



# Photoaktivierbare siRNAs und *molecular beacons*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Vera Lucie Mikat**  
aus Engelskirchen

Frankfurt am Main, 2010  
(D30)



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

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Erster Gutachter: Prof. Dr. A. Heckel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. J. W. Engels

Datum der Disputation:



„ICH BIN IMMER NOCH VERWIRRT, ABER AUF EINEM HÖHEREN NIVEAU.“

- ENRICO FERMI -



---

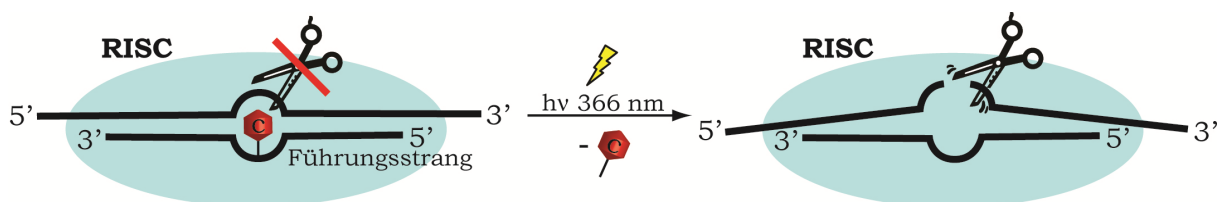
## Zusammenfassung

Die Verfügbarkeit synthetischer Oligonukleotide hat der Entwicklung einer Vielzahl molekularbiologischer, biochemischer und medizinischer Anwendungen den Weg geebnet. Und sind viele diese Anwendungen für sich genommen schon hochinteressant, so eröffnet die Kombination mehrerer Methoden oft noch ganz neue Möglichkeiten.

In der vorliegenden Doktorarbeit ist es gelungen, die Technik der photolabilen Schützung auf die Anwendungen von siRNAs und *molecular beacons* zu übertragen und diesen damit die Option der orts- und zeitaufgelösten Aktivierung zu ermöglichen.

Durch die Einführung eines Nukleotids mit 2-(2-nitrophenyl)propyl-geschützter Nucleobase in eine siRNA, konnte der katalytische Schritt der RNA-Interferenz, die mRNA-Spaltung, unterbunden werden. Hierzu wurde das photolabil modifizierte Nukleotid so in der siRNA positioniert, dass es gegenüber der mRNA-Schnittstelle bzw. in unmittelbarer Nachbarschaft zu dieser lag. Dabei war das modifizierte Nukleotid selbst kein Ribonucleotid sondern ein Desoxynucleotid. Zuvor konnte gezeigt werden, dass die Einführung einzelner Desoxynucleotide in eine siRNA keinerlei Einfluss auf deren Aktivität hat.

Als Modellsystem diente der RFP/eGFP-Reporterassay, wobei die Plasmide mit der siRNA in die verwendeten HeLa-Zellen kotransfiziert wurden. Die verwendete siRNA regulierte dabei die eGFP-mRNA, die gemessene Fluoreszenz wurde auf die RFP-Fluoreszenz normiert. In der Studie gelang es, ein sauberes „An/Aus-Verhalten“ zu erzielen, das heißt, die modifizierte siRNA zeigte zunächst keinerlei Einfluss auf die eGFP-mRNA. Bestrahlte man diese siRNA jedoch für drei Minuten bei 366 nm, erzielte man eine Unterdrückung der eGFP-Expression, die der einer unmodifizierten siRNA entsprach. Dies funktionierte für vor der Transfektion bestrahlte siRNAs ebenso, wie für solche, die erst nach der Transfektion in der Zelle entschützt wurden.



**Vereinfachte Darstellung der lichtaktivierbaren RNA Interferenz. Links: solange die Photoschutzgruppe (rot) auf dem Führungsstrang sitzt wird das Substrat des RISC nicht geschnitten. Rechts: Bestrahlung mit UV-Licht entfernt die Photoschutzgruppe und aktiviert die RNAi-Maschinerie.**

Ein bis jetzt ungeklärtes und noch näher zu untersuchendes Phänomen ist die Stabilität der Modifikationen in der Zelle. Aus bisher nicht eindeutig zu benennender Ursache fand nach

---

einer definierten Zeit eine Aktivierung der ausgeschalteten siRNA statt, ohne dass diese bestrahlt wurde.

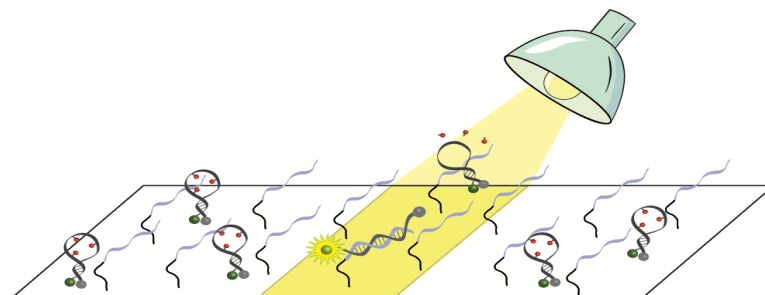
Versuche mit photolabil modifizierten Nukleotiden an anderen Positionen innerhalb der siRNA, sowie eine Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie-Studie mit fluoreszenzmarkierter siRNA und fluoreszenzmarkiertem RISC erlaubten es Rückschlüsse auf den Schritt der RNAi zu ziehen, der durch die Einführung der Basenmodifikation blockiert wird. Offenbar handelt es sich tatsächlich um den katalytischen Schritt der mRNA-Spaltung, ein Einbau der modifizierten siRNA in den RISC findet statt.

Zudem zeigte die erfolgreiche Inaktivierung der für die FCS-Studie genutzten anti-TK siRNA, dass der Ansatz, die Modifikation im Bereich der Schnittstelle einzubauen, von der anti-eGFP siRNA auf andere siRNAs übertragbar ist.

Im zweiten erfolgreichen Projekt gelang es, *molecular beacons* durch Einführung zahlreicher photolabiler Basenmodifikationen lichtaktivierbar zu machen. Hierzu wurde ein bereits beschriebener GAPDH-*molecular beacon* verwendet. Modifiziert man die Schleife dieses *molecular beacon* mit sieben photolabilen Basenschutzgruppen (NPP und NPE) so gelingt es die Bindung desselben an seine komplementäre Ziel-RNA komplett zu unterbinden, während ein GAPDH-beacon mit drei oder fünf Modifikationen noch in verringertem Maße bindungsfähig ist. Dieses Verhalten wurde sowohl mittels einfachen Auslesens der Fluoreszenzintensität, als auch anhand eines PA-Geles belegt.

Eine große Herausforderung bei diesem Projekt stellte die Aufreinigung des hochmodifizierten *molecular beacon* dar, der neben Fluorophor und Quencher auch zahlreiche Photoschutzgruppen trägt. Diese gelang schließlich durch den Einsatz einer *extra densely bond*-RP-HPLC-Säule und wiederholter HPL-Chromatographie.

Ebenfalls konnte der große Vorteil eines lichtaktivierbaren *molecular beacon*, die Möglichkeit der präzisen Ortsauflösung der Aktivierung, dargestellt werden. Hierzu wurde modellhaft die Ziel-RNA auf einer Objektträgeroberfläche immobilisiert. Die dann aufgetragene *molecular beacon*-Lösung zeigte zunächst keine Fluoreszenz. Diese trat erst nach Bestrahlung und auch nur begrenzt auf den wenige Quadratmikrometer großen Bestrahlungsbereich auf.



**Schematische Darstellung der ortsauflösten Lichtaktivierung eines *molecular beacon*. Im bestrahlten Bereich wird der MB von seinen Photoschutzgruppen (rot) befreit und kann an die immobilisierte Ziel-RNA (hellblau) binden.**



---

## Abstract

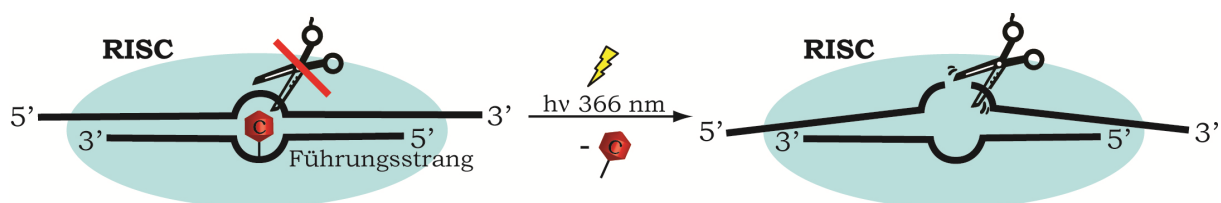
The availability of synthetic oligonucleotides paved the way for the development of a multitude of molecular biological, biochemical and medical applications. And as many of these applications might already be exciting separately, combining some of these methods establishes even further prospects.

Within the PhD thesis at hand the technique of photolabile protection could successfully be transferred to the applications of siRNAs and molecular beacons. Therewith these methods additionally gained the feature of spatiotemporal control.

By introducing a nucleotide bearing a 2-(2-nitrophenyl)propyl-protected nucleobase into an siRNA, the catalytic step of RNA-interference – the mRNA cleavage - could be prevented. To achieve this the photolabilely modified nucleotide was placed within the siRNA opponent to the mRNA cleavage site or adjacent to this position. The modified nucleotide itself was no ribonucleotide but a deoxynucleotide. Before, it could be shown that introducing single deoxynucleotides into an siRNA had no effect on siRNA activity.

The RFP/eGFP-reportergene-assay was chosen as a model system. Both plasmides were cotransfected with the siRNA. The siRNA which was used targeted eGFP-mRNA, the fluorescence detected was normalized to RFP-fluorescence.

In the present study a clean „on/off-behaviour“ was obtained. Initially, the modified siRNA did not show any influence on the eGFP-mRNA. However, irradiation of the siRNA with UV-light (366 nm) lead to a suppression of eGFP-expression which was equal to the extent of suppression triggered by a non-modified siRNA. Re-activation worked for siRNAs which were exposed to UV-light prior to transfection as well as for siRNAs irradiated post transfection inside living cells.



**Schematic of light-activatable RNA-interference. Left: as long as the protection group (red) is located on the guide-strand the mRNA-substrate of RISC is not cleaved. Right: Irradiation with UV-light removes the photolabile protecting group and RNA-interference is activated.**

A phenomenon yet to be investigated is stability of the modification within the cytoplasm. After a certain time, a small amount of inactivated siRNAs were re-activated without irradiation and till recently no reasonable explanation could be conceived.

---

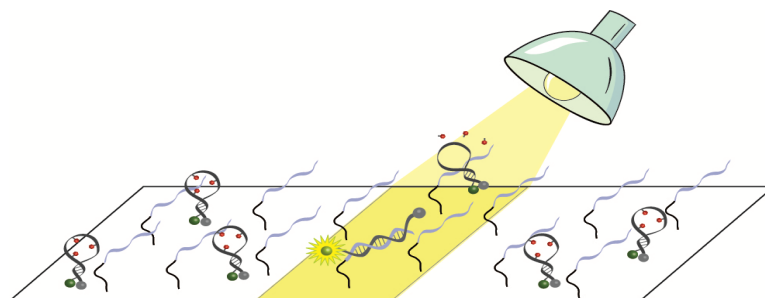
Additionally experiments with modifications at different positions within the siRNA as well as a fluorescence-cross-correlation-spectroscopy-study using a labelled anti-TK siRNA and a labelled RISC were performed. This allowed for drawing conclusions concerning the very step of RNAi, which is blocked by introduction of the photolabile protecting group. Apparently blockage really is a matter of the catalytic step of mRNA-cleavage as the modified siRNA is still introduced into RISC.

Furthermore the successful inactivation of the anti-TK siRNA clearly showed, that the approach of introducing the modification in close proximity of the cleavage-site can be transferred from the anti-eGFP siRNA to other siRNAs.

During the second successful project molecular beacons could be altered light-activatable by introducing several photolabile nucleobase-modifications. For this study an already published GAPDH-molecular beacon was used. By modifying the loop region of this molecular beacon with seven photolabile protecting groups (NPE and/or NPP) hybridization of the beacon to its complementary target-RNA was completely abolished whereas the same molecular beacon bearing only three or five such modifications showed a residual target-binding capacity. The characteristics of light-activatable molecular beacons were followed both via fluorescence read-out and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

A major challenge of this project was constituted by the purification of this highly modified system. The light-activatable molecular beacon not only carries a fluorophor and a quencher but additionally several photolabile protection groups. In the end sufficient purification could be achieved by using an *xtra densely bond*-RP-HPLC-column and performing several rounds of HPL-chromatography.

Moreover the major advantage of a light-activatable molecular beacon could be demonstrated: the capability of precise spatio-temporal addressing. As a model system, target-RNA was immobilised to the surface of a glass-slide. Adding molecular-beacon solution did not result in any fluorescence. Only after irradiation fluorescence could be detected and still the area lighting up was restricted to the very region, which was exposed to UV-light.



**Schematic of light-activation of a molecular beacon with spatial resolution. Within the irradiated area the MB gets liberated of the photolabile modification (red) and is now able to hybridise to the immobilised target-RNA (light blue).**

---

# Inhalt

|   |            |
|---|------------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1. <i>Oligonukleotidfestphasensynthese</i>  | 1          |
| 1.1.1. Synthesezyklus   | 1          |
| 1.1.2. Schutzgruppen  | 4          |
| 1.1.3. Modifizierte Oligonukleotide   | 7          |
| 1.2. <i>Modifikation mit photolabilen Schutzgruppen - caging</i>                      | 11         |
| 1.2.1. Photoschutzgruppen für Nukleinsäuren   | 12         |
| 1.2.2. Zwei Photonen Entschützung   | 15         |
| 1.3. <i>RNA-Interferenz</i>   | 17         |
| 1.3.1. Kurze interferierende RNAs   | 18         |
| 1.3.2. Mechanismus  | 19         |
| 1.3.3. Beteiligte Proteine  | 21         |
| 1.3.4. Unspezifische Effekte  | 28         |
| 1.3.5. Design   | 29         |
| 1.3.6. Modifikationen   | 30         |
| 1.3.7. Delivery   | 31         |
| 1.3.8. Anwendung  | 34         |
| 1.4. <i>Molecular beacons</i>   | 37         |
| 1.4.1. Mechanismus  | 38         |
| 1.4.2. Design   | 40         |
| 1.4.3. Modifikationen   | 42         |
| 1.4.4. Delivery   | 45         |
| 1.4.5. Anwendung  | 46         |
| <b>2. Motivation und Zielsetzung</b>  | <b>51</b>  |
| <b>3. Ergebnisse</b>  | <b>55</b>  |
| 3.1. <i>Lichtgesteuerte RNA-Interferenz</i>   | 55         |
| 3.1.1. Vorarbeiten  | 55         |
| 3.1.2. Voruntersuchungen  | 58         |
| 3.1.3. Photolabil modifizierte siRNAs   | 61         |
| 3.1.4. Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie lichtaktivierbarer siRNAs in Zellen | 77         |
| 3.2. <i>Lichtaktivierbare molecular beacons</i>                                       | 85         |
| 3.2.1. Vorarbeiten  | 85         |
| 3.2.2. Vorarbeiten – die Wahl des geeigneten <i>molecular beacon</i>                  | 88         |
| 3.2.3. Photolabil geschützte $\square$ -Aktin- <i>molecular beacons</i>               | 91         |
| 3.2.4. Der GAPDH- <i>molecular beacon</i>   | 97         |
| 3.2.5. Zusammenfassung und Ausblick   | 114        |
| <b>4. Experimenteller Teil</b>  | <b>117</b> |
| 4.1. <i>Chemische Synthese</i>  | 117        |

---

|   |            |
|---|------------|
| 4.1.1. Phosphoramiditsynthese   | 117        |
| 4.2. <i>Allgemeine Methoden</i>   | 121        |
| 4.2.1. Oligonukleotid-Festphasensynthese  | 122        |
| 4.2.2. Entschützung und Abspaltung von Oligonukleotiden nach der Festphasensynthese | 123        |
| 4.2.3. HPLC   | 125        |
| 4.2.4. Entsalzen  | 128        |
| 4.2.5. Belichtungsexperimente   | 129        |
| 4.2.6. Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden                                | 130        |
| 4.2.7. Fluoreszenzmarkierung  | 131        |
| 4.2.8. Schmelzpunktbestimmung   | 131        |
| 4.2.9. CD-Spektroskopie   | 132        |
| 4.3. <i>Molekularbiologische Methoden</i>   | 133        |
| 4.3.1. <i>Molecular beacon</i> Assays   | 133        |
| 4.3.2. Gelelektrophorese  | 135        |
| 4.3.3. Eukaryontische Zellkultur  | 136        |
| <b>5. Anhang</b>  | <b>139</b> |
| 5.1. <i>Oligonukleotidsequenzen</i>   | 139        |
| 5.1.1. siRNA Sequenzen  | 139        |
| 5.1.2. <i>Molecular beacon</i> -Sequenzen   | 140        |
| 5.2. <i>Spektren</i>  | 143        |
| 5.2.1. HPLC-Chromatogramme  | 143        |
| 5.2.2. MS-Spektren (ESI)  | 147        |
| 5.3. <i>Vektorkarten</i>  | 150        |
| 5.3.1. pEGFP-N1   | 150        |
| 5.3.2. p-CMV-DsRed-Express  | 150        |
| 5.3.3. pRL-TK   | 151        |
| 5.4. <i>Abkürzungsverzeichnis</i>   | 152        |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b>  | <b>155</b> |
| <b>7. Danksagung</b>  | <b>161</b> |
| <b>8. Lebenslauf</b>  | <b>163</b> |

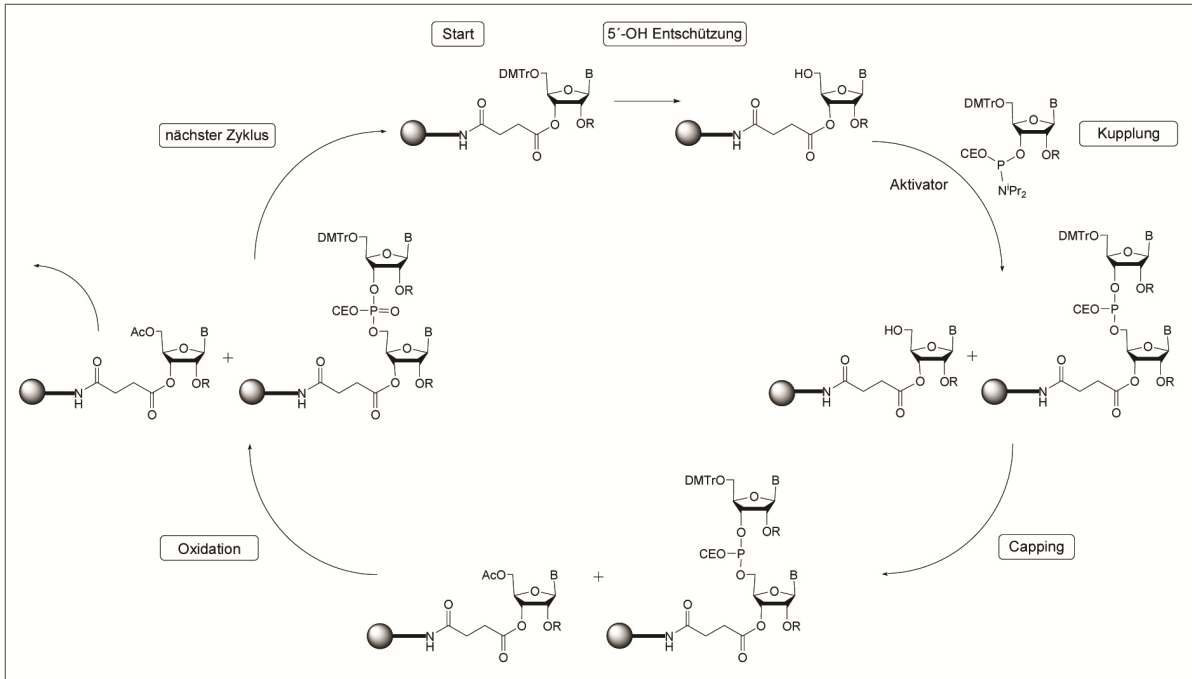
# 1. Einleitung

## 1.1. Oligonukleotidfestphasensynthese

Seit den ersten erfolgreichen Versuchen in den späten 60er Jahren von Letsinger et al., synthetische DNA mit Hilfe der Festphasensynthese herzustellen,<sup>[1]</sup> wurde das Verfahren stetig verbessert. Zu Beginn der 80er Jahre wurde die Festphasensynthese von Oligodesoxyribonukleotiden nach der Phosphoramiditmethode durch Caruthers und Beaucage<sup>[2]</sup> etabliert, die heute neben der H-Phosphonat Methode die wichtigste Möglichkeit zur Festphasensynthese von Oligonukleotiden darstellt. Analog zur DNA-Synthese ist auch die RNA-Synthese inzwischen als automatisierte Festphasensynthese möglich. Auch hier ist die sogenannte 3'-O-Phosphoramiditmethode, bei der in 3'→5'-Richtung an trivalente Phosphite gekuppelt wird, die Methode der Wahl. So ist es heutzutage möglich, annähernd einhundert Nukleotide lange DNA- und RNA-Stränge einer beliebigen Sequenz zu synthetisieren. Erst die Verfügbarkeit dieser synthetischen Oligonukleotide schuf die Basis für zahlreiche Anwendungen als molekularbiologische Werkzeuge und die Verwendung für therapeutische Zwecke, die die Medizin, aber vor allem die Wissenschaft in den letzten Jahren weit vorangebracht haben.

### 1.1.1. Synthesezyklus

Die automatisierte Festphasensynthese von Oligonukleotiden, in Abb. 1 schematisch dargestellt, besteht im Wesentlichen aus vier Syntheseschritten. Ausgangspunkt ist ein über einen Linker an eine feste Phase, meist *controlled-pore glass* (CPG) oder Polystyrol, gebundenes, vollständig geschütztes Mononukleotid. Dieses wird im ersten Schritt chemoselektiv an der 5'-OH Position entschützt (Detritylierung). Dann wird das folgende Amidit der gewünschten Sequenz in Anwesenheit eines Aktivators an diese 5'-OH Position der wachsenden Kette gekuppelt. Hierauf folgt ein sogenannter *capping*-Schritt, in dem alle nicht abreagierten Nukleotide an der 5'-OH Position irreversibel geschützt werden, um eine Verlängerung dieser entstandenen unerwünschten Sequenz zu verhindern. Nach dem *capping*-Schritt erfolgt die Oxidation des Phosphittriesters zum Phosphotriester, womit der Zyklus endet. Es schließen sich weitere Zyklen an, bis man das Oligonukleotid der gewünschten Länge und Sequenz erhalten hat.



**Abb. 1 Zyklus der automatisierten Festphasensynthese von Oligoribonucleotiden**

**a) Entschützung: Trichloressigsäure/Dichlormethan,**

**b) Kupplung: 5-Ethylthiotetrazol/CH<sub>3</sub>CN**

**c) Capping: THF/Lutidin/Ac<sub>2</sub>O/N-Methylimidazol,**

**d) Oxidation: THF/Pyridin/I<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.**

**R = TBDMS/tom; B = Nucleobase**

Im Folgenden werden die vier Syntheseschritte genauer beschrieben.

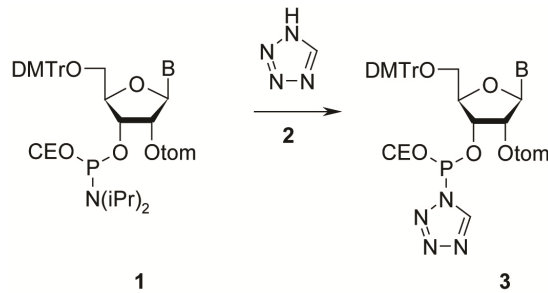
#### DETRITYLIERUNG

Die 5'-Hydroxygruppe ist ein ausgezeichnetes Nucleophil. Dies macht man sich in der Festphasensynthese von Oligonucleotiden zu Nutze, indem man die wachsende Kette entgegen der natürlichen Syntheserichtung in 3'→5'-Richtung verlängert, sodass die 5'-Hydroxygruppe nucleophil angreifen kann. Hierzu wird im ersten Schritt eines jeden Zyklus' die 5'-O-4,4'-Dimethoxytritylgruppe sauer abgespalten, üblicherweise mit 3% iger Trichloressigsäure (TCA) in Dichlormethan. Alternativ kann man auch Dichloressigsäure (DCA) verwenden. Diese hat einen höheren pK<sub>a</sub> als TCA, was einerseits längere Detritylierungszeiten erfordert, andererseits aber die Gefahr der Depurinierung minimiert. Dies ist insbesondere bei Synthesen sehr langer Oligonucleotide, bei denen hohe Einzelkupplungsausbeuten essentiell sind, von Vorteil.

Das abgespaltene Tritylkation hat eine intensive orange Färbung. Diese kann man nutzen, um manuell photometrisch zu bestimmen, mit welcher Ausbeute der, der Entschützung unmittelbar vorangegangene Zyklus abgeschlossen wurde. Die automatische Ausbeutenbestimmung läuft allerdings über eine Leitfähigkeitsmessung.

KUPPLUNG

Um aus den verhältnismäßig reaktionsträgen Nucleosidamiditen **1** reaktive Intermediate **3** zu generieren, wird für die Kupplungsreaktion ein Katalysator benötigt. Als solcher, Aktivator genannter Katalysator, dienen schwache Säuren. Vor allem Tetrazolderivate haben sich bewährt. Die Aktivierung eines Nucleotids mit 1*H*-Tetrazol (**2**) ist in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2 Aktivierung eines Nucleotids durch 1*H*-Tetrazol.**

Dabei agiert das Tetrazol gleichzeitig als Säure, die die Diisopropylaminogruppe des Phosphoramidits protoniert, und als Nucleophil, welches im zweiten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt diese funktionelle Gruppe ersetzt, sodass das Phosphorotetrazolid-Intermediat **3** entsteht. Beide Schritte sind reversibel. Noch bessere Aktivatoren, als 1*H*-Tetrazol sind 5-(Ethylthio)-1*H*-tetrazol, und 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol, die einen etwas geringeren p*K*<sub>a</sub>-Wert aufweisen. Diese kommen vor allem in der RNA-Synthese häufig zum Einsatz. Es ist jedoch zu bedenken, dass die schwachen Aktivatorsäuren in geringem Maße auch in der Lage sind, die 5'-DMTr-Gruppe abzuspalten. Die Folge ist eine Bildung von Dimeren des aktivierten Phosphoramidits, welche wiederum zu n+1-Verunreinigungen des Vollständigproduktes führen. Dies geschieht umso mehr, je geringer der p*K*<sub>a</sub>-Wert (und je länger die Kupplungszeit) des Aktivators ist. Eine Alternative stellen daher Aktivatoren dar, die weniger sauer dafür aber nucleophiler sind wie z.B. 4,5-Dicyanoimidazol (DCI).

CAPPING

Der *capping*-Schritt ist nicht direkt für die Kettenverlängerung notwendig. Dennoch ist er unerlässlich, um entschützte, aber nicht abreagierte 5'-Hydroxyfunktionen durch Veresterung mit Acetanhydrid zu schützen. So wird vermieden, dass Fehlsequenzen weiter verlängert werden und ermöglicht, dass nach der Abspaltung von der festen Phase eine leichte Abtrennung dieser anhand der unterschiedlichen Hydrophobizität erfolgen kann.

Weitere unerwünschte Nebenprodukte, die während der Kettenverlängerung auftreten können, sind über die O<sup>6</sup>-Position von Guanosin verlängerte Oligonucleotide. Ihre Konzentration wird ebenfalls durch das *capping*-Reagenz gering gehalten, da die hierin enthaltenen Acetationen das an O<sup>6</sup> fehlgekuppelte Nucleotid wieder abspalten.

Eine häufig verwendete *capping*-Lösung nach Farrance *et al.* besteht aus einer Mischung aus Acetanhydrid, *N*-Methylimidazol und 2,6-Lutidin in THF.<sup>[3]</sup> Eine Alternative zum *N*-Methylimidazol ist die Verwendung von 6,5 %iger DMAP-Lösung, welche die *capping*-Effizienz erhöht.

Eine hohe Ausbeute des *capping*-Schrittes ist vor allem erstrebenswert, um eine effiziente Aufreinigung zu ermöglichen. Insbesondere das Entfernen von n-1meren wird erschwert, wenn die fehlende Base im Sequenzverlauf nicht gekuppelt und anschließend der *capping*-Schritt nicht funktioniert hat. Diese n-1mere tragen die 5'-Tritylgruppe und unterscheiden sich in der RP-Chromatographie so gut wie nicht vom Volllängenprodukt.

#### OXIDATION

Eine Oxidation der gerade geknüpften Phosphitriesterbindung ist nach jedem einzelnen Kettenverlängerungsschritt erforderlich und kann nicht am Ende der vollständigen Oligonukleotidsynthese erfolgen, da die Phosphitriesterbindung unter den Bedingungen der 5'-O-Detrylierung nicht stabil ist. Als Oxidationsreagenz wird üblicherweise eine verdünnte wässrige Lösung von Iod und Pyridin oder 2,6-Lutidin in THF verwendet.

Der Oxidationsschritt bietet in gewissem Rahmen die Möglichkeit, das Phosphatrückgrat bereits während der Synthese zu derivatisieren. Im Abschnitt 1.1.3 wird hierauf näher eingegangen.

#### ABSPALTUNG VON DER FESTEN PHASE UND ENTSCHÜTZUNG

Im Anschluss an den Syntheseyklus wird das erhaltene Oligonukleotid von der festen Phase abgespalten und entschützt. Die Abspaltung erfolgt üblicherweise mit Ammoniak, Methylamin oder einer Mischung aus beidem (AMA) in wässriger, alkoholischer Lösung. Dabei werden die basenlabilen Schutzgruppen des Phosphatrückgrates und der Nukleobasen gleichzeitig abgespalten. Handelt es sich bei dem synthetisierten Oligonukleotid um RNA wird im Anschluss an die alkalische Abspaltung noch die empfindliche 2'-Hydroxyfunktion entschützt. Sie ist meist mit einer fluoridlabilen Schutzgruppe versehen, die mit TBAF in THF abgespalten wird.

Die DMTr-Schutzgruppe wird entweder erst nach einer chromatographischen Aufreinigung abgespalten, da sie hierbei nützlich sein kann (s. Abschnitt 4.2.3) oder bereits am Synthesizer in einem letzten Schritt entschützt.

### 1.1.2. Schutzgruppen

Bei der 3'-O-Phosphoramiditmethode wird ein an eine feste Phase gebundenes (Oligo-) Nukleotid über seine 5'-Hydroxyfunktion mit dem Phosphitriester des gewünschten amiditierten Folgenukleotids gekuppelt. Dies setzt voraus, dass einige andere funktionelle Gruppen sowohl der bereits vorliegenden Oligonukleotide, als auch der Nukleotid-



Phosphoramidite durch Schutzgruppen blockiert sind, um die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte zu vermeiden.

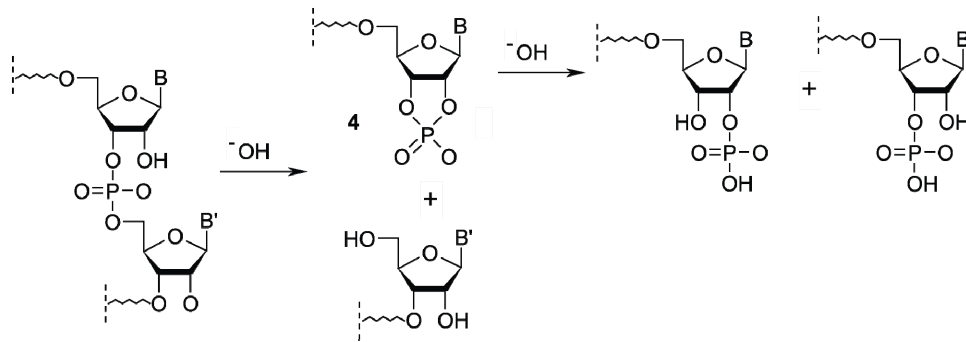
#### *5'-OH SCHUTZGRUPPEN*

Die 5'-Hydroxyfunktion ist die reaktivste der drei Hydroxyfunktionen eines Nucleosids im Bezug auf nukleophile Substitutionen. Sie ist am wenigsten sterisch gehindert und auch am geringsten dem elektronenziehenden Effekt der anderen Funktionen ausgesetzt. Da bei der Kettenverlängerung außerdem die Gefahr der Selbstpolymerisation besteht, ist es unerlässlich, diese Funktion zu schützen. Die Grundvoraussetzung für die 5'-Hydroxyschutzgruppe ist, dass sie orthogonal zu den restlichen Schutzgruppen sein muss, da sie schon während des Synthesesyklus' selektiv abgespalten wird.

Zur Blockierung der 5'-Hydroxyfunktion haben sich die 1978 von Seliger et al. eingeführten säurelabilen Mono- und Dimethoxytritylschutzgruppen durchgesetzt.<sup>[4]</sup> In der automatisierten Festphasensynthese von Oligonucleotiden findet besonders die Dimethoxytritylschutzgruppe Anwendung, denn sie hat einige Vorteile: Neben den Grundvoraussetzungen einer Schutzgruppe, der selektiven Einführbarkeit, sowie der quantitativen Abspaltbarkeit, ist sie ausreichend stabil gegenüber den üblichen Tetrazolaktivatoren. Außerdem lässt sich die intensive Färbung des abgespaltenen Tritylkations nutzen, um die Ausbeute jedes Zyklus' zu bestimmen. Belässt man weiterhin die Schutzgruppe nach dem letzten Zyklus auf der 5'-Hydroxyfunktion des Oligonucleotids, ermöglicht dies eine einfache Abtrennung auf Grund der erhöhten Hydrophobie im Vergleich zu den kürzeren Abbruchsequenzen, deren 5'-Acetylcap während der basischen Aufarbeitung abgespalten wird.

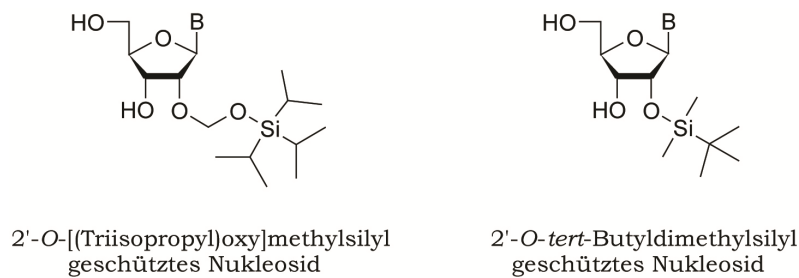
#### *2'-OH SCHUTZGRUPPEN*

Einen Unterschied der Ribonucleotidsynthese zur Desoxyribonucleotidsynthese bedingt die zusätzliche Hydroxyfunktion an der 2'-Position. Bleibt diese ungeschützt, so besteht unter basischen Bedingungen, unter denen auch die Cyanoethylgruppe des Phosphatlinkers abgespalten wird, die Gefahr der Spaltung des Oligoribonucleotids. Abb. 3 zeigt den Mechanismus der alkalischen Ribonucleotidspaltung, die über ein zyklisches Intermediat **(4)** verläuft. Bei Anwendung der Phosphoramiditmethode mit einer Dimethoxytrityl geschützten 5'-Hydroxyfunktion darf die Schutzgruppe der 2'-Hydroxyfunktion somit weder basisch, noch sauer abzuspalten sein.



**Abb. 3 Spaltung der Interribonucleotidverknüpfung unter basischen Bedingungen.**

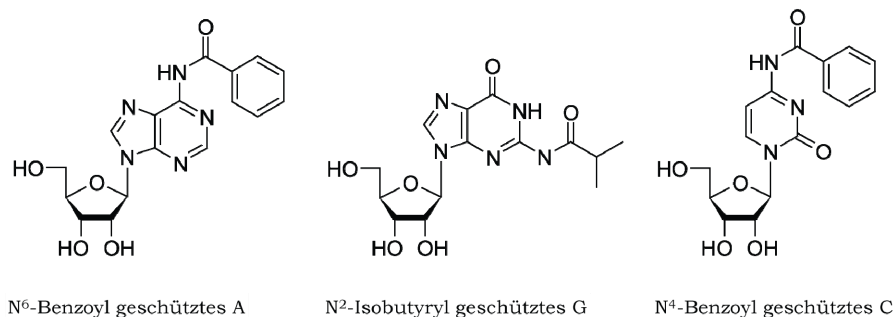
Etabliert haben sich hier neben photolabilen und Acetalschutzgruppen hauptsächlich fluoridlabile Schutzgruppen, wie die *tert*-Butyldimethylsilylgruppe (TBDMS), die zuerst 1974 von Ogilvie et al. als Schutzgruppe für Ribonucleoside verwendet wurde und die [(Triisopropylsilyl)-oxy]methylschutzgruppe (tom), die von Pitsch et al. eingeführt wurde.<sup>[5],[6]</sup> Während die TBDMS-Schutzgruppe die günstigere Variante darstellt, liegen die Vorteile der weniger sperrigen tom-Schutzgruppe in der durch kürzere Zeit und höhere Ausbeuten effizienteren Kupplung (99 % in 2,5 min.).



**Abb. 4 Fluoridlabile 2'-OH-Schutzgruppen.**

SCHUTZGRUPPEN DER NUKLEOBASEN

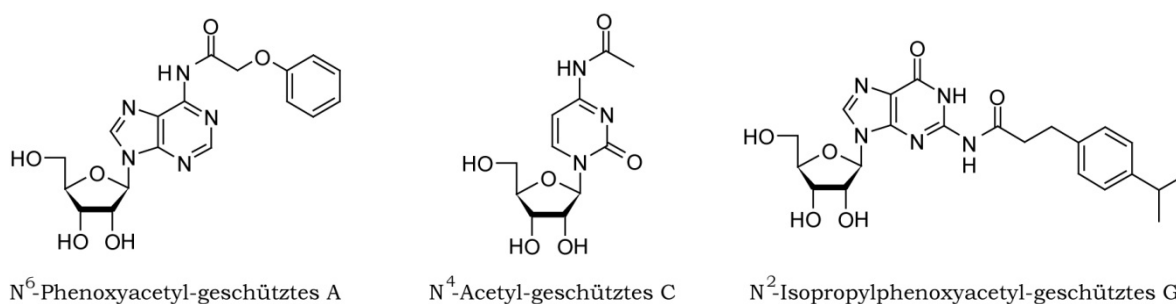
Auch die exozyklischen Aminofunktionen der Nucleobasen Adenin, Cytosin und Guanin können während der Kupplungszyklen zahlreiche Nebenreaktionen eingehen. Kommerziell erhältliche Nucleotidphosphoramidit sind üblicherweise durch Acylierung geschützt.



**Abb. 5 Schutzgruppen der exozyklischen Aminofunktionen.**

Häufig sind Adenin und Cytosin benzyliert, während Guanin mit einer Isobutyrylschutzgruppe versehen ist.

Die Abspaltung dieser Schutzgruppen erfordert jedoch relativ harsche Bedingungen (5 h, 55 °C, konz. Ammoniak), was mit vielen Nukleotidmodifikationen und einigen 2'-OH Schutzgruppen nicht vereinbar ist. Als Lösung für diese Problematik gibt es einige labilere Schutzgruppen, wie z.B. DMF. Das Optimum an leicht abspaltbaren Schutzgruppen stellen die sogenannten UltraMild geschützten Nucleobasen von *Glenresearch* dar, die in Abb. 6 dargestellt sind. Diese lassen sich in wenigen Stunden bei Raumtemperatur mit Kaliumcarbonat in Methanol entschützen.

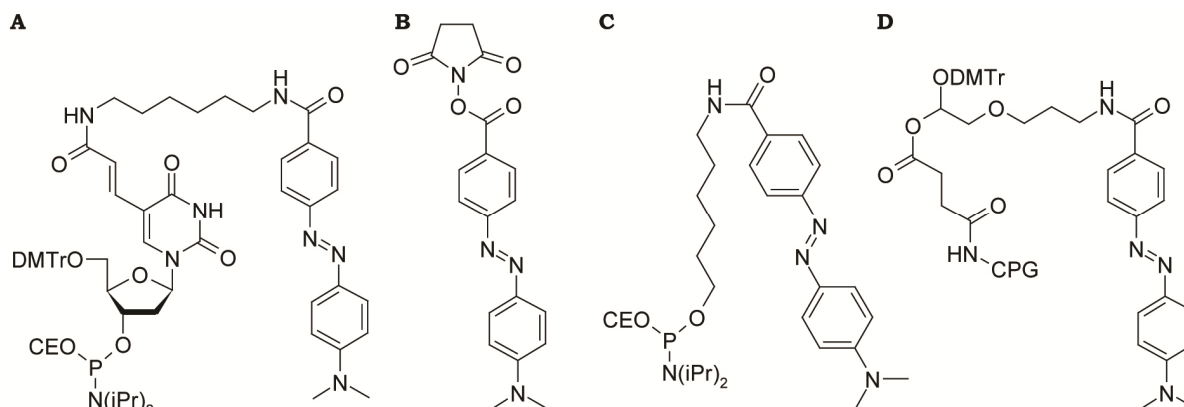


**Abb. 6 Ultramilde Schutzgruppen der exocyclischen Aminofunktionen.**

### 1.1.3. Modifizierte Oligonukleotide

Die gute synthetische Zugänglichkeit durch die automatisierte Festphasensynthese sowie das zunehmende Verständnis der zahlreichen Funktionen, die Oligonukleotide in einer Zelle ausüben, haben immer mehr Anwendungen entstehen lassen, in denen man sich diese Funktionen zu Nutze macht. Die Verwendung von Oligonukleotiden als Therapeutika aber auch als Werkzeuge zur Untersuchung und Manipulation zellulärer Vorgänge ist jedoch meist mit verschiedenen Problemen oder Anforderungen verbunden, die es notwendig machen, die benötigten Oligonukleotide zu modifizieren. Sei es, um die Nukleasestabilität zu erhöhen, die Konformation (RNA/DNA) zu verändern, den Schmelzpunkt anzupassen, die Aufnahme in Zellen zu erleichtern oder durch Kupplung an Fluorophore die Verwendung als Sonde zu ermöglichen. Veränderungen können dabei an sämtlichen Funktionen vorgenommen werden: an der Nucleobase, an der Zuckerstruktur, am Phosphatrückgrat oder an der 2'-Position. Dabei gibt es Derivatisierungen, die mit der Phosphoramiditchemie kompatibel sind und solche, die eine gänzlich andere Chemie erfordern, wie z.B. der Austausch der Zuckerphosphatstruktur gegen ein Peptid- oder Morpholinorückgrat. Letztere Modifikationen kamen in der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz und sollen daher hier nicht näher beschrieben werden.

Grundsätzlich gibt es verschiedene Wege, Modifikationen in ein Oligonukleotid einzuführen: Direkt über ein bereits modifiziertes Phosphoramidit, über die Einführung einer Kupplungsstelle für eine postsynthetische Modifikation oder über eine abgewandelte Festphase. Dabei entscheidet meist die gewünschte Position im Oligonukleotid darüber, auf welche Weise eine Modifikation eingefügt wird, sodass diese als verschiedene Vorläufermoleküle erhältlich sind.



**Abb. 7** Verschieden funktionalisiertes DABCYL zur Einführung in Oligonukleotide.

**A:** als dT-Basenmodifikation zur internen Einführung.

**B:** als NHS-Ester zur postsynthetischen Kupplung an Amine.

**C:** als Phosphoramidit zur 5'-Modifizierung.

**D:** als modifizierte Festphase zur 3'-terminalen Einführung.

Ein Spezialfall ist die Verwendung eines veränderten Phosphatrückgrates. Während einfache Derivatisierungen, wie z.B. zum Phosphorothioat mit der Verwendung eines besonderen Oxidationsreagenzes in die gängige Phosphoramidit-DNA-Synthese integriert werden können, müssen für aufwändigere Modifikationen wie Methylphosphonate ganz andere Kupplungszyklen verwendet werden. Geht man ganz vom Zuckerphosphatrückgrat weg beispielsweise zur PNA (Petidnukleinsäure) oder Morpholinostruktur, so ist eine gänzlich andere Chemie gefragt.

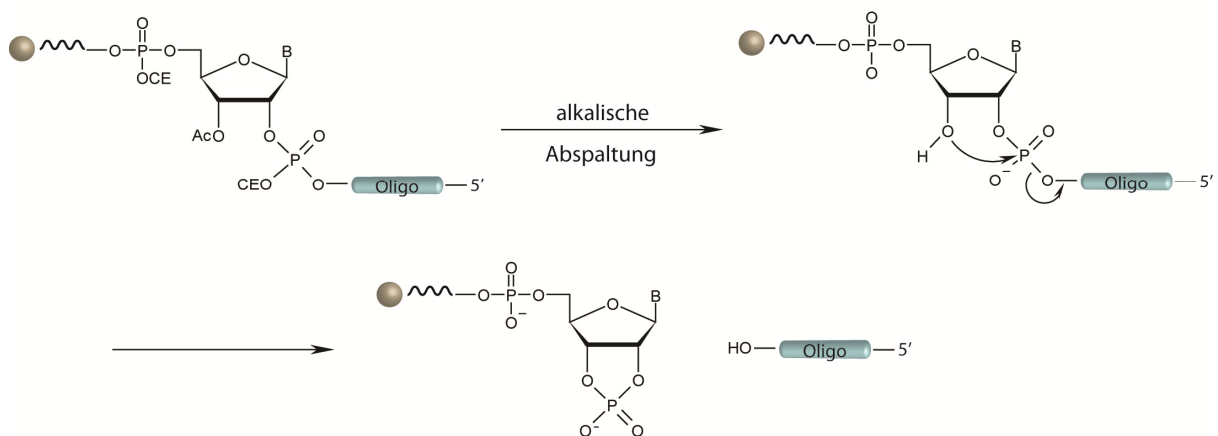
#### MODIFIZIERTE PHOSPHORAMIDITE

Sofern die gewünschten Modifikationen unter den Bedingungen der Festphasensynthese stabil sind, ist es möglich, diese entweder über basenmodifizierte Nukleosidphosphoramidite einzuführen, oder die Struktur selbst als Phosphoramidit zu koppeln. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten photoaktivierbaren Nukleobasen werden beispielsweise als Phosphoramidite eingeführt, während Modifikationen wie Fluorophore und Quencher oft auch direkt als Phosphoramidit zur Verfügung stehen. Für eine interne Modifizierung ist es dabei notwendig, dass nicht nur die Phosphoramiditfunktionalität vorhanden ist, sondern auch eine der 5'-Hydroxygruppe analoge Funktion, um eine Kettenverlängerung zu ermöglichen. Ist es nicht möglich, die Modifikation auf diese Weise zu funktionalisieren,

wird der Umweg über ein basenmodifiziertes Nukleosidphosphoramidit gewählt, wie das in Abb. 7 A dargestellte dT-DabcyI. Das dort ebenfalls abgebildete DabcyIphosphoramidit C weist kein 5'-OH-Analogon auf und ist daher nur zur 5'-terminalen Modifizierung geeignet. Neben speziellen Sonderamiditen werden vor allem Funktionalitäten als Phosphoramidite eingeführt, die dazu geeignet sind, eben jene Modifikationen, die die Festphasensynthese nicht überstehen würden, postsynthetisch anzukuppeln. Hierzu zu zählen vor allen Dingen Amine und Thiole (s. Abschnitt *Postsynthetisches Labeling*).

#### MODIFIZIERTE FESTPHASE

Für den Spezialfall einer 3'-terminal einzuführenden Modifikation kann man, unter Beachtung der selben Einschränkungen, wie für die Verwendung modifizierter Phosphoramidite, eine modifizierte Festphase einsetzen. Üblicherweise ist an die feste Phase einer DNA- oder RNA-Synthesäule bereits eine erste Base gekuppelt. Es sind jedoch auch Festphasen erhältlich, die z.B. mit einem Fluorophor, einem Quencher oder Biotin beladen sind. Der Vorteil der Verwendung dieser Säulen liegt in der erhöhten Ausbeute im Vergleich zu dem Fall, dass man die Modifikation als Sonderamidit einfügt. Allerdings sind diese Säulen verhältnismäßig teuer und außerdem muss man für jede Modifikation eine spezielle Säule bevorraten. Möchte man flexibel bleiben, ist der Einsatz von sogenannten Universalfestphasen anzuraten. Auf diesen Festphasen ist das 3'-terminale Kettenglied noch nicht gekuppelt d.h. von ihnen erhält man bei der basischen Abspaltung ein Oligonukleotid, welches am 3'-Ende das zuerst gekuppelte Phosphoramidit aufweist. Diese Universalfestphasen können je nach Hersteller unterschiedlich aussehen. Die Oligonukleotidsynthese mit Standardfestphasen führt nach der Abspaltung zu einer terminalen 3'-OH Gruppe.



**Abb. 8 Mechanismus der alkalischen Abspaltung eines Oligonukleotids von einer Universalfestphase.**

Da bei der Verwendung von Universalfestphasen das erste Kettenglied aber als Phosphoramidit gekuppelt wird, ist hier die Kette über einen Phosphodiester an die feste Phase bzw. den Linker gekuppelt. Daher muss das 3'-Phosphat unter den Abspaltungsbedingungen entfernt werden. Häufig ist die Universalfestphase daher mit einem invers, also 3'-5'-verknüpften, Ribonukleotid beladen, welches unter alkalischen Bedingungen mitsamt der Phosphatgruppe eliminiert. In Abb. 8 ist der Abspaltungsmechanismus für eine so beladene Festphase dargestellt. Es gibt auch andere Varianten von Universalfestphasen, der Abspaltungsmechanismus ist jedoch immer analog dem gezeigten.

#### *POSTSYNTHETISCHES LABELING*

Ist es nicht möglich, die Modifikation bereits während der Festphasensynthese in das Oligonukleotid einzuführen, kann man sie postsynthetisch ankuppeln. Dafür müssen die entsprechenden Funktionalitäten in Form eines Phosphoramidits als Anknüpfstelle in das Oligonukleotid integriert werden. Standardgruppen sind hier die Aminofunktion für eine Kupplung mit NHS-Estern und Thiole für eine Verknüpfung mit einem Maleimid. Praktisch alle gängigen Fluoreszenzfarbstoffe und Tags wie Biotin sind als NHS-Ester und Maleimide kommerziell erhältlich. Zu beachten ist, dass derart modifizierte Oligonukleotide unter Umständen bei der Abspaltung und Entschützung anders behandelt werden müssen als herkömmliche Oligonukleotide. So ist die für 5'-Aminomodifikationen häufig verwendete MMTr-Schutzgruppe deutlich labiler als die DMTr-Schutzgruppe, sodass bereits das Entfernen der Base nach der alkalischen Entschützung ausreicht, um diese abzuspalten. Dies macht entweder eine veränderte Aufreinigung z.B. per AE-HPLC an Stelle einer RP-HPLC (vgl. Abs. 4.2.3) oder eine besonders vorsichtige Aufarbeitung erforderlich. Die für 5'-Thiolmodifikationen gebräuchliche Tritylschutzgruppe hingegen verlangt gänzlich andere Abspaltungsbedingungen unter Verwendung von Silbernitrat.<sup>[7]</sup> Eine neuere Funktionalität, die zunehmend zur Anwendung kommt ist das Azid, das in einer kupferkatalysierten Reaktion an Alkine addiert. Unter dem Namen „Click-Chemie“ haben auch diese Labels mehr und mehr Einzug in die Kataloge der Oligonukleotidhersteller gehalten.

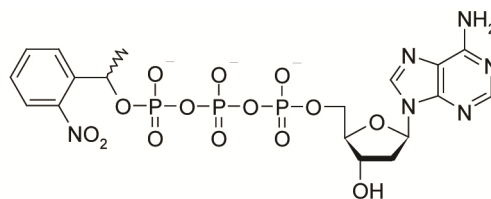
Die Einführung einer funktionellen Gruppe als Kupplungsstelle für spätere Modifikationen ist allerdings weit mehr als ein Umweg, den man wählt, um einen empfindlichen Rest einzuführen. Durch die Wahl eines universellen Platzhalters bewahrt man sich die Möglichkeit, markierte Oligonukleotide modular aufzubauen, anstatt sich vor der Synthese auf ein einzelnes Label festzulegen. So kann man nach der Synthese variieren und aus einer synthetisierten Sequenz mehrere verschieden modifizierte Oligonukleotide erhalten.

## 1.2. Modifikation mit photolabilen Schutzgruppen - *caging*

Biologische Aktivität von Wirkmolekülen vorübergehend auszuschalten, kann für viele Anwendungen, sowohl im Labor als auch für therapeutische Zwecke, interessant sein. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, ist die kovalente Anbindung von einem oder mehreren photolabilen Chromophoren, die die Wechselwirkung mit dem jeweiligen Reaktionspartner blockieren. Durch Einstrahlen von Licht einer definierten Wellenlänge, üblicherweise im nahen UV-Bereich, können die Chromophore wieder abgespalten werden und das Effektmolekül erhält seine volle Funktionsfähigkeit zurück. Es handelt sich also um eine irreversible Aktivierung durch Licht. Im englischen Sprachgebrauch wird diese Technik, speziell im Zusammenhang mit biologisch aktiven Molekülen, als *caging* bezeichnet, wenngleich dieser Terminus leicht irreführend ist, ist doch das Wirkmolekül nicht im eigentlichen Sinne in einem Käfig physikalisch von der Umgebung abgeschirmt und eingeschlossen. Dementsprechend werden die benutzten Chromophore *cages* genannt. Im Deutschen gibt es keine speziell für diesen Zweck belegten Bezeichnungen. Man spricht allgemein von photoaktivierbaren Substanzen bzw. von photolabilen Schutzgruppen oder Photoschutzgruppen.

Aus dieser Bezeichnung wird auch der ursprüngliche Einsatzzweck der photolabilen Modifikationen ersichtlich. Lange Zeit fanden diese hauptsächlich Anwendung in orthogonalen Schutzgruppenstrategien, vor allem für Carboxylgruppen, Alkohole, Amine, Ketone und Phosphate.<sup>[8]</sup>

Die ersten, die Photoschutzgruppen im Sinne des *caging* verwendeten, waren Kaplan et. al. Analog zu Experimenten mit photolabil geschützten anorganischen Phosphaten nutzen sie 1-(2-nitro)phenylethyl (NPE) erfolgreich, um ATP als Substrat für die Na:K-Pumpe in Erythrozytengestern zu inhibieren.<sup>[9]</sup>



**Abb. 9 Photolabil blockiertes ATP nach Kaplan et. al.<sup>[9]</sup>**

### LICHT ALS AUSLÖSER

Die Verwendung von Licht als Triggersignal zur Auslösung biologischer Vorgänge ist ideal. Je nach Wellenlängenbereich kann es Gewebe, mit Ausnahme weniger photosensitiver Zellen, weitgehend wechselwirkungsfrei passieren. Es ermöglicht also auch hier eine orthogonale Ansprache der zu aktivierenden Wirkmoleküle. Ist kurzwelliges UV-Licht dafür bekannt z.B. von Nukleobasen absorbiert zu werden und in diesen Strukturen potentiell

Schaden anzurichten, so ist davon auszugehen, dass im nahen UV-Bereich ab 300 nm aufwärts keine schadhafte Wechselwirkung mit dem umliegenden Gewebe mehr auftritt. Lediglich die Lichtdurchlässigkeit ist hier ein problematischer Faktor, der den Einsatz von Licht als Trigger einschränken kann. Die Eindringtiefe von UV-Licht der für die Abspaltung der häufig eingesetzten *ortho*-Nitrobenzylschutzgruppen benötigten Wellenlänge von ca. 350 nm beträgt nur einen Millimeter. Zur Anwendung in gängigen Modellorganismen, wie Fruchtfliegenembryo, Fadenwurm oder Zebrafisch sowie in Zellkultur eignet sich Licht jedoch hervorragend. Zudem ermöglichen moderne Geräte wie Laser und das Pulsen derselben im Nanosekundenbereich eine extrem hohe räumliche und zeitliche Auflösung sowie Dosiskontrolle, wie sie z.B. mit chemisch adressierbaren Systemen nicht annähernd zu realisieren ist.

### **1.2.1. Photoschutzgruppen für Nukleinsäuren**

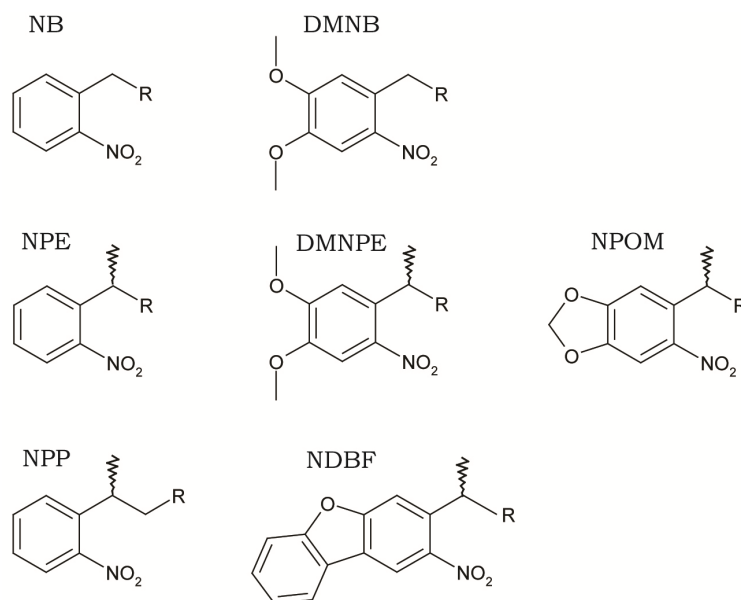
Eine Schutzgruppe, die als *cage*, also zur reversiblen Inhibierung biologischer Effektormoleküle zum Einsatz kommen soll, muss über den Grundanspruch, durch Belichtung schnell und vollständig abspaltbar zu sein, hinaus eine ganze Reihe zusätzlicher Anforderungen erfüllen.

Zum einen muss die Schutzgruppe eine hohe Quantenausbeute aufweisen und gleichzeitig in signifikantem Maße bei solchen Wellenlängen absorbieren, die möglichst nicht mit biologischem Material interferieren. Allgemein geht man davon aus, dass dies für Licht ab einer Wellenlänge von 300 nm aufwärts zutrifft. Vor allem Schutzgruppen, die im nahen UV-Bereich absorbieren, haben sich bisher etabliert. Eine Alternative stellen Zwei-Photonen-Schutzgruppen dar, bei denen Photolyse auch im IR-Bereich möglich ist. Jedoch ist nicht nur das eingestrahelte Licht potentiell toxisch, auch das Abspaltungsprodukt muss diesbezüglich unbedenklich sein. Gerade unter den Nitrobenzylderivaten gibt es einige, die unter Bildung einer Nitrosoverbindung eliminieren, was im Kontext einer Anwendung in Zellen mutmaßlich nicht unproblematisch ist. Zudem spielt in diesem Zusammenhang auch die Löslichkeit und Stabilität eine Rolle. Eine Photoschutzgruppe für die *in vivo* Applikation muss im wässrigen Milieu bei physiologischem pH löslich und stabil sein und auch die Abspaltungsreaktionen, die zum Teil pH-abhängig sind, müssen unter diesen Bedingungen effizient ablaufen. Zum Schluss bleibt die Anforderung einer einfachen und kostengünstigen Synthese und Kupplung an das Effektormolekül, zumindest für den Fall, dass die Schutzgruppe breit zur Anwendung kommen soll.



NITROBENZYLSCHUTZGRUPPEN

Am weitesten verbreitet zur photolabilen Schützung von Nukleinsäuren sind Derivate der 2-Nitrobenzylschutzgruppe, die auch Kaplan und Engels in den *caging*-Experimenten der ersten Stunde verwendeten.<sup>[9]</sup> Das Grundgerüst besteht aus einer Benzylstruktur, die in *ortho*-Position zum Effektor mit einer Nitrogruppe substituiert ist.



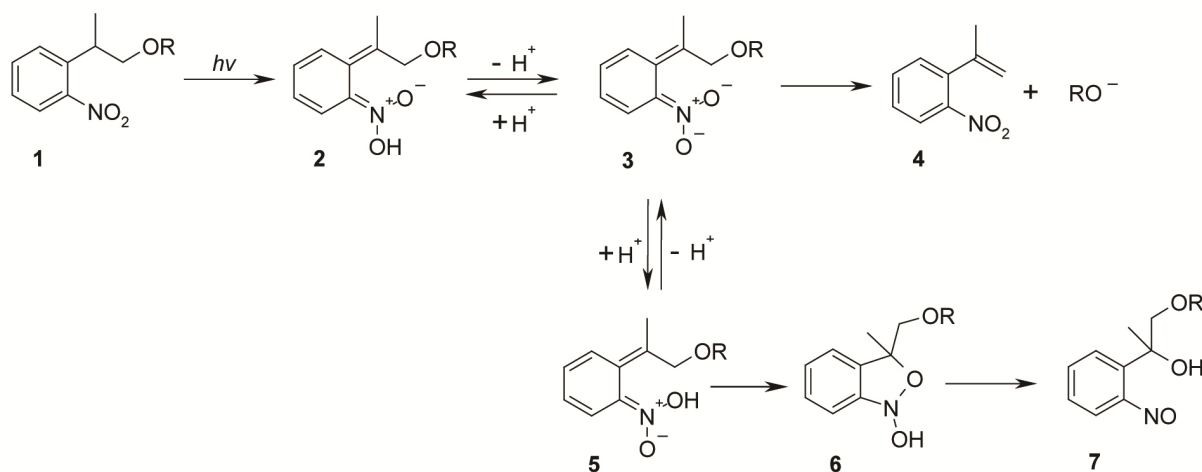
**Abb. 10** Gängige Photoschutzgruppen mit Nitrophenylgrundgerüst.

Abwandlungen bestehen hauptsächlich aus Substitutionsvarianten des Aromaten, um die Absorptionsmaxima zu verändern, bzw. aus alternativen Verknüpfungen zum Effektor, um die Effizienz der Photolyse zu erhöhen. Für Ringsubstitutionen sind vornehmlich elektronendonierende Reste von Interesse, da diese die Absorption in den längerwelligen Bereich verschieben, der potentiell weniger schädigend für Zellbestandteile ist. So absorbieren die Dimethoxyderivate der Nitrobenzyl- und Nitrophenylethyl-Schutzgruppen bei 350 bzw. 355 nm, im Vergleich zu einem Absorptionsmaximum von 320 nm für die Stammderivate. Häufig führt allerdings eine Verbesserung in dieser Hinsicht zu einer weniger effizienten Photolyse.<sup>[10]</sup>

ABSPALTUNGSMECHANISMUS

Der Photolysemechanismus von *ortho*-Nitrobenzylderivaten (**1**) verläuft, unabhängig vom Substitutionsmuster, initial über einen intramolekularen Transfer des benzylichen Protons zur Nitrogruppe. Intermediär entsteht dabei ein Biradikal, welches jedoch schnell zu einer *aci*-Nitroverbindung **2** relaxiert. Dabei ist die Quantenausbeute der Photolyseproportion zur Produktbildungsausbeute dieses ersten Tautomerisierungsschrittes. Dies zeigt, dass die theoretisch mögliche Rückreaktion dieses Tautomers zum Ausgangsprodukt

kinetisch benachteiligt ist. Die anschließend folgende, schnelle Protolyse der verschiedenen *aci*-Nitroverbindungen führt zu jedoch unterschiedlichen Endprodukten der Ausgangsderivate. In beiden Fällen erfolgt aber im weiteren Reaktionsverlauf die Abstraktion eines Protons, wodurch die pH-Wert- und Lösungsmittelabhängigkeit der Gesamtreaktion klar wird. Die gebildete *aci*-Nitrokomponente und deren dissoziiertes Anion liegen im Gleichgewicht vor. Das *aci*-Nitroanion ist die Ausgangsverbindung für eine sich anschließende  $\beta$ -Eliminierung in der das ursprünglich geschützte Molekül ROH schließlich freigesetzt wird. Aus dem *Z*-Isomer der *aci*-Nitroverbindung (**5**), kann in einer Nebenreaktion allerdings auch das zyklische Intermediat **6** gebildet werden. Dieses reagiert irreversibel zu einem Nitroso Nebenprodukt **7** weiter, aus dem die Ausgangsverbindung ROH nicht mehr freigesetzt werden kann.

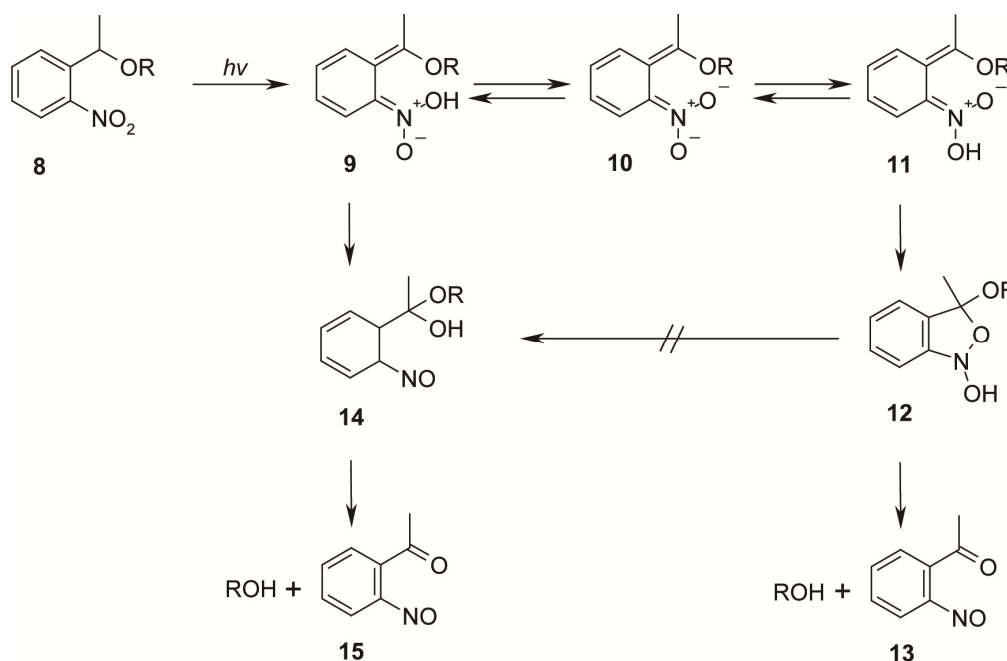


**Abb. 11 Photolysemechanismus einer NPP-geschützten Verbindung ROH nach Pfeleiderer et al.<sup>[11]</sup>**

Die Geschwindigkeit, mit der die  $\beta$ -Eliminierung abläuft, ist bei NPP-geschützten Biomolekülen also entscheidend für die Gesamtausbeute, der Entschützungsreaktion. Die Bildung des problematischen, zyklischen Intermediates ist aus dem *aci*-Nitroanion **3** thermodynamisch nicht begünstigt, sondern entsteht ausschließlich aus dem *Z*-Isomer der *aci*-Nitroverbindung. Handelt es sich bei ROH bzw. RO<sup>-</sup> um eine schlechte Abgangsgruppe kann man daher die Ausbeute der Entschützungsreaktion durch gezielte Verschiebung des pH-Wertes in den basischen Bereich verbessern. Dennoch ist zu bedenken, dass dies die Entschützung eines Moleküls in physiologischem Kontext nicht erlaubt.

Im Gegensatz zur unerwünschten Nebenreaktion, die bei der NPP-Entschützung aus der Zyklisierung der undissoziierten *aci*-Nitroverbindung resultiert, ist dieser Schritt zur Produktfreisetzung aus einer NPE-geschützten Variante notwendig. Das Intermediat **12** bildet die Zwischenstufe zur Übertragung eines Sauerstoffs von der Nitrofunktionalität auf die Benzylposition, woraus das endgültige Nitrosoketon **13**, sowie die entschützte Ausgangsverbindung ROH resultieren. Die Bildung des Halbacetals **14** findet laut Studien

von Walker et al. aus **12** aber nicht statt. Dennoch wird die Verbindung **14** als Intermediat beobachtet. Sie entsteht auf einem alternativen Reaktionsweg direkt aus dem *Z*-Isomer des *aci*-Nitroautomers.



**Abb. 12** Photolysemechanismus einer NPE-geschützten Verbindung ROH nach Corrie et al.<sup>[12]</sup>

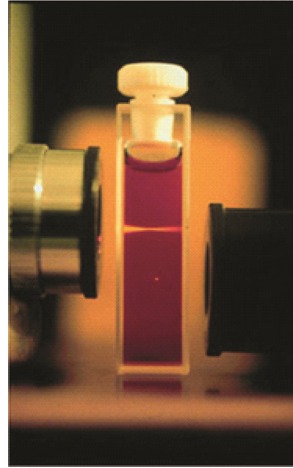
Je nach  $pK_a$ -Wert der *aci*-Nitroverbindung verläuft die Reaktion zu unterschiedlichen Anteilen über die beiden Reaktionswege, wobei der Weg über die bicyclische Zwischenstufe der schnellere von beiden ist. Interessanterweise lässt sich der Reaktionsweg über eine Veränderung des pH-Wertes trotzdem nicht beeinflussen.<sup>[12]</sup>

### 1.2.2. Zwei Photonen Entschützung

Die Methode der photolabilen Inaktivierung von Biomolekülen eröffnet eine Vielzahl von Anwendungen, in denen eine räumlich und zeitlich definierte, dosiskontrollierte Freisetzung eines Effektormoleküls von Interesse ist. Die räumliche Auflösung eines fokussierten Laserstrahles ergibt in einer dreidimensionalen Probe üblicherweise einen annähernd zylindrisch bestrahlten Bereich, in dem ein photolabil geschütztes Effektormolekül freigesetzt wird. Es gibt eine Technik, mit deren Hilfe sich dieser Bereich noch weiter, auf einen Punkt mit Femtolitervolumen einschränken lässt: die Zwei-Photonenanregung.<sup>[10]</sup>

Bestimmte Schutzgruppen, wie beispielsweise das *ortho*-Nitrobenzyl-derivat NDBF, können nicht nur im UV-Bereich durch Einfangen eines Photons in den angeregten Zustand, aus welchem die Photolyse erfolgt, versetzt werden, sondern auch durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen halber Energie. Die Wahrscheinlichkeit einer Zwei-

Photonenabsorption hängt quadratisch von der Lichtintensität ab. Daher findet dieser Vorgang nur im unmittelbaren Fokus des einfallenden Lichtstrahls statt. Das erlaubt eine deutlich verbesserte dreidimensionale Auflösung bis in den Femtoliterbereich hinein.



**Abb. 13 Fluoreszenz durch Ein-Photon-Anregung (oben - strahlförmig) und durch Zwei-Photonen-Anregung (unten - punktförmig).** <sup>[13]</sup>

Über die verbesserte Auflösung hinaus ermöglicht die Zwei-Photonen-Anregung auch eine Entschätzung bei einer Wellenlänge im IR-Bereich. Das wiederum bietet nicht nur den Vorteil der besseren biologischen Verträglichkeit, sondern ermöglicht auch eine höhere Eindringtiefe in das Gewebe. Während UV-Licht mit einer Wellenlänge von 350 nm nur etwa einen Millimeter in (nicht farbloses) Gewebe vordringt, erreicht man mit Infrarotlicht im IR-A Bereich immerhin eine Tiefe von 4-5 mm.

### 1.3. RNA-Interferenz

Bereits 1969 stellten Britten und Davidson die These auf, dass die Genexpression durch RNA reguliert werden könnte.<sup>[14]</sup> Durch die Entdeckung der Nuklearfaktoren jedoch geriet dieser Vorschlag zunächst in Vergessenheit. Erst im Jahr 1990 kam man dieser Idee wieder auf die Spur, als die Forschergruppe um R. Jørgensen versuchte, durch Überexpression eines für die Farbgebung von Petunien verantwortlichen Enzyms deren violette Färbung zu intensivieren. Anstatt einer Vertiefung der Farbe erhielten sie jedoch Blüten, die teilweise oder sogar vollkommen entfärbt waren.<sup>[15]</sup> Da nicht nur das Transgen, sondern auch das endogene Gen in seiner Expression unterdrückt war, bezeichneten sie das Phänomen zunächst mit dem Begriff Cosuppression. Im Laufe der neunziger Jahre wurde immer wieder von ähnlichen Vorgängen in anderen Organismen, wie *N. crassa* und *C. elegans* berichtet und auch die erste microRNA, *lin4*, wurde entdeckt.<sup>[16],[17]</sup> Aber erst nach und nach erkannte man den Zusammenhang zwischen diesen Beobachtungen. 1998 schließlich identifizierten Andrew Fire und Craig Mello doppelsträngige RNA als Auslöser dieses Phänomens, welches sie RNA Interferenz taufte. Hierfür erhielten sie 2006 den Medizinnobelpreis.<sup>[18]</sup> Kurz darauf wurden kleine 21mere als eigentliche Effektormoleküle erkannt.<sup>[19]</sup> Man gab ihnen den Namen *short interfering RNA* (siRNA). Diese regulieren nicht etwa die Transkription eines Gens selbst, sondern induzieren einen Abbau der zugehörigen mRNA, sodass keine Translation mehr stattfinden kann. Aus diesem Grunde wird die RNA-Interferenz zu den Mechanismen der posttranskriptionalen Genregulation (PTGS) gezählt.

Sehr schnell wurde die Möglichkeit, durch RNA Interferenz die Genregulation von außen zu steuern und das damit verbundene Potential erkannt. Tuschl gelang es 2001 die RNA Interferenz auch in Säugerzellen anzuwenden.<sup>[20]</sup> Durch die bereits erworbenen Kenntnisse auf dem Gebiet der *Antisense*-Technologie wurden rasend schnell Fortschritte erzielt und schon im Jahr 2004 wurde das erste siRNA-basierte Medikament getestet.

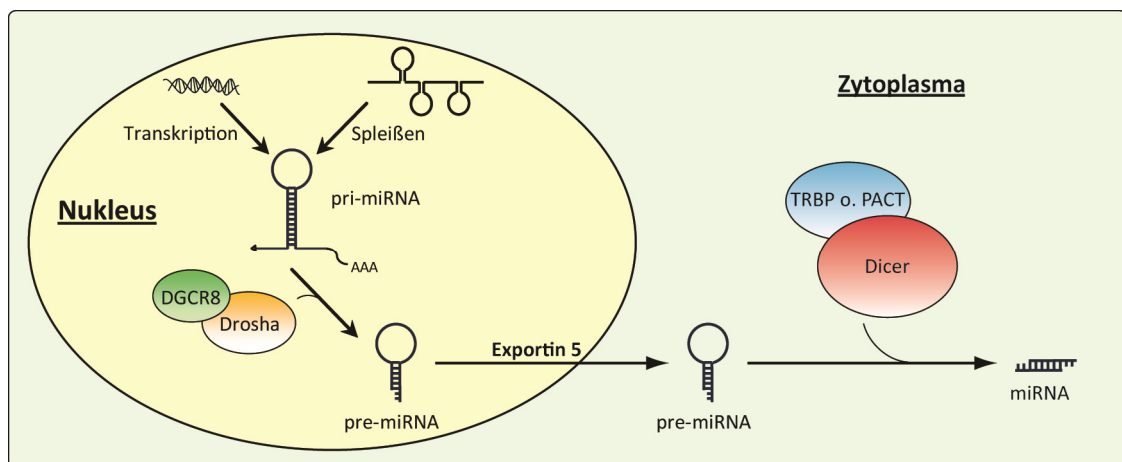
Die Erkenntnisse über beteiligte Proteine, Quellen der kurzen RNAs und Mechanismen die die Unterdrückung der Expression beschreiben sind zahlreich und werden von Jahr zu Jahr detaillierter. Doch erhoffte man sich anfangs klare Regeln, die es alsbald möglich machen würden, den Effekt einer beliebigen kurzen RNA auf die Zelle exakt vorherzusagen, scheint inzwischen eher das Gegenteil zuzutreffen. Ständig werden neue eingebundene Proteine und Spielarten kurzer RNAs entdeckt, alternative oder ergänzende Mechanismen zur Wirkweise vorgeschlagen und die Grenzen zwischen zunächst isoliert geglaubten Vorgängen und Klassen kurzer RNAs verschwimmen zunehmend. Die „wenn“- „dann“ Verknüpfungsregeln werden immer komplizierter.

Auch das Wissen über den Einfluss endogener RNA Interferenz auf biologische Funktionen nimmt ständig zu. So weiß man heute, dass kurze RNAs von der Angiogenese über Immunzellentwicklung und Differenzierung bis zur X-Chromosominaktivierung an zahllosen essentiellen zellulären Prozessen beteiligt sind.

### 1.3.1. Kurze interferierende RNAs

Die Effektormoleküle der RNA-Interferenz sind kurze ca. 21 Nukleotide lange doppelsträngige RNAs, die an ihrem 3'-Ende jeweils zwei ungepaarte Nukleotide Überhang aufweisen.<sup>[21],[20]</sup> Diese 21mere werden, je nach Herkunft, in siRNAs (aus langer exogener oder endogener dsRNA) oder miRNAs (aus endogenen Haarnadeln) unterteilt, wobei den siRNAs mittlerweile noch einige Unterklassen zugeordnet wurden, mit Hilfe derer endogene siRNAs genauer klassifiziert werden. So gibt es in Pflanzen die sogenannten *transacting* siRNAs (tasiRNAs), welche im Gegensatz zu anderen siRNAs nicht vollständig komplementär zur Ziel-mRNA sein müssen.<sup>[22]</sup> Einzigartige siRNAs, die *piwi-interacting* siRNA (piRNAs) gibt es auch in Keimzellen.<sup>[23]</sup> Hier interagieren die piRNAs statt mit Ago (s. Abs. 1.3.2) mit der Endonuklease PIWI, die auch zur Argonaut-Familie gehört. Sie sind die zahlenmäßig größte Klasse an endogenen siRNAs und etwas länger als üblich, nämlich ca. 26-31nt lang. PiRNAs bestehen überwiegend aus *antisense*-Sequenzen zu Transposons und werden daher mit der Kontrolle von mobilen genetischen Elementen in Keimzellen in Verbindung gebracht. Eine Unterklasse der piRNAs, die *repeat-associated* siRNAs (rasiRNAs) können sowohl mit PIWI als auch mit Ago RNA-Interferenz auslösen und sind vor allem an der Bildung und Stabilisierung von Heterochromatin beteiligt.<sup>[24]</sup> Hier handelt es sich also strenggenommen um Genregulation auf Transkriptionsebene und nicht um PTGS.

Die wichtigste Rolle unter den endogenen kurzen RNAs spielen microRNAs (miRNAs). Diese sind eigenständig als Gen oder auch auf Introns anderer Transkripte - häufig von jenen Proteinen, die durch sie reguliert werden - codiert.

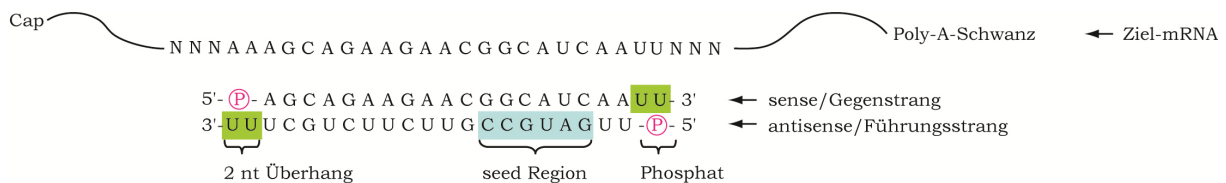


**Abb. 14 Reifung einer miRNA. Pri-miRNAs, die entweder direkt exprimiert werden oder beim Spleißen von mRNAs entstehen, werden im Nukleus zunächst von der Endonuklease Drosha in kleinere Haarnadeln geschnitten. Der Cofaktor DGCR bindet die pri-miRNA dabei derart, dass Drosha mit genau 11 nt Abstand oberhalb der Einzelstrangverzweigung schneidet.**

Sie werden zunächst als Haarnadelstrukturen, mit längeren nicht paarenden Enden, die wie eine mRNA ein 5'-Cap und einen 3'-Poly-A-Schwanz tragen, transkribiert. Diese Vorläufermoleküle, pri-miRNAs genannt, werden im Kern ein erstes Mal zu kleineren, ca. 66 nt langen Haarnadeln prozessiert und durch Exportin5 ins Zytoplasma transportiert, wo sie ähnlich wie dsRNA durch Dicer zu fertigen miRNAs geschnitten werden.

Im Gegensatz zu siRNAs, die häufig komplementär zum offenen Leseraster einer mRNA sind, binden miRNAs üblicherweise im Bereich der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR). In diesen Abschnitten existieren speziell hierfür vorgesehene miRNA Bindungsstellen, die dort in mehrfachen Kopien vorhanden sind. miRNAs sind eines der wichtigsten Regulationswerkzeuge der Zelle, um die Genexpression zu steuern. Man nimmt an, dass ca. ein Drittel aller proteincodierenden Gene durch miRNA kontrolliert wird und so nimmt die Zahl der entdeckten miRNAs ständig zu.

Aus den RNAi-induzierenden Doppelsträngen wird nur ein Strang, der sogenannte Führungsstrang (engl. *guide-strand*) in einen katalytisch aktiven Komplex aus Proteinen und RNA eingebaut. Der Konvention entsprechend wird dieser Strang im si- bzw. miRNA-Duplex als *antisense* bezeichnet, da er komplementär zum „codierenden“ mRNA-Strang ist, welcher gebunden und nachfolgend abgebaut wird.



**Abb. 15 Struktur einer siRNA (mit beispielhafter Sequenz) und der zugehörigen mRNA .**

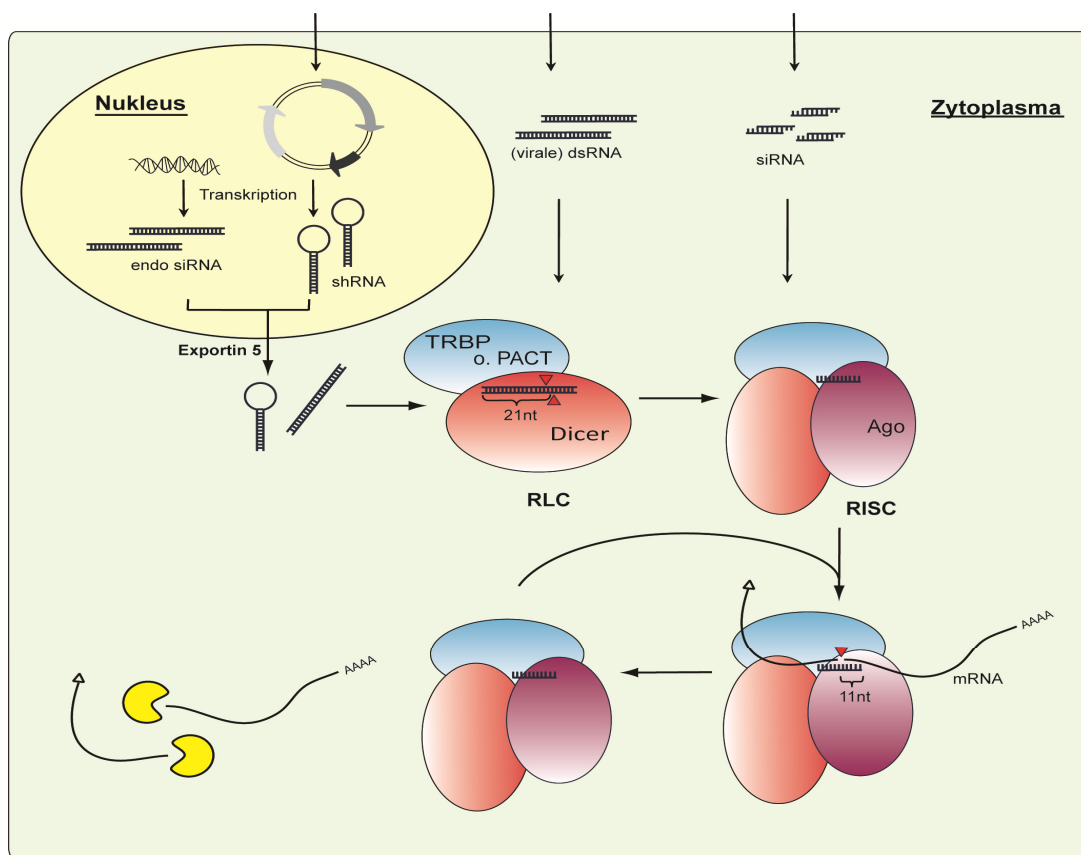
Eine spezielle Rolle bei der Hybridisierung an eine mRNA nehmen die Nukleotide 3-8 der kurzen RNAs ein, welche als *seed*-Region bezeichnet werden. Sie leisten einen besonders großen Beitrag zur Bindungsenergie des siRNA:mRNA Doppelstranges, was gleichzeitig das Erfordernis einer kanonischen Basenpaarung in diesem Bereich erhöht. Endogene kurze RNAs weisen auf Grund ihrer Biogenese am 5'-Ende stets ein Phosphat auf. Exogene kurze RNAs werden, sollten sie stattdessen einen 5'-OH-Terminus besitzen, im Zytoplasma schnell von unspezifischen Kinasen 5'-phosphoryliert.

### 1.3.2. Mechanismus

RNAi ist ein katalytischer Prozess, der nicht allein von einer siRNA gesteuert, sondern durch zahlreiche Proteine vermittelt wird. Der Vorgang der RNA-Interferenz kann grob in zwei Schritte eingeteilt werden, einen Induzierungsschritt und einen Effektorschritt.

Im Induzierungsschritt werden zunächst aus Vorläufermolekülen, langer dsRNA, die tatsächlich aktiven kurzen interferierenden RNAs von etwa 21 nt Länge hergestellt. Dies

übernimmt eine Endonuklease namens Dicer im Zusammenspiel mit einem Cofaktor. Den Komplex aus Dicer, Cofaktor und gebundenem RNA-Einzelstrang nennt man auch *RISC-loading-complex* (RLC), da dieser Komplex nach dem Schneiden der Vorläufer den tatsächlichen Effektorcomplex RISC (*RNA induced silencing complex*) mit einem Strang der siRNA belädt. Welcher Strang dies ist, entscheidet die Stabilität der Enden – derjenige Strang, dessen 5'-Ende leichter zu entwenden ist, ist der zukünftige sogenannte Führungsstrang im RISC. RISC schließlich bindet diejenige mRNA die komplementär zum ausgewählten siRNA-Führungsstrang ist und schneidet diese exakt 10 nt aufwärts des 5'-Endes der siRNA. Die mRNA, nun nicht mehr geschützt durch ein 5'-Cap und einen 3'-Poly-A-Schwanz, wird daraufhin sehr schnell durch Nukleasen abgebaut. Das Protein, das die katalytische Funktion (*slicer*-Aktivität) aufweist, ist Ago.



**Abb. 16 Schematische Darstellung der Abläufe bei der RNA-Interferenz.**

Stammt der Führungsstrang im RISC nicht aus einer siRNA sondern aus einer miRNA, sind zwei verschiedene Wege möglich, wie mit der gebundenen komplementären mRNA verfahren wird. Paart die miRNA wie eine siRNA perfekt mit der Ziel-mRNA, so geschieht dieselbe endonukleolytische Spaltung, wie oben beschrieben. Meist jedoch weisen miRNAs Fehlpaarungen auf. Eine Spaltung durch Ago ist dann nicht möglich. Diese miRNAs interferieren mit der Genexpression auf andere Art und Weise. Entweder wird die Translation oder deren Initiierung blockiert oder die mRNA wird anderweitig destabilisiert

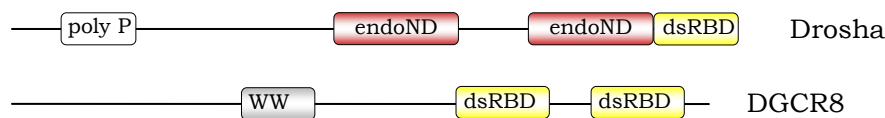


und abgebaut (s. Unterkapitel *Ago*). RNA Interferenz wird überwiegend als zytoplasmatisches Phänomen beschrieben, findet jedoch auch im Nukleus statt.<sup>[25]</sup> Dort kann Ago assoziierte siRNA auch auf Transkriptionsebene mit der Genexpression interferieren, indem diese an Genpromotorregionen bindet.<sup>[26]</sup>

An der Maschinerie der RNA-Interferenz sind zahlreiche Proteine beteiligt. Dass diese je nach Organismus durchaus verschieden sein können, macht es nicht leichter, einen Überblick über alle an der RNAi beteiligten Faktoren zu behalten. Zumal davon auszugehen ist, dass die Liste der bisher entdeckten Proteine nicht vollständig ist bzw. auch den gefundenen Proteinen ihre Funktionen längst nicht in vollem Umfang zugeordnet werden konnten. Im folgenden liegt der Fokus auf den, an der RNAi in Säuger- und *Drosophila*-Zellen beteiligten Proteinen.

### 1.3.3. Beteiligte Proteine

#### *DROSHA UND DGCR8/PASHA*



miRNAs sind endogen codiert und werden als pri-miRNAs transkribiert bzw. entstehen beim Spleißen. Diese Haarnadelstrukturen werden noch im Kern ein erstes Mal prozessiert. Dies geschieht durch ein als Mikroprozessorkomplex bezeichnetes Proteintandem aus der Endonuklease Drosha und DGCR8 (bzw. Pasha in *D. melanogaster*) einem Protein mit zwei dsRNA-bindenden Domänen (dsRBDs). Hierbei dient DGCR8 nicht nur der Bindung an die pri-miRNA, sondern erkennt auch die Region in der der doppelsträngige Haarnadelstamm in die einzelsträngigen 3'- und 5'-Enden aufgespalten wird und dirigiert Drosha derart, dass diese die pri-miRNA in genau 11nt Abstand zu dieser Verzweigung schneidet. Die daraus entstandenen kleineren Haarnadeln (pre-miRNA) werden nachfolgend von Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert.<sup>[27]</sup> Auch mit endogen codierten siRNAs wird derart verfahren.

Die **dsRNA bindende Domäne (dsRBD)**, ist in zahlreichen Proteinen vertreten, die während Translation, Transkription, Lokalisation und Prozessierung mit RNA in Wechselwirkung treten und die daher auch unter der Bezeichnung dsRNA bindende Proteine (dsRBP) zusammengefasst werden. dsRBDs sind evolutionär konserviert und finden sich sowohl in Eukaryonten und Prokaryonten als auch in Viren. Die Bindung der dsRNA erfolgt in den meisten Fällen nicht sequenzspezifisch, sondern durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen Protein und ca. 11-16 negativ geladenen Phosphaten des RNA-Rückgrats. Die RNA-Spezifität ergibt sich aus der Bindung von Proteinseitenketten an die

2'-Hydroxylgruppen in der kleinen Furche von A-RNA. Außer der RNA-Bindungsfunktion können die dsRBPs auch untereinander über die dsRBDomänen miteinander wechselwirken, was zu einem sehr komplexen Wechselspiel aus gegenseitiger Regulierung führt (s. auch TRBP und PACT).<sup>[28]</sup>

Alle Endonukleasen vom Typ III, zu denen Drosha und auch Dicer zählen, besitzen mindestens eine, üblicherweise aber zwei **Endonukleasedomänen (endoNDs)**. Die Spaltprodukte weisen ein 5'-Phosphat und eine 3'-OH Gruppe auf, sowie die RNAi typischen, zwei Nukleotide langen 3'-Überhänge. Prokaryontische endoNDs sind echte Dimere, während Drosha und Dicer Pseudodimere aus zwei endoNDs, die aber auf dem selben Proteinstrang liegen, bilden. Die räumliche Anordnung der beiden endoNDs entspricht den um zwei Nukleotide versetzten Schnittstellen. Es scheint ein zwei-Metall-Ionen Mechanismus vorzuliegen, ähnlich dem der RNase H.<sup>[29]</sup>

#### DICER

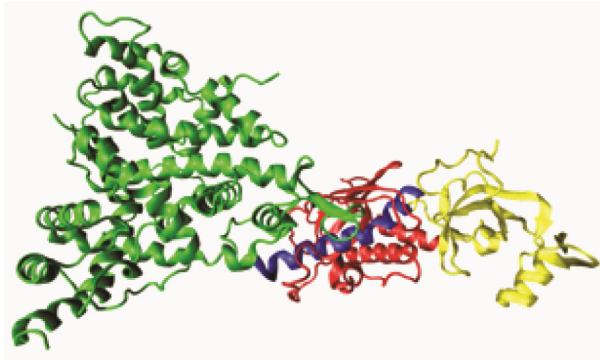


Dicer ist die zytoplasmatische Variante der in der RNAi vertretenen RNasen vom Typ III. Wie Drosha im Kern, weist auch Dicer eine dsRBD und zwei endoNDs auf. Allerdings besitzt Dicer eine N-terminale Verlängerung in der sich zusätzlich die 3'-Bindungsdomäne PAZ, eine RNA Helikase A/ ATPase Domäne (DEX D/H) und eine dsRNA Bindungsfurche (DUF283) befinden, über deren genaue Funktion es allerdings erst Vermutungen gibt.<sup>[30]</sup> Dicer schneidet jegliche dsRNA in ~22nt lange Stücke und weist lediglich Präferenzen für den Strangterminus auf, der als eine Art Lineal, für den Abstand zur Schnittstelle dient.<sup>[31]</sup> Während in Säugerzellen nur eine einzige Variante von Dicer vorliegt, finden sich in *Drosophila*-Zellen zwei verschiedene Dicerhomologe - Dicer1 und Dicer2.<sup>[32]</sup> Diese erkennen jeweils unterschiedliche RNAs als Substrat und verfahren auch auf verschiedene Weise mit ihnen. Dicer-1 bindet und prozessiert endogene pre-miRNAs, Dicer-2 bindet exogene dsRNA. Entsprechend den Substratpräferenzen hat Dicer-1 eine Bindungsstelle für 3'-ssRNA, die PAZ-Domäne, welche in Dicer2 nicht vorhanden ist. Allgemein ist davon auszugehen, dass in allen Zellen, in denen verschiedene Dicerhomologe vorliegen, diese auch unterschiedliche kurze RNAs prozessieren.<sup>[33]</sup>

Der Name der **PAZ-Domäne** leitet sich von den drei Proteinen ab, in denen sie zuerst gefunden wurde: PIWI, Argonaut und Zwillie. Die PAZ-Domäne ermöglicht die Bindung an das 3'-Ende einzelsträngiger Oligonukleotide oder an dsRNA mit 3'-Überhängen. Hieraus ergibt sich auch die strukturelle Vorgabe des Überhangs von zwei Nukleotiden am 3'-Ende im Design von siRNAs. Die Bindung von siRNA in einer hydrophoben Tasche verläuft ohne

größere konformationelle Änderungen im Protein, wohl aber der beteiligten Nukleinsäuren.<sup>[34]</sup> Die Watson-Crick-Sites der ungepaarten Nukleotide wechselwirken nicht in definierter Art und Weise mit den Aminosäureresten in der 3'-Bindungstasche und auch 2'-OH-Gruppen von RNA sind nicht an der Bindung beteiligt.<sup>[35]</sup> Das lässt darauf schließen, dass die PAZ-Bindung von Oligonukleotiden weder sequenzabhängig noch RNA-spezifisch ist, weshalb man beim Design von siRNAs für die 3'-Überhänge häufig die stabileren DNA- oder 2'-O-modifizierte RNA-Nukleotide wählt.

Das Vorhandensein bzw. Fehlen der PAZ-Domäne ist ein Unterscheidungsmerkmal der beiden Dicer-Typen in *Drosophila* und hierin kann auch die Substratspezifität begründet liegen. Die von Drosha produzierten pre-miRNAs weisen *sticky ends* auf, dsRNA hat üblicherweise zumindest ein *blunt end*. Dicer-1, welcher an der zytoplasmatischen Reifung von pre-miRNAs beteiligt ist besitzt eine PAZ Domäne, während sie bei Dicer2, welcher dsRNA prozessiert, fehlt.



**Abb. 17 Kristallstruktur von Dicer aus *G. intestinalis* – in Gelb die 3'-bindende PAZ-Domäne, grün die beiden Endonukleasedomänen.**<sup>[143]</sup>

Experimente mit **RNA Helikase A-** sowie **ATPase-Domäne-**defizienten Zellen legen nahe, dass diese in humanen Zellen nicht oder zumindest in den bekannten RNAi-Mechanismen nicht funktional sind. Es wird stattdessen ein Part in der Rekrutierung des Dicer-Cofaktors TRBP angenommen, wofür ein zwischen diesen beiden Domänen angesiedelter Bereich, bezeichnet als D1, verantwortlich zu sein scheint.<sup>[36]</sup> In diesem Zusammenhang wurde auch eine Autoinhibierung von Dicer durch die DExD/H-ATPase Domäne in Abwesenheit von TRBP beobachtet.<sup>[37]</sup> In *Drosophila* Dicer2 und *C. elegans* Dicer hingegen unterdrückten Mutationen, die die ATPase Aktivität zerstörten, die RNA-Interferenz.<sup>[38]</sup>

#### MECHANISMUS DER ENDONUKLEOLYTISCHEN DSRNA-SPALTUNG DURCH DICER

Das 3'-Ende einer Substrat-RNA wird in Säugerzellen durch die Dicer-PAZ-Domäne gebunden. Im weiteren Verlauf liegt der RNA-Strang auf einer Länge von ca. zwei A-Helix-Windungen auf der Proteinoberfläche, um dann in der aktiven Tasche zwischen den beiden Endonukleasedomänen eingeschlossen zu werden. Entsprechend des Abstands zwischen

PAZ und den endoNDs können die geschnittenen kurzen RNAs, die die verschiedenen Dicer-Varianten produzieren, von unterschiedlicher Länge sein (vgl. siRNAs und piRNAs). Die beiden endoNDs liegen leicht versetzt in der aktiven Tasche und schneiden jeweils einen Strang der dsRNA woraus der Produktdoppelstrang mit 2 nt Überhang am 3'-Ende resultiert. Das entstehende 5'-Ende trägt ein Phosphat.<sup>[38]</sup>

*dsRBPs: TRBP, Loqs UND R2D2*



Dicer bindet, wie Drosha auch, stets einen Cofaktor für die RNA-Prozessierung. Entsprechend der Tatsache, dass pre-siRNA und pre-miRNA in Drosophila auf getrennten Wegen von zwei verschiedenen Dicer-Proteinen prozessiert und in den Effektor-Komplex eingeführt werden, rekrutieren die beiden Dicer-Varianten dort auch zwei unterschiedliche dsRBPs. Dicer1 ist im Komplex mit Loquacious (Loqs) für die Prozessierung von pre-miRNAs zuständig. Loqs besitzt je nach Isoform zwei oder drei dsRBDs. Dicer-2 rekrutiert R2D2 welches durch Bindung des thermodynamisch stabileren Endes der siRNA festlegt welcher Einzelstrang der dsRNA in den RISC Komplex eingebaut wird.<sup>[39]</sup> Dennoch muss Dicer-2 auch in der Lage sein, lange dsRNA zu prozessieren, denn diese löst RNA-Interferenz in Drosophila aus. Da auch Komplexe zwischen Dicer-2 und Loqs gefunden wurden, ging man einige Zeit davon aus, dass Dicer-2 je nach Herkunft der dsRNA diese entweder mit Loqs oder mit R2D2 prozessiert. Exogene dsRNA sollte nach diesem Modell von Dicer-2-R2D2 geschnitten werden, endogene dsRNA von Dicer-2-Loqs. Neuste Erkenntnisse machen aber einen anderen Mechanismus wahrscheinlich, in dem Dicer-2 zuerst im Komplex mit Loqs dsRNA unabhängig von deren Herkunft prozessiert und anschließend Loqs entlässt und R2D2 zu Beladung des RISC rekrutiert.<sup>[40]</sup>

In humanen Zellen wurde lange Zeit nur ein Bindungspartner für die einzige vorliegende Dicervariante identifiziert, das TRBP (*trans-activation-responsive RNA-binding protein*), ein Homologes zu Loqs. TRBP, welches drei dsRBD sowie eine C-terminale Bindungsstelle für die Interaktion mit Dicer - C4-Domäne benannt – aufweist, ist, wie zu erwarten, in diesem Proteintandem für die Bindung der siRNA zuständig.<sup>[41],[36]</sup> Im weiteren Verlauf der RNAi ist TRBP zudem dafür verantwortlich, Ago2 zu rekrutieren und mit den geschnittenen siRNAs zu beladen. Aber auch bei Vorliegen fertiger 21 nt langer siRNAs, die den Dicer-TRBP-Komplex zur Prozessierung theoretisch gar nicht benötigen würden, zeigt sich, dass bei TRBP-knock down Zellen die Effektivität der RNAi stark reduziert ist. Dies deutet darauf hin, dass TRBP im RLC maßgeblich dazu beiträgt, siRNAs an Ago2 zu binden.<sup>[42]</sup>

TRBP hat neben seiner Funktion als dsRBP im Komplex mit Dicer jedoch noch eine andere Funktion: es bindet und inhibiert die Proteinkinase R (PKR) durch Bindung an selbige. Die Wechselwirkung mit der PKR, ein an der Interferonantwort beteiligtes Enzym, erfolgt über

die dsRBD3 welche ebenfalls für die Bindung an Dicer benötigt wird. Dicer-TRBP funktioniert sowohl in der pre-miRNA Prozessierung, als auch in der Beladung von RISC. Lange wurde angenommen, dass dsRNA in Säugerzellen ohnehin nur als siRNA die RNAi initiieren kann, da lange dsRNA eine Interferonantwort auslöst. Inzwischen sind aber auch endogene siRNAs gefunden wurde, die aus langen dsRNA-Transkripten prozessiert werden, ohne dass die Zelle apoptotisch stirbt.

### PACT

Vor einiger Zeit ist noch ein weiteres dsRBP, welches an Dicer bindet, gefunden worden - PACT (PKR *activator*).<sup>[43]</sup> Dieses bindet – möglicherweise auch zusammen mit TRBP - an Dicer, ist wie dieses ein Loqs-Homologes und verbessert die Effizienz der RNAi, wenngleich Dicer auch ohne diese Proteine (eingeschränkt!) seine Aktivität behält.<sup>[44]</sup> Wie der Name impliziert, hat auch PACT einen Einfluss auf die PKR, es wirkt – entgegen TRBP – aktivierend.

Die Aminosäuresequenz von PACT ist stark homolog zu der von TRBP. Sie besitzen beide drei dsRBDs, von denen die beiden N-terminalen gleichermaßen für die Bindung der PKR verantwortlich sind. Die C-terminale dsRBD ist bei beiden Proteinen nicht dsRNA-bindungsfähig, unterscheidet sich im Vergleich der Domänen unter den beiden Proteinen aber ansonsten am stärksten. Diese Domäne ist auch für die Aktivierung der PKR durch PACT verantwortlich.<sup>[45]</sup>

### ARGONAUT-PROTEINE



Der Effektorcomplex der RNAi ist RISC, der RNA *induced silencing complex*. Dieser setzt sich üblicherweise aus einem Protein der Argonaut Familie Ago und den Proteinen des RLC, also Dicer und jeweiligem Cofaktor sowie der siRNA zusammen. Dabei katalysiert die Endonukleaseaktivität von Ago den zentralen Schritt der RNAi, das Schneiden der mRNA. Auch Ago allein zeigt eine endonukleolytische Zerlegung von mRNA, wenn eine entsprechende siRNA gebunden ist. Diese beiden Komponenten allein werden daher als minimal RISC bezeichnet.<sup>[46]</sup> Wie bei Dicer gibt es auch bei den Argonaut Proteinen verschiedene Varianten, die jeweils leicht unterschiedliche Substrate haben. Die Anzahl an Argonaut-Proteinen ist je nach Spezies unterschiedlich. Drosophila besitzt vier verschiedene Ago-Typen, während es in humanen Zellen derer acht gibt. Davon gehören jeweils vier zur Ago- und vier zur PIWI-Subfamilie und noch nicht allen konnte eine eindeutige Funktion zugewiesen werden. Im humanen RISC der siRNA induzierten RNAi, die zu einer direkten mRNA-Spaltung führt, ist Ago2 das zentrale Protein.<sup>[47],[48]</sup> Ago2 weist wie Dicer eine PAZ

Domäne auf und kann somit spezifisch RNA mit 3'-ungepaarten Nukleotiden binden. Die für den Effektorschritt notwendige Endonukleaseaktivität geht von der C-terminalen PIWI-Domäne aus, während die MID-Domäne das 5'-Phosphat einer siRNA bindet. Zwischen der PAZ- und der MID-Domäne liegt die siRNA in einer Furche auf der Proteinoberfläche. Diese ist stark positiv geladen und wechselwirkt rein elektrostatisch, also sequenzunspezifisch, mit dem Phosphatrückgrat der siRNA. Allerdings erkennt Ago die Weite der kleinen Furche und kann somit dsRNA von dsDNA oder einem RNA:DNA-Hybrid diskriminieren. Wie aus der Kristallstruktur von *Thermus Thermophilus* Argonaut und einer gebundenen DNA hervorgeht, weisen insbesondere die Watson-Crick-Sites der Nukleotide 2-6, welches in etwa der *seed*-Region entspricht, nach außen und liegen somit für die Sequenzerkennung der komplementären mRNA frei.<sup>[49]</sup> Außerdem sind diese Nukleotide bereits in einer helikalen Anordnung vororganisiert, was eine Erklärung dafür sein könnte, weshalb die Hybridisierung dieser *seed*-Nukleotide sehr viel mehr zu Gesamtbindungsenergie des siRNA:mRNA Doppelstranges und damit zu Basenselektivität in der 5'-Hälfte der siRNA beiträgt, als der Rest der siRNA Sequenz.<sup>[38]</sup>

Die **Piwi-Domäne** trägt diesen Namen in Anlehnung an das keimzellspezifische PIWI-Protein, da sie eine Sequenzhomologie zu diesem aufweist. Die PIWI-Domäne zeigt eine Tertiärstruktur, die der typischen Faltung von RNase H-Domänen entspricht und produziert, wie diese, Einzelstrangbrüche in einem der Stränge eines Doppelstranges. Der einzige Unterschied zur RNase H besteht darin, dass es sich beim PIWI Substrat um einen RNA-Doppelstrang handelt, während anderen RNase H Enzyme spezifisch den RNA-Strang eines RNA-DNA-Hybrides schneiden. Auch die Spaltungsprodukte sind identisch mit denen der bekannten RNase H-Enzymen. Ago produziert ein 5'-Phosphat und ein 3'-OH mit 2 nt Überhang. Ebenso ist die Notwendigkeit von Mg<sup>2+</sup> beiden gemein.<sup>[49]</sup>

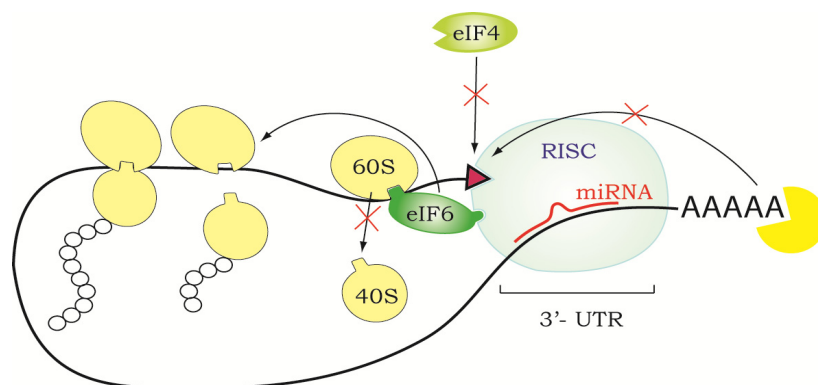
Während PAZ das 3'-Ende einer siRNA bindet, erkennt die **MID-Domäne** sehr spezifisch das 5'-Phosphat. Dabei wird die erste Base seitlich weggeklappt und in dieser Position, vermittelt über ein Metallkation, an ein Carboxylat und das dritte Phosphat im Rückgrat gebunden.

#### *MECHANISMUS DER mRNA-REGULATION DURCH DEN RISC*

Eine endonukleolytische Spaltung der Ziel-mRNA tritt auf, wenn der im RISC gebundene RNA-Führungsstrang zentral keine Fehlpaarungen zur mRNA aufweist. Dies ist bei siRNAs üblicherweise der Fall und kann auch bei miRNAs zutreffen, überwiegend aber paaren miRNA und Ziel-mRNA nicht vollständig. In diesem Fall tritt eine Translationsinhibierung auf, der verschiedene Mechanismen zu Grunde liegen. Hier könnten auch die anderen endonukleolytisch nicht kompetenten Ago-Proteine ihre Bedeutung in der RNAi haben. Denn während eine mRNA-Spaltung in Ago2-defizienten Zellen nicht mehr beobachtet wird,

kann eine Translationsinhibierung weiterhin stattfinden. In der unterschiedlichen *silencing*-Effizienz der einzelnen Ago-Proteine und ihrer gewebsspezifischen Verteilung, ist vermutlich auch die Ursache zu suchen, weshalb siRNAs und miRNAs in verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedliche Wirksamkeit zeigen.<sup>[50]</sup>

Ago-Proteine weisen in der MID-Domain eine Bindungsstelle für das 7-methylguanosincap auf, welches die mRNA vor Nukleaseverdau schützt. Außerdem wird diese Capstruktur in Eukaryonten bei der Translationsinitiierung benötigt, indem der Translationsinitiierungsfaktor eIF4 hieran bindet, der unter anderem im Verlauf der Translationsinitiierung die ribosomale 40S Untereinheit rekrutiert. Ago2, durch die teilweise komplementäre Sequenz der miRNA zur Ziel-mRNA dirigiert, konkurriert nun mit eIF4 um die Bindung der Capstruktur und kann so die Translationsinitiierung verhindern.<sup>[51]</sup> Zudem verhindert ein Binden der Capstruktur durch RISC die Zirkularisierung der mRNA. Unter normalen Umständen rekrutiert der Poly-A-Schwanz spezifische Bindungsproteine (PABP, Poly-A-Binding-Proteins), die wiederum ihrerseits an die 5'-Cap-gebundenen Initiierungsfaktoren binden. Die mRNA und ihre assoziierten Proteine bilden nun ein ringförmiges Konstrukt. Steht das 5'-Cap nicht für eine Zirkularisierung mit dem 3'-Ende zur Verfügung, führt dies zu einer Deadenylierung und damit letztlich zu einem Abbau der mRNA.<sup>[52]</sup>



**Abb. 18 Mechanismen der miRNA induzierten Translationsinhibierung. RISC besitzt eine Bindungsstelle für die 5'-Cap-Struktur. Die Bindung dieser verhindert zum einen die für die Translationsinitiierung notwendige Rekrutierung des Faktors eIF4. Zum anderen ist auch die Zirkularisierung der mRNA nicht mehr möglich, was in der Folge zu einem Nukleaseverdau derselben führt. Desweiteren besitzt RISC eine Bindungsstelle für den Faktor eIF6. Dieser wiederum bindet die große ribosomale Untereinheit, welche alsdann nicht mehr mit der kleinen Untereinheit zum reifen Ribosom kombinieren kann. Ebenso kann eIF6 eine frühzeitige Abdissoziation aktiver Ribosomen herbeiführen.**

Ein anderer Mechanismus der Translationsrepression scheint durch die Bindung von TRBP an eIF6 ausgelöst zu werden. eIF6 ist an der Reifung der ribosomalen 60S Untereinheit beteiligt und verhindert ein frühzeitiges Assoziieren mit der 40S Untereinheit. Indem der RISC diesen Faktor in unmittelbarer Umgebung des Startcodons lokalisiert, wo sich die beiden Untereinheiten zum funktionstüchtigen Ribosom zusammenfinden, wird eben dieser

Vorgang des Aufbaus translationskompetenter Ribosomen verhindert.<sup>[53]</sup> Auch ein beschleunigtes Abdissoziieren der Ribosomen von der mRNA ausgelöst durch 3'-UTR-gebundene miRNAs, konnte beobachtet werden.<sup>[54]</sup>

Die verschiedenen vorgeschlagenen Mechanismen zur Translationsinhibierung stehen teilweise im Gegensatz zueinander. Noch ist nicht klar, welche Wege *in vivo* tatsächlich beschritten werden und unter welchen Voraussetzungen die einzelnen Mechanismen bevorzugt stattfinden. Selbst die lange gültig scheinende Ansicht, dass perfekt paarende miRNAs den siRNA-analogen mRNA-Abbauweg beschreiten, scheint nicht in allen Fällen zuzutreffen. So wurden 3'-UTR-bindende miRNAs, aber auch siRNAs gefunden, die trotz vollständig kanonischer Basenpaarung Translationsrepression statt mRNA-Abbau auslösen<sup>[50]</sup> oder die unter speziellen Bedingungen sogar zu einer Hochregulierung des Zielgens führen.<sup>[55]</sup>

#### **1.3.4. Unspezifische Effekte**

##### *OFF-TARGET-EFFEKTE*

RISC bindet zur siRNA komplementäre mRNA und baut diese ab. Leider ist diese Selektivität bezüglich des kanonischen Gegenstranges nicht hundertprozentig. Sehr schnell nach der Identifizierung von kurzen RNAs als Effektormoleküle der RNAi wurde auch erkannt, dass Fehlpaarungen in bestimmten Bereichen einer siRNA deren Aktivität nicht signifikant herabsetzen oder zumindest nicht vollständig ausschalten. Chiu und Rana beschrieben die Notwendigkeit einer vollständigen A-Helixwindung.<sup>[56]</sup> Diese umfasst 11,6 Nukleotide und als Ergebnis einer anderen Studie über *off-target* Effekte von siRNAs erhielt man auch genau elf Nukleotide als Minimalkonsens für RNAi-Aktivierung.<sup>[57]</sup> Als einzigartig im menschlichen Genom wird eine Sequenz ab einer Länge von ca. 15-17 Nukleotiden angenommen. So ist es nicht verwunderlich, dass auch eine gewisse Wahrscheinlichkeit für den Abbau anderer mRNAs als der gewünschten besteht. Zudem muss eine siRNA nicht immer vollständig komplementär sein, um eine RNAi auszulösen. Auch ein Übereinstimmen der *seed*-Region allein mit Bereichen der 3'-UTR kann zum Abbau einer mRNA führen.<sup>[58]</sup> Die *seed*-Region jedoch umfasst nur sechs Nukleotide. Systematische Untersuchungen an der 3'-UTR von mRNAs zeigten, dass einige Hexamere sehr häufig vertreten sind, während andere deutlich seltener auftreten. Wird eine solche Übereinstimmung zur 3'-UTR nicht sorgfältig genug ausgeschlossen, kann eine ungewollte Inhibierung anderer mRNAs analog dem Mechanismus einer miRNA induzierten Translationsrepression stattfinden.<sup>[59]</sup>

##### *INTERFERONANTWORT*

Während z.B. in *Drosophila*-Zellen dsRNA ein sehr potentes Mittel zur Initiierung von RNAi darstellt, führt dsRNA, die länger als 30 Nukleotide lang ist, in Säugerzellen zur



interferoninduzierten Apoptose.<sup>[60]</sup> Jedoch können auch kurze interferierende RNAs die Interferonantwort auslösen. Zum einen binden diese an die PKR, ein Protein, das am Anfang der Interferonaktivierungskaskade steht, und aktivieren diese.<sup>[61]</sup> Zum anderen können auch einzelne der *toll-like*-Rezeptoren, die ebenfalls an der Interferonaktivierung beteiligt sind, siRNA binden. Toll-artige Rezeptoren sind Teil des angeborenen Immunsystems und dienen der Erkennung molekularer Strukturen von Krankheitserregern. TLR3 bindet lange dsRNA, TLR7 und 8 binden kurze ss- oder dsRNA. Hier wurden, ähnlich dem TLR9 aktivierenden CpG-DNA-Motiv, spezielle Sequenzen ausfindig gemacht, die im Verdacht stehen, die Bindung an die TLRs auszulösen.<sup>[62]</sup>

### 1.3.5. Design

Die Aufgabe, eine siRNA zum Ausschalten eines bestimmten Gens zu finden, scheint zunächst leicht, wenn die Sequenz der transkribierten mRNA bekannt ist. Dass die im RISC eingebauten Effektoroligonukleotide der RNAi 21 Nukleotide lang sind, wurde früh erkannt.<sup>[20]</sup> Aber während man z.B. *Drosophila*-Zellen mit langer dsRNA transfizieren kann, die dann von der zelleigenen Maschinerie in 21mere zerlegt wird, war schon lange vor Entdeckung der RNAi bekannt, dass lange dsRNA in Säugerzellen zu unspezifischer Repression der Proteinbiosynthese führt.<sup>[63]</sup> Inzwischen weiß man, dass dieser Weg einerseits über ein Auslösen der Interferonantwort, andererseits über Aktivierung der RNase L läuft, welche unspezifisch RNA in der Zelle abbaut.<sup>[64]</sup> Mittlerweile wird allerdings teilweise schon wieder in Frage gestellt, dass dies zwangsläufig geschieht und von erfolgreicher, gezielter Expressionsunterdrückung durch längere dsRNA in Säugerzellen berichtet.<sup>[65]</sup> Diese ist, da sie von Dicer zu verschiedenen siRNAs prozessiert wird, deutlich potenter in ihrer Wirkung, als eine einzelne kurze siRNA-Sequenz. Ebenso fand Tuschl heraus, dass zwei Nukleotide 3'-Überhang wichtig für die Regulationsstärke einer siRNA sind.<sup>[66]</sup> Mit den heutigen detaillierten Kenntnissen des Mechanismus' liegt auch der Grund dafür auf der Hand. Auch wenn Dicer eine transfizierte 21 nt lange siRNA nicht mehr zu schneiden braucht, steigert der RLC, welcher Dicer enthält und der Ago mit den siRNAs belädt, die Effizienz der RNAi beträchtlich. Dicer wiederum rekrutiert siRNAs mit Hilfe seiner PAZ-Domäne, welche einzelsträngige RNA-3'-Enden bindet.

Dennoch führt nicht jede siRNA, die die oben beschriebenen Kriterien erfüllt und die komplementär zur Ziel-mRNA ist, zu einer zufriedenstellenden Verminderung der Proteinexpression. Wichtig ist es, nicht nur die Sequenz, sondern auch die mitunter sehr ausgeprägte Sekundärstruktur der mRNA zu kennen. Ist der Zielsequenzabschnitt nicht für den RIS-Komplex zugänglich, kann die mRNA auch nicht abgebaut werden. Dieses Problem kann z.B. theoretisch durch systematische computergestützte Berechnung angegangen werden oder experimentell durch RNaseH Mapping.<sup>[67],[68]</sup>

Im Abschnitt *Unspezifische Effekte* wurden bereits Faktoren genannt, die dazu führen können, dass eine siRNA nicht oder nicht ausschließlich die erwünschte Ziel-mRNA zerstört. Diese sind selbstverständlich zu vermeiden. Neben dem bereits genannten sequenzspezifischen Binden an TLRs finden sich in der Literatur auch Hinweise darauf, dass bestimmte Motive, wie beispielsweise UGGC, stark zelltoxisch wirken, ohne eine Interferonantwort hervorzurufen.<sup>[69]</sup>

Die Asymmetrie in der Stabilität der 5'-Strangenden bestimmt, welcher Strang in den RISC eingebaut wird. Derjenige Strang mit dem thermodynamisch einfacher aufzuwindenden 5'-Ende wird als Führungsstrang verwendet.<sup>[70]</sup> Indem man also für einen Strang ein AU-reiches 5'-Ende wählt, erhöht man signifikant die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Strang auch als Führungsstrang ausgewählt wird.

Ob spezifische Basen an definierten Positionen innerhalb der siRNA bevorzugt sind, war ebenfalls bereits Gegenstand systematischer Untersuchungen. Es zeigte sich, dass unter anderem vor allem ein Uridin an Position zehn die Effizienz einer siRNA deutlich erhöht.<sup>[71]</sup> Diese Entdeckung ist nicht erstaunlich vor dem Hintergrund, dass die meisten Endonukleasen bevorzugt das 3'-Ende eines U-Nukleotids schneiden. Insgesamt führte in diesem Fall ein Algorithmus mit acht verschiedenen rationalen Parametern zu einer sehr hohen Trefferwahrscheinlichkeit bezüglich des Designs einer effektiven siRNA. 29 von 30 so designten siRNA reduzierten das Zielproteinlevel um 50 %.

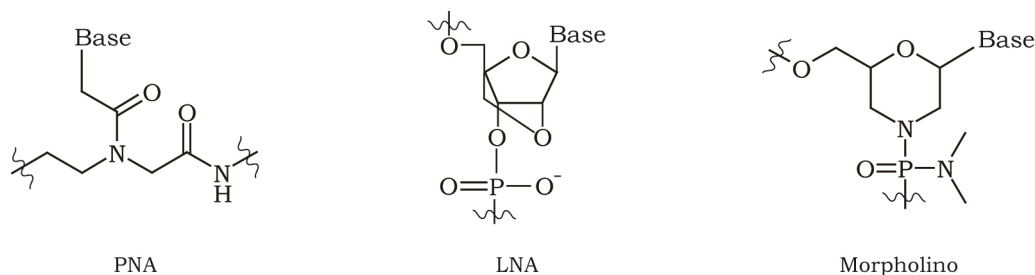
### **1.3.6. Modifikationen**

Wie bei den *antisense*-Oligonukleotiden (ASOs) gibt es auch für siRNAs zahlreiche chemische Modifikationsmöglichkeiten, vor allem um die Stabilität *in vivo* zu erhöhen. Da die 2'-OH-Gruppen grundsätzlich nicht in den RNAi-Mechanismus eingebunden sind, diese aber häufig der Substraterkennung von RNasen dienen, können hier Modifikationen problemlos eingeführt werden, solange sie nicht dazu führen, dass der siRNA:mRNA-Doppelstrang seine A-Helixstruktur im zentralen Bereich verliert.<sup>[56]</sup> Gängige Modifikationen an dieser Position sind 2'-O-Methyl- und 2'-F Nukleotide. Während das kleine Fluorid an der 2'-Position die Gesamtstruktur nicht verändert, führt eine komplette Substitution aller 2'-Hydroxylgruppen durch Methoxygruppen zu einer nicht funktionellen siRNA. Daher werden üblicherweise nur die ersten zwei bis drei Nukleotiden von beiden Enden zum Schutz gegen RNasen 2'-O-Methyl substituiert. Außerdem verringert die Einführung einer 2'-O-Me Modifikation am zweiten Nukleotid des siRNA Strangs die 3'-UTR-bindungsinduzierten *off-target*-Effekte sehr deutlich.<sup>[72]</sup>

LNA-Nukleotide können ebenfalls zur Stabilisierung in eine siRNA integriert werden. LNA - Oligonukleotide sind bereits in einer Konformation ähnlich der einer hybridisierten RNA vororganisiert. Dies erhöht die Schmelztemperatur des Basenpaares und verbessert damit auch die Spezifität. Es gelten aber dieselben Einschränkungen bzgl. der

Gesamtstrukturveränderung von einer A-Helix in Richtung B-Helix, wie für 2'-O-Methylmodifikationen. Diesen Effekt der Inaktivierung eines siRNA-Stranges über Strukturänderung durch vollständige Substitution von RNA gegen LNA kann man sich jedoch auch zu Nutze machen, indem man so den Gegenstrang ausschaltet und damit *off-target* Effekte bedingt durch den Einbau des falschen Stranges reduziert.<sup>[73]</sup>

Auch die bei *Antisense*-Oligonukleotiden bereits erfolgreich *in vivo* angewendeten Phosphorothioate (PS) haben sich als hilfreich für *delivery* und Nukleasestabilität von siRNAs erwiesen. Allerdings darf der PS-Nukleotidanteil nicht zu groß werden, da andernfalls toxische Effekte beobachtet wurden.<sup>[74]</sup>



**Abb. 19 Zuckermodifikationen von Nucleotiden. Im Falle der *locked nucleic acids* (LNA) bleibt das Ribosegrundgerüst erhalten. In Peptid-Nucleinsäuren (PNA) und Morpholinos wird eine ungeladene Analogstruktur verwendet.**

Eine Verbesserung der Eigenschaften von siRNAs durch Einführung ungeladener Analogstrukturen, wie PNA oder Morpholinos entsprechend des Vorgehens bei ASOs ist zwar denkbar, das Problem, welches sich hier stellt, ist aber die Tatsache, dass aktuell keine automatisierten Synthesemodule zur Herstellung von Hybriden aus RNA und diesen Analoga zur Verfügung stehen. Eine vollständige Substitution, wie bei ASOs steht durch die Strukturanforderungen an eine funktionierende siRNA außer Frage.

### 1.3.7. Delivery

Oligonukleotide sind verhältnismäßig große Biomoleküle und besitzen eine negative Gesamtladung. Daher passieren sie die Zellmembran nur schwerlich. Zur breiten Anwendung von siRNA, sei es in der Forschung oder in der Medizin, ist es notwendig geeignete Wege zu finden, diese gezielt und ohne große Verluste *in vivo* oder in Zellkultur in die Zellen zu transportieren. Dabei gibt es zwei grundsätzliche Möglichkeiten. Entweder man transfiziert reife siRNA durch Komplexierung oder kovalente Verknüpfung mit Lipiden oder anderen zellgängigen Molekülen. Oder man verwendet virale Vektoren um siRNA-Vorläufermoleküle in der Zelle stabil zu exprimieren. Soll eine siRNA mit einer, wie auch immer gearteten, chemischen Modifikation zum Einsatz kommen, ist der Weg der Expression jedoch von vornherein ausgeschlossen.

Eine der ersten häufig angewandten Methoden zur *in vivo* Applikation von siRNAs ist die Injektion in die Schwanzvene von Mäusen. Ein direktes Einbringen über den Blutkreislauf bringt jedoch Probleme mit sich. Zum einen werden freie Oligonukleotide von Leber und Nieren aus dem Blut herausgefiltert. Aus diesem Grunde wird das oben angesprochene Verfahren auch überwiegend dann verwendet, wenn Zielgene in Leber und Niere angesprochen werden sollen. Zum anderen werden unmodifizierte Oligonukleotide sehr schnell von Nukleasen abgebaut oder wie andere körperfremde Makromoleküle phagozytiert. Für eine Applikation *in vivo*, aber auch in Zellkultur, sind daher modifizierte Oligonukleotide besser geeignet. In dieser Hinsicht ist die Phosphorothioatmodifikation doppelt hilfreich. Sie verlängert nicht nur die Halbwertszeit des Oligonukleotids in der Zelle, sondern erleichtert auch dessen zelluläre Aufnahme, da die Thiolgruppen mit Oberflächenproteinen der Zellen wechselwirken und damit eine adsorptive Endozytose erleichtern.

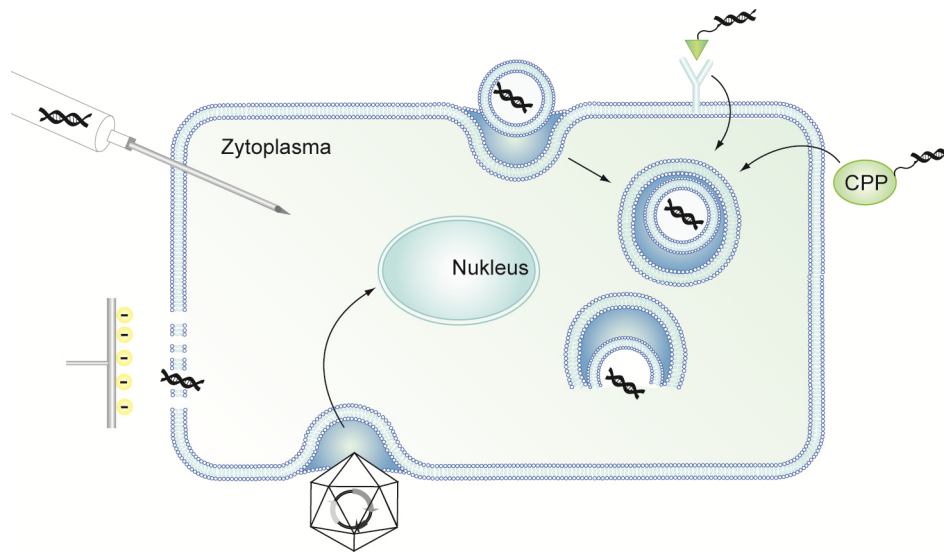
Wie effektiv dieser Weg ist, hängt sowohl von den Oligonukleotiden im einzelnen, als auch vom Zelltyp und Zellzyklus ab. Und auch wenn die Aufnahme in die Zelle mit verhältnismäßig guten Ausbeuten gelingt, steht das Oligonukleotid noch nicht am Wirkort zur Verfügung, sondern muss erst das Endosom verlassen. Bei zu langer Verweildauer ist sonst ein lysosomaler Verdau wahrscheinlich.<sup>[75]</sup>

DNA-analoge Strukturen wie PNA und Morpholinos sind ungeladen. Daher binden sie kaum an die Zelloberfläche und können nicht endozytotisch aufgenommen werden. Um diese Moleküle in die Zelle einzubringen und auch um die relativ ineffiziente Methode der adsorptiven Endozytose zu ersetzen, wird vielfach mit kationischer Lipofektion gearbeitet. Kationische Lipide schirmen die negative Gesamtladung der Oligonukleotide ab und vereinfachen eine Endozytose. Doch auch die Lipofektion hat Nachteile. In hohen Konzentrationen wirken die Kationen toxisch. Neben Liposomen eignen sich auch andere polykationische Strukturen zur siRNA-*delivery*, z.B. Polymere wie Polyethylenimin, welches bereits erfolgreich in Mäusen angewendet wurde. Seine positive Gesamtladung kompensiert die negative Ladung der siRNA und destabilisiert zudem die Endosomen, in denen die siRNA aufgenommen wird, sodass diese in der Zelle leichter aus den Endosomen entkommen kann.<sup>[76]</sup>

Eine andere Alternative ist der *carrier*-vermittelte Transport in die Zelle. Hierbei werden die Oligonukleotide kovalent an ein *carrier*-Molekül gebunden. Durch die Wahl eines geeigneten *carriers* wird nicht nur die Aufnahme verbessert, sondern es können auch gezielt bestimmte Zelltypen angesprochen werden, die einen spezifischen Rezeptor aufweisen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass auch der *carrier* selbst als Effektor wirken kann und ggf. unerwünschte Effekte hervorrufen kann. Als *carrier* kommen vor allem Cholesterol und *cell-penetrating-peptides* (CPPs), wie z.B. das HIV-Tat-Peptid, zum Einsatz.<sup>[77],[78]</sup>

Besonders vielversprechend ist eine zellspezifische Applikation von siRNA, da auf diese Weise die Dosis niedriger und auch mögliche Nebenwirkungen in anderem Gewebe gering gehalten werden können. Ein Beispiel dafür ist die Einführung einer siRNA durch

nichtkovalente Verknüpfung mit einem Antikörperfragment, mit dem es möglich war, eine siRNA spezifisch in HIV-infizierte T-Zellen und Tumorzellen einzubringen.<sup>[79]</sup> Auch Nucleinsäuren selbst können zur Transfektion von siRNA genutzt werden. Durch Kupplung einer siRNA an ein antigenbindendes Aptamer gelang es, diese spezifisch in Prostatakrebszellen, die bestimmte Membranproteine aufwiesen, einzubringen. Hier war die siRNA über Streptavidin an das Aptamer gebunden. Eine direkte Kupplung von siRNA und Aptamer vereinfacht die Synthese und Dicer kann die siRNA in der Zelle vom Aptamer abtrennen.



**Abb. 20 Übersicht über ausgewählte Methoden zur Applikation von siRNA. Nähere Erläuterungen siehe Text.**

Ein weiteres großes Problem stellt häufig die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke dar. Hier hat es sich als erfolgreich herausgestellt, eine siRNA an ein Glykoprotein zu koppeln, welches spezifisch an neuronale Acetylcholinrezeptoren bindet.

Für die Untersuchung einzelner Zellen ist die Mikroinjektion geeignet, bei der die Oligonucleotidlösung direkt mit einer sehr feinen Nadel in die Zelle verbracht werden. Diese Methode ist jedoch aufwändig und ist daher für die Transfektion ganzer Kulturen oder eine Anwendungen *in vivo* nicht praktikabel.

Als letzte Möglichkeit sei die Elektroporation erwähnt. Hierbei wird die Zellmembran durch das Anlegen eines elektrischen Feldes permeabilisiert. In der umgebenden Lösung befindliche Substanzen, wie z.B. Oligonucleotide werden so unspezifisch von der Zelle aufgenommen. Die Effizienz der Elektroporation ist allerdings gering.

Um RNA Interferenz in der Zelle zu stimulieren, muss man aber nicht zwangsläufig reife siRNA in die Zelle einbringen. Es besteht auch die Möglichkeit, die Zelle dazu zu bringen, einen Vorläufer zur siRNA, z.B. eine *short hairpin RNA* (shRNA) die dann von Dicer

prozessiert wird, selbst zu exprimieren. Hierzu ist es üblich den Bauplan für die shRNA mit Hilfe viraler Vektoren in die Zelle einzuschleusen. Je nach gewünschten Eigenschaften wählt man dazu aus verschiedenen Virustypen aus. Retroviren integrieren ihr Erbgut in das des Wirtes, sodass diese dann als Vektor verwendet werden, wenn eine dauerhafte Expression der shRNA angestrebt ist. Eine potentielle Nebenwirkung ist dabei die insertionsinduzierte Mutation des Wirtserbgutes durch Zerstörung wichtiger Gene oder Aktivierung benachbarter Gene.<sup>[80]</sup> Die retrovirale Insertion von shRNA-Genen gegen Oncogene und das Hepatitis C Virus (HCV), wird bereits in klinischen Studien getestet. Adenovirale Vektoren werden nicht ins Zellerbgut insertiert sondern bleiben in Episomen und werden autonom repliziert, womit man die Möglichkeit dadurch hervorgerufener Mutationen umgeht. Die Expression ist allerdings nicht so stabil und langanhaltend, wie bei retroviral eingebrachten shRNA-Genen. Das Problem, dass adenovirale Vektoren mitunter eine sehr starke Immunantwort auslösen können, wird mittlerweile umgangen, indem man sämtliche viralen codierenden Sequenzen aus den Vektoren entfernt hat. Eine generelle Gefahr bei der Nutzung viraler Vektoren bleibt jedoch die Kontamination mit Wildtyp- bzw. replikationsfähigen Viren.<sup>[81]</sup>

### **1.3.8. Anwendung**

Die Zielstrukturerkennung durch das Effektormolekül geschieht bei der RNA Interferenz über Watson-Crick-Basenpaarung. Daher ist bei einem definierten Zielgen - mit gewisser Variabilität - immer klar, wie die zugehörige siRNA aussehen muss. Folglich geht die Entwicklung von siRNAs als Therapeutika oder zur Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen verhältnismäßig schnell, vor allem, wenn man es mit dem Screening nach einem geeigneten kleinen Molekül für dieselben Anwendungen vergleicht. Andere funktionelle Oligonukleotide wie *antisense*-DNA oder Ribozyme befinden sich schon seit langer Zeit in der klinischen Entwicklung. Die Übertragbarkeit der Erfahrungen aus diesen Studien ermöglichte es, dass siRNA schon innerhalb weniger Jahre nach der Entdeckung der RNA Interferenz sehr breit angewendet wurde.

#### *UNTERSUCHUNG VON GENFUNKTION*

Seit dem Jahr 2000 ist das menschliche Genom vollständig entschlüsselt. Dies heißt aber zunächst einmal nicht mehr, als dass die Basenabfolge bekannt ist. Die Funktion vieler Gene liegt noch völlig im Dunklen. Ein Ansatz, die Funktion unbekannter Gene zu bestimmen, ist die sogenannte Funktionsverlustuntersuchung. Hierzu wird ein Gen ausgeschaltet und über den daraus resultierenden Phänotyp Rückschlüsse auf die Funktion dieses Gens gezogen. Funktionsverlust kann man durch knock-out erreichen, das heißt das Zielgen wird durch gezielte Genmodifikation aus dem Genom entfernt. Auch mit kleinen

Molekülen kann man die Genexpression manipulieren. Beide Methoden kosten aber sehr viel Zeit.

Die Vorteile von siRNAs in dieser Anwendung sind vielseitig. Zum einen ist eine passende siRNA schnell identifiziert, da ihre Basenabfolge durch die Sequenz und Struktur der Ziel-mRNA eingegrenzt ist. Außerdem gibt es Proteine, die in verschiedenen Isoformen exprimiert werden. Indem man die hierfür verantwortlichen Sequenzabschnitte mit einer siRNA angreift, kann man gezielt einzelne Isoformen ausschalten, was mit kleinen Molekülen kaum möglich ist. Und auch wenn ein kleines Molekül als Inhibitor zum Einsatz kommen soll, ist es hilfreich, zunächst mit einer siRNA die Zielstruktur zu verifizieren, bevor man auf ein kleines Molekül testet. Lediglich die Möglichkeit von unspezifischen Effekten sollte stets bedacht werden, wobei die Wahrscheinlichkeit dieser minimiert werden kann, indem mehrere siRNAs gegen ein und das selbe Zielgen verwendet werden.

#### *siRNA THERAPEUTIKA*

siRNAs werden bereits seit einiger Zeit auch als Medikamente getestet. Offensichtlich bieten sich siRNAs vor allem für Krankheiten mit genetischer Disposition oder virale Infektionen an und auf diesen Gebieten wurden bisher auch die größten Fortschritte erzielt.

Ein großes Problem stellt nach wie vor die systemische Verfügbarkeit von siRNAs dar, weshalb sich das Auge, als nicht invasiv zugängliches, von umliegendem Gewebe gut abgegrenztes Organ mit geringer Nukleaseaktivität hervorragend für die Anwendung von siRNA Therapeutika eignet. So adressieren die bislang einzigen beiden FDA (*food & drug administration* der USA) zugelassenen siRNA-Medikamente die altersbedingte Makuladegeneration, kurz AMD, welche die häufigste Erblindungsursache in den Industrienationen darstellt. Appliziert wird in diesem Fall durch intravitreale Injektion.

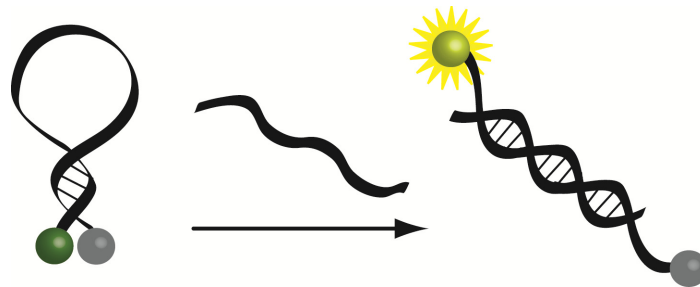
Virale Pandemien stellen in der heutigen global mobilen Bevölkerung eine zunehmend starke Bedrohung dar. HIV sowie HBV und HCV verbreiten sich in Drittweltländern immer noch stark. Gegen virale Infektionen gibt es nur wenige wirksame Medikamente und auch die Vorsorge ist durch die schnelle Mutation, z.B. des Grippevirus', nicht immer einfach. Gerade gegen letzteres Problem bietet sich die Verwendung von siRNAs mit ihrem schnell anzupassenden Design an. Zudem würde man sich bei der Nutzung von siRNA gegen virale Infektionen einen Zellmechanismus, der vermutlich zu genau diesem Zweck entstanden ist, zunutze machen. Doch ganz so einfach wie es scheint, ist es nicht. Virale RNA besitzt eine ausgeprägte Sekundärstruktur und ist daher für den RISC nur eingeschränkt zugänglich. Zudem können Viren, die zunächst erfolgreich durch eine siRNA reprimiert werden nach einiger Zeit diesem Einfluss entgehen, indem sie sehr schnell Punktmutationen ausbilden. Dieser Mechanismus wird *viral-escape* genannt. Um diese Entziehung durch das Virus zu umgehen, ist es entweder hilfreich hochkonservierte Bereich im viralen Erbgut zu adressieren - sofern diese strukturell zugänglich sind - oder nicht das Virus ins Visier zu nehmen, sondern von diesem benötigte zelluläre Strukturen auszuschalten. Hier besteht

natürlich die Einschränkung, dass die entsprechenden Proteine für die Zelle selbst nicht essenziell sein dürfen. Als bisher beste Strategie hat es sich erwiesen, das Virus an mehreren Fronten zu bekämpfen. So ist der aktuell erfolgreichste Ansatz zur Bekämpfung von HIV mit Oligonukleotidmedikamenten, eine Kombinationsgabe von siRNA, Ribozym und Decoy mit sowohl viralen Proteinen als auch einem zellulären HIV-Rezeptor als Zielstruktur. Krebsleiden bieten viele Angriffspunkte für die RNA Interferenz. Die Blockierung von Oncogenexpression ist nur der offensichtlichste. Tumore sind zudem auf die Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, angewiesen, um mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt zu werden. Unterbindet man die Angiogenese drückt man den Tumoren buchstäblich die Luft ab.<sup>[82]</sup> Andererseits stellt häufig nicht der Primärtumor selbst, der chirurgisch entfernt werden kann, das größte Problem dar, sondern das Neuwachstum des Tumors oder die Metastasierung. Hier wurden bei der Inhibierung des Neuwachstums operativ entfernter Tumoren im menschlichen Gehirn erstaunliche Ergebnisse erzielt.<sup>[65]</sup> Außerdem bilden viel Tumore durch die Expression einer sogenannten *multi-drug-resistance* (mdr) eine Resistenz gegen die eingesetzten Medikamente einer Chemotherapie aus. Durch Ausschalten dieser mdr kann es gelingen, die Zellen wieder anfällig für die Chemotherapeutika zu machen.



### 1.4. *Molecular beacons*

*Molecular beacons*, zu Deutsch „molekulare Leuchtfeuer“ sind kleine Oligonukleotidhaarnadeln, die bei Erkennung eines definierten Biomoleküls Fluoreszenz emittieren. Üblicherweise handelt es sich bei den Zielmolekülen um DNA- oder RNA-Oligonukleotide, deren Sequenz komplementär zur ungepaarten Schleife des beacons ist. Da die Hybridisierung mit der Zielsequenz thermodynamisch günstiger ist, als allein die Basenpaarung des Haarnadelstammes, öffnet sich die Struktur sobald die Zielsequenz gebunden wird. An jeweils einem Ende der Haarnadel sitzen ein Fluorophor und ein passender Quencher, der die Lichtemission des Fluorophors in räumlicher Nähe zu diesem, also bei geschlossenem Stamm, unterdrückt. Daher geht die Bindung an eine Zielsequenz und das daraus resultierende Öffnen der Haarnadel mit einer auftretenden Fluoreszenz einher.



**Abb. 21 Funktionsweise eines *molecular beacon*. Sind Fluorophor (grün) und Quencher (grau) in räumlicher Nähe zueinander, tritt keine Fluoreszenz auf. Wird die Haarnadel durch Hybridisierung an eine Zielsequenz aufgewunden ist Fluoreszenz detektierbar.**

Auf diese Weise können *molecular beacons* sehr spezifisch die Anwesenheit einer komplementären Sequenz anzeigen. *Molecular beacons* können jedoch nicht ausschließlich zur Detektion von Oligonukleotiden eingesetzt werden, sondern binden ebenfalls hoch selektiv und affin an Proteinoberflächen oder kleine Moleküle. Das macht sie zu wertvollen Werkzeugen in biologischen und biomedizinischen Anwendungen z.B. als Sonden bei real time PCR und Genotypisierung, zum Erkennen von Mutationen wie Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs), als Biosensoren oder Biochips, zum Beobachten von mRNA in lebenden Zellen, zur Detektion von Krebszellen und zur Untersuchung von Enzymreaktionen oder generell von Oligonukleotid-Protein-Wechselwirkungen.

Die Detektion von Zielstrukturen durch Binden komplementärer Oligonukleotide ist nicht neu. *Northern-* und *Southern-Blots* nutzen markierte Oligonukleotidsonden um immobilisierte Zielstrukturen, meist aus Zellextrakten zu identifizieren. Der Nachteil hier ist jedoch das aufwändige Verfahren. Die interessierenden Oligonukleotide müssen zunächst an eine Matrix gebunden und diese nach Inkubation der Sonden gewaschen werden, um unspezifisch und nicht gebundene Sonden zu entfernen. Eine seit langem angewendete

Methode zur Untersuchung von Oligonukleotiden in ganzen Zellen mit Fluoreszenzsonden ist die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung *FISH*. Doch auch dabei fallen Waschschriffe an und wie beim *Blotting* ist eine Isolierung des Sonden-Zielsequenz-Konstrukts erforderlich.

Ein *molecular beacon* hat hier deutliche Vorteile. Er fluoresziert idealerweise ausschließlich, wenn die Zielsequenz gebunden ist. Dadurch ist das Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zu anders konstruierten Sonden erheblich verbessert. Dies macht ein aufwändiges Entfernen überschüssiger, nicht gebundener Sonden oder wahlweise eine Amplifikation geringer Zielsequenzmengen unnötig. D.h. auch eine Isolierung der Zielsequenz oder des Sonden-Zielsequenz-Hybrides fällt weg, was eine kontinuierliche Detektion von Zielsequenzen ermöglicht und das auch in intakten Zellen. Außerdem übertrifft eine Haarnadelsonde, wie ein *molecular beacon*, eine lineare Sonde immer um ein Vielfaches in ihrer Spezifität in einem größeren Temperaturbereich und erlaubt sogar die Diskriminierung von Fehlsequenzen, die sich von der Zielsequenz in nur einem einzigen Nukleotid unterscheiden.

#### **1.4.1. Mechanismus**

##### *KINETIK*

*Molecular beacons* bestehen aus einer SONDENSEQUENZ, die von zwei komplementären Armen flankiert ist. In Abwesenheit der Zielsequenz hybridisieren diese beiden Arme in einer unimolekularen Reaktion, sodass ein Haarnadelkonstrukt gebildet wird, bei dem die SONDENSEQUENZ die Schleife bildet. Die Anwesenheit der Zielsequenz führt zu einer Hybridisierung der SONDENSEQUENZ in einer bimolekularen Reaktion. Da die Schleife innerhalb der Haarnadelstruktur für die Ausbildung einer Doppelhelix zu stark gekrümmt ist, Stamm und Schleife also nicht gleichzeitig doppelsträngig vorliegen können, bricht die Hybridisierung der Schleife an die Zielsequenz immer die Haarnadel auf und führt zu einem linearen Konstrukt.

Aufwinden des Stammes und Hybridisierung der Zielsequenz geschehen nahezu simultan. Dennoch kann der Vorgang in drei Abschnitte eingeteilt werden. Zunächst bindet nur ein Teil der Zielsequenz an die Haarnadelschleife, nämlich genau so viel, wie es in der geschlossenen Konformation möglich ist. Nach und nach binden dann weitere Basen an die Schleife und der Stamm öffnet sich. Ist dies geschehen können auch die restlichen Zielsequenzbasen sehr rasch hybridisieren. Der letzte Schritt sollte am schnellsten vor sich gehen. Es ist anzunehmen, dass dies genauso schnell geschieht, wie die Hybridisierung einer linearen Sonde. Je länger der Stamm ist, desto langsamer geht auch der zweite Initiierungsschritt vonstatten. Die Energiebarriere, die überwunden werden muss, ist höher, je mehr Basen im Stamm getrennt werden müssen. Während ein Beacon mit einem vier bp zählenden Stamm noch annähernd genauso schnell an eine Zielsequenz hybridisiert, wie eine lineare Sonde, dauert der Vorgang bei fünf bp schon wenige Sekunden und bei sechs bp

einige Minuten.<sup>[83]</sup> Dabei spielt auch die Länge der Schleife eine Rolle. Ist sie länger und damit flexibler, können mehr Basen bei geschlossenem Stamm hybridisieren.

#### *THERMODYNAMIK*

Für die thermodynamische Betrachtung von *molecular beacons* sind vor allem zwei Größen von Bedeutung. Die freie Enthalpie des intramolekularen Haarnadelstammes  $\Delta G_S$  und die freie Energie des an die Zielstruktur hybridisierten beacons  $\Delta G_H$ . Diese sind zum Teil durch die jeweiligen Schmelzpunkte  $T_S$  und  $T_H$  charakterisiert, welche natürlich nicht absolut zu bestimmen sind, sondern unter anderem von Faktoren wie Art und Konzentration der Salze im Lösungsmittel und der Konzentration der Nukleinsäuren selbst abhängig sind. Wichtig ist aber die relative Lage zueinander. In jedem Falle muss  $\Delta G_S$  kleiner als  $\Delta G_H$  sein, da andernfalls keine Bindung der Zielstruktur stattfinden kann. Der beacon selbst kann in zwei Formen vorliegen: hybridisiert als Haarnadel oder offen als unstrukturiertes Knäuel. Die Phasenübergangstemperatur von der einen in die andere Form entspricht  $T_S$ . Sie gibt Aufschluss, in welchem Temperaturbereich der beacon überhaupt eingesetzt werden kann, denn in der unstrukturierten Form ist die räumliche Nähe von Fluorophor und Quencher nicht mehr unbedingt gegeben, sodass Fluoreszenz auch ohne Hybridisierung an eine Zielstruktur auftritt.  $T_S$  kann auf zweierlei Art beeinflusst werden, durch die Länge des Stammes und durch dessen Basenzusammensetzung, das gleiche gilt für  $T_H$ . Hier ist man jedoch unter Umständen nicht völlig frei in der Auswahl der Sequenz, da die Zielstruktur eventuell nur in einem gewissen Rahmen frei zu wählen ist. Generell gilt: je näher  $T_S$  und  $T_H$  beieinander liegen, umso spezifischer diskriminiert der beacon zwischen einer Zielsequenz und einer ähnlichen Sequenz mit Fehlpaarungen. Zu vernachlässigen ist hierbei nicht die Entropie, die es überhaupt erst ermöglicht, dass die Schmelztemperatur des kurzen – aber intramolekularen – Stammes in der gleichen Größenordnung liegt, wie die der deutlich längeren – aber intermolekularen – Hybridisierung der Sondenschleife an die Zielsequenz. Gegebenenfalls reicht dann sogar eine einzelne fehlgepaarte Base aus, um den  $T_H$  derart abzusenken, dass die Haarnadel insgesamt energetisch begünstigt ist und damit keine Bindung der Fehlsequenz stattfindet. Tsourkas et. al berichteten zudem, dass eine einzelne Mutation in der Zielsequenz umso größere Auswirkung hat, wenn sie zentral lokalisiert ist.<sup>[83]</sup> Zu beachten ist, dass sich  $T_S$  auf  $T_H$  auswirkt. Erhöht man durch die Wahl eines längeren Stammes dessen Schmelztemperatur, so wird  $T_H$  gleichzeitig leicht abgesenkt, vermutlich dadurch, dass ein Abdissoziieren der Zielsequenz umso wahrscheinlicher wird, je stabiler die alternativ gebildete Struktur energetisch ist. Dabei ist der Effekt umso ausgeprägter, je kürzer die Sondensequenz ist.<sup>[83]</sup> Hier liegt auch der Grund für die gegenüber linearen Sonden erhöhten Spezifität von Haarnadelsonden. Mit der Haarnadel existiert eine Art energetischer Konkurrenzzustand zum Sonden:Zielstruktur-Dimer. Der Enthalpienachteil der Dissoziation wird durch die Hybridisierung des intramolekularen Doppelstranges zum Teil abgefangen. Immer ist auch ein Einfluss der Reportermoleküle auf

die Schmelztemperatur in Betracht zu ziehen. So sind stabilisierende Wechselwirkungen zwischen Fluorophoren und Quenchern dokumentiert, die die Schmelzpunkte der an sie gebundenen Oligonukleotide um einige Grad Celsius erhöhen können.<sup>[84]</sup> Außerdem ist die Fähigkeit einzelner Fluorophore zur Interkalation oder anderweitigen Wechselwirkungen mit doppelsträngigen Oligonukleotiden bekannt.<sup>[85]</sup>

$\Delta G_S$  und  $\Delta G_H$  bestimmen also im Wesentlichen die Konkurrenz zwischen Zielmolekülbindung und Haarnadelbildung. Sie ergeben sich aus der jeweiligen Länge und Basenzusammensetzung des Stammes bzw. des Hybrides aus Schleife und Zielsequenz und der Ionenstärke des umgebenden Mediums sowie der Temperatur. Unter definierten Voraussetzungen lassen sich aus der Differenz aus  $\Delta G_S$  und  $\Delta G_H$  Stabilität, Spezifität und Bindungskonstanten abschätzen.

#### FLUORESZENZ

In der geschlossenen Konformation emittiert der Beacon keine Fluoreszenz, da das angeregte Fluorophor seine Energie auf den Quencher überträgt, der diese seinerseits meist in Form von Wärme wieder abgibt. Die Energieübertragung findet bei den meisten Fluorophor-Quencher-Paaren nach einem Förster-Resonanzenergietransfer-Mechanismus (FRET-Mechanismus) statt, seltener zusätzlich auch mittels direkter Energieübertragung durch Kollision. Beim FRET handelt es sich um einen strahlungslosen Übergang der Energie eines angeregten Donors auf einen Akzeptor. Die Energie wird rein über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen übertragen. Voraussetzungen für einen effektiven FRET sind eine große Überlappung des Donoremissionsspektrums und des Akzeptorabsorptionsspektrums. In großem Ausmaß bestimmt auch der Abstand von Donor und Akzeptor die Effizienz des Energietransfers, die mit der sechsten Potenz des Abstands abnimmt. Üblicherweise liegt dieser Abstand im einstelligen Nanometerbereich. Der Akzeptor kann, muss aber nicht zwangsläufig ein Quencher sein. Eine wichtige Kenngröße bei der Beschreibung eines Fluorophors ist der Stokesshift. Dieser beschreibt die Verschiebung der Emissionswellenlänge im Vergleich zur absorbierten Wellenlänge. Um zu vermeiden, dass auch das eingestrahelte Licht teilweise in den Detektor gelangt, ist ein möglichst großer Stokesshift erstrebenswert.

#### 1.4.2. Design

Das grundsätzliche Design eines *molecular beacons* erscheint recht einfach. Man benötigt eine Haarnadelstruktur, deren Stamm bei Umgebungstemperatur zuverlässig hybridisiert ist und deren Schleife lang genug ist, um durch Hybridisierung an die Zielsequenz die Basenpaarung des Stammes aufzubrechen. Da die Bildung der intramolekularen Haarnadel gegenüber dem intermolekularen linearen Konstrukt entropisch bevorzugt ist, muss die Schleife deutlich länger sein, als der Stamm. Kramer und Tyagi, die den *molecular beacon*

1995 entwickelten, sprechen von der Erfordernis einer Schleife, die mindestens doppelt so lang ist, wie der Stamm.<sup>[86]</sup> Üblicherweise wählt man heute einen Stamm von fünf bis sieben Basenpaaren. Ist der Stamm zu kurz, geht dies zu Lasten der Spezifität des beacons und erhöht den Fluoreszenzhintergrund, ist er zu lang nimmt die Hybridisierungsrate ab. Hier muss man, je nach Anwendung, entscheiden, welches Kriterium wichtiger ist. Bei Mutationsstudien wie der Einzelnukleotid-Polymorphismen-Genotypisierung (SNP-*genotyping*) ist eine hohe Spezifität erwünscht. Bei *in vivo* Anwendung, wie dem Beobachten von mRNA in Zellen ist eine schnelle Hybridisierung wichtiger. Üblicherweise partizipieren die Stammbasen nicht an der Bindung der Zielstruktur. Es gibt jedoch auch Varianten, bei denen beispielsweise ein Arm des Stammes an der Zielsequenzhybridisierung beteiligt ist.<sup>[87]</sup> Die Sequenz der Schleife ist einerseits vorgegeben durch die Zielsequenz, die gebunden werden soll, muss aber auch eine gewisse Mindestschmelztemperatur aufweisen. Bei der Auswahl der Zielsequenz ist darauf zu achten, dass diese für den Beacon zugänglich ist, also nicht etwa durch Sekundärstrukturen oder RNA-bindende Proteine blockiert und dass sie möglichst einzigartig ist, was mit dem *basic local alignment search tool* (BLAST) überprüft werden kann.<sup>[88]</sup> Einzigartigkeit der Sequenz und ausreichend hohe Schmelztemperatur des Hybrides aus Schleife und Zielsequenz können aber nicht durch beliebige Verlängerung der Schleife erreicht werden. Denn je länger diese Sequenz ist, desto geringer wird auch der Einfluss einer einzelnen Basenfehlpaarung, die Spezifität leidet. 15-25, selten bis zu 30 Basen ist die gängige Länge der Schleife der meisten beacons. Die Schmelztemperatur ist darüber hinaus vor allem über den G-C Gehalt zu steuern.

Nicht nur die Zielsequenz kann unerwünschte Sekundärstrukturen aufweisen. Ist eine vielversprechende Sequenz für den *molecular beacon* gefunden, sollte auch diese auf mögliche Alternativkonformationen untersucht werden. Oft ist die Haarnadelstruktur nicht die einzig stabile oder nur unter sehr eingeschränkten Voraussetzungen. Hilfreich ist hier z.B. das Programm *mfold*.<sup>[89]</sup>

Auf Grund der Kürze des Stammes ist die Variation von dessen Sequenz relativ begrenzt. Zudem möchte man mit einem möglichst kurzen Stamm meist eine möglichst hohe Schmelztemperatur erzielen, sodass der GC-Gehalt üblicherweise sehr hoch ist. Sequenzvorgaben muss man lediglich beachten, wenn ein Arm des Stammes in einem sog. *shared-stem molecular beacon* an der Zielsequenzbindung beteiligt werden soll.<sup>[87]</sup> Ansonsten ist lediglich darauf zu achten, dass sich am 5'-Ende, wo üblicherweise das Fluorophor gebunden ist, kein Guanosin befindet, da dieses auch Quencheigenschaften aufweist.<sup>[90]</sup>

Die Hybridisierung der Stammbasen sollte vor einer Dimerbildung aus zwei *molecular beacons* bevorzugt sein. Dennoch kann es vorkommen, dass sich unter bestimmten Voraussetzungen Dimere bilden können, die stabiler sind, als die Haarnadel. Das ist jedoch vor allem dann problematisch, wenn das Dimer Überhänge aufweist, da dann Fluorophor und Quencher möglicherweise für einen FRET zu weit voneinander entfernt sind. Die Hintergrundfluoreszenz wäre stark erhöht.<sup>[91]</sup> Inzwischen findet sich im Internet kostenlose

Software wie *Beacon Design* zur Unterstützung bei der Erstellung der optimalen *molecular beacon* Sequenz.<sup>[144]</sup>

Einfacher, als das Design der optimalen Sequenz, wenn auch nicht gänzlich zu vernachlässigen, ist die Wahl von Fluorophor und Quencher. Doch auch hier gibt es Spielraum, vor allem beim Signal-Rausch-Verhältnis, das je nach FRET-Paar durchaus deutlich variieren kann. Insbesondere wenn sehr geringe Mengen eines Oligonukleotids nachgewiesen werden sollen, sind hier gute Werte erforderlich. Außerdem ist die Verwendung mehrerer beacons in einem einzigen Assay - sogenanntes Multiplexen - möglich, wenn man verschiedene Fluorophore ohne Überlappung in der Emission wählt. Auch sind etliche *molecular beacon*-Varianten beschrieben, die ohne Quencher auskommen. Neben der bereits erwähnten Option, durch ein terminales Guanosin zu quenchen, gibt es auch Versuche, Goldpartikel als Quencher zu verwenden.<sup>[92]</sup> Verschiedene Arten quencherfreier *molecular beacons* hat Venkatesan zusammengetragen.<sup>[93]</sup>

### 1.4.3. Modifikationen

Die ursprüngliche Idee Tyagis und Kramers, FRET-markierte DNA-Haarnadeln als Sonden zur Detektion komplementärer Oligonukleotide einzusetzen, wurde mit der Zeit mehrfach abgewandelt und verbessert. Diese Verbesserungen umfassen zum einen die üblichen chemischen Modifikationen von Oligonukleotiden, um deren Stabilität und Selektivität zu erhöhen, zum anderen aber auch die Struktur der Sonden selbst, sowie Variationen bei den Reporter- und Quencher-molekülen.

#### CHEMISCHE MODIFIKATIONEN

Wie für alle Oligonukleotide, die in Zellen verbraucht werden, besteht für *molecular beacons* die Gefahr des Nukleaseabbaus. Sind Fluorophor und Quencher über das Phosphat mit dem Oligonukleotid verknüpft, was üblicherweise zutrifft, so ist der *molecular beacon* immerhin gegen einen Exonukleaseabbau geschützt. Die einzelsträngige Schleifensequenz ist aber nach wie vor anfällig für den Abbau durch Endonukleasen. Im Falle von *molecular beacons* ist dies besonders problematisch, da damit nicht nur die Zahl der intakten Sonden verringert (und somit bei quantitativen Fragestellungen verfälscht) wird, sondern ein Verdau der Schleife durch Endonukleasen auch die Stammhybridisierung enorm destabilisiert, sodass dieser sich öffnet und die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Hier schaffen die bekannten chemisch modifizierten Nukleotide Abhilfe.

Über die Verwendung der sehr gängigen PS-, 2'-OMe- und PNA-Modifikation wurde zwar berichtet, diese eignen sich allerdings nur bedingt für den Einsatz in *molecular beacons*. Der Einbau von 2'-OMe-Nukleotiden verbessert zwar, wie von anderen Anwendungen bekannt, die Nukleasestabilität, allerdings erhöht diese Modifikation offenbar die Affinität für eine Proteinbindung, was zur Absenkung der Hintergrundfluoreszenz kontraproduktiv ist.<sup>[94]</sup>

Phosphorothioatmodifizierte *molecular beacons* wurden in verschiedenen Studien erfolgreich verwendet, wenngleich die bereits aus anderen Anwendungen bekannte Tendenz von PS-Oligonukleotiden, im Zytoplasma zu PS-Körpern zu aggregieren auch bestätigt und geringere Bindungsraten gemessen wurden.<sup>[95],[96]</sup> PNA konnte mit den bekannten Vor- und Nachteilen ungeladener Nukleotidanaloga eingesetzt werden. Sie schützt zwar zuverlässig vor einem Nukleaseabbau, führt aber zu einer geringeren Löslichkeit in wässriger Umgebung. Vor allem LNA eignet sich auf Grund ihrer Eigenschaft die Schmelzpunkte und damit die Selektivität zu erhöhen, hervorragend für den Einbau in *molecular beacons*. Und ist die durch Modifikationen oft nicht mehr gegebene Erkennung eines abzubauenen Doppelstranges durch Nukleasen bei *antisense*- oder siRNA-Anwendungen üblicherweise eher von Nachteil, ist sie im Falle von *molecular beacons* durchaus als vorteilhaft anzusehen, schützt sie doch die gebundene mRNA vor ungewolltem RNase H-Abbau. Beim Einsatz von LNA-Nukleotiden muss jedoch die Kinetik im Auge behalten werden. Durch die extreme Schmelzpunkterhöhung (> 95 °C für einen *molecular beacon* mit einem sechs bp Stamm) nimmt die Hybridisierungsgeschwindigkeit stark ab. Es empfiehlt sich daher in einem *molecular beacon* die einzelnen Nukleotide nur teilweise durch LNA zu ersetzen. Der Einsatz eines *molecular beacon* mit alternierenden DNA und LNA Nukleotiden hat sich als praktikabel erwiesen.<sup>[97]</sup>

#### ASSAYVARIATIONEN

Auch die Sonden selbst haben bei *molecular beacon*-Assays häufige Abwandlung erfahren. Antrieb war dabei neben einer verbesserten Spezifität vor allem das Ziel, das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Diese Absicht konnte auf verschiedene Weise realisiert werden. Zeichnen sich *molecular beacons* bei *in vitro* Anwendungen durch einen sehr geringen Hintergrund aus, so musste bei *in vivo* Anwendungen oft festgestellt werden, dass die beacons die in sie gesetzten Erwartungen diesbezüglich nicht erfüllen konnten. Vor allem Nukleaseabbau, aber auch unspezifische Bindung an Proteine führen oft zu einem ungewollten Öffnen der Haarnadel.

Ein sehr vielversprechender Ansatz ist die Verwendung von Dual-FRET-*molecular beacons* also zweier Sonden für die Detektion einer einzigen Zielsequenz. Jede Sonde für sich besteht aus einem Fluorophor-Quencher-Paar, das die jeweilige Fluoreszenz im geschlossenen Haarnadelzustand unterdrückt. Der Trick ist dabei, das auch die beiden Fluorophore untereinander ein FRET-Paar darstellen.



**Abb. 22 In Dual-FRET-*molecular beacon*-Assays werden zwei MBs eingesetzt, deren Fluorophore ebenfalls ein FRET-Paar darstellen.**

Binden nun beide Fluorophore in direkter Nachbarschaft auf der Zielsequenz, kann das Fluorophor der Akzeptorsonde, angeregt durch Energietransfer des Fluorophors der Donorsonde, seinerseits fluoreszieren. Da von außen kein Licht in der Anregungswellenlänge des Akzeptorfluorophors eingestrahlt wird, fluoresziert es ausschließlich dann, wenn beide Sonden die Zielsequenz gebunden haben. Ein Öffnen der Akzeptorsonde durch unspezifische Bindung oder Nukleaseabbau führt nicht zu einem falschpositiven Signal.<sup>[98]</sup> Zudem weist dieser Ansatz zusätzlich die Vorteile wellenlängenverschiebender *molecular beacons* auf, die im nachfolgenden Absatz beschrieben werden. Dual-FRET-*molecular beacon* weisen noch eine weitere Neuerung gegenüber konventionellen *molecular beacons* auf. Sie sind üblicherweise sogenannte *shared stem molecular beacons*, d.h. *molecular beacons* deren einer Stammarm gleichzeitig auch in die Zielsequenzhybridisierung eingebunden ist.<sup>[87]</sup> Dies ist notwendig, um zu gewährleisten, dass die beiden Fluorophore nach der Hybridisierung an die Zielsequenz räumlich nahe genug zueinander stehen, damit ein effektiver FRET stattfinden kann.

Mit wellenlängenverschiebenden *molecular beacons* konnte eine Verbesserung der Signalstärke erreicht werden. Diese besitzen einen Quencher aber zwei Fluorophore, wovon eines optimal die eingestrahlte Wellenlänge absorbiert, die Energie dann aber an das zweite Fluorophor transferiert, welches das letztlich detektierte Signal emittiert.



**Abb. 23 Wellenlängenverschiebende MBs besitzen ein Akzeptor- und ein Donorfluorophor, was den Stokesshift erhöht und somit zu einer verringerten Hintergrundfluoreszenz führt.**

Dadurch, dass hier zweimal ein Stokesshift auftritt, ist die Wellenlängenverschiebung zwischen eingestrahlttem und emittiertem Licht größer. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Teil des eingestrahltten Lichts mit detektiert wird nimmt ab und auch möglicherweise auftretende Autofluoreszenz zellulärer Bestandteile kann das Signal nun nicht verfälschen, da dort der Stokesshift kleiner ist und somit die emittierte Wellenlänge in einem anderen Bereich liegt, als die des Sondensignals.<sup>[99]</sup>

#### FLUOROPHOR- UND QUENCHERABWANDLUNGEN

Neben der Vermeidung unspezifischen Öffnens des *molecular beacon* können auch Veränderungen direkt an Fluorophor und/oder Quencher das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern. Grundsätzlich gibt es zwei Ansätze. Entweder man verbessert die Quencheffizienz oder man verstärkt das Signal.

Eine verbesserte Quencheffizienz erzielt man beispielsweise durch die Verwendung von *superquenching-molecular beacons*. Diese *molecular beacons* tragen nicht nur einen, sondern mehrere Quencher an ihrem 3'-Ende, womit eine 320-fache Signalverstärkung erzielt



werden konnte, was einer über 20-fachen Verbesserung gegenüber dem selben FRET-Paar mit nur einem Quencher entspricht.<sup>[100]</sup>

Neben den klassischen organischen Fluorphorderivaten von Fluoreszein, Rhodamin oder Cyanin, gibt es weitere Reporter-moleküle, deren Einsatz in *molecular beacons* getestet wurde und die eine teils drastisch erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu den herkömmlichen Fluorophoren zeigen. Hier seien vor allem die Quantenpunkte genannt, die gleich mehrere Vorteile aufweisen. So weisen sie ein breites Absorptions- aber sehr scharfes Emissionsspektrum auf, was einen sehr großen effektiven Stokes-shift ermöglicht. Im Hinblick auf Multiplexanwendungen ist es außerdem von Vorteil, dass Quantenpunkte, die bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren, trotzdem bei ein und derselben Wellenlänge absorbieren können. Zudem sind Quantenpunkte deutlich photostabiler, als organische Fluorophore, was insbesondere bei der Langzeitbeobachtung von RNAs in lebenden Zellen ein wichtiges Kriterium ist.<sup>[101]</sup> Ein unspezifisches Öffnen von *molecular beacons* wird besonders stark im Nukleus beobachtet. Da quantenpunktgebundene *molecular beacons* für einen Eintritt in den Nukleus durch die Poren zu groß sind und sie damit im Zytoplasma verbleiben, tritt auch die im Kern verursachte unspezifische Hintergrundfluoreszenz nicht auf.<sup>[102]</sup>

#### **1.4.4. Delivery**

Die bekannten Strategien zum Einbringen von Oligonukleotiden in Zellen können für *molecular beacons* zum Teil übernommen werden. Für *molecular beacons* genauso wie für unmodifizierte Oligonukleotide funktioniert die kationische Transfektion, wenn auch mit mäßigen Ausbeuten unter 80 %. Zudem ist die Aufnahme langsam. Das stundenlange Verbleiben in Endosomen erhöht die Wahrscheinlichkeit eines Endonukleaseabbaus und damit das Hintergrundsignal. Auch verteilen sich die eingebrachten *molecular beacons* häufig nicht gleichmäßig, sondern akkumulieren an einzelnen Punkten.

Eine nahezu 100 %ige Effizienz beim Einschleusen von *molecular beacons* in Zellen kann mit der Kupplung an Cholesterin und CPPs, vornehmlich HIV-1 Tat erreicht werden. Zudem ist die Aufnahme erheblich schneller, als bei der Lipofektion und auch eine gezielte Adressierung bestimmter Gewebearten ist möglich. Die Verknüpfung mit den Peptiden lässt sich auf verschiedene Weise realisieren. Ein Weg ist, sowohl den *molecular beacon* als auch das Peptid zu biotinylieren und anschließend beide über Streptavidin zu verbinden. Eine andere Möglichkeit geht über die Funktionalisierung als Maleimid und Thiol, um Peptid und *molecular beacon* direkt aneinander zu koppeln. Ein thiolmodifizierter *molecular beacon* kann aber auch über die Knüpfung einer Disulfidbrücke direkt mit einem Cysteinrest des Peptids verbunden werden. Der Vorteil hierbei ist, dass Disulfidbrücken unter zytosolischen Bedingungen rasch reduziert werden, sodass der *molecular beacon* im Zytosol wieder isoliert ohne das Transportmolekül vorliegt.<sup>[103]</sup>

Erfolgreich angewendet wurde auch die Strategie der reversiblen Permeabilisierung der Zellmembran durch porenformende Toxine, womit zum Teil zehnfach höhere *molecular beacon*-Konzentrationen im Zytoplasma erzielt werden konnten als mit Lipofektion. Allerdings bedarf die Anwendung dieser Methode eine sehr umfassende Optimierung auf den jeweiligen Zelltyp und kann zudem nur *ex vivo* in Zellkultur angewendet werden.<sup>[104]</sup>

Eine aufwändige aber gut funktionierende Methode, solange man die *molecular beacons* nur in einzelne Zellen verbringen möchte, ist die Mikroinjektion, bei der die Sonden mit einer extrem feinen Nadel in die Zellen injiziert werden. Ein auftretendes Phänomen, das hierbei nicht nur für *molecular beacons* sondern auch für lineare Sonden beschrieben wird, ist die Akkumulation im Nukleus. Binnen wenigen Minuten wandern auch ins Zytoplasma injizierte Sonden in den Zellkern und verbleiben dort. Eine Möglichkeit, die Sonden im Zytoplasma zu halten, bietet lediglich die Verknüpfung mit größeren Biomolekülen wie beispielsweise Streptavidin, Quantenpunkten oder tRNA.<sup>[102], [105]</sup>

#### 1.4.5. Anwendung

Die Anwendungsmöglichkeiten für *molecular beacons* sind vielseitig und zahlreich. Im Folgenden sind einige gängige und interessante Anwendungen herausgegriffen.

##### *ECHTZEITVERFOLGUNG VON PCR-REAKTIONEN*

In der kontinuierliche Verfolgung von PCR-Reaktionen in Echtzeit, der sogenannten real time PCR finden Fluoreszenzsonden, wie z.B. Taqmansonden schon lange Anwendung. Während des *annealing*-Schrittes in jedem PCR-Zyklus bindet die Sonde an das gebildete Amplifikat. Wenn die Temperatur für die Polymerisationsschritte weiter angehoben wird, dissoziiert die Sonde wieder ab, sodass sie dabei nicht stört. Dies ermöglicht es, während die PCR läuft einen Überblick über die Menge an gebildetem Amplifikat zu behalten, da eine Zunahme desselben mit einer zunehmende Fluoreszenz korreliert. Schon Kramer und Tyagi testeten die von Ihnen entwickelten *molecular beacons* in ihrer ersten Veröffentlichung auf ihre Tauglichkeit in der real time PCR.<sup>[86]</sup> Heute werden *molecular beacons* auf Grund ihrer höheren Sensitivität für minderexprimierte Amplifikate, wegen ihres verbesserten Signal-Rausch-Verhältnisses und wegen ihrer höheren Spezifität sehr häufig in der real time PCR eingesetzt.

Im Multiplexeinsatz, also bei der gleichzeitigen Verwendung verschiedener Sonden mit unterschiedlichen Fluorophoren, haben sich *molecular beacons* bereits in der klinischen Diagnose bewährt. So wurde beispielsweise ein Assay entwickelt, der es ermöglicht in einer einzigen PCR-Reaktion zwischen einer Infektion mit vier verschiedenen Retroviren zu unterscheiden. Dabei gibt der Assay nicht nur Aufschluss, ob und mit welchen der o.g. Viren ein Organismus infiziert ist, sondern auch in welchem Maße. Nur 10 Kopien des einen Retrovirus' können neben 100.000 eines anderen nachgewiesen werden.<sup>[106]</sup>

Die SNP-Genotypisierung beruht ebenfalls auf dem Einsatz von *molecular beacons* in real time-PCR Assays. Der überwiegende Teil der genetischen Unterschiede zwischen Menschen wird durch SNPs hervorgerufen. Daher sind sie aussagekräftige Marker bei der DNA-gestützten Personenidentifizierung. Auch dabei werden bei der PCR gleichzeitig mehrere *molecular beacons* mit SONDENSEQUENZEN gegen die verschiedenen Allele eingesetzt, wobei die mögliche Mutation zentral in der Schleifensequenz detektiert wird, da hier die Auswirkung einer Fehlpaarung am stärksten ist. Auch hier heben sich die *molecular beacons* gegenüber anderen Sonden wieder durch die erhöhte Spezifität hervor und ein Hochdurchsatzverfahren, wie es z.B. für die Erstellung einer Verbrecherkartei nötig ist, wird erst durch die Möglichkeit, mehrere beacons parallel zu verwenden, realisierbar.

#### *BIOCHIPS UND BIOSENSOREN*

*Molecular beacons* lassen sich auf diversen Oberflächen, wie zum Beispiel Glas, Gold oder Agarose immobilisieren. Damit sind sie zugänglich für die Verwendung in Biochips und Biosensoren. Durch die Bindung von biotinylierten *molecular beacons* an die angeätzte Oberfläche einer optischen Faser und Verstärkung des Fluoreszenzsignals bei der Aufnahme z.B. durch die Verwendung von Lawinenfotodioden, können sehr schnell ansprechende, ultraempfindliche Sensoren hergestellt werden. Diese ermöglichen es, Oligonukleotide in Echtzeit und mit hoher Selektivität zu detektieren. Es wurde von Nachweisgrenzen bis zu 300 pM berichtet, wobei zwischen Nukleotiden, die sich um nur eine Base unterscheiden, differenziert werden kann. Die Sensoren sind zudem mehrfach verwendbar und liefern sehr gut reproduzierbare Ergebnisse z.B. bei der Bestimmung von DNA-Bindungskinetiken oder zur mRNA-Detektion. Indem mehrere verschieden belegte Fiberglassonden eingesetzt werden, ist auch eine gleichzeitige Detektion verschiedener Zielsequenzen möglich, ohne dass die Analytlösung durch die Zugabe von Sonden, also Fremddoligonukleotiden, verunreinigt werden müsste.<sup>[107]</sup>

#### *DETEKTION VON PROTEINEN UND KLEINEN MOLEKÜLEN*

Die hochspezifische Bindung komplementärer Basen führt recht schnell zu der naheliegenden Idee, das Vorliegen eines Oligonukleotids durch Bindung des zur Sonde umfunktionierten Gegenstranges anzuzeigen. Darüber hinaus kann man *molecular beacons* aber auch zur Detektion von Proteinen und kleinen Molekülen verwenden.

In einem ersten Versuch machte man sich dazu die spezifische Bindung eines einzelstrangbindenden Proteins in *E. coli* zu Nutze. Die Interaktion mit der Proteinoberfläche führt zu einer Rekonstitution in einem *molecular beacon*, die dergestalt ist, dass sich der Beacon öffnet und die Bindung durch Fluoreszenz angezeigt wird.<sup>[108]</sup> Auch die Wechselwirkung anderer Proteine mit DNA kann durch *molecular beacons* angezeigt werden. So führt z.B. die Bindung von LDH an einen bestimmten *molecular beacon* wie im ersten Fall zu einer Haarnadelöffnung. Möglich ist aber auch eine Destabilisierung des Stammes durch

Nukleaseabbau der Schleife.<sup>[109]</sup> Inzwischen wurden zahlreiche Assays entwickelt, um die Wechselwirkung von Proteinen mit Oligonukleotiden zu verfolgen. Dabei muss nicht unbedingt der Beacon selbst an das Protein binden. Um beispielsweise die Kinetik einer Ligase zu untersuchen, wurde ein *molecular beacon* anstelle einer langen komplementären Sequenz mit zwei kurzen Strängen inkubiert. Die Stränge hybridisierten an die Schleife, jedoch ohne ein Öffnen derselben zu erzwingen. Erst nachdem die beiden einzelnen Stränge durch eine Ligase zu einem verschmolzen, entstand eine lineare Struktur aus *molecular beacon* und der ligierten Sequenz, angezeigt durch die Fluoreszenz des Beacons. Auf diese Weise wurden bereits verschiedene Ligasen sowie der Einfluss von Metallionen, Fehlpaarungen oder kleinen Molekülen auf die Ligation untersucht.<sup>[110]</sup>

Aptamere sind Nukleinsäuren, die vermittelt durch ihre Sekundärstruktur hochspezifisch an bestimmte Proteine binden. Indem man einen Teil der Aptamersequenz gegen ein bestimmtes Protein in einen *molecular beacon* einbindet, erhält man einen *molecular beacon* der hochspezifisch die Anwesenheit dieses Proteins anzeigt. Dies zeigten Yamamoto und Kumar als erste für das TAT-Protein.<sup>[111]</sup>

#### RNA DETEKTION IN LEBENDEN ZELLEN

RNA-Oligonukleotiden werden mehr und mehr Funktionen in biologischen Prozessen zugeordnet. Daher gewinnen Informationen über das Expressionslevel, Lebensdauer und Verteilung der RNAs immer mehr an Bedeutung. Die ersten *in vivo*-Anwendungen von *molecular beacons* dienten der Bestimmung von mRNA-Levels.<sup>[112]</sup> Zwar hat die Verwendung von *molecular beacons* hier die üblichen Vorteile – erhöhte Spezifität und keine Isolierung und Aufreinigung der gebundenen Sonden - oft ist es jedoch problemlos möglich, die Zelle zu lysieren und dann die verschiedenen mRNA-Level zu bestimmen. Möchte man aber den Transport oder die Lokalisation einer mRNA und das evtl. auch noch zeitabhängig verfolgen, ist eine Untersuchung auf diesem Wege nicht mehr möglich. Ein Weg, eine mRNA innerhalb einer intakten Zelle zu verfolgen, ist die plasmidische Coexpression von Fusionsproteinen aus einem Fluoreszenzmarker und einem RNA-bindenden Protein. In den meisten Fällen muss aber auch die Ziel-mRNA von einem Plasmid exprimiert werden, da für eine zuverlässige Bindung des Fusionsproteins Modifikationen, wie spezielle Bindungsstellen, geschaffen werden müssen. Diese Methode birgt daher etliche Nachteile. Zum einen versetzt die Transfektion der Plasmide die Zelle in einen Stresszustand. Da außerdem die Sequenz der exogenen mRNA nicht mit der endogenen Variante übereinstimmt und plasmidische mRNA auch oft überexprimiert wird, sind keine sicheren Rückschlüsse auf die Zustände *in vivo* möglich. *Molecular beacons* hingegen können theoretisch passend für jede endogene mRNA zusammengestellt werden und müssen zudem nicht unbedingt transfiziert werden. Im Jahr 2003 publizierten Tyagi et al. die erfolgreiche Verwendung von *molecular beacons* zur Echtzeitbeobachtung des Transports einer mRNA in Eizellen von *D. melanogaster*.<sup>[113]</sup> Die Anwendung bleibt nicht auf endogene RNA beschränkt. Auch zur Aufklärung der

Verteilung, Dynamik und Kollokalisierung von viraler RNA konnten *molecular beacon*-Studien beitragen.<sup>[104]</sup>

Neben der Rolle endogener RNAs in der Zelle nimmt auch die Bedeutung oligonukleotidbasierter Medikamente, wie siRNA, Aptamere und *antisense*-Oligodesoxynukleotide immer mehr zu. Die Effizienz der Bindung an die kanonischen Zielstrukturen *in vivo* zu untersuchen, ist dabei nicht trivial. *Molecular beacons*, deren Schleife die *antisense*-Sequenz zu einer mRNA enthalten, können dazu genutzt werden, die generelle Zugänglichkeit eines mRNA-Abschnittes unter physiologischen Bedingungen für ein Oligonukleotid zu ermitteln.<sup>[96]</sup>



## 2. Motivation und Zielsetzung

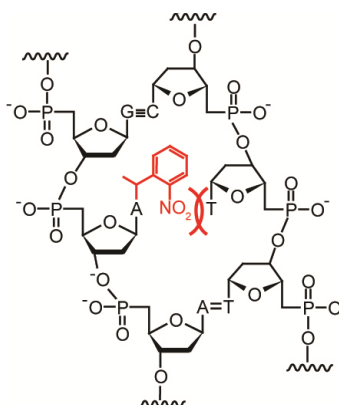
Die Forschung der vergangenen Jahrzehnte hat einen großen Setzkasten interessanter chemischer und molekularbiologischer Methoden hervorgebracht.

Mit der Erfindung der DNA-Festphasensynthese legten Caruthers und Beaucage den Grundstein für die Entwicklung vieler Anwendungen, die heute aus dem modernen molekularbiologischen Labor nicht mehr wegzudenken sind.<sup>[2]</sup> Die vielfältigsten Anwendungen von der Polymerase-Kettenreaktion über therapeutische Oligonukleotide wie siRNA oder ASOs bis hin zu analytischen Oligonukleotidsonden, um nur einen Bruchteil zu nennen, wären nicht denkbar ohne die Möglichkeit, Oligonukleotide in beliebiger Sequenz zusammenzusetzen.

Die Aufklärung des Mechanismus' der RNA-Interferenz durch Fire und Mello stellt einen weiteren Meilenstein in der jüngeren Forschungsgeschichte dar.<sup>[18]</sup> Mit ihrer Hilfe konnte einerseits die Aufklärung der Genfunktion erheblich vorangetrieben und andererseits Ärzten ein vielversprechendes therapeutisches Werkzeug an die Hand gegeben werden, um zukünftig Krankheiten auf Transkriptionsebene zu behandeln. Hierfür wurde im Jahr 2006 der Nobelpreis verliehen.

Aber auch weniger aufsehenerregende Errungenschaften eröffneten einzigartige Optionen. Photolabile Modifikationen, anfangs noch ausschließlich für eine orthogonale Schutzgruppenstrategie eingesetzt, bilden die Grundlage für die Technik des *caging*, der zeitlich und räumlich kontrollierten Freisetzung biologisch aktiver Moleküle.

Kombiniert man diese verschiedenen Methoden miteinander, ergibt sich ein ganz neues Potential.



**Abb. 24 Vereinfachte Darstellung der Auswirkungen einer photolabilen Modifizierung von Nucleobasen in einem DNA-Doppelstrang. Die Photoschutzgruppe besetzt einerseits einen Wasserstoffbrückendonator, führt andererseits aber auch zu sterischen Problemen bei der Doppelstrangbildung.**

Die Möglichkeiten, welche das *caging* bietet, konnten bereits erfolgreich für Nukleinsäuren erschlossen werden. Die präziseste Herangehensweise, um Nukleinsäuren reversibel zu inaktivieren ist die Einführung von Photoschutzgruppen an den Nukleobasen. Diese ermöglichen es, die zentrale Interaktionsstelle von Oligonukleotiden, die Watson-Crick-Site, zu blockieren, um sie räumlich, zeitlich und dosisdefiniert wieder zu aktivieren. Die Technik des *caging* ist im Arbeitskreis Heckel bereits etabliert und es werden neue Photoschutzgruppen für Nukleobasen entwickelt und untersucht.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollten nun Anwendungsmöglichkeiten für diese vielversprechende Technik untersucht werden, indem funktionelle Oligonukleotide photolabil geschützt werden. Die Vorzüge der exakten Ansteuerung lichtaktivierbarer Watson-Crick-Basenpaarung sollte mit interessanten molekularbiologischen Methoden kombiniert werden. Zwei Anwendungen, für die das gelungen ist, sind die RNA-Interferenz und *molecular beacon*-Sonden.

Die RNA-Interferenz – eine vorübergehende Stummschaltung eines bestimmten Gens – setzt ein, sobald das Wirkmolekül, die siRNA, in die Zelle eingebracht wird. Vielfach kann es aber von Interesse sein, dass dies verzögert eintritt oder aber auf einen bestimmten Bereich der Zelle oder des Organismus beschränkt bleibt, z.B. wenn eine konstitutive Ausschaltung des Gens letal ist.

Hier kann eine photoaktivierbare siRNA hilfreich sein. Sie führt nicht sofort und nicht in der kompletten Zelle zum Einsetzen der RNAi, sondern erst nach Bestrahlung und auch nur im bestrahlten Bereich. Darüber hinaus kann über eine Kontrolle der Bestrahlungsdosis auch die Dosis der freigesetzten siRNA moduliert werden. Parallel zu unserer Forschung hierzu wurde auch in anderen Gruppen ein ähnliches Ziel verfolgt und erste Erfolge vermeldet.<sup>[114],[115],[116]</sup>

Jedoch gelang es in diesen Arbeiten nicht, ein vollständiges An-Aus-Verhalten zu erreichen, sodass dieses in den Fokus der vorliegenden Arbeit rückte. Die Herangehensweise basierte darauf, eine Schlüsselposition des enzymatischen Vorganges gezielt zu blockieren, um so die Aktivität der modifizierten siRNA vollständig zu unterbinden und gleichzeitig die Option zu wahren, diese auch wieder komplett zu reaktivieren. Als Modellsystem für die Untersuchungen sollte hierzu der eGFP/RFP-Reportergenassay in HeLa-Zellen dienen. Hierbei handelt es sich um einen gut etablierten Assay, für dessen Reportergene es darüber hinaus bereits erprobte siRNAs gibt.

In einem weiteren Projekt sollte die Technik des *caging* auf *molecular beacons* angewendet werden. *Molecular beacons* sind kleine Oligonukleotidsonden, die auf Grund einer Konformationsänderung bei der Bindung an eine komplementäre Sequenz fluoreszieren. Dies wird unter anderem zur Echtzeitverfolgung des mRNA-Transports in lebenden Zellen



ausgenutzt. Hier tritt aber ein ähnliches Problem, wie bei den siRNAs auf: sobald die *molecular beacons* in die Zelle eingebracht sind, können sie an ihre Zielstruktur binden und fluoreszieren. Dies führt zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz, was die Verfolgung einzelner RNAs erschwert. Auch hier wäre es von großem Vorteil, wenn die *molecular beacons* räumlich begrenzt eingeschaltet werden könnten.

Im Gegensatz zur RNA-Interferenz handelt es sich hier jedoch nicht um einen enzymatischen Vorgang. Daher war zunächst unklar, wie vieler photolabiler Schutzgruppen es bedarf, um die Bindung eines *molecular beacon* an seine Zielstruktur gänzlich zu unterbinden. Klar war, dass dies wesentlich von der Selektivität des verwendeten *molecular beacon* abhängen würde. Zudem stellt ein mehrfach photolabil modifizierter *molecular beacon* ein hochmodifiziertes System dar, dessen Synthese und Aufreinigung nicht trivial sein würden. Darüber hinaus sollte zu dem für *molecular beacons* üblichen reinen Fluoreszenz-*readout* eine weitere Methode gefunden werden, wie die Aktivität eines modifizierten *molecular beacon* beobachtet werden kann, um zwei voneinander unabhängige Assaysysteme zu haben. Es galt, einen geeigneten *molecular beacon* zu finden und auch ein Modellsystem zu etablieren, mit dem das Potential zur Ortsauflösung demonstriert werden kann.

Beide Projekte umfassen in einem ersten Schritt die Oligonukleotidfestphasensynthese einschließlich der chemischen Synthese der photolabil geschützten Vorläufernukleosidphosphoramidite. Darüber hinaus wird es, insbesondere beim *molecular beacon*-Projekt, gegebenenfalls notwendig sein, einzelne Oligonukleotide postsynthetisch an Farbstoffmoleküle zu koppeln. Ein essenzieller Schritt wird die Aufreinigung der teilweise hochmodifizierten, zur Sekundärstrukturbildung neigenden Sequenzen sein, da hierzu keine Standardmethoden existieren. Ebenso müssen die neu hergestellten Oligonukleotide charakterisiert werden und letztlich sind die jeweiligen molekularbiologischen Assays, teilweise in Zellkultur, zu etablieren.



## 3. Ergebnisse

### 3.1. Lichtgesteuerte RNA-Interferenz

#### 3.1.1. Vorarbeiten

Seit der Aufklärung des Mechanismus der RNA-Interferenz 1998 durch Fire und Mello<sup>[18]</sup> fand diese sehr schnell ihren Weg in die Labore von Wissenschaftlern und Medizinern, wo sie zu einem der wichtigsten Werkzeuge für die Untersuchung von Genfunktion und zur Steuerung der Genregulation avancierte. Im Gegensatz zu *knock-out* Modellen, für die Tiere mit Gendefekten aufwändig und für jeden neuen Genotyp gesondert gezüchtet werden müssen, ist es mit Hilfe von siRNAs möglich, bei bekannter Sequenz theoretisch jedes beliebige Gen in einem Gewebe jederzeit vorübergehend stummzuschalten.

Die konstitutive Stummschaltung eines Zielgens führt jedoch in vielen Fällen zu unerwünschten Nebeneffekten. Vor allem bei der Erforschung von Genen, die essentiell für den Fortbestand der Zelle, die Regulation des Zellzyklus, und die Zellentwicklung sind, ist ein dauerhaftes oder vollständiges Ausschalten der betreffenden Gene oft letal. Daher ist es sowohl für therapeutische Applikationen, als auch für die Anwendung in der Forschung von großem Interesse, RNA-Interferenz zeitlich und/oder räumlich präzise kontrollierbar zu machen. Im Englischen spricht man hier von *conditional interference* also bedingter RNA-Interferenz.

Um dies zu erreichen, besteht bisher hauptsächlich die Möglichkeit, ein chemisch adressierbares System zu verwenden. So gelang es z.B., die Expression einer shRNA, also eines siRNA-Vorläufers, in Säugerzellen unter die Kontrolle eines Promotors zu stellen, der durch das Hormon Ecdyson aktiviert wird. Ecdyson kommt in Säugerzellen natürlicherweise nicht vor, sodass auf diese Weise eine sehr zuverlässige Aktivierung erreicht werden konnte und auch der Hintergrund im nichtinduzierten Zustand sehr gering blieb.<sup>[117]</sup>

Wenngleich eine grundsätzliche zeitliche Steuerung und auch eine Modulierung der Dosis mit den Methoden der chemisch-ansprechbaren Systeme möglich wird, bleibt eine gewisse Unschärfe, was einen definierten Start- und Endpunkt des auslösenden Signals betrifft. Zudem stellt die präzise räumliche Auflösung eine Herausforderung dar, für die es bisher keine zufriedenstellende Lösung gibt.

Licht stellt einen außerordentlich präzisen Auslöser dar. Es bietet sowohl die Möglichkeit, zeitlich exakt eingesetzt zu werden und durch Steuerung der Intensität eine Dosiskontrolle auszuüben, als auch mit entsprechenden Hilfsmitteln wie konfokalen Mikroskopen eine hohe räumliche Auflösung bis in den Nanometerbereich hinein zu erzielen.

Eine Methode, diesen hochpräzisen Trigger zur räumlichen und zeitlichen Kontrolle von biologischer Aktivität zu nutzen, ist das *caging*, welches auch auf Nukleinsäuren anzuwenden ist. Hierbei wird eine photosensitive Modifikation kovalent an ein biologisches Wirkmolekül - z.B. an ein Oligonukleotid - gebunden, sodass dessen Aktivität blockiert ist. Erst durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, üblicherweise im nahen UV-Bereich, wird die Modifikation abgespalten und das Wirkmolekül erhält seine volle Funktionalität zurück. Für das *caging* von Nukleinsäuren gibt es verschiedene Ansätze. Erste photolabil blockierte Nukleinsäuren wurden bereits vor 1980 von Engels und Hoffman in Form von nitrophenylmodifiziertem cAMP und ATP vorgestellt.<sup>[118],[9]</sup> Die Verwendung von Photoschutzgruppen in einem Oligonukleotid zur reversiblen Blockierung von dessen biologischer Aktivität erdachte aber erst Haselton gut zwanzig Jahre später.<sup>[119]</sup> Ihm gelang es zu zeigen, dass die Transkription eines Plasmids durch statistisches *caging* desselben reversibel unterbunden werden kann. Eine erste Anwendung zur Genregulation *in vivo* publizierten Ando und Mitarbeiter im Jahr 2001 mit ihren photoaktivierbaren Morpholinos.<sup>[120]</sup>

Friedman et al. wendeten die Methode des *caging* als erste auf siRNAs an.<sup>[114]</sup> Durch statistisches Schützen des Phosphatrückgrats mit DMNPE-Gruppen konnten sie zeigen, dass es grundsätzlich möglich ist, siRNAs durch Modifikation mit photolabilen Schutzgruppen zu inaktivieren. Die Reaktivierung der siRNAs gelang jedoch nur teilweise. Die quantitative Abspaltung aller Photoschutzgruppen war nicht möglich, sodass eine Verminderung der Proteinexpression auf ein Level, wie es mit einer unmodifizierten siRNA erzielt wird, nicht erreicht werden konnte. Ein Grund hierfür ist sicherlich die hohe Anzahl der Schutzgruppen, die bei der statistischen Photoschutzung eingeführt werden. Da das Phosphatrückgrat im Allgemeinen, wie auch im Falle der RNA-Interferenz nur unspezifisch mit Proteinen wechselwirkt, ist eine größere Anzahl an Photoschutzgruppen allerdings notwendig, um diese Interaktion ausreichend zu beeinflussen. Zudem zeigen neuere Untersuchungen der Gruppe, dass die Verteilung der DMNPE-Schutzgruppen auf der siRNA deutlich anders ist, als ursprünglich angenommen.<sup>[121]</sup> W. T. Monroe vermutete noch eine andere Ursache für das Unvermögen, die siRNA Aktivität in vollem Umfang wiederherzustellen: So ist es bekannt, dass Phosphotriester im Gegensatz zu Phosphodiestern in wässriger Lösung instabil sind. Ein photolabil geschütztes internes Phosphat könnte also zu einer Spaltung des Phosphatrückgrats und anschließendem Nukleaseabbau der siRNA führen. Um diese These zu überprüfen verwendeten sie eine DMNPE-geschützte siRNA, die zusätzlich 2'-fluoridmodifiziert war, um eine 2'-OH-vermittelte Autohydrolyse zu verhindern. Doch auch diese Maßnahme ermöglichte es nicht, eine vollständig reaktivierbare siRNA zu erhalten, sodass die Instabilität eines Phosphotriesters zumindest nicht der alleinige Grund für die unvollständige Reaktivierung sein kann.<sup>[122]</sup>

Nguyen und Mitarbeiter versuchten, das geschilderte Problem 2006 mit einer präziseren Herangehensweise zu lösen. Die Auswahl einer bekannten Schlüsselposition in der siRNA-Proteinwechselwirkung für die Schutzstrategie sollte es ermöglichen, mit einer einzigen Photoschutzgruppe auszukommen und damit die Entschützungsausbeute zu erhöhen. Aus Untersuchungen zum Mechanismus der RNAi ist bekannt, dass das 5'-Phosphat des Führungsstranges der siRNA essentiell ist, damit dieser erfolgreich von der MID-Domäne des schneidenden Argonautproteins gebunden werden kann.<sup>[123],[124]</sup> Eine Maskierung des 5'-Phosphats durch eine Photoschutzgruppe sollte daher ebenfalls eine vielversprechender Strategie zur Inaktivierung einer siRNA darstellen. Das Manko der unvollständigen Entschützung und damit unvollständigen Reaktivierung der siRNA konnte mit diesem Ansatz in der Tat behoben werden. Allerdings war hier nun das gegenteilige Problem zu beobachten: die photolabil geschützte siRNA wies eine Restaktivität auf.<sup>[115],[116]</sup>

Der Anspruch eine siRNA herzustellen, die mit Hilfe von Photoschutzgruppen ein perfektes „An/Aus-Verhalten“ zeigt, war also immer noch nicht erfüllt. Das statistische *caging* hatte zu viele Entschützungprobleme mit sich gebracht, sodass eine gezieltere Vorgehensweise vielversprechender schien. Der Ansatz der 5'-Phosphat-Blockierung hatte jedoch auch nicht den gewünschten Effekt erzielt, also musste eine andere Schlüsselposition in der RNAi-Maschinerie gefunden werden. Chiu und Rana untersuchten 2003 in einer umfassenden Studie die Toleranz einer siRNA bezüglich verschiedener Modifikationen an unterschiedlichen Positionen.<sup>[56]</sup> Die Quintessenz dieser Untersuchungen war, dass Modifikationen und auch Mismatches toleriert werden, solange sie die A-Helix des siRNA:mRNA-Duplexes in der zentralen Region nicht stören.

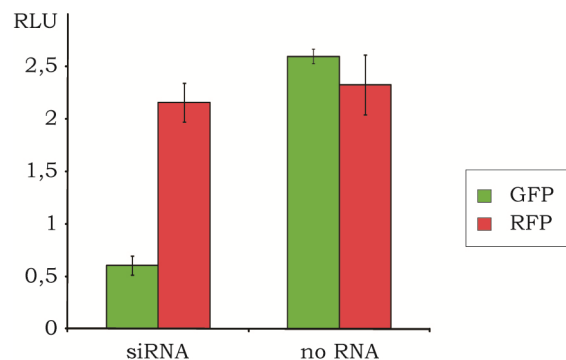
Aus Vorarbeiten von Heckel et. al ist bekannt, dass die Einführung einer photolabilen Schutzgruppe auf einzelnen Nukleobasen deren Fähigkeit zur spezifischen Wechselwirkung, wie z.B. der Ausbildung von Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen zerstört. Auf diesem Prinzip basierend konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass es möglich ist, die Transkription einer kurzen DNA durch die T7 RNA-Polymerase zu unterbinden, indem man in die Promotorregion ein photolabil modifiziertes Thymidin integriert. Die Umkehr der Transkriptionseinhibierung durch Entschützung des Thymidins mit UV-Licht gelang ebenfalls.<sup>[125]</sup>

Nichts anderes als ein Aufbrechen der Watson-Crick-Basenpaarung bewirkt eine Basenfehlpaarung. Daher erschien es ein vielversprechender Ansatz zu sein, eine siRNA mit einer photolabilen Schutzgruppe zu versehen. Diese Schutzgruppe sollte die Watson-Crick Basenpaarung unterbinden und somit die Auswirkung einer temporäre Fehlpaarung imitieren.

### 3.1.2. Voruntersuchungen

#### *EGFP-RFP ZWEIFACHFLUORESZENZ-ASSAY*

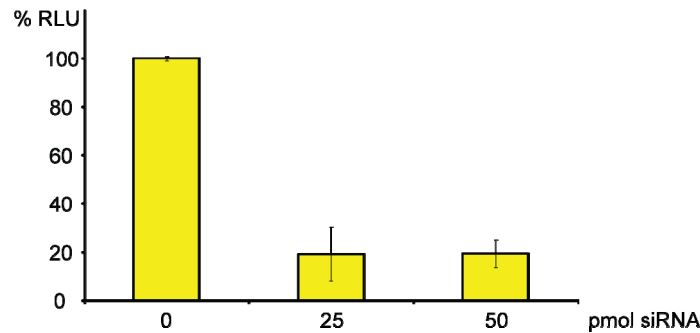
Ein einfaches und gut auszuwertendes Modellsystem für die Verfolgung der Genexpression, ist die Verwendung von Reporterensystemen. Hierzu wird ein Plasmid, welches für ein fluoreszierendes Protein oder ein an einer Lumineszenzreaktion beteiligtes Enzym codiert, in den Modellorganismus verbracht. Die Menge des gebildeten Proteins kann man so direkt mit der ausgesendeten Lichtemission in Form von Fluoreszenz oder Lumineszenz korrelieren, ohne das Protein oder die mRNA aufwändig extrahieren zu müssen. Reportergenplasmide mit Promotoren für den Einsatz in den verschiedensten Organismen sind kommerziell erhältlich. Ein sehr häufig verwendetes Modell ist das GFP-RFP System. Hierbei kommen zwei Plasmide, die für ein grün bzw. rot fluoreszierendes Protein codieren, zum Einsatz. Transfiziert man beide Plasmide gleichzeitig, ermöglicht die Normierung auf die Fluoreszenzintensität des einen Proteins, eine einfache Quantifizierung der jeweils anderen, ohne Transfektionseffizienz oder Zellzahl bestimmen zu müssen. In den folgenden Experimenten wurde die grüne Fluoreszenz auf die des rot fluoreszierenden Proteins normiert. Demzufolge hatte die untersuchte siRNA einen regulatorischen Einfluss auf die Expression des grün fluoreszierenden Proteins eGFP. Die Expression des RFP hingegen wird durch die Transfektion der anti-eGFP siRNA nicht beeinträchtigt. Es wurde stets eine Dreifachbestimmung durchgeführt.



**Abb. 25 Die Transfektion einer anti-eGFP siRNA senkt die eGFP-Expression, nicht die von RFP.**

#### *TRANSFEKTIONSMENGENTEST*

Für den geplanten Assay sollte eine kommerziell erhältliche siRNA-Sequenz gegen eGFP in HeLa-Zellen verwendet werden. Für ein well einer Platte im 24er Format verwendet man üblicherweise 25-50 pmol. Um, vor allem im Hinblick auf die herzustellenden modifizierten siRNAs, nicht unnötig viel Material zu verbrauchen, sollte die Menge, der für die nachfolgenden Assays standardmäßig eingesetzten Oligonukleotide optimiert werden.



**Abb. 26 Mit einer Transfektion von 25 pmol siRNA wird eine ausreichende Suppression erzielt.**

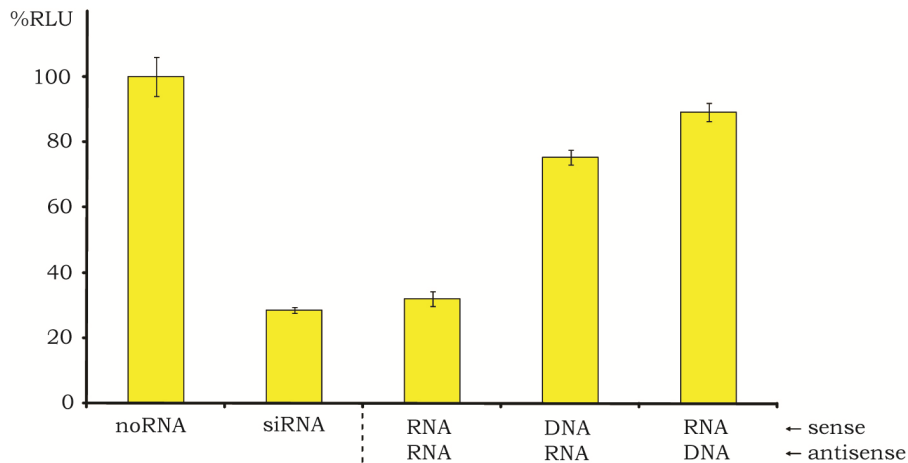
Der Test ergab, dass der Einsatz von 50 pmol siRNA im Vergleich zur Transfektion von 25 pmol keinerlei zusätzlichen Effekt zeigte. Da das künstliche Einbringen zusätzlicher regulatorischer RNAs zu Lasten der endogenen RNAi-Maschinerie geht, also eine zusätzliche Belastung für die Zelle bedeutet, wurden daher für die folgenden Experimente 25 pmol als Standardtransfektionsmenge pro well einer 24 well Platte festgesetzt.

#### *TRANSFEKTION VON siDNA:RNA-HYBRIDEN*

Die vorliegende Literatur zum Thema tolerierter Modifikationen in siRNAs kommt zu kontroversen Ergebnissen, was die Funktionalität von siRNAs angeht, in denen ein Strang vollständig durch DNA substituiert ist (siRNA:DNA-Hybride). Einerseits wurde mehrfach publiziert, dass der Austausch eines kompletten Stranges in DNA in einer nicht mehr funktionellen siRNA resultiert, was Chiu und Rana über das Fehlen einer A-Helixstruktur begründen<sup>[56]</sup> Andererseits finden Lamberton und Christian in ihren Studien ganz im Gegenteil einen ebenso effizienten und darüber hinaus sogar länger andauernden RNAi-Effekt bei der Verwendung von Hybriden.<sup>[126]</sup>

Aus Gründen der einfacheren und schnelleren Synthese und Aufreinigung sollte versucht werden, die photolabil modifizierten Nukleotide in Form von DNA-Nukleotiden einzusetzen. Daher galt es zunächst die widersprüchlichen Ergebnisse der Literatur bezüglich des vollständigen Austauschs eines siRNA Stranges gegen einen DNA Strang zu überprüfen. Als Kontrolle für die Aktivität der synthetisierten Einzelstränge im Vergleich zur kommerziell bezogenen Positivkontrolle (siRNA) wurde auch eine vollständige siRNA aus den selbst hergestellten Strängen hybridisiert und erfolgreich getestet (RNA-RNA).

Der vorliegende Test bestätigt die Ergebnisse von Chiu und Rana weitgehend. Der Austausch des Führungsstranges – konventionell wird dieser als *antisense*-Strang deklariert - gegen einen DNA-Strang resultierte in einer annähernd nicht funktionellen siRNA. Erstaunlicherweise verblieb aber bei Umwandlung des Gegenstranges in DNA eine Restaktivität des siRNA-Hybrides bestehen.



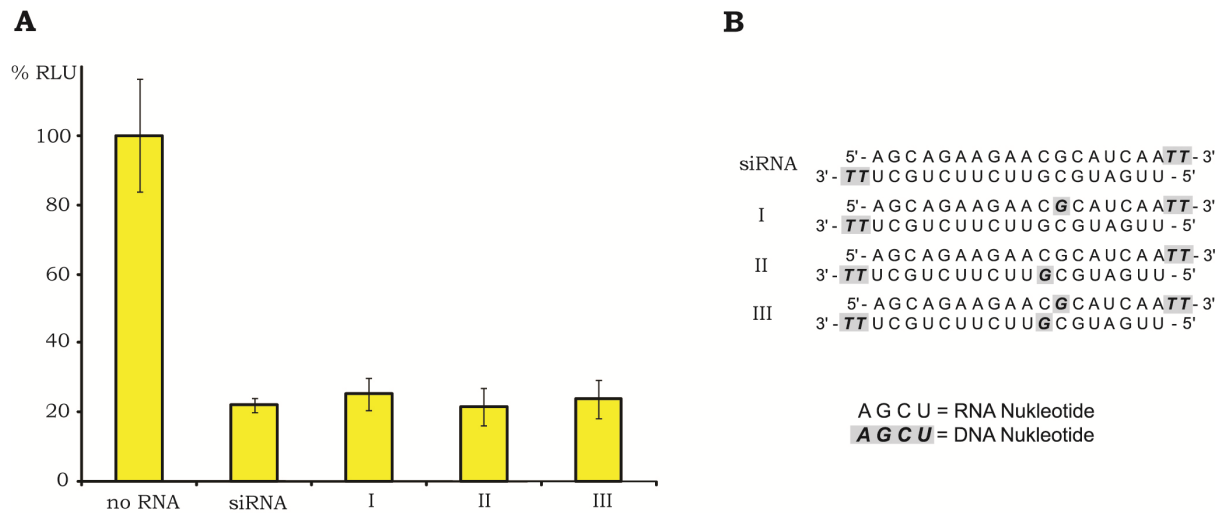
**Abb. 27 Substitution einzelner siRNA Stränge gegen DNA-Stränge**

Geht man davon aus, dass ein RNA:DNA-Hybrid auf Grund seiner Helixstruktur gar nicht erst durch den RISC gebunden werden kann, sollten beide Hybride gleichermaßen inaktiv sein. Eine grundsätzliche Bindung einer B-Helix scheint also möglich zu sein. Die im Vergleich zu einer nativen siRNA verringerte Aktivität könnte nun einerseits darauf zurückzuführen sein, dass ein DNA-Strang entweder nur ein sehr schlechtes Substrat für den RISC ist und daher zu einem verlangsamten Abbau führt oder, was wahrscheinlicher ist, gar kein Substrat und daher auf anderem Wege aus dem RISC entfernt werden muss. Da ein DNA:RNA-Hybrid eine höhere Schmelztemperatur aufweist, als eine reine doppelsträngige RNA, könnte dies zu einer deutlich verlangsamten Reaktion führen. Eine andere oder auch zusätzliche Erklärung wäre, dass ein RNA:DNA-Hybrid das Substrat für die RNaseH darstellt. Erfolgt der Abbau durch diese Nuklease in annähernd gleicher Zeit, wie der Einbau in den RISC, könnten die beide Wege miteinander konkurrieren und ein größerer Teil der Hybrid-siRNA zerstört werden, bevor ein Einbau in den RISC erfolgt.

#### *siRNAs MIT EINZELNEN DNA-NUKLEOTIDEN*

Während ein RNA-Doppelstrang eine A-Helix ausbildet, die, wie im Einleitungsteil über RNA-Interferenz erwähnt, für eine funktionelle RNAi essentiell ist, und ein DNA Doppelstrang eine B-Helix formt, bildet ein RNA:DNA-Doppelstrang unter stark solvatisierenden Bedingungen ebenfalls eine Helixstruktur aus, die einer B-Helix sehr ähnlich ist. Demnach ist klar, dass ein reiner DNA-Führungsstrang keine RNA-Interferenz auslösen kann. Die 2'-Hydroxygruppe ist jedoch nicht direkt in die RNAi-Maschinerie eingebunden und kann substituiert werden. Nun galt es zu bestätigen, dass es folglich möglich ist, einzelne Nukleotide einer siRNA durch Desoxynukleotide zu ersetzen, ohne Einbußen in der Aktivität in Kauf nehmen zu müssen.





**Abb. 28 Die Einführung einzelner Desoxynukleotide beeinflusst die siRNA-Effizienz nicht.**  
**A: Expressionslevel von eGFP nach Transfektion unterschiedlicher siRNA-Sequenzen.**  
**B: Sequenzen der verwendeten Stränge. In dieser und allen folgenden Abbildungen wird in siRNA-Doppelsträngen der *sense*/Gegenstrang stets oben, der *antisense*/Führungsstrang unten dargestellt.**

Hierzu wurden mehrere siRNA Doppelstränge synthetisiert, in denen entweder im *sense*, im *antisense* oder in beiden Strängen zentral ein einzelnes rG Nukleotid durch ein dG-Nukleotid ersetzt wurde.

Wie im Transfektionsmengentest führte die Transfektion der unveränderten siRNA zu einer Reduzierung der Proteinexpression auf ca. 20 % des Ausgangswertes. Der Austausch eines einzelnen RNA-Nukleotids gegen ein DNA-Nukleotid veränderte diesen Wert im Rahmen der Fehlertoleranz, wie erwartet nicht. Selbst wenn in beiden Strängen ein DNA-Nukleotid integriert wurde, blieb die Suppression stabil.

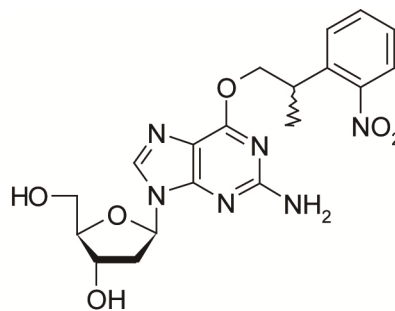
Dieses Experiment zeigte klar, dass die Verwendung von Desoxynukleotiden für die photolabil geschützten Positionen keinen Einfluss auf die Regulationskraft der siRNA haben wird.

### 3.1.3. Photolabil modifizierte siRNAs

Aus der Literatur sind unterschiedliche Voraussetzungen bekannt die eine kurze dsRNA Erfüllen muss, um RNA Interferenz auszulösen (vgl. Kap. 1.2). Auf der Ebene der Basenpaarung, die wir durch unsere Modifikation beeinflussen können, ist einerseits eine vollständig paarende *seed*-Region essentiell, welche den Basen 2-8 des Führungsstranges entspricht. Andererseits formulierten Chiu und Rana den Anspruch an die Bildung einer A-Helix zwischen Führungsstrang und mRNA mit intakter großer Furche. Die NPP-Gruppe imitiert nicht nur eine Basenfehlpaarung durch Unterdrückung der Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen, sondern ragt auf Grund ihres sterischen Anspruches auch

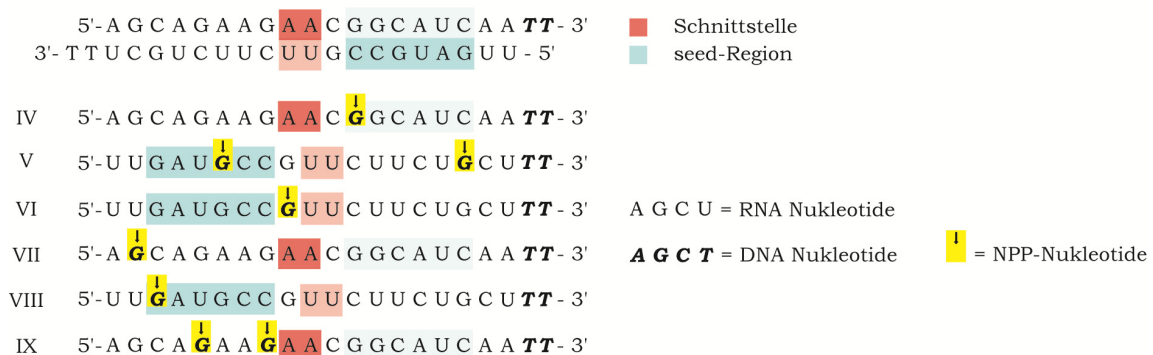
in die große Furche hinein. Daher werden auch die benachbarten Basenpaare in ihrer Wechselwirkung geschwächt, der Einfluss der NPP-Gruppe ist somit noch größer, als der einer einzelnen Basenfehlpaarung. Somit sollte die Einführung dieser Funktionalität überaus gut geeignet sein, um die Wechselwirkung einer siRNA mit ihrem mRNA-Zielstrang zu stören.

Zu Beginn der Arbeit an diesem Projekt war die Modifizierung von Desoxyguanosin und Thymin im Arbeitskreis Heckel etabliert. Da die Bindung eines G-C Basenpaares stärker ist als die eines A-T Basenpaares, ist durch die Substitution eines Guanosins durch das NPP-geschützte Desoxy-Derivat die maximale Destabilisierung eines Doppelstranges zu erwarten.



**Abb. 29** Verwendetes, photolabil geschütztes Desoxyguanosinderivat.

Um einen ersten Eindruck der Auswirkung zu bekommen, die die Einführung der Photoschutzgruppe in siRNAs verursacht, wurden daher einige Einzelstränge synthetisiert, die ein oder zwei NPP-geschützte Desoxyguanosinnukleotide enthielten. Die Modifikationen wurden an unterschiedlichen Positionen und in beiden Strängen eingeführt.



**Abb. 30** Position der Photoschutzgruppen in den synthetisierten siRNA-Strängen im Vergleich zu *seed*-Region und Schnittstelle.

Insgesamt wurden je Strang drei photolabil modifizierte Varianten hergestellt.

Sequenz V und VIII wurden an unterschiedlichen Stellen der *seed*-Region modifiziert, wobei Sequenz V darüber hinaus eine weitere Modifikation in der 3'-Region aufweist. In Sequenz

VI ist das neunte Nukleotid, welches unmittelbar an *seed*-Region und den Schnittstellenbereich angrenzt, substituiert. Darüber hinaus wurden auch drei *sense*-Stränge mit NPP-Schutzgruppen versehen, wenngleich die Einführung in den Gegenstrang entsprechend der Literaturvorarbeiten vielversprechender sein sollte. Sequenz IV weist eine Modifikation im Bereich auf, der mit der *seed*-Region des Führungsstranges hybridisiert. Sequenz VII ist nahe dem 5'-Ende modifiziert. Denkbar ist, dass dadurch bedingt der eigentliche Gegenstrang eingebaut wird, da hierfür bekanntermaßen die Stabilität des 5'-Endes entscheidend ist (s. Kap. 1.3.2). Sequenz IX ist zweifach modifiziert, wovon eine Modifikation ebenfalls unmittelbar angrenzend an die die Schnittstelle umfassenden Nukleotide positioniert ist.

#### GELAUFREINIGUNG MODIFIZIERTER OLIGONUKLEOTIDE

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide müssen nach Abspaltung von der Festphase und aller Schutzgruppen von den Abspaltungsprodukten sowie den Abbruchsequenzen aus der Synthese befreit werden. Bei DNA-Oligonukleotiden geschieht dies üblicherweise über eine Umkehrphasen-HPLC-Trennung. RNA-Sequenzen werden bevorzugt über eine Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt, da sie stark zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigen, welche in einer RP-Trennung zu sehr unklaren Peaks führt, die eine Produkterkennung und Abtrennung schwierig machen.

Für die photolabil modifizierten Oligonukleotide muss jedoch ein weiterer Reinigungsschritt erfolgen um Oligonukleotide, welche die Schutzgruppe tragen von jenen, die sie z.B. im Laufe der Aufreinigung verloren haben, abzutrennen. Dies ist vor allem im Hinblick auf eine Verwendung für die RNA-Interferenz von Bedeutung, da es sich dabei um einen katalytischen Prozess handelt. Eine siRNA kann zum Abbau von rund der dreißigfachen Menge an mRNA führen. Somit würde vermutlich schon eine geringfügige Verunreinigung einen merklichen Effekt auf das Expressionslevel des Zielgens haben. Die eingeführte NPP-Schutzgruppe mit ihrer aromatischen Struktur verändert allerdings ausschließlich die Hydrophobizität des Oligonukleotids. Da eine Trennung über Anionenaustauschchromatographie rein nach Ladung erfolgt, kann man modifizierte und unmodifizierte Sequenzen folglich mit dieser Methode nicht voneinander unterscheiden. In dem Wissen um die Probleme, die eine RP-Aufreinigung von RNA-Sequenzen jedoch mit sich bringen kann, wurde zunächst versucht eine Aufreinigung über ein Polyacrylamidgel vorzunehmen. Die Hoffnung bestand darin, dass die photolabile Schutzgruppe durch ihren sterischen Anspruch zu einer verlangsamten Retention im Vergleich zu den unmodifizierten Sequenzen führen könnte.

Doch auch eine Gelaufreinigung bringt Schwierigkeiten mit sich. Üblicherweise wird zur Visualisierung der aufgetrennten Banden ein Interkalator zugesetzt der die Anwesenheit eines Oligonukleotids durch Fluoreszenz anzeigt. Für präparative Anwendungen bringt das jedoch zum einen den Nachteil mit sich, dass der Interkalator anschließend wieder aus der

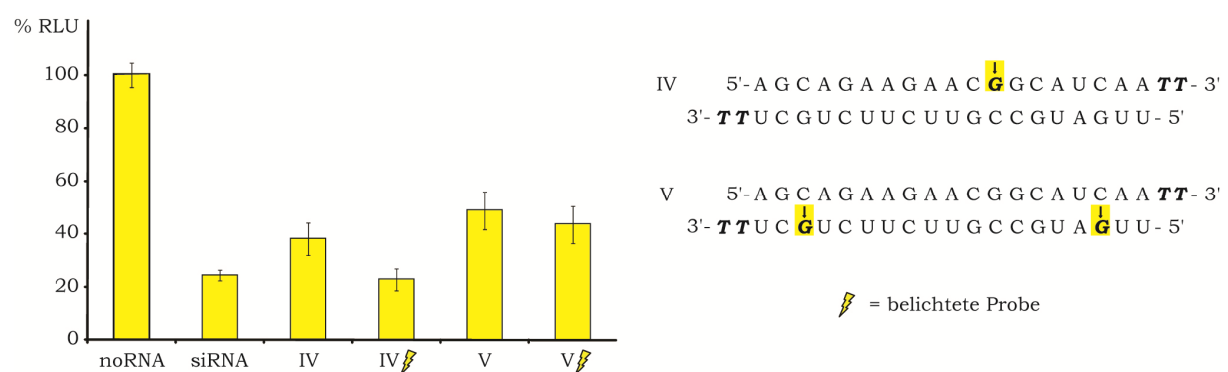
Probe entfernt werden muss. Vor allem aber liegt die Anregungswellenlänge von Ethidiumbromid im Bereich um 312 nm. Eine Visualisierung bei dieser Wellenlänge birgt die Gefahr, die Photoschutzgruppen, zumindest teilweise, unbeabsichtigt abzuspalten, liegt deren Absorptionsmaximum doch in eben diesem Bereich.

Daher sollte die Möglichkeit überprüft werden, neben den präparativen Banden jeweils eine analytische Bande als Markerbande mitlaufen zu lassen. Diese Markerbanden sollten dann angefärbt werden um anhand deren Retention die Position der präparativen Banden abzuschätzen und diese dann blind auszuschneiden.

Eine Aufreinigung nach dieser Methode wurde zunächst für die beiden Sequenzen IV und V getestet. Durch Extraktion der ausgeschnittenen Banden konnte zwar eine ausreichende Menge an Oligonukleotid für einen siRNA Assay gewonnen werden, eine nachfolgende Kontrollanfärbung der Gelreste zeigte jedoch, dass auf diese Weise ein nicht unerheblicher Teil an Probe verloren geht. Es ist ein bekanntes Phänomen, dass in denaturierenden PAGElen die äußeren Banden häufig weniger weit laufen, als die inneren. Dieser Effekt wird als *gel smiling* bezeichnet und kann nicht vollkommen sicher ausgeschlossen werden, sodass dieses Verfahren als Standardmethode für zukünftige Aufreinigungen ausschied.

#### TEST EINES EINFACH MODIFIZIERTEN SENSE UND EINES ZWEIFACH MODIFIZIERTEN ANTISENSE siRNA-STRANGES

Trotz der Ausbeuteverluste, die das blinde Ausschneiden der Gelbanden mit sich brachte, war von den aufgereinigten Strängen IV und V ausreichend Material für eine Transfektion vorhanden. Als Negativkontrolle für die unregulierte eGFP-Expression diente eine Probe, in der keinerlei siRNA transfiziert wurde. Zur Positivkontrolle für die als maximal möglich angenommene Suppression wurde die kommerziell erworbene siRNA verwendet. Die modifizierten Oligonukleotide wurden vor der Transfektion mit ihrem jeweiligen Gegenstrang hybridisiert und einmal unbestrahlt, einmal nach Belichtung bei 366 nm verwendet. Die Belichtung wurde hier zunächst in einfach Phosphatpuffer bei pH 11 für eine Stunde durchgeführt.



**Abb. 31 Test erster NPP-modifizierter siRNAs**

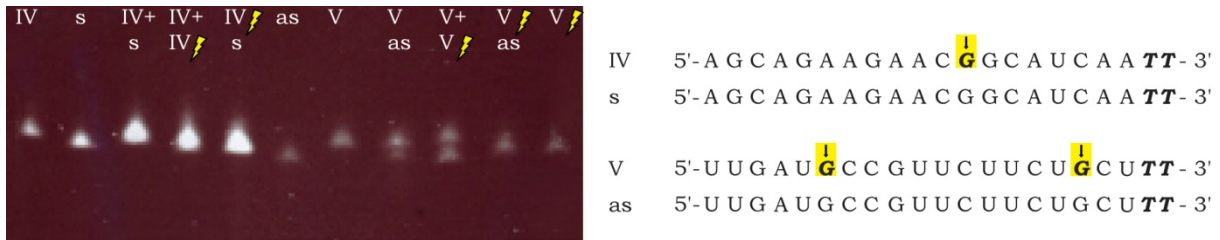
Auch wenn diese Bedingungen, insbesondere der pH-Wert, für eine spätere Belichtung in Zellkultur nicht zu realisieren sein würden, wurden sie für einen ersten Test zunächst gewählt, da sie sich in Vorarbeiten als optimal zur vollständigen Abspaltung der NPP-Gruppe herausgestellt hatten.

Sowohl die im *sense*-Strang einfach modifizierte Sequenz IV, als auch die im *antisense* Strang zweifach NPP-geschützte Sequenz V zeigen eine gegenüber der Positivkontrolle leicht verringerte siRNA Aktivität. Eine vollständig „ausgeschaltete“ siRNA ist allerdings bei weitem nicht erreicht. Und während die bestrahlte Probe der Sequenz IV tatsächlich die Aktivität der Positivkontrolle erreicht, also komplett „anschaltbar“ ist, bleibt die Aktivität der eigentlich durch Bestrahlung entschützten siRNA V nahezu unverändert. Grundsätzlich scheint es aber möglich zu sein, durch das Einführen von Modifikationen, die die Watson-Crick-Wechselwirkungen zwischen den Basen blockieren, die siRNA-Aktivität herabzusetzen. Ebenso ist es generell möglich durch Photolyse der Schutzgruppen die vollständige Aktivität zurück zu erhalten.

#### *POLYACRYLAMIDGEL ENTSCHÜTZUNGSANALYTIK*

Da der Test der ersten beiden modifizierten siRNA-Sequenzen, nur in einem Fall eine zufriedenstellende Lichtaktivierbarkeit gezeigt hatte, musste überprüft werden, ob die Sequenzen unter den gewählten Bedingungen tatsächlich, wie angenommen, vollständig entschützt werden. Hierzu wurden analytische Mengen beider Stränge mit verschiedenen Kontrollen mittels PA-Gelelektrophorese analysiert.

Von jeder Sequenz wurde eine unbelichtete sowie eine belichtete Probe (in Abbildungen gekennzeichnet durch das Blitzsymbol) aufgetragen. Im Falle einer vollständigen Entschützung sollten diese Proben jeweils eine einzige Bande ergeben, die zudem eine andere Retentionszeit aufweist, als die unbelichtete Vergleichsprobe. Zur Kontrolle der Retentionszeit belichteter Proben wurden die jeweils analogen unmodifizierten Stränge aufgetragen. Diese entsprechen für die Sequenz IV dem *sense*-Strang, für die Sequenz V dem *antisense*-Strang der anti-eGFP siRNA. Als weitere Kontrollen wurden außerdem Mischfraktionen aus unbelichteten und belichteten Sequenzen, sowie aus unbelichteten Sequenzen und *sense* (s) bzw. *antisense* (as) aufgetragen. Diese beiden Kontrollen sollten identisch und in zwei Banden laufen. Als dritte Mischfraktion wurden belichtete Probe und s bzw. as-Kontrolle zusammen aufgetragen, welche wiederum als eine gemeinsame Bande erwartet wurden.



**Abb. 32 PAGE Entschützungsanalytik.**

Das resultierende Gel zeigt für die zweifach modifizierte as-Sequenz V (rechte Gelhälfte) das erwartete Laufverhalten. Die unmodifizierte Vergleichssequenz „as“ und die besagte Sequenz V zeigen unterschiedliche Retentionszeiten. Diese bleiben auch in der Mischfraktion dieser beiden Sequenzen erhalten, was dafür spricht, dass diese geringen Laufzeitdifferenzen nicht durch ein ungleichmäßiges Laufen des Gels zustande gekommen sind, sondern auf einem realen Unterschied zwischen den Sequenzen beruhen. Eine Mischung aus belichteter und unbelichteter Sequenz V zeigt das selbe Laufverhalten wie die zuvor besprochene Mischfraktion. Belichtet man die NPP-geschützte Sequenz, so zeigt sie dieselbe Retentionszeit wie die unmodifizierte Vergleichskontrolle as. Eine Mischfraktion dieser beiden Proben läuft in einer einzigen Bande. Zudem scheint die Entschützung vollständig zu sein, da die belichtete Probe V ebenfalls nur eine einzige Bande zeigt. Allein ein unentschützter Rest unterhalb der Detektionsgrenze wäre denkbar.

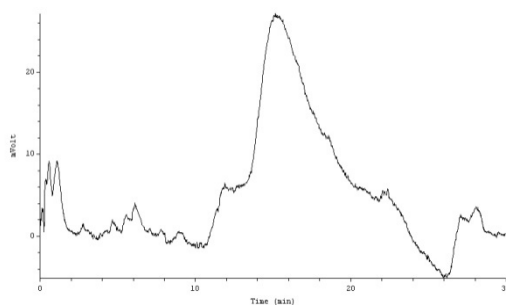
Für die einfach NPP-modifizierte *sense*-Sequenz IV scheint ebenfalls ein Laufzeitunterschied vorzuliegen, allerdings sind die Banden zu stark beladen, um diese über einen Vergleich mit den Mischfraktionen zu verifizieren. Für eine Analytik könnte diese Problematik durch auftragen von weniger Oligonukleotidmenge zu lösen sein. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass es mindestens zweier NPP-Modifikationen bedarf, um einen sichtbaren Effekt auf die Laufzeit zu haben.

#### ANIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE VON siRNA-SEQUENZEN

Die PAGE hatte keine befriedigenden Ausbeuten hinsichtlich der Aufreinigung NPP-modifizierter RNA-Stränge geliefert. Daher musste ein anderer Weg hierfür gefunden werden. Eine gängige Methode zur Aufreinigung von RNA ist die Trennung durch Anionenaustauschchromatographie. Die Schwierigkeit besteht darin, potentielle Sekundärstrukturen, zu deren Ausbildung RNA sehr stark neigt, zu unterdrücken, da diese sonst zu stark verbreiterten Peaks führen. Hierzu gibt es verschiedene Möglichkeiten, die auf ihre Anwendbarkeit für die siRNA-Aufreinigung getestet werden sollten.

Harnstoff ist ein gängiges Additiv, dessen chaotrope Eigenschaft häufig zur Denaturierung genutzt wird. Allerdings würde durch die Verwendung von Harnstoff nach der HPLC ein neues Problem entstehen, da dieser wieder entfernt werden muss. Zunächst sollte allerdings geklärt werden, ob die Zugabe von Harnstoff überhaupt zum gewünschten Erfolg führt.

Hierzu wurde dem Eluenten Harnstoff beigemischt und anschließend über eine PRP-X600 Anionenaustauschsäule der Firma Hamilton aufgereinigt.

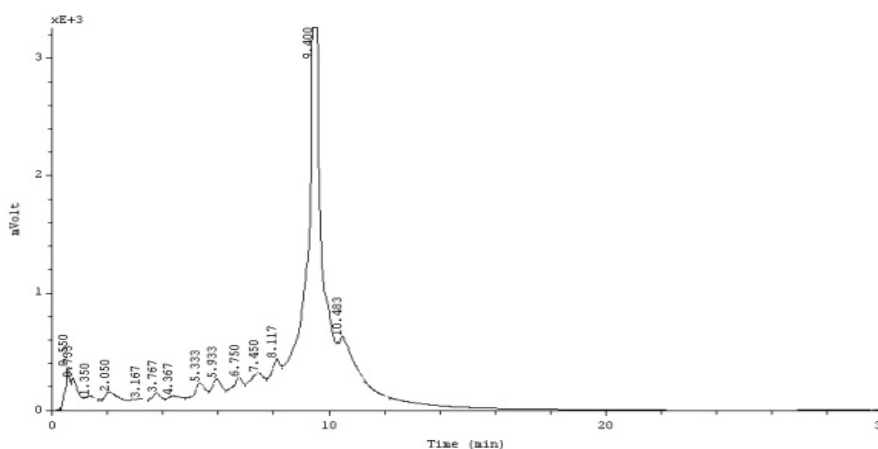


**Abb. 33 AE-HPLC-Chromatogramm eines RNA 21mers mit starken Sekundärstrukturen.**

Wie aus dem obigen Chromatogramm ersichtlich ist, führt diese Methode nicht zum Erfolg. Das Produkt eluiert über mehrere Minuten in einem sehr unscharfen Peak, sodass auch die Reinheit fraglich ist.

Auch im stark basischen Milieu werden Sekundärstrukturen unterdrückt. Da RNA allerdings in starken Basen hydrolysiert (vgl. Kap 1.1.2) ist eine Aufreinigung bei einem pH-Wert von  $> 11$ , wie er zu diesem Zwecke üblich ist, nicht ratsam. Die Verwendung von Puffersystemen mit einem pH-Wert von 8,5 ist aber auch zur Anwendung für RNA-HPLC-Methoden dokumentiert. Im praktischen Versuch stellte sich eine Anhebung des pH-Werts auf diesen Betrag jedoch als nicht ausreichend heraus, um die Sekundärstrukturbildung vollständig zu unterdrücken.

Eine weitere Möglichkeit Sekundärstrukturen aufzubrechen besteht darin, die Probe aufzuheizen. Die Spezifikation der vorliegenden PRP-X600 Säule erlaubte allerdings nur eine Betriebstemperatur von unter  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Daher wurde eine andere Säule getestet, mit der eine Chromatographie bei  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  auch in Kombination mit leicht alkalischen Puffern möglich ist.

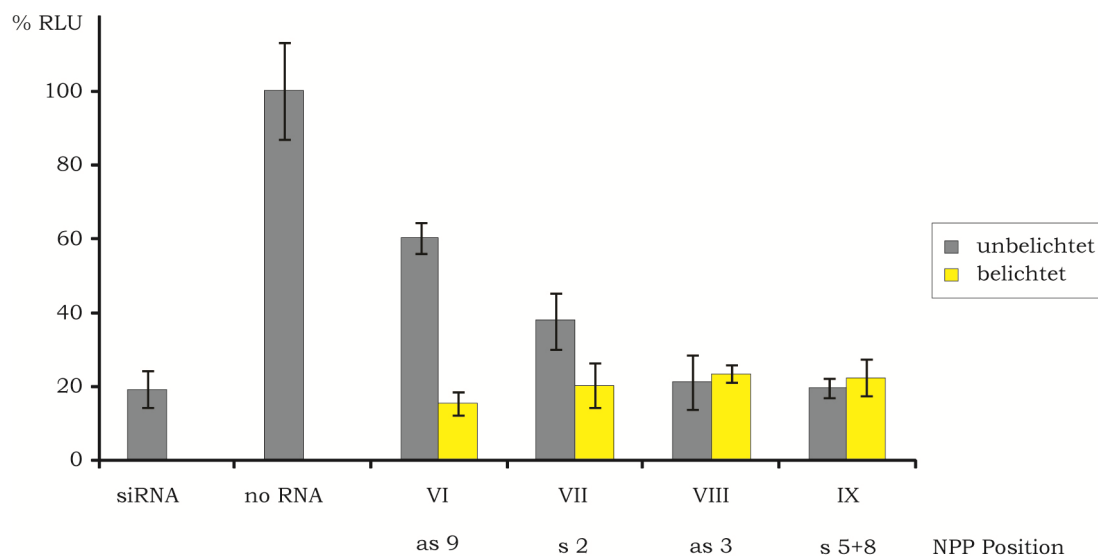


**Abb. 34 Erfolgreiche Aufreinigung eines RNA 21mers mit einer Dionex DNA-Pac-Säule bei  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Tris·HCl (plus  $\text{NaClO}_4$  im Hochsalzpuffer) bei pH 8,5.**

Die Verwendung einer DNA-Pac Säule der Firma Dionex mit einem Tris-Puffer (mit Natriumperchlorat im Hochsalzpuffer) bei pH 8,5 führte zu sauber abgegrenzten Peaks, die eine gezielte Abtrennung des Produkts zulassen. Auf diese Weise wurden nun auch die übrigen hergestellten Sequenzen mit NPP-modifizierten dG-Nukleotiden aufgereinigt.

#### WEITERE SENSE UND ANTISENSE NPP-MODIFIZIERTE siRNAs IN ZELLKULTUR

Mit der Etablierung einer zuverlässigen Aufreinigungsmethode für RNA-Sequenzen konnten auch die restlichen NPP-modifizierten Sequenzen aufgearbeitet und in Zellkultur auf ihre Aktivität getestet werden. Ebenso wie bei den bereits überprüften Sequenzen IV und V wurde die Belichtung für die entsprechenden Proben vor der Transfektion in Phosphatpuffer bei pH 11 vorgenommen.



**Abb. 35 Aktivität weiterer siRNAs mit NPP-Modifikationen im sense- oder antisense-Strang.**

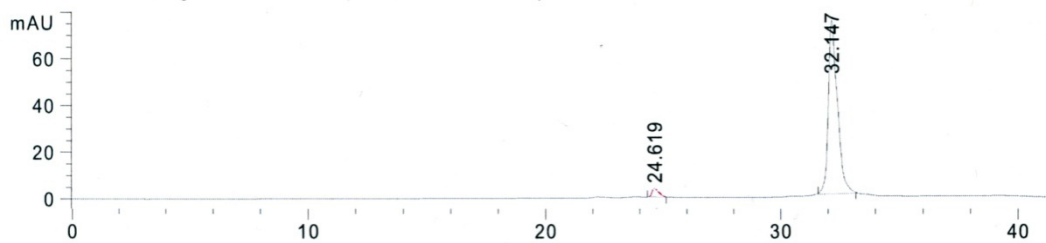
Alle modifizierten Sequenzen sind nach der Belichtung vollständig aktiviert. Eine deutliche Inaktivierung durch die photolabile Schutzgruppe ist allerdings nur für die Sequenz VI und geringfügig auch für die Sequenz VII zu beobachten, d.h. die Sequenzen VIII und IX können trotz temporärer Blockierung der Watson-Crick-Wechselwirkung einzelner Basen eine RNAi auslösen. Die siRNA VI mit einer zentral geschützten Nukleobase im *antisense* Strang weist allerdings eine eindeutige Lichtschaltbarkeit auf. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei der RNAi um einen katalytischen Vorgang handelt – mit einer einzigen siRNA können zahlreiche mRNAs abgebaut werden – könnten Verunreinigungen durch unbeabsichtigt vorzeitig abgespaltene Photoschutzgruppen zumindest teilweise für die Restaktivität von ca. 40 % verantwortlich sein. Für eine Analytik, die Verbleib oder vorzeitige Abspaltung der Photoschutzgruppe belegen kann, käme eine PA-Gel zwar in Frage, sollte sich aber herausstellen, dass das Problem tatsächlich hier liegt, müsste auch eine Lösung zur Abtrennung dieser Verunreinigung gefunden werden. Hierzu eignet sich die PAGE, wie



bereits gezeigt wurde, nicht. Daher sollte als nächstes eine Möglichkeit gefunden werden, geschützte Vollängenprodukte von solchen, bei denen die Schutzgruppe bereits unbeabsichtigt abgespalten wurde, zu trennen.

#### UMKEHRPHASEN HPLC VON RNA 21MEREN.

Wie bereits im Kapitel zur Anionenaustauschchromatographie von RNA angesprochen wurde, ist das größte Problem bei der HPLC-Aufreinigung von RNA die Bildung von Sekundärstrukturen. Für die AE-HPLC hat sich die Durchführung der Trennung unter erhöhter Temperatur als hilfreich erwiesen, um Sekundärstrukturen zu unterbinden. Daher sollte diese Vorgehensweise auf die RP-HPLC übertragen werden. Allerdings können die verwendeten Nukleosil-Säulen im Gegensatz zu der für den AE verwendeten Pac-Säule nicht auf 80 °C, sondern maximal auf 55 °C geheizt werden, da andernfalls das Material im wässrigen Puffer eine kritische Löslichkeit erreicht.



**Abb. 36 RP-HPLC Chromatogramm von Sequenz VI. Bei 55 °C werden keine Sekundärstrukturen gebildet. Neben der modifizierten Sequenz ist auch eine Verunreinigung durch bereits vorzeitig entschütztes Oligonukleotid zu erkennen.**

Abb. 36 zeigt das Chromatogramm einer RP-HPLC von Sequenz VI bei 55 °C. Die Bildung von Sekundärstrukturen kann offensichtlich auch bei 55 °C ausreichend vermieden werden. Deutlich erkennbar ist, dass neben dem Hauptpeak bei einer Retentionszeit von 32 min auch eine weniger hydrophobe Substanz nach knapp 25 min eluiert, bei welcher es sich um vorzeitig entschütztes Produkt handeln könnte. Ein Vergleich mit einem Chromatogramm von Sequenz II, die der entschützten Sequenz VI entspricht, ergibt eine Übereinstimmung der Retentionszeiten. Daher handelt es sich bei dem Peak bei 25 min sehr wahrscheinlich tatsächlich um einen Anteil von ca. 3 % der entschützten Sequenz VI. Die große Retentionszeitdifferenz macht eine präparative Abtrennung dieses Nebenproduktes jedoch leicht. Die RP-HPLC wird fortan standardmäßig nach der AE-Aufreinigung durchgeführt, um die modifizierten Sequenzen von ihren unmodifizierten Analoga zu befreien.

## DOSISABHÄNGIGE AKTIVIERUNG

Nicht nur Zeit- und Ortsauflösung sind für die Anwendung lichtaktivierbarer Biomoleküle von Interesse, sondern auch die leichte und präzise Dosiskontrolle ist ein Vorteil. Nachdem mit einer prä-transfektionell bestrahlten siRNA bereits gezeigt werden konnte, dass diese grundsätzlich durch Licht zu aktivieren ist (s. Abb. 35), sollte nun die optimale Dosis gefunden werden, mit der die siRNA auch in Zellkultur entschützt werden kann. Optimal heißt in diesem Fall so kurz wie möglich, um die Zellen nicht unnötig zu strapazieren, aber so lange wie nötig, um sicher zu gehen, dass die siRNA vollständig entschützt wird. Da zur Belichtung nur eine UV-Lampe mit fixer Leistung zur Verfügung stand, musste die Dosis über die Belichtungsdauer variiert werden.

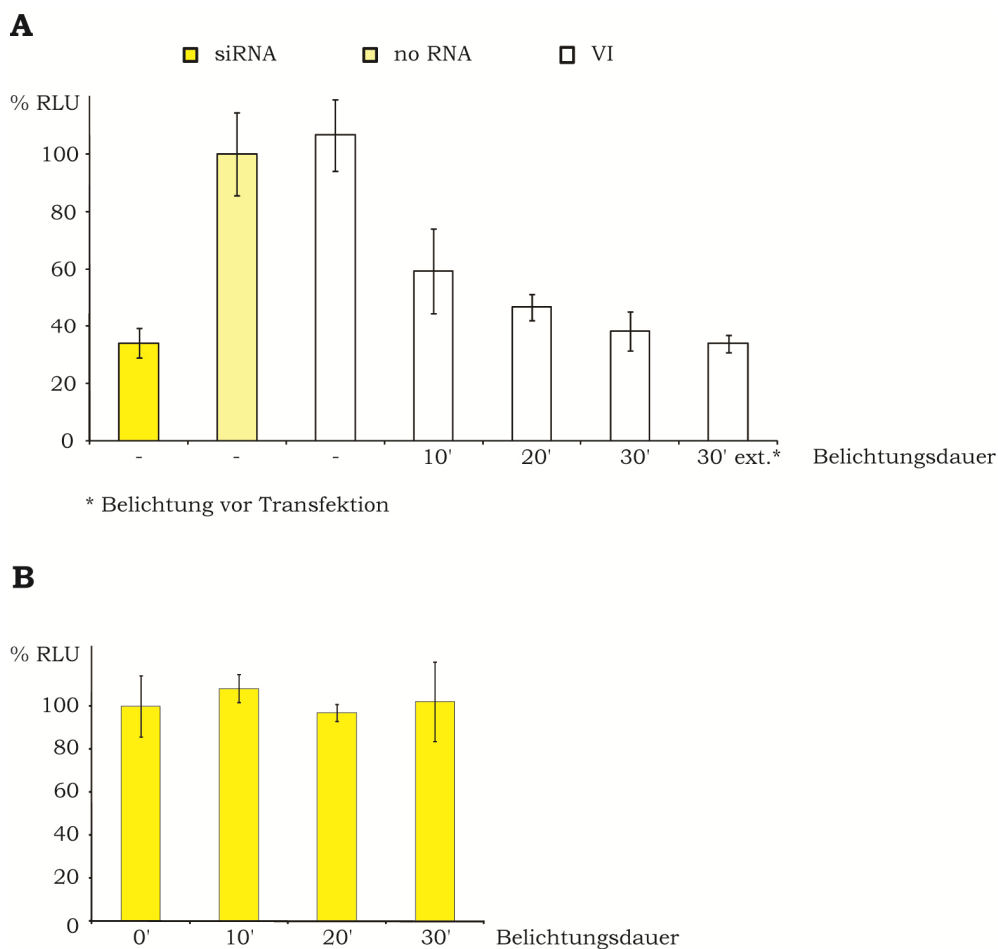


Abb. 37

**A: Der Grad der Aktivierung ausgeschalteter siRNAs kann durch die Belichtungsdauer (Dosis) kontrolliert werden.**

**B: Die Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm schadet den Zellen gemessen am eGFP-Expressionslevel nicht.**

Hierzu wurden HeLa-Zellen wie üblich transfiziert und die Proben unterschiedlich lange unter einer Quecksilber-Handlampe bei 366 nm bestrahlt. Zur Entschützung wurde die Sequenz VI verwendet, die bereits erfolgreich durch Bestrahlung vor der Transfektion

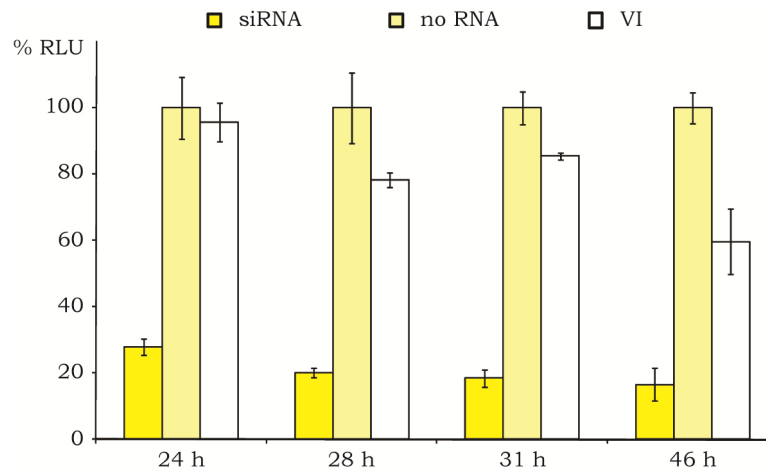
aktiviert werden konnte. Zum Vergleich wurde neben der unmodifizierten siRNA auch eine Probe transfiziert, die, wie bisher üblich, vorher in Lösung bestrahlt worden war.

Die Auswertung des Experiments zeigt zum einen, dass die RP-HPLC-Aufreinigung der Sequenz VI tatsächlich das Problem der teilaktiven siRNA eliminiert hat. Die unbelichtete Sequenz VI beeinträchtigt das eGFP-Level nicht, die Fluoreszenzintensität entspricht der einer nicht siRNA transfizierten Probe. Zudem ist eine deutliche Dosisabhängigkeit der Aktivierung zu erkennen. Schon zehn Minuten Bestrahlung reichen aus, um eine Aktivität von 60 % - gemessen am Suppressionspotential der Vergleichssequenzen - zu erhalten. Nach 30 minütiger Bestrahlung ist die vormals inhibierte Sequenz wieder nahezu vollständig aktiviert. Dabei nehmen die Zellen, soweit eine Beurteilung allein anhand des Proteinexpressionslevels möglich ist, keinen Schaden. Das Fluoreszenzlevel von Zellen, die nur mit den Plasmiden aber nicht mit siRNA transfiziert wurden, liegt auch nach 30 minütiger Belichtung bei 366 nm im selben Bereich wie das einer unbelichteten Probe (Abb. 37 B). Für zukünftige Experimente wird daher eine Belichtungsdauer von 40 min als definitiv ausreichend erachtet, um NPP-geschützte siRNA-Sequenzen komplett zu aktivieren.

#### STABILITÄT DER PHOTOSCHUTZGRUPPE IN ZELLKULTUR

Die beschriebenen Zellkulturexperimente wurden standardmäßig 24 h nach der Transfektion ausgelesen. Bei Proben, welche in Zellkultur belichtet wurden, geschah dies 4 h nach der Transfektion. Neben der Ortsauflösung ist eine vielversprechende Anwendung für photolabil geschützte siRNAs die Bestimmung des Starzeitpunkts der RNAi unabhängig vom Transfektionszeitpunkt. Dabei ist es wichtig zu wissen, wie weit sich eine Aktivierung transfizierter siRNAs hinauszögern lässt. Zwei Szenarien sind denkbar, die den Aufschub des Aktivierungszeitpunktes nach der Transfektion begrenzen. Zum einen ist die Dauer eines RNAi Effekts in Säugerzellen begrenzt. In einigen Spezies, wie Pflanzen aber auch *D. melanogaster* kann eine posttranskriptionale Expressionsunterdrückung vererbt werden. In Säugerzellen ist dies jedoch nicht möglich. Für die siRNA induzierte Unterdrückung der Expression von eGFP in HeLa-Zellen ein Peak nach 42 h dokumentiert. Nach ungefähr 66 h ist der Effekt nicht mehr beobachtbar. Fraglich ist, ob einer photolabil geschützten siRNA dasselbe Schicksal widerfährt. Demnach wäre eine Aktivierung nach mehr als 42 h nur noch eingeschränkt und nach 66 h gar nicht mehr möglich. Die zweite Voraussetzung, um eine siRNA nach einer längeren Zeit aktivieren zu können, ist, dass diese auch über einen längeren Zeitraum inaktiv bleibt. So ist es vorstellbar, dass z.B. zelleigene Reparaturmechanismen für mutierte Nukleobasen auch die Photoschutzgruppe als eine solche unerwünschte Veränderung erkennen und gezielt entfernen oder das komplette Oligonukleotid abbauen.

Um die Stabilität einer modifizierten siRNA zu testen, wurde diese transfiziert und die Proben nach unterschiedlichen Zeitintervallen ohne Belichtung ausgelesen. Die untersuchten Proliferationszeiten betragen dabei 24, 28, 31 und 46 h.



**Abb. 38 Nach ca. 28 h setzt auch ohne Belichtung eine Aktivierung geschützter siRNA ein.**

Während die eGFP-Expression nach 24 h noch vollständig uneingeschränkt ist, beginnt bereits nach 28 h eine leichte Aktivierung der siRNA. Wenngleich der Effekt nicht streng linear zu sein scheint, so steigt die siRNA Aktivität doch bis zur 48 h-Probe deutlich an und die eGFP-Expression ist nun um 40 % herabgesetzt. Somit ist nicht etwa die Stabilität der siRNA insgesamt für eine zeitliche Eingrenzung der siRNA-Aktivierung bestimmend, sondern tatsächlich die Stabilität der Modifikation. Sei es auf Grund aktiver Oligonukleotid-reparaturmechanismen oder der chemischen Umgebung in der Zelle. Dieses Experiment verdeutlicht, dass es mit den vorliegenden NPP-geschützten siRNAs möglich ist, die RNAi um bis zu 24 h versetzt zum Transfektionszeitpunkt zu initiieren.

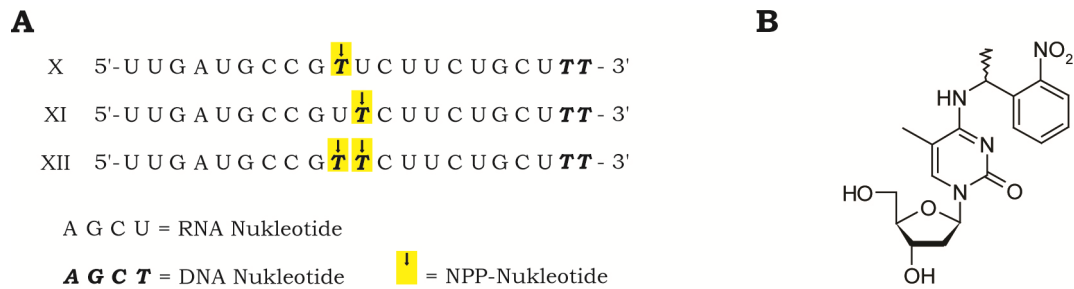
#### *SYNTHESE VON siRNA ANTISENSE SEQUENZEN MIT MODIFIKATIONEN IM BEREICH DER SCHNITTSTELLE*

Von den bisher modifizierten siRNA Strängen zeigte nur ein einziger, die Sequenz VI, eine vollständige Desaktivierung durch die Einführung einer Basenmodifikation. Die von Chiu und Rana angesprochene Notwendigkeit einer A-Helix mit intakter großer Furche ist also vermutlich auf den zentralen Bereich der Schnittstelle einzuschränken. Die negativen Ergebnisse für die anderweitig modifizierten Sequenzen legen nahe, dass das Blockieren der Watson-Crick-Basenpaarung an beliebiger Stelle bzw. auch der gezielte Einsatz in der *seed*-Region nicht ausreicht, um die RNA-Interferenz vollständig zu unterbinden.

Der *sense*-Strang wird im Laufe der RISC-Formierung ohnehin entfernt. Die beobachtete Herabsetzung der siRNA-Aktivität in einigen der *sense*-modifizierten siRNAs (IV und VII) könnte also schlicht durch ein verzögertes Einsetzen der vollen Aktivität durch einen verlangsamten RISC-Aufbau zu erklären sein, die sich im Verlauf einer längeren Zeit evtl. sogar gar nicht mehr auswirken würde. Möchte man eine Störung installieren, die sich nicht nur auf die Formierung des RISC auswirkt, sondern die auch darüber hinaus Bestand hat, so sollte diese Störung also vorzugsweise im Führungsstrang eingeführt werden. Der enzymatische Schlüsselschritt der RNA Interferenz, das Schneiden der mRNA, findet exakt gegenüber dem zehnten und elften Nukleotid des in den RISC integrierten siRNA Stranges

statt. Die einzige Sequenz, die eine starke Herabsetzung der siRNA-Aktivität aufwies, trägt die Modifikation auf dem neunten Nukleotid. Dies ist sehr nah an dem Bereich, in dem sich die Spaltung der mRNA abspielt.

Daher wurden nun einige siRNA-Führungsstränge synthetisiert, die in genau diesem Bereich eine NPP-modifizierte Base aufweisen. An zehnter und elfter Position befinden sich in der verwendeten anti-eGFP siRNA Uridine. Dieses wurde durch ein T<sup>NPP</sup>-Nukleotid substituiert, es entstanden die folgenden drei Sequenzen.



**Abb. 39**

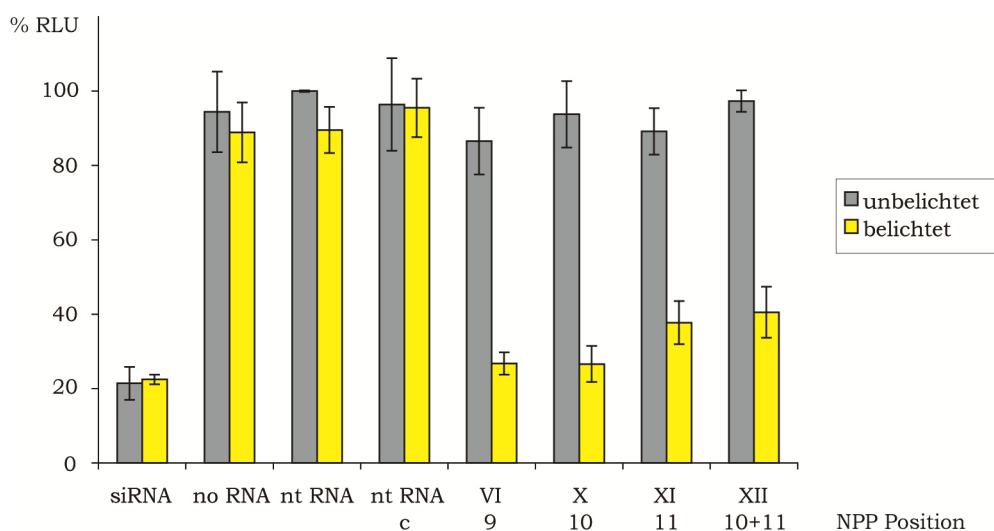
**A: Schnittstellenmodifizierte siRNA Führungsstränge.**

**B: Eingesetztes T<sup>NPP</sup> Nukleosid.**

#### siRNA FÜHRUNGSSTRÄNGE MIT NPP-MODIFIZIERTER SCHNITTSTELLE IN ZELLKULTUR

Die nach dem neuen Ansatz konzipierten siRNA *antisense*-Stränge wurden nun in Zellkultur auf ihre Funktionalität getestet und stellten sich als geeignet für die lichtaktivierbare RNAi heraus. Eine zunächst noch vorliegende geringfügige Restaktivität geschützter Stränge von ca. 30 % (ohne Abb.) konnte durch eine weitere RP-HPLC-Aufreinigung beseitigt werden, verdeutlichte aber nochmals die äußerst hohe Anforderung an die Reinheit der siRNAs für diesen katalytischen Prozess.

Zudem wurden zwei weitere Kontrollen eingeführt. Da davon auszugehen ist, dass nicht nur die Transfektion an sich die Zellen strapaziert, sondern auch die Menge an transfizierten Nukleotiden eine Rolle spielt, wurde eine sogenannte *non targeting* (nt) RNA synthetisiert. Diese besitzt die gleiche Basenzusammensetzung, wie die eigentliche siRNA, hat aber, wie der Name schon sagt, in der verwendeten Zelllinie kein Zielgen. Die Fluoreszenz der nt RNA-Probe wurde nun anstelle der no RNA-Probe als 100 % Wert festgelegt. Um ferner zu überprüfen, ob nicht die NPP-Modifikation selbst oder ihr Abspaltungsprodukt nach der Bestrahlung einen Einfluss auf das eGFP-Level haben, wurde zudem eine (zweifach) NPP-geschützte Variante der nt RNA hergestellt. Sie trägt die Bezeichnung nt RNA c.



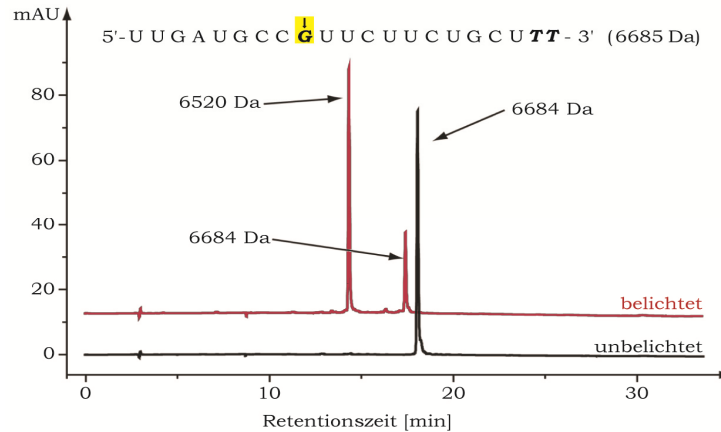
**Abb. 40 Aktivität und Lichtaktivierbarkeit von siRNA Sequenzen mit NPP-Modifikation im Bereich der Schnittstelle des antisense-Strangs.**

Alle Proben, die mit modifizierten siRNA Sequenzen transfiziert und nicht belichtet wurden (graue Balken) sind im Rahmen des Fehlers nahezu vollständig inaktiviert. Erfreulicherweise lassen sich die beiden Sequenzen VI und X durch 40 minütige Bestrahlung auch wieder vollständig aktivieren. Der Anspruch, eine lichtschaltbare siRNA mit perfektem „An/Aus-Verhalten“ herzustellen, konnte also erfüllt werden. Die beiden Sequenzen XI und XII konnten leider nur zu rund 80 % reaktiviert werden. Über die Gründe hierfür kann man spekulieren. Bekannt ist, dass die Stabilität der Photoschutzgruppe ebenso wie die Effizienz der Photolyse nicht allein von den modifizierten Basen selbst, sondern auch von den umgebenden Basen bestimmt wird. Möglicherweise liegt hier also ein sequenzspezifisches Problem vor, welches vermutlich die modifizierte Base elf betrifft. Diese ist in beiden auffälligen Sequenzen modifiziert und in Vergleich zur Sequenz XI, in der nur die elfte Base modifiziert ist, zeigt die Sequenz XII nicht signifikant mehr Restinaktivierung, obwohl sie zwei Photoschutzgruppen trägt.

#### *ENTSCHÜTZUNGSANALYTIK DER ERFOLGREICH INAKTIVIERTEN siRNA-STRÄNGE*

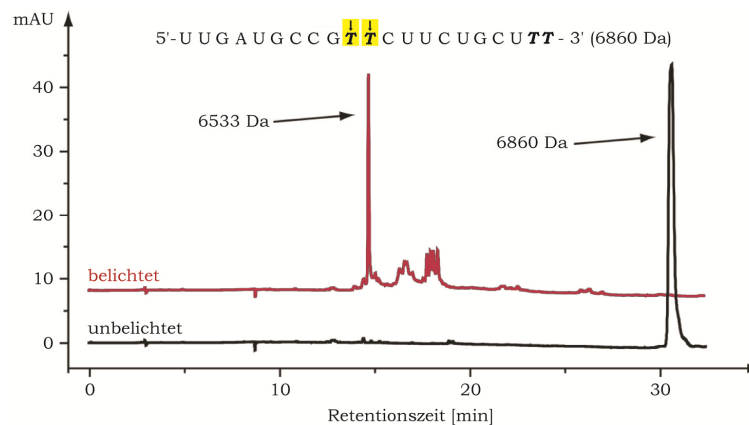
Zwei der hergestellten siRNA antisense-Stränge mit Photoschutzgruppe im Schnittstellenbereich zeigten das gewünschte, klare An/Aus-Verhalten vor und nach der Belichtung. Zwei weitere Stränge allerdings, jene welche eine Modifikation auf der elften Base enthalten, konnten nicht vollständig reaktiviert werden. Es ist jedoch bekannt, dass die Photolyseeffizienz sequenzabhängig unterschiedlich sein kann, selbst wenn es sich um identische Basen mit ein und derselben Photoschutzgruppe handelt. Desweiteren ist bekannt, dass sich bei der Abspaltung der NPP-Gruppe in unterschiedlichem Maße ein Nebenprodukt bilden kann, welches nicht in einer entschützten Sequenz resultiert, sondern in einer dauerhaft modifizierten (s. Kap. 1.2.1). Über eine RP-HPLC sollte sich dieser Vorgang beobachten und die Verhältnisse von Produkt und Nebenprodukt bestimmen

lassen. Eine nachfolgende MS-Charakterisierung sollte die gefundenen Peaks identifizieren, wemgleich damit nur eine Unterscheidung zwischen modifiziert und unmodifiziert getroffen werden kann, da die Photoschutzgruppe und das möglicherweise gebildete Nebenprodukt dieselbe Masse haben. Eine Veränderung in der Retentionszeit ist zwischen diesen beiden Derivaten jedoch zu erwarten, womit eine eindeutige Zuordnung möglich sein sollte.



**Abb. 41 Chromatogramm einer LC-MS Messung von Sequenz VI.**

Vergleicht man die Chromatogramme von Sequenz VI vor und nach der Belichtung, so ist zu erkennen, dass der Peak der modifizierten Ausgangssequenz (schwarzes Chromatogramm, 6684 Da) durch die Belichtung vollständig verschwindet. Neben einem Peak der unmodifizierten Sequenz (6520 Da) ist zudem ein kleinerer Peak mit derselben Masse, aber einer anderen Retentionszeit, als die der Ausgangssequenz entstanden. Dieser führt aber laut den Ergebnissen des Zellkulturtests zu keinerlei Einbußen im Regulationsvermögen der siRNA. Zu bedenken ist allerdings, dass das Belichtungsexperiment zwar in 1 x PBS Puffer bei pH 7,4 durchgeführt wurde, um möglichst physiologischen Bedingungen zu simulieren, den exakten chemischen Bedingungen innerhalb der Zelle entspricht dies jedoch nicht.

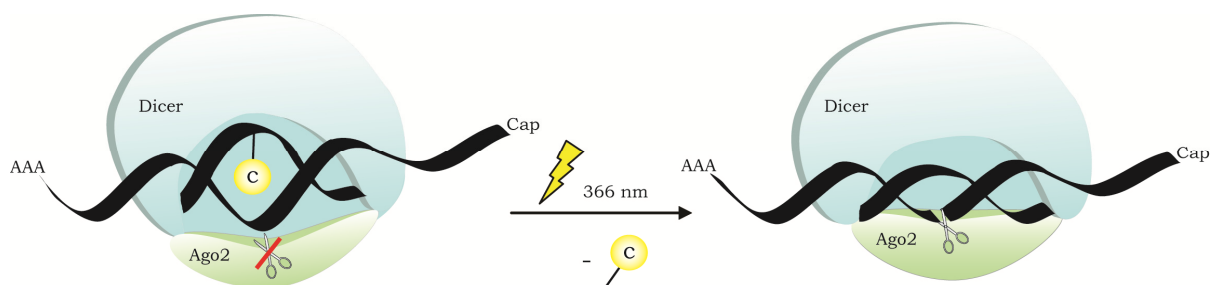


**Abb. 42 Chromatogramm einer LC-MS Messung von Sequenz XII.**

Im Chromatogramm der belichteten Sequenz XII, von der zwei NPP-Gruppen abgespalten werden, ist ein deutlicherer Laufzeitunterschied zu den, zu höheren Retentionszeiten verschobenen Photolysenebenprodukten zu erkennen. Es wird aber auch deutlich, dass der Anteil des entstandenen Nebenproduktes größer ist, als bei der Belichtung von Sequenz VI, was für die Problematik der nicht vollständigen Lichtaktivierbarkeit verantwortlich sein könnte.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Studie gelang es, eine siRNA gegen ein Reportergen durch Einführung einzelner photolabil modifizierter Desoxynukleotide lichtaktivierbar zu machen. Eine erfolgreiche Inaktivierung konnte durch Einführung einer 2-(2-Nitrophenyl)propylgruppe auf den die mRNA-Schnittstelle flankierenden Nukleotiden zehn und elf, sowie an Position neun erzielt werden. Modifikationen in anderen Bereichen der siRNA, wie z.B. der *seed*-Region sowie im *sense*-Strang führten zu keiner oder nur einer geringfügigen Inaktivierung. Dies legt den Schluss nahe, dass die photolabile Modifikation tatsächlich mit dem enzymatischen Spaltungsschritt interferiert und nicht etwa den Strangeinbau in den RISC-Komplex, das Aufwinden des siRNA-Doppelstranges, das Entfernen des Gegenstranges oder die mRNA-Erkennung blockiert.



**Abb. 43 Die Einführung einer photolabilen Modifikation im Bereich der Schnittstelle (*cage*) führt zu einer Blase in der siRNA:mRNA-Helix, wodurch die enzymatische mRNA-Spaltung unterbunden wird. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wird die Modifikation abgespalten. Die Helix nimmt eine A-Konformation ein, Ago2 kann die mRNA nun spalten.**

Eine komplette Reaktivierung gelang für zwei Sequenzen. Sequenzen, in denen das elfte Nukleotid modifiziert war konnten ihre Aktivität durch Belichtung nicht in vollem Umfang zurückerlangen. LC-MS Untersuchungen legen nahe, dass die Bildung des Photolysenebenproduktes hier in größerem Ausmaß stattfindet, was unter anderem von der unmittelbaren chemischen Umgebung, also auch der Sequenz abhängt. Die siRNAs mit einer einzelnen Modifikation auf Nukleotid neun oder zehn konnten durch 30 minütige Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) aktiviert werden und zeigten die gleiche Regulationsstärke wie eine unmodifizierte Vergleichssequenz. Das Ziel, eine lichtinduzierbare siRNA mit perfektem „An/Aus-Verhalten“ herzustellen, wurde erreicht.



Für zukünftige Projekte wäre es interessant, die lichtgesteuerte RNAi für tatsächliche, konkrete Fragestellungen *in vivo* anzuwenden. Hier kommen vor allem Studien an „durchsichtigen“ Organismen wie *D. melanogaster*-Embryos oder Zebrafisch in Frage. Insbesondere bei Entwicklungsstudien von *D. melanogaster* könnte die Möglichkeit einer RNA-Interferenz in räumlich definierten Kompartimenten von Interesse sein.

Zur weiteren Methodenentwicklung im Bereich *delivery* kann über eine kovalente Verknüpfung der siRNA an ein *carrier*-Molekül, wie z.B. Cholesterin nachgedacht werden. Wählt man die Photoschutzgruppe gleichzeitig als Anker für den Linker der kovalenten Verknüpfung, bietet das zwei Vorteile. Zum einen wächst damit der sterische Anspruch der photolabilen Modifikation um ein Vielfaches, was eine sichere Ausschaltung gewährleisten könnte. Zum anderen hat man damit durch die Photolyse automatisch eine einfache Möglichkeit, den *carrier* schnell und effektiv abzutrennen. Die aminomodifizierte NPP-Gruppe, die in der nachfolgenden FCCS-Studie zum Einsatz gekommen ist (s. Abb. 48), bietet hierfür ein gutes Grundgerüst.

#### **3.1.4. Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie lichtaktivierbarer siRNAs in Zellen**

##### *DIE METHODE DER FLUORESZENZ-KREUZKORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE (FCCS)*

Die FCCS ist eine Möglichkeit, die intrazelluläre Bewegung zweier (oder mehrerer) Molekülspezies auf Einzelmolekülebene zu vergleichen. Hierzu werden die verschiedenen Spezies mit spektral voneinander unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffen versehen und mit einem Konfokalmikroskop in einem Kleinstvolumen zur Fluoreszenz angeregt und beobachtet. Aufgrund des minimalen Volumens ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Moleküle zufällig gemeinsam durch das Messvolumen bewegen, extrem gering. Beobachtet man also einen solchen Vorgang, Ko-Diffusion genannt, ist davon auszugehen, dass diese beiden Moleküle aneinander gebunden sind.

Diese Methode ist in der Arbeitsgruppe Schwillke (Technische Universität Dresden) etabliert und wurde dort bereits in ersten Studien des RNAi Mechanismus angewendet.<sup>[127]</sup> Die Gruppe verfügt über ein AGO2-GFP-Fusionsprotein. Durch den Einsatz von Fluoreszenzmarkierter siRNA können Aussagen über die Wechselwirkung zwischen dieser und dem RISC getroffen werden. Ist der Führungsstrang markiert, kann eine Kreuzkorrelation zwischen RISC und siRNA-Strang beobachtet werden, solange dieser aktiv ist. Die Bildung des RISC mit Aufwinden des siRNA Doppelstranges und Entfernung des Gegenstrangs verläuft hingegen so schnell, dass für einen markierten Gegenstrang und den RISC keine Kreuzkorrelation erfasst werden kann. Dasselbe gilt für eine etwaige Kreuzkorrelation zwischen einer markierten Ziel-mRNA und RISC. Auch deren Abbau geschieht in einem Zeitfenster, das im Rahmen einer FCCS nicht detektierbar ist.

Interessant wäre es nun zu vergleichen, wie sich die verschiedenen Komponenten – Führungs- und Gegenstrang, sowie Ziel-mRNA – bei Einsatz einer photolabil geschützten

siRNA Verhalten. Ist, wie von uns angenommen, tatsächlich die mRNA-Spaltung der Punkt, an dem die RNAi durch die Modifikation unterbrochen wird, wäre das Auftreten einer Kreuzkorrelation von Ziel-mRNA und RISC denkbar. Eine Kreuzkorrelation zwischen Gegenstrang und RISC hingegen würde dafür sprechen, dass entgegen der bisherigen Annahmen doch die RISC-Formierung der beeinträchtigte Schritt ist.

Darüber hinaus ist ein Experiment denkbar, in dem der Verbleib der photolabilen Schutzgruppe selbst untersucht werden könnte. Hierzu müsste neben dem modifizierten siRNA-Strang auch die NPP-Gruppe selbst mit einem Fluorophor versehen werden, um eine Kreuzkorrelation zwischen der siRNA und ihrer Modifikation zu beobachten. Mit Hilfe dieses Experiments könnte die beobachtete Problematik der nicht induzierten Selbstaktivierung der ausgeschalteten siRNAs geklärt werden (s. Kap. 3.1.3 → *Stabilität der Photoschutzgruppe in Zellkultur*).

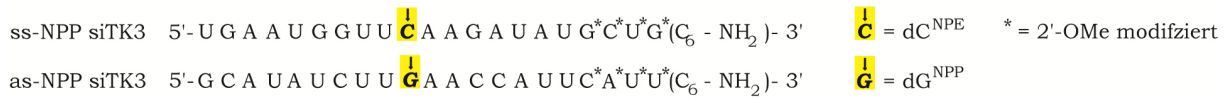
#### *siTK3 LUMINESZENZASSAY*

Für die FCCS-Untersuchungen sollte die gleiche siRNA verwendet werden, die im AK Schwille bereits für die bisherigen Studien genutzt wurde. Das Zielgen dieser als siTK3 bezeichneten siRNA ist die *Renilla* Luciferase, exprimiert von dem Plasmid pRL-TK. Um die Nukleasestabilität zu erhöhen, sind die letzten 4 Nukleotide des 3'-Endes mit einer 2'-O-Methylmodifikation versehen.

Die Vorteile eines dualen Reporterassays wurden bereits im Abschnitt über das eGFP-RFP-System diskutiert. Ein ebenso häufig verwendetes Reporterensystem ist der *Renilla/Firefly* Luciferase zweifach Reporterassay. *Renilla* und *Firefly* Luciferase sind zwei Enzyme, die zwei unterschiedliche Substrate unter Emission von Lumineszenz unterschiedlicher Wellenlänge umsetzen. Ebenso wie beim RFP-GFP-System kann so die Expressionsstärke des einen Plasmids auf die des anderen normiert werden. Da für das Auftreten der Lumineszenz zwingend das Substrat vorhanden sein muss, liegt der Vorteil dieses Systems im geringen Hintergrundsignal. Dies bedingt aber auch gleichzeitig eine geringfügig aufwändigere Handhabung, als die des RFP und eGFP-Systems, da dort die Fluoreszenz einfach nur ausgelesen werden muss.

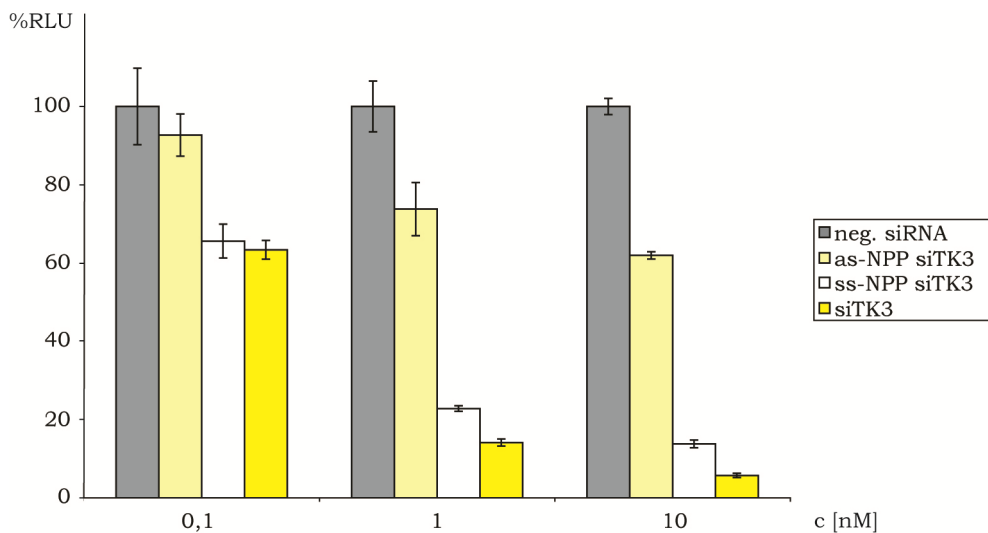
Die Experimente mit der siTK3 wurden in 10G-Zellen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine aus HEK-Zellen erhaltene Zelllinie, die AGO2 als Fusionsprotein mit eGFP exprimiert. Dadurch wird es möglich, eine Kreuzkorrelation von markierten Oligonukleotiden und dem RISC zu untersuchen. Unter der Annahme, dass die photolabile Modifizierung der Schnittstelle ein allgemein gültiger Ansatz ist, um die Aktivität einer beliebigen siRNA zu modifizieren, wurde zunächst der Führungsstrang der siTK3 an Position zehn mit einem NPP-Desoxyribonukleotid versehen. Zu Kontrollzwecken wurde darüber hinaus ein ebenfalls an Position zehn modifizierter Gegenstrang synthetisiert. Um die Lokalisation der Stränge später im FCCS-Experiment verfolgen zu können, wurden zudem

an die 3'-Enden ein Amin über einen C6-Linker angebunden, um den Fluoreszenzmarker Cy5 durch NHS-Kupplung anzubringen.



**Abb. 44 Photolabil modifizierte Einzelstränge der siTK3.**

Diese Stränge wurden mit ihrem jeweiligen unmodifizierten Gegenstrang hybridisiert und zunächst in 10G-Zellen transfiziert und auf ihre Aktivität hin in einem einfachen Lumineszenzassay untersucht.



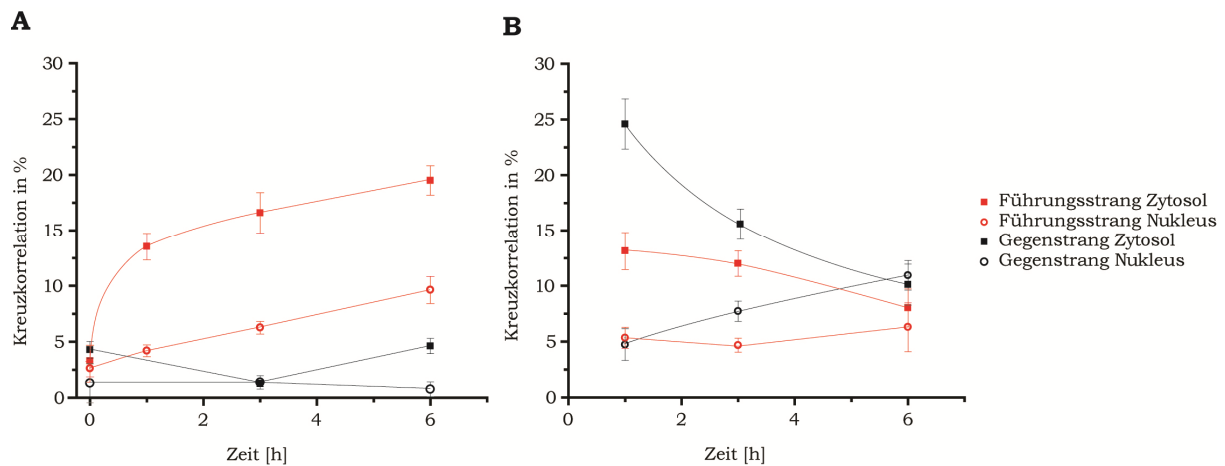
**Abb. 45 Lumineszenzassay der anti-TK3 siRNAs.**

Als Negativkontrolle dient in diesem Assay ein 21mer RNA-Doppelstrang, der kein bekanntes Zielgen in der verwendeten Zelllinie hat. Eine Titration der siRNA Konzentration von 0,1 nM bis 10 nM zeigt, dass eine effektive Expressionsunterdrückung erst bei höheren Konzentrationen erreicht wird. Das Zielgen wird durch die Zugabe von 10 nM siRNA nach 24 h auf unter 20 % der Ausgangsexpression supprimiert. Die siRNA mit NPP-Modifikation im Gegenstrang, ss-NPP siTK3, zeigt dabei eine geringfügig weniger starke Aktivität, als die Positivkontrolle siTK3. Die siRNA mit NPP-geschützter Schnittstelle im *antisense*-Strang, as-NPP siTK3, ist zwar nicht völlig inaktiv, aber dennoch ist die Suppression, wie gewünscht, deutlich reduziert. Die Genaktivität ist auf gut 60 % herunter reguliert. Der Grund für die Restaktivität kann darin zu suchen sein, dass die siRNA in unserem Arbeitskreis hergestellt und aufgereinigt, dann aber verschickt und zunächst längere Zeit gelagert wurde. Da im AK Schulle keine Möglichkeit zur erneuten HPLC-Aufreinigung besteht und, wie bereits gezeigt, schon geringe Verunreinigungen mit vorzeitig entschützten

siRNA-Strängen zu einer deutlichen Reaktivierung des Mehrfachdurchsatz-Enzymkomplexes RISC führen, ist hier vermutlich die Ursache zu suchen. Da in diesem Experiment allerdings keine Notwendigkeit für perfektes An/Aus-Verhalten besteht, wurde der Lumineszenzassay auch nicht weiter optimiert. Die grundsätzliche Aussage, dass auch für die siTK3 ein schnittstellenmodifizierter *antisense*-Strang zu einer deutlich herabgesetzten RNAi-Aktivität führt, während ein schnittstellenmodifizierter *sense*-Strang das Zielgen weiterhin größtenteils herunter reguliert, kann jedoch anhand dieses Experiments getroffen werden und ist ausreichend.

*KREUZKORRELATION VON RISC UND DEN EINZELNEN siRNA-STRÄNGEN BEI VERWENDUNG SCHNITTSTELLENMODIFIZIERTER siRNA-STRÄNGE.*

Für die FCCS-Experimente wurden die im Lumineszenzassay getesteten siRNAs in 10G-Zellen mikroinjiziert.



**Abb. 46 Kreuzkorrelation der einzelnen siTK3 Stränge und des RISC.**

**A:** mit unmodifizierter siRNA.

**B:** mit NPP-Modifikation jeweils an Position 10. Die Kurven wurden graphisch an die Messwerte angepasst und dienen allein der Übersichtlichkeit.

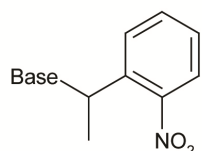
Abb. 46 zeigt eine typische Kreuzkorrelation (KK) zwischen dem RISC-Komplex und den beiden Strängen einer siRNA. In roter Farbe ist die KK mit dem Führungsstrang aufgetragen, in schwarz die KK mit dem Gegenstrang. Dabei ergeben sich unterschiedliche Verläufe für das Zytosol und den Nukleus. Eine KK zwischen Gegenstrang und RISC ist wie erwartet kaum zu beobachten, da dieser sofort abgebaut wird. Der Führungsstrang reichert sich hingegen zunehmend in RISC-Komplexen an, wobei dies im Zytosol deutlich schneller und in größerem Maße geschieht, als im Kern. Dies entspricht der normalen Verteilung einer mikroinjizierten siRNA in Zellen.<sup>[127]</sup> Üblicherweise befindet sich kaum siRNA im Kern. Abbildung 33 B zeigt die Verhältnisse, wie sie nach der Injektion zweier siRNAs aussehen, die im *sense*-Strang (schwarz) bzw. im *antisense*-Strang (rot) an Position zehn die NPP-Modifikation tragen. Der modifizierte *antisense*-Strang verhält sich völlig anders als sein

unmodifiziertes Analoges. In den ersten 30 min nach der Mikroinjektion erfolgt zwar noch eine vergleichbare Aufnahme in der RISC (in beiden Fällen ca. 13 % KK) danach wird aber nicht, wie im Fall eines unmodifizierten Stranges, stetig mehr siRNA in den RISC eingebaut, sondern die KK nimmt langsam wieder ab. Das kann eigentlich nur durch zwei Szenarien zu erklären sein. Entweder, die komplette siRNA wird wieder aus dem RISC entfernt oder der Gegenstrang wird stattdessen eingebaut und der Führungsstrang dafür – verlangsamt, wie im Falle des modifizierten Gegenstranges dieser auch – abgebaut. Letztere Möglichkeit stünde allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den eGFP siRNA Experimenten. Eine Lichtaktivierung nach längerer Zeit wäre nicht mehr möglich, sobald der Führungsstrang erst einmal abgebaut ist. Daher ist es wahrscheinlich, dass der blockierte Führungsstrang nicht im RISC verbleibt, sondern sich Proteinkomplex und siRNA oder möglicherweise der einzelne Führungsstrang, wieder trennen.

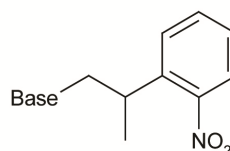
Im Gegensatz zur unmodifizierten siRNA, zeigt die siRNA mit modifiziertem *sense*-Strang im Zytosol sehr schnell eine sehr hohe Kreuzkorrelation mit dem RISC (schwarze Quadrate). Die Anwesenheit der Modifikation im Bereich der Schnittstelle am Gegenstrang scheint die Entfernung desselben aus dem RISC zunächst zu behindern. Eine dauerhafte Blockade der RNAi wird nach unseren Ergebnissen mit der anti-eGFP siRNA jedoch nicht erwartet und in der Tat nimmt die Kreuzkorrelation mit der Zeit wieder stark ab. Offenbar wird der Gegenstrang also trotz Modifikation entfernt, es dauert nur länger. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen unseres Fluoreszenzassays für die Sequenz IV. Diese *sense*-Sequenz war ebenfalls im Bereich der Schnittstelle (Pos. 9) modifiziert und zeigte eine geringfügige Inaktivierung, für deren Erklärung eine solche verlangsamte Entfernung des Gegenstranges angedacht wurde. Die These, dass der Gegenstrang tatsächlich letztendlich entfernt und nicht, wie es auch denkbar wäre, die komplette gestörte siRNA wieder aus dem RISC beseitigt wird, wird durch die Ergebnisse des Lumineszenzassays für die modifizierte siTK3, die im nachfolgenden Abschnitt diskutiert werden, unterstützt.

Im Kern ist ein anderer Trend zu beobachten. Dort steigt die KK erst langsam im Laufe der Zeit an. Hierzu ist anzumerken, dass fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der injizierten Zellen für die *sense*-modifizierten Proben eine ungewöhnliche Lokalisation innerhalb der Zelle offenbaren - die Bilder zeigen eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz auf Zellkern und Zytosol. siRNAs gelangen üblicherweise zwar in den Zellkern, werden durch einen Exportin-5-Transport jedoch aktiv wieder heraus geschleust.<sup>[128]</sup> Daher ist ihre Konzentration dort deutlich geringer. In diesem Fall akkumuliert die siRNA offenbar im Zellkern. Dies könnte erklären, warum auch dort wie im Zytosol nur zeitlich eine zunehmende KK mit dem RISC zu erkennen ist. Zu erwarten wäre, dass auch dort die KK mit fortschreitender Zeit über den beobachteten Zeitraum von sechs Stunden hinaus wieder abnimmt, da der Gegenstrang entfernt wird.

Zu überlegen bleibt, aus welchem Grund der Gegenstrang sich so anders verhält. Allein die Tatsache, dass er eine Modifikation trägt kann nicht die Ursache sein, da der modifizierte Führungsstrang eine normale Verteilung in der Zelle aufweist. Allerdings sind die beiden Stränge nicht mit derselben Modifikation versehen. Die Photoschutzgruppen sind sich zwar sehr ähnlich, allerdings sind sie nicht identisch. Während der Führungsstrang mit einer Nitrophenylpropylgruppe versehen ist, trägt der Gegenstrang, bedingt durch eine andere Base, die modifiziert wurde, eine Nitrophenylethylgruppe.



1,2 Nitrophenylethyl



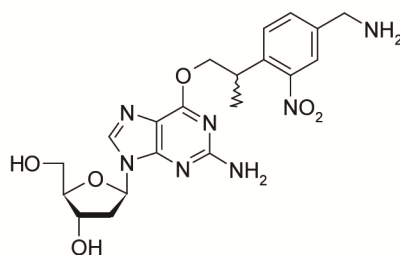
1,2 Nitrophenylpropyl

**Abb. 47 Vergleich der unterschiedlichen Photoschutzgruppen für *sense*- und *antisense*-Strang.**

Neben unterschiedlichen Abspaltungsmechanismen, sowie entsprechend verschiedenen Abspaltungsprodukten, welche vor der Belichtung aber keine Rolle spielen sollten, unterscheiden sich die beiden Schutzgruppen hauptsächlich in ihrem räumlichen Anspruch. Denkbar ist daher, dass die 1,2-Nitrophenylethylgruppe den aktiven Transport aus dem Kern durch Exportin5 blockiert oder zumindest verlangsamt. Die NPE-Gruppe ist zwar insgesamt kleiner als die NPP-Gruppe, allerdings ist letztere durch die zusätzliche Methylengruppe vermutlich beweglicher, während die NPE-Gruppe sehr starr gebunden ist.

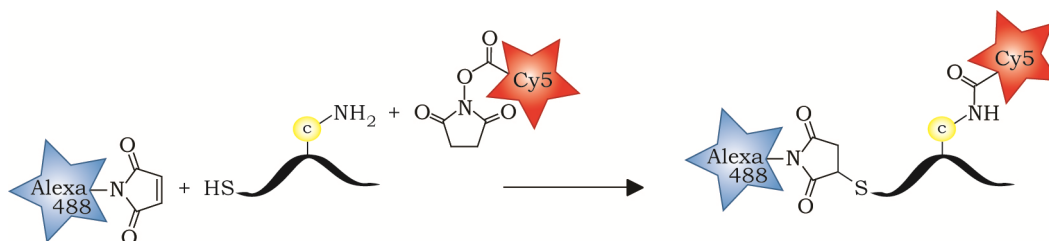
#### *SYNTHESE EINER ZWEIFACH FLUORESZENZMARKIERTEN siRNA*

Weiterhin ungeklärt ist die Frage, auf welchen Mechanismus die unspezifische, vorzeitige Aktivierung photolabil geschützter siRNAs zurückzuführen ist. In erster Linie wäre die Frage zu klären, ob die Photoschutzgruppe dazu tatsächlich ursächlich abgespalten wird, oder ob eine RNAi trotz der Modifikation möglich, aber vielleicht verlangsamt stattfinden kann. Hilfreich hierzu wäre eine doppelt fluoreszenzmarkierte siRNA, mit einem Fluorophor am Oligonukleotid selbst sowie einem weiteren Fluorophor an der photolabilen Modifikation. Eine Kreuzkorrelation dieser beiden Signale würde zeigen, ob die Photoschutzgruppe und das Oligonukleotid räumlich assoziiert bleiben oder sich mit der Zeit voneinander trennen. Zu diesem Zwecke wurde eine siRNA hergestellt, die eine aminomodifizierte Photoschutzgruppe trägt.



**Abb. 48 Aminomodifizierte NPP-Schutzgruppe zur postsynthetischen Fluorophorkupplung.**

Da auch das 5'-Fluorophor des Oligonukleotids aus Gründen der Ausbeute postsynthetisch gekuppelt werden sollte, wurde das 5'-Ende mit einem C<sub>6</sub>-verlinkten Thiol modifiziert. Während Amine typischerweise mit NHS-Estern verknüpft werden, kuppelt man Thiole an Maleimide. Die Chemie dieser beiden Kupplungen ist selektiv, sodass das photolabil geschützte Oligonukleotid mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen versehen werden kann.



**Abb. 49 Strategie einer Zweifachmarkierung der siRNA mit Cy5 und Alexa488.**

#### ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Durch die Experimente mit photolabil modifizierten TK siRNAs konnten weitere Erkenntnisse über lichtaktivierbare RNA-Interferenz gewonnen werden. Zunächst bestätigte sich, dass der Ansatz, die RNAi zu blockieren, indem man die zur mRNA-Schnittstelle gegenüberliegenden siRNA-Führungsstrangnukleotide mit einer Photoschutzgruppe versieht, offenbar auch über die bereits erfolgreich getestete anti-eGFP siRNA hinaus anwendbar ist. Desweiteren konnten die Vermutungen über die genauen Auswirkungen, die eine sterische Blockierung dieser Nukleotide in einer siRNA mit sich bringt, untermauert bzw. ergänzt werden. So ist anhand von Kreuzkorrelationsexperimenten deutlich geworden, dass tatsächlich ein Einbau der modifizierten siRNAs in den RISC stattfindet und nicht bereits dieser Schritt unterbunden wird. Allerdings scheinen die inaktivierten Stränge nicht, wie angenommen, im RISC zu verweilen, bis eine Entschützung stattfindet, sondern nach einer Weile wieder aussortiert zu werden. Eine Lichtaktivierung allerdings bleibt möglich, daher muss zu einem späteren Zeitpunkt ein Wiedereinbau stattfinden. Da nach wie vor nicht geklärt ist, ob der Gegenstrang aufgewunden und entfernt wird oder, was wahrscheinlicher ist, dem RISC als erstes Substrat dient, ist ebenfalls unklar, ob die modifizierte siRNA als intakter Doppelstrang aus dem RISC beseitigt wird, oder der

Doppelstrang aufgewunden und der Führungsstrang als Einzelstrang entfernt wird. Die letzere Möglichkeit ist allerdings allein deshalb unwahrscheinlich, weil ein Einzelstrang im Zytoplasma deutlich instabiler ist als ein Duplex und vermutlich nicht über einen längeren Zeitraum in voller Konzentration erhalten bleiben würde. Gewissheit brächte hier ein FCCS-Experiment, in dem sowohl Führungs- als auch Gegenstrang fluoreszenzmarkiert sind, jedoch mit unterschiedlichen Fluorophoren, sodass sich die Lokalisation beider Stränge in Bezug zueinander verfolgen ließe.

Auch die FCCS-Messungen der zweifach markierten siRNA, mit deren Hilfe die Möglichkeit der ungewollten, vorzeitigen Entschützung bestätigt oder ausgeschlossen werden könnte, stehen noch aus.



## 3.2. Lichtaktivierbare *molecular beacons*

### 3.2.1. Vorarbeiten

Mit der Entdeckung nichtcodierender RNAs, wie z.B. der microRNAs, ist das wissenschaftliche Interesse an posttranskriptionaler Genregulation förmlich explodiert. Jedoch ist diese nicht allein wegen ihres Potentials als Werkzeug zur Genmanipulation in den Fokus der Forschung gerückt. Auch das Verständnis der zelleigenen Mechanismen zur Modulation der Genaktivität über die Transkription hinaus ist von großem Interesse, um neue Erkenntnisse für die funktionelle Genomik und letztlich die Systemik zu gewinnen. Die mRNA-Prozessierung spielt hierfür eine wichtige Rolle. Die subzelluläre mRNA-Lokalisation, der gezielte Transport einer mRNA, ist dabei einer der Punkte, an denen diese Mechanismen ansetzen. Während die Transkription eines Gens nur allgemein zu der Möglichkeit einer Proteinsynthese in der gesamten Zelle führt, kann durch die mRNA-Lokalisation festgelegt werden, wo dies geschieht. Das codierte Protein wird nur in jenen Zellbereichen translatiert, in denen es auch benötigt wird, indem die mRNA nur in genau diese Bereiche transportiert und ihre Translation bis dahin unterdrückt wird. Insbesondere hochpolarisierte Zellen wie z.B. Neuronen mit einer stark asymmetrischen Proteinverteilung nutzen diesen Mechanismus. Und wenngleich auch zahlreiche Proteine ihr eigenes Zielsignal besitzen, ist der Vorteil des mRNA-Transports gegenüber einem späteren Transport des Proteins der, dass die betreffenden Proteine gar nicht erst andernorts entstehen, wo sie ggf. zu Fehlfunktionen oder Fehlentwicklungen der Zelle führen könnten.<sup>[129],[130]</sup> Darüber hinaus erlaubt die mRNA-Lokalisation eine variable, bedarfsabhängige Proteinsynthese, gesteuert durch eine Stimulation oder Repression des Translationsapparates vor Ort. Die Fähigkeit von Nervenzellen zu lernen ist auf solche Vorgänge, neuronale Plastizität genannt, zurückzuführen.<sup>[131]</sup> Die mRNA-Lokalisation wird auf unterschiedlichen Wegen realisiert: durch lokal begrenzten Schutz vor Abbau, Diffusion im Zusammenspiel mit lokaler Akkumulierung oder durch aktiven Transport.

Die Voraussetzung, um detaillierte Informationen über die räumliche und zeitliche Verteilung einer mRNA zu erhalten, ist die Möglichkeit ihrer Visualisierung in der intakten Zelle. Seit 1969 ist es mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung (ISH) zwar möglich ein statisches Bild des mRNA-Levels einer Zelle zu zeichnen, diese wurde aber vorrangig für fixierte Zellen entwickelt und kann keine dynamischen Prozesse erfassen.<sup>[132]</sup> Mittlerweile gibt es aber diverse Fluoreszenzsonden, die auch eine *in vivo* Hybridisierung ermöglichen. Sie sind in oligonukleotidbasierte und proteinbasierte Sonden zu unterteilen.

Proteinbasierte Sonden haben den Vorteil, dass sie von der Zelle selbst exprimiert werden können und somit keinerlei invasiver Eingriff notwendig ist, um die Sonde in die Zelle einzubringen. Diese Sonden bestehen üblicherweise aus einem fluoreszierenden Protein wie eGFP und einem RNA-bindenden Protein (RBP). Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist

die Proteinfragmentkomplementierung.<sup>[133]</sup> Hierbei sind zwei Untereinheiten des Fluoreszenzproteins an zwei verschiedene RBPs gekuppelt, sodass Fluoreszenz nur auftritt, wenn zwei RBPs benachbart an die Sequenz binden und die beiden Hälften des Fluoreszenzproteins zur aktiven Konformation assoziieren können. Dennoch haben die proteinbasierten Methoden einen entscheidenden Nachteil. RBPs binden überwiegend unspezifisch oder benötigen spezielle Bindungsstellen, sodass entweder keine spezifische RNA detektiert werden kann oder spezielle Bindungsstellen eingefügt werden müssen, was wiederum bedeutet, dass eine Detektion endogener RNA nicht möglich ist.

Die einfachste Variante einer Oligonukleotidsonde ist eine einfache lineare *antisense*-Sequenz, die an einem Ende mit einem Fluorophor behaftet ist. Der größte Nachteil dieser Sonden ist darin zu sehen, dass die beobachtete Fluoreszenz kaum Aufschluss darüber gibt, ob die Sonde die Zielsequenz tatsächlich gebunden hat oder nicht.<sup>[134]</sup> Daher ist die Anwendung dieser einfachen Sonden entweder auf solche RNAs beschränkt, die stark akkumuliert vorliegen oder die Bindungsstellen für mehrere Sonden aufweisen, sodass beispielsweise ein FRET-Paar benachbart binden und durch die veränderte Emissionswellenlänge Aufschluss über den Hybridisierungszustand geben kann.

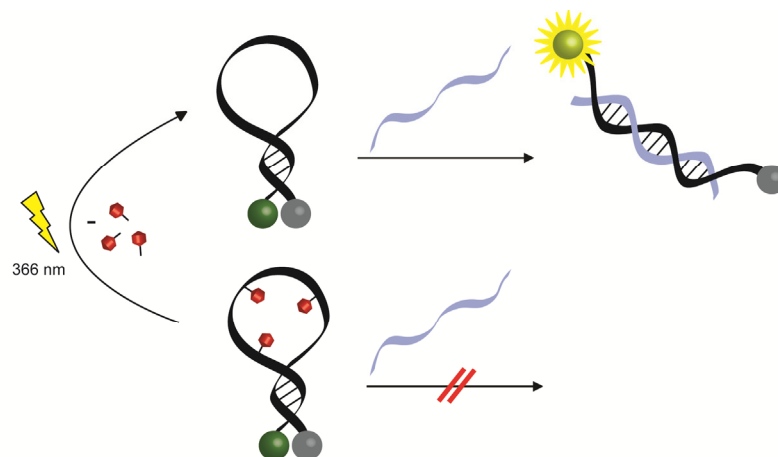
Hier zeigen *molecular beacons* ihren großen Vorteil. Aufgrund ihrer Struktur, eine Haarnadel an deren beiden Enden ein Fluorophor bzw. ein Quencher sitzen, fluoreszieren sie im ungebundenen Zustand nicht. Die Haarnadel wird erst dann geöffnet, wenn ein zur Schleife komplementäres Oligonukleotid an diese bindet. Die Hintergrundfluoreszenz durch ungebundene Sonden ist somit minimiert, wenn auch nicht völlig ausgeschaltet, da unspezifische Bindung, zum Beispiel an DNA-bindende Proteine, auftritt. Zudem sind *molecular beacons* selektiver als lineare Sonden. Da ein Teil der Sonde, nämlich der Stamm, auch im ungebundenen Zustand hybridisiert vorliegt, muss das Hybrid aus Schleife und Zielstruktur eine gewisse Stabilität aufweisen, um den Stamm öffnen zu können. Je nach Wahl von Schleifen- und Stammsequenz kann man so *molecular beacons* designen, die zwischen dem Zieloligonukleotid und einer Sequenz, die sich von dieser durch nur eine Base unterscheidet, diskriminieren.

Allen diesen Sonden ist allerdings gemein, dass sie Fluoreszenz emittieren, sobald sie an ihre Ziel-mRNA binden. Dies führt zu einer verhältnismäßig hohen Hintergrundfluoreszenz, die es erschwert ein einzelnes Sonden:mRNA-Hybrid auszumachen und zu verfolgen. Schon Ende der neunziger Jahre nahm sich J. Politz dieses Problems an und sah eine mögliche Lösung in der Verwendung einer photolabil ausgeschalteten Sonde. Die gezielte photolabile Schützung von Nukleobasen war allerdings bis dato nicht bekannt, und die hochspezifischen *molecular beacons* als Oligonukleotidsonden noch nicht so weit verbreitet. Politz' Ansatz bestand daher darin, das Fluorophor selbst, namentlich Fluoreszein, photolabil auszuschalten und dieses mit einem ASO zu kombinieren.<sup>[135]</sup> Die interessante Anwendung für ihr Konstrukt sah sie schon damals darin, mRNA-Transport zu verfolgen.

*Molecular beacons* sind jedoch *antisense*-Sonden, vor allem in ihrer Spezifität, deutlich überlegen. Zudem hat Fluoreszein als Fluorophor eine Reihe von Nachteilen. Neben der geringen Fluoreszenzintensität im physiologischen pH-Bereich und der breiten Fluoreszenzbande, ist vor allem das schnelle Bleichen ein Problem.

Die Methoden der Proteinverfolgung sind bereits einen Schritt weiter. Hier wurden verschiedene lichtaktivierbare Varianten der gängigen fluoreszenten Markerproteine entwickelt. Proteine wie pa-GFP, Kaede und DRONPA reagieren auf Bestrahlung mit UV-Licht mit einer stark erhöhten Fluoreszenzintensität und bzw. oder einer Verschiebung in der Emissionswellenlänge. Hierdurch eröffnet sich die Möglichkeit, diese Fluorophore mit räumlicher Auflösung zu aktivieren.<sup>[136]</sup>

Eine Kombination aus einer lichtaktivierbaren Sonde, wie sie für die Proteinverfolgung schon zum Einsatz kommt und wie Politz sie in einem ersten Versuch erdacht hatte, und der Selektivität eines *molecular beacon*, sollte also ein Werkzeug schaffen, mit dessen Hilfe eine hochselektive und gleichzeitig räumlich präzise aufgelöste Zielstrukturerkennung möglich ist.



**Abb. 50 Das Prinzip eines photoaktivierbaren *molecular beacon*: Während ein unmodifizierter MB ungehindert mit seiner Zielsequenz (hellblau dargestellt) hybridisieren kann (obere Reihe) ist diese Möglichkeit bei einem photoaktivierbaren MB durch die Modifikationen (rote Kugeln) sterisch blockiert (untere Reihe). Erst die Bestrahlung mit Licht spaltet die Modifikationen ab, und der MB kann wieder ungehindert an seine Zielsequenz binden.**

Dass eine Störung der Bindung zwischen einem *molecular beacon* und seinem Komplement durch photolabile Schützung von Nukleobasen prinzipiell möglich ist, zeigte W.T. Monroe in einem 2005 veröffentlichten reversen Assay: hier wurde die Fähigkeit der DMNPE-Gruppe, Watson-Crick-Basenpaarung zu unterbinden, dadurch demonstriert, dass ein mit dieser Schutzgruppe modifiziertes ODN nicht mehr durch einen entsprechenden *molecular beacon* gebunden werden konnte.<sup>[137]</sup>

### 3.2.2. Vorarbeiten – die Wahl des geeigneten *molecular beacon*

Sinn und Zweck der nachfolgenden Studie sollte es nicht sein, einen neuen MB zu kreieren und zu optimieren, sondern allein die Möglichkeit einer lichtinduzierbaren Aktivierung zu überprüfen. Dennoch gab es bestimmte Punkte beim Design des zur photolabilen Schützung vorgesehenen *molecular beacons* zu bedenken.

#### LÄNGE DER SCHLEIFE

Die Länge der Schleife und des Stammes und ihr Verhältnis zueinander bestimmt nachhaltig die Selektivität und die Bindungskinetik eines *molecular beacon* (s. Kap. 1.4.1 und 1.4.2). Beide Punkte sind für eine Machbarkeitsstudie bezüglich eines photoaktivierbaren *molecular beacon* jedoch zweitrangig. Ein sehr selektiver MB wäre vorteilhaft, da dieser mit einzelnen oder im Optimalfall sogar nur mit einer einzigen photolabilen Schutzgruppe auszuschalten wäre. Dennoch ist die Notwendigkeit der Einführung mehrerer *cages* kein Ausschlusskriterium, da es weitere Punkte zu bedenken gibt. Grundsätzlich sollte ein *molecular beacon* mit einer langen Schleife (bei gleichem Stamm) weniger selektiv sein, da bei Bindung an das Zieloligonukleotid mehr Bindungsenergie frei wird und einzelne Fehlpaarungen eher toleriert werden können. Eine hohe Selektivität für den Testbeacon wäre insofern von Vorteil, als dass dieser vermutlich mit weniger Modifikationen auszuschalten wäre als ein weniger selektiver. Es gibt jedoch auch noch einen zweiten Effekt, der bei der Schleifenlänge bedacht werden muss und dieser ist sterischer Natur. Ein *molecular beacon* kann nur deshalb nicht gleichzeitig die Zielstruktur binden und dennoch geschlossen bleiben, weil ein Doppelstrang eine gewisse Rigidität aufweist. Der Radius der Schleife ist zu klein, um einen Doppelstrang auszubilden. Je größer nun die Schleife ist, desto mehr Nukleotide können binden, ohne dass der Stamm schon auseinandergetrieben wird. Auch dies kann ein Kriterium sein, welches die Anzahl der notwendigen Modifikationen zur Ausschaltung bestimmt. Je mehr Basenpaarungen bei geschlossenem Stamm möglich sind, desto weiter können die modifizierten Nukleotide auseinanderplaziert werden. Optimal wäre also ein *molecular beacon* mit einer langen Schleife und dabei gleichzeitig einem sehr stabilen Stamm für eine hohe Selektivität bei gleichzeitig maximal flexibler Schleife.

#### FLUOROPHOR UND QUENCHER

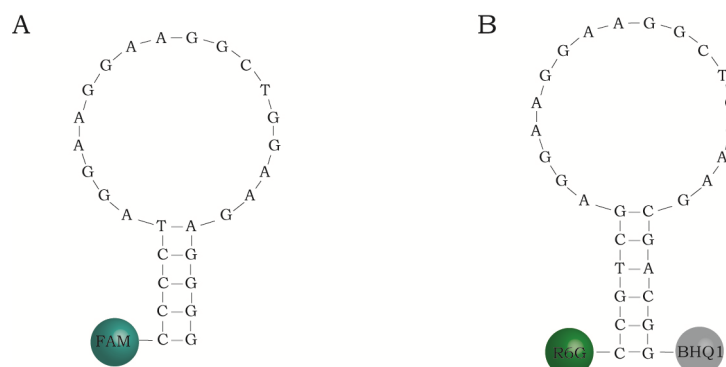
Im Hinblick auf die Photochemie unterscheidet sich ein *molecular beacon* von den von uns bisher verwendeten photolabil modifizierten Oligonukleotiden, denn sie tragen neben den Nitrophenylderivaten weitere Chromophore - Fluorophor und Quencher. Absorbiert eine dieser Funktionalitäten im Bereich der Wellenlänge, die zur Entschützung der Modifikationen eingestrahlt wird, sind zwei Szenarien denkbar, die zu Problemen führen könnten. Zum einen könnte eine Absorption des Fluorophors zu einem Bleichprozess

führen, wodurch das Fluorophor und damit auch die Funktion des *molecular beacons* zerstört würde. Durch geeignete Wahl eines Fluorophors, das keine Absorption im relevanten Wellenlängenbereich aufweist, kann diese Möglichkeit jedoch ausgeschlossen werden. Zum anderen könnte eine Absorption von Fluorophor oder Quencher zu einem Quenchen der Entschützungsreaktion führen. Dies ist jedoch als nicht sehr wahrscheinlich zu erachten, da für ein Quenchen entsprechend eines FRET-Effektes der Abstand der photolabilen Schutzgruppe zum Quencher zu groß ist. Denkbar ist allenfalls eine durch die zusätzlichen absorbierenden Chromophore geringere Photonendichte, welche aber vermutlich allenfalls zu einer weniger effizienten Entschätzung und nicht zu ihrem gänzlichen Ausbleiben führen würde.

#### ZIELSEQUENZ

Für die die Durchführung einer Machbarkeitsstudie über lichtaktivierbare *molecular beacons* ist es zunächst nicht von Bedeutung, wie die Zielsequenz beschaffen ist. Im Hinblick auf eine spätere Anwendung als Marker für die Verfolgung einer mRNA in lebenden Zellen erspart es aber den Schritt der Entwicklung eines neuen lichtaktivierbaren *molecular beacon*, wenn für die Machbarkeitsstudie von vorneherein ein *molecular beacon* gegen eine existierende mRNA, die vorzugsweise möglichst abundant in vielen verschiedenen Gewebetypen vorkommt, verwendet wird.

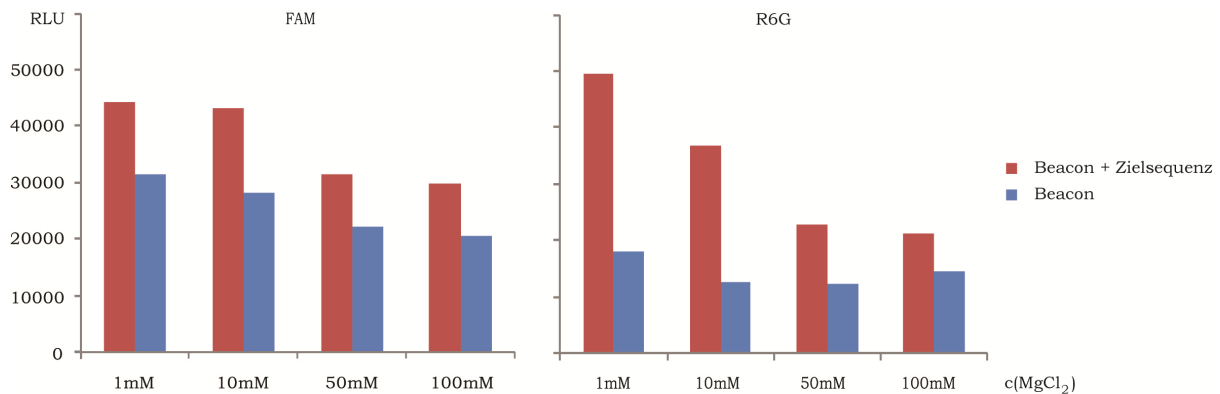
Auf Grund der beschriebenen Kriterien wurden für einen ersten Test zwei *molecular beacons* gegen  $\beta$ -Aktin, ein gängiges Haushaltsgen, ausgewählt. Als Fluorophore wurden Carboxyfluoreszein (FAM) bzw. Rhodamin 6G (R6G) eingesetzt. Während ersteres der eingangs genannten Anforderung, keine Absorption im Bereich der Entschätzungswellenlänge zu zeigen, genügt, besitzt R6G eine leichte Absorption in dieser Region. Auch als Quencher sollten zwei verschiedene Varianten gewählt werden. Viele gebräuchliche Quencher absorbieren ebenfalls leicht um 360 nm. Wie weiter oben diskutiert, stellt das vermutlich für die Abspaltung kein Problem dar.



**Abb. 51 und Struktur der beiden ersten getesteten MBs.**

Dennoch gibt es Alternativen zum Einsatz eines Quenchers. So ist z.B. über ein *molecular beacon*-Design mit viermal Guanosin am 3'-Ende, anstelle eines Quencher berichtet worden.<sup>[93]</sup> Diese Variante sollte ebenfalls getestet werden.

Die Sequenz des R6G-*molecular beacon* ist in dieser Form bereits in einer publizierten Studie zur Anwendung gekommen, allerdings mit anderem Fluorophor-Quencher-Paar.<sup>[138]</sup> Zweiwertige Ionen stabilisieren die Watson-Crick Basenpaarung. Daher ist es üblich, Hybridisierungspuffern Magnesiumchlorid zuzusetzen, so auch bei vielen beschriebenen Experimenten mit *molecular beacons*. Mit der ersten Überprüfung der Funktionalität der beiden ausgewählten *molecular beacons* sollte daher die optimale Magnesiumchloridkonzentration für diese bestimmt werden. Hierzu wurden die *molecular beacons* in Tris-Puffer zunächst mit einem fünffachen Überschuss der Zielsequenz und unterschiedlichen Mengen an Magnesiumchlorid versetzt. Für diese Vortests wurden jeweils nur Einfachbestimmungen durchgeführt, daher ist kein Fehler angegeben.



**Abb. 52 Fluoreszenztest des  $\beta$ -Aktin-*molecular beacon* mit unterschiedlichen Fluorophoren und Quenchern. Links FAM und poly-dG als Quencher, rechts Rhodamin 6G mit BHQ1 als Quencher.**

Wie aus Abb. 52 ersichtlich wird, führen steigende Konzentrationen an Magnesiumchlorid im Puffer keineswegs zu einer zunehmenden Interaktion zwischen *molecular beacon* und Ziel-RNA. Vielmehr scheint es umgekehrt so zu sein, dass durch das Magnesiumchlorid in erster Linie die Basenpaarung der Stammnukleotide stabilisiert wird, sodass mit zunehmender Magnesiumchloridkonzentration die absolute Fluoreszenzintensität sinkt. Ein weiteres Experiment (ohne Abb.), in welchem verschiedene Magnesiumchloridkonzentrationen zwischen 1 mM und 0,1 mM eingesetzt wurden bzw. auch eine Probe gänzlich ohne Magnesiumchlorid vermessen wurde, bestätigte diesen Trend, sodass für alle weiteren Experimente kein Magnesiumchlorid mehr zugesetzt wurde. Im Vergleich der absoluten Fluoreszenz unterscheiden sich FAM und R6G als Fluorophore kaum. Dennoch ist die Hintergrundfluoreszenz bei allen FAM-PolyG-Proben deutlich höher als beim BHQ-1-*molecular beacon*. Während die Fluoreszenz des R6G-*molecular beacon* bei Anwesenheit der Zielsequenz im besten Fall immerhin auf das 2,8-fache zunimmt, steigt die Aktivierung des

FAM-polyG-*molecular beacon* maximal auf das 1,5-fache an. Um ein möglichst gutes zukünftiges An/Aus-Verhalten zu erkennen, ist ein großes Signal-Rausch-Verhältnis jedoch besonders wichtig. Daher wird nachfolgend mit dem R6G-beacon weitergearbeitet.

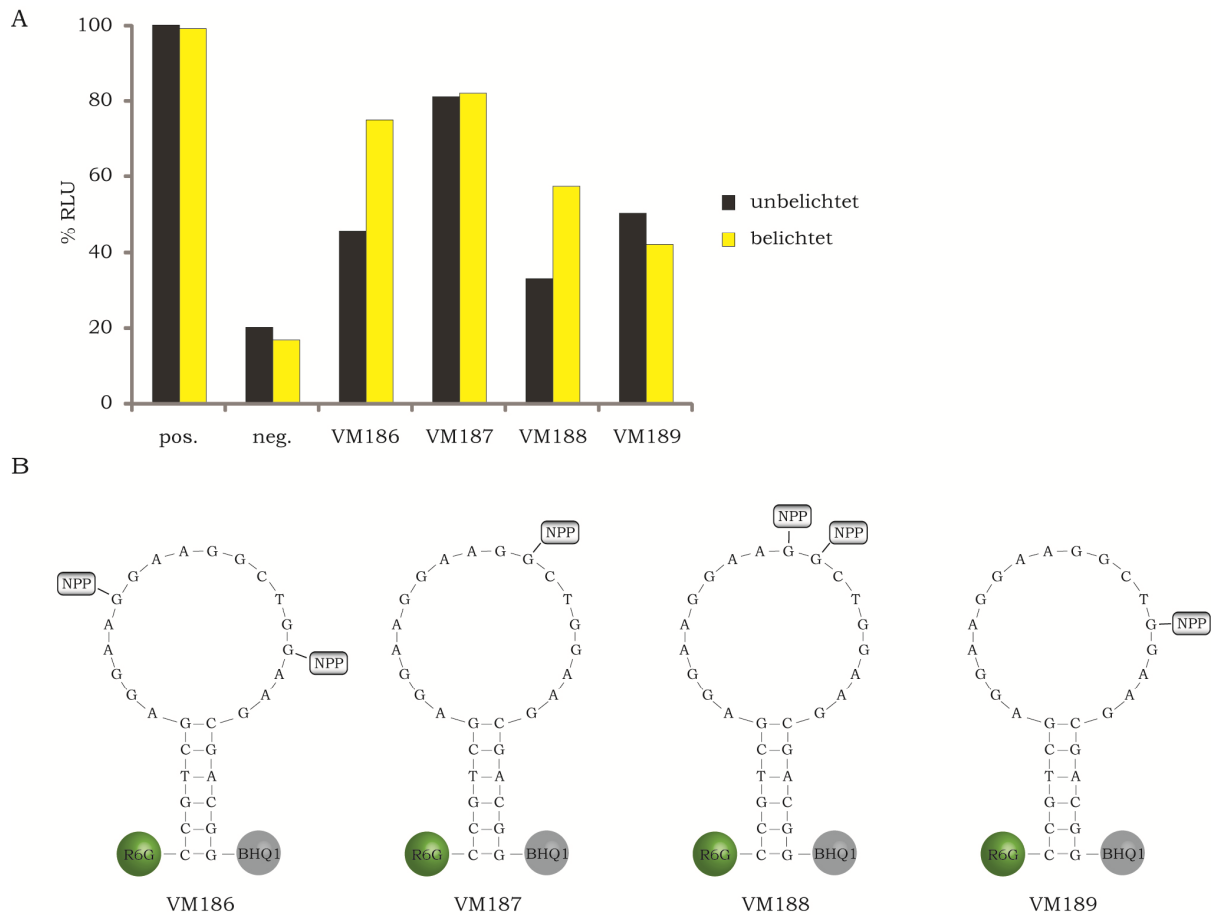
### 3.2.3. Photolabil geschützte $\beta$ -Aktin-*molecular beacons*

#### FLUORESZENZASSAY

Nach der Auswahl der Sequenz und eines geeigneten Fluorophor-Quencher-Paares für einen Testbeacon, sollte ein erstes Set an photolabil geschützten Varianten hergestellt werden. Wie viele Basen geschützt werden müssen, ist von der Selektivität des zugrunde liegenden *molecular beacon* abhängig. Ein sehr selektiver *molecular beacon*, dessen Stammschmelzpunkt nur geringfügig unter der Schmelztemperatur des Schleifen:Zieloligonukleotid-Hybrids liegt, könnte theoretisch mit einem einzigen *cage* ausgeschaltet werden. Ist der *molecular beacon* nicht sehr selektiv, können zahlreiche Modifikationen notwendig sein.

Auch die Verteilung der *cages* kann ausschlaggebend sein. Je nach Sequenz ist die Reichweite der Störung, die ein *cage* verursacht, mehr oder weniger weitreichend, sodass die Modifikationen näher oder weniger nah aneinander ihre maximale Wirkung haben. Dies ist aber ebenfalls schwer vorherzusagen. Zunächst wurden vier *molecular beacons* mit den in Abb. 53 dargestellten Sequenzen und Modifikationen synthetisiert.

Mit einem einfachen Fluoreszenzassay wurde anschließend überprüft, inwieweit die modifizierten *molecular beacons* durch die Einführung einzelner photolabiler Schutzgruppen inaktiviert sind (Abb. 53). Als Positivkontrolle (pos.) für die maximal mögliche Fluoreszenz wurde der unveränderte *molecular beacon* mit der Ziel-RNA versetzt. Über die Höhe der Hintergrundfluoreszenz, die auch ohne Bindung an eine Zielsequenz zu erwarten ist, gibt die Negativkontrolle (neg.) Aufschluss, für die der *molecular beacon* mit Puffer, statt mit der Ziel-RNA versetzt wurde. Tatsächlich zeigen die modifizierten *molecular beacons* eine unterschiedlich stark verminderte Fluoreszenz (schwarze Balken). Auffällig ist jedoch, dass sich keiner dieser *molecular beacons* durch die Bestrahlung mit Licht vollständig reaktivieren lässt (gelbe Balken). Immerhin ist bei den Varianten **VM186** und **VM188** eine gewisse Photoaktivierbarkeit erkennbar. Als Ursache hierfür kommen unterschiedliche Gründe in Frage. Zum einen könnte die Belichtung entgegen der Prognose doch ein größeres Maß an Fluorophor zerstören. In der Tat ist die Fluoreszenzintensität der beiden Kontrollproben nach Bestrahlung vermindert, allerdings nur äußerst geringfügig, sodass dies zumindest nicht die alleinige Ursache sein kann.

**Abb. 53****A: Fluoreszenzassay der photolabil modifizierte  $\beta$ -Aktin *molecular beacons*.****B: Sequenzen der in A verwendeten Varianten.**

Weiterhin ist eine mangelnde Reinheit als Grund denkbar. Im Gegensatz zu z.B. photolabil geschützten siRNA Strängen, stellen die synthetisierten *molecular beacon*-Varianten ein deutlich komplizierteres Konstrukt dar, das neben den photolabilen Schutzgruppen mit einem Fluorophor und einem Quencher modifiziert ist und darüber hinaus in zwei Konformationen – linear oder als Haarnadel – vorliegen kann. Eine Aufreinigung mittels HPLC gestaltet sich also überaus schwierig. Sind die modifizierten Proben jedoch mit Sequenzen verunreinigt, die kein Fluorophor tragen, so ist die durch Hybridisierung auftretende, maximal mögliche Fluoreszenz bei gleicher ODN-Konzentration geringer, da nicht jede Sequenz ein Fluorophor trägt. Eine Verunreinigung mit entschützten *molecular beacons* hingegen würde sich auf die nicht bestrahlten Proben auswirken und zu einer Teilaktivierung führen.

Um das vermutete Reinheitsproblems beim ersten Fluoreszenzassays zu überprüfen und ggf. zu beseitigen, wurden alle modifizierten *molecular beacons* erneut über eine RP-HPLC aufgereinigt. Anstatt des bisher verwendeten Standard-DNA Gradienten (s. Tab. 4 Gradient

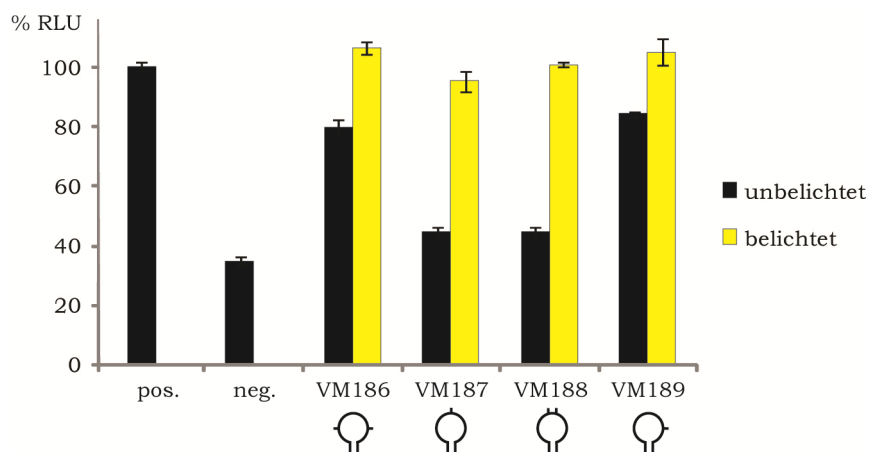


für die Umkehrphasen-HPLC von DNA) wurde nun allerdings ein deutlich flacherer Gradient gefahren, um die dicht beieinander eluierenden Peaks besser trennen zu können.

**Tab. 1 Gradient für die Aufreinigung des  $\beta$ -Aktin-*molecular beacons*.**

| T [min] | % A  | % B  |
|---------|------|------|
| 0       | 100  | 0    |
| 2       | 100  | 0    |
| 10      | 28   | 72   |
| 30      | 30,5 | 69,5 |

Die so aufgereinigten *molecular beacons* wurden unmittelbar nach der HPLC in einem neuerlichen Fluoreszenzassay unter identischen Bedingungen wie beim ersten Experiment eingesetzt, jedoch wurden hier Dreifachbestimmungen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 54 dargestellt.



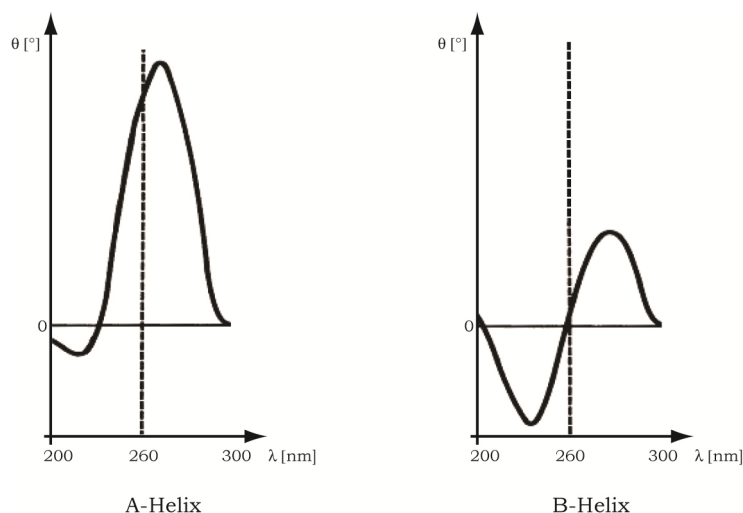
**Abb. 54 Fluoreszenzassay der lichtaktivierbaren  $\beta$ -Aktin MBs nach erneuter HPLC.**

In der Tat ist nach der weiteren Aufreinigung das Problem der unvollständigen Lichtaktivierbarkeit behoben. Alle modifizierten *molecular beacons* erreichen nach der Belichtung eine Aktivität, die der des unmodifizierten *molecular beacon* (pos.) entspricht. Bei den modifizierten *molecular beacons* zeichnet sich zum Teil ein im Vergleich zum vorigen Experiment deutlich anderes Bild. Der mittig zweifach modifizierte *molecular beacon* **VM188** weist nach wie vor eine im Vergleich zur Negativkontrolle sehr gute, wenngleich auch immer noch nicht vollständige Inaktivierung auf. Der *molecular beacon* **VM189** bestätigt ebenfalls den Trend des Vorexperimentes. Er ist nach wie vor nur wenig inaktiv. **VM186**, der sich im ersten Experiment zu etwa 50 % inaktiv zeigte und damit nur 30 % über der Aktivität der Negativkontrolle lag, scheint nun deutlich stärker an die Zielsequenz zu binden, während **VM187**, zuvor nahezu vollständig bindungsfähig, nun ebenso inaktiv ist, wie **VM188**. Damit liegen **VM187** und **VM188** nur 10 % über dem Niveau der Negativkontrolle.

In nachfolgend durchgeführten Fluoreszenzassays gelang es leider nicht, reproduzierbare Werte für die einzelnen *molecular beacon*-Varianten zu erhalten. Lediglich ein allgemeiner Trend, der **VM188** eine gute Inaktivierung bestätigt und **VM189** als mehr oder weniger vollständig aktiv darstellt, zeichnete sich ab, während **VM186** und **VM187** in ihrer Aktivität weiterhin stark schwankten.

#### CD-SPEKTROSKOPIE

Da die Gründe für die uneinheitlichen Messergebnisse im Fluoreszenzassay nicht abschließend sicher bestimmt werden konnten, sollte eine alternative Methode gefunden werden, um die Aktivität der einzelnen *molecular beacon*-Varianten abzubilden. Hierzu bot sich die CD-Spektroskopie an. Mit dieser Methode kann unter anderem zwischen unterschiedlichen Oligonukleotidhelizes unterschieden werden. Während ein RNA-Doppelstrang eine relativ gestauchte A-Helix ausbildet, liegen DNA-Doppelstränge üblicherweise in Form einer gestreckteren B-Helix vor. Diese geben gut unterscheidbare CD-Spektren ab, wie sie beispielhaft in Abb. 55 dargestellt sind.

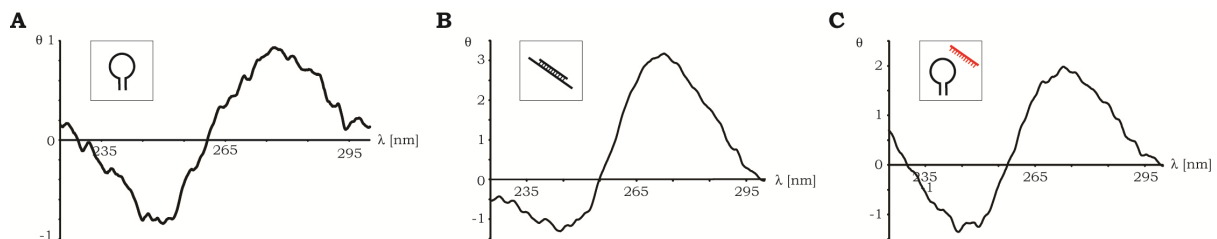


**Abb. 55 CD-Spektren von Oligonukleotiddoppelsträngen in unterschiedlichen Konformationen.**

Während das Spektrum einer B-Helix bei 260 nm einen Nulldurchgang hat und die Fläche, die die Kurve zwischen 200 und 300 nm einschließt im positiven wie im negativen Bereich ungefähr gleich groß ist, ist der Positivanteil im Spektrum einer A-Helix deutlich größer und der Nulldurchgang zu kleineren Wellenlängen verschoben.

Hybridsequenzen aus einem DNA- und einem RNA-Oligonukleotid ergeben üblicherweise ein CD-Spektrum, das eher dem einer A-Helix gleicht. Ein DNA-*molecular beacon*, wie er für diese Studie verwendet wurde, der gebunden an eine RNA-Zielsequenz vorliegt, sollte also ein ebensolches A-Helixspektrum zeigen. Ist keine RNA-Zielsequenz zugegen oder kann diese, z.B. gehindert durch die photolabilen Schutzgruppen, nicht gebunden werden, sollten die gepaarten Nukleotide der Stammsequenz das Spektrum einer typischen B-Helix ergeben.

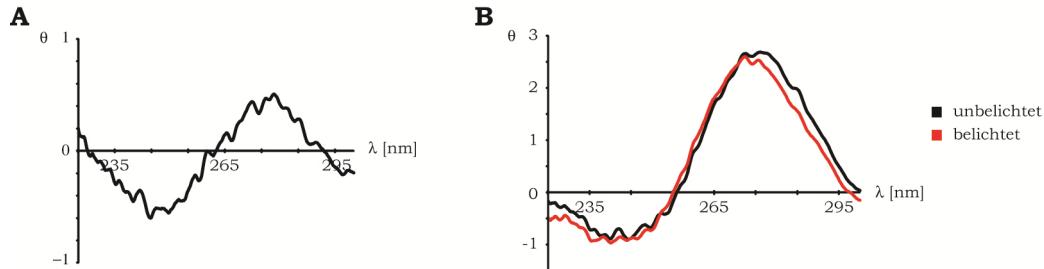
Zunächst wurde anhand des unmodifizierten  $\beta$ -Aktin-*molecular beacon* überprüft, wie die Spektren von ungebundenem (Abb. 56 A) und gebundenem (Abb. 56 B) beacon aussehen. Hierzu wurde jeweils das Spektrum einer reinen *molecular beacon*-Lösung bzw. das Spektrum des MB versetzt mit Ziel-RNA vermessen. In der Tat zeigt das Spektrum des freien *molecular beacons* die Charakteristika einer B-Helix, während das Spektrum des an seine Ziel-RNA gebundenen *molecular beacons* deutliche Merkmale einer A-Helix aufweist. Um zudem einen Vergleich für das Spektrum eines ungebundenen *molecular beacons* in Anwesenheit einer RNA-Sequenz, die jedoch nicht an die Schleife bindet, zu haben, wurde zusätzlich ein Spektrum einer Lösung von  $\beta$ -Aktin-*molecular beacon* aufgenommen, der eine nicht komplementäre Fehlsequenz zugesetzt war. Auch diese Lösung ergibt ein CD-Spektrum einer typischen B-Helix (Abb. 56 C).



**Abb. 56 CD-Spektren des unmodifizierten  $\beta$ -Aktin *molecular beacon*.**  
**A: Ohne Zielsequenz. B: Mit Zielsequenz. C: Mit einer Fehlsequenz.**

Als nächstes wurden die modifizierten Varianten des  $\beta$ -Aktin *molecular beacon* gemessen, mit Ausnahme von **VM189**, das sich bereits im Fluoreszenzassay als eindeutig nicht inaktiviert herausgestellt hatte. Auch hier wurde zunächst wieder der reine beacon vermessen die Lösung anschließend mit der Zielsequenz versetzt und erneut ein Spektrum aufgenommen. Ein drittes Spektrum wurde schließlich aufgenommen, nachdem die Lösung von beacon und Zielsequenz unter Standardbedingungen (s. Experimenteller Teil) belichtet wurde. Die großen Intensitätsunterschiede zwischen der Probe mit reinem *molecular beacon* und der mit Zielsequenz versetzten Probe ergibt sich aus der Tatsache, dass die B-Helix des Stammes nur sechs Basenpaare umfasst, während die A-Helix aus Schleife und Ziel-RNA ganze 18 Basenpaare lang ist. Die Ergebnisse dieser CD-Messungen fielen jedoch sämtlich unbefriedigend im Hinblick auf eine Inaktivierung der untersuchten *molecular beacons* aus. In Abb. 57 sind exemplarisch die CD-Spektren von **VM186** abgebildet. Der reine *molecular beacon* **VM186** liegt wie erwartet in Form einer B-Helix vor (Abb. 57 A). Nach Zugabe der Zielsequenz (Abb. 57 B) liegt bereits eine A-Helix vor, was für eine Bindung des *molecular beacons* an die Zielsequenz trotz photolabiler Schutzgruppen spricht. In der Tat ändert sich das Spektrum durch Bestrahlung der Probe nicht mehr signifikant, wie aus Abb. 57 B ersichtlich wird. Das Spektrum der unbestrahlten Probe (schwarz) und das der bestrahlten

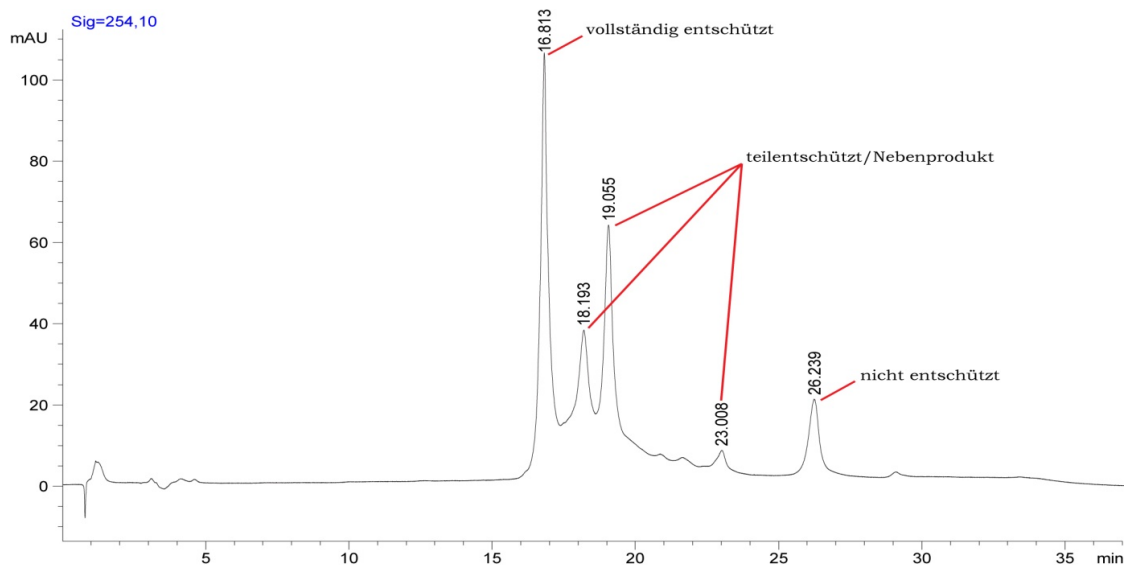
Probe (rot) sind nahezu identisch. Für die anderen modifizierten *molecular beacon*-Varianten **VM187** und **VM188** zeichnet sich das gleiche Bild ab. Alle modifizierten  $\beta$ -Aktin *molecular beacons* binden auch vor der Entschützung an die Zielsequenz.



**Abb. 57 CD-Spektren des zweifach modifizierten  $\beta$ -Aktin-*molecular beacon* VM186. A: Ohne Zielsequenz. B: Mit Zielsequenz vor und nach Belichtung.**

#### ENTSCHÜTZUNGSKONTROLLE PER HPLC

Parallel zu den Problemen der unvollständigen Inaktivierung allgemein und der schlechten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den Fluoreszenzassays zeigten sich bei der Überprüfung der Entschützungseffizienz und der Reinheit nach Lagerung per HPLC weitere Schwierigkeiten. Unter den Standardentschützungsbedingungen ( 3 min UV-LED bei 0,5 A) in Tris-Puffer traten größere Mengen an Nebenprodukten auf, wie das nachfolgende Chromatogramm von **VM188ofq** ( $\triangleq$  VM188 ohne Fluorophor und Quencher) beispielhaft zeigt.



**Abb. 58 Die UV-Entschützung in Tris-Puffer führt zu erheblichen Anteilen an Nebenprodukten.**

Die *molecular beacons* **VM186-189** waren sämtlich mit einer NPP-Gruppe an dG-Nukleotiden modifiziert. Diese hatten bereits bei früheren Studien nach Bestrahlung hin

und wieder, je nach Sequenz, größere Mengen an Entschützungsnebenprodukt aufgewiesen und/oder ließen sich nicht vollständig entschützen.

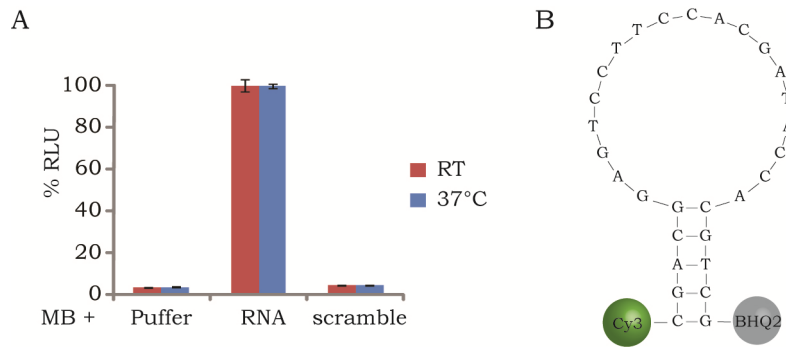
Ebenso schien die Lagerung der Proben problematisch zu sein. Zuvor hatte sich immer wieder gezeigt, dass die Stabilität der einzelnen *cages* auch sequenzabhängig ist, wobei das NPP modifizierte Desoxyguanosin sich als tendenziell eher stabil vor allem gegenüber dem dT<sup>NPP</sup> erwiesen hatte. In diesem Fall zeigten HPLC-Chromatogramme aufgereinigter, sauberer Proben jedoch nach einigen Tagen der Lagerung bei -20 °C neue Peaks mit Retentionszeiten, die denen des unmodifizierten bzw. eben auch entschützten *molecular beacons* entsprachen. Offenbar waren die *cages* also nicht sehr lange stabil.

### **3.2.4. Der GAPDH-*molecular beacon***

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die Entschützung des verwendeten  $\beta$ -Aktin *molecular beacon* in Tris-Puffer zu einer großen Menge unerwünschten Nebenproduktes führt, zugleich auch das Signal-Rausch-Verhältnis nur mäßig war und die Ergebnisse des Fluoreszenzassays stark schwankten, sollte nun noch einmal ein anderer *molecular beacon* getestet werden. Da der Schwerpunkt dieser Studie nicht auf der Optimierung eines *molecular beacon* lag und es in unserem Arbeitskreis bezgl. *molecular beacon*-Design noch keine Expertise gab, wurde wieder ein publizierter *molecular beacon* ausgewählt, der bereits erfolgreich zum Einsatz gekommen war. Als geeignet erschien ein von Nitin et. al beschriebener *molecular beacon*.<sup>[103]</sup> Dieser bindet ebenfalls an ein weitverbreitetes Haushaltsgen, die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Darüber hinaus wird als Fluorophor Cy3 eingesetzt, welches bei 366 nm keine nennenswerte Absorption zeigt. Die publizierten *in vitro* Experimente mit dem GAPDH-*molecular beacon* wurden in PBS-Puffer durchgeführt. Dass dieser geeignet ist, um die verwendeten NPP- und NPE-Schutzgruppen überwiegend sauber zu entschützen, war aus vorherigen Experimenten bekannt.

#### *VOREXPERIMENTE*

In einem Vorabexperiment sollte das Signal-Rausch-Verhältnis überprüft werden. Hierzu wurde der *molecular beacon* entsprechend der Studie von Nitin in 1x PBS Puffer mit der doppelten Menge Ziel-RNA versetzt und mit zwei Proben, die keine RNA bzw. eine *scramble*-Sequenz enthielten, verglichen. Es zeigte sich, dass dieser GAPDH-beacon das Signal-Rausch-Verhältnis des bisher verwendeten  $\beta$ -Aktin *molecular beacons* um den Faktor zehn übertrifft (Abb. 59).

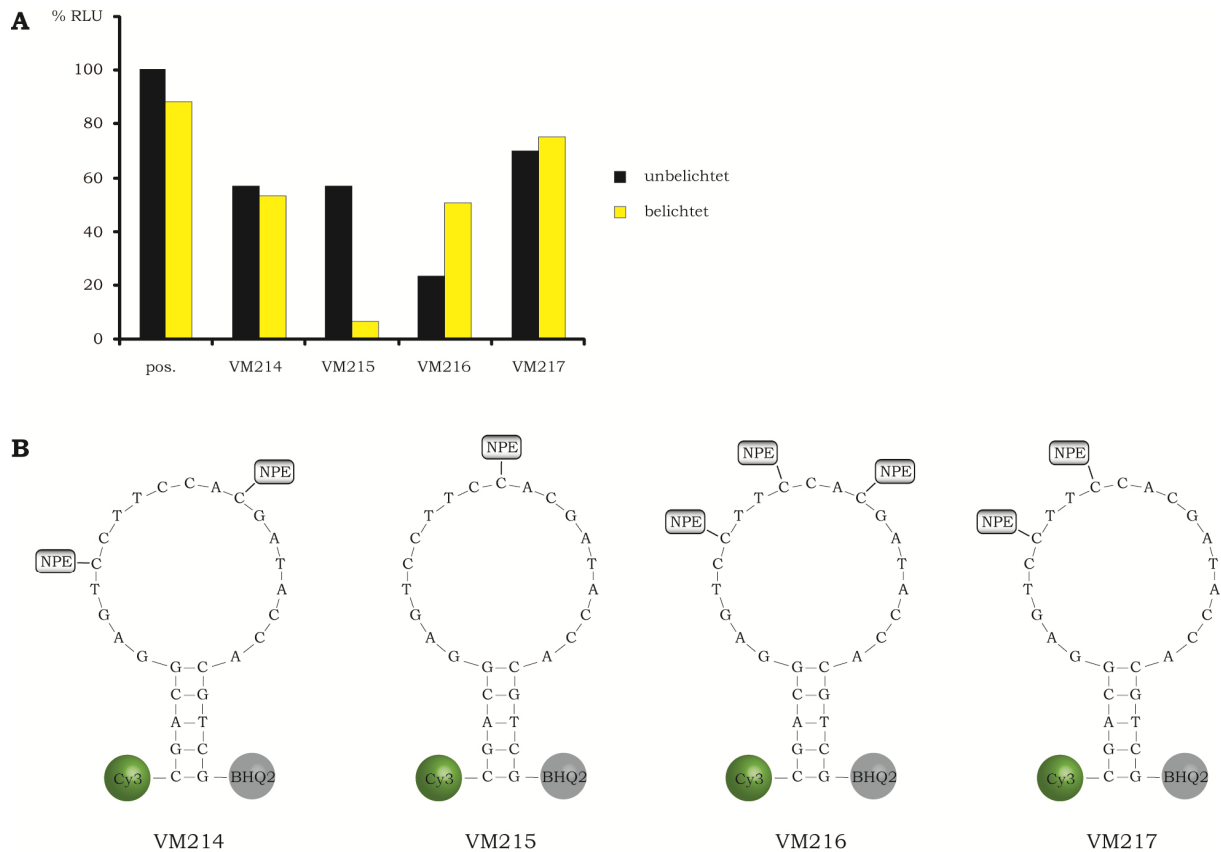
**Abb. 59****A: Test des GAPDH-beacons auf Signal-Rausch-Verhältnis.****B: Sequenz des GAPDH-beacons.**

Dabei machte es für die absolute Fluoreszenzintensität, die Selektivität oder das Signal-Rausch-Verhältnis keinen Unterschied, ob die Messung bei Raumtemperatur oder bei 37 °C durchgeführt wurde.

#### PHOTOLABIL GESCHÜTZTE GAPDH-MOLECULAR BEACONS

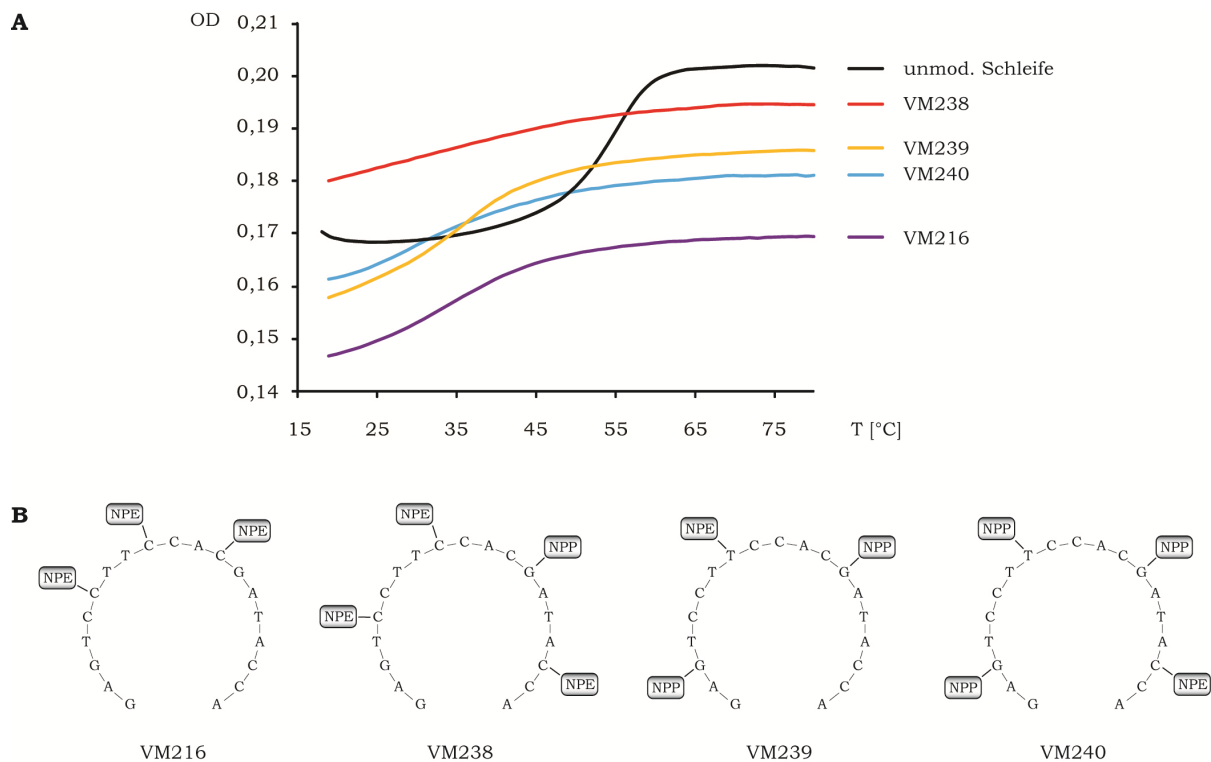
Nachdem sich der GAPDH *molecular beacon* als grundsätzlich geeignet erwiesen hatte, wurde wieder ein Set von unterschiedlich modifizierten Varianten hergestellt. Da sich die Entschützung der dG<sup>NPP</sup>-modifizierten  $\beta$ -Aktin-*molecular beacons* als problematisch dargestellt hatte, sollte hierbei auf dG<sup>NPP</sup> verzichtet werden. Stattdessen wurden NPE-geschützte Cytidine eingesetzt. Die folgende Abb. 60 B zeigt die synthetisierten dC<sup>NPE</sup> modifizierten GAPDH *molecular beacons*.

Diese photolabil modifizierten GAPDH *molecular beacons* wurden in einem Fluoreszenzassay getestet (Abb. 60 A). Alle Varianten zeigen eine verminderte Fluoreszenzintensität, es bindet also keiner der *molecular beacons* mehr in vollem Umfang an die Ziel-RNA (schwarze Balken). Jedoch besteht offenbar das gleiche Problem wie zunächst bei den  $\beta$ -Aktin *molecular beacons*: keine der Sequenzen lässt sich durch Bestrahlung mit Licht vollständig reaktivieren (gelbe Balken). Die im Falle von **VM215** nach Bestrahlung sogar auf das Niveau der Hintergrundfluoreszenz verminderte Aktivität ist allerdings höchstwahrscheinlich auf einen Pipettierfehler (fehlen der Zielsequenz) zurückzuführen. Es galt also nach wie vor, die Aufreinigung der modifizierten *molecular beacons* zu verbessern.

**Abb. 60****A: Fluoreszenzassay der ersten photolabil modifizierten GAPDH MBs.****B: Sequenzen der in für den Assay verwendeten MBs.***SCHMELZPUNKTSTUDIEN*

Parallel zur Optimierung der Aufreinigung sollte mit einer alternativen Methode die Aktivität potentieller neuer lichtaktivierbarer GAPDH-*molecular beacon*-Varianten bestimmt werden. Eine sehr genaue Auskunft über die zu erwartende Stabilität eines Doppelstranges gibt dessen Schmelzpunkt. Auch wenn es sich dabei nicht um einen Schmelzvorgang im eigentlichen Sinne handelt, erinnert die sigmoidale Kurve der Absorptionsänderung, die häufig zur Schmelzpunktbestimmung herangezogen wird, an die Schmelzkurve eines kristallinen Stoffes, weshalb diese Bezeichnung übernommen wurde. Als Schmelzpunkt wird die Temperatur definiert, bei der die Hälfte der Basenpaare eines Doppelstranges nicht mehr hybridisiert vorliegt. Über eine Schmelzpunktbestimmung des Hybrides könnte man also im Gegensatz zur CD-Spektroskopie nicht nur eine Aussage darüber treffen, welche der modifizierten Sequenzen überhaupt bindungsfähig sind, sondern sehr leicht auch eine Aussage über das Ausmaß der Destabilisierung treffen und damit ein Rangfolge erstellen. Da die Synthese der Komplettbeacons neben der aufwändigen und bis dato nicht zufriedenstellenden Aufreinigung außerdem sehr teuer ist, sollten hier zunächst Fluorophor und Quencher nicht in die Sequenzen integriert werden. Um eine möglichst klare Schmelzkurve zu erhalten, wurden zudem ausschließlich die modifizierten Schleifen ohne

den Stamm auf ihre Bindungsfähigkeit an die Zielsequenz überprüft. Zu Vergleichszwecken wurde ebenfalls **VM216** in die Schmelzpunktstudien eingeschlossen, der im Fluoreszenzassay die beste Inaktivierung gezeigt hatte. Die neuen modifizierten Schleifenvarianten sind in Abb. 61 B dargestellt. Zunächst wurde eine klassische Schmelzpunktanalyse mit einem UV-Spektrometer durchgeführt. Dabei wird die Absorption in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Wenn sich die gestapelten Basenpaare eines Oligonukleotiddoppelstranges trennen, verändert sich auch das Ausmaß der  $\pi$ -Elektronendelokalisierung und damit die Absorption. Abb. 61 A zeigt die Schmelzkurven der neuen Schleifenvarianten.



**Abb. 61**

**A: Schmelzkurven der neuen Varianten modifizierter GAPDH-MB-Schleifen**

**B: Sequenzen der in der Schmelzpunktstudie eingesetzten GAPDH-MB-Schleifen.**

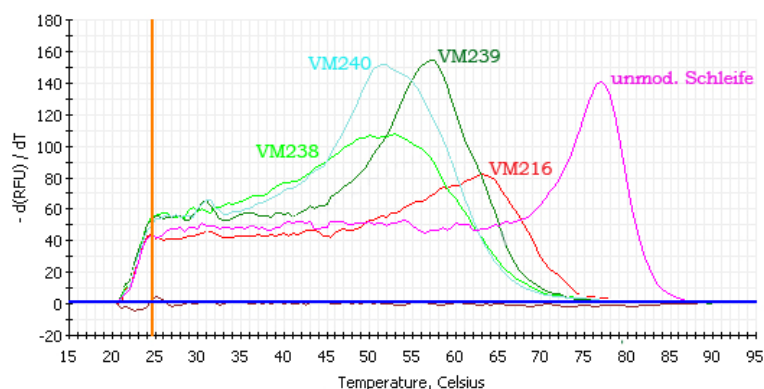
Hierbei fällt als erstes ins Auge, dass allein die unmodifizierte Schleife des GAPDH *molecular beacon* eine klare Schmelzkurve zeigt, wie man sie erwarten würde (schwarz). Bei geringen Temperaturen bis ca. 45 °C ist der Duplex aus Schleife und Ziel-RNA sehr stabil, die Absorption ändert sich nur geringfügig. Die Kurve steigt dann mit zunehmendem Aufschmelzen der Stränge stark an, um schließlich, wenn die beiden Stränge komplett voneinander getrennt vorliegen, wieder ein Plateau zu erreichen. Aus dem Wendepunkt der Kurve lässt sich der Schmelzpunkt bestimmen, der bei etwa bei 55 °C liegt. Bereits die beiden dreifach modifizierten *molecular beacons* **VM216** (violett) und **VM239** (gelb) sind demgegenüber deutlich in ihrer Bindungsfähigkeit destabilisiert. Sie schmelzen bei einer



Temperatur, die gut 20 °C unterhalb der der unmodifizierten Sequenz liegt und zeigen auch kein so eindeutiges Schmelzverhalten mehr. Die Kurven verlaufen deutlich flacher, diese Stränge schmelzen über einen breiteren Temperaturbereich. Das kann zum einen darin begründet liegen, dass die Ausgangsduplexe in ihrer Struktur uneinheitlich sind. Offenbar liegt ein Teil der Sequenzen teilweise gebunden vor. Jedoch ist es vorstellbar, dass jeweils unterschiedliche Regionen zwischen oder vor und hinter den modifizierten Bereichen an der Ziel-RNA Bindung beteiligt sind. Zum anderen ist die Gesamtänderung der Absorption umso geringer, je weniger Basenpaare zu Anfang vorliegen, weshalb die Kurven umso flacher verlaufen, je stärker der Doppelstrang durch die Modifikationen destabilisiert ist.

Die vierfach modifizierte Sequenz **VM240**, dargestellt in blau, zeigt eine, im Vergleich zu den dreifach modifizierten Strängen nochmals um ca. 5 °C verminderte Schmelztemperatur. **VM238** ist ebenfalls vierfach modifiziert, aber mit einer anderen Verteilung der *cages*. Hier ist nun keine eindeutige Schmelzkurve mehr auszumachen (rote Kurve), was für eine sehr starke Destabilisierung spricht, die zu einem Schmelzpunkt führt, der bereits im Bereich der Raumtemperatur liegt.

Alternativ zur Schmelzpunktbestimmung über die Absorptionsänderung mit einem UV-Spektrometer kann auch die Fluoreszenzintensität eines Interkalators Auskunft über den Hybridisierungszustand eines Doppelstranges geben. Diese fluoreszieren um ein Vielfaches stärker, wenn sie in eine Doppelhelix interkalieren, als wenn sie an einen Einzelstrang binden. Dies nutzt man z.B. bei der Charakterisierung und Quantifizierung von PCR-Amplifikaten. Die Schmelzpunktbestimmung in einem 96 well Ansatz hat aber auch für allgemeine Anwendungen den Vorteil, dass viele Proben parallel vermessen werden können und zudem die für die Messung benötigte Menge sehr klein ist. Daher sollte auch dieses Verfahren zur Schmelzpunktbestimmung erprobt werden. Eine Abweichung der so ermittelten Schmelzpunkte von den konventionell im UV-Spektrometer ermittelten wurde zwar erwartet, da ein Interkalator den Doppelstrang, in den er interkaliert, üblicherweise stabilisiert. An der relativen Rangfolge der Schmelzpunkte sollte dies jedoch nichts ändern.



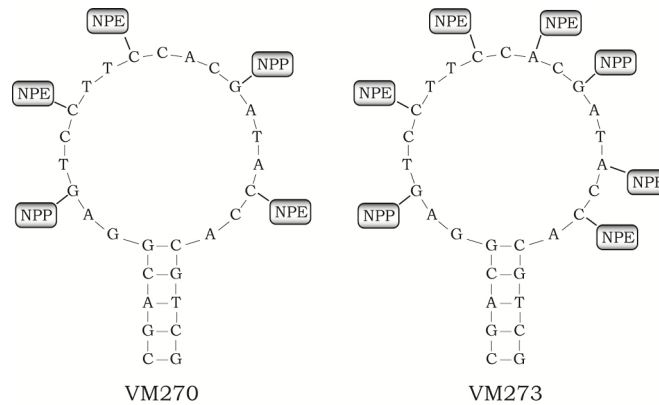
**Abb. 62 Schmelzpunktbestimmung mit Hilfe eines Real-Time-PCR-Blocks. Aufgetragen ist die Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Temperaturänderung.**

Aus Abb. 62 wird ersichtlich, dass die absoluten Schmelztemperaturen in der Tat sehr viel höher liegen, als die mit dem UV-Spektrometer bestimmten. Die unmodifizierte Schleife weist mit 77 °C einen deutlich höheren Schmelzpunkt auf, als die photoaktivierbaren Sequenzen. Auch hier besteht das Problem, dass die Schmelzkurven der modifizierten Schleifen teilweise sehr flach und breit werden, was eine zuverlässige Bestimmung eines Schmelzpunktes schwierig macht. Tendenziell weisen jedoch auch hier die beiden vierfach modifizierten Sequenzen **VM238** und **VM240** eine geringere Schmelztemperatur um 51 °C auf als die Sequenzen, die einen *cage* weniger tragen. Während die absolute Schmelztemperatur für die Sequenz **VM240** bei diesem Experiment sogar ein wenig niedriger zu sein scheint als die von **VM238**, zeigt letztere ein eindeutig unschärferes Schmelzverhalten, was ebenfalls auf eine starke Destabilisierung hindeutet. Eine Rangierung dieser beiden Sequenzen untereinander ist daher schwierig. **VM216** und **VM239** liegen bei dieser Art der Schmelzpunktbestimmung in ihren Werten weiter auseinander als zuvor. Während **VM239** schon bei 58 °C schmilzt, schneidet **VM216** mit einem Schmelzpunkt von 63 °C hier am schlechtesten ab. Dennoch ist auch beim Vergleich dieser beiden Sequenzen anzumerken, dass **VM216** trotz des höheren Schmelzpunktes die wesentlich unschärfere Schmelzkurve aufweist, was eine exakte Bestimmung erschwert.

Die Schmelzkurven einer photolabil modifizierten Sequenz und ihres Gegenstranges werden offenbar umso breiter und schlechter auszuwerten, je besser sie durch ihre Modifikationen destabilisiert sind. Daher stellte sich die Frage, ob mit Hilfe der Schmelzpunkte eine fundierte Vorhersage über die Qualität verschiedener Modifikationsvarianten hinsichtlich ihres Destabilisierungspotentials gemacht werden kann. Eindeutig war jedoch aus diesen Experimenten zu erkennen, dass mit drei photolabilen Schutzgruppen der Rahmen des Möglichen im Hinblick auf eine Destabilisierung der Hybridisierung noch nicht ausgeschöpft war.

#### *FÜNF- UND SIEBENFACH MODIFIZIERTE GAPDH-MOLECULAR BEACON*

Um den vorliegenden GAPDH-*molecular beacon* sicher auszuschalten, reichten drei *cages* nicht aus. Auch vier Modifikationen zeigten zumindest bei einer der zwei getesteten Sequenzen, dass immer noch eine Art Schmelzvorgang beobachtet werden konnte. Die Einführung von fünf gleichmäßig über die Schleife verteilten Modifikationen in die Schleife des GAPDH *molecular beacons* würde dazu führen, dass maximal drei benachbarte Nukleotide für eine Basenpaarung zur Verfügung stünden. Erhöhte man die Anzahl auf sieben, blieben nur noch maximal zwei benachbarte unmodifizierte Nukleotide zur Basenpaarung frei.



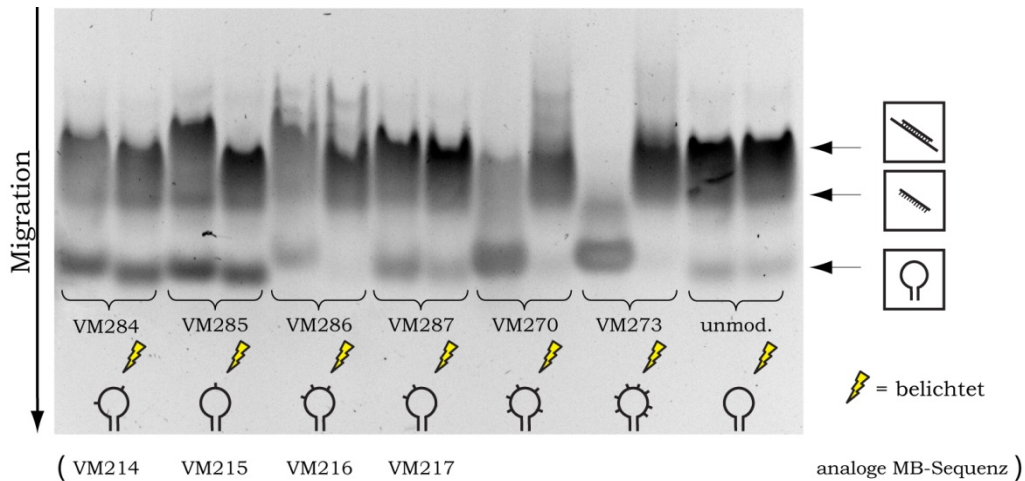
**Abb. 63 Neue fünf- und siebenfach modifizierte GAPDH-Haarnadeln**

Diese beiden Varianten sollten erneut in einem Vorabexperiment auf ihre Bindungsfähigkeit getestet werden. Da sich auch die Schmelzpunktbestimmung als nicht optimal zur Einschätzung des Potentials einzelner Varianten herausgestellt hatte, sollte erneut ein anderes Verfahren zum Einsatz kommen. Eine Methode, mit deren Hilfe beides, gebundener und freier *molecular beacon*, visualisiert werden kann, ist die Gelelektrophorese. Unter nativen Bedingungen durchgeführt, sollte man eindeutig erkennen, ob ein eingesetzter *molecular beacon* vollständig oder nur teilweise an seine Zielsequenz bindet. Und wenngleich auch die Bandenintensität von gepaartem und ungepaartem *molecular beacon* auf Grund unterschiedlich langer doppelsträngiger Bereich nicht direkt miteinander vergleichbar sein würden, könnte man dennoch die Intensitäten des nichtgebundenen Anteils zwischen verschiedenen modifizierten Varianten miteinander vergleichen.

Ein weiterer Vorteil der Gelelektrophorese im Vergleich zu den Schmelzpunktstudien ist, dass hier wieder problemlos die vollständige Haarnadelsequenz eingesetzt werden kann. Somit wird nicht nur eine Aussage über die Bindungsfähigkeit der modifizierten Schleife allein getroffen, sondern auch über die Bindungsfähigkeit in Konkurrenz zur intramolekularen Stammbildung, um die es letztlich geht. Fluorophor und Quencher wurden auch hier nicht zur Visualisierung benötigt, die, wie bei der Gelelektrophorese üblich, über das Anfärben mit einem Interkalator erfolgte.

Nicht nur die beiden neuen Sequenzen **VM270** und **VM273** sollten mit Hilfe der Gelelektrophorese analysiert werden, auch die bereits im Fluoreszenzassay getesteten Varianten sollten verglichen werden. Hierzu wurden von den *molecular beacons* **VM214-VM217** die jeweiligen Haarnadeln **VM284-VM287** ohne Fluorophor und Quencher synthetisiert. Jede Sequenz mit Ausnahme der unmodifizierten Variante wurde mit einer äquimolaren Menge an Ziel-RNA versetzt. Hier wurde ein geringfügiger Überschuss an Haarnadel eingesetzt, um einen Marker für die Migration ungebundener Haarnadeln zu haben. Auf das Gel aufgetragen wurden jeweils zwei Proben jeder Sequenz, von denen eine belichtet wurde. In Abb. 64 sind diese mit einem gelben Belichtungssymbol gekennzeichnet. Die Laufzeitunterschiede zwischen hybridisierten Sequenzen, die eine geringere Migration zeigen und die obere Bande bilden, und ungebundenen Sequenzen, die weiter laufen und

die untere Bande bilden, waren hinreichend, um die Sequenzen deutlich voneinander unterscheiden zu können. Die ungebundene Zielsequenz weist im Gegensatz zu den ungebundenen Haarnadeln keine doppelsträngigen Bereiche auf und wird somit weniger durch den Farbstoff SYBR Gold angefärbt. Daher war diese nur schwach als mittlere Bande auszumachen.



**Abb. 64 Native PAGE verschiedener modifizierter Haarnadeln des GAPDH-MB.**

Dass die Banden der hybridisierten Sequenzen unscharf und etwas verlaufen sind, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich das Gel im Laufe der Elektrophorese trotz Durchführung im Kühlschrank leicht erwärmte, die Doppelstränge somit teilweise über die Zeit wieder aufschmolzen und sich auf dem Gel trennten. Zudem scheinen auch Anzahl und Position der *cages* einen Laufzeitunterschied auszumachen: die Positionen der Banden sowohl für die gebundenen als auch die ungebundenen Haarnadeln unterscheiden sich bei ein und derselben Sequenz, wenn man belichtete und unbelichtete Proben vergleicht. Betrachtet man zunächst die (oberen) Banden der hybridisierten Sequenzen, so fällt auf, dass alle Haarnadeln zumindest teilweise die Ziel-RNA binden mit Ausnahme der siebenfach modifizierten Variante **VM273**. Im oberen Bereich des Gels ist hier vor der Bestrahlung nur eine Bande der Ziel-RNA auszumachen aber keine Haarnadel:RNA-Hybride. Für die bereits als Komplettbeacon getesteten Sequenzen spiegelt die Gelelektrophorese das Ergebnis des Fluoreszenzassays wider: während **VM214**, **VM215** und **VM217** bereits unbelichtet sehr stark an die Ziel-RNA binden, liegt **VM216** nur teilweise hybridisiert vor und lässt sich durch Bestrahlung deutlich aktivieren. Die fünfmal modifizierte Sequenz **VM270** zeigt im modifizierten Zustand eine weniger starke Restaktivität als **VM216**, jedoch ist sie auch nicht vollständig inaktiv.

Die (unteren) Banden ungebundener Haarnadeln sollten nach Bestrahlung der Proben mit UV-Licht verschwinden, da die Modifikationen abgespalten werden und die Haarnadeln nun ungehindert an die Ziel-RNA binden können. Für die drei (teil-)inaktivierten Sequenzen war dies auch zutreffend. In den bestrahlten Proben trat keine Bande ungebundener

Haarnadeln mehr auf. Interessanterweise war dies bei den restlichen Proben **VM284**, **VM285** und **VM287** nicht der Fall. Die bereits im Fluoreszenzassay beobachtete Problematik, dass sich die Sequenzen durch Bestrahlung nicht aktivieren lassen, zeigte sich auch hier. Eine Erklärung ließ sich für dieses Verhalten nicht finden. Da diese Sequenzen allerdings aufgrund ihrer Aktivität trotz Modifikation ohnehin nicht von Interesse waren, wurden sie auch nicht weiter verwendet und die Problematik nicht weiter untersucht. Die Bestrahlung einer Probe der unmodifizierten Haarnadel zeigte, dass die Bestrahlung selbst keinen Einfluss auf die Migration hat.

**VM270** und **VM273** sollten nun als *molecular beacon* mit Fluorophor und Quencher synthetisiert und, nach einer geeigneten Aufreinigung ebenfalls im Fluoreszenzassay getestet werden.

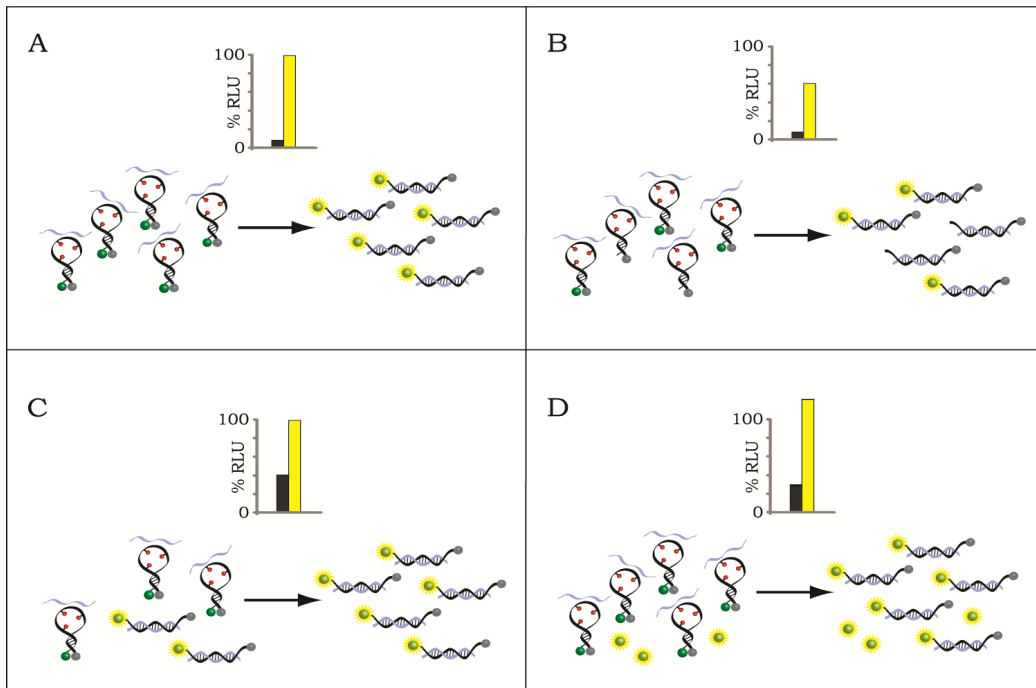
#### HPLC-AUFREINIGUNG UND ANALYTIK HOCHFUNKTIONALISierter DNA-SEQUENZEN

Analog der Haarnadel-Sequenzen **VM270** und **VM273** wurden die beiden *molecular beacons* **VM278** und **VM297** synthetisiert. Für die anschließende Aufreinigung ebenso wie für eine erneute Aufreinigung der bereits im Fluoreszenzassay überprüften Varianten **VM214-VM217** sollte eine verbesserte HPLC-Methode gefunden werden, um die Reinheit zu erhöhen, damit das Bild der Inaktivierung und Aktivierung nicht durch Verunreinigungen z.B. in Form von teilentschützten oder nicht fluoreszenzmarkierten Sequenzen verfälscht wird. Die Probleme, die sich bei der Aufreinigung von *molecular beacons* im Vergleich zu einfachen Oligonukleotidsequenzen ergeben, liegen in der hochgradigen Funktionalisierung der *molecular beacons* begründet.

Eine erste Schwierigkeit stellt die Fähigkeit der *molecular beacons* zur Sekundärstrukturbildung dar. Bedingt durch das Haarnadeldesing können *molecular beacons* linear, als intramolekularer und als intermolekularer (Teil-) Doppelstrang vorliegen. Dies führt, ähnlich wie bei RNA-Strängen häufig zu stark verbreiterten Peaks. Abhilfe lässt sich hier, ebenfalls wie bei der Aufreinigung von RNA, durch eine Chromatographie bei erhöhter Temperatur erzielen. Ein Unterschied zur RNA-Aufreinigung besteht allerdings darin, dass die für Nukleosilsäulen maximal akzeptable Temperatur von 55 °C nicht deutlich über dem Schmelzpunkt der Oligonukleotide liegt. Daher führt eine Elution von *molecular beacons* bei 55°C zwar meist zu einer deutlichen Verbesserung der Peakform, aber nicht in allen Fällen zu einem optimalen Ergebnis.

Bisher erfolgte bei Oligonukleotiden mit photolabilen Schutzgruppen eine Aufreinigung sehr zuverlässig per Umkehrphasen-HPLC. Die Polaritätsänderung, die durch die Einführung selbst einer einzelnen Modifikationen auftritt, war stets ausreichend, um eine deutliche Retentionszeitverschiebung gegenüber der gleichen, unmodifizierten Sequenz zu erzielen. Im Falle von *molecular beacons* trifft dies nicht mehr zu. Zusätzlich zu den Photoschutzgruppen ist das Oligonukleotid mit einem Fluorophor und einem Quencher mit sehr ausladenden unpolaren Funktionalitäten modifiziert, sodass eine Verschiebung zu höheren

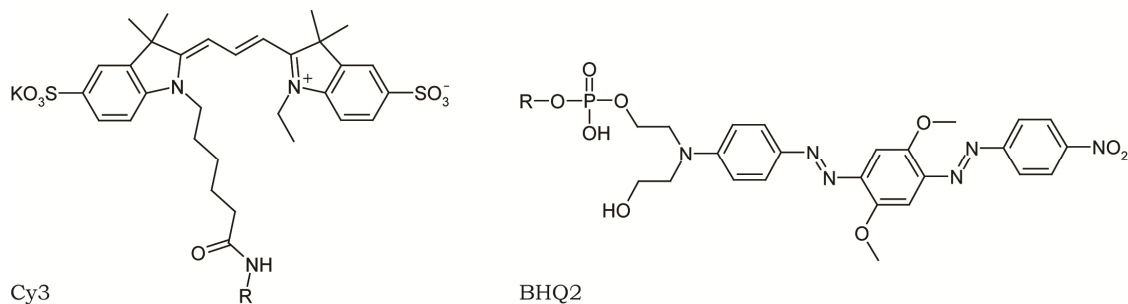
Retentionszeiten durch einzelne, im Vergleich hierzu recht kleine Photoschutzgruppen nicht mehr signifikant ist. Es ist also sehr schwer, eine sehr reine Zielsequenz zu erhalten.



**Abb. 65 Auswirkungen verschiedener Verunreinigungen auf den MB-Fluoreszenzassay:**  
**A: Optimale Aufreinigung führt zu einem eindeutigen An/Aus-Verhalten im Fluoreszenzassay.**  
**B: Verunreinigungen mit nicht fluoreszenzmarkierten Sequenzen bedingen eine Probe, die sich nicht zu 100 % aktivieren lässt.**  
**C: Werden frühzeitig entschützte Sequenzen nicht abgetrennt, täuscht dies eine weniger gute Inaktivierung vor.**  
**D: Verbleibt freier Fluoreszenzfarbstoff in der Probe, erscheint die Inaktivierung nicht vollständig und zusätzlich führt die Bestrahlung zu einer Aktivierung auf über 100% im Vergleich zur Kontrollprobe (A).**

Der Quencher wird im Laufe der Synthese über eine modifizierte Festphase eingeführt. Das Fluorophor Cy3 hingegen wird erst postsynthetisch an eine 5'-Aminofunktionalität gekuppelt. In der Annahme, dass an einem „halben“ *molecular beacon* - also einer Sequenz, die zwar den Quencher trägt, aber noch nicht das Fluorophor - der Einfluss der *cages* auf die Retentionszeit größer ist, als bei der kompletten Sonde, sollte überprüft werden, ob es gelänge, durch einen zusätzlichen, sehr sorgfältigen Aufreinigungsschritt vor der Fluorophorkupplung, die Reinheit der Zielsequenz zu erhöhen.

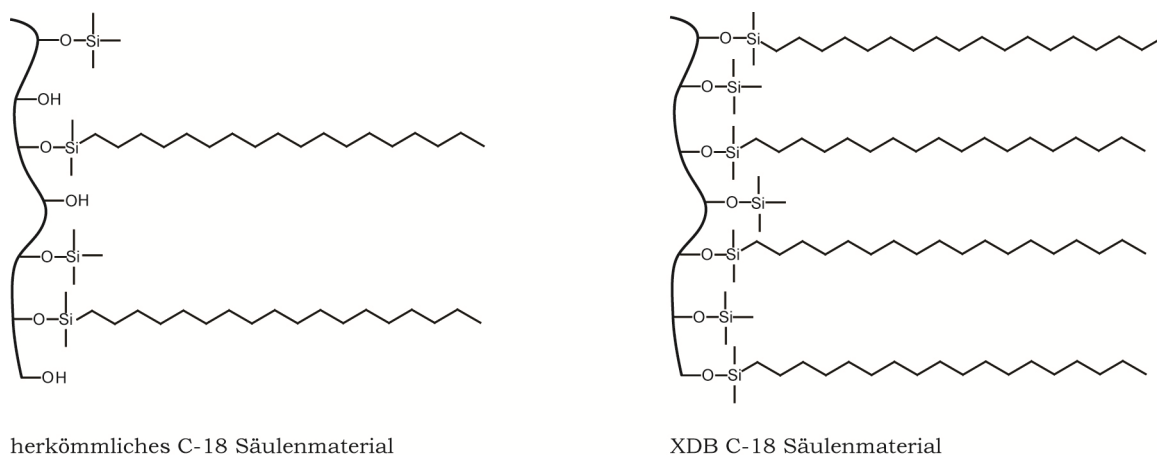
Es stellte sich jedoch heraus, dass ohne Cy3 die Retentionszeit noch deutlich weiter in den unpolaren Bereich verschoben ist. Zwar enthält auch Cy3 mehrere unpolare, aromatische Gruppen, jedoch hat es gleichzeitig überaus polare ionische Funktionalitäten. Demzufolge ist der Einfluss der Photoschutzgruppen auf die Retentionszeit des Oligonukleotids ohne Cy3 noch geringer.



**Abb. 66** Struktur des für den GAPDH-molecular beacon verwendeten Fluorophors und Quenchers.

Die Möglichkeit, die Reinheit bzgl. der vollständig photolabil geschützten *molecular beacons* zu erhöhen, bot sich auf diese Weise also nicht. Gestaltete man den Laufmittelgradienten zunehmend flacher, um so eine bessere Auftrennung zu erhalten, führte dies zu einer immer stärker werdenden Verbreiterung des Peaks, ohne dass eine scharfe Trennung zwischen Produkt und Verunreinigung zu erkennen gewesen wäre.

Eine grundlegende Verbesserung der Trennung konnte schließlich durch die Verwendung einer anderen RP-Säule erreicht werden. Die *xtra-densely-bond* (XDB)-Säulen der Firma *Agilent* bestehen wie die bisher verwendeten RP-Säulen aus C-18 Material, jedoch sind diese Säulen, wie der Name schon sagt, besonders dicht modifiziert.

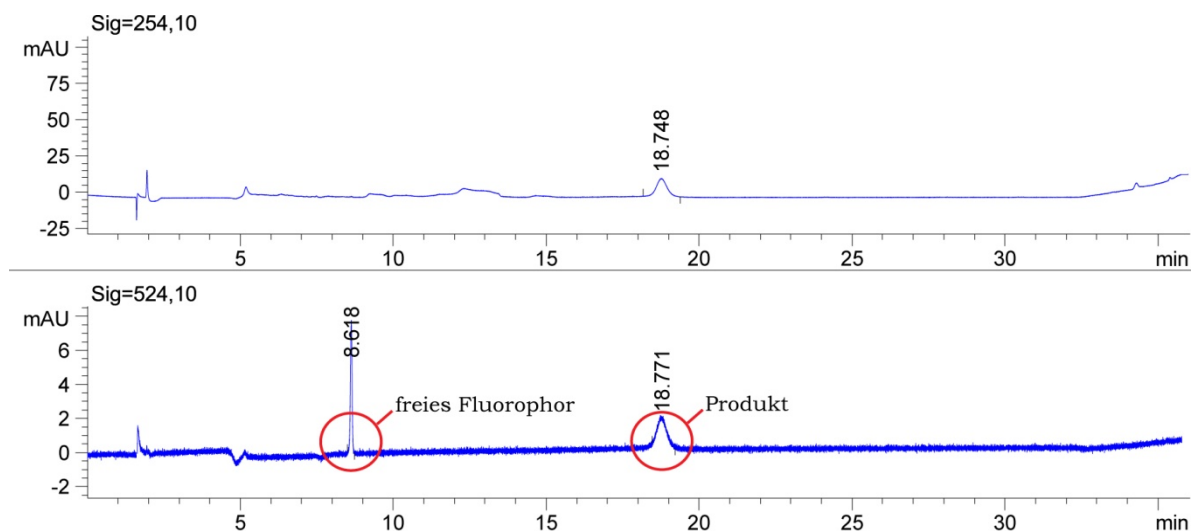


**Abb. 67** Die Silikafestphase der Eclipse XDB-Säulen von *Agilent* ist besonders dicht mit C-18 funktionalisiert. Zudem wird der *end-capping*-Schritt, bei dem unmodifizierte Silanole silanisiert werden, zweimal durchgeführt.

Zudem wird das sogenannte *end-capping*, bei dem unmodifizierte Silanole mit Trimethylsilylgruppen abgesättigt werden, zweifach durchgeführt. Die Anzahl der verbleibenden Silanole, die vor allem im mittleren pH-Bereich unerwünscht mit polaren Gruppen der Analyten wechselwirken und damit zu einem *tailing*, also einer Peakverbreiterung führen, ist damit optimal minimiert. Dies ermöglicht auch einen Betrieb der Säule bei höherer Temperatur, als es die einfachen Nukleosil C-18 Säulen erlauben.

Darüber hinaus zeigte sich bei der HPLC-Aufreinigung ein weiterer Vorteil davon, zahlreiche Photoschutzgruppen auf der Schleifensequenz anzubringen. Je mehr unpolare *cages* ein *molecular beacon* trägt, umso größer ist der Effekt auf die Retention und umso deutlicher kann zwischen dem vollständig (oder zumindest hochgradig) modifizierten Produkt und vollständig bzw. überwiegend entschützter Verunreinigung unterschieden werden.

Ein letztes Problem bei der Aufreinigung stellte die Verunreinigung mit Resten von nicht gekuppeltem Fluorophor dar. Obwohl dieses eine deutlich geringere Retentionszeit als das Produkt aufweist, scheint es auf eine nicht näher untersuchte Art und Weise an das Produkt assoziieren zu können, denn in der Analytik aufgereinigten Produktes fand sich fast immer trotzdem wieder ein Peak des freien Fluorophors.



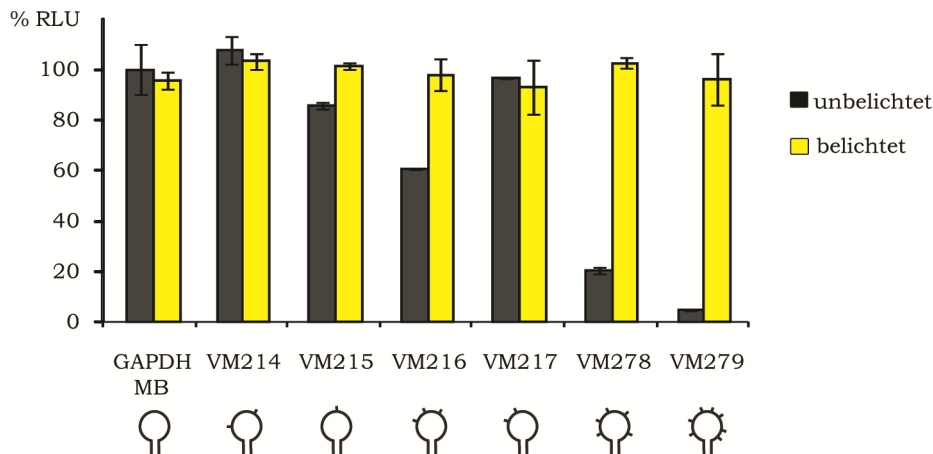
**Abb. 68 Analytisches HPLC-Chromatogramm nach der Aufreinigung eines photolabil geschützten GAPDH-molecular beacon.** Obwohl die Abtrennung des freien Fluorophors vom Produkt auf Grund des großen Retentionszeitunterschiedes einfach sein sollte, finden sich hier Reste des Fluorophors in der gesammelten Produktfraktion. Sig=254 nm – DNA/ Sig=524 nm – Fluorophor.

Nur durch wiederholte Aufreinigung gelang es, diese Verunreinigung vollständig zu entfernen.

#### FLUORESZENZASSAY PHOTOAKTIVIERBARER GAPDH MOLECULAR BEACONS

Die neuerlich aufgereinigten *molecular beacon*-Sequenzen wurden nun ein weiteres Mal in einem Fluoreszenzassay getestet. Sollte die neue Aufreinigung tatsächlich zu einer erhöhten Reinheit geführt haben und das Ergebnis der Haarnadeln aus der Gelelektrophorese auf die Kompletbeacons übertragbar sein, wäre hier zum einen nach Bestrahlung für alle Sequenzen eine Aktivierung auf 100 % zu erwarten. Zum anderen sollte die unbestrahlte Sequenz **VM279** nahezu vollständig inaktiv sein.





**Abb. 69 Fluoreszenzassay nach verbesserter Aufreinigung incl. der neuen fünf- und siebenfach modifizierten MBs.**

Wie Abb. 69 zu entnehmen ist, bestätigt der Fluoreszenzassay die Prognosen. Durch eine bessere Aufreinigung konnte das Problem der nicht vollständig aktivierbaren modifizierten Sequenzen behoben werden. Nach UV-Bestrahlung binden nun alle *molecular beacons* im Rahmen des Fehlers ebenso gut an die Ziel-RNA, wie der unmodifizierte GAPDH-*molecular beacon*. Am Maße der Inaktivierung hat sich für die zuerst synthetisierten Sequenzen **VM214-VM217** nichts Grundlegendes geändert. Allein die dreifach modifizierte Sequenz **VM216** ist nennenswert inaktiv. Sie zeigt eine Restaktivität von immerhin 60 %. Für die beiden neuen Sequenzen **VM278** und **VM279** wird der Trend, der aus der Gelelektrophorese zu erwarten war, bestätigt. Der fünffach modifizierte *molecular beacon* **VM278** ist bereits deutlich inaktiviert und zeigt nur noch eine geringe Restaktivität von 20 %. **VM279**, dessen Schleife sieben *cages* trägt, ist indes als vollständig ausgeschaltet zu sehen. Die Fluoreszenzintensität von unter 5 % liegt im Rahmen des Hintergrundes.

Es ist also möglich, einen *molecular beacon* durch die Einführung photolabiler Schutzgruppen derart zu blockieren, dass keine Bindung an die Zielsequenz mehr stattfindet. Durch Bestrahlung dieses inaktivierten *molecular beacon* mit UV-Licht erhält dieser seine volle Aktivität zurück.

#### ORTSAUFGELOSTE AKTIVIERUNG EINES PHOTOLABIL GESCHÜTZTEN MOLECULAR BEACONS

Den Hintergrund für die Entwicklung eines photoaktivierbaren *molecular beacon* stellte dessen Potential zur räumlich (und zeitlich) definierten Aktivierung dar. Ein solcher *molecular beacon*, eingebracht in eine Zelle, böte die Möglichkeit, die Fluoreszenz auf einen kleinen Bereich einzuschränken und somit den störenden Hintergrund zu minimieren.

Dieses Potential sollte nun näher belegt werden.

Hierzu sollte zunächst ein Modellsystem entwickelt werden, welches mit Hilfe einer oberflächenimmobilisierten Ziel-RNA eine räumlich begrenzte Aktivierung sichtbar machen sollte.

In einem ersten Experiment wurde versucht, die RNA analog einer von Wang veröffentlichten Methode auf einem dünnen Agarosefilm auf einem Objektträger zu immobilisieren.<sup>[139]</sup> Die C-6-Hydroxylgruppen der Agarose wurden dazu mit Natriumperodat zum Aldehyd oxidiert, um die 3'-aminomodifizierte RNA zunächst über ein Imin, welches abschließend mit Natriumborhydrid zum Amin reduziert wurde, anzuknüpfen. Die Immobilisierung gelang auch, sodass nach Zugabe des unmodifizierten *molecular beacon* unter dem Mikroskop eine Fluoreszenz in den Begrenzungen des immobilisierten RNA-Spots zu beobachten war. Ebenfalls zeigte der inaktivierte *molecular beacon* **VM279** keine Fluoreszenz, nachdem er auf die RNA-modifizierte Agarose aufgetragen worden war. Bestrahlte man **VM279** vor dem Auftragen mit UV-Licht, zeigte dieser dieselbe auf den Bereich der gespotteten RNA beschränkte Fluoreszenz, wie der unmodifizierte GAPDH-*molecular beacon*. Allerdings war es nicht möglich, diesen *molecular beacon* nach dem Auftragen auf die Agarose durch Bestrahlung zu aktivieren. Da die Lichtaktivierbarkeit dieses *molecular beacon* jedoch nachgewiesen worden war, wurde als Ursache angenommen, dass die Mobilität der *molecular beacons* auf der Agaroseoberfläche nicht ausreichend war, um nach der Aktivierung eine RNA-Sequenz zu erreichen.

Um das Problem der unzureichenden Mobilität zu umgehen, sollte eine Möglichkeit gefunden werden, den *molecular beacon* auf der modifizierten Oberfläche länger in Lösung zu halten. Als Alternative zur Agaroseimmobilisierung bot sich die direkte Immobilisierung der RNA auf dem Objektträger an. Hierzu muss die Oberfläche des Objektträgers funktionalisiert werden, was z.B. mit Hilfe von Silanderivaten geschehen kann. Es gibt allerdings auch bereits funktionalisierte Objektträger kommerziell zu beziehen. Da von den Agaroseimmobilisierungsexperimenten bereits aminofunktionalisierte Ziel-RNA vorhanden war, wurde das *Nexterion*® AL System, ein Objektträger mit Aldehydoberfläche, der Firma Schott gewählt, um die RNA zu immobilisieren. Zusätzlich wurde das *Nexterion*® H System von Schott getestet. Hier ist der Objektträger mit NHS-Estern funktionalisiert, die über lange hydrophile *spacer* an die Oberfläche gebunden sind.

Zur Immobilisierung wurde Ziel-RNA mit drei verschiedenen 3'-Termini verwendet. Zum einen in der ursprünglichen Form ohne Funktionalisierung, wie sie auch für den Fluoreszenzassay eingesetzt worden war, weiterhin mit einer über einen C-6 Linker angeknüpften Aminomodifikation und zuletzt mit einem zusätzlichen *spacer* aus 20 T-Nukleotiden zwischen (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-Amin und der Zielsequenz.

Im Ergebnis funktionierte die Verknüpfung der Ziel-RNA über eine NHS-Kupplung nicht, während die aldehydmodifizierten Objektträger alle Variationen der Ziel-RNA gebunden haben. Hier sollten nun die optimalen Bedingungen für den Assay herausgefunden werden.

**Spottingpuffer:** getestet wurden sowohl der von Schott mitgelieferte *Nexterion® Spot* Puffer, als auch einfacher PBS-Puffer bei pH 7. In beiden Fällen konnte die Ziel-RNA immobilisiert werden, jedoch schien mit *Nexterion® Spot*, gemessen an der absoluten Fluoreszenzintensität des unmodifizierten GAPDH-*molecular beacon* geringfügig mehr Ziel-RNA gebunden worden zu sein, sodass für alle weiteren Experimente dieser Puffer verwendet wurde.

**Hybridisierungspuffer:** auch für die Hybridisierung der Komplementärstränge (hier der *molecular beacons*) an die Ziel-RNA wurde ein Puffer (*Nexterion® Hyb*) mitgeliefert. Hier konnte jedoch kein Unterschied zur Hybridisierung in PBS ausgemacht werden, sodass diese weiterhin in PBS durchgeführt wurde.

**Konzentration der RNA-Spottinglösung:** für die ersten Tests wurde die Ziel-RNA in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  gespottet. Nun sollte überprüft werden, ob durch die Verwendung einer höher konzentrierten Lösung die absolute Fluoreszenzintensität noch erhöht werden konnte. Dies traf jedoch nicht zu, sodass auch weiterhin eine 20  $\mu\text{M}$  Ziel-RNA-Lösung zur Immobilisierung eingesetzt wurde.

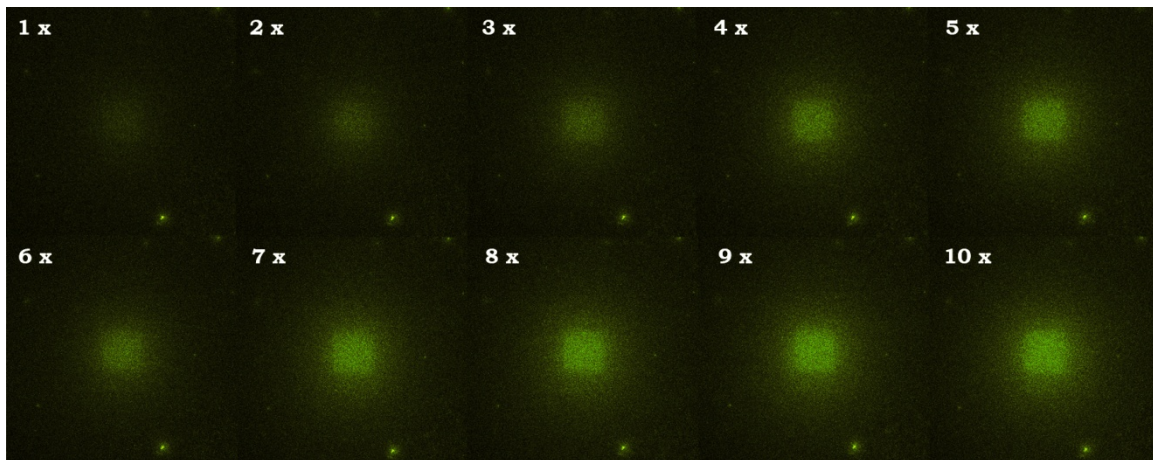
**Konzentration der MB-Lösung:** hier wurden Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  ausprobiert. Während bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  keine Fluoreszenz auszumachen war, konnte die Fluoreszenzintensität zwischen einer 5  $\mu\text{M}$  und einer 10  $\mu\text{M}$  *molecular beacon*-Lösung nicht unterschieden werden. Um Material zu sparen, wurde daher für alle zukünftigen Experimente eine *molecular beacon*-Lösung eingesetzt in 5  $\mu\text{M}$  Konzentration eingesetzt.

**Wahl der Ziel-RNA:** wie eingangs erwähnt, konnten alle drei Ziel-RNA Varianten erfolgreich an die aldehydmodifizierte Oberfläche des Objektträgers gebunden werden. Die am zuverlässigsten zu reproduzierenden Ergebnisse lieferte allerdings die unmodifizierte Ziel-RNA, die über die exozyklischen Aminofunktionen der Nukleobasen ebenfalls an die Aldehydfunktionen binden kann.

Unter den für optimal befundenen Bedingungen wurde nun die Ziel-RNA immobilisiert und die *molecular beacon*-Lösung zur Hybridisierung hinzugegeben. Bei ersten Belichtungstests stellte sich jedoch heraus, dass die Lösung unter dem Mikroskop sehr rasch verdampfte, was zu einer unerwünschten Aufkonzentration des *molecular beacons* führte und auch die Zeit, die für die Mikroskopexperimente zur Verfügung stand, stark verkürzte. Hier erwies es sich als hilfreich, die Ränder der Deckgläser mit Schliff fett abzudichten.

Zur Bestrahlung im verwendeten Mikroskop stand kein UV-Laser zur Verfügung, der eine Wellenlänge von 366 nm emittiert. Jedoch war ein Argonlaser installiert, der verwendet wird, um den gängigen Kernfarbstoff DAPI bei 405 nm anzuregen. Die NPP- und NPE-Schutzgruppe absorbieren bei 405 nm nur noch sehr wenig, jedoch für eine Photolyse mit einem Laser ausreichend, wie Experimente der Arbeitsgruppe Tampé mit einem Nitrophenylderivat gezeigt hatten.<sup>[140]</sup> Nachdem mit ersten Probebestrahlungen über ein- bis

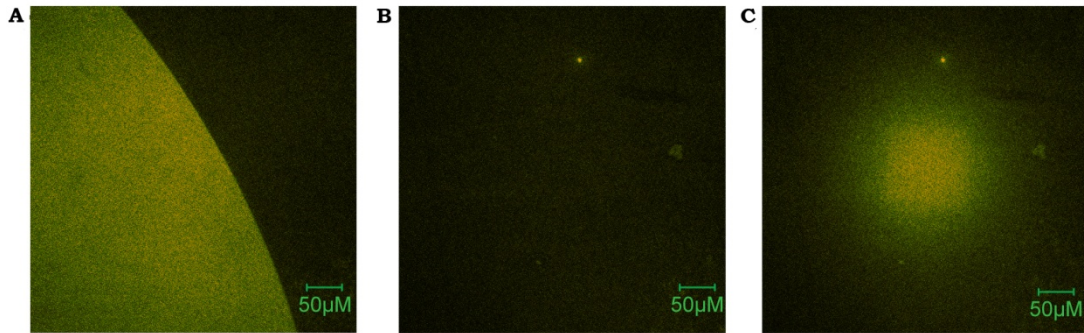
drei Minuten keine Intensivierung der Fluoreszenz erreicht werden konnte, sondern im Gegenteil die Hintergrundfluoreszenz im bestrahlten Bereich verringert wurde, also eher ein Bleichen auftrat, wurde zunächst eine Serie mit Einzelscans aufgenommen, um zu klären, welche Bestrahlungsdauer in etwa notwendig ist, um einen Effekt zu erzielen. Hierzu wurde in den beobachteten Bereich hineingezoomt, dieser dann einmal mit dem Laser abgerastert, wieder hinausgezoomt und eine konfokale Aufnahme gemacht. Anschließend wurde wieder in denselben Bereich gezoomt, eine weitere Belichtung vorgenommen und wieder eine Aufnahme ohne Zoom gemacht. Diese Prozedur wurde zehn Mal wiederholt. Das Ergebnis ist in Abb. 70 dargestellt.



**Abb. 70** Belichtungsserie des photolabil inaktivierten *molecular beacon* VM279. Ein und derselbe quadratische Ausschnitt wurde jeweils abwechselnd einmal mit einem Laser bei 405 nm abgerastert und anschließend ein Bild aufgenommen.

Tatsächlich ist bereits nach einmaligem Abrastern der Oberfläche eine leichte Aktivierung des *molecular beacon* auszumachen. Zudem ist deutlich zu erkennen, dass die ansteigende Fluoreszenz auf den bestrahlten quadratischen Bereich begrenzt ist. Die Hybridisierung des *molecular beacon* an die Zielsequenz nach der Entschützung findet im Vergleich zur Diffusion also schnell statt. Die Fluoreszenzintensität steigt bis ca. zum achten Scan mit jeder zusätzlichen Bestrahlung an. Ab dann nimmt sie nicht mehr merklich zu, jedoch steigt nun die Fluoreszenz in der das Quadrat umgebenden, nicht bestrahlten Region zunehmend an. Da sich der *molecular beacon* in Lösung befindet, ist dies durch Diffusionsprozesse zu erklären. Die Oberfläche im bestrahlten Bereich weist nur eine begrenzte Anzahl an Ziel-RNA auf. Sind diese Bindungsstellen für den *molecular beacon* überwiegend abgesättigt, diffundiert der aktivierte *molecular beacon* aus dem bestrahlten Bereich hinaus und bindet dort an freie Ziel-RNA. Die Anzahl von sieben bis acht Scans entspricht in etwa einer Zeit von fünfzehn Sekunden.

Abb. 71 zeigt das Bindungsverhalten des siebenfach modifizierten *molecular beacon* VM279 nach unterschiedlicher Behandlung.



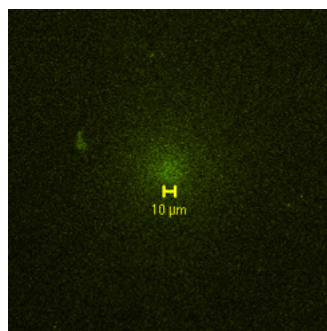
**Abb. 71 Lösung von VM279 auf Objektträger mit immobilisierter Ziel-RNA.**

**A: MB aufgetragen nach Bestrahlung mit UV-LED.**

**B: Nicht bestrahlt.**

**C: Belichtet mit Argonlaser im Mikroskop.**

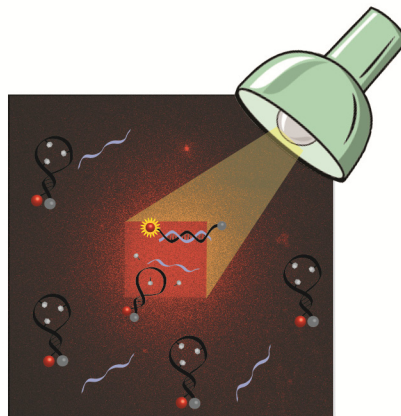
Für Abb. 71 A wurde die *molecular beacon*-Lösung vor dem Auftragen auf den Objektträger bestrahlt. Der Bildausschnitt zeigt den Rand, des immobilisierten RNA-Spots, der sich durch die Fluoreszenz des hybridisierten *molecular beacons* deutlich abhebt. Abb. 71 B und C zeigen ein und denselben Bereich eines RNA-Spots. Abb. 71 B wurde aufgenommen, kurz nachdem der noch komplett photolabil geschützte *molecular beacon* aufgetragen worden war. Es lässt sich keine Fluoreszenz beobachten, der *molecular beacon* ist, wie im Fluoreszenzassay, vollständig inaktiviert. Abb. 71 C zeigt dieselbe Stelle, nachdem ein quadratischer Ausschnitt 15 Sekunden lang bei 405 nm bestrahlt wurde. Deutlich ist die Aktivierung des *molecular beacon* zu erkennen, die räumlich überwiegend auf den bestrahlten Bereich begrenzt bleibt und die eine Intensität erreicht, die der des unmodifizierten GAPDH-*molecular beacon* entspricht. Auch kleinere Bereiche lassen sich aktivieren, wobei die untere Grenze hierbei durch die eingesetzte Technik bestimmt wird. Die in Abb. 72 aktivierte Fläche beträgt etwa  $100 \mu\text{m}^2$ . Hier wurde fünf Sekunden lang belichtet.



**Abb. 72 Aktivierung von VM279 auf einer etwa  $100 \mu\text{m}^2$  großen Fläche.**

### 3.2.5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, lichtaktivierbare *molecular beacons* herzustellen. Indem in die Schleifenregion eine ausreichende Anzahl photolabiler Schutzgruppen integriert werden, die die Hybridisierung an die Zielsequenz sterisch behindern, kann erreicht werden, dass die Bindungsstärke des Schleifen-Zielsequenz-Hybrides nicht mehr ausreichend ist, um den gepaarten Stamm des *molecular beacon* zu öffnen. Im vorliegenden Falle des GAPDH *molecular beacon* waren hierzu sieben photolabile Schutzgruppen notwendig, um die beobachtete Fluoreszenz in der Probe auf das Maß der Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren. Für selektivere *molecular beacons* kann vermutlich auch eine geringere Anzahl ausreichend sein. Ebenfalls gelang es, den auf diese Weise inaktivierten *molecular beacon* wieder vollständig zu reaktivieren. Ein kritischer Punkt bei diesen hochmodifizierten Systemen ist die Aufreinigung. Geringgradige Verunreinigungen mit nichtfluoreszenzmarkierten oder vorzeitig entschützten *molecular beacons* beeinträchtigen den Hintergrund und die Reaktivierbarkeit ganz erheblich.



**Abb. 73 Graphische Darstellung der räumlich definierten Aktivierung eines *molecular beacon*. Im bestrahlten Bereich (rotes Quadrat) werden die *cages* (hellgraue Sphären) abgespalten und der *molecular beacon* kann an die Ziel-RNA (hellblau) binden.**

Der potentielle Nutzen lichtaktivierbarer *molecular beacons* liegt in der Möglichkeit, diese innerhalb einer Zelle räumlich begrenzt zu aktivieren. Mit dieser Option reduziert sich der Fluoreszenzhintergrund ganz enorm, was insbesondere für die Verfolgung einzelner (RNA-)Moleküle von großem Vorteil sein wird.

In einem Modellsystem konnte diese räumliche Lichtaktivierbarkeit bereits unter Beweis gestellt werden. Aufgebracht auf einen Objektträger mit immobilisierter RNA auf der Oberfläche, konnte ganz gezielt eine Fluoreszenz aktiviert werden, die sich auf einen zuvor kurz mit UV-Licht bestrahlten Bereich begrenzte.

Nun soll die Anwendung für konkrete Fragestellungen in der Zelle folgen. Eine Schwierigkeit, die es bei der Übertragung in lebende Zellen zu überwinden gilt, ist stets die der Applikation. Zum Einbringen einfacher und geringfügig modifizierter Oligonukleotide gibt es bereits zahlreiche Strategien. Aber wie ist ein so hochmodifiziertes Oligonukleotid wie ein *molecular beacon* mit Fluorophor und Quencher in eine Zelle einzubringen? Eine Möglichkeit konnte bereits in einem Vorabexperiment mit einem Kooperationspartner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Deller erprobt werden. Es gelang, den unmodifizierten GAPDH *molecular beacon* mit Hilfe der *patch clamp*-Technologie in eine Nervenzelle einzuschleusen. Jetzt kann gezielt ein lichtaktivierbarer *molecular beacon* entwickelt werden, der dabei helfen wird, den mRNA-Transport, der bei der sogenannten synaptischen Plastizität eine Rolle spielt, genauer zu untersuchen.



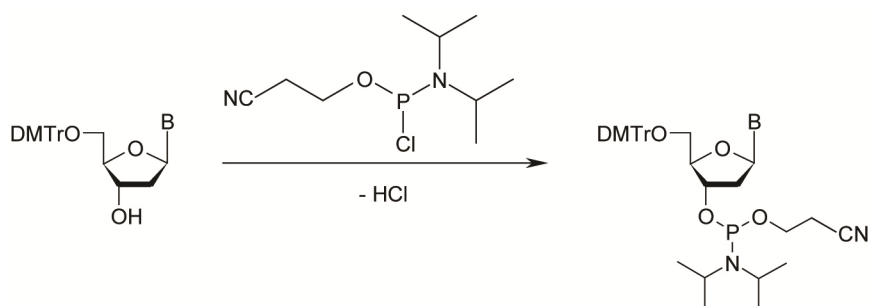


## 4. Experimenteller Teil

### 4.1. Chemische Synthese

#### 4.1.1. Phosphoramiditsynthese

Die verwendeten Phosphoramidite werden nach der folgenden allgemeinen Vorschrift synthetisiert.



**Abb. 74 Allgemeines Reaktionsschema einer Phosphoramiditsynthese**

#### Ansatz

|   |                         |      |
|---|-------------------------|------|
| Nukleosid   | 0,1 – 0,5 g             | 1 eq |
| DCM abs.  | 1 ml je 0,1 g Nukleosid |      |
| DIPEA   |                         | 6 eq |
| 2-Cyanoethyl- <i>N,N</i> -diisopropylchlorophosphoramidit |                         | 3 eq |

#### DURCHFÜHRUNG

Ein Äquivalent des Vorläufernukleosids wird in einem Kolben unter Argonatmosphäre vorgelegt und in DCM gelöst. Zunächst werden 6 Äquivalente DIPEA zugegeben und die Lösung für 10 min bei RT gerührt. Dann setzt man 3 Äquivalente des Amidierungsreagenzes zu und rührt für weitere 2 h bei RT. Die Reaktion wird durch Zugabe von gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung abgebrochen und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird anschließend noch zwei bis dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und nachdem dieses abfiltriert ist, säulenchromatographisch aufgereinigt.

Säulenchromatographie

Eluent :  $dG^{NPP}/dT^{NPP}/dA^{NPE}$  - Cyclohexan/Aceton 2:1 + 1 % Triethylamin  
 $dG^{NPP-NH_2} / dC^{NPE}$  - Cyclohexan/Aceton 3:2 + 1 % Triethylamin

$R_f dG^{NPP} = 0,37 / R_f dT^{NPP} = 0,35 / R_f dG^{NPP-NH_2} = 0,47 / R_f dC^{NPE} = 0,35 / R_f dA^{NPE} = 0,23$

Ausbeute

75-90 %

Alle so hergestellten Phosphoramidite sind in Abb. 75 dargestellt. Bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  und unter Argonatmosphäre sind diese Phosphoramidite mehrere Monate ohne Einbußen der Kupplungsausbeuten haltbar. In Lösung unter Argonatmosphäre bei RT sind die Amidite mehrere Tage stabil.

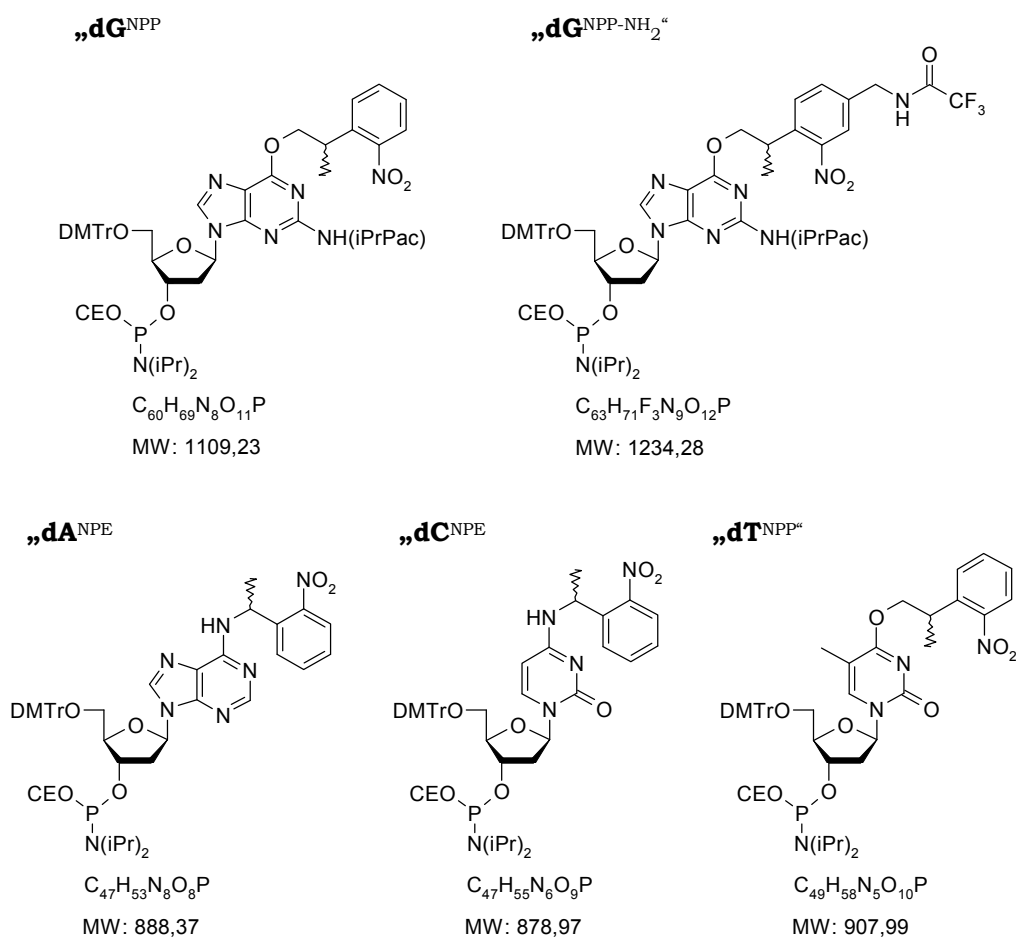


Abb. 75 Synthetisierte Phosphoramidite

## NMR-SPEKTREN

dG<sup>NPP</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 400 MHz):  $\delta$  = 0,97-1,20 (18H, m, CH<sub>3</sub> *i*-Pr); 1,37-1,39 (3H, CH<sub>3</sub> NPP); 2,56-2,61 (1H, m, H-2'); 2,71 (1H, t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5,85 Hz, CH *i*PrPac); 2,77-2,87 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN); 2,98-3,06 (1H, m, H-2'); 3,16-3,39 (2H, m, H-5'); 3,46-3,54 (2H, m, CH<sub>2</sub>OP); 3,57-3,63 (1H, m, CH *i*PrPac); 3,68 (6H, 2s, OCH<sub>3</sub>); 3,71-3,78 (1H, m, CH NPP); 4,02-4,14 (1H, m, H-4'); 4,67-4,80 (3H, m, CH<sub>2</sub> NPP, H-3'); 4,92 (2H, s, CH<sub>2</sub> *i*PrPac); 6,36-6,39 (1H, m, H-1'); 6,69-6,77 (4H, m, H<sub>ar</sub> DMTr); 6,81-6,83 (2H, m, H<sub>ar</sub>, *i*PrPac); 7,11-7,17 (9H, H<sub>ar</sub> 7x DMTr, 2x *i*PrPac); 7,26-7,30 (2H, m, H<sub>ar</sub> DMTr); 7,45-7,50 (1H, CH<sub>ar</sub> NPP); 7,64-7,70 (1H, m, H<sub>ar</sub> NPP); 7,78-7,85 (2H, m, H<sub>ar</sub> NPP); 8,32 (1H, m, H-8); 10,48-10,50 (1H, m, NH) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (DMSO, cpd, 162 MHz):  $\delta$  = 148,47; 149,15 ppm.

dG<sup>NPP-NH<sub>2</sub></sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 400 MHz):  $\delta$  = 0,98-1,13 (9H, m, CH<sub>3</sub> N(*i*Pr)<sub>2</sub>); 1,16 (6H, d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,79 Hz, CH<sub>3</sub> *i*PrPac); 1,22 (3H, d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,61 Hz, CH<sub>3</sub> N(*i*Pr)<sub>2</sub>); 1,37-1,40 (3H, m, CH<sub>3</sub> NPP); 2,56-2,61 (1H, m, H-2'); 2,71 (1H, t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5,74 Hz, CH *i*PrPac); 2,79-2,86 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN); 3,00-3,06 (1H, m, H-2'); 3,16-3,42 (2H, m, H-5'); 3,45-3,62 (3H, m, CH *i*PrPac, CH<sub>2</sub>OP); 3,67-3,70 (6H, m, OCH<sub>3</sub>); 3,72-3,80 (1H, m, CH NPP); 4,04-4,16 (1H, m, H-4'); 4,46 (2H, d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5,97 Hz, CH<sub>2</sub>-NH-TFA); 4,67-4,89 (3H, m, CH<sub>2</sub> NPP, H-3'); 4,93 (2H, s, CH<sub>2</sub> *i*PrPac); 6,36-6,43 (1H, m, H-1'); 6,67-6,78 (4H, m, H<sub>ar</sub> DMTr), 6,81-6,85 (2H, m, H<sub>ar</sub> *i*PrPac); 7,12-7,18 (9H, H<sub>ar</sub> 7x DMTr, 2x *i*PrPac); 7,24-7,30 (2H, m, H<sub>ar</sub> DMTr); 7,59-7,61 (1H, CH<sub>ar</sub> NPP); 7,79-7,83 (2H, m, CH<sub>ar</sub> NPP); 8,32-8,34 (1H, m, H-8); 10,07-10,10 (1H, m, NH-TFA); 10,51-10,53 (1H, m, NH N-6) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (DMSO, cpd, 162 MHz):  $\delta$  = 147,27; 147,94 ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO, 162 MHz):  $\delta$  = 17,9 (CH<sub>3</sub> NPP); 18,7 (CH<sub>3</sub> N*i*Pr<sub>2</sub>); 24,0 (CH<sub>3</sub> *i*PrPac); 32,5 (CH *i*PrPac); 33,0 (CH NPP); 37,6 (C-2'); 41,6 (CH<sub>2</sub> TFA); 45,6 (CH N*i*Pr<sub>2</sub>); 54,9 (OCH<sub>3</sub>); 58,4 (CH<sub>2</sub>OP); 60,3 (CH<sub>2</sub>-CN); 63,7 (C-5'); 67,4 (CH<sub>2</sub> *i*PrPac); 70,3 (CH<sub>2</sub> NPP); 83,5 (C-1'), 85,0 (C-4'); 85,5 (DMTr); 112,9; 114,0; 114,3; 117,5; 117,9; 118,1; 118,7; 118,9; 122,8; 126,5; 127,0; 127,6; 129,0; 129,6; 132,0; 135,4; 135,8; 137,6; 140,8; 140,9; 141,4; 144,8; 149,9; 151,5; 152,5; 156,0; 156,3; 156,8; 158,0; 159,9 ppm.

## dANPE

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 400 MHz):  $\delta$  = 1,08-1,16 (12H, m, CH<sub>3</sub> N(*i*Pr)<sub>2</sub>); 1,64 (3H, d, *J*<sub>1</sub> = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub> NPE); 2,41 (1H, m, H-2'); 2,66 (1H, t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5,8 Hz, CH<sub>2</sub>CN); 2,75 (1H, t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5,8 Hz, CH<sub>2</sub>CN); 2,99 (1H, m, H-2'); 3,19 (2H, m, H-5'); 3,43-3,65 (4H, m, CH *i*Pr, OCH<sub>2</sub>); 3,71 (6H, 2s, OCH<sub>3</sub> DMTr); 4,06-4,10 (2H, m, H-4'); 4,75 (1H, m, H-3'); 5,75 (1H, m, CH NPE); 6,34 (1H, m, H-1'); 6,78-6,80 (4H, m, CH<sub>ar</sub> DMTr); 7,16-7,29 (9H, m, CH<sub>ar</sub> DMTr); 7,60-7,94 (4H, m, CH<sub>ar</sub> NPE); 8,31 (1H, m, H-8); 8,38 (1H, m, NH) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (DMSO, cpd, 162 MHz):  $\delta$  = 146,99; 147,04; 147,62 ppm.

dC<sup>NPE</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 400 MHz):  $\delta$  = 1,17 (6H, d,  $^3J_{HH}$  = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub> *i*-Pr); 1,19 (6H, d,  $^3J_{HH}$  = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub> *i*-Pr); 1,48 (3H, d,  $^3J_{HH}$  = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub> NPE); 2,06-2,37 (2H, m, H-2'); 2,63 (1H, t,  $^3J_{HH}$  = 5,8 Hz, CH<sub>2</sub>CN); 2,89 (1H, t,  $^3J_{HH}$  = 5,8 Hz, CH<sub>2</sub>CN); 3,24 (2H, m, H-5'); 3,39-3,60 (4H, m, 2x CH *i*-Pr, OCH<sub>2</sub>); 3,74 (6H, 2s, OCH<sub>3</sub> DMTr); 3,96-4,09 (2H, m, H-4'); 4,47 (2H, m, H-3'); 5,51 (1H, m, CH NPE); 5,65-5,69 (1H, m, H-6); 6,03-6,13 (1H, m, H-1'); 6,86-6,91 (4H, m, CH<sub>ar</sub> DMTr); 7,22-7,36 (9H, m, CH<sub>ar</sub> DMTr); 7,50-7,75 (4H, m, CH<sub>ar</sub> NPE), 7,93 (1H, m, H-5), 8,38 (1H, m, NH) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (DMSO, cpd, 162 MHz):  $\delta$  = 147,28; 147,31; 147,66 ppm.

dT<sup>NPP</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 400 MHz):  $\delta$  = 0,97 (3H, d,  $J_I$  = 6,68 Hz, CH<sub>3</sub> *i*-Pr); 1,09-1,13 (9H, m, CH<sub>3</sub> *i*-Pr); 1,34-1,36 (3H, m, CH<sub>3</sub> NPP); 2,21-2,45 (2H, m, H-2'); 2,69 (2H, dt,  $^2J_{HH}$  = 36,22,  $^3J_{HH}$  = 5,83, CH<sub>2</sub>CN); 3,24-3,29 (2H, m, H-5'); 3,45-3,54 (1H, m, H-6); 3,56-3,63 (2H, m, CH<sub>2</sub>OP); 3,72 (6H, 2s, OCH<sub>3</sub>); 4,01-4,11 (1H, m, H-4'); 4,36 (3H, s, CH<sub>3</sub>-5); 6,11-6,19 (1H, m, H-1'); 6,84-6,89 (4H, m, H<sub>ar</sub> DMTr); 7,21-7,30 (7H, m, DMTr); 7,34-7,37 (2H, DMTr); 7,45-7,50 (1H, m, H<sub>ar</sub> NPP); 7,66-7,83 (3H, m, H<sub>ar</sub> NPP) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (DMSO, cpd, 162 MHz):  $\delta$  = 147,28; 147,32; 147,60 ppm.

## 4.2. Allgemeine Methoden

**Lösungsmittel und Reagenzien.** Alle kommerziell erworbenen Chemikalien werden wie vom Hersteller geliefert ohne weitere Reinigung verwendet. Wasserfreie Lösungsmittel werden über 4 Å Molekularsieb gelagert und für alle Reaktionen unter Argonatmosphäre verwendet. Fertige Lösungen für die Oligonukleotidsynthese werden von den Firmen *J.T. Baker* oder *Applied Biosystems* bezogen, die Festphasensäulen hierzu liefert *Applied Biosystems*. Standardphosphoramidite (ohne photolabile Schutzgruppe) stammen von den Firmen *AZCO Biotec. Inc.*, *SAFC*, *Vivotide*, *Chemgenes* oder *Applied Biosystems*. Der Aktivator 5-Ethylthiotetrazol (ETT) wird von der Firma *AZCO Biotec. Inc.* bezogen.

Für sämtliche wässrigen Lösungen bzw. Puffer wird MilliQ-Wasser aus einem Milli-Q Plus Gerät (*Millipore Corp.*) mit Filterkartuschen der *Siemens AG* verwendet.

Die Ansätze für die genutzten Puffer sind im Folgenden aufgeführt.

| <i>1x PBS, 1 l</i>               |        |                        | <i>1x TBE, 1 l</i> |        |                       |
|----------------------------------|--------|------------------------|--------------------|--------|-----------------------|
| NaCl                             | 8,0 g  | ( $\triangleq$ 137 mM) | Tris               | 10,8 g | ( $\triangleq$ 89 mM) |
| KCl                              | 0,2 g  | ( $\triangleq$ 2,7 mM) | Borsäure           | 5,5 g  | ( $\triangleq$ 89 mM) |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,44 g | ( $\triangleq$ 100 mM) | EDTA               | 0,59 g | ( $\triangleq$ 2 mM)  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,24 g | ( $\triangleq$ 2 mM)   |                    |        |                       |

**Präparative Säulenchromatographie.** Die Reinigung aller Verbindungen erfolgte nach dem Prinzip der Flash-Chromatographie.<sup>[141]</sup> Hierzu wird als stationäre Phase Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 40-63 µm der Firmen *Macherey-Nagel GmbH&Co.KG* oder *Merck KGaA* verwendet. Die verwendeten Lösungsmittel weisen die Reinheit p.a. auf.

**NMR-Spektroskopie.** Zur Aufnahme von NMR-Spektren werden Geräte der Firma *Bruker Corporation* verwendet: AM250 (<sup>1</sup>H: 250 MHz, <sup>13</sup>C: 62.5 MHz), AM/ARX300 (<sup>1</sup>H: 300 MHz, <sup>13</sup>C: 75 MHz, <sup>31</sup>P: 121 MHz), AM/AV400 (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz). Die NMR-Experimente sind mit der verwendeten Messfrequenz gekennzeichnet. Gemessen wird bei Raumtemperatur (~293 K). Als Lösungsmittel dient deuteriertes DMSO oder Chloroform jeweils mit einem Deuterierungsgrad von  $\geq 99.8$  %. Die Kalibrierung der Spektren erfolgt bei <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR intern nach der relativen Verschiebung des Lösungsmittelsignals,<sup>[142]</sup> für die <sup>31</sup>P-Experimente wird 85 %ige Phosphorsäure als externer Standard verwendet. Zur Bezeichnung der Multipletts werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, sep = Septett, m = unbestimmtes Multiplett, bs = breites Singulett. Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in *parts per million* [ppm], Kopplungskonstanten *J* sind in [Hz] angegeben. Die <sup>13</sup>C-NMR Spektren werden Protonen-Breitband entkoppelt (cpd, *composite pulse decoupling*) aufgenommen.

**Massenspektrometrie.** ESI-Massenspektren von Oligonukleotiden werden an einem micrOTOF-Q Gerät der Firma *Bruker Corporation* im Negativmodus aufgenommen. Für MALDI-Massenspektren wird ein Voyager-DE MALDI-Spektrometer der Firma *Applied Biosystems* verwendet. Als Matrix für die MALDI-Experimente dient 2,5 Dihydroxybenzoesäure.

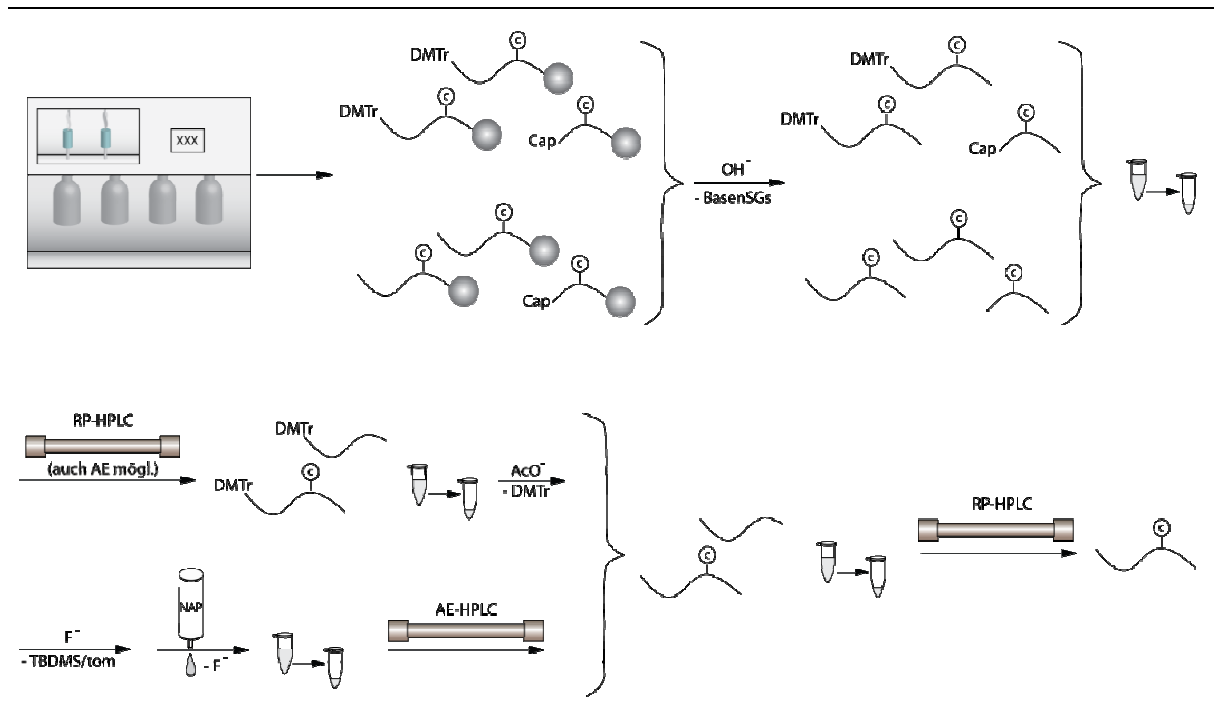
**Dünnschichtchromatographie.** Zur Reaktions- und Reinheitskontrolle werden DC-Kieselgelplatten 60 mit Fluoreszenzindikator (254 nm) der Firma *Merck KGaA* verwendet. Die Detektion erfolgt mit UV-Licht der Wellenlängen 254 nm. Die Anfärbung von Substanzflecken erfolgt durch Eintauchen der DC-Platte in ein Ce/Mo Färbereagenz (2,5 g Cer(IV)sulfat, 6,25 g Ammoniumheptamolybdat, 225 ml Wasser, 25 ml konz. Schwefelsäure) und anschließendes Erwärmen mittels Heißluftpistole.

#### 4.2.1. Oligonukleotid-Festphasensynthese

Die Oligonukleotidsynthesen werden auf einem ABI 392-8 DNA/RNA-Synthesizer der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. Der Synthesemaßstab beträgt stets 200 nmol, als feste Phase wird Polystyren (PS) in *low volume* Synthesesäulen (ABI LV200) verwendet. Im genutzten Standardkopplungszyklus (LV200 394-8) beträgt die Dauer des eigentlichen Kopplungsschritts 5 min.

Die *capping*-Reagenzien bestehen aus 10 % Essigsäureanhydrid und 10 % 2,6-Lutidin in THF (CapA) und 16 % 1-Methylimidazol in THF (CapB). Zur Oxidation wird eine 3 %ige Iodlösung in THF mit 2 % Wasser und 20 % Pyridin verwendet. Als Aktivator dient 5-Ethylthiotetrazol (ETT) 0,25 M in Acetonitril. Dieser wird nicht als Lösung sondern als Feststoff gelagert und die Gebrauchslösung frisch angesetzt. Die exozyklischen Aminofunktionen der Standardphosphoramiditnukleobasen sind wie folgt geschützt: dA – Benzoyl; dG – Dimethylformamid; dC – Acetyl. Kommerziell erhältliche, wie eigenhändig synthetisierte Phosphoramidite werden in einer Konzentration von 0,1 M in Acetonitril eingesetzt.

#### 4.2.2. Entschützung und Abspaltung von Oligonukleotiden nach der Festphasensynthese



**Abb. 76** Schematische Darstellung verschiedener Aufreinigungswege von Oligonukleotiden nach der Synthese.

##### ALKALISCHE ABSPALTUNG UND ENTSCHÜTZUNG

Für die basische Entschützung und Abspaltung der Oligonukleotide von der Festphase, wird diese in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Abspaltung/ Entschützung erfolgt, je nach Schutzgruppen und Modifikationen, entweder mit  $\text{NH}_3$  (33 % wässr. Lösung) oder mit  $\text{MeNH}_2$  (33 % in  $\text{H}_2\text{O}$  /  $\text{MeNH}_2$  42 % in  $\text{EtOH}$  abs. (1:1)). Je nach Menge der Festphase werden 200–400  $\mu\text{l}$  des alkalischen Reagenzes auf die Festphase gegeben. Auch die Inkubationszeiten und -bedingungen müssen für das jeweilige Oligonukleotid und seine Modifikationen optimiert werden. Zu beachten ist, dass einige Modifikationen nicht alle Abspaltungsbedingungen schadlos überstehen. Vor allem erhöhte Temperatur ist oft problematisch. Andererseits benötigen einige Basenschutzgruppen recht harsche Bedingungen, um vollständig abgespalten zu werden. Es ist daher immer vonnöten, vor der Synthese zu überprüfen, ob die für die gewählten Nucleobasenschutzgruppen notwendigen Abspaltungsbedingungen mit den vorhandenen Modifikationen kompatibel sind. Tab. 2 zeigt, unter welchen Bedingungen die verwendeten Basenschutzgruppen abgespalten werden können und ob die Modifikationen unter diesen Bedingungen stabil sind.

**Tab. 2 Entschützungsbedingungen für verschiedene Basenschutzgruppen.**  
**\* die Abspaltung von C<sup>Bz</sup> in AMA führt zur Basenmodifikation.**

|   | NH <sub>3</sub> - RT | NH <sub>3</sub> - 65 °C | MeNH <sub>2</sub> - RT | AMA - RT<br>(ultra fast) |
|---|----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|
| <b>d/rA<sup>Bz</sup></b>                                  | √                    | <b>3 h</b>              | <b>3 h</b>             | √                        |
| <b>dC<sup>Bz</sup></b>                                    | <b>16 h</b>          | <b>3 h</b>              | ?                      | - *                      |
| <b>d/rC<sup>Ac</sup></b>                                  | <b>2 h</b>           | √                       | <b>3 h</b>             | <b>2 h</b>               |
| <b>d/rG<sup>dmf</sup></b>                                 | <b>16 h</b>          | <b>2 h</b>              | <b>3 h</b>             | <b>2 h</b>               |
| <b>d/rG<sup>Ac</sup></b>                                  | <b>16 h</b>          | <b>2 h</b>              | <b>3 h</b>             | <b>2 h</b>               |
| <b>d/rG<sup>iBu</sup></b>                                 | -                    | <b>8 h</b>              | <b>4 h - 65°C</b>      | <b>2 h</b>               |
| <b>d/rG<sup>iPrPac</sup></b>                              | <b>2 h</b>           | <b>0,5 h</b>            | <b>3 h</b>             | √                        |
| <b>dT<sup>NPP</sup></b>                                   | √                    | -                       | √                      | √                        |
| <b>dG<sup>NPP</sup>/dC<sup>NPE</sup>/dA<sup>NPE</sup></b> | √                    | √                       | √                      | √                        |
| <b>Cy3</b>  | √                    | √                       | ?                      | √                        |
| <b>BHQ2</b>   | √                    | √                       | √                      | -                        |
| <b>FAM</b>  | √                    | -                       | ?                      | √                        |
| <b>R6G</b>  | -                    | -                       | -                      | -                        |

Nach der alkalischen Entschützung wird das Abspaltungsreagenz in der Vakuumzentrifuge entfernt und die Probe von Abbruchsequenzen befreit. Trägt das Oligonukleotid die DMTr-Gruppe noch, geschieht dies mittels RP-HPLC, andernfalls wird eine AE-HPLC durchgeführt.

#### ENTSCHÜTZEN DER 2'-OH-FUNKTION

Die 2'-Hydroxyfunktion von RNA-Nukleotiden wird stets nach der alkalischen Abspaltung der Basenschutzgruppen entschützt, um eine alkalische Hydrolyse der RNA zu vermeiden (s. Abb. 3 Spaltung der Interribonukleotidverknüpfung unter basischen Bedingungen.) Hierzu wird die nahezu trockene Probe mit 200 – 400 µl *tert.*Butylammoniumfluorid in THF versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Teil des Fluorids lässt sich durch Gelfiltration über eine NAP-Kartusche (*GE Amersham*) bereits abtrennen, jedoch ist diese Aufreinigung nie vollständig. Dies muss bei der nachfolgenden HPLC-Aufreinigung bedacht werden. Während silikabasierte RP-HPLC-Säulen niemals mit fluoridhaltigen Lösungen beladen werden dürfen, ist dies für die zur AE-Chromatographie genutzten DNA-Pac-Säule vollkommen unproblematisch.



*ENTSCHÜTZEN MIT ESSIGSÄURE*

Wird im letzten Schritt der Festphasensynthese die DMTr-Gruppe für eine RP-HPLC Aufreinigung anhand der Hydrophobizität auf dem letzten Nukleotid belassen, erfolgt die DMTr-Entschützung dieser Oligonukleotide erst nach einer ersten RP-HPLC Trennung. Hierzu wird die getrocknete Probe mit Essigsäure (75  $\mu$ l, 80 % aq.) versetzt und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Probe erneut an der Vakuumzentrifuge eingeengt.

**4.2.3. HPLC**

Alle HPLC-Experimente werden an einem Gerät der 1200 er Serie der Firma *Agilent* mit Autosampler, Fraktionensammler und Säulenofen durchgeführt. Bei der Probenvorbereitung ist darauf zu achten, dass sich keine festen Partikel in der Probenlösung befinden bzw. solche durch Filtration zu entfernen. Puffer die für die Aufreinigung von RNA-Oligonukleotiden vorgesehen sind, werden nach Herstellung sterilfiltriert und ggf. im Kühlschrank gelagert. Säulen, die für die Trennung von RNA vorgesehen sind, werden ausschließlich mit sterilen Puffern benutzt.

*ANIONENAUSTAUSCH HPLC*

Bei der Aufreinigung von RNA-Oligonukleotiden wird im ersten Schritt eine Anionenaustausch-HPLC durchgeführt. Die Trennung erfolgt dabei anhand der negativen Ladung, weshalb Abbruchsequenzen sehr gut entfernt werden können. Grundsätzlich ist es zwar möglich, auch auf RNA-Sequenzen die DMTr-Gruppe zu belassen und die Abbruchsequenzen durch RP-HPLC abzutrennen, für die Verwendung von C-18 Säulen muss dann jedoch äußerst sorgfältig das für die 2'-OH-Entschützung verwendete Fluoridreagenz entfernt werden. Das Polymer der Anionenaustauschersäule ist diesbezüglich nicht empfindlich. Die verwendete Säule der Firma Dionex enthält eine stationäre Phase, die mit quaternären Aminen funktionalisiert ist und erreicht die maximal mögliche Auflösung von n neben n-1. Für analytische wie präparative Auftrennungen wird dieselbe Säule verwendet. Da RNA stark dazu neigt Sekundärstrukturen auszubilden, die von der Säule nicht zerstört werden, wird die Trennung bei erhöhtem pH-Wert und erhöhter Temperatur durchgeführt.

Säule: *DNAPac PA-100*, Dionex, 4 x 250 mm

Temperatur: 80 °C

Puffersystem: Tris·HCl 25mM, pH 8, steril!

Eluent A: Puffer

Eluent B: Puffer + 0,5 M NaOCl<sub>4</sub>

Flow: 1,5 ml·min<sup>-1</sup>

Gradient:

**Tab. 3 Gradient für die Anionenaustausch-HPLC von RNA.**

| <b>T [min]</b> | <b>% A</b> | <b>% B</b> |
|----------------|------------|------------|
| <b>0</b>       | 100        | 0          |
| <b>2</b>       | 100        | 0          |
| <b>40</b>      | 25         | 75         |
| <b>45</b>      | 0          | 100        |
| <b>50</b>      | 0          | 100        |
| <b>55</b>      | 100        | 0          |

#### UMKEHRPHASEN HPLC

Die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) trennt nach Polarität. Verschieden lange Oligonukleotide vermag man mit dieser Methode nicht zu unterscheiden. Daher wird die RP-HPLC nur verwendet, wenn unterschiedlich funktionalisierte Oligonukleotide voneinander getrennt werden sollen, beispielweise um 5'-DMTr-geschütztes Volllängenprodukt von 5'-O-Cap geschützten Abbruchsequenzen zu trennen oder um Oligonukleotide mit Photoschutzgruppen von jenen ohne diese zu separieren.

DNA-Sequenzen werden zur Aufreinigung nach der Synthese zweimal per RP-HPLC-aufgereinigt. Ein erstes Mal vor der DMTr-Entschützung, um Abbruchsequenzen abzutrennen, ein zweites Mal danach, sofern die Oligonukleotide Photoschutzgruppen tragen. Diese sind auch unter den Abspaltungsbedingungen geringfügig labil, sodass danach vollständig oder bei mehreren Photoschutzgruppen auch teilentschützte Oligonukleotide vorliegen können. Neben der stark hydrophoben DMTr-Gruppe fällt der durch einzelne Photoschutzgruppen verursachte Hydrophobizitätsunterschied jedoch kaum ins Gewicht. Daher ist eine Auftrennung anhand der Photoschutzgruppen erst möglich, wenn die DMTr-Gruppe abgespalten ist. Für analytische wie präparative Trennungen wird dieselbe Säule verwendet.

Säule: *Nukleosil 100-5 C18*, CS-Chromatographie, 4 x 250 mm

Temperatur: RT

Puffersystem: TEAA 0,1 M, pH 7

Eluent A: Puffer

Eluent B: Acetonitril

Flow: 1,0 ml·min<sup>-1</sup>

Gradient:

**Tab. 4 Gradient für die Umkehrphasen-HPLC von DNA.**

| <b>T [min]</b> | <b>% A</b> | <b>% B</b> |
|----------------|------------|------------|
| <b>0</b>       | 100        | 0          |
| <b>5</b>       | 100        | 0          |
| <b>30</b>      | 58         | 42         |
| <b>32</b>      | 0          | 100        |
| <b>35</b>      | 0          | 100        |
| <b>40</b>      | 100        | 0          |

RNA-Oligonukleotide werden nach der Anionenaustauschchromatographie ebenfalls ein weiteres Mal aufgereinigt, wenn nach der Anzahl von Photoschutzgruppen getrennt werden soll. Auch hier ist eine erhöhte Temperatur vorteilhaft. Bei C-18 Material ist die maximal mögliche Temperatur allerdings 55 °C, da die Löslichkeit im wässrigen Puffer sonst zu stark ansteigt. Und selbst bei dieser moderaten Temperatur sinkt die Lebensdauer der Säulen merklich. Auch hier wird präparativ wie analytisch dieselbe Säulengröße verwendet.

Säule: *Nukleosil 100-5 C18*, CS-Chromatographie, 4 x 250 mm

Temperatur: 55 °C

Puffersystem: AA 0,1 M, pH 6,5, steril!

Eluent A: Puffer

Eluent B: Acetonitril

Flow: 1,0 ml·min<sup>-1</sup>

Gradient:

**Tab. 5 Gradient für die Umkehrphasen-HPLC von RNA.**

| <b>T [min]</b> | <b>% A</b> | <b>% B</b> |
|----------------|------------|------------|
| <b>0</b>       | 100        | 0          |
| <b>2</b>       | 100        | 0          |
| <b>30</b>      | 80         | 20         |
| <b>35</b>      | 0          | 100        |
| <b>40</b>      | 0          | 100        |
| <b>45</b>      | 100        | 0          |

*Molecular beacons* werden auf einer anderen Säule und mit einem anderen Gradienten aufgetrennt. Ähnlich wie die DMTr-Gruppe erschwert hier insbesondere der stark hydrophobe Quencher die Aufreinigung anhand der Anzahl der Photoschutzgruppen. Hier

hat sich die Verwendung einer Säule bewährt, die mit einer besonders dicht alkylmodifizierten stationären Phase gepackt ist. Zudem sind nicht alkylierte Silanole bei dieser sogenannten XDB (*xtra densely bond*) Säule mit einem *cap* versehen, was das *tailing* minimiert. Auch hier hilft eine leicht erhöhte Temperatur, die Peakschärfe zu verbessern, es gilt aber dieselbe Einschränkung bezüglich der Maximaltemperatur, wie für normales C-18 Material. Für analytische Trennungen (a) wird eine kleinere Säule verwendet, als für präparative Aufreinigungen (p).

Säule: *EclipseXDB-C18, Agilent, 4,6 x 150 mm (a), 4,6 x 250 mm (p)*

Temperatur: 55 °C

Puffersystem: TEAA 0,1 M, pH 7

Eluent A: Puffer

Eluent B: Acetonitril

Flow: 1,0 ml·min<sup>-1</sup>

Gradient:

**Tab. 6 Gradient für die Umkehrphasen-HPLC von *molecular beacons*.**

| <b>T [min]</b> | <b>% A</b> | <b>% B</b> |
|----------------|------------|------------|
| <b>0</b>       | 100        | 0          |
| <b>2</b>       | 100        | 0          |
| <b>5</b>       | 80         | 20         |
| <b>30</b>      | 65         | 35         |
| <b>35</b>      | 0          | 100        |
| <b>40</b>      | 0          | 100        |
| <b>45</b>      | 100        | 0          |

#### 4.2.4. Entsalzen

Für das Entsalzen von Proben nach der Anionenaustauschchromatographie werden *NAP 5* Kartuschen der Firma *GE Amersham* verwendet. Dabei handelt es sich um Gelfiltrationssäulen, die mit G25 Material gepackt sind. Die Elution wird entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt, als Eluent dient jedoch H<sub>2</sub>O.

Soll im Anschluss eine RP-HPLC folgen, ist es auch möglich, die Proben auf ein Volumen < 100 µl einzuengen und die Salzlösung direkt in die HPLC zu injizieren. Das Retentionsverhalten der Oligonukleotide verändert sich dadurch nicht.

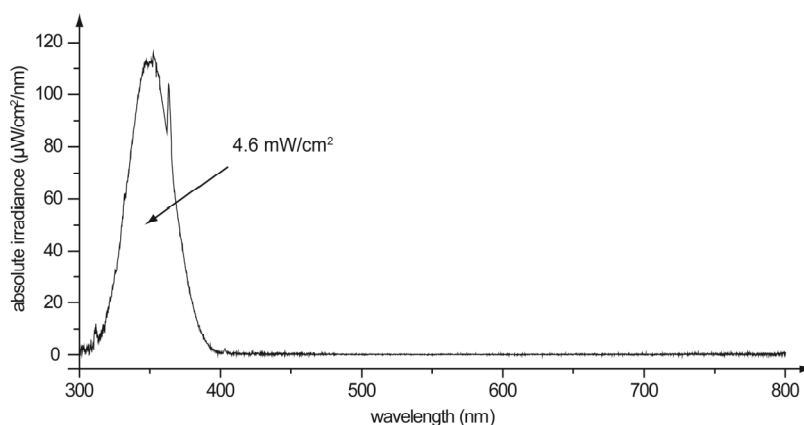
Für das Entsalzen weniger salzhaltiger Proben, z.B. zum Umpuffern, werden G25 Microspin Kartuschen, ebenfalls von *GE Amersham*, verwendet.

#### 4.2.5. Belichtungsexperimente

Für die Entschützung der photolabilen Schutzgruppen kommen drei verschiedene Geräte zur Anwendung.

##### *BELICHTUNG IN ZELLEN*

Zur Photoentschützung von Oligonukleotiden innerhalb von Zellen dient eine Quecksilber Niederdrucklampe von Desaga, Modell *MinUvis*. Die Leistung dieser Lampe bei 366 nm beträgt 4,6 mW/cm<sup>2</sup>.



**Abb. 77** Spektrum der eingesetzten Desaga UV-Lampe aufgenommen mit einem kalibrierten USB4000 Spektrometer der Firma *Ocean Optics*.

Die Zellen werden in den well-Platten unmittelbar unter der Lampe in der Sterilwerkbank platziert und standardmäßig 4 Stunden nach der Transfektion für 40 min belichtet. Um eine Kontamination zu vermeiden, bleibt der Deckel der well-Platten geschlossen, dieser ist für UV-Licht der Wellenlänge 366 nm nahezu vollständig durchlässig.

##### *BELICHTUNG IN (KONFOKAL-)MIKROSKOPIEN*

Für Experimente im Konfokalmikroskop steht kein Laser mit einer Wellenlänge von 366 nm zur Verfügung. Ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 405 nm, entsprechend seiner Hauptanwendung auch Dapi-Laser genannt, gehört jedoch meist zur Standardausstattung. NPP und NPE-Schutzgruppen auf Nukleobasen lassen sich auch bei dieser Wellenlänge in für die durchgeführten Experimente ausreichendem Maße entschützen. Je nach System und Leistung des verwendeten Lasers, ist eine unterschiedlich lange Belichtungszeit notwendig, um die Oligonukleotide annähernd vollständig zu entschützen. Mit einem Argonlaser, der eine Nennleistung von 25 mW erbringt, kann bei voller Leistung in weniger als einer Minute eine nahezu komplette Entschützung der o.g. Schutzgruppen beobachtet werden.

UV-BELICHTUNGSBOX

Für alle Entschützungsexperimente, die nicht mit der Handlampe oder im Konfokalmikroskop durchgeführt werden, wird eine speziell angefertigte UV-LED-Belichtungsapparatur verwendet. Kern dieses Apparates sind 3 UV-LEDs, welche die Probe von unten, von der Seite und/oder von oben mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm bestrahlen.

In der Standardeinstellung werden alle drei LEDs gleichzeitig bei einem Betriebsstrom von 0,5 A eingesetzt und die Probe für 3 min belichtet. Die Leistung bei 0,5 A beträgt etwa 100 mW.

Die Proben werden in unterschiedlicher Konzentration, in den meisten Fällen in 1 x PBS, bei pH 7,4 bestrahlt, um möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren. Abweichende Puffersysteme und Einstellungen am Gerät werden explizit erwähnt.

**4.2.6. Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden**

Zur Quantifizierung von Oligonukleotiden wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels UV-Spektrometrie bestimmt (Evolution 300, Thermo Fisher Scientific Inc.). Hierfür gilt das *Lambert-Beersche* Gesetz:

$$c = \frac{OD_{260}}{d \times \epsilon}$$

mit

c = Konzentration der DNA [mol/L]

OD<sub>260</sub> = Extinktion bei 260 nm

ε = Extinktionskoeffizient in [L\*<sup>mol</sup><sup>-1</sup>\*cm<sup>-1</sup>]

d = Schichtdicke [cm]

Die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide, welche für die Berechnung des Gesamttextinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden herangezogen werden, sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Eine Abweichung des Extinktionskoeffizienten photolabil geschützter Nukleotide wird als nicht relevant erachtet und vernachlässigt.

**Tab. 7 Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Nukleotide.**

| Base | Extinktionskoeffizient [l·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ] |
|------|---|
| dA   | 15.400  |
| dG   | 13.700  |
| dC   | 9.000   |
| dT   | 10.000  |
| A    | 15.200  |
| G    | 12.000  |
| C    | 7050  |
| T    | 8400  |

#### 4.2.7. Fluoreszenzmarkierung

Sequenzen die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzmarker versehen werden sollen, werden mit einer Aminofunktion synthetisiert, die über einen C<sub>6</sub>-Linker und ein Phosphat mit dem 5'-Ende des Oligonukleotids verbunden sind.

Zunächst wird die Oligonukleotidprobe entsalzen. Hierzu wird eine *G25-Microspin-Säule (GE Amersham)* verwendet, die zuvor durch dreimaliges Waschen mit Wasser konditioniert wird. Zur Markierung mit Cy3 wird ein CyDye -Labeling Kit der Firma *GE Amersham* verwendet. Ca. 10 nmol der entsalzenen Probe in 50 µl frisch angesetztem 0,5 M Bicarbonatpuffer bei pH 8,7 werden in ein Reaktionsgefäß mit 40 nmol Markierungsreagenz gegeben und 90 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 40 µl 1 M Tris·HCl, pH 8 abgebrochen. Die Abtrennung von überschüssigem Reagenz erfolgt über eine NAP5 G25-Säule (*GE Amersham*), die zuvor mit 20 % Ethanol aq. konditioniert wird. Als Eluent dient ebenfalls eine 20 %ige wässrige Ethanollösung. Die abschließende Aufreinigung erfolgt per RP-HPLC.

#### 4.2.8. Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte von Oligonukleotiden werden auf zwei verschiedene Arten bestimmt. Zum einen an einem UV-Spektrometer anhand der Absorptionsunterschiede zwischen einzel- und doppelsträngigen Oligonukleotiden. Zum anderen über die Änderung der Fluoreszenzintensität eines Interkalators.

##### UV-SPEKTROMETER

Die Schmelzkurven werden in einem UV-Spektrometer *Evolution 300* der Firma ThermoFisher oder einem *Cary 1* der Firma *Varian* aufgezeichnet. Das *Evolution 300* verfügt im Gegensatz zum *Cary 1* nicht nur über einen Temperaturfühler im Heizblock sondern auch über einen solchen direkt in der Probenlösung. Da die Blocktemperatur von der Temperatur der Probe stark abweichen kann, sind die Absolutwerte des *Evolution 300* genauer und können sich von denen am *Cary 1* gemessenen unterscheiden. Zudem hat sowohl die Salzkonzentration in der Oligonukleotidlösung, als auch die Konzentration der Oligonukleotide selber einen Einfluss auf den absoluten Schmelzpunkt. Daher wird stets eine 1 µM Oligonukleotidlösung in 1 x PBS, pH 7,4 vermessen. D.h. für den Fall einer intermolekularen Schmelzpunktbestimmung zwischen zwei verschiedenen Oligonukleotiden werden diese jeweils in 0,5 µM Konzentration eingesetzt.

Die Kurven werden in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 80 °C aufgezeichnet. Um die hohen Temperaturen in der Probenlösung zu erreichen wird als obere Blocktemperatur beim *Cary 1* 95 °C gewählt. Die Erhitzungsrate wird auf 1 °C/ min festgelegt, wobei die jeweiligen Zwischentemperaturen (1 °C-Schritte) nach Erreichen für 10 sec gehalten werden. Ein festes

Verschließen der Probengefäße ist wichtig, um ein Verdampfen der Probe welches zu einer Aufkonzentration der Oligonukleotide und damit zu einer Verfälschung der Messwerte führt, zu verhindern.

#### *REAL TIME-PCR-CYCLER*

Im Anschluss an eine real time PCR können die entsprechenden Geräte eine Schmelzpunktbestimmung durchführen, um festzustellen, ob sich ein oder mehrere Amplifikate gebildet haben. Dies geschieht über die Messung der Fluoreszenzintensität eines Interkalators. Diese ist im Falle der Interkalation an einen Doppelstrang um ein Vielfaches höher, als bei der Bindung an einen Einzelstrang. Da auch ein Interkalator die Schmelztemperatur eines Oligonukleotids beeinflusst – sie wird konzentrationsabhängig zu höheren Werten verschoben – sind die so ermittelten Werte nicht absolut, sondern können nur bei gegebener Konzentration von Oligonukleotid und Interkalator relativ zueinander verglichen werden. Der Vorteil einer Schmelzpunktbestimmung mit dieser Methode im Vergleich zu der Bestimmung mittels UV-Spektroskopie liegt hier im Multiwellansatz. Es können bis zu 96 Proben gleichzeitig vermessen werden, während im UV-Spektrometer stets eine Probe nach der anderen bearbeitet wird.

Die im Multiwellansatz aufgenommenen Schmelzkurven werden an einem *MyiQ iCycler* der Firma *Biorad* gemessen. Als Interkalator wird *PicoGreen® (Invitrogen)* verwendet. Die Vorratslösung *PicoGreen®* wird, anders als in der Gebrauchsanleitung angegeben, mit 1 x PBS im Verhältnis 1:200 verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 20 µl pro Probe eingesetzt. Das Probengesamtvolumen sind 50 µl wobei die Endkonzentration von Ziel-RNA und *molecular beacon* jeweils 15 µM beträgt. Die Proben werden für eine Minute auf 90 °C erhitzt, anschließend erfolgt in 20-facher Wiederholung eine Abkühlung auf 20 °C während die Fluoreszenzintensität aufgezeichnet wird. Der Temperaturgradient beträgt 0,5 °C pro 12 sec. Zur Auswertung der Schmelzkurven wurde die zugehörige *MyiQ* Software verwendet.

#### **4.2.9. CD-Spektroskopie**

CD-Spektren wurden mit einem J-715 CD-Spektrometer der Firma *Jasco* aufgenommen, jeweils 6-fach akkumuliert und pufferkorrigiert. Zur Messung wurden Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 5 µM in 1 x TEAA-Puffer eingesetzt.



### 4.3. Molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1. *Molecular beacon Assays*

##### FLUORESZENZASSAY IN LÖSUNG

*Molecular beacon* und Ziel-RNA werden getrennt voneinander in der gleichen Menge an Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt und dann in schwarzen 96 well-Platten der Fa. Greiner zusammengegeben. Sofern nicht anders angegeben, beträgt das Volumen jeweils 50 µl, sodass ein Endvolumen von 100 µl pro well erreicht wird. Die MB-Lösung wird vor Verwendung auf 80 °C erhitzt und dann zur Hybridisierung auf RT abkühlen lassen. Belichtungsexperimente werden immer mit der UV-LED-Box und sofern nicht anders beschrieben unter Standardbedingungen (s. Abschn. „Belichtung“) und in Puffer ausgeführt.

β-Aktin MB: Als Puffer wird Tris·HCl, 20 mM, pH 8 verwendet. Die Endkonzentration der Oligonukleotide beträgt 50 nM für den MB und 250 nM für die Ziel-RNA. Sofern MgCl<sub>2</sub> zugesetzt wird, wird dies in der Beschreibung des jeweiligen Experiments explizit erwähnt.

GAPDH-MB: Als Puffer wird 1x PBS-Puffer bei pH 7,4 verwendet. Die Endkonzentration des *molecular beacon* variiert zwischen 50 nM und 1 µM, die Konzentration der Ziel-RNA beträgt stets 2 µM. Die verwendete 96 well-Platte wird auf 37 °C vorgewärmt. Nach dem Zusammengeben der Lösungen wird die Platte für eine Minute bei 500 rpm und 37 °C geschüttelt, um eine gleichmäßige Durchmischung beider Komponenten zu erzielen. Insbesondere bei geringeren Volumina als 100 µl hilft dies auch, den Boden der *wells* gleichmäßig zu benetzen. MgCl<sub>2</sub> wird nicht zugesetzt.

Der Fluoreszenzreadout erfolgt mit einem Infinite 200 Plattenlesegerät der Firma *Tecan*. Die Exzitation- und Emissionswellenlängen für die verschiedenen Fluorophore sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

**Tab. 8 Anregungs - und Emissionswellenlänge der verwendeten Fluorophore.**

| Fluorophor | λ Exzitation [nm] | λ Emission [nm] |
|------------|-------------------|-----------------|
| Cy3        | 545               | 580             |
| FAM        | 480               | 520             |
| R6G        | 520               | 560             |

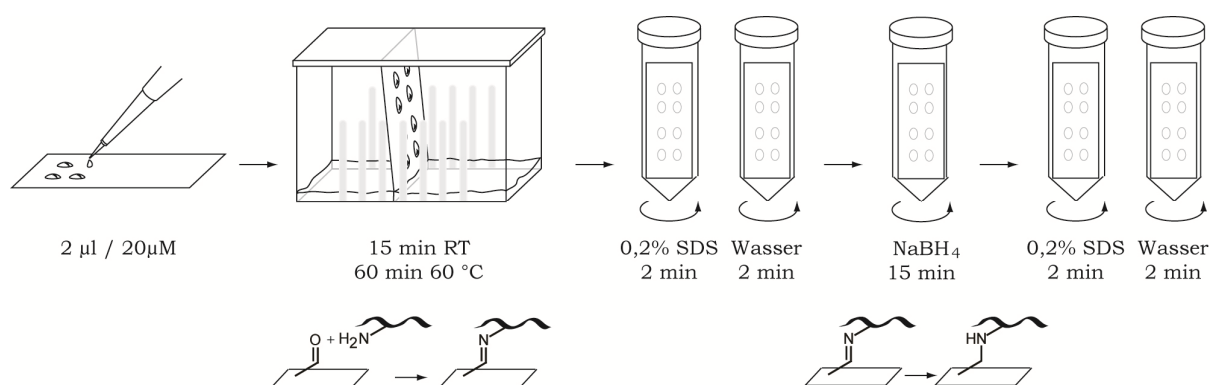
Da die Bandbreite bei dem benutzen Gerät feststehend ist, erfolgten Anregung und Detektion nicht immer bei den spektralen Maxima, um sicher auszuschließen, dass Anregungslicht mit detektiert wird. Die Bandbreite beträgt 20 nm für die Anregungswellenlängen und 9 nm für die emittierte Wellenlänge.

Der Parameter „Verstärkung“ wurde nicht manuell festgesetzt, sondern durch die Auswahl „optimal“ durch das Gerät für jede Messung automatisch optimiert, sodass der Bereich zwischen minimal- und maximal detektierbarer Intensität voll ausgenutzt werden konnte.

Zu beachten ist, dass daher die absoluten Messwerte nicht miteinander verglichen werden können. Die „Anzahl der Blitze“ lag bei 25, die Emission wurde, wie bei intransparenten Platten nicht anders möglich, von oben (Einstellung „top“) detektiert.

#### IMMOBILISIERUNG VON ZIEL-RNA

Die Immobilisierung von Ziel-RNA auf einer Objektträgeroberfläche erfolgt auf den aldehydmodifizierten Objektträgern *Nexterion® slide AL* der Firma Schott. Diese sind, einmal angebrochen unter Argon bei  $-20\text{ °C}$ , nur wenige Wochen stabil. Zur Immobilisierung wird unmodifizierte Ziel-RNA verwendet. Diese wird auf eine Endkonzentration von  $20\text{ }\mu\text{M}$  im mitgelieferten Spottingpuffer *Nexterion® Spot* verdünnt und pro Spot  $2\text{ }\mu\text{l}$  dieser Lösung aufgetragen. Anschließend inkubieren die Objektträger zuerst 15 min bei Raumtemperatur und nachfolgend 60 min bei  $60\text{ °C}$  in einer Feuchtigkeitskammer. Hierzu wird ein mit Parafilm versiegelter Färbetank benutzt, dessen Boden mit etwas gesättigter Natriumchloridlösung bedeckt ist. Nach der Inkubation wird die Spottinglösung abgespült, indem der Objektträger nacheinander jeweils 2 min in 0,2 %iger SDS-Lösung und dann Wasser geschwenkt wird.



**Abb. 78** Fließschema der einzelnen Schritte zur RNA-Immobilisierung auf einem Objektträger.

Um die geknüpften Iminbindungen zu stabileren Aminen zu reduzieren, erfolgt als nächstes ein Reduktionsschritt, bei dem der Objektträger für 15 min in Natriumborhydridlösung ( $0,1\text{ g NaBH}_4$  in  $30\text{ ml } 1\times\text{ PBS} + 10\text{ ml EtOH}$  zur Verminderung der Blasenbildung) eingelegt wird. Es schließen sich dieselben Waschschritte (in SDS und Wasser) an, wie oben beschrieben.

#### FLUORESZENZASSAY MIT IMMOBILISIRTER ZIEL-RNA

Für Fluoreszenzassays mit immobilisierter Ziel-RNA wird diese unmittelbar vor der Verwendung frisch auf einem Objektträger immobilisiert. *Molecular Beacons* werden in einer Konzentration von  $5\text{ }\mu\text{M}$  in  $1\times\text{ PBS}$  eingesetzt. Um eine möglichst blasenfreie, gleichmäßige Verteilung der *molecular beacon*-Lösung unter dem Deckglas ( $18\times 18\text{ mm}$  ohne Absorption bei  $365\text{ nm}$ ) zu gewährleisten, wird dieses erst auf den Objektträger aufgelegt und

anschließend die Lösung seitlich aufpipettiert, sodass diese durch die Adhäsion unter das Deckglas gezogen wird. Um eine Verdunstung der Lösung an den Rändern des Deckglases zu verhindern, werden diese mit einem dünnen Schliff fettfilm versiegelt.

Die Hybridisierung wird mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie abgebildet (Axiovert 200 M, Carl Zeiss). Zur Aufnahme der Bilder wird ein Plan Apochromat Objektiv mit 20-facher Vergrößerung gewählt (NA 0,75, Carl Zeiss). Cy3 wird bei 543 nm von einem He/Ne-Laser (1 mW) mit 80 % der maximal möglichen Leistung angeregt. Bestrahlungskontrollproben werden vor dem Auftragen unter Standardbedingungen (s. Abschn. „Belichtung“) entschützt. Die orts aufgelöste Entschützung erfolgt unter dem Mikroskop mit dem vorhandenen Argon-Diodenlaser (25 mW) bei 405 nm. Die so erhaltenen Bilder können ggf. mit der Leica LAS AF Software bearbeitet werden, z.B. zur Kolorierung oder um einen Maßstab einzufügen.

#### 4.3.2. Gelelektrophorese

##### *POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (PAGE)*

Denaturierende PA-Gele:

Da siRNAs sehr kurz sind und die Trennleistung hoch sein muss, werden zur Analytik hochprozentige Gele verwendet (20 % PA in 1 x TBE). Um die Bildung von Sekundärstrukturen zu unterdrücken und ein einheitliches Laufverhalten gleicher Sequenzen zu erzielen, laufen die Gele unter denaturierenden Bedingungen. Als Laufpuffer wird 1 x TBE eingesetzt. Die Proben werden im Verhältnis 2:1 mit Ladepuffer (1 x TBE mit Formamid) verdünnt und unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel für 1 min bei 80 °C denaturiert.

Das Gel wird zunächst 30 min ohne Beladung bei Zielspannung erwärmt. Um ein möglichst gleichmäßiges Laufen der Banden zu erzielen, wird weitere 30 min Ladepuffer ohne Probe laufen gelassen. Zum selben Zwecke werden bei der anschließenden Trennung die äußeren Geltaschen ebenfalls mit leerem Ladepuffer belegt. Die Trennung erfolgt für ca. 3 h bei 500 V was in etwa 10 W entspricht. Zur Visualisierung der Banden wird das Gel für 1 h in 100 ml 1 x TBE, dem 1 µl SybrGreen zugesetzt wird, eingelegt.

Native PA-Gele:

Für die Analytik der Wechselwirkung von *molecular beacons* und ihrer Ziel-RNA werden native PA-Gele eingesetzt, um die Basenpaarungen zu erhalten. Zudem wird dem Laufpuffer zur Stabilisierung derselben MgCl<sub>2</sub> in 11 mM Konzentration zugesetzt.

Für langsame Elektrophoreseläufe bei niedriger Spannung (18 h bei 60 V) wurden 15 %ige PA-Gele eingesetzt. Für kürzere Läufe über 4 h wird die Leistung auf 8 W erhöht, was in etwa 130 – 160 V entspricht, um eine ausreichende Trennleistung zu erhalten. Zudem wird ein weniger konzentriertes 8 %iges Gel verwendet, damit sich das Gel nicht zu stark

erwärmt, was zu einer Trennung der Doppelstränge führen würde. Aus demselben Grund werden die Laufkammern der nativen Gele im Kühlschrank platziert und der Laufpuffer ebenfalls auf 4 °C vorgekühlt eingesetzt.

Die Auswertung der nativen Gelexperimente erfolgt identisch wie im Falle der denaturierenden Gele.

### **4.3.3. Eukaryontische Zellkultur**

#### *VERWENDETE ZELLINIE*

Zur Untersuchung der siRNA in Zellkultur werden HeLa-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um adhärent wachsende, humane Epithelzellen, die aus einem Cervixkarzinom stammen.

#### *ALLGEMEINER UMGANG MIT ZELLKULTUREN*

Alle Arbeiten mit Zellen werden in einer Sterilwerkbank und unter Verwendung steriler, d.h. autoklavierter oder heißluftsterilisierter Materialien durchgeführt. Jeglicher Zellkulturabfall wird vor der Entsorgung autoklaviert.

Kultiviert werden die Zellen unter den üblichen Bedingungen in einem Begasungsbrutschrank (5 % CO<sub>2</sub>) bei 37 °C und Wasserdampfsättigung. Alle Medien und Puffer werden vor der Verwendung auf 37 °C vorgewärmt.

#### *KULTIVIERUNG UND SUBKULTIVIERUNG DER TUMORZELLINIE*

Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgt in 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen. Als Kulturmedium dient Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und Glutamin.

Die Zellen wachsen als Einzelschicht-Kultur bis zu einer optischen Dichte von ca. 90 % und werden dann subkultiviert (alle 1-3 Tage). Hierzu wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS-Puffer (Dulbecco, ohne Ca/Mg) gewaschen und anschließend zur Ablösung vom Boden für 2-3 min mit 2 ml einer Trypsin/EDTA Lösung (0,5 mg/ ml Trypsin in PBS-Puffer) im Brutschrank inkubiert. Die hierdurch vom Flaschenboden abgelösten Zellen werden mit 8 ml Kulturmedium verdünnt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Je nach gewünschtem Zeitpunkt für eine erneute Subkultivierung (nach 3, 2 oder einem Tag) werden anschließend 1, 2, oder 4 ml davon in eine neue Kulturflasche überführt und mit Kulturmedium auf ca. 40 ml aufgefüllt.

Zum Ausplattieren wird die homogenisierte Zelllösung im Verhältnis 1:13 mit Kulturmedium aufgefüllt und davon je 0,5 ml pro well einer 24 well-Platte bzw. 1 ml pro well einer 12 well-Platte auspipettiert.

#### *TRANSFEKTION VON PLASMIDEN UND siRNA*

Die wie oben beschrieben ausgesäten Zellen werden transfiziert, sobald sie eine optische Konfluenz von ca. 50-80 % erreichen. Dies ist in der Regel nach 18-24 h der Fall.

Als Transfektionsreagenz wird Metafectene (*Biontex*) verwendet. Dabei handelt es sich um ein polykationisches Transfektionsreagenz, welches auf Grund seiner neutralen Kolipidkomponente in liposomaler Form vorliegt. Das Verhältnis von Volumen Metafectene zu der zu transfizierenden Nukleinsäuremenge beträgt für gewöhnlich 4  $\mu$ l/1  $\mu$ g, wobei ein maximal eingesetztes Volumen an Metafectene von 8  $\mu$ l nicht überschritten wird. Standardmäßig werden pro well einer 24 well-Platte 200 ng pEGFP, 400 ng pDsRed und 25 pmol siRNA transfiziert. Werden die Versuche im 12 well-Format durchgeführt, wird die doppelte Menge eingesetzt.

Entsprechend der Arbeitsanleitung des Herstellers für 24 well-Platten (12 well-Platten) werden zunächst für jede Probe zwei Vorratslösungen hergestellt. Die erste Lösung enthält 30  $\mu$ l (60 $\mu$ l) Transfektionsmedium pro well, sowie die zu transfizierenden Oligonukleotide und Plasmide in einem Gesamtvolumen von 2  $\mu$ l (4 $\mu$ l). Die zweite Stocklösung enthält ebenfalls 30  $\mu$ l (60 $\mu$ l) Transfektionsmedium und das entsprechende Volumen an Metafectene. Diese beiden Lösungen werden vereint und 15-30 min bei RT inkubiert. Anschließend werden je 60  $\mu$ l (120 $\mu$ l) des Transfektionsmixes direkt in das Kulturmedium der Proben gegeben und mindestens 3, höchstens 6 Stunden inkubiert. Zum Abbruch der Inkubation wird das Transfektionsmedium nach zweimaligem Waschen mit PBS durch frisches Kulturmedium ersetzt.

#### *ZELLYSE*

Um die Reporterogenaktivität zu untersuchen werden die transfizierten HeLa-Zellen nach 3-48 h geerntet. Dazu wird der Kulturüberstand entfernt und die Zellen zweimal mit ca. 1-2 ml PBS je well gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 200  $\mu$ l 1x Reporter-Lysispuffer (*Promega*) pro well und zweimaligem Einfrieren (-80 °C) und Auftauen lysiert. Um den Lysisüberstand von Zelltrümmern zu befreien, wird dieser in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, wobei sich die festen Bestandteile als Pellet absetzen. Der Überstand wird anschließend abgenommen und zur Quantifizierung der Fluoreszenz herangezogen.



## 5. Anhang

### 5.1. Oligonukleotidsequenzen

#### 5.1.1. siRNA Sequenzen

|             |                            |  |
|-------------|----------------------------|--|
|             | <b>VM058</b>               | 5' - AGC AGA AGA ACG GCA UCA AdTdT - 3'                                  |
|             | <b>VM059</b>               | 5' - UUG AUG CCG UUC UUC UGC UdTdT - 3'                                  |
| <b>I</b>    | <b>VM062</b>               | 5' - AGC AGA AGA ACdG GCA UCA AdTdT - 3'                                 |
| <b>II</b>   | <b>VM063</b>               | 5' - UUG AUG CCdG UUC UUC UGC UdTdT - 3'                                 |
| <b>IV</b>   | <b>VM079</b>               | 5' - AGC AGA AGA ACdG <sup>NPP</sup> GCA UCA AdTdT - 3'                  |
| <b>IX</b>   | <b>VM080</b>               | 5' - UUG AUG CCdG <sup>NPP</sup> UUC UUC UGC UdTdT - 3'                  |
| <b>VI</b>   | <b>VM081</b>               | 5' - AdG <sup>NPPC</sup> AGA AGA ACG GCA UCA AdTdT - 3'                  |
| <b>VII</b>  | <b>VM082</b>               | 5' - UUdG <sup>NPP</sup> AUG CCG UUC UUC UGC UdTdT - 3'                  |
| <b>VIII</b> | <b>VM083</b>               | 5' - AGC AdG <sup>NPPA</sup> AdG <sup>NPPA</sup> ACG GCA UCA AdTdT - 3'  |
| <b>V</b>    | <b>VM084</b>               | 5' - UUG AUdG <sup>NPP</sup> CCG UUC UUC UdG <sup>NPPC</sup> UdTdT - 3'  |
|             | <b>VM104</b>               | 5' - UUG AUG CCG UUC UUC UGC UdT <sup>NPPd</sup> T - 3'                  |
| <b>X</b>    | <b>VM105</b>               | 5' - UUG AUG CCG dT <sup>NPPUC</sup> UUC UGC UdTdT - 3'                  |
|             | <b>VM106</b>               | 5' - UUG AUG CCG UUC UUC dT <sup>NPPGC</sup> UdTdT - 3'                  |
| <b>XI</b>   | <b>VM107</b>               | 5' - UUG AUG CCG UdT <sup>NPPC</sup> UUC UGC UdTdT - 3'                  |
| <b>XII</b>  | <b>VM108</b>               | 5' - UUG AUG CCG dT <sup>NPPd</sup> T <sup>NPPC</sup> UUC UGC UdTdT - 3' |
|             | <b>scramble<br/>siEGFP</b> | 5' - CGA UAU UGU CAG UGC AAU AdTdT - 3'                                  |

|  |   |         |
|--|---|---------|
| <b>caged scramble<br/>siEGFP</b>       | 5' - CGA UAU UGU CAG UGC AAdT <sup>NPP</sup> AdTdT - 3'                                       |         |
| <b>antisense<br/>siEGFP</b>            | 5' - UAU UGC ACU GAC AAU AUC GdTdT - 3'   |         |
| <b>caged anti-<br/>scramble siEGFP</b> | 5' - UAU UGC ACU GAC AAU AdT <sup>NPPC</sup> GdTdT - 3'                                       |         |
| <b>as caged siTK3</b>                  | 5' - UGA AUG GUU dC <sup>NPE</sup> AA GAU AUG* C*U*G* - C <sub>6</sub> - NH <sub>2</sub> - 3' | *2'-OMe |
| <b>ss caged siTK3</b>                  | 5' - GCA UAU CUU dG <sup>NPP</sup> AA CCA UUC* A*U*U* - C <sub>6</sub> - NH <sub>2</sub> - 3' | *2'-OMe |

### 5.1.2. Molecular beacon-Sequenzen

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>MB β-Aktin 1</b>         | 5' - NH <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> - T <sub>20</sub> - FAM - CCC CTA GGA AGG AAG GCT GGA AGA GAG GGG - 3' |
| <b>MB β-Aktin 2</b>         | 5' - R6G - CCG TCG AGG AAG GAA GGC TGG AAG AGC GAC GG - BHQ1 - 3'  |
| <b>MB β-Aktin 3</b>         | 5' - FAM - CCC CTA GGA AGG AAG GCT GGA AGA GAG GGG - 3'  |
| <b>β-Aktin<br/>target</b>   | 5' - CUC UUC CAG CCU UCC UUC CU - 3' (RNA)   |
| <b>VM186</b>                | 5' - R6G - CCG TCG AGG AAG <sup>NPP</sup> GAA GGC TGG <sup>NPP</sup> AAG AGC GAC GG - BHQ1 - 3'              |
| <b>VM187</b>                | 5' - R6G - CCG TCG AGG AAG GAA GG <sup>NPPC</sup> TGG AAG AGC GAC GG - BHQ1 - 3'                             |
| <b>VM188</b>                | 5' - R6G - CCG TCG AGG AAG GAA G <sup>NPPG</sup> <sup>NPPC</sup> TGG AAG AGC GAC GG - BHQ1 - 3'              |
| <b>VM189</b>                | 5' - R6G - CCG TCG AGG AAG GAA GGC TG <sup>NPPG</sup> AAG AGC GAC GG - BHQ1 - 3'                             |
| <b>VM199OFQ</b>             | 5' - CCG TCG AGG AAG <sup>NPP</sup> GAA G <sup>NPPG</sup> C TG <sup>NPPG</sup> AAG AGC GAC GG - 3'           |
| <b>VM186OFQ</b>             | 5' - CCG TCG AGG AAG <sup>NPP</sup> GAA GGC TGG <sup>NPP</sup> AAG AGC GAC GG - 3'                           |
| <b>VM188OFQ</b>             | 5' - CCG TCG AGG AAG GAA G <sup>NPPG</sup> <sup>NPPC</sup> TGG AAG AGC GAC GG - 3'                           |
| <b>MB β-Aktin 2<br/>OFQ</b> | 5' - CCG TCG AGG AAG GAA GGC TGG AAG AGC GAC GG - 3'   |
| <b>VM188OF</b>              | 5' - CCG TCG AGG AAG GAA G <sup>NPPG</sup> <sup>NPPC</sup> TGG AAG AGC GAC GG - BHQ1 - 3'                    |
| <b>VM188OQ</b>              | 5' - R6G - CCG TCG AGG AAG GAA G <sup>NPPG</sup> <sup>NPPC</sup> TGG AAG AGC GAC GG - 3'                     |



|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b>VM186OF</b>               | 5'- CCG TCG AGG AAG <sup>NPP</sup> GAA GGC TGG <sup>NPP</sup> AAG AGC GAC GG - BHQ1 - 3'                      |
| <b>MB GAPDH</b>              | 5' - Cy3 - CGA CGG AGT CCT TCC ACG ATA CCA CGT CG - BHQ2 - 3'   |
| <b>MB GAPDH OFQ</b>          | 5'- CGA CGG AGT CCT TCC ACG ATA CCA CGT CG - 3'   |
| <b>GAPDH target</b>          | 5' - UGG UAU CGU GGA AGG ACU C - 3' (RNA)   |
| <b>GAPDH scramble target</b> | 5' - ACA UGG UGA GCU UGU GCA G - 3' (RNA)   |
| <b>VM214</b>                 | 5' - Cy3 - CGA CGG AGT C <sup>NPP</sup> CT TCC AC <sup>NPP</sup> G ATA CCA CGT CG - BHQ2 - 3'                 |
| <b>VM284</b>                 | 5'- CGA CGG AGT CC <sup>NPP</sup> T TCC AC <sup>NPP</sup> G ATA CCA CGT CG - 3'                               |
| <b>VM215</b>                 | 5' - Cy3 - CGA CGG AGT CCT TCC <sup>NPP</sup> ACG ATA CCA CGT CG - BHQ2 - 3'                                  |
| <b>VM285</b>                 | 5'- CGA CGG AGT CCT TCC <sup>NPP</sup> ACG ATA CCA CGT CG - 3'  |
| <b>VM216</b>                 | 5' - Cy3 - CGA CGG AGT CC <sup>NPP</sup> T TC <sup>NPP</sup> C AC <sup>NPP</sup> G ATA CCA CGT CG - BHQ2 - 3' |
| <b>VM286</b>                 | 5'- CGA CGG AGT CC <sup>NPP</sup> T TC <sup>NPP</sup> C AC <sup>NPP</sup> G ATA CCA CGT CG - 3'               |
| <b>VM217</b>                 | 5' - Cy3 - CGA CGG AGT CC <sup>NPP</sup> T TC <sup>NPP</sup> C ACG ATA CCA CGT CG - BHQ2 - 3'                 |
| <b>VM287</b>                 | 5'- CGA CGG AGT CC <sup>NPP</sup> T TC <sup>NPP</sup> C ACG ATA CCA CGT CG - 3'                               |
| <b>VM2361</b>                | 5' - GAG TCC TTC CAC GAT ACC A - 3'   |
| <b>GAPDH target1</b>         | 5' - TGG TAT CGT GGA AGG ACT A - 3' (DNA)   |
| <b>VM2161</b>                | 5' - GAG TC <sup>NPE</sup> C TTC <sup>NPE</sup> CAC <sup>NPE</sup> GAT ACC A - 3'                             |
| <b>VM2381</b>                | 5' - GAG TC <sup>NPE</sup> C TTC <sup>NPE</sup> CAC G <sup>NPP</sup> AT AC <sup>NPE</sup> C A - 3'            |
| <b>VM2391</b>                | 5' - GAG <sup>NPP</sup> TCC TT <sup>NPP</sup> C CAC G <sup>NPP</sup> AT ACC A - 3'                            |
| <b>VM2401</b>                | 5' - GAG <sup>NPP</sup> TCC TT <sup>NPP</sup> C CAC G <sup>NPP</sup> AT AC <sup>NPE</sup> C A - 3'            |
| <b>VM2451</b>                | 5' - GAG TCC TTC CAC GAT ACC A - 3'   |

**VM278** 5' - Cy3 - CGA CGG AG<sup>NPPT</sup> CC<sup>NPET</sup> TC<sup>NPEC</sup> ACG<sup>NPP</sup> ATA CN<sup>PECA</sup> CGT CG - BHQ2 - 3'

**VM270** 5' - CGA CGG AG<sup>NPPT</sup> CC<sup>NPET</sup> TC<sup>NPEC</sup> ACG<sup>NPP</sup> ATA CN<sup>PECA</sup> CGT CG - 3'

**VM279** 5' - Cy3 - CGA CGG AG<sup>NPPT</sup> CC<sup>NPET</sup> TC<sup>NPEC</sup> AN<sup>PECGNPP</sup> ATAN<sup>PE</sup> CC<sup>NPEA</sup> CGT CG -  
BHQ2 - 3'

**VM273** 5' - CGA CGG AG<sup>NPPT</sup> CC<sup>NPET</sup> TC<sup>NPEC</sup> AN<sup>PECGNPP</sup> ATAN<sup>PE</sup> CC<sup>NPEA</sup> CGT CG - 3'

## 5.2. Spektren

### 5.2.1. HPLC-Chromatogramme

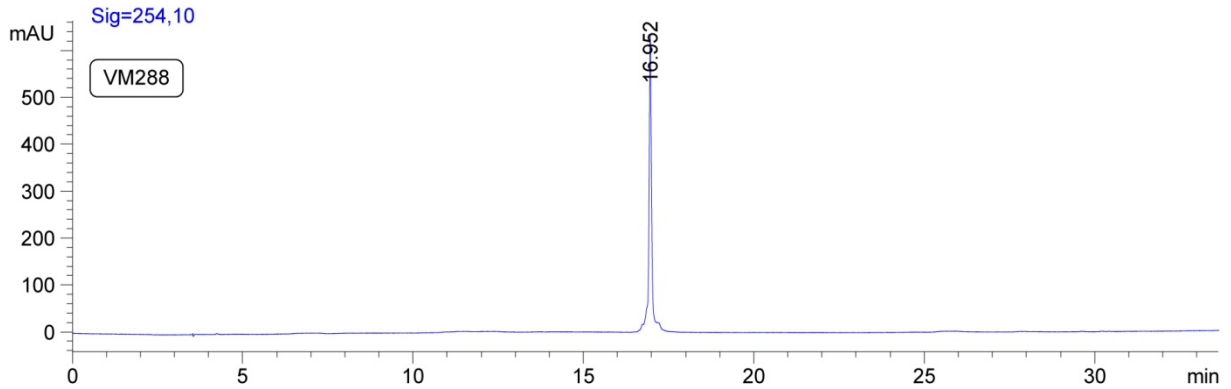


Abb. 79 HPLC-Chromatogramm der unmodifizierten GAPDH-Haarnadel.

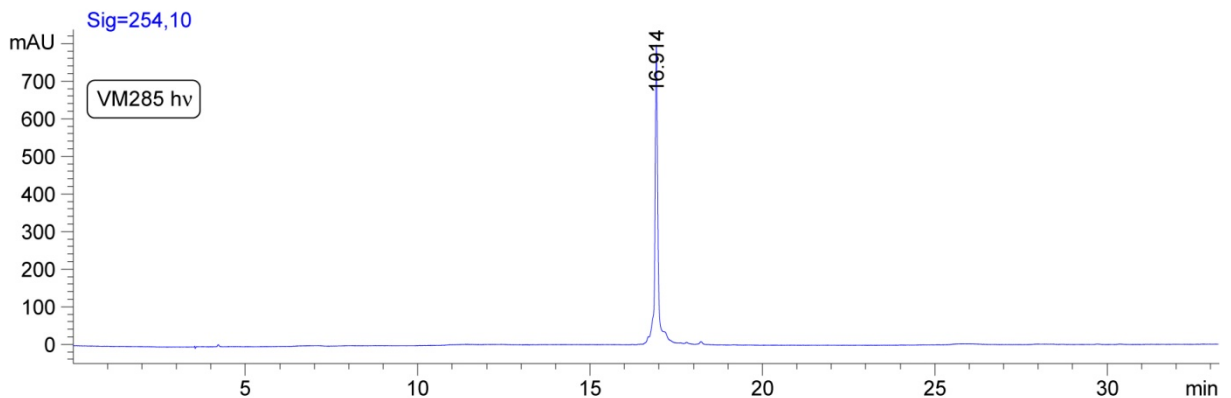
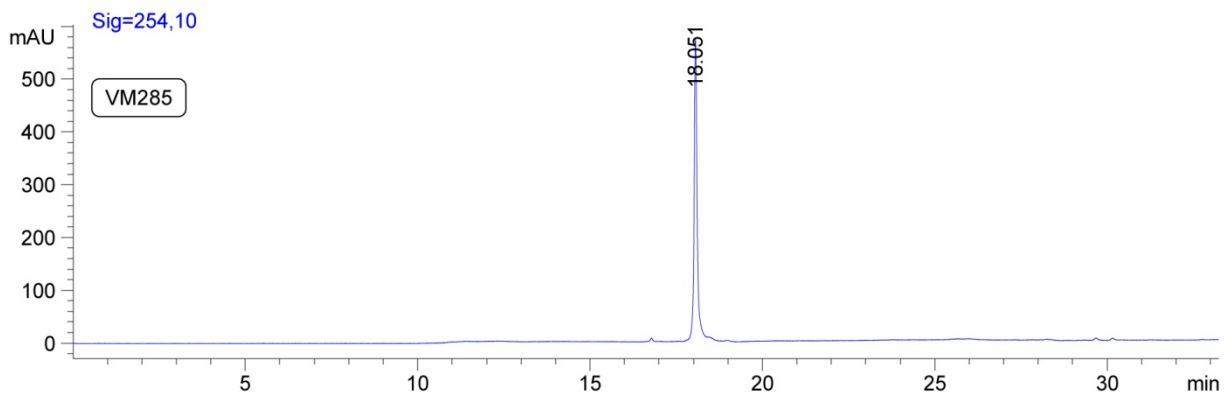
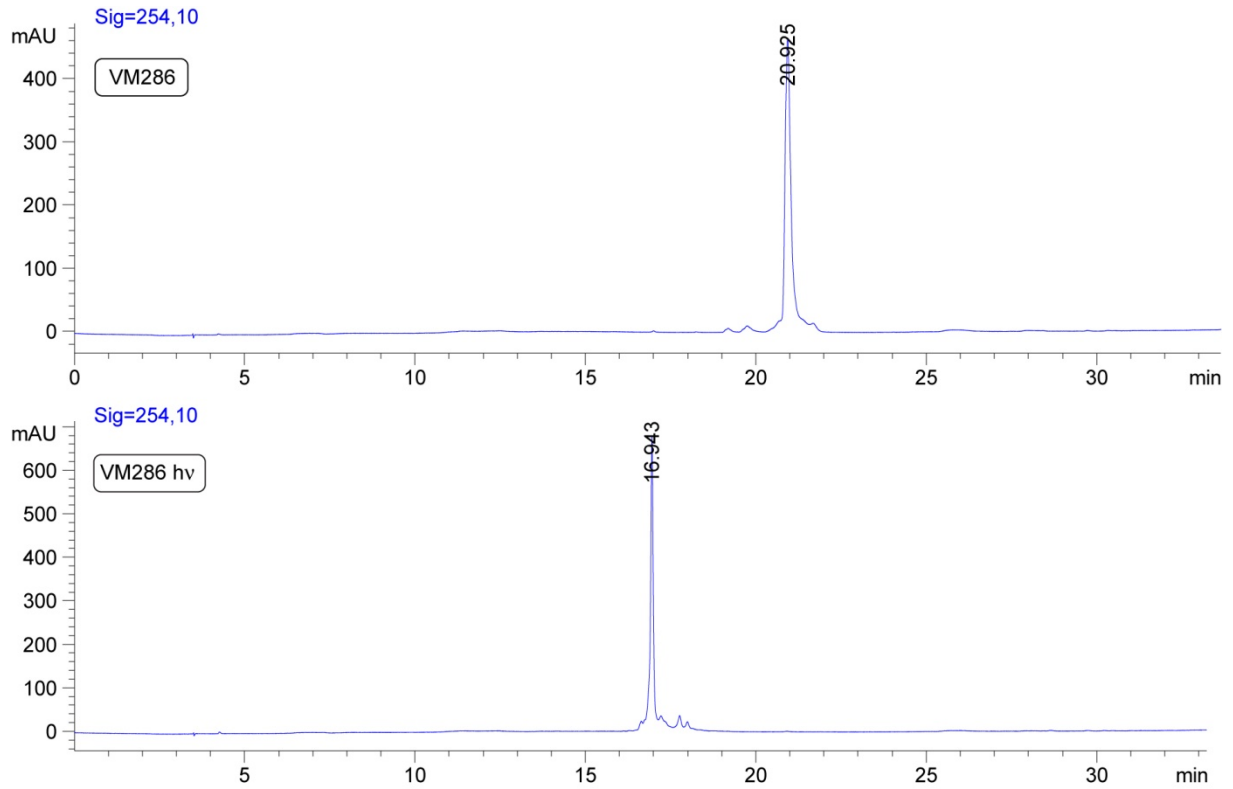
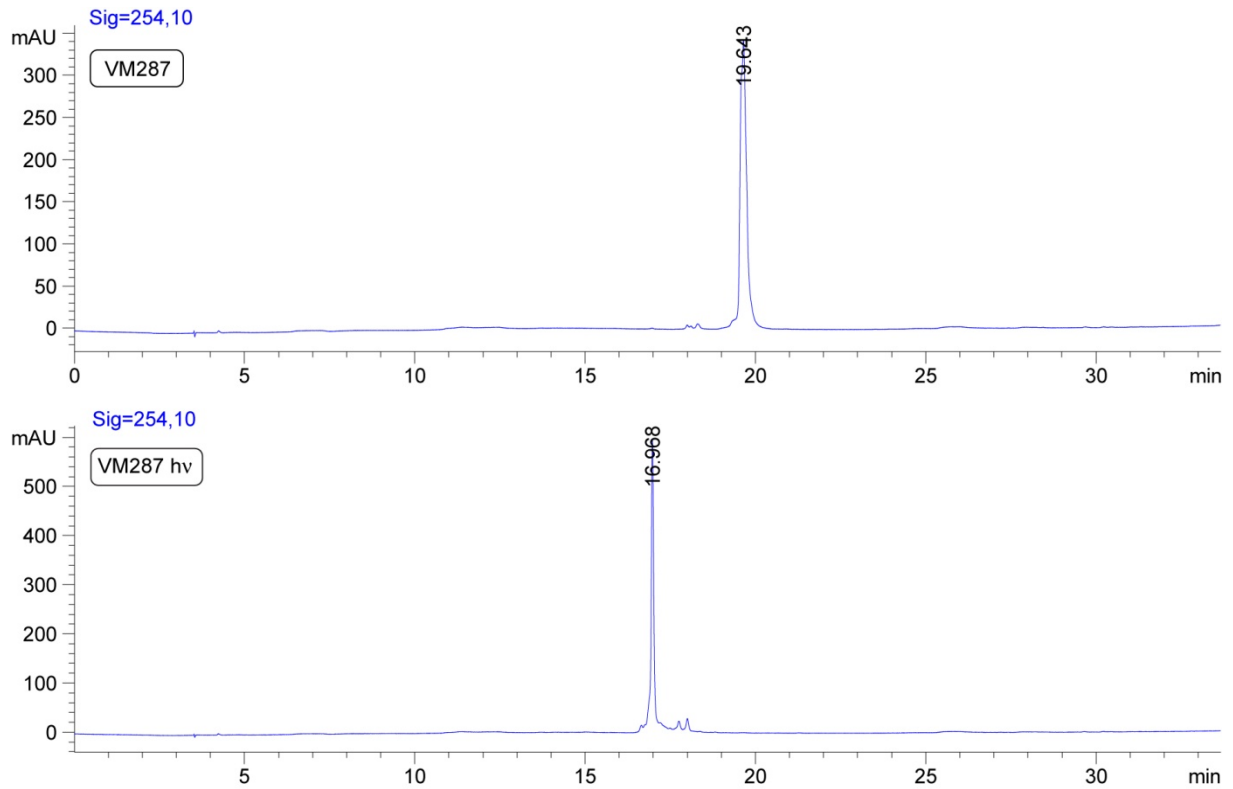


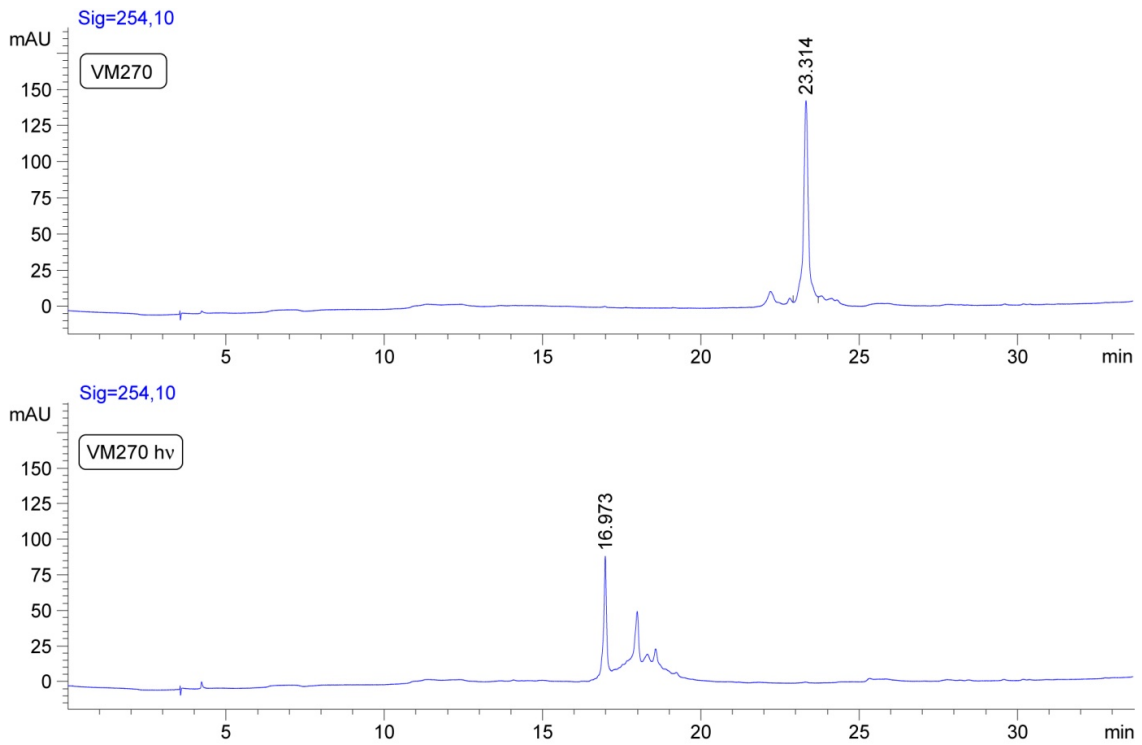
Abb. 80 HPLC-Chromatogramm der einfach photolabil modifizierten GAPDH-Haarnadel VM285 vor und nach der Belichtung.



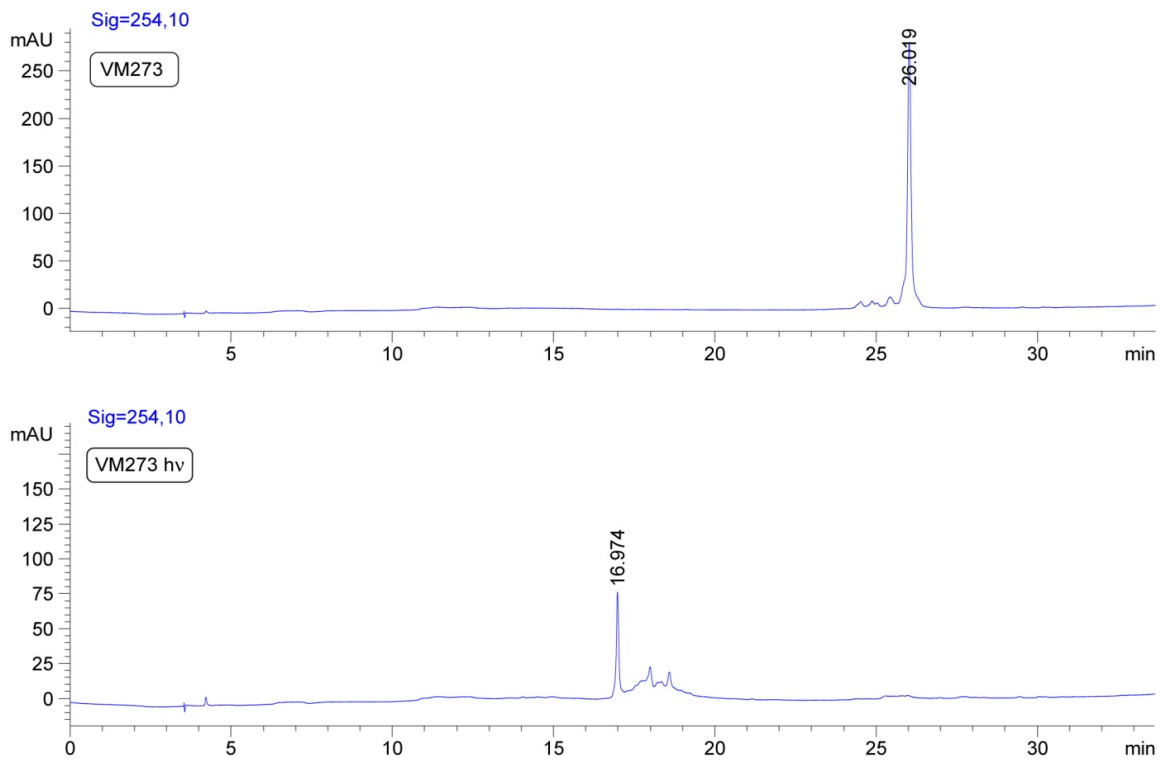
**Abb. 81 HPLC-Chromatogramm der dreifach photolabil modifizierten GAPDH-Haarnadel VM286 vor und nach der Belichtung.**



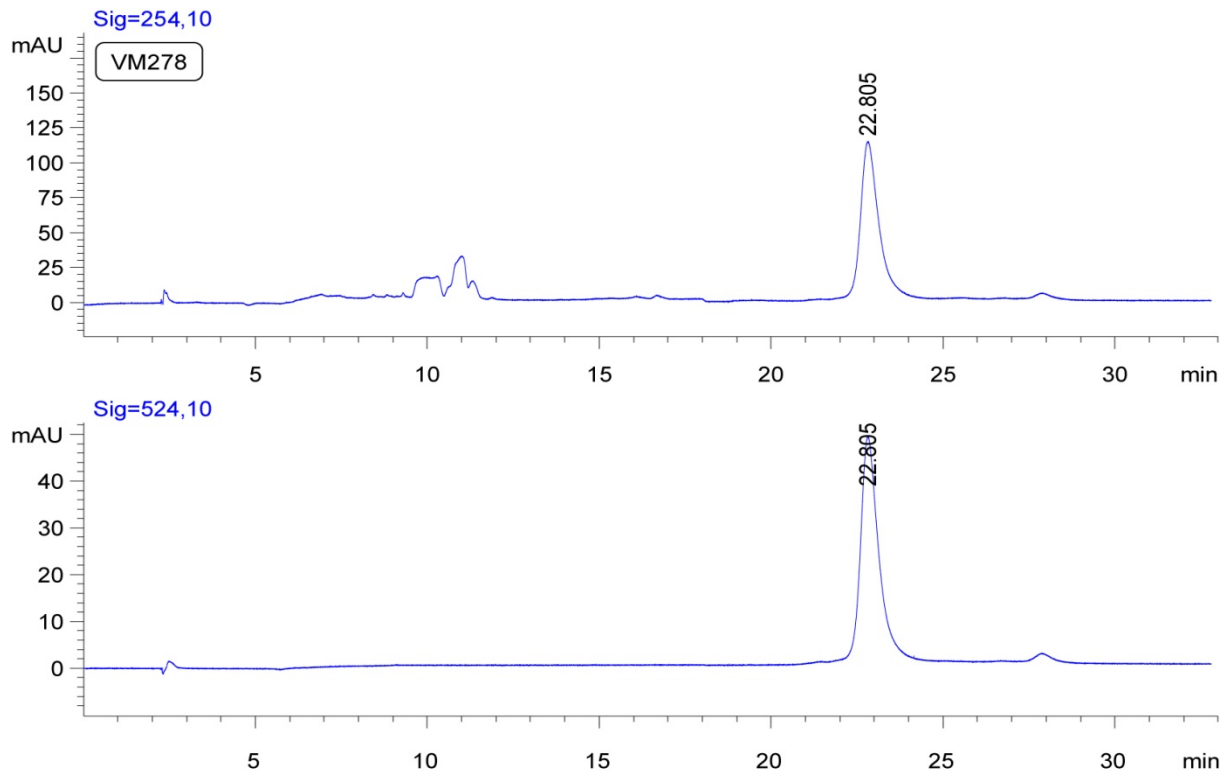
**Abb. 82 HPLC-Chromatogramm der zweifach photolabil modifizierten GAPDH-Haarnadel VM287 vor und nach der Belichtung.**



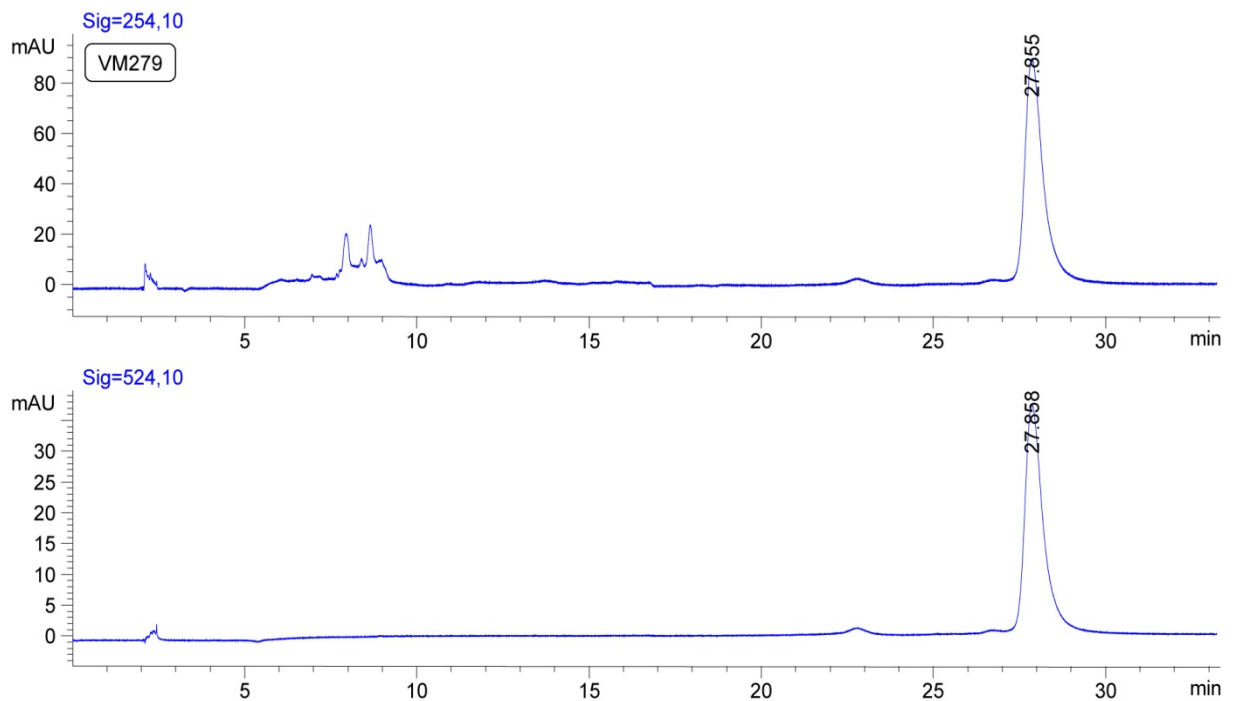
**Abb. 83 HPLC-Chromatogramm der fünffach photolabil modifizierten GAPDH-Haarnadel VM270 vor und nach der Belichtung.**



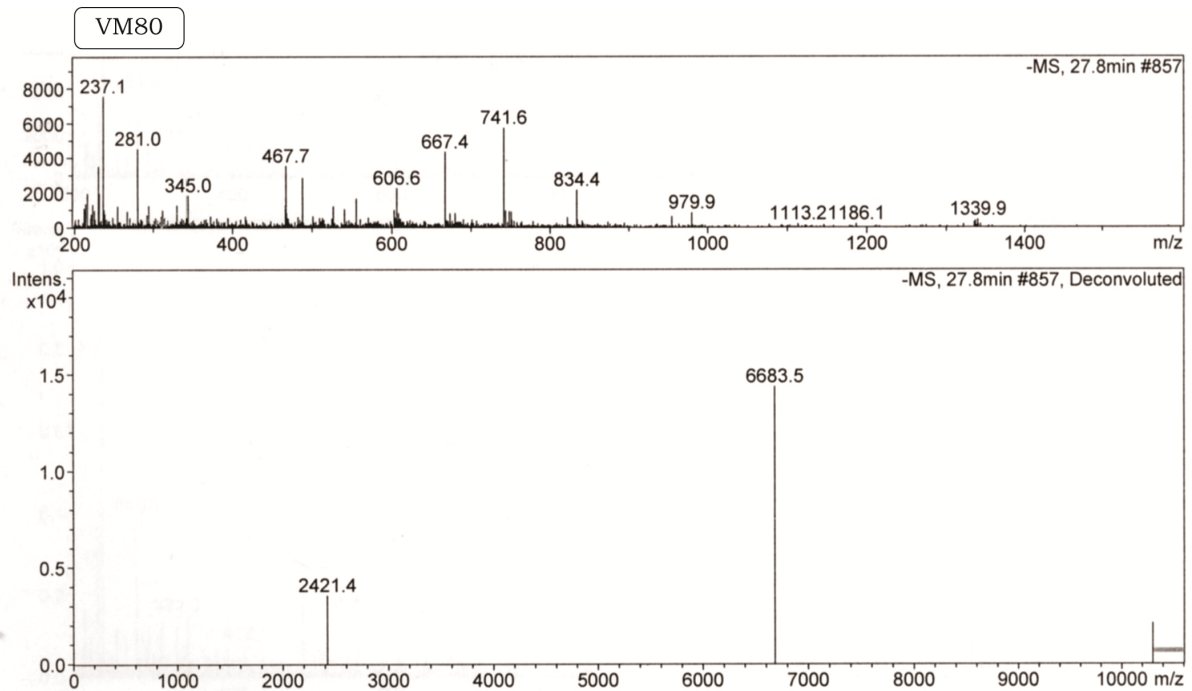
**Abb. 84 HPLC-Chromatogramm der siebenfach photolabil modifizierten GAPDH-Haarnadel VM273 vor und nach der Belichtung.**



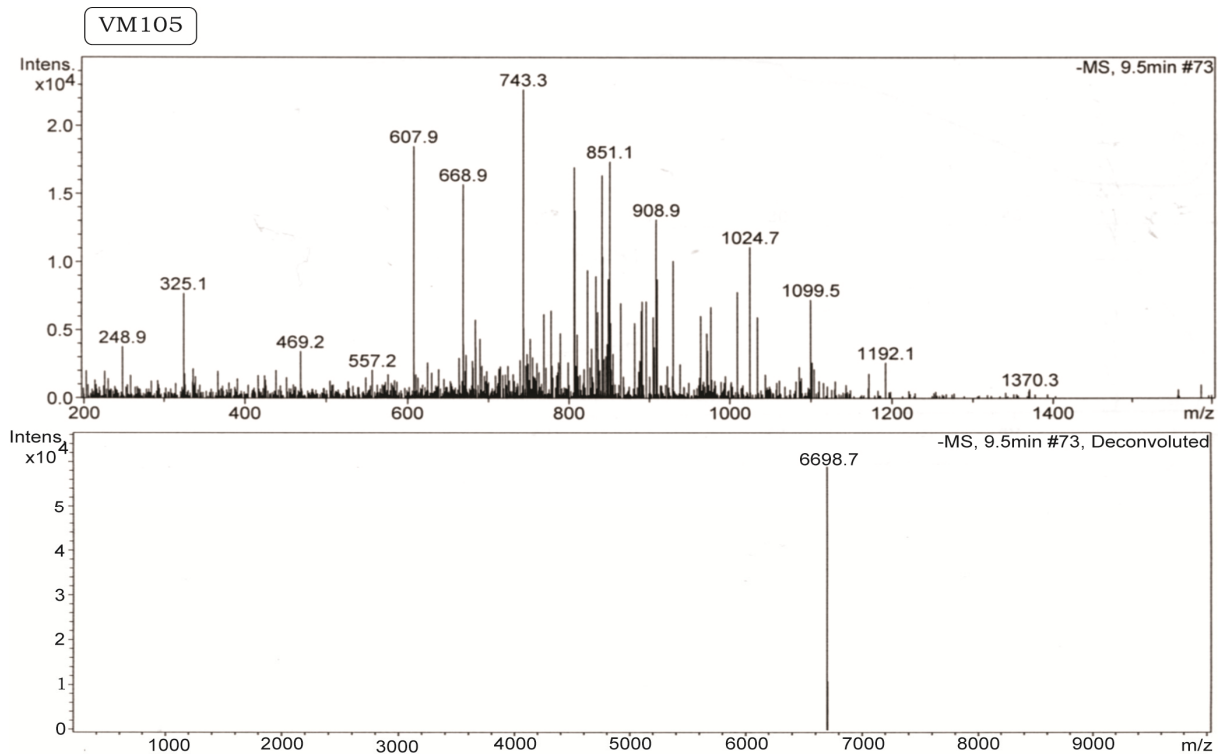
**Abb. 85 HPLC-Chromatogramm des fünffach photolabil modifizierten GAPDH-MB VM278, detektiert bei zwei verschiedenen Wellenlängen: 254 nm (DNA-Absorption), 542 nm (Cy3-Absorption).**



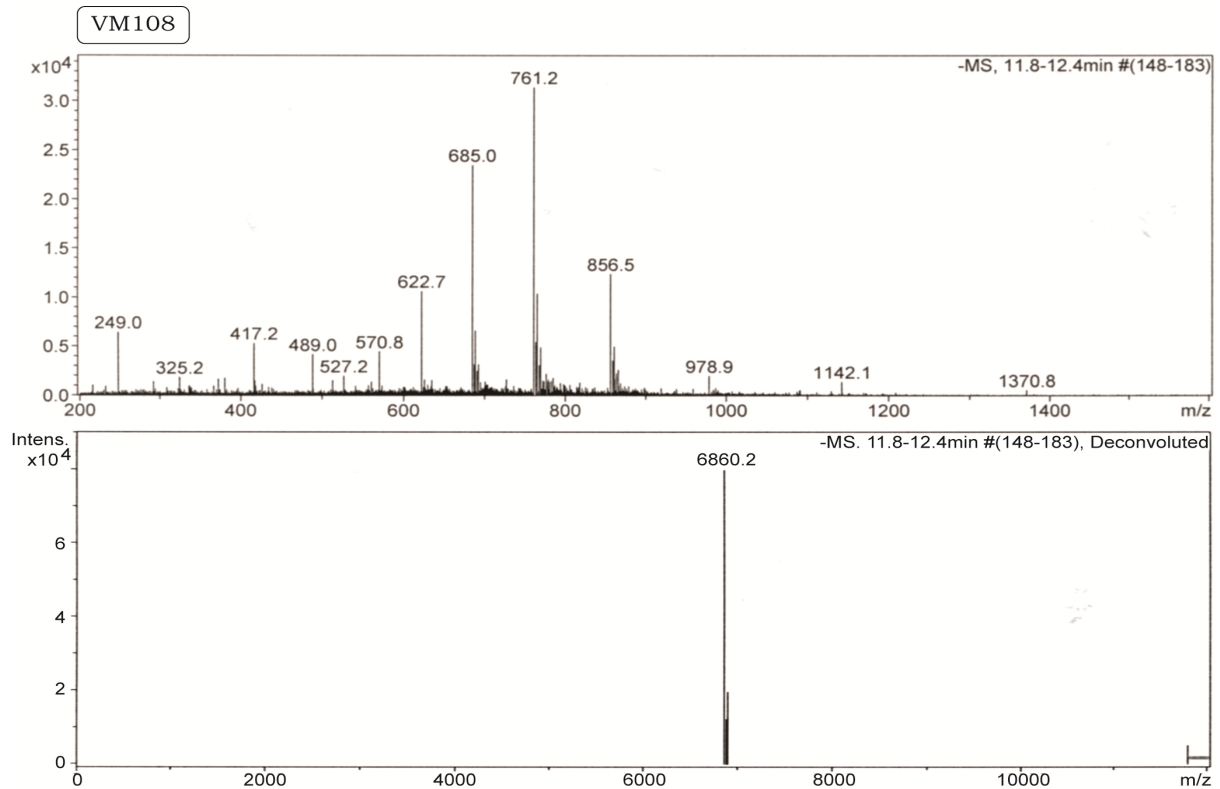
**Abb. 86 HPLC-Chromatogramm des siebenfach photolabil modifizierten GAPDH-MB VM279, detektiert bei zwei verschiedenen Wellenlängen: 254 nm (DNA-Absorption), 542 nm (Cy3-Absorption).**

**5.2.2. MS-Spektren (ESI)**

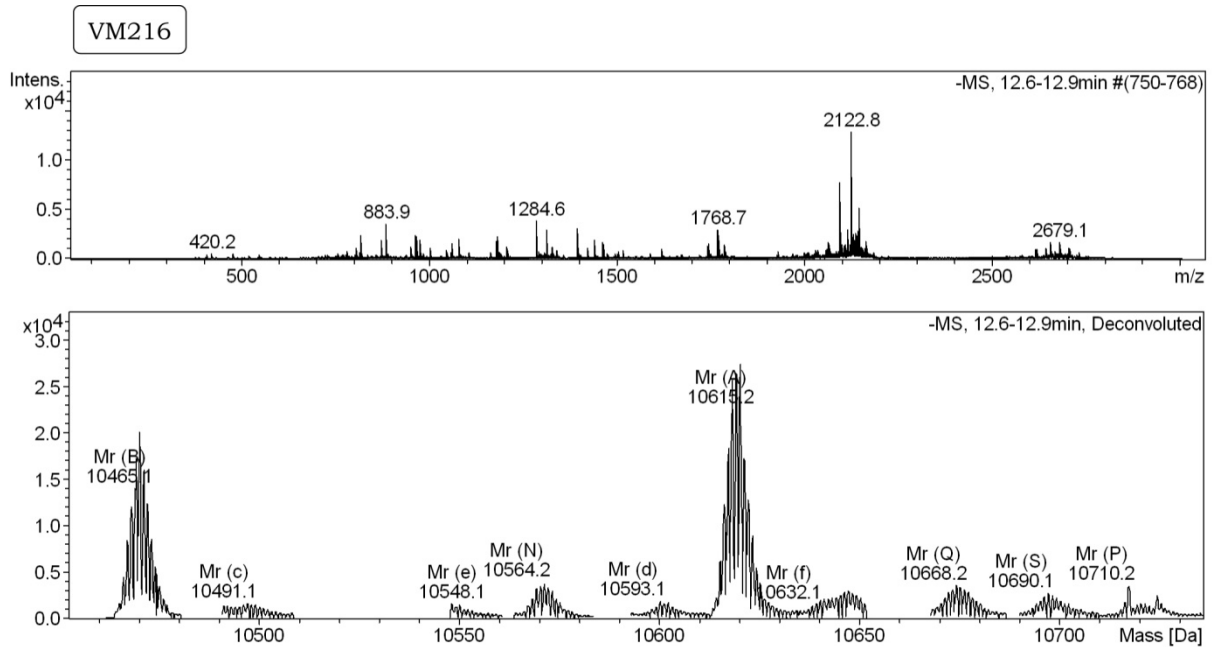
**Abb. 87 LC-MS Spektrum (unten dekonvolutiert) der an Position 9 photolabil modifizierten siRNA VM80 (Seq. XII). Berechnete Masse: 6685,0.**



**Abb. 88 LC-MS Spektrum (unten dekonvolutiert) der an Position 10 photolabil modifizierten siRNA VM105 (Seq. XII). Berechnete Masse: 6699,1.**

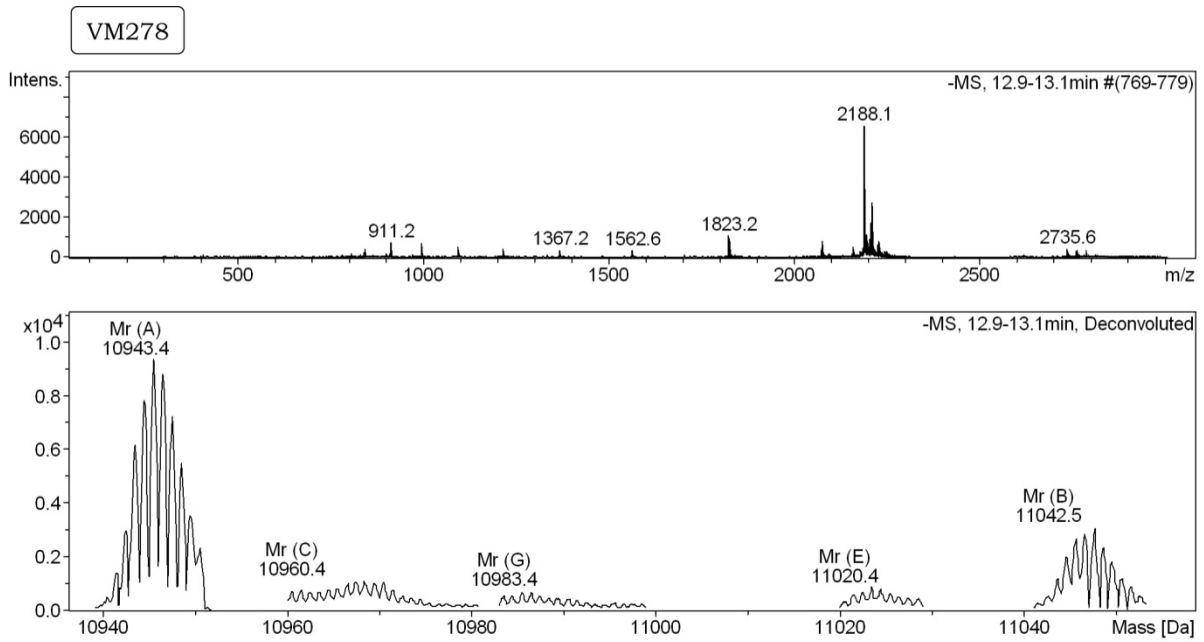


**Abb. 89** LC-MS Spektrum (unten dekonvolviert) der an Position 9 und 11 photolabil modifizierten siRNA VM108 (Seq. XII). Berechnete Masse: 6860,3.

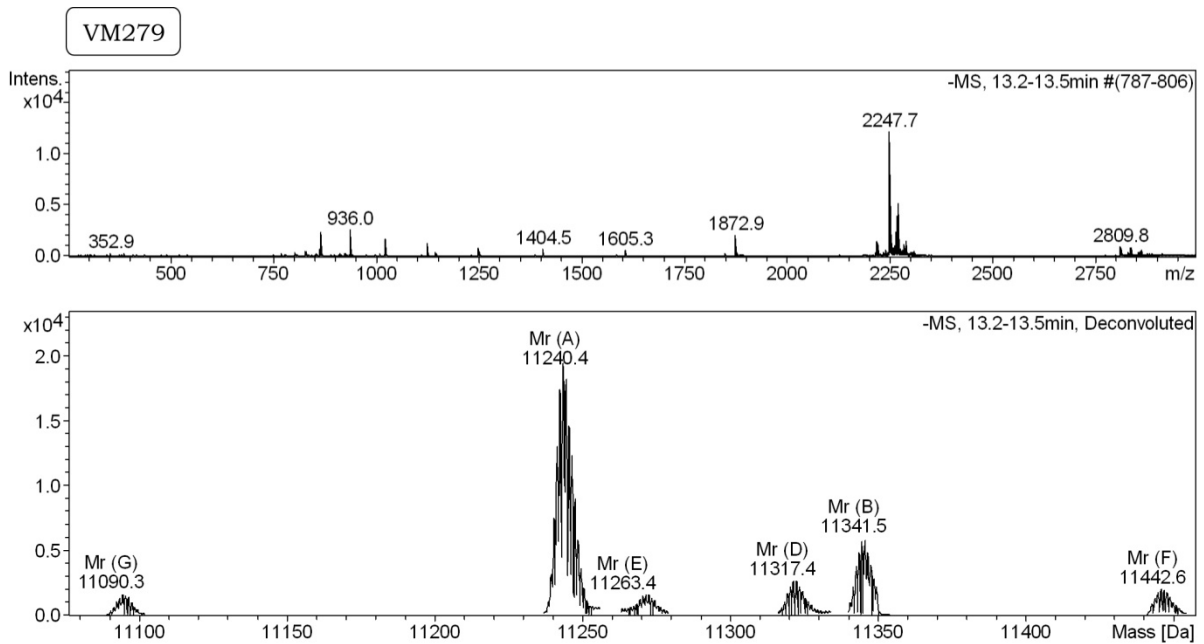


**Abb. 90** LC-MS Spektrum (unten dekonvolviert) des dreifach photolabil geschützten *molecular beacon* VM216. Berechnete Masse: 10615,5.





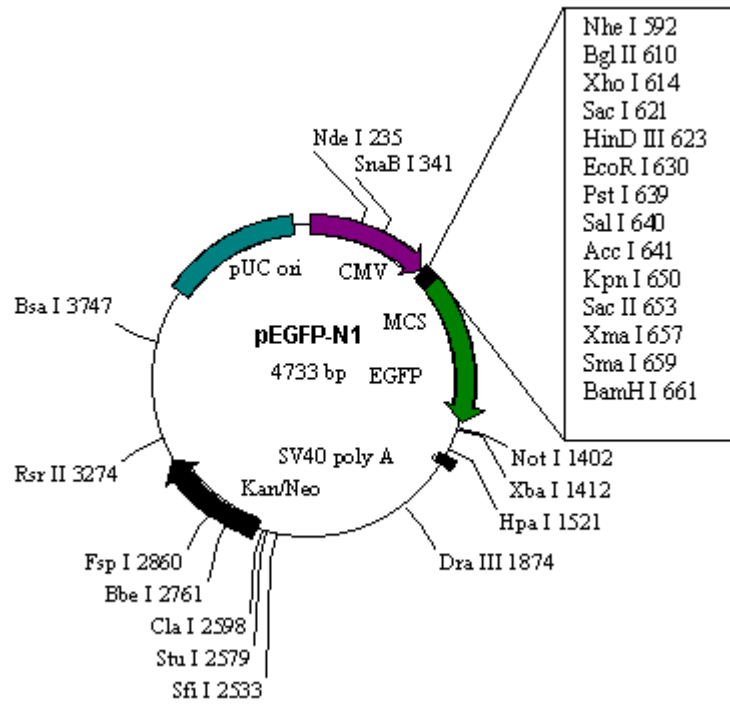
**Abb. 91 LC-MS Spektrum (unten dekonvoluted) des fünffach photolabil geschützten *molecular beacon* VM278. Berechnete Masse: 10942,9.**



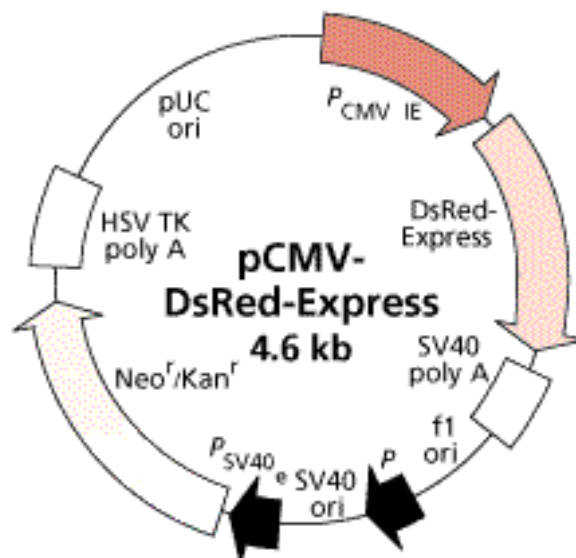
**Abb. 92 LC-MS Spektrum (unten dekonvoluted) des siebenfach photolabil geschützten *molecular beacon* VM279. Berechnete Masse: 11241,2.**

### 5.3. Vektorkarten

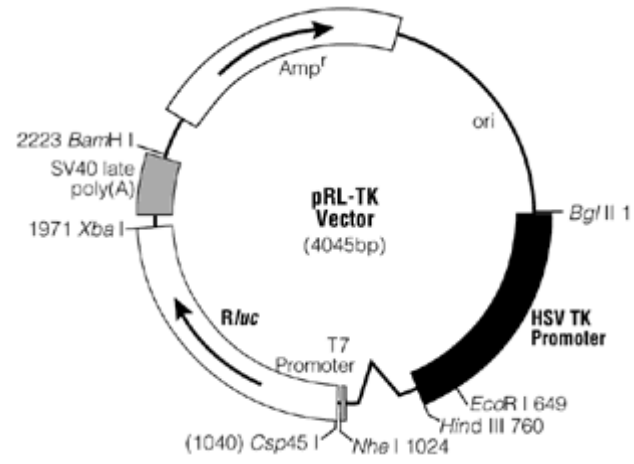
#### 5.3.1. pEGFP-N1



#### 5.3.2. p-CMV-DsRed-Express



### 5.3.3. pRL-TK



## 5.4. Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| A                 | Adenosin   |
| AA                | Ammoniumacetat   |
| Abb.              | Abbildung  |
| abs.              | absolutiert  |
| Ac                | Acetyl   |
| Ac <sub>2</sub> O | Acetanhydrid   |
| AE                | Anionenaustausch   |
| AMA               | Ammoniak-Methylamin                                      |
| AMD               | altersbedingte Makuladegeneration                        |
| aq.               | aqueous/wässrig  |
| ar                | aromatisch   |
| as                | <i>antisense</i>   |
| ASO               | <i>antisense</i> -Oligodesoxynukleotid                   |
| ATP               | Adenosintriphosphat                                      |
| BHQ               | <i>black hole quencher</i>                               |
| bp                | Basenpaare   |
| BTT               | 5-Benzylthio-1 <i>H</i> -tetrazol                        |
| Bz                | Benzoyl  |
| C                 | Cytidin  |
| cAMP              | zyklisches Adenosinmonophosphat                          |
| CE                | Cyanoethyl   |
| cpd               | <i>composite pulse decoupling</i> / Breitbandentkopplung |
| CPG               | <i>controlled pore glass</i>                             |
| CPP               | zellpenetrierende Peptide                                |
| Cy3/5             | <i>cyanine dye 3/5</i>                                   |
| DABCYL            | 4-((4-( <i>dimethylamino</i> )phenyl)azo)benzoesäure     |
| DC                | Dünnschichtchromatographie                               |
| DCA               | Dichloressigsäure  |
| DCM               | Dichlormethan  |
| DIPEA             | Diisopropylethylamin                                     |
| DMEM              | Dulbecco's Modified Eagle Medium                         |
| DMNB              | 4,5-Dimethoxynitrobenzyl                                 |
| DMF               | <i>N,N</i> -Dimethylformamid                             |
| DMNPE             | (4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan                       |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid   |
| DMTr              | 4,4'-Dimethoxytriphenylmethan                            |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                                   |

---

|               |  |
|---------------|--|
| ds            | doppelsträngig   |
| dsRBD         | doppelsträngige RNA bindende Domäne  |
| dsRBP         | doppelsträngige RNA bindendes Protein                                      |
| EDTA          | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| endoND        | Endonukleasedomäne   |
| (e)GFP        | ( <i>enhanced</i> /verstärkt) grün fluoreszierendes Protein                |
| eq            | Äquivalent(e)  |
| Et            | Ethyl  |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> /und andere   |
| EtOH          | Ethanol  |
| ETT           | 5-Ethylthio-1 <i>H</i> -tetrazol   |
| FAM           | Carboxyfluoreszein   |
| FCS           | Fetales Kälberserum  |
| FCS           | Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie                                       |
| FCCS          | Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie                                  |
| FRET          | Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (auch Förster-Resonanzenergietransfer) |
| G             | Guanosin   |
| GAPDH         | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                                   |
| HPLC          | Hochdruckflüssigkeitschromatographie                                       |
| iPrPac        | (4-Isopropylphenoxy)acetyl   |
| IR            | Infrarot   |
| KK            | Kreuzkorrelation   |
| konz.         | konzentriert   |
| LNA           | <i>locked nucleic acid</i>   |
| MB            | <i>molecular beacon</i>  |
| mdr           | <i>multi drug resistance</i>   |
| Me            | Methyl   |
| miRNA         | microRNA   |
| MTr           | 4'-Monomethoxytriphenylmethan  |
| mRNA          | <i>messengerRNA</i> / BotenRNA   |
| MS            | Massenspektrometrie  |
| NB            | 2-Nitrobenzyl  |
| NDBF          | 1-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl  |
| NHS           | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid  |
| NMR           | Kernmagnetresonanz   |
| NPE           | 1-(2-Nitrophenyl)ethyl   |
| NPP           | 2-(2-Nitrophenyl)propyl  |
| NPOM          | 1-(4,5-Methylenedioxy-2-nitrophenyl)ethyl                                  |
| nt            | Nukleotid(e)   |

---

|         |  |
|---------|--|
| ODN     | Oligodesoxynukleotid                           |
| PCR     | Polymerasekettenreaktion                       |
| rasiRNA | <i>repeat associated short interfering RNA</i> |
| PA      | Polyacrylamid                                  |
| PBS     | <i>phosphate buffered saline</i>               |
| piRNA   | <i>piwi interacting RNA</i>                    |
| PNA     | Peptidnukleinsäure                             |
| ppm     | <i>parts per million</i>                       |
| PS      | Phosphorothioat                                |
| RFP     | rot fluoreszierendes Protein                   |
| RISC    | <i>RNA induced silencing complex</i>           |
| RLC     | <i>RISC loading complex</i>                    |
| RLU     | Relative Lichteinheiten                        |
| RNA     | Ribonukleinsäure                               |
| RNAi    | RNA Interferenz                                |
| RP      | <i>reversed phase</i> /Umkehrphase             |
| rpm     | Umdrehungen pro Minute                         |
| RT      | Raumtemperatur                                 |
| R6G     | Rhodamin-6G                                    |
| siRNA   | <i>short interfering RNA</i>                   |
| SNP     | Einzelnukleotidpolymorphismen                  |
| ss      | einzelsträngig                                 |
| T       | Thymin   |
| Tab.    | Tabelle  |
| tasiRNA | <i>transacting short interfering RNA</i>       |
| Tat     | <i>trans-activator of transcription</i>        |
| TBAF    | Tetrabutylammoniumfluorid                      |
| TBDMS   | <i>t</i> -Butyldimethylsilyl                   |
| TBE     | Tris-Borat-EDTA-Puffer                         |
| TCA     | Trichloressigsäure                             |
| TEAA    | Triethylammoniumacetat                         |
| TFA     | Trifluoressigsäure                             |
| THF     | Tetrahydrofuran                                |
| tom     | [(Triisopropylsilyl)oxy]methyl                 |
| Tris    | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol       |
| tRNA    | Transfer-RNA                                   |
| U       | Uridin   |
| UTR     | untranslatierte Region                         |
| UV      | Ultraviolett                                   |

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3350–3355.
- [2] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [3] I. K. Farrance, J. S. Eadie, R. Ivarie, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 1231–1245.
- [4] H. Seliger, M. Holupirek, H. H. Görtz, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 2115–2118.
- [5] K. K. Ogilvie, K. L. Sadana, E. A. Thompson, M. A. Quilliam, J. B. Westmore, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 2861–2863.
- [6] S. Pitsch, P. Weiss, L. Jenny, A. Stutz, X. Wu, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3773–3795.
- [7] B. A. Connolly, P. Rider, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 4485–4502.
- [8] V. N. R. Pillai, *Synthesis* **1980**, 1–26.
- [9] J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [10] M. Goeldner, R. Givens, *Dynamic Studies in Biology. Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules*, Wiley VCH, Weinheim, **2005**.
- [11] S. Walbert, W. Pfleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1601–1611.
- [12] J. E. T. Corrie, A. Barth, V. R. N. Munasinghe, D. R. Trentham, M. C. Hutter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8546–8554.
- [13] [http://sydney.edu.au/science/chemistry/~kable\\_s/](http://sydney.edu.au/science/chemistry/~kable_s/), 20.12.2010.
- [14] R. J. Britten, E. H. Davidson, *Science* **1969**, *165*, 349–357.
- [15] C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant Cell* **1990**, *2*, 279–289.
- [16] N. Romano, G. Macino, *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 3343–3353.
- [17] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, *75*, 843–854.
- [18] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [19] S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 188–200.
- [20] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- [21] P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp, D. P. Bartel, *Cell* **2000**, *101*, 25–33.
- [22] L. Williams, C. C. Carles, K. S. Osmont, J. C. Fletcher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 9703–9708.
- [23] T. Samji, *Yale J. Biol. Med.* **2009**, *82*, 121–124.
- [24] K. Saito, K. M. Nishida, T. Mori, Y. Kawamura, K. Miyoshi, T. Nagami, H. Siomi, M. C. Siomi, *Genes Dev.* **2006**, *20*, 2214–2222.
- [25] G. B. Robb, K. M. Brown, J. Khurana, T. M. RANA, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 133–137.
- [26] B. A. Janowski, K. E. Huffman, J. C. Schwartz, R. Ram, R. Nordsell, D. S. Shames, J. D. Minna, D. R. Corey, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 787–792.
- [27] J. Han, Y. Lee, K.-H. Yeom, J.-W. Nam, I. Heo, J.-K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B.-T. Zhang, V. N. Kim, *Cell* **2006**, *125*, 887–901.
- [28] G. Laraki, G. Clerzius, A. Daher, C. Melendez-Peña, S. Daniels, A. Gagnon, *RNA Biol.* **2008**, *5*, 92–103.
- [29] M. Nowotny, S. A. Gaidamakov, R. J. Crouch, W. Yang, *Cell* **2005**, *121*, 1005–1016.
- [30] H. Qin, F. Chen, X. Huan, S. Machida, J. Song, Y. A. Yuan, *RNA* **2010**, *16*, 474–481.

- [31] H. Zhang, F. A. Kolb, V. Brondani, E. Billy, W. Filipowicz, *EMBO J.* **2002**, *21*, 5875–5885.
- [32] Y. S. Lee, K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. He, E. J. Sontheimer, R. W. Carthew, *Cell* **2004**, *117*, 69–81.
- [33] D. Murphy, B. Dancis, J. Brown, *BMC Evol. Biol.* **2008**, *8*, 92–100.
- [34] A. Lingel, B. Simon, E. Izaurralde, M. Sattler, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 576–577.
- [35] J.-B. Ma, K. Ye, D. J. Patel, *Nature* **2004**, *429*, 318–322.
- [36] S. Daniels, C. Melendez-Pena, R. Scarborough, A. Daher, H. Christensen, M. El Far, D. Purcell, S. Laine, A. Gatignol, *BMC Mol. Biol.* **2009**, *10*, 38.
- [37] E. Ma, I. J. MacRae, J. F. Kirsch, J. A. Doudna, *J. Mol. Biol.* **2008**, *380*, 237–243.
- [38] Y. Tomari, P. D. Zamore, *Genes Dev.* **2005**, *19*, 517–529.
- [39] Y. Tomari, C. Matranga, B. Haley, N. Martinez, P. D. Zamore, *Science* **2004**, *306*, 1377–1380.
- [40] J. T. Marques, K. Kim, P.-H. Wu, T. M. Alleyne, N. Jafari, R. W. Carthew, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 24–30.
- [41] A. D. Haase, L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Lainé, R. Sack, A. Gatignol, W. Filipowicz, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 961–967.
- [42] T. P. Chendrimada, R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, R. Shiekhattar, *Nature* **2005**, *436*, 740–744.
- [43] K. H. Kok, M.-H. J. Ng, Y.-P. Ching, D.-Y. Jin, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17649–17657.
- [44] Y. Lee, I. Hur, S.-Y. Park, Y.-K. Kim, M. R. Suh, V. N. Kim, *EMBO J.* **2006**, *25*, 522–532.
- [45] V. Gupta, X. Huang, R. C. Patel, *Virology* **2003**, *315*, 283–291.
- [46] J. Martinez, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2004**, *18*, 975–980.
- [47] G. Meister, M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, T. Tuschl, *Mol. Cell* **2004**, *15*, 185–197.
- [48] J. Liu, M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J.-J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor, G. J. Hannon, *Science* **2004**, *305*, 1437–1441.
- [49] J.-J. Song, S. K. Smith, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Science* **2004**, *305*, 1434–1437.
- [50] L. Wu, J. Fan, J. G. Belasco, *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 1327–1332.
- [51] M. Kiriakidou, G. S. Tan, S. Lamprinaki, M. de Planell-Saguer, P. T. Nelson, Z. Mourelatos, *Cell* **2007**, *129*, 1141–1151.
- [52] N. Standart, R. J. Jackson, *Genes Dev.* **2007**, *21*, 1975–1982.
- [53] T. P. Chendrimada, K. J. Finn, X. Ji, D. Baillat, R. I. Gregory, S. A. Liebhaber, A. E. Pasquinelli, R. Shiekhattar, *Nature* **2007**, *447*, 823–828.
- [54] C. P. Petersen, M.-E. Bordeleau, J. Pelletier, P. A. Sharp, *Mol. Cell* **2006**, *21*, 533–542.
- [55] S. Vasudevan, Y. Tong, J. A. Steitz, *Science* **2007**, *318*, 1931–1934.
- [56] Y. L. Chiu, T. M. Rana, *RNA* **2003**, *9*, 1034–1048.
- [57] A. L. Jackson, S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet, P. S. Linsley, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 635–637.
- [58] A. Birmingham, E. M. Anderson, A. Reynolds, D. Ilsley-Tyree, D. Leake, Y. Fedorov, S. Baskerville, E. Maksimova, K. Robinson, J. Karpilow et al., *Nat. Methods* **2006**, *3*, 199–204.
- [59] A. L. Jackson, J. Burchard, J. Schelter, B. N. Chau, M. Cleary, L. Lim, P. S. Linsley, *RNA* **2006**, *12*, 1179–1187.



- [60] L. Manche, S. R. Green, C. Schmedt, M. B. Mathews, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 5238–5248.
- [61] C. A. Sledz, M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, B. R. G. Williams, *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 834–839.
- [62] A. D. Judge, V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, I. MacLachlan, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 457–462.
- [63] T. Hunter, T. Hunt, R. J. Jackson, H. D. Robertson, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 409–417.
- [64] P. Svoboda, *Cytogenet. Genome Res.* **2004**, *105*, 422–434.
- [65] R. Zukiel, S. Nowak, E. Wyszko, K. Rolle, I. Gawronska, M. Z. Barciszewska, J. Barciszewski, *Cancer Biol. Ther.* **2006**, *5*, 991–996.
- [66] S. M. Elbashir, J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, T. Tuschl, *EMBO J.* **2001**, *20*, 6877–6888.
- [67] M. Overhoff, M. Alken, R. Far, Kretschmer-Kazemi, M. Lemaitre, B. Lebleu, G. Sczakiel, I. Robbins, *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 871–881.
- [68] Y. Shao, C. Y. Chan, A. Maliyekkel, C. E. Lawrence, I. B. Roninson, Y. Ding, *RNA* **2007**, *13*, 1631–1640.
- [69] Y. Fedorov, E. M. Anderson, A. Birmingham, A. Reynolds, J. Karpilow, K. Robinson, D. Leake, W. S. Marshall, A. Khvorova, *RNA* **2006**, *12*, 1188–1196.
- [70] G. Hutvagner, *FEBS Letters* **2005**, *579*, 5850–5857.
- [71] A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall, A. Khvorova, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 326–330.
- [72] A. L. Jackson, J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols et al., *RNA* **2006**, *12*, 1197–1205.
- [73] D. R. Corey, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 3615–3622.
- [74] J. Harborth, S. M. Elbashir, K. Vandenburgh, H. Manniga, S. A. Scaringe, K. Weber, T. Tuschl, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2003**, *13*, 83–105.
- [75] M. A. Lysik, S. Wu-Pong, *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 1559–1573.
- [76] Q. Ge, L. Filip, A. Bai, T. Nguyen, H. N. Eisen, J. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 8676–8681.
- [77] C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H.-P. Vornlocher, C. Unverzagt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4975–4977.
- [78] J. J. Turner, S. Jones, M. M. Fabani, G. Ivanova, A. A. Arzumanov, M. J. Gait, *Blood Cells Mol. Dis.* **2007**, *38*, 1–7.
- [79] E. Song, P. Zhu, S.-K. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D. M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D. B. Weiner, P. Shankar et al., *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 709–717.
- [80] J. C. Bell, N. Sonnenberg, D. A. Gray, *Cancer Invest.* **1991**, *9*, 295–304.
- [81] W. F. Anderson, G. J. McGarrity, R. C. Moen, *Hum. Gene Ther.* **1993**, *4*, 311–321.
- [82] A. Santel, M. Aleku, O. Keil, J. Endruschat, V. Esche, B. Durieux, K. Loffler, M. Fechtner, T. Rohl, G. Fisch et al., *Gene Ther.* **2006**, *13*, 1360–1370.
- [83] A. Tsourkas, M. A. Behlke, S. D. Rose, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1319–1330.
- [84] S. A. Marras, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e122.
- [85] S. M. Yarmoluk, S. S. Lukashov, T. Y. Ogul'Chansky, M. Y. Losytskyy, O. S. Korniyushyna, *Biopolymers* **2000**, *62*, 219–227.
- [86] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [87] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4208–4215.

- [88] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 20.12.2010.
- [89] <http://mfold.rna.albany.edu/>, 20.12.2010.
- [90] T. K. J.-P. Heinlein, O. Piestert, M. Sauer, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7957–7964.
- [91] W. T. Monroe, F. R. Haselton, *BioTechniques* **2003**, *34*, 68–73.
- [92] B. Dubertret, M. Calame, A. J. Libchaber, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365–370.
- [93] N. Venkatesan, Y. J. Seo, B. H. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 648–663.
- [94] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5168–5176.
- [95] R. W. Dirks, C. Molenaar, H. J. Tanke, *Histochem. Cell Biol.* **2001**, *115*, 3–11.
- [96] V. Vijayanathan, T. Thomas, L. H. Sigal, T. J. Thomas, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 225–233.
- [97] C. J. Yang, L. Wang, Y. Wu, Y. Kim, C. D. Medley, H. Lin, W. Tan, *Mol. Biol.* **2007**, *35*, 4030–4041.
- [98] A. Tsourkas, M. A. Behlke, Y. Xu, G. Bao, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3697–3703.
- [99] S. Tyagi, S. A. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191–1196.
- [100] C. J. Yang, H. Lin, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12772–12773.
- [101] J. H. Kim, D. Morikis, M. Ozkan, *Sens. Actuators B* **2004**, *102*, 315–319.
- [102] A. Chen, M. A. Behlke, A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *36*, e105.
- [103] N. Nitin, P. J. Santangelo, G. Kim, S. Nie, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e58.
- [104] P. J. Santangelo, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3602–3611.
- [105] M. M. Mhlanga, S. Tyagi, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1392–1398.
- [106] J. A. M. Vet, A. R. Majithia, S. A. E. Marras, S. Tyagi, S. Dube, B. J. Poesz, F. R. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 6394–6399.
- [107] X. Liu, W. Farmerie, S. Schuster, W. Tan, *Anal. Biochem.* **2000**, *283*, 56–63.
- [108] J. J. Li, X. Fang, S. M. Schuster, Tan Weihong, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 1049–1052.
- [109] J. J. Li, R. Geyer, W. Tan, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e52.
- [110] L. F. Liu, Z. W. Tang, K. F. Wang, W. H. Tan, J. Li, Q. P. Guo, X. X. Meng, C. B. Ma, *Analyst* **2005**, *130*, 350–357.
- [111] R. Yamamoto, P. K. R. Kumar, *Genes Cells* **2001**, *5*, 389–396.
- [112] J. Perlette, W. Tan, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5544–5550.
- [113] D. P. Bratu, B.-J. Cha, M. M. Mhlanga, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13308–13313.
- [114] S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1328–1332.
- [115] Q. N. Nguyen, R. V. Chavli, J. T. Marques, P. G. Conrad II, D. Wang, W. He, B. E. Belisle, A. Zhang, L. M. Pastor, F. R. Witney et al., *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, *1758*, 394–403.
- [116] S. Shah, S. H. Friedman, *Oligonucleotides* **2007**, *17*, 35–43.
- [117] S. Gupta, R. A. Schoer, J. E. Egan, G. J. Hannon, V. Mittal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 1927–1932.
- [118] J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- [119] W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20895–20900.
- [120] H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325.
- [121] S. Shah, P. K. Jain, A. Kala, D. Karunakaran, S. H. Friedman, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4508–4517.

- [122] R. A. Blidner, K. R. Svoboda, R. P. Hammer, W. T. Monroe, *Mol. BioSyst.* **2008**, *4*, 431–440.
- [123] T. M. Rana, Chiu Y.-L., *Mol. Cell* **2002**, *10*, 549–561.
- [124] F. Czauderna, M. Fechtner, S. Dames, H. Aygün, A. Klippel, G. J. Pronk, K. Giese, J. Kaufmann, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2705–2716.
- [125] L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 471–473.
- [126] J. S. Lamberton, A. T. Christian, *Mol. Biotechnol.* **2003**, *24*, 111–119.
- [127] T. Ohrt, P. Schwille, *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 3674–3685.
- [128] T. Ohrt, D. Merkle, K. Birkenfeld, C. J. Echeverri, P. Schwille, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1369–1380.
- [129] A. Ephrussi, L. K. Dickinson, R. Lehmann, *Cell* **1991**, *66*, 37–50.
- [130] E. R. Gavis, R. Lehmann, *Cell* **1992**, *71*, 301–313.
- [131] O. Steward, E. M. Schuman, *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24*, 299–325.
- [132] J. G. Gall, M. L. Pardue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1969**, *63*, 378–383.
- [133] M. Valencia-Burton, R. M. McCullough, C. R. Cantor, N. E. Broude, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 421–427.
- [134] C. Molenaar, S. A. Marras, J. C. M. Slats, J. C. Truffert, M. Lemaitre, A. K. Raap, R. W. Dirks, H. J. Tanke, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e89.
- [135] J. Politz, *Trends Cell Biol.* **1999**, *9*, 284–287.
- [136] S. Chapman, K. J. Oparka, A. G. Roberts, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005**, *8*, 565–573.
- [137] B. Ghosn, F. R. Haselton, K. R. Gee, W. T. Monroe, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 953–959.
- [138] T. J. Drake, C. D. Medley, A. Sen, R. J. Rogers, W. Tan, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2041–2047.
- [139] H. Wang, J. Li, H. Liu, Q. Liu, Q. Mei, Y. Wang, J. Zhu, N. He, Z. Lu, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e61.
- [140] C. Grunwald, K. Schulze, A. Reichel, V. U. Weiss, D. Blaas, J. Piehler, K. H. Wiesmüller, R. Tampé, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 6146–6151.
- [141] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923–2925.
- [142] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [143] <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>, 20.12.2010.
- [144] [http://www.premierbiosoft.com/molecular\\_beacons/index.html](http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/index.html), 20.12.2010



## 7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Heckel bedanken. Für das Vertrauen in meine Fähigkeiten, für die Freiräume, die mir für meine Arbeit gegeben wurden ebenso wie für die Reibungsflächen, die mir geboten wurden. Letzteres betreffend möchte zwei Zeilen anbringen, die ich vor einiger Zeit gelesen habe und die mir sehr passend erscheinen:

*Wer nur Freunde hat, die der gleichen Meinung sind wie man selbst, ist entweder sehr reich, sehr mächtig oder sehr anspruchslos.*

Ich denke das gilt auch für Chefs.

Herrn Prof. Dr. J. W. Engels möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens für diese Arbeit danken.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die mich zu jeder Zeit und auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt haben.

Der umfassendste Dank geht an den Arbeitskreis.

Wir kamen als eine eingeschworene Truppe, die sich fast seit dem ersten Semester kannte, aus Bonn. Aber ausnahmslos jedes Mitglied, um das sich der Arbeitskreis in Frankfurt erweiterte war eine Bereicherung. Fachlicher Rat, moralische Unterstützung, kulinarische Verführung, musikalischer Blödsinn oder einfach nur jemand zum Quatschen - für alles konnte man jederzeit den passenden Partner finden. Ihr werdet mir fehlen.

Ein besonderer Dank gilt Maximilian Buff, Clara Menge und Florian Schäfer, die sehr aufmerksam und mit einem Auge für's Detail diese Arbeit korrekturgelesen haben.

Der letzte und gleichzeitig größte Dank geht an Timo – er hat über all die Jahre des Studiums, der Diplomarbeit und schließlich der Doktorandenzeit Freud' und Leid mit mir geteilt. Manches Unverständliche hast Du mir erklärt, mich in depressiven Phasen fast immer aufzuheitern gewusst und den ein oder anderen Wutanfall besänftigt. Ohne Dich wäre der Computer sicherlich spätestens beim Zusammenschreiben aus dem Fenster geflogen.

Apropos aus dem Fenster fliegen: man möge sich im AK Heckel bitte daran erinnern, mir Bescheid zu sagen, wenn die HPLC eines Tages ausgedient hat...



## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 11.11.1980  
Geburtsort: Engelskirchen  
Nationalität: Deutsch

### Ausbildung

05.2006 - 08.2010 Promotion an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und der Goethe-Universität Frankfurt (AK Prof. A. Heckel)

Thema: *Photoaktivierbare siRNAs und molecular beacons*

10.2000 - 01.2006 Studium der Chemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Akad. Grad: Diplom Chemikerin

Diplomarbeit: *Untersuchungen zur Synthese photoaktivierbarer RNA und Anwendung photoaktivierbarer Decoyoligodesoxynukleotide*

08.1991 - 06.2000 Besuch des Städtischen Gymnasiums Grotenbach in Gummersbach

Abschluss: Abitur

### Fachpublikationen

Mikat, V., Heckel, A. *Light-activatable molecular beacons*, eingereicht.

Mikat, V., Heckel, A. *Light-Dependent RNA Interference with Nucleobase-Caged siRNAs*, RNA **2007**, 13, 2341-2347.

Mayer, G., Kröck, L., Mikat, V., Engeser, M., Heckel, A. *Light-induced formation of G-quadruplex DNA secondary structures*, ChemBioChem **2005**, 6, 1966-1970.