

Adaptormoleküle zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren oder miRNAs an nicht native Bindestellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Mathias Bolz
aus Flörsheim am Main

Frankfurt am Main, 2021

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael W. Göbel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

Datum der Disputation: 26.05.2021

„Every so often, you have to unlearn what you thought you already knew, and replace it by something more subtle”

Terry Pratchett

Kurzfassung

Die Kontrolle der Genexpression ist eines der großen Ziele der chemischen Biologie. Gemäß dem klassischen Dogma der Molekularbiologie verläuft der Fluss der genetischen Information über die Transkription von DNA zur *messenger* RNA (mRNA) und durch die Translation von mRNA zu Proteinen. Auch wenn der ursprünglichen Formulierung dieses Dogmas verschiedene Aspekte hinzugefügt wurden, bleibt die Kernaussage unverändert. Eine Störung der Genexpression ist in vielen Fällen die Ursache für schwerwiegende Erkrankungen. Klassische Therapeutika, die im Allgemeinen aus kleinen Molekülen bestehen, können pathogene Proteine spezifisch binden und inhibieren. Allerdings greifen diese Wirkstoffe am Ende der Produktionskette ein und nicht alle Proteine können adressiert werden. Im Gegensatz dazu könnte ein Eingriff auf der Ebene der Transkription oder Translation die Expression der pathogenen Proteine auf ein normales Maß senken oder ganz verhindern. Als entscheidende Regulatoren der Genexpression stellen Transkriptionsfaktoren (TFs) einen interessanten Angriffspunkt zur Kontrolle der Transkription dar. TFs können über den Kontakt zu weiteren Proteinen die RNA-Polymerase II rekrutieren und so die Transkription starten. Für die Translation ist die Halbwertszeit der mRNA ein entscheidender Faktor. Die Lebensdauer wird durch eine Vielzahl an Proteinen und *micro* RNAs (miRNAs) reguliert. MiRNAs sind kurze Oligonukleotide, die in Argonautproteine eingebaut werden können. Die daraus resultierenden *RNA-induced silencing complexes* (RISCs) sind in der Lage, den Abbau der mRNA einzuleiten. Sowohl TFs als auch RISCs besitzen dabei Nukleinsäure-bindende Untereinheiten, die mit spezifische Sequenzen assoziieren. In gewisser Weise ist die molekulare Erkennung der Nukleinsäuren vergleichbar mit einer Postsendung, die aufgrund der Adresse korrekt zugestellt wird. Um in diesem Bild des täglichen Lebens zu bleiben: Bei einem Wechsel des Wohnorts ist es üblich, einen Nachsendeauftrag zu stellen. Dabei wird die alte Anschrift auf den Postsendungen mit einem neuen Adressetikett überklebt und die Zustellung erfolgt an den neuen Wohnort. Das zentrale Thema dieser Dissertation ist, dieses „Umetikettieren“ auch auf TFs und RISCs zu übertragen. Hierbei ist es notwendig, die Nukleinsäure-bindenden Untereinheiten der Komplexe, also die „alte Adresse“, vollständig zu blockieren und gleichzeitig eine hohe Affinität zu einer neuen Sequenz zu erzeugen. Hierzu könnten bifunktionale Adaptormoleküle verwendet werden.

Die Adaptoren für die Rekrutierung von TFs müssen in der Lage sein, sowohl die doppelsträngige DNA (dsDNA) als auch einen TF zu binden (Abbildung I). Dabei sollte eine Selbstbindung des Adaptors vermieden werden. In dieser Arbeit wurde der TF Sp1 als Ziel gewählt, da er an GC-reiche dsDNAs bindet. Dies ermöglicht die Wahl einer AT- oder GA-reichen DNA-Sequenz als Ziel der Umleitung, wodurch eine Selbstbindung des Adaptors minimiert werden sollte. Zur Erkennung der DNA war geplant, Pyrrol-Imidazol-

Polyamide (PIPs), triplexbildende Oligonukleotide (TFOs) oder pseudokomplementäre PNAs einzusetzen. Für Letztere war es möglich, eine neue Syntheseroute zu einem Fmoc-geschützten Thiouracil-Monomer zu entwerfen. Dabei konnte eine selektive Alkylierung an der N1-Position des Thiouracils durchgeführt werden. Auf Basis der PIPs und der TFOs wurden jeweils verschiedene Adaptoren entworfen, deren Bindung zu ihren Zielen mit Band-Shift-Experimenten und im Fall der PIPs zusätzlich mit fluoreszenzbasierten Pulldown-Experimenten gezeigt wurde. Im Rahmen dieser Versuche zeigte sich, dass die PIP-basierten Systeme deutlich besser an die Zielsequenzen banden als die TFO-basierten Adaptoren. Das Konjugat **K5a** besaß hierbei die besten Eigenschaften. Weiterhin konnte mit diesem Adaptor in Pulldown-Experimenten gezeigt werden, dass Sp1 auf eine nicht kanonische AT-reiche Bindestelle umgeleitet wurde. Im Anschluss konnte das Sp1 in Western-Blots detektiert werden. Des Weiteren ließ sich zeigen, dass **K5a** in einem HeLa-Lysat über mehrere Stunden stabil war und somit eine Anwendung in Zellkulturexperimenten möglich sein sollte.

Für die Rekrutierung der RISCs war lediglich eine Erkennung zweier einzelsträngiger RNA-Abschnitte notwendig. Hierzu wurden zwei LNAs oder LNA/DNA-Mixmere verwendet, die über einen Linker verknüpft waren (Abbildung I). Als Folge dieses Aufbaus mussten die beiden Adaptorhälften orthogonal sein, da eine Selbstbindung des Adaptors leichter als bei den TF-Adaptoren auftreten konnte. Diese Adaptoren wurden mit Band-Shift- und fluoreszenzbasierten Pulldown-Experimenten auf ihre Fähigkeit, eine Cy5-gelabelte miRNA auf eine Ziel-RNA umzuleiten, überprüft. Es konnte beobachtet werden, dass *all*-LNA Adaptoren sehr viele off-target-Effekt aufwiesen, welche die Umleitung von miRNAs verhinderte. Im Gegensatz dazu konnten mit DNA/LNA-Mixmeren eine vollständige Umleitung von miRNA-Modellen beobachtet werden. Es war ebenfalls möglich, spezifische RISCs aus HeLa-Lysaten mit unterschiedlichen Adaptoren in Pulldown-Experimenten zu isolieren und in nachfolgenden Western-Blots zu detektieren. Nachdem gezeigt war, dass eine Umleitung *in vitro* gelang, sollte die Funktion der Adaptoren in Zellkulturexperimenten geprüft werden. Allerdings konnten in diesen Versuchen keine eindeutigen Ergebnisse erhalten werden, sodass die biologische Relevanz der RISC-Umleitung bislang noch nicht bestätigt werden konnte.

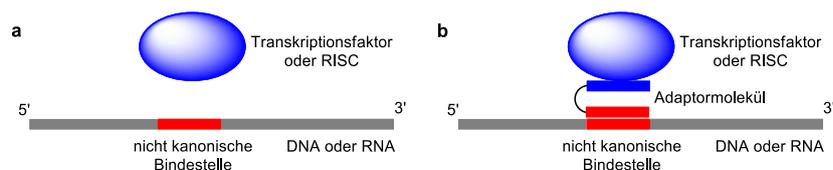


Abbildung I: Schematische Darstellung der Umleitung von TFs oder RISCs. **a:** Ein TF oder RISC (blau) ist nicht in der Lage mit einer Nukleinsäure zu interagieren, da diese keine Bindestelle aufweist (rot). **b:** Durch die Zugabe eines Adaptor-Moleküls erfolgt eine Umleitung der Proteine und die Genexpression kann beeinflusst werden.

Abstract

The control of gene expression is one of the most important goals of chemical biology. According to the classical dogma of molecular biology the flow of genetic information proceeds via transcription from DNA to messenger RNA (mRNA) and through translation from mRNA to proteins. Even though the original dogma was extended in several aspects, there is no change in the central statement. A malfunction of gene expression often causes severe diseases. Classical therapeutics, which are typically small molecules, can bind and inhibit these pathogenic proteins specifically. Nevertheless, these agents interfere at the end of the production chain and there are undruggable proteins. In contrast, an intervention at the level of transcription or translation could reduce the pathogenic proteins to a normal level or prevent their expression completely. As important regulators of gene expression transcription factors (TFs) are interesting targets for transcriptional control. TFs can make contact to further proteins and recruit the RNA-polymerase II and start the transcription of a gene. An important aspect for translation is the half-life of the mRNA. The lifetime is controlled by several proteins and micro RNAs (miRNAs). MiRNAs are short oligonucleotides, which can be incorporated in argonaut proteins. The resulting RNA induced silencing complexes (RISCs) can initiate the degradation of the mRNA. Both TFs and RISCs contain a nucleic acid binding subunit for a sequence specific recognition. In a way, the molecular recognition of nucleic acid is comparable to a post, that is delivered correctly because of its address. To use the same metaphor: In case of a change of residence, a redirection service is usually ordered. Thereby the old address of the post is paste over with a new address label. The central goal of this dissertation is the transfer of this "relabeling" to TFs and RISCs. In this case it is necessary to cover the nucleic acid binding unit, the "old address", completely and to create a high affinity to a new sequence at the same time. This can be achieved by using bifunctional adaptor molecules.

The adaptor molecules for the redirection of TFs must have the ability to bind double stranded DNA (dsDNA) and TFs (Figure I). Thereby, a self-binding must be avoided. In this work the TF Sp1 was chosen as target since it binds to GC-rich dsDNA. This allows the choice of a AT- or GA-rich DNA sequence as target for redirection and minimize the possibility of self-binding. pyrrole-imidazole-polyamides (PIPs), triplex-forming oligonucleotides (TFOs) and pseudo complementary PNAs should be used for the recognition of DNA. For the latter it was possible to create a new synthetic route for a Fmoc-protected thiouracil monomer. Thereby, a selective alkylation of the N1-position of thiouracil could be achieved. Based on PIPs and TFOs, several adaptor molecules were created. The binding of the adaptor molecules to their target sequences was shown in band shift assays and in case of the PIP-adaptors by fluorescent based pulldown experiments as well. It turned out that the PIP-adaptors were more effective than the TFO-based systems.

Especially the conjugate **K5a** was very effective. Subsequently, the adaptor was used in pulldown experiments to recruit Sp1 to a non-canonic AT-rich binding-site. This was proofed by a western blot that followed the pulldown. Additionally, it was shown, that **K5a** was stabile in a HeLa-lysate for several hours, and therefore it is suitable for cell culture experiments.

For the recruitment of RISCs, it was necessary to recognize two single stranded RNAs. As a result, the adaptor molecule was compromised of two LNAs or DNA/LNA-mixmers, that were connected by a linker (Figure I). In consequence of the design, the two parts of the adaptor must be orthogonal, since a self-binding was more likely than in the case of the TF-adaptors. Those adaptors were tested in band shift and fluorescent based pulldown experiments on their ability to recruit a Cy5-labeled miRNA to a target-RNA. It turned out that the all-LNA-adaptors showed to many off target effects, that limited their abilities to redirect miRNAs. In contrast the DNA/LNA-mixmers showed the expected behavior and a complete redirection of miRNA models. It was also possible to isolate specific RISCs from HeLa-lysates in pulldown experiments with multiple adaptors and to detect them in western blots. After the *in vitro* experiments indicate, that the redirection of RISCs was possible, the concept should be confirmed in cell culture trials. Unfortunately, the results of the cell culture experiments remained unclear and hard to reproduce. Therefore, the biological relevance of the concept could not be confirmed yet.

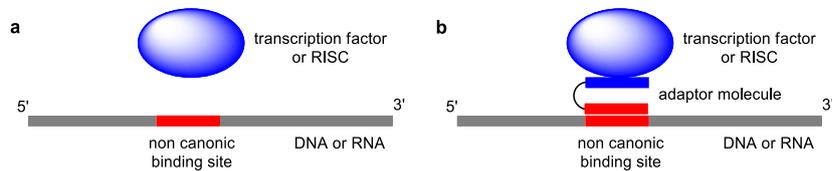


Figure I: Schematic representation of the redirection of TFs or RISCs. **a:** TF or RISC is unable to interact with a nucleic acid, since it has no binding site (red). **b:** The addition of an adaptor molecule induces a complexation and affects gene expression.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Nukleinsäuren und ihre Modifikationen	3
2.1 Aufbau und Struktur von DNA und RNA	3
2.1.1 Strukturen der Nukleinsäuren.....	4
2.1.2 Alternative Basenpaarungen.....	6
2.2 Modifizierte Nukleinsäuren	10
2.2.1 <i>Locked Nucleic Acids</i> (LNAs).....	12
2.2.2 Peptidnukleinsäuren (PNAs).....	14
3. Die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3.....	17
4. DNA-Erkennung und artifizielle Transkriptionsfaktoren (ATFs)	20
4.1 Pyrrol-Imidazol-Polyamide (PIPs).....	23
4.1.1 Synthese der PIPs	25
4.1.2 PIP-basierte ATF	26
5. Regulation der mRNA	28
5.1 RNA-Interferenz und micro RNAs.....	28
5.1.1 Aufbau von siRNA.....	30
5.1.2 Anwendungen für miRISCs.....	31
5.2 Das Argonaut 2 Protein (Ago2).....	33
5.3 Der miRNA 17/92 Cluster	34
6 Oligonukleotid-basierte Therapien und Bioverfügbarkeit.....	36
6.1 ON-Therapien	36
6.1.1 <i>antisense oligonucleotides</i> (ASOs)	36
6.1.2 RNAi und miRNA	37
6.1.3 TF <i>decoy</i> (TFD).....	38
6.2 Bioverfügbarkeit von Oligonukleotiden	39
7 Adaptoren zur Umleitung von Sp1 auf nicht natürliche Bindestellen	41
7.1 Synthese der Polyamide.....	45
7.1.1 Festphasensynthese.....	46
7.1.1.1 Synthese der Monomere 5 und 10	46
7.1.1.2 Synthese der Polyamide	48
7.1.1.4 Synthese der Dimere	50
7.1.2 Synthese in Lösung	54
7.1.2.1 Synthese von Fragment A	54
7.1.2.2 Synthese des Fragments B	55
7.1.2.3 Synthese der Fragmente C	58
7.1.3 Synthese der Polyamide	59

7.1.3.1	Synthese von PA4	59
7.1.3.2	Synthese von PA3	61
7.1.3.3	Synthese von PA6	61
7.2	Synthese der Konjugate	63
7.3	Experimente zur Umleitung von Sp1 auf eine AT-reiche Sequenz.....	67
7.3.1	Band-Shift-Experimente.....	67
7.3.1.1	Experimente mit den Konjugaten K1 – K3	67
7.3.1.2	Experimente mit den Konjugaten K4 – K9	70
7.3.2	Pulldown-Experimente	75
7.3.3	Stabilität der Konjugate in Zelllysaten	81
7.4	Adaptoren auf TFO Basis	83
7.4.2	Band-Shift-Experimente mit den TFO-Adaptoren.....	84
7.4.3	Vergleich der TFO-Adaptoren mit den PIP-Konjugaten.....	87
7.5	Zellkulturversuche mit K9	91
7.6	Bausteine für pseudokomplementäre PNA.....	92
8	Umleitung von hAgo2 mittels Adaptormolekülen	97
8.2	Band-Shift und Pulldown-Experimente mit den LNA-Adaptoren	100
8.2.1	Selektivität der RISC-Bindung.....	107
8.3	LNA/DNA-Adaptoren	109
8.3.1	Band-Shift-Experimente mit den DNA/LNA-Mixmeren	110
8.3.2	Pulldown-Experimente	114
8.3.3	Schmelzpunktmessungen	116
8.3.4	Isolierung von RISCs aus HeLa-Lysaten.....	117
8.3.5	Zellkulturexperimente zur Umleitung von miR-20a auf die <i>PIM1</i> -mRNA.....	119
8.3.6	Stabilitätstest mit den Adaptoren 30 und 31	121
8.4	Gegen miR-let-7 gerichteter Adaptor 37	123
8.4.1	Zellkulturexperimente mit Adaptor 37	126
8.5	Vorgehen beim Entwurf der Adaptoren.....	130
9	Zusammenfassung und Ausblick.....	132
9.1	Umleitung von Sp1	132
9.2	Umleitung von RISCs	135
10	Experimenteller Teil.....	137
10.1	Allgemeine Arbeitstechniken	137
10.1.1	Verwendete Apparaturen	137
10.1.2	Hydrierungen unter erhöhtem Druck	137
10.1.3	Dünnschichtchromatographie.....	138
10.1.4	Präparative Säulenchromatographie	138
10.1.5	Analytische und semipräparative <i>rp</i> -HPLC der Polyamide	138

10.2 Analytische und spektroskopische Methoden	140
10.2.1 Kernresonanzspektroskopie.....	140
10.2.2 Massenspektrometrie.....	140
10.2.3 IR-Spektroskopie	141
10.2.4 UV/VIS-Spektroskopie	141
10.2.5 Schmelzpunktmessungen der Verbindungen	141
10.2.6 Schmelzpunktmessungen der Oligonukleotide.....	141
10.3 Gelelektrophorese	142
10.3.1 Analytische dPAGE.....	142
10.3.2 Präparative dPAGE.....	142
10.3.3 Band-Shift Experimente	142
10.4 Pulldown-Experimente.....	143
10.4.1 Beladen der <i>Magnetic Beads</i>	143
10.4.2 Fluoreszenz-Pulldown.....	143
10.4.3 Pulldown-Experimente zur Proteinisolierung und Detektion mittels Western-Blot.....	144
10.5 Synthese der Monomere für die Festphasensynthese	146
10.5.1 Synthese von 1-Methyl-2-trichloracetylpyrrol (Py-CCl ₃) 1	146
10.5.2 Synthese von 1-Methyl-4-nitro-2-trichloracetylpyrrol (O ₂ N-Py-CCl ₃) 2	147
10.5.3 Synthese von Methyl-1-methyl-4-nitropyrrol-2-carboxylat (O ₂ N-Py-OMe) 3 ..	148
10.5.4 Synthese von Methyl-4-[(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino]-1-methylpyrrol-2- carboxylat (Boc-Py-OMe) 4	148
10.5.5 Synthese von 4-[(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino]-1-methylpyrrol-2-carbonsäure (Boc-Py-OH) 5	149
10.5.6 Synthese von 1-Methyl-2-trichloracetylimidazol (Im-CCl ₃) 6	150
10.5.7 Synthese von 1-Methyl-4-nitro-2-trichloracetylimidazol (O ₂ N-Im-CCl ₃) 7	151
10.5.8 Synthese von Methyl-1-methyl-4-nitroimidazol-2-carboxylat (O ₂ N-Im-OMe) 8	151
10.5.9 Synthese von Methyl-4-[(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino]-1-methylimidazol-2- carbonsäure (Boc-Im-OMe) 9	152
10.5.10 Synthese von 4-[(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino]-1-methylimidazol-2-carboxylat (Boc-Im-OH) 10	152
10.5.11 Synthese von 1-Methylpyrrol-2-carbonsäure (Py-OH) 13	153
10.5.12 Synthese von Boc-Py-Py-OH 14	154
10.5.13 Synthese von Boc-Py-Py- γ -OH 15	154
10.5.14 Synthese von Boc-Py-Im-OH 16	155
10.5.15 Synthese von Py-Im-OH 17	155
10.5.16 Synthese von Py-Py-OH 18	156
10.5.17 Synthese von O ₂ N-Py- γ -OMe 19	157
10.5.18 Synthese von O ₂ N-Py-Py-OMe 20	157

10.5.19	Synthese von O ₂ N-Py-Py- γ -OMe 21	158
10.5.20	Synthese von O ₂ N-Py-Im-OMe 22	159
10.5.21	Synthese von Boc-Py-Py-OMe 23	160
10.5.22	Synthese von Boc-Py-Py- γ -OMe 24	160
10.5.23	Synthese von Boc-Py-Im-OMe 25	161
10.5.24	Synthese von 1-Methyl-4-nitropyrrol-2-carbonsäure (O ₂ N-Py-OH) 26	162
10.5.25	Synthese von Py-Im-OMe 27	162
10.5.26	Synthese von Py-Py-OMe 28	163
10.5.27	Synthese von Boc- γ -Py-Im-OMe 29	164
10.5.28	Synthese von Boc- γ -Py-Im-OH 30	165
10.6	Festphasensynthese der Polyamide	166
10.6.1	Im-Py-Py- γ -Py-Py-Py- β -Linker-NH ₂ (PA2).....	166
10.6.2	Im-Py-Py-Py- γ -Py-Py-Py-Py- β -Linker-NH ₂ (PA3)	167
10.6.3	Py-Py-Py-Py- γ -Py-Im-Py-Py- β -Linker-NH ₂ (PA5)	168
10.7	Synthese der PIPs in Lösung	169
10.7.1	Synthese von H ₂ N-Linker-Boc 31	169
10.7.2	Synthese von z- β -Linker-Boc 32	169
10.7.3	Synthese von H ₂ N- β -Linker-Boc 33	170
10.7.4	Synthese von O ₂ N-Py-Py-Py-Py-OH 34	171
10.7.5	Synthese von O ₂ N-Py-Py-Py-OMe 35	171
10.7.6	Synthese von O ₂ N-Py-Py-Py-Py-OMe 36	172
10.7.7	Synthese von O ₂ N-Py-Py-OH 37	173
10.7.8	Synthese von Py-Im-Py-Py- γ -OMe 38	174
10.7.9	Synthese von Py-Im-Py-Py- γ -OH 39	175
10.7.10	Synthese von Im-Py-Py-Py- γ -OMe 40	176
10.7.11	Synthese von Im-Py-Py-Py- γ -OH 41	177
10.7.12	Synthese von Im-Py-OMe 42	177
10.7.13	Synthese von Im-Py-OH 43	178
10.7.14	Synthese von O ₂ N-Py-Py-Py-Py- β -Linker-Boc 44	179
10.7.15	Synthese von PA4-Boc	180
10.7.16	Synthese von PA4	181
10.7.17	Synthese von PA3-Boc	182
10.7.18	Synthese von O ₂ N-Py-Py-Py-Py-Linker-Boc 45	183
10.7.19	Synthese von PA6-Boc	184
10.7.20	Synthese von PA6	185
10.8	Synthese der Konjugate	186
10.9	Synthese der PNA-Bausteine	190

10.9.1 Synthese von Ethyl-2-(2-(2-methyl-4-methoxybenzyl)thiouracil-1-yl)acetat 48	190
10.9.2 Synthese von 4-Methoxy-2-methylbenzylalkohol 50	191
10.9.3 Synthese von 2-(2-Methyl-4-methoxybenzyl)thiouracil 53	191
10.9.4 Synthese von Ethoxycarbonyl-methyltrifluoromethansulfonat 55	193
10.9.5 Synthese von 2-(2-(2-Methyl-4-methoxybenzyl)thiouracil-1-yl)acetat 56	193
10.9.6 Synthese von 2-(4-Methoxybenzyl)thiouracil 61	194
10.9.7 Synthese von Ethyl-2-(2-(4-methoxybenzyl)thiouracil-1-yl)acetat 62	195
10.9.7.1 Synthese von Ethyl-2-(thiouracil-1-yl)acetat 60	196
10.9.8 Synthese von 2-(2-(4-Methoxybenzyl)thiouracil-1-yl)acetat 63	196
10.9.9 Synthese von 2-(4-Methoxybenzyl)thiouracil-Fmoc/Bn-PNA-Monomer 64	197
11 Literatur	199
12. Anhang	210
12.1 Puffer und Gele	210
12.1.1 Puffer Stammlösungen:	210
12.1.2 Gele	213
12.1.3 Färbelösungen	214
12.2 Abkürzungsverzeichnis	216
12.3 Nomenklatur der synthetisierten Verbindungen	222
12.4 Sequenz von Sp1 und Sp1-H8	223
12.5 Erklärungen zu Kooperationen und Copy Right	224
12.6 Wissenschaftliche Beiträge	225
12.6.1 Publikationen	225
12.6.2 Vorträge	225
12.6.3 Poster	225
12.7 Eidesstattliche Erklärung	226

1. Einleitung

Eine wichtige Aufgabe der chemischen Biologie ist die Entwicklung molekularer Werkzeuge zur gezielten Beeinflussung der Genexpression. Eine gestörte Expression ist vor allem in Krebs- oder viralen Erkrankungen zu beobachten, deren Korrektur als Ansatzpunkt für Therapien dienen könnte. In diesem Zusammenhang sind Transkriptionsfaktoren (TFs) oder miRNAs interessante Ziele, da sie essenziell für die Regulation der Transkription und Translation sind. Einen Ansatz zur Kontrolle dieser Systeme stellen Oligonukleotid (ON)-basierte Wirkstoffe dar, welche zelleigene Nukleinsäuren oder Proteine adressieren und so theoretisch alle Prozesse der Zelle regulieren können. Auch wenn die Stabilität und Bioverfügbarkeit der ON noch kritische Faktoren sind, konnten in den letzten Jahren deutliche Fortschritte im Bereich der ON-basierten Wirkstoffe erzielt werden.^[1-3] Beispielsweise stellen mRNA-basierte Impfstoffe, welche von den Firmen BioNTech, Moderna, oder CureVac entwickelt wurden, die ersten in Europa zugelassenen Vakzine zur Bekämpfung der COVID-19-Pandemie dar. Darüber hinaus ist die Regulation der mRNA mittels *splice-switching oligonucleotides* (SSOs) oder siRNAs eine der Hauptanwendung von ON-basierten Therapeutika.^[2] Auch wenn in diesen Bereichen große Fortschritte erzielt wurden, konnten noch keine Methoden zur Adressierung von TFs und miRNAs bis zur klinischen Anwendung entwickelt werden.

TFs sind essenzielle Aktivatoren der Genexpression. Sie sind in der Lage an spezifische Promotoren auf der DNA zu binden und die Transkription von Genen auszulösen. Seitdem mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung der Transkription auf Protein-Protein Wechselwirkungen beruht^[4,5] und somit auch mit artifiziellen TFs (ATFs) möglich ist, stellt der Aufbau von ATFs ein besonderes Ziel der chemischen Biologie dar. Dabei ist eine Herausforderung, dass die ATFs in den Zellkern gelangen und dort die doppelsträngige DNA (dsDNA) erkennen müssen. Die sequenzspezifische Bindung an DNA kann dabei durch proteinbasierte Systeme, insbesondere CRISPR/Cas 9,^[6] triplexbildende ON (TFOs)^[7] und *minor groove* bindenden Molekülen, wie Pyrrol-Imidazol-Polyamide (PIPs),^[8] erfolgen. Allerdings stellt eine geringe Spezifität, Effektivität oder Bioverfügbarkeit der ATFs noch eine große Hürde für ihre Anwendungen dar. Während TFs für die Regulation der Genexpression bei der Transkription verantwortlich sind, können *micro* RNAs (miRNAs), in Form von *RNA-induced silencing complexes* (RISCs), als Regulatoren der mRNA nach der Transkription eingreifen. Dabei ist eine miRNA in der Lage, gleichzeitig eine Vielzahl an mRNAs zu kontrollieren und Abweichungen ihrer Expressionslevel können ein Auslöser von Krankheiten wie Krebs sein.^[9] Aus diesen Gründen stellen miRNAs ebenfalls interessante Ziele dar und können therapeutisch eingesetzt werden (miR-Mimic) oder als Zielstruktur dienen (anti-miR).

Aufgrund der vielfältigen Aufgaben der miRNAs, ist ihre Wirkung jedoch sehr komplex und dies stellt eine der Herausforderungen für die Entwicklung miRNA-basierter Therapeutika dar.^[9,10]

Während viele Ansätze, wie ATFs oder miR-Mimics darauf beruhen, die Funktion natürlicher Systeme nachzuahmen, wird im Arbeitskreis Göbel ein alternativer Ansatz verfolgt.^[11–13] Dabei sollen Adaptormoleküle verwendet werden, um TFs oder RISCs zu rekrutieren und somit an nicht nativen Bindestellen wirken zu lassen (Abbildung 1). In diesem Zusammenhang soll die über Protein-Protein-Kontakte erfolgende Wirkung von TFs und RISCs genutzt werden, welche keine direkte Bindung dieser Systeme an ihre Ziele erfordert. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Adaptoren für die Aktivierung der Genexpression weiterentwickelt und dabei verschiedene DNA-bindende Moleküle, wie PIPs,^[14,15] TFOs^[16,17] und PNAs^[18,19], verwendet. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Adaptoren entworfen, welche eine Rekrutierung von RISCs an nichtkomplementäre Bindestellen und somit eine Regulation der Translation ermöglichen.^[13]

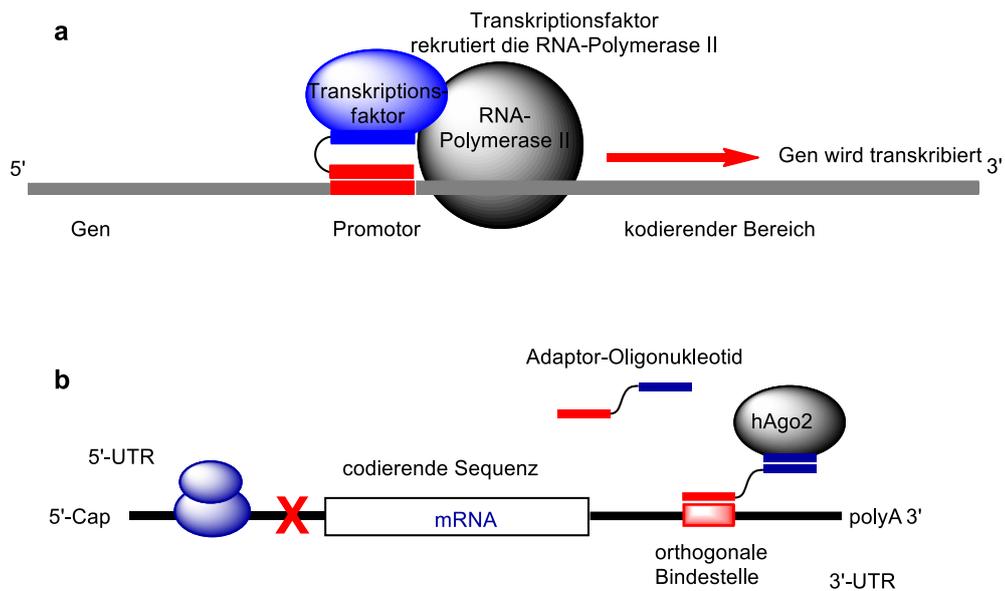


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktion von Adaptormolekülen zur Umleitung von **a:** Transkriptionsfaktoren und **b:** RISCs. Dabei kann mit ersteren die Genexpression aktiviert werden, während letztere die Translation inhibieren. Die blauen und roten Rechtecke sollen die jeweils zueinander komplementären Bindestellen symbolisieren.

2. Nukleinsäuren und ihre Modifikationen

Nukleinsäuren sind in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und der Ribonukleinsäure (RNA) die Grundlage des bekannten Lebens. Dabei dient die stabilere DNA im Allgemeinen als Speicher der genetischen Information, welche durch die Abfolge der Nucleobasen codiert wird. Im Gegensatz dazu besitzt die RNA vielfältigere Funktionen. Einerseits ist sie in Form der Messenger-RNA (mRNA), der Transfer-RNA (tRNA), sowie Ribosomaler RNA (rRNA) essenziell für die Proteinbiosynthese. Andererseits besitzt sie in Form der microRNA (miRNA),^[20,21] *small interfering RNA* (siRNA),^[22] *long non-coding RNA* (lncRNA)^[23] und weiterer nicht-kodierender RNAs^[24] regulierende Funktionen.

2.1 Aufbau und Struktur von DNA und RNA

DNA und RNA sind Biopolymere, die sich aus 3'-5'-verknüpften Nucleotiden zusammensetzen (Abbildung 2). Diese bestehen wiederum aus einem Phosphatrest (grün), einer (Desoxy)Ribose (rot) sowie einer Nucleobase (blau). Die Bausteine der DNA und RNA unterscheiden sich an der 2'-Position des Zuckers durch die An- oder Abwesenheit einer Hydroxygruppe. Diese besitzt einen großen Einfluss auf die Stabilität, Flexibilität, und Struktur der Nucleinsäuren und ist unter anderem für ihre unterschiedlichen Funktionen verantwortlich. So besitzt die DNA, durch die Abwesenheit der Hydroxygruppe, im Vergleich zur RNA das deutlich flexiblere Rückgrat,^[25] welches auch die stabileren Phosphordiesterbindungen aufweist. Während die Halbwertszeit der DNA auf ca. 30 Millionen Jahre geschätzt wird,^[26] sinkt diese für RNA in den Bereich von Jahren.^[27] Der Grund dafür ist, dass die 2'-OH Gruppe als internes Nucleophil agieren und so die Spaltung des Phosphordiesters beschleunigen kann. Gleichzeitig führt die Abwesenheit der Hydroxygruppe in der DNA dazu, dass sie unter sauren Bedingungen leichter depuriniert wird. Ein weiterer Unterschied ist in den Nucleobasen zu finden. Während DNA die Basen Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) oder Guanin (G) enthält, kommt in der RNA Uracil (U) anstelle von T vor. Abgesehen von diesen kanonischen Basen können in Nucleinsäuren

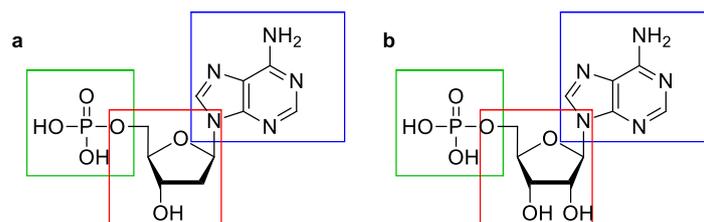


Abbildung 2: Beispiel eines Nucleotids am Beispiel des Desoxyadenosinmonophosphats (dAMP, **a**) und des Adenosinmonophosphats (AMP, **b**). Diese setzen sich aus Desoxyribose im Fall der DNA (**a**, rot) oder Ribose im Fall der RNA (**b**, rot), der Base Adenin (blau) und einem Phosphatrest (grün) an der 5'-OH-Gruppe zusammen.

auch nichtkanonische Nukleoside wie Inosin, Pseudouridin oder 5-Methylcytidin (m^5C) vorkommen. Während die erstgenannten Bausteine insbesondere in tRNAs zu finden, wo sie einen großen Einfluss auf die Struktur besitzen,^[28] kann 5-Methylcytosin auch in der DNA gefunden werden. Bei einer Methylierung von C in Promotorregionen wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert und so die Genexpression epigenetisch reguliert.^[29] Außerdem dient die Methylierung der DNA zur Unterscheidung von zelleigener und bakterieller oder viraler DNA.^[30]

Ein weiterer Unterschied zwischen RNA und DNA ist in ihrer Sekundärstruktur zu finden. Während genomische DNA in Zellen als Doppelhelix vorliegt,^[31] besitzt die RNA keinen Gegenstrang. Dadurch ist ein RNA-Strang in der Lage, mit sich selbst zu binden und zu falten. Dies ermöglicht eine größere Anzahl an Sekundärstrukturen, wie *stem-loop* oder *hairpin*-, sowie *pseudoknot*-Strukturen. Aus diesen Strukturen und der unterschiedlichen Länge der verschiedenen RNA-Spezies ergeben sich die Vielzahl an Funktionen, die RNAs in Organismen ausüben können.

2.1.1 Strukturen der Nukleinsäuren

Wie zuvor erwähnt, liegt genomische DNA unter nativen Bedingungen als Doppelhelix bestehend aus zwei Einzelsträngen vor. Diese sind dabei antiparallel ausgerichtet, was bedeutet, dass jeweils ein 3'-Ende einem 5'-Ende gegenüber liegt (Abbildung 3, links). Die Bindung der beiden Stränge erfolgt durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleobasen, wobei sich spezifisch Paare aus G und C sowie A und T bilden (Abbildung 3, Mitte und rechts), welche als Watson-Crick-Paare bezeichnet werden. Darüber hinaus wird die Helix durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den übereinanderliegenden Basen stabilisiert, während die elektrostatische Repulsion des Phosphat-Rückgrats eine

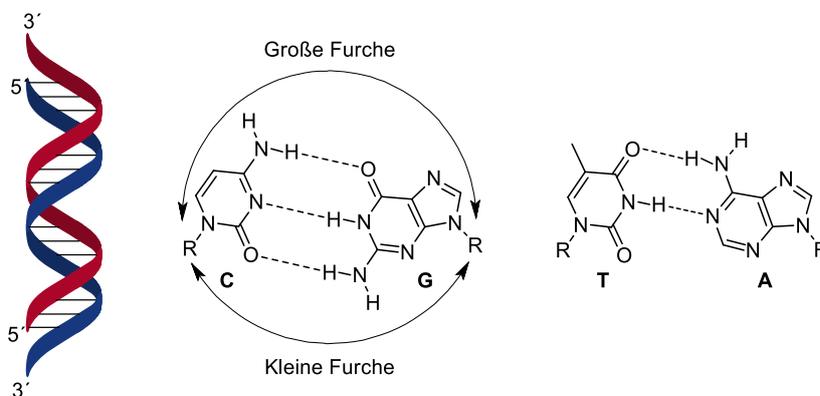


Abbildung 3: Struktur der DNA-Doppelhelix nach Watson und Crick (links).^[31] Dabei sind zwei DNA-Stränge über die Basenpaarung zwischen G•C (Mitte) und A•T (rechts) antiparallel verknüpft. Durch die Position des Rückgrats entsteht dabei eine große und eine kleine Furche (Mitte).

Tabelle 1: Zusammenfassung der Parameter der drei Formen der DNA.^[25]

	A-Form	B-Form	Z-Form
Drehsinn der Helix	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
Durchmesser	≈ 26 Å	≈ 20 Å	≈ 18 Å
Basenpaare pro Windung	11	10.4	12
Höhe pro Basenpaar	2.3 Å	3.4 Å	3.8 Å
Neigung der Basenpaare zur Achse der Helix	19°	1°	9°
Zuckerkonformation	C3'- <i>endo</i>	C2'- <i>endo</i>	Purine: C3'- <i>endo</i> Pyrimidine: C2'- <i>endo</i>
Konformation der glykosidischen Bindung	<i>anti</i>	<i>anti</i>	Purine: <i>syn</i> Pyrimidine: <i>anti</i>
große Furche	eng und tief	breit und tief	Flach
kleine Furche	breit und flach	eng und tief	sehr eng und tief

destabilisierende Wirkung besitzt. Aufgrund der Geometrie der Basenpaare und der daraus folgenden Stellung der Reste zueinander, entsteht in den Helices eine große und eine kleine Furche (Abbildung 3, Mitte). Da die DNA über ein sehr flexibles Rückgrat verfügt, ist sie in der Lage verschiedene Helixformen einzunehmen (Tabelle 1 und Abbildung 4). Die natürliche Form der DNA stellt dabei die von Watson und Crick 1953 aufgeklärte B-Form dar (Abbildung 4, Mitte).^[31] In dieser Form nimmt die Desoxyribose die sogenannte 2'-*endo*-Konformation ein, wodurch ein maximaler Abstand der Phosphatreste gegeben ist (Abbildung 5, **b**, rechts). Die Basen stehen dabei *anti* zur Desoxyribose, was bedeutet, dass die Base vom Zuckermolekül weg zeigt (Abbildung 5, **a**) und aus sterischen Gründen günstiger ist.^[25] In der B-Form besitzt die Helix eine breite und tiefe große, sowie eine enge

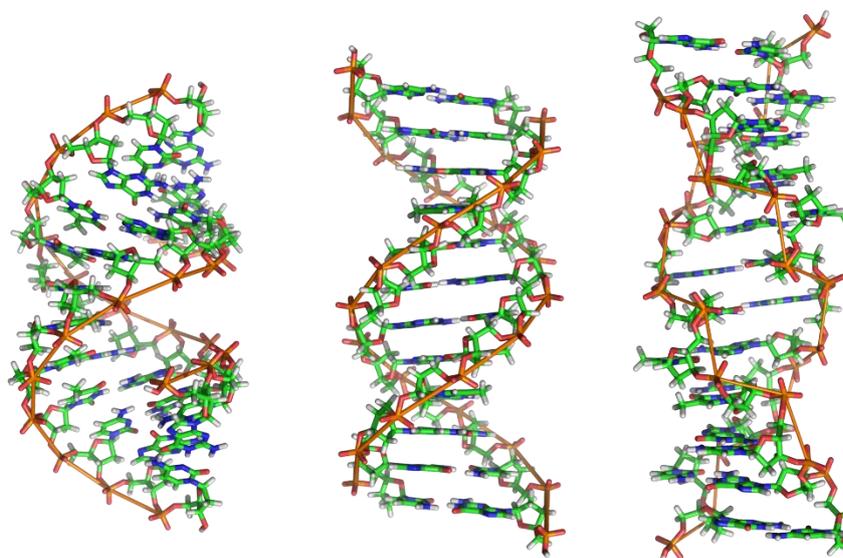


Abbildung 4: Strukturen der A-, B- und Z-DNA (von links nach rechts).^[32]

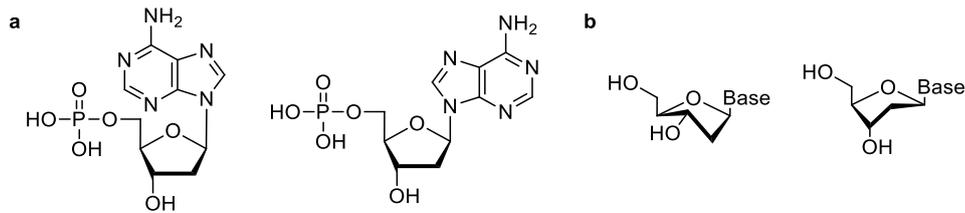


Abbildung 5: Konformationen der DNA-Nukleotide. **a:** Durch die Stellung der Nukleobase kann zwischen der *syn*- (links) und *anti*-Konformation (rechts) unterschieden werden. **b:** Die *3'-endo*- (links) und *2'-endo*-Konformation (rechts) der Desoxyribose. Dabei ist in der *2'-endo*-Konformation der Abstand zwischen den Phosphatgruppen größer.

und tiefe kleine Furche. Aufgrund der unterschiedlichen funktionellen Gruppen, welche in die beiden Furchen ragen, ist eine selektive Erkennung der Doppelhelix sowohl in der großen als auch in der kleinen Furche möglich. Neben der B-Form existieren noch die A- und Z-Form der DNA. Die A-Form ist eine kompaktere Struktur der DNA (Abbildung 4, links), welche bereits von Watson und Crick postuliert ^[33] und zunächst in dehydratisierten Kristallen entdeckt wurde.^[34] In der A-Form ändert sich die Konformation der Desoxyribose von *2'-endo* zu *3'-endo* (Abbildung 5, **b**, links). Diese konformationellen Änderungen führen zu einer engen großen und einer relativ breiten und flachen kleinen Furche. Auch wenn die A-Form für die DNA nur bedingt von Relevanz ist, stellt sie die Grundform aller RNA-Helices dar. Hierbei wird die Ribose in die *3'-endo*-Konformation gezwungen, da es ansonsten zu massiven sterischen Wechselwirkungen kommen würde.^[25,31] Die unterschiedliche Form der Helices und die damit verbundene Struktur der Furchen ermöglicht es beispielsweise, dsDNA selektiv in der kleinen Furche zu erkennen, während dsRNA nicht adressiert wird.^[35] Die Z-Form der DNA bildet, im Gegensatz zu den anderen Formen, eine linksgängige Helix aus und kann bei Sequenzen mit alternierenden G•C-Paaren beobachtet werden (Abbildung 4, rechts).^[36,37] In diesem Fall weisen die Purin- und Pyrimidinbasen unterschiedliche Konformationen auf (Tabelle 1), wodurch die Z-DNA lediglich eine sehr enge Furche besitzt.

2.1.2 Alternative Basenpaarungen

Abgesehen von den Watson-Crick-Basenpaaren können Nukleinsäuren weitere Basenpaarungen ausbilden. Dazu gehören die Hoogsteen-Paare (Abbildung 6) oder, insbesondere im Fall der RNA, Wobble-Paare zwischen G und U. Letztere sind dabei unter anderem bei der Stabilisierung von Sekundärstrukturen der RNA entscheidend beteiligt. Dies kann insbesondere im Fall der tRNAs beobachtet werden.^[25] Auch Hoogsteen-Paare spielen bei der Stabilisierung von tRNAs eine Rolle,^[38] indem diese die Bildung von Tripelhelices ermöglichen, welche für die Tertiärstruktur von großer Bedeutung sind. Die Bildung von Tripelhelices ist jedoch nicht nur mit RNA sondern auch mit DNA möglich.^[16,39] Dabei lagert sich ein dritter Nukleinsäurestrang über Hoogsteen-Paarungen in der große

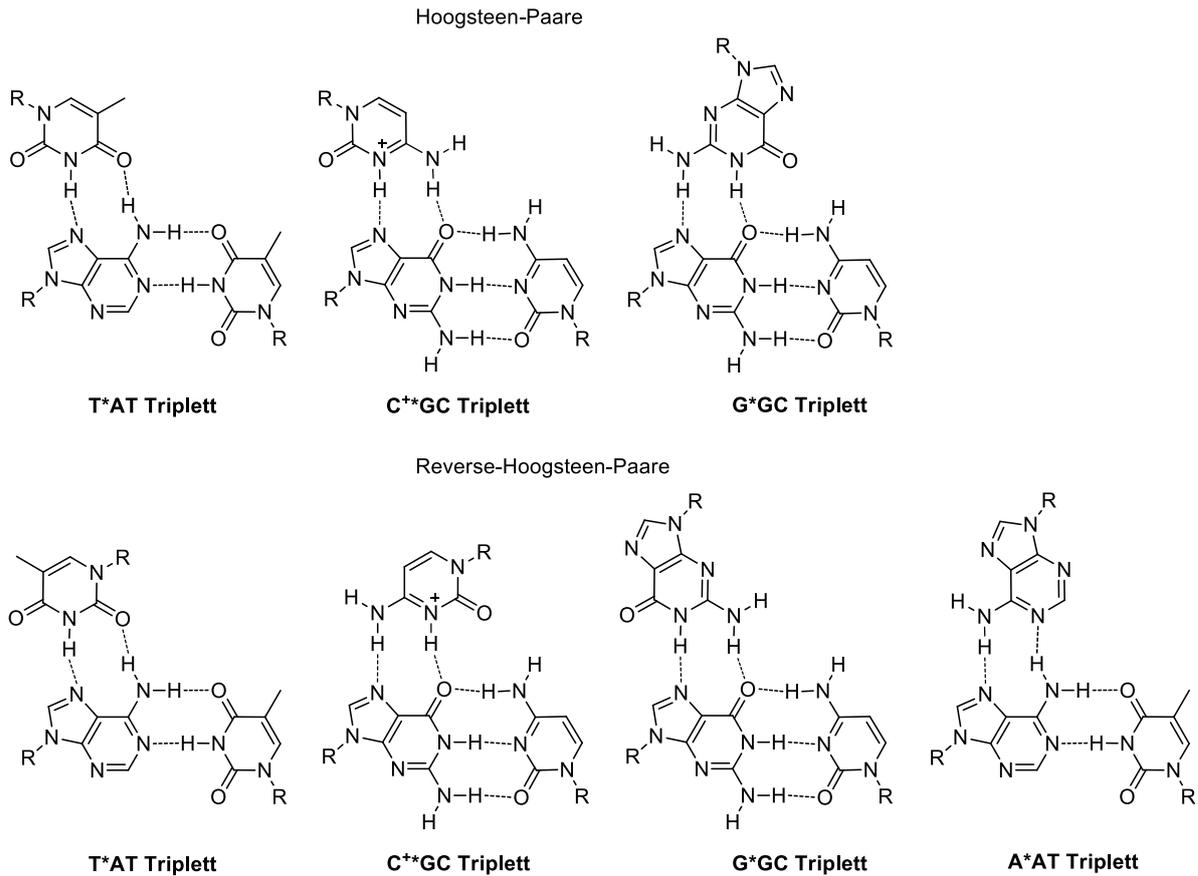


Abbildung 6: Hoogsteen-Basenpaarungen der vier Basen A, T, G und C. Dabei kann zwischen Hoogsteen (oben) und reversen Hoogsteen Paaren (unten) unterschieden werden. Diese unterscheiden sich durch die Stellung ihres Rückgrats (R) im Vergleich zum Purin-reichen Strang. Eine Hoogsteen-Paarung zwischen C und einem G•C Paar ist nur mit protoniertem C möglich.

Furche einer Doppelhelix an. Zur Ausbildung dieses Strukturtyps muss die dsDNA einen Homopurinstrang enthalten, da Hoogsteen-Paare nur an Purinen möglich sind (Abbildung 6). Darüber hinaus muss das triplexbildende ON (TFO) strukturelle Anforderungen erfüllen, die durch die Geometrie und Art der Hoogsteen-Paare festgelegt werden. Die Ursache hierfür ist einerseits, dass Hoogsteen-Paare mit Ausnahme von A*A•T-Triplets in zwei Orientierungen möglich sind. Diese werden je nach der Orientierung des TFO-Strangs zum Purinstrang in Hoogsteen- und reverse Hoogsteen-Paare unterschieden (Abbildung 6). Eine Folge daraus ist, dass ein TFO entweder über Hoogsteen- oder reverse Hoogsteen-Paare binden muss. Hierbei ist zudem entscheidend, dass die Positionen der C1'-Atome weitgehend isomorph sind, um Deformationen des ON-Rückgrats zu verhindern. Aufgrund der Geometrie der Hoogsteen-Paare sind jedoch nur die Triplets mit C und T isomorph (Abbildung 7) und Homopyrimidin-TFOs binden bevorzugt über Hoogsteen-Paare und somit parallel zum Homopurinstrang.^[40] Allerdings können diese Paare nur mit protoniertem C gebildet werden, wodurch sie unter physiologischen Bedingungen nicht stabil sind. Abgesehen von CT-haltigen Strängen können jedoch auch GA-reiche ONs unter physiologischen Bedingungen Tripelhelices

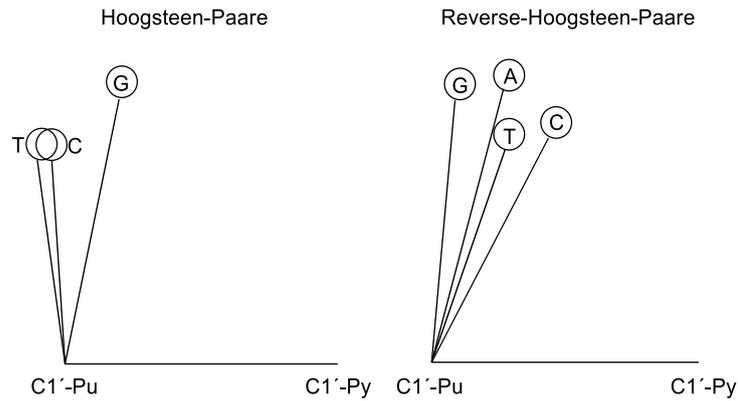


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Lage der C1'-Atome bei Hoogsteen-Basenpaaren.^[40]

bilden. Diese binden über eine Reverse-Hoogsteen-Basenpaarung und ordnen sich antiparallel zum purinreichen Strang des Duplex an. Außerdem können purinhaltige TFOs auch einzelne Ts tolerieren.^[41] Abgesehen von den bisher vorgestellten TFOs ist eine Triplexbildung auch mit GT-haltigen ON möglich. Hierbei können die ON aus poly-T und poly-G Blöcken bestehen oder eine alternierende Abfolge der Basen besitzen.^[42,43] Die Zusammensetzung der TFOs bestimmt dabei ihr Bindevverhalten. Während die aus Blöcken aufgebauten TFOs über Hoogsteen-Paare binden und einen parallelen Triplex bilden, ist im alternierenden Fall eine reverse Hoogsteen-Paarung günstiger, woraus sich ein antiparalleler Triplex ergibt.

Außer den Tripelhelices können über Hoogsteen-Basenpaare auch G-Quadruplexe gebildet werden. Diese bestehen aus einer Überlagerung von mindestens drei G-Tetraden, welche wiederum einen Zusammenschluss von vier Guanosinen darstellen (Abbildung 8, **a**). Auch diese sind über Hoogsteen-Paare verknüpft und werden durch die Koordination eines zentralen Metallions stabilisiert. Hierfür werden Alkalimetalle in der Reihenfolge $K^+ > Na^+ > Li^+$ bevorzugt. Die Quadruplexe werden zusätzlich durch π - π -Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Tetraden stabilisiert. Die Ausbildung von G-Quadruplexen kann zwischen mehreren Strängen erfolgen, wobei alle Nukleinsäuren der Sequenz $G_{\geq 3}N_xG_{\geq 3}N_xG_{\geq 3}N_xG_{\geq 3}$ in der Lage solche Strukturen ohne Partnerstrang auszubilden.^[44,45] Dabei kann der ON-Stang sowohl parallel, antiparallel oder in einer Hybridform verlaufen (Abbildung 8, **b – d**). Während diese Strukturen zunächst als reine *in vitro* Effekte betrachtet wurden, konnten sie im Laufe der Zeit verstärkt *in vivo* nachgewiesen werden. Dabei ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob dies ein Effekt der eingesetzten Methoden ist oder ob es sich um physiologisch relevante Strukturen handelt.^[44–46]

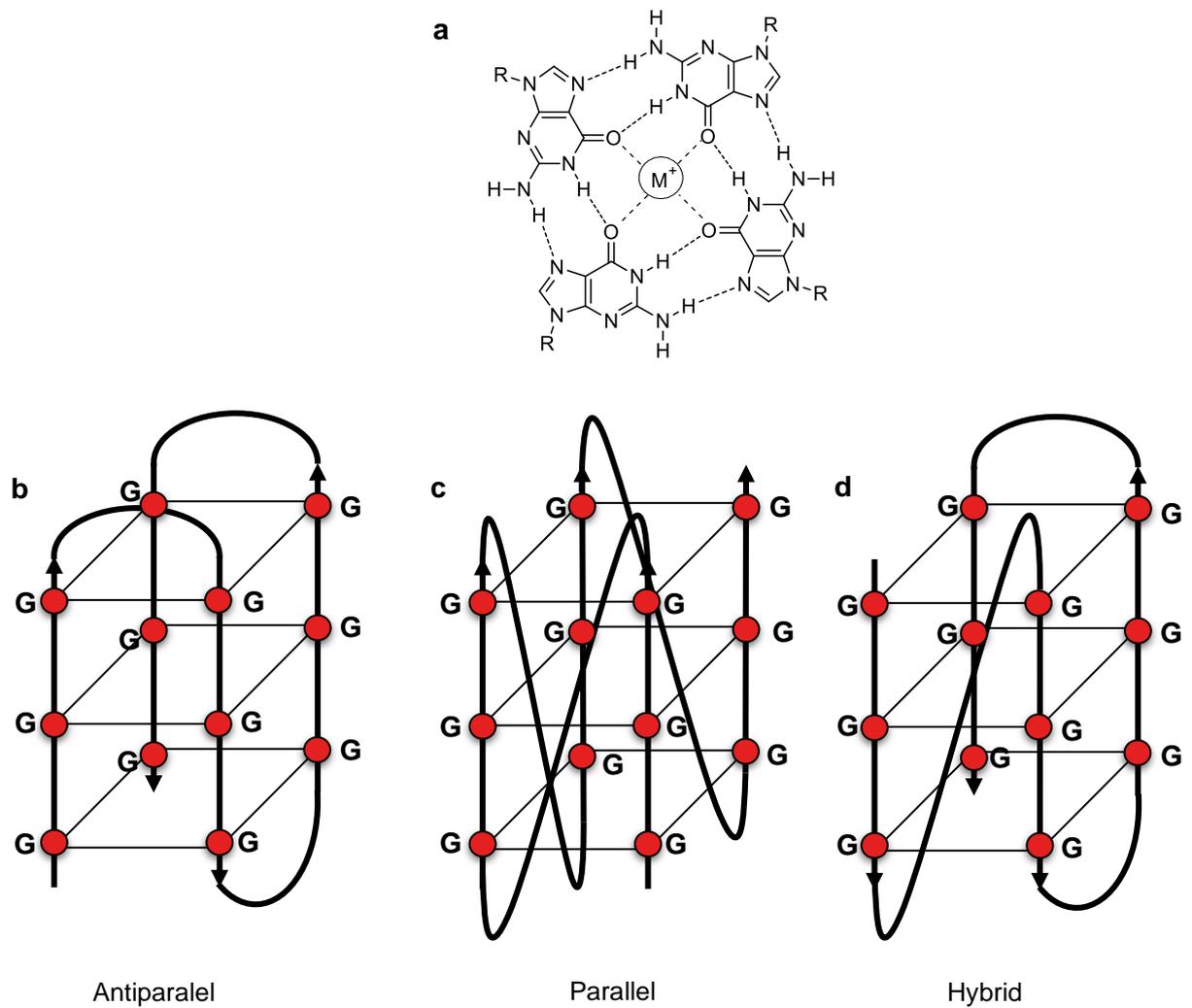


Abbildung 8: a: Schematische Darstellung einer G-Tetrade; b – d: Schematische Darstellung verschiedener intramolekularer G-Quadruplexe. Dabei werden die G-Tetraden durch Rauten und die Lage der Gs durch rote Kreise dargestellt.

2.2 Modifizierte Nukleinsäuren

Aufgrund ihrer Flexibilität und der großen Anzahl an Funktionen sind RNAs ein interessantes medizinisches Ziel.^[47] Dabei ist die Adressierung der mRNA mittels *antisense oligonucleotides* (ASOs) oder *RNA-induced silencing complexes* (RISCs) die häufigste Anwendung.^[9,47] Darüber hinaus sind CRISPR-Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9*) basierte Systeme und die dafür notwendigen *guide RNAs* (gRNA) von großem Interesse.^[47] Ein Problem für diese Anwendungen stellt dabei die hohe Instabilität der RNA gegenüber Nukleasen dar. Im Fall der ASOs, welche die älteste Anwendung von ONs darstellten,^[1,47] wurden zunächst DNAs eingesetzt.^[48] Allerdings war auch bei diesen ein schneller Abbau durch Exo- und Endonukleasen zu beobachten. Zudem zeigte sich, dass die Stabilität eines RNA/DNA-Duplex geringer war als die eines entsprechenden RNA/RNA-Duplex.^[49] Um die Stabilität und die Affinität der ASOs zu erhöhen, wurden Modifikationen an der 2'-OH Gruppe sowie am Rückgrat vorgenommen (Abbildung 9). Dazu verwendete man zunächst 2'-OMe-RNA, welche ebenfalls in natürlicher RNA vorhanden ist. Die entsprechenden ASO wiesen neben einer erhöhten Stabilität gegenüber Nukleasen auch eine im Vergleich zu DNA erhöhte Affinität zu RNA auf.^[47,50] In diesem Fall konnte eine Erhöhung des Schmelzpunktes um 0.2 – 0.8 °C pro Nukleotid beobachtet werden. Ausgehend davon wurde versucht, diesen Effekt durch längere Alkylketten zu verstärken. Dabei war die 2'-O-Methoxyethyl-RNA (2'-MOE) besonders effektiv und es konnte ein ΔT_m von 0.9 – 1.7 °C pro Nukleotid beobachtet werden.^[47] Aufgrund ihrer größeren Ähnlichkeit zur RNA und ihrer höheren Kompatibilität mit RNA-bindenden Proteinen, wie dem Ago2, werden 2'-OMe-RNAs verstärkt im Bereich der siRNA eingesetzt. Da 2'-MOE-RNAs für diese Anwendungen weniger geeignet sind, werden sie im Bereich der ASOs verwendet.^[47]

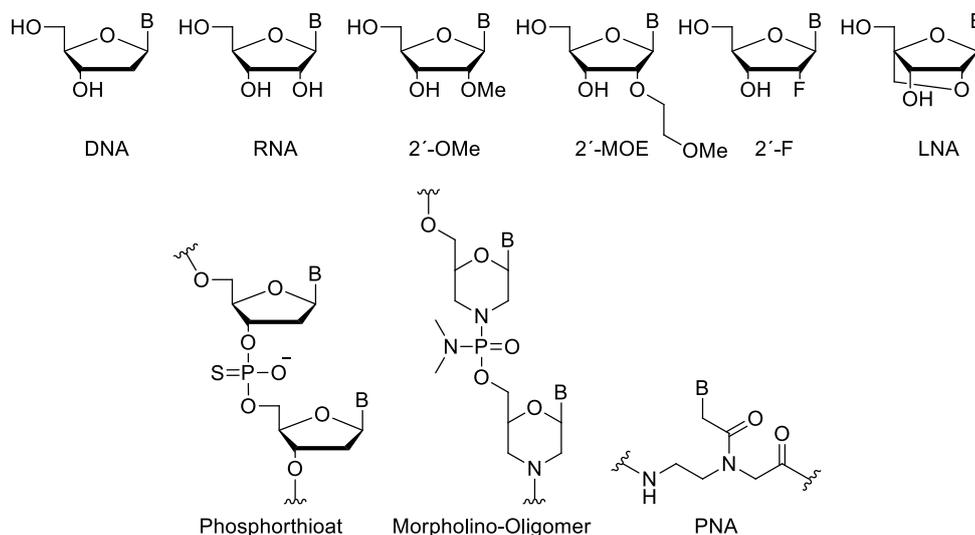


Abbildung 9: Mögliche Modifikationen an der 2'-OH Gruppe der Ribose (oben) und Modifikationen des Rückgrats (unten).

Eine weitere Modifikation der RNA stellt die 2'-F-RNA dar, bei welcher die 2'-OH Gruppe durch ein Fluoratom substituiert ist. Dadurch konnte neben einer Erhöhung der Nukleasestabilität auch eine höhere Affinität erzielt werden ($\Delta T_m = 2.5 \text{ °C}$ pro Nukleotid).^[47] Aufgrund der Größe und Ladung des Fluors ist die 2'-F-RNA dabei ein sehr gutes Imitat der nativen RNA und kann ebenfalls für die Stabilisierung von siRNAs verwendet werden. In Kombination mit 2'-OMe-RNA können auf diese Weise vollständig modifizierte siRNAs aufgebaut werden, da sich die Einflüsse der Modifikationen auf die Struktur der ON ausgleichen und eine RNA nahe Struktur erhalten wird.^[47] Eine weitere Modifikation der Nukleotide stellen die 2' – 4' verbrückten *locked nucleic acids* (LNAs) dar (siehe Abschnitt 2.3.1).

Neben der 2'-Position der Ribose können auch Modifikationen am Rückgrat vorgenommen werden. In diesem Zusammenhang sind Phosphorthioate die älteste und am häufigsten verwendete Modifikation.^[47,51] Bei diesen wird ein ungebundener Sauerstoff des Phosphats durch Schwefel substituiert, wodurch die Nukleasestabilität der Phosphordiesterbindung drastisch erhöht wird.^[47] Allerdings führt dies zu einer verringerten Affinität der ONs ($\Delta T_m = 0.5 - 0.7 \text{ °C}$).^[47,52] Darüber hinaus wird durch die Substitution des Sauerstoffatoms durch Schwefel ein Stereozentrum erschaffen, dessen Kontrolle nur bedingt möglich ist. Dies hat die Bildung von stereoisomeren Verbindungen zur Folge, welche die Wirkung der ONs beeinflussen können.^[47] Andererseits wirkt sich die Verwendung von Phosphorthioaten positiv auf die Zellgängigkeit der ONs aus und verhindert eine rasche Ausscheidung der ONs durch Bindung an Albumin,^[51] wodurch die Vorteile dieser Modifikation deutlich überwiegen. Eine weitere Modifikation des Rückgrats sind Phosphoramidat-Morpholino-ONs (PMOs). Bei diesen wurde die Ribose durch ein funktionalisiertes Morpholin ersetzt und die Verknüpfung der Bausteine erfolgt durch ein Phosphoramidat. Somit besitzen PMOs bei physiologischem pH-Werten ein neutrales Rückgrat,^[53] was zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Nukleasen und einer im Vergleich zu DNA gesteigerten Affinität zu RNAs führt.^[47] Das neutrale Rückgrat stellt jedoch eine Herausforderung bei der Anwendung von TFOs dar, da es eine Wechselwirkung mit Serum-Proteinen verhindert und dies zu einer erhöhten renalen Ausscheidung führt.^[53] Gleichzeitig erlaubt das neutrale Rückgrat der PMOs die Konjugation mit positiv geladenen *cell-penetrating peptides* (CPPs), welche die Zellaufnahme verbessern können. PMOs werden hauptsächlich als *splice-switching ONs* (SSOs) zur Regulation des Spleißens der mRNA eingesetzt,^[2] da sie nicht in der Lage sind, mit Proteinen wie der RNase H oder Ago2 zu interagieren. Eine noch drastischer Modifikation des ON-Rückgrats ist bei den Peptidnukleinsäuren (PNAs) zu finden (Abschnitt 2.3.2). Diese besitzen ein Rückgrat aus einem synthetischen Polypeptid, an das die Basen ebenfalls über Peptidbindungen

angebracht sind. Dies hat zur Folge, dass PNAs gegen Nukleasen resistent sind und über ein neutrales Rückgrat verfügen.

2.2.1 Locked Nucleic Acids (LNAs)

Ein Grund für die im Vergleich zur DNA höhere Affinität von 2'-modifizierten ON zur RNA ist in der Struktur der Stränge zu finden. Obwohl die DNA ein flexibles Rückgrat besitzt und die Konformation der Desoxyribose relativ einfach von 2'-endo zu 3'-endo wechseln kann,^[54] wird die 2'-endo Konformation bevorzugt. Im Gegensatz dazu muss die Ribose die 3'-endo Konformation einnehmen, da es ansonsten zu sterischen Wechselwirkungen zwischen 2'-OH, Nukleobase und Phosphatrest an der 3'-OH-Gruppe kommen würde. Als Resultat nehmen RNA/DNA-Hybride eine Mischform aus der A- und der B-Form ein. Hierbei liegt die RNA in der 3'-endo Konformation vor, während die Desoxyribose sowohl die 2'- als auch die 3'-endo Konformation einnimmt. Im Fall der 2'-modifizierten ONs liegt die Ribose ebenfalls in der 3'-endo Konformation vor und sie bilden eine A-Form artige Struktur aus. Somit ist ihre Struktur der RNA-Konformation deutlich ähnlicher und die Duplices deutlich thermostabiler.^[55] Um diesen Effekt zu verstärken, wurden die bizyklischen LNAs entwickelt. Bei diesen ist die 2'-OH Gruppe der Ribose über eine Methylengruppe mit dem 4'-Kohlenstoffatom verknüpft (Abbildung 9), wodurch der Zucker kovalent in die 3'-endo Konformation gezwungen wird. Als Resultat kann die thermische Stabilität eines RNA/DNA-Duplex durch den Einbau von LNA-Nukleotiden in den DNA-Strang massiv

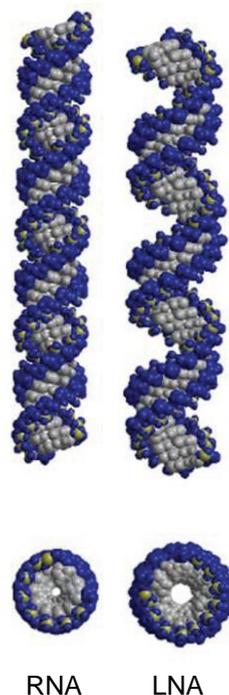


Abbildung 10: Strukturen von RNA und LNA Helices. Dabei ist die Helix im Fall der LNA deutlich gestreckter und breiter.^[56]

erhöht werden ($\Delta T_m = 4 - 8 \text{ °C}$ pro Nukleotid).^[47,54,57,58] Ein Grund dafür ist, dass die starre Struktur der LNA auch benachbarte Desoxyribosen in die 3'-*endo*-Konformation zwingt.^[54] Die Auswirkungen der starren Struktur der LNA-Nukleotide zeigt sich auch in der Form von LNA/LNA Duplices. Dort ist die Helix deutlich gestreckter und breiter als bei der natürlichen RNA (Abbildung 10).^[56,59] In Hybrid-Duplices kann dahingegen eine Mischung beider Strukturen beobachtet werden.^[56] Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede werden LNAs in Proteinkomplexen schlecht toleriert. Beispielsweise führt der Einbau von LNA-Nukleotiden in siRNA zu einer geringeren Aktivität der RNA-Interferenz (RNAi). Bei einem Einbau in DNA-Stränge kann die Anwesenheit von LNA-Nukleotiden die Rekrutierung der RNase H^[60] oder von TFs^[61] verhindern. Allerdings wird die Nukleasestabilität von ONs durch den Einbau von LNA-Nukleotiden deutlich erhöht.

Aufgrund ihrer hohen Affinität und Nukleasestabilität sind LNAs attraktive Modifikationen in ONs zur Regulierung von RNA. Obwohl LNAs nicht für den Einsatz in siRNA geeignet sind, können sie in Form von DNA/LNA-Mixmeren in ASOs oder anti-miRs eingesetzt werden.^[47,57] Im Fall der anti-miRs ist neben alternierenden DNA/LNA-Mixmeren auch der Einsatz von kurzen LNA-ONs (*tiny*-LNAs) möglich.^[47,57,62] ASOs werden je nach Anwendung in zwei Gruppen unterteilt, die eine unterschiedliche Positionierung der LNA-Nukleotide benötigen. Einerseits können ASOs als Gapmere eingesetzt werden. Diese ONs sind in der Lage, die RNase H zu rekrutieren, welche DNA/RNA-Hybride erkennt und die RNA spezifisch degradieren kann. Um die Funktion dieser Konstrukte zu gewährleisten, müssen Gapmere einen Block von mindestens 6 – 8 DNA-Basen enthalten.^[57,60] Die LNA-Nukleotide werden in diesem Fall als Blöcke an den Enden des Stranges eingebaut, um die Nukleasestabilität und die Affinität der ONs zu erhöhen. Die Wirkung der zweiten Gruppe der ASOs beruht auf der Bindung an die mRNA. Dort können sie als sterischer Block dienen und so die Translation inhibieren oder das Spleißen einer mRNA regulieren. In diesen Fällen werden Mixmere aus alternierenden Abfolgen an DNA und LNA verwendet, um die Rekrutierung der RNase H zu verhindern. Im Rahmen dieser Anwendungen konnte beobachtet werden, dass LNAs potenziell hepatotoxisch sind,^[57] wobei diese Wirkung von der Länge und Zusammensetzung des jeweiligen ONs abhängig ist.^[63]

LNAs können zudem eingesetzt werden, um dsDNA zu adressieren. Beispielsweise führt der Einbau in TFOs zu einer Stabilisierung der Tripelhelix (Abbildung 11, links).^[54] Aufgrund ihrer hohen Affinität sind LNA-ONs oder LNA/DNA-Mixmere auch zur Stranginvasion fähig.^[64-66] Dazu können bifunktionale ONs (bisLNA) verwendet werden, welche an einen Strang einer dsDNA sowohl über Hoogsteen- als auch über Watson-Crick Basenpaarung binden können (Abbildung 11, Mitte).^[66] Eine andere Möglichkeit sind Zorro-LNAs (Abbildung 11, rechts).^[64,65] Diese besteht aus zwei, über einen starren Linker verbundene, ONs, welche in der Lage sind, versetzt an beide Stränge einer dsDNA zu binden. Die

versetzten Target-Sequenzen verhindern dabei eine Selbstkomplementarität der Stränge, welche das ON inhibieren würden. Ein großes Problem für die Doppelstranginvasion (DSI) stellt jedoch die negative Ladung des Phosphat-Rückgrats und die hohe Stabilität des DNA-Doppelstrangs unter physiologischen Bedingungen dar. Hierdurch verlaufen die Stranginvasionen oft nur in geringer Effizienz und nur bei geringem GC-Gehalt.

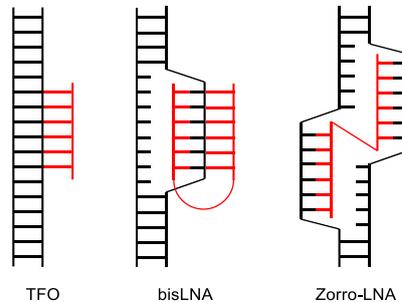


Abbildung 11: Verschiedene LNA-Motive zur Bindung an dsDNA (schwarz). Dabei kann die LNA (rot) eine Tripelhelix bilden (links), oder in den Doppelstrang binden (rechts). BisLNAs (Mitte) stellen eine Mischform dar.

2.2.2 Peptidnukleinsäuren (PNAs)

PNAs sind Analoga der DNA, bei denen das Phosphordiesterückgrat durch 2-Aminoethylglycin-Einheiten ersetzt wurde, welche durch Peptidbindungen verknüpft sind. Aufgrund ihrer Analogie zu Peptiden werden PNAs von ihrem N-Terminus zu ihrem C-Terminus notiert, wobei der N-Terminus dem 5'-Ende einer DNA entspricht. PNAs verfügen über ein neutrales Rückgrat, welches sowohl gegenüber Nukleasen und Proteasen stabil ist und gleichzeitig über eine hohe Flexibilität verfügt.^[67] Dennoch weicht die Struktur einer PNA/PNA-Helix deutlich von der Form anderer Nukleinsäuren ab und bildet die deutlich gestreckter P-Form aus.^[68,69] Aufgrund ihres neutralen Rückgrats und der nicht vorhandenen elektrostatischen Repulsion besitzt die PNA eine sehr hohe Affinität zu DNA und RNA, wobei die gebildeten Komplexe eine Mischform der jeweiligen Helix-Strukturen annehmen.^[69] Diese Komplexe können dabei bereits bei niedrigen Salzkonzentrationen Komplexe mit einer hohen thermischen Stabilität gebildet werden.^[70,71] Da das Rückgrat der PNA keine Chiralitätszentren aufweist, ist sie in der Lage sowohl parallel als auch antiparallel an eine DNA zu binden, wobei die antiparallele Anordnung bevorzugt wird. Das neutrale Rückgrat der PNA hat jedoch zur Folge, dass ihre Löslichkeit in wässrigen Medien gegenüber anderen ONs geringer ist und ihr Einsatz dadurch limitiert wird. Dies kann jedoch durch den Einbau von Lysininen kompensiert werden,^[70,71] welche unter physiologischen Bedingungen positiv geladen sind. Die daraus resultierende elektrostatische Anziehung erhöht zudem die Affinität zur DNA und RNA.

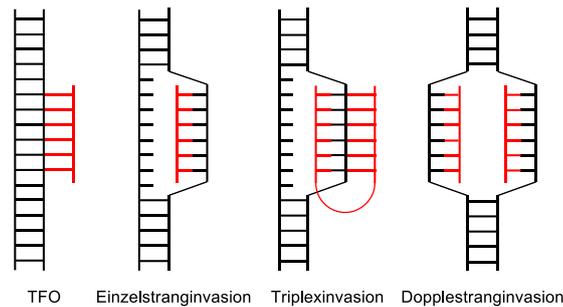


Abbildung 12: Bindungsmotive von PNA (rot) an dsDNA (schwarz).^[71,72]

PNAs wurden ursprünglich auf Basis von Computermodellen entwickelt und sollten als TFOs eingesetzt werden.^[70] Aufgrund ihres neutralen, aber dennoch flexiblen Rückgrats und der fehlenden elektrostatischen Repulsion wurde eine bessere Affinität im Vergleich zu entsprechenden DNAs erwartet. Allerdings konnte bei der Anwendung der PNAs keine Triplexbildung beobachtet werden, sondern es trat eine Stranginvasion der PNA in den DNA-Doppelstrang auf (Abbildung 12, 2. von links). In nachfolgenden Experimenten zeigte sich, dass es sich hierbei nicht um eine Einzelstranginvasion sondern um einer Triplexinvasion (Abbildung 12, 2. von rechts) handelte.^[70,71] Somit stellen PNAs neben LNAs eine weitere ON-Klasse dar, die zu einer DSI fähig sind. Die Gründe hierfür sind die hohe Stabilität von PNA/DNA-Doppelsträngen, sowie das ungeladene Rückgrat der PNA. Die Triplexinvasion kann durch die Verknüpfung zweier PNAs zu einer bisPNA effektiver gestaltet werden. Wie bei der analogen bisLNA ist jedoch die Stabilität der dsDNA physiologischen Bedingungen der limitierende Faktor für die Ausbildung dieser Strukturen. Im Fall der PNA ist es möglich die Effizienz der DSI durch den Einbau positiv geladener Gruppen zu steigern.^[71]

Ein grundsätzliches Problem der DSI ist der Umstand, dass die beiden benötigten ONs auch zueinander komplementär sind (Abbildung 12, rechts).^[73] Die Selbsthybridisierung steht dann in direkter Konkurrenz zur beabsichtigten Stranginvasion. Um dieses Problem zu vermeiden wurden die sogenannten pseudokomplementären PNAs vorgeschlagen. Dabei ersetzen die Basen Diaminopurin (D) und Thiouracil (U_s) Adenin und Thymin. Die Bezeichnung pseudokomplementär wurde gewählt, da eine Basenpaarung zwischen D und

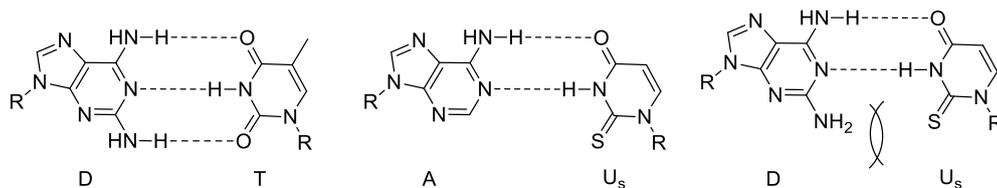


Abbildung 13: Basenpaare zwischen Diaminopurin (D), Thiouracil (U_s), A und T. Dabei bildet ein D•T Paar drei Wasserstoffbrückenbindungen aus, was zu einer erhöhten Stabilität gegenüber einem A•T Paar führt (links). Zwischen A• U_s kann eine analoge Struktur zu A•T Paaren beobachtet werden (mitte), während sich ein D• U_s Paar, aufgrund sterischer Abstoßung zwischen der Amino- und der Thiogruppe, nicht bilden kann.

U_s aufgrund sterischer Hinderung nicht möglich ist, wodurch eine Hybridisierung der PNA-Stränge verhindert wird (Abbildung 13, rechts). Gleichzeitig kann D mit T drei Wasserstoffbrücken ausbilden (Abbildung 13, links). Damit ist dieses Basenpaar deutlich stabiler als ein analoges A•T-Paar ($\Delta T_m = 3 - 6 \text{ °C pro D}$).^[73,74] Die Bildung eines A•U_s-Paares ist ebenso möglich (Abbildung 13, Mitte), auch wenn dabei eine leichte Destabilisierung des Duplex zu beobachten ist ($\Delta T_m = 2 - 3 \text{ °C pro U}_s$).^[73] Für eine erfolgreiche Invasion muss die Zielsequenz jedoch zu mindestens 40 % aus A•T-Basenpaaren bestehen.^[75] Zusätzlich limitiert die hohe Stabilität der dsDNA den Einsatz unter physiologischen Bedingungen. Allerdings kann die Effizienz der DSI mittels positiver Ladungen, beispielsweise durch die Konjugation mit einem *nuclear localization signal* (NLS),^[76] oder das Anbringen DNA-bindender Einheiten, wie Pyrrol-Imidazol-Polyamiden (PIP),^[19] deutlich gesteigert werden.

Neben der Bindung zu DNA können PNAs auch mit RNA stabile Komplexe bilden. Dabei können PNAs als ASOs eingesetzt werden und die Translation einer mRNA blockieren oder als SSO fungieren.^[68,77] Des Weiteren können PNAs als anti-miRs eingesetzt werden^[78-80] und aufgrund ihrer Fähigkeit zur Triplexinvasion können sie miRNAs bereits auf der Stufe der doppelsträngigen pri- und pre-miRNA adressieren. Somit ist es möglich, miRNAs bereits vor dem Einbau in RISCs zu regulieren.^[78]

3. Die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3

Die Regulation der Genexpression erfolgt in eukaryotischen Zellen über Transkriptionsfaktoren (TFs). Diese binden an bestimmte, als Promotorelemente bezeichnete, Regionen einer DNA und rekrutieren über die Interaktion mit weiteren Proteinen eine RNA-Polymerase. In Eukaryonten gibt es drei RNA-Polymerasen, von denen die RNA-Polymerase II für die Synthese der mRNA verantwortlich ist.^[81] Eines der häufigsten Promotorelemente ist dabei die nach ihrer Sequenz benannte TATA-Box, welche 30 bis 100 bp vor dem Transkriptionsstart liegt und durch das TATA-Box-bindende Protein (TBP) erkannt wird. Neben diesem Element kann die Transkription auch durch die CAAT- und die GC-Box aktiviert werden, welche dabei bis zu 150 bp vom Transkriptionsstart entfernt liegen können. Besonders die GC-Box spielt eine besondere Rolle bei der Expression von Haushaltsgenen, welche in vielen Fällen keine TATA-Box enthalten.^[81]

Eine Familie der Transkriptionsfaktoren, welche an diese GC-Boxen binden, sind die *Specificity Protein/Krüppel-like Factors* (SP/KLF). Diese Familie beinhaltet mindestens 25 verschiedenen TFs, deren häufigster Vertreter das *specificity protein 1* (Sp1) ist.^[82,83] Sp1 war zudem der erste TF, der erfolgreich isoliert, geklont und zur Aktivierung der Transkription eingesetzt werden konnte.^[84,85] Sp1 bindet die DNA über drei C₂H₂-Zinkfingerdomänen (Abbildung 14) an seine Konsensussequenz (G/T)GGGCGG(G/A)(G/T).^[83,86,87] Abgesehen von der Bindedomäne besitzt Sp1 glutaminreiche Sequenzen, die als Aktivierungsdomänen (AD) fungieren und über den Kontakt mit weiteren Proteinen für die Rekrutierung der RNA-Polymerase II verantwortlich sind. In der Nachbarschaft der AD befinden sich Serin- und Threonin-reiche Domänen,^[88] welche beispielsweise durch Phosphorylierung oder Methylierung modifiziert werden können, wodurch die Stabilität und Aktivität des Sp1 beeinflusst werden.^[89,90]

Sp1 ist einer der am besten untersuchten TFs und ist als ubiquitärer TF an der Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt.^[83] Unter diese Genen ist auch Sp1 selbst zu finden, sodass es einer Autoregulation unterliegt.^[83,89] Des Weiteren ist Sp1 entscheidend an der

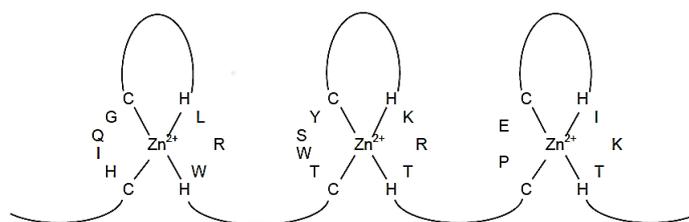


Abbildung 14: Zinkfingerdomäne des Sp1-Proteins.^[87] Dabei sind nur die Aminosäuren in der Nähe des Zinkions dargestellt. Die Erkennung der DNA erfolgt über Aminosäuren in den Finger

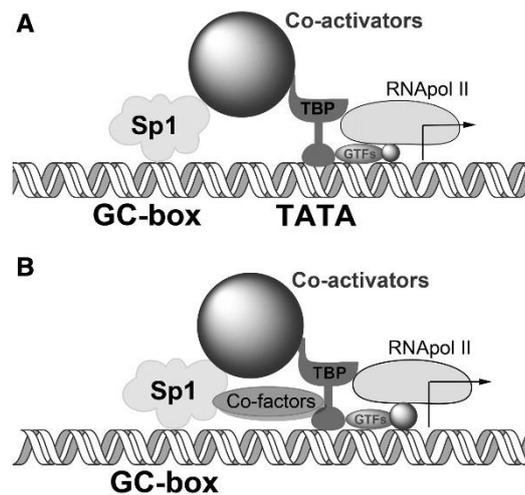


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Aktivierung der Genexpression durch Sp1. **A:** Transaktivierung durch Sp1 bei vorhandener TATA-Box. **B:** Transaktivierung für Gene ohne TATA-Box. In diesem Fall sind weitere Cofaktoren für die Rekrutierung des TBP notwendig. Mit Erlaubnis entnommen aus Vizcaíno *et al.*^[83] Copyright © 2015, Elsevier Inc..

Regulation von Haushaltsgenen ohne TATA-Box beteiligt (Abbildung 15, **B**).^[83,86] In diesen Fällen ist Sp1 in der Lage, das TBP zu rekrutieren, welches für die Initiation der Transkription essenziell ist.^[83] Aufgrund seiner Wechselwirkungen mit dem TBP kann Sp1 auch in der Transkription von Genen mit einer TATA-Box eine aktivierende Rolle spielen und dort als Coaktivator oder Corepressor fungieren (Abbildung 15, **A**).^[86,89] Falls in einer Promotorregion mehrere Bindestellen für Sp1 vorhanden sind, kann die Genexpression durch Sp1 synergistisch erfolgen und so verstärkt werden.^[91,92] Hierfür ist jedoch keine kooperative Bindung von Sp1 an die DNA verantwortlich, sondern die Bildung von Sp1-Tetrameren.^[91] Abgesehen von der Regulation von Haushaltsgenen spielt SP1 auch eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellzyklus^[89,91] und kann die epigenetischen Modulationen der DNA beeinflussen.^[91] Beispielsweise ist Sp1 in der Lage, die Methylierung von DNA^[91] oder die Acetylierung von Histonen zu verändern.^[89,91]

Neben Sp1 existiert mit Sp3 ein weiterer Vertreter der SP/KLF-Familie, der an GC-reiche Sequenzen bindet und die Funktion von Sp1 beeinflussen kann.^[86] SP3 besitzt im Gegensatz zu Sp1 verschiedene Isoformen, die nicht alle über eine aktivierende Domäne verfügen.^[89] Darüber hinaus ist Sp3 nicht in der Lage, Multimere auszubilden und verfügt somit über keine synergistischen Eigenschaften. Dies führte dazu, dass Sp3 zunächst lediglich als Repressor der Transkription und Gegenspieler von Sp1 gesehen wurde.^[86] Allerdings zeigte sich, dass dieser Effekt hauptsächlich auftrat, wenn viele Bindestellen für Sp1 vorhanden sind und Sp1 als Tetramer agieren kann. In diesen Fällen kann Sp3 leichter an die DNA binden als SP1 und somit die Transkription abschwächen.^[91] Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Sp3 auch zur Aktivierung der Transkription fähig ist.^[86] Beispielsweise konnte bei einer gleichzeitigen Überexpression von Sp1 und Sp3 eine verstärkte Aktivierung des Tumorsuppressors *RASSF1A* beobachtet werden.^[93] Ob es sich

in diesem Fall um eine synergistische Aktivierung handelte ist jedoch umstritten, da es Hinweise auf eine unterschiedliche Verteilung der TFs im Zellkern gibt und sie somit nicht zeitgleich an denselben Promotor binden sollten.^[94] Des Weiteren regulieren Sp1 und Sp3 unterschiedliche Gruppen von Genen, welche sich nur partiell überschneiden.^[95,96]

Da bei der Transkription vieler Genen eine Beteiligung von Sp1 nachgewiesen werden konnte, entstand die Annahme, dass Sp1 für die Regulation von Haushaltsgenen essenziell wäre.^[91] Allerdings zeigte sich in *knock-out*-Experimenten an Mäusen, dass heterozygote Embryonen mit verminderten Sp1-Leveln kleiner als der Wildtyp, aber dennoch lebensfähig waren.^[85,97] Bei einem vollständigen *knock-down* von Sp1 waren die Embryonen nicht mehr lebensfähig und starben im Schnitt nach 10-11 Tagen.^[85,97] Dennoch konnte für viele durch Sp1 regulierte Gene eine hohe Expression nachgewiesen werden. Als Erklärung dafür wurde in Betracht gezogen, dass Sp3 einen Teil der Aufgaben von Sp1 ausübte.^[91] Für diese Annahme sprach zudem, dass Embryonen mit verringerten Sp1- und Sp3-Leveln nicht mehr lebensfähig waren.^[97] Ebenso zeigte sich, dass ein *Sp3-knock-out* erst nach der Geburt letal war.^[97] Dies stellte einen Unterschied zu den Ergebnissen des *Sp1 knock-out* dar, welcher jedoch durch die unterschiedlichen von Sp1 und Sp3 regulierten Gene zu erklären war. Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl Sp1 als auch Sp3 essenziell für das embryonale Wachstum sind, aber die Expression der Haushaltsgene nicht vollständig von Sp1 abhängig ist.^[85] Dafür sprechen auch Hinweise auf die Abnahme der Sp1-Level mit zunehmendem Zellalter.^[98]

Aufgrund seiner Rolle als Regulator des Zellzyklus und der Expression von Wachstumsfaktoren,^[89,99] sind die Sp1-Level einer Zelle entscheidend für ihr normales Wachstum. Während zu geringe Sp1-Level noch ausgeglichen werden können,^[85,97] ist eine Überexpression von Sp1 in vielen Krebsarten zu beobachten und ein Indikator für eine schlechte Prognose.^[96,100] Durch die Absenkung der Sp1-Level auf das Niveau gesunder Zellen kann das Tumorwachstum gebremst und die Bildung von Metastasen verhindert werden.^[83] Zwar sind die genauen Gründe, die zu einer Überexpression von Sp1 führen, nicht vollständig geklärt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die Autoaktivierung von Sp1 eine Rolle spielt. Eine weitere Ursache stellt die Inhibierung von Repressoren wie den ZBTB-Proteinen durch miRNAs dar. Die ZBTB-Proteine binden ebenfalls an GC-reiche Sequenzen und verhindern so die Expression der von Sp1 regulierten Gene und somit die Expression von Sp1 selbst. Zu den Repressoren der ZBTB-Proteine gehören onkogene miRNAs wie miR-17, miR-20a und miR-27a. Durch eine Inhibierung dieser miRNAs können die Sp1-Level normalisiert werden und somit das Tumorwachstum verlangsamt werden.^[96]

4. DNA-Erkennung und artifizielle Transkriptionsfaktoren (ATFs)

Transkriptionsfaktoren sind für die Regulation der Genexpression essenziell und können diese über die spezifische Bindung an Promotoren inhibieren oder aktivieren.^[101,102] Hierzu verfügen TFs über drei wichtige Domänen, welche über Linkerdomänen (LD) verbunden sind. Diese Domänen sind ein Kernlokalisierungssignal (NLS), eine Aktivierungsdomäne (AD) und eine DNA-bindende Domäne (DBD).^[8,103] Dabei wird das NLS benötigt, damit die TFs in den Zellkern gelangen können. Die AD kann über den Kontakt zu weiteren Proteinen die RNA-Polymerase II rekrutieren, während die DBD für die spezifische Erkennung der DNA verantwortlich ist. Um die Genexpression gezielt kontrollieren zu können, ist der Aufbau artifizieller Transkriptionsfaktoren (ATFs) eines der Ziele der chemischen Biologie.^[8,103] Eine der großen Herausforderungen ist dabei die spezifische Erkennung der dsDNA. Im Gegensatz zur RNA ist eine Erkennung der dsDNA über Watson-Crick-Basenpaarung nur nach einer Trennung der DNA-Stränge möglich. Hierzu können LNA- oder PNA-basierte ONs verwendet werden, welche zu DSI fähig sind.^[64,66,71,73] Allerdings ist die Effektivität dieser ONs unter physiologischen Bedingungen oft gering. Eine weitere Möglichkeit stellt eine proteinvermittelte Trennung der DNA-Stränge dar, wie sie im CRISPR/Cas9-System zu beobachten ist. Dadurch liegt die DNA partiell als Einzelstrang vor und kann durch die gRNA über Watson-Crick-Paarung erkannt werden. Abgesehen davon ist eine Erkennung der DNA auch mit positiv geladenen oder interkalierenden kleinen Molekülen möglich, jedoch geschieht dies in den meisten Fällen unspezifisch. Eine weitere Option zur sequenzspezifischen Adressierung der DNA stellt eine Wechselwirkung mit den funktionellen Gruppen der großen und kleinen Furche dar. Eine der ältesten Methoden ist dabei die Verwendung von TFOs, die über Hoogsteen-Basenpaarung in die große Furche der DNA binden.^[16] Auch wenn auf diese Weise nur Purin-reiche Sequenzen adressiert werden können, wurden TFO-basierte ATFs zur Regulierung der Genexpression eingesetzt. Diese kann durch Binden eines TFOs inhibiert werden.^[104] Für eine Aktivierung der Genexpression muss das TFO mit einer AD konjugiert werden. Hierzu wurden zwei Methoden verwendet. Einerseits wurden die TFOs mit einem DNA-*hairpin* konjugiert, das die Bindesequenz eines TFs enthielt,^[7,17,105] oder andererseits mit aktivierenden Peptiden, wie VP16, versehen.^[106,107] Auch wenn die Nukleasestabilität der TFOs ein großes Problem für ihre Anwendung darstellt, konnte sowohl *in vitro*^[107] als auch in Zellkulturexperimenten^[7,107] eine Aktivierung der Transkription nachgewiesen werden. Dennoch ist der Einsatz der TFOs, aufgrund ihrer Beschränkung auf Purin-reiche Sequenzen, stark limitiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Erkennung der DNA ist die Verwendung natürlicher DBDs.^[102,103,108] Eine Klasse der DBDs stellen die sogenannten Zinkfingerproteine (ZFPs)

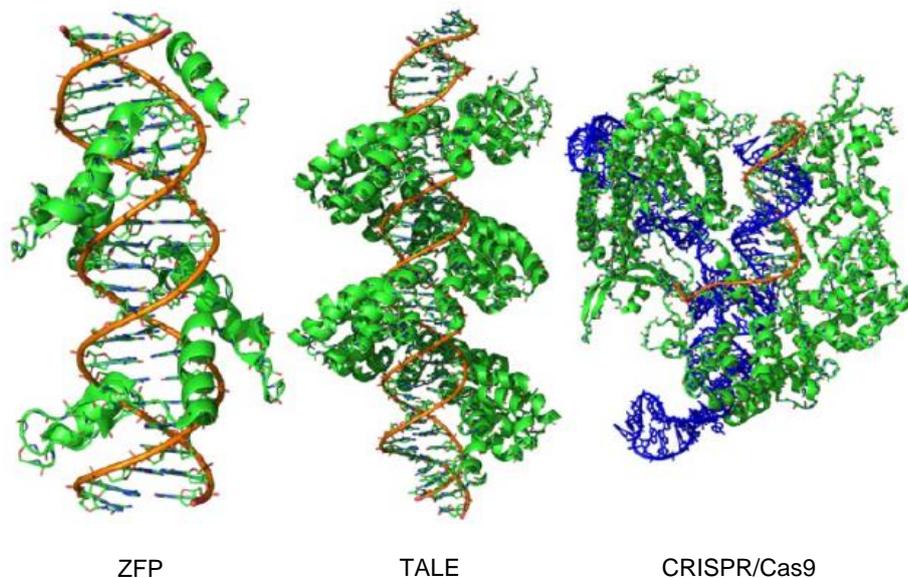


Abbildung 16: Darstellung der Bindung von ZFP, TALE und CRISPR/Cas9 an DNA. Dabei sind die Proteine grün dargestellt. Die DNA ist in orange (links, Mitte) oder blau (rechts) gezeigt und die gRNA in orange (rechts). Entnommen aus Rathnam *et al.*^[109]

dar (Abbildung 16, links), zu denen auch Sp1 gehört (Abschnitt 3). Diese Proteine besitzen eine DBD, die zur Ausbildung ihrer Struktur Zn^{2+} -Ionen koordiniert und die DNA über Aminosäuren in den daraus resultierenden Fingern erkennt. Durch eine Kombination verschiedener Zinkfinger, besteht die Möglichkeit spezifische DNA-Sequenzen gezielt zu adressieren.^[109–112] Allerdings ist das Design und die Herstellung entsprechender ZFPs sehr aufwändig^[113] und die Kombination von ZF-Domänen kann die Spezifität einzelner Domänen beeinflussen und so eine erhöhte *off-target*-Aktivität verursachen.^[114] Zum Aufbau eines ATFs können die ZFPs mit ADs wie VP16 oder VP64 kombiniert werden.

Eine andere Klasse an DBDs konnte in *transcription activator-like effectors* (TALEs) gefunden werden (Abbildung 16, Mitte).^[109,115,116] Diese Proteine wurden aus Bakterien der Gattung *Xanthomonas* isoliert^[115] und besitzen eine einzigartige Bindedomäne. Diese besteht aus Wiederholungen von 34 oder 35 Aminosäuren,^[116] wobei die Aminosäuren 12 und 13 für die sequenzspezifische Erkennung verantwortlich sind. Durch eine Variation an diesen Positionen ist es möglich, die Zielsequenz des Proteins zu programmieren,^[109,116] was jedoch einen erhöhten synthetischen Aufwand erfordert.^[6,114] Analog zu den ZFPs ist die Fusion mit einer AD wie p65 oder VP64 zum Aufbau eines ATFs notwendig.^[109,110] Im Vergleich zu ZFPs besitzen TALEs eine höhere Sequenzspezifität und weisen nur geringe *off-target*-Effekte auf. Diese Eigenschaften sind im Allgemeinen ein großer Vorteil in der Anwendung. Da TFs jedoch in der Lage sind, auch leicht von der Konsensussequenz abweichende DNA-Abschnitte zu erkennen, kann die hohe Spezifität bei ATFs je nach Anwendung auch einen Nachteil darstellen.^[114] Des Weiteren erfolgt die DNA-Erkennung

bei TALEs über die große Furche der DNA und die Adressierung methylierter DNA kann nicht in allen Fällen erfolgen.^[6]

Mit dem *guide* RNA (gRNA) basierten CRISPR/Cas9-System steht eine neue und einfach anwendbare Methode zur Erkennung DNA zur Verfügung (Abbildung 16, rechts).^[117,118] Dieses System besteht aus einer Cas-Endonuklease, in vielen Fällen Cas9, und einer synthetischen gRNA.^[6,117–119] Die initiale Erkennung der DNA erfolgt über das Cas-Protein das *protospacer-adjacent motif* (PAM) bindet. Im Anschluss entwindet das Protein die DNA, welche dann über die gRNA erkannt wird. Ist die gRNA dabei vollständig komplementär zur DNA kann diese von Cas geschnitten werden. Das PAM des Cas9 (5' NGG) kommt dabei sehr häufig in der humanen DNA vor und da die Sequenz der gRNA ist frei wählbar ist, ermöglicht dies die Erkennung fast jeder Stelle des Genoms.^[6,118] Durch die Verwendung eines deaktivierten Cas-Proteins (dCas) kann CRISPR/Cas auch als DBD für ATFs eingesetzt werden.^[120] Auch in diesem Fall muss das System um eine AD erweitert werden, wobei zunächst VP16-Einheiten verwendet wurden. Der Effekt dieser Konstrukte war jedoch gering, konnte aber durch die Verwendung mehrerer gRNAs deutlich gesteigert werden.^[6,119] Eine andere Variante zur Aktivierung der Transkription stellen die sogenannten SunTags dar.^[121] Bei diesen wird das Cas9 mit einer Peptidkette versehen, welche von Antikörpern erkannt werden kann, die mit einer AD fusioniert sind. Dies ermöglicht es an einen ATF gleich mehrere ADs anzubringen, wodurch eine stärkere Aktivierung der Genexpression erzielt werden kann. Auf einem ähnlichen Konzept beruhen SAMs (*synergistic activation mediators*).^[6,119,122] Diese enthalten eine gRNA, die um zusätzliche *stem-loops* erweitert wurde. Diese können dann ebenfalls von Fusionsproteinen erkannt werden und so die Genexpression auslösen.

Gegenüber ZFP- oder TALE-basierten ATFs besitzt CRISPR/Cas9 zudem den Vorteil, dass aktivierbare Proteine möglich sind und so eine Aktivierung der Transkription durch externe Stimulation erfolgen kann.^[119] Außerdem ist die gRNA für die Erkennung der DNA verantwortlich, wodurch die Erkennungssequenz einfach angepasst werden kann. Des Weiteren ist es durch die Verwendung mehrerer gRNAs möglich, mit einem Protein verschiedene Sequenzen auf der DNA zu adressieren und so eine verstärkte Wirkung der ATFs zu erhalten. Ein Nachteil der CRISPR/Cas9-basierten Systeme ist jedoch, dass sie aus mindestens zwei bis drei Komponenten bestehen, welche alle in eine Zelle transfiziert werden müssen. Um dies zu erreichen, sind in manchen Fällen mehrere Vektoren notwendig^[6,119] und eine systemische Anwendung ist komplexer als bei den TALE- oder ZFP-basierten ATFs. Jedoch besteht auch bei diesen Systemen die Schwierigkeit, dass der ATF in die Zelle gelangen muss, weswegen die Entwicklung zellgängiger ATFs immer noch eine Herausforderung darstellt.^[103]

4.1 Pyrrol-Imidazol-Polyamide (PIPs)

Eine weitere Klasse DNA-erkennender Moleküle stellen die *minor groove binder* dar. Diese sind kleine Verbindungen, welche die kleine Furche der DNA spezifisch erkennen können. Zu diesen Verbindungen zählen unter anderem Farbstoffe der Hoechst-Klasse, die Naturstoffe Netropsin und Distamycin A oder Pyrrol-Imidazol-Polyamide (PIPs).

PIPs setzen sich aus *N*-Methylpyrrol (Py) und *N*-Methylimidazol (Im) zusammen und sind in der Lage, die kleine Furche der DNA selektiv zu erkennen.^[123,124] Diese Substanzen wurden ausgehend von den Naturstoffen Netropsin und Distamycin A entwickelt (Abbildung 17), welche eine hohe Affinität zu AT-reichen Regionen der DNA besitzen. Aufgrund ihrer Fähigkeit die Transkription zu inhibieren, wurden diese Stoffe als Chemotherapeutika in Betracht gezogen, allerdings erwiesen sie sich als zu toxisch und somit zur Anwendung ungeeignet.^[125] Eine genauere Analyse ihres Bindeverhaltens mittels NMR-Spektroskopie und Kristallstrukturanalyse ergab, dass Distamycin A mit einer Ziel-DNA sowohl in einem Verhältnis von 1:1 als auch von 1:2 komplexieren konnte.^[126] Bei den 1:2 Komplexen konnte jeweils eine Orientierung der Distamycin-Stränge vom N-Terminus zum C-Terminus in 5'-3' Richtung der DNA beobachtet werden. Ausgehend von den Erkenntnissen über die Bindung von Netropsin und Distamycin entstand die Hypothese, dass sie eine Substitution von Py durch Im die Adressierung von G•C Paaren möglich sein sollte, was in der Gruppe von Peter Dervan bestätigt werden konnte.^[123-125] Dabei konnte zudem beobachtet werden, dass die eingesetzten Verbindungen entgegen der Erwartung nicht in einem Verhältnis von 1:1 mit der DNA komplexierten, sondern als antiparallele Dimere.^[123] In nachfolgenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass zwei Polyamide unterschiedlicher Sequenz als Heterodimere an die DNA banden.^[127] Hierbei wurde das System durch die unterschiedliche Affinität der Peptide jedoch sehr komplex. Um diese Problem zu umgehen, wurden die beiden Peptide kovalent verknüpft und durch den Einbau einer GABA-Einheit konnte die Affinität zur DNA stark erhöht werden.^[128] Die daraus resultierenden PIPs banden als antiparalleler *hairpin*, wobei eine Orientierung der PIPs vom N- zu C-Terminus in 5'-3'-Richtung der DNA bevorzugt war (Abbildung 18). Des Weiteren konnten Paarungsregeln aufgestellt werden, durch die die Zielsequenz der PIPs vorhergesagt werden konnte. Ein Py/Py-Paar erkennt selektiv A•T-

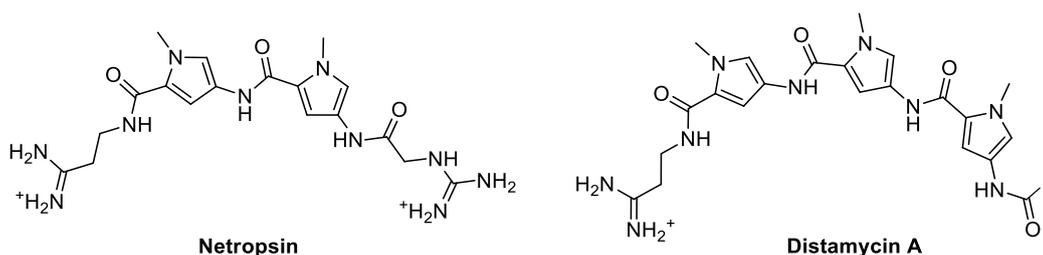


Abbildung 17: Struktur der Naturstoffe Netropsin und Distamycin A.

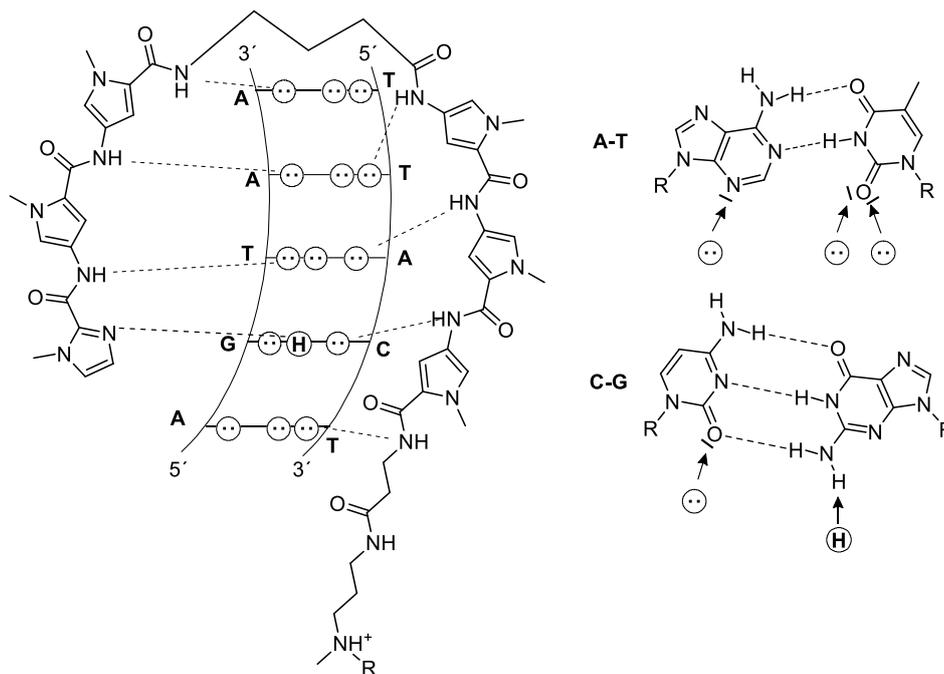


Abbildung 18: Darstellung der Bindung eines PIPs an die kleine Furche der DNA (links).^[128] Die gepunkteten Kreise stellen dabei die freien Elektronenpaare der Basen, Kreise mit H den N2-Wasserstoff des Guanins dar. Auf der rechten Seite sind die an Wechselwirkungen beteiligten Elektronenpaare und der Wasserstoff markiert.

oder T•A-Paare, wobei eine genauere Unterscheidung nicht möglich ist. Ein Paar aus Im/Py bindet selektiv an G•C-Paare, während die Kombination Py/Im selektiv C•G-Paare adressiert (Abbildung 18).^[129] Mit der Kombination Im/Im können keine Basenpaare erkannt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Affinität der PIPs durch den Einbau eines β -Alanins (β) am C-Terminus weiter gesteigert werden konnte,^[130] wobei β bevorzugt A oder T erkennt. Dies hat zur Folge, dass der Einbau von β zu Einschränkungen bei der Wahl möglicher Zielsequenzen führt.^[131] Eine andere Möglichkeit die Affinität und Selektivität der PIPs zu erhöhen, stellt die Substitution des GABA-*turns* durch eine α -Aminosäure dar.^[132] Diese erhöht die Affinität der PIPs durch eine zusätzliche positive Ladung, während die Stellung der chiralen Aminogruppe eine reverse Bindung des PIPs verhindert. Zudem kann die Aminogruppe zur weiteren Funktionalisierung der PIPs genutzt werden. Mit einer Acetylierung konnte gezeigt werden, dass die Affinität der PIPs im Bereich eines unmodifizierten GABA-*turns* liegt, aber die Selektivität der Bindung deutlich erhöht ist.^[132]

Da PIPs aus sechs Py- und Im-Einheiten nur einen kurzen DNA-Abschnitt von 5 bp adressieren können, wurde die Polyamid-Kette verlängert. Dabei können *hairpin*-PIPs auf eine Länge von zehn Einheiten verlängert werden, wobei die zu erkennende Sequenz auf 6 bzw. 7 bp erhöht wird. Darüber hinaus steigt die Affinität eines Achtmer-PIPs gegenüber einem Sechser-PIP um zwei bis drei Zehnerpotenzen und diese Verbindungen binden im niedrigen nanomolaren Bereich.^[14] Somit weisen diese PIPs Bindungskonstanten auf, die

mit TFs vergleichbar sind. Da sie zudem die Zellmembran passieren können, sind sie in der Lage die Genexpression zu inhibieren.^[15] Die Verwendung eines Zehner-PIPs führt zu keiner weiteren Zunahme der Affinität und diese PIPs stellen die maximale Kettenlänge für *hairpin*-Polyamide dar.^[132] Bei längeren Ketten unterscheidet sich die Struktur der PIPs zu stark von der DNA-Helix, sodass eine Komplexierung ungünstig wird. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Erkennung von GC-reichen Sequenzen problematisch, da Im-Einheiten zu einer flachen und engen Struktur der PIPs führen.^[133–135] Um diesen Effekt auszugleichen ist es möglich, Py-Einheiten durch β -Einheiten zu substituieren.^[136] Auch diese verhalten sich analog zu Py, sind jedoch deutlich flexibler und ermöglichen so die Erkennung längerer DNA-Sequenzen.^[137,138] Allerdings liegt die Länge der Sequenzen mit ca. 9 bp unter den 16 bp, welche für eine einzigartige Zielsequenz benötigt werden.^[139] Um diese zu erreichen, können sogenannte Tandempolyamide eingesetzt werden,^[140,141] bei denen bis zu drei PIPs über eine Aminofunktion im *turn* verknüpft werden. Auf diese Weise ist es möglich, bis zu 18 bp zu erkennen.^[141]

Um die Spezifität der PIPs weiter zu erhöhen, wurde versucht zwischen A•T und T•A-Paaren zu unterscheiden. Dazu wurde *N*-Methyl-3-hydroxypyrrol verwendet, welches mit der 3'-Hydroxygruppe eine zusätzliche Wasserstoffbrücke mit T ausbilden kann. Allerdings sind diese Verbindungen sehr oxidationsempfindlich, was ihren Einsatz verhindert.^[142] Zur Steigerung der Affinität wurden auch zyklische PIPs verwendet, die zwar eine höhere Affinität als die *hairpin*-Polyamide besaßen,^[143] jedoch in Zellkulturexperimenten eine höhere Toxizität aufwiesen.^[144] Somit stellen die *hairpin*-PIPs die am Häufigsten eingesetzten PIPs dar.

4.1.1 Synthese der PIPs

Die Synthese der PIPs erfolgt typischerweise mittels Festphasensynthese. Dabei kann sowohl eine Boc-^[145] als auch eine Fmoc-basierte^[146] Variante verwendet werden, die jeweils eine schnelle Synthese unterschiedlicher PIPs ermöglichen. Dabei stellt jedoch der Einbau von Im-Einheiten eine große Herausforderung dar. Diese Bausteine besitzen eine niedrige Nukleophilie und eine Kupplung auf ein an fester Phase gebundenes Im ist nur in schlechten Ausbeuten möglich.^[147] Um dieses Problem zu umgehen, können im Vorfeld Di- oder Trimere synthetisiert und zur Kupplung verwendet werden. Dies bedeutet jedoch einen erhöhten Anteil an Synthese in Lösung.^[145,148] Mit der Verwendung von HATU als Aktivierungsmittel ist es möglich, die Festphasensynthese schneller und effektiver durchzuführen, jedoch bleibt die Kupplung auf Im in diesen Fällen problematisch.^[149] Für eine effiziente Kupplung auf Im-Einheiten wurden zwei Methoden entwickelt, die entweder den Einsatz eines Mikrowellenreaktors^[150] oder eine Aktivierung der Monomere mit

Triphosgen (BTC) erfordern.^[147,151] In der BTC-Methode wird die Carbonsäure *in situ* zu einem Säurechlorid umgewandelt und im Anschluss zur Kupplung eingesetzt.

Abgesehen von der Festphasensynthese können PIPs auch in Lösung aufgebaut werden. Dies ist zwar zeitaufwendiger, eignet sich jedoch für die Herstellung größerer Mengen eines PIPs.^[150] Auch in dieser Methode können dimere oder trimere Bausteine eingesetzt werden, um die Synthese zu vereinfachen. Zum Aufbau dieser Einheiten kann neben einer Peptidkupplung auch eine Haloform-artige-Reaktion eingesetzt werden.^[152–154] Auch in diesem Fall kann der fragmentbasierte Ansatz die Zahl der Reaktionsschritte verringern und die Gesamtausbeute der Synthese erhöhen. Außerdem erhöht der modulare Aufbau die Flexibilität der Synthese unterschiedlicher PIPs.^[152]

4.1.2 PIP-basierte ATF

Aufgrund ihrer Fähigkeit DNA spezifisch zu erkennen und die Transkription in Zellkulturexperimenten zu inhibieren,^[15,155] kommen PIPs auch als DBD in ATFs in Frage. Durch die Konjugation von PIPs mit aktivierenden Peptiden war es möglich, die Genexpression *in vitro* zu aktivieren.^[156–158] Allerdings waren diese Konstrukte nicht für Zellkulturexperimente geeignet, da die Konjugate ein relativ hohes Molekulargewicht besaßen und nicht von Zellen aufgenommen wurden. Aus diesem Grund wurde versucht, die aktivierende Domäne zu verkleinern.^[159–161] Die große Herausforderung bestand darin, Konjugate zu erhalten, die nicht nur die Genexpression *in vitro* beeinflussen konnten,^[159] sondern auch in Zellkulturexperimenten funktional waren.^[160] Zwar konnten zellgängige Konjugate erhalten werden, allerdings wurde die Genexpression nur mäßig aktiviert.^[8,109] Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden Versuche unternommen, die Genexpression durch eine Regulation von epigenetischen Faktoren, wie der Histonacetylierung, zu aktivieren.^[162] Für diese Anwendung wurden PIPs mit einem Inhibitor der Histon-Deacetylase (HDAC), SAHA (*suberanilohydroxamic acid*), kombiniert (Abbildung 19), wodurch eine selektive Inhibierung der HDAC ermöglicht wurde. Zwar war es mit diesen

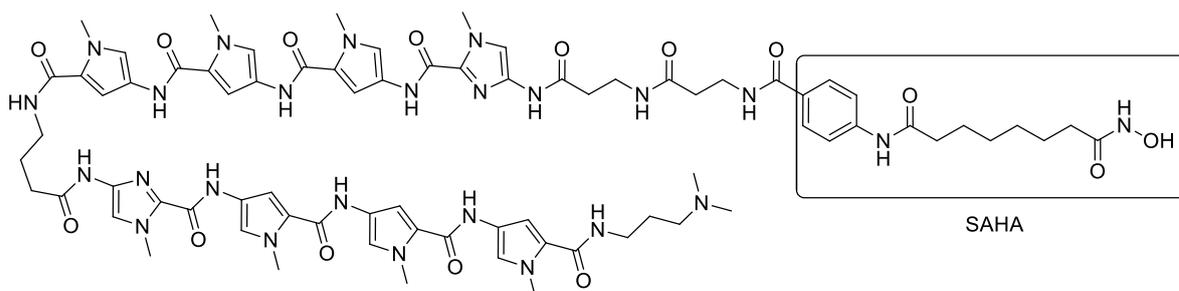


Abbildung 19: Struktur eines SAHA-PIPs.^[163] Die SAHA Einheit ist am N-Terminus angebracht und gesondert markiert.

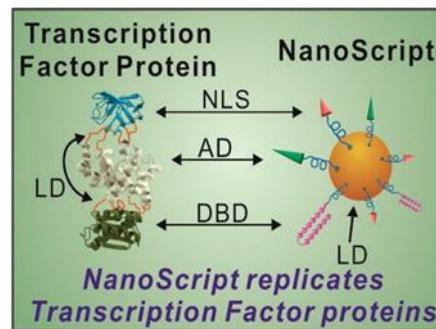


Abbildung 20: Schematische Darstellung eines *NanoScripts* im Vergleich zu einem TF, entnommen aus Patel *et al.*^[8] Dabei steht LD für Linkerdomäne, NLS für Kernlokalisierungssignal, AD für Aktivierungsdomäne und DBD für DNA-bindende Domäne.

Konjugaten möglich die Genexpression zu regulieren,^[163,164] allerdings waren auch diese Verbindungen nur mäßig effizient.^[8] Ein weiteres Konzept zur Regulation der Genexpression stellen die sogenannten *NanoScripts* dar (Abbildung 20).^[8,137] Diese bestehen aus einem Goldnanopartikel, auf den funktionelle Domänen über Thiole aufgebracht sind. Dabei dienen PIPs als DBD, während weitere Peptide als NLS und AD fungieren und so einen ATF bilden. Diese Konstrukte bieten den Vorteil, dass alle Domänen mehrfach auf den Nanopartikeln vorhanden und dadurch in ihrer Wirkung effektiver sind.^[138] Außerdem erlaubt die Konstruktion dieser ATFs eine leichte Anpassung der *NanoScripts*, wodurch sie die Genexpression aktivieren^[8,137] oder inhibieren^[138] sowie epigenetische Modulationen^[165] vornehmen können. *NanoScripts* stellen die effektivsten PIP-basierten ATFs dar und sind in der Lage, die Genexpression in Zellkulturexperimenten zu modulieren. Auf diese Weise war es unter anderem möglich, die Umwandlung von mesenchymalen Stammzellen in Muskelzellen auszulösen.^[137]

Trotz ihrer grundsätzlichen Eignung als DBD stellt die kurze Zielsequenz der PIPs ein Hindernis für ATFs dar. Zwar konnten mit den *NanoScripts* Sequenzen von 10 bp adressiert werden, allerdings liegt dieser Wert unter den 16 bp, welche für eine einzigartige Erkennung der DNA benötigt werden.^[139,166] Aufgrund der mangelnden Unterscheidung zwischen A•T- und T•A-Paaren wird eine eindeutige Erkennung der DNA zusätzlich erschwert, wodurch die Gefahr von *off-target*-Effekten deutlich ansteigt. Gleichzeitig können die PIPs, analog zu natürlichen TFs, auch Varianten ihrer Konsensussequenz erkennen.

5. Regulation der mRNA

Neben der Regulation der Transkription kann die Genexpression auch auf der Ebene der Translation beeinflusst werden. Hierfür kann die mRNA als Angriffspunkt gewählt werden. Eine Interaktion kann dabei durch eine direkte Bindung an die mRNA erfolgen. Der älteste Ansatz stellt dabei die Verwendung von *antisense ONs* (ASOs) dar.^[47,48,57,60,77] Eine weitere Methode ist der gezielte Abbau von mRNAs mittels RNA-Interferenz (RNAi), die über eine *small interfering RNA* (siRNA) induziert werden kann.^[167] Des Weiteren sind micro RNAs als natürliche Regulatoren der mRNA ein geeignetes Mittel um die Lebensdauer der mRNA zu beeinflussen.

5.1 RNA-Interferenz und micro RNAs

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein komplexer Prozess, der hauptsächlich zur Abwehr von Virusinfektionen in einer Zelle dient.^[167–169] Dabei werden lange doppelsträngige RNAs, die normalerweise in einer Zelle nicht vorkommen würden, durch die Ribonuklease *Dicer* in Fragmente mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden geschnitten. Durch Einbau eines der beiden Stränge in das Argonaut 2 Protein (Ago2) wird dieses als sequenzspezifische Ribonuklease programmiert. Bindet dieser RNA-Protein-Komplex an eine vollständig komplementäre RNA, zum Beispiel die virale RNA, aus der er einmal hervorgegangen ist, so bewirkt die RNase H Aktivität von Ago2 einen katalytischen Abbau der viralen RNA (Abbildung 21, links).^[167] Man spricht vom *RNA-induced silencing complex* (RISC). Diese RNAi kann auch durch gezielte Zugabe kurzer synthetischer RNAs ausgelöst und gegen beliebige mRNAs einer Zelle gerichtet werden. Man spricht dann von siRNAs und von siRISCs. Der Einsatz von siRNAs zählt heute zu den wichtigsten Methoden, um den temporären *knock-out* eines Gens zu erreichen.^[167]

Mechanistisch ähnlich, aber mit anderer Zielsetzung erfolgt die Bildung von *micro RNAs* (miRNAs).^[167] Diese werden im Zellkern als pri-miRNAs exprimiert, welche noch eine 5'-cap besitzen und 3'-polyadenyliert sind. In dieser Form bilden sie eine *hairpin*-Struktur aus, wobei keine vollständige Basenpaarung vorliegt (Abbildung 21, oben).^[167] Die pri-miRNA kann durch den *microprocessor complex* bestehend aus dem Protein *Pasha* und der RNase *Drosha* in die 70-100 Nukleotide lange pre-miRNA prozessiert und daraufhin durch Exportin 5 aus dem Zellkern in das Cytosol transportiert werden. Dort wird die pre-miRNA durch *Dicer* weiter zu einer doppelsträngigen miRNA, bestehend dem *guide*-Strang und einem *passenger*-Strang, prozessiert. Von diesem Duplex wird daraufhin der *guide*-Strang in Ago2 eingebaut und so der RISC gebildet nun miRISC genannt, während der *passenger*-

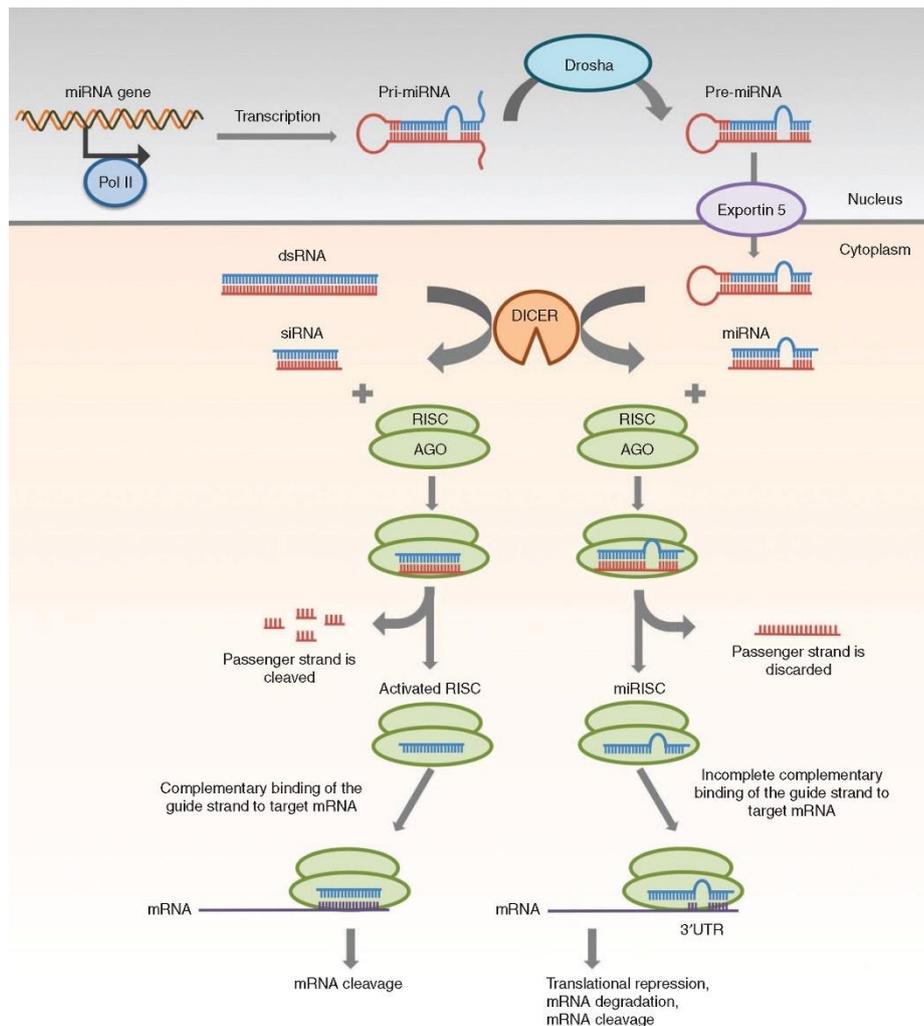


Abbildung 21: Gen-Silencing Mechanismus von siRNA und miRNA. Entnommen aus Lam *et al.*^[167]

Strang verworfen wird (Abbildung 21, rechts).^[167,170]

Strukturell sind siRISCs und miRISCs nicht unterscheidbar, wohl aber in ihrer Funktion. MiRISCs sind nämlich nicht vollständig komplementär zu den mRNAs der Zelle und schneiden sie daher nicht. Außerdem binden miRISCs in den meisten Fällen lediglich mit den Nukleotiden zwei bis sieben oder acht, der sogenannten *seed*-Region, an die 3'-UTR einer mRNA.^[167] Zwar ist auch eine zusätzliche Bindung durch die Nukleotide 13 bis 16 möglich, der sogenannten *supplementary*-Region. Dies kann jedoch nur bei ca. 5 % aller Fälle beobachtet werden.^[171,172] Dementsprechend besitzen miRISCs oft nur eine kurze Zielsequenz auf der mRNA und sind somit deutlich unspezifischer als siRISCs. Eine miRNA kann beispielsweise über 100 mRNAs adressieren. Die unvollständige Bindung der miRNA führt dazu, dass miRISCs keine Nukleaseaktivität aufweisen. Stattdessen rekrutieren sie Glycin-Tryptophan-reiche GW182-Proteine, wie das *tri-nucleotide repeat-containing protein 6* (TNRC 6).^[173,174] Diese interagieren mit weiteren Proteinen, welche den Stopp der Translation, oder eine Deadenylierung auslösen können. Ebenso kann die 5'-cap entfernt und durch diesen Prozessen der Abbau der mRNA ausgelöst werden.^[174] In seltenen Fällen,

bei denen mRNA und miRNA eine hohe Komplementarität aufweisen, können die miRISC jedoch ebenfalls als Nuklease wirken.^[167] In analoger Weise übernehmen siRISCs die Funktionen der miRISCs, wenn die *seed*-Region einer siRNA der einer miRNA entspricht.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, die Genexpression zu inhibieren und dabei nahezu jedes Ziel adressieren zu können, stellen siRNAs und miRNAs eine gute therapeutische Plattform dar, wobei die siRNA die weiter entwickelte Technologie ist.^[1] Dies liegt am weniger komplexen Mechanismus der siRISCs, wodurch ihre Wirkung besser vorherzusehen ist. Als therapeutische Ansätze im Bereich der RISCs können dabei siRNAs, miR-Mimics oder anti-miRs eingesetzt werden.^[167] Während siRNAs und miR-Mimics in Ago2 eingebaut werden, dienen anti-miRs als Inhibitoren von miRISCs, indem sie an die *seed*-Region einer miRNA binden.

5.1.1 Aufbau von siRNA

Seit ihrer Entdeckung 1998^[22] sind siRNA-basierte RISCs ein häufig verwendetes System zum *knock-out* einzelner Gene,^[167] da siRISCs eine mRNA mit hoher Effizienz und Spezifität degradieren können. Aufgrund ihres häufigen Einsatzes war es zudem möglich, die Eigenschaften der benötigten ONs zu optimieren. Als klassische siRNAs werden zwischen 19 und 21 Nukleotide lange dsRNAs eingesetzt, bei denen an den jeweiligen 3'-Enden der Einzelstränge zwei Nukleotide überlappen. Abgesehen davon können auch längere, aus 27 Nukleotiden bestehende dsRNAs verwendet werden. Diese RNAs müssen zunächst durch *Dicer* prozessiert werden und besitzen eine bis zu 100-fach höhere RNAi-Effizienz als die klassischen siRNAs.^[167,175] Allerdings besteht bei längeren dsRNAs die Gefahr, mit zelleigenen Abwehrmechanismen zu interagieren. Beispielsweise aktivieren RNA-Duplice von mehr als 30 bp das angeborene Immunsystem und besitzen somit ungewollte Nebenwirkungen.^[167,176] Insbesondere sind GU-reiche Sequenzen zu vermeiden, da diese die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) 7 und 8 aktivieren.^[1,167] Beim Entwurf von siRNAs ist außerdem zu beachten, dass sich die Sequenz der Nukleotide 2 – 7 von *seed*-Regionen bekannter miRNAs unterscheiden sollte, um eine miRISC-artige Wirkung zu verhindern. Des Weiteren ist es grundsätzlich möglich, beide Stränge der dsRNA in RISCs einzubauen. Um einen der Stränge zu bevorzugen, sollte die dsRNA asymmetrisch aufgebaut werden. Hierzu kann die Präferenz des Ago2 für die Basen U oder A am 5'-Ende des *guide*-Strang genutzt werden, wobei der Einbau von U präferiert wird. Da zudem derjenige RNA-Strang bevorzugt eingebaut wird, der am 5'-Ende die instabileren Basenpaarungen aufweist, sollte der *guide*-Strang am 5'-Ende AU-reich und am 3'-Ende GC-reich sein. Um diesen Effekt zu verstärken, können modifizierte ONs eingesetzt werden, um stabilere Basenpaare zu erhalten.^[167] Die Verwendung von modifizierten ONs bietet zudem den Vorteil, dass die

Nukleasestabilität der siRNA erhöht wird, welche beispielsweise im Blut nur wenige Minuten beträgt.^[58] Außerdem können die Modifikationen eine Aktivierung der *Toll-like*-Rezeptoren verhindern und die Anwendung der ONs somit sicherer machen. Allerdings ist bei den Modifikationen darauf zu achten, dass sie durch das Ago2 toleriert werden müssen und dass sie die thermische Stabilität der dsRNA nicht zu stark erhöhen. Beides würde die RISC-Bildung und die Effizienz der RNAi verringern.^[167] Im Allgemeinen gilt dabei, dass Modifikationen des *passenger*-Strangs besser toleriert werden und dort zu einer besseren Unterscheidung der beiden Stränge beitragen.^[167] Sollten Modifikationen in den *guide*-Strang eingeführt werden, ist jedoch darauf zu achten, dass zur Einlagerung einer RNA in Ago2 eine Phosphatgruppe am 5'-Ende benötigt wird. Diese kann auch in der Zelle durch Phosphorylierung einer freien 5'-Hydroxygruppe eingefügt werden, jedoch darf das 5'-Ende keine Modifikationen aufweisen.^[58,167] Beim Einsatz modifizierter ONs im *guide*-Strang muss zudem beachtet werden, dass die Modifikationen die Struktur der RNA nicht zu stark verändern, da dies einen Einbau in Ago2 verhindern würde. Beispielsweise können einzelne LNA-Nukleotide im *guide*-Strang enthalten sein,^[177] allerdings nur in geringem Ausmaß und ihre Verwendung im *passenger*-Strang stellt die bessere Anwendung dar.^[58,167] Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur RNA sind 2'-OMe- oder 2'-F-RNA die am besten geeigneten Modifikationen für den *guide*-Strang.^[47,58] Allerdings bedingt ein zu hoher Anteil einer dieser Modifikationen jeweils eine Abweichung von der natürlichen Form der RNA und somit zu einer geringeren RNAi-Aktivität.^[58] Da der Einbau von 2'-OMe-Nukleotiden die RNA-Helix überwindet, während die 2'-F-RNA eine Unterwindung hervorruft, können diese Effekte durch einen alternierenden Einbau beider Modifikationen ausgeglichen werden. Dies ermöglicht vollständig modifizierte ONs, die effizient zur RNAi fähig sind.^[58,178] Somit kann die Art und Anzahl der Modifikationen an den Verwendungszweck angepasst werden. Soll eine siRNA beispielsweise mittels eines Lipidnanopartikels (LNP) verabreicht werden, sind nur wenige Modifikationen notwendig, während beispielsweise eine Applikation von ON-GalNac-Konjugaten ein vollständig modifiziertes ON erfordert.^[58] Zusätzlich können siRNAs mit einem Phosphorothioat-Rückgrat versehen werden, wobei dies nur an den Enden der ONs toleriert wird. Bei einer vollständigen Modifikation sinkt die Effektivität der RNAi hingegen deutlich.^[58,177]

5.1.2 Anwendungen für miRISCs

Im Vergleich zu siRISCs können miRISCs als therapeutisches Ziel oder als Therapeutikum dienen.^[167] Beispielsweise werden in Krebszellen oft die tumorunterdrückenden miRNAs

miR-let-7a oder miR-34a unterexprimiert. In diesen Fällen können miR-Mimics genutzt werden, um den Anteil dieser tumorunterdrückenden miRNAs in der Zelle zu erhöhen.^[179] Hierzu können sowohl einzel- als auch doppelsträngige RNAs eingesetzt werden, wobei die doppelsträngige Variante deutlich effektiver ist.^[167,179] Für den Aufbau der miR-Mimics gelten dabei ähnliche Voraussetzungen wie für die siRNAs. Da jedoch die Sequenzen natürlicher miRNAs eingesetzt werden, ist der Entwurf in diesem Fall einfacher. Im Vergleich zu siRNAs besitzen miR-Mimics jedoch den Nachteil, dass ihre Wirkung deutlich komplexer und die Zahl der möglichen Ziele deutlich höher ist, was die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen erhöht. Da miRNAs zudem mit TLRs interagieren können, besteht beim Einsatz von miR-Mimics die Gefahr eine Immunantwort der Zelle auszulösen, wodurch weitere, unkontrollierbare Nebenwirkungen auftreten würden.^[180,181]

Abgesehen von der Substitution von miRNA, können überexprimierte onkogene miRNAs durch anti-miRs inhibiert werden und so eine normale Zellfunktion wiederhergestellt werden. Die Wirkung der anti-miRs beruht dabei auf einer Bindung an die *seed*-Region der RISCs, wodurch diese blockiert wird und somit nicht mehr an ihre Zielsequenzen binden kann. Insofern sind anti-miRs in ihrer Wirkung mit ASOs zu vergleichen. Da anti-miRs einzelsträngig sein müssen, werden dort modifizierte ONs verwendet, um ihre Affinität und Nukleasestabilität zu erhöhen. Die ersten anti-miRs, welche auch als Antagomirs bezeichnet werden, bestanden dabei vollständig aus 2'-OMe-RNA.^[182] Durch den Einsatz von LNA/DNA- oder LNA/2'-OMe-RNA-Mixmeren konnte die Effizienz der anti-miRs weiter gesteigert werden.^[9,183] Aufgrund der hohen Affinität der LNA zu RNA ermöglicht sie zudem den Einsatz von 8-mer LNAs mit Phosphorthioat-Rückgrat, sogenannten *tiny*-LNAs, die ganze miR-Familien inhibieren können.^[62] Neben der blockierenden Wirkung der anti-miRs, gibt es Hinweise, dass vollständig komplementäre anti-miRs fähig sind, miRNAs aus den RISCs zu lösen.^[184,185] Abgesehen von LNA kann auch PNA für den Aufbau von anti-miRs verwendet werden. Diese ONs sind in der Lage, sowohl an RISCs als auch an Vorformen der miRNA zu binden.^[78,79] Des Weiteren können PNAs mit positiv geladenen Peptiden konjugiert werden, wodurch ihre Zellaufnahme verbessert wird. Dabei besteht die Möglichkeit, positiv geladene PNA-Konjugate zu verwenden, um die Transfektion von miR-Mimics zu verbessern. In Form solcher Konjugate konnten gleichzeitig anti-miRs und miR-Mimics in eine Zelle eingebracht werden.^[79]

5.2 Das Argonaut 2 Protein (Ago2)

Das Ago2 spielt als aktives Protein eine entscheidende Rolle in der RNAi. Wie alle Vertreter der Ago-Familie ist es auf die Bindung kurzer RNAs spezialisiert und kann durch diese RNAs mit der mRNA interagieren. Das Ago2 setzt sich aus einer Domäne am Amino-Terminus (*N*), sowie der *PAZ*- (*PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE*), der *Mid*- (Mittel), der *PIWI*- und zweier Linker-Domänen zusammen (Abbildung 22).^[186,187] Die *Mid*-Domäne besitzt eine Bindetasche für das 5'-Ende des *guide*-Strangs, in die das 5'-Phosphat und das erste Nukleotid eingebaut werden.^[187] Die *PAZ*-Domäne ist in der Lage, das 3'-Ende des *guide*-Strangs zu binden, wodurch die RNA fest in das Ago2 eingebaut und vor Nukleasen geschützt wird.^[186,187] Dabei wird die RNA so eingebaut, dass lediglich die *seed*- und die *supplementary*-Region zugänglich sind. Die *PIWI*-Domäne ähnelt in ihrer Struktur der RNase H und ist für die Spaltung der mRNA bei siRISCs verantwortlich. Außerdem kann diese Domäne mit GW182-Proteinen wechselwirken und ist somit auch die aktive Einheit bei miRISC-basierten Prozessen.^[186] Die *N*-Domäne des Proteins spielt ebenfalls für die RNase-Aktivität des Ago2 eine wichtige Rolle, indem sie die A-Form des RNA-Duplex stört und für die Entsorgung des geschnittenen Substrats verantwortlich ist.^[186] Die beiden Linker-Domänen sorgen für die Flexibilität des Proteins, welche für die Bindung der mRNA benötigt wird.^[186] Ein Beispiel dafür ist die Helix 7 des Linkers L2, welche sich im Bereich der *seed*-Region befindet. Nach der Bindung der mRNA ändert diese ihre Konformation deutlich und kann im Anschluss mit der kleinen Furche der RNA-Helix wechselwirken. Da sich die Struktur der kleinen Furche bei der Bildung von G•U-Wobble-Paare verändert, könnte dies ein Mechanismus sein, der die Erkennung dieser Paare verhindert und so die Spezifität der RISCs erhöht.^[188]

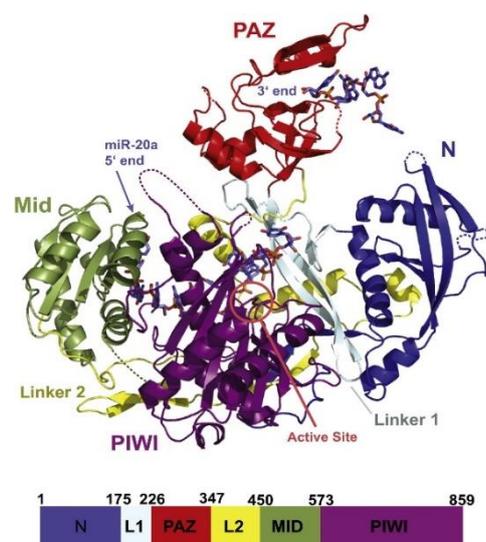


Abbildung 22: Schematische Darstellung eines RISCs bestehend aus Ago2 und miR-20a (oben). Eine schematische Darstellung der Primärstruktur ist unten gezeigt. Mit Erlaubnis entnommen aus Elkayam *et al.*^[187] Copyright © 2012, Elsevier Inc..

5.3 Der miRNA 17/92 Cluster

Eine der am besten untersuchten miRNA-Familien stellt der miR-17/92 Cluster dar.^[189] Dieser Cluster besteht aus den miRNAs miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 sowie miR-92a-1 und wurde 2004 identifiziert.^[190] Die miRNAs dieser Familie sind in vielen Krebsarten überexprimiert und so wurde dieser Cluster als erstes als oncomiR bezeichnet.^[191] Abgesehen von dem miR-17/92 Cluster gehören auch die paralogen Cluster miR-106b/25 und miR-106a/363 Cluster zu dieser miR-Familie. Diese beinhalten die miR-106b, miR-93 und miR-25, sowie miR-106a, miR-18b, miR-20b, miR-19b-2, miR-92a-2 und miR-363.^[189] Aufgrund ihrer *seed*-Sequenzen ist es möglich diese Familie in vier Unterfamilien aufzuteilen (Tabelle 2).

In gesunden Zellen spielt die miR-17/92 Familie eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Entwicklung. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass ein *knock-down* des miR-17/92 Clusters zu Fehlbildungen an Skelett und Lunge zur Folge hat und kurz nach der Geburt zum Tod führt.^[189,192] Auch beim Menschen führt eine verringerte Expression des miR-17/92 Clusters zu Fehlbildungen am Skelett, wie es beispielsweise beim Feingold-Syndrom zu beobachten ist.^[189,193] Als Ursache konnte eine Mutation des *MYCN*-Gens ausgemacht werden, das den TF N-Myc codiert. Dieser ist ein wichtiger Aktivator des miR-17/92 Clusters. In einer weiteren Variante dieser Krankheit erfolgt eine heterozygote Deletion im Bereich des miR-17/92 Clusters, wodurch seine Expression verhindert wird. Darüber hinaus spielt der miR-17/92 Cluster eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von B-Zellen, kann jedoch bei einer Überexpression auch lymphoproliferative Erkrankungen auslösen.^[189]

Tabelle 2: Sequenzen der Vertreter der miR-17/92, miR-106b/25 und miR-106a/363 Cluster unterteilt nach ihren *seed*-Sequenzen. Diese sind in hellblau dargestellt. Dabei wurden miR-19-1 und miR-19-2 sowie miR-92a-1 und miR-92a-2 zusammengefasst.

miR-17-Familie	hsa-miR-17-5p	CAAAGUGC UUACAGUGCAGGUAG
	hsa-miR-20a-5p	AAAAGUGC CUUAUAGUGCAGGUAG
	hsa-miR-20b-5p	CAAAGUGC CUCAUAGUGCAGGUAG
	hsa-miR-106a-5p	AAAAGUGC CUUACAGUGCAGGUAG
	hsa-miR-106b-5p	AAAAGUGC CUGACAGUGCAGAU
	hsa-miR-93-5p	CAAAGUGC CUGUUCGUGCAGGUAG
miR-18-Familie	hsa-miR-18a-5p	UAAGGUG CAUCUAGUGCAGAUAG
	hsa-miR-18b-5p	UAAGGUG CAUCUAGUGCAGUUAG
miR-19-Familie	hsa-miR-19a-3p	UGUGCAA AUCUAUGCAAACUGA
	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAA AUCCAUGCAAACUGA
miR-92-Familie	hsa-miR-92a-3p	UAUUGCA CUUGUCCCGGCCUGU
	hsa-miR-25-3p	CAUUGCA CUUGUCUCGGUCUGA
	hsa-miR-363-3p	AAUUGCA CGGUAUCCAUCUGUA

Während der miR-17/92 Cluster in der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt, ist er in vielen Krebsarten überexprimiert und fördert das Tumorstadium. Ein Grund dafür ist die Inhibierung der Expression des Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) Inhibitors 1 auch, p21 genannt, durch miR-17 und miR-20a.^[183,194] p21 ist für die Regulation des Zellzyklus entscheidend, wirkt dabei tumorinhibierend und kann Apoptose auslösen. Außerdem können miR-17 und miR-20a die Expression von ZBTB-Proteinen unterdrücken, wodurch der TF Sp1 verstärkt exprimiert wird, welcher ebenfalls das Tumorstadium fördern kann. Abgesehen davon ist der miR-17/92 Cluster auch an der Regulation der E2F-Familie beteiligt.^[189,195] Dies ist eine Familie von TFs, die unter anderem an der Auslösung von Apoptose beteiligt sind. Dabei erfolgt die Regulation in beiden Richtungen, da E2Fs die Expression des miR-17/92 Clusters aktivieren und gleichzeitig durch die miRNAs reguliert werden. Da hohe E2F-Level für das Auslösen der Apoptose notwendig sind, kann diese durch hohe miRNA-Level verhindert und so das Tumorstadium gefördert werden.^[195] Aufgrund dieser Eigenschaften stellt der miR-17/92 Cluster entscheidende Marker und Angriffspunkte bei vielen Krebserkrankungen dar.

6 Oligonukleotid-basierte Therapien und Bioverfügbarkeit

Beim Design von Wirkstoffen spielen Selektivität und Sicherheit eine besondere Rolle. Konventionelle Wirkstoffe bestehen häufig aus kleinen Molekülen, welche spezifisch an bestimmte Proteinenregionen binden können. Dabei besteht das Problem, dass eine Erkennung nicht immer möglich ist und somit nicht alle zellulären Prozesse adressierbar sind.^[1] Eine Abhilfe könnte ein früherer Eingriff durch die Beeinflussung der Genexpression darstellen. Hierfür ist jedoch eine Bindung an RNA oder DNA notwendig, was mit kleinen Molekülen nur bedingt spezifisch möglich ist.^[1] In diesem Zusammenhang bieten ON-basierte Therapeutika den Vorteil, dass sie nahezu jede Sequenz spezifisch über Basenpaarung adressieren können, solange diese sterisch zugänglich ist. Bei der Anwendung stellen jedoch die Größe und die negative Ladung der ONs ein Problem bei der Aufnahme in die Zelle dar. Des Weiteren sind die Stabilität der ONs, sowie die Aktivierung zelleigener Abwehrmechanismen, beispielsweise der TLRs, ein Hindernis. Trotz dieser Schwierigkeiten steigt die Zahl der durch die Food and Drug Administration (FDA) oder die European Medicines Agency (EMA) zugelassenen ON-basierten Wirkstoffe in den letzten Jahren stark an, wobei in den meisten Fällen seltene Krankheiten adressiert werden.^[2,3] Im Folgenden werden einige Therapieansätze sowie Methoden für die Verteilung der ON vorgestellt, wobei mRNA-basierte Wirkstoffe nicht behandelt werden.

6.1 ON-Therapien

6.1.1 *antisense oligonucleotides* (ASOs)

Im Bereich der ON-basierten Therapeutika sind ASOs die ältesten und häufigsten Vertreter. Von den elf im Juni 2020 durch die FDA oder EMA zugelassenen ON-Therapeutika, sind sieben ASO-basiert.^[2,3,196] Dazu zählt auch das erste, allerdings mittlerweile zurückgezogene, ON-Therapeutikum Fomivirsen.^[1,2] Dieses konnte die Transkription der mRNA in Cytomegalieviren durch einen sterischen Block inhibieren und so bei AIDS-Erkrankten gefährliche Infektionen des Auges verhindern. Allerdings wurde diese Anwendung durch bessere HIV-Therapeutika überflüssig. Nach der Zulassung von Fomivirsen dauerte es 15 Jahre, bis das nächste ASO-Therapeutikum, das Gapmer Mipomersen, von der FDA zugelassen wurde. Die Zulassung durch die EMA wurde jedoch aufgrund von Sicherheitsbedenken verweigert, da es schwere Leberschäden auslösen kann.^[2] 2016 wurde mit dem *splice-switching ON* (SSO) Eteplirsen das erste systemisch applizierbare ON-Therapeutika durch die FDA zugelassen, jedoch verweigerte die EMA erneut die Zulassung.^[2,47] Mit Nusinersen wurde im selben Jahr ein weiteres SSO sowohl

durch die FDA als auch durch die EMA zugelassen.^[2,3] Insgesamt kommen im Bereich der ASOs sowohl Gapmere als auch SSOs zum Einsatz.^[2,3,196] Für die Gapmere werden 2'-MOE-RNA/DNA-Mixmere mit einem Phosphorthioatrückgrat verwendet, deren Anwendungsgebiete Leberkrankheiten sind. Die SSOs bestehen in vielen Fällen aus 2'-MOE-RNAs oder Morpholino-ONs (PMOs) und werden zur Behandlung seltener Muskelkrankheiten, wie der Duchenne-Muskeldystrophie eingesetzt.^[2,196] Hierbei konnte insbesondere bei den PMO-basierten ASOs schwere Nebenwirkungen, wie Hepatotoxizität, festgestellt werden, wodurch ihre Zulassung beschränkt und somit ihr Einsatz limitiert wird.^[2]

6.1.2 RNAi und miRNA

Eine andere Gruppe der ON-Therapeutika stellen siRNAs dar, auf Basis derer im Juni 2020 zwei Medikamente zugelassen waren und sich weitere in der Zulassung befinden.^[3] Der erste Vertreter der RNAi-Therapeutika, Patisiran, wurde 2018 und damit 20 Jahre nach dem ersten ASO zugelassen und dient zur Behandlung der hereditären ATTR-Amyloidose.^[197] Patisiran besteht aus einer mit wenigen 2'-OMe-Nukleotiden modifizierten dsRNA und wird in Lipidnanopartikeln (LNPs) appliziert. Allerdings ist seine Wirksamkeit begrenzt und es muss in Kombination mit Steroiden angewendet werden.^[2] Der zweite Vertreter dieser Klasse, Givosiran, wurde Ende 2019 zugelassen und wird gegen die akute intermittierende Porphyrie eingesetzt. Givosiran ist ein vollständig modifiziertes dsON bestehend aus alternierenden 2'-F- und 2'-OMe-Nukleotiden deren Enden durch Phosphorthioate (PS) weiter stabilisiert werden. Der *passenger*-Strang ist am 3'-Ende mit *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) konjugiert, um die Aufnahme der Verbindung in die Leber zu erleichtern.

Im Gegensatz zu siRNAs haben miRNA-basierte Ansätze bisher noch keine Phase III Studien erreicht.^[2,10] Dies liegt einerseits an der komplexeren Wirkung der miRNAs und andererseits an den Anwendungen, bei denen es sich in vielen Fällen um virale und Krebserkrankungen handelt. Dies erfordert eine Verteilung der ONs über die Leber hinaus, was eine große Herausforderung darstellt. In der Wirkstoffentwicklung sind die anti-miRs weiter fortgeschritten und mit Miravirsin konnte ein erstes anti-miR erfolgreich in Phase II getestet werden.^[1,10] Dieses wurde gegen das Hepatitis-C-Virus eingesetzt und in den Studien konnte gezeigt werden, dass die Anwendung sicher war. Außerdem konnte die Virenlast deutlich gesenkt, jedoch keine vollständige Heilung erzielt werden.^[1] Da gleichzeitig effektivere Medikamente auf den Markt kamen, wurden die Studien zu Miravirsin eingestellt.^[1] Weitere anti-miR-basierte Wirkstoffe befinden sich derzeit in Phase II-Studien.^[2] Im Gegensatz zu anti-miRs sind die Anwendungen von miR-Mimics noch seltener in fortgeschrittenen klinischen Studien zu finden und es gibt nur wenige

Ansätze, die in Phase II getestet werden.^[2,10] 2013 begannen mit dem ersten Vertreter dieser Klasse, MRX34, Phase I Studien, welche 2016 aufgrund gravierender Nebenwirkungen gestoppt wurden.^[1,10] MRX34 war ein Mimic der miR-34a, die in Krebszellen herunterreguliert ist, und wurde in Lipidnanopartikeln verabreicht.

6.1.3 TF *decoy* (TFD)

Die bisher vorgestellten Ansätze beruhen alle darauf, die Genexpression durch Wechselwirkung mit mRNA beeinflussen. Dies hat den Vorteil, dass die ONs lediglich in die Zelle, jedoch nicht in den Nukleus gelangen müssen. Außerdem ist die Erkennung von dsDNA mit ONs nicht ohne weiteres möglich und auf Stranginvasion oder Triplexbildung begrenzt. Allerdings sind beide Technologien zu wenig entwickelt, um in klinischen Studien getestet zu werden.^[1] Die am weitesten entwickelte Methode zur Beeinflussung der Transkription stellen *TF decoys* (TFD) dar. Dieser Ansatz beruht auf kurzen, partiell modifizierten dsDNAs, welche die Bindesequenz eines TFs enthalten. Somit können sie kompetitiv TFs binden und auf diese Weise die Expression von Genen inhibieren.^[198,199] Im Gegensatz zu anderen ON-Therapeutika besitzen sie den Vorteil, dass kurze dsDNAs von Zellen aufgenommen werden können,^[198,199] wobei dies über die Bindung an Rezeptoren oder *carrier*-basiert erfolgen kann. Ein Problem dieses Ansatzes stellt jedoch die geringe Nukleasestabilität der dsDNA im zellulären Milieu dar. Um die Stabilität zu erhöhen, ist es möglich, die ONs zu modifizieren. Beispielsweise können PS eingesetzt werden, die sowohl die Nukleasestabilität als auch die Zellaufnahme der ONs verbessern.^[199,200] Des Weiteren können modifizierte Nukleotide, wie LNAs oder PNAs genutzt werden, um die Nukleasestabilität zu erhöhen.^[61,201] Allerdings müssen diese Nukleotide außerhalb der Bindestellen der TFs eingesetzt werden, da ansonsten die Bindung der TFs verhindert würde. Eine weitere Variante um die Nukleasestabilität zu erhöhen, stellt die Verwendung von *hairpin*- oder zyklischen DNAs dar.^[199] Auf dieser Basis konnten in vorklinischen Studien gute Ergebnisse erzielt werden und TFD-ONs wurden bis in Phase III getestet. Zwar zeigten sich bei diesem Ansatz keine Nebenwirkungen, allerdings konnten gegenüber Placebos keine signifikanten Effekte beobachtet werden.^[1,199]

6.2 Bioverfügbarkeit von Oligonukleotiden

Eines der größten Probleme bei der Anwendung von therapeutischen ONs stellt ihre geringe Bioverfügbarkeit dar. Die Ursachen hierfür sind die Größe und die negative Ladung der ONs, welche eine Zellaufnahme verhindern.^[1] Des Weiteren muss der Abbau der ONs durch Nukleasen verhindert werden, wodurch eine systemische Applikation der ONs weitgehend verhindert wird. Dies hat zur Folge, dass therapeutische ONs entweder lokal appliziert werden oder bei Leberkrankheiten zum Einsatz kommen, da die Leber vergleichsweise leicht zu adressieren ist.^[2] Ein weiteres Problem bei der Applikation von ONs ist, dass exogene ONs meist einen bakteriellen oder viralen Ursprung besitzen. Dies hat zur Folge, dass Rezeptoren wie TLRs zellfremde ONs erkennen und eine Immunantwort auslösen können.^[1,202,203] Zu diesen Rezeptoren gehören TLR9, welcher unmethylierte CpG-Motive in ssDNA erkennt,^[203] sowie TLR3, TLR7 und TLR8, welche durch exogene RNAs aktiviert werden.^[1] Diese Rezeptoren erkennen insbesondere GU-reiche und poly-U-haltige Sequenzen. Um eine Reaktion des Immunsystems zu verhindern, sollten diese Sequenzen entweder vermieden oder durch modifizierte Nukleotide wie 2'-F- oder 2'-OMe-RNA ersetzt werden.^[1] Beim Einsatz von modifizierten ONs besteht jedoch die Gefahr, dass diese toxisch wirken können. Beispielsweise kann der Einsatz von 2'-MOE-PS-Gapmeren zu Thrombozytopenie führen,^[53] während LNAs hepatotoxisch wirken können.^[57]

Die Bioverfügbarkeit von ONs kann durch Modifikationen erhöht werden. Bei der Verwendung eines PS-Rückgrats kann neben einer erhöhten Nukleasestabilität der ONs auch eine verbesserte Zellaufnahme beobachtet werden.^[1,47] Außerdem können PS-ONs an Albumin oder andere Serum-Proteine binden, wodurch ihre Verweildauer nach der Applikation erhöht wird. Da die negative Ladung des Phosphordiesterückgrats und die daraus resultierende elektrostatische Repulsion mit der Zellmembran einen der Gründe für die schlechte Zellinternalisierung darstellt, könnte man annehmen, dass die Zellaufnahme durch ein neutrales Rückgrat verbessert wird. Allerdings zeigte sich, dass die neutralen PMOs nur schlecht und die ebenfalls neutralen PNAs gar nicht in Zellen aufgenommen werden.^[1] Das neutrale Rückgrat ermöglicht jedoch eine Konjugation mit positiv geladenen *cell penetrating peptides* (CPPs) wodurch die Zellaufnahme verbessert werden kann.^[2,79] Aufgrund der fehlenden Ladung binden PMOs und PNAs außerdem eher schlecht an Serumproteine, wodurch diese ONs nur eine geringe Verweildauer im Blut besitzen und schnell renal ausgeschieden werden.^[2] Da insbesondere ASOs entweder ein PS-Rückgrat besitzen oder auf PMOs basieren und ihre Anwendung auf die Leber oder eine lokale Applikation beschränkt ist, können diese ONs ohne weitere Hilfsmittel verabreicht werden. Außerdem erlaubt die erhöhte Nukleasestabilität dieser Verbindungen den Einsatz von

Konjugaten. Dabei werden abgesehen von CPPs insbesondere GalNAc-Konjugate eingesetzt.^[2] Bei diesen wird die Bindung von GalNAc an den Asialoglycoproteinrezeptor 1 (ASGPR) genutzt, welche zur Aufnahmen der ONs mittels Endozytose führt. Da ASGPR besonders stark in Leberzellen exprimiert wird, eignet sich GalNAc besonders für die Adressierung der Leber.^[1,2] Eine andere Methode zur Funktionalisierung von ONs, ist die Konjugation mit Polyethylenglycol (PEG). Dies sorgt durch Vergrößerung des Molekulargewichts zu einer erhöhten Verweildauer im Blut in Folge einer verminderten renalen Ausscheidung.^[1,9] Allerdings können PEGylierte ONs allergische Reaktionen auslösen, was ihren Einsatz limitiert.

Die zuvor genannten Methoden eignen sich nur für stark modifizierte ONs, die eine hohe Nukleasestabilität aufweisen. Schwach modifizierte ONs müssen hingegen vor Nukleasen geschützt werden, um intakt in die Zelle zu gelangen. Eine Möglichkeit hierzu bieten virale Vektoren wie Lentiviren, Adenoviren, and Adeno-assoziierte Viren.^[204] Bei der Verwendung viraler Vektoren besteht jedoch immer das Risiko, dass sie eine Immunantwort hervorrufen und somit Nebeneffekte auslösen. Zudem ist die Herstellung viraler Vektoren in großen Maßstäben deutlich komplizierter als die nicht viraler Systeme.^[9,180,204] Ein Beispiel für nicht virale Vektoren sind LNPs. Diese bestehen aus kationischen oder ionisierbaren Lipiden, welche die Aufnahme der Partikel erleichtern, sowie aus Cholesterol und PEGylierten Lipiden.^[2,204] Diese Vektoren werden beispielsweise bei Patisiran erfolgreich angewendet.^[1,2,197] Die Verwendung dieser Vektoren hat jedoch den Nachteil, dass sie bevorzugt von der Leber aufgenommen werden und für die Aufnahme in andere Zelltypen funktionalisiert werden müssen.^[2] Durch eine stärkere Funktionalisierung erhöht sich jedoch die Gefahr toxischer Nebeneffekte, was ihren Einsatz limitiert.^[2,204]

Bei der Entwicklung ON-basierter Wirkstoffe konnten in den vergangenen Jahren deutliche Fortschritte erzielt werden, was die steigende Zahl zugelassener Produkte zeigt. Dennoch stellt die Bioverfügbarkeit der ONs eine große Hürde für den Einsatz dar. Insbesondere für einen systemischen Einsatz der ONs fehlen geeignete Methoden. Dennoch stellt die lokale Applikation eine Alternative dar, die zudem toxische Nebenwirkungen verhindern kann.

7 Adaptoren zur Umleitung von Sp1 auf nicht natürliche Bindestellen

Transkriptionsfaktoren (TFs) sind entscheidende Regulatoren der Genexpression. Sie bilden über ihre Aktivierungsdomäne (AD) Komplexe mit weiteren Proteinen und können so die RNA-Polymerase II rekrutieren. Dabei kommt es mehr auf die Nähe als auf die exakte räumliche Anordnung an. Im Hefe-zwei-Hybrid-System zum Beispiel werden die DNA-bindende-Domäne (DBD) und die AD eines TFs komplett voneinander getrennt und mit anderen Proteinen fusioniert.^[4,5] Erst ein Ligand, der gleichzeitig beide dieser an fusionierten Proteine bindet, stellt die räumliche Nähe von DBD und AD wieder her. Obwohl sich dieses nichtkovalente Proteinensemble massiv vom ursprünglichen TF unterscheidet, führt es doch zur effizienten Aktivierung von Reportergenen. Darauf gründet sich unsere Erwartung, dass ein TF auch dann zur Aktivierung eines nachgeschalteten Gens führen sollte, wenn dieser nicht direkt an den Promotor bindet, sondern nur indirekt, vermittelt durch ein Adaptormolekül (Abbildung 23). In der Vergangenheit wurden verschiedene Versuche unternommen, artifizielle TFs (ATFs) zu entwerfen.^[7,8,17,105,156,159] Da dies eine selektive Erkennung der DNA erfordert, wurden unter anderem Pyrrol-Imidazol-Polyamide (PIPs) als DNA-bindende Einheit verwendet.^[8,156,159] Nach Verknüpfung mit speziellen Peptiden als minimalistische AD konnten sie die Genexpression *in vitro*^[156,159] und in Zellkulturexperimenten^[8] erhöhen. Ein alternativer Ansatz stellt die Verwendung bifunktioneller ONs dar. Diese bestanden aus einem triplexbildenden ON (TFO) und einer *hairpin*-DNA, die eine Bindestelle für einen natürlichen TF enthielt.^[7,17,105] Auch mit diesen Adaptoren konnte die Genexpression *in vitro*^[105] und in Zellkulturexperimenten^[7] aktiviert werden.

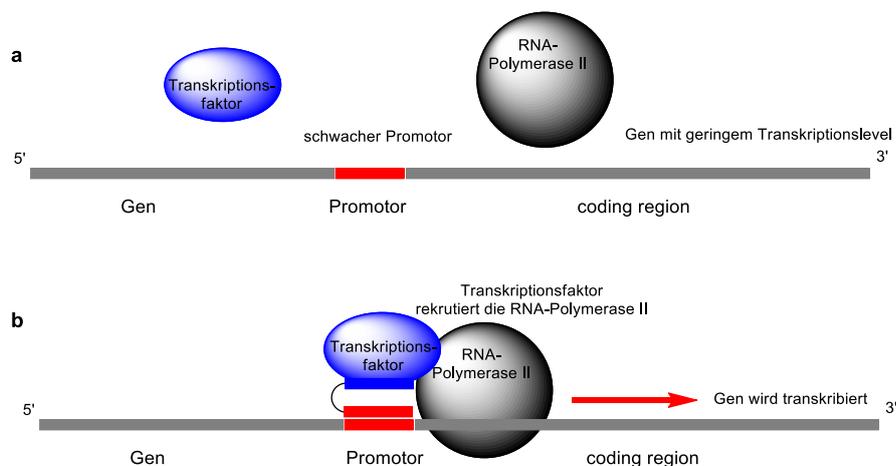


Abbildung 23: Allgemeines Konzept zur Umleitung von Transkriptionsfaktoren am Beispiel eines Gens mit geringer Transkriptionsrate, aufgrund eines schwachen Promotors (a). Durch die Zugabe eines Adaptors wird ein Transkriptionsfaktor indirekt an diesen Promotor gebunden, welcher die RNA-Polymerase II rekrutiert und die Transkriptionsrate erhöht (b).

Auf Basis dieser Arbeiten entstand in unserer Gruppe die Idee, diese Konzepte zu kombinieren und einen Adaptor aus einem PIP und einer *hairpin*-DNA aufzubauen, um TFs zu rekrutieren und auf nicht natürliche Bindestellen umzuleiten (Abbildung 23). Dabei besitzen diese Konstrukte ein geringeres Molekulargewicht als entsprechende *hairpin*-TFOs und sind potenziell weniger anfällig gegenüber Nukleasen. Darüber hinaus kann auf den Einsatz aktivierender Peptide verzichtet werden, von welchen bekannt ist, dass sie die den Einsatz der PIP-ATFs limitieren.^[159] Für den Aufbau der PIP-Adaptoren ist jedoch darauf zu achten, dass PIP und DNA orthogonal zueinander sind, um eine Inhibierung des Adaptors durch eine Bindung des PIPs an die eigene DNA zu verhindern. Aus diesem Grund wurden der TF Sp1 als Ziel gewählt, welcher eine GC-reiche Sequenz erkennt und das PIP so designt, dass es an AT-reiche Sequenzen bindet.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte in unserer Gruppe bereits ein entsprechendes Konjugat **K1** aus der gegen Sp1 gerichteten DNA **2** und dem PIP **PA1** synthetisiert werden (Abbildung 24).^[11,12] Zur Synthese wurde die DNA **2** auf fester Phase mit einem Diisocyanat umgesetzt und im Anschluss mit **PA1** gekuppelt (Informationen zur Nomenklatur der Verbindungen sind in Anhang 12.3 zu finden). Es zeigte sich jedoch, dass eine Reinigung des Konjugats mittels *rp*-HPLC nur bedingt möglich war und die unkonjugierte DNA nicht abgetrennt werden konnte. Allerdings war es mit dem verunreinigten Material bereits

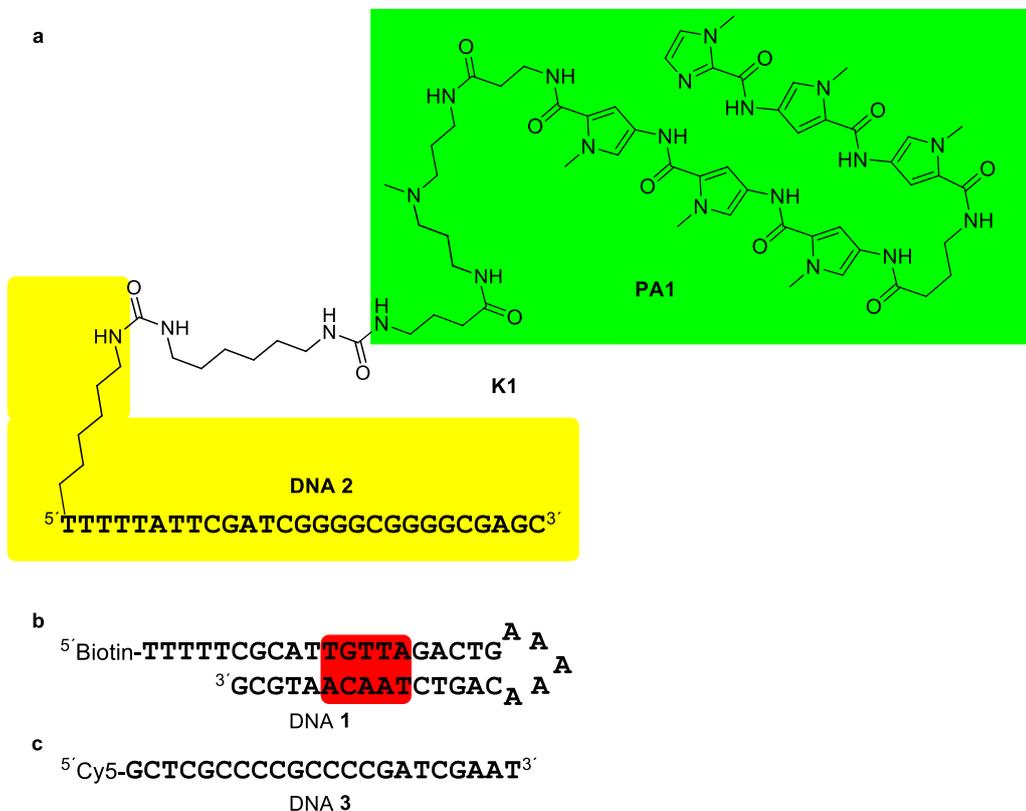


Abbildung 24: **a:** Struktur des Konjugats **K1** bestehend aus dem PIP **PA1** (grün) und der DNA **2** (gelb); **b:** Sequenz der Ziel-DNA **1**, die Bindestelle für **K1** ist rot markiert; **c:** DNA **3:** Gegenstrang zu DNA **2**.

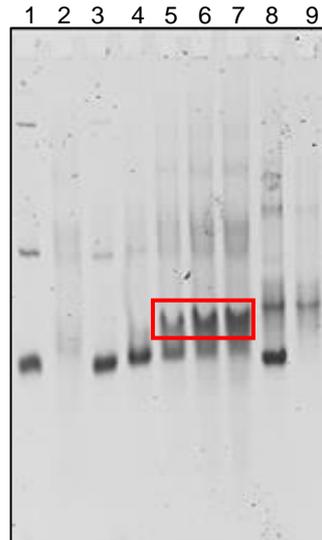


Abbildung 25: Band-Shift-Experimente mit dem Konjugat **K1**, entnommen und adaptiert aus Bolz (2015).^[12] Dabei konnte eine Bindung von **K1** an die DNA **1** beobachtet werden (roter Kasten). Im Gegensatz dazu konnte **K1a** nicht an die DNA **1** binden und wies eine breite Bande auf (Lane 8 + 9). Lane 1: DNA **1** (1 μM); Lane 2: **K1** (4 μM); Lane 3: DNA **1** (1 μM) + **K1** (1 μM); Lane 4: DNA **1** (1 μM) + **K1** (2 μM); Lane 5: DNA **1** (1 μM) + **K1** (4 μM); Lane 6: DNA **1** (1 μM) + **K1** (6 μM); Lane 7: DNA **1** (1 μM) + **K1** (8 μM); Lane 8: DNA **1** (1 μM) + **K1a** (1 μM); Lane 9: **K1a** (1 μM). Die Proben wurden 1 h bei 4 °C in einem TEMg-Puffer inkubiert.

möglich, in Band-Shift-Experimenten eine Bindung von **K1** an die Zielsequenz auf DNA **1** nachzuweisen. Der PIP-Teil von **K1** (Abbildung 24, grün) sollte an die TGTTA-Sequenz der DNA **1** binden (Abbildung 24, rot). Dadurch sollte die Bande von DNA **1** im nativen Gel retardiert werden. Dieser Bandshift war bei großen Überschüssen von **K1** tatsächlich zu beobachten (Abbildung 25, rot markiert). Wurde jedoch der DNA-Teil von **K1** mit DNA **3** zum Doppelsträngigen Adaptor **K1a** hybridisiert, war keine Bindung an DNA **1** mehr zu beobachten. Lane 8 in Abbildung 25 zeigt lediglich ein Experiment mit geringen Konzentrationen von **K1a**, doch konnte in weiteren Versuchen auch bei hoher Konzentration dieses Adaptors kein Bandshift mehr beobachtet werden. Zusätzlich fiel die relativ bereite Bande des Adaptors auf (Abbildung 25, Lane 9). Eine mögliche Erklärung für die geringe Affinität des Konjugats **K1a** ist die intramolekulare Wechselwirkung des PIP-Teils von **K1a** mit dem eigenen DNA-Teil, sobald dieser als Duplex vorliegt. Diese Beobachtung ist sehr problematisch, da der GC-reiche Duplex zum Einfangen von Sp1 benötigt wird. Schließlich entsprach auch die Affinität von **K1** zur Ziel-DNA **1** nicht den Erwartungen, was später als Motivation zur Synthese von Achtmer-PIPs diente, die sich erfahrungsgemäß durch eine stark erhöhte Affinität auszeichnen.^[14]

Ausgehend von diesen Ergebnissen galt es im nächsten Schritt die Umleitung des TFs Sp1 mittels Adaptormolekülen nachzuweisen. Hierzu sollten Pulldown-Experimente durchgeführt werden, in denen Sp1 auf die DNA **1** umgeleitet und im Anschluss in Western-Blots detektiert wurde. Hierzu waren geeignete Konjugate notwendig, wozu die Synthese, Reinigung und Struktur der PIPs sowie der Konjugate optimiert werden musste.

Dabei war geplant, die Synthese der PIPs auf eine Festphasensynthese umzustellen und die Sequenz der PIPs auf insgesamt acht Py- und Im-Einheiten auszuweiten, um die Affinität der Konjugate zu erhöhen. Zur genaueren Untersuchung der Bindung der Adaptoren an die DNA 1 sollten dann Band-Shift- und Pulldown-Experimente mit anschließender Fluoreszenzdetektion durchgeführt und so geeignete Kandidaten für die Umleitung von Sp1 gewählt werden. Da bereits TFO-basierte Adaptoren beschrieben waren,^[7] mussten diese mit den PIP-Adaptoren verglichen werden, um das effektivere System zu bestimmen. Hierzu wurden an die Literatur angelehnte TFO-Adaptoren aufgebaut und in Band-Shift-Experimenten auf ihre Affinität zu spezifischen Ziel-DNAs untersucht. Im Anschluss war geplant sie mit den PIP-Adaptoren zu vergleichen, wozu die PIP-Adaptoren an die gleichen Ziel-DNAs binden mussten. Um eine möglichst breite Basis an DNA-bindenden Molekülen zu testen, wurde als dritte Variante der Einsatz pseudokomplementärer PNAs in Betracht gezogen.^[75,205] Hierzu sollte eine Methode etabliert werden, die den Aufbau eines Thiouracil-Monomers erlaubte.

7.1 Synthese der Polyamide

Ausgehend von der Struktur des Polyamids **PA1**, welches aus meiner Masterarbeit vorhanden war,^[12] wurden die im Folgenden vorgestellten PIPs synthetisiert (Abbildung 26). Da das aus **PA1** resultierende Konjugat nur eine geringe Affinität zu seiner Ziel-DNA besaß, war es notwendig, die Länge der PIPs auf acht Py und Im-Einheiten zu erhöhen (**PA3 – PA5**), um die Affinität zu steigern.^[14] Darüber hinaus sollte das Bindungsverhalten der PIPs genauer untersucht werden. Hierzu wurden einerseits die Linker der Polyamide verkürzt (**PA2** und **PA6**), um den Einfluss weniger flexibler Komplexe auf die Umleitung zu untersuchen. Mit **PA6** sollte zusätzlich geprüft werden, welchen Effekt eine Eliminierung der β -Gruppe hatte. Da diese analog zu Py eine Bindung an A oder T bevorzugt, kann sich dies in manchen Fällen negativ auf die Bindung der PIPs auswirken.^[131] Des Weiteren wurde untersucht, ob die Orientierung der PIPs auf der Ziel-DNA **1** einen Einfluss auf die Affinität besaßen. Hierzu wurde die Polyamide **PA4** und **PA5** eingesetzt (Abbildung 27). **PA3** besaß auf der DNA **1** eine Mismatch-Bindestelle und diente als Negativkontrolle.

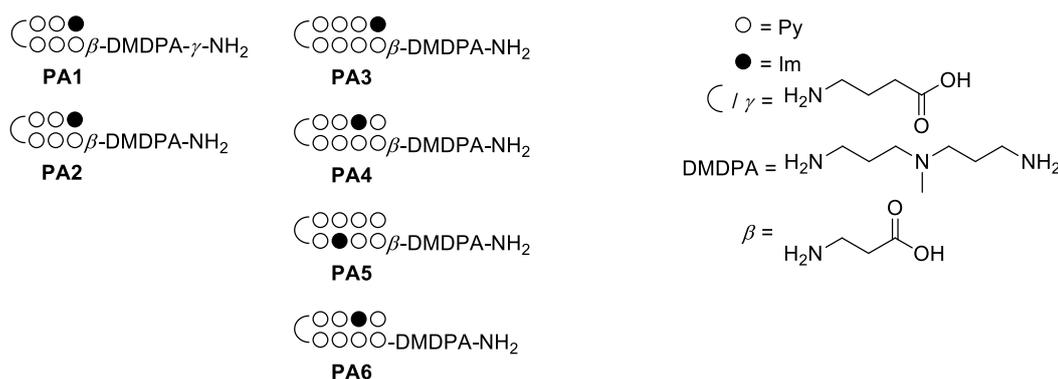


Abbildung 26: Sequenzen der in dieser Arbeit synthetisierten PIPs. Die vollständige Konstitution von **PA1** ist in Abbildung 24 gezeigt.

Ein weiterer Grund für das Entfernen der endständigen γ -Einheit des **PA1** in den PIPs **PA2 – PA6** war die zum Aufbau der PIPs gewählte Festphasensynthese. Diese ist literaturbekannt und bietet gegenüber einer Synthese in Lösung den Vorteil, dass PIPs unterschiedlicher Sequenz schneller herzustellen und leichter zu variieren sind.^[145–147,150,151] Für die PIPs **PA2 – PA6** war diese Methode geeignet, da die Abspaltung der PIPs vom Träger mit 3,3'-Diamino-*N*-methyl-diaminopropylamin (DMDPA) durchgeführt wurde und so

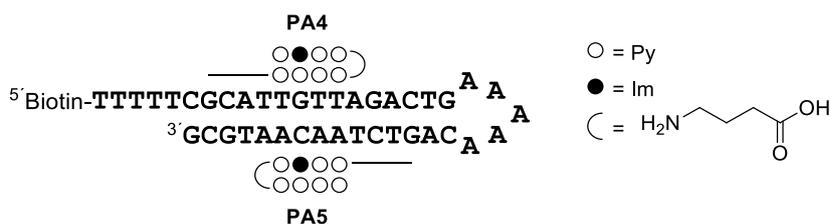
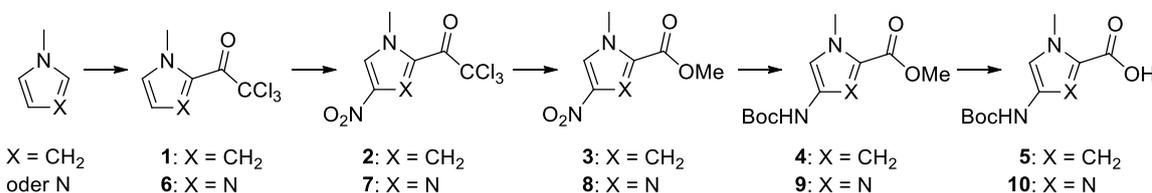


Abbildung 27: Bindung der PIPs **PA4** und **PA5** an die DNA **1**.

das vollständige PIP erhalten wird. Im Gegensatz dazu müsste eine Abspaltung mit einem Peptid aus DMDPA und Boc-GABA erfolgen, um den in **PA1** verwendeten Linker zu erhalten. Bei dieser Verbindung handelte es sich jedoch um eine hochviskose Flüssigkeit, die nicht zur Abspaltung geeignet ist. In diesem Fall müsste das PIP mit DMDPA abgespalten und die GABA-Einheit postsynthetisch eingefügt werden.

7.1.1 Festphasensynthese

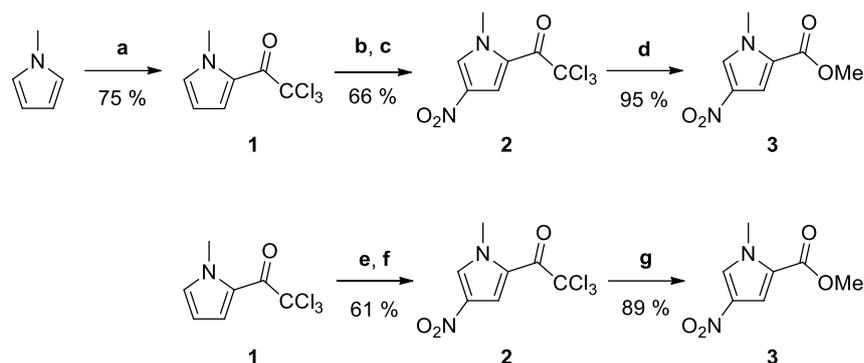
Für die Festphasensynthese der PIPs mussten zunächst geeignete Schutzgruppen (Boc oder Fmoc) sowie die Kupplungsmethode gewählt werden. Für die Standardaktivierung der Monomere mit Hydroxybenzotriazolen war bekannt, dass bei Kupplungen auf Im schlechte Ausbeuten erhalten wurden und im Allgemeinen lange Reaktionszeiten notwendig waren.^[145,147,150,206] Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit eine von Su *et al.* entwickelte Methode verwendet werden, mit welcher die Kupplung auf Im problemlos möglich sein sollte.^[147] Hierbei wurden die Monomere zunächst mittels Triphosgen (BTC) *in situ* in Säurechloride umgewandelt und zur Kupplung verwendet. Die in der beschriebenen Methode verwendete Boc-basierte Schutzgruppenstrategie wurde in dieser Arbeit übernommen. Dementsprechend wurden die Bausteine **5** und **10**, ausgehend von *N*-Methylpyrrol und *N*-Methylimidazol synthetisiert (Schema 1).



Schema 1: Synthesepfad für die Monomere **5** und **10** ausgehend von *N*-Methylpyrrol und *N*-Methylimidazol.

7.1.1.1 Synthese der Monomere **5** und **10**

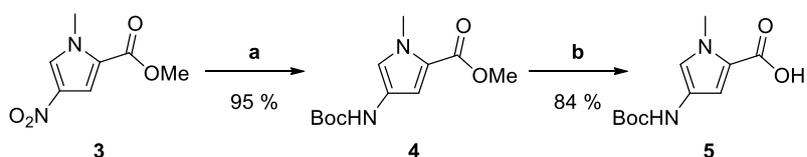
Die Synthese des Monomers **5** verlief in den ersten Teilen analog zu in vorherigen Arbeiten durchgeführten Synthesen.^[12,145,153,207] Dabei wurde von *N*-Methylpyrrol ausgegangen und dieses zunächst mit Trichloroacetylchlorid (TCACl) zu Verbindung **1** umgesetzt. Im Anschluss erfolgte eine Nitrierung mit 100%iger HNO_3 in Essigsäureanhydrid zu Verbindung **2**. Verbindung **3** wurde daraufhin durch den zweiten Schritt einer Haloform-Reaktion mit NaOMe erhalten. (Schema 2, oben). Zwar stellte diese Route eine effiziente Synthese der Verbindung **3** dar, jedoch waren sehr reaktive und aggressive Verbindungen notwendig. Aus diesem Grund sollte die Synthese unter mildereren Bedingungen durchgeführt werden (Schema 2, unten). Dies galt insbesondere für die Synthese der



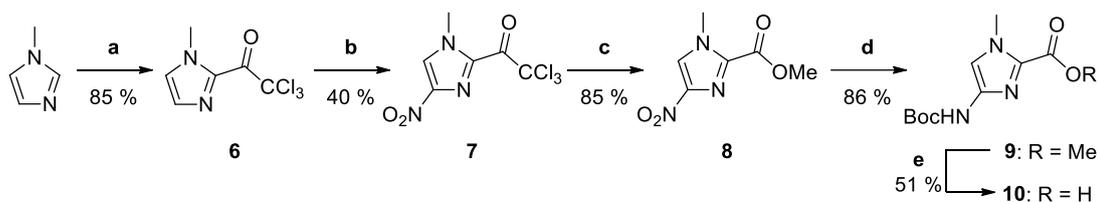
Schema 2: Synthese von Verbindung **3**. Im oberen Teil ist die ursprüngliche Syntheseroute zu sehen. Im unteren Teil befindet sich die modifizierte Variante. **a:** TCACl, DCM, RT; **b:** HNO₃ (100%ig), Ac₂O, -50 °C auf RT; **c:** Isopropanol, -50 °C; **d:** NaH, MeOH, RT; **e:** HNO₃ (65%ig), Ac₂O, -50 °C auf RT; **f:** H₂O, RT; **g:** DMAP, MeOH, RT.

Verbindung **2**. Dort wurde 100%ige HNO₃ verwendet, um *in situ* Acetylnitrat zu erzeugen. Nach der Reaktion war es notwendig, die Reaktionslösung einzuengen, damit die abschließende Fällung der Verbindung **2** mit Isopropanol effektiv verlief. Da Acetylnitrat nur in bestimmten Konzentrationsbereichen sicher zu handhaben ist, stellte dies ein Problem dar. Zudem musste die Fällung mit Isopropanol bei -40 °C durchgeführt werden und die entstandene Essigsäure konnte nicht vollständig entfernt werden. Allerdings zeigte sich, dass die Nitrierung auch mit 65%iger HNO₃ möglich war.^[208] Im Anschluss an die Reaktion erfolgte die Aufarbeitung durch das Überführen der Reaktionslösung auf Eis. Dabei entstand ein Präzipitat, welches im Anschluss säulenchromatographisch gereinigt wurde. Somit konnte, bei vergleichbaren Ausbeuten, ein Produkt erhalten werden, dass vollständig frei von Essigsäuren und regioisomeren Nitrierungsprodukten war.

Die ursprüngliche Synthese der Verbindung **3** verlief zwar in hohen Ausbeuten (Schema 2, oben), allerdings erforderte die Synthese den Einsatz von stöchiometrischen Mengen NaH und es sollte nach weniger reaktiven und atomökonomischeren Reagenzien gesucht werden. In diesem Fall zeigte sich, dass statt der Haloform-Reaktion mit NaOMe auch eine DMAP katalysierte Reaktion mit vergleichbaren Ausbeuten möglich war.^[209] Um die Verbindung **3** in das entsprechende Monomer **5** umzusetzen, musste im nächsten Schritt die Nitrogruppe reduziert und die Schutzgruppe eingeführt werden. Aufgrund der großen Instabilität des entstehenden Amins, erfolgte dies in einem Schritt.^[210] Dazu wurde die Reduktion in Anwesenheit von Boc₂O durchgeführt. Auf diese Weise konnte **4** in sehr guten Ausbeuten erhalten und im Anschluss zum Monomer **5** verseift werden (Schema 3).



Schema 3: Synthese von Verbindung **5**. **a:** H₂ (1 bar), Pd/C, Boc₂O, MeOH, RT; **b:** 2 M NaOH, MeOH, 60 °C.



Schema 4: Synthese des Monomers **10**. **a:** TCACl, DCM, RT; **b:** HNO₃ (100%ig), konz. H₂SO₄, Ac₂O, -50 °C auf RT; **c:** DMAP, MeOH, RT; **d:** H₂ (1 bar), Pd/C, Boc₂O, MeOH; **e:** KOH_{aq}, THF.

Das Monomer **10** wurde auf ähnliche Weise synthetisiert (Schema 4). Diese Syntheseroute konnte in einer parallelen Arbeit etabliert werden^[211] und zeigte sich effektiver als die in der Literatur beschriebenen Varianten.^[145,210] Zunächst wurde *N*-Methylimidazol mit TCACl zu Verbindung **6** umgesetzt. Im Anschluss erfolgte die Nitrierung zu **7**. Im Vergleich zur entsprechenden Verbindung **2** verlief diese Reaktion jedoch deutlich schlechter. Ein Grund hierfür ist die geringere Reaktivität des Imidazols, weswegen der Reaktion zusätzlich katalytische Mengen H₂SO₄ zugesetzt werden musste. Durch den zusätzlichen Stickstoff konnte bei der Aufarbeitung ein signifikanter Einfluss des pH-Werts beobachtet werden. Lag dieser zu sehr im Sauren war die Verbindung in Wasser partiell löslich, bei zu basischen Bedingungen bestand die Gefahr der Hydroxylierung. Der Umsatz zu Verbindung **8** erfolgte analog zu Verbindung **3** mittels DMAP und Methanol. In Analogie zu Verbindung **4** konnte Verbindung **9** ebenfalls durch eine Reduktion in Gegenwart von Boc₂O durchgeführt werden. Die anschließende Verseifung zu Verbindung **10** gelang hingegen nur in mäßigen Ausbeuten. Dabei bereitete die Instabilität der Verbindung Probleme, da sie, im Gegensatz zu Verbindung **5**, verstärkt zur Decarboxylierung neigte.

7.1.1.2 Synthese der Polyamide

Nach der Synthese der Monomere, sollte die Kupplung der PIPs über *in situ* generierte Carbonsäurechloride erfolgen. Dazu inkubierte man die Monomere mit BTC und 2,4,6-Collidin in THF, bevor sie mit DIPEA versetzt und zur Kupplung verwendet wurden. Als Träger verwendete man ein β -Ala-Pam-Harz. Zunächst sollte diese Methode in der Synthese des PIPs **PA2** erprobt werden. Dazu benötigte man neben dem Monomer **5** noch die Bausteine **6** und **11** (Abbildung 28). Nach Abschluss der Synthese sollte das Polyamid gemäß der Literatur mit DMDPA **12** abgespalten werden, woraufhin das vollständige Polyamid erhalten wurde.^[147,212] Im Verlauf der Festphasensynthese stellte jedoch die Überprüfung der Kupplungseffizienz ein Problem dar. Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass Standardmethoden wie der Kaiser-Test nicht anwendbar waren.^[206] Aus diesem Grund musste die Effizienz der Kupplungsschritte mittels *rp*-HPLC erfolgen. Allerdings ist diese Art der Überprüfung sehr zeitaufwändig und hierbei war die hohe Oxidationsempfindlichkeit der freien 4-Aminopyrrole problematisch. Nach Abschluss der

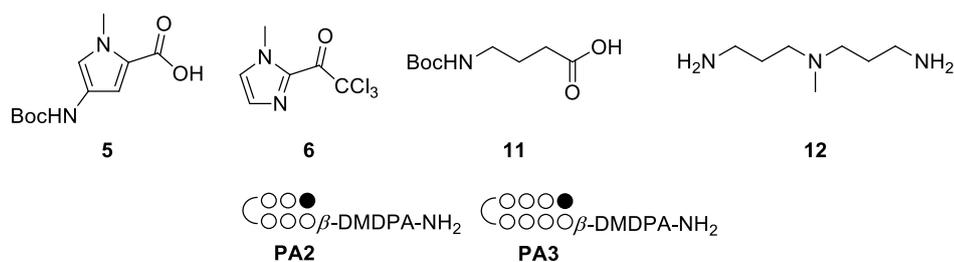


Abbildung 28: Bausteine für die Synthese der PIPs **PA2** und **PA3** (oben) und deren Sequenz (unten).

Synthese zeigte sich die Reinigung des Polyamids als kritisch, da das im Überschuss eingesetzte Amin **12** vor der Reinigung mittels *rp*-HPLC entfernt werden sollte, um pH-Effekte zu vermeiden. Da dies aufgrund des hohen Siedepunktes desamins nicht im Vakuum möglich war, wurde **PA2** zunächst durch Zugabe von Et₂O gefällt.^[212] Jedoch konnte auch auf diese Weise nicht der gesamte Überschuss desamins entfernt werden und so wurde das Rohprodukt vor der Reinigung mit TFA angesäuert. Trotz dieser Probleme konnte **PA2** erhalten werden, auch wenn die Ausbeuten mit ca. 9 % eher gering waren. Zudem konnten deutliche Abbrüche nach den ersten drei Pyrrolen beobachtet werden.

Nachdem die Synthese eines Sechsmers-Polyamids möglich war, sollte als nächstes **PA3** synthetisiert werden. Auch in diesem Fall waren keine Kupplungen auf Im-Gruppen notwendig, wodurch die Synthese potenziell vereinfacht wurde. Zwar konnte **PA3** erhalten werden, allerdings war die Ausbeute deutlich geringer als bei **PA2** und lag nur bei ca. 3 %. Wie schon in der Synthese von **PA2** konnten auch in diesem Fall neben dem vollständigen Polyamid deutliche Abbrüche nach der Hälfte der Einbauten beobachtet werden. Diese Beobachtungen waren konsistent mit Arbeiten von Fallows *et al.*, in denen ebenfalls eine geringe Kupplungseffizienz nach Einbau der GABA-Gruppe beschrieben wurde.^[213] Als eine mögliche Ursache wurden in dieser Arbeit erhöhte π - π -Wechselwirkungen innerhalb eines Polyamids oder zwischen mehreren Polyamiden genannt, welche die Kupplung weiterer Monomere erschwerten.

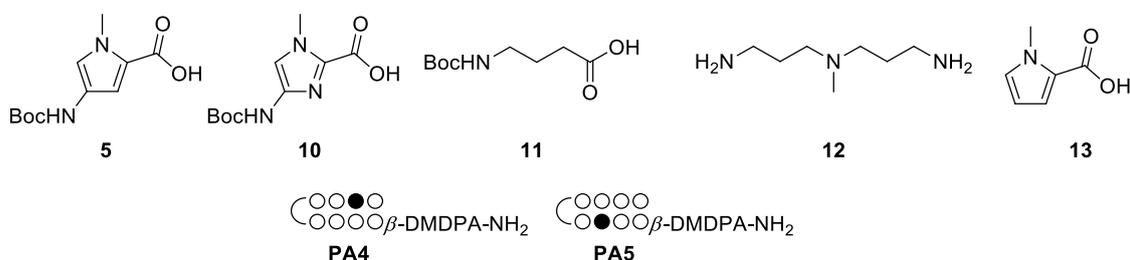
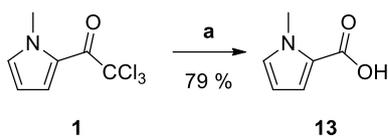


Abbildung 29: Bausteine für die Synthese der PIPs **PA4** und **PA5** (oben) und deren Sequenz (unten).

Im Anschluss wurde versucht, die Polyamide **PA4** und **PA5** unter Verwendung der Monomere **5** und **10** sowie der Verbindungen **11** – **13** zu synthetisieren (Abbildung 29). Verbindung **13** konnte dabei durch die Verseifung von Verbindung **1** erhalten werden



Schema 5: Synthese von Verbindung **13**. a: NaOH_{aq}, MeOH.

(Schema 5).^[208] Jedoch wurde wie bei **PA3** ein frühzeitiger Abbruch der Synthesen beobachtet und die volllängen PIPs konnten nicht erhalten werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, die Festphasensynthese mit Dimeren durchzuführen, welche bereits von der Dervan-Gruppe genutzt wurden, um die Kupplung auf Im-Bausteine zu umgehen.^[145] Dadurch sollte die Zahl der Kupplungsschritte von neun auf vier bis fünf verringert und zudem die Kupplung auf Im-Bausteine, sowie die Verwendung der Verbindung **11** verhindert werden. Aufgrund dieser Überlegungen wurden die Monomere **14 – 18** synthetisiert (Abbildung 30).

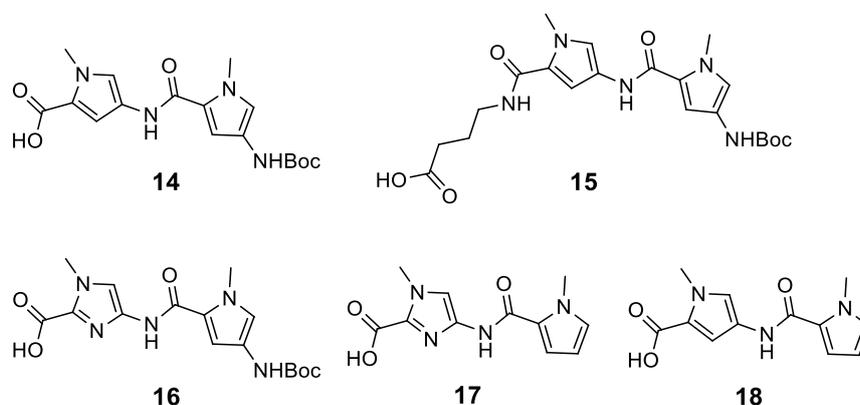
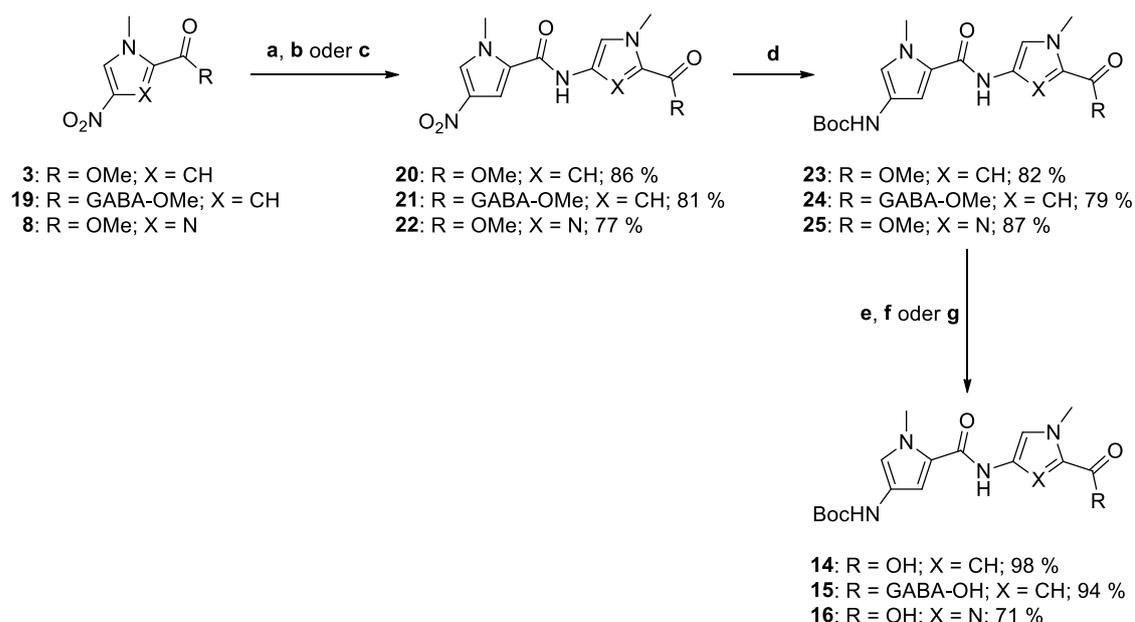


Abbildung 30: Dimere für die Festphasensynthese der Polyamide **PA4** und **PA5**.

7.1.1.4 Synthese der Dimere

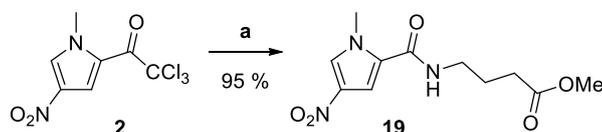
Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Verbindungen **14 – 16**, wurden die Synthesen nach einem vergleichbaren Schema durchgeführt (Schema 6). Dazu wurde zunächst ein entsprechendes Dimer mittels einer Haloform-artigen-Reaktion aufgebaut, im Anschluss die Schutzgruppe eingeführt und daraufhin verseift.

Als erstes Dimer wurde Verbindung **14** aufgebaut. Die Synthese verlief dabei im ersten Schritt nach einer bekannten Vorschrift.^[12,153,207] Dabei wurde **3** zunächst reduziert und im Anschluss mit **2** zu **20** umgesetzt. Analog zu der Synthese der Monomere, sollte die Einführung der Boc-Gruppe während der Reduktion erfolgen. Da die dimeren Nitroverbindungen jedoch schlecht löslich waren, musste die Reduktion mit erhöhtem Druck und Temperatur durchgeführt werden. Die so erhaltene Verbindung **23** wurde im Anschluss in sehr guten Ausbeuten (98 %) zu Verbindung **13** verseift.



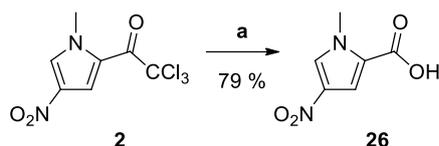
Schema 6: Synthese der Verbindungen **14**, **15** und **16**. **a:** H₂ (1 bar), Pd/C, EE; **b:** **2**, DIPEA, DCM, RT; **c:** **26**, HOBt, DIC, DIPEA, DMF, 60 °C; **d:** H₂ (40 bar), Pd/C, Boc₂O, MeOH, 50 °C; **e:** NaOH, MeOH/H₂O (1:3.3), RT; **f:** LiOH·H₂O, MeOH/H₂O (3:1), RT; **g:** KOH, THF/H₂O (1:2), RT.

Für die Synthese von Verbindung **15** musste zunächst der Startbaustein **19** synthetisiert werden (Schema 7). Dieser konnte durch eine Haloform-Reaktion von **2** mit γ -Aminobuttersäuremethylester-Hydrochlorid erhalten werden. Im Anschluss sollte die Synthese analog zu Verbindung **14** erfolgen (Schema 6). Dabei stellte sich zunächst die Frage, ob die Synthese der Verbindung **21** analog zu der der Verbindung **20** möglich war. In der Vergangenheit war es in unserer Gruppe nicht möglich, die Haloform-Reaktion in konstant guten Ausbeuten durchzuführen, wenn kein NaH eingesetzt wurde.^[153,207] Diese Beobachtungen konnten jedoch nicht bestätigt werden und nach der Reduktion von Verbindung **19** bei RT und Normaldruck in EE verlief die anschließende Reaktion mit **2** auch ohne die Zugabe von NaH in konstant guten Ausbeuten (81 %).



Schema 7: Synthese von Verbindung **19**. **a:** γ -Aminobuttersäuremethylester Hydrochlorid, DIPEA, DCM.

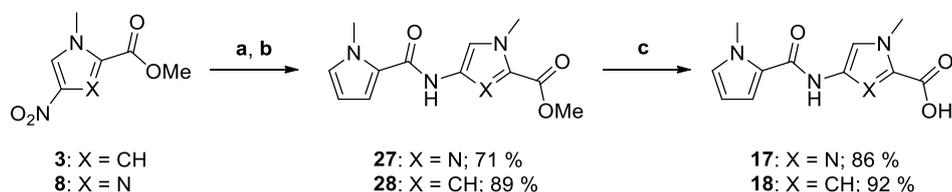
Für die Synthese der Verbindung **16** musste das Konzept leicht verändert werden. Hier war eine Haloform-Reaktion mit **2** nicht möglich, da die Aminogruppe an Position 4 des Imidazols nicht nukleophil genug war. Aus diesem Grund erfolgte der Aufbau des Dimers über eine Peptidkupplung. Dazu musste Verbindung **2** zunächst in die entsprechende Carbonsäure **26** umgewandelt werden, was in guten Ausbeuten (79 %) gelang (Schema 8).^[208] Auch die anschließende Kupplung zu Verbindung **22** konnte in guten Ausbeuten (77 %) durchgeführt werden. Nach der Einführung der Boc-Gruppe erfolgte die



Schema 8: Synthese von Verbindung **26**. a: NaOH, H₂O.

Verseifung zu Verbindung **25**. Analog zu Verbindung **10** bestand auch hier die Möglichkeit einer Decarboxylierung, diese war jedoch nicht zu beobachten und **16** konnte in guten Ausbeuten erhalten werden (71 %).

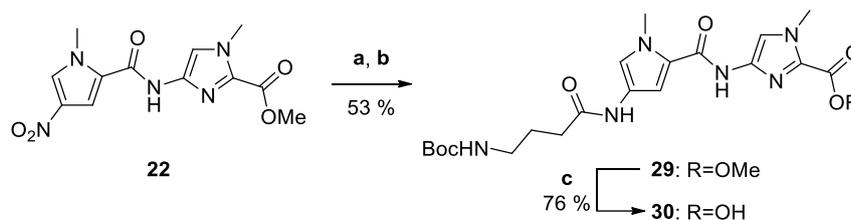
Auch die Synthese der endständigen Dimere **17** und **18** sollte nach der zuvor angewendeten Syntheseroute ablaufen (Schema 9), wobei die Einführung der Boc-Gruppe nicht notwendig war. Wie bereits in der Synthese von Verbindung **22** war eine Haloform-Reaktion zum Aufbau der Verbindung **27** nicht möglich, da Verbindung **1** deutlich weniger elektrophil als **2** war. Auch der Aufbau der Verbindung **28** sollte über eine Peptidkupplung verlaufen. Aus diesem Grund wurde die Carbonsäure **13** verwendet. Im Anschluss erfolgte die Synthese der Dimere **27** und **28** in guten Ausbeuten, welche im Fall der Verbindung **28** höher waren. Dies war jedoch aufgrund der höheren Reaktivität des Amins zu erwarten. Abschließend konnten die Bausteine **17** und **18** durch Verseifung erhalten werden. Diese konnten in beiden Fällen mit sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden. Bei Verbindung **17** stellte auch die Decarboxylierung kein Problem dar.



Schema 9: Synthese von Verbindung **17** und **18**. a: H₂ (1 bar), Pd/C, EE; b: **13**, HOBt, DIC, DIPEA, 60 °C; c: NaOH_{aq}, MeOH.

Im Anschluss wurden diese Bausteine in der Festphasensynthese der Polyamide **PA4** und **PA5** eingesetzt. Dabei war es leider erneut nicht möglich, die Polyamide effizient aufzubauen und es entstanden allenfalls analytische Mengen des Volllängenprodukts. In diesen Fällen war die Kupplung der GABA-Dimere nicht effizient genug und führte zum Abbruch der Synthese.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Synthese von **PA5** ein neues Dimer eingesetzt (**30**). Dieses enthielt die GABA-Gruppe am N-Terminus, wodurch die Kupplungseffizienz gesteigert werden sollte. Hierzu wurde zunächst Verbindung **22** reduziert und im Anschluss mit **11** in moderaten Ausbeuten (53 %) zu Verbindung **29** gekuppelt (Schema 10). Diese konnte danach zu Verbindung **30** verseift werden. Baustein **30** wurde daraufhin mit den Verbindungen **14** und **18** zur Synthese von **PA5** eingesetzt. Dabei trat bei der Aktivierung von **30** mit BTC eine Gelbildung auf, welche den Einsatz der Verbindung erschwerte.



Schema 10: Synthese des Bausteins **30**. **a:** H₂ (40 bar), Pd/C, EE, 40 °C; **b:** **11**, HOBT, DIC, DIPEA, DMF, RT; **c:** KOH_{aq}, MeOH, RT.

Dennoch konnte die Synthese durchgeführt werden und das erhaltene Rohprodukt mittels HPLC analysiert werden. Dabei zeigte sich ein Hauptpeak (Abbildung 31), welcher im Anschluss isoliert und massenspektrometrisch als **PA5** identifiziert wurde. Allerdings wurde **PA5** ebenfalls nur in einer Ausbeute von ca. 10 % erhalten.

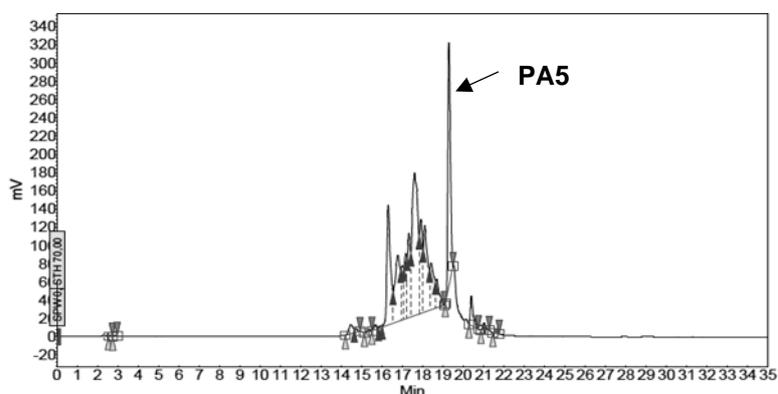


Abbildung 31: Rohprodukt der Festphasensynthese von **PA5**. Dabei ist ein deutlicher Produktpeak bei 19 min zu sehen. Laufbedingungen: Linearer Gradient von 10 % B zu 70 % B in 30 min. A: 0.1 % TFA in H₂O; B: ACN.

Nachdem mittels Festphasensynthese nur die Polyamide **PA2** und **PA5** in ausreichenden Mengen erhalten wurden und die Synthese auch mit den Dimeren nicht effektiv durchzuführen war, mussten alternative Synthesewege für die Polyamide **PA3**, **PA4** und **PA6** in Betracht gezogen werden. Dazu kam der Aufbau der PIPs in Lösung in Frage, welche bereits in der Vergangenheit erfolgreich für den Aufbau von PIPs mit sechs Py- oder Im-Einheiten angewendet wurde und mit der größere Mengen der PIPs zugänglich waren.^[12,153,207] Einen zusätzlichen Vorteil für diese Methode stellten die bereits synthetisierten Dimere dar, welche auch in der Synthese in Lösung verwendet werden konnten.

7.1.2 Synthese in Lösung

Die Synthese der Polyamide in Lösung erforderte eine Änderung der Strategie, da ein linearer Aufbau nicht praktikabel war. Wegen der Ähnlichkeit der Sequenzen der PIPs **PA3**, **PA4** und **PA6** wurden sie in drei Fragmente unterteilt (Abbildung 32). Fragment **A** (rot) stellte dabei die Linkereinheit dar, welcher für **PA3** und **PA4** identisch war. Fragment **B** (gelb) bildete die erste Einheit aus vier Pyrrolen und war für alle PIPs identisch. Das abschließende Fragment **C** (grün) bestand aus den verbleibenden drei Py- und Im- sowie der GABA-Einheit. Eine vergleichbare Strategie konnte in vorangegangenen Arbeiten für die Synthese von **PA1** erfolgreich umgesetzt werden.^[12,153,207] Hierzu wurden die einzelnen Fragmente mittels Haloform-Reaktionen aufgebaut und im Anschluss zunächst die Fragmente **A** und **B** verknüpft. Das so erhaltene Fragment wurde daraufhin mit **C** verknüpft und somit das vollständige PIP erhalten. Dieses allgemeine Vorgehen sollte auch für die Synthese der Achtmer-PIPs **PA3**, **PA4** und **PA6** angewendet werden.

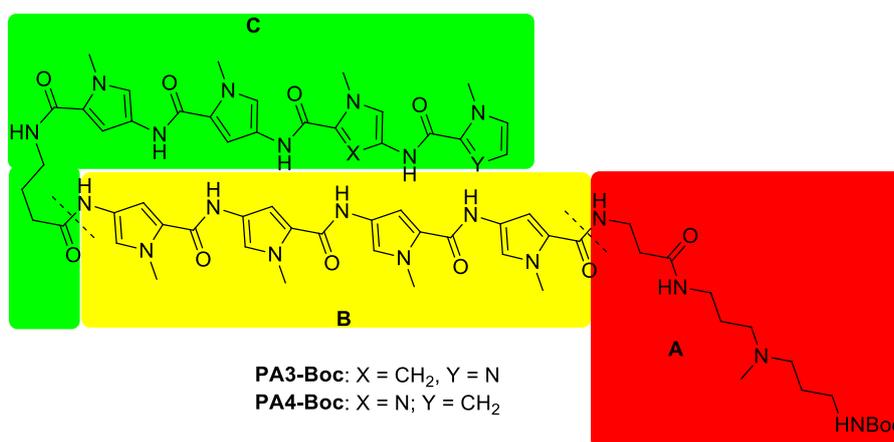
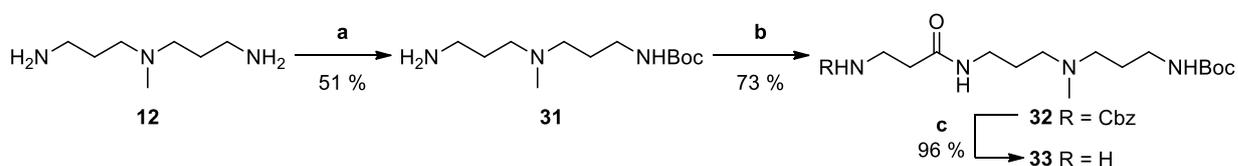


Abbildung 32: Aufteilung der Polyamide **PA3-Boc** und **PA4-Boc** in drei Fragmente. Diese Unterteilen sich in den Linker **A** (rot), ein mittleres Fragment **B** (gelb) und das Endfragment **C** (grün).

7.1.2.1 Synthese von Fragment A

Das Fragment **A** (**33**) war für die PIPs **PA3** und **PA4** identisch, während das für **PA6** benötigte Fragment eine Zwischenstufe (**31**) der Synthese von **33** darstellte. Die Synthese verlief nach bekannten Vorschriften (Schema 11).^[12,153] Dabei wurde zunächst eine Aminogruppe des DMDPAs mit Boc₂O geschützt und Verbindung **31** in moderaten

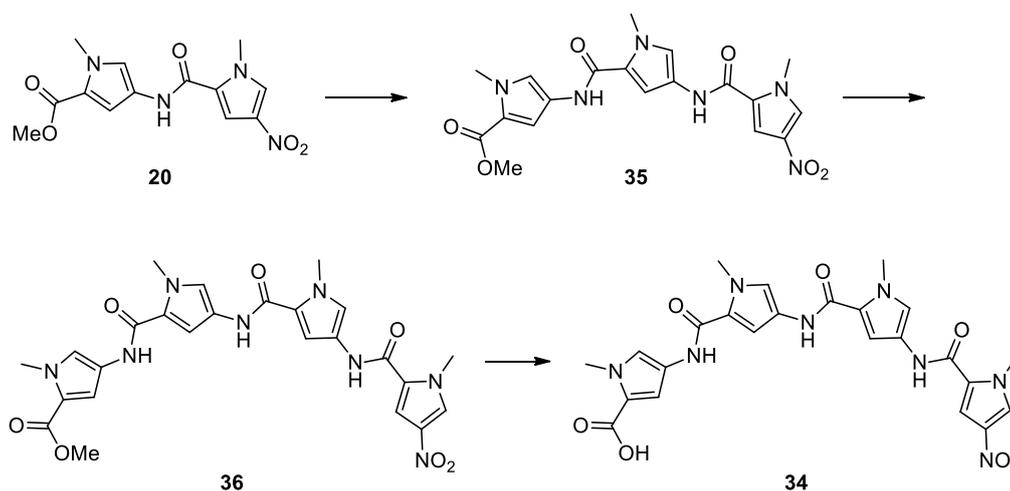


Schema 11: Synthese von Verbindung **33**. **a:** Boc₂O, Dioxan, RT; **b:** Cbz-β-Ala-OH, HOBT, DIC, DIPEA, DMF, 60 °C; **c:** H₂ (1 bar), Pd/C, MeOH, RT.

Ausbeuten erhalten. Im Anschluss wurde **31** mit einem *Cbz*-geschützten β -Alanin gekuppelt und die Schutzgruppe konnte im Anschluss unter Erhaltung der Boc-Gruppe reaktiv entfernt werden. Die resultierende Verbindung **33** stellte das vollständige Fragment **A** dar.

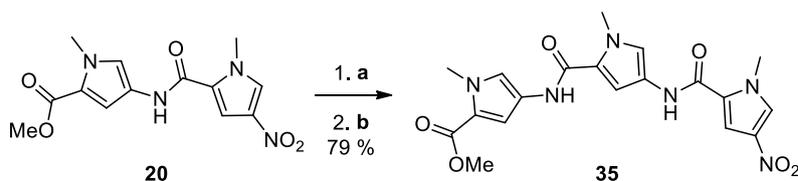
7.1.2.2 Synthese des Fragments **B**

Für das Fragment **B** (**34**) standen, ausgehend von Verbindung **20**, zwei Synthesewege zur Auswahl. Dabei war die Überlegung, ob das Fragment linear, über Haloform-Reaktionen, oder über die Verknüpfung zweier Dimere, mittels Peptidkupplung, aufgebaut werden sollte. Aus vorausgegangenen Arbeiten unserer Gruppe war bekannt, dass die Haloform-Reaktion mit guten Ausbeuten verlief und zu Produkten von großer Reinheit führte.^[12,207] Gleichzeitig wiesen die Verbindungen **20** und **35** in den meisten Lösemitteln nur eine geringe Löslichkeit auf, was die Vermutung nahelegte, dass dies auch für Verbindung **36** gelten sollte. Dies wäre bei der Haloform-Reaktion von Vorteil, da sie in DCM durchgeführt wird und das Produkt durch Präzipitation isoliert und gereinigt werden kann. Bei einer Peptidkupplung bestünde dagegen der Nachteil, dass diese in DMF durchgeführt werden müsste, worin die Peptide löslich sind. Da bei einer Peptidkupplung zudem schwerlösliche Nebenprodukte, wie Alkylharnstoffe entstehen können, wären weitere Reinigungen erschwert und dieser Weg nur bedingt praktikabel. Aus diesem Grund wurde der lineare Aufbau bevorzugt (Schema 12).



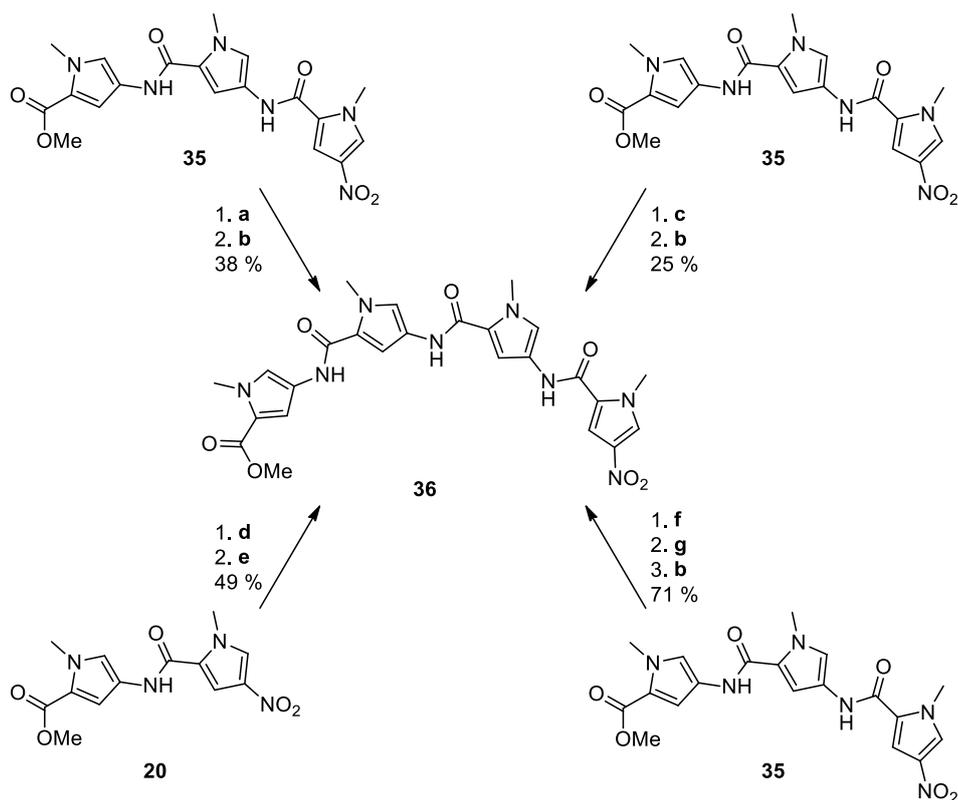
Schema 12: Syntheseroute zur Synthese des Fragments **B** für das Polyamid **PA4**.

Hierzu wurde zunächst die Verbindung **35** aufgebaut. Dazu wurde die Nitrogruppe von **20** unter erhöhtem H_2 -Druck und erhöhter Temperatur in EE reduziert und im Anschluss in einer Haloform-Reaktion mit **2** zu Verbindung **35** umgesetzt (Schema 13). Die Synthese der Verbindung **36** sollte analog erfolgen. Allerdings konnte die Verbindung **35** nicht vollständig reduziert werden und auch das Erhöhen der Temperatur sowie die Verlängerung der



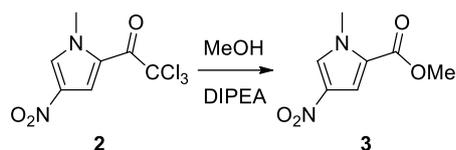
Schema 13: Synthese von Verbindung **35**. **a:** H₂ (40 bar), Pd/C, EE, 45 °C; **b:** **2**, DIPEA, DCM, RT.

Reaktionszeit brachten in diesem Fall keinen Erfolg. Erst nach der Zugabe von MeOH, konnte eine erfolgreiche Reduktion beobachtet werden, allerdings verlief die anschließende Haloform-Reaktion zu Verbindung **36** nur in schlechten Ausbeuten (37 %). Aufgrund der langen Reaktionszeit konnte die Oxydation des endständigen Amins nicht ausgeschlossen werden und die Reduktion wurde in Methanol wiederholt. Zwar gelang diese vollständig, allerdings zersetzte sich das Amin während der Aufarbeitung, was durch eine Braunfärbung der Lösung sichtbar wurde. Dadurch konnten in der nachfolgenden Haloform-Reaktion nur schlechte Ausbeuten (38 %) erhalten werden (Schema 14, links oben) und es zeigte sich, dass überschüssiges Methanol die Reaktion störte, da es mit Verbindung **2** zu dem Methoxyester **3** reagierte (Schema 15).



Schema 14: Verschiedene Synthesewege zur Verbindung **36**. **a:** H₂ (40 bar), Pd/C, MeOH, 45 °C; **b:** **2**, DIPEA, DCM, RT; **c:** NaBH₄, Pd/C, MeOH, RT; **d:** H₂ (40 bar), Pd/C, EE, 40 °C; **e:** **37**, HOBt, DIC, DIPEA, DMF, 60 °C; **f:** H₂ (40 bar), Pd/C, Boc₂O, MeOH, 45 °C; **g:** TFA/DCM.

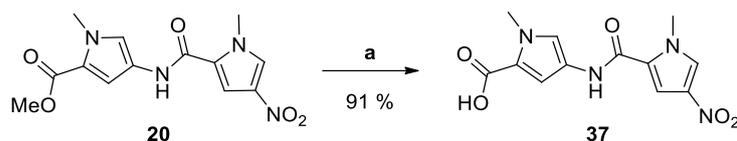
Um die Probleme während der Reduktion zu umgehen, wurde nach alternativen Wasserstoff-Donoren gesucht, welche eine Reaktion bei Raumtemperatur und Normaldruck ermöglichten. Als erste Alternative wurde eine Transfer-Hydrierung in



Schema 15: Nebenreaktion von Verbindung **2** mit MeOH.

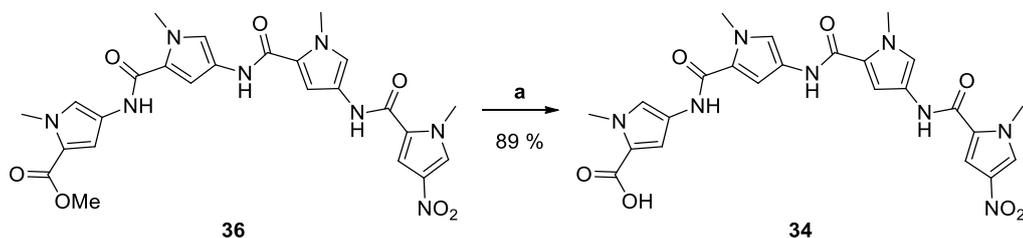
Erwägung gezogen, bei der Triethylsilan (TES) als Wasserstoffquelle diente.^[214] Allerdings war auch in diesem Fall keine vollständige Reduktion der Verbindung **35** zu beobachten. Eine weitere Alternative stellte die Verwendung von NaBH₄ in Methanol dar.^[215,216] In diesem Fall konnte die Reduktion bei Normaldruck und RT in 1 h durchgeführt werden. Aufgrund der Instabilität der entstandenen Amine war eine Aufarbeitung der Reaktion jedoch nicht möglich und die Reaktionslösung wurde lediglich über Celite filtriert. Dies hatte zu Folge, dass neben dem Amin noch Borsalze vorhanden waren und beim Trocknen nicht das gesamte MeOH entfernt werden konnte. In der nachfolgenden Haloform-Reaktion mit **2** zeigte sich ebenfalls, dass Verbindung **3** als Nebenprodukt entstand. Da auch die Zersetzung des Amins ein zusätzliches Problem darstellte, konnte **36** nur in schlechten Ausbeuten (25 %) erhalten werden (Schema 14, rechts oben).

Ausgehend von diesen Ergebnissen blieben für die Synthese von **36** nur zwei Varianten. Entweder musste bei der Reduktion auf Methanol als Lösemittel verzichtet werden, oder das entstehende Amin musste *in situ* in ein stabiles Zwischenprodukt umgewandelt werden. Dadurch könnte das MeOH vor der Haloform-Reaktion entfernt werden, ohne dass die Gefahr einer Zersetzung bestünde. Der Verzicht auf Methanol als Lösemittel war für den linearen Ansatz nur bedingt möglich, da eine Hydrierung in EE nichtvollständig verlief und auf DMF ebenfalls verzichtet werden sollte, weil dieses die Aufarbeitung der Reaktion deutlich erschweren würde. Aus diesem Grund wurde geprüft, ob es möglich war, Verbindung **36** ausgehend von Verbindung **20** aus zwei Dimeren aufzubauen (Schema 14, links unten). Hierzu musste **20** zu Verbindung **37** verseift werden (Schema 16). Daraufhin wurde **20** reduziert und im Anschluss mittels einer Peptidkupplung mit der Carbonsäure **37** verknüpft. Verbindung **36** konnte auf diese Weise in mäßigen Ausbeuten (49 %) erhalten werden. Allerdings war eine Reinigung der Verbindung **36** durch Präzipitation in diesem Fall nicht möglich, da in der Peptidkupplung schwerlösliche Nebenprodukte wie Diisopropylharnstoff entstanden, welche nicht abgetrennt werden konnten. Somit musste Verbindung **36** säulenchromatographisch gereinigt werden, was jedoch aufgrund der geringen Löslichkeit der Verbindung keine geeignete Methode darstellte und diese Syntheseroute somit nur als Notlösung dienen konnte. Da keine der getesteten Syntheserouten zufriedenstellend verlief, wurde daraufhin versucht, das aus **35** entstehende Amin in eine stabilere Form zu überführen. Analog zu den zuvor synthetisierten Dimeren wurde entstandene das Amin *in situ* mit Boc₂O geschützt. Das



Schema 16: Synthese der Verbindung **37**. **a:** NaOH_{aq}, EtOH, 1 h, Reflux.

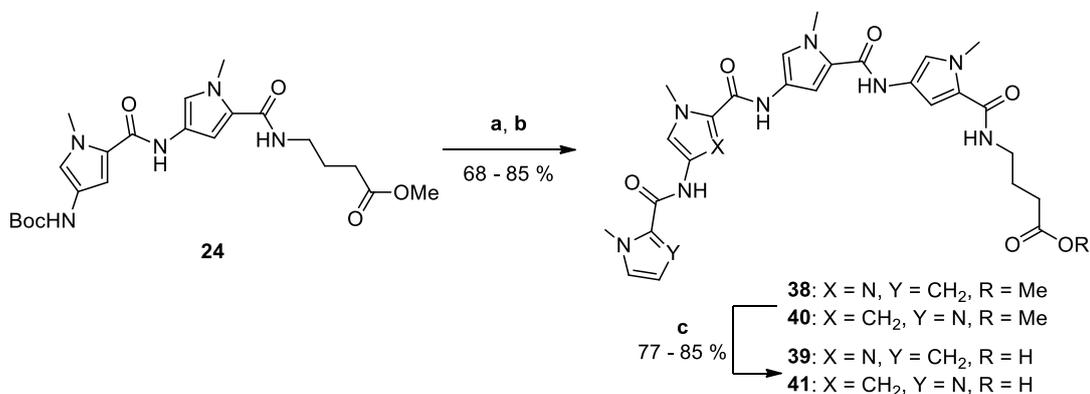
resultierende Zwischenprodukt war ausreichend stabil, wodurch das MeOH entfernt werden konnte. Zur weiteren Umsetzung entfernte man die Boc-Gruppe mit TFA in DCM und in einer nachfolgenden Haloform-Reaktion wurde **36** in guten Ausbeuten erhalten (71 %, Schema 14, rechts unten). Im Anschluss erfolgte die Verseifung zum Baustein **34** (Schema 17).



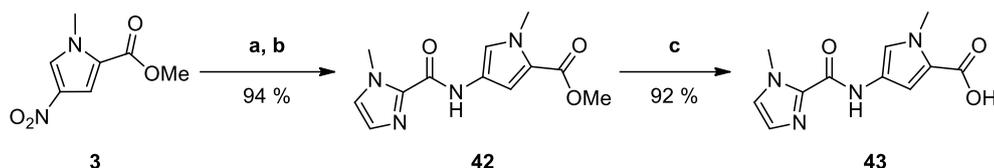
Schema 17: Synthese des Fragmentes **B**. **a:** NaOH_{aq}, EtOH, 1 h, Reflux.

7.1.2.3 Synthese der Fragmente **C**

Analog zur Synthese des Fragments **B** konnten auch die Fragmente **C** (**39** und **41**) linear oder aus zwei Blöcken aufgebaut werden. Da aus der Synthese des Polyamids **PA1** bekannt war, dass das Fragment **C** (Im-Py-Py- γ -OMe) besser löslich war als das Fragment **B**.^[12,153] Zusätzlich war davon auszugehen, dass die Kupplung auf Im-Bausteine nicht sehr effektiv verlief, sodass der lineare Ansatz verworfen wurde. Als Ausgangsmaterial diente in beiden Fällen Verbindung **24**, welche entschützt werden musste und dann mit den Verbindungen **17** oder **43** gekuppelt wurde (Schema 18). Im Gegensatz zur Synthese der Verbindung **36** musste die Entschützung der Verbindung **24** mit methanolischer HCl



Schema 18: Synthese der Fragmente **C**. **a:** AcCl, MeOH, 0 °C auf RT, 1 h; **b:** **17** oder **43**, HBTU, DIPEA, DMF, RT; **c:** LiOH·H₂O, MeOH/H₂O, RT.



Schema 19: Synthese von Verbindung **43**. **a:** H₂ (1 bar), Pd/C, EE, RT; **b:** **6**, DIPEA, RT; **c:** NaOH_{aq}, EtOH, Reflux.

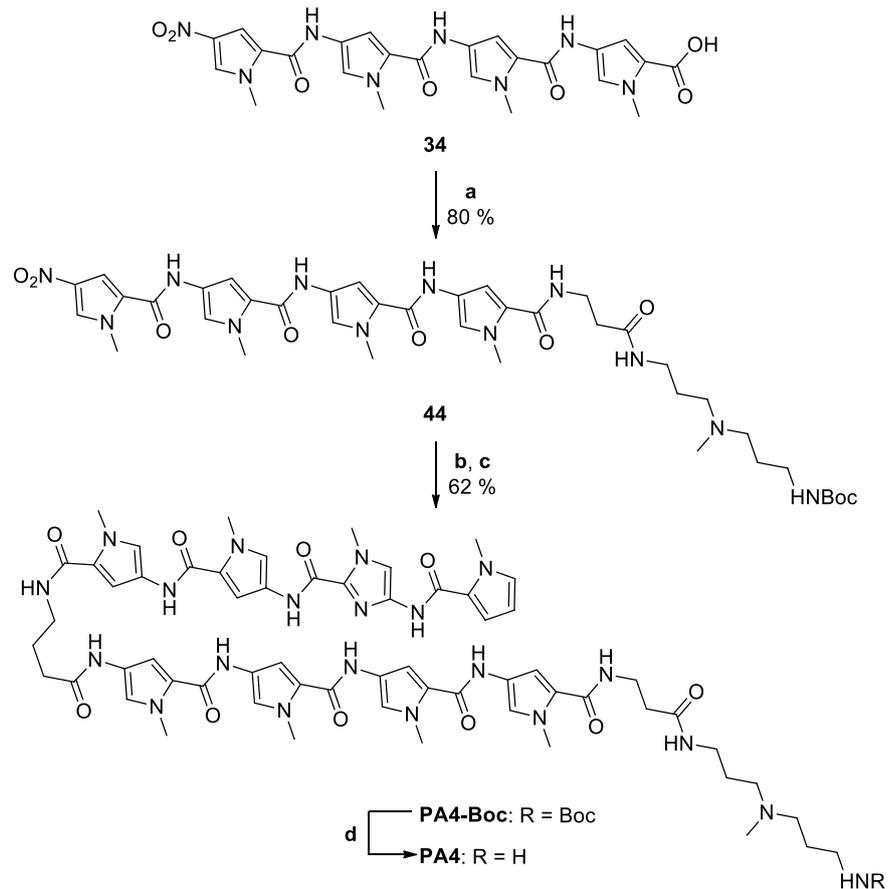
erfolgen, da ansonsten die Gefahr bestand, dass Reste der TFA in der Peptidkupplung reagierten, wodurch ein TFA-geschütztes Amin entstünde. Durch die Kupplung des Amins mit **17**, sowie der anschließenden Verseifung mit LiOH, konnte **39** in guten Ausbeuten (je 85 %) erhalten werden. Für die Synthese von Verbindung **41** musste zunächst Verbindung **43** hergestellt werden. Dies geschah ausgehend von Verbindung **3**, welche reduziert und im Anschluss in einer Haloform-Reaktion mit **8** zu Verbindung **42** umgesetzt wurde, welche man im Anschluss zur Carbonsäure **43** verseifte. Beide Reaktionen verliefen dabei in sehr guten Ausbeuten (>90 %, Schema 19). Die finale Kupplung zu Verbindung **40** verlief in moderaten Ausbeuten (68 %), während in der abschließenden Verseifung zu **41** gute Ausbeuten (77 %) erhalten wurden.

7.1.3 Synthese der Polyamide

Nachdem die benötigten Fragmente aufgebaut waren, mussten diese zu den vollständigen PIPs verknüpft werden. Dabei galt es, zunächst die Fragment **A** und **B** zu verknüpfen und im Anschluss mit **C** zu konjugieren. Hierbei musste man zunächst das PIP **PA4** synthetisieren, dessen Aufbau mittels Festphasensynthese bisher nicht möglich war. In analoger Weise sollten dann **PA3** und **PA6** aufgebaut werden.

7.1.3.1 Synthese von **PA4**

Für die Synthese von **PA4** wurden zunächst die Verbindungen **33** und **34** mittels einer Peptidkupplung zu Verbindung **44** verknüpft, wobei die Reaktion in guten Ausbeuten verlief (80 %, Schema 20). Zum Aufbau des vollständigen PIPs wurde **44** in MeOH reduziert. Bei der Aufarbeitung der Reduktion konnte jedoch eine Braunfärbung der Lösung beobachtet werden, die auf eine Zersetzung des Amins hindeutete. Die anschließende Kupplung mit Verbindung **39** verlief in schlechten Ausbeuten (27 %). Im Gegensatz zu der Synthese der Verbindung **36** war in diesem Fall keine *in situ* Schützung mit Boc möglich. Dies würde zu einer zweifach Boc-geschützten Verbindung führen, wodurch eine selektive Entschützung unmöglich und somit ein Aufbau des PIPs verhindert wäre. Somit musste eine alternative Methode gefunden werden, um die Zersetzung des Amins zu unterbinden. Da die Peptidkupplung zwischen dem Amin und **39** in DMF erfolgte, wurde sie *in situ* durchgeführt.



Schema 20: Synthese des Polyamids **PA4**. **a:** **33**, HOBT, DIC, DIPEA, DMF, 60 °C; **b:** H₂, Pd/C (1 bar), DMF; **c:** **39**, HBTU; DIPEA, DMF, RT, **d:** TFA/DCM, RT, quant.

Hierzu aktivierte man die Verbindung **39** in DMF und gab diese Lösung, nach Entfernen des Wasserstoffs, zu der Reduktionslösung. Auf diese Weise konnte **PA4-Boc** in ordentlichen Ausbeuten (62 %) erhalten werden und eine Zersetzung des Amins war nicht zu beobachten. **PA4** konnte daraufhin durch Entfernen der Boc-Gruppe mit TFA in DCM erhalten werden. Eine Analyse per *rp*-HPLC zeigte, dass das Rohprodukt nur geringe Verunreinigungen aufwies (Abbildung 33) und **PA4** ohne weitere Reinigung zur Synthese der Konjugate eingesetzt werden kann.

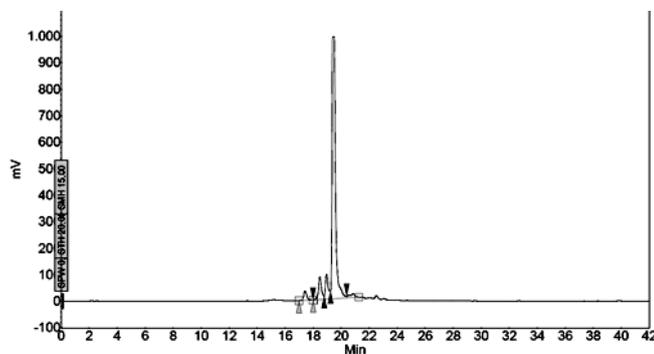
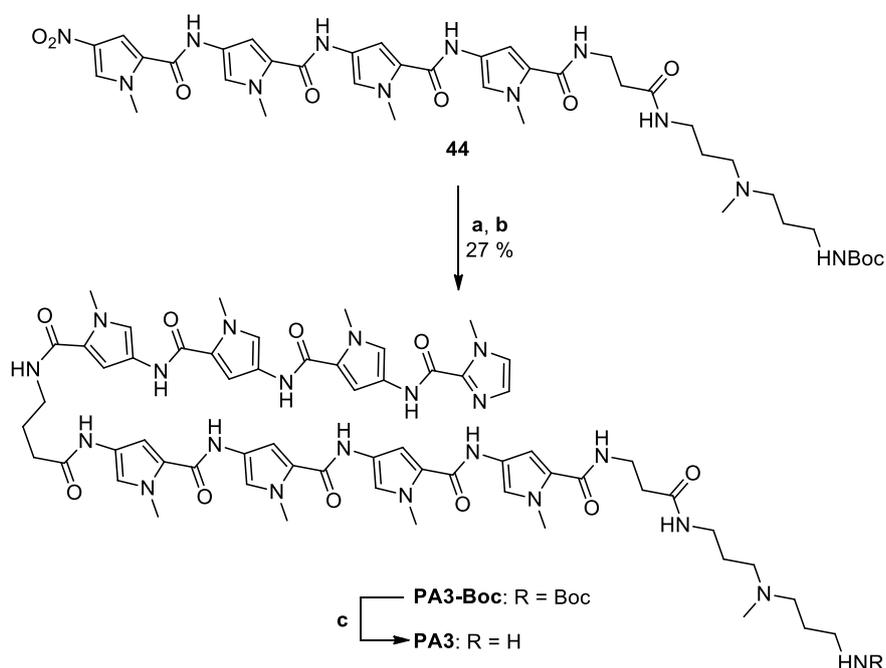


Abbildung 33: HPLC-Chromatogramm des Rohproduktes von **PA4**. Laufbedingungen: Linearer Gradient von 10 % B zu 70 % B in 30 min. A: 0.1 % TFA in H₂O; B: ACN.

7.1.3.2 Synthese von **PA3**

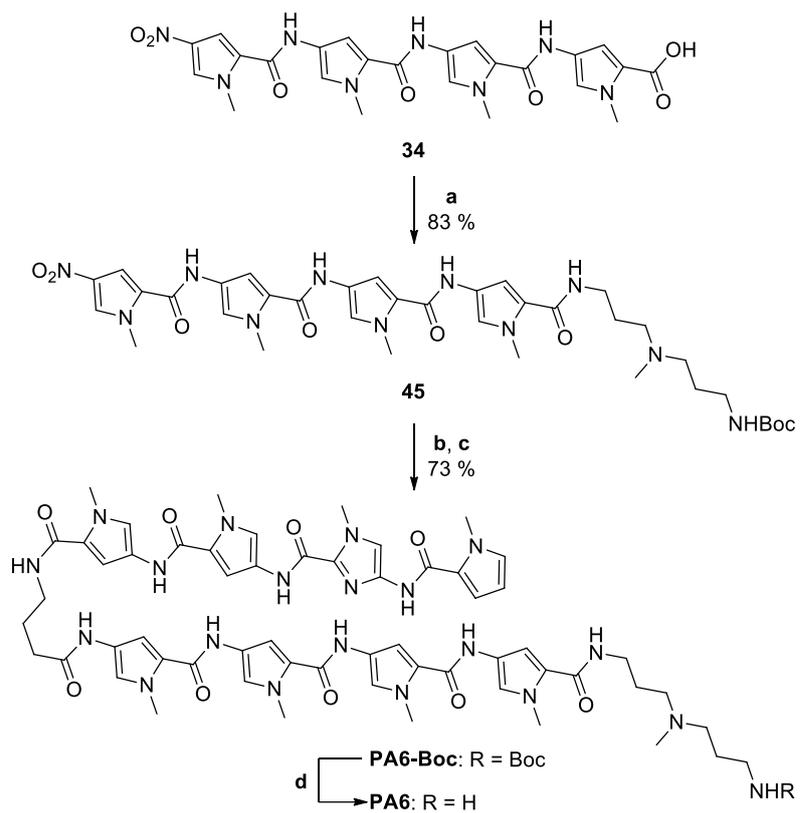
Die Synthese des PIPs **PA3** sollte analog zu der von **PA4** durchgeführt werden, jedoch waren 60 °C als Temperatur der abschließenden Peptidkupplung vorgesehen. Hierdurch sollten mögliche π - π -Wechselwirkungen der Fragmente verhindert werden und dies zu einer höheren Ausbeute führen. Allerdings konnte **PA3-Boc** nach der Reaktion von **35** mit **41** nur in schlechten Ausbeuten erhalten werden (27 %, Schema 21). Die genaue Ursache hierfür fand sich leider nicht. Allerdings musste das Rohprodukt mehrfach säulen-chromatographisch gereinigt werden, was zumindest einen Teil der Verluste erklärt. **PA3** erhielt man durch die Entschützung mit TFA in DCM. Auch in diesem Fall konnte das PIP direkt zur Synthese der Konjugate verwendet werden.



Schema 21: Synthese von **PA3**. a: H₂ (1 bar), Pd/C, DMF, RT; b: **41**, HBTU, DIPEA, DMF, 60 °C; c: TFA/DCM, RT, quant.

7.1.3.3 Synthese von **PA6**

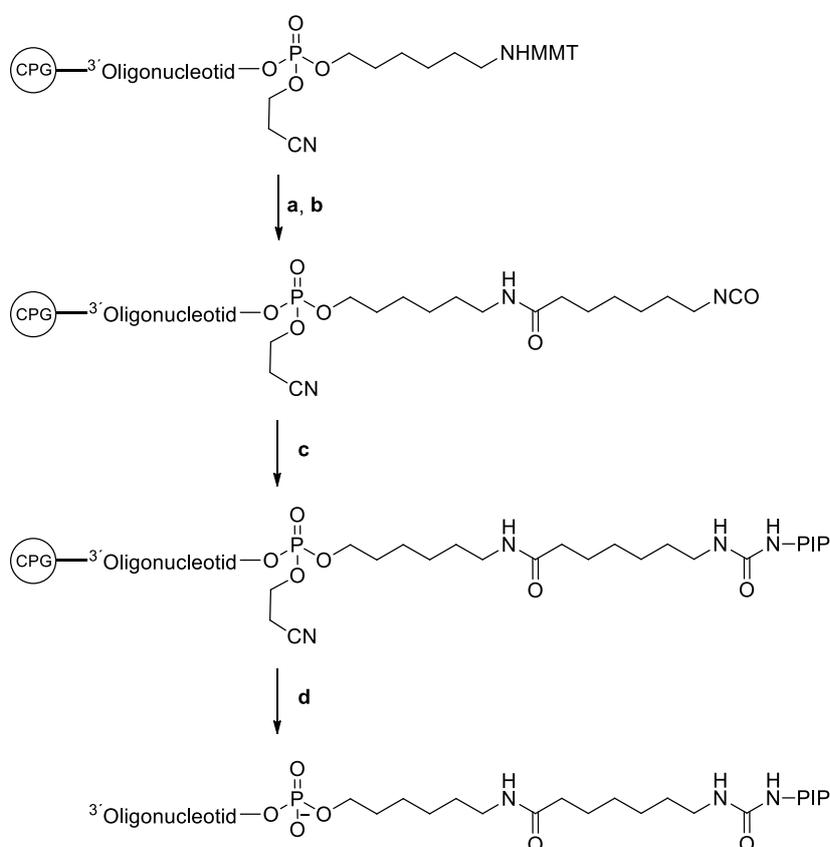
Das PIP **PA6** wurde in Analogie zu **PA4** und **PA3** aufgebaut. Hierzu wurde zunächst Verbindung **34** mit **31** zu **45** umgesetzt (Schema 22). Im Anschluss erfolgte eine Reduktion in DMF und das entstandene Amin wurde *in situ* mit Verbindung **39** umgesetzt. Auch in diesem Fall wurde die Kupplung bei 60 °C durchgeführt und **PA6-Boc** konnte in guten Ausbeuten (73 %) erhalten werden. Durch Entfernen der Boc-Gruppe mit TFA in DCM erhielt man im Anschluss **PA6**, welches ebenfalls direkt zum Aufbau der Konjugate verwendet werden konnte.



Schema 22: Synthese von **PA6**. **a:** **31**, HOBt, DIC, DIPEA, DMF, 60 °C; **b:** H₂, Pd/C, DMF, RT; **c:** **39**, HOBt, DIC; DIPEA, 60 °C, **d:** TFA/DCM, RT, quant.

7.2 Synthese der Konjugate

Die Konjugation der zuvor synthetisierten Polyamide erfolgte nach einer Methode von Kubo *et al.* (Schema 23).^[217] Dabei wurde eine auf fester Phase gebundene DNA mit Aminolinker zunächst mit Hexamethyldiisocyanat umgesetzt. Daran schloss sich die Reaktion mit dem Polyamid an. Nach der Abspaltung der DNA vom Träger konnte das Konjugat erhalten werden. In meiner Masterarbeit konnte ich zeigen, dass die Synthese des Konjugats **K1** möglich war (Abbildung 35). Allerdings gab es Probleme bei der Reinigung mittels *rp*-HPLC und das Konjugat konnte nicht hinreichend von den Edukten sowie einem nicht charakterisierten Nebenprodukt getrennt werden.^[12] Als eine alternative Methode wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE) in Betracht gezogen und in ersten Versuchen erschien eine Trennung möglich. Wie erhofft konnten mittels einer präparativen dPAGE drei Banden isoliert werden (Abbildung 34). Dabei war bereits bekannt, dass die unterste Bande aus DNA **2**, sowie dem Produkt aus der Kupplung mit dem Diisocyanat bestand (Lane 2). Im Gegensatz dazu zeigte **K1** ein langsames Laufverhalten (Lane 3) und die oberste der Banden konnte durch Massenspektrometrie als Dimer der DNA **2** identifiziert werden. Dieses entsteht durch Verknüpfung des Diisocyanats mit den Aminoenden zweier benachbarter DNA-Stränge.



Schema 23: Allgemeines Vorgehen für die Synthese der Konjugate. **a:** 3 % TFA oder TCA in DCM; **b:** OCN-(CH₂)₆-NCO, DIPEA, ACN, RT; **c:** PIP-NH₂, DIPEA, ACN/MeOH oder DMF, **d:** NH₃ (32%ig), 55 °C.

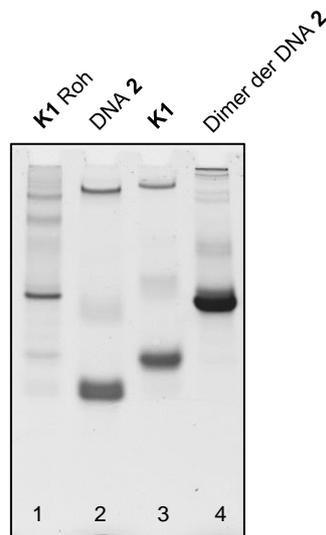


Abbildung 34: Denaturierende PAGE nach der Trennung von **K1** mittels präparativer PAGE. Dieses Gel ist repräsentativ für die Trennung der PIPs **PA2** – **PA8**. Lane 1: Rohprodukt; Lane 2: unkonjugierte DNA **2**; Lane 3: **K1**; Lane 4: Dimer der DNA **2**. 16 % dPAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold, die Charakterisierung durch Massenspektrometrie.

Nachdem eine Methode zur Synthese und Reinigung der Konjugate etabliert war, wurden als nächstes die Konjugate **K2** und **K3** aus der DNA **2** und den Polyamiden **PA2** und **PA3** synthetisiert (Abbildung 35). Jedoch zeigte sich in späteren Experimenten, dass ein Duplex aus der DNA **2** und DNA **3** nicht für die Konjugate geeignet war, da dieser Mismatch-Bindestellen für die PIPs aufwies und so ihre Affinität verringerte (Abschnitt 7.3.1). Aus diesem Grund wurden Konjugate auf Basis der DNA **4** verwendet, die keine Bindestelle für die PIPs enthielt (Abbildung 36). Mit dieser Sequenz konnte in einer Arbeit von Raiber *et al.* die Bindung von Sp1 nachgewiesen werden.^[218] Zunächst wurde **K4** aus der DNA **4** und **PA2** synthetisiert, um zu prüfen, ob auch die Verwendung DNA **4** zu Selbstbindungen führte. Nachdem dies nicht der Fall war, wurde die DNA **4** im Anschluss mit **PA4** zu **K5**, mit **PA5** zu **K6**, mit **PA6** zu **K7** und mit **PA3** zu **K8** umgesetzt (Abbildung 36). Darüber hinaus wurde **K9** aus **PA4** und DNA **6** aufgebaut, welches in Zellkulturexperimenten eingesetzt werden sollte. Die DNA **6** stellte dabei einen *hairpin* aus den DNAs **4** und **5** dar, der einen stabileren Duplex ausbilden und eine höhere Stabilität gegenüber Nukleasen besitzen sollte. Aufgrund der längeren Sequenz der DNA **6** war

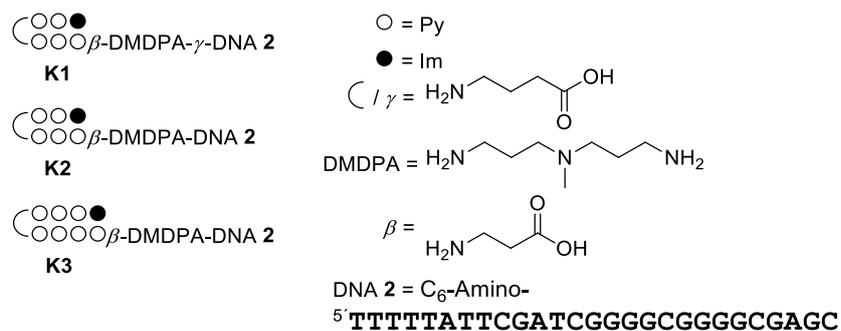


Abbildung 35: Struktur der Konjugate **K1** – **K3**.

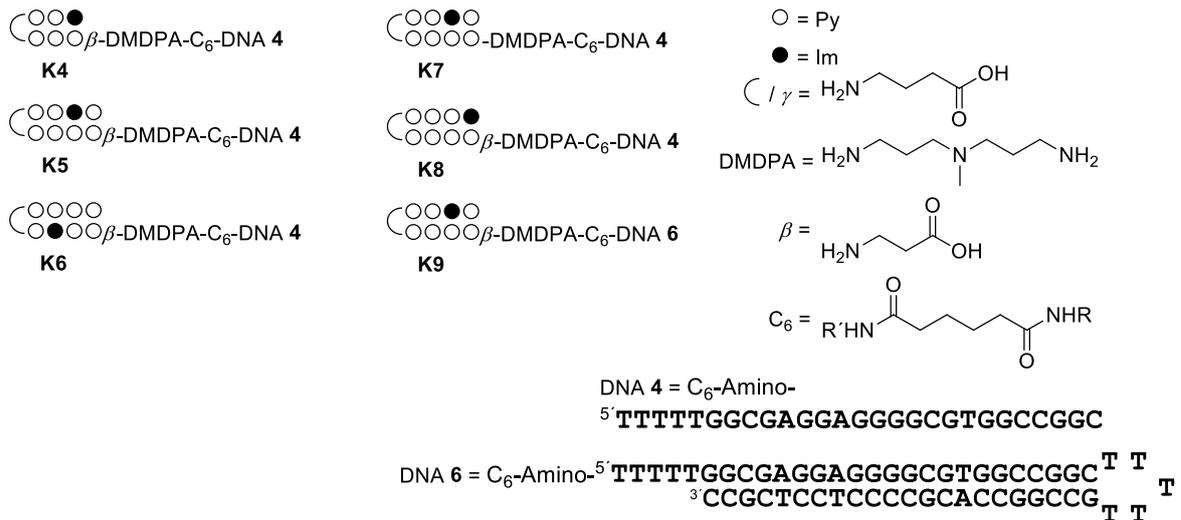


Abbildung 36: Sequenzen der Konjugate K4 – K9.

jedoch die dPAGE-Reinigung des Adaptors **K9** problematisch, da der Laufunterschied zwischen Konjugat und unkonjugierter DNA zu gering für eine saubere Trennung war. Dementsprechend konnte nach der dPAGE noch ein deutlicher Anteil der DNA **6** beobachtet werden (Abbildung 37, **a**). Dies erforderte eine weitere Reinigung, welche mittels *rp*-HPLC erfolgte (Abbildung 37, **b**). Eine anschließende Analyse mittels analytischer dPAGE zeigte, dass **K9** nun in hoher Reinheit vorlag (Abbildung 37, **c**). Auch die Charakterisierung des Konjugats gestaltete sich schwierig, da aufgrund der höheren molekularen Masse der Verbindung ein massenspektrometrischer Nachweis des Konjugats nicht möglich war. Jedoch konnte sowohl in der dPAGE als auch in der *rp*-HPLC ein retardiertes Laufverhalten gegenüber der unkonjugierten DNA beobachtet werden, was ein

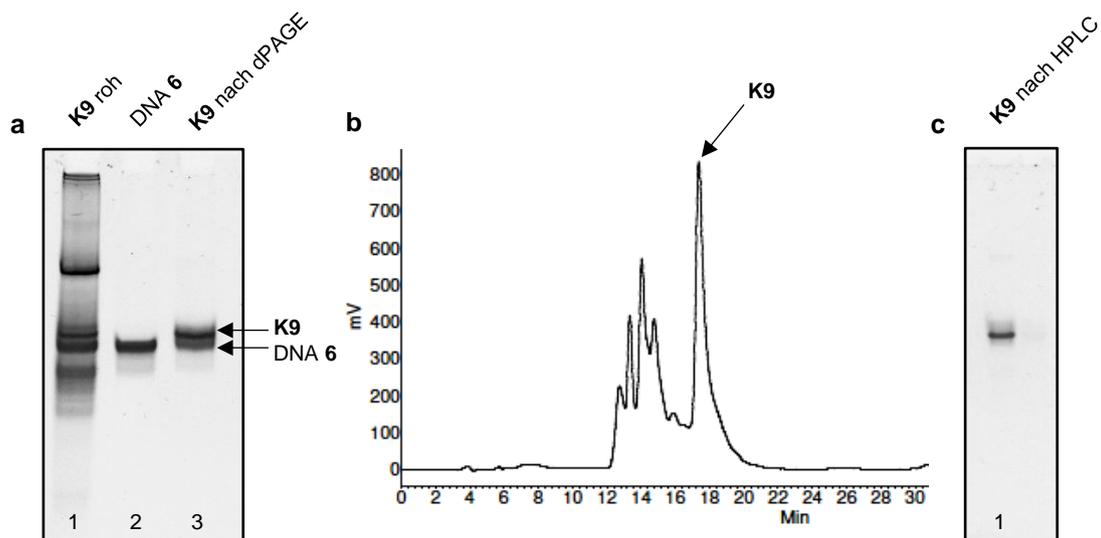


Abbildung 37: Reinigung des Konjugats **K9** mittels dPAGE und HPLC. **a**: Analytik des Konjugats nach der Reinigung mittels dPAGE. Lane 1: Rohprodukt der Reaktion; Lane 2: Isolierte DNA **6**; Lane 3: Isoliertes Konjugat **K9**. **b**: Chromatogramm der *rp*-HPLC-Trennung von **K9**. Dabei entspricht das Signal nach 17 min dem Konjugat. **c**: Analytik des Konjugats nach der Reinigung mittel HPLC. 16% dPAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold. Laufbedingungen *rp*-HPLC: Linearer Gradient von 10 % B zu 40 % B in 25 min. A: 0.1 M TEAA in H₂O; B: 0.1 M TEAA in ACN.

deutlicher Hinweis auf ein Konjugat war. Ein weiterer Hinweis konnte aus der UV/VIS-Spektroskopie gewonnen werden. Dort war eine, dem Absorptionsmaximum eines PIPs entsprechende, Absorption bei 320 nm zu beobachten.^[154] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Konjugat an die Ziel-DNA **1** band (Abschnitt 7.3.1, Abbildung 47) und sein Verhalten dem des analogen Konjugats **K5a** entsprach, das aus **K5** und der DNA **5** gebildet wurde (Abbildung 38). Zusammengenommen weist dies auf die Identität des Konjugats **K9** hin.

Für die Umleitung von Sp1 war es zudem notwendig, die einzelsträngigen Konjugate **K1 – K8** mit ihren Gegensträngen zu hybridisieren. Dies erfolgte für die Konjugate **K1 – K3** mit DNA **3** und für die Konjugate **K4 – K8** mit DNA **5** (Abbildung 38).

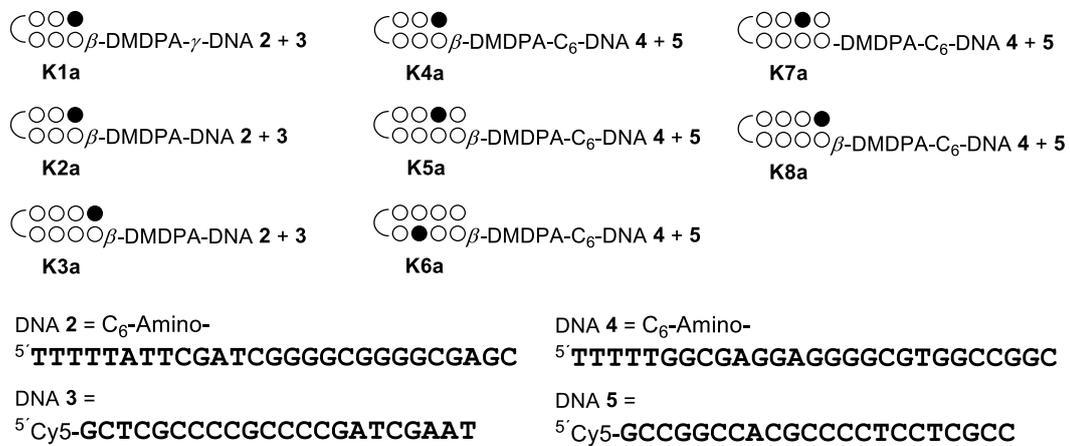


Abbildung 38: Sequenzen der doppelsträngigen Konjugate **K1a – K8a**.

7.3 Experimente zur Umleitung von Sp1 auf eine AT-reiche Sequenz

Bevor mit den Umleitungsexperimenten begonnen werden konnte, musste die Bindung der Konjugate an die DNA **1** anhand von Band-Shift-Experimenten bestätigt werden. Im Anschluss sollte der an GC-reiche Sequenzen bindende TF Sp1 in einem *in vitro*-Assay auf die AT-reiche DNA **1** umgeleitet werden. Dazu sollten Pulldown-Experimente durchgeführt werden. Für diese wurde die biotinylierte DNA **1** an Streptavidin beladene *Magnetic Beads* gebunden. Nach der Inkubation mit einem Adaptor oder Sp1 konnten die *Beads* mit einem Magnetstand gesammelt, ungebundenes Material durch Waschen der *Beads* entfernt werden. Zunächst waren Pulldown-Experimente mit Cy5-gelabelten Adaptoren geplant, um eine geeignete Inkubationszeit zu ermitteln und die Zahl der Waschschritte zu optimieren. Hierzu wurden nach Beendigung des Experiments die DNA-Stränge des Konjugats durch Erhöhen des pH-Werts getrennt und die Fluoreszenz der Cy5-gelabelten Stränge detektiert. Zur besseren Vergleichbarkeit mussten die erhaltenen Werte normiert werden und hierfür galt es ein geeignetes Bezugssystem zu finden. Für die Umleitung von Sp1 folgte nach dem Waschen der *Beads* eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Sp1 wurde durch spezifische Antikörper nachgewiesen.

7.3.1 Band-Shift-Experimente

Nachdem in meiner Masterarbeit bereits mit dem verunreinigten Konjugat **K1** eine Bindung an die DNA **1** nachgewiesen wurde,^[12] konnte das gereinigte Konjugat eingesetzt werden, um das Bindeverhalten genauer zu untersuchen. Hierbei galt es insbesondere, Verhältnisse zwischen DNA **1** und Konjugat zu ermitteln, bei denen eine Bindung nachzuweisen war. Des Weiteren verlangte der Befund, dass **K1a** eine geringere Affinität als **K1** aufwies, eine genauere Untersuchung. Durch den Vergleich von **K1** und **K1a** mit den Konjugaten **K2** und **K2a** sollte der Einfluss eines verkürzten Linkers auf die Bindung an DNA **1** betrachtet werden.

7.3.1.1 Experimente mit den Konjugaten **K1** – **K3**

Da sich in meiner Masterarbeit zeigte, dass die Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen im Puffer keinen Einfluss auf die Stabilität der Bindung des Konjugats an DNA **1** hatte,^[12] wurden die Experimente zur besseren Vergleichbarkeit in 0.5x SSPE-Puffer durchgeführt. Erste Versuche mit **K1** zeigten, dass ein fünffacher Überschuss des Konjugats **K1** zu einer deutlichen Abnahme der Bande der DNA **1** und zu einem retardierten Laufverhalten der ON führte. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die Konjugate **K1** und **K2** verglichen

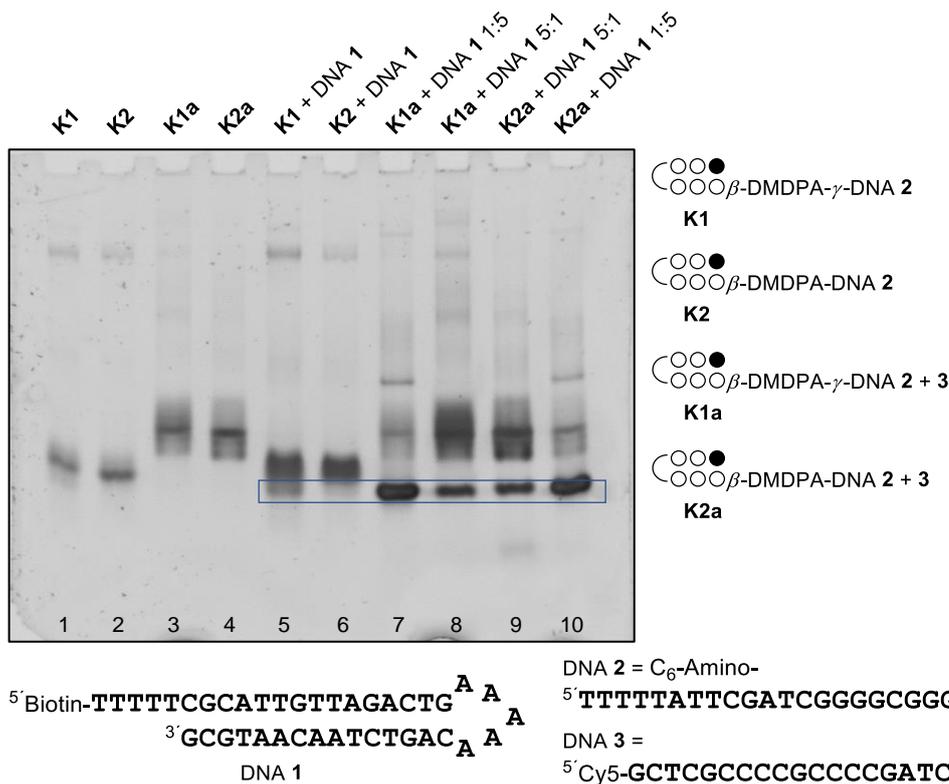


Abbildung 39: Band-Shift-Experimente mit **K1** und **K2**, sowie **K1a** und **K2a**. Lane 1: **K1** (2 μM); Lane 2: **K2** (2 μM); Lane 3: **K1a** (1 μM); Lane 4: **K2a** (1 μM); Lane 5: DNA 1 (0.5 μM) + **K1** (2.5 μM); Lane 6: DNA 1 (0.5 μM) + **K2** (2.5 μM); Lane 7: DNA 1 (2.5 μM) + **K1a** (0.5 μM); Lane 8: DNA 1 (0.5 μM) + **K1a** (2.5 μM); Lane 9: DNA 1 (0.5 μM) + **K2a** (2.5 μM); Lane 10: DNA 1 (2.5 μM) + **K2a** (0.5 μM). Die Proben wurden 3 h 0.5x SSPE bei RT inkubiert. 16 % nativ PAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold. Die Bande der DNA 1 ist blau eingerahmt.

(Abbildung 39). Es zeigte sich, dass ein fünffacher Überschuss an **K2** einen vollständigen Shift der DNA 1 bewirkte (Lane 6, blauer Kasten), während unter Verwendung von **K1** noch eine schwache Bande der DNA 1 zu beobachten war (Lane 5, blauer Kasten). In nachfolgenden Experimenten zeigte sich, dass **K2** bereits mit vier Äquivalenten eine vollständige Bindung an die DNA 1 aufwies und somit auf eine höhere Affinität als **K1** geschlossen werden konnte.

Im Anschluss daran wurden die durch Hybridisierung mit DNA 3 erhaltenen Konjugate **K1a** und **K2a** untersucht. Diese wurden entweder in einem fünffachen Überschuss (Lane 8 + 9) oder fünffachem Unterschuss (Lane 7 + 10) zur DNA 1 verwendet. Es konnte jedoch in keinem der Fälle eine Bindung an die Zielsequenz beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich, dass die Banden der Konjugate sehr breit waren (Lane 3 + 4), was den zuvor in unserer Gruppe erhaltenen Ergebnissen entsprach.^[12] Im Fall von **K2a** konnten dabei mehrere Banden beobachtet werden (Lane 4), welche nicht eindeutig zuzuordnen waren. Eine Vermutung war jedoch, dass diese Banden durch Sekundärstrukturen der Konjugate hervorgerufen wurden. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde der Duplex aus DNA 2 und 3 auf Bindestellen für die PIPs untersucht. Dabei konnten Mismatch-Bindestellen gefunden werden (Abbildung 40, oben). In diesen Fällen war für die β -Einheit der PIPs nur

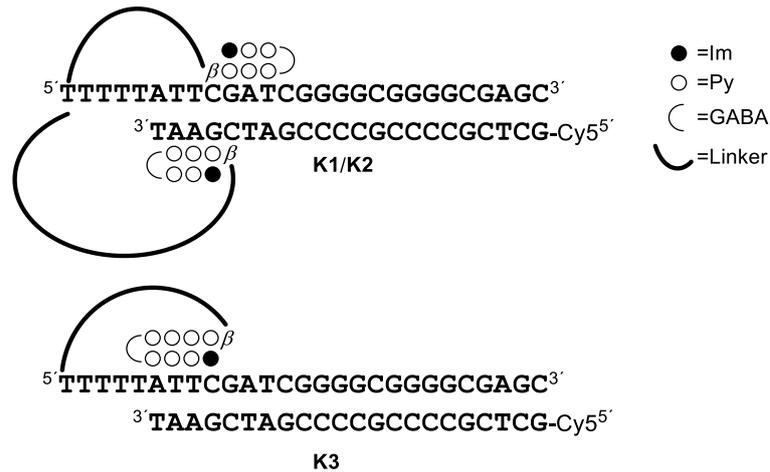


Abbildung 40: Beispiele für die intramolekulare Wechselwirkung der Konjugate **K1**, **K2** und **K3**.

eine Wechselwirkung mit G oder C möglich, wodurch die Affinität der PIPs für diese Stellen deutlich herabgesetzt wird.^[131] Da es sich jedoch um intramolekulare Wechselwirkungen handelte, war eine Selbstbindung dennoch möglich und führte zu einer Inhibierung des Adaptors. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Experimente mit den Konjugaten **K1** und **K2** eingestellt, da die Sequenz des Duplex aus DNA **2** und **3** nicht für Konjugate mit Sechsmers-PIPs geeignet war.

Analog zu **K1** und **K2** waren auch für die Konjugate mit längeren PIPs intramolekulare Wechselwirkungen zu erwarten (Abbildung 40, unten). Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Experimente mit den Konjugaten **K3** und **K3a** durchgeführt. Diese besaßen zwar auf der DNA **1** nur eine Mismatch-Bindestelle, da die Affinität der Achtmers-PIPs deutlich über der der Sechsmers-PIPs liegt,^[14] war eine Bindung von **K3** an die DNA **1** aber nicht auszuschließen. In den Band-Shift-Experimenten konnte dies bestätigt werden (Abbildung 41, Lane 4 – 8) und ab einem vierfachen Überschuss war die Bande der DNA **1** nicht mehr zu beobachten (Lane 7, blauer Kasten). Somit lag die Affinität des Konjugats **K3** im Bereich der Konjugate **K1** und **K2**. Analog zu **K2a** wies das entsprechende Konjugat **K3a** mehrere Banden auf (Lane 3), welche auf intramolekulare Wechselwirkungen hindeuteten, und zeigte keine Bindung an die DNA **1**. Eine Möglichkeit die Selbstinhibierung der Konjugate zu verhindern, wäre es, die DNA **3** an ihrem 3'-Ende um mehrere Nukleotide zu verkürzen. Auf diese Weise würde die Bindestelle der PIPs aus den Adaptoren entfernt, wodurch diese eine höhere Affinität zu DNA **1** aufweisen sollten. Dieser Ansatz hätte jedoch längere einzelsträngige Bereiche in den Adaptoren zur Folge, wodurch eine geringere Nukleasestabilität zu erwarten war. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz verworfen und es wurden keine weiteren Konjugate auf Basis der DNA **2** aufgebaut.

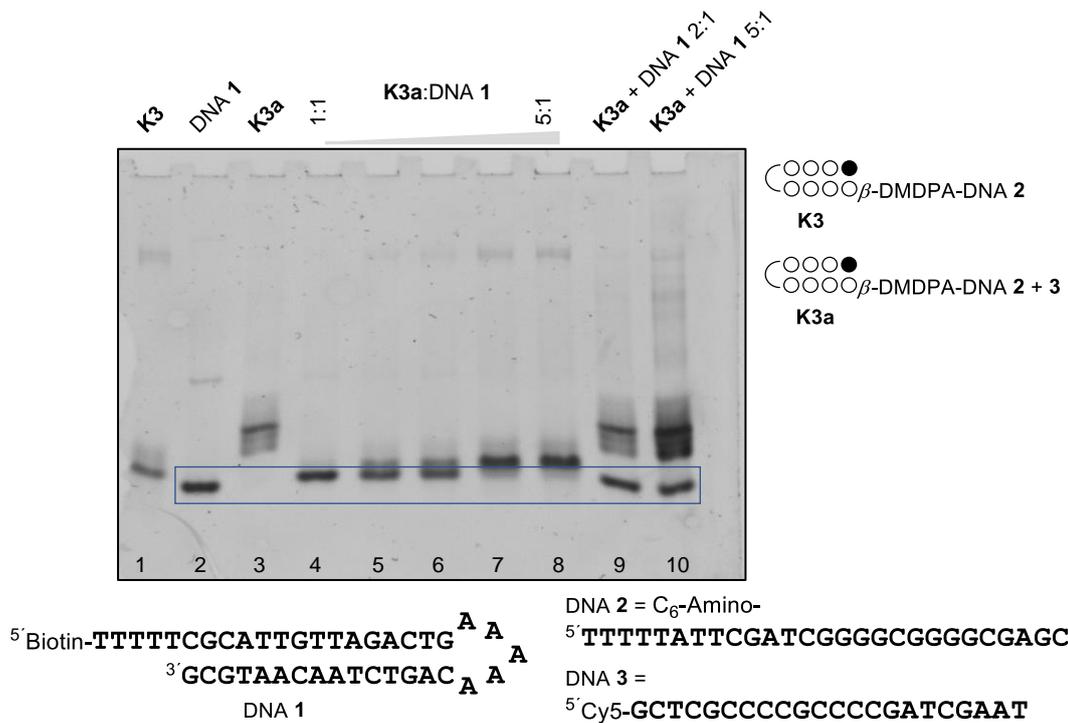


Abbildung 41: Band-Shift-Experiment mit **K3** und **K3a**. Lane 1: **K3** (2 µM); Lane 2: DNA 1 (0.5 µM); Lane 3: **K3a** (1 µM); Lane 4: DNA 1 (0.5 µM) + **K3** (0.5 µM); Lane 5: DNA 1 (0.5 µM) + **K3** (1 µM); Lane 6: DNA 1 (0.5 µM) + **K3** (1.5 µM); Lane 7: DNA 1 (0.5 µM) + **K3** (2 µM); Lane 8: DNA 1 (0.5 µM) + **K3** (2.5 µM); Lane 9: DNA 1 (0.5 µM) + **K3a** (1 µM); Lane 10: DNA 1 (0.5 µM) + **K3a** (2.5 µM). Die Proben wurden in 0.5x SSPE 2 h bei RT inkubiert. 16 % nativ PAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold. Die Bande der DNA 1 befindet sich im blauen Kasten.

7.3.1.2 Experimente mit den Konjugaten **K4** – **K9**

Nachdem die DNA 2 nicht zum Aufbau der Konjugate geeignet war, da sich die resultierenden Adaptormoleküle selbst inhibierten, musste eine neue DNA für die Umleitung von Sp1 gewählt werden. Dazu war am 5'-Ende eine deutlich von DNA 2 verschiedene Sequenz erforderlich, da die internen Wechselwirkungen durch diesen Bereich zustande kamen (Abbildung 42, rot unterlegt). Aus diesem Grund wählte man die DNA 4, welche bereits in einer Arbeit der Balasubramanian-Gruppe zur Isolierung von Sp1 eingesetzt wurde^[218] und zudem keine Bindestellen für die PIPs aufwies. Aus DNA 4 wurde zunächst das zu **K2** analoge Konjugat **K4** aufgebaut und in Band-Shift-Experimenten auf seine Funktion getestet. Dabei wies **K4** ab einem dreifachen Überschuss eine gute Bindung an die DNA 1 auf und war mit dem Konjugat **K2** vergleichbar. Dennoch war in manchen Fällen auch bei einem vierfachen Überschuss kein vollständiges Verschwinden der DNA 1 zu



Abbildung 42: Vergleich der DNAs 2 und 4. Im Fall der DNA 4 unterschied sich die Sequenz deutlich von dem Teil der DNA 2, der für die intramolekularen Wechselwirkungen verantwortlich war.

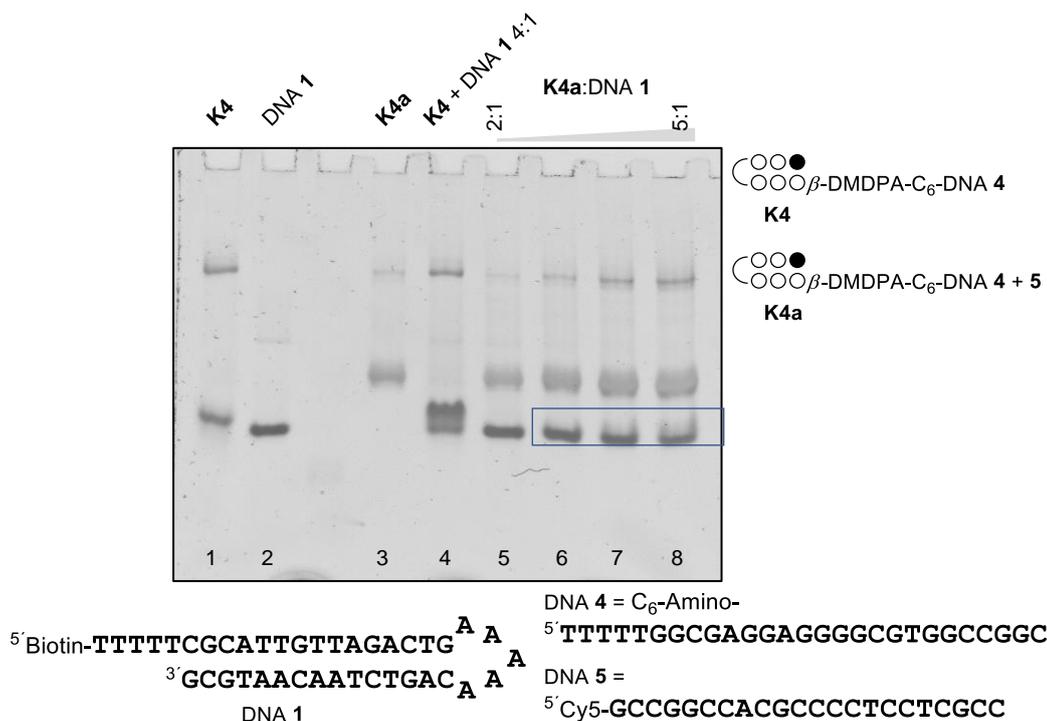


Abbildung 43: Band-Shift Experimente mit **K4** und **K4a**. Lane 1: **K4** (2 μ M); Lane 2: DNA 1 (0.5 μ M); Lane 3: **K4a** (1 μ M); Lane 4: DNA 1 (0.5 μ M) + **K4** (2 μ M); Lane 5: DNA 1 (0.5 μ M) + **K4a** (1 μ M); Lane 6: DNA 1 (0.5 μ M) + **K4a** (1.5 μ M); Lane 7: DNA 1 (0.5 μ M) + **K4a** (2 μ M); Lane 8: DNA 1 (0.5 μ M) + **K4a** (2.5 μ M). Die Proben wurden über Nacht in 0.5x SSPE bei RT inkubiert. 16 % nativ PAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold. Die Veränderung der Banden der DNA 1 sind blau markiert.

beobachten (Abbildung 43, Lane 4). Nach der Hybridisierung mit der DNA 5 wies das resultierende Konjugat **K4a** eine deutlich schmalere Bande auf (Lane 3) als die Konjugate **K1a** – **K3a**. Das deutete darauf hin, dass in diesem Fall keine Selbstbindung vorlag. Dennoch konnte für **K4a** keine direkte Bindung an die DNA 1 beobachtet werden. Ab einem Verhältnis von 4:1 wurde die Bande der DNA 1 jedoch weniger fokussiert (Lane 8 und 9) und da dieser Effekt reproduziert wurde, war davon auszugehen, dass die Bindung des Konjugats die Ursache darstellte. Dies bedeutete gleichzeitig, dass die Affinität von **K4a** an die Ziel-DNA 1 gering war, wodurch sich der Komplex durch das unterschiedliche Laufverhalten der ON während der Elektrophorese auflöste. Aus diesen Beobachtungen konnten zwei Erkenntnisse gewonnen werden. Erstens schienen bei **K4a** keine oder kaum internen Wechselwirkungen zwischen PIP-Teil und DNA-Duplex aufzutreten. Die zweite Beobachtung war, dass die Affinität der Sechsmers-PIPs zu gering war, um eine stabile Bindung der Konjugate an die DNA 1 zu ermöglichen und sie somit nicht zur Umleitung von Sp1 geeignet waren. Aus den Experimenten mit **K3** konnte jedoch geschlossen werden, dass die Achtmer-PIPs eine deutlich höhere Affinität als die Sechsmers-PIPs besaßen, da bereits bei einem Mismatch-Fall eine mit den Sechsmers-PIPs vergleichbare Affinität zu beobachten war. Aufgrund der in der Dervan-Gruppe erhaltenen Ergebnisse, war davon auszugehen, dass die Affinität im Match-Fall 10 – 100fach höher sein sollte.^[14] Dementsprechend wurden als nächstes die auf Achtmer-PIPs basierten Konjugate **K5** und

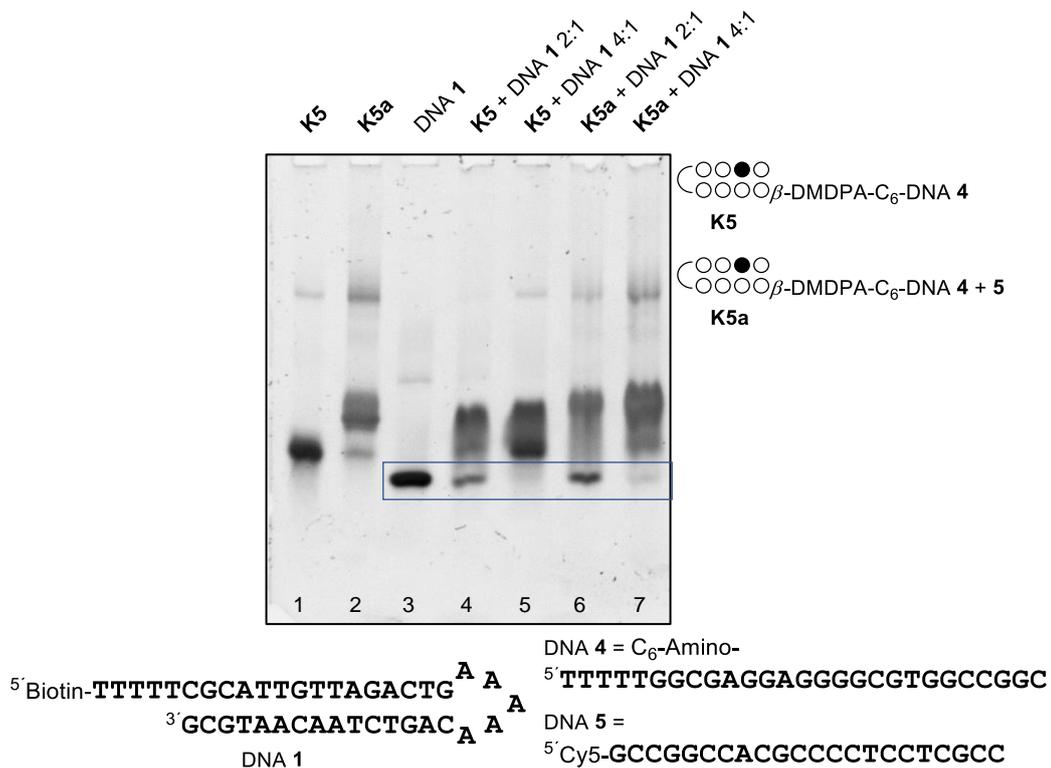


Abbildung 44: Band-Shift-Experiment mit **K5**. Lane 1: **K5** (2 μ M); Lane 2: **K5a** (2 μ M); Lane 3: DNA 1 (0.5 μ M); Lane 4: DNA 1 + **K5** (1 μ M); Lane 5: DNA 1 (0.5 μ M) + **K5** (2 μ M); Lane 6: DNA 1 (0.5 μ M) + **K5a** (1 μ M); Lane 7: DNA 1 (0.5 μ M) + **K5a** (2 μ M). Die Proben wurden über Nacht in 0.5x SSPE bei RT inkubiert. 16 % nativ PAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold. Die Bande der DNA 1 ist blau markiert.

K5a getestet (Abbildung 44). Diese zeigten eine gute Bindung an die DNA 1. Mit **K5** konnte bereits bei einem doppelten Überschuss eine deutliche Abnahme der DNA 1 beobachtet werden (Lane 4) und ein vierfacher Überschuss führte zu einem vollständigen Verschwinden der Ziel-Bande (Lane 5, blauer Kasten). Im Gegensatz dazu waren mit den zuvor verwendeten Konjugaten **K1** – **K4** erst ab einem dreifachen Überschuss geringe Effekte zu beobachten. Mit **K5a** konnten analoge Ergebnisse erzielt werden. Mit zwei Äquivalenten des Konjugats war eine deutliche Abnahme der DNA 1 und ein Shift von **K5a** zu beobachten (Lane 6) und bei einem vierfachen Überschuss war die DNA 1 nur noch in Spuren zu detektieren (Lane 7). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Achtmer-PIPs eine ausreichende Affinität für die Konjugate besaßen und sich zur Isolierung von Sp1 eignen sollten.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Bindungsorientierung des Konjugats auf der DNA 1 optimal war. Im Fall der Konjugate **K1** bis **K5** zeigte die DNA des Konjugats in Richtung des 5'-Endes der DNA 1 (Abbildung 45). Da dieses in den geplanten Pulldown-Experimenten an die *Magnetic Beads* gebunden war, konnte eine sterische Wechselwirkung zwischen den *Beads* und der Konjugat-DNA nicht ausgeschlossen werden. Im Fall des Konjugats **K6** war die DNA 4 hingegen in Richtung des *turns* der DNA 1 gerichtet (Abbildung 45) und die Bindung der DNA 1 an die *Beads* hätte somit keinen Einfluss. In Band-Shift-Experimenten wiesen die Konjugate **K6** und **K6a** jedoch nur eine

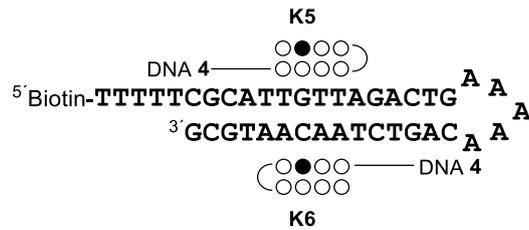


Abbildung 45: Orientierung der Konjugate **K5** und **K6** nach der Bindung an die DNA 1.

geringe Bindung an die DNA 1 auf und ihre Affinitäten schienen im Bereich der Konjugate **K4** und **K4a** zu liegen. Somit stellten diese Konjugate keine geeigneten Alternativen zu **K5** dar.

Nachdem die Frage der Bindungsorientierung geklärt war, wurde getestet, ob das Entfernen der β -Einheit einen Einfluss auf die Bindung der Konjugate hatte. Dazu wurden die Konjugate **K5** und **K7** verglichen (Abbildung 46) und in den Experimenten konnte kein Unterschied in der Bindung an die DNA 1 festgestellt werden. Sowohl **K7** (Lane 7 + 8) als auch **K7a** (Lane 5 + 6) zeigten bei einem doppelten Überschuss eine gute Bindung an DNA 1, welche vergleichbar mit der den Konjugaten **K5** (Lane 10) und **K5a** (Lane 9) waren. Nachdem das Verkürzen des Linkers keinen Einfluss auf die Affinität der Konjugate hatte, wurde das Konjugat **K5a** für die Umleitung von Sp1 eingesetzt und auch das für

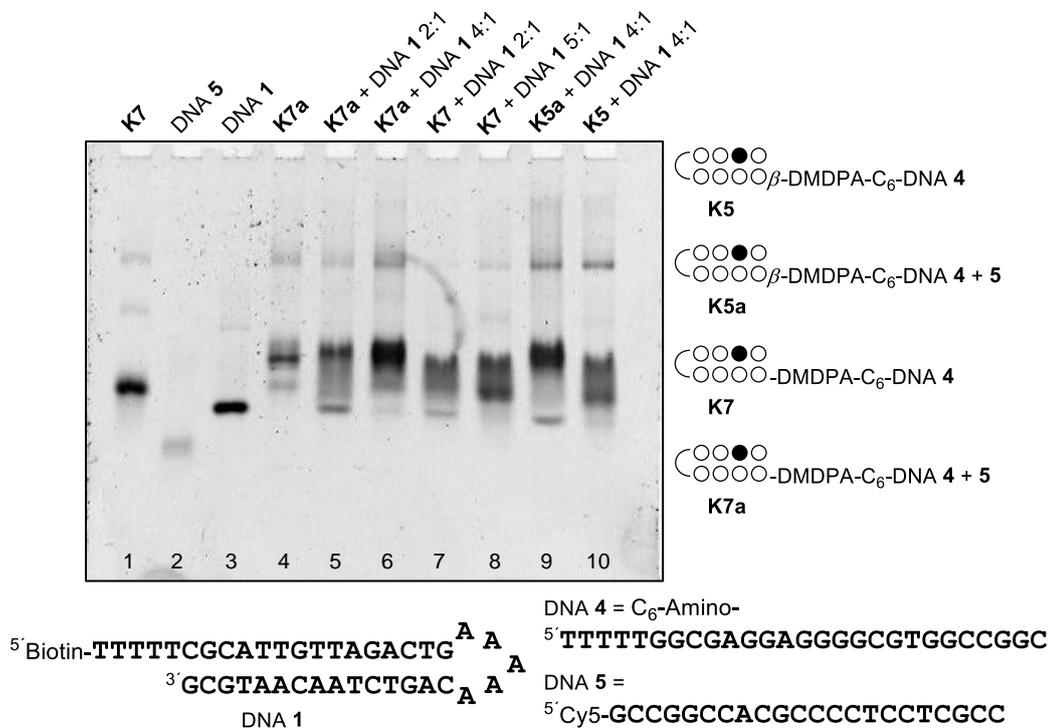


Abbildung 46: Band-Shift-Experimente mit **K5**, **K7**, **K5a** und **K7a**. Lane 1: **K7** (2 μ M); Lane 2: DNA 5 (2 μ M); Lane 3: DNA 1 (0.5 μ M); Lane 4: **K7a** (1 μ M); Lane 5: DNA 1 (0.5 μ M) + **K7a** (1 μ M); Lane 6: DNA 1 (0.5 μ M) + **K7a** (2 μ M); Lane 7: DNA 1 (0.5 μ M) + **K7** (1 μ M); Lane 8: DNA 1 (0.5 μ M) + **K7** (2 μ M); Lane 9: DNA 1 (0.5 μ M) + **K5a** (2 μ M); Lane 10: DNA 1 (0.5 μ M) + **K5** (2 μ M). Die Proben wurden 3 h bei RT in 0.5x SSPE inkubiert. 16 % nativ PAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold.

Zellkulturexperimente vorgesehene Konjugat **K9** wurde auf Basis des Polyamids **PA4** aufgebaut. Im Gegensatz zu den zuvor verwendeten Konjugaten, enthielt das Konjugat **K9** eine *hairpin*-DNA, deren Sequenz sich aus den DNAs **4** und **5** zusammensetzte. Nach der Synthese des Konjugats **K9** trat das Problem auf, dass es nicht mittels Massenspektrometrie charakterisiert werden konnte und nur bekannt war, dass es sich um ein Konjugat handeln musste (vgl. Abschnitt 7.2). Um zu zeigen, dass dieses funktional war, sollte es mit dem analogen Adaptor **K5a** verglichen werden. Wenn das erhaltene Konjugat tatsächlich **K9** war, sollte die Laufstrecke in einer nativ PAGE und die Affinität zu DNA **1** mit **K5a** identisch sein. Die Band-Shift-Experimente wurden dabei in Puffer 1 (25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.01 mM ZnCl₂, 5 % Glycerol) durchgeführt, welcher physiologische Bedingungen besser nachstellte als der 0.5x SSPE-Puffer. Dabei wurde untersucht, ob in Anwesenheit von K⁺- und Mg²⁺-Ionen eine Bindung an DNA **1** möglich war. In den Experimenten konnte auch in Puffer 1 eine gute Bindung des Konjugats **K5a** an die DNA **1** beobachtet werden (Abbildung 47, Lane 4). Darüber hinaus zeigte sich, dass die Konjugate **K5a** und **K9** eine nahezu identische Laufstrecke aufwiesen und sich die Form ihrer Banden ähnelte (Lane 2 und 3). Außerdem war in beiden Fällen eine gute Bindung an die DNA **1** zu beobachten (Lane 4 und 5). Aufgrund dieser Ergebnisse war davon auszugehen, dass es sich bei dem Konjugat um **K9** handelte.

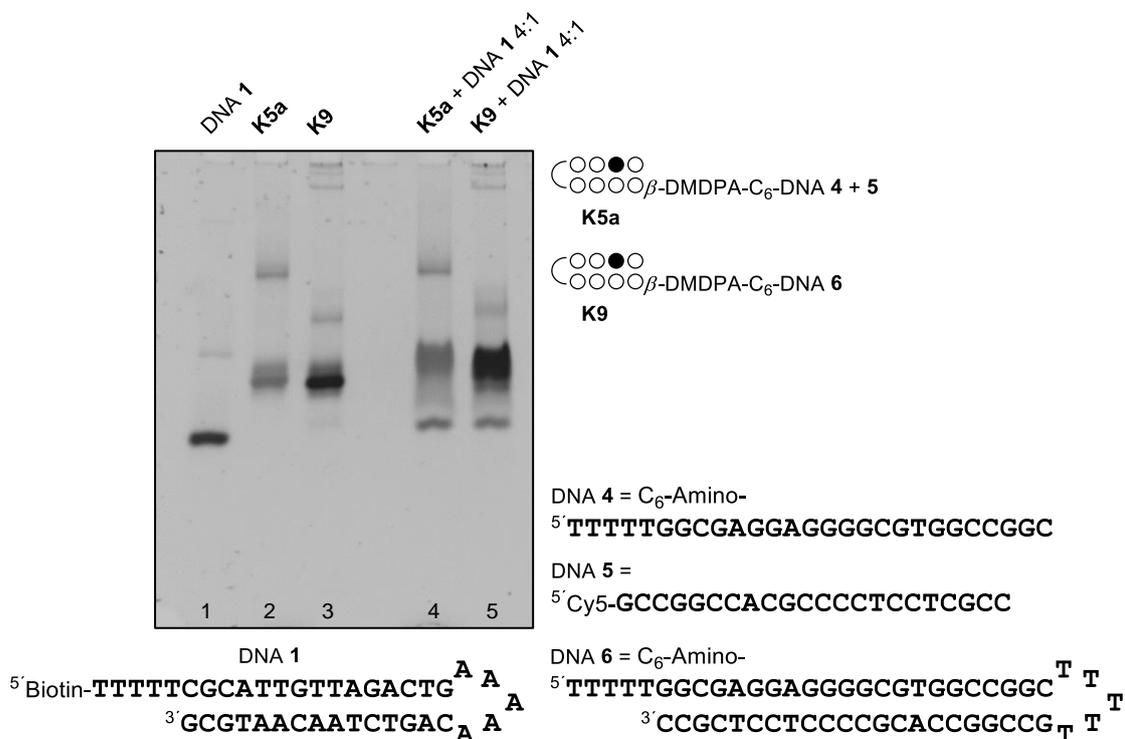


Abbildung 47: Band-Shift-Experiment mit den Konjugaten mit **K5a** und **K9**. Lane 1: DNA **1** (0.5 μM); Lane 2: **K5a** (2 μM); Lane 3: **K9** (2 μM); Lane 4: DNA **1** (0.5 μM) + **K5a** (2 μM); Lane 5: DNA **1** (0.5 μM) + **K9** (2 μM). Die Proben wurden über Nacht bei 37 °C in Puffer 1 inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold.

Mit den Konjugaten **K5a** und **K9** waren zwei Adapormoleküle vorhanden, mit denen eine Umleitung von Sp1 möglich schien und die in Pulldown-Experimenten eingesetzt werden sollten. Gleichzeitig fehlte ein Konjugat, das als Negativkontrolle dienen konnte. Hierzu wurden die Verbindungen **K8** und **K8a** aufgebaut und (Abbildung 48) in Puffer 1 getestet. Hierbei konnte analog zu **K3a** erwartungsgemäß keine Bindung an die DNA **1** nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass **K8a** eine geeignete Negativkontrolle für die geplanten Pulldown-Experimente darstellte.

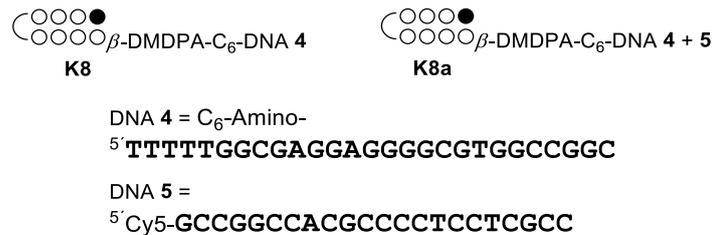


Abbildung 48: Sequenz der Konjugate **K8** und **K8a**.

7.3.2 Pulldown-Experimente

Ein Fernziel dieses Projektes ist die Synthese von Adaptormolekülen, die nicht nur in Zellen, sondern auch in deren Kerne eindringen können. Dort sollen sie nach Rekrutierung des ubiquitären TFs Sp1 diesen an AT-reiche Promotorsequenzen umleiten und somit eine Hochregulierung nachgeschalteter Gene bewirken können (vgl. Abbildung 23, Seite 41). Im Rahmen dieser Dissertation ist ein biologischer *proof of principle* noch nicht ernsthaft versucht worden. Um sich diesem Ziel aber anzunähern, wurden Pulldown-Experimente durchgeführt, in denen zumindest alle relevanten Bindungsvorgänge eindeutig nachgewiesen werden konnten: Dabei steht die biotinylierte DNA **1** als Modell für die AT-reiche Promotorregion. Mit ihr assoziiert das Adaptormolekül sowie der daran gebundene TF Sp1, der selbst keine Affinität zum AT-reichen Duplex von DNA **1** hat. Wird nun DNA **1** mit Hilfe Streptavidin-haltiger *Magnetic Beads* über ihr Biotin eingefangen, so lässt sich das über den Adaptor indirekt gebundene Sp1 schließlich durch einen Western-Blot nachweisen. Um zu diesem Punkt zu gelangen, mussten aber noch wichtige Parameter des Pulldown-Experiments optimiert werden. Dazu wurde in einem nochmals vereinfachten Versuchsaufbau statt des Proteins Sp1 lediglich eine fluoreszenzmarkierte DNA eingefangen, die zum einzelsträngigen Teil des jeweiligen Adaptors, nicht aber zur biotinylierten DNA **1**, komplementär ist. Am Ende des Versuchs wurde diese bei pH 10 von den *Beads* abgetrennt und ihre Floreszenz vermessen. Bei einem Pulldown von DNA **1** sollte in Abwesenheit von Adaptoren daher keine fluoreszierende DNA detektiert werden können. In Gegenwart des Adaptors hingegen würde diese die indirekte Bindung an DNA **1** vermitteln (Abbildung 49).

In den vorrausgegangenen Band-Shift-Experimenten konnten die Konjugate **K5a**, **K7a** und **K9** als geeignete Adaptoren für eine Umleitung von Sp1 identifiziert werden. In Bezug auf die Inkubation mussten einerseits ein Puffer und eine geeignete Inkubationszeit gewählt werden. Im Gegensatz zu den Band-Shift-Studien wurden die Pulldown-Experimente anstelle des 0.5x SSPE-Puffers in Puffer Z (25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM KCl, 12.5 mM MgCl₂, 0.01 mM ZnCl₂, 20 % Glycerol) durchgeführt, der bereits in ähnlichen Versuchen der Balasubramanian-Gruppe zum Einsatz kam^[218] und außerdem zur Isolierung des Sp1 aus HeLa-Zellen verwendet wurde. Auf der Suche nach geeigneten Bedingungen wurde zunächst die Zahl der Waschschriffe optimiert und nach einer Normierungsmethode für die Fluoreszenz gesucht. Bei den Waschschriffen war darauf zu achten, möglichst viel ungebundenes Material zu entfernen, ohne das gebundene Konjugat abzulösen. Dazu wurde die DNA **1** entweder mit **K5a** oder einem Duplex der DNAs **4** und **5**, als Negativkontrolle, inkubiert und im Anschluss zwischen einem und fünf Mal gewaschen. Dabei konnte mit **K5a** eine hohe, aber konstant abnehmende Fluoreszenz beobachtet werden. Dies war ein Indiz dafür, dass in den Waschschriffen auch gebundenes Konjugat entfernt wurde. Im Fall des Duplex aus den DNAs **4** und **5** war ab drei Waschschriffen keine weite Abnahme der Restfluoreszenz zu beobachten. Da die detektierte Fluoreszenz bei den Experimenten mit **K5a** nach drei Waschschriffen noch vergleichsweise hoch war, wurde in den nachfolgenden Pulldown-Experimenten dreimal gewaschen. Nach einer Reihe von Pulldowns zeigte sich, dass die Fluoreszenzwerte der Negativkontrollen stark variierte und nicht zur Normierung der Experimente geeignet war. Stattdessen wurden die erhaltenen Werte entweder auf eine analoge Menge des eingesetzten Konjugats oder auf einen, an *Beads* gebundenen, Duplex der DNAs **2a** und **3** oder **4a** und **5** normiert (DNA **2a** und **4a** wurden durch Biotinylierung von DNA **2** und **4** erhalten). Bei der Bestimmung der optimalen Inkubationszeit war darauf zu achten, dass einerseits die Komplexierung des Adaptors mit der DNA **1** nahezu vollständig war. Andererseits ist bei Experimenten mit Sp1 oder gar bei zellbiologischen Anwendungen darauf zu achten, dass es nicht durch überlange Inkubationszeiten zu einer Degradation von Sp1 oder der Adaptormoleküle kommt. In Pulldown-Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine maximale Komplexierung zwischen **K5a** und DNA **1** nach 5 bis 7 h erhalten wurde (Abbildung 49). Da jedoch bereits nach 3 h bereits 84 % dieses Werts detektiert wurden und bei einer kürzeren Inkubation von einer geringeren Degradation des Sp1 auszugehen war, wurde die Inkubation für die nachfolgenden Experimente auf 3 h begrenzt.

Mit den optimierten Bedingungen sollte die Bindung der Konjugate **K1a** – **K7a** an die DNA **1** in Pulldown-Experimenten genauer untersucht werden. Da die Pulldown-Experimente eine empfindlichere Methode als die Band-Shift-Experimente darstellten, sollte hiermit eine

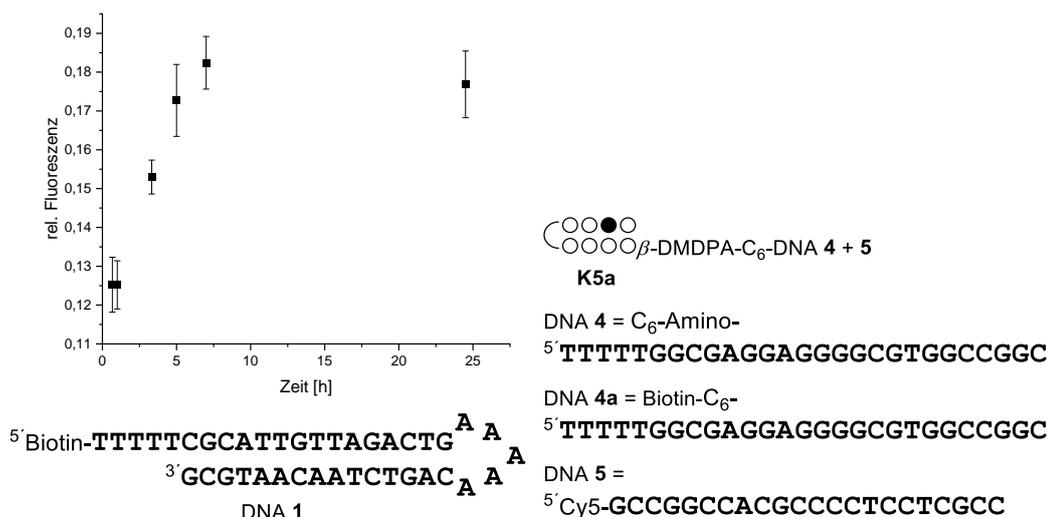


Abbildung 49: Zeitlicher Verlauf der Komplexbildung aus **K5a** und DNA 1 in Puffer Z. Die Proben wurden dreimal gewaschen und die gemessene Fluoreszenz auf den Wert eines Duplex aus DNA 4a und 5 normiert.

genauere Aussage über die Affinität getroffen werden können, insbesondere bei Konjugaten, die in den Band-Shift-Experimenten eine vergleichbare Komplexbildung zeigten. Des Weiteren wurde der Einfluss der PIP-Länge auf die Bindung der Konjugate sowie die Auswirkungen der intramolekularen Wechselwirkungen auf die Affinität der Konjugate **K1a** – **K3a** untersucht. Dabei war zu beachten, dass die Cy5-Markierte DNA 3 der Konjugate **K1a** – **K3a** einen Labelinggrad von 60 % besaß, während dieser bei den Konjugaten **K4a** – **K7a** 100 % betrug. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurde die gemessene Fluoreszenz auf eine 100 nM Lösung der jeweiligen Konjugate normiert. In den Experimenten wiesen die Konjugate **K5a** und **K7a** die mit Abstand beste Bindung an die DNA 1 auf und die erhaltenen Fluoreszenzwerte waren untereinander vergleichbar (Abbildung 50). Für das Konjugat **K6a** war der Fluoreszenzwert hingegen nur halb so hoch und analog zu den Band-Shift-Experimenten deutete dies auf eine deutlich schlechtere Bindung an die DNA 1 hin. Dies zeigte, dass die Bindung der DNA 1 an *Magnetic Beads* keinen negativen Einfluss auf die Bindung des Konjugats **K5a** hatte und es offensichtlich zu keiner sterischen Abstoßung zwischen der Konjugat-DNA und den *Beads* kam. Außerdem zeigte sich auch hier, dass die auf Achtmer-PIPs basierenden Konjugate eine deutlich höhere Affinität besaßen als die Sechsmern-PIP-basierten. Von den Sechsmern wies das Konjugat **K4a** die höchsten Fluoreszenzwerte auf, auch wenn die Werte mit denen des Konjugats **K2a** vergleichbar waren. Auch dies war konsistent mit den vorherigen Ergebnissen und der Vergleich der Konjugate **K2a** und **K4a** wies darauf hin, dass die intramolekularen Wechselwirkungen im Fall von **K2a** nur einen geringen Einfluss auf die Bindung der DNA 1 hatten. Im Fall des Konjugats **K1a** war die erhaltene Fluoreszenz deutlich niedriger. Die Ursache hierfür könnte der längere Linker darstellen, der die Ausbildung von intramolekularen Wechselwirkungen erleichtert und somit das Konjugat

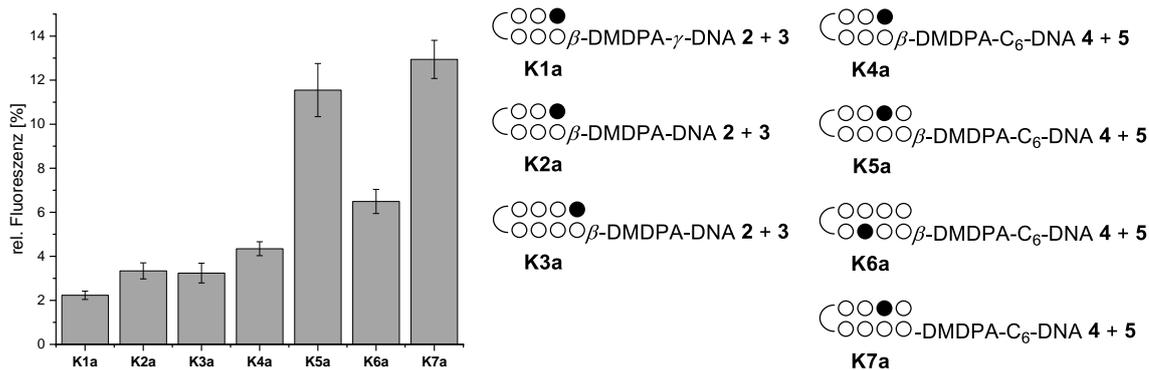


Abbildung 50: Pulldown-Experimente mit DNA 1 (300 nM) und den Konjugaten **K1a** – **K7a** (100 nM). Die Proben wurden 3 h bei RT in Puffer Z inkubiert. Die erhaltene Fluoreszenz wurde auf eine 100 nM Lösung der jeweiligen Konjugate normiert. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen dar.

stärker inhibieren könnte. Mit der Negativkontrolle **K3a**, die auf der DNA 1 nur eine Mismatch-Bindestelle besaß, konnten Fluoreszenzwerte beobachtet werden, die denen der Sechsmers-PIPs entsprachen. Gleichzeitig waren die Werte deutlich geringer als die der Konjugate **K5a** und **K7a**. Daraus konnte abgeleitet werden, dass die Affinität der Konjugate wie erwartet in einem Mismatch-Fall deutlich abnahm und eine erfolgreiche Umleitung nur in einem Match-Fall gelingen sollte. Somit konnten die Ergebnisse der Band-Shift-Experimente in den Pulldown-Experimenten bestätigt werden. Da sich auch in diesen Versuchen zeigte, dass die Konjugate **K5a** und **K7a** ähnliche Eigenschaften besaßen, wurde zur Umleitung von Sp1, wie zuvor geplant, das Konjugat **K5a** verwendet.

Die ersten Umleitungsversuche wurden mit rekombinantem Sp1 (Promega) durchgeführt (Abbildung 51). Auch wenn in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Bindung der DNA 1 an die *Magnetic Beads* keinen Einfluss auf die Affinität von **K5a** besaß, war es dennoch denkbar, dass eine Bindung von Sp1 durch sterische Hinderung inhibiert werden könnte. Aus diesem Grund wurden die Konjugate **K5a** und **K6a** in Pulldown-Experimenten eingesetzt. Mit **K5a** wurde dabei eine gute Bindung von Sp1 erwartet, während der Effekt bei **K6a** deutlich geringer ausfallen sollte. Als Positivkontrolle wurde ein Duplex aus den DNAs **2a** (biotinyliert) und **3** verwendet, der eine direkte Bindestelle für Sp1 enthält. In diesen Experimenten sollte eine möglichst vollständige Komplexbildung erzielt werden, weshalb die Proben 20 h inkubiert wurden. Dabei zeigte sich mit **K5a** eine deutlich sichtbare Sp1-Bande (Lane 1), aus der sich schließen ließ, dass Sp1 umgeleitet werden konnte. Außerdem war die Umleitung mit **K5a** deutlich effizienter als mit **K6a** (Lane 2) und somit war davon auszugehen, dass auch hier keine sterischen Wechselwirkungen vorlagen. Gleichzeitig war die Bande mit **K6a** schwächer als bei einer Inkubation der DNA 1 mit Sp1 (Lane 3). Eine Erklärung hierfür wäre, dass das Sp1 an **K6a** gebunden war, sich jedoch kein stabiler Komplex mit der DNA 1 bildete. Daraufhin wurde

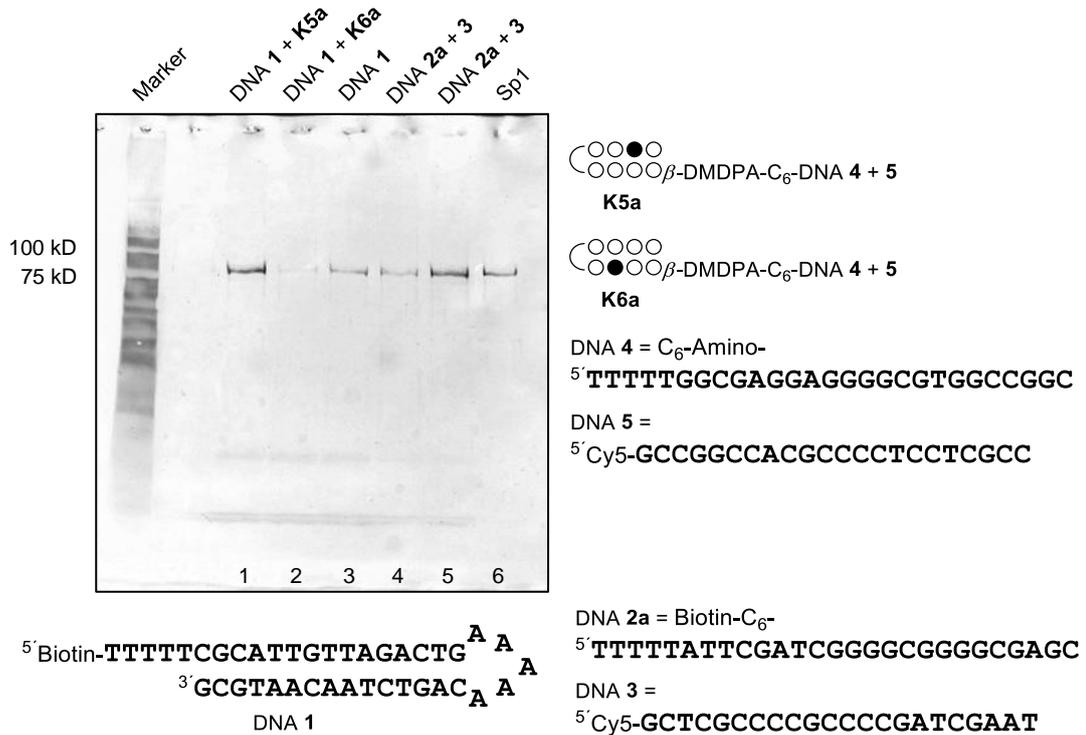


Abbildung 51: Umleitung von rekombinantem Sp1 mittels Pulldown-Experiment und nachfolgendem Western-Blot. Die Detektion der Banden erfolgte mit einem Sp1-spezifischen Antikörper. Lane 1: **K5a** (100 nM)+ DNA 1 (300 nM); Lane 2: **K6a** (100 M) + DNA 1 (300 nM); Lane 3: DNA 1 (300 nM); Lane 4: DNA 2a + 3 (je 100 nM); Lane 5: DNA 2 + 3 (ohne Cy5) (je 100 nM); Lane 6: Sp1 (1 µL). Die Proben wurden 20 h bei RT inkubiert. In allen Fällen wurde 1 µL einer Sp1-Lösung (215 ng/µL) eingesetzt.

das Sp1 mit dem Konjugat in den Waschschrinen entfernt. In nachfolgenden Experimenten mit **K5a** zeigte sich, dass ein vermitteltes Einfangen von Sp1 schon bei kürzeren Inkubationszeiten (3 h) möglich war. Somit konnte das Konzept der Umleitung auf eine nicht kanonische AT-reiche Bindestelle bestätigt werden. Allerdings war bei diesen Ergebnissen zu beachten, dass im Kontrollexperiment, bei welchem lediglich die DNA 1 mit Sp1 inkubiert wurde (Lane 3), uneinheitliche Ergebnisse erhalten wurden. Analog zu den fluoreszenzbasierten Pulldown-Experimenten variierte die Intensität der detektierten Sp1-Bande. Aufgrund dieser Befunde waren weitere Experimente notwendig, in denen auch untersucht werden sollte, ob die Umleitung mit dem Konjugat **K9** möglich war. An diesem Punkt trat jedoch das Problem auf, dass das rekombinante Sp1 nicht mehr durch Promega vertrieben wurde. Daraufhin wurde ein rekombinantes Sp1 eines anderen Hersteller bezogen, welches in Western-Blots aber nicht durch den in dieser Arbeit verwendeten Antikörper detektiert werden konnte. Schließlich isolierte man ein rekombinantes Sp1-H8 aus *E.coli* als HisTag-Fusionsprotein (vgl. Anhang 11.4), um eine besser Reinigung zu ermöglichen.

Mit dem so gewonnenen Sp1 konnten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. In ersten Experimenten fiel wiederum auf, dass das isolierte Sp1 eine überraschend hohe Affinität zur DNA 1 aufwies und im Western-Blot eine sehr starke Bande beobachtet werden

konnte. Im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Experimenten konnten hierbei jedoch keine Variationen in der Intensität der Banden beobachtet werden. Um auszuschließen, dass dieser oder die zuvor beobachteten Effekte durch den Puffer Z verursacht wurden, wiederholte man die Experimente in Puffer 1. Dieser wies einen geringeren Zuckeranteil auf (5 % statt 20 %), wodurch die Lösung eine verminderte Viskosität besaß, was die Waschschritte vereinfachte. Darüber hinaus war die Konzentration der Mg^{2+} -Ionen mit 2.5 mM deutlich geringer als im Puffer Z (12.5 mM) und stellte physiologische Bedingungen besser nach.^[219] Hierdurch sollten mögliche durch Mg^{2+} -Ionen vermittelte Bindungen verhindert werden. Diese Anpassungen führten zu einer minimalen Verbesserung, auch wenn die Affinität zur DNA 1 weiterhin sehr hoch war (Abbildung 52, Lane 1). Eine andere Erklärung für das Auftreten dieser Bande war eine mäßige Reinheit des isolierten Sp1. Die Aufreinigung erfolgte in diesem Fall lediglich über den His-Tag und so konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die gereinigten Fraktionen andere Proteine enthielten, durch die die Banden verursacht wurden. Um zu sehen wie spezifisch die Bindung der Proteine war, wurde die DNA 1 mit einem vierfachen Überschuss der DNA 6 inkubiert, die eine Bindestelle für Sp1 aufwies. Auf diese Weise konnte eine Bindung von Sp1 an die DNA 1 verhindert und nur eine sehr schwache Bande detektiert werden (Abbildung 52, Lane 2).

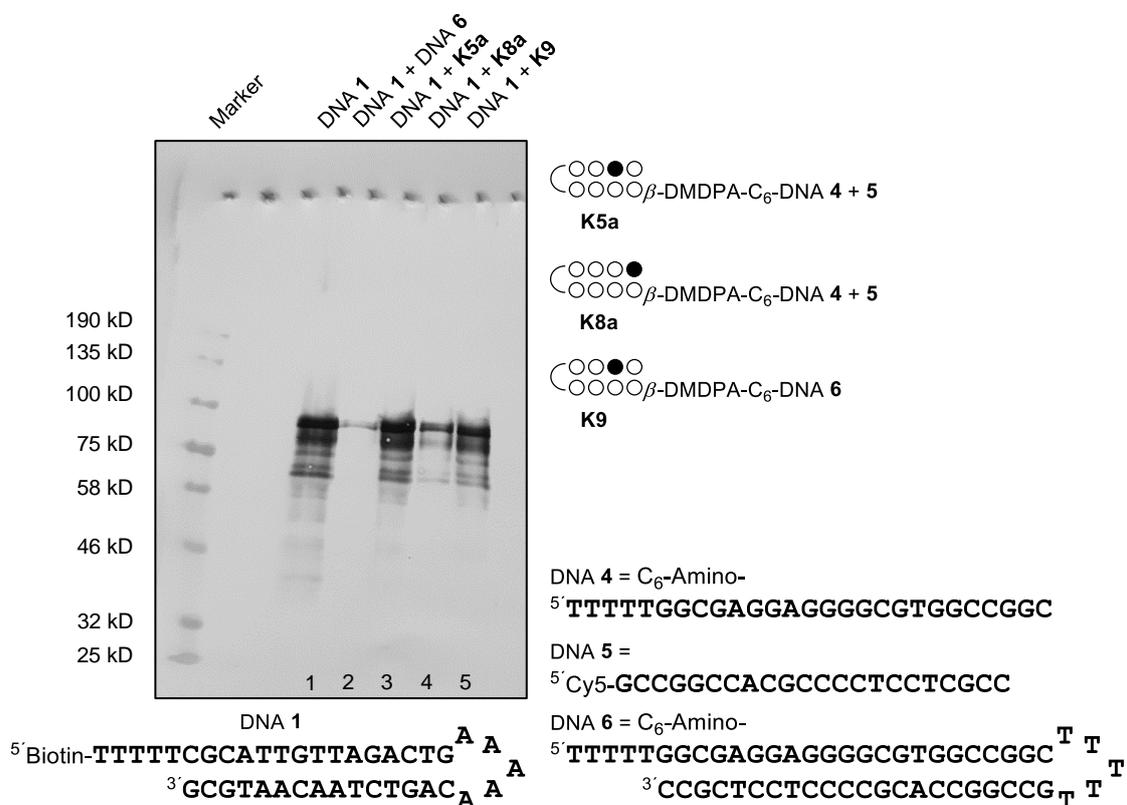


Abbildung 52: Umleitung von Sp1-H8 mittels Pull-down-Experiment und nachfolgendem Western-Blot. Die Detektion der Banden erfolgte mit einem Sp1-spezifischen Antikörper. Lane 1: DNA 1 (100 nM); Lane 2: DNA 1 (100 nM) + DNA 6 (400 nM); Lane 3: DNA 1 (100 nM) + K5a (400 nM); Lane 4: DNA 1 (100 nM) + K8a (400 nM); Lane 5: DNA 1 (100 nM) + K9 (400 nM). Die Proben wurden 3 h bei RT in Puffer 1 inkubiert.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnten Pulldown-Experimente mit Sp1-H8 und den Konjugaten **K5a**, **K8a** und **K9** durchgeführt werden. Dabei wurden die Konjugate ebenfalls im vierfachen Überschuss eingesetzt, um alles Sp1 zu binden. Dadurch sollte nach dem Waschen nur über das Konjugat gebundenes Sp1 zu detektieren sein. Die Konjugate **K5a** und **K9** (Abbildung 52, Lane 3 und 5) wiesen dabei eine starke Bande auf, was für eine Umleitung von Sp1 sprach. Mit der Negativkontrolle **K8a** war hingegen nur eine schwache Bande zu beobachten (Lane 4). Dies zeigte, dass bei einem Einsatz eines schlecht bindenden Konjugats das SP1 in den Waschschrritten entfernt werden konnten.

Aus diesen Versuchen ergibt sich weitere Evidenz für die Umleitung von Sp1. Die Adaptoren **K5a** und **K9** sollten daraufhin in Zellkulturexperimenten auf ihre Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung untersucht werden. Als Vorarbeiten hierzu war geplant, die Stabilität der Konjugate in HeLa-Cytosolen genauer zu untersuchen. Außerdem sollten die Affinität der PIP-Konjugate mit der von Adaptoren auf TFO-basis verglichen werden. Diese Systeme waren literaturbekannt und konnten in Zellkulturexperimenten die Genexpression aktivieren.^[7]

7.3.3 Stabilität der Konjugate in Zelllysaten

In den *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Umleitung von Sp1 grundsätzlich möglich war. Da für weitere Untersuchungen zur Funktion der Adaptoren Zellkulturexperimente geplant waren, wurde als Vorbereitung die Stabilität der Konjugate in einer zellulären Umgebung überprüft. Hierzu wurde das Konjugat **K5a** in HeLa-Cytosolen^[13] unterschiedlicher Konzentration (1.5, 5.2 und 6.6 µg/µL) sowohl bei RT als auch bei 37 °C inkubiert. In einem ersten Versuch wurde **K5a** in einem ein HeLa-Lysat mit einer geringen Proteinkonzentration (1.5 µg/µL) bei RT inkubiert und es konnte eine sehr hohe Stabilität des Konjugats beobachtet werden. Dabei konnte das Konjugat auch nach sechs Tagen nachgewiesen werden. In diesem Experiment zeigte sich zudem, dass die Bande von **K5a** in einem Bereich lag, in der keine zelleigenen ONs vorkamen. Somit war eine Detektion der Konjugat-Bande trotz starker Hintergrundbanden möglich. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde das Experiment mit höheren Proteinkonzentration (5.2 – 6.6 µg/µL) wiederholt, wobei von einer geringeren Stabilität der Konjugate auszugehen war. Tatsächlich war die Bande des Konjugats bereits nach einem Tag bei RT vollständig verschwunden und bei einer Inkubation bei 37 °C (Abbildung 53) war das Konjugat nur für 5 h nachzuweisen. Da der Adaptor im Cytosol für mehrere Stunden stabil war und analoge TFO-basierte Systeme trotz einer geringen Nukleasestabilität eine Aktivierung der Transkription auslösen konnten,^[7] war davon auszugehen, dass eine Aktivierung der Transkription auch mit den PIP-Konjugaten möglich sein sollte.

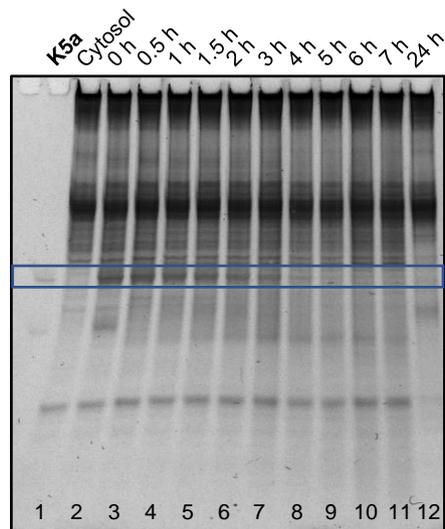


Abbildung 53: Stabilitätstest mit **K5a** (2 μ M) in HeLa-Lysat (5.2 μ g/ μ L gesamt Protein). Die Proben wurden bei 37 °C inkubiert. Die Bande des Adaptors wird durch den blauen Kasten markiert. Die starken Hintergrundbanden stammen von zelleigenen ONs.

7.4 Adaptoren auf TFO Basis

Da in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass die PIP-basierten Adaptoren **K5a** und **K9** Sp1 auf eine AT-reiche DNA umleiten konnten und in Zelllysaten eine ausreichende Stabilität besaßen, sollte ihre Affinität mit der von TFO-basierten Adaptoren verglichen werden. Diese wurden bereits zur Rekrutierung von TFs auf nicht kanonische Bindestellen und zur Aktivierung der Genexpression in Zellen eingesetzt.^[7,17,105] Dazu wurden Purin*Purin•Pyrimidin TFOs (Abbildung 6) mit einer *hairpin*-DNA kombiniert, welche eine Bindestelle für einen TF besaß.^[7] Es war daher naheliegend, das Konzept für die Umleitung von Sp1 zu adaptieren (Abbildung 54) und mit den PIP-Konjugaten zu vergleichen. Dazu musste die Ziel-DNA eine Bindestelle für die Konjugate **K5a** und **K9** enthalten. Ausgehend von einer durch Ghosh *et al.* verwendeten TFO-Sequenz (DNA **7**)^[105] wurde ein Sp1-bindendes *hairpin*-TFO (DNA **8**) entworfen. Die DNA **13** diente dabei als Ziel-DNA (Abbildung 55). Diese enthielt dabei eine Bindestelle für die PIP-Konjugate (rot), die im Bindebereich des TFOs lag. Da Polypurinsequenzen eine enge kleine Furche besitzen^[220] und dies die Bindung der PIPs erschweren kann, wurde eine zusätzliche Bindestelle in der Nähe des *turns* als Alternative eingefügt (blau), um eine Bindung der PIPs sicherzustellen. Abgesehen von der DNA **7** war geplant, weitere TFOs zu untersuchen, um einen möglichst affinen Adaptor zu erhalten. Da der Entwurf von TFOs nicht trivial und die Ausbildung von Triplexen nur teilweise vorhersehbar ist, wurde eine Arbeit von Vekhoff *et al.* als Vorlage verwendet.^[221] In dieser Arbeit wurden empirische Regeln aufgestellt, die auf der Verteilung und dem Anteil der verwendeten Basen (z.B. G und A)

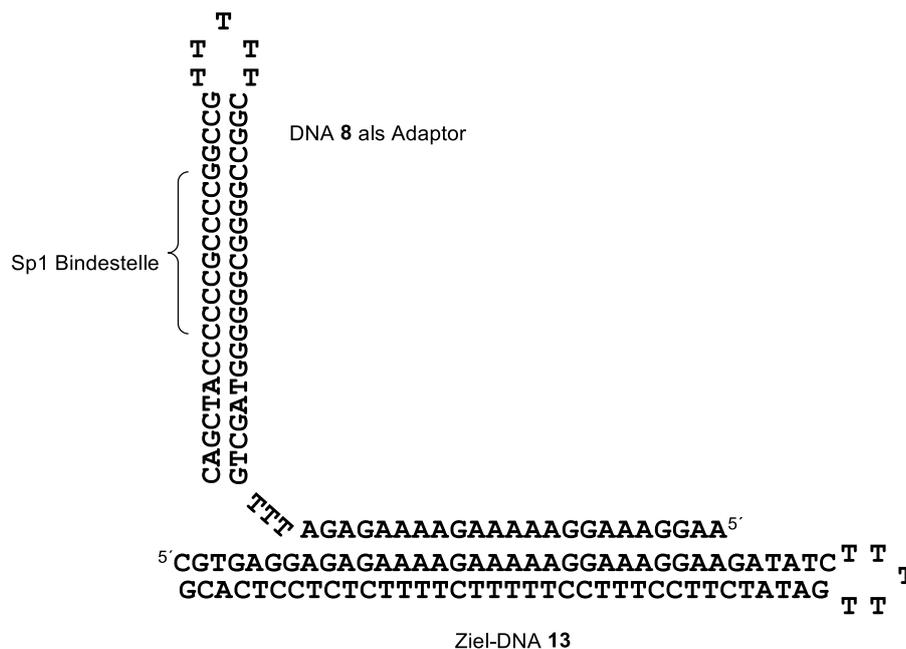


Abbildung 54: Allgemeine Darstellung der Bindung der TFO basierten Adaptoren an die entsprechende Ziel-DNA am Beispiel der DNAs **8** und **13**.



Abbildung 55: Sequenzen der verwendeten TFOs 7 – 12 sowie ihrer Ziel-DNAs 13 – 15. In den Ziel-DNAs 13 – 15 sind die jeweiligen Bindestellen für die TFOs unterstrichen. Die Bindestellen für die PIP-Konjugate sind rot und blau geschrieben.

beruhen. Auf dieser Basis konnte abgeschätzt werden, ob eine Triplexbildung wahrscheinlich ist. Bei Anwendung dieser Regeln zeigte sich, dass die Ausbildung einer Triplehelix mit der DNA 7 eher unwahrscheinlich war. Der Grund hierfür lag in einem zu hohen Anteil an As. Um die Wahrscheinlichkeit einer Triplexbildung zu erhöhen, wurde die Sequenz der DNA 7 unter Erhalt der PIP-Bindestelle variiert und der G-Anteil erhöht. Daraus resultierte mit DNA 9 ein neues TFO und mit DNA 10 eine entsprechende Variante der DNA 8. Die DNA 14 stellt die Ziel-DNA dar. Zusätzlich wurde ein 28mer entworfen (DNA 11), welches eine höhere Sequenzspezifität aufweisen und somit weniger Nebeneffekte generieren sollte. Auch dieses wurde unter Anwendung der Regeln aus der DNA 7 abgeleitet. Daraus resultierten die DNAs 11 und 12 sowie die Ziel-DNA 15 (Abbildung 55).

7.4.2 Band-Shift-Experimente mit den TFO-Adaptoren

Die entworfenen TFO-Adaptoren (DNA 8, 10, und 12) sollten in Band-Shift-Experimenten auf ihre Affinität zu ihren Ziel-DNAs 13 – 15 und auf ihre Selektivität hin untersucht werden. Gleichzeitig wollte man ihre Affinität mit der der PIP-Konjugate vergleichen. Darüber hinaus war geplant die Selektivität der TFOs anhand von Kreuzexperimenten nachzuweisen. Hierzu galt es zunächst geeignete Bedingungen zu finden, mit denen eine Triplexbildung zu beobachten war. In diesen Versuchen wurden im ersten Schritt die Cy5-markierten TFOs 7, 9, und 11 eingesetzt und die Banden der TFOs nach der Elektrophorese über die

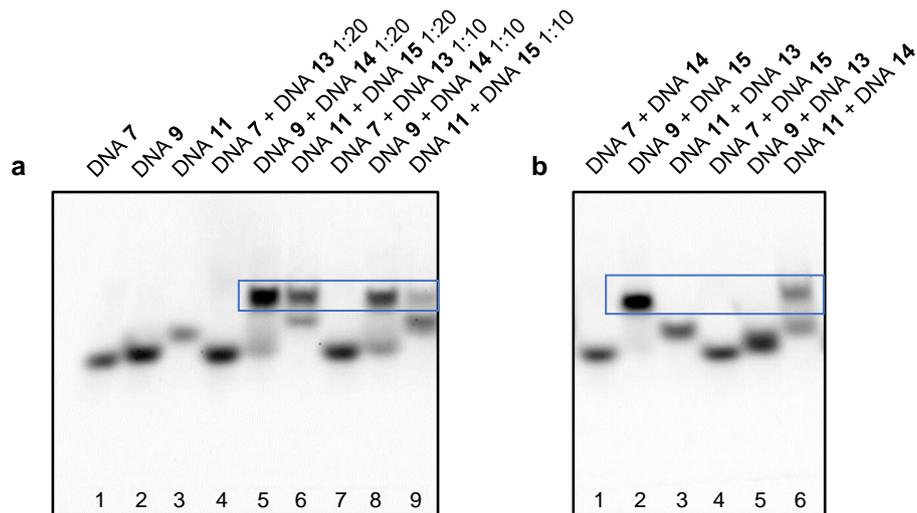


Abbildung 56: Band-Shift-Experiment mit Cy5 gelabelten TFOs. **a:** TFOs 7, 9 und 11 (je 500 nM) sowie die Ziel-DNAs 13, 14 und 15. Lane 1: DNA 7; Lane 2: DNA 9; Lane 3: DNA 11; Lane 4: DNA 7 + DNA 13 (5 μ M); Lane 5: DNA 9 + DNA 14 (5 μ M); Lane 6: DNA 11 + DNA 15 (5 μ M); Lane 7: DNA 7 + DNA 13 (10 μ M); Lane 8: DNA 9 + DNA 14 (10 μ M); Lane 9: DNA 11 + DNA 15 (10 μ M). : Kreuzexperimente mit den TFOs 7, 9 und 11 (je 500 nM) und den Ziel-DNAs 13, 14 und 15 (je 10 μ M). Lane 1: DNA 7 + DNA 14; Lane 2: DNA 9 + DNA 15; Lane 3: DNA 11 + DNA 13; Lane 4: DNA 7 + DNA 15; Lane 5: DNA 9 + DNA 13; Lane 6: DNA 11 + DNA 14. Die Proben wurden 20 h bei 37 °C inkubiert. 8 % nativ PAGE. Die Detektion der Banden erfolgte über die Cy5-markierten DNAs. Die Banden der entstandenen Komplexe sind blau eingerahmt.

Fluoreszenz detektiert.

Auf der Suche nach optimalen Verhältnissen, wurden die entsprechenden TFOs zunächst mit einem zehnfachen der Ziel-DNAs für 20 h bei 37 °C in Triplexpuffer (50 mM HEPES-NaOH pH 7.0, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂) inkubiert (Abbildung 56, **a**, Lane 7 – 9). Dabei konnte für die DNA 9 eine intensive neue Bande beobachtet werden (**a**, Lane 8), welche auf eine Triplexbildung schließen ließ. Diese war jedoch nicht vollständig. Für die DNA 11 war eine schwache Bindung zu beobachten (**a**, Lane 9), während mit der DNA 7 keine Triplexbildung stattfand (**a**, Lane 7). Bei Experimenten mit einem zehnfachen Überschuss der TFOs konnte in keinem Fall eine vollständige Triplexbildung beobachtet werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die TFOs mit einem 20fachen Überschuss der Ziel-DNAs inkubiert. In diesem Fall wies die DNA 9 eine fast vollständige Komplexbildung auf (Abbildung 56, **a**, Lane 5). Auch mit der DNA 11 konnte ein hoher Anteil des Triplex beobachtet werden (**a**, Lane 6), während mit der DNA 7 keine Effekte auftraten. Somit war dieses TFO unter den gewählten Bedingungen nicht zu einer Triplexbildung in der Lage und für die gewünschte Anwendung ungeeignet.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Spezifität der Triplexbildung in Kreuzexperimenten untersucht. Hierbei wurden keine Effekte erwartet, da sich die Sequenzen der DNAs 7, 9 und 11 weitgehend unterschieden. Entgegen dieser Annahme konnte eine Triplexbildung sowohl zwischen den DNAs 9 und 15 als auch zwischen 11 und 14 beobachtet werden (Abbildung 56, **b**, blauer Kasten). Dabei war die Komplexbildung der

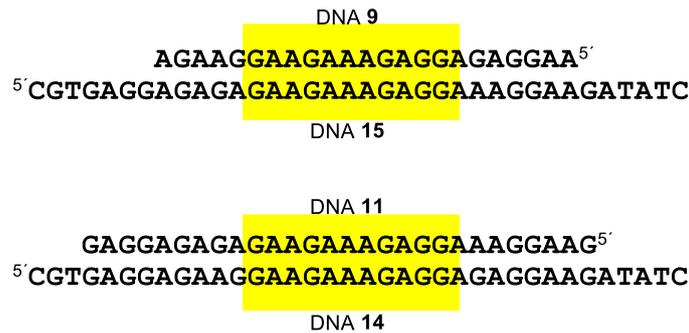


Abbildung 57: Mismatch-Stellen zwischen den DNAs **9** und **15** sowie **11** und **14**. Die Bindestellen sind gelb unterlegt. Dabei sind nur die Purinsträng der DNAs **14** und **15** gezeigt.

DNA **9** mit der DNA **15** (**b**, Lane 2) sogar vergleichbar mit der der eigentlichen Ziel-DNA **14** (**a**, Lane 5). Aufgrund dieser Befunde wurden die Sequenzen der TFOs **9** und **11** verglichen und eine Übereinstimmung von 12 Nukleotiden gefunden (Abbildung 57, gelb). Da für beide TFOs eine gute Bindung beobachtet werden konnte, lag die Annahme nahe, dass die Komplexbildung über diese 12 Nukleotide erfolgte. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Ausprägung der Effekte wäre, dass längere ungebundene Bereiche die Affinität durch eine erhöhte elektrostatische Repulsion herabsetzten. Dadurch würde die DNA **11** schwächer binden als die DNA **9**. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Triplexbildung deutlich weniger selektiv war als angenommen und die Komplexbildung auch mit Teilsequenzen der TFOs möglich war. Dabei betrug die Teilsequenz wahrscheinlich 12 Nukleotide und lag somit unter den 16, die für eine spezifische Anwendung in Organismen benötigt würden.

Da mit den TFOs **9** und **11** Bedingungen gefunden wurden, die eine Triplexbildung ermöglichten, wurde als nächstes die Fragestellung untersucht, ob der *hairpin* in den Adaptoren **8**, **10** und **12** einen Einfluss auf die Affinität besaß. Auch hierzu wurden Band-Shift-Experimente durchgeführt (Abbildung 58). Dabei konnten die vorherigen Ergebnisse bestätigt werden und mit der DNA **10** eine deutliche Komplexbildung beobachtet werden (Lane 5, blauer Kasten). Allerdings war in diesem Fall ein größerer Anteil des freien Adaptors zu beobachten als im Fall der DNA **9**. Dies deutete darauf hin, dass die Affinität des Adaptors aufgrund des *hairpins* geringer war als bei dem entsprechenden TFO. Auch für die DNA **12** konnte eine Komplexbildung beobachtet werden (Lane 8, roter Kasten). Diese war jedoch deutlich geringer als bei dem entsprechenden TFO **11**, was ebenfalls auf eine Abnahme der Affinität schließen ließ. Mit der DNA **8** zeigten sich, wie in den Experimenten mit DNA **7**, keine Effekte (Lane 2). Im Anschluss wurden die Experimente in Puffer Z wiederholt, um zu überprüfen, ob K⁺-Ionen und höhere Mg²⁺-Konzentrationen die Triplexbildung beeinflussten. In den Versuchen konnte jedoch kein Unterschied beobachtet werden. In weiteren Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass die DNA **10**, analog zu DNA **9**, einen Komplex mit der DNA **15**

bildete. Dies zeigte, dass die Spezifität der *hairpin*-TFOs ebenfalls geringer als erwartet war. Dennoch konnte anhand der Band-Shift-Experimente gezeigt werden, dass der Adaptor **10** zur Umleitung von Sp1 geeignet war. Allerdings war die Affinität der Adaptoren deutlich geringer als die der PIP-Adaptoren an DNA **1**.

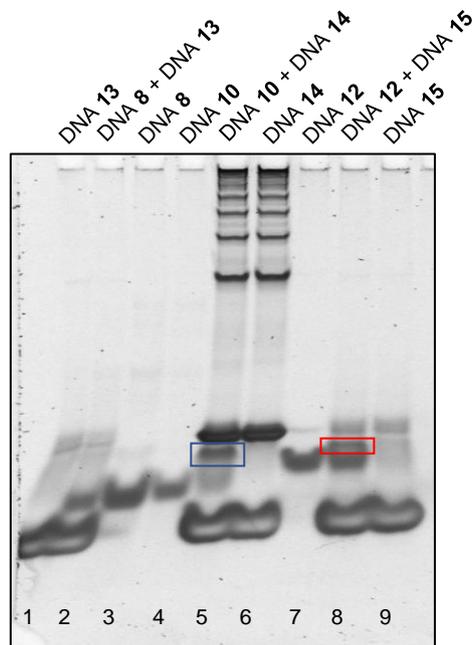


Abbildung 58: Band-Shift mit den DNAs **8**, **10** und **12** (je 200 nM) und den Ziel-DNAs **13**, **14** oder **15** (je 4 µM). Lane 1: DNA **13**, Lane 2: DNA **8** + DNA **13**; Lane 3: DNA **8**; Lane 4: DNA **10**; Lane 5: DNA **10** + DNA **14**; Lane 6: DNA **14**; Lane 7: DNA **11**; Lane 8: DNA **11** + DNA **15**; Lane 9: DNA **15**. Die Proben wurden 23 h bei 37 °C in Triplexpuffer inkubiert. 8 % nativ PAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold. Die Banden der Triplexe sind farbig markiert. Die DNA **14** wurde im Vorfeld dieses Experiments nicht *annealed*. Dadurch lagen neben dem *hairpin* selbstkomplementäre Oligomere vor.

7.4.3 Vergleich der TFO-Adaptoren mit den PIP-Konjugaten

Um die TFO-Adaptoren mit den PIP-basierten Systemen genauer vergleichen zu können, war es notwendig, sie unter analogen Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurde das Konjugat **K5a** mit den DNAs **13** – **15** (Abbildung 59) in Triplexpuffer bei 37 °C inkubiert. Um auszuschließen, dass sich die Affinität von **K5a** im Triplexpuffer änderte, wurde die DNA **1** als Kontrolle eingesetzt. Zusätzlich sollte die Bindung von **K5a** an die DNA **1** mit der an die DNAs **13** – **15** verglichen werden. Hierbei war zu beachten, dass die DNAs zwei Bindestellen für **K5a** aufwiesen (Abbildung 59, rot und blau) und somit auch eine mehrfache Bindung des Konjugats möglich war. Dies könnte zu verschiedenen Komplexen führen, welche ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen sollten. Auch dies wurde in den Band-Shift-Experimenten untersucht. Aufgrund der zuvor mit den PIP-Konjugaten erhaltenen Ergebnisse wurde **K5a** in einem vierfachen Überschuss eingesetzt. Die

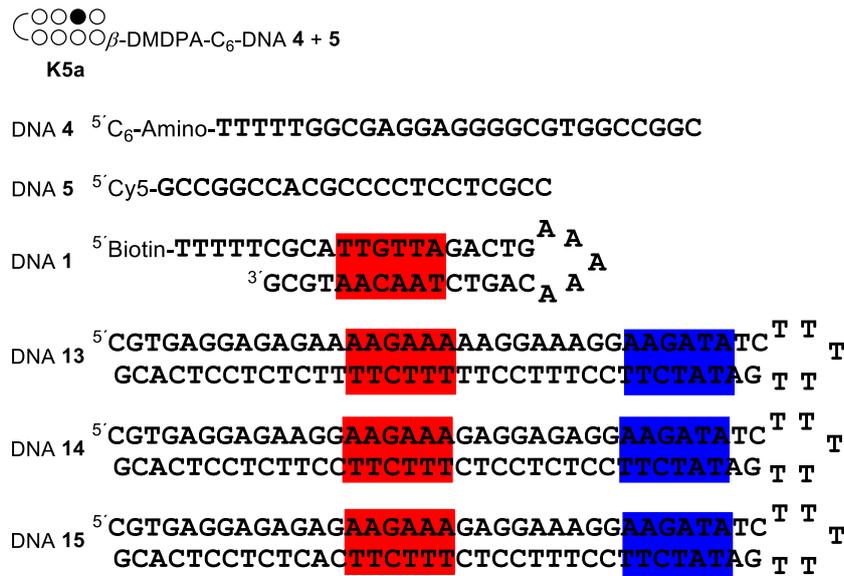


Abbildung 59: Für die Band-Shift-Experimente eingesetzte ONs. Die Bindestellen für **K5a** sind rot unterlegt. Die alternativen Bindestellen für die Konjugate sind blau unterlegt.

Detektion der Banden erfolgte dabei sowohl über eine Färbung des Gels als auch über das Cy5-gelabelte Konjugat (Abbildung 60, **a** und **b**). Analog zu den vorhergehenden Experimenten war die Bande der DNA **1** nach der Bindung des Konjugats **K5a** kaum noch nachzuweisen, wodurch eine Störung der Komplexbildung durch den Puffer auszuschließen war (Abbildung 60, **a**, Lane 3). Auch die Bande der DNA **13** war nach der Inkubation mit **K5a** sehr geschwächt und der entstehende Komplex migrierte deutlich langsamer (Abbildung 60, **a**, Lane 4). In beiden Fällen konnte auch in der Cy5-Detektion beobachtet werden, dass das Konjugat eine kürzerer Laufstrecke aufwies (**b**, Lane 3 und 4) als im ungebundenen Fall (**b**, Lane 1). Zudem zeigte sich mit der DNA **13**, dass die Bande des Komplexes nur etwa ein Drittel der Intensität des freien Konjugats aufwies. Von den vier Äquivalenten des Adaptors wäre demnach nur einer gebunden. Daraus kann auf eine 1:1 Stöchiometrie geschlossen werden. Im analogen Experiment mit den DNAs **14** und **15** konnte jedoch kein klarer Band-Shift beobachtet werden (**a**, **b**, Lane 5 und 6). Allerdings wurde das Konjugat im Überschuss eingesetzt und es war nicht auszuschließen, dass die Bande des Komplexes durch die des freien Konjugats überlagert wurde. Um eine bessere Auflösung zu erhalten, wurde das Experiment mit einem Unterschuss von **K5a** wiederholt (Abbildung 60, **c**). Wie im vorhergehenden Experiment führte die Komplexbildung von **K5a** mit den DNAs **1** und **13** zu einer langsameren Migration (**c**, Lane 2 und 3). Dabei zeigte sich, die beobachtete Laufstrecke des Komplexes aus DNA **13** und **K5a** unabhängig von der Konzentration des Konjugats war (vgl. **b**, Lane 4 und **c** Lane 3) und auch dies sprach für eine einfache Bindung von **K5a** an DNA **13**. Im Fall der DNAs **14** und **15** konnte nun ebenfalls eine langsamere Migration des Adaptors beobachtet werden und die Banden waren deutlich fokussierter als die des freien Konjugats (Abbildung 60, **c**, Lane 4 und 5).

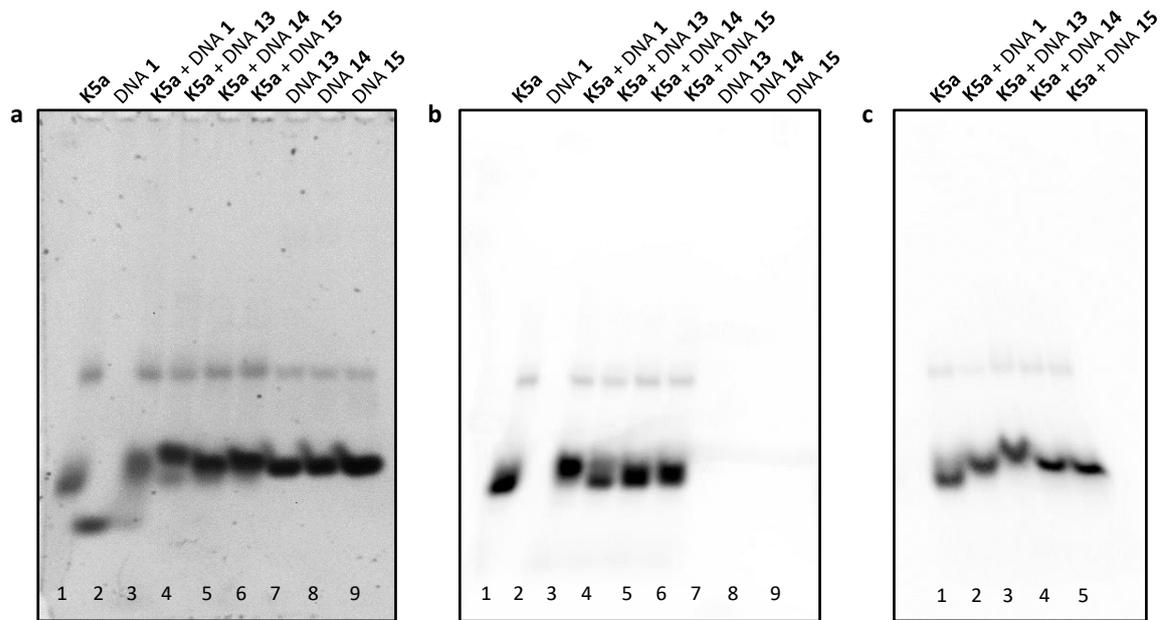


Abbildung 60: Band-Shift mit den Ziel-DNAs **1** sowie **13 – 15** und **K5a**. **a + b:** **K5a** (2 µM), Ziel-DNAs (0.5 µM). Lane 1: **K5a**; Lane 2: DNA **1**; Lane 3: **K5a** + DNA **1**; Lane 4: **K5a** + DNA **13**; Lane 5: **K5a** + DNA **14**; Lane 6: **K5a** + DNA **15**; Lane 7: DNA **13**; Lane 8: DNA **14**; Lane 9: DNA **15**. **c:** **K5a** (0.5 µM), Ziel-DNAs (2 µM). Lane 1: **K5a**; Lane 2: **K5a** + DNA **1**; Lane 3: **K5a** + DNA **13**; Lane 4: **K5a** + DNA **14**; Lane 5: **K5a** + DNA **15**. Die Proben wurden 20 h bei 37 °C in Triplexpuffer inkubiert. 8% nativ PAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold (**a**) oder über die Cy5-markierten DNA **5** (**b + c**).

Daraus ließ sich schließen, dass **K5a** auch mit den DNAs **14** und **15** vollständig komplexierte. Allerdings war der Effekt auf die Laufstrecke geringer war als im Fall der DNA **13**. Aus dieser Beobachtung konnten zwei Schlüsse gezogen werden. Dies deutete einerseits darauf hin, dass auf den DNAs **14** und **15** nur eine der Bindestellen besetzt wurde und bedeutete andererseits, dass sich die Bindestelle auf DNA **13** von denen der anderen DNAs unterscheiden musste. Da die Bindestelle in der Nähe des *turns* auf allen DNAs identisch ist, konnte davon ausgegangen werden, dass **K5a** mit der rot markierten Stelle assoziiert (Abbildung 59). Außerdem war aufgrund des größeren Shifts von DNA **13** anzunehmen, dass die Affinität von **K5a** zu dieser Bindestelle höher war als zu den rot markierten Sequenzen in DNA **14** und **15**. Für diese DNAs konnte keine direkte Aussage über die Bindestellen getroffen werden. Da es im Fall der DNA **13** jedoch keine Hinweise auf eine Komplexierung der blauen Sequenz gab, war anzunehmen, dass diese auch in den DNAs **14** und **15** nicht mit **K5a** interagiert. Somit kann geschlossen werden, dass für die Wechselwirkung von **K5a** mit seinen Ziel-DNAs die jeweils roten Positionen verantwortlich sind. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Affinität zu den Bindestellen besteht darin, dass der Bereich auf der DNA **13** von A•T-Paaren umgeben ist, welche im Allgemeinen zu einer höheren Affinität der PIPs führen,^[131] während die Bindestellen auf den DNAs **14** und **15** von G•C-Paaren abgeschlossen wurden. Die entscheidende Erkenntnis war jedoch, dass eine Mehrfachbindung an die DNAs **13 – 15**

unwahrscheinlich und somit ein Vergleich der PIP-Konjugate mit den TFO-Adaptoren ohne Berücksichtigung der zweiten Bindestelle möglich ist.

In den Band-Shift-Experimenten mit **K5a** konnte bei einem vierfachen Überschuss der Ziel-DNAs **13 – 15** in keinem der Fälle eine Bande des freien Konjugats beobachtet werden. Somit war davon auszugehen, dass die Affinitäten von **K5a** zu den DNAs **13 – 15** in einem ähnlichen Bereich lagen, wie die zu DNA **1** und damit deutlich höhere Affinitäten als die TFO-Adaptoren besaßen, bei denen auch bei einer fünffach höheren Konzentration der Ziel-DNAs kein vollständiges Verschwinden der Adaptor-Bande zu beobachten war. Darüber hinaus war auch die Spezifität der TFOs geringer als erwartet und lag unter den erforderlichen 16 bp, womit auch dieser potenzielle Vorteil der TFOs weniger ausgeprägt war. Ein weiterer Vorteil der PIP-Konjugate ist, dass sie auch bei einem Überschuss zur Ziel-DNA binden, was bei den TFOs nicht beobachtet wurde. Des Weiteren war die Zielsequenz der PIP-Adaptoren deutlich flexibler zu wählen als die der TFOs. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden mit den TFO-Adaptoren keine Pulldown-Experimente durchgeführt, da die Adaptoren nicht effektiv genug waren. Da für eine Bindung der TFO-Adaptoren ein 20facher Überschuss des Targets benötigt wurde und in den vorangegangenen Experimenten eine hohe unspezifische Bindung des rekombinanten Sp1 zu beobachten war, konnte zudem angenommen werden, dass die TFO-Adaptoren nicht mit den Pulldown-Experimenten kompatibel waren. Aus diesem Grund sollten vorrangig die PIP-Adaptoren eingesetzt werden und auf ihre Fähigkeit, die Expression eines Modellprotein zu aktivieren, getestet werden. In Rahmen dieser Experimente war geplant, auch die DNA **10** einzusetzen und mit den PIP-Konjugaten zu vergleichen. Ein Grund hierfür war, dass mit den PIP-Konjugaten stärkere *off-target*-Effekte zu erwarten waren und dies zu einer verminderten Transkriptionsaktivierung führen könnte. Mit den TFO-Adaptoren sollten diese Effekte geringer sein und somit war eine stärkere Genexpression nicht auszuschließen.

7.5 Zellkulturversuche mit K9

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die PIP-basierten Adaptoren Sp1 auf eine nicht natürliche Bindestelle umleiten konnten. Dies lieferte jedoch keinen Hinweis, ob auch die Transkription aktiviert werden könnte. Um dies zu überprüfen, waren Zellkulturexperimente geplant, in denen die Aktivierung der Transkription durch einen Luciferase-Assay detektiert werden sollte. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Marschalek wurde die Zielsequenz der DNA **9** (^{5'}AGAAGGAAGAAAGAGGAGAGGAA) fünfmal in die Promotorregion der Luciferase eingebaut und diese konnte sowohl von dem PIP-Adaptor **K9** als auch von dem TFO-Adaptor **10** aktiviert werden. Zur Normierung diente eine konstante Expression von GFP. Um gleichbleibende Ergebnisse zu erhalten, wurden dazu stabil transfizierte HeLa-Zellen über ein Sleeping-Beauty-Transposon^[222] hergestellt. In den Zellkulturexperimenten wurde zunächst das Konjugat **K9** eingesetzt, mit dem die besten Ergebnisse zu erwarten waren. Dieses wurde ohne Transfektionsreagenzien eingesetzt, da aus Arbeiten zu TF *decoys* bekannt war, dass kurze dsDNAs in Zellen aufgenommen werden können^[199] und auch die PIPs zellgängige Moleküle sind.^[15] Dabei konnten im hohen nanomolaren Bereich minimale Effekte beobachtet werden, die auf eine erhöhte Transkription hindeuten. Da es sich um einen ersten Test handelte, wurde **K9** lediglich mit unbehandelten Zellen verglichen und auf weitere Kontrollen verzichtet. Aus diesen Gründen zeigen die Ergebnisse zwar, dass die Zugabe des Adaptors wohlmöglich zu einer erhöhten Transkription führt. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Umleitung von Sp1 oder ein anderer Mechanismus dafür verantwortlich war. Weitere Experimente wurden wegen eines Defekts des Messgeräts ausgesetzt und konnten wegen der Covid-19-Pandemie nicht fortgeführt werden.

7.6 Bausteine für pseudokomplementäre PNA

Als weitere Klasse DNA-bindender Moleküle fiel die Wahl auf pseudokomplementäre PNAs. Diese enthalten anstelle der Basen A und T Diaminopurin (D) und Thiouracil (U_s) wodurch eine Selbsthybridisierung der PNAs durch sterische Wechselwirkungen verhindert wird. Gleichzeitig bilden sie stabile Duplices mit der DNA und sind zur Doppelstranginvasion in der Lage.^[223] Die Synthese der PNAs war mittels Fmoc-basierter Festphasensynthese geplant, wofür die Monomere **46** und **47** benötigt wurden (Abbildung 61, **a**), welche nicht kommerziell verfügbar waren^[75] und synthetisiert werden mussten. In der Bachelorarbeit von Kerim Yilmaz^[224] konnte der Baustein **46** erfolgreich aufgebaut werden, während die Synthese des Monomers **47** nicht gelang. Hierbei war insbesondere die Synthese der Verbindung **48** (Abbildung 61, **b**) problematisch, da das gewünschte Isomer nur zu 35 % erhalten wurde und zusätzlich eine Alkylierung am N3 (**48a**) und am Sauerstoff (**48b**) beobachtet wurde. Auch in der nachfolgenden Verseifung konnten nur mäßige Ausbeuten erhalten werden, da die stark säurelabile 2-Methyl-4-methoxybenzyl-Gruppe (MMPM) eine saure Aufarbeitung der Reaktion verhinderte. In der vorliegenden Arbeit sollte die Synthese des Monomers **47** optimiert werden.

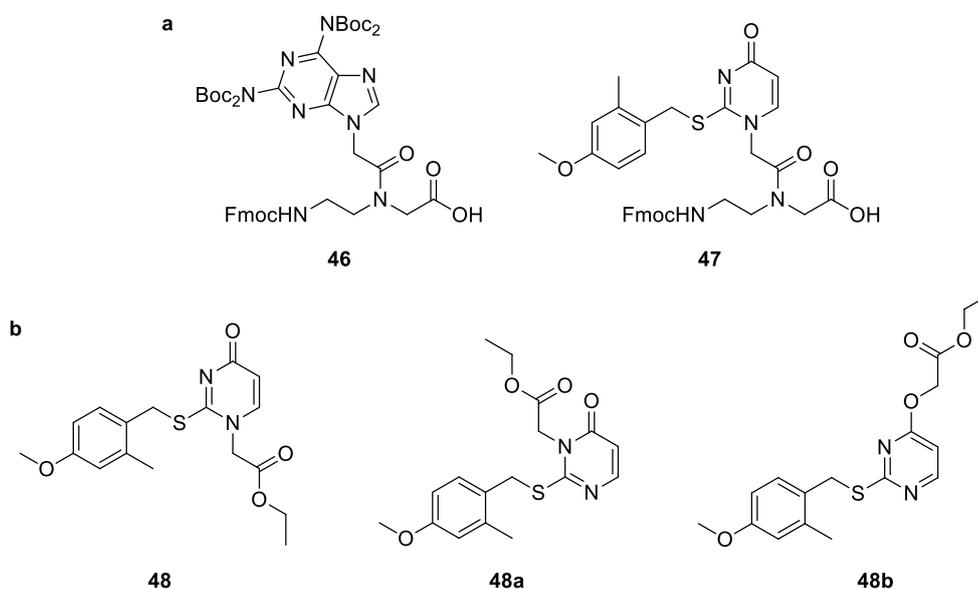
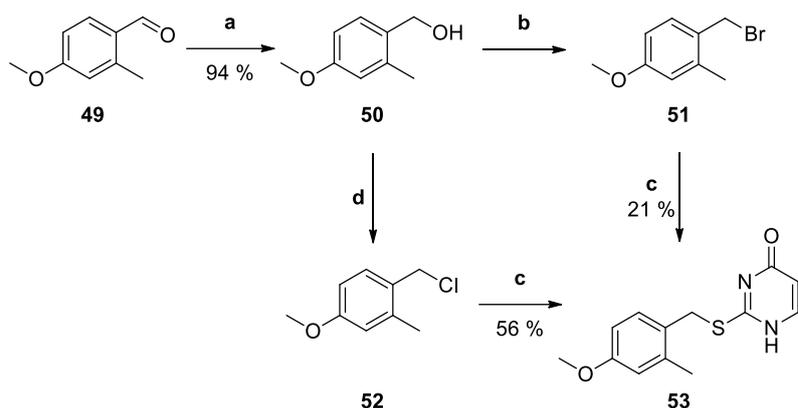


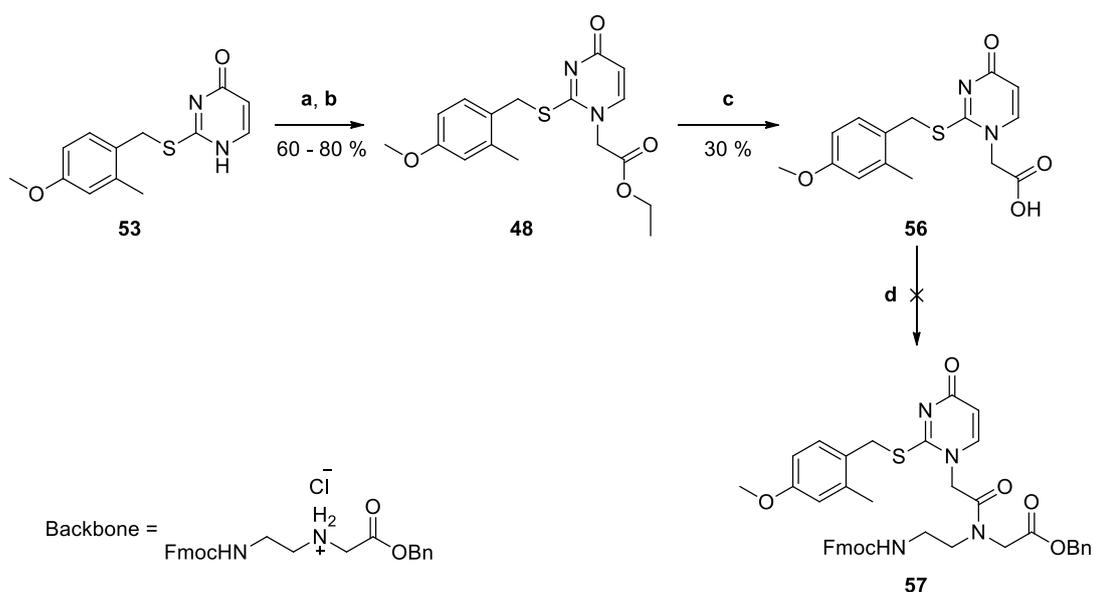
Abbildung 61: a: Monomere für die Festphasensynthese pseudokomplementärer PNAs. b: Produkte bei der Alkylierung des MMPM-geschützten Thiouracils.

Für die Synthese der Verbindung **48** musste zunächst U_s mit der MMPM-Gruppe geschützt werden (Schema 24). Dazu wurde, ausgehend von Aldehyd **49**, das Bromid **51** synthetisiert, welches dann weiter mit U_s umgesetzt wurde. Zwar gelang die Synthese von Verbindung **51** in guten Ausbeuten, allerdings zeigte sich, dass die Verbindung sehr reaktiv war und schon bei Raumtemperatur zur Polymerisation neigte. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des U_s , musste die Reaktion in einem Gemisch aus EtOH und KOH durchgeführt



Schema 24: Synthese von Verbindung **53**. **a:** NaBH₄, MeOH, RT; **b:** PBr₃, DCM; **c:** Thiouracil, KOH, EtOH/H₂O; RT; **d:** TMSCl, RT.

werden, wobei **51** mit EtOH zum einem Ethoxyether reagierte und **53** nur in schlechten Ausbeuten (21 %) erhalten wurde. Um dies zu umgehen, wurde der Alkohol **50** zunächst *in situ* in das weniger reaktive Chlorid **52** überführt^[225] und zu der Lösung des U_s gegeben. Auf diese Weise konnte **53** in mäßigen Ausbeuten (56 %) erhalten werden. Da eine Alkylierung der Verbindung **53** mit NaOEt in EtOH sowie dem Bromid **54** (Abbildung 62) nur mit einer geringen Selektivität an N1 verlief, musste ein Weg gefunden werden, die Reaktion von N3 sowie des Sauerstoffs zu verhindern. Hierzu wurde der Sauerstoff des U_s zunächst *in situ* mit TMS geschützt.^[226,227] Aufgrund des sterischen Anspruchs der TMS-Gruppe konnte dadurch auch das N3 des U_s abgeschirmt werden. Allerdings war eine Alkylierung mit dem Bromid **54** nicht mehr möglich und es musste das Triflat **55** (Abbildung 62) eingesetzt werden.^[227] Die Verbindung **48** konnte in guten Ausbeuten erhalten werden (60 – 80 %). Da die Reaktion unter leicht sauren Bedingungen verlief, durfte die Silylierung jedoch nicht länger als 1 h dauern, da ansonsten die MMPM-Gruppe



Schema 25: Synthese von Verbindung **57**. **a:** 1. HMDS, Saccharin, **b:** **55**, DCM, Reflux; **c:** LiOH, MeOH/THF/H₂O (3:7:1), RT; **d:** 1. HBTU, DIPEA, 2. Backbone, DMF, RT. Die Verbindung **57** konnte nicht isoliert werden.

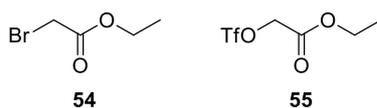
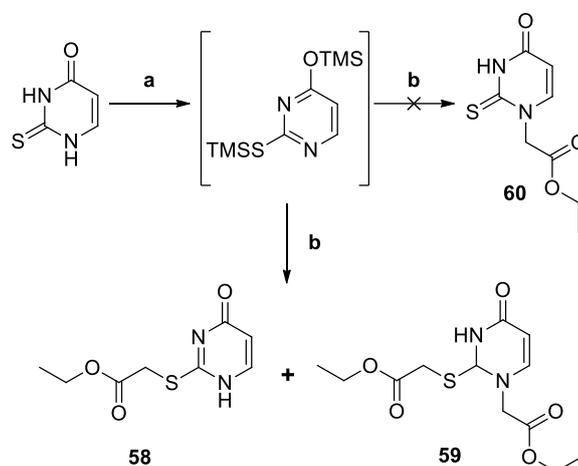


Abbildung 62: Alkylierungsmittel für N1 des MMPM-geschützten Thiouracils.

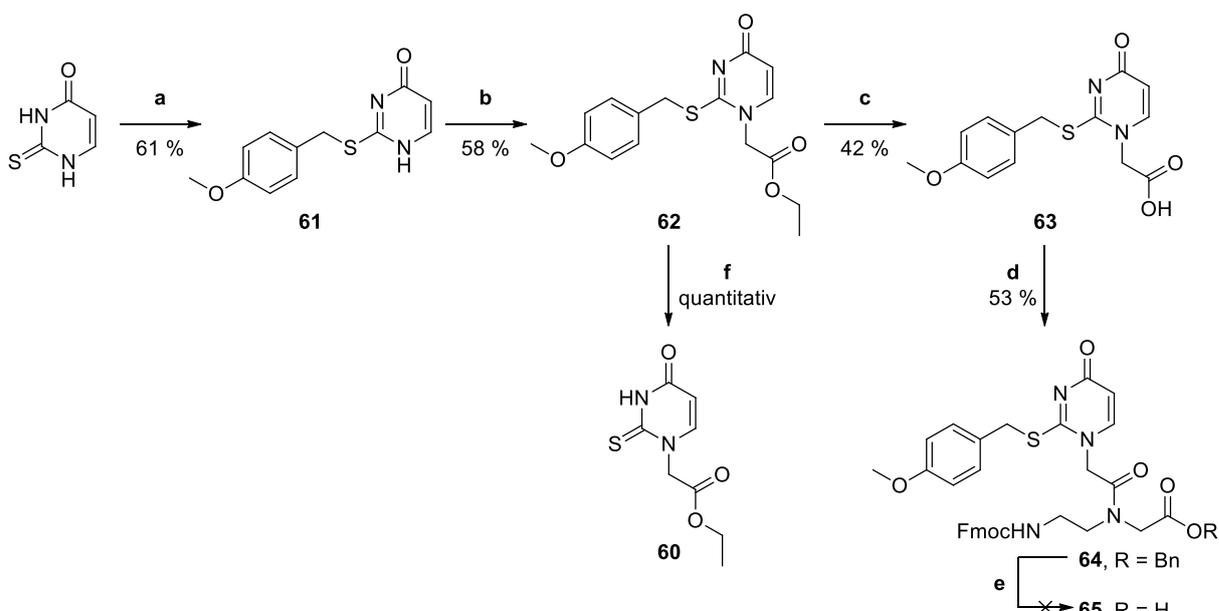
abgespalten wurde und dies zur Alkylierung des Schwefels führte (analog zu Schema 26). Im Anschluss wurde **48** zu Verbindung **56** verseift. Dabei war in einer Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie eine schnelle und vollständige Umsetzung zu beobachten. Jedoch erwies sich die Aufarbeitung als kompliziert, da die Lösung aufgrund der Labilität der Schutzgruppe nicht angesäuert werden konnte. Dies erschwerte die Präzipitation der Verbindung **56**, welche nur in schlechten Ausbeuten (30 %) und geringen Mengen (max. 14 mg) erhalten werden konnte. Die erhaltene Carbonsäure wurde daraufhin mit dem Backbone verknüpft und mittels Massenspektrometrie konnte die Verbindung **57** nachgewiesen werden. Allerdings gelang eine Isolierung der Verbindung nicht. Hierbei war die geringe Zugänglichkeit der Carbonsäure ein entscheidender Faktor und so wurde eine alternative Syntheseroute der Verbindung **56** getestet, in der zunächst die Säurefunktion und dann die Schutzgruppe eingeführt werden sollte. Dazu musste die Verbindung **60** aufgebaut werden (Schema 26), indem das U_s zunächst *in situ* silyliert und im Anschluss mit Verbindung **55** alkyliert wurde. Allerdings war die Synthese von **60** auf diese Weise nicht möglich und es konnten lediglich die Verbindungen **58** und **59** isoliert werden.



Schema 26: Versuch der direkten Alkylierung von 2-Thiouracil. Allerdings konnten nur die Verbindungen **58** und **59** isoliert werden. **a:** HMDs, Saccharin, DCM, 60 °C; **b:** **55**, DCM, 60 °C.

Nachdem die Synthese der Verbindung **56** nicht in ausreichenden Mengen erhalten werden konnte und die hohe Säurelabilität der MMPM-Gruppe ein großes Problem darstellte, war es notwendig, eine stabilere Schutzgruppe zu verwenden. Hierbei fiel die Wahl auf die in der Boc-basierte Festphasensynthese genutzte PMB-Gruppe,^[228] welche elektronenärmer als die MMPM-Gruppe war. Da die Entfernung der Schutzgruppen in der Boc-basierten Festphasensynthese mit einer Mischung aus Trifluormethansulfonsäure und TFA erfolgte, während im Fmoc-basierten Fall TFA/TIPS/H₂O (95:2.5:2.5) eingesetzt wurde, stellte sich

die Frage, ob die PMB-Gruppe in der Fmoc-Synthese eingesetzt werden konnte. In einer Arbeit von Góngora-Benítez *et al.* an PMB-geschützten Cystein konnte gezeigt werden, dass eine Entfernung der PMB-Gruppe mit 95%iger TFA in 2 h bei 40 °C möglich war.^[229] Da das Thiouracil eine bessere Abgangsgruppe darstellen sollte, wurde davon ausgegangen, dass die Schutzgruppe auch in 1 h bei RT entfernt werden könnte. Zur Überprüfung wurde die Verbindung **62** synthetisiert (Schema 27) und im Anschluss in einer Mischung aus TFA/TIPS/H₂O (95:2.5:2.5) zu Verbindung **60** entschützt. Dazu wurde zunächst U₅ mit PMBCl zu Verbindung **61** umgesetzt, wobei höhere Ausbeuten (61 %) als in der vergleichbaren Reaktion zu Verbindung **53** (max. 56 %) erhalten wurden. Im Anschluss erfolgte die Alkylierung an N1 analog zur Synthese von **48**. Aufgrund der größeren Stabilität der PMB-Gruppe, war die Reaktionszeit in diesem Fall weniger kritisch und es konnten vergleichbare Ausbeuten (58 %) zur Synthese von **48** erhalten werden. Um die Abspaltung der PMB-Gruppe zu testen, wurde Verbindung **62** in TFA/TIPS/H₂O (95:2.5:2.5) aufgenommen und 1 h bei RT inkubiert. Dabei konnte mittels DC-Kontrolle bereits nach 30 min ein deutlicher und nach 1 h ein vollständiger Umsatz der Verbindung **62** beobachtet werden. Nach Entfernen des Lösemittels wurde das Rohprodukt mittels Massen- und NMR-Spektrometrie untersucht (Abbildung 63). Dabei konnte eine vollständige Entfernung der PMB-Gruppe beobachtet und das erhaltene Produkt als Verbindung **60** identifiziert werden. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die PMB-Gruppe als Schutzgruppe geeignet war, sollte daraus das entsprechende Monomer **65** synthetisiert werden. Dazu wurde Verbindung **62** mit LiOH verseift und die



Schema 27: Synthese von Verbindung **64**. **a:** 1. KOH, 2. PMBCl, EtOH/H₂O, 61 %, RT; **b:** 1. HMDS, Saccharin, 2. **55**, DCM Reflux; **c:** LiOH, MeOH/THF/H₂O (3:7:1), RT; **d:** 1. HBTU, DIPEA, 2. Backbone, DMF, RT; **e:** NaOH, THF/H₂O, RT; **f:** TFA/TIPS/H₂O (95:2.5:2.5), 1 h, RT.

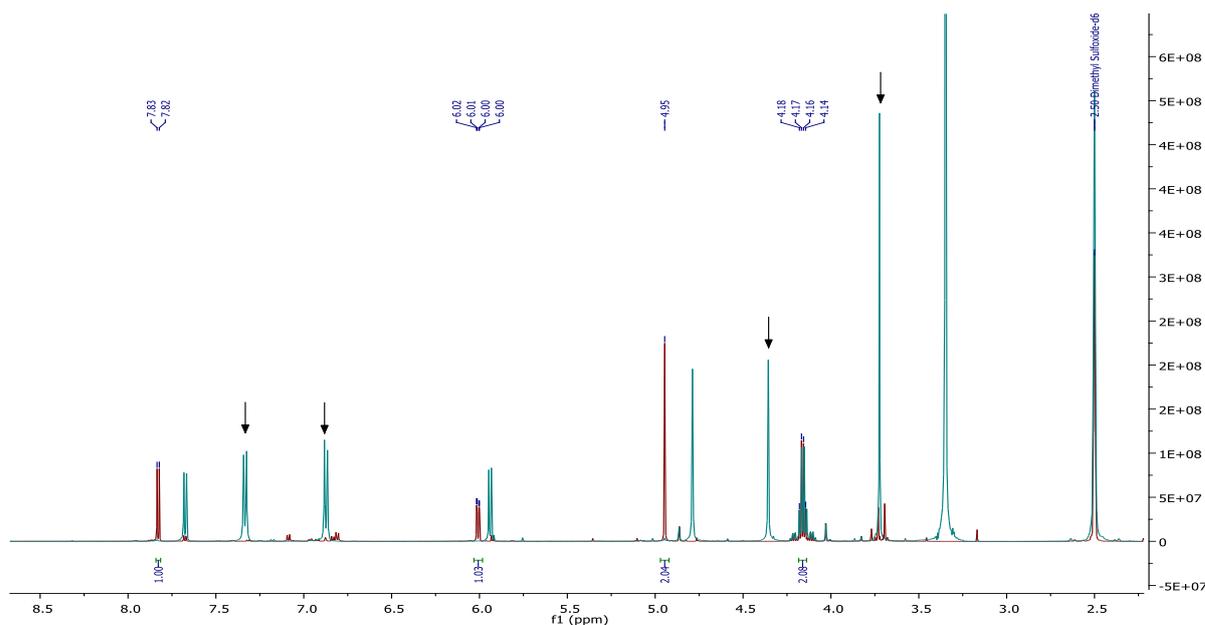


Abbildung 63: Überlagerung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verbindungen **62** vor (blau) und **60** nach (rot) der Inkubation in TFA/TIPS/ H_2O (95:2.5:2.5). Die Signale der PMB-Gruppe sind mit Pfeilen markiert. Nach der Reaktion waren diese Signale nicht mehr zu beobachten und die erhaltene Verbindung entsprach **60**.

Reaktion verlief in deutlich höheren Ausbeuten (53 %) als bei der MMPM geschützten Verbindung (42 %). Im Anschluss wurde Verbindung **63** an das PNA-Backbone gekuppelt, wobei man **64** in moderaten Ausbeuten (53 %) erhielt. Die Verseifung der Verbindung **64** zum Monomer **65** misslang jedoch, da neben der Benzyl- auch die Fmoc-Gruppe entfernt wurde.

Nachdem in dieser Arbeit eine effiziente und selektive Methode zur Alkylierung von U_s entworfen und eine mit PMB eine geeignete Schutzgruppe für die Fmoc-basierte Festphasensynthese gefunden wurde, führte Frau Catharina Kost dieses Thema in ihrer Masterarbeit fort.^[230] Dort konnte das Monomer **65** erfolgreich synthetisiert und in eine PNA eingebaut werden. Zeitgleich wurde durch Hudson *et al.* ebenfalls die Synthese eines PMB-geschützten Thiouracils-Monomers publiziert.^[205]

8 Umleitung von hAgo2 mittels Adaptormolekülen

MiRNAs sind kurze nicht kodierende RNAs mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden.^[21,231] Diese können von Ago2 gebunden werden und bilden so RISCs (*RNA-induced silencing complexes*) aus. Diese interagieren über die *seed*-Region mit der 3'-UTR von mRNAs und inhibieren deren Transkription (Abbildung 64, **a**). Dies erfolgt über die Rekrutierung von GW-Proteinen wie TNRC6, welche den Abbau der mRNA auslösen.^[174] Eine Dysregulation der miRNAs kann im Zusammenhang mit vielen schweren Krankheiten, wie Krebs, beobachtet werden.^[232] Dabei ist in vielen Fällen eine Überexpression bestimmter miRNAs, beispielsweise des miR-17/92 Clusters,^[191] zu beobachten. Eine Möglichkeit überexprimierte miRNAs zu inhibieren, stellen sogenannte anti-miRs dar, welche an die *seed*-Region eines RISC binden (Abbildung 64, **b**).^[182,183] Neben ihrer Überexpression kann auch das Fehlen von miRNAs ein Auslöser von Krankheiten sein. In diesen Fällen kann die Funktion der miRNAs durch doppelsträngige miR-Mimics wiederhergestellt werden.^[180] Durch eine kombinierte Transfektion von anti-miRs und miR-Mimics ist es möglich, onkogene miRNAs zu inhibieren und gleichzeitig tumorunterdrückende Funktionen der Zellen zu reaktivieren.^[79]

Da die Wirkung der RISCs über Protein-Protein-Kontakte erfolgt, entstand in unserer Gruppe die Idee, Adaptormoleküle zu verwenden, um RISCs auf nicht kanonische mRNAs umzuleiten (Abbildung 64, **c**). Auf diese Weise wäre es mit einem Molekül möglich, sowohl

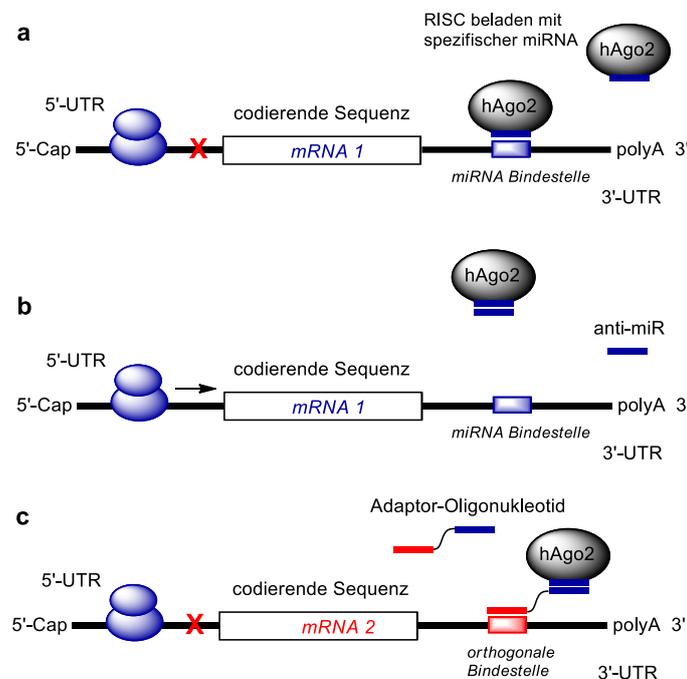


Abbildung 64: Allgemeines Konzept zur Umleitung von RISC. **a:** Ein RISC bindet an die 3'-UTR einer mRNA. Die miRNA und ihre Bindestelle sind in Blau gezeigt. **b:** Ein anti-miR ON bindet an den RISC und verhindert die Bindung an die 3'-UTR. Dadurch wird die mRNA translatiert. **c:** Der Adaptor bindet mit dem blauen Teil den RISC und leitet ihn mit dem roten Part auf die 3'-UTR einer zweiten mRNA. Dadurch wird die Translation unterdrückt. Ribosome sind durch blaue Ovale dargestellt.^[13]

onkogene miRNAs als auch tumorfördernde Proteine zu inhibieren. Um sowohl die miRNA als auch die mRNA adressieren zu können, musste der Adaptor aus zwei ONs bestehen. Hierbei stellt eine Hälfte des Adaptors ein anti-miR dar, welches RISCs bindet, während die andere Hälfte als ASO fungiert, welches gegen eine entsprechende mRNA gerichtet ist. Zur Verknüpfung der beiden Hälften wurde mit einem Hexaethylenglycol-Linker (HEG) ein möglichst langer und hydrophiler Linker verwendet. Mit diesem sollte einerseits eine sterische Abstoßung zwischen RISC und der mRNA verhindert und andererseits eine hydrophobe Kontraktion vermieden werden. In dieser Arbeit war geplant, das Konzept der Umleitung mittels Pulldown-Experimenten zu überprüfen. Dazu sollte zunächst ein Cy5-gelabeltes miRNA-Mimic auf eine orthogonale Ziel-RNA umgeleitet werden. Im Anschluss waren Pulldown-Experimente geplant, in denen RISCs aus HeLa-Lysaten isoliert und dann mittels Western-Blot detektiert wurden. Als Ziel-miRNA wurde die miR-20a gewählt (RNA **17** und **17a**, Abbildung 65), welche zum miR-17/92 Cluster gehört und in vielen Tumorzelllinien überexprimiert ist. Die Ziel-RNA musste hinsichtlich ihrer Sequenz orthogonal zur miR-20a sein und durfte zudem keine Bindestellen für RISCs enthalten. Dies traf für die RNA **19** zu. Um einen möglichst nukleaseresistenten Adaptor zu erhalten, wurde der Adaptor **18** vollständig aus LNA-Basen aufgebaut. Um die Effektivität des Adaptors mit einem anti-miR vergleichen zu können, wurde die gegen miR-20a gerichtete LNA **16** als Kontrolle verwendet.

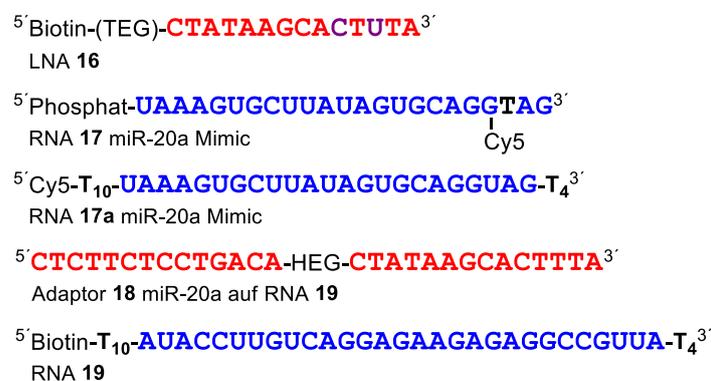


Abbildung 65: Für die Pulldown-Experimente benötigte ONs. Dabei steht Rot für LNA, Violett für 2'-Methoxy RNA, Blau für RNA und Schwarz für DNA. LNA **16** bindet unmittelbar an die RNAs **17** und **17a**. Die Bindung dieser miRNA-Modelle an die nicht komplementäre RNA **19** hingegen, bedarf der Vermittlung durch das Adaptormolekül **18**.

Parallel zu den *in vitro* Experimenten sollten die Adaptoren in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Hartmann von der Philipps Universität Marburg zu Umleitungsexperimenten in Zellkulturen eingesetzt werden. Für diese Experimente wurden chronisch-myeloische Leukämiezellen (K562) verwendet, von denen bekannt war, dass sie miR-20a überexprimierten. Zu den Zielen der miR-20a gehört das tumorunterdrückende Protein p21, welches Apoptose auslösen kann.^[183] In der Hartmann-Gruppe konnte zuvor gezeigt werden, dass die Zugabe einer gegen miR-20a gerichteten LNA zu einer erhöhten

p21-Expression führte.^[183] Als weiteres Ziel des Adaptors wurde die tumorfördernde Proteinkinase Pim-1 gewählt. Diese wird in K562-Zellen überexprimiert und fördert das Zellwachstum.^[233,234] Aus vorhergehenden Arbeiten der Hartmann-Gruppe war ebenfalls bekannt, dass die *PIM1*-mRNA durch eine siRNA an Position 1491, als auch durch ein Mimic der miR-33a desaktiviert werden konnte.^[233]. Davon ausgehend wurden zwei Adaptormoleküle entworfen, welche die miRNA-20a an diese Stellen umleiten konnten (Adaptor **20** und **21**, Abbildung 66). Zusätzlich wurde der Adaptor **22** als Transfektionskontrolle eingesetzt. Dieser war gegen die RNA **19** gerichtet und konnte keine miRNA binden. Mit diesen Adaptoren sollten die Pim-1-Level in K562-Zellen gesenkt und gleichzeitig die p21-Level erhöht werden. Darüber hinaus konnte Adaptor **22** als Negativkontrolle in den Pulldown-Experimenten verwendet werden.

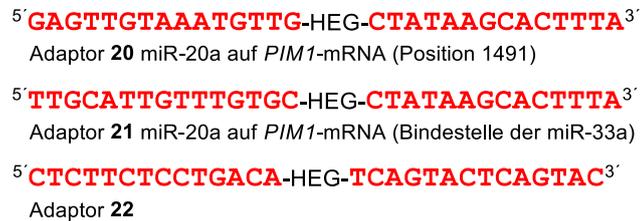


Abbildung 66: LNA-Adaptoren für die Zellkulturexperimente.

8.2 Band-Shift und Pulldown-Experimente mit den LNA-Adaptoren

Zur Bestätigung des Konzepts der Umleitung wurden fluoreszenzbasierte Pulldown-Experimente durchgeführt. Die biotinylierte RNA **19** stellte in diesem Versuch ein Modell der 3'-UTR dar, auf die ein RISC mittels Adaptormolekül umgeleitet werden sollte. Im ersten Schritt dieser Versuche wurde das fluoreszenzmarkierte miR-Mimic **17a** anstelle des natürlichen miRNA-hAgo2-Komplexes verwendet. Eine direkte Komplementarität zwischen Ziel-RNA **19** und miR-Mimic **17a** besteht nicht. Diese muss erst durch den Adaptor vermittelt werden. Im fluoreszenzbasierten Experiment wurde die RNA **19** an *Magnetic Beads* gebunden und im Anschluss mit RNA **17a** in Puffer 2 (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂) inkubiert. Nach dem Entfernen der ungebundenen RNA konnte in Anwesenheit des Adaptors **18** eine ca. 100fach höhere Fluoreszenz detektiert werden als in dessen Abwesenheit (das fluoreszenzmarkierte miRNA-Modell wurde zur Messung bei pH 10 von den *Magnetic Beads* abgelöst). Da in einem analogen Versuch mit der direkt an Adaptor **17a** bindenden anti-miR-LNA **16** ein vergleichbarer Wert erhalten wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die Umleitung effektiv war. Allerdings fiel in diesen Experimenten auf, dass die RNA **19** abgebaut wurde. Das hatte zur Folge, dass mit RNA **19** beladene *Beads* nicht gelagert werden konnten. Die hohe Instabilität gegen Nukleasen verhinderte außerdem ihren Einsatz in der Isolierung von RISCs aus HeLa-Lysaten. Aus diesem Grund wurden die Experimente mit der analogen 2'-OMe-RNA **23** wiederholt und der Adaptor **22** als Negativkontrolle eingesetzt (Abbildung 67). Auch in diesen Fall konnte in Anwesenheit des Adaptors eine deutlich erhöhte Fluoreszenz gegenüber dem ON **23** beobachtet werden (92fach), und auch mit dem Adaptor **22** konnte keine Bindung der RNA **17a** beobachtet werden, wodurch das Konzept der Umleitung auf Basis von ONs bestätigt wurde.

Zur weiteren Bestätigung des Konzepts wurde in einem Pulldown-Experiment versucht, miR-20a beladene RISCs aus HeLa-Lysaten zu isolieren. Die Detektion der Komplexe

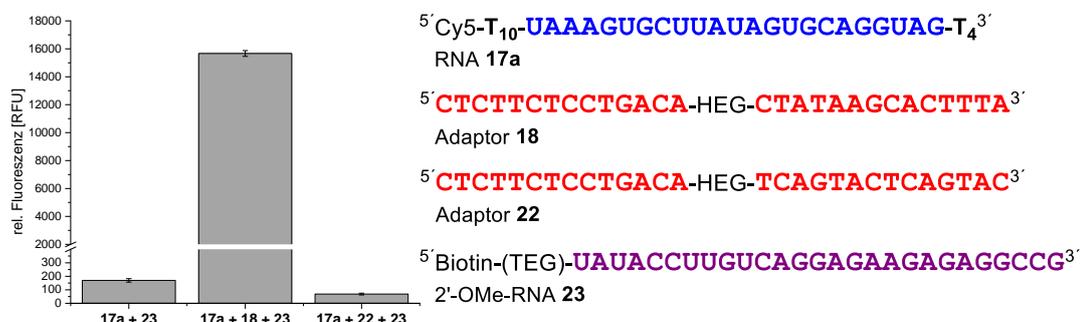


Abbildung 67: Ergebnisse der Pulldown-Experimente mit den ONs **17a**, **18**, **22** und **23** (je 100 nM). Dabei konnte mit dem Adaptor **18** eine Erhöhung der Fluoreszenz um den Faktor 92 beobachtet werden. Inkubation: 3 h, RT in Puffer 2.

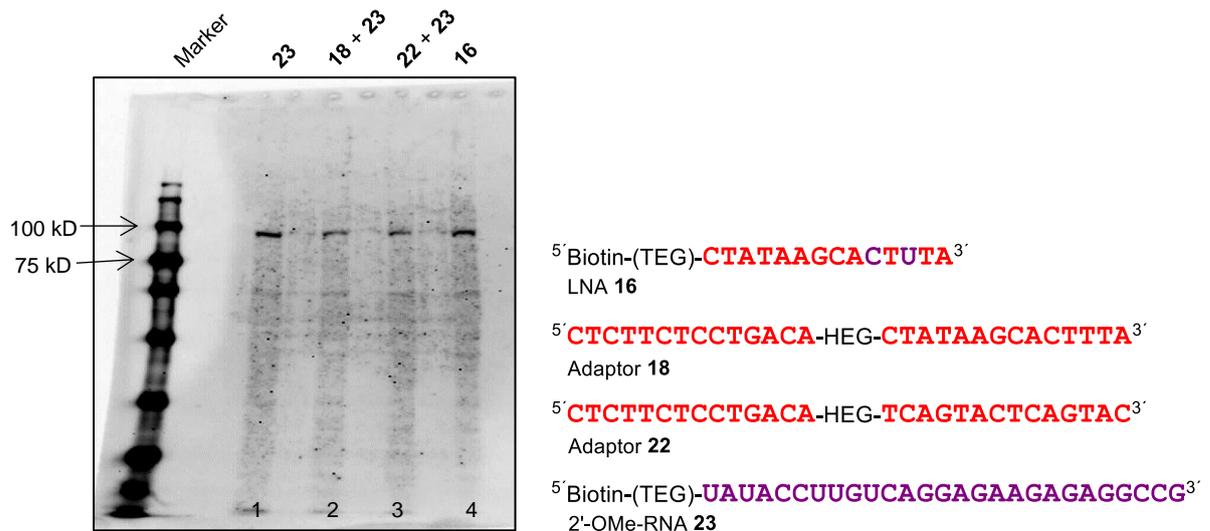


Abbildung 68: Isolation von RISC-Komplexen mit 2'-OMe-RNA **23** mit den Adaptoren **18** oder **22**. Lane 1: ON **23** (100 nM); Lane 2: ON **23** (100 nM) + Adaptor **18** (100 nM); Lane 3: ON **23** (100 nM) + Adaptor **22** (100 nM); Lane 4: LNA **16** (100 nM). Die Proben wurden 3 h in HeLa-Lysat inkubiert.

erfolgte mittels eines nachfolgenden Western-Blots (Abbildung 68). In der Positivkontrolle mit LNA **16** (Lane 4), die nicht nur die fluoreszenzbasierten miRNA-Modelle **17** und **17a**, sondern auch die natürlichen RISCs binden sollte, wurde wie erhofft eine starke Bande beobachtet, die im erwarteten Größenbereich von 100 kD lag. Im eigentlichen Umleitungsexperiment mit dem biotinylierten ON **23** und Adaptor **18** konnte jedoch nur eine schwache Bande beobachtet werden (Lane 2). Als Negativkontrolle wurde auch ein Versuch mit ON **23** und Adaptor **22** durchgeführt (Lane 4). LNA **22** ist komplementär zu ON **23** nicht aber zu miR-20a. Die Bandenintensität im Western-Blot war jedoch vergleichbar stark mit Lane 2. Völlig unerwartet war die starke hAgo2-Bande mit ON **23** allein (Lane 1), deren Intensität dem Ergebnis des Versuchs mit LNA **16** entsprach. Bei der Auswahl der Sequenz von ON **23** war nicht überprüft worden, ob diese Sequenz nicht andere hoch exprimierte miRNA unmittelbar binden könnte. Dies ist offensichtlich der Fall. Bei einer nachträglichen Überprüfung fand sich in ON **23** eine Mismatch-Bindestelle für die miR-let-7-Familie (Abbildung 69), bei der die Basen drei bis sieben der *seed*-Region komplementär waren und das Nukleotid an Position zwei ein G•U-Wobble-Paar bilden konnte. Auch wenn die Bindung von RISCs an Mismatch-Stellen nicht häufig vorkommt,^[171] gab es in diesem Fall zwei Gründe, die für eine Bindung sprachen. Einerseits beinhaltet die miR-let-7-Familie einige der am höchsten exprimierten miRNAs und andererseits besitzen

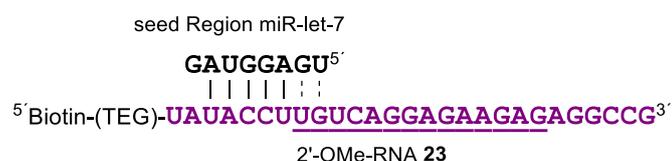


Abbildung 69: Bindestelle für miR-let-7 auf dem ON **23**. Dabei sind die Basen 3 – 7 komplementär und das Nukleotid 2 kann ein G•U-Wobble-Paar bilden. Die Bindestelle der Adaptoren ist unterstrichen.

2'-OMe-RNAs eine höhere Affinität zu RISCs als entsprechende RNAs. Eine Kombination dieser Faktoren könnte die beobachtete starke hAgo2-Bande in Lane 1 erklären. Da die Bindestelle für miR-let-7 in unmittelbarer Nachbarschaft zur Ziel-Sequenz der Adaptoren **18** und **22** lag, würde die Zugabe dieser Adaptoren zu ON **23** das Andocken von miR-let-7 abschwächen, was die schwachen Banden in Lane 2 und 3 erklärt. In der Kombination von ON **23** und Adaptor **18** sollte bei erfolgreicher Umleitung aber ähnlich viel hAgo2 isoliert werden können, wie mit LNA **16**. Dies ist aber nicht der Fall.

Da die Ergebnisse des Western-Blots im Gegensatz zu den Pulldown-Experimenten mit RNA **17a** standen, sollte die Komplexbildung des Adaptors in Band-Shift-Experimenten betrachtet werden (Abbildung 70, Lane 1 – 6). Hierzu wurde Adaptor **18** bei RT mit den Ziel-ONs **17** und **23** inkubiert und es sollte überprüft werden, ob die Bildung des ternären Komplexes vollständig war oder andere Sekundärstrukturen auftraten. Im Zuge dieser Experimente zeigte sich, dass der Adaptor **18** partiell als Dimer vorlag (Lane 2 – 6, roter Kasten). Dennoch konnten der Adaptor mit den ONs **17** und **23** hybridisieren (Lane 4 – 6). Während der Duplex aus Adaptor **18** und RNA **17** (Lane 5, schwarz) deutlich unter dem ternären Komplex (Lane 6, orange) lief, traf dies für den Duplex aus ON **23** und Adaptor **18** nicht zu (Lane 4, grün) und die ausgebildete Struktur zeigte ein stärker retardiertes

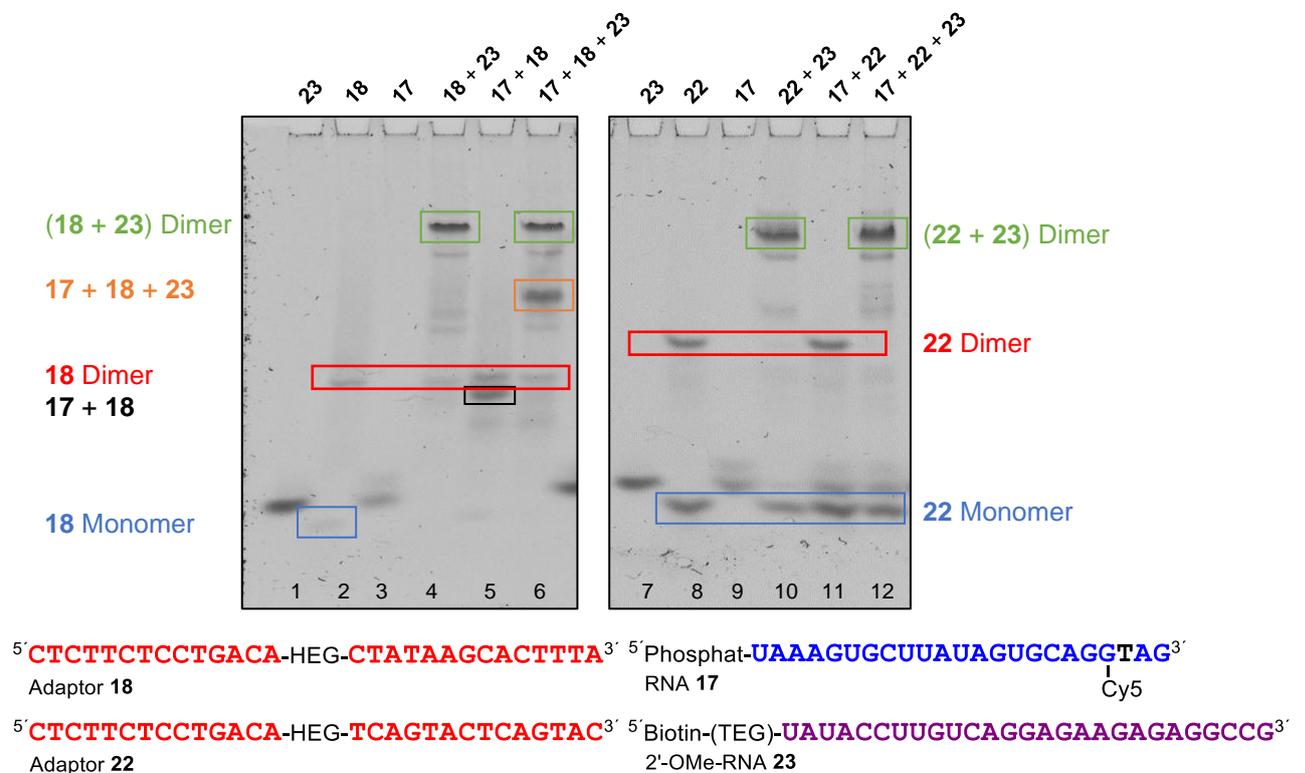


Abbildung 70: Band-Shift Experimente mit Adaptor **18** (Lane 1 – 6) und Adaptor **22** (Lane 7 – 10). Lane 1 und 7: ON **23**; Lane 2: Adaptor **18**; Lane 8: Adaptor **22**; Lane 3 und 9: RNA **17**; Lane 4 und 10: ON **23** + Adaptor **18** oder **22**; Lane 5 und 11: RNA **17** + Adaptor **18** oder **22**; Lane 6 und 12: RNA **17** + ON **23** + Adaptor **18** oder **22**. Die Proben wurden 3 h bei RT in Puffer 2 inkubiert. Die Konzentration der ON betrug in allen Fälle ungefähr 1 μ M. 16 % nativ PAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold.

Laufverhalten als der ternäre Komplex. Das ließ auf eine größere Struktur schließen und in Kombination mit dem beobachteten Dimer des Adaptors deutete dies auf einen quartären Komplex hin. Hierbei müssten zwei Adaptoren über die gegen miR-20a gerichteten Stränge hybridisieren (Abbildung 72). In Gegenwart aller ONs war jedoch der ternäre Komplex die bevorzugte Struktur dar (Lane 6). Trotz dieser Beobachtung konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Dimerisierung des Adaptors die Bindung der RISCs verhinderte.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollten auch die anderen Adaptoren in Band-Shift-Experimenten auf mögliche Sekundärstrukturen untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass der Adaptor **22** ebenfalls partiell als Dimer vorlag (Abbildung 70, Lane 8 + 11, rot). Analog zu Adaptor **18** konnte jedoch eine gute Bindung an das ON **23** beobachtet werden (Lane 10, blau), wobei das Dimer deutlich besser als das Monomer band und wodurch auch hier ein quartärer Komplex entstand.

Das Experiment mit dem gegen die Nukleotide ab Position 1491 der *PIM1*-mRNA gerichteten Adaptor **20** zeigte, dass dieser als Monomer vorlag und nur eine geringe Dimerisierung aufwies (Abbildung 71, Lane 3). Zur besseren Detektion der gebildeten Spezies wurden zusätzlich zu der Färbung des Gels auch die Cy5-gelabelten ONs detektiert und die Bilder überlagert. Mit der RNA **25** konnte eine vollständige Hybridisierung beobachtet werden. Der entstandene Komplex wies jedoch ein stark retardiertes Laufverhalten auf (Lane 4, grün), was darauf hindeutete, dass auch in diesem Fall die gegen miR-20a gerichteten Adaptorhälften hybridisierten und sich ein quartärer Komplex ausbildete. Zur RNA **17a** besaß der Adaptor nur eine geringe Affinität (Lane 5, schwarz) und in diesem Fall waren großen Mengen monomeren Adaptors und der RNA zu detektieren. Der ternäre Komplex aus Adaptor **20** und den ONs **17a** und **25** konnte zwar nachgewiesen werden (Lane 6, orange), dennoch waren in diesem Fall noch größere Menge der Di- und Monomere zu beobachten (Lane 6, grün, schwarz und blau). Somit war davon auszugehen, dass der Adaptor **20** nur eine geringe Affinität zu seinen Zielen aufwies und eine Umleitung von RISCs war nicht zu erwarten.

Analog zu Adaptor **20** lag auch der Adaptor **21** zu großen Teilen als Monomer vor (Abbildung 71, Lane 9). Allerdings waren hier zusätzlich verschiedene Dimere (rot) und Trimere (blau) zu beobachten, was auf eine geringe Orthogonalität der Adaptorhälften schließen ließ. Darüber hinaus konnte weder mit der RNA **17a** noch mit RNA **26** eine vollständige Hybridisierung beobachtet werden (Lane 10 und 11) und diese führte zur Bildung komplexerer Strukturen. Obwohl auch hier die Bildung eines ternären Komplexes beobachtet werden konnte (Lane 12, orange) und dieser die bevorzugte Spezies darstellte, waren immer noch größere Anteile ungebundener ONs vorhanden. Dementsprechend war

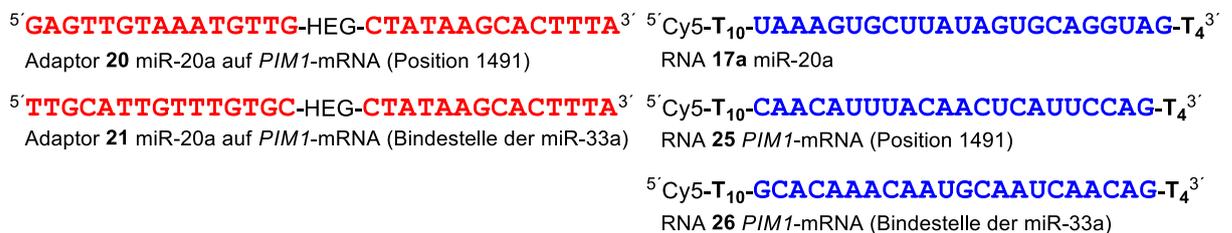
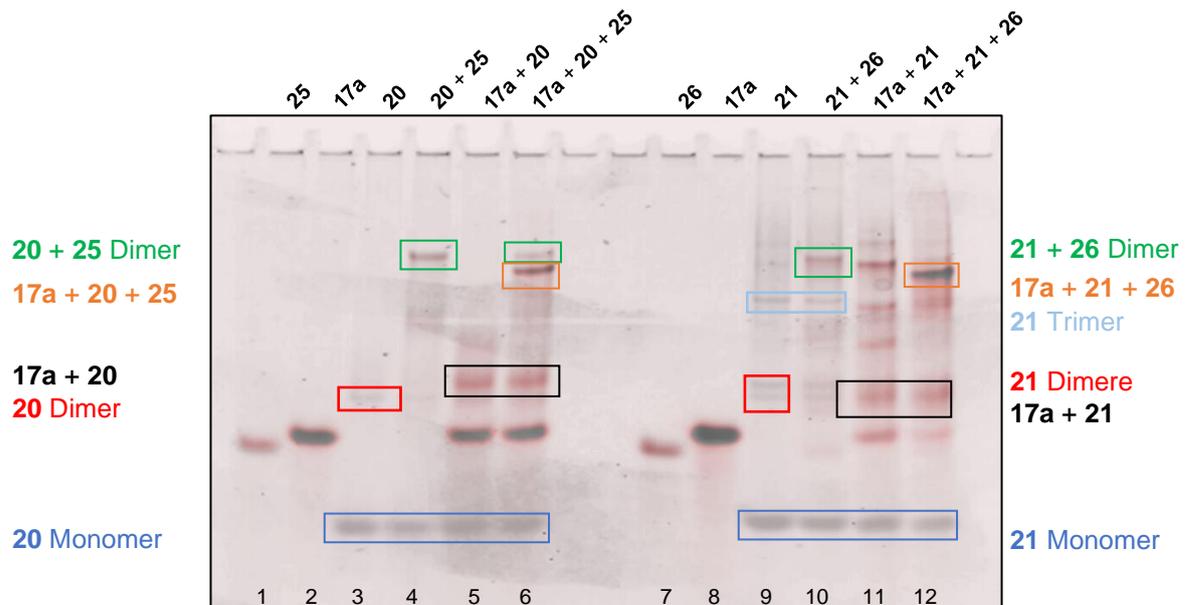


Abbildung 71: Band-Shift Experiment mit den Adaptoren **20** (Lane 1 – 6) und **21** (Lane 9 – 14). Die Abbildung stellt eine Überlagerung der SYBR-Gold-Färbung (schwarz) und der Cy5-Detektor (rote Banden) dar. Lane 1: RNA **25**; Lane 2 + 8: RNA **17a**; Lane 3: Adaptor **20**; Lane 4: Adaptor **20** + RNA **25**; Lane 5: Adaptor **20** + RNA **17a**; Lane 6: Adaptor **20** + RNA **17a** + RNA **25**; Lane 7: RNA **26**; Lane 9: Adaptor **21**; Lane 10: Adaptor **21** + RNA **26**; Lane 11: Adaptor **21** + RNA **17a**; Lane 12: Adaptor **21** + RNA **17a** + RNA **26**. Die Proben wurden 3 h bei RT in Puffer 2 inkubiert. Die Konzentration der ON betrug in allen Fällen ungefähr 1 μM . 16 % nativ PAGE.

auch in diesem Fall die Umleitung von RISCs fraglich.

Aufgrund der Tatsache, dass die Adaptoren **20** und **21** offensichtlich als Monomere vorlagen, jedoch nur eine geringe Affinität zu ihnen Ziel-RNAs aufwiesen, musste angenommen werden, dass sie intramolekulare *hairpin*-Strukturen ausbildeten. Diese würden den Adaptor abschirmen und die Bindung der Ziel-RNAs verhindern. Darüber hinaus wiesen die quartären Komplexe darauf hin, dass die Adaptorhälften teilweise komplementär sein mussten und in der Folge die Umleitung inhibierten. Um einen besseren Überblick über die möglichen Sekundärstrukturen zu erhalten, wurden Strukturanalysen durchgeführt. Hierzu wurde sowohl der *Exiqon LNA Oligo Optimizer* als auch die *Nupack Web Application* eingesetzt.^[235,236] Um einen Überblick über mögliche Interaktionen zwischen den einzelnen LNA-Strängen zu erhalten, wurde der *Oligo Optimizer* verwendet. Bei einer Komplementarität beider Stränge eines Adaptors war die Ausbildung eines internen *hairpins* wahrscheinlich. Eine Analyse der vollständigen Adaptoren war mit dem *Oligo Optimizer* nicht möglich, da es in diesem System keine Möglichkeit gab Linker einzufügen. Aufgrund der hohen Stabilität von LNA-Basenpaaren gelang es außerdem

nicht den Linker durch das Einfügen nicht bindender Basen zu ersetzen. Um die mögliche Struktur der Vollängen-Adaptoren zu betrachten, wurde die *Nupack Web Application* eingesetzt. Bei dieser wurden die Adaptoren als RNA-Stränge betrachtet und der Linker konnte durch das Einfügen von Nukleotiden nachgestellt werden. Wurden dort Sekundärstrukturen gefunden, deren Basenpaarung den Ergebnissen des *Oligo Optimizers* entsprach, wurde die Struktur als wahrscheinlich angesehen. Zusätzlich sollte es mit den potenziellen inter- und intramolekularen Strukturen möglich sein, die Ergebnisse der Band-Shift-Experimente zu erklären. Unter diesen Voraussetzungen konnten für alle Adaptoren Sekundärstrukturen gefunden werden (Abbildung 72), von deren Existenz im Folgenden ausgegangen wird.

Für den Adaptor **18** war eine Hybridisierung der gegen miR-20a gerichteten Stränge möglich, was mit dem beobachteten Dimer und quartären Komplex übereinstimmte. Hierbei erfolgte die Basenpaarung zu großen Teilen über die gegen die *seed*-Region gerichtete Sequenz. Zwar konnte das Dimer durch eine freie miR-20a aufgelöst werden, allerdings war anzunehmen, dass das Dimer die Bindung eines RISCs verhinderte. Dies wäre eine Erklärung, warum die Umleitung in fluoreszenzbasierten Pulldown-Experimenten



Abbildung 72: Mögliche Wechselwirkungen der Adaptoren 18, 20, 21 und 22.

erfolgreich verlief, während die Umleitung von RISCs nicht gelang. Der Adaptor **22** konnte sowohl ein Dimer als auch eine *hairpin*-Struktur ausbilden, welche auch zu beobachten waren. Die Ausbildung einer *hairpin*-Struktur erklärte auch die bevorzugte Bindung des Dimers an das ON **23**. Im Fall des Dimers war der gegen ON **23** gerichtete Teil des Adaptors frei zugänglich, während er im *hairpin* abgeschirmt war.

Für den Adaptor **20** war analog zu **18** die Ausbildung eines Duplex der gegen miR-20a gerichteten Stränge denkbar, allerdings war in den Band-Shift-Experimenten nur monomerer Adaptor zu beobachten und die Dimerisierung trat erst nach Bindung an RNA **25** auf (Abbildung 71, Lane 3 und 4). In den Strukturanalysen zeigte sich, dass der Adaptor **20** einen sehr stabilen *hairpin* bilden konnte, in welchem die gegen die *PIM1*-mRNA gerichtete Sequenz noch zugänglich war. Dies erklärte, wieso eine Hybridisierung mit RNA **25** gelang. Im Gegensatz dazu war der gegen miR-20a gerichtete Teil stark abgeschirmt und eine Bindung der RNA **17a** wurde verhindert. Die Bildung des ternären Komplexes erfolgte in diesem Fall wahrscheinlich über eine Öffnung des *hairpins* durch die RNA **25**, wodurch der gegen miR-20a gerichtete Teil des Adaptors zugänglich wurde. Gleichzeitig konnte in einer Wiederholung des Band-Shift-Experiments gezeigt werden, dass eine Inkubation bei 37 °C zu einer besseren Hybridisierung des Adaptors **20** mit der RNA **17a** führte, was auf eine thermische Öffnung des *hairpins* hindeutete.

Der Adaptor **21** war ebenfalls in der Lage einen stabilen *hairpin* auszubilden, wodurch beide Hälften des Adaptors abgeschirmt wurden. Darüber hinaus waren beide Hälften selbstkomplementär. Somit konnten für diesen Adaptor verschiedene polymere Strukturen angenommen werden, welche auch im Band-Shift-Experiment zu beobachten waren. Außerdem erklärte sich dadurch die Ausbildung der quartären Komplexe, die nach der Hybridisierung einer der Adaptorhälften auftraten. Die geringe Affinität des monomeren Adaptors gegenüber der Ziel-RNA **26** konnte durch die Bildung des *hairpins* schlüssig erklärt werden.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden die Experimente mit den reinen LNA-Adaptoren eingestellt, da davon auszugehen war, dass eine Umleitung von RISCs durch die Sekundärstrukturen der Adaptoren verhindert würde. Um die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen zu schwächen oder zu verhindern, sollten DNA/LNA-Mixmere eingesetzt werden, für die im Allgemeinen geringere Affinitäten zu erwarten waren. Gleichzeitig stellte sich aufgrund der beobachteten Bindung von RISCs an ON **23** die Frage, inwieweit eine selektive Umleitung von RISCs möglich war. Da dies eine Grundvoraussetzung des Konzepts war, musste ein Nachweis für die Bindung spezifischer RISCs erbracht werden, bevor weitere Adaptoren eingesetzt werden konnten.

8.2.1 Selektivität der RISC-Bindung

Zunächst wurde überprüft, ob eine Bindung von RISCs mit allen LNAs möglich war. Hierzu wurde eine Siebenmer-LNA gegen die *seed*-Region der miR-20a-Familie eingesetzt (LNA **27**, Abbildung 73) und mit der LNA **28** verglichen. Diese stellte eine verkürzte Version des nichtbindenden Teils des Adaptors **22** dar, welcher keine Komplementarität zu *seed*-Regionen von miRNAs aufwies. In Pulldown-Experimenten mit nachfolgendem Western-Blot konnte gezeigt werden, dass mit LNA **27** hAgo2 isoliert werden (Abbildung 73, Lane 1) konnte, während dies mit LNA **28** nicht möglich war (Lane 2). Dies bedeutete zwar, dass LNAs eine gewisse Komplementarität zu miRNAs aufweisen müssen, um RISCs zu binden, allerdings war keine eindeutige Aussage über die Spezifität der LNA **27** möglich.

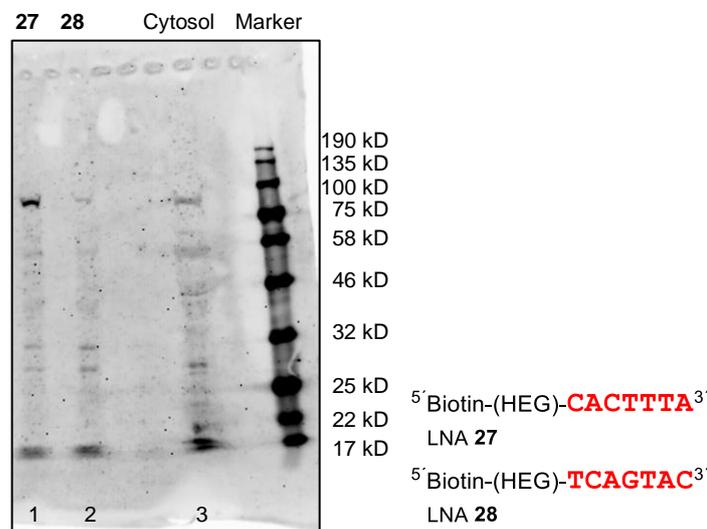


Abbildung 73: Isolation von RISC durch Pulldown mit den LNAs **27** und **28**; die Banden wurden durch Western-Blot nach Elektrophorese durch spezifische Antikörper gegen human Ago2 (hAgo2) sichtbar gemacht. Lane 1: HeLa-Cytosol und LNA **27** (100 nM); Lane 2: HeLa-Cytosol und LNA **28** (100 nM); Lane 3: HeLa Cytosol (3 µL). Die Proben wurden 3 h bei RT inkubiert.

Aus diesem Grund wurde versucht, die mit LNA **27** gebundenen miRNAs mittels *Next Generation Sequencing* zu identifizieren. Dazu wurde LNA **27** in HeLa-Lysat inkubiert und im Anschluss versucht die miRNAs mittels Tri-Reagent® zu isolieren. Zwar war bekannt, dass die Isolierung von miRNAs mit Tri-Reagent® in Anwesenheit vollständig komplementärer LNA-basierter anti-miRs nur mäßig effektiv verlief,^[237] da die LN **27** jedoch deutlich kürzer war, wurde eine bessere Isolierung der miRNAs erhofft. Die anschließende Sequenzierung wurde durch die Firma *GenXPro* durchgeführt. Allerdings konnten dabei keine miRNAs gefunden werden. Es lag daher nahe, dass die Isolierung der miRNAs mit dem Tri-Reagent® nicht gelang oder sie nicht aus dem RISC gelöst wurden und dadurch nicht zu isolieren waren. Falls jedoch mit dem Tri-Reagent® LNA **27**-miRNA-Komplexe isoliert worden sind, könnte die stark gebundene LNA **27** die RT-PCR inhibieren. Aus

diesem Grund wurden diese Versuche beendet und nach einem alternativen Nachweis für die Selektivität gesucht.

Da die Experimente mit LNA **27** zeigten, dass RISCs durch komplementäre LNAs gebunden wurden, während dies mit nichtkomplementären LNAs nicht möglich war, entstand die Idee, unterschiedliche miRISCs nacheinander in Pulldown-Experimenten zu isolieren. Hierbei sollte zunächst eine miRNA-Familie aus einem HeLa-Lysat nachweislich entfernt werden und im Anschluss eine weitere miRNA-Familie adressiert werden. Diese wäre nur dann zu detektieren, wenn der vorhergehende Pulldown selektiv verlief. Neben der miR-20a-Familie wurde als zweites Ziel die miR-let-7-Familie gewählt, welche von der LNA **29** adressiert wurde. Da die miR-let-7-Familie eine höhere Expression aufweisen sollte als der miR-17/92-Cluster, wurde das Lysat zunächst mit einem Überschuss der LNA **27** inkubiert (Abbildung 74, Lane 1). Um nachzuweisen, dass alle RISCs der miR-20a-Familie entfernt waren, wurde das Lysat erneut mit LNA **27** inkubiert, wobei eine deutlich geringere hAgo2-Bande zu beobachten war (Lane 2). Der Überstand wurde daraufhin mit der LNA **29** inkubiert und es konnte erneut eine starke hAgo2-Bande detektiert werden (Lane 3). Die Intensität dieser Bande nahm bei einer zweiten Inkubation mit LNA **29** ab (Lane 4), auch wenn sie aufgrund der Häufigkeit von miR-let-7 immer noch stärker als nach der zweiten Inkubation mit LNA **27** war. Somit gelang es, mit unterschiedlichen miR-Familien beladene RISCs unabhängig voneinander zu isolieren. Dies bedeutete auch, dass die Bindung der RISCs mittels spezifischer Basenpaarung erfolgte und die Selektivität auch für eine Umleitung mit den Adaptoren gegeben sein sollte.

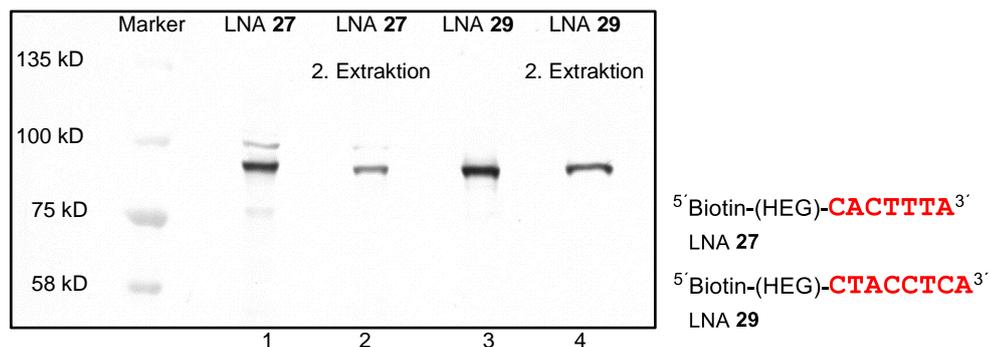


Abbildung 74: Selektive Isolation von RISC durch Pulldown mit den LNAs **27** und **29**. Die Banden wurden in einem Western-Blot nach der Elektrophorese durch spezifische Antikörper gegen hAgo2 sichtbar gemacht. Lane 1: HeLa-Lysat und LNA **27**; Lane 2: HeLa-Lysat und LNA **27** 2. Extraktion; Lane 3: HeLa-Lysat und LNA **29**; Lane 4: HeLa-Lysat und LNA **29** 2. Extraktion. Die Proben wurden je 1 h bei RT inkubiert. Die Konzentration der LNAs betrug jeweils 1 μ M.^[13]

8.3 LNA/DNA-Adaptoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich RISCs durch Basenpaarung selektiv einfangen lassen, galt es in einem nächsten Schritt DNA/LNA-Mixmer-Adaptoren zu designen. Diese sollten durch *in vitro* Experimente auf ihre Fähigkeit RISCs zu rekrutieren untersucht werden. Parallel dazu wurde die Umleitung von RISCs in Zellkulturversuchen betrachtet.^[238] Für die *in vitro* Experimente wurde ausgehend von Adaptor **18** der Adaptor **30** entworfen (Abbildung 75). Dabei wurde ungefähr die Hälfte der Nukleotide durch DNA ersetzt und die Lage der LNA-Basen so gewählt, dass die Bildung von Dimeren verhindert wurde. Um eine hohe Stabilität gegenüber Nukleasen zu erhalten, wurden die Enden der Stränge mit LNA-Basen versehen. Bei der Verteilung der LNAs galt es, größere Abfolgen an DNA-Nukleotiden zu vermeiden, um die Rekrutierung der RNase H zu verhindern. Nachdem sich in den vorhergehenden Experimenten zeigte, dass das Ziel-ON **23** ebenfalls RISCs binden konnte, wurde es auf die Bindestelle des Adaptors **30** verkürzt (ON **24**, Abbildung 75), wodurch die zu miR-let-7a komplementäre Sequenz entfiel.

5' **CTCTTCTCCTGACA**-HEG-**CTATAAGCACTTTA** 3'

Adaptor **30** miR-20a auf ON **24**

5' **GAGTTGTAAATGTTG**-HEG-**CTATAAGCACTTTA** 3'

Adaptor **31** miR-20a auf *PIM1*-mRNA (Position 1491)



5' **GAGTTGTAAATGTTG**-HEG-**GCACTTTA** 3'

Adaptor **32** miR-20a auf *PIM1*-mRNA (Position 1491)



5' Biotin-(HEG)-**CAACAUUUACAACUC** 3'

2'-OMe-RNA **33** *PIM1*-mRNA (Position 1491)

5' Biotin-(HEG)-**UGUCAGGAGAAGAG** 3'

2'-OMe-RNA **24**

5' Phosphat-**UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGTAG** 3'

RNA **17** miR-20a

Cy5

Abbildung 75: Sequenz der Mixmer-Adaptoren **30** – **32** sowie des Modells der *PIM1*-mRNA **33** und des ONs **24**. Mögliche intramolekulare Sekundärstrukturen der Adaptoren sind auf der rechten Seite gezeigt. Dabei steht Rot für LNA, Schwarz für DNA, Blau für RNA und Violett für 2'-Methoxy RNA.

Für die Zellkulturexperimente wurden ausgehend von Adaptor **20** die Adaptoren **31** und **32** abgeleitet (Abbildung 75). Dabei entsprach der der Adaptor **31** in seiner Sequenz dem Adaptor **20**, während der Adaptor **32** gegen die *seed*-Region der miR-20a-Familie gerichtet war. Da dieser Adaptor eine größere Anzahl an RISCs adressieren konnte, wurden mit ihm größere Effekte erwartet. Analog zu Adaptor **20** war davon auszugehen, dass auch die Adaptoren **31** und **32** einen *hairpin* ausbilden konnten (Abbildung 75, rechts). Diese sollten

jedoch eine geringere Stabilität aufweisen als im Fall des Adaptors **20** und somit bereits bei RT zu einer Hybridisierung mit den Ziel-ONs fähig sein. Für die Bindestelle der miR-33a wurde kein Adaptor entworfen, da keine Möglichkeit bestand eine Selbstinhibierung des Adaptors zu verhindern. Der Grund dafür war, dass der entsprechende Adaptor **21** eine Vielzahl an Sekundärstrukturen aufwies und einen sehr stabilen *hairpin* formte.

8.3.1 Band-Shift-Experimente mit den DNA/LNA-Mixmeren

Zunächst wurde in Band-Shift Experimenten geprüft, ob der Einsatz der DNA/LNA-Mixmere die Ausbildung der intermolekularen Sekundärstrukturen verhinderte und wie sich die neuen Adaptoren gegenüber den LNA-Analoga verhielten (Abbildung 76). Außerdem sollte die Auswirkungen eines Überschusses der Adaptoren gegenüber ihren Ziel-ONs untersucht werden. Dabei war aus statistischen Gründen zu erwarten, dass eine Erhöhung der Adaptorkonzentration zu einem erhöhten Anteil der binären Komplexe gegenüber dem ternären Komplex führen sollte.

Zunächst wurde der Adaptor **30** betrachtet, mit dem keine Dimerisierung beobachtet werden konnte (Abbildung 76, **a**, Lane 2). Dies zeigte, dass die intermolekularen Sekundärstrukturen bei den DNA/LNA-Mixmeren nicht ausgebildet wurden. Außerdem konnte die vollständige Hybridisierung zwischen **30** und den ONs **17** oder **24** zu binären Komplexen (Abbildung 76, **a**, Lane 4 + 5) sowie dem ternären Komplex (Lane 6) beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Experimenten mit Adaptor **18** waren nach der Hybridisierung mit ON **24** keine quartären Komplexe sichtbar (Lane 4). Des Weiteren konnte die erwartete Abhängigkeit der Komplexbildung von der Adaptorkonzentration beobachtet werden und ein zweifacher Überschuss des Adaptors führte zu einer verstärkten Bildung der binären Komplexe (Lane 7).

Mit dem Adaptor **31** konnte ebenfalls eine weitgehend vollständige Bildung der binären Komplexe, sowie des ternären Komplexes beobachtet werden (Abbildung 76, **b**, Lane 4 – 6). Analog zu Adaptor **30** konnte auch hier keine Wechselwirkungen der gegen miR-20a gerichteten Hälften des Adaptors festgestellt werden. Beim Vergleich der Laufstrecke der Adaptoren **30** und **31** (**a + b**, Lane 2) mit der RNA **17** fiel auf, dass **30** (28 Basen) langsamer durch das Gel wanderte als RNA **17**, während Adaptor **31** (29 Basen) schneller migrierte. Da **31** ein Nukleoid mehr enthielt als Adaptor **30** und somit eher langsamer als **30** laufen sollte, lag es nahe, dass die Bildung des erwarteten *hairpins* die Ursache war. Aufgrund der guten Hybridisierung des Adaptors mit RNA **17** konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass der *hairpin* den Adaptor nicht inhibierte. Bei einem Überschuss des Adaptors **31** konnte im Gegensatz zu Adaptor **30** kein Einfluss auf die

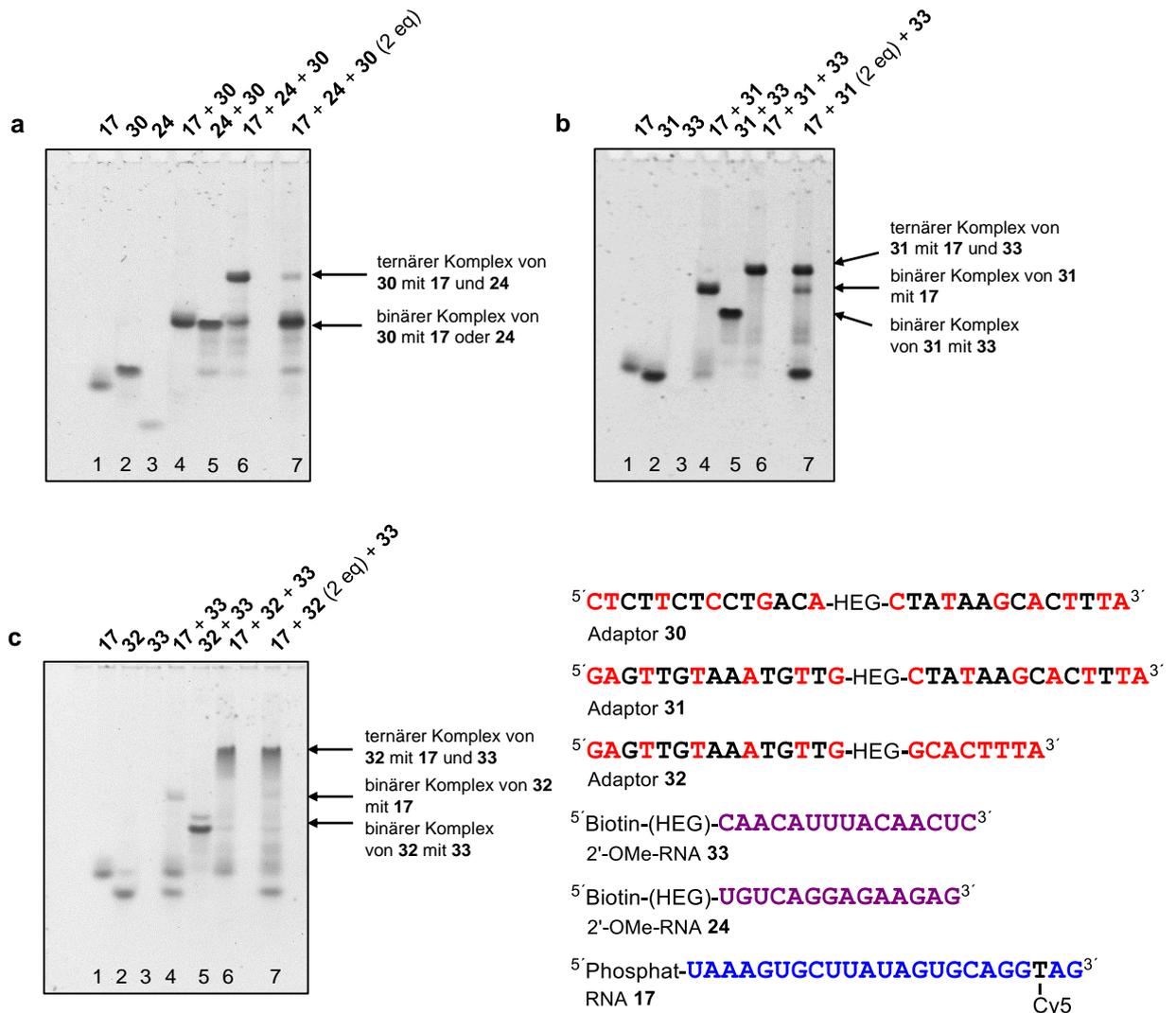
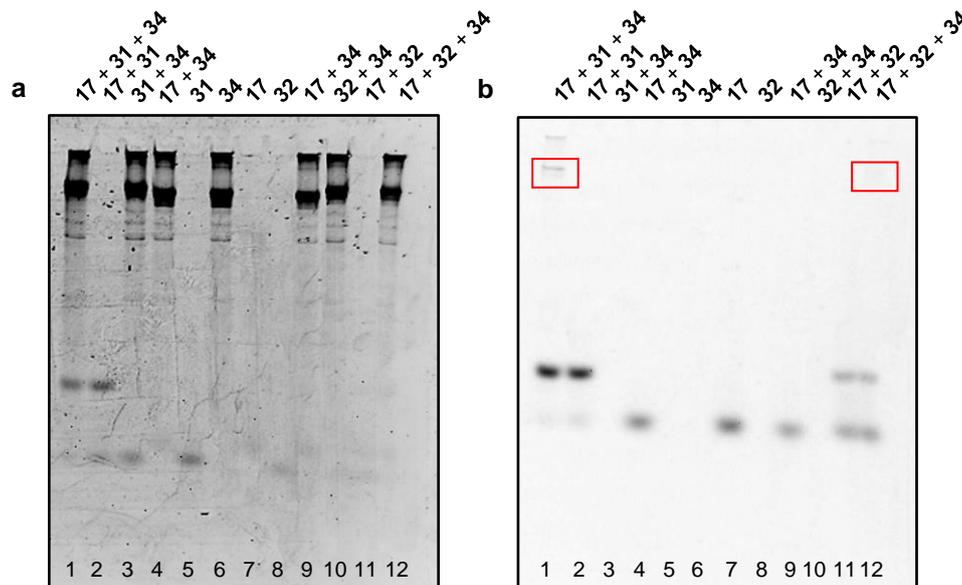


Abbildung 76: Band-Shift Experimente der Adaptoren **30** (a), **31** (b) und **32** (c). Die Proben wurden bei RT 16 h inkubiert. Lane 1: RNA **17**; Lane 2: Adaptor **30** (a), **31** (b) oder **32** (c); Lane 3: ON **24** (a) oder **33** (b + c); Lane 4: Adaptor **30** (a), **31** (b) oder **32** (c) + RNA **17**; Lane 5: Adaptor **30** (a), **31** (b) oder **32** (c) + ON **24** (a) oder **33** (b + c); Lane 6: RNA **17** + Adaptor **30** (a), **31** (b) oder **32** (c) + ON **24** (a) oder **33** (b + c); Lane 7: RNA **17** + 2 eq Adaptor **30** (a), **31** (b) oder **32** (c) + ON **24** (a) oder **33** (b + c). Die Proben wurden 16 h bei RT in Puffer 2 inkubiert. 16 % nativ PAGE. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold. Die Standardkonzentration der ON betrug 1 μ M.

Bildung des ternären Komplexes beobachtet werden und der überschüssige Adaptor lag als Monomer vor (b, Lane 7). Eine mögliche Erklärung wäre, dass der *hairpin* des Adaptors durch die Bindung des ON **33** geöffnet und die Hybridisierung mit RNA **17** durch diese Konformationsänderung bevorzugt wurde. Dieses Verhalten ähnelte dem einer kooperativen Bindung, bei der das Andocken eines Liganden eine Konformationsänderung hervorruft und dadurch die Bindung weiterer Liganden erleichtert. Charakteristisch für diese Systeme ist ein makroskopisches alles-oder-nichts Verhalten, welches auch für den Adaptor **31** zu beobachten war.^[239] Aufgrund dieser Analogie wird das für die Bildung des ternären Komplexes aus Adaptor **31** und den ONs **17** und **33** beobachtete Verhalten ebenfalls als kooperativ bezeichnet.

Mit dem Adaptor **32** konnten ähnliche Ergebnisse wie mit Adaptor **31** erhalten werden (Abbildung 76, c). Auch in diesem Fall war die Bildung eines *hairpins* aus dem Laufverhalten des Adaptors abzuleiten (Lane 2). Da der *hairpin* des Adaptors **32** mehr LNA-Basen enthielt als der des Adaptors **31** war davon auszugehen, dass der *hairpin* stabiler war und somit die Bindung der RNA **17** weitgehend abschwächte, wie in Lane 4 zu sehen ist. Die Hybridisierung mit ON **33** erfolgte jedoch vollständig (Lane 5), genauso wie die Bildung des ternären Komplexes aus Adaptor **32** und den ONs **17** und **33** (Lane 6). Analog zu Adaptor **31** führte ein Überschuss des Adaptors zu keiner Abnahme des ternären Komplexes (Lane 7) und somit konnte auch in diesem Fall von einem kooperativen Bindeverhalten ausgegangen werden.

Nachdem gezeigt wurde, dass die DNA/LNA-Mixmere **31** und **32** mit den kurzen ONs **17** und **33** vollständig hybridisieren konnten, sollte gezeigt werden, dass ein ternärer Komplex auch mit einem längeren Ausschnitt der *PIM1*-mRNA (RNA **34**)^[240] möglich war. Aufgrund der Länge der RNA **34** von über 400 bp war davon auszugehen, dass sich ihr Laufverhalten durch die Bindung des Adaptors nur wenig verändern würde, wodurch die Band der RNA **34** durch eine SYBR-Gold-Färbung nicht von der des Komplexes zu unterscheiden wäre. Aus



5' **GAGTTGTAAATGTTG**-HEG-**CTATAAGCACTTTA** 3'
Adaptor **31**

5' **GAGTTGTAAATGTTG**-HEG-**GCACTTTA** 3'
Adaptor **32**

5' Phosphat-**UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGTAG** 3'
RNA **17**
Cy5

Abbildung 77: Band-Shift-Experiment mit den Adaptoren **31** und **32** sowie der RNA **34**. **a:** Färbung mit SYBR Gold, **b:** Detektion der Cy5-gelabelten RNA **17**. Lane 1: RNA **17** + RNA **34** + Adaptor **31**; Lane 2: RNA **17** + Adaptor **31**; Lane 3: RNA **34** + Adaptor **31**; Lane 4: RNA **17** + RNA **34**; Lane 5: Adaptor **31**; Lane 6: RNA **34**; Lane 7: RNA **17**; Lane 8: Adaptor **32**; Lane 9: RNA **17** + RNA **34**; Lane 10: Adaptor **32** + RNA **34**; Lane 11: RNA **17** + Adaptor **32**; Lane 12: RNA **17** + Adaptor **32** + RNA **34**. Die Proben wurden 2 h in Puffer 2 inkubiert. 8 % nativ PAGE. Die Konzentration der ON betrug in allen Fällen ungefähr 1 µM.

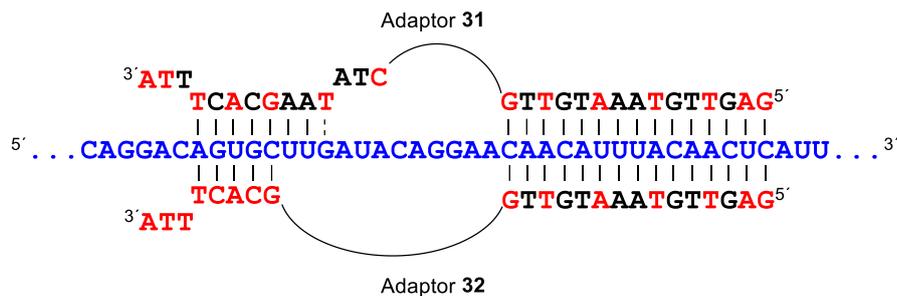


Abbildung 78: Schematische Darstellung der möglichen doppelten Bindung der Adaptoren **31** (oben) und **32** (unten) an die RNA **34**.

diesem Grund erfolgte zusätzlich eine Detektion der Cy5-gelabelten RNA **17** (Abbildung 77, **b**). Entgegen der Erwartung zeigte sich, dass die Bindung der Adaptoren an die RNA **34** zu einer langsameren Migration führte (Abbildung 77, **a**, Lane 3 und 10). Obwohl die Bande der RNA **34** vollständig shiftete, war dennoch eine deutliche Bande des Adaptors zu erkennen, was darauf schließen ließ, dass die RNA **34** im Überschuss vorlag. Nach der Inkubation von RNA **34** mit den Adaptoren und RNA **17** änderte sich das Migrationsverhalten nicht mehr (Lane 1 und 12). Die Detektion der ternären Komplexe konnte somit nur über die Cy5-gelabelte RNA **17** erfolgen. Es zeigte sich jedoch, dass mit beiden Adaptoren nur sehr geringe Anteile des ternären Komplexes gebildet wurden. Dabei war der Anteil im Fall des Adaptors **31** (Lane 1, roter Kasten) höher als im Fall des Adaptors **32** (Lane 12, roter Kasten). Diese Beobachtung stand im Widerspruch zu den vorherigen Experimenten mit ON **33**, bei denen die Adaptoren eine erhöhte Affinität zur RNA **17** aufwiesen, wenn sie zuvor die *PIM1*-Sequenz gebunden hatten. Aus diesem Grund wurde eine Bindung beider Adaptorhälften an die RNA **34** in Betracht gezogen und deren Sequenz genauer untersucht. In der Nähe der Bindestelle der Adaptoren lag eine zu der gegen miR-20a gerichteten Hälfte der Adaptor komplementäre Sequenz (Abbildung 78). Dies ließ den Schluss zu, dass die Adaptoren an zwei Stellen an die RNA **34** banden, wodurch die Hybridisierung mit der RNA **17** verhindert wurde. Dabei fiel auf, dass der Adaptor **31** zwar eine höhere Anzahl an Basenpaare mit RNA **34** ausbilden konnte als **32**, aber dennoch besser an RNA **17** band. Als mögliche Ursache für diese Beobachtung kam die höhere Anzahl der LNA-Basen in Adaptor **32** in Frage.

Die mögliche zweifache Bindung des Adaptors an die *PIM1*-mRNA war auch im Hinblick auf die Zellkulturexperimente kritisch, da sie auch die Umleitung von RISCs verhindern würde. Da die Proben jedoch bei RT inkubiert wurden, war eine Wiederholung des Experiments bei 37 °C notwendig, um die Bedingungen der Zellkulturexperimente besser nachzubilden (Abbildung 79). Dabei konnte bei 37 °C (Lane 1) ein deutlich höherer Anteil des ternären Komplexes beobachtet werden als bei RT (Lane 2). Somit konnte gezeigt werden, dass die Umleitung einer miRNA auch an einen längeren Ausschnitt der

PIM1-mRNA durchaus möglich war und es wurde angenommen, dass dies auch für die Umleitung von RISCs in den Zellkulturexperimenten gelingen könnte.

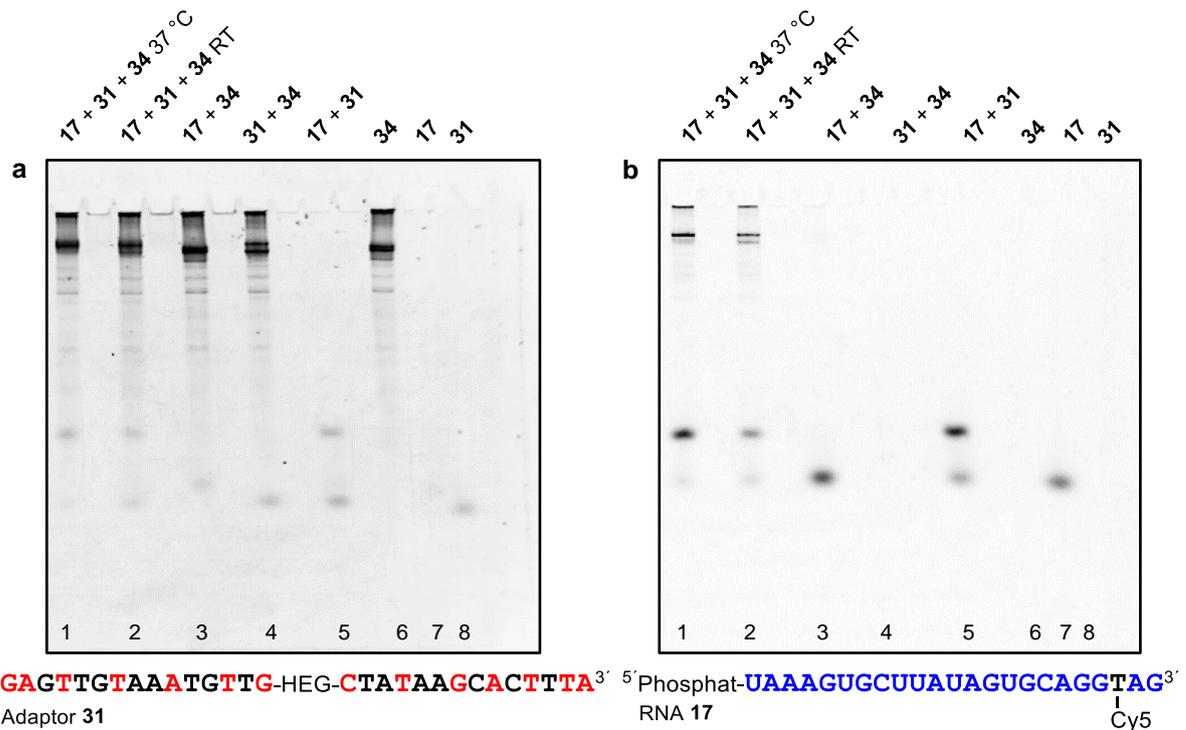


Abbildung 79: Band-Shift-Experimente mit Adaptor **31** und den RNAs **17** und **34**. **a** Färbung mit SYBR Gold, **b** Detektion über Cy5 Lane 1: RNA **17** + RNA **34** + Adaptor **31**, 37 °C; Lane 2: RNA **17** + RNA **34** + Adaptor **31**, RT; Lane 3: RNA **17** + RNA **34**; Lane 4: RNA **34** + Adaptor **31**; Lane 5: RNA **17** + Adaptor **31**; Lane 6: RNA **34**; Lane 7: RNA **17**; Lane 8: Adaptor **31**. 8 % nativ PAGE. Die Proben wurden für 2 h in Puffer 2 inkubiert. Die Konzentrationen der ON betragen 1 µM.

8.3.2 Pulldown-Experimente

Im Anschluss an die Band-Shift-Experimente sollte die Bildung der ternären Komplexe in fluoreszenzbasierten Pulldown-Experimenten bestätigt werden. Diese Methode erlaubte zudem die Untersuchung der Abhängigkeit des ternären Komplexes von der Konzentration der Adaptoren **30** – **32**. Hierzu wurde die 2'-OMe-RNA **24** an *Magnetic Beads* gebunden und im Verhältnis 1:1 mit dem nicht komplementären miRNA-Modell **17** versetzt. Nun wurde der Adaptor **30** in steigender Konzentration zugegeben. Nach der Inkubationszeit führte man den Pulldown durch, wusch und trennte dann die fluoreszenzmarkierte RNA **17**, falls vorhanden, durch einen pH-Sprung von den *Beads* ab (Abbildung 80, schwarz). Dabei konnte ein nahezu linearer Anstieg der Fluoreszenz bis zu einem Verhältnis von 1:1.25:1 (**24/30/17**) beobachtet werden, bei dem die maximale Fluoreszenz erreicht wurde. Bei höheren Konzentrationen des Adaptors fielen die Werte stark ab und bei einem sechsfachen Überschuss konnten noch ca. 10 % des Maximums detektiert werden. Dies bestätigte die Ergebnisse der Band-Shift-Experimente und deutete auf eine unabhängige Hybridisierung der beiden Adaptorhälften hin. Analog dazu wurden die Adaptoren **31** (rot)

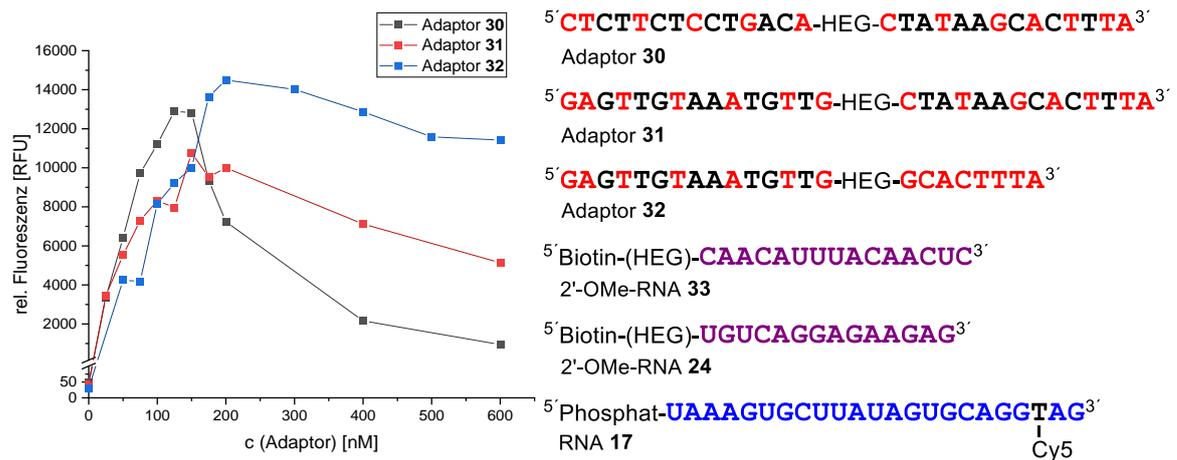


Abbildung 80: Titrationsexperiment mit den Adaptoren **30** (Schwarz), **31** (rot) und **32** (blau). Dabei wurden die ONs **17** und **24** oder **33** in einem Verhältnis von 1:1 vorgelegt und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Adaptors 1 h bei RT in Puffer 2 inkubiert.

und **32** (blau) betrachtet, wozu sie in steigender Konzentration zu den ONs **17** und **33** gegeben wurden. Auch hier war zunächst ein steiler linearer Anstieg der Fluoreszenz zu Adaptors **31** verschob sich das Maximum nur leicht und lag bei 1:1.5:1 (**33/31/17**), während der Effekt bei Adaptor **32** mit einem Verhältnis von 1:2:1 (**33/32/17**) deutlich ausgeprägter war. Bei höheren Konzentrationen der Adaptoren traten jedoch größere Unterschiede auf. Im Fall des Adaptors **31** zeigte sich eine langsame, fast lineare Abnahme der Fluoreszenz, welche bei einem sechsfachen Überschuss des Adaptors **31** noch ca. 50 % des maximalen Werts betrug. Dies entsprach in etwa dem fünffachen Wert des Adaptors **30**. Für den Adaptor **32** war die Abnahme der Fluoreszenz noch geringer und es konnten bei einem sechsfachen Überschuss noch ca. 80 % des maximalen Werts detektiert werden, was dem zehnfachen Wert des Adaptors **30** entsprach. Da in den Pulldown-Experimenten die ONs **17** und **33** vorgelegt und dann mit den Adaptoren **31** und **32** versetzt wurden, konnte man zudem annehmen, dass die Bindung der Adaptoren an ON **33** deutlich schneller verlief als die an RNA **17**. Dieses Verhalten wies darauf hin, dass die Bindung des Adaptors an ON **33** die Hybridisierung mit RNA **17** erleichterte und war ein weiterer Hinweis auf die Kooperativität der Adaptoren. Zwar erschien dieses kooperative Verhalten auf den ersten Blick ungünstig, da es einen negativen Einfluss auf die Affinität der Adaptoren zu den miRNAs besaß. Gleichzeitig war die Bildung des ternären Komplexes dadurch jedoch unabhängig von der Adaptorkonzentration, was in späteren Anwendungen vorteilhaft sein könnte, da so eine Übertitration durch den Adaptor verhindert wurde. Im Falle des ON **30** bestände bei einer zu hohen Adaptorkonzentration die Möglichkeit, dass lediglich der anti-miR-Effekt vorhanden wäre und jedoch keine Inhibierung der Translation aufträte. Im Gegensatz dazu würde der Adaptor **31** bevorzugt nach der Bindung an die Ziel-RNA mit den RISCs interagieren und sollte somit seine Funktion behalten.

8.3.3 Schmelzpunktmessungen

Ausgehend von den Ergebnissen der Band-Shift- und den Pulldown-Experimente mit den Adaptoren gab es starke Hinweise, dass die Adaptoren **31** und **32** *hairpin*-Elemente ausbildeten (Abbildung 75). Somit sollten die Adaptoren doppelsträngige Bereiche besitzen und beim Erwärmen eine Hyperchromizität aufweisen, auch wenn nur ein geringer Unterschied in der Absorption erwartet wurde. Für einen orthogonalen Adaptor sollte hingegen keine Hyperchromizität auftreten und mit Schmelzpunktmessungen könnte so ein weiterer Hinweis auf mögliche *hairpin*-Strukturen gefunden werden. Um dies zu überprüfen, wurden die Adaptoren **30** und **31** betrachtet. Diese wiesen eine vergleichbare Länge (28 gegen 29 Basen) auf, wodurch mögliche Änderungen der Absorption besser vergleichbar sein sollten als mit dem kürzeren Adaptor **32** (23 Basen). Außerdem war davon auszugehen, dass nur mit Adaptor **31** eine Hyperchromizität auftrat, jedoch nicht mit **30**. In den Schmelzpunktmessungen konnten diese Annahmen bestätigt werden und während der Adaptor **30** kein Schmelzverhalten aufwies,^[13] konnte für den Adaptor **31** ein Schmelzpunkt von ungefähr 62 °C bestimmt (Abbildung 81). Dies zeigte, dass der Adaptor **31** doppelsträngige Abschnitte enthielt und in Kombination mit den Ergebnissen der Band-Shift- und Pulldown-Experimente war die Ausbildung der angenommenen *hairpin*-Struktur sehr wahrscheinlich. Bei einer genaueren Betrachtung des Kurvenverlaufs der Heizzyklen wurden zudem Anzeichen für einen weiteren Schmelzpunkt von ca. 32 °C gefunden, was auf eine partielle Öffnung des *hairpins* hindeuten könnte. Diese würde die gute Komplexierung des Adaptors **31** an die RNA **17** erklären, da größere Bereiche der Bindestelle leichter zugänglich wären. Ebenso würde dies erklären, warum die Affinität des Adaptors **20** stieg, wenn dieser bei 37 °C inkubiert wurde. Für den Adaptor **32** waren diese Effekte nicht möglich, da die gegen miR-20a gerichtete Sequenz deutlich kürzer war und auch bei einer partiellen Öffnung des Adaptors nicht zugänglich sein sollte, was ebenfalls in den Band-Shift- Experimenten zu beobachten war.

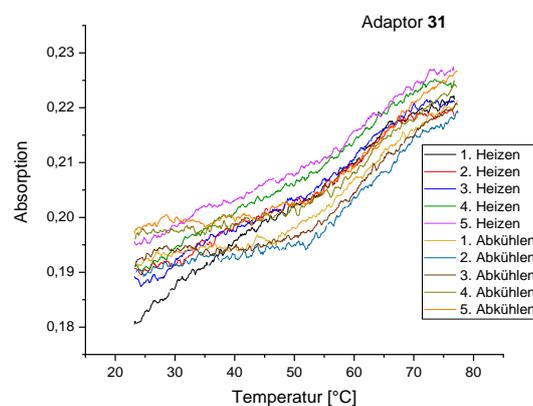


Abbildung 81: Schmelzkurven des Adaptors **31**. Der Adaptor (1 μ M) wurde in 1 mL Puffer 2 in fünf Zyklen zwischen 23 °C and 77 °C gemessen. Dabei konnte für den Adaptor **31** ein T_m von ungefähr 62 °C erhalten werden.^[13]

Um der Fragestellung nachzugehen, ob die *hairpin*-Struktur einen Einfluss auf die Bindung des Adaptors zu seinen Ziel-ONs hatte, wurden die Schmelzpunkte der Adaptorhälften mit den ONs **17** oder **33** bestimmt (Abbildung 82).^[13] Als Kontrollen wurden die Mixmere **35** und **36** betrachtet, welche die beiden Hälften von Adaptor **31** repräsentierten. Dabei zeigte sich, dass die Hybridisierung mit ON **33** nicht beeinflusst wurde und sowohl mit Adaptor **31** als auch mit ON **35** konnte ein Schmelzpunkt von 76 °C bestimmt werden. Der Schmelzpunkt des Duplex zwischen den ONs **31** und **17** (72 °C) war gegenüber dem Duplex aus den ONs **36** und **17** (74 °C) um ca. 2 °C erniedrigt. Gleichzeitig wies der Duplex von RNA **17** mit Adaptor **30** (73 °C) ebenfalls eine Erniedrigung von 1 °C gegenüber dem Duplex aus den ONs **17** und **36** auf. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Ursache der leichten Schmelzpunkterniedrigung eher in einer elektrostatischen Repulsion der ungebundenen RNA mit der ungebundenen Adaptorhälfte zu suchen war als in der *hairpin*-Struktur des Adaptors **31**. Da der Schmelzpunkt immer noch bei über 70 °C lag, sollte eine Hybridisierung unter physiologischen Bedingungen nicht beeinflusst werden.

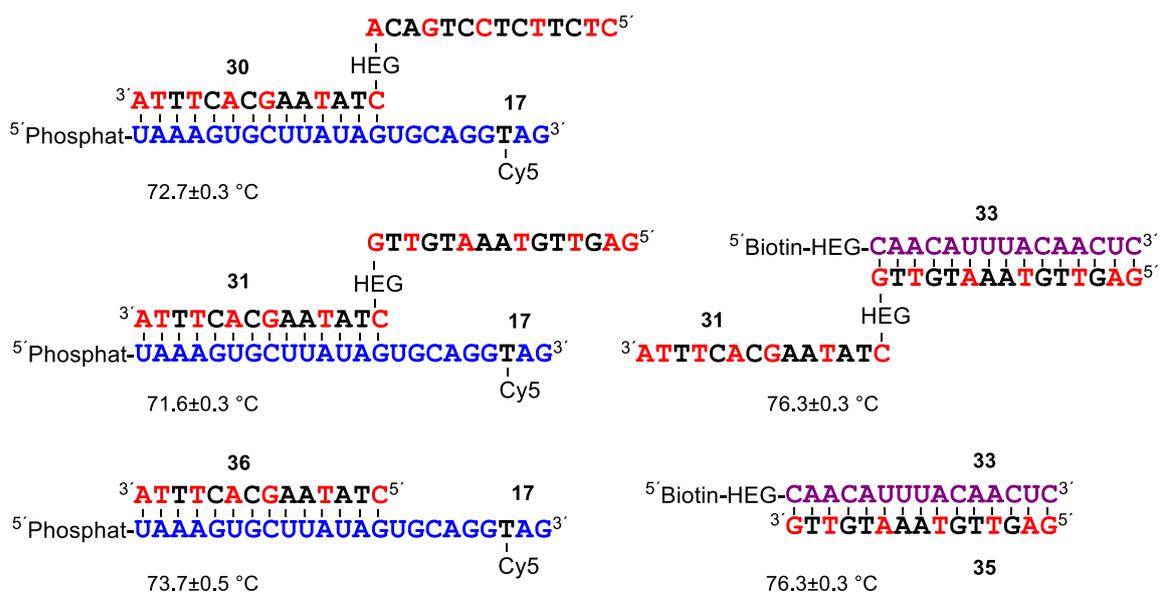


Abbildung 82: Schmelzpunkte der Adaptoren **30** und **31** mit den ONs **17** und **33**. Diese wurden mit den ONs **35** und **36** verglichen, welche die beiden Fragmente des Adaptors **31** darstellen. Die ONs (1 µM) wurden in 1 mL des Puffers 2 für 20 h bei 37 °C inkubiert. Die Absorption bei 260 nm wurde in einem Bereich von 20 °C bis 90 °C gemessen. Die Schmelzpunkte stellen die Mittelwerte (± SD) aus mindestens drei unabhängigen Messungen dar.^[13]

8.3.4 Isolierung von RISCs aus HeLa-Lysaten

In den vorangegangenen Experimenten konnte mit den Adaptoren **30** – **32** eine erfolgreiche Umleitung der Modell-RNA **17** auf verschiedene Ziel-ONs beobachtet werden. Daraufhin sollte versucht werden, RISCs aus HeLa-Lysat zu isolieren, um das Konzept der Umleitung auf Basis von *in vitro* Experimenten zu bestätigen. Dazu wurden zunächst mit ON **24** beladene *Magnetic Beads* entweder mit oder ohne Adaptor **30** in einem HeLa-Lysat

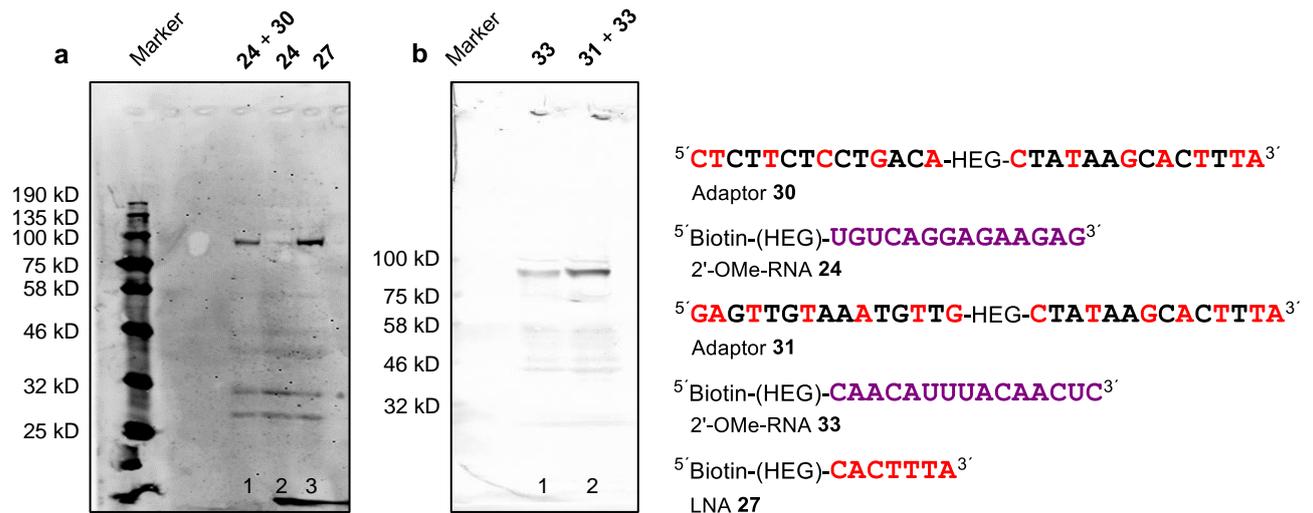


Abbildung 83: Isolation von RISC-Komplexen durch Pull-down-Experimente mit **a:** ON 24 mit Adaptor 30; **b:** ON 33 und Adaptor 31. Lane 1: ON 24 + Adaptor 30; Lane 2: ON 24; Lane 3: LNA 27. **b:** Lane 1: ON 33; Lane 2: ON 33 + Adaptor 31. Die Banden wurden durch Western-Blot nach Elektrophorese durch spezifische Antikörper gegen hAgo2 sichtbar gemacht. **a:** Die Konzentration der ONs betrug jeweils 100 nM und die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenz-Antikörper; **b:** Die Konzentration der ONs betrug jeweils 300 nM und die Detektion erfolgte mittels Färbung (BCIP/NBT).

inkubiert (Abbildung 83, **a**). Als Positivkontrolle diente dabei die LNA 27 (Lane 3). Hierbei konnte in Anwesenheit des Adaptors 30 eine deutliche hAgo2-Bande detektiert werden (Lane 1), während in Abwesenheit des Adaptors nur eine minimale Bande zu beobachten war (Lane 2). Zwar war die mit Adaptor 30 erhaltene Bande weniger intensiv als mit der LNA 27 (Lane 3), diese war jedoch gegen die gesamte miR-20a-Familie gerichtet und konnte somit potenziell mehr RISCs adressieren. Auf Grundlage dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass die Umleitung von mit miR-20a beladenen RISCs durch Adaptormoleküle möglich war, was das Konzept auf der Basis von *in vitro* Experimenten bestätigte. Daraufhin wurde das Experiment mit Adaptor 31 wiederholt, um zu zeigen, dass eine Umleitung auf verschiedene Zielstrukturen möglich war (Abbildung 83, **b**). Auch in diesem Fall konnte mit dem Adaptor 31 eine deutliche hAgo2-Bande beobachtet werden (Lane 2). Allerdings fiel auf, dass der Hintergrund mit dem Ziel-ON 33 (Abbildung 83, **b**, Lane 1) höher war als im vorhergehenden Experiment (Abbildung 83, **a**, Lane 2). Als Ursache hierfür konnte eine Mismatch-Bindung von RISCs an das ON 33 nicht ausgeschlossen werden. Da die Bande in Anwesenheit des Adaptors deutlich intensiver war, zeigte sich, dass auch Adaptor 31 in der Lage war RISCs umzuleiten. Nachdem es mit den Adaptoren 30 und 31 möglich war, miR-20a beladene RISCs auf orthogonale Ziele umzuleiten, wurde die Selektivität der Umleitung geprüft. Dazu wurden die Adaptoren 30 und 31 jeweils mit den ONs 24 und 33 inkubiert (Abbildung 84). Dabei zeigte sich, dass mit Adaptor 30 nur in Kombination mit ON 24 eine hAgo2-Bande zu beobachten war (Lane 2), während dies für Adaptor 31 nur mit ON 33 auftrat (Lane 5). In allen anderen Fällen konnte nur eine schwache Hintergrundbande beobachtet werden. Somit war eine Umleitung von

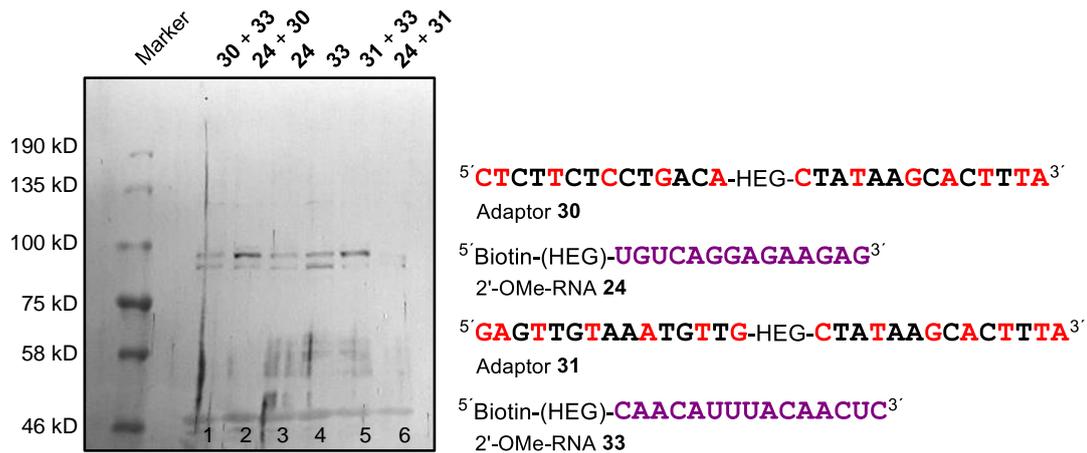


Abbildung 84: Selektive Isolierung von RISCs mittels der Adaptoren **30** und **31**. Lane 1: ON **33** + Adaptor **30**; Lane 2: ON **24**+ Adaptor **30**; Lane 3: ON **24**; Lane 4: ON **33**; Lane 5: ON **33** + Adaptor **31**; Lane 6: ON **24** + Adaptor **31**. Die Banden wurden durch Western-Blot nach Elektrophorese durch spezifische Antikörper gegen hAgo2 sichtbar gemacht. Detektion mittels Färbung (BCIP/NBT). Konzentration der ONs betrug jeweils 300 nM in 100 µL.

RISC nicht nur auf unterschiedliche Zielsequenzen möglich, sondern konnte auch selektiv erfolgen.

Mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Umleitung von miR-20a beladener RISCs auf unterschiedliche Zielsequenzen möglich war. Darüber hinaus konnte in Kreuzexperimenten nachgewiesen werden, dass die Umleitung sequenzspezifisch erfolgte. Außerdem zeigte sich, dass die *hairpin*-Struktur des Adaptors **31** die Umleitung von RISCs nicht verhinderte. Allerdings war unklar, ob eine Bindung beider Adaptorhälften an die *PIM1*-mRNA die Effizienz der Umleitung abschwächen könnte.

8.3.5 Zellkulturexperimente zur Umleitung von miR-20a auf die *PIM1*-mRNA

Parallel zu den Band-Shift- und Pulldown-Experimenten wurden in der Gruppe von Prof. Hartmann Zellkulturexperimente mit den Adaptoren durchgeführt.^[238] Dabei wurden K562-Zellen mit den Adaptoren **20** – **22** transfiziert und untersucht, ob eine Erhöhung der p21-Level oder eine niedrigere Pim-1-Expression erzielt werden konnte. Mit Adaptor **20** konnte dabei in manchen Experimenten eine minimale Reduktion der Pim-1-Level beobachtet werden, allerdings war dieser Effekt nur bedingt reproduzierbar. Entgegen der Erwartung waren die p21-Level bereits zu Beginn sehr so hoch, sodass die erhoffte Hochregulierung dieses Proteins nur schwer detektiert werden konnte. Mit Adaptor **21** ließen sich überhaupt keine Effekte beobachten. Nachdem in den Band-Shift-Experimenten gezeigt wurde, dass die LNA-Adaptoren eine starke Selbstinhibierung aufwiesen, wurden die Experimente mit ihnen eingestellt und durch die Mixer-Adaptoren **31** und **32** ersetzt (Abbildung 85). In diesen Experimenten konnten in den untransfizierten Zellen und mit der

8.3.6 Stabilitätstest mit den Adaptoren 30 und 31

Um die Stabilität der DNA/LNA-Mixmere gegenüber Nukleasen zu untersuchen, wurden die Adaptoren **30** und **31** in HeLa-Lysaten bei RT und bei 37 °C inkubiert. In den Experimenten zeigte sich, dass die Adaptoren bei RT über mehrere Tage relativ stabil waren (Abbildung 86, **a** und **b**, Lane 2 – 8, rot). Zwar war die Bande des Adaptors **30** bereits nach einem Tag deutlich abgeschwächt, konnte jedoch auch nach 4 d noch nachgewiesen werden. Der Adaptor **31** war hingegen auch nach 7 d noch nachzuweisen und zeigte innerhalb der ersten 4 d nur einen geringen Abbau. Wie zu erwarten, trat der Abbau der Adaptoren bei einer Inkubation bei 37 °C deutlich früher ein (Abbildung 86, **a** und **b**, Lane 10 – 16). Im Fall des Adaptors **30** zeigte sich bereits nach 3 h ein deutlicher Abbau (**a**, Lane 12) und nach 24 h war der Adaptor nicht mehr zu detektieren (Lane 13). Im Gegensatz dazu wies der Adaptor **31** nach 3 h nur eine geringe Degradierung auf (**b**, Lane 12), konnte jedoch nach 24 h ebenfalls nicht mehr detektiert werden (**b**, Lane 13). Allerdings war das Lysat nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C, im Unterschied zu der Inkubation bei RT, deutlich getrübt, was auf eine verstärkte Präzipitation bei 37 °C hindeutete. Da nach 24 h nicht einmal Abbauprodukte der Adaptoren zu beobachten waren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Adaptoren ebenfalls präzipitierten und somit

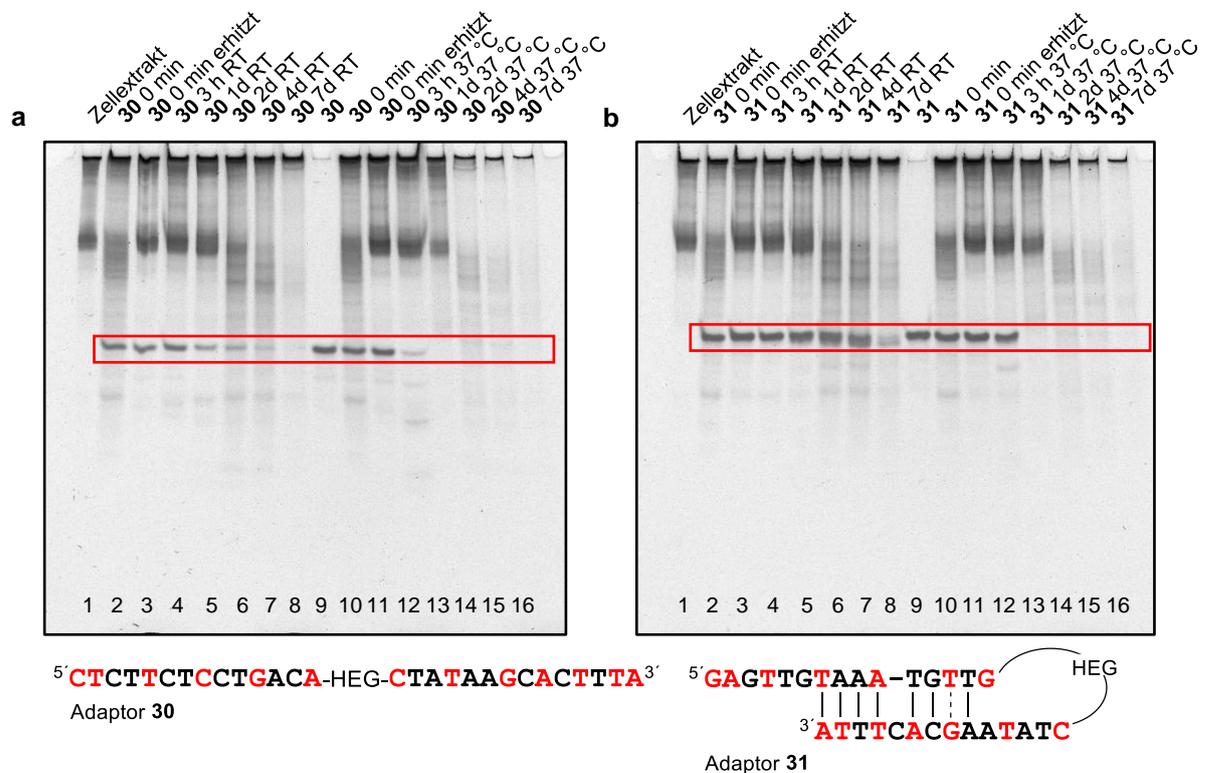


Abbildung 86: Stabilitätstest mit den Adaptoren **30** (**a**) und **31** (**b**) (je 2 µM). Die Adaptoren wurden dabei sowohl bei RT als auch bei 37 °C inkubiert. Die Proben des ersten Tages wurden vor der Elektrophorese für 5 min auf 90 °C erwärmt, bei den späteren Proben wurde darauf verzichtet, um einen möglichen beschleunigten Abbau oder die Präzipitation des Adaptors zu vermeiden. Die Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit SYBR Gold. Die Adaptorbanden sind rot markiert, der starke Hintergrund wird durch zelleigene ONs verursacht. 16 % dPAGE.

nicht mehr zu beobachten waren. Aus diesem Grund konnte keine endgültige Aussage über die Stabilität der Adaptoren getroffen werden, jedoch zeigten diese Experimente, dass der Adaptor **31** einen geringeren Abbau als Adaptor **30** aufwies. Dies ließ den Schluss zu, dass die *hairpin*-Struktur einen stabilisierenden Effekt besaß.

Aufgrund der geringen Reproduzierbarkeit der Zellkulturexperimente und da eine Degradierung der Adaptoren als Ursache nicht belegt werden konnte, wurden die Experimente mit den gegen miR-20a gerichteten Adaptoren eingestellt.

8.4 Gegen miR-let-7 gerichteter Adaptor 37

Für einen biologischen *proof of principle* ist es wichtig, eine Derepression solcher Proteine zu zeigen, die durch die fragliche miRNA im verwendeten Zelltyp herunterreguliert sind. Noch wichtiger ist es allerdings, durch das Umleiten der miRISCs eine Absenkung des neuen Zielproteins zu erreichen. Dies konnte in den Experimenten mit miR-20a und Pim-1 nicht eindeutig beobachtet werden. Eine Grundvoraussetzung für den Erfolg ist eine bestimmte Stöchiometrie der involvierten Nukleinsäuren: Die 3'-UTR der Ziel-RNA sollte zu einem hohen Anteil mit einem RISC-beladenen Adaptor belegt sein. Dies setzt eine hinreichende Menge an umzuleitender miRNA voraus. Andernfalls würden unbeladene und damit inaktive Adaptoren mit den RISC-beladenen um die Bindestelle konkurrieren. Um diese kontraproduktive Situation zu vermeiden, dürfte die Umleitung solcher miRNAs am aussichtsreichsten sein, die in möglichst hoher Zahl in einer Zelle vorkommen. Noch bedeutend häufiger als miR-20a sind in fast allen Zellen die miRNAs der let-7-Familie anzutreffen. Im Gegensatz zu miR-20a handelt es sich bei ihnen keineswegs um oncomiRs. Sie haben im Gegenteil sogar tumorhemmende Eigenschaften, die man eigentlich nicht blockieren sollte. Um jedoch die Inhibierung eines Zielproteins durch RISC-Umleitung zu demonstrieren, erschienen miR-let-7a und seine Verwandten als aussichtsreichste Kandidaten. Die nachfolgend geschilderten Experimente hatten daher zum Ziel, miR-let-7a auf die bekannte Bindestelle 1491 in der 3'-UTR der *PIM1*-mRNA umzuleiten. Hierzu wurde der zu Adaptor **32** analoge Adaptor **37** (Abbildung 87) entworfen und in Band-Shift- sowie Pull-down-Experimenten auf sein Bindeverhalten untersucht. Parallel dazu wurden in der Hartmann-Gruppe statt der K562-Zellen die stabiler zu transfizierenden HeLa-Zellen für die Zellkulturexperimente eingesetzt.^[238]

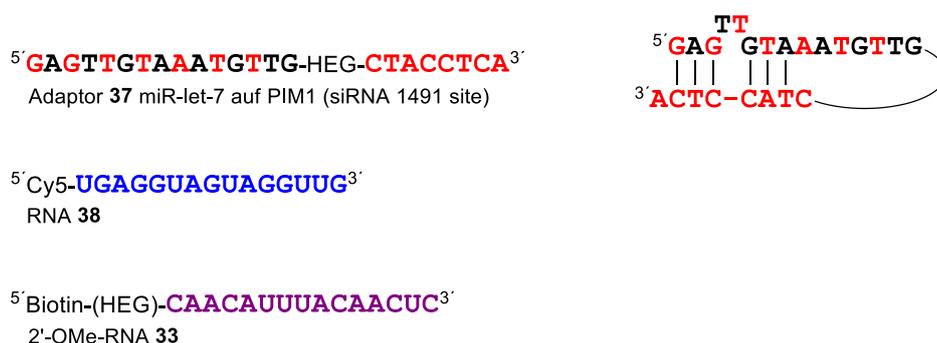


Abbildung 87: Sequenz der ONs **37** und **38**. Eine mögliche *hairpin*-Struktur des Adaptors ist auf der rechten Seite gezeigt. Dabei steht Rot für LNA, Schwarz für DNA, Blau für RNA und Violett für 2'-OMe-RNA.

Wie schon bei den zuvor verwendeten Adaptoren wurde Adaptor **37** auf eine mögliche Bildung von Sekundärstrukturen überprüft. Es zeigte sich, dass auch Adaptor **37** eine *hairpin*-Struktur ausbilden konnte (Abbildung 87, rechts). Zusätzlich wurde die *PIM1*-mRNA auf mögliche Bindestellen des gegen die miR-let-7-Familie gerichteten Teil des Adaptors untersucht. Hierbei konnten zwar komplementäre Bereiche gefunden werden, allerdings

lagen diese weit von dem Nukleotid 1491 entfernt, sodass eine doppelte Bindung des Adaptors eher unwahrscheinlich war. Die Funktion des Adaptors wurde zunächst in Band-Shift- und Pulldown-Experimenten mit dem Cy5-markierten miRNA-Modell **38** geprüft. Von besonderem Interesse waren dabei Hinweise auf eine mögliche Selbststruktur (Abbildung 87). Im Anschluss sollte die Umleitung von RISCs in HeLa-Lysat getestet werden.

In den Band-Shift-Experimenten konnte ein zu Adaptor **32** analoges Verhalten beobachtet werden. Allerdings war die Bindung an miR-let-7a besser als die von Adaptor **32** an miR-20a. Auch in diesem Fall war die Bildung des ternären Komplexes aus Adaptor **37** und den ONs **33** und **38** unabhängig von der Konzentration des Adaptors und es konnte wieder von einer Art kooperativer Bindung ausgegangen werden. Die fluoreszenzbasierten Pulldown-Experimente wurden analog zu den Versuchen mit Adaptor **32** durchgeführt und es zeigte sich ein vergleichbares Verhalten der Adaptoren (Abbildung 88). Hierbei konnte ein linearer Anstieg der Fluoreszenz bis zu einem Verhältnis von 1:1:1 beobachtet werden, auf die eine deutlich geringere Zunahme bis zu einem Maximum bei 1:1.75:1 (**33/37/38**) folgte. Analog zu Adaptor **32** fiel die detektierte Fluoreszenz bei höheren Adaptorkonzentrationen nur schwach ab und selbst bei einem sechsfachen Überschuss konnten noch rund 70 % der maximalen Fluoreszenz detektiert werden. Daraus konnte abgeleitet werden, dass auch der Adaptor **37** ein kooperatives Bindeverhalten aufwies, aber dennoch zur Umleitung von RISCs geeignet sein sollte. Daraufhin wurden Band-Shift-Experimente mit der 412mer RNA **34** durchgeführt (Abbildung 89). In diesem Ausschnitt der *PIM1*-mRNA war die mögliche Bindestelle für den gegen miR-let-7a gerichteten Teil des Adaptors nicht vorhanden und dementsprechend war eine vollständige Bildung des ternären Komplexes zu erwarten. Analog zu den Adaptoren **31** und **32** führte die Bindung des Adaptors **37** zu einer langsameren Migration der RNA **34** (Lane 4), während die

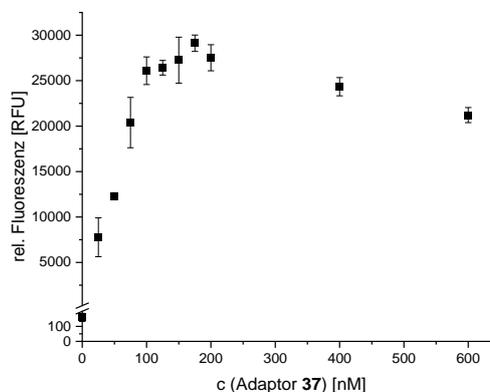


Abbildung 88: Fluoreszenz-Pulldown mit Adaptor **37** und den ONs **33** und **38** (je 100 nM). Die Proben wurden 1 h in Puffer 2 inkubiert. Dabei konnte ein Maximum bei einem Verhältnis von 1:1.75:1 (**33/37/38**) beobachtet werden.

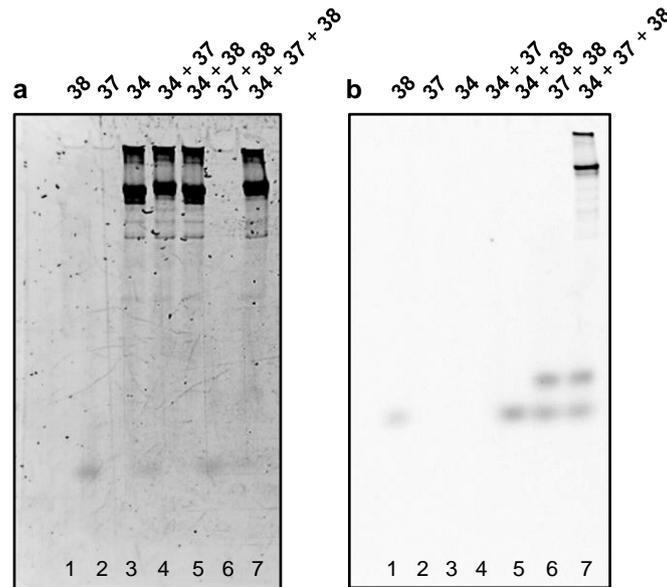


Abbildung 89: Band-Shift-Experiment mit den RNAs **34** und **38** und dem Adaptor **37**. Detektion mittels **a:** SYBR Gold Färbung, **b:** Cy5-Fluoreszenz. Lane 1: RNA **38**; Lane 2: Adaptor **37**; Lane 3: RNA **34**; Lane 4: RNA **34** + Adaptor **37**; Lane 5: RNA **34** + RNA **38**; Lane 6: RNA **38** + Adaptor **37**; Lane 7: RNA **34** + RNA **38** + Adaptor **37**. Die Proben wurden 2 h in Puffer 2 bei RT inkubiert. Die Konzentration der ONs betrug in allen Fällen ungefähr 1 μ M. 8 % nativ PAGE.

Bindung der RNA **38** keinen weiteren Effekt hatte. Allerdings konnte bei Detektion der Cy5-gelabelten RNA **38** eine intensive Bande beobachtet werden (Abbildung 89, **b**, Lane 7), die auf die Ausbildung des ternären Komplexes schließen ließ. Die Cy5-Detektion zeigte zusätzlich noch einen deutlichen Anteil des binären Komplexes zwischen RNA **38** und Adaptor **37** sowie der ungebundenen RNA **38**. Dies war jedoch, analog zu den Experimenten mit den Adaptoren **31** und **32**, durch einen Unterschuss der RNA **34** zu erklären. Dies zeigte, dass die Bildung des ternären Komplexes aus den ONs **37**, **34** und **38** möglich war. Mit dem verwendeten Konstrukt konnte jedoch eine Bindung beider Adaptorhälften an die *PIM1*-mRNA nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Umleitung einer Modell-RNA mit Adaptor **37** erfolgreich war, wurde er eingesetzt, um miR-let-7 beladene RISCs aus HeLa-Lysaten zu isolieren (Abbildung 90). Darüber hinaus wurde die Selektivität des Adaptors untersucht. Dazu wurde der Adaptor **37** mit einem Ausschnitt der *PIM1*-mRNA (ON **33**) sowie der orthogonalen Zielsequenz des Adaptors **30** (ON **24**) inkubiert. Dabei zeigte sich, dass der Adaptor **37** nur in Gegenwart des ON **33** hAgo2 umleiten konnte (Lane 2). Ohne den Adaptor oder in Kombination mit ON **24** war dagegen nur eine schwache Bande zu beobachten (Lane 3 + 1).

Somit ergab sich aus den *in vitro* Experimenten, dass sich nach den ONs **30** und **31** auch der dritte Adaptor **37** zur Umleitung von RISCs eignete. Zusätzlich zeigten die Erfahrungen mit Adaptor **37**, dass neben miR-20a auch die miR-let-7-Familie adressiert werden konnte, wodurch das Konzept nicht auf eine miR-Familie beschränkt war.

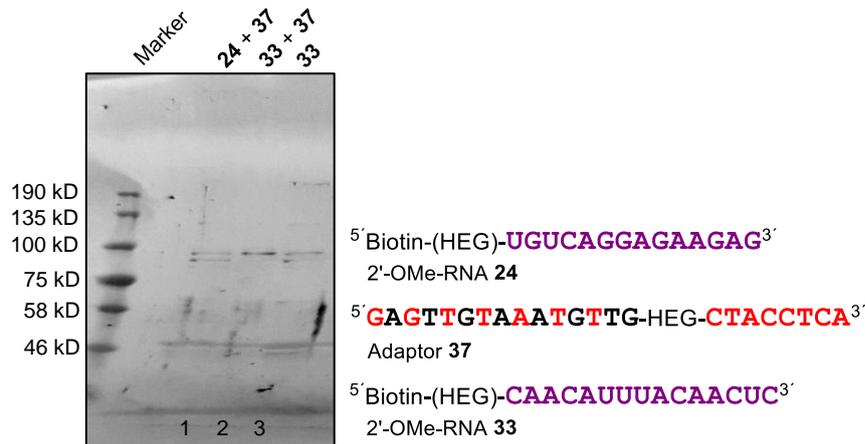


Abbildung 90: Selektive Isolierung von RISCs mittels des Adaptors **37**. Lane 1: ON **24** + Adaptor **37**; Lane 2: Adaptor **37** + ON **33**; Lane 3: ON **33**; Die Banden wurde durch Western-Blot nach Elektrophorese durch spezifische Antikörper gegen hAgo2 sichtbar gemacht. Detektion mittels Färbung (BCIP/NBT). Die Proben wurden für 3 h bei RT in Puffer 2 inkubiert. Die Konzentration der ONs betrug jeweils 300 nM in 100 µL.

8.4.1 Zellkulturexperimente mit Adaptor 37

In den Zellkulturexperimenten wurden zusätzlich zu Adaptor **37** verschiedene Kontrolladaptoren verwendet (Abbildung 91). Die ONs **39** und **40** konnten an die *PIM1*-mRNA binden, waren jedoch nicht in der Lage RISCs zu rekrutieren. Mit ihnen sollte ausgeschlossen werden, dass die Bindung des Adaptors **37** auch ohne die Rekrutierung von RISCs einen Einfluss auf die Pim-1-Expression hatte und mögliche Effekte lediglich auf Konformationsänderungen der mRNA oder einem sterischen Block beruhen könnten. Der Adaptor **41** war komplementär zur miR-let-7-Familie, sollte aber nicht mit der *PIM1*-mRNA interagieren. Mit ihm sollte überprüft werden, ob die Bindung des Adaptors an die miR-let-7-Familie einen Effekt auf die Pim-1-Expression induzieren konnte. Der Adaptor **42** sollte keine Funktion besitzen und diente wie die DNA **43** als Transfektionskontrolle.

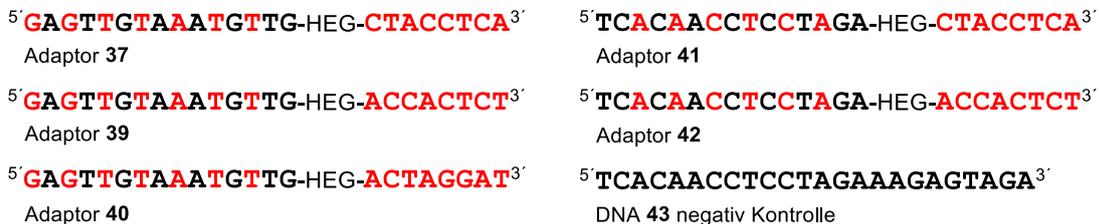


Abbildung 91: Für die Zellkulturexperimente eingesetzte ON. Dabei steht Rot für LNA und Schwarz für DNA.

In ersten Experimenten konnten mit Adaptorkonzentrationen von 50 nM – 200 nM eine Reduktion von Pim-1 beobachtet werden, während dies mit den Negativkontrollen **39** oder **40** nicht auftrat. Die Ergebnisse wurden so interpretiert, dass eine Adaptorbindung ohne RISC-Rekrutierung (**39** und **40**) keinen Einfluss hatte, wohingegen der miR-let-7-beladene

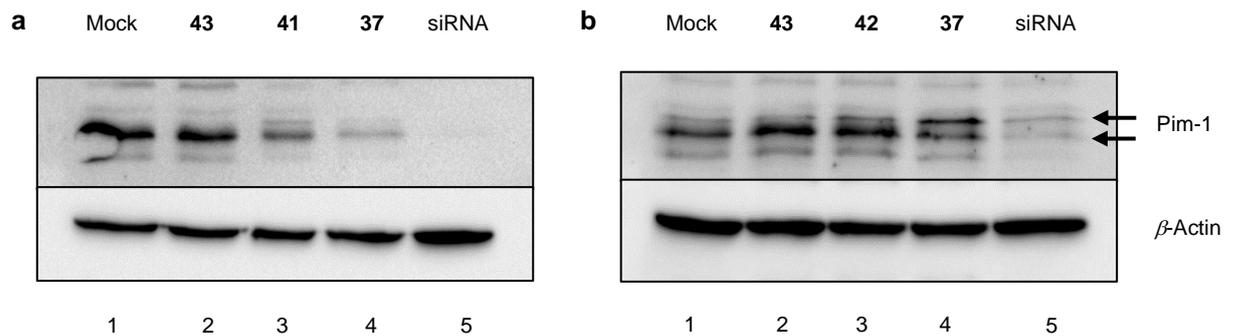


Abbildung 92: Zellkulturexperimente mit dem Adaptor **37** (200 nM). **a:** Mit frischen Zellen, **b:** mit gealterten Zellen. Für Pim-1 konnte eine Doppelbande detektiert werden (**b**, Pfeile). β -Actin wurde als Expressionskontrolle verwendet. Die Experimente wurden von Laura Thomas aus der Gruppe von Prof. Hartmann (Universität Marburg) durchgeführt.

Adaptor **37** den gewünschten Effekt bewirkte. Um auszuschließen, dass ein anti-miR-Effekt auf die miR-let-7-Familie die Ursache für die reduzierte Pim-1-Expression war, wurden Experimente mit den Adaptoren **37** und **41** durchgeführt (Abbildung 92, **a**). Auch hier konnte eine deutliche Reduktion der Pim-1-Expression durch den Adaptor **37** beobachtet werden (Lane 4). Allerdings wurde die Expression auch durch den Adaptor **41** inhibiert (Lane 3). Um auszuschließen, dass ein anti-miR-Effekt die Ursache der Reduktion war, wurde eine gegen miR-let-7 gerichtete Achtmer-LNA transfiziert, die jedoch keinen Effekt auf die Pim-1-Expression besaß. Somit konnte ein reiner anti-miR-Effekt ausgeschlossen werden. Allerdings befand sich im kodierenden Bereich der *PIM1*-mRNA eine Mismatch-Bindestelle für den Adaptor **41**. Damit war nicht auszuschließen, dass die Reduktion der Pim-1-Level durch eine miR-let-7-Umleitung auf diese Stelle verursacht wurde. Beim Vergleich von Daten aus mehreren unabhängigen Versuchen fiel auf, dass die Effekte des Adaptors von der Zahl der Passagen abhing und bei steigendem Zellalter geringer wurde (Abbildung 92, **b**, Lane 4). Dies führte dazu, dass über diese Versuche eine mittlere Reduktion der Pim-1-Expression von 20 bis 40 % beobachtet werden konnte, womit die Effekte des Adaptors deutlich unter denen der siRNA lagen und auch schlechter als die vergleichbarer miR-Mimics waren.^[233] Des Weiteren wurde die Auswertung durch das Auftreten zusätzlicher Pim-1-Banden beeinträchtigt (Abbildung 92, **b**), die mit zunehmendem Zellalter vermehrt beobachtet werden konnten. Dabei zeigte sich, dass diese Banden selbst bei Zugabe einer siRNA nicht gleichmäßig reduziert werden konnten (**b**, Lane 5). Eine eindeutige Aussage über die Funktion der Adaptoren ließ sich somit nicht treffen.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden die Experimente mit den Adaptoren vorerst zurückgestellt, da es mit dem gewählten System nicht möglich war, das Konzept der RISC-Umleitung in Zellkulturexperimenten zu bestätigen. Das gewählte Testsystem war dabei sehr komplex und konnte nicht konsistent ausgewertet werden. Dadurch blieb die

Aussagekraft der Experimente eingeschränkt. Darüber hinaus stellte sich jedoch die Frage, ob weitere Ursachen für die mangelnde Funktion der Adaptoren vorlagen. Hierbei waren sowohl grundlegende konzeptionelle Hindernisse als auch adaptorspezifische Probleme denkbar.

In Bezug auf die konzeptionellen Ursachen ist zwar nicht grundsätzlich nicht auszuschließen, dass RISCs eine direkte Bindung an die RNA benötigen, um GW-Proteine zu rekrutieren. In diesem Fall wäre eine Unterdrückung der Translation durch die Umleitung von RISCs nicht möglich. Gegen diese These sprach jedoch, dass mit Adaptor **37** in einigen Fällen eine Repression der Pim-1-Expression erzielt wurde. Ein weiteres grundlegendes Problem stellte eine Eliminierung der miRNA aus den RISCs im Anschluss an eine Hybridisierung mit dem Adaptor dar.^[185] In diesem Fall ginge das für die Wirkung entscheidende hAgo2-Protein verloren. Allerdings sollte dieser Effekt nur bei vollständig komplementären anti-miRs auftreten. In diesem Fall wäre auch eine Isolierung von RISCs in Pulldown-Experimenten nicht möglich. Da dies jedoch mit unterschiedlichen Adaptoren gelang, ist auch diese Hypothese widerlegt.

Da es keine konkreten Hinweise auf konzeptionelle Ursachen gab, war davon auszugehen, dass adaptorspezifische Probleme vorlagen. In diesem Zusammenhang war insbesondere das kooperative Bindeverhalten der Adaptoren zu beachten. Im Fall der Adaptoren **31**, **32** und **37** erfolgte die Rekrutierung von RISCs bevorzugt nach der Bindung des Adaptors an die *PIM1*-mRNA, während eine Hybridisierung des freien Adaptors aufgrund ihrer *hairpin*-Struktur erschwert wurde. Zwar bot dieses Verhalten auch Vorteile, wie eine erhöhte Nukleasestabilität, allerdings ergaben sich auch potenzielle Nachteile. Beispielsweise erhöhte dieses Verhalten die Wahrscheinlichkeit von *off-target*-Effekten, wie bei den Adaptoren **31** und **32** zu beobachten war. In diesem Fall band die anti-miR-Hälfte des Adaptors ebenfalls an die *PIM1*-mRNA und verhinderte so eine Rekrutierung von RISCs. Da die RNA **34** nicht die vollständige 3'-UTR der *PIM1*-mRNA abbildet, konnte dieser Effekt für Adaptor **37** nicht ausgeschlossen werden. Als Folge des kooperativen Bindeverhaltens der Adaptoren und der unbekanntenen Sekundärstruktur der *PIM1*-mRNA konnte zudem eine sterische Abschirmung der anti-miR-Hälfte des Adaptors nicht ausgeschlossen werden. Dabei stellte sich die Frage, wie der Adaptor nach der Bindung an die mRNA orientiert und ob er für RISCs zugänglich war. Die Experimente mit RNA **34** zeigten zwar, dass eine proteinfreie miRNA umgeleitet werden konnte, was gegen eine sterische Abschirmung des Adaptors sprach. Allerdings ist der sterische Anspruch eines RISCs deutlich höher, wodurch die Ergebnisse nicht ohne weiteres übertragen werden können.

Um diese Effekte auszuschließen, wäre ein vollständig orthogonaler Adaptor notwendig, der zunächst mit RISCs interagieren und im Anschluss an die mRNA binden könnte. Bei

der Verwendung orthogonaler Adaptoren ist jedoch zu beachten, dass diese eine geringere Nukleasestabilität aufwiesen als die *hairpin*-Adaptoren, wie in den Stabilitätstests mit den Adaptoren **30** und **31** gezeigt werden konnte. Somit müsste die Stabilität der Adaptoren erhöht werden, wozu Phosphorthioate verwendet werden können. Da diese zusätzlich die Affinität der Adaptoren leicht reduzieren,^[47] könnten auch *off-target*-Effekte geschwächt oder vollständig verhindert werden. Somit sollten mögliche Folgeexperimenten mit Adaptoren dieses Typs durchgeführt werden.

8.5 Vorgehen beim Entwurf der Adaptoren

Beim Aufbau von Adaptoren aus bifunktionalen ONs besteht eine der Herausforderungen darin, eine hinreichende Orthogonalität der Adaptorhälften zu erzielen, damit intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen vermieden werden können. Hierauf ist insbesondere bei der Verwendung von LNA-Nukleotiden zu beachten, da diese die Affinität der ONs deutlich erhöhen. Daher erfordert der Aufbau der Adaptoren eine genaue Planung, damit sie ihre vorgesehene Funktion erfüllen können. Ausgehend von den in dieser Arbeit beobachteten Schwierigkeiten wird im Folgendem ein Leitfaden aufgestellt werden, welcher den zukünftigen Aufbau der Adaptoren erleichtern kann.

Zu den grundlegenden Problemen dieser Arbeit zählte die partielle Selbstkomplementarität der Adaptoren die zu intermolekularen Wechselwirkungen führte. Diese Effekte traten insbesondere bei den LNA-Adaptoren auf und konnten durch die Verwendung von DNA/LNA-Mixmeren verhindert werden. Gleichzeitig war es mit den Mixmeren nicht möglich, intramolekulare *hairpin*-Strukturen auszuschließen. Der Einfluss dieser Strukturen auf die Umleitung der RISCs konnte dabei nicht vollständig aufgeklärt werden und erfordert weitere Untersuchungen. Um potenzielle *hairpin*-Strukturen schon in der Planung der Adaptoren zu erkennen und gegebenenfalls zu verhindern, sind Analysen mit dem *LNA Oligo Optimizer* von Qiagen, sowie der *NUPACK Web Applikation* vonnöten.^[235,236] Dabei können die Einflüsse der LNA-Nukleotide mit dem *LNA Oligo Optimizer* untersucht werden, um komplementäre Abschnitte der Adaptorhälften zu identifizieren. Auf diese Weise können intermolekulare Wechselwirkungen ausgeschlossen und mögliche *hairpin*-Strukturen lokalisiert werden. Um die Vollängen-Adaptoren zu überprüfen, ist der Einsatz der *NUPACK Web Applikation* zu empfehlen. Mit dieser Applikation können die Adaptoren als RNAs betrachtet und der Linker durch nichtkomplementäre Basen nachgestellt werden. Falls beide Programme identische Basenpaarungen voraussagen, muss man von der Bildung einer *hairpin*-Struktur ausgehen.

Im Anschluss an den Entwurf müssen die Adaptoren auf ihre Funktion getestet werden. Hierzu empfehlen sich Band-Shift-Experimente, in denen die Bildung des ternären Komplexes überprüft und der Adaptor auf eine mögliche Kooperativität hin untersucht werden kann. In Experimenten mit längeren Ausschnitten der 3'-UTR der Ziel-RNA kann eine mögliche Bindung beider Adaptorhälften an die mRNA ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Band-Shifts sollten daraufhin in fluoreszenzbasierten Pulldown-Experimenten bestätigt werden. Dabei kann die Abhängigkeit des ternären Komplexes von der Adaptorkonzentration genauer untersucht werden. Nach diesen Versuchen sollte man die Isolierung von RISCs in Pulldown-Experimenten verifizieren, bevor der Adaptor in Zellkulturen eingesetzt werden kann.

Daraus ergibt sich die folgende Vorgehensweise:

- 1. Auswahl geeigneter Ziel-RNAs und miR-Familien und Überprüfung des resultierenden Adaptors auf Orthogonalität.
- 2. Prüfung der Zielsequenz auf mögliche Bindestellen für beide Hälften des Adaptors, was möglichst zu vermeiden ist.
- 3. Verteilung der LNA-Basen mit dem Ziel, eine möglichst hohe Stabilität und Affinität bei geringen Nebeneffekten zu erhalten.
- 4. Prüfung der Adaptoren auf intramolekulare Sekundärstrukturen (*hairpins*)
- 5. Band-Shift-Experimente mit kurzen und langen Ziel-RNAs.
- 6. Pulldown-Experimente mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden.
- 7. Pulldown-Experimente mit Zelllysat.
- 8. Zellkulturexperimente mit geeigneten Reporterproteinen.

9 Zusammenfassung und Ausblick

9.1 Umleitung von Sp1

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die PIPs **PA2**, **PA3** und **PA5** mittels Festphasensynthese und die PIPs **PA3**, **PA4** und **PA6** in Lösung erfolgreich aufgebaut werden. Hierbei war es möglich, die Synthese der Grundbausteine **2** und **3** mit weniger reaktiven Substanzen durchzuführen. Die Synthese der PIPs in Lösung konnte durch eine *in situ* Einführung der Boc-Gruppen während der Reduktion und die somit verhinderte Zersetzung der Amine effektiv durchgeführt werden. Für den finalen Aufbau der PIPs erwies sich eine direkt auf die Reduktion der Nitrogruppe folgende Peptidkupplung als gute Methode. Im Anschluss konnten die PIPs erfolgreich mit einem ON gekuppelt und die Konjugate nachfolgend mittels dPAGE gereinigt werden. Unter Verwendung der DNAs **4**, **5** und **6**, sowie der Polyamide **PA4** und **PA6** erhielt man die Adaptoren **K5a**, **K7a** und **K9**. In Band-Shift-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sie mit einer guten Affinität und Spezifität an definierte Zielsequenzen banden. Anhand von Pulldown-Versuchen war es möglich, die Rekrutierung des TFs Sp1 an eine nicht natürliche Bindestelle zu zeigen. Als alternatives Konzept wurden Adaptoren auf TFO-Basis entworfen. In Band-Shifts konnte dabei eine Bindung der DNA **10** an die Ziel-DNA **14** beobachtet werden. Allerdings besaß dieser Adaptor eine geringere Affinität als die PIP-Konjugate. Darüber hinaus zeigte sich, dass diese DNA **10** auch mit der partiell komplementären DNA **15** wechselwirkte und somit deutlich weniger spezifisch war als erhofft. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit eine Syntheseroute zu einem Fmoc-geschützten Thiouracil-PNA-Monomer (**70**) entworfen werden. Dabei wurde die Eignung von PMB als Schutzgruppe nachgewiesen und eine Methode zur selektiven Alkylierung der N1-Position des Thiouracils entwickelt. Auf diese Weise war es möglich, eines der größten Hindernisse bei der Synthese von Thiouracil-Monomeren zu beheben.

In zukünftigen Arbeiten wäre es notwendig zu untersuchen, ob der Adaptor **K9** oder die DNA **10** durch Rekrutierung von Sp1 die Transkription eines Reportergens, z.B. einer Luciferase, aktivieren können. Dazu sollten Zellkulturexperimente mit oder ohne Transfektionsmittel durchgeführt werden. Als Negativkontrollen käme neben der unkonjugierten DNA **6** auch ein PIP-Konjugat auf Basis von **PA3** in Frage. Mit diesem könnte überprüft werden, ob die Aktivierung der Transkription tatsächlich durch das Umleiten von Sp1 ausgelöst wird, oder ob die dsDNA der Adaptoren andere Signalwege aktiviert, welche die Transkription erhöhen könnten. Darüber hinaus wäre es notwendig, die Nukleasestabilität der Adaptoren zu erhöhen, indem man z.B. die Nukleotide an den 5'- und 3'-Enden durch LNAs und das Rückgrat an diesen Positionen, sowie im *turn* durch

Phosphorothioate ersetzt. Sollten die Adaptoren die Genexpression des Modellsystems aktivieren können, wäre es notwendig, ihre Spezifität zu erhöhen. Im Fall der PIP-Konjugate war die kurze und AT-reiche Zielsequenz die Ursache für eine geringe Spezifität, weil Pyrrole nicht zwischen A und T unterscheiden können. Um dies zu beheben, wäre es denkbar, vermehrt Guanosinreste in die Ziel-DNA einzubauen, die durch Imidazole spezifisch erkannt werden können. Hierdurch wird jedoch die Synthese der PIPs anspruchsvoller und bei zu hohen Im-Anteilen sinkt oftmals die Affinität der PIPs. Dem könnte jedoch durch die Substitution von Pyrrol durch β -Alanin entgegengewirkt werden. Außerdem ermöglicht dieser Austausch den Aufbau längerer Polyamidketten, wodurch sich ebenfalls die Spezifität steigern lässt.^[137] Eine andere Möglichkeit, die Länge der Ziel-Sequenz zu erhöhen, wäre die Verwendung von Tandem-PIPs,^[140,141,148] mit welchen bis zu 18 bp erkannt werden können.^[141]

Ein weiterer Punkt für zukünftige Arbeiten stellt die Wahl des Transkriptionsfaktors dar. Hierfür wäre NF- κ B ein interessantes Ziel, da es in den meisten Zelllinien im Cytosol vorliegt und erst durch eine externe Stimulierung in den Zellkern eindringt.^[241] Somit bestünde die Möglichkeit, den Adaptor zu transfizieren und im Anschluss eine gezielte Aktivierung der Transkripten auszulösen. Hierdurch könnte ein besseres Signal zu Rausch Verhältnis erhalten werden, um die Aktivierung der Transkription störungsfreier zu detektiert.

Für die TFO- und PNA-basierten Adaptorsysteme wären ebenfalls weitere Untersuchungen notwendig. Bei den TFO-basierten Adaptoren könnten LNA-Nukleotide im TFO eingebaut werden, da diese die Stabilität der Triplexbildung erhöhen.^[54] Somit wäre es möglich, die Affinität der Adaptoren und gleichzeitig ihre Nuklease Stabilität zu verbessern. Für die pseudokomplementären PNAs ist zunächst die Wahl einer Sequenz entscheidend, die eine Duplexinvasion unter physiologischen Bedingungen erlaubt. Diese sollte daraufhin mit einer gegen den ausgewählten TF gerichteten DNA verknüpft werden. Zum Aufbau dieser Konjugate sollte neben den in dieser Arbeit verwendeten Diisocyanaten auch Di-NHS-Ester oder Click-Cycloadditionen in Betracht gezogen werden. Sind funktionale Konjugate vorhanden, die aus zwei Einzelsträngen bestehen, müsste sichergestellt werden, dass die Transfektionseffizienz aller Komponenten gleichmäßig gewährleistet ist, da andernfalls eine Doppelstranginvasion durch pseudokomplementäre PNAs nicht funktioniert. Die kovalente Verknüpfung beider Stränge ist zwar ein strategisch einfaches Konzept, synthetisch jedoch mit großem Aufwand verbunden. Als Alternative wäre es denkbar, beide PNA-Stränge mit einer Hälfte des gewünschten DNA-Duplex zu konjugieren (Abbildung 93). Somit würden die pseudokomplementären PNA-Stränge auf nicht kovalente Weise miteinander verknüpft und gleichzeitig die dsDNA-Bindestelle für den TF erzeugt.^[242,243]

Zusammenfassung und Ausblick

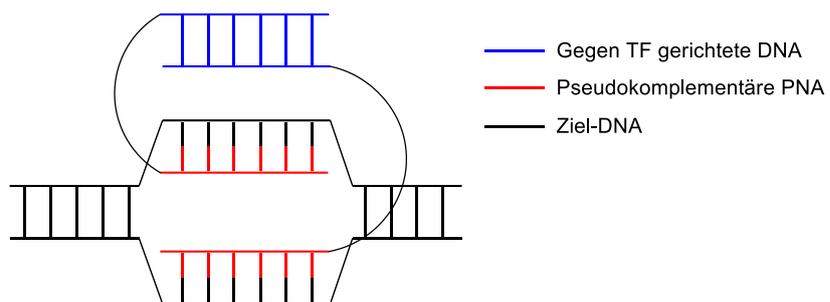


Abbildung 93: Schematische Darstellung der Bindung eines Adaptors auf Basis von pseudokomplementärer PNA.

9.2 Umleitung von RISCs

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnten RISCs *in vitro* erfolgreich auf nicht natürliche Bindestellen umgeleitet werden. Hierzu wurden Adaptoren aus DNA/LNA-Mixmeren verwendet, welche über einen HEG-Linker verknüpft waren. In Band-Shift- und Pulldown-Experimenten wurde gezeigt, dass die Umleitung eines fluoreszenzmarkierten miRNA-Modells auf mRNA-Modelle unterschiedlicher Länge möglich war. In diesen Versuchen konnte zudem beobachtet werden, dass die Adaptoren **31**, **32** und **37** gegenüber ihren beiden Partnersträngen ein Verhalten aufwiesen, das dem einer kooperativen Bindung ähnelte. Die Ursache hierfür waren intramolekulare *hairpin*-Strukturen, durch welche der anti-miR-Teil des Adaptors blockiert wurde. Dies hatte zur Folge, dass die Bildung des ternären Komplexes aus Adaptor, miRNA und mRNA nach der Bindung des Adaptors an die mRNA bevorzugt wurde. Während dieses Verhalten bei kurzen Zielsequenzen keinen Einfluss auf die Bildung des ternären Komplexes hatte, zeigten sich an längeren Ausschnitten der *PIM1*-mRNA, dass eine Bindung beider Adaptorhälften möglich war. Dies hatte zur Folge, dass der ternäre Komplex nicht gebildet werden konnte. In Pulldown-Experimenten war es mit den Adaptoren möglich, RISCs umzuleiten und in einem anschließenden Western-Blot nachzuweisen. Diese Umleitung verlief sequenzspezifisch. In parallel durchgeführten Zellkulturexperimenten konnte in der Gruppe von Prof. Hartmann (Universität Marburg) gezeigt werden, dass mit Adaptor **37** eine Reduktion der Pim-1-Expression in HeLa-Zellen möglich war. Allerdings waren die Effekte nur schlecht zu reproduzieren und es konnte eine Abhängigkeit vom Zellalter beobachtet werden. Aufgrund der derzeitigen Datenlage können die steigernden und inhibierenden Effekte der RISC-Umleitung auf die Expression von Zielproteinen weder bestätigt noch widerlegt werden.

Da sich in dieser Arbeit zeigte, dass es mit dem gewählten Testsystem nicht möglich war die biologischen Effekte der RISC-Umleitung zu demonstrieren, stellt die Suche nach einem geeigneterem Versuchsaufbau eine der Aufgaben für zukünftige Arbeiten dar. Nachdem sich zelleigene Proteine in dieser Arbeit als ungünstige Ziele erwiesen, wäre zu überlegen, ein Reporterplasmid zu verwenden und die Funktion des Adaptors in einem Luciferase-Assay zu überprüfen. Dabei sollte sich die 3'-UTR der Ziel-RNA von der zelleigenen mRNAs möglichst unterscheiden, um *off-target*-Effekt zu verhindern. Auch darf die mRNA des Zielproteins nicht in zu hoher Konzentration vorliegen, da für ein optimales Funktionieren ein Überschuss der miRNA vonnöten ist. Um zu überprüfen, ob die Zielsequenz innerhalb einer stark gefalteten mRNA zugänglich ist, könnten Gapmere oder siRNAs verwendet werden. Eine weitere Alternative stellen künstliche Nukleasen dar,

Zusammenfassung und Ausblick

welche in unserer Gruppe eingesetzt werden und die in der Lage, sind auch lange RNAs sequenzspezifisch zu schneiden.^[240]

Des Weiteren sollten die Adaptoren so aufgebaut werden, dass eine intramolekulare *hairpin*-Struktur vermieden wird, da diese die Affinität des Adaptors verringert. Hierzu müssen die Adaptorhälften vollständig orthogonal sein. Nachdem sich in dieser Arbeit zeigte, dass die ungefalteten Adaptoren anfälliger gegenüber Nukleasen sind, sollten sie mit einem Phosphorthioat-Rückgrat versehen werden, um ihre Stabilität zu erhöhen. Darüber hinaus sollte auch die Reihenfolge der Adaptorhälften genauer untersucht werden. Die bisher verwendeten Adaptoren begannen mit dem ASO am 5'-Ende (Abbildung 94, links), allerdings wurde diese Anordnung willkürlich gewählt. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, auch die umgekehrte Orientierung zu testen, bei der die Adaptoren am 5'-Ende mit der anti-miR-Sequenz beginnen (Abbildung 94, rechts). Auf diese Weise würde die Positionierung des Linkers und somit auch die räumliche Orientierung der Adaptoren verändert. Außerdem wäre es hierdurch denkbar, *off-target*-Effekte zu verhindern und intramolekulare Wechselwirkungen der Adaptorhälften abzuschwächen.

Wenn mit diesen Experimenten die Steuerung von Proteinkonzentrationen durch RISC-Umleitung gelingt, sollten im Anschluss medizinisch relevante Ziele gesucht werden. Hierbei sind bevorzugt miRNAs zu wählen, die beispielsweise in Krebszellen überexprimiert sind und in normalen Zellen sehr geringe Expressionslevel aufweisen. Dadurch wäre die Wirkung der Adaptoren in gesunden Zellen nur gering, während ein starker Effekt in den Zielzellen zu erwarten ist.

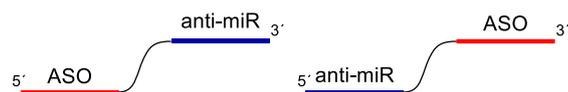


Abbildung 94: Möglicher Aufbau der Adaptoren. Links: Der Adaptor beginnt am 5'-Ende mit dem ASO-Teil; rechts: Der Adaptor beginnt am 5'-Ende mit dem anti-miR.

10 Experimenteller Teil

10.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Wasser- und/oder sauerstoffempfindlichen Substanzen wurden unter Argon gehandhabt. Hierzu wurden die Apparaturen vor Gebrauch im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend mit Argon gespült.

Absolute Lösemittel wurden von den Firmen Acros oder Sigma Aldrich bezogen.

Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich, TCI, Alfa Aesar, Fluka, Carbolution oder Fluorochem bezogen und ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

Oligonukleotide wurden von den Firmen BioTeZ und Bio Spring, Iba und Eurogentec bezogen.

Sp1 wurde von Promega (E6391) bezogen oder von Frau Dr. Ute Scheffer isoliert und bereitgestellt.

Die HeLa-Lysate wurden von Frau Elisabeth Kalden bereitgestellt.^[13]

Bei Arbeiten mit DNA wurde steriles MiliQ-Wasser und für Arbeiten mit RNA DEPC-Wasser verwendet.

Streptavidin beladene *Magnetic Beads* wurden von der Firma Promega bezogen.

10.1.1 Verwendete Apparaturen

Zum Einengen kleiner Volumina wurde eine *Speed Vac Plus SC110A* der Firma Savant oder eine *RVC 2-18* der Firma Christ genutzt.

Für Zentrifugationen wurde eine *Mikro 220r* der Firma Hettich verwendet.

10.1.2 Hydrierungen unter erhöhtem Druck

Eine Autoklavenhülse wurde mehrere Minuten lang mit Argon gespült. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Lösemittels, des Katalysators und der zu reduzierenden Substanz. Dann wurde die Apparatur geschlossen, drei Mal mit Argon auf einen Druck von fünf Bar befüllt und das Gas wieder abgelassen. Dieser Vorgang wurde mit H₂ wiederholt und erst dann der gewünschte Druck eingestellt. Nach beendeter Reaktion wurde die Apparatur auf RT abgekühlt und anschließend der Druck abgelassen. Danach befüllte man drei Mal mit Argon, bevor die Apparatur geöffnet werden konnte.

10.1.3 Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigfolien Alugramm® Xtra SIL G/UV₂₅₄ der Firma Macherey-Nagel mit einem Fluoreszenz-Indikator für 254 nm verwendet.

Zum Anfärben wurden die Folien mit einer Lösung von Ninhydrin in Ethanol und Eisessig benetzt und anschließend mit einer Heatgun erhitzt.

10.1.4 Präparative Säulenchromatographie

Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 der Firma Macherey-Nagel verwendet. Für die präparative Säulenchromatographie wurden Lösemittel technischer Qualität verwendet.

10.1.5 Analytische und semipräparative *rp*-HPLC der Polyamide

Für die analytische *rp*-HPLC wurden folgende Geräte verwendet: *JASCO DG-980-50*, *JASCO LG-980-02*, *JASCO Pu-980*, *JASCO UV-970*, *JASCO MD 2010 Plus*. Dazu eine *150/4 Nucleodur C18 HTec 5mm* Säule der Firma Macherey-Nagel. Es wurden bei einem Fluss von 0.7 mL/min entweder isokratische Bedingungen oder der folgende Gradient aus A: 0.1 % TFA in H₂O und B: ACN verwendet:

Zeit	A	B
0 min	90 %	10 %
2 min	90 %	10 %
30 min	30 %	70 %
40 min	30 %	70 %

Für die semipräparative Trennung wurde eine *Waters 2525 Binary Gradient Module Pump* sowie ein *Waters 2487 Detektor* verwendet. Dazu eine *VP 250/21 Nucleodur C18 HTec, 7 µm* Säule der Firma Macherey-Nagel. Die Trennung erfolgte bei einem Fluss von 9 ml/min mit einem isokratischem Gemisch 0.1 % TFA in Wasser und ACN oder einem der folgenden Gradienten aus A: 0.1 % TFA in H₂O und B: ACN:

Für **PA5**:

Zeit	A	B
0 min	90 %	10 %
5 min	90 %	10 %
35 min	30 %	70 %
38 min	30 %	70 %

Für **PA4** und **PA6**:

Zeit	A	B
0 min	90 %	10 %
5 min	90 %	10 %
35 min	35 %	65 %
38 min	35 %	65 %

10.2 Analytische und spektroskopische Methoden

10.2.1 Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an folgenden Spektrometern aufgenommen:

Bruker DPX 250:	^1H (250.1 MHz), ^{13}C (62.9 MHz)
Bruker 300:	^1H (300.1 MHz), ^{13}C (75.5 MHz)
Bruker AVANCE 400:	^1H (400.1 MHz), ^{13}C (100.6 MHz)
Bruker AVANCE 500:	^1H (500.1 MHz), ^{13}C (125.8 MHz)
Bruker DRX 600:	^1H (600.1 MHz), ^{13}C (151.0 MHz)

Alle aufgeführten ^{13}C -NMR-Spektren sind ^1H -Breitband-entkoppelt. Die Angabe der chemischen Verschiebung bezieht sich auf die δ -Skala in ppm. Die NMR-Spektren wurden standardmäßig bei 300 K aufgenommen. Zur Kalibrierung der ^1H -NMR- und ^{13}C -Spektren dienen die Restprotonen- und Lösemittelsignale der deuterierten Lösemittel:

^1H -NMR (CDCl_3 : 7.26 ppm; $\text{DMSO}-d_6$: 2.5 ppm)

^{13}C -NMR (CDCl_3 : 77.16 ppm; $\text{DMSO}-d_6$: 39.52 ppm)

Für die Beschreibung der Multiplizität der NMR-Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett; d = Dublett; t = Triplett; m = Multipllett; dd = Dublett von Dublett; q = Quartett; p = Pentett. Breite Signale sind mit *br* gekennzeichnet.

10.2.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde von der Serviceeinheit Massenspektrometrie der Universität Frankfurt durchgeführt.

LC-ESI-Massenspektrometrie wurde an einem *Surveyor MSQ* der Firma ThermoFisher durchgeführt.

MALDI-Massenspektrometrie wurde an *Voyager-DE STR* der Firma PerSeptive Biosystems durchgeführt.

MALDI-Präzisionsmassen wurden an *LTQ Orbitrap XL* der Firma ThermoFisher gemessen.

Die Massenspektrometrie (ESI/TOF) der Oligonukleotide wurde von Martin Held und Alexandra Schuck aus dem AK Heckel an einem LCMS-Gerät mit einem *micrOTOF-Q II*

Detektor der Firma Bruker durchgeführt. Es wurde eine Agilent 1200 Series HPLC mit einem MeOH/5 mM TEAA Puffer (Gradient 0 – 60 %) und einer *125x2.1 mm MultoKrom 5-C18* Säule bei einer Flussrate von 0.2 mL/min verwendet.

10.2.3 IR-Spektroskopie

Die Spektren wurden mit einem *Spectrum Two* IR-Spektrometer der Firma PerkinElmer mittels einer UATR-Einheit aufgenommen. Die Proben wurden mit der UATR-Einheit als Feststoff auf einen Diamanten gepresst und gemessen. Die Lagen der Absorptionsbanden werden in cm^{-1} angegeben. Die Ausprägung der Absorptionsbanden wird durch die folgenden Abkürzungen beschrieben.

w = schwach; m = mittelstark; s = stark; breite Banden wurden mit *br* abgekürzt.

10.2.4 UV/VIS-Spektroskopie

Die Konzentrationen der Oligonukleotide wurden mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt. Dazu wurde ein *NanoDrop 2000c* Spektrometer der Firma ThermoScientific genutzt. Dazu wurden die Extinktionskoeffizienten nach einem *nearest neighbor* Modell berechnet.^[244] Zur Vereinfachung wurden die Einflüsse der Modifikationen vernachlässigt.

10.2.5 Schmelzpunktmessungen der Verbindungen

Die Ermittlung der Schmelzpunkte erfolgte durch über die Kapillarmethode an einem Schmelzpunktbestimmungsgerät des Typs *MPM-H2* der Firma Schorpp Gerätetechnik.

10.2.6 Schmelzpunktmessungen der Oligonukleotide

Vor der Messung inkubierte man die ONs (1 μM pro Strang) in Puffer 2 (1 mL; 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl pH 8) über Nacht bei 37 °C. Die Schmelzpunktmessungen wurden an einem UV-VIS-Spektrometer (*Evolution 300*, Thermo Scientific) unter Verwendung einer 1 mL Küvette (Hellma Analytics) mit einer Weglänge von 1 cm durchgeführt. Die Temperatur der Messzelle wurde in der Lösung gemessen. Die Änderung der UV-Absorption wurde bei 260 nm zwischen 20 °C und 90 °C bestimmt, wobei die Temperaturänderungen 1 °C/min betrug. Es wurden drei bis fünf Zyklen aufgenommen und die erhaltenen Kurven individuell mit einem sigmoidalen Fit in *OriginLabs* gefittet. Die Schmelzpunkte sind als Durchschnitt der erhaltenen Werte angegeben.

10.3 Gelelektrophorese

10.3.1 Analytische dPAGE

Für die analytische dPAGE wurden 16 % Gele (7 M Harnstoff, 1x TBE-Puffer; Acrylamid:Bisacrylamid 19:1) verwendet. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen des denaturierenden 2x Ladepuffers (8 M Harnstoff, 20 mM EDTA, 0.2 % Orange G) gemischt und 5 – 10 min auf 90 °C erhitzt. Für die Elektrophorese wurde ein 0.5 x Tris-Borat-EDTA-Laufpuffer (TBE) verwendet und eine Spannung von 200 – 220 V angelegt. Man ließ den Farbstoff bis in das untere Drittel des Gels migrieren. Im Anschluss erfolgte eine Färbung mittels SYBR Gold (1:10000 in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 15 – 20 min) und eine Detektion mittels Fotografie unter Verwendung eines Grünfilters.

10.3.2 Präparative dPAGE

Für die präparative dPAGE wurden 16 % Gele (7 M Harnstoff, 1x TBE-Puffer, Acrylamid:Bisacrylamid 19:1) verwendet. Die Proben wurden in einer konzentrierten Harnstoff-Lösung aufgenommen, mit etwas denaturierendem 2x Ladepuffer versetzt und für 5 – 10 min auf 90 °C erwärmt. Für der Elektrophorese wurde ein steriler 0.5 x TBE-Laufpuffer verwendet und eine Spannung von 230 – 250 V angelegt. Man ließ den Farbstoff bis zur Hälfte des Gels migrieren. Dann wurden die Banden mittels UV-*shadowing* sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die Gelfragmente wurden über Nacht mit einem Gelelutionspuffer (500 mM NaOAc pH 7.0, 2 mM EDTA, 0.1 % SDS) inkubiert. Nach der Elution wurden die Proben durch einen Zentrifugalfilter (VWR, 516-0235, 13000x g) filtriert. Die Filtrate wurden mit dem dreifachen Volumen EtOH versetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Danach zentrifugierte man die Proben bei 30 min bei 18620x g und der Überstand entfernt. Die erhaltenen Pellets wurden in H₂O aufgenommen und die ONs mittels Gelfiltration entsalzt.

10.3.3 Band-Shift Experimente

Für die Band-Shift-Experimente wurden die Proben in den entsprechenden Puffern zwischen 3 h und 24 h bei RT oder 37 °C inkubiert und im Anschluss mit dem Ladepuffer versetzt.

Für die Elektrophorese wurde ein 0.5 x TBE-Laufpuffer und 8 % oder 16 % Nativgele (Acrylamid:Bisacrylamid: 37.5:1, 1x TBE-Puffer, 5 % Glycerin) verwendet. Dabei verwendete man zwischen 10 und 20 Taschen, die mit 10 µL oder 6 µL der Proben befüllt

wurden. Es wurde eine Spannung von 80 – 120 V angelegt und man ließ den Ladepuffer ungefähr bis zur Mitte des Gels migrieren. Die Färbung erfolgte mittels SYBR Gold (1:10000 in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 15 – 20 min) und die Detektion wurde mittels Fotografie unter Verwendung eines Grünfilters durchgeführt. Die Cy5-Detektionen erfolgten mittels einem *FUSION Xpress™ Multi-Imaging System*.

10.4 Pulldown-Experimente

10.4.1 Beladen der *Magnetic Beads*

Streptavidin beladene *Magnetic Beads* (600 μ L, Bindekapazität 0.75 μ mol/ μ L) wurden dreimal mit 0.5x SSPE-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde eine Lösung der biotinylierten Oligonukleotide (2 μ M) in 0.5x SSPE (450 μ L) mit 10 % *Rot®*-Block (Roth) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden die *Beads* mit Hilfe eines Magneten gesammelt, der Überstand entfernt und die *Beads* dreimal mit 0.5x SSPE gewaschen. Nach der Zugabe von 0.5x SSPE (450 μ L) wurden die *Beads* bei 4 °C gelagert.

10.4.2 Fluoreszenz-Pulldown

Allgemeines Vorgehen:

Ein Aliquot beladener *Beads* (100 mM – 400 nM) wurde in den jeweiligen Puffern (je 50 μ L – 100 μ L), der 10 % *Rot®*-Block enthielt, suspendiert und mit den Oligonukleotiden versetzt. Die Proben wurden zwischen 1 h und 24 h inkubiert, mit Hilfe eines Magneten gesammelt und anschließend mit dem entsprechenden Puffer gewaschen. Danach versetzte man die Proben mit 0.5x SSPE (97 μ L) sowie 0.1 M NaOH (3 μ L) und inkubierte diese Lösung für 30 min. Die Suspension wurde in schwarze 96-*well-microtiter* Platten (*Corning costar*) überführt und die Fluoreszenz der Cy-5-gelabelten Stränge gemessen (λ_{ex} = 649 nm, λ_{em} = 670 nm, *Tecan Safire II*).

Experimente mit den PIP-DNA Konjugaten:

Für die Inkubation und das Waschen der Proben wurde 0.5x SSPE-Puffer, Puffer Z oder Puffer 1 verwendet. Die Proben wurden drei Mal gewaschen.

Experimente mit den DNA/LNA Adaptoren:

Für die Inkubation und das Waschen der Proben wurde Puffer 2 verwendet. Die Proben wurden fünf Mal gewaschen.

10.4.3 Pulldown-Experimente zur Proteinisolierung und Detektion mittels Western-Blot

Allgemeines Vorgehen

Ein Aliquot der beladenen *Beads* wurde mit der gewünschten Proteinmischung in An- oder Abwesenheit der Konjugate oder der Adaptoren für 1 bis 3 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die *Beads* gewaschen, mit *Laemmli*-Puffer (6 μ L) versetzt und für 5 – 10 min auf 90 °C erhitzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert (6 % oder 8 % *stacking*, 8 % oder 10 % *resolving* Gel). Dazu verwendete man den SDS-Laufpuffer und legte eine Spannung von 100 – 120 V an. Daraufhin transferierte man die Proteine bei einer Leistung von 8 W über 30 min auf eine PVDF-Membran, welche daraufhin mit 10 % *Rot®*-Block in Wasser oder 0.5 % Casein (*Hammarsten grade*) geblockt wurde. Die anschließende Inkubation der Membran mit dem Erstantikörper erfolgte in *Tris-buffered saline* (TBS)-Puffer und dem jeweiligen Blockierungsreagenz. Dann wurde die Membran dreimal mit TBST (TBS mit 0.1 % Tween 20) gewaschen, mit einem funktionalisierten Zweitantikörper in TBS inkubiert und erneut dreimal mit TBST gewaschen. Danach erfolgte die Detektion der Banden.

Experimente zur Isolierung von SP1:

Für die Isolierung von SP1 wurden die *Beads* (100 oder 300 – 400 nM) mit den jeweiligen Konjugaten und ONs (je 100 oder 400 nM) in Puffer Z oder Puffer 1 ($V_{\text{ges}} = 100 \mu\text{L}$) mit Sp1 (1 μL , 215 ng/ μL) inkubiert. Die Proben wurden drei Mal gewaschen. Der Erstantikörper (*Sigma-Aldrich*, SAB1404397) wurde in einer Verdünnung von 1:650 verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein *AP-linked*-Antikörper (*Cell Signaling*, 7056S) in einer Verdünnung von 1:1500 verwendet. Die Detektion erfolgte über eine Färbung mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP). In der Färbereaktion wird BCIP nach Abspaltung der Phosphat-Gruppe zu einem Indigo-Farbstoff oxidiert, während NBT zu einem Formazan-Farbstoff reduziert wird.

Experimente zur Isolierung von hAgo2:

Für die Isolierung von hAgo2 wurden die *Beads* (1 μM für die Selektivitäts-Pulldowns und 100 – 300 nM für Experimente mit den Adaptoren) in HeLa-Lysat inkubiert ($V_{\text{ges}} = 100 – 300 \mu\text{L}$). Die Proben wurden fünf Mal mit Puffer 2 gewaschen. Der Erstantikörper (*Sino Biological*, 11079-T36) wurde in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:400 eingesetzt. Als Zweitantikörper verwendete man entweder einen fluoreszenzmarkierten Antikörper (*ThermoFisher Scientific*, 35563) in einer Verdünnung von 1:4000 oder einen *AP-linked*-

Antikörper (*Cell Signaling, 7054S*) in einer Verdünnung von 1:2000. Die Detektion erfolgte im Fall des fluoreszenzmarkierten Antikörpers mittels des *FUSION Xpress™ Multi-Imaging Systems* und im Fall der *AP-linked*-Antikörper über eine Färbung mit NBT und BCIP.

10.5 Synthese der Monomere für die Festphasensynthese

10.5.1 Synthese von 1-Methyl-2-trichloracetylpyrrol (Py-CCl₃) **1**



Zu einer Lösung aus Trichloroacetylchlorid (22.5 mL, 200 mmol, 1.0 eq) in abs. DCM (100 mL) wurde 1-*N*-Methylpyrrol (17.8 mL, 200 mmol, 1.0 eq) in DCM (100 mL) über 2 h zugegeben und die resultierende braune Mischung 20 h bei RT gerührt. Anschließend gab man eine Lösung von K₂CO₃ (14 g) in Wasser (100 mL) zu und trennte die Phasen. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Solvens unter vermindertem Druck und einer säulenchromatographischen (CH/DCM 7:3) Aufarbeitung, konnte **1** als leicht gelber Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 34.2 g, 151 mmol, 75 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.51 (dd, J = 4.4, 1.6 Hz, 1H, C³-H), 6.99 – 6.93 (m, 1H, C⁵-H), 6.22 (dd, J = 4.4, 2.4 Hz, 1H, C⁴-H), 3.97 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 173.1 (C=O), 133.8 (C⁵), 124.2 (C³), 122.0 (C²), 109.0 (C⁴), 96.5 (CCl₃), 38.7 (N-CH₃) ppm.

DC: R_f: 0.44 (CH/DCM 7:3)

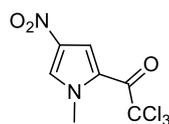
Schmelzpunkt: 65 – 66 °C

Literatur: 64 °C.^[207]

IR (Wellenzahl cm⁻¹): 3122 (w), 2955 (w), 1652 (s), 1521 (m), 1456 (m), 1399, (s), 1357 (s), 1331 (s), 1243 (m), 1205 (m), 1099 (m), 1066 (m), 979 (m), 880 (w), 841 (s), 805 (s), 740 (s), 684 (s), 597 (s), 564 (w), 525 (m).

MS (ESI): m/z ber. für C₇H₆Cl₃NO ([M]⁺): 225.0; gef.: 224.8.

10.5.2 Synthese von 1-Methyl-4-nitro-2-trichloracetylpyrrol ($\text{O}_2\text{N-Py-CCl}_3$) 2



2
 $\text{C}_7\text{H}_5\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_3$
FW: 271.49 g/mol

Variante A:

Verbindung 1 (15.0 g, 66.2 mmol, 1.0 eq) wurde in Ac_2O (150 mL) gelöst und auf $-50\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Daraufhin gab man 100%ige HNO_3 (5.5 mL, 132 mmol, 2.0 eq) zu, wobei eine Temperatur von $-40\text{ }^\circ\text{C}$ nicht überschritten werden durfte. Im Anschluss wurde 30 min bei $-50\text{ }^\circ\text{C}$ und 4 h bei RT gerührt. Dann engte man die Lösung um ca. die Hälfte ein, kühlte sie auf $-50\text{ }^\circ\text{C}$ ab und gab Isopropanol (120 mL) hinzu. Nach 30 min fiel ein Feststoff aus, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde erneut eingeeengt, mit Isopropanol (100 mL) versetzt und auf $-50\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Hierbei fiel erneut ein hellgelber Feststoff aus, der ebenfalls abfiltriert wurde. Die Feststoffe wurden vereint und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 11.9 g, 43.8 mmol, 66 %.

Variante B:

Verbindung 1 (15.0 g, 66.2 mmol, 1.0 eq) wurde in Ac_2O (80 mL) gelöst und auf $-50\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Während der anschließenden Zugabe von 65%iger HNO_3 (8.3 mL, 119 mmol, 1.8 eq) musste die Temperatur unter $-40\text{ }^\circ\text{C}$ gehalten werden. Im Anschluss wurde 3 h gerührt und dabei langsam auf RT erwärmt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung in Eiswasser gegeben, wobei ein gelber Feststoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert und säulenchromatographisch (CH/EE 5:1 auf 4:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 10.9 g, 40.2 mmol, 61 %.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 7.95 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 4.05 (s, 3H) ppm.

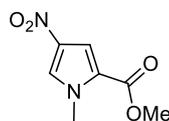
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ = 173.9, 135.5, 130.4, 121.6, 117.7, 95.0, 39.9 ppm.

DC: R_f : 0.60 (CH/EE 5:1)

IR (Wellenzahl cm^{-1}): 3138 (w), 1691 (s), 1530 (m), 1514 (m), 1493 (s), 1423 (m), 1403 (m), 1338 (w), 1310 (s), 1224 (m), 1181 (m), 1110 (s), 1077 (w), 994 (m), 852 (s), 812 (s), 799 (s), 748 (s), 714 (s), 684 (s), 610 (m), 581 (s), 519 (w), 483 (w), 476 (w), 429 (w), 415 (w).

10.5.3 Synthese von Methyl-1-methyl-4-nitropyrrol-2-carboxylat (O₂N-Py-OMe)

3



3

C₇H₈N₂O₄

FW: 184.15 g/mol

Verbindung **2** (2.00 g 7.38 mmol, 1.0 eq) wurde in MeOH (15 mL) suspendiert, mit DMAP (90 mg, 0.74 mmol, 0.1 eq) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Suspension filtriert und der Feststoff mit MeOH gewaschen. Das Filtrat wurde eingeeengt, erneut mit MeOH suspendiert und filtriert, um weiteres Produkt zu erhalten. Verbindung **3** konnte als farbloser Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1.21 g, 6.57 mmol, 89 %.

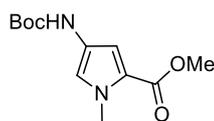
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.28 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, C⁵-H), 7.32 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, C³-H), 3.93 (s, 3H, N-CH₃), 3.80 (s, 3H, COOCH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 159.9, 134.2, 129.5, 122.7, 111.6, 51.9, 37.5 ppm.

Schmelzpunkt: 119 – 120 °C

Literatur: 120 – 122 °C.^[245]

10.5.4 Synthese von Methyl-4-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-methylpyrrol-2-carboxylat (Boc-Py-OMe) **4**



4

C₁₂H₁₈N₂O₄

FW: 254.28 g/mol

Verbindung **3** (4.94 g, 26.8 mmol, 1.0 eq) wurde in abs. EE (100 mL) gelöst und mit Pd/C (500 mg, 10 % auf Aktivkohle) versetzt. Die Suspension wurde 3 h in einer H₂-Atmosphäre gerührt und im Anschluss über Celite filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand kurz im Vakuum getrocknet. Dann wurde abs. MeOH (30 mL) sowie Boc₂O (6.43 g, 29.5 mmol, 1.1 eq) in abs. MeOH (20 mL) zugegeben und die Lösung 15.5 h bei RT gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck, wurde der Rückstand säulenchromatographisch (CH/EE 7:2) gereinigt. **4** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6.47 g, 25.4 mmol, 95 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.08 (s, 1H, NH), 7.08 (s, 1H, C⁵-H), 6.62 (s, 1H, C³-H), 3.78 (s, 3H, N-CH₃), 3.70 (s, 3H, O-CH₃), 1.43 (s, 9H, CH₃-Boc) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 160.8, 152.8, 123.2, 119.3, 118.7, 107.5, 78.6, 50.9, 36.1, 28.2 ppm.

DC: R_f: 0.40 (CH:EE 7:2)

Schmelzpunkt: 110 – 111 °C

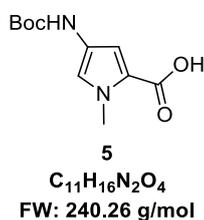
Literatur: 109°C.^[246]

IR (Wellenzahl cm⁻¹): 3345 m, 3166 w, 2967 w, 1805 w, 1714 m, 1680 s, 1587 m, 1552 m, 1453 s, 1406 m, 1388 m, 1367 m, 1287 w, 1264 m, 1230 s, 1167 s, 1149 s, 1115 s, 1058 s, 994 m, 961 w, 889 m, 818 w, 778 s, 742 m, 658 m, 627 m, 602 m, 542 w, 477 w, 431 w.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₈H₁₁N₂O₄ ([M+H-(*t*-Bu)]⁺): 199.1; gef.: 199.1.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₂H₁₈N₂NaO₄ ([M+Na]⁺): 277.11588; gef.: 277.11601.

10.5.5 Synthese von 4-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-1-methylpyrrol-2-carbonsäure (Boc-Py-OH) **5**



Verbindung **4** (4.64 g, 18.2 mmol, 1.0 eq) wurde in MeOH (15 mL) suspendiert, mit einer 2 M NaOH-Lösung (10 mL, 20 mmol, 1.1 eq) versetzt und auf 60 °C erwärmt. Nach 4.5 h wurde weitere NaOH (400 mg, 10 mmol, 0.6 eq) zugegeben, die Lösung auf RT abgekühlt und weitere 16.5 h bei RT gerührt. Im Anschluss extrahierte man viermal mit Et₂O (20 mL), säuerte die wässrige Phase mit 10%iger H₂SO₄ an und extrahierte viermal mit EE (20 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene hellbraune Schaum wurde in DCM (5 mL) gelöst und mit CH (20 mL) versetzt. Die erhaltene Suspension wurde erneut eingeeengt und Verbindung **5** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3.70 g, 15.4 mmol, 84 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.02 (s, 1H, NH), 7.03 (s, 1H, C⁵-H), 6.57 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, C³-H), 3.76 (s, 3H, N-CH₃), 1.43 (s, 9H, CH₃-Boc) ppm.^a

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 161.9, 152.8, 122.9, 119.7, 118.8, 107.6, 78.5, 36.1, 28.2 ppm.

Schmelzpunkt: 150 – 151 °C

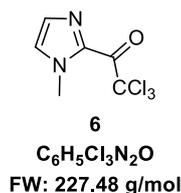
Literatur: 151 – 151.5 °C.^[247]

IR (Wellenzahl cm⁻¹): 3349 w, 2952 w *br*, 2628 w, 1695 s, 1667 s, 1585 m, 1555 w, 1527 s, 1451 s, 1386 s, 1281 s, 1244 s, 1199 m, 1159 s, 1112 m, 1061 m, 998 m, 889 m, 824 w, 808 w, 778 m, 723 m, 690 w, 661 w, 623 m, 610 w, 561 w, 495 w, 454 w, 429 w.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₁₁H₁₅N₂O₄ ([M-H]⁻): 239.1; gef.: 239.1.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₁H₁₆N₂NaO₄ ([M+Na]⁺): 263.10023; gef.: 263.09921.

10.5.6 Synthese von 1-Methyl-2-trichloracetylimidazol (Im-CCl₃) **6**



Zu einer Lösung aus Trichloracetylchlorid (11.2 mL, 100 mmol, 1.0 eq) in abs. DCM (60 mL) gab man langsam eine Mischung aus *N*-Methylimidazol (8.00 mL, 100 mmol, 1.0 eq) in DCM (60 mL). Im Anschluss wurde die Lösung 16 h bei RT gerührt und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Dann gab man tropfenweise NEt₃ (14.0 mL, 100 mmol, 1.0 eq) zu. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (CH/EE 3:1). Verbindung **6** konnte als farbloser Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 19.2 g, 84.4 mmol, 84 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.35 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 4.06 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

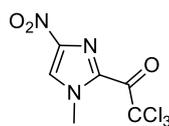
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 172.4, 136.3, 130.7, 128.7, 94.9, 37.3 ppm.

DC: R_f: 0.56 (CH:EE 3:1)

Schmelzpunkt: 77 – 78 °C

Literatur: 79 – 80 °C.^[207]

^a Das Signal des Säureprotons konnte aufgrund eines Austauschs mit dem im Lösemittel enthaltenen Wasser im nicht detektiert werden.

10.5.7 Synthese von 1-Methyl-4-nitro-2-trichloracetylimidazol ($\text{O}_2\text{N-Im-CCl}_3$) 7

7

 $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_3$

FW: 272.47 g/mol

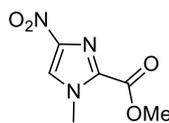
Verbindung **6** (10.1 g, 44.4 mmol, 1.0 eq) wurde in Ac_2O (75 mL) gelöst und auf $-45\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Im Anschluss wurden 100%ige HNO_3 (6 mL, 144 mmol, 3.2 eq) und konz. H_2SO_4 (280 μL) zugegeben, wobei die Temperatur unter $-40\text{ }^\circ\text{C}$ gehalten wurde. Die Lösung wurde 30 min bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt, dann auf RT erwärmt und 21 h gerührt. Im Anschluss gab man die Lösung auf Eiswasser (580 mL) und stellte mit K_2CO_3 einen pH-Wert von ca. 4 ein. Der entstandene farblose Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 4.86 g, 17.8 mmol, 40 %.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 7.94 (s, 1H), 4.16 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ = 173.0, 133.8, 131.6, 126.1, 93.6, 38.5 ppm.

DC: R_f : 0.73 (CH:EE 1:2)

10.5.8 Synthese von Methyl-1-methyl-4-nitroimidazol-2-carboxylat ($\text{O}_2\text{N-Im-OMe}$) 8

8

 $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_4$

FW: 185.14 g/mol

Verbindung **7** (4.00 g, 14.7 mmol, 1.0 eq) und DMAP (90.0 mg, 734 μmol , 0.05 eq) wurden in MeOH (28 mL) suspendiert und 8 h bei RT gerührt. Im Anschluss filtrierte man den Feststoff ab und engte das Filtrat ein. Der Rückstand wurde mit MeOH suspendiert und erneut filtriert, um weiteres Produkt zu erhalten. Verbindung **8** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.32 g, 12.5 mmol, 85 %.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 7.85 (s, 1H), 4.12 (s, 3H), 3.98 (s, 3H) ppm.

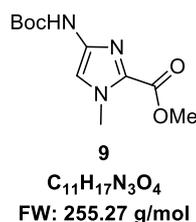
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ = 158.8, 134.8, 132.0, 124.5, 53.2, 37.3 ppm.

DC: R_f : 0.38 (CH:EE 1:2)

MS (ESI): m/z ber. für $C_6H_8N_3O_4$ ($[M+H]^+$): 186.1; gef.: 186.2.

HRMS (MALDI): m/z ber. $C_6H_8N_3O_4$ ($[M+H]^+$): 186.05093; gef.: 186.05090.

10.5.9 Synthese von Methyl-4-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-methylimidazol-2-carbonsäure (Boc-Im-OMe) **9**



Verbindung **8** (1.00 g, 5.40 mmol, 1.0 eq) wurde mit Boc_2O (3.53 g, 16.2 mmol, 3.0 eq) in abs. MeOH (80 mL) gelöst, mit Pd/C (100 mg, 10 % auf Aktivkohle) versetzt und bei RT in einer H_2 -Atmosphäre 6 h gerührt. Im Anschluss rührte man in einer Argon-Atmosphäre weitere 17 h bei RT. Die Suspension wurde über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (CH:EE 1:2) gereinigt und Verbindung **9** als farbloser Feststoff erhalten.

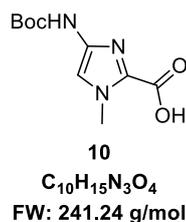
Ausbeute: 1.18 g, 4.62 mmol, 86 %.

1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 9.71 (s *br*, 1H), 7.32 (s *br*, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 1.44 (s, 9H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 158.9, 152.7, 138.1, 130.7, 113.9, 79.0, 51.7, 35.4, 28.1 ppm.

DC: R_f : 0.46 (CH:EE 1:2)

10.5.10 Synthese von 4-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-methylimidazol-2-carboxylat (Boc-Im-OH) **10**



Zu einer Lösung aus KOH (1.49 g, 26.6 mmol, 6.0 eq) in H_2O (158 mL) gab man Verbindung **9** (1.13 g, 4.43 mmol, 1.0 eq) in THF (72 mL). Die erhaltene Suspension wurde 1 h bei RT gerührt und im Anschluss mit H_2O (30 mL) und EE (30 mL) versetzt. Die

Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit EE (30 mL und 15 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde dann mit 1 M HCl (26 mL) versetzt und dreimal mit EE (30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **10** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 540 mg, 2.2 mmol, 51 %.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.60 (s *br*, 1H), 7.26 (s *br*, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.44 (s, 9H) ppm.^b

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 159.9, 152.7, 137.6, 131.8, 113.5, 78.9, 51.7, 35.4, 28.1 ppm.

MS (ESI): m/z ber. für C₁₀H₁₄N₃O₄ ([M-H]⁻): 240.1; gef.: 240.0.

HRMS (MALDI): m/z ber. für C₁₀H₁₅N₃NaO₄ ([M+Na]⁺): 264.09548; gef.: 264.09444.

10.5.11 Synthese von 1-Methylpyrrol-2-carbonsäure (Py-OH) **13**



Verbindung **1** (3.20 g, 14.1 mmol, 1.0 eq) wurde in MeOH (9.5 mL) suspendiert, mit 2 M NaOH (35 mL, 70 mmol, 5.0 eq) versetzt und 23 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit 1 M HCl angesäuert, und der Niederschlag abfiltriert. Der gelbe Feststoff wurde getrocknet. Das Filtrat wurde viermal mit EE (40 mL) extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde entfernt und weiteres Produkt als brauner Feststoff erhalten.

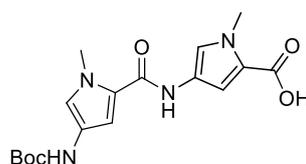
Ausbeute: 1.44 g, 11.5 mmol, 79 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.14 (s, 1H, OH), 7.03 (t, J = 2.0 Hz, 1H, C⁵-H), 6.78 (dd, J = 3.9, 1.8 Hz, 1H, C³-H), 6.05 (dd, J = 3.9, 2.5 Hz, 1H, C⁴-H), 3.83 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 162.0 (C=O), 129.8 (C⁵), 122.5 (C²), 117.3 (C³), 107.3 (C⁴), 36.3 (N-CH₃) ppm.

^b Das Säureproton konnte aufgrund eines zu schnellen Austauschs nicht detektiert werden.

10.5.12 Synthese von Boc-Py-Py-OH 14



14
 $C_{17}H_{22}N_4O_5$
 FW: 362.38 g/mol

Verbindung **23** (500 mg, 1.33 mmol, 1.0 eq) wurde in MeOH (3 mL) gelöst und mit 2 M NaOH (10 mL, 20 mmol, 15.0 eq) versetzt. Nach 4 h bei RT wurde die Lösung mit 1 M HCl angesäuert und mit EE extrahiert. Die organische Phase wusch man mit Brine und trocknete über $MgSO_4$. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und **14** als bräunlicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 389 mg, 1.07 mmol, 81 %.

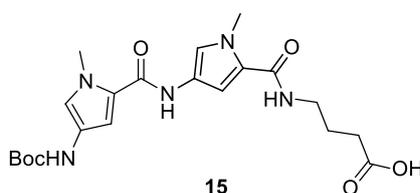
1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 12.13 (s *br*, 1H), 9.81 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.40 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.85 – 6.78 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 1.45 (s, 9H) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 162.0, 158.4, 152.9, 122.7, 122.7, 122.4, 120.3, 119.5, 117.1, 108.4, 103.8, 78.3, 36.1, 36.1, 28.2 ppm.

MS (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{23}N_4O_5$ ($[M+H]^+$): 363.2; gef.: 363.2.

HRMS (MALDI): m/z ber. für $C_{17}H_{22}N_4NaO_5$ ($[M+Na]^+$): 385.14824; gef.: 385.14664.

10.5.13 Synthese von Boc-Py-Py- γ -OH 15



15
 $C_{21}H_{29}N_5O_6$
 FW: 447.49 g/mol

Zu einer Suspension von **24** (500 mg, 1.08 mmol, 1.0 eq) in MeOH/ H_2O (3:1, 20 mL) wurde bei 0 °C $LiOH \cdot H_2O$ (230 mg, 5.42 mmol, 4.2 eq) gegeben und über Nacht gerührt, wobei die Mischung auf RT erwärmte. Die Lösung wurde mit HCl angesäuert und im Anschluss mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Brine gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

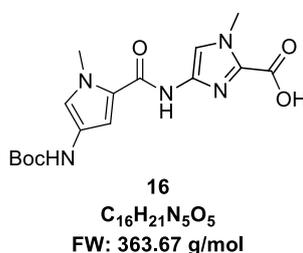
Ausbeute: 450 mg, 1.01 mmol, 94 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.04 (s *br*, 1H), 9.80 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.01 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.86 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.18 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.25 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.71 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 174.3, 161.4, 158.4, 152.9, 122.9, 122.9, 122.3, 122.1, 117.8, 117.0, 104.2, 103.8, 78.3, 37.9, 36.1, 35.9, 31.2, 28.2, 24.8 ppm.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₂₁H₂₈N₅O₆ ([M-H]⁻): 446.2; gef.: 446.2.

10.5.14 Synthese von Boc-Py-Im-OH 16

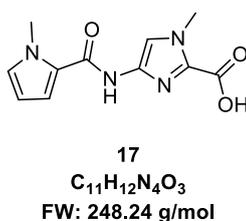


Verbindung **25** (310 mg, 820 μ mol, 1.0 eq) wurde in 5 mL THF gelöst und mit KOH (380 mg, 6.8 mmol, 8.2 eq) in H₂O (10 mL) versetzt. Die Lösung rührte man 2 h bei RT und säuerte im Anschluss mit HCl an. Der entstandenen Niederschlag wurde abfiltriert und der farblose Feststoff im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 212 mg, 583 μ mol, 71 %.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.55 (s, 1H), 9.05 (s *br*, 1H), 7.58 (s, 1H), 6.97 (s *br*, 1H), 6.91 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 1.45 (s, 9H) ppm.^c

10.5.15 Synthese von Py-Im-OH 17



Verbindung **27** (246 mg, 936 μ mol, 1.0 eq) wurde in MeOH (10 mL) suspendiert und mit NaOH (44 mg, 1.1 mmol 1.2 eq) versetzt. Dazu gab man H₂O (10 mL) und erhitze die

^c Das Signal des Säureprotons konnte aufgrund zu schnellen eines Austauschs nicht detektiert werden.

Mischung zum Sieden. Nach 3 h wurde die entstandene Lösung abgekühlt, zweimal mit DCM (30 mL) gewaschen und mit konz. HCl angesäuert, bis ein farbloser Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 199 mg, 803 μ mol, 86 %.

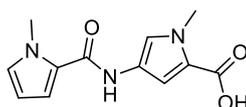
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.55 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.16 (dd, J = 4.0, 1.6 Hz, 1H), 6.99 – 6.95 (m, 1H), 6.03 (dd, J = 3.9, 2.6 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.88 (s, 3H) ppm.^d

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 160.1, 158.7, 137.5, 131.7, 128.9, 124.5, 114.9, 114.0, 107.0, 36.5, 35.5 ppm.

MS (ESI): m/z ber. $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 249.1; gef.: 249.2

HRMS (MALDI): m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 249.09822; gef.: 249.09863.

10.5.16 Synthese von Py-Py-OH 18



18
 $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$
 FW: 247.25 g/mol

Verbindung **28** (630 mg, 2.4 mmol, 1.0 eq) wurde in MeOH (8 mL) suspendiert, mit einer 1 M NaOH-Lösung (15 mL, 15 mmol, 6.3 eq) versetzt und für 2 h zum Sieden erhitzt. Im Anschluss wurde für 18 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung mit EE extrahiert und anschließend mit 2 M HCl angesäuert. Die erhaltene Lösung wurde mit EE extrahiert, die organische Phase mit Brine gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 580 mg, 2.34 mmol, 91 %.

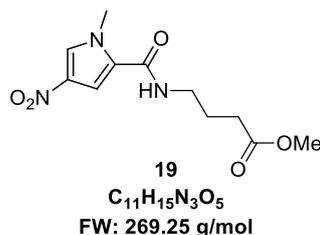
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.15 (s br, 1H), 9.78 (s, 1H), 7.41 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.89 (dd, J = 3.9, 1.6 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 3.7, 2.6 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 162.0, 158.6, 128.2, 125.3, 122.6, 120.3, 119.5, 112.6, 108.3, 106.7, 36.2, 36.2 ppm.

MS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 248.1; gef.: 248.2.

^d Das Signal des Säureprotons konnte aufgrund zu schnellen eines Austauschs nicht detektiert werden.

10.5.17 Synthese von O₂N-Py- γ -OMe 19



Verbindung **2** (1.50 g, 5.56 mmol, 1.0 eq) und γ -Aminobuttersäuremethylester-Hydrochlorid (940 mg, 6.13 mmol, 1.1 eq) wurden in abs. DCM (10 mL) suspendiert und mit DIPEA (1.9 mL, 8.3 mmol, 1.5 eq) versetzt. Die Lösung wurde 27 h bei RT gerührt, im Anschluss auf Kieselgel absorbiert und säulenchromatographisch (CH/EE 1:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.42 g, 5.39 mmol, 95 %.

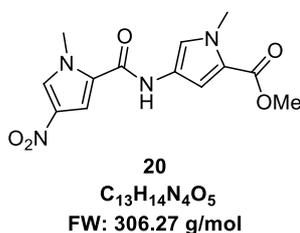
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 8.40 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.20 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.36 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.74 (p, J = 7.1 Hz, 2H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 173.1, 159.9, 133.8, 127.9, 126.4, 107.3, 51.3, 37.9, 37.4, 30.7, 24.4 ppm.

DC: R_f: 0.30 (CH/EE 1:1)

HRMS (MALDI): m/z ber. für C₁₁H₁₆N₃O₅ ([M+H]⁺): 270.10845; gef.: 270.10854.

10.5.18 Synthese von O₂N-Py-Py-OMe 20



Verbindung **3** (4.38 g, 23.8 mmol, 1.0 eq) wurde in abs. EE (100 mL) gelöst, mit Pd/C (400 mg, 10 % auf Aktivkohle) versetzt und 19.5 h bei RT in einer H₂-Atmosphäre gerührt. Nach Filtration der Suspension über Celite entfernte man das Lösemittel unter vermindertem Druck. Der Rückstand wurde kurz getrocknet und anschließend in abs. DCM (40 mL) aufgenommen. Nach der Zugabe von Verbindung **2** (7.08 g, 26.1 mmol, 1.1 eq) in abs. DCM (15 mL) und DIPEA (6.0 mL, 35 mmol, 1.5 eq) rührte man 4.5 h bei RT. **20** fiel als gelber Feststoff aus und wurde abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 6.26 g, 20.4 mmol, 86 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.26 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.74 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 160.8, 156.9, 133.8, 128.3, 126.1, 122.2, 120.9, 118.9, 108.3, 107.7, 51.1, 37.5, 36.3 ppm.

Schmelzpunkt: 250 °C (Zersetzung)

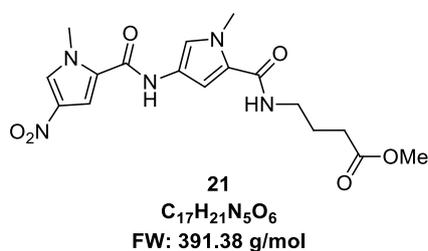
Literatur: 262 °C.^[245]

IR (Wellenzahl cm⁻¹): 3373 (m), 3138 (w), 3029 (w), 2960 (w), 1693 (s), 1662 (s), 1568 (s), 1536 (m), 1503 (m), 1479 (s), 1444 (s), 1420 (m), 1393 (s), 1365 (m), 1314 (s), 1247 (s), 1213 (s), 1187 (m), 1151 (w), 1119 (s), 1101 (s), 1060 (m), 1008 (w), 969 (w), .888 (w), 844 (m), 814 (m), 780 (m), 747 (m), 713 (w), 653 (w), 630 (m), 604 (m), 587 (m), 573 (m), 457 (w), 423 (m).

MS (ESI): *m/z* ber. für C₁₃H₁₅N₃O₅ ([M+H]⁺): 307.1; gef.: 307.1.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₃H₁₄N₃O₅ ([M-e]⁺): 306.09587; gef.: 306.09606.

10.5.19 Synthese von O₂N-Py-Py- γ -OMe 21



Verbindung **19** (400 mg, 1.49 mmol, 1.0 eq) wurde mit Pd/C (50 mg, 10 % auf Aktivkohle) in abs. EE (10 mL) suspendiert und in einer H₂-Atmosphäre bei RT 18 h gerührt. Im Anschluss wurde über Celite filtriert und das Lösemittel entfernt. Der Rückstand wurde in abs. DCM (10 mL) aufgenommen, mit **2** (480 mg, 1.78 mmol, 1.2 eq) sowie DIPEA (0.5 mL, 3 mmol, 2.0 eq) versetzt und zwei Tage bei RT gerührt. Der entstandene gelbe Feststoff wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 470 mg, 1.20 mmol, 81 %.

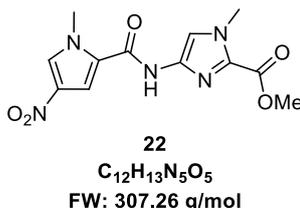
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.23 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.08 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.18 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.81 – 1.67 (m, 2H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 173.3, 161.3, 156.9, 133.9, 128.3, 126.4, 123.3, 121.4, 118.1, 107.6, 104.1, 51.3, 37.8, 37.6, 36.1, 30.9, 24.7 ppm.

MS (ESI): m/z ber. für C₁₇H₂₀N₅O₆ ([M-H]⁻): 390.1; gef.: 390.1

HRMS (MALDI): m/z ber. für C₁₇H₂₂N₅O₆ ([M+H]⁺): 392.15646; gef.: 392.15498.

10.5.20 Synthese von O₂N-Py-Im-OMe 22



Verbindung **26** (590 mg, 3.47 mmol, 1.1 eq) wurde in abs. DMF (5 mL) gelöst und mit HOBt (530 mg, 3.47 mmol, 1.1 eq, 12 % H₂O) und DIC (1.1 mL, 6.9 mmol, 2.2 eq) versetzt und bei RT 29 h gerührt.

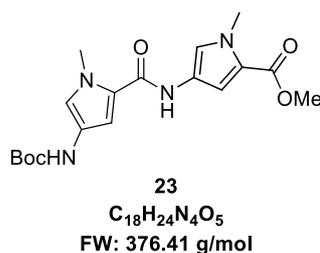
Verbindung **8** (580 mg, 3.20 mmol, 1 eq) wurde in abs. EE (10 mL) gelöst, mit Pd/C (70 mg, 10 % auf Aktivkohle) versetzt und 23 h bei RT in einer H₂-Atmosphäre gerührt. Im Anschluss wurde über Celite filtriert und das Lösemittel entfernt. Nach kurzem Trocknen wurde abs. DMF (4 mL), die oben beschriebene Lösung sowie DIPEA (1.1 mL, 6.3 mmol, 2 eq) zugegeben und 3 h auf 60 °C erwärmt. Danach wurde 16 h bei RT und erneut 3 h bei 60 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung auf Eiswasser (50 mL) gegeben und der Niederschlag abfiltriert. Das Rohprodukt wurde in einer Mischung aus MeOH, EE und DCM gelöst, mit 1 M HCl versetzt und mit DCM extrahiert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (CH/EE 1:2) gereinigt. Das Produkt konnte als farbloser Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 740 mg, 2.41 mmol, 77 %.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.13 (s, 1H), 8.19 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.82 (s, 3H) ppm.

DC: R_f: 0.45 (CH/EE 1:3)

10.5.21 Synthese von Boc-Py-Py-OMe 23



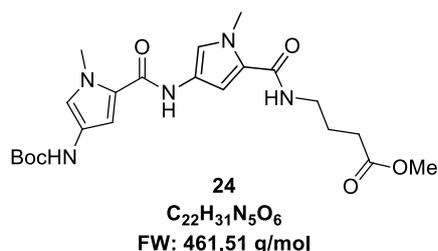
Verbindung **20** (1.74 g, 5.68 mmol, 1.0 eq), Boc₂O (2.48 g, 11.4 mmol, 2.0 eq) und Pd/C (180 mg, 10 % auf Aktivkohle) wurden in abs. MeOH (10 mL) suspendiert. Es wurde 18 h bei 45 °C und 40 bar H₂-Druck gerührt. Man filtrierte die Suspension über Celite und entfernte das Lösemittel unter vermindertem Druck. Der Rückstand wurde ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 1,75 g, 4.65 mmol, 82 %.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 9.85 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 7.44 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.92 – 6.86 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 1.45 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 160.8, 158.4, 152.9, 123.0, 122.6, 122.4, 120.7, 118.5, 117.2, 108.4, 103.8, 78.3, 51.0, 36.2, 36.0, 28.2 ppm.

MS (ESI): m/z ber. für C₁₈H₂₃N₄O₅ ([M-H]⁻): 375.2; gef.: 375.2.

10.5.22 Synthese von Boc-Py-Py- γ -OMe 24

Verbindung **21** (2.00 g, 5.11 mmol, 1.0 eq), Boc₂O (2.23 g, 10.2 mmol, 2.0 eq) and Pd/C (200 mg, 10 % auf Aktivkohle) wurden in abs. MeOH (40 mL) suspendiert und in bei 45 °C und 45 bar H₂-Druck 19 h gerührt. Die Suspension wurde über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. **24** konnte als farbloser Schaum erhalten werden.

Ausbeute: Quantitativ.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 9.81 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.02 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.88 (s *br*, 1H), 6.85 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.81 (s *br*, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.78

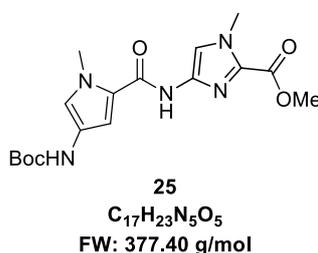
(s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.18 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.77 – 1.70 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.45 (s, 9H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) $\delta = 173.2, 161.4, 158.4, 152.9, 122.9, 122.8, 122.3, 122.1, 117.8, 117.0, 104.2, 103.8, 78.3, 51.3, 37.7, 36.1, 35.9, 30.8, 28.2, 24.7$ ppm.

MS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_6$ ($[\text{M-H}]^-$): 460.2; gef.: 460.3.

HRMS (MALDI): m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_6$ ($[\text{M+H}]^+$): 462.23471; gef.: 462.23335.

10.5.23 Synthese von Boc-Py-Im-OMe 25



Verbindung **22** (520 mg, 1.69 mmol, 1.0 eq) wurde mit Pd/C (50 mg, 10 % auf Aktivkohle) und Boc_2O (740 mg, 3.40 mmol, 2.0 eq) in abs. MeOH (15 mL) suspendiert und bei 40 bar H_2 -Druck über Nacht bei 50 °C gerührt. Im Anschluss wurde über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Schaum erhalten.

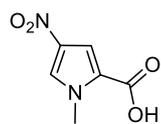
Ausbeute: Quantitativ.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 10.62$ (s, 1H), 9.06 (s br, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.98 (s br, 1H), 6.92 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 1.45 (s, 9H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 158.9, 158.7, 152.9, 137.9, 130.7, 122.4, 121.8, 118.2, 115.4, 105.1, 78.3, 51.71, 36.2, 35.4, 28.2$ ppm.

MS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_5$ ($[\text{M-H}]^-$): 376.2; gef.: 376.2.

10.5.24 Synthese von 1-Methyl-4-nitropyrrol-2-carbonsäure (O₂N-Py-OH) 26



26
C₆H₆N₂O₄
FW: 170.12 g/mol

Verbindung **2** (2.52 g, 9.3 mmol, 1.0 eq) wurde in wässriger KOH (23 mL, 46 mmol, 5.0 eq) gelöst und 2 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde mit 1 M HCl angesäuert. Den entstandenen Feststoff filtrierte man ab, wusch ihn mit EE und trocknete ihn im Vakuum. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

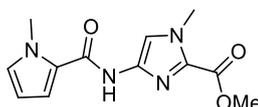
Ausbeute: 740 mg, 2.41 mmol, 77 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.05 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H) ppm.^e

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 161.9, 133.7, 127.5, 109.4, 39.5, 37.3 ppm.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₆H₅N₂O₄ ([M-H]⁻): 169.0; gef.: 168.9.

10.5.25 Synthese von Py-Im-OMe 27



27
C₁₂H₁₄N₄O₃
FW: 262.27 g/mol

Verbindung **8** (1.00 g, 5.40 mmol, 1.0 eq) wurde in abs. EE (20 mL) suspendiert, mit Pd/C (100 mg, 10 % auf Aktivkohle) versetzt und 2 h in einer H₂-Atmosphäre bei RT gerührt. Im Anschluss wurde über Celite filtriert, das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

Verbindung **13** (810 mg, 6.48 mmol, 1.2 eq) wurde in abs. DMF (10 mL) gelöst, mit HOBt (1.00 mg, 6.48 mmol, 1.2 eq, 12 % H₂O) sowie DIC (1.36 mL, 10.8 mmol, 2.0 eq) versetzt und 3 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde filtriert und das Filtrat zu dem Amin gegeben. Man gab DIPEA (1.84 mL, 10.8 mmol, 2.0 eq) hinzu und erwärmte 3 h auf 60 °C. Im Anschluss wurde 16 h bei RT und weitere 5 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Lösung auf RT abgekühlt war, wurde sie mit 20%iger Na₂HCO₃-Lösung versetzt und mit DCM

^e Das Signal des Säureprotons konnte aufgrund eines Austauschs mit dem im Lösemittel enthaltenen Wasser nicht detektiert werden.

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (CH/EE 1:4) aufgearbeitet und **27** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.12 g, 4.27 mmol, 79 %.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 10.58 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.17 (dd, J = 4.0, 1.7 Hz, 1H), 6.97 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 6.04 (dd, J = 4.0, 2.5 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.81 (s, 3H) ppm.

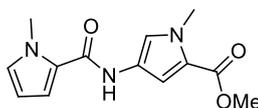
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 159.0, 158.7, 137.9, 130.7, 128.9, 124.4, 115.3, 114.0, 107.0, 51.7, 36.5, 35.4 ppm.

DC: R_f : 0.55 (CH/EE 1:4)

MS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 263.1; gef.: 263.1

HRMS (MALDI): m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 263.11387; gef.: 263.11403.

10.5.26 Synthese von Py-Py-OMe **28**



28
 $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$
 FW: 261.28 g/mol

Verbindung **3** (500 mg, 2.70 mmol, 1.0 eq) wurde in abs. EE (10 mL) suspendiert und nach Zugabe von Pd/C (50 mg, 10 % auf Aktivkohle) über Nacht bei RT in einer H_2 -Athmosphäre gerührt. Die Suspension wurde über Celite filtriert, das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

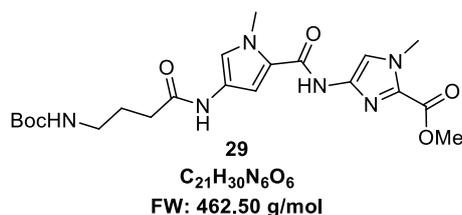
Verbindung **13** (400 mg, 3.00 mmol, 1.1 eq) wurde mit HOBt (460 mg, 3.00 mmol, 1.1 eq, 88 %) in abs. DMF (5 mL) gelöst und mit DIC (930 μL , 6.00 mmol, 2.2 eq) versetzt. Im Anschluss wurde die Lösung über Nacht bei RT gerührt und dann zu dem frisch hergestellten Amin gegeben. Nach der Zugabe von DIPEA (460 μL , 5.4 mmol, 2 eq) erhitzte man die Lösung für 5 h auf 60 °C und rührte im Anschluss über Nacht bei RT. Das Reaktionsgemisch wurde mit H_2O (20 mL) versetzt und mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit konz. NaHCO_3 -Lösung, H_2O und Brine gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatisch (CH/EE 3:1 zu 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 630 mg, 2.40 mmol, 89 %.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.81 (s, 1H), 7.45 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.97 – 6.93 (m, 1H), 6.90 – 6.86 (m, 2H), 6.06 (dd, *J* = 3.9, 2.5 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.73 (s, 3H) ppm.

DC: R_f: 0.58 (CH/EE 3:1)

10.5.27 Synthese von Boc- γ -Py-Im-OMe **29**



Zunächst wurde Boc-GABA (538 mg, 2.65 mmol, 1.1 eq) in abs. (DMF) 10 mL gelöst, mit HOBt (407 mg, 2.65 mmol, 1.1 eq, 12 % H₂O) sowie DIC (820 μ L, 5.30 mmol, 2.2 eq) versetzt und bei RT 26 h gerührt.

Verbindung **22** (740 mg, 2.40 mmol, 1.0 eq) wurde in abs. EE (10 mL) suspendiert, mit Pd/C (70 mg, 10 % auf Aktivkohle) versetzt und 17 h bei 40 °C und 40 bar H₂-Druck gerührt. Im Anschluss wurde über Celite filtriert und das Lösemittel entfernt. Nach kurzem Trocknen wurde die oben beschriebene Lösung sowie DIPEA (820 mL, 4.80 mmol, 2.0 eq) zugegeben und 48 h bei RT gerührt. Die entstandene Suspension wurde filtriert und mit EE nachgewaschen. Dann versetzte man das Filtrat mit einer 4:1 Mischung aus H₂O und konz. NaHCO₃ (100 mL), trennte die Phasen und extrahierte die wässrige Phase dreimal mit EE (40 mL) sowie dreimal mit DCM (40 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH 99:1 auf 9:1) gereinigt und Verbindung **29** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 586 mg, 1.26 mmol, 53 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.65 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.82 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.93 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.70 – 1.60 (m, 2H), 1.37 (s, 9H) ppm.

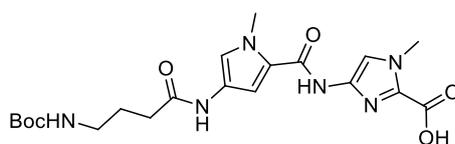
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 169.3, 159.0, 158.7, 155.7, 137.9, 130.7, 122.1, 121.6, 119.4, 115.5, 104.8, 77.5, 51.8, 36.4, 35.5, 33.1, 28.3, 25.9 ppm.^f

DC: R_f: 0.79 (DCM:MeOH 9:1)

MS (ESI): *m/z* ber. für C₂₁H₃₁N₆O₆ ([M+H]⁺): 463.2; gef.: 463.1.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₂₁H₃₀N₆NaO₆ ([M+Na]⁺): 485.21190; gef.: 485.21173.

10.5.28 Synthese von Boc- γ -Py-Im-OH **30**



30
C₂₀H₂₈N₆O₆
FW: 448.47 g/mol

Verbindung **29** (200 mg, 432 μ mol, 1 eq) wurde in einer Mischung aus MeOH/H₂O (1:1, 8 mL) suspendiert und mit einer 10 M KOH-Lösung (0.2 mL, 2.0 mmol, 4.6 eq) versetzt. Dann wurde 21.5 h bei RT gerührt und das MeOH unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Lösung wurde mit 1 M HCl angesäuert, der entstandene Niederschlag abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Verbindung **30** konnte als farbloser Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 147 mg, 327 μ mol, 76 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.60 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.83 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 2.93 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.69 – 1.61 (m, 2H), 1.37 (s, 9H) ppm.^g

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 169.3, 160.1, 158.7, 155.7, 137.4, 131.7, 122.1, 121.7, 119.3, 115.2, 104.7, 77.5, 36.4, 35.6, 33.1, 28.3, 25.9 ppm.^h

MS (ESI): *m/z* ber. für C₂₀H₂₉N₆O₆ ([M+H]⁺): 449.2; gef.: 449.3.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₂₀H₂₈N₆NaO₆ ([M+Na]⁺): 471.19625; gef.: 471.19662.

^f Für die Verbindung **29** wurde im ¹³C-Spektrum ein Signal im Bereich von 39 ppm erwartet. Dieses wurde durch das Lösemittelsignal überlagert.

^g Das Säureproton konnte aufgrund eines zu schnellen Austauschs nicht detektiert werden.

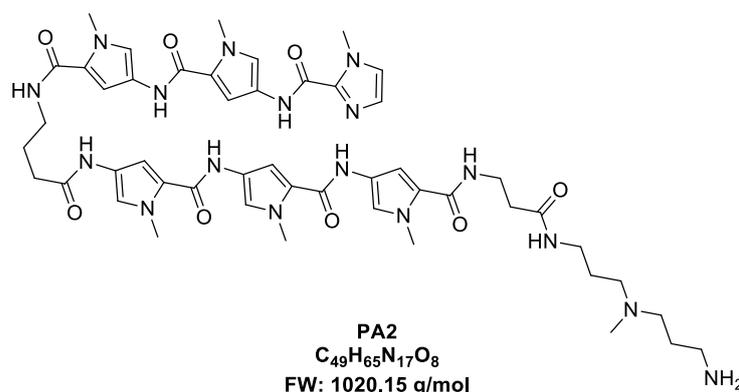
^h Für die Verbindung **30** wurde im ¹³C-Spektrum ein Signal im Bereich von 39 ppm erwartet. Dieses wurde durch das Lösemittelsignal überlagert.

10.6 Festphasensynthese der Polyamide

Der Boc- β -Ala-Pam-Träger (0.5 mmol/g) wurde in eine 5 mL Spritze mit Filter gegeben und 30 min in abs. DMF equilibriert. Im Anschluss entschützte man mit einer TFA-Lösung (TFA/H₂O/Phenol 92.5/2.5/5; zweimal, 1 mL, 5 min). Daraufhin wurde mit DMF gewaschen (viermal 2 mL) und der Träger 2 min in THF (1 mL) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Boc-geschützte Aminosäure (4 eq) mit BTC (1.3 eq) in THF (1 mL) gelöst und mit 2,4,6-Collidin (12 eq) versetzt. Nach einer Minute gab man DIPEA (8 eq) zu, um den entstandenen Niederschlag zu lösen. Die erhaltene Lösung wurde zum Träger gegeben und 45 min geschüttelt. Im Anschluss wusch man viermal mit DMF (2 mL) und gab eine Capping-Lösung (Ac₂O (100 μ l) und DIPEA (175 μ l) in 1 mL DMF) zu. Dann wurde viermal mit DMF (2 mL) gewaschen und ein neuer Zyklus begonnen. Im Fall der PIPs **PA2** und **PA3** erfolgte die abschließende Kupplung durch die Zugabe von Verbindung **6** (4 eq) und DIPEA (8 eq). Die Kupplungszeit betrug 60 min.

Zur Abspaltung wurde das Amin **12** (1 mL) zugegeben und mit dem Träger 23 h bei 55°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Mischung filtriert, mit MeOH nachgewaschen und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Zur Entfernung des überschüssigen Amins wurde der Rückstand in MeOH aufgenommen, mit dem zehnfachen Volumen an Et₂O versetzt und auf -20 °C gekühlt. Die entstandenen Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde getrocknet und mittels *rp*-HPLC gereinigt.

10.6.1 Im-Py-Py- γ -Py-Py-Py- β -Linker-NH₂ (PA2)



Die Synthese erfolgte mit den Verbindungen **5**, **6** und **11**.

Träger: 105.29 mg, 52.6 mmol. **Theoretische Ausbeute:** 53.7 mg.

Ausbeute nach HPLC-Reinigung: 5.76 mg. Die Verbindung wurde als TFA-Salz erhalten. Da der TFA-Anteil nicht bekannt war, entspricht dies einer Ausbeute von 9 – 11 %.

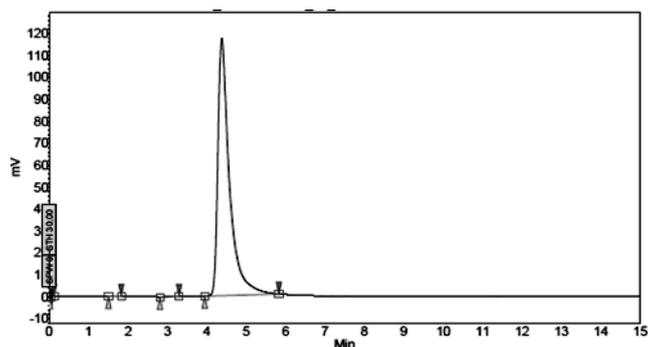
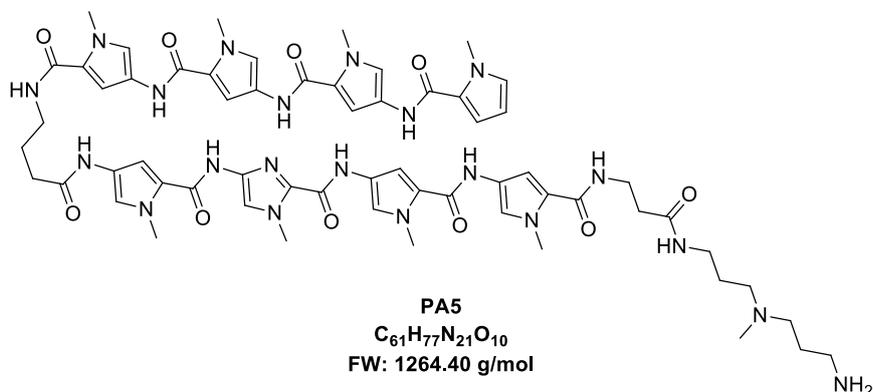


Abbildung 96: *rp*-HPLC-Chromatogramm des gereinigten Polyamids **PA3**. Laufmittel: 74 % 0.1 % TFA, 26 % ACN.

10.6.3 Py-Py-Py-Py- γ -Py-Im-Py-Py- β -Linker-NH₂ (PA5)



Die Synthese erfolgte mit den Verbindungen **14**, **18** und **30**.

Träger: 101.23 mg, 50.6 mmol. **Theoretische Ausbeute:** 64.0 mg.

Ausbeute nach HPLC-Reinigung: 6.0 mg. Die Verbindung wurde als TFA-Salz erhalten. Da der TFA-Anteil nicht bekannt war, entspricht dies einer Ausbeute von ca. 9 %.

MS (ESI): m/z ber. für $C_{61}H_{78}N_{21}O_{10}$ ($[M+H]^+$): 1264.6; gef.: 1265.7.

m/z ber. für $C_{61}H_{79}N_{21}O_{10}$ ($[M+2H]^+$): 632.8; gef.: 633.1.

MS (MALDI): m/z ber. für $C_{61}H_{77}N_{21}O_{10}$ ($[M]^+$): 1263.6157; gef.: 1263.2139.

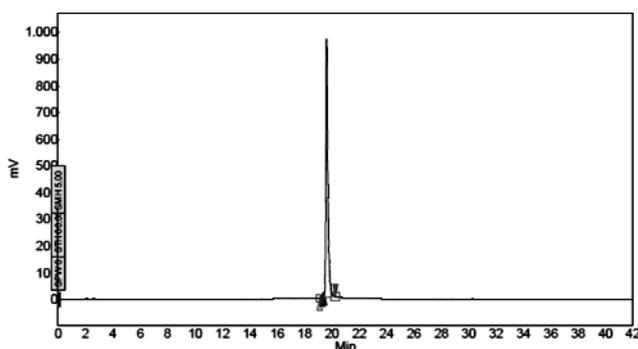
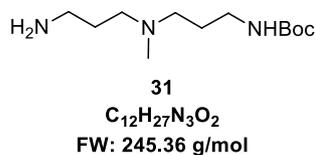


Abbildung 97: *rp*-HPLC-Chromatogramm nach der Reinigung von **PA5**. Linearer Gradient von 10 % B zu 70 % B in 30 min. A: 0.1 % TFA in H₂O; B: ACN.

10.7 Synthese der PIPs in Lösung

10.7.1 Synthese von H₂N-Linker-Boc 31



3,3'-Diamino-*N*-methyldipropylamin (15.0 mL, 92.8 mmol, 4.1 eq) wurde in Dioxan (25 mL) gelöst und dazu eine Lösung von Boc₂O (5.01 g, 22.9 mmol, 1.0 eq) in Dioxan (25 mL) getropft. Die entstandene Suspension rührte man für 20 h bei RT. Im Anschluss wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in H₂O (40 mL) aufgenommen und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen trocknete man über Na₂SO₄ und entfernte das Lösemittel unter vermindertem Druck. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch (1. DCM/MeOH 5:1 mit 5 % NEt₃, DCM/MeOH 2:1 + 5 % NH₃) gereinigt. **31** wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 2.88 g, 11.7 mmol, 51 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 5.37 (s, 1H), 3.16 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.38 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H), 2.18 (s, 3H), 1.94 (s *br*, 2H), 1.69 – 1.56 (m, 4H), 1.43 (s, 9H) ppm.

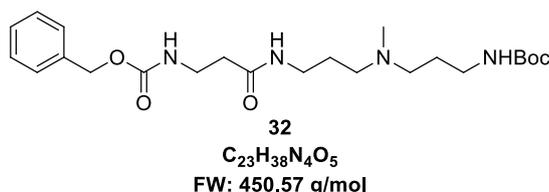
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 156.3, 79.0, 56.4, 55.8, 42.2, 40.6, 40.0, 30.8, 28.6, 27.1 ppm.

DC: R_f: 0.31 (DCM/MeOH 2:1 + 5 % NH₃)

MS (ESI): *m/z* ber. für C₁₂H₂₈N₃O₂ ([M+H]⁺): 246.2; gef.: 246.2.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₂H₂₈N₃O₂ ([M+H]⁺): 246.21760; gef.: 246.21791.

10.7.2 Synthese von α - β -Linker-Boc 32



Cbz- β -Alanin (1.84 g, 8.25 mmol, 1.1 eq) wurde in abs. DMF (15 mL) gelöst, mit HOBt (1.27 g, 8.25 mmol, 1.1 eq) sowie DIC (2.3 mL, 15 mmol, 2.0 eq) versetzt und 22 h bei RT gerührt. Dann wurde die Suspension zu Verbindung **31** (1.84 g, 7.50 mmol, 1.0 eq) gegeben, der Kolben mit DMF (3 mL) nachgespült und 24 h bei RT gerührt. Im Anschluss

filtrierte man die entstandene Suspension und überführte das Filtrat in 20%ige NaHCO₃-Lösung (100 mL). Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM (40 mL) extrahiert und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE/MeOH 6:1 + 1 % NEt₃) gereinigt. Man erhielt **32** als farbloses Öl.

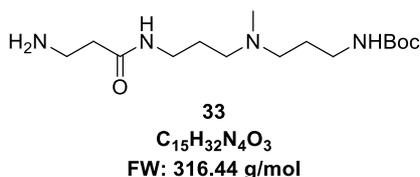
Ausbeute: 2.70 g, 5.99 mmol, 73 %.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.40 – 7.27 (m, 5H), 7.10 (s *br*, 1H), 5.59 (s *br*, 1H), 5.17 – 4.96 (m, 3H), 3.47 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.37 – 3.27 (m, 2H), 3.17 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.56 – 2.34 (m, 6H), 2.20 (s, 3H), 1.75 – 1.59 (m, 4H), 1.43 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 171.5, 156.6, 156.3, 136.8, 128.6, 128.2, 79.4, 66.7, 56.0, 55.6, 41.7, 39.0, 38.5, 37.5, 36.1, 28.6, 27.6, 25.9 ppm.

DC: R_f = 0.5 (EE/MeOH 2:1 + 1 % NEt₃)

10.7.3 Synthese von H₂N- β -Linker-Boc **33**



Verbindung **32** (625 mg, 1.39 mmol, 1.0 eq) wurde in abs. MeOH (10 mL) gelöst. Dazu gab man Pd/C (70 mg, 10 % auf Aktivkohle) und rührte in einer H₂-Atmosphäre 18 h bei RT. Die Suspension wurde über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **33** konnte als farbloses Öl erhalten werden.

Ausbeute: 420 mg, 1.33 mmol, 96 %.

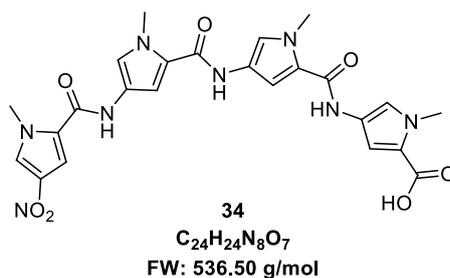
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.86 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 6.77 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.04 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.91 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.72 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.26 – 2.20 (m, 4H), 2.14 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.53 – 1.45 (m, 4H), 1.36 (s, 9H) ppm.ⁱ

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 171.2, 155.6, 77.3, 54.8, 54.8, 41.7, 39.0, 38.3, 36.7, 28.3, 27.2, 26.9 ppm.^j

MS (ESI): *m/z* ber. für C₁₅H₃₃N₄O₃ ([M+H])⁺ = 317.3; gef.: 317.3.

ⁱ Die Signale der NH₂-Gruppe können durch einen schnellen Austausch mit dem im Lösemittel enthaltenen Wasser nicht detektiert werden.

^j Ein Alkyl-C kann durch Überlagerung mit dem Lösemittel oder einem weiteren Peak nicht detektiert werden.

10.7.4 Synthese von O₂N-Py-Py-Py-Py-OH **34**

Verbindung **36** (104 mg, 189 µmol, 1 eq) und NaOH (22.6 mg, 567 µmol, 3 eq) wurden in EtOH (1.32 mL) und H₂O (0.95 mL) suspendiert und 1 h zum Sieden erhitzt. Im Anschluss wurde die Lösung mit konz. HCl angesäuert und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Dieser wurde im Vakuum getrocknet und Verbindung **34** als beiger Feststoff erhalten.

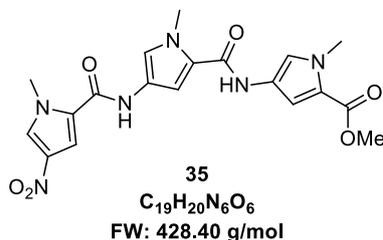
Ausbeute: 90 mg, 168 µmol, 89 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.15 (s *br*, 1H), 10.30 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.82 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 162.0, 158.5, 158.4, 156.9, 133.8, 128.3, 126.3, 123.0, 122.7, 122.6, 122.2, 121.4, 120.3, 119.5, 118.7, 118.6, 108.4, 107.6, 104.8, 104.5, 37.5, 36.2, 36.2, 36.1 ppm.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₂₄H₂₃N₈O₇ ([M-H]⁻): 535.2; gef.: 535.1.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₂₄H₂₄N₈NaO₇ ([M+Na]⁺): 559.16602; gef.: 559.16564.

10.7.5 Synthese von O₂N-Py-Py-Py-OMe **35**

Das Dimer **20** (2.00 g, 6.53 mmol, 1 eq) wurde in abs. EE (40 mL) suspendiert und mit Pd/C (300 mg, 10 % auf Aktivkohle) versetzt. Die Suspension rührte man für 3 h bei 45 °C und 40 bar H₂-Druck. Nachdem die Reaktionslösung auf RT abgekühlt war, wurde sie über Celite gefiltert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde kurz im Vakuum getrocknet, anschließend in abs. DCM (10 mL) aufgenommen und zu einer Lösung von **2** (1.95 g, 7.18 mmol, 1.1 eq) in abs. DCM (30 mL) gegeben. Das Gemisch

wurde mit DIPEA (1.7 ml, 10 mmol, 1.5 eq) versetzt und 22 h bei RT gerührt. Danach filtrierte man den entstandenen gelben Feststoff ab und trocknete ihn im Vakuum. Verbindung **35** wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.21 g, 5.16 mmol, 79 %.

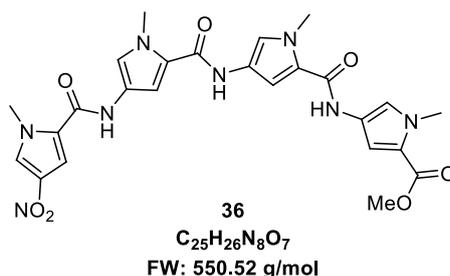
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.29 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.74 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 160.8, 158.4, 157.0, 133.8, 128.3, 126.3, 122.9, 122.8, 121.5, 120.8, 118.8, 118.6, 108.4, 107.6, 104.6, 51.0, 37.5, 36.2, 36.2 ppm.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₁₉H₂₁N₆O₆ ([M+H]⁺): 429.2; gef.: 429.0.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₉H₂₁N₆O₆ ([M+H]⁺): 429.15171; gef.: 429.15153.

10.7.6 Synthese von O₂N-Py-Py-Py-Py-OMe **36**



Verbindung **35** (200 mg, 467 μ mol, 1.0 eq), Boc₂O (204 mg, 934 μ mol, 2.0 eq) sowie Pd/C (20 mg, 10 % auf Aktivkohle) wurden in abs. MeOH (5 mL) suspendiert und für 18 h bei 50 °C und 40 bar H₂-Druck gerührt. Im Anschluss filtrierte man die Suspension über Celite und entfernte das Lösemittel unter vermindertem Druck. Das Rohprodukt wurde mit TFA/DCM (2:3, 5 mL) versetzt und für 30 min bei RT gerührt. Nach der Reaktion wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet. Das erhaltene TFA-Salz suspendierte man in abs. DCM (5 mL), versetzte es mit Verbindung **2** (254 mg, 934 μ mol, 2.0 eq) sowie DIPEA (238 μ L, 1.40 mmol, 3.0 eq) und rührte 49 h bei RT. Die entstandene Suspension wurde filtrierte, der Feststoff mit DCM gewaschen und getrocknet. Man erhielt Verbindung **36** als leicht gelben Feststoff.

Ausbeute: 182 mg, 331 μ mol, 71 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.30 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H),

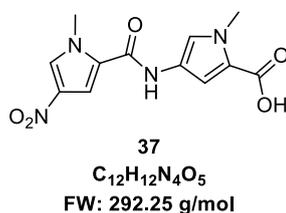
7.24 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.73 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 161.0, 158.6, 158.5, 157.1, 133.9, 128.4, 126.4, 123.1, 123.1, 122.7, 122.3, 121.5, 120.9, 118.8, 118.8, 118.7, 108.5, 107.6, 105.0, 104.7, 51.1, 37.6, 36.3, 36.3, 36.2$ ppm.

MS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_8\text{O}_7$ ($[\text{M-H}]^-$): 549.2; gef.: 549.2.

HRMS (MALDI): m/z ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_7$ ($[\text{M}]^+$): 550.19190; gef.: 550.19124.

10.7.7 Synthese von $\text{O}_2\text{N-Py-Py-OH}$ **37**



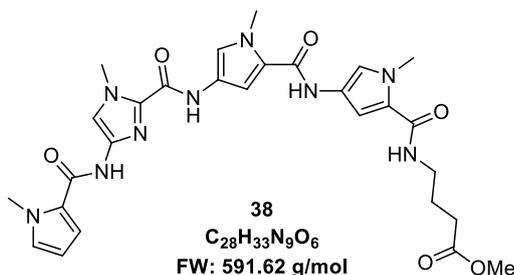
Verbindung **20** (610 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq) wurde mit 0.3 M NaOH (20 mL, 6.00 mmol, 3.0 eq) sowie EtOH (20 mL) versetzt und für 1 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Ende der Reaktion wurde mit 1 M HCl (10 mL) angesäuert und der gelbe Niederschlag abfiltriert. Man erhielt Verbindung **37** als gelben Feststoff.

Ausbeute: 532 mg, 1.82 mmol, 91 %.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 12.25$ (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.83 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 161.9, 156.9, 133.8, 128.3, 126.2, 121.9, 120.4, 119.9, 108.3, 107.6, 37.5, 36.2$ ppm.

HRMS (MALDI): m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$ ($[\text{M}]^+$): 292.08022; gef.: 292.08042.

10.7.8 Synthese von Py-Im-Py-Py- γ -OMe **38**

Abs. MeOH (3 mL) wurde auf 0 °C gekühlt und mit AcCl (1 mL) versetzt. Die Lösung wurde 20 min bei 0 °C gerührt und Verbindung **24** (100 mg, 217 μ mol, 1.0 eq) in abs. MeOH (2 mL) zugegeben. Nachdem die Lösung für 20 min bei 0 °C und 60 min bei RT rührte, entfernte man das Lösemittel unter vermindertem Druck und trocknete das Rohprodukt im Vakuum. Das entstandene Hydrochlorid, Verbindung **17** (65 mg, 260 μ mol, 1.2 eq) sowie HBTU (107 mg, 282 μ mol, 1.3 eq) wurden in abs. DMF (5 mL) gelöst und mit DIPEA (111 μ L, 650 μ mol, 3.0 eq) versetzt. Die Mischung rührte man für 19 h bei RT und gab sie im Anschluss zu einer 20%igen NaHCO₃-Lösung. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und die organische Phase über Mg₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (CH/EE/MeOH 2:9:1) gereinigt. **38** konnte als leicht brauner Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 109 mg, 184 μ mol, 85 %.

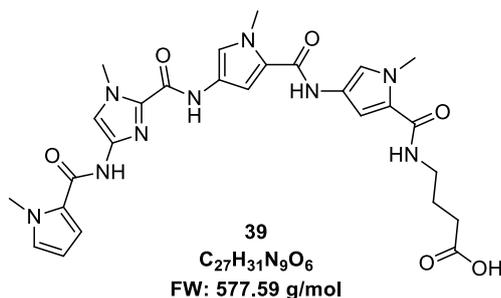
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.24 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.04 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.13 – 7.09 (m, 2H), 7.00 – 6.97 (m, 1H), 6.88 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.06 (dd, *J* = 3.8, 2.6 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.18 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.78 – 1.70 (m, 2H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 173.2, 161.3, 158.8, 158.4, 155.8, 136.2, 134.1, 128.9, 124.6, 123.1, 122.9, 122.0, 121.2, 118.5, 117.9, 114.5, 113.8, 107.0, 105.1, 104.3, 51.3, 37.7, 36.5, 36.2, 36.0, 34.9, 30.8, 24.7 ppm.

DC: R_f: 0.39 (CH/EE/MeOH 2:9:1)

MS (ESI): *m/z* ber. für C₂₈H₃₄N₉O₆ ([M+H]⁺): 592.3; gef.: 592.3

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₂₈H₃₃N₉NaO₆ ([M+Na]⁺): 614.24460; gef.: 614.24463.

10.7.9 Synthese von Py-Im-Py-Py- γ -OH **39**

Verbindung **38** (153 mg, 259 μ mol, 1 eq) wurde in MeOH/H₂O (3:1, 5 ml) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Dazu gab man LiOH·H₂O (54 mg, 1.29 mmol, 5 eq) und rührte über Nacht, wobei die Lösung langsam auf RT erwärmt wurde. Die Reaktionslösung wurde auf Kieselgel absorbiert und säulenchromatographisch (DCM/MeOH 5:1) gereinigt. Verbindung **39** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 127 mg, 221 μ mol, 85 %.

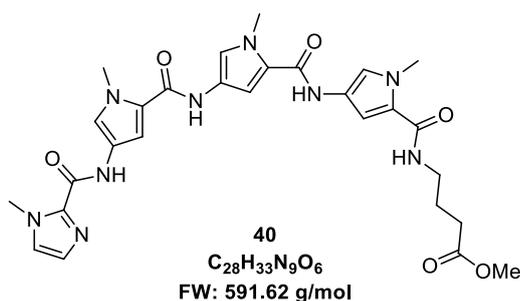
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.04 (s *br*, 1H), 10.24 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.03 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.13 – 7.09 (m, 2H), 7.00 – 6.97 (m, 1H), 6.88 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.06 (dd, *J* = 3.9, 2.5 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.18 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.22 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.71 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 174.3, 161.3, 158.8, 158.4, 155.8, 136.2, 134.1, 128.9, 124.6, 123.2, 123.0, 122.0, 121.2, 118.5, 117.9, 114.5, 113.8, 107.0, 104.7, 104.3, 37.9, 36.4, 36.2, 36.0, 34.9, 31.1, 24.8 ppm.

DC: R_f: 0.72 (DCM/MeOH 5:1)

MS (ESI): *m/z* ber. für C₂₇H₃₀N₉O₆ ([M-H]⁻): 576.2; gef.: 576.2.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₂₇H₃₂N₉O₆ ([M+H]⁺): 578.24701; gef.: 578.24758.

10.7.10 Synthese von Im-Py-Py-Py- γ -OMe **40**

Verbindung **24** (100 mg, 221 μ mol, 1.0 eq) wurde in abs. MeOH (1 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurde eine Lösung von AcCl (1 mL) in abs. MeOH (3 mL) gegeben und für 1.5 h bei 0 °C gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Im Anschluss wurde der Rückstand in abs. DMF (5 mL) aufgenommen und mit **43** (66 mg, 187 μ mol, 1.2 eq) sowie HBTU (109 mg, 287 μ mol, 1.3 eq) versetzt. Nach der Zugabe von DIPEA (113 μ L, 663 μ mol, 3.0 eq) wurde 20.5 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung mit einer 1 M NaHCO₃-Lösung, H₂O sowie DCM versetzt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert, die organische Phase mit Brine gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (CH/EE 2:9 auf CH/EE/MeOH 2:9:1) gereinigt. Verbindung **40** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 90 mg, 152 μ mol, 68 %.

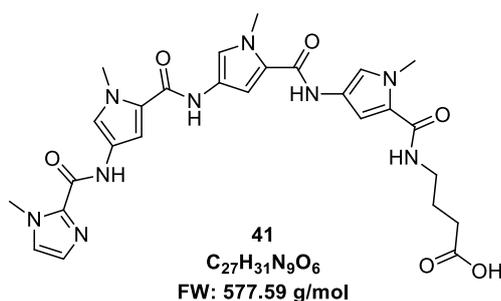
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.46 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.04 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.07 – 7.03 (m, 2H), 6.87 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.19 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.74 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 173.2, 161.4, 158.5, 158.5, 156.1, 138.8, 127.0, 126.4, 123.0, 122.9, 122.8, 122.2, 122.2, 121.5, 118.7, 118.5, 117.8, 105.0, 104.7, 104.2, 51.3, 37.7, 36.1, 36.1, 36.0, 35.1, 30.8, 24.7 ppm.

DC: R_f: 0.21 (CH/EE/MeOH 2:9:1)

MS (ESI): *m/z* ber. für C₂₈H₃₄N₉O₆ ([M+H]⁺): 592.3; gef.: 592.4.

MS (MALDI): *m/z* ber. für C₂₈H₃₄N₉O₆ ([M+H]⁺): 592.2627; gef.: 592.3173.

10.7.11 Synthese von Im-Py-Py-Py- γ -OH 41

Verbindung **40** (200 mg, 338 μ mol, 1.0 eq) wurde in MeOH (5.1 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit einer 1 M Lösung von LiOH in Wasser (1.7 mL, 1.7 mmol, 5.0 eq) versetzt. Das Gemisch wurde 19 h gerührt und dabei langsam auf RT erwärmt. Die Lösung wurde auf Kieselgel absorbiert und säulenchromatographisch (DCM/MeOH 9:1) gereinigt. Das Produkt konnte als blass-gelber Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 149 mg, 258 μ mol, 77 %.

1 H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.01 (s *br*, 1H), 10.46 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.06 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.30 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 1.7 Hz, 1H) 7.17 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.18 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.24 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.71 (p, J = 7.1 Hz, 2H) ppm.

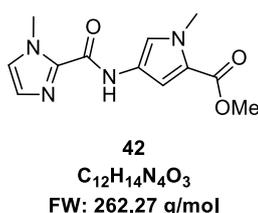
13 C-NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 174.6, 161.3, 158.5, 158.5, 156.1, 138.8, 127.0, 126.4, 123.0, 123.0, 122.8, 122.2, 122.2, 121.5, 118.7, 118.5, 117.8, 105.0, 104.7, 104.2, 37.9, 36.1, 36.1, 36.0, 35.1, 31.4, 24.9 ppm.

DC: R_f : 0.44 (DCM/MeOH 9:1)

MS (ESI): m/z ber. für $C_{27}H_{32}N_9O_6$ ($[M+H]^+$): 578.3; gef.: 578.4.

HRMS (MALDI): m/z ber. für $C_{27}H_{32}N_9O_6$ ($[M+H]^+$): 578.24701; gef.: 578.24629.

10.7.12 Synthese von Im-Py-OMe 42



Verbindung **3** (1.00 g, 5.43 mmol, 1.0 eq) wurde in abs. EE (20 mL) gelöst, mit Pd/C (100 mg, 10 % auf Aktivkohle) versetzt und 2.5 h bei RT in einer H_2 -Atmosphäre gerührt.

Im Anschluss wurde die Suspension über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach kurzem Trocknen gab man **6** (1.48 g, 6.50 mmol, 1.2 eq), abs. DCM (10 mL) sowie DIPEA (1.85 mL, 10.9 mmol, 2 eq) zu und rührte 17 h bei RT. Im Anschluss wurde die Lösung auf Kieselgel absorbiert und säulenchromatographisch (CH/EE 1:1) gereinigt. Das Produkt konnte als farbloser Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1.34 g, 5.10 mmol, 94 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.52 (s, 1H), 7.53 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.05 – 7.02 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.73 (s, 3H) ppm.

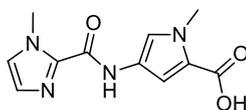
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 160.8, 156.2, 138.6, 127.0, 126.5, 122.2, 121.0, 118.7, 108.8, 50.9, 36.3, 35.1 ppm.

DC: R_f: 0.22 (CH/EE 1:1)

MS (ESI): *m/z* ber. für C₁₂H₁₅N₄O₃ ([M+H]⁺): 263.1; gef.: 263.1.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₂H₁₅N₄O₃ ([M+H]⁺): 263.11387; gef.: 263.11402.

10.7.13 Synthese von Im-Py-OH **43**



43
C₁₁H₁₂N₄O₃
FW: 248.24 g/mol

Verbindung **42** (1.32 g, 5.03 mmol, 1.0 eq) wurde in EtOH/H₂O (1:1, 60 mL) suspendiert. Dazu gab man NaOH (1.00 g, 25.2 mmol, 5.0 eq) und erhitzte die Mischung für 40 min zum Sieden. Nachdem die Lösung auf RT abgekühlt war, säuerte man sie mit 1 M HCl an und filtrierte den entstandenen Niederschlag ab. Dieser wurde im Vakuum getrocknet und man erhielt Verbindung **43** als farbloser Feststoff.

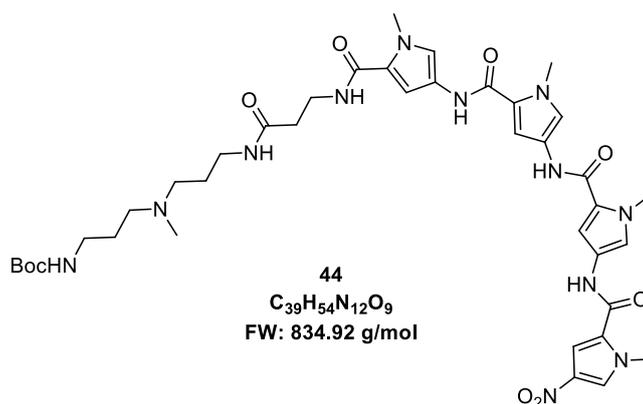
Ausbeute: 1.15 g, 4.63 mmol, 92 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.20 (s, 1H), 10.48 (s, 1H), 7.47 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.03 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.82 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 162.0, 156.1, 138.7, 127.0, 126.4, 122.0, 120.5, 119.7, 108.9, 36.2, 35.1 ppm.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₁₁H₁₁N₄O₃ ([M-H]⁻): 247.1; gef.: 247.2.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₁H₁₃N₄O₃ ([M+H]⁺): 249.09822; gef.: 249.09836.

10.7.14 Synthese von O₂N-Py-Py-Py-Py-β-Linker-Boc 44

Verbindung **34** (100 mg, 186 μmol, 1.0 eq) wurde in abs. DMF (5 mL) gelöst und mit HOBt (28.5 mg, 186 μmol, 1 eq), **33** (70.8 mg, 223 μmol, 1.2 eq) sowie DIPEA (63.0 μl, 223 μmol, 2.0 eq) versetzt. Man erwärmte auf 60 °C, gab DIC (57.0 μl, 371 μmol, 2.0 eq) zu und rührte 3 h bei 60 °C sowie weitere 18.5 h bei RT. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt zweimal säulenchromatographisch (1. DCM/MeOH 9:1 + 1 % NEt₃, 2. DCM/MeOH 9:1 + 1 % NH₃) gereinigt. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 124 mg, 148 μmol, 80 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.30 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.20 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.01 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.89 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.09 – 7.02 (m, 2H), 6.84 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.79 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.06 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.92 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.39 – 2.24 (m, 6H), 2.14 (s *br*, 3H), 1.59 – 1.47 (m, 4H), 1.36 (s, 9H) ppm.^k

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 170.4, 161.3, 158.5, 158.4, 156.9, 155.6, 133.8, 128.3, 126.3, 123.0, 122.8, 122.8, 122.2, 122.1, 121.4, 118.7, 118.5, 117.9, 107.6, 104.7, 104.5, 104.2, 77.4, 54.6, 54.6, 41.5, 38.2, 37.5, 36.7, 36.2, 36.1, 36.0, 35.6, 35.5, 28.3, 26.9, 26.6 ppm.

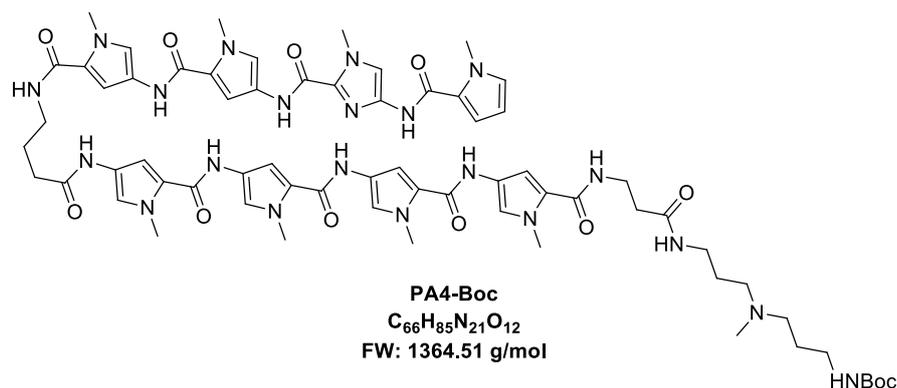
DC: R_f: 0.34 (DCM/MeOH 9:1 + 1 % NEt₃)

MS (ESI): *m/z* ber. für C₃₉H₅₅N₁₂O₉ ([M+H]⁺): 835.9; gef.: 835.7.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₃₉H₅₅N₁₂O₉ ([M+H]⁺): 835.42095; gef.: 835.42168.

^k Ein Signal von 2 Protonen im Bereich von 3.4 ppm wird durch im Lösemittel vorhandenen Wasser überlagert.

10.7.15 Synthese von PA4-Boc



Verbindung **44** (50.0 mg, 59.5 μ mol, 1.0 eq) wurde mit Pd/C (5 mg, 10 % auf Aktivkohle) in abs. DMF (2 mL) suspendiert und in einer H₂-Atmosphäre 16 h bei RT gerührt.

Verbindung **39** (41.3 mg, 71.9 μ mol, 1.2 eq) wurde mit HBTU (29.0 mg, 77.4 μ mol, 1.3 eq) in abs. DMF (1.5 mL) aufgenommen, mit DIPEA (20.0 μ L, 119 μ mol, 2.0 eq) versetzt und 5 min bei 0 °C gerührt. Die resultierende Mischung wurde zu der Reduktions-Lösung gegeben und 5 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Suspension über Celite filtriert, das Filtrat mit konz. NaHCO₃-Lösung (20 mL) sowie H₂O (20 mL) versetzt und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch (1. DCM/MeOH 5:1 + 1 % NEt₃; 2. DCM/MeOH 5:1 + 1 % NH₃) gereinigt. Das Produkt konnte als beiger Feststoff erhalten werden

Ausbeute: 50.0 mg, 36.6 μ mol, 62 %

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.22 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.92 – 9.86 (m, 3H), 9.84 (s, 1H), 8.06 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.99 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.86 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.26 – 7.22 (m, 2H), 7.21 – 7.16 (m, 3H), 7.13 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J* = 4.0, 1.7 Hz, 1H), 7.08 – 7.03 (m, 2H), 7.00 – 6.97 (m, 1H), 6.91 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.76 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 6.06 (dd, *J* = 3.9, 2.5 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.22 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.06 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.92 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.35 – 2.20 (m, 8H), 2.09 (s, 3H), 1.84 – 1.76 (m, 2H), 1.55 – 1.45 (m, 4H), 1.36 (s, 9H) ppm.¹

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 170.4, 169.3, 161.3, 161.2, 158.8, 158.5, 158.5, 158.5, 158.4, 155.8, 155.6, 136.2, 134.1, 128.9, 124.6, 123.1, 123.0, 122.8, 122.8, 122.7, 122.2, 122.2, 122.2, 122.1, 122.0, 121.2, 118.5, 118.4, 118.2, 117.9, 114.6, 113.8, 107.0, 104.7,

¹ Ein Signal von 2 Protonen im Bereich von 3.4 ppm wird durch im Lösemittel vorhandenen Wasser überlagert.

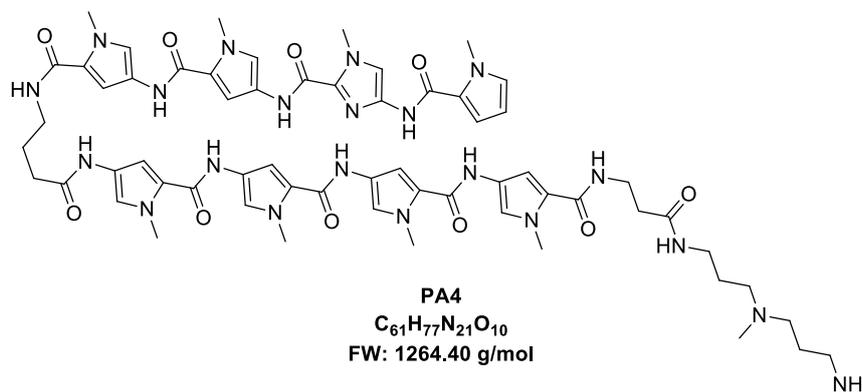
104.7, 104.3, 104.2, 104.0, 77.4, 54.8, 54.7, 41.7 38.3, 38.2, 36.8, 36.4, 36.2, 36.1, 36.0, 36.0, 35.6, 35.5, 34.9, 33.3, 28.3, 27.1, 26.8, 25.7 ppm.

DC: R_f: 0.28 (DCM/MeOH 5:1 + 1 % NH₃)

MS (ESI): *m/z* ber. für C₆₆H₈₆N₂₁O₁₂ ([M+H]⁺): 1364.7 ; gef.: 1364.7

MS (MALDI): *m/z* ber. für C₆₆H₈₆N₂₁O₁₂ ([M+H]⁺): 1364.6759; gef.: 1364.2140.

10.7.16 Synthese von PA4



PA4-Boc (20 mg, 16 μmol) wurde in DCM/TFA (1:1, 1 mL) für 1.5 h bei 0 °C gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der braune Rückstand getrocknet. Dieser konnte ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt werden.

Ausbeute: Quantitativ.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₆₁H₇₈N₂₁O₁₀ ([M+H]⁺): 1264.6; gef.: 1264.6.

m/z ber. für C₆₁H₇₉N₂₁O₁₀ ([M+2H]⁺): 632.8; gef.: 633.0.

MS (MALDI): *m/z* ber. für C₆₁H₇₈N₂₁O₁₀ ([M+H]⁺): 1264.6235; gef.: 1264.4244.

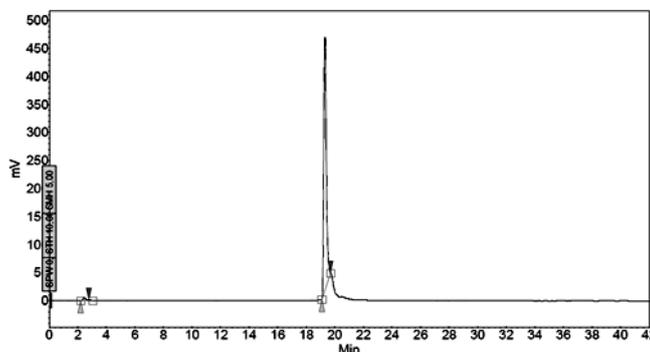
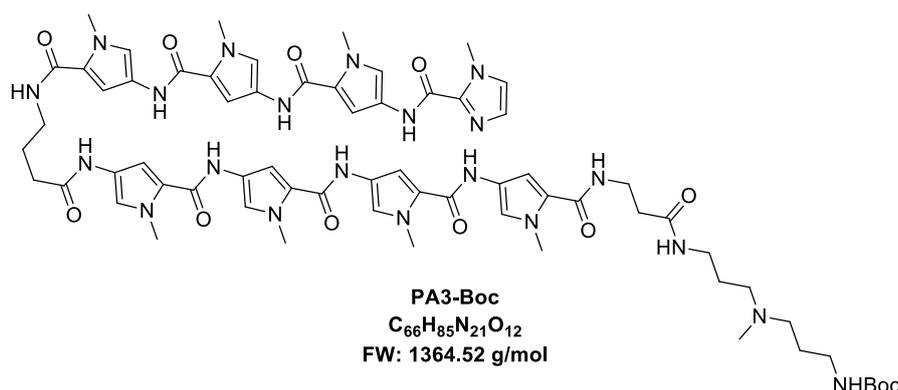


Abbildung 98: *rp*-HPLC-Chromatogramm nach der Reinigung von **PA4**. Linearer Gradient von 10 % B zu 70 % B in 30 min. A: 0.1 % TFA in H₂O; B: ACN.

10.7.17 Synthese von PA3-Boc



Verbindung **44** (50.0 mg, 59.9 μmol , 1.0 eq) wurde mit Pd/C (5 mg, 10 % auf Aktivkohle) in abs. DMF (5 mL) suspendiert und in einer H_2 -Atmosphäre bei RT 24 h gerührt.

Verbindung **41** (41.5 mg, 71.9 μmol , 1.2 eq) und HBTU (29.5 mg, 77.4 μmol , 1.3 eq) wurde in abs. DMF (1 mL) gelöst, mit DIPEA (20 μl , 110 μmol , 2 eq) versetzt und 5 min bei RT gerührt. Die resultierende Lösung wurde zu der Reduktionsmischung gegeben und 5 h bei 60 °C sowie im Anschluss für weitere 19 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde über Celite filtriert, mit einer 20%igen $NaHCO_3$ -Lösung (40 mL) versetzt und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch (DCM/MeOH 9:1 auf 5:1 + 1 % NH_3) gereinigt. Das Produkt konnte als beiger Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 20 mg, 15 μmol , 26 %.

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 10.43 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.92 (s, 1H), 9.92 – 9.88 (m, 3H) 8.11 – 8.05 (m, 2H), 8.03 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.25 – 7.23 (m, 3H), 7.20 – 7.16 (m, 4H), 7.09 – 7.05 (m, 3H), 7.04 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 6.94 – 6.89 (m, 3H), 6.87 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.88 – 3.85 (m, 9H), 3.84 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.41 – 3.36 (m, 2H), 3.22 (q, J = 6.3 Hz, 2H), 3.12 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.00 – 2.89 (m, 6H), 2.63 (s, 3H), 2.34 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.30 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.83 – 1.71 (m, 6H), 1.37 (s, 9H) ppm.

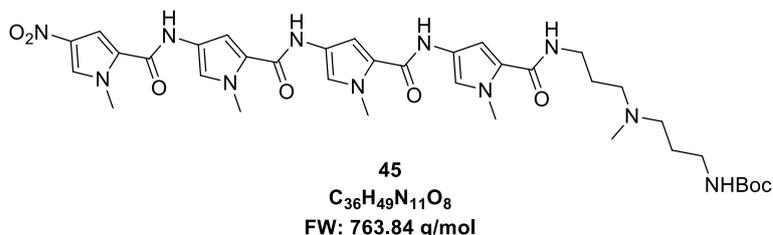
^{13}C -NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 170.9, 169.3, 161.3, 161.3, 158.5, 158.5 158.5, 156.1, 155.7, 138.8, 127.0, 126.4, 123.1, 123.0, 122.8, 122.8, 122.8, 122.7 122.2, 122.2, 122.2, 122.1, 121.5, 118.7, 118.5, 118.5 118.2, 118.0, 117.8, 105.0, 104.8, 104.3, 104.0, 77.8, 53.1 53.0, 38.2, 37.2, 36.1, 36.1, 36.0, 35.8, 35.6, 35.5, 35.1, 33.3, 28.2, 25.8, 24.3, 24.1 ppm.

DC: R_f : 0.35 (DCM:MeOH 5:1 + 1 % NH_3)

MS (ESI): m/z ber. für $C_{66}H_{86}N_{21}O_{12}$ ($[M+H]^+$): 1364.7 ; gef.: 1365.4.

MS (MALDI): m/z ber. für $C_{66}H_{85}N_{21}O_{12}$ ($[M]^+$): 1363.6687; gef.: 1363.9575.

10.7.18 Synthese von O₂N-Py-Py-Py-Py-Linker-Boc 45



Verbindung **34** (100 mg, 186 μ mol, 1 eq) wurde in abs. DMF (2 mL) gelöst und mit HOBt (28.5 mg, 186 μ mol, 1 eq), Verbindung **31** (54.7 mg, 223 μ mol, 1.2 eq) sowie DIPEA (63 μ l, 370 μ mol, 2 eq) versetzt. Man erwärmte auf 60 °C und gab DIC (57 μ l, 370 μ mol, 2 eq) zu. Es wurde 3 h bei 60 °C und 18.5 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch (1. DCM/MeOH 9:1 + 1 % NEt_3 , 2. DCM/MeOH 9:1 + 1 % NH_3) gereinigt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 118 mg, 154 μ mol, 83 %

¹H-NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 10.30 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.20 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.03 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.08 – 7.03 (m, 2H), 6.84 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.79 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.19 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.94 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.34 – 2.23 (m, 4H), 2.12 (s, 3H), 1.65 – 1.57 (m, 2H), 1.55 – 1.48 (m, 2H), 1.36 (s, 9H) ppm.

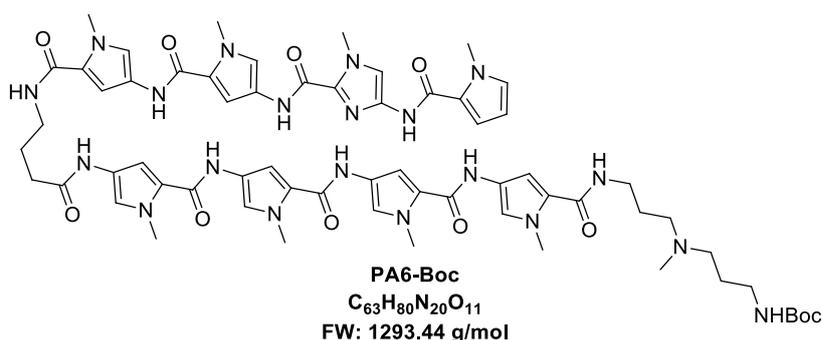
¹³C-NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 161.2, 158.5, 158.4, 156.9, 155.6, 133.8, 128.3, 126.3, 123.0, 122.8, 122.1, 121.4, 118.6, 118.5, 117.7, 107.6, 104.7, 104.5, 104.0, 77.3, 55.2, 54.8, 41.8, 38.3, 37.5, 37.0, 36.2, 36.1, 35.9, 28.3, 27.2, 27.0 ppm.

DC: R_f : 0.62 (DCM/MeOH 9:1 + 1 % NH_3)

MS (ESI): m/z ber. für $C_{36}H_{50}N_{11}O_8$ ($[M+H]^+$): 764.4; gef.: 764.6.

HRMS (MALDI): m/z ber. für $C_{36}H_{50}N_{11}O_8$ ($[M+H]^+$): 764.38383; gef.: 764.38435.

10.7.19 Synthese von PA6-Boc



Verbindung **45** (50.0 mg, 65.4 μ mol, 1.1 eq) wurde in abs. DMF (5 mL) gelöst und mit Pd/C (18 mg, 10 % auf Aktivkohle) versetzt. Die Lösung rührte man für 17.5 h in einer H_2 -Atmosphäre.

Verbindung **39** (35.4 mg, 61.3 μ mol, 1.0 eq) und HBTU (25.6 mg, 67 μ mol, 1.1 eq) wurden in abs. DMF (0.5 mL) gelöst und mit DIPEA (22.3 μ L, 131 μ mol, 2.1 eq) zu der Reduktionslösung gegeben. Diese rührte man in einer Argon-Atmosphäre 4 h bei 60 °C. Im Anschluss wurde die Suspension über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung (DCM/MeOH 9:1 auf 5:1 + 1 % NH_3) wurde **PA6-Boc** als beiger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 58 mg, 45.1 μ mol, 73 %.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.22 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 9.91 (s, 2H), 9.89 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.05 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.28 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.26 – 7.22 (m, 2H), 7.20 – 7.16 (m, 3H), 7.14 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 4.0, 1.7 Hz, 1H), 7.08 – 7.05 (m, 2H), 7.00 – 6.97 (m, 1H), 6.92 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.85 – 6.78 (m, 1H), 6.06 (dd, J = 3.9, 2.5 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.25 – 3.18 (m, 4H), 2.95 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.46 (s br, 3H), 2.35 – 2.15 (m, 6H), 1.84 – 1.77 (m, 2H), 1.71 – 1.64 (m, 2H), 1.61 – 1.54 (m, 2H), 1.36 (s, 9H) ppm.

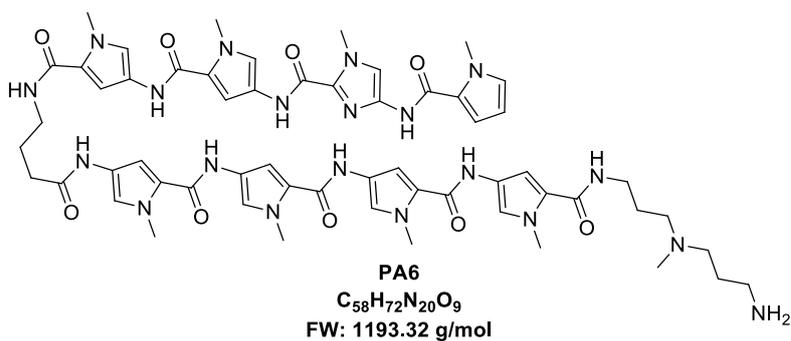
^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 169.3, 161.3, 158.8, 158.5, 158.5, 158.5, 158.4, 155.8, 155.6, 136.2, 134.1, 128.9, 124.6, 123.2, 123.0, 122.9, 122.8, 122.8, 122.7, 122.2, 122.2, 122.2, 122.1, 122.0, 121.2, 118.5, 118.4, 118.2, 117.9, 117.8, 114.6, 113.8, 107.0, 104.8, 104.7, 104.7, 104.3, 104.2, 104.0, 77.5, 54.7, 54.4, 41.2, 38.2, 38.0, 36.7, 36.4, 36.2, 36.1, 36.0, 35.9, 34.9, 33.3, 28.3, 26.4, 25.7 ppm.

DC: R_f : 0.40 (DCM:MeOH 5:1 + 1 % NH_3)

MS (ESI): m/z ber. für $C_{63}H_{81}N_{20}O_{11}$ ($[M+H]^+$): 1293.6; gef.: 1294.1.

MS (MALDI): m/z ber. für $C_{63}H_{81}N_{20}O_{11}$ ($[M+H]^+$): 1293.6388; gef.: 1293.5610.

10.7.20 Synthese von PA6



PA6-Boc (30 mg, 25 μ mol) wurde in DCM/TFA (1:1, 1 mL) für 1.5 h bei 0 °C gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der braune Rückstand getrocknet. Dieser konnte ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt werden.

Ausbeute: Quantitativ.

MS (ESI): m/z ber. für $C_{58}H_{73}N_{20}O_9$ ($[M+H]^+$): 1193.6; gef.: 1194.0.

m/z ber. für $C_{58}H_{72}N_{20}O_9$ ($[M+2H]^+$): 597.3; gef.: 597.6.

MS (MALDI): m/z ber. für $C_{58}H_{73}N_{20}O_9$ ($[M+H]^+$): 1193.5864; gef.: 1192.3091.

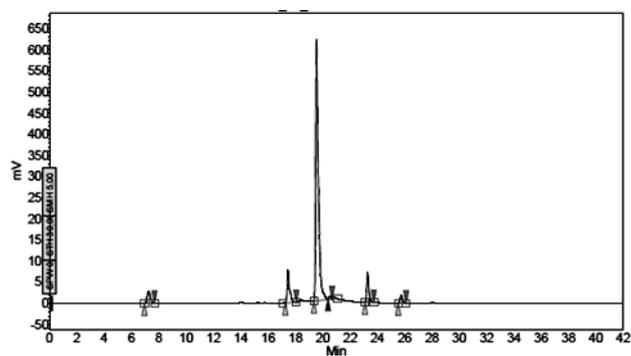


Abbildung 99: *rp*-HPLC-Chromatogramm vor der Reinigung von **PA6**. Linearer Gradient von 10 % B zu 70 % B in 30 min. A: 0.1 % TFA in H₂O; B: ACN.

10.8 Synthese der Konjugate

Es wurden 10 mg des Trägers (ca. 250 nmol) mit darauf gebundenem voll geschützten ON (*fast deprotection*) in abs. DCM (1 mL) für 30 min aufgeschlämmt. Anschließend inkubierte man für 5 min mit 3%iger TCA in abs. DCM (0.5 mL), um die MMT-Gruppe abzuspalten. Die orangefarbene Lösung wurde entfernt, der Träger kurz mit abs. DCM (0.5 mL) gewaschen und danach für weitere 5 min mit einer 3%igen TCA-Lösung (0.5 mL) behandelt. Anschließend wusch man fünfmal mit abs. ACN (je 0.5 mL) und gab eine Lösung von DIPEA (1.7 μ L, 10 μ mol) und 1,6-Diisocyanatohexan (8.42 μ L, 48 μ mol) in abs. ACN (1 mL) zu. Es wurde 18 h bei RT geschüttelt und anschließend fünfmal mit abs. ACN (0.5 mL) gewaschen.

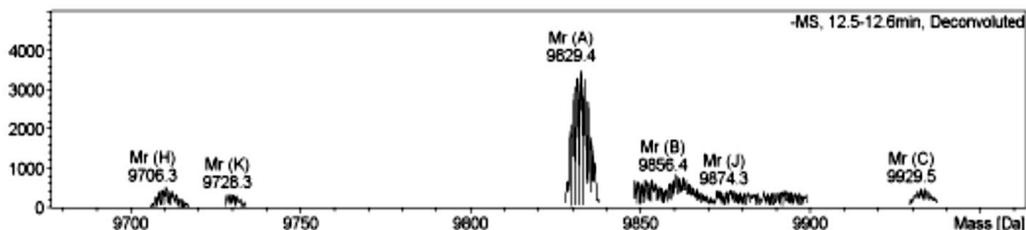
Dann gab man eine Lösung des jeweiligen PIPs (2.5 μ mol, ca. 10 eq) in abs. MeOH (150 μ L) sowie DIPEA (25 – 75 μ L) in abs. ACN (750 μ L) zu. Im Anschluss wurde 24 h bei RT geschüttelt und dann fünfmal mit abs. ACN (0.5 mL) gewaschen.

Zur Abspaltung von der festen Phase wurde viermal 32%ige NH_3 -Lösung (0.5 mL) zugegeben und jeweils 30 min bei RT geschüttelt. Im Anschluss erwärmte man die Lösung für 5 h auf 55 °C. Das Lösemittel wurde in einer Speedvac getrocknet und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Zu der Lösung gab man Harnstoff, bis eine gesättigte Lösung entstand. Diese Mischung wurde mittels dPAGE (16 %, 230 – 250 V) getrennt, wobei im Fall des Konjugats **K9** eine Temperatur von 50 °C angelegt wurde. Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten, das Konjugat aus der Gelmatrix gelöst und durch die Zugabe von Ethanol bei -20 °C gefällt. Die resultierenden Pellets wurden in Wasser aufgenommen und ihre Konzentration bestimmt.

K1:

Im-Py-Py- γ -Py-Py-Py- β -DMDPA- γ -C₆-C₆-⁵TTTTTATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC

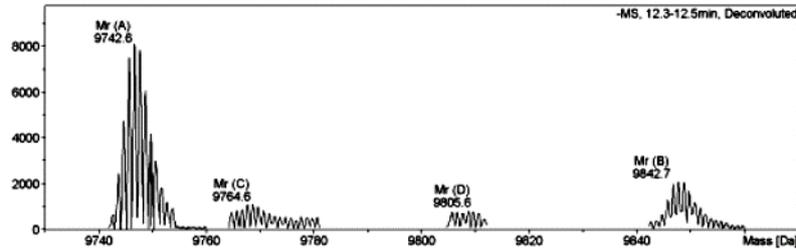
MS (ESI - TOF): m/z ber. für C₃₃₂H₄₃₁N₁₂₂O₁₇₉P₂₇ ([M]): 9826.1; gef.: 9829.4



K2:

Im-Py-Py- γ -Py-Py-Py- β -DMDPA-C₆-C₆-^{5'}TTTTTATTTCGATCGGGGCGGGGCGAGC

MS (ESI - TOF): m/z ber. für C₃₂₈H₄₂₄N₁₂₁O₁₇₈P₂₇ ([M]⁻) 9741.1; gef.: 9742.6

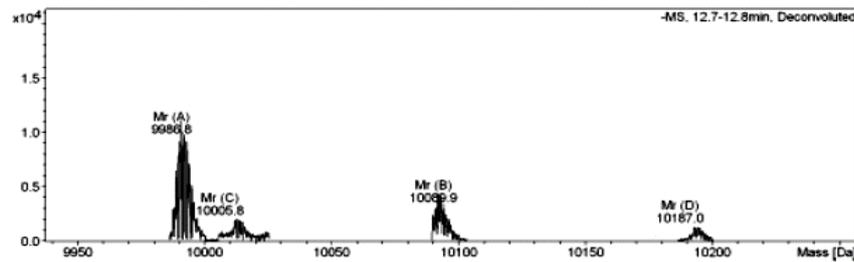


K3:

Im-Py-Py-Py- γ -Py-Py-Py-Py- β -DMDPA-C₆-C₆-

^{5'}TTTTTATTTCGATCGGGGCGGGGCGAGC

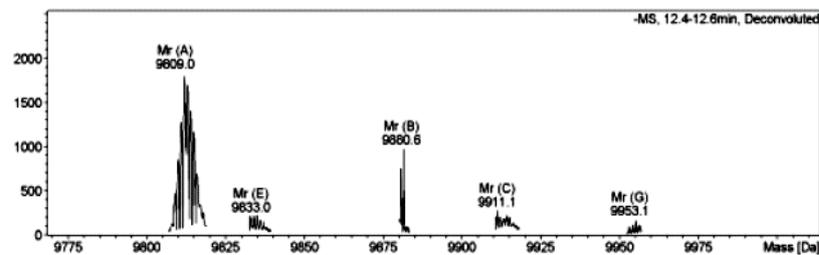
MS (ESI - TOF): m/z ber. für C₃₄₀H₄₃₆N₁₂₅O₁₈₀P₂₇ ([M]⁻): 9985.2; gef.: 9986.8



K4:

Im-Py-Py- γ -Py-Py-Py- β -DMDPA-C₆-C₆-^{5'}TTTTTGCGAGGAGGGGCGTGGCCGGC

MS (ESI - TOF): m/z ber. für C₃₂₈H₄₂₂N₁₂₇O₁₇₇P₂₇ ([M]⁻): 9807.1; gef.: 9809.0

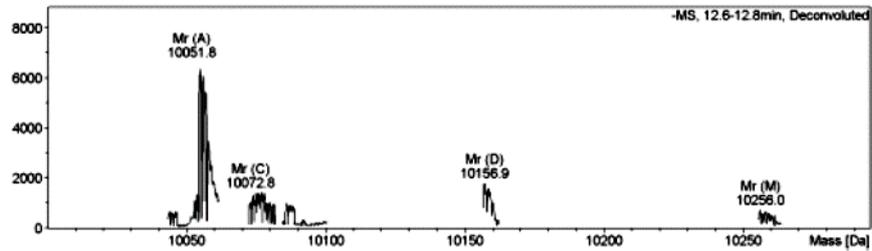


K5:

Py-Im-Py-Py- γ -Py-Py-Py-Py- β -DMDPA-C₆-C₆-

5'TTTTTGGCGAGGAGGGGCGTGGCCGGC

MS (ESI - TOF): m/z ber. für C₃₄₀H₄₃₄N₁₃₁O₁₇₉P₂₇ ([M]⁻):10051.2; gef.: 10051.8

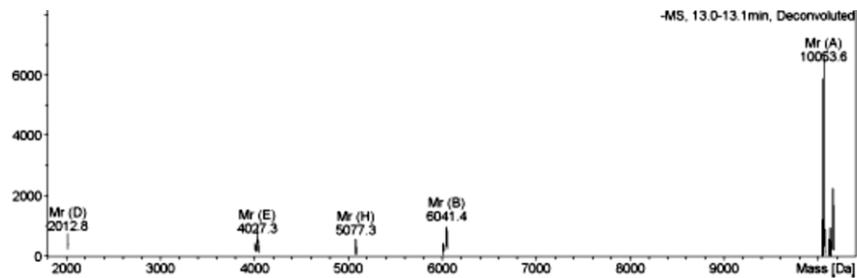


K6:

Py-Py-Py-Py- γ -Py-Im-Py-Py- β -DMDPA-C₆-C₆-

5'TTTTTGGCGAGGAGGGGCGTGGCCGGC

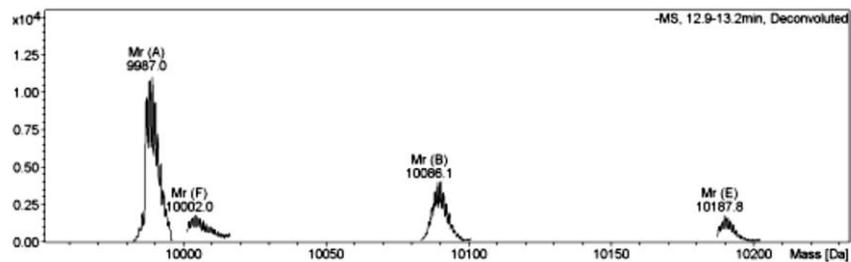
MS (ESI - TOF): m/z ber. für C₃₄₀H₄₃₄N₁₃₁O₁₇₉P₂₇ ([M]⁻): 10051.2; gef.: 10053.8



K7:

Py-Im-Py-Py- γ -Py-Py-Py-Py-DMDPA-C₆-C₆-5'TTTTTGGCGAGGAGGGGCGTGGCCGGC

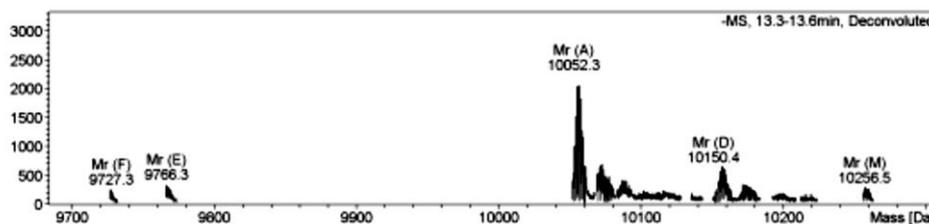
MS (ESI - TOF): m/z ber. für C₃₃₇H₄₂₉N₁₃₀O₁₇₈P₂₇ ([M]⁻): 9980.1; gef.: 9987.0



K8:

Im-Py-Py-Py- γ -Py-Py-Py-Py- β -DMDPA-C₆-C₆-
 5'TTTTTGGCGAGGAGGGGCGTGGCCGGC

MS (ESI - TOF): m/z ber. für C₃₄₀H₄₃₄N₁₃₁O₁₇₉P₂₇ ([M]):10051.2; gef.: 10052.3



K9:

Py-Im-Py-Py- γ -Py-Py-Py-Py- β -DMDPA-C₆-C₆-
 5'TTTTTGGCGAGGAGGGGCGTGGCCGGC-TTTTTGCCGGCCACGCCCTCCTCGCC

Aufgrund der Länge des Konjugats musste es nach der Gelelektrophorese zusätzlich mittels *rp*-HPLC gereinigt werden.

Verwendete Geräte: *Jasco DG-980-50*, *Jasco LG-980-02*, *Jasco Pu-980*, *Jasco UV-970*, *Jasco MD 2010 Plus*; Säule: *Macherey-Nagel 250/8/4 Nucleosil 120-5-C₁₈*.

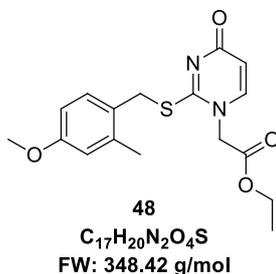
Laufbedingungen A: Wasser, B: ACN, C: 1 M TEAA-Puffer; Fluss 4 mL/min

Zeit	A	B	C
0 min	85 %	5 %	10 %
3 min	85 %	5 %	10 %
25 min	50 %	40 %	10 %
26.5 min	45 %	45 %	10 %

In diesem Fall konnte keine Masse gemessen werden. Die Identität des Konjugats wurde über die UV-Absorption, das Laufverhalten und seine Bindungseigenschaften an die Ziel-DNA identifiziert.

10.9 Synthese der PNA-Bausteine

10.9.1 Synthese von Ethyl-2-(2-(2-methyl-4-methoxybenzyl)thiouracil-1-yl)acetat **48**



Verbindung **53** (200 mg, 762 μ mol, 1.0 eq) wurde in abs. DCM (5 mL) suspendiert. Dazu gab man HMDS (195 μ L, 941 μ mol, 1.2 eq) sowie Saccharin (1.39 mg, 7.62 μ mol, 0.01 eq) und erhitzte die Lösung für 1 h zum Sieden. Im Anschluss wurde Verbindung **55** (243 mg, 1.03 μ mol, 1.4 eq) in abs. DCM (1 mL) zugegeben und für eine weitere Stunde refluxiert. Nachdem die Lösung auf RT abgekühlt war, gab man konz. Na_2CO_3 -Lösung (12 mL) und H_2O (5 mL) zu. Die Mischung wurde mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE/MeOH 19:1) gereinigt. **48** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 214 mg, 614 μ mol, 80 %.

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 7.67 (d, J = 7.5 Hz, 1H, C^6 -H- U_s), 7.31 (d, J = 8.4 Hz, 1H, C^6 -H-Ar), 6.78 (d, J = 2.4 Hz, 1H, C^3 -H-Ar), 6.71 (dd, J = 8.4, 2.6 Hz, 1H, C^5 -H-Ar), 5.94 (d, J = 7.5 Hz, 1H, C^5 -H- U_s), 4.78 (s, 2H, CH_2 -N), 4.35 (s, 2H, CH_2 -S), 4.16 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2 -O), 3.72 (s, 3H, OMe), 2.30 (s, 3H, CH_3 -Ar), 1.17 (d, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 167.0, 166.4, 162.4, 158.9, 145.5, 138.5, 131.5, 125.1, 115.9, 111.3, 108.6, 61.7, 55.0, 52.5, 33.3, 19.0, 13.9 ppm.

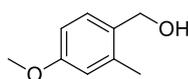
DC: R_f : 0.30 (EE/MeOH 19:1).

MS (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{20}N_2NaO_4S$ ($[M+Na]^+$): 371.1; gef.: 371.0.

HRMS (MALDI): m/z ber. für $C_{17}H_{20}N_2NaO_4S$ ($[M+Na]^+$): 371.10360; gef.: 371.10374.

Schmelzpunkt: 121 – 122.5 °C.

10.9.2 Synthese von 4-Methoxy-2-methylbenzylalkohol **50**



50
 $C_9H_{12}O_2$
 FW: 152.19 g/mol

4-Methoxy-2-methylbenzylaldehyd (2.00 g, 13.3 mmol, 1.0 eq) wurden in EtOH (32 mL) gelöst und mit $NaBH_4$ (0.55 g, 14.6 mmol 1.1 eq) versetzt. Nach 15 min wurde H_2O (240 mL) zugegeben. Die Lösung wurde mit 4 M HCl angesäuert und mit Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O und Brine gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösemittel wurde entfernt und **50** als gelbes Öl erhalten.

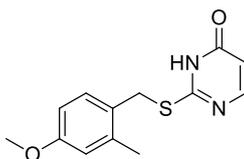
Ausbeute: 1.91 g, 12.6 mmol, 94 %.

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.23 (d, J = 8.3 Hz, 1H, C⁶-H), 6.75 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-C3), 6.72 (dd, J = 8.3, 2.6 Hz, 1H, C⁵-H), 4.63 (s, 2H, CH_2), 3.80 (s, 3H, OMe) 2.37 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 1H, OH) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ = 159.4, 138.3, 131.3, 129.7, 116.4, 110.9, 63.5, 55.4, 19.1 ppm.

DC: R_f : 0.39 (CH/EE 2:1).

10.9.3 Synthese von 2-(2-Methyl-4-methoxybenzyl)thiouracil **53**



53
 $C_{13}H_{14}N_2O_2S$
 FW: 262.33 g/mol

Variante A:

Verbindung **50** (4.00 g, 26.3 mmol, 2.2 eq.) wurde in DCM (160 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung tropfte man langsam PBr_3 (2.7 mL, 28.9 mmol, 2.4 eq). Im Anschluss wurde 20 min bei 0 °C gerührt und die Reaktionsmischung in eine eisgekühlte $NaHCO_3$ -Lösung gegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit Et_2O extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit H_2O und Brine gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltende Bromid wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

2-Thiouracil (1.53 g, 11.9 mmol, 1.0 eq.) wurde in EtOH (15 mL) suspendiert und mit einer wässrigen KOH-Lösung (878 mg, 15.7 mmol, 1.3 eq., in 15 mL H₂O) versetzt. Die Suspension erhitzte man auf 45 °C, bis eine klare Lösung vorlag. Nachdem die Lösung auf RT abgekühlt war, wurde das Bromid in EtOH (9 mL) gelöst und zur Reaktionsmischung hinzugegeben. Die entstandene Suspension wurde für 19 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck, nahm man den Rückstand in einer konz. NaHCO₃-Lösung (30 mL) auf. Die Mischung wurde filtriert und der erhaltende Feststoff mit H₂O, EtOH, EE und Et₂O gewaschen. Verbindung **53** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 655 mg, 2.50 mmol, 21 %.

Variante B:

Verbindung **50** (500 mg, 3.29 mmol, 1.7 eq) wurde mit TMSCl (500 µL, 3.94 mmol, 2.0 eq) versetzt und 1 h bei RT gerührt.

2-Thiouracil (253 mg, 1,97 mmol, 1.0 eq) wurde zu einer Lösung von KOH (144 mg, 2.56 mg, 1.3 eq) in EtOH/H₂O (1:1, 4 mL) gegeben und auf 45 °C erhitzt, bis das Reaktionsgemisch aufklarte. Nach dem dieses auf RT abgekühlt war, gab man die oben beschriebene Lösung zu. Im Anschluss wurde mit KOH ein basischer pH-Wert eingestellt und die Mischung wurde 3 Tage bei RT gerührt. Das Solvens wurde entfernt und der Rückstand in einer konz. NaHCO₃-Lösung (10 mL) aufgenommen. Die Mischung wurde filtriert und der erhaltende Feststoff mit H₂O, EtOH, EE und Et₂O gewaschen. Verbindung **53** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 288 mg, 1.08 mmol, 56 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.64 (s *br*, 1H, NH), 7.91 (s *br*, 1 H, C⁶-H-U_s), 7.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, C⁶-H-Ar), 6.78 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, C³-H-Ar), 6.71 (dd, *J* = 8.4, 2.6 Hz, 1H, C⁵-H-Ar), 6.12 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, C⁵-H-U_s), 4.35 (s, 2H, CH₂), 3.71 (s, 3H, OMe), 2.31 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 176.1, 161.0, 158.8, 142.1, 138.2, 131.2, 125.9, 115.8, 111.3, 105.3, 55.0, 31.9, 19.0 ppm.

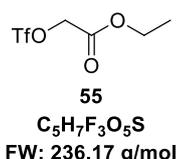
DC: R_f: 0.31 (CH/EE 1:1).

MS (ESI): *m/z* ber. für C₁₃H₁₄N₂NaO₂S ([M+Na]⁺): 285.1; gef.: 285.1.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₃H₁₄N₂NaO₂S ([M+Na]⁺): 285.06682; gef.: 285.06700.

Schmelzpunkt: 200 – 201 °C.

10.9.4 Synthese von Ethoxycarbonyl-methyltrifluormethansulfonat **55**



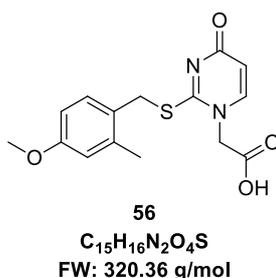
Ethyl-2-hydroxyacetat (950 µL, 10.0 mmol, 1.0 eq), und abs. Pyridin (1.00 mL, 13.0 mmol, 1.3 eq) wurden in DCM (16 mL) gelöst und auf -70 °C gekühlt. Dann wurde Tf₂O (1.90 mL, 11.5 mmol, 1.2 eq) zugegeben, wobei die Temperatur unter -60 °C gehalten wurde. Im Anschluss wurde 30 min bei -60 °C und 1.5 h bei RT gerührt. Dann gab man H₂O (20 mL) und DCM zu, trennte die Phasen und extrahierte die wässrige Phase mit DCM. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **55** wurde als braunes Öl erhalten und ohne weitere Reinigung verwendet.

Ausbeute: 1.98 g, 8.4 mmol, 84 %.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 4.90 (s, 2H), 4.33 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 164.6, 118.6 (q, *J*_{CF} = 319.5 Hz), 69.1, 63.0, 14.1 ppm.

10.9.5 Synthese von 2-(2-(2-Methyl-4-methoxybenzyl)thiouracil-1-yl)acetat **56**



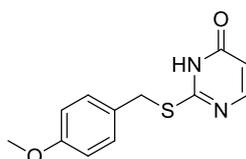
Zu einer Suspension von **48** (50 mg, 144 µmol, 1.0 eq) in THF/MeOH (7:3, 1.2 mL) wurde eine 2 M Lösung von LiOH in H₂O (0.12 mL, 240 µmol 1.7 eq) gegeben und 20 min bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in H₂O (0.5 mL) aufgenommen. Die Suspension wurde filtriert und der Feststoff mit EE und Et₂O gewaschen und getrocknet. **56** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 14 mg, 44 µmol, 30 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.62 (s *br*, 1H, COOH), 7.67 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, C⁶-U_s), 7.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, C⁶-H-Ar), 6.78 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, C³-H-Ar), 6.71 (dd, *J* = 8.3, 2.6 Hz, 1H, C⁵-H-Ar), 5.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, C⁵-H-U_s), 4.66 (s, 2H, CH₂-N), 4.34 (s, 2H, CH₂-S), 3.72 (s, 3H, OMe), 2.30 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 168.4, 166.6, 162.4, 158.9, 145.7, 138.5, 131.5, 125.2, 115.9, 111.3, 108.5, 55.0, 52.6, 33.2, 19.1 ppm.

10.9.6 Synthese von 2-(4-Methoxybenzyl)thiouracil **61**



61
 $C_{12}H_{12}N_2O_2S$
 FW: 248.30 g/mol

2-Thiouracil (640 mg, 4.99 mmol, 1.0 eq) wurde in EtOH/H₂O (1:1, 6 mL) suspendiert und mit KOH (395 mg, 7.04 mmol, 1.4 eq) versetzt. Nachdem eine klare Lösung entstand, gab man PMBCl (800 μ L, 7.92 mmol, 1.6 eq) zu und rührte 1 h bei RT. Das EtOH wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 50%iger NaHCO₃-Lösung aufgenommen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit 50%iger NaHCO₃, EE und Et₂O gewaschen. **61** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 767 mg, 3.09 mmol, 61 %.

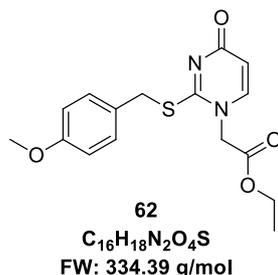
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.44 (s 1H, *br*, NH), 7.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, C⁶-H-U_s), 7.34 – 7.30 (m, 2H, C²-H-Ar), 6.90 – 6.84 (m, 2H, C³-H-Ar), 6.10 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, C⁵-H-U_s), 4.33 (s, 2H, CH₂), 3.72 (s, 3H, OMe) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 163.4, 163.0, 158.5, 153.8, 130.3, 128.8, 113.9, 109.7, 55.1, 33.3 ppm.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₁₂H₁₁N₂O₂S ([M-H]⁻): 247.1; gef.: 247.1.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₁₂H₁₂N₂NaO₂S ([M+Na]⁺): 271.05117; gef.: 271.05164.

Schmelzpunkt: 201 °C.

10.9.7 Synthese von Ethyl-2-(2-(4-methoxybenzyl)thiouracil-1-yl)acetat **62**

Zu einer Suspension von Verbindung **61** (500 mg, 2.01 mmol, 1.0 eq) in DCM (10 mL) wurde HMDS (375 μ L, 1.81 μ mol, 0.9 eq) und Saccharin (3.7 mg, 20 μ mol, 0.01 eq) gegeben. Im Anschluss erhitze man die Lösung für 1 h zum Sieden und gab dann Verbindung **55** (642 mg, 2.72 mmol, 1.4 eq) in abs. DCM (1 mL) zu. Die Lösung wurde für eine weitere Stunde refluxiert und nach dem Abkühlen auf RT mit konz. $NaHCO_3$ -Lösung (5 mL), H_2O (2 mL), MeOH (5 mL) und DCM (10 mL) versetzt. Die Mischung wurde mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE/MeOH 9:1) gereinigt. **62** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 387 mg, 1.16 mmol, 58 %.

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 7.67 (d, J = 7.6 Hz, 1H, C^6 -H- U_s), 7.36 – 7.31 (m, 2H, C^2 -H-Ar), 6.90 – 6.85 (m, 2H, C^3 -H-Ar), 5.94 (d, J = 7.5 Hz, 1H, C^5 -H- U_s), 4.79 (s, 2H, CH_2 -N), 4.36 (s, 2H, CH_2 -S), 4.16 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2 -O), 3.72 (s, 3H, OMe), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 167.1, 166.5, 162.4, 158.7, 145.6, 130.5, 128.0, 113.9, 108.7, 61.8, 55.1, 52.5, 34.4, 14.0 ppm.

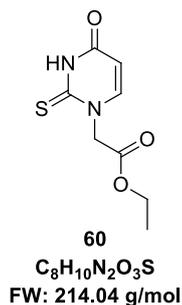
DC: R_f : 0.42 (EE:MeOH 9:1)

MS (ESI): m/z ber. für $C_{16}H_{18}N_2NaO_4S$ ($[M+Na]^+$): 357.1; gef.: 357.2.

HRMS (MALDI): m/z ber. für $C_{16}H_{19}N_2O_4S$ ($[M+H]^+$): 335.10600; gef.: 335.10645.

Schmelzpunkt: 137 °C.

10.9.7.1 Synthese von Ethyl-2-(thiouracil-1-yl)acetat **60**



Verbindung **62** (20 mg) wurde in TFA/TIPS/H₂O (95:2.5:2.5, 1 mL) aufgenommen und 1 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und Verbindung **60** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: Quantitativ.

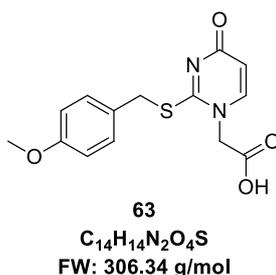
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.76 (s, 1H, N-H) 7.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, C⁶-H-U_s), 6.01 (dd, *J* = 7.9, 2.2 Hz, 1H, C⁵-H-U_s), 4.95 (s, 2H, CH₂-N), 4.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-O), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 176.9, 167.1, 160.2, 146.4, 106.1, 61.2, 54.3, 14.0 ppm.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₈H₁₁N₂NaO₃S ([M+H]⁺): 215.1; gef.: 215.1.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₈H₁₁N₂O₃S ([M+H]⁺): 215.04849; gef.: 215.04859.

10.9.8 Synthese von 2-(2-(4-Methoxybenzyl)thiouracil-1-yl)acetat **63**



Zu einer Suspension von Verbindung **62** (350 mg, 1.05 mmol, 1.0 eq) in THF/MeOH (2:1, 8.8 mL) wurde eine 2 M Lösung von LiOH in H₂O (875 μ L, 1.75 mmol 1.7 eq) gegeben und 10 min bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung mit 2 M HCl angesäuert, die organischen Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und die erhaltene Lösung auf 4 °C abgekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und der Feststoff mit Wasser und Et₂O gewaschen und getrocknet. **63** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 170 mg, 555 μ mol, 53 %.

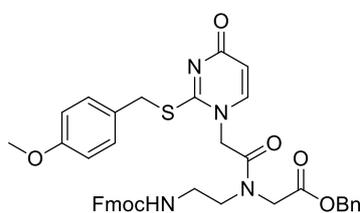
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.54 (s, 1H, COOH), 7.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, C⁶-H-U_s), 7.36 – 7.32 (m, 2H, C²-H-Ar), 6.90 – 6.85 (m, 2H, C³-H-Ar), 5.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, C⁵-H-U_s), 4.67 (s, 2H, CH₂-N), 4.36 (s, 2H, CH₂-S), 3.73 (s, 3H, OMe) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 168.3, 166.5, 162.3, 158.7, 145.6, 130.4, 127.9, 113.9, 108.5, 55.1, 52.5, 34.3 ppm.

MS (ESI): *m/z* ber. für C₁₄H₁₅N₂O₄S ([M+H]⁺): 307.1; gef.: 307.2.

Schmelzpunkt: 149 °C.

10.9.9 Synthese von 2-(4-Methoxybenzyl)thiouracil-Fmoc/Bn-PNA-Monomer **64**



64
C₄₀H₃₈N₄O₇S
FW: 718.82 g/mol

Verbindung **63** (100 mg, 326 μ mol, 1.0 eq.) wurde in abs. DMF (5 mL) gelöst und mit HBTU (136 mg, 359 μ mol, 1.1 eq.) sowie DIPEA (100 μ L, 588 μ mol, 1.8 eq.) versetzt. Anschließend gab man das Amidrückgrat (168 mg, 359 μ mol, 1.1 eq.) hinzu und rührte 2 h bei RT. Nach Ende der Reaktion überführte man die Lösung in EE und wusch mit 10%iger KHSO₄- und 10%iger NaHCO₃-Lösung. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH 19:1) gereinigt und Verbindung **64** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 100 mg, 139 μ mol, 43 %.

Dieses Produkt besteht aus zwei Rotameren, welche im Verhältnis von 1:0.4 vorliegen.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.88 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.46 und 7.41 (d, *J* = 7.5 Hz, [maj/min], 1H), 7.44 – 7.38 (m, 3H), 7.37 – 7.28 (m, 7H), 7.25 und 7.30 (d, *J* = 8.6 Hz, [maj/min], 2H), 6.76 und 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, [maj/min], 2H), 5.89 und 5.87 (d, *J* = 7.5 Hz, [maj/min], 1H), 5.16 und 5.11 (s, [min/maj], 2H), 4.98 und 4.78 (s, [maj/min], 2H), 4.35 und 4.14 (s, [min/maj], 2H), 4.31 – 4.28 (m, 2H), 4.27 (s, 2H), 4.21 – 4.15 (m, 1H), 3.70 und 3.65 (s, [min/maj], 3H), 3.43 und 3.35 (t, *J* = 6.4 Hz, [maj/min], 2H), 3.24 und 3.11 (q, *J* = 6.2 Hz, [maj/min], 2H)

DC: R_f = 0.32 (DCM/MeOH: 19:1).

MS (ESI): *m/z* ber. für C₄₀H₃₉N₄O₇S ([M+H]⁺): 719.3; gef.: 719.5.

HRMS (MALDI): *m/z* ber. für C₄₀H₃₉N₄O₇S ([M+H]⁺): 719.25340; gef.: 719.25309.

11 Literatur

- [1] C. I. E. Smith, R. Zain, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *59*, 605–630.
- [2] T. C. Roberts, R. Langer, M. J. A. Wood, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 673–694.
- [3] F. Wang, T. Zuroske, J. K. Watts, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 441–442.
- [4] S. Fields, O. Song, *Nature* **1989**, *340*, 245–246.
- [5] V. Ratushny, E. A. Golemis, *BioTechniques* **2008**, *44*, 655–662.
- [6] M. F. La Russa, L. S. Qi, *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35*, 3800–3809.
- [7] M. K. Ghosh, A. Katyal, R. Chandra, V. Brahmachari, *Mol. Cell. Biochem.* **2005**, *278*, 147–155.
- [8] S. Patel, D. Jung, P. T. Yin, P. Carlton, M. Yamamoto, T. Bando, H. Sugiyama, K.-B. Lee, *ACS Nano* **2014**, *8*, 8959–8967.
- [9] R. Rupaimoole, F. J. Slack, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 203–222.
- [10] J. Hanna, G. S. Hossain, J. Kocerha, *Front. Genet.* **2019**, *10*, 478.
- [11] D. Wirth Hamdoune, Konjugate Minor-Groove-Bindender Imidazol-Pyrrol-Polyamide Als DNA-Spalter Und Potentielle Transkriptionsaktivatoren, Dissertation, Goethe Universität, **2016**.
- [12] M. Bolz, Synthese von Adaptermolekülen Zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren an Nichtnative Bindungsstellen, Masterarbeit, Goethe Universität, **2015**.
- [13] M. Bolz, L. Thomas, U. Scheffer, E. Kalden, R. K. Hartmann, M. W. Göbel, *Chem. Biodivers.* **2020**, *17*, e2000272.
- [14] J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1996**, *382*, 559–561.
- [15] J. M. Gottesfeld, L. Neely, J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1997**, *387*, 202–205.
- [16] H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645–650.
- [17] F. Svinarchuk, I. Nagibneva, D. Chern, S. Ait-Si-Ali, L. L. Pritchard, P. Robin, C. Malvy, A. Harel-Bellan, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3459–3464.
- [18] D. Ackermann, M. Famulok, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 4729–4739.
- [19] W. Kameshima, T. Ishizuka, M. Minoshima, M. Yamamoto, H. Sugiyama, Y. Xu, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13681–13684.
- [20] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281–297.
- [21] D. P. Bartel, *Cell* **2009**, *136*, 215–233.
- [22] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, **1998**, *391*, 6.
- [23] Y. Fang, M. J. Fullwood, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2016**, *14*, 42–54.
- [24] K. V. Morris, J. S. Mattick, *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 423–437.

- [25] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, in *Stryer Biochem.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2018**, pp. 127–162.
- [26] K. S. Gates, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1747–1760.
- [27] U. Kaukinen, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 468–474.
- [28] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, in *Stryer Biochem.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2018**, pp. 1059–1095.
- [29] D. Shames, J. Minna, A. Gazdar, *Curr. Mol. Med.* **2007**, *7*, 85–102.
- [30] A. M. Krieg, *Oncogene* **2008**, *27*, 161–167.
- [31] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [32] “Nucleic acid secondary structure,” can be found under https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Nucleic_acid_secondary_structure&oldid=952368594, **2020**.
- [33] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964–967.
- [34] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Acta Crystallogr.* **1953**, *6*, 673–677.
- [35] D. M. Chenoweth, J. L. Meier, P. B. Dervan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 415–418.
- [36] A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel, A. Rich, *Nature* **1979**, *282*, 680–686.
- [37] J. Zhao, A. Bacolla, G. Wang, K. M. Vasquez, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 43–62.
- [38] E. I. Zagryadskaya, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3946–3953.
- [39] B. P. Belotserkovskii, S. M. Mirkin, P. C. Hanawalt, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 8620–8637.
- [40] N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 666–690.
- [41] M. Cooney, G. Czernuszewicz, E. Postel, S. Flint, M. Hogan, *Science* **1988**, *241*, 456–459.
- [42] C. Giovannangeli, M. Rougee, T. Garestier, N. T. Thuong, C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 8631–8635.
- [43] J.-S. Sun, C. Hélène, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 345–356.
- [44] F. Raguseo, S. Chowdhury, A. Minard, M. Di Antonio, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 1317–1324.
- [45] J. Spiegel, S. Adhikari, S. Balasubramanian, *Trends Chem.* **2020**, *2*, 123–136.
- [46] D. Varshney, J. Spiegel, K. Zyner, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 459–474.
- [47] D. A. Glazier, J. Liao, B. L. Roberts, X. Li, K. Yang, C. M. Stevens, W. Tang, *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 1213–1233.
- [48] M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1978**, *75*, 285–288.
- [49] S. Wang, E. T. Kool, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4125–4132.

- [50] M. Majlessi, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2224–2229.
- [51] F. Eckstein, *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *24*, 374–387.
- [52] C. A. Stein, C. Subasinghe, K. Shinozuka, J. S. Cohen, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3209–3221.
- [53] S. T. Crooke, J. L. Witztum, C. F. Bennett, B. F. Baker, *Cell Metab.* **2018**, *27*, 714–739.
- [54] J. Wengel, M. Petersen, M. Frieden, T. Koch, *Lett. Pept. Sci.* **2003**, *10*, 237–253.
- [55] S. Freier, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4429–4443.
- [56] C. Förster, A. Eichert, D. Oberthür, C. Betzel, R. Geßner, A. Nitsche, J. P. Fürste, *J. Nucleic Acids* **2012**, *2012*, 1–8.
- [57] P. H. Hagedorn, R. Persson, E. D. Funder, N. Albæk, S. L. Diemer, D. J. Hansen, M. R. Møller, N. Papargyri, H. Christiansen, B. R. Hansen, H. F. Hansen, M. A. Jensen, T. Koch, *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 101–114.
- [58] A. Khvorova, J. K. Watts, *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 238–248.
- [59] I. Yildirim, E. Kierzek, R. Kierzek, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 14177–14187.
- [60] J. Kurreck, E. Wyszko, C. Gillen, V. A. Erdmann, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1911–1918.
- [61] R. Crinelli, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 2435–2443.
- [62] S. Obad, C. O. dos Santos, A. Petri, M. Heidenblad, O. Broom, C. Ruse, C. Fu, M. Lindow, J. Stenvang, E. M. Straarup, H. F. Hansen, T. Koch, D. Pappin, G. J. Hannon, S. Kauppinen, *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 371–378.
- [63] P. H. Hagedorn, V. Yakimov, S. Ottosen, S. Kammler, N. F. Nielsen, A. M. Høg, M. Hedtjärn, M. Meldgaard, M. R. Møller, H. Ørum, T. Koch, M. Lindow, *Nucleic Acid Ther.* **2013**, *23*, 302–310.
- [64] R. Ge, J. E. Heinonen, M. G. Svahn, A. J. Mohamed, K. E. Lundin, C. I. E. Smith, *FASEB J.* **2007**, *21*, 1902–1914.
- [65] E. M. Zaghloul, A. S. Madsen, P. M. D. Moreno, I. I. Oprea, S. El-Andaloussi, B. Bestas, P. Gupta, E. B. Pedersen, K. E. Lundin, J. Wengel, C. I. E. Smith, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1142–1154.
- [66] P. M. D. Moreno, S. Geny, Y. V. Pabon, H. Bergquist, E. M. Zaghloul, C. S. J. Rocha, I. I. Oprea, B. Bestas, S. E. Andaloussi, P. T. Jorgensen, E. B. Pedersen, K. E. Lundin, R. Zain, J. Wengel, C. I. E. Smith, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 3257–3273.
- [67] V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchard, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310–1313.
- [68] P. E. Nielsen, *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3118–3123.

- [69] A. Kiliszek, K. Banaszak, Z. Dauter, W. Rypniewski, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1937–1943.
- [70] P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [71] P. E. Nielsen, M. Egholm, *Curr. Issues Mol. Biol.* **1999**, *1*, 89–104.
- [72] P. Muangkaew, T. Vilaivan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127064.
- [73] J. Lohse, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 11804–11808.
- [74] G. Haaima, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4639–4643.
- [75] T. Sugiyama, G. Hasegawa, C. Niikura, K. Kuwata, Y. Imamura, Y. Demizu, M. Kurihara, A. Kittaka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3337–3341.
- [76] Y. Aiba, Y. Honda, M. Komiyama, *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 4021–4026.
- [77] P. E. Nielsen, *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 786–804.
- [78] A. Ghidini, H. Bergquist, M. Murtola, T. Punga, R. Zain, R. Strömberg, *Org Biomol Chem* **2016**, *14*, 5210–5213.
- [79] X. Wang, X. Xiao, B. Zhang, J. Li, Y. Zhang, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 2106–2109.
- [80] R. Marchelli, R. Corradini, A. Manicardi, S. Sforza, T. Tedeschi, E. Fabbri, M. Borgatti, N. Bianchi, R. Gambari, in *Targets Gene Ther.* (Ed.: Y. You), InTech, **2011**.
- [81] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, in *Stryer Biochem.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2018**, pp. 1017–1058.
- [82] G. Suske, E. Bruford, S. Philipsen, *Genomics* **2005**, *85*, 551–556.
- [83] C. Vizcaíno, S. Mansilla, J. Portugal, *Pharmacol. Ther.* **2015**, *152*, 111–124.
- [84] W. S. Dynan, R. Tjian, *Cell* **1983**, *32*, 669–680.
- [85] M. Marin, A. Karis, P. Visser, F. Grosveld, S. Philipsen, *Cell* **1997**, *89*, 619–628.
- [86] G. Suske, *Gene* **1999**, *238*, 291–300.
- [87] J. T. Kadonaga, K. R. Carner, R. Tjian, *Cell* **1987**, *51*, 1079–1090.
- [88] S. S. Solomon, G. Majumdar, A. Martinez-Hernandez, R. Raghov, *Life Sci.* **2008**, *83*, 305–312.
- [89] L. Li, J. R. Davie, *Ann. Anat. - Anat. Anz.* **2010**, *192*, 275–283.
- [90] W.-C. Chang, J.-J. Hung, *J Biomed Sci* **2012**, *19*, 94.
- [91] L. O'Connor, J. Gilmour, C. Bonifer, *Yale J. Biol. Med.* **2016**, *89*, 513–525.
- [92] I. A. Mastrangelo, A. J. COUREYt, J. S. Wall, S. P. Jackson, P. V. C. Hough, *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**, *88*, 5670–5674.
- [93] V. H. Y. Lee, B. K. C. Chow, K. W. Lo, L. S. N. Chow, C. Man, S. W. Tsao, L. T. O. Lee, *Gene* **2009**, *443*, 55–63.
- [94] S. He, J.-M. Sun, L. Li, J. R. Davie, *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 4073–4083.
- [95] E. Hedrick, Y. Cheng, U.-H. Jin, K. Kim, S. Safe, *Oncotarget* **2016**, *7*, 22245–22256.
- [96] S. Safe, J. Abbruzzese, M. Abdelrahim, E. Hedrick, *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* **2018**, *11*, 371–382.

- [97] I. Krüger, M. Vollmer, D. Simmons, H.-P. Elsässer, S. Philipsen, G. Suske, *Dev. Dyn.* **2007**, 236, 2235–2244.
- [98] J.-E. Oh, J.-A. Han, E. S. Hwang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 353, 86–91.
- [99] K. Beishline, J. Azizkhan-Clifford, *FEBS J.* **2015**, 282, 224–258.
- [100] S. Safe, I. Jutooru, G. Chadalapaka, *Gastrointest. Cancer Targets Ther.* **2014**, 65.
- [101] C. W. Garvie, C. Wolberger, *Mol. Cell* **2001**, 8, 937–946.
- [102] J. Rodríguez, J. Mosquera, R. García-Fandiño, M. E. Vázquez, J. L. Mascareñas, *Chem. Sci.* **2016**, 7, 3298–3303.
- [103] K. Roy, A. Mazumder, P. Ghosh, G. Naiya, B. Ghosh, S. Roy, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 1611–1614.
- [104] P. Marchand, K. Resch, H. H. Radeke, *J. Immunol.* **2000**, 164, 2070–2076.
- [105] M. K. Ghosh, A. Katyal, V. Brahmachari, R. Chandra, *J. Biomol. Structure Dyn.* **2002**, 20, 265–273.
- [106] S. Kuznetsova, S. Ait-Si-Ali, I. Nagibneva, F. Troalen, J.-P. Le Villain, A. Harel-Bellan, F. Svinarchuck, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 3995–4000.
- [107] D. Stanojevic, R. A. Young, *Biochemistry* **2002**, 41, 7209–7216.
- [108] Y. Ruiz García, Y. V. Pabon-Martinez, C. I. E. Smith, A. Madder, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 6653–6656.
- [109] C. Rathnam, S.-T. D. Chueng, L. Yang, K.-B. Lee, *Theranostics* **2017**, 7, 2775–2793.
- [110] R. R. Beerli, B. Dreier, C. F. Barbas, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 1495–1500.
- [111] R. R. Beerli, C. F. Barbas, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 135–141.
- [112] K.-H. Bae, Y. Do Kwon, H.-C. Shin, M.-S. Hwang, E.-H. Ryu, K.-S. Park, H.-Y. Yang, D. Lee, Y. Lee, J. Park, H. Sun Kwon, H.-W. Kim, B.-I. Yeh, H.-W. Lee, S. Hyung Sohn, J. Yoon, W. Seol, J.-S. Kim, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 275–280.
- [113] A. M. Chiarella, D. Lu, N. A. Hathaway, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 943.
- [114] E. A. Heiderscheidt, A. Eguchi, M. C. Spurgat, A. Z. Ansari, *FEBS Lett.* **2018**, 592, 888–900.
- [115] J. Boch, U. Bonas, *Annu. Rev. Phytopathol.* **2010**, 48, 419–436.
- [116] R. Morbitzer, P. Romer, J. Boch, T. Lahaye, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, 107, 21617–21622.
- [117] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **2012**, 337, 816–821.
- [118] L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, F. Zhang, *Science* **2013**, 339, 819–823.
- [119] L. A. Syding, P. Nickl, P. Kasperek, R. Sedlacek, *Cells* **2020**, 9, 993.

- [120] L. A. Gilbert, M. H. Larson, L. Morsut, Z. Liu, G. A. Brar, S. E. Torres, N. Stern-Ginossar, O. Brandman, E. H. Whitehead, J. A. Doudna, W. A. Lim, J. S. Weissman, L. S. Qi, *Cell* **2013**, *154*, 442–451.
- [121] M. E. Tanenbaum, L. A. Gilbert, L. S. Qi, J. S. Weissman, R. D. Vale, *Cell* **2014**, *159*, 635–646.
- [122] S. Konermann, M. D. Brigham, A. E. Trevino, J. Joung, O. O. Abudayyeh, C. Barcena, P. D. Hsu, N. Habib, J. S. Gootenberg, H. Nishimasu, O. Nureki, F. Zhang, *Nature* **2015**, *517*, 583–588.
- [123] W. S. Wade, M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8778–8783.
- [124] W. S. Wade, M. Mrksich, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11385–11389.
- [125] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 1376–1380.
- [126] J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1393–1399.
- [127] M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2572–2576.
- [128] M. Mrksich, M. E. Parks, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7983–7988.
- [129] S. White, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 569–578.
- [130] M. E. Parks, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6147–6152.
- [131] S. E. Swalley, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1113–1120.
- [132] D. M. Herman, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1382–1391.
- [133] P. B. Dervan, B. S. Edelson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 284–299.
- [134] M. A. Marques, R. M. Doss, A. R. Urbach, P. B. Dervan, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 4485–4517.
- [135] Y.-W. Han, T. Matsumoto, H. Yokota, G. Kashiwazaki, H. Morinaga, K. Hashiya, T. Bando, Y. Harada, H. Sugiyama, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 11510–11517.
- [136] J. M. Turner, S. E. Swalley, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6219–6226.
- [137] S. Patel, P. T. Yin, H. Sugiyama, K.-B. Lee, *ACS Nano* **2015**, *9*, 6909–6917.
- [138] S. Patel, S.-T. D. Chueng, P. T. Yin, K. Dardir, Z. Song, N. Pasquale, K. Kwan, H. Sugiyama, K.-B. Lee, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11983–11988.
- [139] P. Dervan, *Science* **1986**, *232*, 464–471.
- [140] I. Kers, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3339–3349.
- [141] Y. Kawamoto, A. Sasaki, K. Hashiya, S. Ide, T. Bando, K. Maeshima, H. Sugiyama, *Chem Sci* **2015**, *6*, 2307–2312.
- [142] D. Renneberg, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5707–5716.
- [143] P. B. Dervan, R. W. Bürli, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 688–693.
- [144] J. A. Raskatov, A. E. Hargrove, A. Y. So, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7995–7999.

- [145] E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6141–6146.
- [146] N. R. Wurtz, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1201–1203.
- [147] W. Su, S. J. Gray, R. Dondi, G. A. Burley, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3910–3913.
- [148] Y. Kawamoto, T. Bando, F. Kamada, Y. Li, K. Hashiya, K. Maeshima, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16468–16477.
- [149] P. O. Krutzik, A. R. Chamberlin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2129–2132.
- [150] J. W. Puckett, J. T. Green, P. B. Dervan, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2774–2777.
- [151] L. Fang, G. Yao, Z. Pan, C. Wu, H.-S. Wang, G. A. Burley, W. Su, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 158–161.
- [152] J. Xiao, G. Yuan, W. Huang, A. S. C. Chan, K.-L. D. Lee, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5506–5513.
- [153] D. Wirth-Hamdoune, S. Ullrich, U. Scheffer, T. Radanović, G. Dürner, M. W. Göbel, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 506–514.
- [154] D. M. Chenoweth, D. A. Harki, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7175–7181.
- [155] T. F. Martinez, J. W. Phillips, K. K. Karanja, P. Polaczek, C.-M. Wang, B. C. Li, J. L. Campbell, P. B. Dervan, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 11546–11559.
- [156] A. K. Mapp, A. Z. Ansari, M. Ptashne, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 3930–3935.
- [157] A. Z. Ansari, A. K. Mapp, D. H. Nguyen, P. B. Dervan, M. Ptashne, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 583–592.
- [158] P. S. Arora, A. Z. Ansari, T. P. Best, M. Ptashne, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13067–13071.
- [159] Y. Kwon, H.-D. Arndt, Q. Mao, Y. Choi, Y. Kawazoe, P. B. Dervan, M. Uesugi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15940–15941.
- [160] X. Xiao, P. Yu, H.-S. Lim, D. Sikder, T. Kodadek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2865–2868.
- [161] X. Xiao, P. Yu, H.-S. Lim, D. Sikder, T. Kodadek, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 592–600.
- [162] A. Ohtsuki, M. T. Kimura, M. Minoshima, T. Suzuki, M. Ikeda, T. Bando, H. Nagase, K. Shinohara, H. Sugiyama, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7288–7292.
- [163] G. N. Pandian, Y. Nakano, S. Sato, H. Morinaga, T. Bando, H. Nagase, H. Sugiyama, *Sci. Rep.* **2012**, *2*, DOI 10.1038/srep00544.
- [164] G. N. Pandian, J. Taniguchi, S. Junetha, S. Sato, L. Han, A. Saha, C. AnandhaKumar, T. Bando, H. Nagase, T. Vijayanthi, R. D. Taylor, H. Sugiyama, *Sci. Rep.* **2015**, *4*, 3843.
- [165] S. Patel, T. Pongkulapa, P. T. Yin, G. N. Pandian, C. Rathnam, T. Bando, T. Vijayanthi, H. Sugiyama, K.-B. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4598–4601.
- [166] J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3534–3535.

- [167] J. K. W. Lam, M. Y. T. Chow, Y. Zhang, S. W. S. Leung, *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2015**, *4*, e252.
- [168] V. Kotikam, J. A. Viel, E. Rozners, *Chem. – Eur. J.* **2020**, *26*, 685–690.
- [169] R. W. Carthew, E. J. Sontheimer, *Cell* **2009**, *136*, 642–655.
- [170] R. Garzon, G. Marcucci, C. M. Croce, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 775–789.
- [171] R. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Genome Res.* **2008**, *19*, 92–105.
- [172] L. M. Wee, C. F. Flores-Jasso, W. E. Salomon, P. D. Zamore, *Cell* **2012**, *151*, 1055–1067.
- [173] M. R. Fabian, N. Sonenberg, W. Filipowicz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 351–379.
- [174] S. Jonas, E. Izaurralde, *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 421–433.
- [175] D.-H. Kim, M. A. Behlke, S. D. Rose, M.-S. Chang, S. Choi, J. J. Rossi, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 222–226.
- [176] M. P. Gantier, B. R. G. Williams, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2007**, *18*, 363–371.
- [177] D. A. Braasch, S. Jensen, Y. Liu, K. Kaur, K. Arar, M. A. White, D. R. Corey, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7967–7975.
- [178] C. R. Allerson, N. Sioufi, R. Jarres, T. P. Prakash, N. Naik, A. Berdeja, L. Wanders, R. H. Griffey, E. E. Swayze, B. Bhat, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 901–904.
- [179] M. Matsui, T. P. Prakash, D. R. Corey, *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 946–955.
- [180] N. Hosseinahli, M. Aghapour, P. H. G. Duijf, B. Baradaran, *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 5574–5588.
- [181] M. Fabbri, A. Paone, F. Calore, R. Galli, C. M. Croce, *RNA Biol.* **2013**, *10*, 169–174.
- [182] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, *438*, 685–689.
- [183] M. Thomas, K. Lange-Grünweller, E. Dayyoub, U. Bakowsky, U. Weirauch, A. Aigner, R. K. Hartmann, A. Grünweller, *RNA Biol.* **2012**, *9*, 1088–1098.
- [184] J. Ariyoshi, Y. Matsuyama, A. Kobori, A. Murakami, H. Sugiyama, A. Yamayoshi, *Nucleic Acid Ther.* **2017**, *27*, 303–308.
- [185] J. Ariyoshi, N. Eimori, A. Kobori, A. Murakami, H. Sugiyama, A. Yamayoshi, *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 143–145.
- [186] S. Niaz, *Biol. Chem.* **2018**, *399*, 525–547.
- [187] E. Elkayam, C.-D. Kuhn, A. Tocilj, A. D. Haase, E. M. Greene, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Cell* **2012**, *150*, 100–110.
- [188] N. T. Schirle, J. Sheu-Gruttadauria, I. J. MacRae, *Science* **2014**, *346*, 608–613.
- [189] E. Mogilyansky, I. Rigoutsos, *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 1603–1614.
- [190] A. Ota, H. Tagawa, S. Karnan, S. Tsuzuki, A. Karpas, S. Kira, Y. Yoshida, M. Seto, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3087–3095.

- [191] L. He, J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon, S. M. Hammond, *Nature* **2005**, *435*, 828–833.
- [192] A. Ventura, A. G. Young, M. M. Winslow, L. Lintault, A. Meissner, S. J. Erkeland, J. Newman, R. T. Bronson, D. Crowley, J. R. Stone, R. Jaenisch, P. A. Sharp, T. Jacks, *Cell* **2008**, *132*, 875–886.
- [193] L. de Pontual, E. Yao, P. Callier, L. Faivre, V. Drouin, S. Cariou, A. Van Haeringen, D. Geneviève, A. Goldenberg, M. Oufadem, S. Manouvrier, A. Munnich, J. A. Vidigal, M. Vekemans, S. Lyonnet, A. Henrion-Caude, A. Ventura, J. Amiel, *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 1026–1030.
- [194] I. Ivanovska, A. S. Ball, R. L. Diaz, J. F. Magnus, M. Kibukawa, J. M. Schelter, S. V. Kobayashi, L. Lim, J. Burchard, A. L. Jackson, P. S. Linsley, M. A. Cleary, *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 2167–2174.
- [195] J. T. Mendell, *Cell* **2008**, *133*, 217–222.
- [196] A. Aartsma-Rus, D. R. Corey, *Nucleic Acid Ther.* **2020**, *30*, 67–70.
- [197] S. M. Hoy, *Drugs* **2018**, *78*, 1625–1631.
- [198] M. Hecker, S. Wagner, S. W. Henning, A. H. Wagner, in *RSC Biomol. Sci.* (Ed.: J. Kurreck), Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2008**, pp. 163–188.
- [199] M. Hecker, A. H. Wagner, *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *144*, 29–34.
- [200] R. Morishita, G. H. Gibbons, M. Horiuchi, K. E. Ellison, M. Nakama, L. Zhang, Y. Kaneda, T. Ogihara, V. J. Dzau, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 5855–5859.
- [201] M. Borgatti, I. Lampronti, A. Romanelli, C. Pedone, M. Saviano, N. Bianchi, C. Mischiati, R. Gambari, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7500–7509.
- [202] H. Wagner, S. Bauer, *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 265–268.
- [203] A. M. Krieg, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 471–484.
- [204] H. Mollaei, R. Safaralizadeh, Z. Rostami, *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 12369–12384.
- [205] R. H. E. Hudson, A. Heidari, T. Martin-Chan, G. Park, J. A. Wisner, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 13252–13261.
- [206] S. Ullrich, Synthese von Aminopyrrol- Und Aminoimidazolcarbonsäuren Als Bausteine DNA-Bindender Peptide, Diplomarbeit, J. W. Goethe-Universität (Frankfurt am Main), **2004**.
- [207] S. Ullrich, Sequenzselektive, Metallfreie DNA-Spalter Auf Der Basis von Bisguanidiniumalkoholen, Dissertation, J. W. Goethe-Universität (Frankfurt am Main), **2009**.
- [208] M. Ikeda, H. Nakagawa, S. Ban, H. Tsumoto, T. Suzuki, N. Miyata, *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1792–1797.
- [209] T. Nagamatsu, *The Improved Stationary Phase for Capillary Electrophoresis DNA Polymorphism Analysis*, **2009**, JP 2009011183.

- [210] D. Jaramillo, Q. Liu, J. Aldrich-Wright, Y. Tor, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8151–8153.
- [211] L. Buyachuihan, Bachelorarbeit Lynn Buyachuihan 2015.pdf, Bachelorarbeit, Goethe Universität, **2015**.
- [212] I. Singh, C. Wendeln, A. W. Clark, J. M. Cooper, B. J. Ravoo, G. A. Burley, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3449–3457.
- [213] A. J. Fallows, I. Singh, R. Dondi, P. M. Cullis, G. A. Burley, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4654–4657.
- [214] P. K. Mandal, J. S. McMurray, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6599–6601.
- [215] I. Beria, P. G. Baraldi, P. Cozzi, M. Caldarelli, C. Geroni, S. Marchini, N. Mongelli, R. Romagnoli, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2611–2623.
- [216] C. Badía, F. Souard, C. Vicent, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10870–10881.
- [217] T. Kubo, M. Morikawa, H. Ohba, M. Fujii, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2623–2626.
- [218] E.-A. Raiber, R. Kranaster, E. Lam, M. Nikan, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1499–1508.
- [219] A. M. P. Romani, *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *512*, 1–23.
- [220] Z. Yu, G. N. Pandian, T. Hidaka, H. Sugiyama, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *147*, 66–85.
- [221] P. Vekhoff, A. Ceccaldi, D. Polverari, J. Pylouster, C. Pisano, P. B. Arimondo, *Biochemistry* **2008**, *47*, 12277–12289.
- [222] E. Kowarz, D. Löscher, R. Marschalek, *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 647–653.
- [223] V. V. Demidov, E. Protozanova, K. I. Izvol'sky, C. Price, P. E. Nielsen, M. D. Frank-Kamenetskii, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 5953–5958.
- [224] K. Yilmaz, Herstellung von Bausteinen für die Synthese pseudokomplementärer PNA Bachelorarbeit, Bachelorarbeit, Goethe Universität, **2018**.
- [225] N. Ajvazi, S. Stavber, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2430–2433.
- [226] K. R. Mulholland, A. R. Ross, G. R. Slater, G. E. Smith, *Process to Prepare (1-Carboxymethyl)-Pyrimidinone Compounds*, **2007**.
- [227] F. Guibbal, S. Bénard, J. Patché, V. Meneyrol, J. Couprie, J. Yong-Sang, O. Meilhac, E. Jestin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 787–792.
- [228] M. Komiyama, Y. Aiba, T. Ishizuka, J. Sumaoka, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 646–654.
- [229] M. Góngora-Benítez, L. Mendive-Tapia, I. Ramos-Tomillero, A. C. Breman, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5472–5475.
- [230] C. Kost, Synthese Pseudokomplementärer PNA Zur Sequenzspezifischen Erkennung Doppelsträngiger DNA, Masterarbeit, Goethe Universität, **2019**.
- [231] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, *75*, 843–854.
- [232] S. M. Hammond, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2006**, *16*, 4–9.

- [233] M. Thomas, K. Lange-Grünweller, U. Weirauch, D. Gutsch, A. Aigner, A. Grünweller, R. K. Hartmann, *Oncogene* **2012**, *31*, 918–928.
- [234] Y. Tursynbay, J. Zhang, Z. Li, T. Tokay, Z. Zhumadilov, D. Wu, Y. Xie, *Biomed. Rep.* **2016**, *4*, 140–146.
- [235] “Explore Tools async - GeneGlobe,” can be found under <https://geneglobe.qiagen.com/us/explore/tools/lna-oligo-optimizer/form>, **2020**.
- [236] J. N. Zadeh, C. D. Steenberg, J. S. Bois, B. R. Wolfe, M. B. Pierce, A. R. Khan, R. M. Dirks, N. A. Pierce, *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 170–173.
- [237] A. G. Torres, M. M. Fabani, E. Vigorito, M. J. Gait, *RNA* **2011**, *17*, 933–943.
- [238] L. Thomas, Inaktivierung von MRNAs Und MiRNAs Durch DNA/LNA-Basierte Und Mit Zusätzlichen Funktionalitäten Konjugierte Antisense-Oligonukleotide, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2020**.
- [239] C. A. Hunter, H. L. Anderson, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7624–7636.
- [240] F. Zellmann, L. Thomas, U. Scheffer, R. K. Hartmann, M. W. Göbel, *Molecules* **2019**, *24*, 807.
- [241] U. Zabel, R. Schreck, P. A. Baeuerle, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 252–260.
- [242] Z. Yu, C. Guo, Y. Wei, K. Hashiya, T. Bando, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2426–2429.
- [243] Z. Yu, W.-C. Hsieh, S. Asamitsu, K. Hashiya, T. Bando, D. H. Ly, H. Sugiyama, *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24*, 14183–14188.
- [244] D. M. Gray, S.-H. Hung, K. H. Johnson, *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 19–34.
- [245] M. Bialer, B. Yagen, R. Mechoulam, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 2389–2391.
- [246] C. Bailly, J.-P. Henichart, N. Pommery, R. Houssin, *J. Pharm. Sci.* **1989**, *78*, 910–917.
- [247] L. Grehn, U. Ragnarsson, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3492–3497.

12. Anhang

12.1 Puffer und Gele

12.1.1 Puffer und Stammlösungen:

10x *Blotting buffer*

250 mM Tris

1.9 M Glycin

Blocking buffer:

0.5 % Casein, Hammarsten Grade

1 mM Tris-HCl pH 8

Gelelutionspuffer:

500 mM NaOAc pH 7.0

2 mM EDTA

0.1 % SDS

Puffer 1:

25 mM HEPES-NaOH pH 7.5

100 mM KCl

2.5 mM MgCl₂

0.01 mM ZnCl₂

5 % Glycerol

Puffer 2:

50 mM Tris-HCl pH 8

100 mM KCl,

2 mM MgCl₂

Puffer 3 (P3)

100 mM Tris-HCl pH 9.5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

Puffer Z:

25 mM HEPES-NaOH pH 7.5

100 mM KCl

12.5 mM MgCl₂

0.01 mM ZnCl₂

20 % Glycerol

10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris

1.92 M Glycin

1 % (w/v) SDS

SSPE 20x:

0.2 M Na₂H₂PO₄

0.02 M EDTA

3 M NaCl

TBE Puffer 10x:

1 M Tris

830 mM Borsäure

10mM Na₂EDTA*2H₂O

TBS:

150 mM NaCl

10 mM Tris-HCl pH 8.0

TBST:

150 mM NaCl

10 mM Tris-HCl pH 8.0

0.1 % Tween 20

TEMg:

40 mM Tris-HCl pH 7.4

2.5 mM EDTA

12.5 mM MgCl₂

Triplexpuffer:

50 mM HEPES-NaOH pH 7.0

50 mM NaCl

2 mM MgCl₂

Gelladepuffer:

Denaturierender Ladepuffer 2x:

8 M Harnstoff

20 mM EDTA

0.2 % Orange G

Ladepuffer 6x:

0.25 % Orange G

40 % Saccharose

Laemmli-Puffer 2x:

100 mM Tris-HCl pH 6.8

20 % Glycerol

4 % SDS

0.1 % Bromphenolblau, oder 0.2 % Orange G

12.1.2 PAGE

Denaturierende PAGE

Acrylamid Stock Lösung 19:1

7M Harnstoff

16 % Acrylamid (19:1)

1x TBE

Nativ PAGE	8 %	16 %
34.5 % Acrylamid-Lösung	2.3 mL	4.6 mL
TBE 10x		1.0 mL

50% Glycerol	1.0 mL	
Wasser	6.8 mL	4.5 mL
APS	100 µL	
TEMED	10 µL	

SDS-PAGE

Stacking Gel:	6 %	8 %
34.5 % Acrylamid-Lösung	0.9 mL	1.2 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 mL	
20 % SDS	25 µL	
Wasser	2.6 µL	2.8 mL
APS	50 µL	
TEMED	5 µL	

Resolving Gel:	8 %	10 %
34.5 % Acrylamid-Lösung	1.7 mL	2.2 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.9 mL	
20 % SDS	37.5 µL	
Wasser	3.8 µL	3.3 mL
APS	75 µL	
TEMED	7.5 µL	

12.1.3 Färbelösungen

BCIP/NBT-Lösung

P3: 6 mL

BCIP: 21 μ L

NBT: 27 μ L

SYBR Gold-Lösung

10 mM Tris-HCl pH 7.5

1 mM EDTA

0.01 % SYBR Gold in DMSO

12.2 Abkürzungsverzeichnis

2'-F-RNA	2'-Fluor-RNA
2'-MOE-RNA	2'-O-Methoxyethyl-RNA
2'-OMe-RNA	2'-Methoxy-RNA
A	Adenin
abs.	absolut
AcCl	Acetylchlorid
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
ACN	Acetonitril
AD	Aktivierungsdomäne
Ago	Argonaut-Protein
AMP	Adenosinmonophosphat
ASGPR	Asialoglycoproteinrezeptor 1
ASO	<i>antisense oligonucleotide</i>
ATF	<i>artificial transkription factor</i> (artifizieller Transkriptionsfaktor)
β -Ala-OH/ β	β -Alanin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaar
BTC	Bis(trichlormethyl)carbonat/Triphosgen
C	Cytosin
ca.	zirka
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i> (cyclin-abhängige Kinase)
CH	Cyclohexan

CPP	<i>cell penetrating peptide</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Cy5	Cyanin 5
D	Diaminopurin
d	<i>dies</i> (Tag)
dAMP	Desoxyadenosinmonophosphat
DBD	DNA-bindende Domäne
dCas9	<i>deactivated CRISPR associated protein 9</i>
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMDPA	3,3'-Diamino- <i>N</i> -methyl-diaminopropylamin
DMF	Dimethylformaid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dPAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DSI	Doppelstranginvasion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE/EtOAc	Essigsäureethylester
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EtOH	Ethanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GalNac	<i>N</i> -Acetylgalatosamin
h	<i>hora</i> (Stunde)

HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HDAC	Histon-Deacetylase
HEG	Hexaethylenglycol
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMDS	Hexamethyldisilazan
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
G	Guanin
GABA/ γ	γ -Aminobuttersäure
gRNA	guide RNA
Im	<i>N</i> -Methylimidazol
IR-Spektroskopie	Infrarot-Spektroskopie
KLF	<i>Krüppel-like factor</i>
LD	Linkerdomäne
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
LNP	Lipidnanopartikels
m ⁵ C	5-Methylcytidin
MeOH	Methanol
min	Minute
mL	Milliliter
μ L	Microliter

MMPM	2-Methyl-4-methoxybenzyl
MMT	Monomethoxytrityl
mRNA	Messenger-RNA
miRNA	microRNA
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NLS	<i>nuclear localization signal</i> (Kernlokalisierungssignal)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
ON	Oligonukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>protospacer-adjacent motif</i>
PAZ	<i>PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE</i>
PEG	Polyethylenglycol
PIP	Pyrrol-Imidazol-Polyamid
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl
PMO	Phosphoramidat-Morpholino-Oligonukleotid
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
PS	Phosphorthioat
Py	<i>N</i> -Methylpyrrol
RISC	<i>RNA-induced silencing complexes</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
<i>rp</i>	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
SAHA	<i>suberanilohydroxamic acid</i>
SAM	<i>synergistic activation mediator</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Sp1	<i>specificity protein 1</i>

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
SSO	<i>splice-switching oligonucleotide</i>
SSPE	<i>saline-sodium phosphate-EDTA</i>
T	Thymin
TALE	<i>Transcription Activator-Like Effectors</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	TBS + Tween 20
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
TCACl	Trichloracetylchlorid
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tf	Trifluomethansulfonat/Triflat
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
TFD	<i>transcription factor decoy</i>
TFO	<i>triplex forming oligonucleotide</i> (Triplex bildendes Oligonukleotid)
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TMS	Trimethylsilyl
TNRC	<i>tri-nucleotide repeat-containing protein</i>
tRNA	Transfer-RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

U	Uracil
U _s	Thiouracil
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
<i>vis</i>	<i>visible</i> (sichtbar)
ZFP	Zinkfingerproteine

12.3 Nomenklatur der synthetisierten Verbindungen

In dieser Arbeit werden die synthetisierten Verbindungen mit **1**, **2**, usw. abgekürzt. Die Polyamide, Konjugate und ON werden gesondert mit **PAx**, **Kx** und **ON x** bezeichnet, wobei **x** für eine ganze Zahl steht.

Der Nomenklatur der synthetisierten Verbindungen liegt die IUPAC-Nomenklatur zugrunde.

Für die Polyamide wurde eine verkürzte Nomenklatur verwendet. Dabei werden die Pyrroleinheiten als Py, die Imidazoleinheiten als Im und die ω -Aminosäuren als ω abgekürzt. Des Weiteren werden Alkylketten mit C_n oder Linker abgekürzt, wobei n für die Anzahl der CH_2 -Gruppen steht. Daraus ergibt sich beispielsweise:

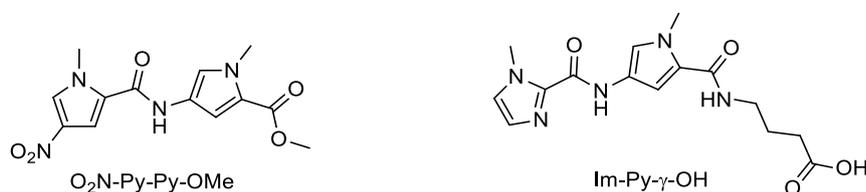


Abbildung 100: Nomenklatur der Polyamide.

Für die Nummerierung der Nucleoside wurden die Nucleobasen mit 1, 2, usw. und die Desoxyribose mit 1', 2', usw. verwendet (Abbildung 101).

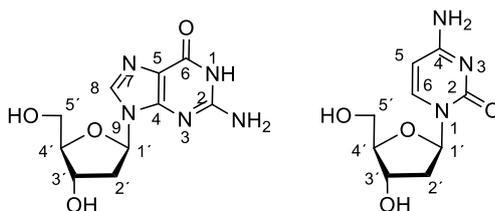


Abbildung 101: Nummerierung der Nucleoside am Beispiel von G und C.

Bei den verwendeten ONs werden die unterschiedlichen Modifikationen farblich unterschieden. Dabei steht:

Schwarz für DNA, Blau für RNA, Violett für 2'-OMe-RNA und Rot für LNA.

12.4 Sequenz von Sp1 und Sp1-H8

Alignment: Sp1 (UniProtKB/Swiss-Prot: P08047.3); SP1-H8

Sp1	Msdqdhsmdemtavvkiekgvgngngnggggafsqarssstgsssstggggqesqpsp	60
Sp1-H8	MSDQDHSMDEMTAVVKIEKGVGNGNGGNGGGAFSQARSSSTGSSSSTGGGGQESQPSP *****	60
Sp1	lallaatcsriespnensnnsqgppsqsqgtgeldltatqlsqgangwqiissss gatpts	120
Sp1-H8	LALLAATCSRIESPNENSNNSQGPPSQSGGTGELDLTATQLSQGANGWQIISSSSGATPTS *****	120
Sp1	keqsgsstngsnsgsessknrtvsggqyvvaapnlqnqqvltgpgvmpniqyqvipqfq	180
Sp1-H8	KEQSGSSSTNGSNGSESSKNRTVSGGQYVVAAPNLQNQQVLTGLPGVMPNIQYQVIPPQFQ *****	180
Sp1	tvdqgqlqfaatgaqvqdgsgqiipganqqiitnrgsggniaampnllqqavplqg	240
Sp1-H8	TVDGQQQLQFAATGAQVQDQSGGQIQIIPGANQQIITNRGSGGNI AAMPNLLQQAVPLQG *****	240
Sp1	lannvlsqgtqyvtnvpvalngnitllpvnsvsaatltppssqavtisssgsqsqsqpvt	300
Sp1-H8	LANNVLSQGTQYVTVNVPVALNGNITLLPVNSVSAATLTPSSQAVTISSSGSQESGSPVPT *****	300
Sp1	sgttissaslvsqasssfftnansystttttsnmgimnfttsqssgtnsqgqtpqrvs	360
Sp1-H8	SGTTISSASLVSSQASSSFFTNANSYSTTTTTSNMGIMNFTTSGSSGTPNSQGTTPQRVS *****	360
SP1	glqgsdalniqqnqtsggslqagqqkegeqnqqtqqqiliqppqlvqggqalqalqaapl	420
SP1-H8	GLQGS DALNIQQNQTS GGS LQAGQQKEGEQNQQTQQQILIQPQLVQGGQALQALQAAPL *****	420
Sp1	sgqftttqaisqetlqnlqlqavpnsqpiiirtptvpgngqvswqtlqnlqvnpqaq	480
Sp1-H8	SGQFTTTQAISQETLQNLQLQAVPNSQPIIIRTPTVPGNGQVSWQTLQNLQVQNPQAQ *****	480
Sp1	titlapmqgvslgqtsstnttltpiasaasipagtvtnaaqlssmpqlqtinlsalghts	540
Sp1-H8	TITLAPMQGVSLGQTSSTNTTLTPIASAASIPAGTVTVNAAQLSSMPQLQTINLSALGTS *****	540
Sp1	giqvhpiqglplaiapanapgdhgaqlglhgaggdgihdtdaggeegenspdaqpqrtr	600
Sp1-H8	GIQVHPIQGLPLAIAPANAPGDHGAQLGLHGAGGDIHDDTAGGEEGENSPDAQPQGRTR *****	600
Sp1	reactcpyckdsegrsgdpgkkqhichiqcgkvygktslhrlahlrwhtgerpfmctw	660
Sp1-H8	REACTCPYCKDSEGRSGDPGKKQHICHIQCGKVYGKTSHLRAHLRWHTGERPFMCTW *****	660
Sp1	sycgkrftrsdelqrhkrthtgekkfacpecpkrfmrsdhlskhikthqnkkggpvals	720
Sp1-H8	SYCGKRFTRSDELQRHKRTHTGEKKFACPECPKRFMRSDHLSKHIKTHQNKKGGPVALS *****	720
Sp1	vgtlpldsgagsegsgtatpsalitnvmameaicpegiarlansginvmqvadlqsini	780
Sp1-H8	VGTLP L DSGAGSESGTATPSALITTNM VAMEAICPEGIARLANSGINVMQVADLQSINI *****	780
Sp1	sgngf-----	785
Sp1-H8	SGNGFGGGGSLEHHHHHHH *****	800

12.5 Erklärungen zu Kooperationen und Copy Right

Wenn nicht anders beschrieben wurden die abgebildeten Ergebnisse in während meiner Doktorarbeit durch mich unter Aufsicht von Prof. Dr. M. W. Göbel erhalten. Die Mitwirkung meiner Kollegen ist explizit in der Arbeit ausgewiesen. Das aufgelistete Material wurde in Kooperationen erhalten:

Abbildung 85: Laura Thomas, Philipps-Universität Marburg, Die Experimente wurden durch Frau Thomas durchgeführt. Die Adaptoren wurden von mir entworfen.

Abbildung 92: Laura Thomas, Philipps-Universität Marburg, Die Experimente wurden durch Frau Thomas durchgeführt. Die Adaptoren wurden von mir entworfen.

Immer wenn Abbildungen, Tabellen oder Texte identisch mit vorherigen Publikationen sind, werden sie explizit ausgewiesen und wenn notwendig wurde eine Erlaubnis eingeholt.

Die Folgenden Teile der Arbeit sind bereits publiziert.

Abbildungen: 4, 10, 15, 16, 20, 21, 22, 64, 74, 81, 82.

12.6 Wissenschaftliche Beiträge

12.6.1 Publikationen

M. Bolz, L. Thomas, U. Scheffer, E. Kalden, R. K. Hartmann, M. W. Göbel, *Chem. Biodivers.* **2020**, *17*, e2000272.

“Redirection of miRNA-Argonaute Complexes to Specific Target Sites by Synthetic Adaptor Molecules”

12.6.2 Vorträge

IV. Doktorandenseminar Nucleinsäurechemie, 20. - 21. September **2018**, Bad Herrenalb

“Adaptor molecules for the redirection of RISC-complexes and transcription factors to non-natural binding sites”

12.6.3 Poster

Summer School – Nucleic acid chemistry and synthetic biology, 28. Juli – 02. August **2019**, Würzburg

Mathias Bolz, Ute Scheffer, Michael Göbel: *“Adaptor molecules for the redirection of transcription factors to non-natural binding sites”*

12.7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Adaptormoleküle zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren oder miRNAs an nicht native Bindestellen“ selbstständig und ohne anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderen fremden Mitteilungen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Dies gilt auch für verwendete Abbildungen. Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.

Flörsheim, den _____

Datum, (Mathias Bolz)