulfonsäure gelöst und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde Eiswasser der Reaktionslösung zugegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 10.9 g (37.6 mmol, 98%)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 11.59 (s, 1H, OH), 7.99 (s, 1H, H5), 6.92 (s, 1H, H8), 6.47 (s, 1H, H3), 4.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm

### Synthese von 6-Brom-4-(methylphosphoniumchlorid)-7-hydroxycumarin 49



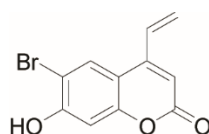
**49**

C<sub>28</sub>H<sub>21</sub>BrClO<sub>3</sub>P  
551,80 g/mol

Bhc-Cl **48** (6 g, 20.7 mmol, 1 eq.) und Triphenylphosphan (9.5 g, 41.4 mmol, 2 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in 60 ml abs. Acetonitril für 12 Stunden auf 85 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und abfiltriert. Der weiße Rückstand wurde mit heißem Benzol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Das Phosphoniumsalz wurde ohne weitere Aufreinigung für Folgereaktionen verwendet.

Ausbeute: 8.1 g (14.7 mmol, 71%)

### Synthese von 6-Brom-4-Vinyl-7-hydroxycumarin 50



**50**

C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>BrO<sub>3</sub>  
267,08 g/mol



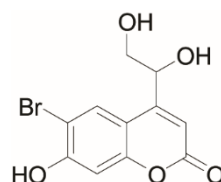
Verbindung **49** (8 g, 14.5 mmol, 1 eq.) wurde in 100 ml 37%-igem Formaldehyd gelöst und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 13 ml 15%-ige Natriumcarbonat-Lösung portionsweise zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 3:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.8 g (6.8 mmol, 51%)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 11.47 (s, 1H, OH), 8.03 (s, 1H, H5), 7.20 (dd, 1H, CH<sub>vinyl</sub>), 6.89 (s, 1H, H8), 6.42 (s, 1H, H3), 6.16 (d, 1H, CH<sub>2</sub>), 5.73 (d, 1H, CH<sub>2</sub>) ppm.

MS: *m/z* berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>BrO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 266.9, gefunden 267.3

### Synthese von 6-Brom-4-(1,2-Dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin **51**



**51**

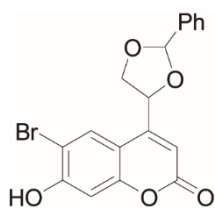
C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>BrO<sub>5</sub>  
301,09 g/mol

Bhc-Ethylen **50** (1.2 g, 4 mmol, 1 eq.) und 4-Methylmorpholin-*N*-oxid (0.9 g, 6.8 mmol, 1 eq.) wurden in einem 2:1 Wasser/Aceton-Gemisch stark gerührt, während etwa 200 µl Osmiumtetroxid (2%-ige Lösung in H<sub>2</sub>O) zugegeben wurde. Die Reaktion wurde für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Aceton wurde der Reaktion im Vakuum entzogen und die zurück gebliebene wässrige Lösung mehrmals mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung für Folgereaktionen verwendet.

Ausbeute: 2 g (6.8 mmol, quantitative Umsetzung)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.03 (s, 1H, H5), 6.87 (s, 1H, H8), 6.27 (s, 1H, H3), 4.89 (s, 1H, CH), 3.56 (d, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm.

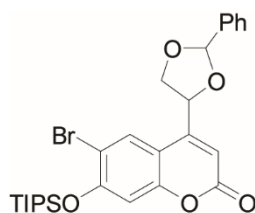
MS: *m/z* berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>BrO<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 301,0 gefunden 301,2

Synthese von 6-Brom-7-hydroxy-4-(2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)-cumarin **52****52**

$C_{18}H_{13}BrO_5$   
389,20 g/mol

Bhc-Diol **51** (2.1 g, 0.7 mmol, 1 eq.), Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (1 g, 0.4 mmol, 1 eq.) und Magnesiumsulfat (8 g) wurden unter Argon-Atmosphäre in abs. Toluol gelöst. Benzaldehyd (800  $\mu$ l) und 1-Butanol (800  $\mu$ l) wurden der Reaktionsmischung hinzugefügt und für 12 Stunden bei 110 °C gerührt. Das Gemisch wurde anschließend abfiltriert und der erhaltene Feststoff mit Chloroform gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 1:1) aufgereinigt.

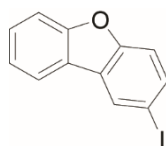
Ausbeute: 0.5 g (1.2 mmol, 31%)

Synthese von 6-Brom-7-Triisopropylsilyl-4-(2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)-cumarin **53****53**

$C_{27}H_{33}BrO_5Si$   
545,55 g/mol

Verbindung **52** (0.4 g, 1 mmol, 1 eq.) und Imidazol (240 mg, 3.5 mmol, 3.5 eq.) wurden in 1 ml DMF gelöst. TIPS-Cl (425  $\mu$ l, 2 mmol, 2 eq.) wurden hinzugegeben und die Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde ein wenig Ethanol zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen. Der unlösliche weiße Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat mit gesättigter NaCl-Lösung und destilliertem H<sub>2</sub>O extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

## Synthese von 2-Iod-Dibenzofuran 71



71

$C_{12}H_7IO$   
294,09 g/mol

Dibenzofuran (5 g, 29.6 mmol, 1 eq.) und Iodbenzoldiacetat (3.4 g, 10.6 mmol, 0.3 eq.) wurden in 10 ml Essigsäureanhydrid und 55 ml Essigsäure gelöst. Konzentrierte Schwefelsäure (0.1 ml) und Iod (3.4 g, 14.4 mmol, 0.5 eq.) wurden portionsweise zugegeben und die Reaktionslösung wurde für 35 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Während dessen fiel ein grauer Feststoff aus, der abfiltriert und zweimal mit  $H_2O$  gewaschen wurde. Anschließend wurde das Rohprodukt in Ethanol umkristallisiert.

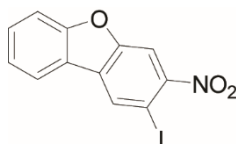
Ausbeute: 4.0 g (13.6 mmol, 46%)

$^1H$ -NMR (250 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 8.44 (s, 1H, H1), 8.18-8.15 (d, 1H,  $^3J$  = 7.7 Hz, H5), 7.8 (d, 1H,  $^3J$  = 8.5 Hz, H4), 7.71-7.67 (d, 1H,  $^3J$  = 8.2 Hz, H8), 7.57-7.52 (t, 1H,  $^3J$  = 7.2 Hz, H7), 7.55-7.52 (d, 1H,  $^3J$  = 8.5 Hz, H3), 7.43-7.37 (t, 1H,  $^3J$  = 7.5 Hz, H6) ppm.

$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 135.7, 129.8, 127.6, 123.4, 121.7, 114.1, 111.7, 86.9, 56.0, 18.5 ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $C_{12}H_7IO$  [M] 293.95361, gefunden 293.95312 ( $\Delta m$  = 0.00049; Fehler: 1.7 ppm)

## Synthese von 2-Iod-3-Nitrodibenzofuran 72



72

$C_{12}H_6INO_3$   
339,09 g/mol

Verbindung **71** (7.7 g, 26.2 mmol, 1 eq.) wurde in Trifluoressigsäure (TFA, 100 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Konzentrierte Salpetersäure (2.2 ml, 52.7 mmol, 2 eq.) wurde in 35 ml TFA gelöst und

langsam zu der Reaktionslösung getropft. Die Suspension wurde für 3 Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch die Zugabe von Eiswasser ausgefällt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und der Rückstand in DCM aufgenommen. Die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen und das Lösungsmittel der organischen Phase unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 20:1) aufgereinigt. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erhalten wurde das Produkt anschließend zunächst in Ethanol, dann in Methanol umkristallisiert.

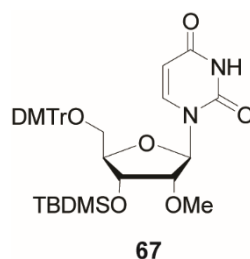
Ausbeute: 3.9 g (11.5 mmol, 44%)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.98 (s, 1H, H4), 8.50 (s, 1H, H1), 8.34-8.33 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, H5), 7.83-7.82 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, H8), 7.71-7.67 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, H7), 7.55-7.51 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, H6) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 157.3, 154.0, 137.3, 132.9, 129.9, 124.2, 122.7, 121.0, 118.9, 114.5, 112.1, 109.4, 80.2 ppm

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>INO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 339.94651, gefunden 339.94553 (Δ*m* = 0.00098; Fehler: 2.8 ppm)

#### Synthese von 5'-*O*-Dimethoxytrityl-2'-*O*-methyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyluridin **67**



**67**

C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Si  
674,87 g/mol

5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-*O*-methyluridin **66** (5 g, 8.9 mmol, 1 eq.) und Imidazol (1.5 g, 22.3 mmol, 2.5 eq.) wurden in abs. DMF gelöst. *Tert*-butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl, 2 g, 13.4 mmol, 1.5 eq.) wurde zugegeben und die Reaktionslösung für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethanol beendet. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und nacheinander mit wässriger 10%-iger Zitronensäure, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 5.8 g (8.7 mmol, 97%)

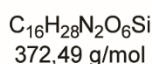
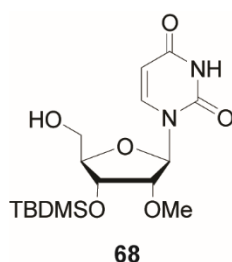
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11.40 (s, 1H, NH), 7.87-7.86 (d, 1H,  $^3J$  = 8.4 Hz, H6), 7.38-6.88 (m, 13H, H<sub>ar</sub>), 5.79-5.78 (d, 1H,  $J$  = 2.6 Hz, H1'), 5.3-5.27 (dd, 1H,  $^3J$  = 7.8 Hz,  $^4J$  = 2.1 Hz, H5), 4.31-4.30 (dt, 1H,  $^3J$  = 7.2 Hz,  $^4J$  = 1.9 Hz, H3'), 3.93-3.90 (m, 1H, H4'), 3.86-3.84 (m, 1H, H2'), 3.73 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>), 3.41-3.40 (m, 1H, H5'), 3.39 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.20-3.17 (m, 1H, H5'), 0.75 (s, 9H, 3 x SiCH<sub>3</sub>), 0.03 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), -0.05 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 170.8, 163.6, 158.7, 150.7, 144.9, 140.9, 135.6, 135.4, 130.3, 130.2, 128.4, 128.3, 127.4, 113.7, 113.6, 101.9, 88.2, 86.4, 82.7, 69.9, 62.2, 60.2, 58.2, 26.0, 21.2, 18.1, 14.5 ppm.

### Allgemeine Synthesevorschrift der Mosher-Ester

Die getrennten HPLC-Signale von Verbindung **67** wurden zunächst mit Essigsäure umgesetzt, um die Ethoxyethyl-Schutzgruppe zu entfernen. Nach Isolierung des Alkohols (1 eq.) wurde dieser in DCM und abs. Pyridin (1.3 eq.) gelöst. Anschließend wurden (*R*)- bzw. (*S*)-MTPA-Chlorid (1.9 eq.) hinzugefügt und die Reaktionslösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt.

### Synthese von 2'-*O*-methyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyluridin **68**



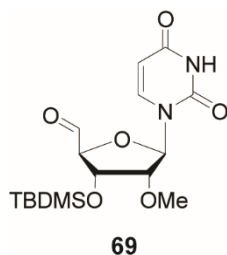
Verbindung **67** (4.7 g, 7.3 mmol, 1 eq.) wurde in einer „1%-igen Iod in Methanol“-Lösung gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 2 Stunden auf 45 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und mit 10%-iger Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde unter vermindertem Druck evaporiert und der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 2.9 g (7.8 mmol, 54%)

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11.37 (s, 1H, NH), 7.9-7.91 (d, 1H,  $^3J$  = 8.4 Hz, H6), 5.82-5.81 (d, 1H,  $J$  = 4.9 Hz, H1'), 5.67-5.65 (dd, 1H,  $^3J$  = 8.3 Hz,  $^4J$  = 2.1 Hz, H5), 5.20-5.18 (t, 1H,  $J$  = 4.9 Hz, OH), 4.3-4.28 (t, 1H,  $^3J$  = 4.6 Hz, H3'), 3.84-3.83 (t, 2H,  $^3J$  = 5 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.67-3.64 (m, 1H, H4'), 3.56-3.52 (m, 1H, H2'), 3.34 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 0.88 (s, 9H, 3 x SiCH<sub>3</sub>), 0.09 (s, 6H, 2 x SiCH<sub>3</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 163.6, 151.0, 140.8, 102.4, 86.6, 85.5, 82.7, 70.2, 60.5, 58.1, 26.1, 18.3, 4.3 ppm.

### Synthese von 5'-Carbonyl-2'-O-methyl-3'-O-tert-butylidimethylsilyluridin 69



$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}$   
370,48 g/mol

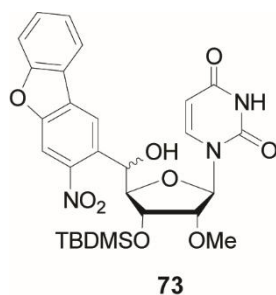
Verbindung **68** (2.8 g, 7.5 mmol, 1 eq.) wurde in einer Toluol/DMSO-Mischung (1:1) gelöst und auf 0°C gekühlt. Imidazol (40 mg, 0.7 mmol, 0.1 eq.), Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 3 g, 15.6 mmol, 2.1 eq.), Pyridin (601  $\mu\text{l}$ , 7.5 mmol, 1 eq.) und TFA (287  $\mu\text{l}$ , 3.7 mmol, 0.5 eq.) wurden nacheinander zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit DCM verdünnt und mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Lösungsmittel der organischen Phase wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 1:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.92 g (5.2 mmol, 70%)

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11.45 (s, 1H, NH), 9.63 (s, 1H, H5'), 7.90-7.87 (d, 1H,  $^3J$  = 8.1 Hz, H6), 5.93-5.91 (d, 1H,  $J$  = 6.5 Hz, H1), 5.75-5.74 (dd, 1H,  $^3J$  = 8.0 Hz,  $^4J$  = 1.7 Hz, H5), 4.67-4.64 (t, 1H,  $^3J$  = 4.8 Hz, H4'), 4.43-4.42 (d, 1H,  $^3J$  = 2.6 Hz, H3'), 3.98-3.94 (q, 1H,  $^3J$  = 6.3 Hz, H2'), 3.31 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 0.90 (s, 9H, 3 x SiCH<sub>3</sub>), 0.13 (s, 6H, 2 x SiCH<sub>3</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 200.5, 163.4, 151.1, 141.7, 102.9, 89.0, 88.2, 81.0, 70.8, 58.1, 26.1, 18.3, 14.6 ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  371.16329, gefunden 371.16314 ( $\Delta m$  = 0.00015; Fehler: 0.4 ppm)

Synthese von 5'-Nitrodibenzofuranyl-2'-*O*-methyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyluridin **73**

$C_{28}H_{33}N_3O_9Si$   
583,67 g/mol

Verbindung **72** (2.2 g, 6.4 mmol, 3.4 eq.) wurde in abs. THF gelöst und auf -40 °C gekühlt. Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 3.2 ml, 3.3 eq.) wurde über einen Zeitraum von 90 Minuten tropfenweise zugegeben. Verbindung **69** (700 mg, 1.9 mmol, 1 eq.) wurde separat in abs. THF gelöst und der Reaktionslösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei -40 °C für 1 Stunde gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl)-Lösung beendet. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit DCM extrahiert und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 2:1) aufgereinigt.

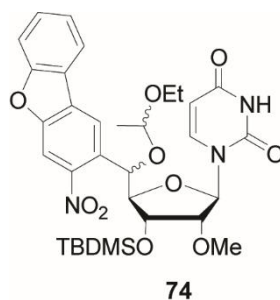
Ausbeute: 720 mg (1.2 mmol, 66%)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 11.45 (s, 1H, NH), 8.50 (s, 1H, H<sub>4</sub><sub>arom.</sub>), 8.44 (s, 1H, H<sub>1</sub><sub>arom.</sub>), 8.33-8.32 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, H<sub>5</sub><sub>arom.</sub>), 8.27-8.25 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, H<sub>8</sub><sub>arom.</sub>), 7.83-7.81 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, H<sub>6</sub>), 7.68-7.65 (t, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, H<sub>6</sub><sub>arom.</sub>), 7.51-7.49 (t, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, H<sub>7</sub><sub>arom.</sub>), 6.53-6.52 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 4.7 Hz, H<sub>1'</sub>), 5.98-5.96 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.2 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.16 Hz, H<sub>5</sub>), 5.83-5.82 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 5.1 Hz, H<sub>4'</sub>), 5.57-5.56 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, H<sub>3'</sub>), 5.50-5.48 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J* = 4.6 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.4 Hz, H<sub>2'</sub>), 4.14 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 2.9 Hz, H<sub>5'</sub>), 3.37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 0.91 (s, 9H, 3 x SiCH<sub>3</sub>), 0.14 + 0.13 (2 x s, 2 x 3H, 2 x SiCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 158.1, 154.9, 151.0, 146.9, 133.4, 130.5, 129.8, 128.2, 124.7, 123.2, 122.8, 119.2, 115.7, 112.7, 109.9, 108.7, 102.8, 87.1, 86.4, 82.6, 80.7, 71.3, 67.0, 58.1, 33.8, 26.1, 25.8, 18.3 ppm.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>SiNa<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 606.18783, gefunden 606.18615 (Δ*m* = 0.00168; Fehler: 2.77 ppm)

Synthese von 5'-Nitrodibenzofuranyl-5'-*O*-ethoxyethyl-2'-*O*-methyl-3'-*O*-tert-butylidimethylsilyl-uridin **74**



$C_{32}H_{41}N_3O_{10}Si$   
655,78 g/mol

Verbindung **73** (720 mg, 1.2 mmol, 1 eq.) und Pyridinium-*para*-toluolsulfonat (PPTS, 30 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq.) wurden in abs. DCM gelöst. Ethylvinylether (3.9 ml, 40.7 mmol, 33 eq.) wurde zugegeben und die Reaktionslösung für 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 2:1) aufgereinigt. Die Trennung der Diastereomere erfolgte mittels RP-HPLC und einem Laufmittelgemisch von Acetonitril/0.1 M TEAA-Puffer im Verhältnis 4:1.

Ausbeute: 573 mg (0.87 mmol, 73%, Diastereomergemisch)

74-R (5'-*R*):  $^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11.42 (s, 1H, NH), 8.50 (s, 1H, H<sub>4arom.</sub>), 8.32 (s, 1H, H<sub>1arom.</sub>), 8.29-8.27 (d, 1H,  $^3J$  = 7.45 Hz, H<sub>5arom.</sub>), 8.18-8.17 (d, 1H,  $^3J$  = 8.23 Hz, H<sub>8arom.</sub>), 7.84-7.83 (d, 1H,  $^3J$  = 8.62 Hz, H<sub>6</sub>), 7.70-7.67 (t, 1H,  $^3J$  = 7.45 Hz, H<sub>6arom.</sub>), 7.53-7.50 (t, 1H,  $^3J$  = 8.23 Hz, H<sub>7arom.</sub>), 5.95-5.94 (d, 1H,  $^3J$  = 8.02 Hz, H<sub>5</sub>), 5.86-5.85 (d, 1H,  $^3J$  = 5.10 Hz, H<sub>1'</sub>), 5.54 (d, 1H,  $J$  = 2.92 Hz, H<sub>5'</sub>), 4.57-4.53 (q, 1H,  $^3J$  = 5.30 Hz, CH), 4.45-4.43 (t, 1H,  $^3J$  = 5.10 Hz, H<sub>3'</sub>), 4.26-4.24 (*pseudo*-q, 1H,  $J$  = 2.66 Hz, H<sub>4'</sub>), 4.04-4.02 (t, 1H,  $^3J$  = 4.74 Hz, H<sub>2'</sub>), 3.37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1.34-1.33 (d, 3H,  $^3J$  = 5.30 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.06-1.03 (t, 3H,  $^3J$  = 6.62 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.87 (s, 9H, 3 x SiCH<sub>3</sub>), 0.09-0.07 (2 x s, 2 x 3H, 2 x SiCH<sub>3</sub>) ppm.

74-R (5'-*R*):  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 154.0, 147.7, 128.7, 98.3, 86.4, 82.2, 71.1, 61.7, 46.2, 31.8, 29.5, 29.2, 26.0, 22.6, 20.7, 18.2, 15.6 ppm.

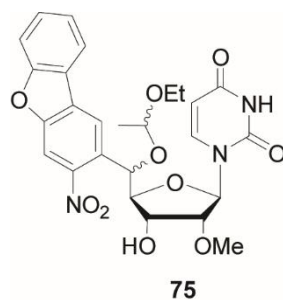
74-S (5'-*S*):  $^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11.41 (s, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, H<sub>4arom.</sub>), 8.46 (s, 1H, H<sub>1arom.</sub>), 8.27-8.25 (d, 1H,  $^3J$  = 7.45 Hz, H<sub>5arom.</sub>), 8.17-8.16 (d, 1H,  $^3J$  = 8.23 Hz, H<sub>8arom.</sub>), 7.84-7.82 (d, 1H,  $^3J$  = 8.62 Hz, H<sub>6</sub>), 7.70-7.66 (t, 1H,  $^3J$  = 7.45 Hz, H<sub>6arom.</sub>), 7.52-7.50 (t, 1H,  $^3J$  = 8.23 Hz, H<sub>7arom.</sub>), 5.91-5.89 (d, 1H,  $^3J$  = 8.42 Hz, H<sub>5</sub>), 5.85-5.84 (d, 1H,  $^3J$  = 4.91 Hz, H<sub>1'</sub>), 5.39 (d, 1H,  $J$  = 3.51 Hz, H<sub>5'</sub>), 4.94-4.91 (q, 1H,  $^3J$  = 4.91 Hz, CH), 4.39-4.37 (t, 1H,  $^3J$  = 4.91 Hz, H<sub>3'</sub>), 4.21-4.20 (*pseudo*-q, 1H,  $J$  = 3.35 Hz, H<sub>4'</sub>), 4.03-4.01 (t, 1H,  $^3J$  = 4.91 Hz, H<sub>2'</sub>), 1.29-1.28 (d, 3H,  $^3J$  = 5.30 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.94-0.91 (t, 9H,  $^3J$  = 7.29 Hz, 3 x SiCH<sub>3</sub>), 0.68-0.66 (t, 3H,  $^3J$  = 6.62 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.05-0.02 (2 x s, 2 x 3H, 2 x SiCH<sub>3</sub>) ppm.



74-S (5'-S)  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 150.1, 130.5, 122.9, 122.3, 108.6, 102.6, 101.9, 86.9, 86.7, 82.1, 70.7, 69.8, 61.0, 57.9, 46.2, 29.5, 29.2, 26.0, 24.9, 21.8, 20.5, 18.1, 15.1, 14.4, 12.2 ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{SiNa}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  678.24534, gefunden 678.24455 ( $\Delta m$  = 0.00079; Fehler: 1.2 ppm)

### Synthese von 5'-Nitrodibenzofuranyl-5'-O-ethoxyethyl-2'-O-methyluridin **75**



$\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{10}$   
541,51 g/mol

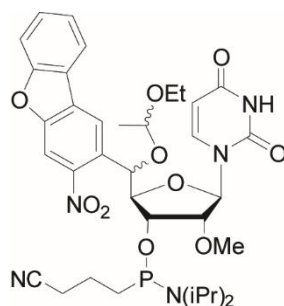
Verbindung **74** (573 mg, 0.87 mmol, 1 eq.) wurde in abs. THF gelöst. Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (1 M in THF, 4.4 ml, 5 eq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 1:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 430 mg (0.79 mmol, 91%)

Diastereomeregemisch  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 11.85 (s, 1H, NH), 8.45 (s, 1H,  $\text{H}_{4\text{arom.}}$ ), 8.30 (s, 1H,  $\text{H}_{1\text{arom.}}$ ), 8.05-8.02 (t, 1H,  $^3J$  = 8.48 Hz,  $\text{H}_{5\text{arom.}}$ ), 7.65-7.57 (m, 1H,  $\text{H}_{8\text{arom.}}$ ), 7.46-7.42 (t, 1H,  $^3J$  = 7.19 Hz, H6), 5.89-5.79 (m, 2H,  $\text{H}_{6\text{arom.}}$  +  $\text{H}_{7\text{arom.}}$ ), 4.58-4.56 (m, 1H, H5), 4.45-4.35 (m, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ), 4.12-4.00 (m, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ), 3.74-3.70 (q, 1H,  $^3J$  = 7.01 Hz,  $\text{H}_{3'}$ ), 3.61 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.99-2.95 (m, 2H,  $\text{H}_{4'}$  +  $\text{H}_{2'}$ ), 0.99 (t, 3H,  $^3J$  = 6.92 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0.07 (d, 3H,  $^3J$  = 4.49 Hz,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{K}^+$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  580.13257 gefunden 580.12948 ( $\Delta m$  = 0.00309; Fehler: 5.3 ppm)

Synthese von 5'-Nitrodibenzofuranyl-5'-*O*-ethoxyethyl-2'-*O*-methyluridin-3'- (2-cyanoethyl)-diisopropylphosphoramidit **65**

**65**

$C_{36}H_{46}N_5O_{10}P$   
739,76 g/mol

Verbindung **75** (430 mg, 0.8 mmol, 1 eq.) wurde in wenig abs. DCM gelöst. Diisopropylethylamin (DIPEA, 826  $\mu$ l, 4.7 mmol, 6 eq.) und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (529  $\mu$ l, 2.4 mmol, 3 eq.) wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung beendet. Die organische Phase wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan: Ethylacetat = 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 400 mg (0.54 mmol, 68%)

$^{31}P$ -NMR (160 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 147.7$

## 4.2 Präparative und analytische Methoden für Nukleinsäuren

### 4.2.1 Oligonukleotidsynthese

Die Festphasensynthesen aller DNA- und RNA-Stränge wurden an einem ABI 392 DNA/RNA Synthesizer der Firma *Applied Biosystems* oder einem Expedite Nucleic Acid Synthesis System durchgeführt. Der Synthesemaßstab betrug stets 200 nmol. Als Festphasenmaterial wurde Polystyren in *low volume* Synthesesäulen (LV200) der Firma *Applied Biosystems* verwendet. BHQ2-CPG und 3'-Thiol.Modifier C6-S-S-CPG-Säulen wurden von der Firma *Link Technologies Ltd.* verwendet. Standard-Phosphoramidite und Reagenzien wurden von *Glen Research Corporation* oder *Link Technologies Ltd.* bezogen. Alle Phosphoramidite wurden als 0.11 M Lösungen, gelöst in wasserfreiem Acetonitril, verwendet. Unmodifizierte DNA-Stränge wurden im DMTr-On-Modus nach Standardprotokoll hergestellt. Die verwendeten Capping-Reagenzien bestanden aus 10% Essigsäureanhydrid und 9% Pyridin in THF (Cap A) und 1-Methylimidazol in THF (Cap B). Für die Oxidation wird eine 3%-ige Iod-Lösung verwendet. Als Aktivator dient 0.325 M 5-Ethylthiotetrazol (ETT) in Acetonitril. Bei der Synthese von DNA-Strängen, modifiziert mit DEACM-Linker, wurden Ultramild-Amidite und entsprechendes Capping-Reagenz (Cap Mix A-Pyridine/Pac-Anhydride) von *Link Technologies Ltd.* verwendet. Die Kupplungszeit des Cumarin-Linkers wurde auf 15 Minuten erhöht. RNA-Stränge wurden im DMTr-off-Modus nach Standardprotokoll hergestellt. Die Kupplungszeit des NDBF-rU-Phosphoramidits wurde verdoppelt. Nach der Festphasensynthese wurden die Säulen im Hochvakuum getrocknet und das Festphasenmaterial in ein Mikroreaktionsgefäß überführt.

#### **Aufreinigung der DNA-Oligonukleotide**

Die Abspaltung vom Festphasenmaterial und die Entschützung erfolgten für unmodifizierte DNA mit konz. Ammoniak-Lösung für 24 Stunden und für Linker-modifizierte DNA mit konz. Ammoniak-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Thermoschüttler der Firma *HLC Biotech*. Das Festphasenmaterial wurde mit Spinfiltern (Porengröße 0.45 µm) der Firma *VWR* entfernt und die Lösung in der Vakuumzentrifuge (Concentrator plus von *Eppendorf*) eingengt. Anschließend wurde das Produkt über HPLC (*Agilent Technologies Serie 1200*) aufgereinigt. Dazu wurden MultoKrom RP C-18 Säulen der Firma *CS Chromatographie Service* verwendet. Als Eluent diente ein 0.1 M TEAA-Puffer (pH7)/Acetonitril-System. Standardmäßig wurde folgende Mischungsverhältnisse verwendet: 5% Acetonitril für 5 Minuten, anschließend ein Gradient von 5 – 40% Acetonitril innerhalb von 33 Minuten. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/Minute. Die Detektion der Oligonukleotide erfolgte

bei einer Wellenlänge von 254 nm und für Cumarin-modifizierte Oligonukleotide zusätzlich bei einer Wellenlänge von 400 nm. Das HPLC-Laufmittel wurde anschließend evaporiert. Zur Entfernung der 5'-DMTr-Schutzgruppe wurde die Oligonukleotidprobe in 80%-iger Essigsäure für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mittels RP-HPLC und gleichem Gradienten aufgereinigt. Das Laufmittel wurde wiederum in der Vakuumzentrifuge entfernt. Das gereinigte Oligonukleotid wurde in Reinstwasser oder Puffer gelöst.

Oligonukleotide, welche in Zellen transfiziert wurden, wurde zunächst zur Entfernung von TEAA-Rückständen in 0.3 M Natriumacetat-Lösung gelöst und mit der 2.5-fachen Menge eiskaltem Ethanol versetzt. Das Oligonukleotid wurde dann für 30 Minuten bei -20 °C gefällt und anschließend für weitere 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (13 000 rpm). Der Überstand wurde entfernt und der Rückstand zweimal in autoklaviertem MilliQ-Wasser gelöst und evaporiert.

### Aufreinigung der RNA-Oligonukleotide

Zur Inaktivierung von RNasen wurden sämtlich Puffer und Lösungen für die RNA-Aufbereitung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und autoklaviert. Mikroreaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden RNasefrei erworben oder mit DEPC-Wasser gewaschen und anschließend autoklaviert. Alle Oberflächen und Gerätschaften, welche mit der RNA-Lösung in Berührung kamen wurden mit RNase AWAY™-Spray von *Thermo Fisher Scientific* behandelt.

RNA-Stränge wurden mit einem 3:1-Gemisch aus Ammoniak und Ethanol für 24 Stunden bei 40 °C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge eingeengt. Zur 2'-Entschützung wurde das Oligonukleotid in einem 3:1.5:2-Gemisch aus NMP/TEA/Et<sub>3</sub>N-3HF gelöst und für 90 Minuten bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Entsalzung mittels Butanolfällung. Dazu wurde die Oligonukleotidlösung mit dem 10-fachen Butanolvolumen versetzt und so lange vermischt bis keine Phasentrennung mehr sichtbar war. Die Lösung wurde für 4 Stunden bei -80 °C gelagert und anschließend bei 4 °C (30 Minuten, 13 000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die Aufreinigung erfolgte zunächst über Ionenaustausch (AE)- und anschließend über RP-HPLC. Für die Ionenaustausch-Chromatographie wurde eine DNAPac PA-100 Säule (9x250 mm, Flussrate 1.5 ml/min) verwendet. Als Eluent diente ein Gemisch aus DEPC-Wasser und 1 M LiCl-Lösung mit einem ansteigenden LiCl-Gehalt (0-100%). Für die RP-HPLC wurde eine Jupiter® 4u Proteo 90 Å-Säule (250x10.0 mm) und ein 0.1 M TEAA-Puffer (pH7)/Acetonitril-System verwendet (5% Acetonitril für 2 Minuten, anschließend ein Gradient von 5-60% Acetonitril innerhalb 35 Minuten). Anschließend erfolgte die Ausfällung der RNA mittels Natriumacetat und Ethanol entsprechend der beschriebenen Anleitung bei der DNA-Aufreinigung. Komplementäre RNA-Einzelstränge wurden durch Aufheizen auf 90 °C für 1 Minute

und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur über einen Zeitraum von 1 Stunde (ein entsprechend Programm wurde in einem PCR-Thermocycler erstellt) zu doppelsträngiger siRNA hybridisiert.

### Bestimmung der Masse

Alle Oligonukleotidsequenzen wurden auf Korrektheit überprüft. 200 pmol wurden an einem microTOF-Q mit ESI-Quelle der Firma *Bruker* vermessen. Folgende massenspektrometrische Daten wurden ermittelt:

DNA/RNA	Masse [Da]kalkuliert	Masse [Da] gefunden
DNA1	4681.8	4681.7
DNA5	9239.8	9239.5
DNA6	8938.9	8935.5
DNA7	8635.4	8635.6
DNA12	4519.0	4517.4
DNA13	4626.1	4624.4
GFP-Decoy 1	9502.2	9502.2
GFP-Decoy 2	9536.7	9534.3
GFP-Decoy 3	9547.6	9550.3
GFP-Decoy 4	9557.7	9558.6
GFP-Decoy 5	10414.8	10414.6
GFP-Decoy 6	10498.8	10498.1
RNA1	6756.2	6753.9
RNA7	6765.9	6766.8
RNA8	6765.9	6766.8
RNA8-R	6765.9	6768.5
RNA8-S	6765.9	6768.5
RNA9	6765.9	6766.8
RNA10	6765.9	6766.8
RNA11	6765.9	6766.8

### Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration wurde mit einer NanoDrop 2000 der Firma *Thermo Fisher Scientific* bestimmt. Diese wird über deren OD bei 260 nm ermittelt.

### Click-Reaktion von TideQencher4-Azid mit Alkin-modifiziertem Oligonukleotid

Für die Click-Reaktion wurde folgende Lösung angesetzt:

70  $\mu$ l Oligonukleotid (2000 pmol)

7  $\mu$ l 2 M TEAA-Puffer (Endkonz. 0.2 M)

77  $\mu$ l DMSO (50 Vol-%)

0.21  $\mu$ l TideQencher4-Azid (10 mM in DMSO)

Ascorbinsäure-Lösung (5 mM in Wasser, frisch angesetzt, Endkonz. 0.5 mM)

Die angesetzte Lösung wurde entgast, indem für ca. 30 Sekunden Inertgas durch die Lösung geleitet wurde.

8.5  $\mu$ l Cu(II)-TBTA-Lösung (10 mM in 55 Vol-% DMSO; Endkonz. 0.5 mM)

Das verwendete Mikroreaktionsgefäß wurde wiederum mit Inertgas gespült, fest verschlossen und die Reaktionslösung sorgfältig am Vortexgerät durchmischt. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA anschließend mit der 4-fachen Menge an kaltem Ethanol (750  $\mu$ l) gefällt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , wurde der Ansatz zentrifugiert (13000 x g, 30 Minuten,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), der Überstand entfernt, das Pellet in 100  $\mu$ l Wasser gelöst und coevaporiert. Zur Aufreinigung folgte eine RP-HPLC. Dazu musste das coevaporierte Pellet dringen in 1 M TEAA-Lösung aufgenommen werden, da sonst mit starken Ausbeuteverlusten, aufgrund der Absorption der DNA an die Mikroreaktionsgefäß-Innenwand, zu rechnen war.

### Fluoreszenzmarkierung mit Atto565

Oligonukleotid-Lösungen, welche mit Atto565 markiert werden sollten, wurden mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf einen pH von 8.5 eingestellt. Zur Messung des pH-Werts wurde die pH-Elektrode InLab<sup>®</sup> Ultra-Micro von *Mettler Toledo* verwendet. 2 Äquivalente des Atto565-NHS-Esters (gelöst in DMSO) wurden zur Oligonukleotidlösung gegeben und für 4 Stunden bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Diese wurde anschließend über RP-HPLC aufgereinigt.

### Reduktion der Dithiol-Funktionen in Oligonukleotiden

Die Reduktion erfolgte mit 50 mM TCEP-Lösung in 100 mM Tris-Puffer (pH 7.4) innerhalb von 2 Stunden. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels RP-HPLC. Es erfolgte keine Retentionszeitverschiebung im Vergleich zu nicht reduzierten Oligonukleotiden, sodass eine

erfolgreiche Reduktion mittels Massenspektrometrie gezeigt wurde. Reduzierte Oligonukleotide wurden sofort weiter verwendet. Eine kurzfristige Lagerung von ca. 1 Woche bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  war möglich, bevor eine erneute Reduktion erforderlich wurde.

#### 4.2.2 Einphotonen-Charakterisierung

##### UV-Vis-Messungen

Zur Messung der Absorption wurde das UV-Vis-Spektrometer Evolution 300 der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Für die Messung in einem Wellenlängenbereich von 200 – 300 nm wurde eine  $4\text{ }\mu\text{M}$  Oligonukleotid-Lösung (in 1 x PBS) verwendet. Für die Messung oberhalb von 300 nm wurde eine  $20\text{ }\mu\text{M}$  Oligonukleotid-Lösung verwendet, um die Absorption der photolabilen Modifikation zu verstärken.

##### Bestimmung der Schmelzpunkte

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte an einem UV-Vis-Spektrophotometer Evolution 300 der Firma *Thermo Scientific* mit einer 1 mL Küvette und einem Fassungsvermögen von  $70\text{ }\mu\text{l}$ . Für eine genaue Temperaturmessung wurde ein innenliegender Temperaturfühler verwendet. Jeweils  $1\text{ }\mu\text{molare}$  Lösungen der DNA- bzw. RNA-Doppelstränge wurden in 1 x PBS-Puffer vermessen. Mit der Software Vision pro wurden 7 Messzyklen (4 Heiz- und 3 Kühlzyklen) festgelegt. Während den Messungen wurde die Absorptionsänderung bei 260 nm aufgezeichnet und gegen die Temperatur aufgetragen. Der Wendepunkt der erhaltenen Schmelzkurve spiegelte den Schmelzpunkt der Oligonukleotide wieder.

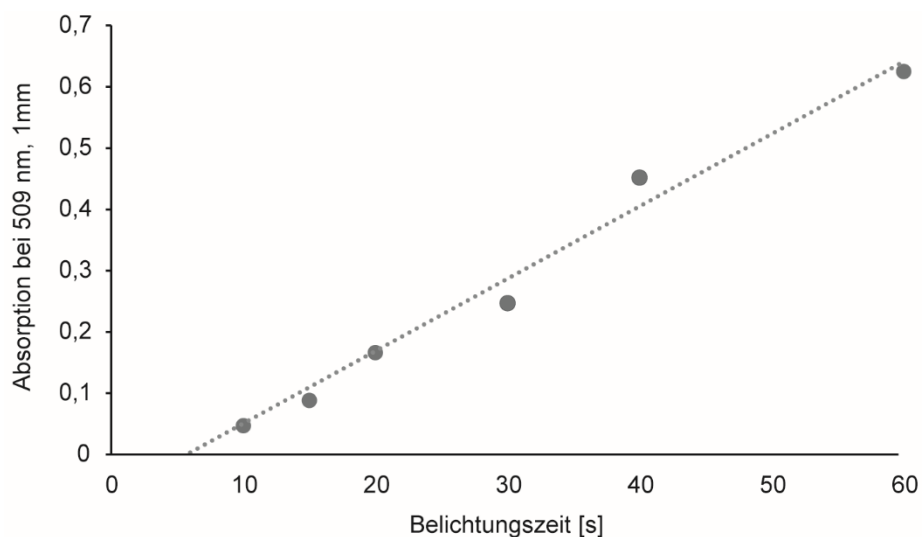
##### Bestimmung der Quantenausbeute

Zur Bestimmung der Quantenausbeute wurde zunächst die eingestrahlte Photonenzahl mittels eines Ferrioxalat-Aktinometers bestimmt. Dazu wurden jeweils  $13\text{ }\mu\text{l}$  einer wässrigen Kaliumferrioxalatlösung ( $6\text{ mM}$ ) mit einer Thorlabs-LED bei  $365\text{ nm}$  in einer Quarz-Küvette bestrahlt. Dabei wird Eisen(+III) zu Eisen(+II) reduziert, während die Oxalat-Liganden zu  $\text{CO}_2$  oxidiert werden. Durch Zugabe einer Phenanthrolin-Lösung bildet sich mit Eisen(+II) ein farbiger Komplex, welcher durch Absorptionsmessung bei  $509\text{ nm}$  quantifiziert werden kann ( $dn_s$ ).

Die Belichtung des Ferrioxalats erfolgt bei einer ausreichenden hohen Konzentration, sodass die relative Absorption ( $1 \cdot 10^{-A}$ ) als 1 festgelegt werden konnte. Der Photonenfluss kann daher direkt nach folgender Formel bestimmt werden, wenn die Quantenausbeute der Reaktion für die verwendete Wellenlänge bekannt ist.

$$\varphi = \frac{dn_s}{q \cdot dt} \quad (1)$$

Die Quantenausbeute der Reaktion bei 365 nm ist literaturbekannt und beträgt  $\varphi = 1.22$ .<sup>217</sup>



**Abbildung 106.** Ferrioxalat-Aktinometrie zur Bestimmung der Photonenzahl  $q$ . Die Absorption des Eisen(II)-Phenanthrolin-Komplexes wird als Funktion der Belichtungszeit bei 365 nm dargestellt.

Zur Bestimmung der Quantenausbeute, wurde das modifizierte Oligonukleotid bei gleichem Belichtungsaufbau für unterschiedlich lange Zeitintervalle belichtet. Die Probelösung enthielt standardmäßig  $20 \mu\text{M}$  Oligonukleotid und einen internen Standard (Uridin/Uracil). Die Photolyse wurde über die Abnahme des Startmaterial-Signals an der RP-HPLC betrachtet. Durch Signal-Integration wurde die Abnahme des Startmaterials ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Durch den monoexponentiellen Fit des Kurvenverlaufs und der Bestimmung der ersten Ableitung kann die Anfangssteigung zum Zeitpunkt  $t = 0\text{s}$  ermittelt werden. Über folgende Gleichung wurde dann die Quantenausbeute bestimmt:



$$\varphi = \frac{dn_s}{q \cdot A_{rel}} \quad (2)$$

Dabei bezeichnet  $dn_s$  die Abnahme des Edukts,  $q$  die Anzahl Photonen und  $A_{rel}$  für die relative Absorption

Die Oligonukleotid-Photolysereihe wurde dreifach durchgeführt. Die Berechnung der Quantenausbeute erfolgte aus den Mittelwerten der gemessenen Daten.

### CD-Spektroskopie

Zur Messung der CD-Spektren wurden 1ml 1  $\mu$ M siRNA-Lösungen verwendet. Die Spektren wurden an einem J-810 CD-Spektrometer der Firma *Jasco* aufgenommen.

### Belichtungsexperimente

Die Belichtung der Oligonukleotide mit 365 nm erfolgte mit unterschiedlichen LEDs. Die Belichtungen in einer Küvette erfolgten in einem Küvettenhalter, in den Mounted-LEDs der Firma *Thorlabs* eingeschraubt wurden. Die Belichtung in Flachbodengläsern erfolgte an zwei speziell angefertigten Belichtungsgeräten. Das erste Belichtungsgerät enthielt 3 LEDs mit einer Wellenlänge von 365 nm der Firma *NICHIA* (Typ NCCU033(T)). Diese belichteten die Probe von drei unterschiedlichen Richtungen. Betrieben wurden sie mit einer Stromstärke von 0.5 A. Das zweite Gerät war ein Multi-LED-Gerät, da es über verschiedene LEDs mit unterschiedlichen Wellenlängen der Firma *Roithner Lasertechnik* verfügt. Verwendet wurde lediglich die „365 nm-LED“ mit einer Stromstärke von 0.5 A. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Belichtung der Oligonukleotide unter physiologischen Bedingungen in PBS-Puffer bei pH 7.4.

#### 4.2.3 Zweiphotonen-Charakterisierung

##### Laser-Setup

Verwendet wurde ein Mai-Tai BB Laser der Firma *Newport-Spectra Physics*. Dessen Leistung wurde mit einem Elektrooptischen Modulator der Firma *Conoptics Inc.* reduziert. Der Laser wurde in eine Zeiss Axio Observer Z1 Mikroskop eingekoppelt. Ein UGA-40 Galvanometer der Firma *Rapp*

*OptoElectronic GmbH* wurde zum Laser-Scanning verwendet. Die Laser-Fokussierung wurde mit einem Plan-Apochromat 40 x/1.40 oder 63 x/1.40 Öl-Objektiv erreicht.

Ein A-Plan 10x/0.25 Ph1 Luft-Objektiv wurde zur Analyse der Hydrogele verwendet. Die Fluoreszenz wurde dabei von einer UVICO-Lampe der Firma *Rapp OptoElectronic GmbH* angeregt. Dabei wurden entsprechende Filterwürfel verwendet.

Weitfeldfluoreszenzaufnahmen (Hydrogel und Zellen) wurden von einer AxioCam MRm Kamera der Firma *Zeiss* aufgenommen.

### Präparation der Hydrogele

Zur Immobilisierung der Oligonukleotide in Hydrogelen wurde das 3-D Life PVA-PEG Hydrogel Kit der Firma *Cellendes GmbH* verwendet. Das Gesamtvolumen der Hydrogele betrug 6.25  $\mu\text{l}$ , welches sich auf 75 pmol Thiol-reduziertes Oligonukleotid, 1.25  $\mu\text{l}$  MalPVA, 1.87  $\mu\text{l}$  PEG-Link in CB-Puffer pH 5.5 und Wasser aufteilten. Das Polymerisieren der Hydrogele erfolgte erst nach Zugabe des PEG-Link, welche zuletzt geschah. Die Hydrogele wurden in Nunc<sup>TM</sup> Lab-Tek<sup>TM</sup> Chambered Coverglass-Kammern präpariert. Das polymerisierte Hydrogel wurde mit 1 x PBS-Puffer und, wenn nötig, mit Sonden-DNA umgeben.

### Quadratische Abhängigkeit der eingestrahlten Leistung

Ein Hydrogel wurde entsprechend der beschriebenen Prozedur angefertigt und mit 1 x PBS-Puffer umgeben. Mehrere Linien wurden nebeneinander mit zunehmender Leistung (1-10 mW) und 780 nm belichtet. Anschließend wurde **Sonde2** zugegeben und die resultierende Fluoreszenz mit einer UVICO Lampe der Firma *Rapp OptoElectronic GmbH* angeregt. Mit der AxioCam MRm Kamera von *Zeiss* wurden Fluoreszenzaufnahmen angefertigt. Mittels der Software Zen (*Zeiss*) wurde die Fluoreszenzintensität der einzelnen Linien bestimmt. Mit Hilfe der Software Origin (*OriginPro*) wurden die Intensitäten integriert, gegen die eingestrahlte Leistung aufgetragen und quadratisch gefittet. Die Messung wurde als Triplikat durchgeführt.

### Vergleich der Einphotonen- und Zweiphotonen-Photolyse

Es wurde ein Hydrogel mit **DNA5** präpariert und **Sonde2** in der umgebenden Lösung verwendet. Für die Zweiphotonen-Photolyse wurde ein „780nm-Laser“ mit 10 mW verwendet. Für die Einphotonen-Photolyse wurde das „780 nm-Laserlicht“ mittels eines „Inspired Blue Frequency doubler“ der Firma *Newport SpectraPhysics* frequenzverdoppelt. Die Leistung betrug 3.1  $\mu\text{W}$ . Die Scangeschwindigkeit wurde in beiden Fällen auf 806 Hz eingestellt. Die resultierende Fluoreszenz wurde mit einer UVICO

Lampe der Firma *Rapp OptoElectronic GmbH* stimuliert, welche in das Mikroskop eingekoppelt wurde. Die 2-D-Aufnahmen wurden durch ein Plan-Apochromat 63 x/1.40 Öl-Objektiv angefertigt (Anregungswellenlänge: 543 nm, Detektion bei 557 – 612 nm). Die Aufnahme der z-Stacks erfolgte an eine LSM710 der Firma *Zeiss* mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Öl DIC M27-Objektiv (Anregungswellenlänge: 543 nm, Detektion bei 557 – 612 nm). Das Bild wurde mit der Software Zen der Firma *Zeiss* bearbeitet.

## 4.3 Zellbiologische Methoden

### 4.3.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

#### Allgemeiner Umgang

HeLa-Zellen wurden vom Leibniz-Institut DSMZ GmbH bezogen (ACC-57). Dabei handelt es sich um Papillom-Virus Typ 18 (HPV-18) infizierte humane Cervix-Karzinom-Zellen. Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer Sterilwerkbank und unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Puffer, Lösungen und Medien wurden vor Verwendung in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Als Wachstumsmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GlutaMAX™ Supplement) mit 10% hitze-inaktiviertem (60 °C, 20 Minuten) fetalem Kälberserum (FBS) verwendet. Zum Ablösen der adherenten Zellen von der Oberfläche wurde, statt der üblichen Trypsin/EDTA-Behandlung, das Reagenz Accutase® (*Sigma-Aldrich*) verwendet. Die Wirkung der Accutase® ist weit weniger aggressiv als die des Trypsins und ist dadurch besonders angenehm in der Handhabung. Zellen wurden mit eiskalter Accutase® versetzt und für 10 Minuten, aber für maximal 1 Stunde, inkubiert. Durch Klopfen konnte die Ablösung der Zellen beschleunigt werden. Wasser, welches zum Ansetzen von Puffern verwendet wurde, wurde aus einer MilliQ®-Anlage der Firma *Merck Millipore* bezogen und zweimal autoklaviert. Anfallender Zellkulturabfall wurde vor der Entsorgung autoklaviert.

#### Einsäen gefrorener HeLa-Zellen

Gefrorene, von der DSMZ bezogene, HeLa-Zellen (1 ml) wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in eine 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 6 ml DMEM mit 10% FBS zugefügt und anschließend für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das

Zellpellet in 5 ml DMEM mit 10% FBS resuspendiert. Anschließend wurden  $0.7 \times 10^6$  bzw.  $2.1 \times 10^6$  Zellen in T25- bzw. T75-Gewebekulturflaschen überführt. 7 bzw. 10 ml DMEM mit 10% FBS wurden zugegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank gelagert und das Medium wurde am nächsten Tag erneuert.

### Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl in einer Lösung zu bestimmen, wurden 10  $\mu$ l Zellsuspension und 10  $\mu$ l Trypanblau miteinander vermischt. 10  $\mu$ l wurden in eine Neubauer Zählkammer (Marienfeld) gegeben und unter dem Mikroskop betrachtet. Tote Zellen sind tiefblau gefärbt. Vitale Zellen sind in der Lage den Farbstoff auszuschließen und erscheinen daher im mikroskopischen Bild hell. Die Zellen innerhalb der 4 Großquadrate der Zählkammer wurden gezählt und anschließend mit 4 dividiert, um den Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat zu erhalten. Die Zellzahl wird anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \cdot \text{Kammertiefe (mm)} \cdot \text{Verdünnung}}$$

Für die benutzte Zählkammer gelten folgende Werte: ausgezählte Fläche: 1 mm<sup>2</sup>, Kammertiefe: 0.1 mm; Verdünnung: ½

Damit ergibt sich folgende Gleichung:

$$\text{Zellen pro ml} = \text{ausgezählte Zellen} \cdot 2 \cdot 10^4$$

### Kryokonservierung

Die Kryokonservierung wurde bei einer Konfluenz (Bedeckung der Oberfläche) von ca. 80 – 90% durchgeführt. Dabei wurde das Zellmedium aus den Gewebekulturflaschen abgesaugt und 4 ml (T-25) Accutase zugegeben. Abgelöste Zellen wurden samt Accutase® in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und das Pellet in 4 ml „Cell Freezing Medium“ (Sigma-Aldrich) aufgeschlämmt. Jeweils 1 ml der Lösung ( $0.7 \times 10^6$  Zellen) wurde in Kryoröhrchen überführt, welche in einen „Cell Freezing Container“ (Corning® CoolCell® Alcohol-free Freezing Container) gegeben und bei – 80 °C über Nacht langsam

gekühlt wurde. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in einem Kryotank (Taylor Wharton, Flüssigstickstofftank, Gasphasenlagerung) gelagert.

### Subkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T-25-Gewebekulturflaschen. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 90% subkultiviert. Dazu wurde das Zellmedium entfernt und die Zellen mit 4 ml PBS-Puffer (ohne Calcium und Magnesium, *Life Technologies*) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml Accutase® von Flaschenboden gelöst. Ein Aliquot (Split 1:4; 1ml) wurde in eine neue Kulturflasche gegeben und mit 7 ml frischen Kulturmedium aufgefüllt. Bis zur nächsten Subkultivierung wurden die Zellen im Brutschrank gelagert.

#### 4.3.2 Transfektion von DNA-Decoys mit Attractene

24 Stunden vor Transfektion wurde das Zellmedium (T-25-Gewebekulturflaschen) entfernt und die Zellen mit 4 ml PBS-Puffer (ohne Calcium und Magnesium, *Life Technologies*) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2.8 ml Accutase® von Flaschenboden gelöst ( $2.8 \times 10^6$  Zellen bei Konfluenz). 0.5 ml der Zellsuspension wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 9.5 ml DMEM und 10% FBS verdünnt (20-fache Verdünnung,  $0.05 \times 10^6$  Zellen/ml). Jeweils 200  $\mu$ l der Zellsuspension ( $0.01 \times 10^6$  Zellen) wurden in die Wells einer 96-well-Platte gefüllt. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank gelagert. 24 Stunden nach Aussaat wurde transfiziert. Pro Transfektion und well mussten dazu 2 Lösungen hergestellt werden:

Lösung A: 25  $\mu$ l serumfreies DMEM, 100 ng GFP-Signal Reporter, Signal Negativ- oder Signal Positivkontrolle (Signal NF $\kappa$ B Pathway Reporter Assay Kit (GFP) von *Qiagen*) und 600 ng DNA-Decoy

Lösung B: 25  $\mu$ l serumfreies DMEM und 0.6  $\mu$ l Attractene, Inkubation für 5 Minuten

Lösung B wurde als „Mastermix“ für alle Transfektionen angesetzt und im Anschluss verteilt. Lösung B wurde zu Lösung A gegeben und für 20 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde das Zellmedium in den Wells erneuert. Die Zellen wurden mit dem Plasmid-Lipid-Komplex versetzt und anschließend für 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde durch PBS-Puffer (mit Calcium und Magnesium, *Life Technologies*) ersetzt. Anschließend wurden ein Teil der Zellen an einem UV-Transilluminator (Biostep®, 9  $\mu$ W/  $\text{cm}^2$ ) bei 365 nm für 5 Minuten belichtet. Nach Belichtung erfolgte der Austausch des PBS-Puffers durch DMEM mit 10% FBS. Zur NF- $\kappa$ B-Freisetzung

wurden 40 ng/ml TNF $\alpha$  zugegeben und die Zellen im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Fluoreszenzassay.

#### 4.3.3 Transfektion von siRNAs mit Metafectene

24 Stunden vor Transfektion wurde das Zellmedium (T-25-Gewebekulturflaschen) entfernt und die Zellen mit 4 ml PBS-Puffer (ohne Calcium und Magnesium, *Life Technologies*) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2.8 ml Accutase<sup>®</sup> von Flaschenboden gelöst ( $2.8 \times 10^6$  Zellen bei Konfluenz). 1 ml der Zellsuspension wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 9 ml DMEM und 10% FBS verdünnt (10-fache Verdünnung,  $0.1 \times 10^6$  Zellen/ml). Jeweils 500  $\mu$ l der Zellsuspension ( $0.05 \times 10^6$  Zellen) wurden in die wells einer 24-well-Platte gefüllt. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank gelagert. 24 Stunden nach Aussaat wurde transfiziert. Pro Transfektion und well mussten dazu 2 Lösungen hergestellt werden:

Lösung A: 30  $\mu$ l serumfreies DMEM, 25 pmol siRNA, 200 ng pAcGFP1-N1 und 300 ng pCMV-DsRed-Express

Lösung B: 30  $\mu$ l serumfreies DMEM und Metafectene (4  $\mu$ l/1000 ng Oligonukleotid-Gesamtmenge)

Lösung A wurde gut vermennt und zur Metafectene-Lösung gegeben. Die vereinigten Lösungen durften nun nicht zusätzlich vermennt oder unnötig viel pipettiert werden, da der entstehende Metafectene-RNA/Plasmid-Komplex sehr empfindlich gegenüber Scherkräften ist. Die Lösung wurde für 15 – 20 Minuten zur Ausbildung des Komplexes inkubiert, im Anschluss vorsichtig zu den Zellen gegeben und für 3 – 6 Stunden im Brutschrank gelagert. Das Transfektionsmedium wurde durch PBS-Puffer (mit Calcium und Magnesium, *Life Technologies*) ersetzt. Anschließend wurden ein Teil der Zellen an einem UV-Transilluminator (Biostep<sup>®</sup>,  $9 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) bei 365 nm für 5 Minuten belichtet. Nach Belichtung erfolgte der Austausch des PBS-Puffers durch DMEM mit 10% FBS. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium abermals erneuert. Der Fluoreszenzassay erfolgte 48 Stunden nach Transfektion.

#### 4.3.4 Isolierung von Proteinen aus HeLa-Zellen

Zur Untersuchung der Reportergenaktivität mussten die transfizierte Zellen lysiert werden. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und zweimalig mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zelllyse wurde durch Zugabe von 200 µl (96-well) bzw. 500 µl (24-well) 1x Reporter Lysis-Puffer (*Promega*) eingeleitet und durch zweimaliges Einfrieren (-80 °C) und Auftauen abgeschlossen. Der Lyseüberstand wurde in ein 1.5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, an einem Vortexgerät kräftig vermischt und für 2 Minuten bei 12000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch setzten sich Zelltrümmer als Pellet ab. Der Überstand wurde zur Quantifizierung der Fluoreszenz (Kapitel 4.7) oder verwendet.

#### 4.3.5 Isolierung von Zellkernproteinen

Zur Gewinnung des NF-κB-Proteins (als Bestandteil aller Zellkernproteine) wurden HeLa-Zellen in T-25-Gewebekulturflaschen kultiviert. 24 Stunden nach Aussaat wurde die NF-κB-Freisetzung mit 20 ng/ml TNF-α induziert. Zur Isolierung wurde das NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (beinhaltet die Lösungen CER I, CER II und NER; *Thermo Fisher Scientific*) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden die Zellen mittels Accutase® vom Flaschenboden gelöst und  $2 \times 10^6$  Zellen in eine 1.5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Diese wurden für 2 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 200 µl eiskaltem CER I suspendiert. Anschließend wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 11 µl eiskaltem CER II wurde die Lösung kräftig vermischt und 1 Minute auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde anschließend für 5 Minuten bei 16 000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthält die zytoplasmatischen Proteine. Das Pellet, welches die Zellkernproteine enthält, wurde mit 100 µl eiskaltem NER versetzt und an einem Vortexgerät kräftig durchmischt. Die Lösung wurde für 40 Minuten auf Eis inkubiert, wobei alle 10 Minuten für jeweils 15 Sekunden auf einem Vortexgerät kräftig durchmischt wurde. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 16 000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun das nukleare Extrakt und wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Den Lösungen CER I und NER wurden vor Verwendung laut Herstellerangaben Protease-Inhibitor (Inhibitorcocktail Plus von *Carl Roth*) zugesetzt.

## 4.4 Molekularbiologische Methoden

### 4.4.1 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

#### Radioaktive Endmarkierung von DNA-Decoys

Radioaktive Arbeiten wurden in einem speziellen Isotopenlabor unter Beachtung des Strahlenschutzgesetzes durchgeführt.

DNA-Decoys wurde durch Aufheizen auf 90 °C für 1 Minute und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur über einen Zeitraum von 1 Stunde hybridisiert. Die radioaktive Endmarkierung am 5'-Ende erfolgte durch Übertragung des  $\gamma$ -Phosphats von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP auf den vorher durch alkalische Phosphatase dephosphorylierten DNA-Decoy mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase. Nach folgendem Schema wurde radioaktiv markiert:

1 $\mu$ l Oligonukleotid-Lösung (400 ng DNA-Decoy)
3 $\mu$ l 10 x PNK-Puffer
1 $\mu$ l T4-Polynukleotid-Kinase
2 $\mu$ l $\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP
<u>23 <math>\mu</math>l H<sub>2</sub>O</u>
30 $\mu$ l Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit von *Qiagen* aufgereinigt.

#### Bindung der DNA-Decoys an NF- $\kappa$ B

Die Bindungsreaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt. Im Vorfeld wurden 30  $\mu$ l 5 x EMSA-Bindungs-Puffer mit 0.3  $\mu$ l 0.1 M DTT-Lösung versetzt.

1.1 $\mu$ l poly-dIdC
3 $\mu$ l 5 x EMSA-Bindungs-Puffer
4 $\mu$ l Nukleares Extrakt (5 $\mu$ g Gesamtproteinmenge)
5 $\mu$ l DNA-Decoy
0.1 $\mu$ l 100 x BSA



Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf einem 16%-igen nativen Polyacrylamidgel analysiert.

### Natives Polyacrylamidgel (16%)

Das Gel wurde vor Beladen für 1 Stunde bei 200 V einem Vorlauf unterzogen. Anschließend erfolgte das Elektrophorieren der Proben bei 95 V für ca. 2 Stunden. Als Laufmittel diente 0.5 x TBE.

Das Auswerten der Gele erfolgte in Abhängigkeit davon, ob die DNA-Decoys im Vorfeld radioaktiv markiert wurden.

Radioaktive Polyacrylamidgele wurden zunächst mit Whatman-Papier auf einem Vakuum-Geltrockner getrocknet und anschließend in einer Kassette mit Phosphorimager-Platte exponiert (1-6 Stunden). Die Phosphorimager-Platte wurde anschließend an einem „Typhoon Biomolecular Imager“ visualisiert.

Nicht-radioaktive Polyacrylamidgele wurden in 1 x SYBR® Gold (*Thermo Fisher Scientific*) in 0.5 x TBE-Puffer für 10 Minuten inkubiert und anschließend an einem UV-Transilluminator (*Biostep*) analysiert.

## 4.5 Proteinchemische Methoden

### 4.5.1 Western Blot

Beim Western Blot wurden die zu untersuchten Proteine auf eine Trägermembran übertragen, wo sie anschließend nachgewiesen werden konnten. Doch zunächst musste das, aus den HeLa-Zellen gewonnene, Proteingemisch (Zelllysate) aufgetrennt werden. Dafür wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet, bei der die Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit wandern.

### SDS-PAGE

Das SDS-Gel wurde nach folgendem Schema zubereitet:

Reagenz	Trenngel 12%	Sammelgel 4%
Acrylamid-Lösung (40%, 19:1)	4.8 ml	1 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	4 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	2.5 ml
MilliQ-H <sub>2</sub> O	6.9 ml	6.3 ml
10% SDS	160 µl	100 µl
TEMED	16 µl	10 µl
10% APS	160 µl	100 µl

Die Proben (20 µg Gesamtproteinmenge) wurden mit 5 x Laemmli-Ladepuffer versetzt, für 5 Minuten auf 90 °C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Das Gel wurde beladen und bei 95 V für ca. 1.5 Stunden laufen gelassen.

### Western Blot

Die Proteine wurden nun in einem weiteren elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Übertragung der Proteine erfolgte im sogenannten „Semi-dry“-Blotting-Verfahren, und zwar in einer „Blotting“-Apparatur der Firma *CBS Scientific* (Model EBU-4000). Direkt nach der SDS-PAGE wurde das Gel in eine „Sandwich-Stapelung“ eingebettet, welche wie folgt aufgebaut wurde: Auf die Anode der Blotting-Apparatur wurde eine dreifache Lage von Blottingpapier, welche zuerst in Isopropanol (1 Minute) und dann in Transferpuffer getaucht (10 Minuten) wurde, gestapelt. Die PVDF-Membran wurde ebenfalls mit Isopropanol und Transferpuffer aktiviert und auf dem Blottingpapier platziert. Im Anschluss folgte das SDS-Gel und erneut eine dreifache Lage von aktiviertem Blottingpapier. Die Kathode wurde auf diesem Stapel platziert und der Transfer für 20 Minuten bei 25 V durchgeführt. Die Membran wurde anschließend direkt in der Immunhybridisierung eingesetzt.

### Antikörperinkubation

Die Membran wurde für 10 Min in 1 x TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde sie für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung (Roti®-Block von *Carl Roth*) inkubiert. Es folgte das zweimalige waschen mit 1 x TBST-Puffer für jeweils 10 Minuten, das einmalige waschen mit 1 x TBS-Puffer für 10 Minuten und die Inkubation mit den monoklonalen Primärantikörpern (COX2-Antikörper AS66 und β-Actin-Ladekontrolle BA3R von *Thermo Fisher Scientific*) bei 4 °C über Nacht. Folgende Antikörperlösung wurde verwendet:

1 ml 10 x TBS  
1 ml 10 x Roti®-Block  
2 µl β-Actin-Ladekontrolle  
5 µl COX2-Antikörper  
8 ml H<sub>2</sub>O

Im Anschluss erfolgte erneut das zweimalige waschen mit 1 x TBST-Puffer für jeweils 10 Minuten, das einmalige waschen mit 1 x TBS-Puffer für 10 Minuten und die Inkubation mit den

Sekundärantikörper (AntiMouse IgG Secondary Antibody HRP Conjugate) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Folgende Antikörperlösung wurde verwendet:

- 1 ml 10 x TBS
- 1 ml 10 x Roti®-Block
- 3.3 µl Sekundärantikörper
- 8 ml H<sub>2</sub>O

### HRP-Entwicklung

Die Antikörper-besetzte Membran wurde dreimal mit 1 x TBS-Puffer für jeweils 5 Minuten gewaschen. Zur Entwicklung der Chemilumineszenz wurde die HRP-Entwicklerlösung SignalFire Elite ECL Reagent von *Thermo Fisher Scientific* verwendet.

## 4.6 Methoden zur Vervielfältigung und Gewinnung von Plasmid-DNA

Die Amplifikation der verwendeten Vektoren erfolgte in *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*) vom Typ DH5- $\alpha$ . Feste Nährmedien wurden aus eine 1.2%-igen Aar-Lösung in LB-Medium hergestellt. Dazu wurden jeweils 15 ml LB-Agar-Lösung in Petrischalen gegeben, welche aushärteten. Für Nährmedien mit Antibiotikum wurde der lauwarmen Agar-Lösung Kanamycin (50 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt.

### 4.6.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode. Dazu wurde ein Aliquot gefrorener *E.coli* DH5- $\alpha$  (100 µl) mit einem Reinigungsausstrich auf festem Nährmedium ohne Antibiotikum (Petrischale) verteilt und über Nacht bei 37 °C Klone gezüchtet. Ein einzelner Klon wurde in 20 ml Antibiotika-freiem LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert (Vorkultur). Für die Hauptkultur wurden 3 ml der Vorkulturlösung in 150 ml Antibiotika-freies LB-Medium überführt und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 0.5$  inkubiert (stündliche Messung). Bei Erreichen der OD wurde die Bakterienkultur auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation bei 4 °C für 10 Minuten (4000 x g)

sedimentiert. Das Pellet wurde in 30 ml TFB1-Puffer resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und wiederum zentrifugiert (4 °C, 4000 x g, 10 Minuten). Dieses Pellet wurde in 6 ml TFB2-Puffer resuspendiert. Zum Aliquotieren der Lösung wurden jeweils 70 µl der Zellsuspension mit 30 µl Glycerin versetzt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### 4.6.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Die Transformation bezeichnet das Einbringen und Vervielfältigen von Plasmiden in Bakterienzellen. Dazu wurde ein Aliquot kompetenter *E.coli*-Zellen (100 µl) auf Eis aufgetaut, 10 ng Plasmid zugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt der Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden. Dabei wird das Plasmid transformiert. Die Suspension wurde erneut für 1 Minute auf Eis inkubiert, anschließend mit 1 ml LB-Medium ohne Selektionsantibiotikum verdünnt und für 30 Minuten bei 37 °C zur Expression der Resistenzgene unter Schütteln inkubiert. 100 µl der Zellsuspension wurden auf ein festes Nährmedium mit Selektionsantibiotikum (Petrischale) gegeben und für 18 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Lagerung wurden die Petrischalen dicht verschlossen und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Ein einzelner Klon wurde in 100 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum (50 µg/ml Kanamycin) und 1% Glucose für 18 Stunden bei 37 °C im Schüttelinkubator vermehrt.

#### 4.6.3 Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolation der Plasmide erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma *Qiagen* entsprechend der Herstellerangaben. Die Konzentration der so gewonnenen Plasmide wurde an einem Thermo Scientific™ *NanoDrop*™ Spektralphotometer bestimmt. Die erfolgreiche Amplifizierung der Plasmide wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung des Plasmids (Probe von 800 ng) wurde bei der Firma *GATC Biotech* in Auftrag gegeben. Mit Hilfe des Onlinetools „blastn suite“ wurden die sequenzierten Daten mit den Originalsequenzen der Plasmide verglichen.

Sequenzierungsdaten des amplifizierten AcGFP1-N1-Vektors:

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1296 bits(1436)	0.0	718/718(100%)	0/718(0%)	Plus/Plus
Query 634	ATGGTGAGCAAGGGCGCCGAGCTGTTTCACCGGCATCGTGCCCATCCTGATCGAGCTGAAT	693		
Sbjct 714	ATGGTGAGCAAGGGCGCCGAGCTGTTTCACCGGCATCGTGCCCATCCTGATCGAGCTGAAT	773		
Query 694	GGCGATGTGAATGGCCACAAGTTTCAGCGTGAGCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC	753		
Sbjct 774	GGCGATGTGAATGGCCACAAGTTTCAGCGTGAGCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC	833		
Query 754	GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCTGTGCCCTGGCCACC	813		
Sbjct 834	GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCTGTGCCCTGGCCACC	893		
Query 814	CTGGTGACCACCCTGAGCTACGGCGTGCAAGTCTCTCACGCTACCCCGATCACATGAAG	873		
Sbjct 894	CTGGTGACCACCCTGAGCTACGGCGTGCAAGTCTCTCACGCTACCCCGATCACATGAAG	953		
Query 874	CAGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTC	933		
Sbjct 954	CAGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTC	1013		
Query 934	TTCGAGGATGACGGCAACTACAAGTCGCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGATACCCTG	993		
Sbjct 1014	TTCGAGGATGACGGCAACTACAAGTCGCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGATACCCTG	1073		
Query 994	GTGAATCGCATCGAGCTGACCGGCACCGATTTCAAGGAGGATGGCAACATCCTGGGCAAT	1053		
Sbjct 1074	GTGAATCGCATCGAGCTGACCGGCACCGATTTCAAGGAGGATGGCAACATCCTGGGCAAT	1133		
Query 1054	AAGATGGAGTACAACACTACAACGCCCAACATGTGTACATCATGACCGACAAGGCCAAGAAT	1113		
Sbjct 1134	AAGATGGAGTACAACACTACAACGCCCAACATGTGTACATCATGACCGACAAGGCCAAGAAT	1193		
Query 1114	GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGATGGCAGCGTGACAGCTGGCC	1173		
Sbjct 1194	GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGATGGCAGCGTGACAGCTGGCC	1253		
Query 1174	GACCACTACCAGCAGAATACCCCCATCGGCGATGGCCCTGTGCTGCTGCCCGATAACCAC	1233		
Sbjct 1254	GACCACTACCAGCAGAATACCCCCATCGGCGATGGCCCTGTGCTGCTGCCCGATAACCAC	1313		
Query 1234	TACCTGTCCACCCAGAGCGCCCTGTCCAAGGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGATC	1293		
Sbjct 1314	TACCTGTCCACCCAGAGCGCCCTGTCCAAGGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGATC	1373		
Query 1294	TACTTCGGCTTCGTGACCGCCGCCCATCACCCACGGCATGGATGAGCTGTACAAGT	1351		
Sbjct 1374	TACTTCGGCTTCGTGACCGCCGCCCATCACCCACGGCATGGATGAGCTGTACAAGT	1431		

Sequenzierungsdaten des amplifizierten pCMV-DsRed Express Vektors:

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1204 bits(1334)	0.0	670/672(99%)	0/672(0%)	Plus/Plus
Query 1257		GCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCC		1316
Sbjct 2671		GCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCC		2730
Query 1317		GTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACC		1376
Sbjct 2731		GTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACC		2790
Query 1377		CAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTG		1436
Sbjct 2791		CAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTG		2850
Query 1437		TCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGAC		1496
Sbjct 2851		TCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGAC		2910
Query 1497		TACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGAC		1556
Sbjct 2911		TACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGAC		2970
Query 1557		GGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCTCCTTCATCTACAAG		1616
Sbjct 2971		GGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCTCCTTCATCTACAAG		3030
Query 1617		GTGAAGTTCATCGGCGTGAACCTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTATG		1676
Sbjct 3031		GTGAAGTTCATCGGCGTGAACCTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTATG		3090
Query 1677		GGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCTGTACCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATC		1736
Sbjct 3091		GGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCTGTACCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATC		3150
Query 1737		CACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAGTCTATCTAT		1796
Sbjct 3151		CACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAGTCTATCTAT		3210
Query 1797		ATGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATC		1856
Sbjct 3211		ATGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATC		3270
Query 1857		ACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCCAC		1916
Sbjct 3271		ACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCCAC		3330
Query 1917		CACCTGTTCTTG 1928		
Sbjct 3331		CACCTGTTCTTG 3342		

## 4.7 Fluoreszenzassay

100 µl des Zellyseüberstandes wurden in schwarze Mikrotiterplatten (*Greiner Bio-One™ 96-Well*) überführt. Die Fluoreszenz wurde anschließend an einem Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Leser (Tecan infinite M200 PRO) bestimmt. Die, in den beiden Projekten verwendeten, Anregungs- und Emissionswellenlängen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

<u>NF-κB-Reportergen-Assay</u>		
	<u>Anregung [nm]</u>	<u>Emission [nm]</u>
Monster-GFP	475	515

<u>RNAi-Reportergen-Assay</u>		
	<u>Anregung [nm]</u>	<u>Emission [nm]</u>
AcGFP	475	505
DsRed	560	583

## 5. Anhang

### 5.1 Oligonukleotidsequenzen

X bezeichnet den DEACM-Linker, Y bezeichnet den NDBF-rU-Baustein

#### Benchmarksequenz

DNA1 5'-GCATAAAXAAAGGTG-3'

#### Oligonukleotide Hydrogellassay

DNA2 5'-GCAT<sup>BHQ2</sup>AAAXAA<sup>Atto565</sup>AGGTG-S-3'

DNA3 5'-GCAT<sup>TQ4</sup>AAAXAA<sup>Atto565</sup>AGGTG-S-3'

DNA4 5'-S-GCATAAATAAAGGTGTXTCACCTTTATTTA-3'

DNA5 5'-S-GCATAAATAAAGGTGTXTCACCTTTATTT-3'

DNA6 5'-S-GCATAAATAAAGGTGTXTCACCTTTATT-3'

DNA7 5'-S-GCATAAATAAAGGTGTXTCACCTTTAT -3'

DNA8 5'-Atto565-CACCTTTATTTATGC-3'

DNA9 5'-ATAAATAAAGGTG-BHQ2-3'

DNA10 5'-TAAATAAAGGTG-BHQ2-3'

DNA11 5'-AAATAAAGGTG-BHQ2-3'

#### DNA-Decoys

DNA12 5'-TTGCCGTACCTGACT-3'

DNA13 5'-AGTCAGGTACGGCAA-3'

GFP-Decoy 1 5'-TGGGGACTTTCCAGTTTCTGGAAAGTCCCCA-3'

GFP-Decoy 2 5'-TGGGGACTTXCCAGTTTCTGGAAAGTCCCCA-3'

GFP-Decoy 3 5'-TGGGGACTTTXCAGTTTCTGGAAAGTCCCCA-3'

GFP-Decoy 4 5'-TGGGGACTTTXCAGTTTCTGXAAAGTCCCCA-3'

GFP-Decoy 5 5'-ACTTTCCAGTTTCTGGAAAGTCCCCATTTTGGGG-3'

GFP-Decoy 6 5'-ACTTTXCAGTTTCTGGAAAGTCCCCATTXTGGGG-3'

DNA18 5'-ATCATAGTATCTGCA-3'

DNA19 5'-TGCAGATACTATGAT-3'

DNA20 5'-AAGGGGATTCCCTTA-3'

DNA21 5'-TAAGGGGATTCCCTT-3'

DNA22 5'-GGCAAGGGGATTCCCTTAGT-3'

DNA23 5'-ACTAAGGGAATCCCTTGCC-3'

CD3 5'-AGGGGATTCCCTTATTTTAAGGGAATCCCT-3'

CD4 5'-ATTCCCTTATTTTAAGGGAATCCCTTTTAGGGG-3'

#### siRNAs

RNA1 5'-GAAUGGCAUCAAGGUGAACdTdT-3'

RNA2 5'-GUUCACCUUGAUGCCAUUCdTdT-3'

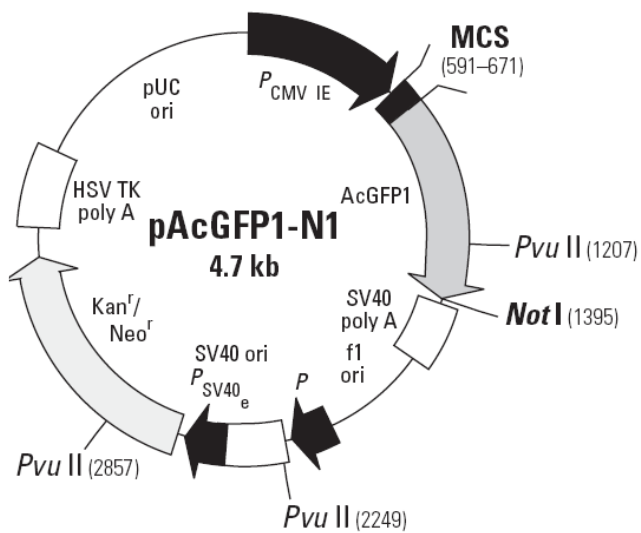
RNA2-Ome 5'-GUUCACCU<sup>OMe</sup>UGAUGCCAUUCdTdT-3'



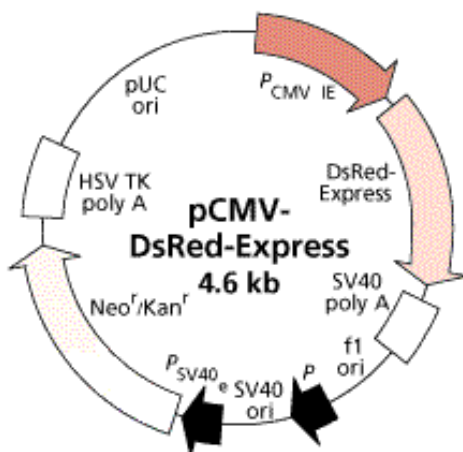
RNA3	5'-GCAGCACGACUUCUUCAAGdTdT-3'
RNA4	5'-CUUGAAGAAGUCGUCCUGCdTdT-3'
RNA5	5'-UAAGAUGGAGUACAACUACdTdT-3'
RNA6	5'-GUAGUUGUACUCCAUCUUAdTdT-3'
RNA7	5'-GUYCACCUUGAUGCCAUUCdTdT-3'
RNA8	5'-GUUCACCYUGAUGCCAUUCdTdT-3'
RNA9	5'-GUUCACCUYGAUGCCAUUCdTdT-3'
RNA10	5'-GUUCACCUUGAYGCCAUUCdTdT-3'
RNA11	5'-GUUCACCUUGAUGCCAYUCdTdT-3'

## 5.2 Vektorkarten der Plasmide

### pAcGFP1-N1



### p-CMV-DsRed Express



## 5.3 Literaturverzeichnis

- (1) Gatterdam, V.; Ramadass, R.; Stoess, T.; Fichte, M. A. H.; Wachtveitl, J.; Heckel, A.; Tampé, R. Three-Dimensional Protein Networks Assembled by Two-Photon Activation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (22), 5680–5684.
- (2) Friedrich, F.; Klehs, K.; Fichte, M. A. H.; Junek, S.; Heilemann, M.; Heckel, A. A Two-Photon Activatable Amino Acid Linker for the Induction of Fluorescence. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (84), 15382–15385.
- (3) Sinha, D. K.; Neveu, P.; Gagey, N.; Aujard, I.; Benbrahim-Bouzi, C.; Le Saux, T.; Rampon, C.; Gauron, C.; Goetz, B.; Dubruille, S.; et al. Photocontrol of Protein Activity in Cultured Cells and Zebrafish with One- and Two-Photon Illumination. *ChemBioChem* **2010**, *11* (5), 653–663.
- (4) Kantevari, S.; Matsuzaki, M.; Kanemoto, Y.; Kasai, H.; Ellis-Davies, G. C. R. Two-Color, Two-Photon Uncaging of Glutamate and GABA. *Nat. Methods* **2010**, *7* (2), 123–125.
- (5) Korzycka, K.; Bennett, P. M.; Cueto-Diaz, E. J.; Wicks, G.; Drobijev, M.; Blanchard-Desce, M.; Rebane, A.; Anderson, H. L. Two-Photon Sensitive Protecting Groups Operating via Intramolecular Electron Transfer: Uncaging of GABA and Tryptophan. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2419–2426.
- (6) Ellis-Davies, G. C. R. Nitrophenyl-Based Caged Neurotransmitters. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2014**, *2014* (6), pdb.top081794-pdb.top081794.
- (7) Dussy, A.; Meyer, C.; Quennet, E.; Bickle, T. A.; Giese, B.; Marx, A. New Light-Sensitive Nucleosides for Caged DNA Strand Breaks. *ChemBioChem* **2002**, *3* (1), 54–60.
- (8) Birmingham, A.; Anderson, E.; Sullivan, K.; Reynolds, A.; Boese, Q.; Leake, D.; Karpilow, J.; Khvorova, A. A Protocol for Designing siRNAs with High Functionality and Specificity. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (9), 2068–2078.
- (9) Miescher, F. *Ueber Die Chemische Zusammensetzung Der Eiterzellen, Hoppe-Seyler's Medizinisch-Chemischen Untersuchungen, Heft 4, 441–460*; Hoppe-Seyler's medizinisch-chemische Unterlagen; 1871; Vol. Heft 4, 441–460.
- (10) Kossel, A. Ueber Eine Neue Base Aus Dem Thierkörper. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, *18* (1), 79–81.
- (11) Levene, P. A. The Structure of Yeast Nucleic Acid Iv. Ammonia Hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **1919**, *40* (2), 415–424.
- (12) Avery, O. T.; MacLeod, C. M.; McCarty, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* **1944**, *79* (2), 137–158.
- (13) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738.
- (14) Sanger, F.; Thompson, E. O. P. The Amino-Acid Sequence in the Glycyl Chain of Insulin. 1. The Identification of Lower Peptides from Partial Hydrolysates. *Biochem. J.* **1953**, *53* (3), 353–366.
- (15) Sanger, F.; Thompson, E. O. P. The Amino-Acid Sequence in the Glycyl Chain of Insulin. 2. The Investigation of Peptides from Enzymic Hydrolysates. *Biochem. J.* **1953**, *53* (3), 366–374.
- (16) Crick, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **1970**, *227* (5258), 561–563.
- (17) Jacob, F.; Monod, J. Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3* (3), 318–356.
- (18) Nirenberg, M. W.; Matthaei, J. H.; Jones, O. W.; Martin, R. G.; Barondes, S. H. Approximation of Genetic Code via Cell-Free Protein Synthesis Directed by Template RNA. *Fed. Proc.* **1963**, *22*, 55–61.

- (19) Khorana, H. G.; Büchi, H.; Ghosh, H.; Gupta, N.; Jacob, T. M.; Kössel, H.; Morgan, R.; Narang, S. A.; Ohtsuka, E.; Wells, R. D. Polynucleotide Synthesis and the Genetic Code. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1966**, *31*, 39–49.
- (20) Engels, J.; Schlaeger, E. J. Synthesis, Structure, and Reactivity of Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphate-Benzyltriesters. *J. Med. Chem.* **1977**, *20* (7), 907–911.
- (21) Goard, M.; Aakalu, G.; Fedoryak, O. D.; Quinonez, C.; St. Julien, J.; Poteet, S. J.; Schuman, E. M.; Dore, T. M. Light-Mediated Inhibition of Protein Synthesis. *Chem. Biol.* **2005**, *12* (6), 685–693.
- (22) Lusic, H.; Deiters, A. A New Photocaging Group for Aromatic N-Heterocycles. *Synthesis* **2006**, *13*, 2147–2150.
- (23) Lusic, H.; Young, D. D.; Lively, M. O.; Deiters, A. Photochemical DNA Activation. *Org. Lett.* **2007**, *9* (10), 1903–1906.
- (24) Rothman, D. M.; Shults, M. D.; Imperiali, B. Chemical Approaches for Investigating Phosphorylation in Signal Transduction Networks. *Trends Cell Biol.* **2005**, *15* (9), 502–510.
- (25) Wöll, D.; Smirnova, J.; Pfeleiderer, W.; Steiner, U. E. Highly Efficient Photolabile Protecting Groups with Intramolecular Energy Transfer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (18), 2975–2978.
- (26) Barltrop, J. A.; Plant, P. J.; Schofield, P. Photosensitive Protective Groups. *Chem. Commun. Lond.* **1966**, *0* (22), 822–823.
- (27) Patchornik, A.; Amit, B.; Woodward, R. B. Photosensitive Protecting Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (21), 6333–6335.
- (28) Specht, A.; Goeldner, M. 1-(o-Nitrophenyl)-2,2,2-Trifluoroethyl Ether Derivatives as Stable and Efficient Photoremovable Alcohol-Protecting Groups. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (15), 2008–2012.
- (29) Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (1), 119–191.
- (30) Givens, R. S.; Matuszewski, B. Photochemistry of Phosphate Esters: An Efficient Method for the Generation of Electrophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (22), 6860–6861.
- (31) Schade, B.; Hagen, V.; Schmidt, R.; Herbrich, R.; Krause, E.; Eckardt, T.; Bendig, J. Deactivation Behavior and Excited-State Properties of (Coumarin-4-yl)Methyl Derivatives. 1. Photocleavage of (7-Methoxycoumarin-4-yl)Methyl-Caged Acids with Fluorescence Enhancement. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (25), 9109–9117.
- (32) Kotzur, N.; Briand, B.; Beyermann, M.; Hagen, V. Wavelength-Selective Photoactivatable Protecting Groups for Thiols. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (46), 16927–16931.
- (33) Yamaji, M.; Nozaki, K.; Allonas, X.; Nakajima, S.; Tero-Kubota, S.; Marciniak, B. Photoinduced Bond Dissociation of 4-Methylcoumarin Derivatives in Solution Studied by Laser Flash Photolysis and DFT Calculations. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (20), 5815–5822.
- (34) Mahmoodi, M. M.; Fisher, S. A.; Tam, R. Y.; Goff, P. C.; Anderson, R. B.; Wissinger, J. E.; Blank, D. A.; Shoichet, M. S.; Distefano, M. D. 6-Bromo-7-Hydroxy-3-Methylcoumarin (MBhc) Is an Efficient Multi-Photon Labile Protecting Group for Thiol Caging and Three-Dimensional Chemical Patterning. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (35), 8289–8300.
- (35) Furuta, T.; Takeuchi, H.; Isozaki, M.; Takahashi, Y.; Kanehara, M.; Sugimoto, M.; Watanabe, T.; Noguchi, K.; Dore, T. M.; Kurahashi, T.; et al. Bhc-CNMPs as Either Water-Soluble or Membrane-Permeant Photoreleasable Cyclic Nucleotides for Both One- and Two-Photon Excitation. *ChemBioChem* **2004**, *5* (8), 1119–1128.
- (36) Eckardt, T.; Hagen, V.; Schade, B.; Schmidt, R.; Schweitzer, C.; Bendig, J. Deactivation Behavior and Excited-State Properties of (Coumarin-4-yl)Methyl Derivatives. 2. Photocleavage of

Selected (Coumarin-4-yl)methyl-Caged Adenosine Cyclic 3',5'-Monophosphates with Fluorescence Enhancement. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (3), 703–710.

(37) Hagen, V.; Bendig, J.; Frings, S.; Eckardt, T.; Helm, S.; Reuter, D.; Kaupp, U. B. Highly Efficient and Ultrafast Phototriggers for CAMP and CGMP by Using Long-Wavelength UV/Vis-Activation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (6), 1045–1048.

(38) Fournier, L.; Gauron, C.; Xu, L.; Aujard, I.; Le Saux, T.; Gagey-Eilstein, N.; Maurin, S.; Dubruille, S.; Baudin, J.-B.; Bensimon, D.; et al. A Blue-Absorbing Photolabile Protecting Group for in Vivo Chromatically Orthogonal Photoactivation. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (7), 1528–1536.

(39) Momotake, A.; Lindegger, N.; Niggli, E.; Barsotti, R. J.; Ellis-Davies, G. C. R. The Nitrodibenzofuran Chromophore: A New Caging Group for Ultra-Efficient Photolysis in Living Cells. *Nat. Methods* **2006**, *3* (1), 35–40.

(40) Bochet, C. G. Photolabile Protecting Groups and Linkers. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **2002**, *0* (2), 125–142.

(41) Gaplovsky, M.; Il'ichev, Y. V.; Kamdzhilov, Y.; Kombarova, S. V.; Mac, M.; Schwörer, M. A.; Wirz, J. Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: 2-Nitrobenzyl Alcohols Form 2-Nitroso Hydrates by Dual Proton Transfer. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4* (1), 33–42.

(42) Schäfer, F.; Joshi, K. B.; Fichte, M. A. H.; Mack, T.; Wachtveitl, J.; Heckel, A. Wavelength-Selective Uncaging of DA and DC Residues. *Org. Lett.* **2011**, *13* (6), 1450–1453.

(43) Göppert-Mayer, M. Über Elementarakte Mit Zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.* **1931**, *401* (3), 273–294.

(44) So, P. T.; Dong, C. Y.; Masters, B. R.; Berland, K. M. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2000**, *2*, 399–429.

(45) Kaiser, W.; Garrett, C. G. B. Two-Photon Excitation in Ca F 2 : Eu 2 +. *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7* (6), 229–231.

(46) Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* **1990**, *248* (4951), 73–76.

(47) LaFratta, C. N.; Fourkas, J. T.; Baldacchini, T.; Farrer, R. A. Multiphoton Fabrication. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (33), 6238–6258.

(48) Helmchen, F.; Denk, W. Deep Tissue Two-Photon Microscopy. *Nat. Methods* **2005**, *2* (12), 932–940.

(49) Ogawa, K.; Kobuke, Y. Two-Photon Photodynamic Therapy by Water-Soluble Self-Assembled Conjugated Porphyrins. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*.

(50) Fisher, W. G.; Partridge, W. P.; Dees, C.; Wachter, E. A. Simultaneous Two-Photon Activation of Type-I Photodynamic Therapy Agents. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66* (2), 141–155.

(51) Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L. Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (18), 3244–3266.

(52) Denk, W. Two-Photon Scanning Photochemical Microscopy: Mapping Ligand-Gated Ion Channel Distributions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91* (14), 6629–6633.

(53) Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G.; Heckel, A. Light-Controlled Tools. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (34), 8446–8476.

(54) Piant, S.; Bolze, F.; Specht, A. Two-Photon Uncaging, from Neuroscience to Materials. *Opt. Mater. Express* **2016**, *6* (5), 1679–1691.

(55) Diaspro, A.; Bianchini, P.; Vicidomini, G.; Faretta, M.; Ramoino, P.; Usai, C. Multi-Photon Excitation Microscopy. *Biomed. Eng. OnLine* **2006**, *5*, 36.

(56) Furuta, T.; Wang, S. S.-H.; Dantzker, J. L.; Dore, T. M.; Bybee, W. J.; Callaway, E. M.; Denk, W.; Tsien, R. Y. Brominated 7-Hydroxycoumarin-4-ylmethyls: Photolabile Protecting Groups with

- Biologically Useful Cross-Sections for Two Photon Photolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (4), 1193–1200.
- (57) Aujard, I.; Benbrahim, C.; Gouget, M.; Ruel, O.; Baudin, J.-B.; Neveu, P.; Jullien, L. O-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups with Red-Shifted Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-Sections for One- and Two-Photon Excitation. *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12* (26), 6865–6879.
- (58) Pirrung, M. C.; Dore, T. M.; Zhu, Y.; Rana, V. S. Sensitized Two-Photon Photochemical Deprotection. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (29), 5313–5315.
- (59) Gug, S.; Bolze, F.; Specht, A.; Bourgogne, C.; Goeldner, M.; Nicoud, J.-F. Molecular Engineering of Photoremovable Protecting Groups for Two-Photon Uncaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (49), 9525–9529.
- (60) Specht, A.; Bolze, F.; Donato, L.; Herbivo, C.; Charon, S.; Warther, D.; Gug, S.; Nicoud, J.-F.; Goeldner, M. The Donor–acceptor Biphenyl Platform: A Versatile Chromophore for the Engineering of Highly Efficient Two-Photon Sensitive Photoremovable Protecting Groups. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11* (3), 578–586.
- (61) Bao, C.; Fan, G.; Lin, Q.; Li, B.; Cheng, S.; Huang, Q.; Zhu, L. Styryl Conjugated Coumarin Caged Alcohol: Efficient Photorelease by Either One-Photon Long Wavelength or Two-Photon NIR Excitation. *Org. Lett.* **2012**, *14* (2), 572–575.
- (62) Bartel, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **2004**, *116* (2), 281–297.
- (63) Dorsett, Y.; Tuschl, T. siRNAs: Applications in Functional Genomics and Potential as Therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (4), 318–329.
- (64) Mandal, M.; Breaker, R. R. Gene Regulation by Riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5* (6), 451–463.
- (65) Sashital, D. G.; Butcher, S. E. Flipping Off the Riboswitch: RNA Structures That Control Gene Expression. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (6), 341–345.
- (66) Nakanishi, K. Anatomy of RISC: How Do Small RNAs and Chaperones Activate Argonaute Proteins? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2016**, *7* (5), 637–660.
- (67) Monroe, W. T.; McQuain, M. M.; Chang, M. S.; Alexander, J. S.; Haselton, F. R. Targeting Expression with Light Using Caged DNA. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (30), 20895–20900.
- (68) Ando, H.; Furuta, T.; Tsien, R. Y.; Okamoto, H. Photo-Mediated Gene Activation Using Caged RNA/DNA in Zebrafish Embryos. *Nat. Genet.* **2001**, *28* (4), 317–325.
- (69) Schwartz, M. E.; Breaker, R. R.; Asteriadis, G. T.; deBear, J. S.; Gough, G. R. Rapid Synthesis of Oligoribonucleotides Using 2-O-(o-Nitrobenzyloxymethyl)-Protected Monomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2* (9), 1019–1024.
- (70) Tanaka, K.; Katada, H.; Shigi, N.; Kuzuya, A.; Komiyama, M. Site-Selective Blocking of PCR by a Caged Nucleotide Leading to Direct Creation of Desired Sticky Ends in The Products. *ChemBioChem* **2008**, *9* (13), 2120–2126.
- (71) Pirrung, M. C. How to Make a DNA Chip. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2002**, *41* (8), 1276–1289.
- (72) Joshi, K. B.; Vlachos, A.; Mikat, V.; Deller, T.; Heckel, A. Light-Activatable Molecular Beacons with a Caged Loop Sequence. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (22), 2746–2748.
- (73) Kröck, L.; Heckel, A. Photoinduced Transcription by Using Temporarily Mismatched Caged Oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (3), 471–473.
- (74) Heckel, A.; Mayer, G. Light Regulation of Aptamer Activity: An Anti-Thrombin Aptamer with Caged Thymidine Nucleobases. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (3), 822–823.
- (75) Heckel, A.; Buff, M. C. R.; Raddatz, M. L.; Müller, J.; Pötzsch, B.; Mayer, G. An Anticoagulant with Light-Triggered Antidote Activity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (40), 6748–6750.

- (76) Young, D. D.; Lusic, H.; Lively, M. O.; Yoder, J. A.; Deiters, A. Gene Silencing in Mammalian Cells with Light-Activated Antisense Agents. *ChemBioChem* **2008**, *9* (18), 2937–2940.
- (77) Govan, J. M.; Lively, M. O.; Deiters, A. Photochemical Control of DNA Decoy Function Enables Precise Regulation of Nuclear Factor KB Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (33), 13176–13182.
- (78) Wienholds, E.; Plasterk, R. H. A. MicroRNA Function in Animal Development. *FEBS Lett.* **2005**, *579* (26), 5911–5922.
- (79) He, L.; Hannon, G. J. MicroRNAs: Small RNAs with a Big Role in Gene Regulation. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5* (7), 522–531.
- (80) Jin, X.; Chen, Y.; Kong, M.; Zheng, L.; Yang, Y.; Li, Y. Transition from Hepatic Steatosis to Steatohepatitis: Unique MicroRNA Patterns and Potential Downstream Functions and Pathways. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *27* (2), 331–340.
- (81) Alvarez, M. L.; Khosroheidari, M.; Eddy, E.; Kiefer, J. Role of MicroRNA 1207-5P and Its Host Gene, the Long Non-Coding RNA Pvt1, as Mediators of Extracellular Matrix Accumulation in the Kidney: Implications for Diabetic Nephropathy. *PLOS ONE* **2013**, *8* (10), e77468.
- (82) Götte, M. MicroRNAs in Breast Cancer Pathogenesis. *Minerva Ginecol.* **2010**, *62* (6), 559–571.
- (83) Liu, B.; Che, Q.; Qiu, H.; Bao, W.; Chen, X.; Lu, W.; Li, B.; Wan, X. Elevated MiR-222-3p Promotes Proliferation and Invasion of Endometrial Carcinoma via Targeting ER $\alpha$ . *PLoS ONE* **2014**, *9* (1).
- (84) Wu, N.; Zhang, C.; Bai, C.; Han, Y. P.; Li, Q. MiR-4782-3p Inhibited Non-Small Cell Lung Cancer Growth via USP14. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2014**, *33* (2), 457–467.
- (85) Graveel, C. R.; Calderone, H. M.; Westerhuis, J. J.; Winn, M. E.; Sempere, L. F. Critical Analysis of the Potential for MicroRNA Biomarkers in Breast Cancer Management. *Breast Cancer Targets Ther.* **2015**, *7*, 59–79.
- (86) Baumann, V.; Winkler, J. MiRNA-Based Therapies: Strategies and Delivery Platforms for Oligonucleotide and Non-Oligonucleotide Agents. *Future Med. Chem.* **2014**, *6* (17), 1967–1984.
- (87) Osaki, M.; Okada, F.; Ochiya, T. MiRNA Therapy Targeting Cancer Stem Cells: A New Paradigm for Cancer Treatment and Prevention of Tumor Recurrence. *Ther. Deliv.* **2015**, *6* (3), 323–337.
- (88) Christopher, A. F.; Kaur, R. P.; Kaur, G.; Kaur, A.; Gupta, V.; Bansal, P. MicroRNA Therapeutics: Discovering Novel Targets and Developing Specific Therapy. *Perspect. Clin. Res.* **2016**, *7* (2), 68–74.
- (89) Schäfer, F.; Wagner, J.; Knau, A.; Dimmeler, S.; Heckel, A. Regulating Angiogenesis with Light-Inducible AntimiRs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (51), 13558–13561.
- (90) Lucas, T.; Schäfer, F.; Müller, P.; Eming, S. A.; Heckel, A.; Dimmeler, S. Light-Inducible AntimiR-92a as a Therapeutic Strategy to Promote Skin Repair in Healing-Impaired Diabetic Mice. *Nat. Commun.* **2017**, *8*.
- (91) Gil, C.; Bräse, S. Traceless and Multifunctional Linkers for the Generation of Small Molecules on Solid Supports. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8* (3), 230–237.
- (92) Früchtel, J. S.; Jung, G. Organische Chemie an Fester Phase. *Angew. Chem.* **1996**, *108* (1), 19–46.
- (93) Wojczewski, C.; Stolze, K.; Engels, J. W. Fluorescent Oligonucleotides - Versatile Tools as Probes and Primers for DNA and RNA Analysis. *Synlett* **1999**, *1999* (10), 1667–1678.
- (94) Gao, L.; Lu, Z. The Removal of Fluorescence in Sequencing-by-Synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *387* (3), 421–424.
- (95) Testa, B. Prodrugs: Bridging Pharmacodynamic/Pharmacokinetic Gaps. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13* (3), 338–344.

- (96) Böhme, D.; Beck-Sickinger, A. G. Drug Delivery and Release Systems for Targeted Tumor Therapy. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21* (3), 186–200.
- (97) Yang, Y.; Hahne, H.; Kuster, B.; Verhelst, S. H. L. A Simple and Effective Cleavable Linker for Chemical Proteomics Applications. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12* (1), 237–244.
- (98) Verhelst, S. H. L.; Fonović, M.; Bogyo, M. A Mild Chemically Cleavable Linker System for Functional Proteomic Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (8), 1284–1286.
- (99) Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6), 2091–2158.
- (100) Leriche, G.; Chisholm, L.; Wagner, A. Cleavable Linkers in Chemical Biology. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (2), 571–582.
- (101) Saneyoshi, H.; Yamamoto, Y.; Kondo, K.; Hiyoshi, Y.; Ono, A. Conjugatable and Bio-reduction Cleavable Linker for the 5'-Functionalization of Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (3), 1796–1802.
- (102) Zheng, T.; Jiang, H.; Wu, P. Single-Stranded DNA as a Cleavable Linker for Bioorthogonal Click Chemistry-Based Proteomics. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (6), 859–864.
- (103) Olejnik, J.; Krzymańska-Olejnik, E.; Rothschild, K. J. Photocleavable Biotin Phosphoramidite for 5'-End-Labeling, Affinity Purification and Phosphorylation of Synthetic Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24* (2), 361–366.
- (104) Heal, W. P.; Tate, E. W. Getting a Chemical Handle on Protein Post-Translational Modification. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (4), 731–738.
- (105) Bi, L.; Kim, D. H.; Ju, J. Design and Synthesis of a Chemically Cleavable Fluorescent Nucleotide, 3'-O-Allyl-DGTP-Allyl-Bodipy-FL-510, as a Reversible Terminator for DNA Sequencing by Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (8), 2542–2543.
- (106) Rodebaugh, R.; Fraser-Reid, B.; Mario Geysen, H. A New O-Nitrobenzyl Photocleavable Linker for Solid Phase Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (44), 7653–7656.
- (107) Glatthar, R.; Giese, B. A New Photocleavable Linker in Solid-Phase Chemistry for Ether Cleavage. *Org. Lett.* **2000**, *2* (15), 2315–2317.
- (108) Seo, T. S.; Bai, X.; Ruparel, H.; Li, Z.; Turro, N. J.; Ju, J. Photocleavable Fluorescent Nucleotides for DNA Sequencing on a Chip Constructed by Site-Specific Coupling Chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (15), 5488–5493.
- (109) Seo, T. S.; Bai, X.; Kim, D. H.; Meng, Q.; Shi, S.; Ruparel, H.; Li, Z.; Turro, N. J.; Ju, J. Four-Color DNA Sequencing by Synthesis on a Chip Using Photocleavable Fluorescent Nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (17), 5926–5931.
- (110) Yang, L.; Zheng, C.; Weisbrod, C. R.; Tang, X.; Munske, G. R.; Hoopmann, M. R.; Eng, J. K.; Bruce, J. E. In Vivo Application of Photocleavable Protein Interaction Reporter Technology. *J. Proteome Res.* **2012**, *11* (2), 1027–1041.
- (111) Wegner, S. V.; Sentürk, O. I.; Spatz, J. P. Photocleavable Linker for the Patterning of Bioactive Molecules. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18309.
- (112) Olejnik, J.; Sonar, S.; Krzymanska-Olejnik, E.; Rothschild, K. J. Photocleavable Biotin Derivatives: A Versatile Approach for the Isolation of Biomolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92* (16), 7590–7594.
- (113) Ordoukhanian, P.; Taylor, J.-S. Design and Synthesis of a Versatile Photocleavable DNA Building Block. Application to Phototriggered Hybridization. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (37), 9570–9571.
- (114) Bai, X.; Li, Z.; Jockusch, S.; Turro, N. J.; Ju, J. Photocleavage of a 2-Nitrobenzyl Linker Bridging a Fluorophore to the 5' End of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (2), 409–413.

- (115) Richards, J. L.; Seward, G. K.; Wang, Y.-H.; Dmochowski, I. J. Turning the 10–23 DNAzyme On and Off with Light. *ChemBioChem* **2010**, *11* (3), 320–324.
- (116) Ouyang, X.; Shestopalov, I. A.; Sinha, S.; Zheng, G.; Pitt, C. L. W.; Li, W.-H.; Olson, A. J.; Chen, J. K. Versatile Synthesis and Rational Design of Caged Morpholinos. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (37), 13255–13269.
- (117) Wu, L.; Wang, Y.; Wu, J.; Lv, C.; Wang, J.; Tang, X. Caged Circular Antisense Oligonucleotides for Photomodulation of RNA Digestion and Gene Expression in Cells. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (1), 677–686.
- (118) Model Studies for New o-Nitrobenzyl Photolabile Linkers: Substituent Effects on the Rates of Photochemical Cleavage - The Journal of Organic Chemistry (ACS Publications) <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo961602x> (accessed Feb 16, 2017).
- (119) Pelliccioli, A. P.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups: Reaction Mechanisms and Applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (7), 441–458.
- (120) Olejnik, J.; Lüdemann, H. C.; Krzymanska-Olejnik, E.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp, F.; Rothschild, K. J. Photocleavable Peptide-DNA Conjugates: Synthesis and Applications to DNA Analysis Using MALDI-MS. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (23), 4626–4631.
- (121) Zheng, G.; Cochella, L.; Liu, J.; Hobert, O.; Li, W. Temporal and Spatial Regulation of MicroRNA Activity with Photo-Activatable Cantimirs. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (12), 1332–1338.
- (122) Tang, X.; Su, M.; Yu, L.; Lv, C.; Wang, J.; Li, Z. Photomodulating RNA Cleavage Using Photolabile Circular Antisense Oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (11), 3848–3855.
- (123) Tang, X.; Maegawa, S.; Weinberg, E. S.; Dmochowski, I. J. Regulating Gene Expression in Zebrafish Embryos Using Light-Activated, Negatively Charged Peptide Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (36), 11000–11001.
- (124) Richards, J. L.; Tang, X.; Turetsky, A.; Dmochowski, I. J. RNA Bandages for Photoregulating in Vitro Protein Synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (23), 6255–6258.
- (125) Griepenburg, J. C.; Rapp, T. L.; Carroll, P. J.; Eberwine, J.; Dmochowski, I. J. Ruthenium-Caged Antisense Morpholinos for Regulating Gene Expression in Zebrafish Embryos. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (4), 2342–2346.
- (126) Reese, J. C. Basal Transcription Factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2003**, *13* (2), 114–118.
- (127) Dröge, P.; Meister, G.; Schiebel, E.; Vingron, M.; Walter, J. *Molekulare Genetik*, 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage.; Nordheim, A., Knippers, R., Eds.; Thieme: Stuttgart New York, 2015.
- (128) Sen, R.; Baltimore, D. Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences. *Cell* **1986**, *46* (5), 705–716.
- (129) Sen, R.; Baltimore, D. Inducibility of  $\kappa$  Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein NF-KB by a Posttranslational Mechanism. *Cell* **1986**, *47* (6), 921–928.
- (130) Gilmore, T. D. Introduction to NF-KB: Players, Pathways, Perspectives. *Oncogene* **2006**, *25* (51), 6680–6684.
- (131) Brivanlou, A. H.; Darnell, J. E. Signal Transduction and the Control of Gene Expression. *Science* **2002**, *295* (5556), 813–818.
- (132) Ben-Neriah, Y.; Karin, M. Inflammation Meets Cancer, with NF-KB as the Matchmaker. *Nat. Immunol.* **2011**, *12* (8), ni.2060.
- (133) Wolf, J. M.; Rohleder, N.; Bierhaus, A.; Nawroth, P. P.; Kirschbaum, C. Determinants of the NF-KB Response to Acute Psychosocial Stress in Humans. *Brain. Behav. Immun.* **2009**, *23* (6), 742–749.



- (134) Castro, R.; Zou, J.; Secombes, C. J.; Martin, S. A. M. Cortisol Modulates the Induction of Inflammatory Gene Expression in a Rainbow Trout Macrophage Cell Line. *Fish Shellfish Immunol.* **2011**, *30* (1), 215–223.
- (135) Yin, M.-J.; Yamamoto, Y.; Gaynor, R. B. The Anti-Inflammatory Agents Aspirin and Salicylate Inhibit the Activity of I $\kappa$ B Kinase- $\beta$ . *Nature* **1998**, *396* (6706), 77–80.
- (136) Mankan, A. K.; Lawless, M. W.; Gray, S. G.; Kelleher, D.; McManus, R. NF- $\kappa$ B Regulation: The Nuclear Response. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13* (4), 631–643.
- (137) Hayden, M. S.; Ghosh, S. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.* **2004**, *18* (18), 2195–2224.
- (138) Stephens, R. M.; Rice, N. R.; Hiebsch, R. R.; Bose, H. R.; Gilden, R. V. Nucleotide Sequence of V-Rel: The Oncogene of Reticuloendotheliosis Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80* (20), 6229–6233.
- (139) Rushlow, C.; Warrior, R. The Rel Family of Proteins. *BioEssays* **1992**, *14* (2), 89–95.
- (140) Bull, P.; Morley, K. L.; Hoekstra, M. F.; Hunter, T.; Verma, I. M. The Mouse C-Rel Protein Has an N-Terminal Regulatory Domain and a C-Terminal Transcriptional Transactivation Domain. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10* (10), 5473–5485.
- (141) Schmitz, M. L.; Silva, M. A. dos S.; Altmann, H.; Czisch, M.; Holak, T. A.; Baeuerle, P. A. Structural and Functional Analysis of the NF- $\kappa$ B P65 C Terminus. An Acidic and Modular Transactivation Domain with the Potential to Adopt an Alpha-Helical Conformation. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (41), 25613–25620.
- (142) Sedlacek, H.-H. *Onkologie - die Tumorerkrankungen des Menschen: Entstehung, Abwehr und Behandlungsmöglichkeiten ; [enthält 470 Tabellen]*; De Gruyter: Berlin, 2013.
- (143) Plaksin, D.; Baeuerle, P. A.; Eisenbach, L. KBF1 (P50 NF- $\kappa$ B Homodimer) Acts as a Repressor of H-2Kb Gene Expression in Metastatic Tumor Cells. *J. Exp. Med.* **1993**, *177* (6), 1651–1662.
- (144) Guan, H.; Hou, S.; Ricciardi, R. P. DNA Binding of Repressor Nuclear Factor- $\kappa$ B P50/P50 Depends on Phosphorylation of Ser337 by the Protein Kinase A Catalytic Subunit. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (11), 9957–9962.
- (145) Ghosh, G.; van Duyne, G.; Ghosh, S.; Sigler, P. B. Structure of NF- $\kappa$ B P50 Homodimer Bound to a  $\kappa$ B Site. *Nature* **1995**, *373* (6512), 303–310.
- (146) Chen, Y. Q.; Ghosh, S.; Ghosh, G. A Novel DNA Recognition Mode by the NF- $\kappa$ B P65 Homodimer. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5* (1), 67–73.
- (147) Müller, C. W.; Rey, F. A.; Sodeoka, M.; Verdine, G. L.; Harrison, S. C. Structure of the NF- $\kappa$ B P50 Homodimer Bound to DNA. *Nature* **1995**, *373* (6512), 311–317.
- (148) Chen, F. E.; Huang, D. B.; Chen, Y. Q.; Ghosh, G. Crystal Structure of P50/P65 Heterodimer of Transcription Factor NF- $\kappa$ B Bound to DNA. *Nature* **1998**, *391* (6665), 410–413.
- (149) Hatada, E. N.; Naumann, M.; Scheidereit, C. Common Structural Constituents Confer I  $\kappa$ B Activity to NF- $\kappa$ B P105 and I  $\kappa$ B/MAD-3. *EMBO J.* **1993**, *12* (7), 2781–2788.
- (150) Pahl, H. L. Activators and Target Genes of Rel/NF- $\kappa$ B Transcription Factors. *Oncogene* **1999**, *18* (49), 1203239.
- (151) Bonizzi, G.; Karin, M. The Two NF- $\kappa$ B Activation Pathways and Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *Trends Immunol.* **2004**, *25* (6), 280–288.
- (152) Karin, M. The Beginning of the End: I $\kappa$ B Kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B Activation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (39), 27339–27342.
- (153) Viatour, P.; Merville, M.-P.; Bours, V.; Chariot, A. Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B Proteins: Implications in Cancer and Inflammation. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30* (1), 43–52.

- (154) DiDonato, J.; Mercurio, F.; Rosette, C.; Wu-Li, J.; Suyang, H.; Ghosh, S.; Karin, M. Mapping of the Inducible I $\kappa$ B Phosphorylation Sites That Signal Its Ubiquitination and Degradation. *Mol. Cell Biol.* **1996**, *16* (4), 1295–1304.
- (155) Zhong, H.; May, M. J.; Jimi, E.; Ghosh, S. The Phosphorylation Status of Nuclear NF-Kappa B Determines Its Association with CBP/P300 or HDAC-1. *Mol. Cell* **2002**, *9* (3), 625–636.
- (156) Karin, M.; Ben-Neriah, Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF-[Kappa]B Activity. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18*, 621–663.
- (157) Häcker, H.; Karin, M. Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2006**, *2006* (357), re13.
- (158) Karin, M. How NF-KappaB Is Activated: The Role of the I $\kappa$ B Kinase (IKK) Complex. *Oncogene* **1999**, *18* (49), 6867–6874.
- (159) Zandi, E.; Rothwarf, D. M.; Delhase, M.; Hayakawa, M.; Karin, M. The I $\kappa$ B Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , Necessary for I $\kappa$ B Phosphorylation and NF-KB Activation. *Cell* **1997**, *91* (2), 243–252.
- (160) Lee, F. S.; Peters, R. T.; Dang, L. C.; Maniatis, T. MEKK1 Activates Both I $\kappa$ B Kinase  $\alpha$  and I $\kappa$ B Kinase  $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (16), 9319–9324.
- (161) Rothwarf, D. M.; Zandi, E.; Natoli, G.; Karin, M. IKK-Gamma Is an Essential Regulatory Subunit of the I $\kappa$ B Kinase Complex. *Nature* **1998**, *395* (6699), 297–300.
- (162) Moynagh, P. N. The NF-KB Pathway. *J. Cell Sci.* **2005**, *118* (20), 4589–4592.
- (163) Stroud, J. C.; Oltman, A.; Han, A.; Bates, D. L.; Chen, L. Structural Basis of HIV-1 Activation by NF-KappaB - a Higher-Order Complex of P50:RelA Bound to the HIV-1 LTR. *J. Mol. Biol.* **2009**, *393* (1), 98–112.
- (164) Isomura, I.; Morita, A. Regulation of NF-KB Signaling by Decoy Oligodeoxynucleotides. *Microbiol. Immunol.* **2006**, *50* (8), 559–563.
- (165) Gambari, R. New Trends in the Development of Transcription Factor Decoy (TFD) Pharmacotherapy <http://www.eurekaselect.com/62318/article> (accessed Dec 4, 2017).
- (166) Bielinska, A.; Shivdasani, R. A.; Zhang, L. Q.; Nabel, G. J. Regulation of Gene Expression with Double-Stranded Phosphorothioate Oligonucleotides. *Science* **1990**, *250* (4983), 997–1000.
- (167) Morishita, R.; Sugimoto, T.; Aoki, M.; Kida, I.; Tomita, N.; Moriguchi, A.; Maeda, K.; Sawa, Y.; Kaneda, Y.; Higaki, J.; et al. In Vivo Transfection of Cis Element “Decoy” against Nuclear Factor- KB Binding Site Prevents Myocardial Infarction. *Nat. Med.* **1997**, *3* (8), 894.
- (168) Yoshimura, S.; Morishita, R.; Hayashi, K.; Yamamoto, K.; Nakagami, H.; Kaneda, Y.; Sakai, N.; Ogihara, T. Inhibition of Intimal Hyperplasia after Balloon Injury in Rat Carotid Artery Model Using Cis-Element ‘Decoy’ of Nuclear Factor-KB Binding Site as a Novel Molecular Strategy. *Gene Ther.* **2001**, *8* (21), 1635.
- (169) Struntz, N. B.; Harki, D. A. Catch and Release DNA Decoys: Capture and Photochemical Dissociation of NF-KB Transcription Factors. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (6), 1631–1638.
- (170) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* **1998**, *391* (6669), 806–811.
- (171) García-Sastre, A.; Biron, C. A. Type 1 Interferons and the Virus-Host Relationship: A Lesson in Détente. *Science* **2006**, *312* (5775), 879–882.
- (172) Stark, G. R.; Kerr, I. M.; Williams, B. R.; Silverman, R. H.; Schreiber, R. D. How Cells Respond to Interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 227–264.

- (173) Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* **2001**, *411* (6836), 494–498.
- (174) Ketting, R. F.; Fischer, S. E. J.; Bernstein, E.; Sijen, T.; Hannon, G. J.; Plasterk, R. H. A. Dicer Functions in RNA Interference and in Synthesis of Small RNA Involved in Developmental Timing in *C. Elegans*. *Genes Dev.* **2001**, *15* (20), 2654–2659.
- (175) Hamilton, A. J.; Baulcombe, D. C. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* **1999**, *286* (5441), 950–952.
- (176) Khvorovova, A.; Reynolds, A.; Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* **2003**, *115* (2), 209–216.
- (177) Meister, G.; Landthaler, M.; Patkaniowska, A.; Dorsett, Y.; Teng, G.; Tuschl, T. Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* **2004**, *15* (2), 185–197.
- (178) Yuan, Y. R.; Pei, Y.; Ma, J. B.; Kuryavyi, V.; Zhadina, M.; Meister, G.; Chen, H. Y.; Dauter, Z.; Tuschl, T.; Patel, D. J. Crystal Structure of *A. Aeolicus* Argonaute, a Site-Specific DNA-Guided Endoribonuclease, Provides Insights into RISC-Mediated mRNA Cleavage., Crystal Structure of *A. Aeolicus* Argonaute, a Site-Specific DNA-Guided Endoribonuclease, Provides Insights into RISC-Mediated mRNA Cleavage. *Mol. Cell Mol. Cell* **2005**, *19*, *19* (3, 3), 405, 405–419.
- (179) Faehnle, C. R.; Elkayam, E.; Haase, A. D.; Hannon, G. J.; Joshua-Tor, L. The Making of a Slicer: Activation of Human Argonaute-1., The Making of a Slicer: Activation of Human Argonaute-1. *Cell Rep. Cell Rep.* **2013**, *3*, *3* (6, 6), 1901, 1901–1909.
- (180) Parker, J. S.; Roe, S. M.; Barford, D. Structural Insights into mRNA Recognition from a PIWI Domain-siRNA Guide Complex. *Nature* **2005**, *434* (7033), 663–666.
- (181) Rand, T. A.; Ginalski, K.; Grishin, N. V.; Wang, X. Biochemical Identification of Argonaute 2 as the Sole Protein Required for RNA-Induced Silencing Complex Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (40), 14385–14389.
- (182) CHIU, Y.-L.; RANA, T. M. siRNA Function in RNAi: A Chemical Modification Analysis. *RNA* **2003**, *9* (9), 1034–1048.
- (183) Jackson, A. L.; Bartz, S. R.; Schelter, J.; Kobayashi, S. V.; Burchard, J.; Mao, M.; Li, B.; Cavet, G.; Linsley, P. S. Expression Profiling Reveals Off-Target Gene Regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (6), 635–637.
- (184) Birmingham, A.; Anderson, E. M.; Reynolds, A.; Ilesley-Tyree, D.; Leake, D.; Fedorov, Y.; Baskerville, S.; Maksimova, E.; Robinson, K.; Karpilow, J.; et al. 3' UTR Seed Matches, but Not Overall Identity, Are Associated with RNAi off-Targets. *Nat. Methods* **2006**, *3* (3), 199–204.
- (185) Sontheimer, E. J.; Carthew, R. W. Silence from within: Endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell* **2005**, *122* (1), 9–12.
- (186) Lee, Y.; Kim, M.; Han, J.; Yeom, K.-H.; Lee, S.; Baek, S. H.; Kim, V. N. MicroRNA Genes Are Transcribed by RNA Polymerase II. *EMBO J.* **2004**, *23* (20), 4051–4060.
- (187) Yeom, K.-H.; Lee, Y.; Han, J.; Suh, M. R.; Kim, V. N. Characterization of DGCR8/Pasha, the Essential Cofactor for Drosha in Primary miRNA Processing. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (16), 4622–4629.
- (188) Denli, A. M.; Tops, B. B. J.; Plasterk, R. H. A.; Ketting, R. F.; Hannon, G. J. Processing of Primary MicroRNAs by the Microprocessor Complex. *Nature* **2004**, *432* (7014), 231.
- (189) Coolen, M.; Katz, S.; Bally-Cuif, L. miR-9: A Versatile Regulator of Neurogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*.

- (190) LAI, E. C.; WIEL, C.; RUBIN, G. M. Complementary MiRNA Pairs Suggest a Regulatory Role for MiRNA:MiRNA Duplexes. *RNA* **2004**, *10* (2), 171–175.
- (191) Jackson, A. L.; Burchard, J.; Leake, D.; Reynolds, A.; Schelter, J.; Guo, J.; Johnson, J. M.; Lim, L.; Karpilow, J.; Nichols, K.; et al. Position-Specific Chemical Modification of siRNAs Reduces “off-Target” Transcript Silencing. *RNA N. Y. N* **2006**, *12* (7), 1197–1205.
- (192) Corey, D. R. Chemical Modification: The Key to Clinical Application of RNA Interference? *J. Clin. Invest.* **2007**, *117* (12), 3615–3622.
- (193) Shah, S.; Rangarajan, S.; Friedman, S. H. Light-Activated RNA Interference. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (9), 1328–1332.
- (194) Jain, P. K.; Shah, S.; Friedman, S. H. Patterning of Gene Expression Using New Photolabile Groups Applied to Light Activated RNAi. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (3), 440–446.
- (195) Blidner, R. A.; Svoboda, K. R.; Hammer, R. P.; Monroe, W. T. Photoinduced RNA Interference Using DMNPE-Caged 2'-Deoxy-2'-Fluoro Substituted Nucleic Acids in Vitro and in Vivo. *Mol. Biosyst.* **2008**, *4* (5), 431–440.
- (196) Mikat, V.; Heckel, A. Light-Dependent RNA Interference with Nucleobase-Caged siRNAs. *RNA* **2007**, *13* (12), 2341–2347.
- (197) Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside Phosphoramidites—A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (20), 1859–1862.
- (198) Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **1985**, *230* (4732), 1350–1354.
- (199) Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74* (12), 5463–5467.
- (200) Buff, M. C. R.; Schäfer, F.; Wulffen, B.; Müller, J.; Pötzsch, B.; Heckel, A.; Mayer, G. Dependence of Aptamer Activity on Opposed Terminal Extensions: Improvement of Light-Regulation Efficiency. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (6), 2111–2118.
- (201) Rinne, J. S.; Kaminski, T. P.; Kubitscheck, U.; Heckel, A. Light-Inducible Molecular Beacons for Spatio-Temporally Highly Defined Activation. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (47), 5375.
- (202) Weecharangsan, W.; Yu, B.; Liu, S.; Pang, J. X.; Lee, L. J.; Marcucci, G.; Lee, R. J. Disulfide-Linked Liposomes: Effective Delivery Vehicle for Bcl-2 Antisense Oligodeoxyribonucleotide G3139. *Anticancer Res.* **2010**, *30* (1), 31–37.
- (203) Anderson, R. R.; Parrish, J. A. The Optics of Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* **1981**, *77* (1), 13–19.
- (204) Smith, A. M.; Mancini, M. C.; Nie, S. Second Window for in Vivo Imaging. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4* (11), 710–711.
- (205) Weissleder, R. A Clearer Vision for in Vivo Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19* (4), 316–317.
- (206) Frangioni, J. V. In Vivo Near-Infrared Fluorescence Imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (5), 626–634.
- (207) Schönleber, R. O.; Bendig, J.; Hagen, V.; Giese, B. Rapid Photolytic Release of Cytidine 5'-Diphosphate from a Coumarin Derivative: A New Tool for the Investigation of Ribonucleotide Reductases. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10* (1), 97–101.
- (208) Weinrich, T.; Gränz, M.; Grünewald, C.; Prinsner, T. F.; Göbel, M. W. Synthesis of a Cytidine Phosphoramidite with Protected Nitroxide Spin Label for EPR Experiments with RNA. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (3), 491–496.
- (209) Ding, R.; He, Y.; Wang, X.; Xu, J.; Chen, Y.; Feng, M.; Qi, C. Treatment of Alcohols with Tosyl Chloride Does Not Always Lead to the Formation of Tosylates. *Molecules* **2011**, *16* (7), 5665–5673.

- (210) VanRheenen, V.; Cha, D. Y.; Hartley, W. M. Catalytic Osmium Tetroxide Oxidation of Olefins: Cis-1,2-Cyclohexanediol. In *Organic Syntheses*; John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- (211) Katayama, K.; Tsukiji, S.; Furuta, T.; Nagamune, T. A Bromocoumarin-Based Linker for Synthesis of Photocleavable Peptidoconjugates with High Photosensitivity. *Chem. Commun. Camb. U. K.* **2008**, No. 42, 5399–5401.
- (212) Lu, M.; Fedoryak, O. D.; Moister, B. R.; Dore, T. M. Bhc-Diol as a Photolabile Protecting Group for Aldehydes and Ketones. *Org. Lett.* **2003**, 5 (12), 2119–2122.
- (213) Rodrigues-Correia, A.; Weyel, X. M. M.; Heckel, A. Four Levels of Wavelength-Selective Uncaging for Oligonucleotides. *Org. Lett.* **2013**, 15 (21), 5500–5503.
- (214) Rodrigues-Correia, A.; Koeppl, M. B.; Schäfer, F.; Joshi, K. B.; Mack, T.; Heckel, A. Comparison of the Duplex-Destabilizing Effects of Nucleobase-Caged Oligonucleotides. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399 (1), 441–447.
- (215) Menge, C.; Heckel, A. Coumarin-Caged DG for Improved Wavelength-Selective Uncaging of DNA. *Org. Lett.* **2011**, 13 (17), 4620–4623.
- (216) Klan, P.; Wirz, J. *Photochemistry of Organic Compounds*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2009.
- (217) Babin, J.; Pelletier, M.; Lepage, M.; Allard, J.-F.; Morris, D.; Zhao, Y. A New Two-Photon-Sensitive Block Copolymer Nanocarrier. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (18), 3329–3332.
- (218) Matsuzaki, M.; Ellis-Davies, G. C. R.; Nemoto, T.; Miyashita, Y.; Iino, M.; Kasai, H. Dendritic Spine Geometry Is Critical for AMPA Receptor Expression in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Nat. Neurosci.* **2001**, 4 (11), 1086–1092.
- (219) Fichte, M. A. H.; Weyel, X. M. M.; Junek, S.; Schäfer, F.; Herbivo, C.; Goeldner, M.; Specht, A.; Wachtveitl, J.; Heckel, A. Three-Dimensional Control of DNA Hybridization by Orthogonal Two-Color Two-Photon Uncaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**.
- (220) Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **1948**, 437 (1–2), 55–75.
- (221) Stefano, D. D. Oligonucleotides Decoy to NF-KappaB: Becoming a Reality? *Discov. Med.* **2011**, 12 (63), 97–105.
- (222) Wan, F.; Lenardo, M. J. Specification of DNA Binding Activity of NF-KB Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, 1 (4).
- (223) Hosoya, T.; Takeuchi, H.; Kanesaka, Y.; Yamakawa, H.; Miyano-Kurosaki, N.; Takai, K.; Yamamoto, N.; Takaku, H. Sequence-Specific Inhibition of a Transcription Factor by Circular Dumbbell DNA Oligonucleotides. *FEBS Lett.* **1999**, 461 (3), 136–140.
- (224) Trask, O. J. Nuclear Factor Kappa B (NF-KB) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening. In *Assay Guidance Manual*; Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Bejcek, B., Chung, T. D. Y., et al., Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD), 2004.
- (225) Hellman, L. M.; Fried, M. G. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions. *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (8), 1849–1861.
- (226) Bergström, S.; Samuelsson, B. Isolation of Prostaglandin E1 from Human Seminal Plasma PROSTAGLANDINS AND RELATED FACTORS 11. *J. Biol. Chem.* **1962**, 237 (9), PC3005-PC3006.
- (227) Simmons, D. L.; Botting, R. M.; Hla, T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol. Rev.* **2004**, 56 (3), 387–437.

- (228) Hulsebosch, C.; Xu, G.; Johnson, K.; Unabia, G.; Nestic-Taylor, O.; Perez-Polo, R. Treatment with DNA “Decoy” That Targets COX-2 Gene Promoter Improves Mechanical and Thermal Allodynia after Spinal Cord Injury in Rats. *J. Pain* **2011**, *12* (4), P41.
- (229) Lee, K.-M.; Kang, B.-S.; Lee, H.-L.; Son, S.-J.; Hwang, S.-H.; Kim, D.-S.; Park, J.-S.; Cho, H.-J. Spinal NF-KB Activation Induces COX-2 Upregulation and Contributes to Inflammatory Pain Hypersensitivity. *Eur. J. Neurosci.* **2004**, *19* (12), 3375–3381.
- (230) Tazawa, R.; Xu, X. M.; Wu, K. K.; Wang, L. H. Characterization of the Genomic Structure, Chromosomal Location and Promoter of Human Prostaglandin H Synthase-2 Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203* (1), 190–199.
- (231) Rafati, D. S.; Geissler, K.; Johnson, K.; Unabia, G.; Hulsebosch, C.; Nestic-Taylor, O.; Perez-Polo, J. R. Nuclear Factor-KB Decoy Amelioration of Spinal Cord Injury-Induced Inflammation and Behavior Outcomes. *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86* (3), 566–580.
- (232) Iribe, H.; Miyamoto, K.; Takahashi, T.; Kobayashi, Y.; Leo, J.; Aida, M.; Ui-Tei, K. Chemical Modification of the siRNA Seed Region Suppresses Off-Target Effects by Steric Hindrance to Base-Pairing with Targets. *ACS Omega* **2017**, *2* (5), 2055–2064.
- (233) Allerson, C. R.; Sioufi, N.; Jarres, R.; Prakash, T. P.; Naik, N.; Berdeja, A.; Wanders, L.; Griffey, R. H.; Swayze, E. E.; Bhat, B. Fully 2'-Modified Oligonucleotide Duplexes with Improved in Vitro Potency and Stability Compared to Unmodified Small Interfering RNA. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (4), 901–904.
- (234) Wahlstrom, J. L.; Ronald, R. C. Detritylation of Ethers Using Iodine-Alcohol Reagents: An Acid-Catalyzed Reaction. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (17), 6021–6022.
- (235) Pfitzner, K. E.; Moffatt, J. G. A New and Selective Oxidation of Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (19), 3027–3028.
- (236) Keumi, T.; Tomioka, N.; Hamanaka, K.; Kakahara, H.; Morita, T.; Kitajima, H.; Fukushima, M. Positional Reactivity of Dibenzofuran in Electrophilic Substitutions. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (15), 4671–4677.
- (237) Keumi, T.; Yamada, H.; Takahashi, H.; Kitajima, H. Regioselective Preparation of 2- and 3-Nitrodibenzofurans by the Direct Nitration of Dibenzofuran. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55* (2), 629–630.
- (238) Berndt, F.; Ioffe, I.; Granovsky, A. A.; Mahrwald, R.; Tannert, S.; Kovalenko, S. A.; Ernsting, N. P. 7-Amino-Dibenzofuran-3-Carboxylate: A New Probe for Femtosecond Dynamic Microsolvation Studies of Biomolecules. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2012**, *234*, 164–170.
- (239) Periasamy, M.; Thirumalaikumar, M. Methods of Enhancement of Reactivity and Selectivity of Sodium Borohydride for Applications in Organic Synthesis. *J. Organomet. Chem.* **2000**, *609* (1), 137–151.
- (240) Zhang, Y.; Ren, T.; Zhu, W.; Xie, Y. An Improved Iodination of 2-Amino-5-Nitrobenzonitrile. *Org. Prep. Proced. Int.* **2007**, *39* (1), 90–93.
- (241) Reddy, K. R.; Maheswari, C. U.; Venkateshwar, M.; Kantam, M. L. Selective Oxidation of Aromatic Amines to Nitro Derivatives Using Potassium Iodide-Tert-Butyl Hydroperoxide Catalytic System. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (1–2), 93–96.
- (242) Gilman, H.; Brown, G. E.; Bywater, W. G.; Kirkpatrick, W. H. Dibenzofuran. III. Nuclear Substitutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56* (11), 2473–2477.
- (243) *Methoden der organischen Chemie. [E] Bd. E6 a: Erweiterungs- und Folgebände zur 4. Auflage Heterene 1 Teil 1*, 4. Aufl.; Backes, J., Kreher, R. P., Houben, J., Müller, E., Weyl, T., Büchel, K. H., Eds.; Thieme: Stuttgart, 1994.

- (244) Bartoli, G. Conjugate Addition of Alkyl Grignard Reagents to Mononitroarenes. *Acc. Chem. Res.* **1984**, *17* (3), 109–115.
- (245) Hoye, T. R.; Jeffrey, C. S.; Shao, F. Mosher Ester Analysis for the Determination of Absolute Configuration of Stereogenic (Chiral) Carbinol Carbons. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (10), 2451–2458.
- (246) Elbashir, S. M.; Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. Functional Anatomy of siRNAs for Mediating Efficient RNAi in *Drosophila Melanogaster* Embryo Lysate. *EMBO J.* **2001**, *20* (23), 6877–6888.
- (247) siDesign Center | Dharmacon <http://dharmacon.gelifesciences.com/design-center/> (accessed Mar 1, 2018).
- (248) Chiu, Y.-L.; Rana, T. M. RNAi in Human Cells. *Mol. Cell* **2002**, *10* (3), 549–561.
- (249) Kypr, J.; Vorlícková, M. Circular Dichroism Spectroscopy Reveals Invariant Conformation of Guanine Runs in DNA. *Biopolymers* **2002**, *67* (4–5), 275–277.

## 5.4 Abkürzungsverzeichnis

**A**

A	Adenin
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl
<i>AcGFP</i>	„ <i>Aequorea coerulea</i> green fluorescent protein“
AE-HPLC	Ionenaustausch-Chromatographie
<i>Ago</i>	Argonaut-Protein
ASS	Acetylsalicylsäure

**B**

Bhc	6-Brom-4-methyl-7-hydroxycumarin
Bhc-diazo	6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycumarin
BHQ	6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxy-8-(methoxycarbonyl)cumarin
bzw.	beziehungsweise

**C**

C	Cytosin
Ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Zirkulardichroismus
COX2	Cyclooxygenase-2
CPG	Controlled Porous Glass
CRDD	„catch and release“-Decoy

**D**

d	Dublett
DBF	Dibenzofuran
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEACM	[7-(Diethylamino)cumarin-4-yl]methyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR 8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8



d.h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMACM	([7-(Dimethylamino)cumarin-4-yl]methyl
DMF	Dimethylformamid
DMNB	4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl
DMNPE	1-(4, 5-dimethoxy-2-nitrophenyl)diazoethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DsRed	Discosoma striata Rot fluoreszierendes Protein
dsRNA	dopplesträngige RNA
DTT	Dithiothreitol

**E**

EANBP	(2-(4'-Bis((2-methoxyethoxy)ethyl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol)
E.coli	Escherichia coli
<i>eGFP</i>	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglykolessigsäure
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ESI	Elektro-Spray-Ionisation
<i>et al.</i>	et alii
eq.	Äquivalente

**F**

FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
fs	Femtosekunde

**G**

G	Guanin
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutamat
GM	Göppert-Mayer

GTF            Genereller Transkriptionsfaktor

## H

h              Stunde

HIV-1        Humanes Immundefizienzvirus Typ 1

HPLC        „high performance liquid chromatography“

HRMS        Hochaufgelöste Massenspektrometrie

Hz            Hertz

## I

IL-1         Interleukin 1

IL-6         Interleukin 6

IL1R         Interleukin-1-Rezeptor

IKK $\alpha$         I $\kappa$ B-Kinase  $\alpha$

IKK $\beta$         I $\kappa$ B-Kinase  $\beta$

IKK $\gamma$         I $\kappa$ B-Kinase  $\gamma$

IR            Infrarot

## J

*J*            Kopplungskonstante (NMR)

## L

LED         Leuchtdiode

## M

M            Molar

m            Multipllett

MALDI       Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation

MHz         Megahertz

miRNA       microRNA

miRNP       Ribonukleoproteinkomplex

ml            Milliliter

$\mu$ l            Mikroliter

mmol        Millimol

MOPS        3-(N-Morpholino)propansulfonsäure-Puffer

mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
<b>N</b>	
NDBF	Nitrodibenzofuran
NEMO	NF- $\kappa$ B essential modifier
NF- $\kappa$ B	„nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“
NIK	NF- $\kappa$ B-induzierte Kinase
nm	Nanometer
NMO	Methylmorpholin-N-Oxid
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NPE	1-(2-Nitrophenyl)ethyl
NPOM	Nitropiperonyloxymethyl
NPP	1-(2-Nitrophenyl)propyl
<b>O</b>	
ODN	Desoxyribonukleinsäure-Decoy
<b>P</b>	
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCMM	„Photocleavable mass marker“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PGHS-2	Prostaglandinsynthase-2
PKR	RNA-abhängige Proteinkinase
pmol	Pikomol
PNA	Peptid-Nukleinsäuren
ppm	„parts per million“
PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat
Pre-miRNA	precursor micro RNA
Pri-mRNA	primary micro RNA
PVA	Polyvinylalkohol

PVDF	Polyvinylidenfluorid
<b>Q</b>	
q	Quartett
<b>R</b>	
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse H	Ribonuklease H
RP	„reversed phase“
Rpm	„revolutions per minute“ = Umdrehungen pro Minute
RTF	Regulatorischer Transkriptionsfaktor
<b>S</b>	
S	Singulett
SEAP	„secreted alkaline phosphatase“
siRNA	„small interfering“ RNA
SPOS	„solid phase organic synthesis“
SPS	Festphasensynthese („solid phase synthesis“)
<b>T</b>	
T	Thymin
t	Triplett
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>Tert</i> -butyldimethylsilyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

Tips	Triisopropylsilyl-Schutzgruppe
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TQ4	TideQuencher4
TRE	Transkriptions-Response Element
tRNA	Transfer-RNA
TsCl	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid

## U

UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett

## V

V	Volt
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül

## W

W	Watt
---	------

## Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

## Symbole

$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\delta$	chemische Verschiebung
$\delta_a$	Zweiphotonen-Einfangsquerschnitt
$\delta_u$	Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
$\phi$	Zweiphotonen-Quantenausbeute
$\varphi$	Quantenausbeute

## 5.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, die an dem guten Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren. Ohne eure Mithilfe und Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Dissertation niemals zustande gekommen.

Mein erster Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Alexander Heckel für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsprojekts und die hervorragenden experimentellen Bedingungen. Darüber hinaus bin ich für die zugestandene wissenschaftliche Freiheit und das mir entgegengebrachte Vertrauen überaus dankbar.

Prof. Dr. Martin Grininger möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter des Massenspektrometrie-Service und der NMR-Abteilung. Ebenso danken möchte ich dem Team der Chemikalienausgabe und –Entsorgung. Eine so umfangreiche Auswahl kompetenter Dienstleistungen zur Verfügung gestellt zu bekommen ist überaus wertvoll.

Den technischen Assistenten Martin Held und Alexandra Schuck danke ich für die Aufnahme vieler Massespektren. Darüber hinaus geht mein Dank an Martin Held für die technische Unterstützung sämtlicher Computer- und HPLC-Probleme. Alexandra Schuck danke ich im Speziellen für die Einführung in das Arbeiten mit Zellen und für die stete Bereitschaft mich bei meinen Zellexperimenten zu unterstützen. Heike Köhler möchte ich ebenfalls danken. Ihre freundlich Art, ihr immer offenes Ohr und ihr Organisationstalent sind für den Arbeitskreis unverzichtbar.

Dr. Ute Scheffer und Elisabeth Kalden danke ich für ihre unendliche Geduld und Lösungsansätze bei den zahlreichen biochemischen Fragestellungen.

Dr. Martin Hengesbach danke ich für die Zurverfügungstellung des Arbeitsplatzes im Isotopenlabor. Mein Dank geht außerdem an Dr. Florian Sochor für die Einführung in das Arbeiten mit radioaktiven Proben.

Bei meinen Forschungspraktikanten Alexandra Gresika, Lisa-Marie Herzig, Cheng-Kang Pou, Robert Brilmayer, Tom Landgraf, Farzaneh Rasekhmanesch und Mara Meub möchte ich mich für die Hilfe bei der organischen Synthese bedanken.

Der umfassendste und herzlichste Dank geht an den gesamten Arbeitskreis: Wir haben viel Zeit miteinander verbracht und dabei wirklich viel erlebt. Wir haben nicht nur zusammen gearbeitet. Wir haben gelacht und auf Tischen getanzt. Wir haben diskutiert und philosophiert. Wir haben gekocht und dabei die Hochs (Gurkengemüse) und Tiefs (Brokkolisuppe) der Kulinarik kennengelernt. Den Stammbaum der Zitrusfrüchte werde ich wohl nie wieder vergessen. Ich blicke zurück auf gemeinsame Grillabende, weihnachtliche Musikauftritte und unvergessliche Ausflüge. Aber vor

allem bin ich euch dankbar für jeden fachlichen Rat und die große moralische Unterstützung. Ich werde euch vermissen.

Im speziellen Danke ich Josefine Kahlstatt, Manuela Fichte und Patrick Seyfried für die vielen, auch außerhalb des Unialltags, verbrachten Stunden. Wir waren ein tolles „Jompix“-Team.

Yvonne Becker und Josefine Kahlstatt danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Juliane Sanfillipo danke ich für die Korrektur des englischsprachigen Abschnitts.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meine Mutter, Grazyna Turowska, und mein Bruder, Aaron Trapold, waren immer für mich da und werden auch immer an meiner Seite sein.

Mein größter Dank geht an meinen Ehemann Oliver. Du hattest es wirklich nicht immer leicht mit mir. Auch wenn ich mal wieder wegen Nichtigkeiten in tiefer Verzweiflung war, hast du mich ertragen, mir immer Mut gemacht und mich bedingungslos unterstützt. Zuletzt danke ich meiner Tochter Madeleine für ... ja, einfach nur dafür, dass du da bist. Du bist das Beste was mir passieren konnte. Danke mein Sonnenschein.

## 5.6 Lebenslauf

**Xenia Maria Magdalena Weyel**

Taunusblick 22  
35647 Waldsolms  
xenia@weyelonline.de



### PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum: 27.04.1986  
Geburtsort: Frankfurt am Main  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### AKADEMISCHER UND SCHULISCHER WERDEGANG

- |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 02/2013 – 10/2017 | <p>Promotionsstudium bei Prof. Dr. Alexander Heckel an der Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt am Main</p> <p><i>Titel der Dissertation: Entwicklung zweiphotonen-spaltbarer Linker zur Erzeugung von lichtinduzierten Strangbrüchen in Oligonukleotiden und deren biologische Anwendung</i></p>                                                     |
| 10/2012 – 01/2013 | <p>Wissenschaftliche Hilfskraft an der Johann Wolfgang von Goethe-Universität am Institut für organischen Chemie und chemische Biologie</p>                                                                                                                                                                                                                       |
| 10/2005 – 08/2012 | <p>Studium der Chemie an der Goethe-Universität Frankfurt am Main</p> <p>Abschluss: Master of Science 08/2012</p> <p><i>Titel der Masterarbeit: Cumarine als photolabile Schutzgruppen von Nukleobasen</i></p> <p>Abschluss: Bachelor of Science 10/2009</p> <p><i>Titel der Bachelorarbeit: Optimierung der Synthese von 2,5-Dihydroxy-terephthalaldehyd</i></p> |
| 10/1996 – 06/2005 | <p>Georg Büchner Gymnasium Bad Vilbel<br/>mit Abschluss: Allgemeine Hochschulreife</p>                                                                                                                                                                                                                                                                            |



## STIPENDIEN

---

02/2013                      Doktorandenstipendium der Johann Wolfgang von Goethe-  
Universität Frankfurt am Main

## WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

---

- 1)     X. M. M. Weyel, M. A. H. Fichte and A. Heckel, ACS Chem. Biol., **2017**, 12, 2183–2190.
- 2)     M. A. H. Fichte, X. M. M. Weyel, S. Junek, F. Schäfer, C. Herbivo, M. Goeldner, A. Specht, J. Wachtveitl and A. Heckel, Angew. Chem. Int. Ed., **2016**, 55, 8948–8952
- 3)     A. Rodrigues-Correia, X. M. M. Weyel and A. Heckel, Org. Lett., **2013**, 15, 5500–5503.