

Optimierung von Kinetik und Spezifität künstlicher metallfreier Ribonucleasen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

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

von

Kathrin Dörr

aus Menden

Frankfurt am Main, 2011

(D30)

Für Alena

[...] Can we climb this mountain?

I don't know

higher now than ever before

no, we can make it if we take it slow [...]

The Killers, "When you were young"

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Oktober 2005 und Juni 2009 unter der Anleitung von Prof. Dr. Michael W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. M. W. Göbel für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas, die Betreuung sowie für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. U. Scheffer und Frau E. Kalden für die Einführung und ständige Begleitung im Themenbereich der Bioanalytik, die stete Diskussionsbereitschaft und vielen Denkanstöße zur Interpretation von Daten usw. sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. G. Dürner und Frau G. Stracke für die analytischen und präparativen Trennungen per HPLC danken.

Herrn Dr. J. G. Zimmermann und seinem Team danke ich für die Unterstützung bei selbstständigen Messungen von NMR-Spektren, Frau H. Brill, Frau I. Prieß und Frau Dr. U. Bahr für die Messungen der Massenspektren.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. C. Gnaccharini, der mich am Anfang meiner Doktorarbeit durch Kollaboration und Einführung in die Herstellung von Peptid-Konjugaten und Oligonucleotiden unterstützte.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. H. Schwalbe und seinen Mitarbeitern sowie bei Frau Dr. U. Dietrich und ihrem Arbeitskreis für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Peptidkonjugate und der Vollängen-RNAs.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern meines Arbeitskreises für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken: Herrn Dr.

O. Boden, Herrn Dr. S. Breitung, Frau Dipl. Chem. S. Brüß, Frau Dipl. Chem. E. Fischer, Herrn Dipl. Chem. C. Pinto Gomes, Herrn Dr. G. Seifert, Frau Dipl. Biochem. T. Stark, Herrn Dr. M. Suhartono, Herrn Dr. S. Ullrich, Herrn Dr. M. Weimar, Frau Dipl. Chem. D. Wirth und Herrn Dipl. Chem. M. Zeiger.

Herrn Dr. M. Weimar möchte ich sehr für das Korrekturlesen einiger Passagen meiner Arbeit danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. D. Akalay für die über das Labor hinausgehende Freundschaft und viele mittägliche Gespräche bedanken.

Herrn Dr. C. E. Timm danke ich für die tolle Laboratmosphäre, zahlreiche Diskussion über Chemie und die Welt und die Unterstützung in meiner musikalischen Weiterbildung.

Frau T. Ruppenthal möchte ich für ihre herzliche Art und ihre Freundschaft danken, die es mir in den letzten Jahren wirklich leichter gemacht haben, so manches Tief zu überwinden.

Zu guter letzt möchte ich mich selbstverständlich bei meiner Familie und dabei ganz besonders bei meinem Ehemann bedanken, die mich alle jederzeit unterstützt und die mir Mut gemacht haben und damit einen großen positiven Beitrag dazu leisteten, dass diese Arbeit nun fertig gestellt ist.

1 Einleitung	1
2 RNA–Spaltung	3
2.1 STRUKTUR UND AUFBAU VON RNA	3
2.2 HYDROLYSE VON RNA.....	6
2.3 KATALYSE DER RNA-HYDROLYSE.....	8
2.4 RNA ALS DRUGTARGET	9
3 HIV	11
3.1 AUFBAU.....	12
3.2 DIE TRANSACTIVATIONAL RESPONSE REGION (TAR).....	14
3.3 DAS VERPACKUNGSSIGNAL Ψ	16
3.4 INHIBIERUNGSMÖGLICHKEITEN AN HIV	17
3.4.1 Inhibition der Genomreplikation.....	18
3.4.2 Protease–Inhibitoren	20
3.4.3 Eintrittsinhibitoren.....	21
3.4.4 Integrase-Inhibitoren	22
3.4.5 Andere HIV-Inhibitoren.....	22
4 Künstliche Ribonucleasen	23
4.1 UNSELEKTIVE KÜNSTLICHE RIBONUCLEASEN.....	25
4.2 SELEKTIVE KÜNSTLICHE RIBONUCLEASEN	32
4.2.1 Metallhaltige künstliche Ribonucleasen.....	34
4.2.1.1 Metallhaltige Ribonucleasen auf Basis von Lanthanid – Ionen.....	34
4.2.1.2 Metallhaltige Ribonucleasen auf Basis von Cu^{2+} -Ionen	37
4.2.1.3 Metallhaltige Ribonucleasen auf Basis von Zn^{2+} -Ionen.....	40
4.2.2 Metallfreie künstliche Ribonucleasen	44
4.2.3 Künstliche Ribonucleasen auf Basis von Trisbenzimidazol.....	48
4.3 ANDERE METHODEN DES SELEKTIVEN RNA-ABBAUS.....	51
5 Eigene Arbeiten	53
5.1 SPEZIFISCHE RNA-SPALTUNG	53
5.1.1 Herstellung „maßgeschneiderter“ Trisbenzimidazol- Konjugate.....	53
5.1.2 RNA–Spaltung und deren Messung.....	56
5.1.3 Spaltungsexperimente mit Trisbenzimidazol-DNA-Konjugat 53	59
5.1.4 Spaltungsexperimente mit Trisbenzimidazol-DNA-Konjugat 55	65
5.1.5 Versuche zur Herstellung eines Pyren-Benzimidazol-Hybrid-Konjugates	69

5.1.6 Sequenzspezifische Spalter unter Verwendung von „Helfer“-Sequenzen	74
5.1.7 Kinetische Analyse der Turnover-Reaktion	83
5.1.8 Versuche zur Konjugation in flüssiger Phase	86
5.1.9 Synthese der Maleimide und Peptid-Konjugate.....	90
5.1.10 Synthese und Labeling großer RNAs	94
5.1.11 Spaltungsexperimente der Peptidkonjugate an Vollängen-RNA	99
5.2 NEUE RNA-SPALTENDE AMIDIN- UND GUANIDINANALOGA.....	107
5.2.1 Einführung.....	107
5.2.2 Untersuchungen der pKa-Werte der möglichen RNA-Spalter.....	111
5.2.3 Berechnung der Bildungsenthalpie (ΔH_f -Werte).....	113
5.2.4 Synthese von 71 und Derivatisierung käuflicher Verbindungen	116
5.2.5 Spaltungsexperimente mit unspezifischen RNA-Spaltern	118
5.2.6 Studien zum Aggregationsverhalten verschiedener kleiner Moleküle	139
6 Zusammenfassung.....	145
7 Ausblick.....	149
8 Experimenteller Teil	151
8.1 ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN.....	151
8.2 ARBEITSMETHODEN	153
8.2.1 Arbeitsmethoden mit Oligonucleotiden.....	153
8.3 SYNTHESE	161
8.3.1 Synthese von 1-(2,2-Diethoxyethyl)-2-aminoimidazol (77) ^{[30, 31]*}	161
8.3.2 Synthese von 1 <i>H</i> -Imidazo[1,2- <i>a</i>]imidazol (71) ^{[30, 31]*}	162
8.3.3 Synthese von 2-(2-{Bis-[2-(1 <i>H</i> -benzoimidazol-2-ylamino)-ethyl]-amino}-ethylamino)-1 <i>H</i> -benzoimidazol-5-carboxylsäure {2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionylamino]-ethyl}-amid (60).....	163
8.3.4 Synthese von Maleimidkonjugat mit C ₆ -Linker und Tat11 (61).....	165
8.3.5 Synthese von Maleimid-Konjugat mit (C ₂)-Linker und Tat11 (62).....	166
8.3.6 Synthese von Konjugat mit C ₆ -Linker und KWPWC (63).....	167
8.3.7 Synthese von Konjugat mit C ₂ -Linker und KWPWC (64).....	168
8.3.8 Herstellung von DNA-Konjugat 51	169
8.3.9 Synthese von 2-Acetylaminoimidazol (72)	171

9 Anhang	172
9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	172
9.2 VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN	174
9.2.1 Puffer und Lösungen für die Sequenzierung von RNA.....	174
9.2.2 Puffer und Lösungen zur in-vivo-Herstellung von RNA	176
9.2.3 Nucleinsäure-Quantifizierungskits	177
9.2.4 Puffer und Lösungen für analytische und präparative Gele.....	177
9.2.5 Andere Lösungen	178
9.3 SPEKTREN UND CHROMATOGRAMME	180
9.4 LITERATURVERZEICHNIS	182
9.5 LEBENSLAUF	189
9.6 PUBLIKATIONEN	190
9.7 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	191

1 Einleitung

Seitdem bekannt ist, dass RNA (Ribonucleinsäure) nicht nur als stummer Vermittler zwischen Genom und den Primärsequenzen der Proteine auftritt, ist sie weiter in den Mittelpunkt aktueller Forschungen gerückt. Sie ist vielmehr auch zuständig und essentiell für die Regulation der Transkription ^[4], der Translation ^[5,9], für die Funktion mancher Proteine ^[10,12] sowie für Katalysereaktionen ^[35]. Sie erfüllt also Aufgaben, die vorherigen Annahmen nach Proteinen vorbehalten waren. Die Erkenntnis dieser Tatsachen lässt RNA als attraktiven Angriffspunkt in der Bekämpfung unterschiedlichster Erkrankungen erscheinen. Bislang konnten, abgesehen von Antibiotika, allerdings erst wenige Wirkstoffkandidaten entwickelt werden – das Thema bleibt eine ernsthafte wissenschaftliche Herausforderung. Auch andere Targets wie das Proteom und das Genom bereiten dahingehend charakteristische Schwierigkeiten: Eine aktuelle Studie bestimmte die Anzahl der im menschlichen Genom codierten Proteine, die durch momentan verwendete Wirkstoffe angreifbar sind, auf 207, was weniger als 15% der Proteine darstellt, die allein für genetische Erkrankungen verantwortlich gemacht werden ^[36].

Der Vorteil gegenüber Proteinen als Target, den DNA und RNA gemein haben, ist die vergleichsweise kleine Anzahl an Bausteinen, was die Entwicklung einer Angriffsstrategie erleichtert. Sicherlich ist RNA in Form von ribosomaler RNA (rRNA) als Drugtarget schon länger bekannt: Aminoglykoside ^[37,38], Makrolide ^[39], Tetracycline ^[40] sowie Oxazolidinone ^[41] stellen bekannte Antibiotika-Klassen dar, die das prokaryotische Ribosom attackieren. Dennoch bleibt es wünschenswert, auch weitere RNA-Ziele wie z.B. messenger RNA (mRNA) durch kleine Moleküle zu adressieren und gegebenenfalls auszuschalten.

Aus der Natur sind verschiedene Mechanismen bekannt, die komplexe zelluläre Vorgänge wie z.B. Genregulation auf der RNA-Ebene steuern, insbesondere RNA-Interferenz durch siRNA. ^[142] Die Erkennung der anzugreifenden RNA erfolgt hierbei über Basenpaarung.

Ein System, welches selektiv DNA erkennt, bindet und spaltet – und zwar nicht über Basenpaarung - entwickelten Dervan und Mitarbeiter. ^[42] Sie ersannen einen einzigartigen "modularen Code" bestehend aus Polyamiden von Pyrrol-, Imidazol- und Hydroxypyrrolbausteinen, die als Erkennungselemente für die einzelnen

Einleitung

Nucleobasen dienen. Ein entsprechendes Gegenstück fehlt bisher in der Welt der RNA.

Die Vielfältigkeit der RNA macht diese als Ziel zur Herausforderung, ist aber gleichzeitig auch ihr Vorteil: Sucht man nach neuen molekularbiologischen Werkzeugen oder neuen Wegen, um bakterielle, virale oder erblich bedingte Erkrankungen zu bekämpfen, ist die Selektivität dieser Werkzeuge das äußerste Gebot.

2 RNA–Spaltung

2.1 Struktur und Aufbau von RNA

Um ein Verständnis für die sich bietenden Möglichkeiten, RNA anzugreifen, zu erlangen, muss man sich zunächst mit ihrer Struktur befassen.

Trotz ihrer Ähnlichkeit gibt es Unterschiede zwischen DNA und RNA, die sich auch auf deren Struktur auswirken. Zunächst einmal unterscheiden sie sich in der Struktur der Ribose, also der Zuckereinheit der Nucleoside. Während RNA über eine Hydroxylgruppe am 2'-Kohlenstoff verfügt, fehlt diese bei DNA, daher auch der Name "Desoxyribonucleinsäure". Dieser strukturelle Unterschied führt dazu, dass RNA 10^7 mal hydrolyseempfindlicher als DNA ist, da die 2'-Hydroxylgruppe als internes Nucleophil am Phosphatrückgrat angreifen kann, während zur Hydrolyse von DNA ein externes Nucleophil benötigt wird.

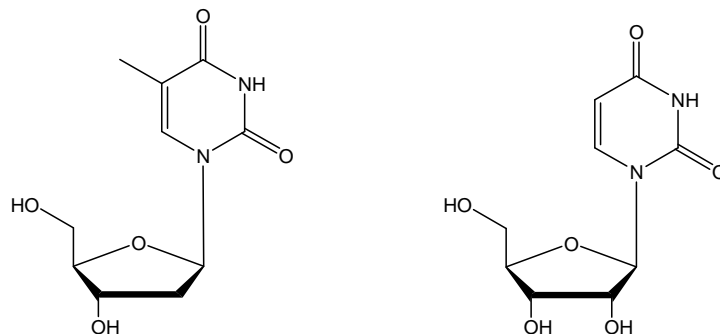


Abb. 1: Links Desoxyribonucleosid mit Thymin als Base, rechts Ribonucleosid mit Uracil als Base.

Drei der vier Nucleobasen sind in RNA und DNA identisch. Nur Thymin in der DNA ist durch Uracil - ein unmethyliertes Derivat von Thymin - in der RNA ausgetauscht.

Viel größeren Einfluss auf die Struktur übt die Zuckerkonformation der Ribose aus, die sich in beiden Makromolekülen unterscheidet. Unter physiologischen Bedingungen liegt DNA dabei in einer 2'-endo (B-DNA), RNA in einer 3'-endo-Konformation vor (s. Abb. 2, f. Seite).

RNA - Spaltung

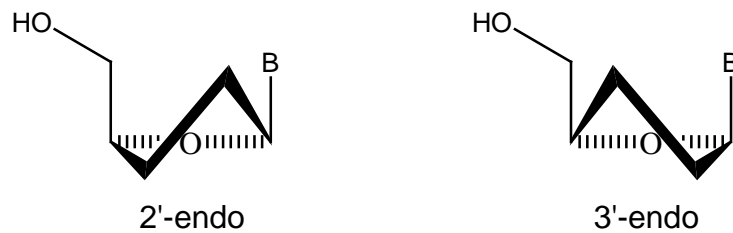


Abb. 2: Schematische Darstellung der Zuckerkonformation in B-DNA (2'-endo) und RNA (3'-endo); die Phosphate und weiteren Hydroxylgruppen wurden der Übersichtlichkeit halber weg gelassen (B=Base).

Die unterschiedlichen Zuckerkonformationen haben zur Folge, dass DNA und RNA im Duplex in zwei verschiedenen helicalen Formen auftreten, nämlich der A-(RNA) und der B-Form (DNA). Ihre Unterschiede spiegeln sich auch in der Ausprägung und der Gestalt der großen und kleinen Furchen (*major* bzw. *minor groove*) wider. In der B-Form bieten beide Furchen genügend Platz für die Interaktion mit kleinen Molekülen in der A-Form, die sowohl von reinen RNA-Strängen als auch von RNA-DNA-Hybriden eingenommen wird, sind die Furchen generell schlechter für Wechselwirkungen geeignet. Die große Furche ist dabei tief, aber sterisch schwer zugänglich, während die kleine Furche eher flach ist. ^[7] Diese strukturellen Gegebenheiten behindern eine Wechselwirkung von Wirkstoffen oder kleinen Molekülen mit Duplex-RNA.

DNA kommt ausschließlich in doppelhelicaler Form vor, codogener und anticodogener Strang sind hybridisiert und bilden zusammen die Doppelhelix. RNA hingegen kann viele verschiedene Sekundärstrukturen aufweisen oder auch als ungepaarter Einzelstrang vorliegen. Die "gepaarten" Sekundärstrukturabschnitte entstehen im Gegensatz zu DNA durch Rückfaltung der eigenen Sequenz, es gibt hier nur einen Strang.

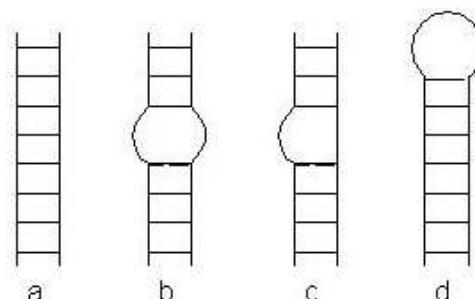


Abb. 3: Schematische Darstellung von vier hauptsächlich auftretenden Sekundärstrukturtypen der RNA: a) Duplex; b) internal loop; c) bulge; d) hairpin loop.

Die Sekundärstrukturen entstehen teilweise durch fehlgepaarte Basen, sie weiten die Helix auf und ermöglichen eine Wechselwirkung mit kleinen Molekülen; man

RNA - Spaltung

könnte sie auch als eine Art Bindungstasche bezeichnen. RNA und Proteine haben die Fähigkeit gemeinsam, komplexe dreidimensionale Strukturen auszubilden, in denen spezifische Bindungstaschen für Liganden entstehen können. Durch die unterschiedlichen Aminosäuren ist das Oberflächenpotential von Proteinen eine Abfolge von positiven und negativen Bereichen, während es bei RNA nur unterschiedlich stark ausgeprägte negativ geladene Bereiche sind.

2.2 Hydrolyse von RNA

Die Hydrolyse von RNA stellt unkatalysiert eine sehr langsame Reaktion dar. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt (Kapitel 2.1 „Struktur und Aufbau von RNA“) erläutert, ist RNA allerdings 10^7 -mal hydrolyseempfindlicher als DNA, was sich auf das Vorhandensein der 2'-OH-Gruppe als internem Nucleophil zurückführen lässt.

In einem vorgelagerten Gleichgewicht kann das Proton dieser 2'-Hydroxylgruppe abstrahiert werden, wodurch sich die Nucleophilie des jetzt negativ geladenen Sauerstoffatoms drastisch erhöht. Im nächsten Schritt greift letzteres das nahe gelegene Phosphoratom an, es bildet sich ein trigonal-bipyramidaler Übergangszustand bzw. eine Zwischenstufe, wenn man von einer Stabilisierung des Intermediats in Lösung ausgeht.^[44] Dies gelingt bei pH-Werten <5 , da das doppelt negativ geladene Anion einfach protoniert wird und damit erheblich an Stabilität gewinnt, so dass sich die Lebensdauer dieser Stufe verlängert. Es findet sogar Pseudorotation statt, was sich durch das Entstehen unterschiedlicher 2'- und 3'-Hydrolyseprodukte zeigt. Wie in Schema 1 ersichtlich, richtet sich die 3'-Ribose derart aus, dass sich zwischen Eintritts- und Abgangsgruppe ein 180° -Winkel auszubilden vermag. Dieses Bild verdeutlicht aber auch die Tatsache, dass eine Spaltung des Phosphodiesterückgrates der RNA nur im einzelsträngigen Bereich möglich ist, da sonst dieser Winkel nicht eingenommen werden könnte. Des Weiteren wird die Hydrolyse durch stacking-Wechselwirkungen sowohl im Doppel- als auch im Einzelstrang beeinträchtigt, besonders in Bereichen, die reich an Purinen sind.^[45] Schließlich kommt es unter Bildung eines fünfgliedrigen Cyclo-Phosphats zum Austritt der Abgangsgruppe.

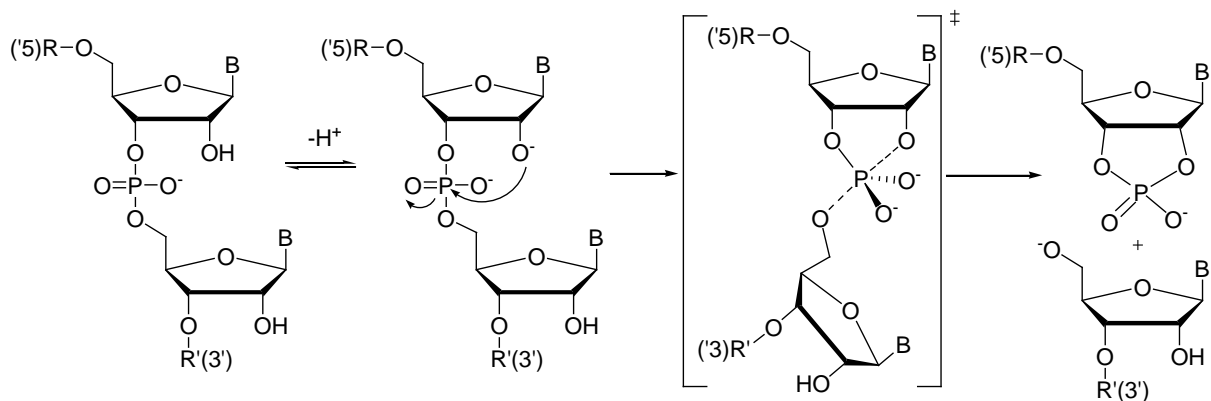
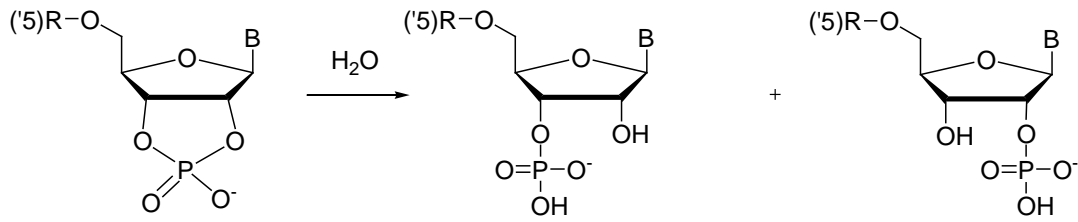


Abb. 4: Schematische Darstellung der RNA-Hydrolyse (Anmerkung: B=Base).

RNA - Spaltung



Schema 1: Hydrolyse des Cyclo-Phosphats (Anm.: B=Base)

Das fünfgliedrige Cyclo-Phosphat wird durch hydrolytische Spaltung zerstört, wobei sich ein Isomerengemisch aus 2'-Hydroxyl- und 3'-Hydroxyl-Ribonucleosid bildet. Erkenntnisse über diesen Reaktionsschritt wurden bereits in den 1950er Jahren bei der Untersuchung der Basenlabilität der RNA gewonnen. ^[46]

2.3 Katalyse der RNA-Hydrolyse

Die Hydrolyse von RNA ist wie bereits erwähnt eine sehr langsame Reaktion, sofern sie unkatalysiert verläuft. Da für den reibungsfreien Vorgang vieler biochemischer Prozesse wie etwa nach der Translation ein RNA-Abbau nötig ist, sind Katalysatoren von essentieller Wichtigkeit, besonders damit die Reaktion unter physiologischen Bedingungen in der Zelle schnell ablaufen kann. Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten, die RNA-Hydrolyse zu katalysieren.

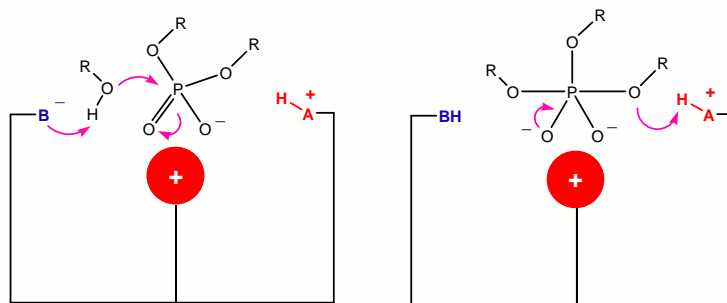


Abb. 5: Schematische Darstellung der Katalyse der RNA-Hydrolyse.

- 1.) *Generelle Basenkatalyse*: Das angreifende Nucleophil – im Falle der RNA-Hydrolyse handelt es sich hierbei um die 2'-Hydroxylgruppe – wird deprotoniert (durch B⁻) und seine Nucleophilie somit erhöht.
- 2.) *Elektrophile Katalyse*: Der trigonal- bipyramidale, dianionische Übergangszustand (bzw. die Zwischenstufe) wird durch ein Elektrophil (E⁺) stabilisiert.
- 3.) *Generelle Säurekatalyse*: Durch Protonierung der Abgangsgruppe (durch H-A⁺) wird deren Basizität erniedrigt und somit ihre Güte gesteigert, ihr Austritt wird daher erleichtert.

Natürliche Katalysatoren des RNA-Abbaus, also Ribonucleasen, arbeiten mit allen drei der oben genannten Methoden, um den Abbau von RNA zu beschleunigen.

2.4 RNA als Drugtarget

RNA als Angriffspunkt in der Therapie verschiedener Krankheiten ist wie eingangs erwähnt aus mehreren Gründen attraktiv. Zum einen kann man diese Herangehensweise als Ergänzung zum Attackieren von regulatorischen Proteinen betrachten, zum anderen kann davon ausgegangen werden, dass bei vielen Protein-RNA-Komplexen der RNA-Teil essentiell für die Funktion ist. ^[35,47]

Bei der Betrachtung von RNA als Drugtarget ist die Suche nach antiviralen und antibakteriellen Werkzeugen eine der Hauptaktivitäten der letzten Jahre gewesen.

Ein häufiges antibakterielles Target stellt beispielsweise das Ribosom dar. Die heute eingesetzten RNA angreifenden Antibiotika zielen ausschließlich auf rRNA (ribosomale RNA) ab. Das prokaryotische Ribosom besteht aus zwei Untereinheiten, einer großen (50S) und einer kleinen (30S), die sich aus ribosomalen Proteinen und rRNA zusammensetzen. Die kleine Untereinheit besitzt eine Kontrollfunktion und sorgt für den Einbau der richtigen Aminosäure durch die tRNA, während die große Untereinheit als Katalyseeinheit für die Kettenverlängerung der Polypeptide und die Bindungsknüpfung fungiert. Für die Funktion beider Einheiten zeichnet hauptsächlich ribosomale RNA verantwortlich. Das Gegenlesen und Kontrollieren der richtigen Aminosäuresequenz findet an einer bestimmten Stelle der 16S rRNA statt, einer Untereinheit der 30S-Einheit, an der sogenannten A-Site. Durch das Binden der richtigen tRNA wird eine Konformationsänderung in diesem Bereich induziert, die zum Einbau der benötigten Aminosäure führt. Nicht passende tRNAs verursachen nicht die benötigte Konformationsänderung, so dass keine falsche Aminosäure ins Polypeptid inkorporiert wird. Aminoglykoside bilden eine Klasse von Antibiotika, die an dieser Stelle angreifen. Es kommt durch die Anlagerung derselben an die A-Site zu einem Ausschwenken von Adenosin 1492, das das Vorliegen eines korrekten Basenpaares zwischen t- und m-RNA vorgaukelt, ^[48,49] was wiederum zum Einbau der falschen Aminosäure und somit zur Exprimierung funktionsuntüchtiger Polypeptide bzw. Proteine und ggf. zum Zelltod des Bakteriums führt.

Es ist auch möglich, tRNA zu inhibieren bzw. unbrauchbar zu machen. Dazu muss man sich nur die wichtige Wechselwirkung von tRNA mit den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (AaRs) vor Augen führen. Diese Enzymklasse ist für das Beladen der tRNA mit ihrer zugehörigen Aminosäure verantwortlich. Stört man diesen Prozess, kann die tRNA nicht in der Proteinbiosynthese eingesetzt werden, ungeladene tRNA

führt gar zur Inhibierung der Proteinsynthese und somit schließlich zum Zelltod. ^[133]

Als Angriffsstrategie ist hier deshalb sowohl die Inhibition der AaRs als auch die der tRNA geeignet. Es zeigte sich, dass Aminoglykoside auch in diesem Bereich einsetzbar sind, da sie an tRNA binden. ^[50,51] Neomycin z.B. vermag die Beladung von tRNA^{Phe} durch Inhibition zu verhindern ($K_i \approx 300 \mu\text{M}$). ^[50]

Ein weiterer Block von Ziel-RNAs sind Ribozyme, also katalytisch aktive RNAs, die sich durch komplexe dreidimensionale Strukturen auszeichnen und beispielsweise zur Selbstspaltung fähig sind. Man geht davon aus, dass es sich bei dieser Form von Katalysatoren um Relikte aus einer Zeit handelt, als ausschließlich RNA an allen wichtigen Funktionen der Zelle beteiligt war, also sowohl enzymatische als auch genetisch regulative Aufgaben erfüllte. ^[52] Da die Struktur mehrerer Ribozyme per Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde, können sie außerdem als brauchbares Modell für das Studium von RNA-Ligand-Interaktionen herangezogen werden. In der Inhibierung von Ribozymen wie den Hammerhead-Ribozymen ^[53] oder den RNase P Ribozymen ^[54] haben sich – wie in vielen anderen Fällen – Aminoglykoside bewährt. Neomycin war unter den getesteten der potenteste Inhibitor. Die Bindung der Aminoglykoside ging mit einer Konkurrenz mit Mg^{2+} -Ionen einher, da beobachtet werden konnte, dass die Inhibition durch Anwesenheit von Mg^{2+} sank. Die Wirkungsweise der Aminoglykoside scheint dabei auch auf dem Verdrängungsmechanismus von Magnesium zu beruhen, da z.B. Hammerhead-Ribozyme für ihre Spaltfunktion auf Mg^{2+} -Ionen angewiesen sind.

Auch Viren arbeiten mit RNA als regulatorischen Elementen, insbesondere Retroviren wie zum Beispiel HIV (Humanes Immundefizienz Virus), deren Genom in RNA codiert ist, bevor es in den Wirtszellen in DNA umgeschrieben wird. Da im Rahmen dieser Arbeit vorwiegend mit Modellen bzw. Transkripten aus dem HIV-Genom gearbeitet wurde, wird an dieser Stelle auf Kapitel 3 "HIV" verwiesen, das sich in einigen Unterpunkten auch mit der Inhibition von viraler RNA sowie HIV allgemein als Drugtarget befasst.

Die hier zusammengefassten Beispiele erörtern, wie RNA als Drugtarget durch Inhibition und Wechselwirkung angegangen werden kann, allerdings kann RNA durch bestimmte Wirkstoffe bzw. Wirkstoffklassen auch zerstört bzw. hydrolysiert werden. Diese RNA-spaltenden Moleküle werden in Kapitel 4 "Künstliche Ribonucleasen" genauer erörtert.

3 HIV

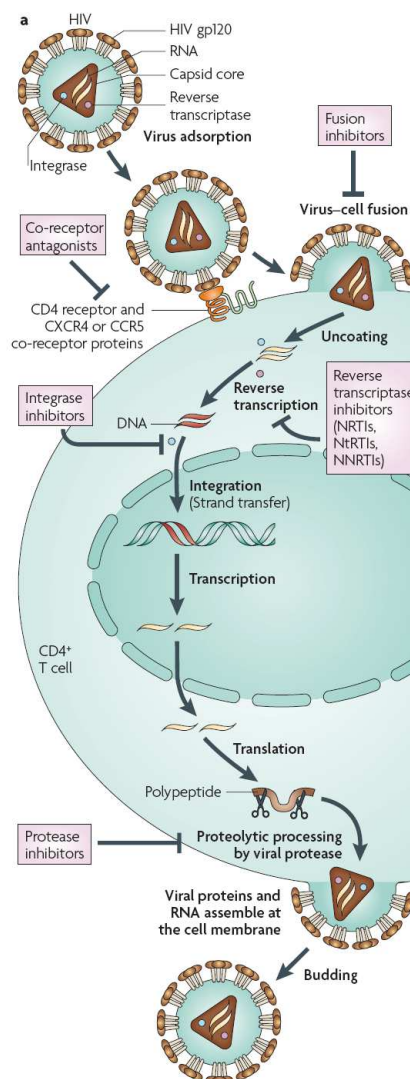
Das Humane Immunodefizienz Virus (HIV) wurde erstmals 1983 und ´84 unabhängig von verschiedenen Wissenschaftlern (Barré-Sinoussi, Broder, Gallo) isoliert und als Ursache der AIDS (Aquired Immunodeficiency Syndrome)-Erkrankung identifiziert.

Heute sind weltweit 33 Millionen Menschen mit HIV infiziert, zwei Drittel davon allein in Afrika, 2.7 Millionen Neuinfektionen waren es allein im Jahr 2010. HIV wird durch Blut, Speichel und andere Körperflüssigkeiten weitergegeben. Die Hauptübertragungswege sind: ungeschützter Geschlechtsverkehr mit infizierten Personen, Verwendung von infiziertem Spritzenbesteck unter Drogenabhängigen, durch Bluttransfusionen oder durch anderen direkten Austausch von Blut (z.B. bei Schürfwunden) sowie während der Geburt oder beim Stillen im Falle einer infizierten Mutter auf den Säugling.

Trotz der vergleichsweise erschwerten Übertragung – vergleicht man HIV beispielsweise mit dem Grippe-Virus – ist die Verbreitung extrem hoch, dennoch lassen sich aufgrund der rasanten Entwicklung von antiretroviralen Therapien die HIV-Infektion und AIDS heute eher als chronisch und weniger als direkt tödlich beurteilen, wie es noch vor 25 Jahren der Fall war. Aber auch heute gibt es noch keine Heilung; das Virus kann nur in Schach gehalten und eine AIDS-Erkrankung so hinausgezögert werden.^[34]

3.1 Aufbau

Das HI-Virus besteht aus einer Lipid-Doppelmembran, in deren Innerem sich das Kapsid mit der Erbinformation – zwei Kopien einer einzelsträngigen RNA – sowie die viralen Enzyme befinden. Um mit der Wirtszelle zu verschmelzen, muss zunächst das Hüllprotein des Virus' mit dem Plasmamembranrezeptor der zu infizierenden Zelle in Wechselwirkung treten. Dieses Hüllprotein besteht selbst aus zwei Polypeptiden, nämlich dem Oberflächen-Glykoprotein gp120 und dem Transmembranprotein gp41, die miteinander über Disulfidbrücken verbunden sind. Ersteres bindet an den Oberflächenrezeptor CD4, der im menschlichen Körper ausschließlich in T4-Lymphozyten und epidermalen Langerhanszellen vorkommt, während das Transmembranprotein zur Verschmelzung von Wirts- und viraler Membran benötigt wird, um das virale Erbgut und die nötigen Enzyme (Reverse Transkriptase, Integrase, Protease) einzuschleusen.



Nun wird durch die Reverse Transkriptase die einzelsträngige RNA in zunächst einzel-, dann doppelsträngige DNA transkribiert. Dabei verfügt die Erbinformation des Virus' über drei Hauptgene: Das gag (= gruppenspezifisches Antigen), mit dessen Hilfe das Kapsid gebildet wird, das pol-Gen, das für die Codierung der viralen Enzyme zuständig ist, und das env-Gen, welches das schon erwähnte Hüllprotein codiert. Die sieben restlichen Gene codieren unterschiedliche regulatorische Funktionen des Virus' (z.B. tat, rev). [25]

Die DNA wird als Provirus durch die Integrase in das Chromosom der Wirtszelle eingefügt, damit die Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle die Expression der Virusbausteine ausführen kann. Die gebildete mRNA erfüllt dabei gleich zwei Aufgaben: Eine Kopie wird zur Genexpression genutzt, die andere wird in neue Viruskörper eingebaut [16]. Das Genom des Provirus' wird von zwei LTR (= long terminal repeats)-Regionen flankiert, die der

Abb. 6 (links): Schematische Darstellung des Replikationszyklus' von HIV [11]

Prozessierung dienen. Die LTR am 5'-Ende kontrolliert die Genexpression, während die 3'-LTR-Region eine Polyadenylierung auslöst. Zwischen 5'-LTR und Genom des Provirus sitzt das Verpackungssignal Ψ , das von den gag-Proteinen erkannt wird und dafür sorgt, dass ausschließlich viruseigene RNA in die neuen Vironen eingebaut wird. ^[16]

Des Weiteren werden durch die Transkription regulatorisch aktive Proteine gebildet wie beispielsweise Tat, auf dessen Funktion im folgenden Abschnitt 3.2 näher eingegangen wird. Die HIV-Protease prozessiert die Vorläufer-Proteine, sogenannte Polyproteine, und macht sie dadurch zu ausgereiften, funktionsfähigen Proteinen, die für die Bestückung neuer Viruskörper notwendig sind, also sowohl strukturelle als auch enzymatische Virusbausteine.

Das neu gebildete Kapsid wird mit der neuen Virus-RNA in doppelter Ausführung sowie den nötigen Enzymen bestückt und durch eine Ausstülpung der Wirtszelle, die zuvor mit den entsprechenden viralen Membran- und Oberflächenproteinen gp120 und gp41 ausgestattet wurde, aus dem Cytosol der Wirtszelle ausgeschleust und durch Abschnürung freigesetzt. Dieser Schritt beschließt einen Infektions- und Replikationscyclus, und ein weiterer kann beginnen.

3.2 Die Transactivational Response Region (TAR)

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, wird das Genom des HI-Virus' nach dem Umschreiben von RNA in doppelsträngige DNA ins Wirtsgenom integriert und dort dann transkribiert. Aufgrund der ineffizienten viralen Promotoren ist die Transkription durch die wirtseigene Polymerase II aber nur langsam, außerdem kommt es oft zum Abbruch der Transkription. Um den Prozess zu beschleunigen, verfügt das Virus über das Adapterprotein Tat, das in spezifische Wechselwirkung mit der TAR-RNA (Transactivation Response Region) tritt, wodurch die Transkriptionsrate um das beinahe 100- fache erhöht wird. Die Wechselwirkung zwischen Tat und TAR leistet damit einen entscheidenden Beitrag zur Virusreplikation.

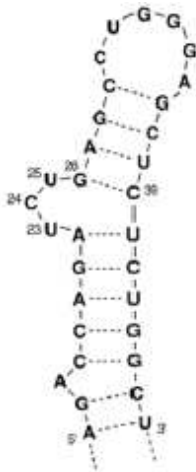


Abb.7: Hochkonservierter Teil der TAR-RNA mit bulge und hairpin-loop.

Tat bindet dabei in der bulge-Region der TAR-RNA – dabei bindet es insbesondere an U23 und die 4 Basenpaare, die den bulge flankieren - und interagiert zusätzlich mit der Transkriptionsmaschinerie der infizierten Zelle. ^[55] Eine weitere Beschleunigung der Transkription wird durch die Erweiterung des Tat-TAR-Komplexes mit Cyclin T1, welches Teil der humanen Transkriptionsmaschinerie ist, erreicht. Unklar ist, in welcher Reihenfolge der Komplex zusammentritt, obwohl deutlich wurde, dass die Bindungsaffinität von Tat an TAR durch Cyclin T1 verstärkt wird.

Theoretisch bieten sich mehrere Möglichkeiten, zu therapeutischen Zwecken in diesen Mechanismus einzugreifen: Einerseits lässt sich durch kompetitive Verdrängung von Tat aus dem Komplex dieser zerstören, andererseits kann man TAR angreifen und beispielsweise durch spezifische Moleküle (wie etwa DNA-Konjugate) spalten und dadurch zerstören.

Argininamid als Peptidomimetikum lagert sich in kompetitiver Weise an die Bindungsregion von Tat an und verdrängt dieses aus dem Komplex. Außerdem trägt die Verbindung auch dazu bei, den Mechanismus der Tat-TAR-Interaktion besser zu verstehen. Aminoglykoside wurden ebenfalls als Kompetitoren dieser Wechselwirkung getestet, wobei Neomycin mit einem IC_{50} -Wert von $0,92 \mu\text{M}$ am besten abschnitt. ^[58]

Verschiedene Bindungsstudien beispielsweise mit Mutanten von TAR zeigten, dass Neomycin unterhalb der bulge-Region an TAR bindet und somit nicht in der Bindungsregion von Tat. ^[59] Einen weiteren Hinweis darauf lieferten Erkenntnisse, die durch ESI-MS-Experimente gewonnen wurden: Neomycin lagert sich an den Tat-TAR-Duplex an und bildet so einen ternären Komplex, die Bindung ist folglich nicht kompetitiv. ^[60]

Durch eine resultierende konformationelle Änderung kommt es jedoch zu einer Verkürzung der Lebensdauer des Tat-TAR-Komplexes. Sehr frühe Studien mit Benzodiazepinen und Epoxysteroiden führten zu einer Verringerung der Virusreplikation, allerdings durch eine Bindung an das Tat-Peptid und nicht an die RNA-Struktur. ^[61] Neben den typischen Screeningsubstanzen wie den Aminoglykosiden wurden auch Intercalatoren als Kompetitoren des Tat-TAR-Komplexes identifiziert. Wilson und Mitarbeiter fanden durch UV-Schmelztemperaturbestimmungen heraus, dass Ethidium an TAR bindet. ^[62] Seither wurden viele intercalatorische Moleküle als TAR-Binder erkannt. Eine andere Gruppe von Liganden für diese Struktur sind Polypeptide, beispielsweise Tripeptide mit teilweise nicht natürlichen Aminosäuren, wie sie auch in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert worden sind. ^[21, 26, 27]

3.3 Das Verpackungssignal Ψ

Einen bestimmenden Schritt in der Replikation von HIV stellt die Verpackung seines Genoms in Form von mRNA in neue Nucleokapside dar. Dabei ist es wichtig, dass nur die Virus-RNA und nicht auch die RNA der Wirtszelle verpackt wird. Um dies sicher zu stellen, verfügt HIV über das Verpackungssignal Ψ , das sich in der 5'-UTR (= Untranslated Region) des ungespalteten HIV-1 befindet. Es verfügt über vier stem loops (SL1-SL4), die über zwei Zinkfingerstrukturen des NCp7 aus dem gag-Vorläufer-Polyprotein wechselwirken. Die hauptsächliche Wechselwirkung findet dabei zwischen den Zinkfingerstrukturen und SL2 und 3 statt, so dass es zu einem dimeren Komplex zwischen genomischer RNA und gag kommt. [63-67]

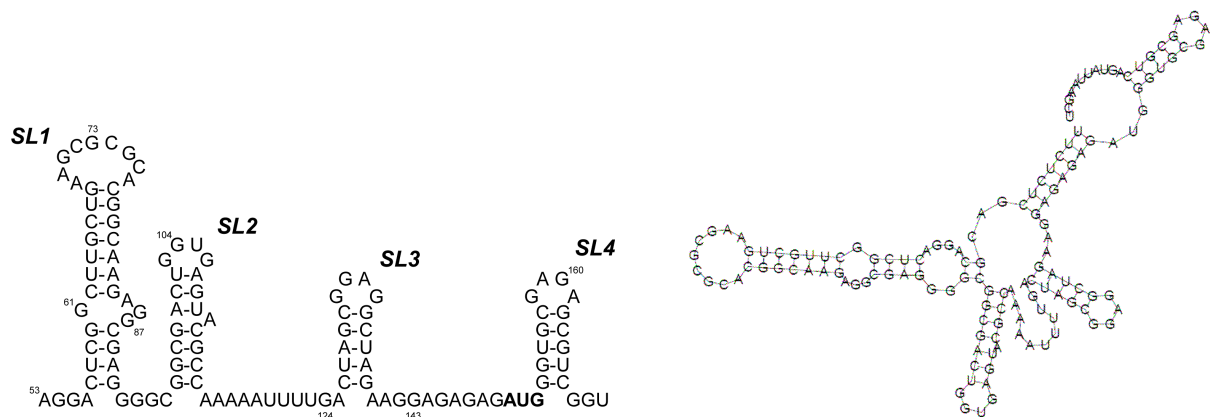


Abb. 8: Links: Angenommene Struktur der HIV- Ψ -RNA.^[15] Rechts: Mögliche Struktur des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PSI-Konstruktes (modelling mit *RNAfold*).^[23a-c]

Nur aufgrund dieser Wechselwirkung kann das virale Genom in die neuen Vironenkapside verpackt werden, folglich sollte eine Störung dieser Wechselwirkung die Virusreplikation behindern. Dietrich und Schwalbe *et. al.* fanden kürzlich durch Zell- und NMR-Studien hoch affine Peptide, die in Zellkultur-Assays antiviral durch Bindung an Ψ wirken.^[15]

In Abschnitt 5.1.11 („Spaltungsexperimente der Peptidkonjugate an Vollängen-RNA“) wird näher auf die Bemühungen, die Ψ -RNA im Rahmen dieser Arbeit mittels Peptidkonjugaten zu zerstören, eingegangen.

3.4 Inhibierungsmöglichkeiten an HIV

Ein Durchbruch in der Bekämpfung von HIV war die Entwicklung der sogenannten **HAART** (highly active anti retroviral therapy), die 1996 ins Leben gerufen wurde. Zu Beginn war allerdings eine Batterie an Pillen nötig, um genau zu sein: 20 Stück täglich. Diese Menge konnte dank Kombinationspräparaten drastisch reduziert werden. Heute verfügt man über Medikamente wie Atripla, die einmal täglich verabreicht werden. Es ist das erste Präparat, das drei Wirkstoffklassen vereint: Nucleosidische Reverse Transkriptase-Hemmer, Nucleotidische Reverse Transkriptase-Hemmer und Nicht-Nucleosidische Reverse Transkriptase-Hemmer. Die oftmals eingesetzten Nucleosid-Analoga führen leider häufig zu Resistenzen, da HIV unter ihrer Einwirkung eine Codon-Mutation in einem Bereich entwickelt, der für die Reverse Transkriptase zuständig ist. Diese Tatsache wird in der HAART zum Positiven genutzt: Durch Verabreichung zweier Nucleosid-Analoga und eines Nicht-nucleosidischen Reverse Transkriptase-Hemmers sollen im Bereich des pol-Gens derart viele Mutationen ausgelöst werden, dass die Reverse Transkriptase funktionsunfähig wird und der resultierenden Mutantentyp sich nicht weiter vermehren kann. ^[25]

3.4.1 Inhibition der Genomreplikation

Vor der Translation viraler Proteine muss zunächst das Genom des Virus' in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mit Hilfe der Reversen Transkriptase, einem viruseigenem Enzym, das das Virus bei seiner Einschleusung in die Wirtszelle einbringt. Da dieses Enzym im gesunden Organismus nicht vorkommt, stellt es das ideale Ziel für die Inhibierung des Virus' dar. Viele der bereits in der HIV-Therapie eingesetzten Wirkstoff-Klassen zielen auf dieses Enzym.

Das allererste Medikament gegen HIV gehörte zur Klasse der **Nucleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren** (NRTIs). Erst durch dreifache Phosphorylierung werden sie zu aktiven Metaboliten. Diese wirken dann in kompetitiver Weise als Inhibitoren der reversen Transkriptase, da sie für letztere eine Alternative zu den natürlichen dNTPs darstellen und zum Abbruch der Kettenverlängerung führen.

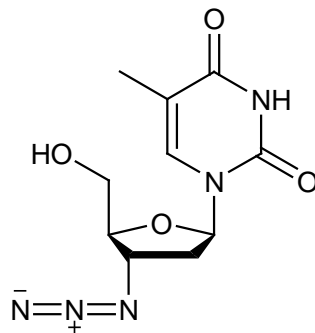


Abb. 9: Zidovudin (Azidothymidin, AZT).

Die Klasse der **Nucleotidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren** (NtRTIs) wirkt in ähnlicher Weise, wobei sie im Unterschied zu den NRTIs über eine Phosphatgruppe verfügt. Diese ist analog zur natürlichen Phosphateinheit, wodurch nur noch zwei Phosphorylierungsschritte nötig sind, um den aktiven Metaboliten zu erzeugen. Dies hat zwei Vorteile: 1.) Es kann die Nucleosid-Kinase-Reaktion umgangen werden, die in anderen Fällen eine Begrenzung der Wirkstoffaktivität verursacht, und 2.) kann die Phosphatgruppe nicht von Esterasen gespalten werden, was ansonsten die Monophosphat-didesoxy-NTPs in Nucleotide umwandeln und ebenfalls zur Inaktivierung des Wirkstoffes führen würde.

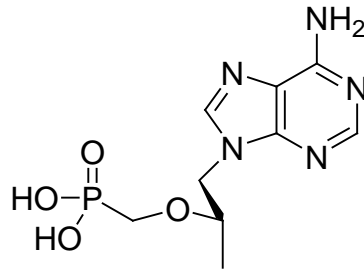


Abb. 10: Tenofovir (Bsp. für einen NtRTI).

Eine andere Gruppe von Wirkstoffen bilden die **Nicht-Nucleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren** (NNRTIs). Sie wurden im Jahr 1990 entdeckt und interagieren mit einer allosterischen Bindungsstelle der RT (Reverse Transkriptase), die durch Bindung von Liganden freigelegt wird. ^[68] Leider kommt es dabei relativ schnell zu Resistenzen, da der Bereich der Bindungsstelle häufig zu Mutationen der Aminosäuresequenz neigt.

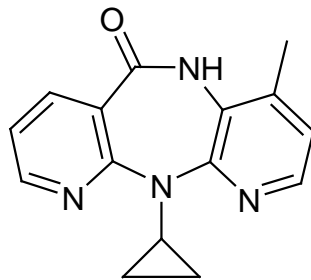


Abb.11: Nevirapin (Bsp. für einen NNRTI).

3.4.2 Protease-Inhibitoren

Eine weitere Klasse von HIV-Inhibitoren attackiert die HIV-Protease, die zur Prozessierung der Vorläufer-Proteine gag und pol zu ausgereiften Proteinen benötigt wird - also strukturelle Kapsid Proteine, Nucleokapsid und virale Enzyme. Diese Protease-Inhibitoren verfügen zumeist über eine Hydroxyethyleinheit, welche die Peptidbindungen des gag-pol-Polyproteinvorläufers imitieren (also Peptidomimetika). Sie binden in kompetitiver Weise an die Protease und verdrängen so das natürliche Substrat aus dem Komplex, das dann nicht prozessiert werden kann. Die Protease kann wegen der Blockierung durch die Inhibitoren seine Funktion nicht erfüllen.

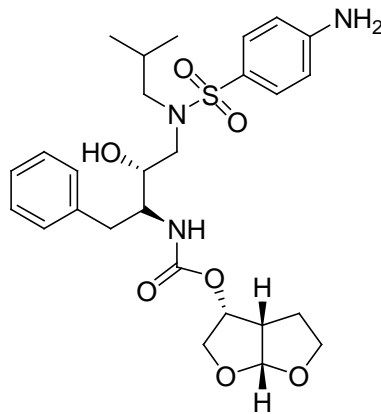


Abb. 12: Darunavir (Bsp. eines Protease-Inhibitors).

3.4.3 Eintrittsinhibitoren

Für den Eintritt des Virus' in die Wirtszelle muss es nicht nur an den Primärrezeptor CD4, sondern auch an Corezeptoren wie CCR5 oder CXCR4 binden. Aus diesem Grund sind die letzteren beiden Rezeptortypen attraktive Angriffspunkte für die HIV-Inhibition. Virale Eintrittsinhibitoren sollen schon zu Beginn des Infektionszyklus das Virus daran hindern, seine funktionellen Bestandteile in die Wirtszelle einzuschleusen.

Bei **Fusionsinhibitoren** wie z.B. Enfuvirtid (Acetyl-YTSLIHSLLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-amid) handelt es sich um Polypeptide, die eine Teildomäne der Glycoproteine (gp41) von HIV nachahmen und damit deren Funktion blockieren. Leider kommt es schnell zu Resistenzen durch Mutationen und außerdem muss der Wirkstoff wegen seiner peptidischen Natur zweimal täglich appliziert werden. Im Zusammenspiel mit anderen Wirkstoffen hat diese Inhibitor-Klasse aber bisher gute Erfolge gezeigt.

Die **Corezeptor-Antagonisten** hingegen greifen zeitlich gesehen dann an, wenn das Hüllprotein gp120 zwar bereits an den Primärrezeptor gebunden hat, aber noch bevor gp41 die Fusionspeptide in die Zellmembran der Wirtszelle hat einschleusen können.

Wie bereits oben erwähnt, kommen für HIV-1 zwei unterschiedliche Corezeptortypen in Frage, wobei sich die Stämme des Virus' auch durch ihre Rezeptorbevorzugung unterscheiden lassen. Weil der CCR5-Rezeptor in einigen Menschen durch eine Genmutation (Aminosäuredeletion $\Delta 32$) nicht vorkommt, richtete sich das Augenmerk der Forschung in der Vergangenheit besonders auf eben diesen. Beispiele für rezeptorselektive Antagonisten sind Maraviroc (CCR5) und Vicriviroc (CXCR4). Beide Antagonisten binden an die jeweiligen Rezeptoren und blockieren somit den Eintritt von HIV in die zu infizierende Zelle. Resistenzen mancher Virusstämme lassen sich mit der Tatsache erklären, dass die Viren trotz blockiertem Corezeptor diesen für das Eindringen in die Zelle nutzen können.

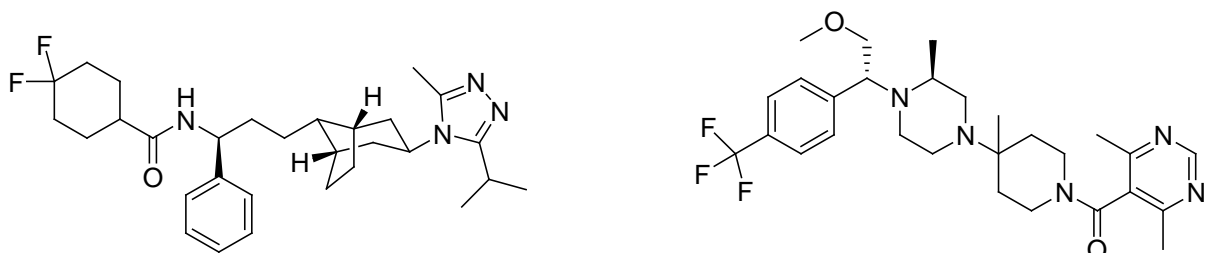


Abb. 13: Maraviroc (links) und Vicriviroc (rechts).

Kürzlich entdeckte eine italienische Forschergruppe, dass sich durch Einsetzen von MicroRNA die Bildung des Co-Rezeptors CXCR4 hemmen lässt.^[28]

3.4.4 Integrase-Inhibitoren

HIV-Integrase-Inhibitoren verhindern den Einbau des proviralen Genoms von HIV als doppelsträngige DNA in das Wirtsgenom. Dadurch verliert das virale Genom Stabilität und die Effizienz der Genexpression und somit auch die Virusreplikation wird reduziert.

Diese Art von HIV-Inhibitoren wie beispielsweise Raltegravir zeigen erstaunliche Potenz bei der Virusreduktion und zwar auch in der Monotherapie.

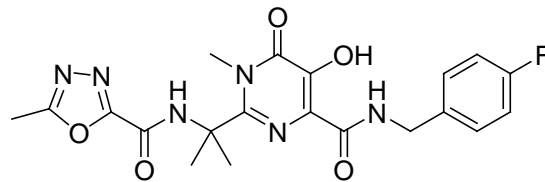


Abb. 14: Raltegravir.

3.4.5 Andere HIV-Inhibitoren

Neben den genannten Wirkstoffformen gibt es auch andere Möglichkeiten, das HI-Virus zu inhibieren. HIV-Reifungsinhibitoren wie Bevirimat greifen in einem späten Prozessierungsschritt des gag-Proteins ein, wenn während der Ausreifung des Kapsid-Vorläufers (CA-SP1) die Spaltung desselben nötig ist. Die Vironen, die mit Bevirimat behandelt wurden, zeigen eine abnorme Kapsidmorphologie und sind nicht länger infektiös. Der Wirkstoff befindet sich allerdings noch in klinischen Studien.^[11]

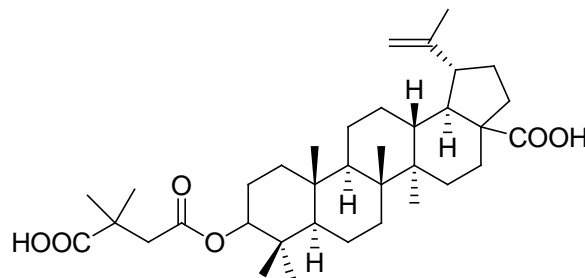


Abb. 15: Bevirimat.

Zugang zu anderen Inhibitorklassen ist noch nicht so stark erschlossen, diese bieten aber denkbare Alternativen zu den etablierten Methoden. Besonders in Hinblick auf Resistenzen durch Mutationen des Virus' u. ä. ist eine ständige Erweiterung des vorhandenen Medikamenten-Repertoires sinnvoll und erstrebenswert.

4 Künstliche Ribonucleasen

Natürlich vorkommende Ribonucleasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von RNA (s.a. Abb. 4 und Schema 1) katalysieren und somit einen Abbau derselben unter physiologischen Bedingungen ermöglichen. Es kann zwischen metallhaltigen und metallfreien Ribonucleasen unterschieden werden, wobei die Strukturmerkmale beider Klassen nahezu identisch sind.

Allesamt arbeiten sie in ihren aktiven Zentren mit Aminosäuren, deren Reste zu allen drei Katalysewegen befähigt sind (d.h. zur Säure-/Basenkatalyse und zur elektrophilen Katalyse, vgl. Abb. 5), oft finden Lysin, Arginin und Histidin Verwendung (Abb. 16). Diese besitzen eine Amino-, eine Guanidinium- bzw. eine Imidazolfunktion, die sich jeweils leicht protonieren, aber dann auch wieder deprotonieren lassen. Dadurch können sie in Kooperation mit weiteren Aminosäureresten im aktiven Zentrum des Enzyms alle drei Katalysewege repräsentieren.

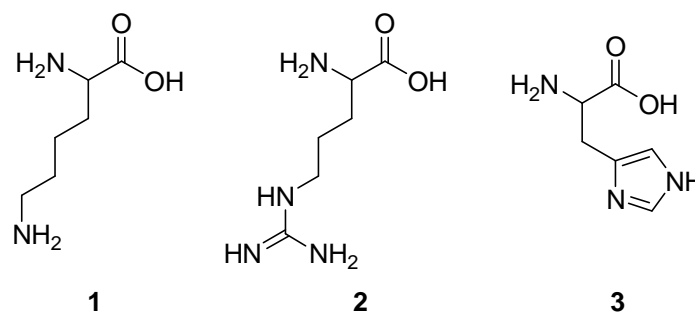


Abb. 16: Aminosäuren Lysin (1), Arginin (2) und Histidin (3)

Die Endonuclease RNase A beispielsweise arbeitet mit zwei Histidinen und einem Lysin im aktiven Zentrum. His-12 deprotoniert zunächst die 2'-OH-Gruppe und fungiert als generelle Base, His-119 steht als generelle Säure zur Verfügung und Lys-41 kann als generelle Säure oder als Elektrophil zur Stabilisierung des Übergangszustandes bzw. der Zwischenstufe beitragen. ^[69]

Als Beispiel einer Metallonuclease kann die Staphylokokken–Nuclease genannt werden. Wie bereits erwähnt arbeitet dieser Typ von Nucleasen ebenfalls mit Aminosäuren, jedoch nutzen sie zusätzlich Metallionen, was ihre Katalysefähigkeit deutlich verstärkt. Die Staphylokokken–Nuclease bedient sich dabei eines Ca^{2+} -Ions in Wechselwirkung mit zwei Guanidiniumresten, wie sich in Untersuchungen an zwei Mutanten dieses Enzyms feststellen ließ. ^[70]

Künstliche Ribonucleasen

Der Entwurf von Enzymmimetika – wie z.B. künstlichen Ribonucleasen – beruht oft auf den Erkenntnissen, die man aus Studien mit den natürlichen Vorbildern gewinnt.

4.1 Unselektive künstliche Ribonucleasen

Analog zu den natürlich vorkommenden Ribonucleasen lässt sich bei den künstlichen ebenfalls zwischen metallhaltigen und metallfreien unterscheiden.

Bei den metallhaltigen künstlichen Ribonucleasen finden Ionen der Hauptgruppenelemente oder auch Übergangsmetallionen wie Zn^{2+} oder Cu^{2+} Verwendung, aber auch Ionen aus der Gruppe der Lanthanide, wie z.B. Europium(III)-Ionen. Bei den zuletzt genannten handelt es sich um eine der erfolgreichsten Spalterklassen,^[71] da sie durch ihre hohe Ladung eine starke Affinität zum negativ geladenen RNA-Rückgrat aufweisen und außerdem besonders geeignet für elektrophile Katalyse sind. Auf sie wird in Abschnitt 4.2 ("Selektive künstliche Ribonucleasen") genauer eingegangen.

Ein direkter Vergleich der Spaltungsausbeuten ist bei RNA-Substraten unterschiedlicher Länge schwierig: Eine ribosomale RNA kann dabei über einige 1000 Nucleotide und entsprechend viele spaltbare Bindungen verfügen, während beispielsweise ApA nur eine spaltbare Bindung aufweist. Bei unstrukturierter RNA könnte man in nächster Näherung die Spaltungsausbeute durch die Anzahl der Bindungen teilen, sofern man davon ausgehen kann, dass diese nur von der Anzahl der Bindungen abhängt. Da aber bei langen Ziel-RNAs auch andere Faktoren wie z.B. konformationelle Effekte in die Spaltungsausbeute hinein spielen, werden im Folgenden die Ausbeuten wie in den jeweiligen Literaturstellen angegeben.

Als Beispiel für ein unselektives Enzymmimetikum mit Metallzentrum soll an dieser Stelle die von Anslyn und Mitarbeitern synthetisierte Verbindung **4** vorgestellt werden.^[72] Es wurde das metallfreie Derivat **4a** mit der als Zn^{2+} -Chelat vorliegenden Verbindung **4b** in Tests verglichen.

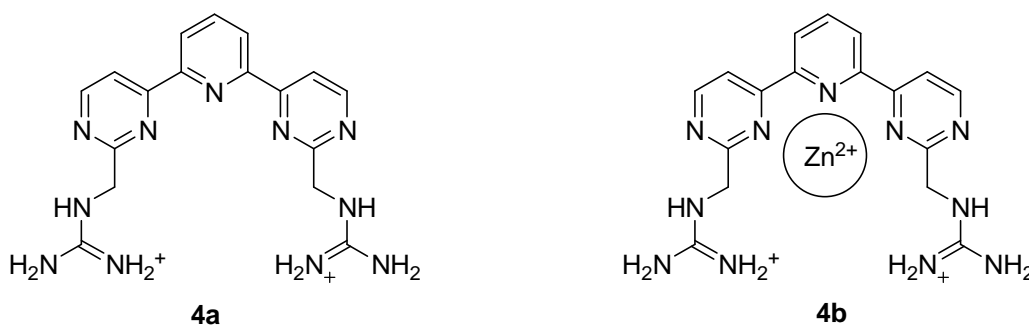


Abb. 17: RNA- Spalter nach Anslyn *et. al.*

Künstliche Ribonucleasen

Als Substrat diente das Dinucleosid ApA unter den folgenden experimentellen Bedingungen: 5 mM Spalter, 0.05 mM Substrat, pH 7.4, 37 °C in 10 mM HEPES-gepuffertem Wasser. Es konnte gezeigt werden, dass die zinkhaltige Verbindung **4b** 105-mal effektiver in der Hydrolyse des Substrates zu Monoadenosin war als das metallfreie Derivat **4a**. Abbildung 18 stellt den vorgeschlagenen Mechanismus der Hydrolyse dar.

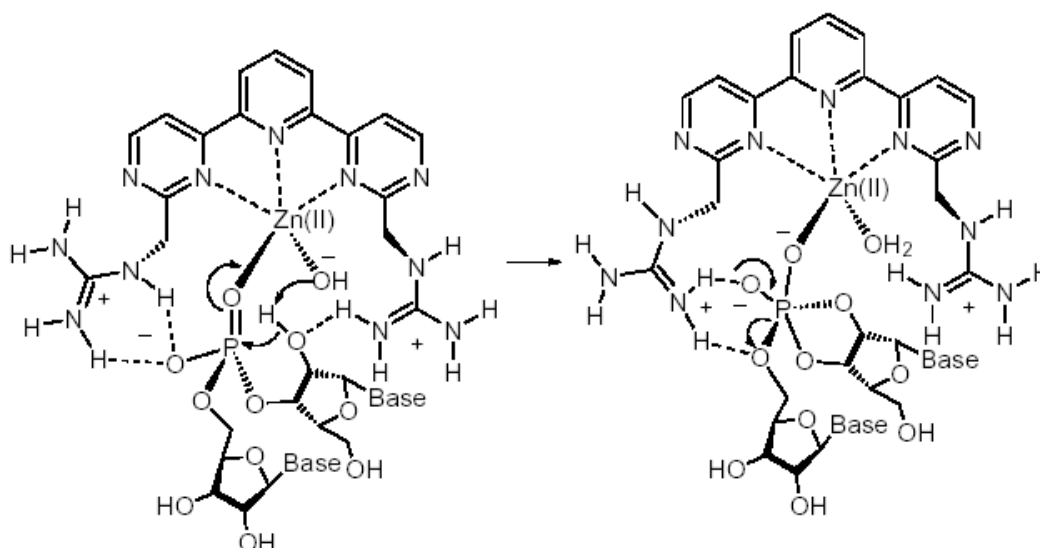


Abb. 18: Vorgeschlagener Mechanismus der Katalyse durch **4b**.^[29]

Das am Zn^{2+} -Zentrum sitzende Hydroxylion stammt aus dem Wasser des Reaktionsmilieus und wird als generelle Base zur Deprotonierung der 2'-OH-Gruppe des Substrates benötigt. Die Protonen der Guanidiniumgruppen dienen zunächst als Wasserstoffbrückendonoren, um das monoanionische Dinucleosid zu binden. Im Folgeschritt dient eine der beiden Guanidiniumeinheiten als generelle Säure zur Protonierung der Abgangsgruppe. Das Zink(II)-Zentrum des Katalysators stabilisiert als Elektrophil den trigonal bipyramidalen Übergangszustand (bzw. die Zwischenstufe).

Auch metallfreie Verbindungen können potente RNA-Spalter sein. Die einfachsten Vertreter dieser Klasse sind aliphatische Mono- oder Polyamine, wie z.B. 1,2-Ethylendiamin. Bei der katalytisch aktiven Spezies handelt es sich wohl um das Monokation der Verbindung, da selbst in neutraler Umgebung der Anteil der ungeladenen Spezies zu gering ist, um an der Reaktion teilzunehmen. Auf diese Weise kann das Molekül gleichzeitig als generelle Base und Säure dienen, weiterhin

Künstliche Ribonucleasen

kann durch die positive Ladung eine elektrophile Stabilisierung des Übergangszustandes (bzw. der Zwischenstufe) stattfinden. ^[73]

Die Effektivität von Diaminen als RNA-Spalter kann durch das Anhängen eines Intercalators noch erhöht werden. ^[74] Shinozuka *et. al.* wählten als intercalatorisches System eine Acridiniumeinheit (**5**).

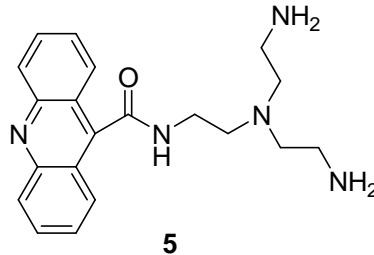


Abb. 19: RNA- Spalter nach Shinozuka *et. al.*

Diese Verbindung war in der Lage, 40 % einer 16S/23S rRNA innerhalb einer Stunde bei einer Konzentration von 1 mmol/L, 37 °C und pH 7.4 zu spalten.

Komiyama und Mitarbeiter konnten erstmals zeigen, dass Carboxyl- und Aminogruppen in Kooperation als RNA-Spalter wirken. Als intercalatorisches System wurde Anthrachinon verwendet. Verbindungen **6a** (Glycinderivat) und **6b** (Aminodiessigsäurederivat) spalteten tRNA^{Phe}. ^[75] Jedoch ist eine gewisse beobachtete Regioselektivität der Spaltung nicht zu erklären, **6a** spaltete den RNA-Strang an CpA-Stellen, während **6b** an GpN-Stellen (N= irgendein Nucleosid) schnitt.

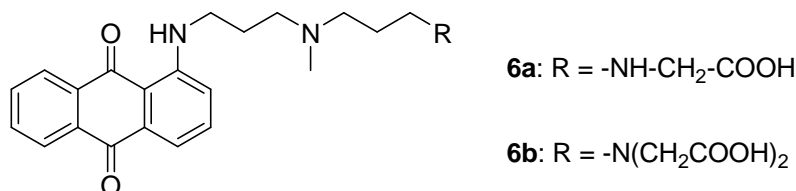


Abb. 20: Verbindungen **6a** und **6b** (Komiyama).

Neben RNA-Spaltern, die Amino- oder Guanidiniumgruppen tragen, stoßen auch solche mit Imidazolfunktionen auf großes Interesse, leitet sich dieses Strukturmerkmal doch von der Aminosäure Histidin ab, die, wie bereits erwähnt, in verschiedenen Enzymen als Teil des aktiven Zentrums Verwendung findet.

Bisimidazolid (bzw. Guanidiniumanalogon) **7** von der Gruppe um Karube spaltete ApA bei pH 7.5 und 50 °C in 4 Tagen zu 30%. ^[76]

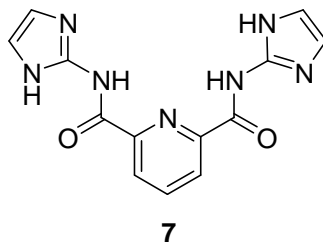


Abb. 21: RNA-Salter nach Karube und Mitarbeitern.

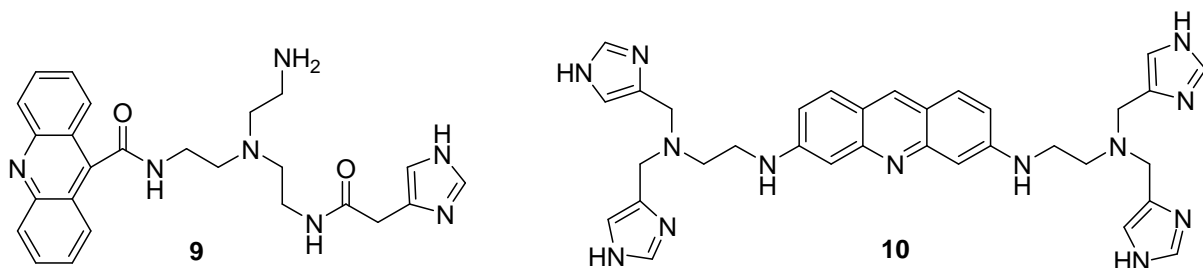
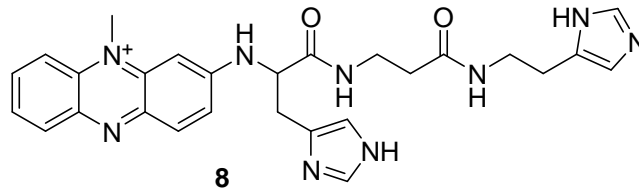


Abb. 22: RNA- Spalter auf Imidazol- Basis mit intercalatorischen Bausteinen.

Deutlich effektiver waren 4-Imidazolyl-haltige Verbindungen, die zusätzlich über ein intercalatorisches Strukturmotiv verfügten (**8-10**). Womöglich positioniert sich der aromatische, planare Baustein in einem vorgelagerten Gleichgewicht durch base-stacking zwischen die Basen des RNA-Stranges, während die Imidazoleinheiten bzw. die Aminoeinheit als eigentliche Katalysatoren aktiv werden.

Das Phenazinderivat **8** aus der Gruppe um Vlassov zeigte Spaltraten von 50% an einem tRNA^{Asp}-Transkript innerhalb von 12 h bei 37 °C und pH 7 (Konzentration Spalter: 1 mmol/L).^[77] Besonders schnell war die Spaltung an der Verbindung zwischen stem- und loop-Region.

Verbindung **9**, welche über jeweils eine Imidazol- und eine Aminogruppe als katalytische Einheiten verfügt, zeigte Spaltungsraten von 60% für eine 16S/23S rRNA innerhalb nur einer Stunde bei 37 °C und pH 7.4. Die Konzentration des Spalters lag ebenfalls bei 1 mM.^[74] Auch Tetrakisimidazolyl-Derivat **10** spaltete einen Großteil einer tRNA in 24 h bei pH 7.^[78]

Eine Kooperation mindestens zweier katalytischer Gruppen scheint also ein besonders Erfolg versprechendes Konzept zu sein. Während eine Gruppe als generelle Säure fungiert, kann die andere die Rolle einer generellen Base übernehmen und natürlich umgekehrt (sofern sie strukturell identisch sind).

Künstliche Ribonucleasen

Ammonium- oder Imidazoliumgruppen können durch ihre Ladung als elektrophile Katalysatoren dienen, während die zweite vorhandene Einheit beispielsweise die 2'-OH-Gruppe deprotoniert. Die positiv geladenen Gruppen können auch als generelle Säuren fungieren und die Abgangsgruppe protonieren. [6]

Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde eine Reihe von metallfreien unselektiven Ribonucleasemimetika hergestellt, die unter anderem über Guanidinium- und Imidazoliumgruppen verfügen und die RNA-Hydrolyse durch Säure- und elektrophile Katalyse beschleunigen können. [8]

In Modellstudien an Cyclophosphaten in DMF als Solvens zeigten sich Verbindung **11** sowie Verbindung **12** als aktive Katalysatoren, wobei **12** aufgrund der höheren Acidität der Imidazoliumeinheiten [79] besser als generelle Säure fungieren kann und daher **11** um einiges übertraf.

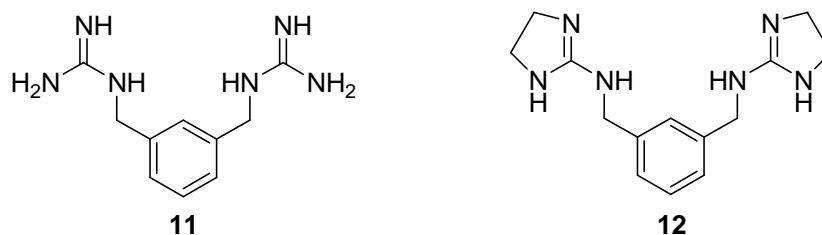


Abb. 23: Strukturen der von Göbel und Mitarbeitern verwendeten Katalysatoren.

Vergleicht man die beiden jedoch in Wasser als Reaktionsmedium, so sind beide in etwa gleich inaktiv. Diese Beobachtung kann durch die pK_a -Werte dieser Verbindungen in Wasser erklärt werden: Sie liegen zwischen 13 und 14 (für unsubstituiertes Guanidin liegt der pK_a -Wert bei 14.4 [80]), was zur Folge hat, dass Guanidin- bzw. Imidazolgruppen in Wasser bei einem pH von 7 oder 7.4 (physiologische Bedingungen) vollständig protoniert vorliegen. Dadurch können sie ausschließlich einen Beitrag zur elektrophilen Katalyse leisten und somit kaum zur Beschleunigung der Reaktion beitragen.

Ganz anders verhält es sich mit Aminobenzimidazoleinheiten. Ihr pK_a -Wert liegt in Wasser bei etwa 7 (7.45 für unsubstituiertes 2-Aminobenzimidazol in Wasser bei 25°C [81]), was sie in die Lage versetzt, auch unter physiologischen Bedingungen zusätzlich als generelle Säure zu fungieren und Protonen abzugeben. Die erwartete Verbesserung der Katalysebeschleunigung durch 2-Aminobenzimidazole konnte in

Künstliche Ribonucleasen

RNA-Spaltungsexperimenten unter Verwendung entsprechender künstlicher RNA-Spalter, die in unserer Gruppe synthetisiert worden waren, belegt werden. [8]

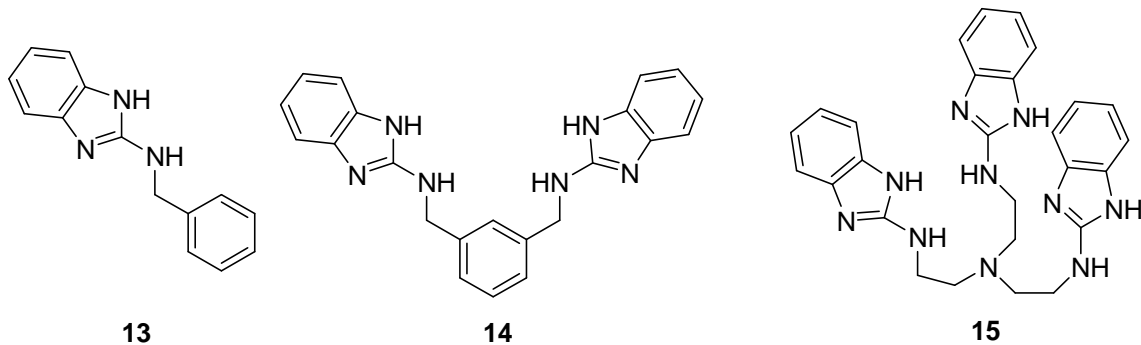


Abb. 24: Molekülstrukturen der RNA-Hydrolyse-Katalysatoren **13**, **14** und **15**.

Abbildung 24 zeigt drei mit 2-Aminobenzimidazoleinheiten ausgerüstete RNA-Hydrolyse-Katalysatoren. In Experimenten an einem TAR-RNA-Modell (**16**) und einem linearen RNA-Substrat konnte gezeigt werden, dass die Spaltaktivität der Verbindungen **13-15** in einer nicht linearen Weise von der Anzahl der 2-Aminobenzimidazoleinheiten abhing.

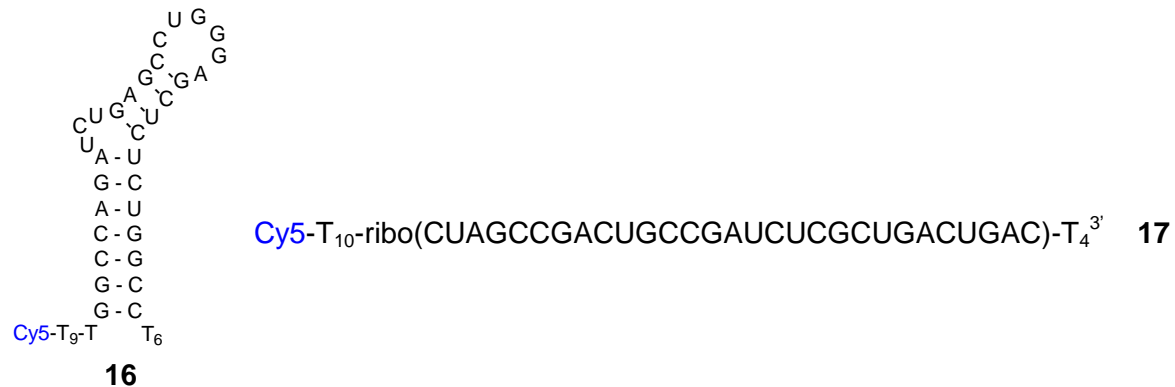


Abb. 25: Verwendete RNA Substrate: 31mer TAR-RNA-Modell **16** und lineares 29mer **17**

Die untersuchten Verbindungen wurden wegen der besseren Löslichkeit in Wasser als Hydrochlorid-Salze getestet (**a**). Folgende Bedingungen wurden für die Experimente gewählt: 50 mM Tris-HCl Puffer, pH 6.0, 0.01% SDS, 37 °C und 20 h Inkubationszeit. Die Spaltungsausbeuten sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Künstliche Ribonucleasen

RNA-Hydrolyse-Katalysator	Lineares 29mer	31mer TAR-RNA-Modell
13a	4.8 %	2.4 %
14a	23.1 %	15.3 %
15a	92.9 %	87.6 %

Tab. 1: gemittelte Werte der Spaltungsexperimente in % des jeweiligen gespaltenen Substrates; experimentelle Bedingungen sind im Text angegeben; es wurde jeweils das HCl-Salz (a) eingesetzt.

Um Artefakte in den Experimenten auszuschließen, die ggf. durch Kontaminationen in Form von RNasen verursacht sein könnten, wurden zusätzlich Spaltungstests mit einem Substrat durchgeführt, welches über enantiomere Zuckerbausteine verfügte, d.h. es wurde bei der Synthese dieser RNA statt der D-Ribose die L-Form verwendet. Dieses war von der RNA-Sequenz her identisch mit Substrat **16** (Abb. 25) und wird von nun an mit **16'** bezeichnet. Streng genommen handelt es sich nicht um das Enantiomer von **16**, weil die Poly-T-Platzhalter (T₁₀ bzw. T₆) an den Enden der Sequenz DNA-Bausteine mit der natürlich vorkommenden D-Ribose sind. Die achiralen künstlichen Ribonucleasen waren selbstverständlich in der Lage, auch dieses Substrat zu spalten, während natürliche RNasen als Kontaminationen diese RNA nicht als Substrat erkennen und abbauen können.

FCS-Messungen (fluorescence correlation spectroscopy, s. auch Abschnitt 5.2.10) mit Verbindung **15a** und **b** ergaben, dass sie zusammen mit Oligonucleotiden Aggregate bilden. Dennoch waren beide Verbindungen bis hin zu geringen Konzentrationen katalytisch aktiv, in denen keine Aggregation mehr auftrat.

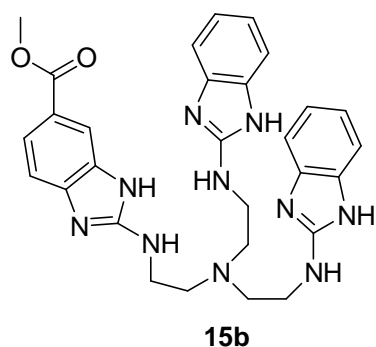


Abb. 26: Trisbenzimidazol-Methylester **15b**.

Konjugate der Verbindung **15b** (Trisbenzimidazol-Methylester) wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Andere Untersuchungen zu Oligonucleotidkonjugaten dieses Spalters wurden in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der Doktorarbeiten von C. Gnaccharini und S. Peter detailliert beschrieben und werden in Abschnitt 5.1 zusammengefasst.

4.2 Selektive künstliche Ribonucleasen

Selektive künstliche Ribonucleasen sind aus unterschiedlichen Gründen Gegenstand der aktuellen Forschung. Zum einen könnten sie als Enzym-Analoga, die eventuell robuster und leichter zugänglich als ihre natürlichen Vorbilder sind, in der Biotechnik zum Einsatz kommen. Zum anderen könnten sie als Mittel in der antiviralen Therapie (Kapitel 2.4 und 3.4) oder auch in der Chemotherapie zur Bekämpfung von Tumoren dienen, auch wenn es auf diesem Sektor noch Probleme wie z. B. mangelnde Zellmembrangängigkeit zu überwinden gilt.

Künstliche Ribonucleasen bestehen grundsätzlich aus einem Sequenz- oder Struktur-erkennenden Merkmal sowie einer katalytisch aktiven Gruppe, die in der Lage ist, RNA gezielt abzubauen. Man kann sie deshalb auch als Konjugate dieser beiden Teilmerkmale bezeichnen. Letztere wurden für sich genommen im vorangehenden Abschnitt beschrieben (Kapitel 4.1).

Auch hier gibt es Vorbilder aus der Natur: Die RNase H, ein intrazellulär vorkommendes Enzym, wird durch Oligodesoxynucleotide (ODN) aktiviert. Es kommt zur Hybridisierung der Ziel-mRNA mit dem ODN und die RNase H baut daraufhin die RNA- Komponente dieses Hybrids ab. Es kommt anschließend zur „Entlassung“ des ODN aus dem Duplex. ^[82]

Künstliche Ribonucleasen sollten ebenfalls in der Lage sein, katalytisch und nicht stöchiometrisch am Abbau einer Ziel-RNA teilzunehmen, der Sequenz-erkennende Teil der Konjugate sollte dazu einen stärkeren Duplex mit der Ziel-RNA bilden als mit der „geschnittenen“. Darüber hinaus ist es von Vorteil, wenn die Sequenz-erkennende Einheit der künstlichen Ribonuclease die abzubauen RNA so bindet, dass es zur Ausbildung einer Sekundärstruktur kommt, die die Hydrolyse erleichtert, z.B. durch die Formierung eines bulges oder eines loops. Dies würde nach der Spaltung des RNA-Stranges außerdem zu einer Destabilisierung des Duplexes führen und die Freisetzung der künstlichen Ribonuclease begünstigen. Dadurch würde ein Turnover erzielt, d.h. es käme auch bei einer tatsächlich katalytischen Menge an Ribonuclease idealerweise zu einem vollständigen Abbau der Substrat-RNA.

Nicht unerwähnt soll die Problematik durch Kontamination mit natürlichen RNasen bleiben. In Spaltungsexperimenten, die durch Mitarbeiter unseres Arbeitskreises durchgeführt wurden, konnten immer wieder Pyrimidin-A-spezifische

Spaltungsmuster beobachtet werden. Dieser Effekt trat jedoch niemals bei Verwendung von Ziel-RNA mit enantiomeren Zucker-Bausteinen ausgemerzt auf. ^[135]

Da die achiralen Katalysatoren Bild und Spiegelbild der RNA nicht unterscheiden können, müssten die Spaltmuster bis ins Detail übereinstimmen, was bei der Pyrimidin-A-Spaltung nicht der Fall war. Dies zeigt zwingend, dass in unseren Experimenten die Fälle überschießender Pyrimidin-A-Spaltungen durch enzymatische Kontaminationen ausgelöst wurden. Da in der Literatur in der Regel keine vergleichbaren Kontrollen vorgenommen wurden, ist zu befürchten, dass hinter „C-A-spezifischen Spaltern“ in Wirklichkeit Kontaminationseffekte stecken.

Viele verschiedene Arbeitsgruppen haben sich bereits diesem Gebiet gewidmet, dementsprechend variierend sind die experimentellen Bedingungen, unter denen gearbeitet wurde, so dass ein strikter quantitativer Vergleich der Ergebnisse erheblich erschwert wird. Dennoch sollen im Folgenden die bisher gemachten Fortschritte auf diesem Gebiet zusammengefasst werden.

4.2.1 Metallhaltige künstliche Ribonucleasen

4.2.1.1 Metallhaltige Ribonucleasen auf Basis von Lanthanid – Ionen

Schon lange ist bekannt, dass Lanthanid-Ionen äußerst effektiv die Hydrolyse von RNA katalysieren. [83,84] Aus diesem Grund lag es nahe, dieselben in künstliche Ribonucleasen zu integrieren.

Die Gruppe um Komiyama [85] konnte als erste zeigen, dass dies sequenzselektiv durch Verwendung eines 15mer ODN mit einer Aminodiessigsäure-Einheit am 5'-Ende möglich ist, die ein Lu^{3+} chelatisiert (Abb. 27).

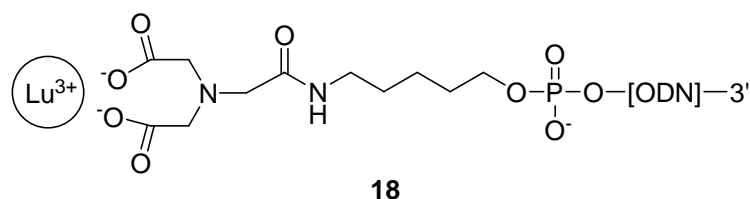


Abb. 27: Lu^{3+} -Chelat-Konjugat **18** nach Komiyama.

Die Spaltaktivität dieses Konjugates ließ trotzdem eher zu wünschen übrig. Bei dem verwendeten Substrat handelte es sich um eine 39mer RNA, die hauptsächlich an einer einzelnen Phosphodiesterbindung geschnitten wurde, die sich zwei Nucleotide weiter Richtung 3'-Terminus nach dem Ende des Konjugat-RNA-Duplexes befand. Die Halbwertszeit lag bei einem ca. 30-fachen Überschuss an Ribonuclease (10 μM Katalysator, 0,3 μM Substrat), pH 8 und 37 °C bei 30 Stunden. Legt man bei einer Extrapolation auf andere pH-Werte eine Kinetik 1. Ordnung zugrunde, so würde man bei einem pH von 7,5 – also im physiologischen Bereich – auf eine Halbwertszeit von etwa 100 Stunden kommen.^[1] Analoge Komplexe mit anderen Ionen wurden ebenfalls untersucht, wobei der entsprechende Eu^{3+} -Komplex in etwa genauso, der analoge La^{3+} -Komplex nur etwa halb so gut spaltete.

Die reduzierte Aktivität dieses Ribonuclease-Typs ist auf die negativ geladenen Carboxylatgruppen zurückzuführen, die zwar sehr wohl in der Lage sind, die Lanthanid-Ionen stark zu chelatisieren, diese aber durch ihre Ladung in ihrer Aktivität deutlich schwächen.

Aus diesem Grund wurden Konjugate mit neutralen, makrozyclischen Liganden attraktiv für RNA-Spaltungsuntersuchungen. Auf diesem Gebiet haben sich zwei Gruppen besonders hervorgetan: Häner *et. al.*, die Pyridin-Cyclophane (Abb. 28) [86]

Künstliche Ribonucleasen

herstellten sowie Sessler und Mitarbeiter, die Konjugate mit Texaphyrinen synthetisierten (Abb. 29).^[87,88]

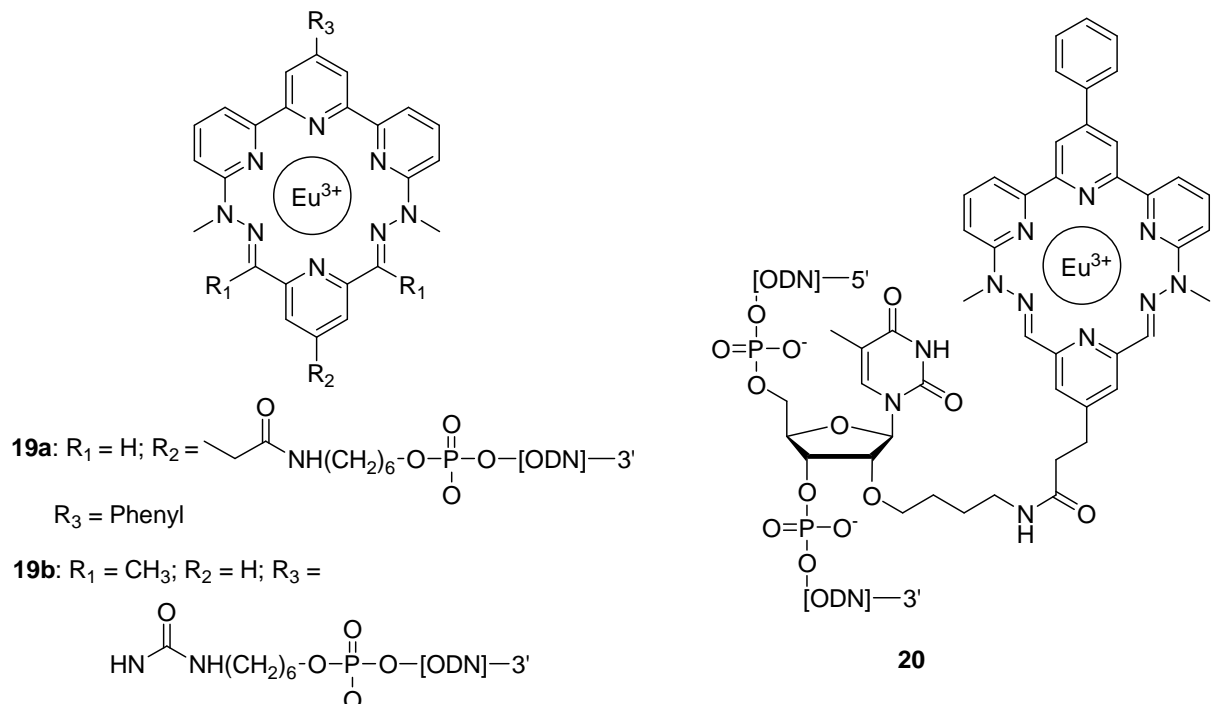


Abb. 28: Künstliche Ribonucleasen nach Häner und Moser.

Die Konjugate aus der Gruppe von Häner und Moser (**19a-Eu³⁺** und **19b-Eu³⁺**) spalteten das Substrat am dritten Nucleotid nach dem letzten Basenpaar und zeigten hierbei Halbwertzeiten von 4 bzw. 10 Stunden bei pH 7.5 und 37 °C.^[86]

21c-Dy³⁺ aus der Gruppe von Sessler, Iverson und Mitarbeitern zeigte sogar noch höhere Aktivität: Bei pH 7.5 und 37 °C lag die Halbwertzeit bei nur 2.1 Stunden.^[88] Dieses Konjugat spaltete am ersten freien Nucleotid des 3'-Endes des Substrates und zeigte außerdem Turnover.^[89] Die Chelatkomplexe von **21a** mit Dy³⁺ und Eu³⁺ kamen dagegen auf Halbwertzeiten von 10 bzw. 50 Stunden (0.05 μM Nuclease, 0.002 μM Substrat). Bei diesen beiden war die Spaltstelle jeweils ein Nucleotid weiter vom letzten Basenpaar entfernt als bei **21c-Dy³⁺**.

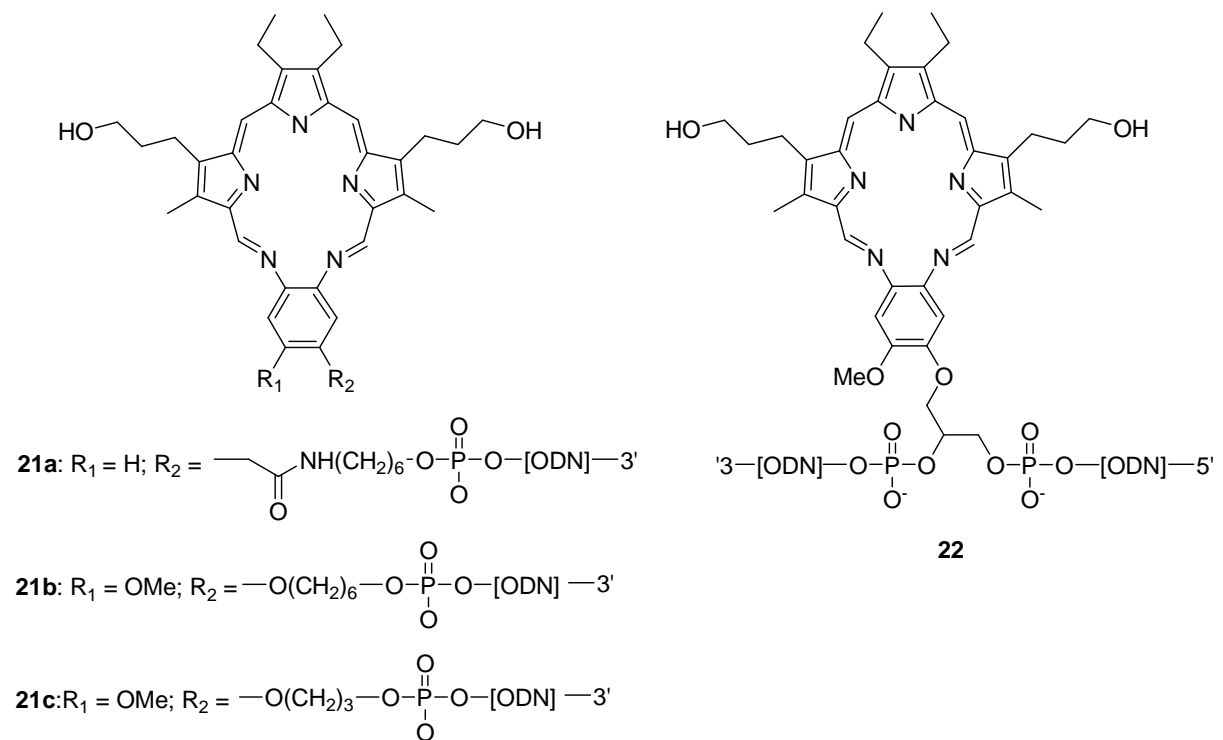


Abb. 29: Oligonucleotid-Konjugate nach Sessler und Iverson *et. al.*

Beide Arbeitsgruppen synthetisierten außerdem Derivate der Konjugate **19a**-Eu³⁺ und **21c**-Dy³⁺, die die katalytische Einheit in der Mitte des sequenzerkennenden Stranges trugen. ^[1-38,40] Dies sollte die Chance auf nahezu vollständigen RNA-Abbau erhöhen, da nach Spaltung des RNA-Stranges die Affinität des Konjugates zum Substrat sinken sollte. Wie bereits in Abschnitt 2.2 beschrieben, ist es unmöglich, einen doppelhelicalen Strang zu schneiden, da das Phosphoran nicht den benötigten 180° Winkel zwischen angreifender und austretender Gruppe einnehmen kann. Deshalb muss bei der Entwicklung der Konjugate darauf geachtet werden, dass sie bei der Hybridisierung mit dem Substrat eine Sekundärstruktur wie z.B. einen bulge ausbilden, wodurch ein einzelsträngiger Abschnitt entsteht. Dieses Konzept wird durch die Daten, die von Moser *et. al.* gewonnen werden konnten, deutlich untermauert: Konjugat **20** war bei einer Substratsequenz, die komplett komplementär zum ODN-Teil der Nuclease war, nur langsam in der Lage, die RNA abzubauen (Halbwertszeit 120 h bei pH 7.5 und 37 °C). Durch Einführung eines zwei Nucleotide großen bulges sank die Halbwertszeit um mehr als eine Größenordnung und lag nur noch bei 4 Stunden unter sonst gleichen Bedingungen. Des Weiteren scheint die Position der katalytischen Einheit im Konjugat eine Rolle zu spielen: So war die Spaltaktivität um Faktor 10 geringer ($\tau_{1/2} = 50$ h), wenn der Chelat-Komplex über denselben Linker an das C5 eines 2'-Desoxyuridins, welches sich im ODN-Strang befand, gebunden war. ^[90]

Künstliche Ribonucleasen

Wie vorhergesagt, führen diese Konjugate zu effizientem Turnover. ^[91] Es konnte gezeigt werden, dass bis zu 40 Spaltungsereignisse unter Verwendung von **20** stattfanden, und zwar bei einer Konzentration von 1 μM an Konjugat und einem 50-fachen Überschuss an Ziel-RNA. Auch das Konjugat **22**- Dy^{3+} von Magda *et. al.* mit der katalytischen Einheit in der Mitte des Stranges zeigt Turnover. ^[88] Hierbei reichte ein bulge mit der Länge eines Nucleosides aus, um effiziente Spaltung zu ermöglichen.

4.2.1.2 Metallhaltige Ribonucleasen auf Basis von Cu^{2+} -Ionen

Obwohl metallhaltige Ribonucleasen auf Basis von Lanthanid-Ionen eine höhere Effektivität als die auf Cu^{2+} -Basis aufweisen, sind letztere von speziellem Interesse, da Cu^{2+} -Ionen in intrazellulären Flüssigkeiten vorkommen. Man kann deshalb davon ausgehen, dass sie auch in einer intrazellulären Umgebung tatsächlich als Cu^{2+} -Komplexe vorliegen, während dies bei Nucleasen mit anderen Metallen nicht sicher der Fall ist.

Das erste Konjugat (**23**) dieser Klasse, das eine Terpyridin-Einheit am C5 einer Intra-Strang-Uracilbase (ODN-Teil des Konjugates: 17mer) trug, stammte aus der Gruppe um Bashkin. ^[92]

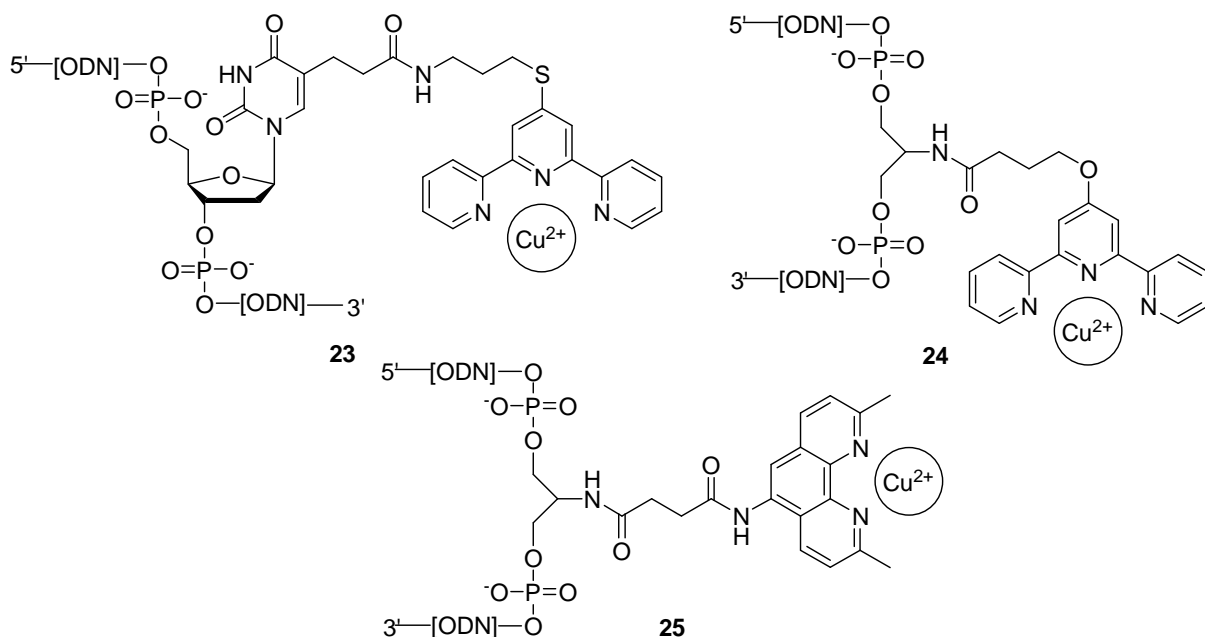


Abb. 30: Oligonucleotid-Konjugate nach Bashkin.

Als Substrat wurde ein 159mer-Fragment der *gag*-mRNA verwendet. Die Spaltstelle lag am 5'-Ende eines Adenosins, welches sich genau gegenüber dem Konjugat befand. Trotz Verwendung eines Überschusses an **23** lag die Halbwertszeit bei 400 h (bei pH 7.5 und 37 °C). Ähnlich wie im Fall des Konjugates **20** kam es hier zu einer drastischen Verbesserung der Spaltaktivität durch Anknüpfen der katalytischen Einheit über einen nicht-nucleosidischen Linker – als Rückgrat wurde ein Serinol-Linker verwendet – der dadurch nicht an der Hybridisierung des Doppelstranges beteiligt war (Konjugat **24**).^[93-95] Außerdem kam es durch Einführung von Propan-1,3-diol-Spacern (ohne Abbildung) zwischen ODN-Teil und Phosphatgruppe zur Bildung eines drei Nucleotide großen internen loops, was die Spaltaktivität nochmals erhöhte: Bei 45 °C und pH 7.4 lag die Halbwertszeit bei 30 h (entspricht etwa 40 h bei pH 7.5 und 37 °C).^[1] **24** war darüber hinaus bei Überschuss an Substrat zu Turnover fähig. Dasselbe Rückgrat mit einer anderen chelatisierenden Gruppe (2,9-Dimethyl-5-aminophenanthrolin) verwendeten Bashkin *et. al.* bei der Synthese von **25**, welches gegenüber **24** eine 5-fach höhere Spaltaktivität aufwies.^[96] Die beiden Methylgruppen am Phenanthrolin-Gerüst verlangsamten hierbei die Dimerisierung der Cu²⁺-Chelat-Komplexe, welche zu einer deutlichen Herabsetzung der Aktivität führen.^[97]

Ein weiteres Beispiel für kupferhaltige künstliche Ribonucleasen wurde von Inoe und Mitarbeitern vorgestellt.^[98,99] Als chelatisierende Gruppen wurden ebenfalls Terpyridine verwendet, der sequenzerkennende Teil der Konjugate bestand aber im Gegensatz zu den oben beschriebenen Konjugaten aus 2'-Methoxy-modifizierten Oligoribonucleasen (ORN).

26 und **27** verfügen über Sequenz-erkennende Teile, die zusammengenommen die Substratsequenz vollständig hybridisierten. Verwendung beider Konjugate gleichzeitig führte zu synergistischen Effekten: Während Konjugat **26** alleine gegenüber dem Substrat inaktiv war, führte **27** zu Halbwertszeiten von 70h bei pH 7.4 und 45°C; bei Verwendung einer Mischung von **26** und **27** sank die Halbwertszeit um mehr als den Faktor 10 auf 5h. Durch die Aneinanderkettung beider Konjugate mit einem flexiblen Linker gelang die Synthese eines Konstruktes (**29**), welches eine doppelt so hohe Spaltaktivität aufwies wie die Mischung von **26** und **27**.^[100]

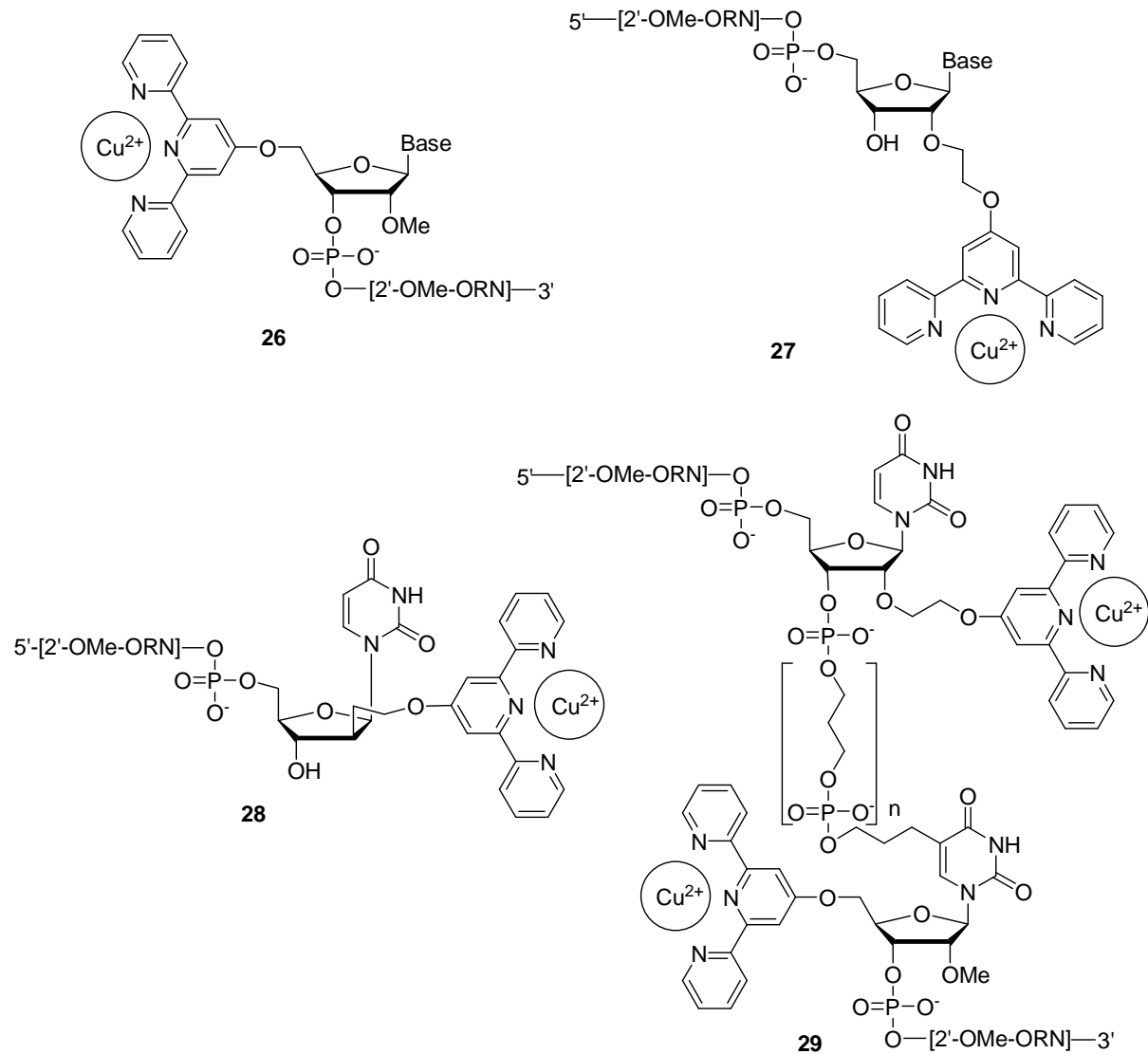


Abb. 31: Konjugate nach Inoe *et. al.* ($n = 0 - 2$).

Kürzlich konnten Inoe und Mitarbeiter die Wirksamkeit ihrer Nucleasen durch leichte Strukturabwandlung verbessern, und zwar indem sie den Linker am C2' der Ribose (**28**) versteiften. Die Verwendung eines 1:1-Gemisches aus **26** und **28** führte bei pH 7.5 und 37 °C in 5 Stunden zu 90% Spaltung des Substrates (zehnfacher Überschuss an Konjugat). Verknüpfte man **28** und **26** analog zu Konjugat **29** kovalent, konnte in 5 h ein zehnfacher Überschuss an Ziel-RNA zu 92% abgebaut werden, man erhielt also Turnover. ^[2]

4.2.1.3 Metallhaltige Ribonucleasen auf Basis von Zn^{2+} -Ionen

Zn^{2+} ist ein weiteres Übergangsmetallion, welches häufiger als Bestandteil in künstlichen Ribonucleasen eingesetzt wird. Genauso wie Cu^{2+} kommt es in intrazellulären Medien vor, und zwar in Konzentrationen im mikromolaren Bereich, was eine Bildung von Komplexen mit nanomolarer Stabilitätskonstante ermöglichen sollte. Außerdem ist Zn^{2+} ein Ion, das von zahlreichen Enzymen als Cofaktor genutzt wird. ^[3] Das im vorherigen Abschnitt beschriebene Konjugat **24** aus der Gruppe um Bashkin wurde ebenfalls als Zn^{2+} -Derivat synthetisiert. Dessen Spaltaktivität betrug allerdings nur 40% von der des Cu^{2+} -Derivates. ^[94]

2,9-Dimethyl-5-aminophenanthrolin wurde auch von Strömberg und Mitarbeitern als Baustein für künstliche Ribonucleasen verwendet. Es wurden unterschiedliche Konjugate hergestellt, um den genaueren Zusammenhang von Spaltaktivität, Natur des Linkers sowie Anknüpfungsart des ODN-Teils an die katalytische Einheit auszuloten. ^[101,102] Es wurden drei unterschiedliche Konjugate (**30-32**) konzipiert, die außerdem Schmelztemperaturmessungen unterzogen wurden. Diese ließen darauf schließen, dass alle drei zu 80-90% unter Ausbildung eines ein bis fünf Nucleotide großen bulges mit der Substrat- RNA hybridisierten.

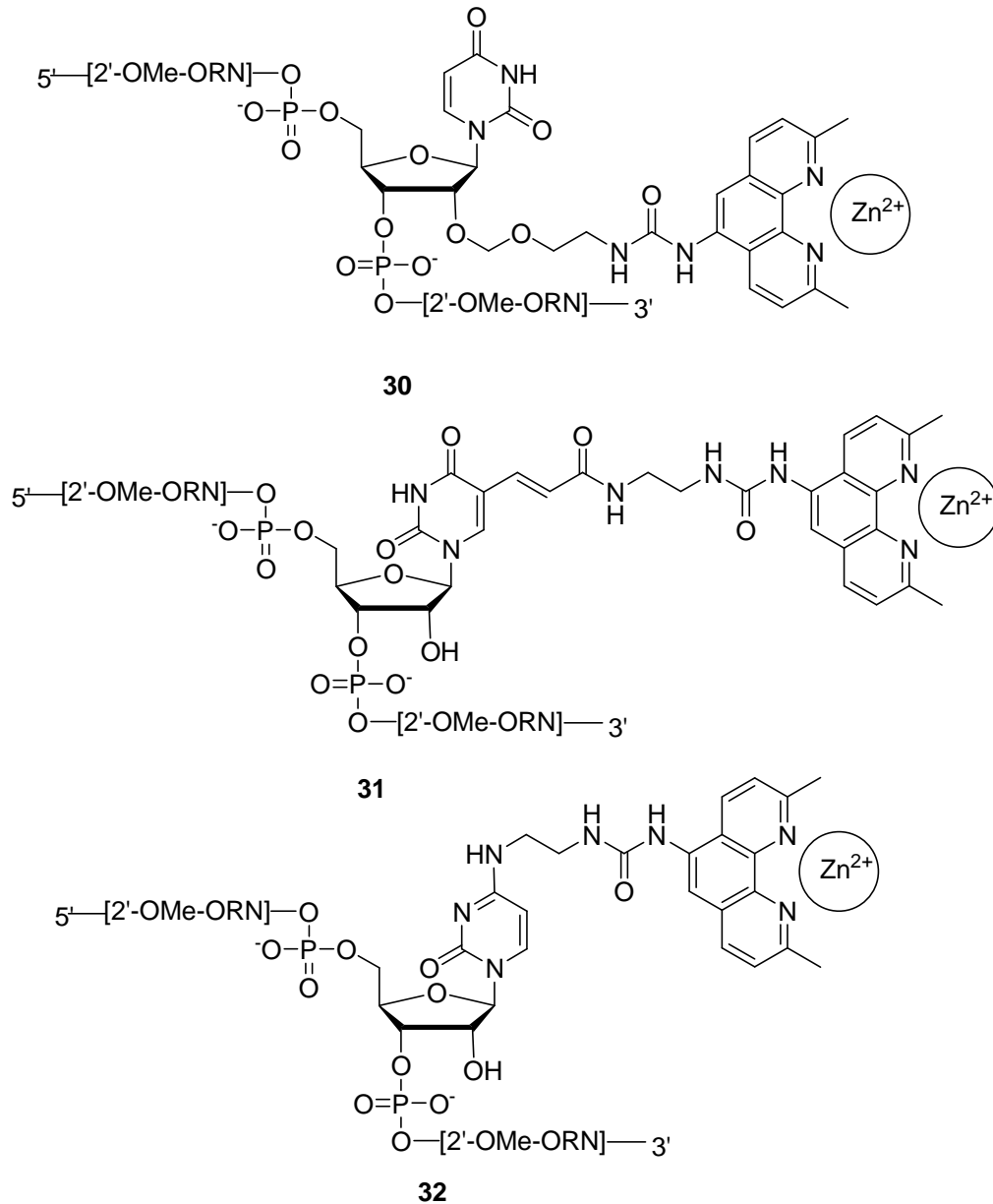


Abb. 32: Künstliche Ribonucleasen nach Strömberg *et. al.*

Es zeigte sich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit unter Verwendung von **31** und **32**, also den Konjugaten, die die katalytische Gruppe an der Base trugen, höher war als mit Konjugat **30**. Dabei war **31** das effizienteste unter den dreien und spaltete außerdem das Substrat unter Ausbildung eines vier Nucleotide großen bulges fünfmal schneller als unter Ausbildung eines nur zwei Nucleotide großen bulges.^[101] Alle Bindungen innerhalb des bulges wurden dabei gespalten, obwohl die Bindungen, die direkt an den doppelsträngigen Bereich angrenzten, etwas weniger leicht zu spalten waren. Man verglich auch die Halbwertzeiten der Spaltung eines bulges aus vier Nucleotiden bei pH 7.4 und 37 °C: Konjugat **30** kam dabei auf 40 h, **31** auf 11 h und **32** auf 14 h; alle drei zeigten Turnover.^[101,102] Verglichen mit RNA-

Künstliche Ribonucleasen

Spaltern desselben Typs, die nicht an ODN konjugiert waren, zeigten die Konjugate um zwei Größenordnungen bessere Reaktionsbeschleunigungen. Eine andere Gruppe setzte zur Konjugation dieselbe Chelat-Gruppe ein, verwendete aber statt 2'-OMe-ORN eine PNA-Sequenz (**33**).^[103] Dies führte jedoch zu keiner weiteren Verbesserung der Spaltaktivität. Lönnberg und Mitarbeiter synthetisierten ein Konjugat mit Imidazol als katalytisch aktiver Einheit (**34**). Dieses Konstrukt führte aber auch bei einem Überschuss von Zn^{2+} nur zu einem langsamen Abbau der Ziel-RNA ($\tau_{1/2} = 300$ h; pH 7.0, 25 °C).^[104]

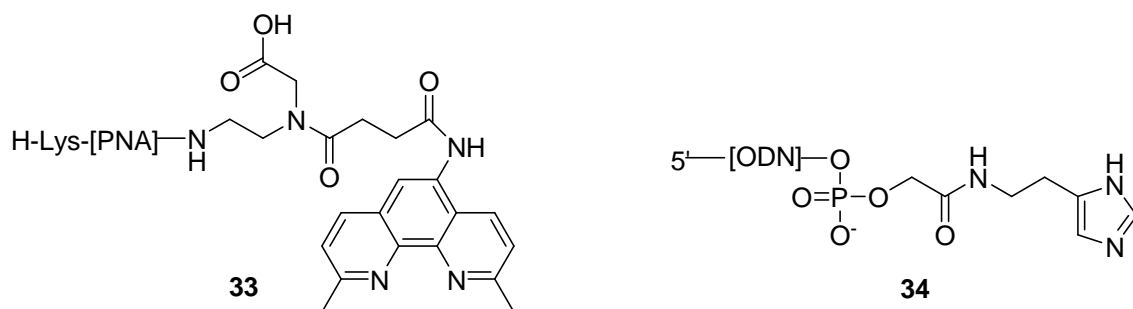


Abb. 33: Konjugat nach Whitney bzw. Lönnberg.

Während die Zn^{2+} -Komplexe auf Basis des 2,9-Dimethylphenanthrolins Stabilitätskonstanten im Bereich von etwa 10^5 M^{-1} aufweisen,^[105] sind die von 2'-OMe-funktionalisierten 1,4,7-Triazacyclodecan-Derivaten deutlich höher ($10^{8.6}$ M^{-1})^[106]. Lönnberg und Mitarbeiter untersuchten aus diesem Grund Konjugate mit diesem Strukturmotiv.^[107,108] Es wurden dabei Konstrukte mit endständiger Spalteinheit untersucht sowie solche, die die katalytische Gruppe innerhalb des Sequenz-erkennenden Teils enthielten. Alle Tests wurden bei pH 7.3 und 35 °C sowohl mit einem 1:1-Verhältnis von Konjugat zu Substrat als auch im Überschuss von Substrat gegenüber der Nuclease durchgeführt, um Turnover-Verhalten zu untersuchen. Alle drei Typen zeigten dabei Turnover, die Zn^{2+} -Komplexe von **35** und **36** spalteten die RNA außerhalb der doppelsträngigen Region. Es gab aber deutliche Unterschiede in der Spaltaktivität der beiden: Das Konjugat mit dem Disulfid-Linker (**36**) führte zu einer 8-fach höheren Spaltungsrate als das Konjugat mit dem β -Peptid-Linker (**35**). Die Ursache für diesen Unterschied ist unbekannt. Die Konjugate **37a-c** waren so konstruiert, dass sie mit der Ziel-RNA einen fünf Nucleotide großen bulge ausbildeten. Die Ziel-RNA spalteten sie mit einer Effizienz von 60-80% bezogen auf die Spaltungsausbeute von **35**. Die Linkerlänge spielte dabei eine untergeordnete

Künstliche Ribonucleasen

Rolle, die längeren Konjugate waren nur leicht schlechter in der Spalteffizienz als die kürzeren.

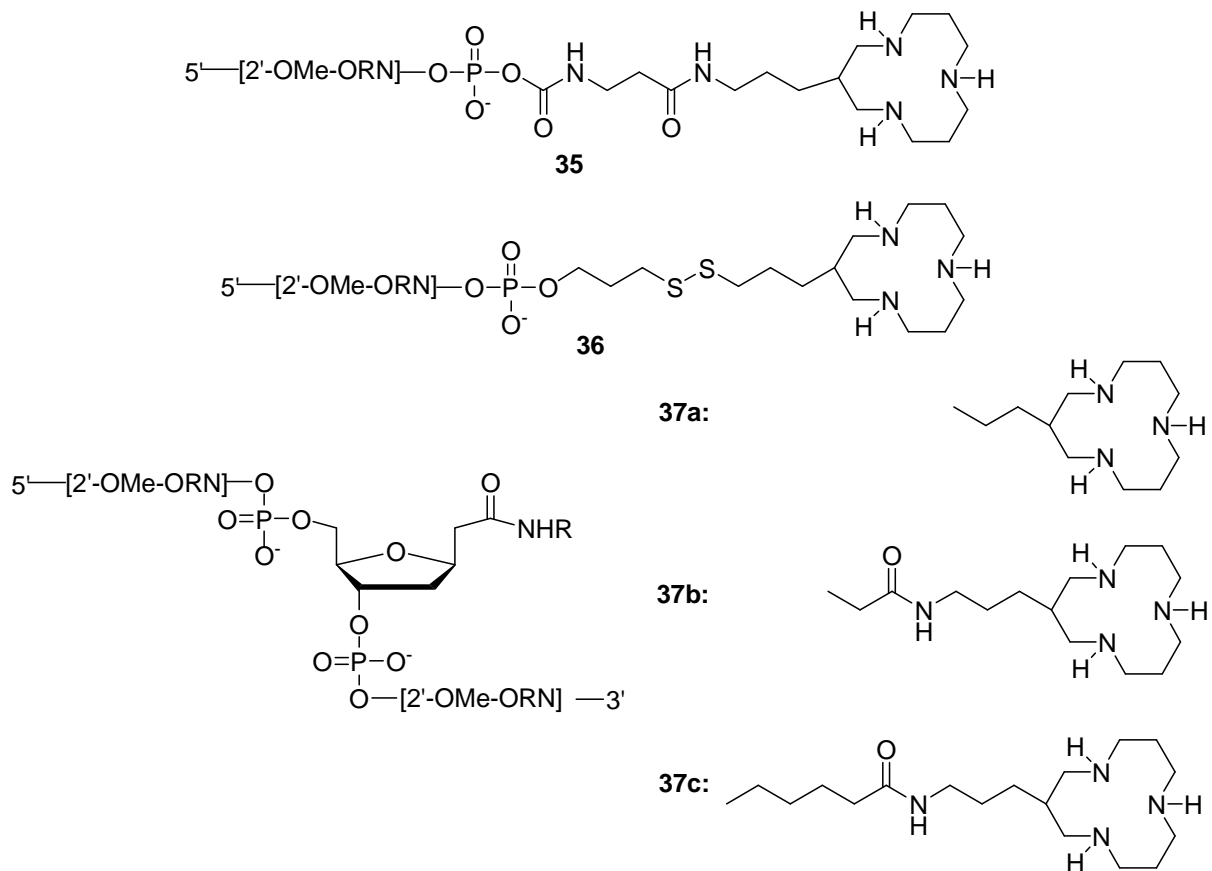


Abb. 34: Azakronenether-Derivate (Lönnerberg *et al.*).

Die Größe des induzierten bulges hingegen scheint eine größere Rolle zu spielen, ein drei Nucleotide messender bulge (A_3) konnte nur mit einer 60%-igen Spaltausbeute im Vergleich zum fünf Nucleotide (A_5) großen bulge gespalten werden. Ebenfalls interessant ist die erstaunliche Stabilität des bulges, wenn man die Adenosine durch Uracile (U_3) austauscht, was wohl auf die Tendenz der Zn^{2+} -Azakronen-Verbindungen zurückgeht, an Uracil- und Thyminbasen zu koordinieren. [109]

Die einzige bis jetzt beschriebene dinukleare künstliche Ribonuclease auf Zinkbasis stammt aus der Gruppe von Komiyama *et al.* (**38**)^[110] Sie spaltet in etwa so gut wie die Konjugate **30-32** (Abb. 32), benötigt hierfür aber deutlich niedrigere Zn^{2+} -Konzentrationen (10 μM).

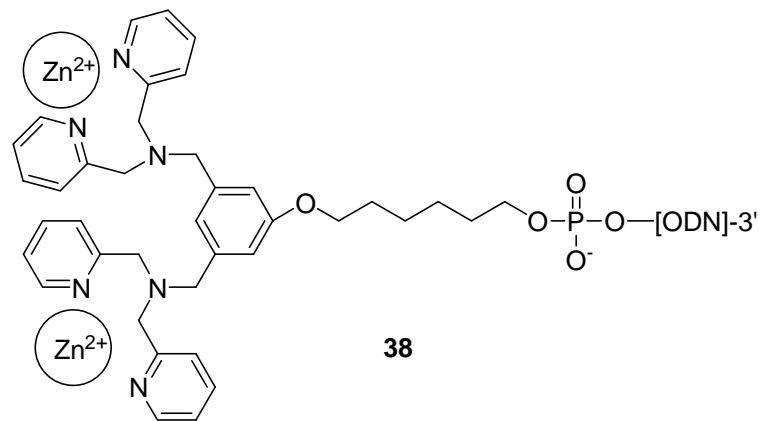


Abb. 35: Dinucleare Ribonuclease nach Komiyama

4.2.2 Metallfreie künstliche Ribonucleasen

Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, ist es natürlich auch möglich, die Hydrolyse von RNA durch organische Moleküle, die ohne Metallionen auskommen, zu katalysieren. Eines der einfachsten Beispiele für Verbindungen dieser Art ist Diethylentriamin. Komiyama und Mitarbeiter haben auch auf diesem Gebiet Forschung betrieben: Verbindung **39** verfügte über einen 19mer-ODN Sequenz-erkennenden Teil und an dessen 5'-Ende ein Diethylentriamin. Die Ziel-RNA wurde am ersten ungepaarten Nucleosid gespalten, die Halbwertszeit des Substrates lag bei 40h (pH 8.0, 50°C).^[131,132] Auf Bedingungen, die einen Vergleich mit den anderen hier vorgestellten Konjugaten erlauben (pH 7.5, 37 °C), wäre die Halbwertszeit mindestens fünfmal so hoch.^[1]

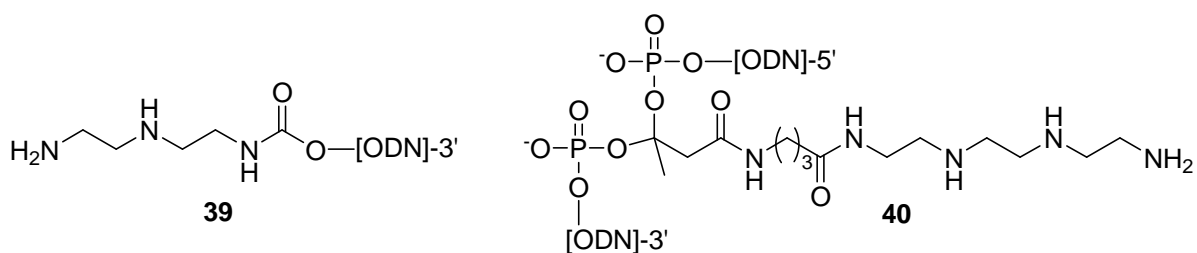


Abb. 36: Metallfreie Ribonucleasen nach Komiyama *et. al.*

Das entsprechende Konjugat mit der katalytischen Gruppe in der Mitte des DNA-Stranges (**40**) spaltete die Hälfte des Substrates bei pH 7.5 und 37°C innerhalb von 400h (extrapoliert^[1]) und lag damit in derselben Größenordnung wie das Konjugat mit der endständigen Spalteinheit.^[111]

Van Boom und Mitarbeiter konnten durch Einsatz von PNA als Sequenz-erkennender Struktur die Spaltaktivität der Diethylentriamin-Einheit mit einer

Künstliche Ribonucleasen

Halbwertszeit von nur 8 h bei pH 7.0 und 40°C deutlich verbessern (**41**).^[112] Dies ist wohl auf die außergewöhnliche Stabilität von PNA-RNA (oder auch DNA)-Duplexen zurückzuführen, da PNA durch ihr ungeladenes Rückgrat zu stärkerer Duplexbildung mit Nucleotidsträngen fähig ist als reine Nucleinsäuresequenzen untereinander.

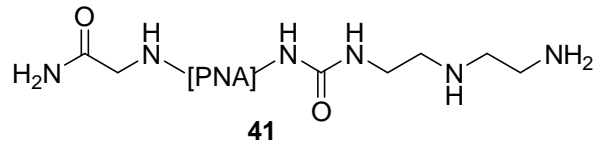


Abb. 37: PNA-Konjugat (Van Boom *et. al.*).

Eine weitere metallfrei eingesetzte Verbindung in Oligonucleotidkonjugaten ist das Imidazol. Dieser Strukturtyp einer künstlichen Ribonuclease leitet sich ab von der RNase A, in deren aktivem Zentrum zwei Histidinreste, His-12 und His-119, eine essentielle Rolle spielen (vgl. auch Abschnitt 4, „künstliche Ribonucleasen“).^[113] Vlassov und Mitarbeiter beschäftigten sich mit DNA-Konjugaten dieser Art. Sie synthetisierten und testeten Verbindungen, die am 5'-Ende mit Imidazol-Resten ausgerüstet waren (**42-44**).^[114-120]

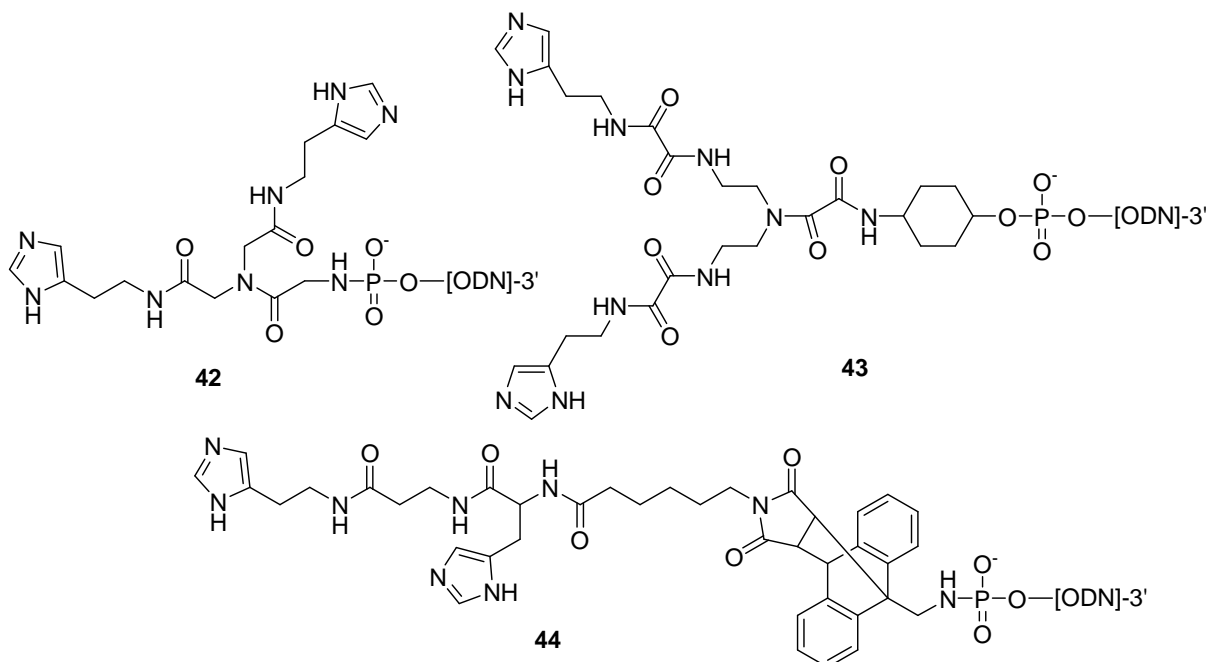


Abb. 38: Imidazol tragende Konjugate nach Vlassov.

Als Ziel-RNA wurde in den Tests hauptsächlich tRNA^{Phe} eingesetzt, die katalytischen Einheiten waren dabei auf eine Stelle gerichtet, die für ihre innewohnende Instabilität bekannt ist. Unter den drei oben gezeigten Konjugaten war **43** der potenteste Spalter.^[1-76] Diese Nuclease wurde beispielsweise auf den Sequenzabschnitt C61-ACA-G65 gerichtet, der einen der hydrolytisch labilsten der tRNA^{Phe} darstellt,

Künstliche Ribonucleasen

wodurch die Bindung zwischen C63 und A64 sehr schnell gespalten wurde, die Halbwertszeit lag bei nur 1.5 h (pH 7.0, 37°C, 50 mM Imidazol-Puffer). Es wurde angenommen, dass die Bildung des Duplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei dieser Reaktion war. Auch **42** ^[114,115] und **44** ^[117-119] waren in der Lage, tRNA^{Phe} in ziemlich kurzer Zeit zu spalten. Dennoch scheint es ziemlich wahrscheinlich, dass die hohe Spaltungsrate weniger auf die Güte der Imidazolfunktion als katalytischer Einheit zurück zu führen ist als auf die außergewöhnlich hohe hydrolytische Instabilität der ausgewählten Phosphodiesterbindungen. Untersuchungen einer anderen Gruppe, deren künstliche Nucleasen den Konjugaten **42-44** sehr ähnelten, konnten zeigen, dass Konjugate auf Imidazol-Basis an kürzerer, einzelsträngiger Ziel-RNA völlig inaktiv waren. ^[121] Darüber hinaus wurden in diesen Projekten keine Kontrollen bezüglich eventueller enzymatischer Kontamination vorgenommen (vgl. auch Bemerkungen zu Kontaminationen zu Beginn des Kapitels 4.2), die ebenfalls eine Pyrimidin-A-lastige Spaltung der Ziel-RNA erklären könnte.

Untersuchungen an Konjugaten, die Imidazol- bzw. Imidazol- und Amino-Einheiten innerhalb eines Methylphosphonat-Oligonucleotid (MPO)-Stranges trugen (**45a** und **b**), untermauerten diese These: Ein 22 Nucleotide langes komplementäres Substrat vermochten sie (Abb. 39) nur sehr langsam zu spalten, die Halbwertszeit lag um 800h bei einem pH von 7.2 und 25 °C (entspricht etw a 130h bei pH 7.5 und 37°C). ^[122]

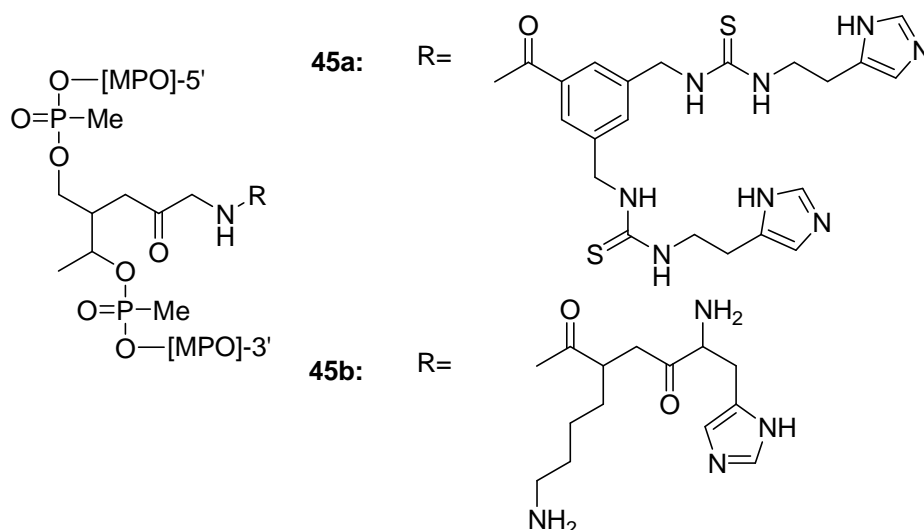


Abb. 39: ODN-Konjugate mit Methylphosphonat-Rückgrat.

Des Weiteren wurden Peptide als katalytische Einheiten in Oligonucleotid-Konjugaten eingesetzt, was allerdings nur zu moderaten Spaltungsraten und zu

Künstliche Ribonucleasen

Sequenz-unspezifischer Spaltung führte. Die Spaltaktivität war auch hier hauptsächlich auf die Instabilität der betreffenden Phosphodiesterbindungen im Substrat zurückzuführen. ^[123-125]

Decout und Mitarbeiter entwickelten eine künstliche Ribonuclease (**46**), die spezifisch an eine 96mer TAR-RNA bindet und spaltet. Es handelt sich dabei um ein PNA-Konjugat mit Neamin, das bei vierfachem Überschuss das Substrat in erwähnenswerter Menge (von den Autoren nicht näher quantifiziert) innerhalb von 5h bei pH 7.4 und 25°C abbaut. ^[126] Da Neamin einen Abkömmling von Neomycin darstellt, welches bekannt für seine Affinität zur TAR-Region von HIV-1 ist, ^[127] bleibt allerdings die Frage, in wie fern Konjugate dieses Typs auch auf andere Substrate anwendbar sind.

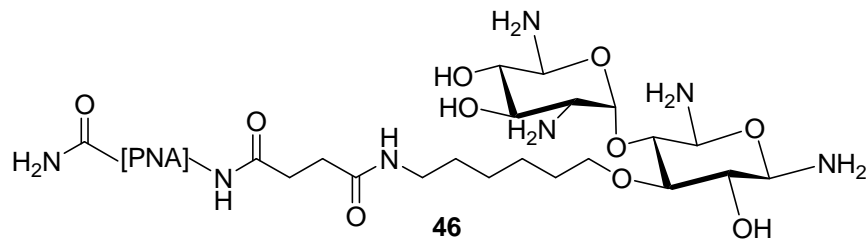


Abb. 40: Neamin-PNA-Konjugat (Decout *et. al.*).

4.2.3 Künstliche Ribonucleasen auf Basis von Trisbenzimidazol

Wie in Abschnitt 4.1 ("Unselektive künstliche Ribonucleasen") beschrieben, ist Verbindung **15** wohl einer der potentesten metallfreien RNA-Spalter überhaupt. Durch Integration eines Methylesters in eine der drei Benzimidazoleinheiten wurde eine Konjugation mit Oligonucleotiden möglich, die als Sequenz-erkennende Bausteine für die selektive Spaltung von RNA notwendig sind. [9]

Zur Kupplung der katalytischen Einheit wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet: Eine davon war eine Anbindung über einen Disulfid-Linker (**48**), die andere beinhaltete die Reaktion des Carboxylats in Anwesenheit von DIC und HOBt mit dem Aminolinker-modifizierten Oligonucleotid (**47**).

Um die Neigung zur Aggregation mit Oligonucleotiden zu testen, wurden auch hier FCS-Messungen (s.a. Abschnitt 5.2.10) durchgeführt, allerdings mit nicht komplementärer DNA statt dem tatsächlichen Substrat der Konjugate, was aus messtechnischen Gründen erforderlich war. Es waren keine Anzeichen von Aggregation feststellbar. [9]

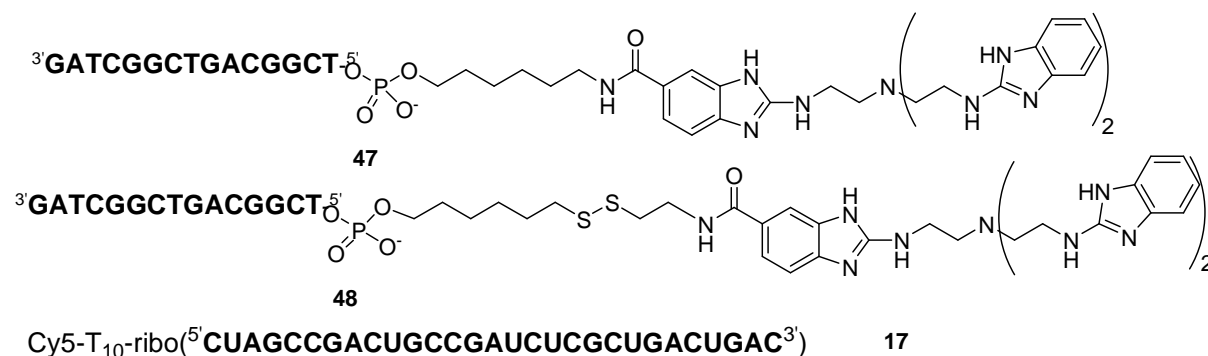


Abb. 41: DNA-Konjugate **47** und **48** sowie komplementäres Substrat **17**.

Zur Detektion der Spaltmuster und -raten wurde ein DNA-Sequenzierer (s. a. Abschnitt 5.1.2 ("RNA-Spaltung und ihre Messung")) verwendet, der mit einer Polyacrylamid-Gelelektrophoresematrix arbeitet. Die experimentellen Bedingungen für die Spaltungstests waren wie folgt: 1.5 μ M Konjugat, 150 nM Substrat, Tris-HCl-Puffer pH 8.0, 37°C, 20 h Inkubationszeit. Man konnte feststellen, dass der Großteil der Spaltung durch beide Konjugate an den Nucleotiden 13, 14 und 15 stattfand, wobei an Nucleotid 14 die größte Spaltaktivität festgestellt wurde. Bei einem 15mer stem-Duplex kann diese Beobachtung am ehesten auf fraying – also Aufdröselung des Duplexes an dessen Enden durch mangelhafte Wasserstoffbrückenbildung - des

Künstliche Ribonucleasen

letzten Basenpaares des Duplexes zurückgeführt werden, da es sich um ein schwaches A-T-Paar handelt (vgl. Sequenzen in Abb. 41).

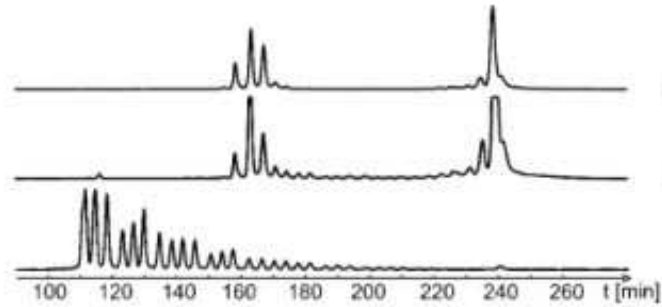


Abb. 42: Kurven von **47** (oben) und **48** (Mitte) + Hydrolyse (unten).

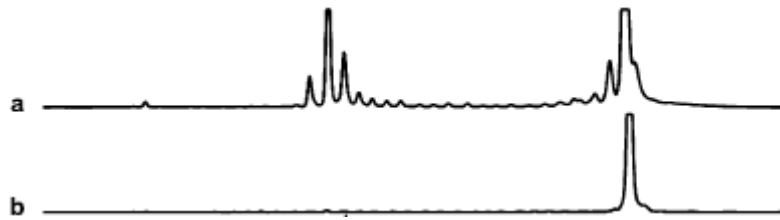
Bei Verwendung eines Unterschusses (10%) an Konjugat in Bezug auf die Menge an Substrat konnte kein Turnover beobachtet werden, was jedoch eine häufige Beobachtung bei DNA-Konjugaten ist, deren katalytische Einheit am 3'- oder 5'-Ende der Konjugates sitzt.

Verschiedene pH-Werte und Ionenstärken (Zusatz von 100 mM NaCl) wurden gescreent, um die passenden Bedingungen für ein Maximum an Spaltaktivität bestimmen zu können.

pH	Kontrolle (bzw. Untergrund)	48	48 (+100 mM NaCl)	47
6.0	< 1	20.8	8.7	25.3
7.0	<1	43.4	35.6	46.6
8.0	<1	55.3	51	68.8
9.0	<5		46.7	

Tab. 2: Ergebnisse der Spaltungsexperimente mit **47** und **48**. Experimentelle Bedingungen: 1.5µM Konjugat, 150 nM Substrat, 50 mM Tris- HCl-Puffer, 37 °C 20 h. Angaben in %, Untergrund bei t= 0 wurde abgezogen.

In Kreuzexperimenten an nicht-komplementärer RNA mit Konjugat **47** konnte gezeigt werden, dass die Spaltung tatsächlich aus einer Hybridisierung mit dem Substrat herrührt und nicht aus einer Spaltung durch das freie Konjugat (s. Abb. 43).



Cy5-T₁₀-ribo(⁵AUACCUUGUCAGGAGAAGAGAGGCCGUUA)-T₄³ **49**

Abb. 43: a) Konjugat **47** mit komplementärem Substrat **17**; b) Konjugat **47** mit nicht- komplementärem Substrat **49** (Sequenz unten); experimentelle Bedingungen wie oben beschrieben.

4.3 Andere Methoden des selektiven RNA-Abbaus

Neben den genannten Möglichkeiten, RNA gezielt und ggf. selektiv zu spalten, gibt es noch weitere, deren nähere Betrachtung im Rahmen dieser Arbeit jedoch zu weit führen würde. Sie werden deshalb an dieser Stelle nur kurz behandelt.

Frühe Ansätze auf dem Gebiet der künstlichen Ribonucleasen beruhten auf der Idee, natürliche unselektive Nucleasen mit sequenzspezifischen Bausteinen (in Form von ODN) zu verknüpfen, um so selektive Spaltung zu erreichen. ^[128,129] Zum einen waren diese Ansätze durch notwendige, zielgerichtete Mutationen der natürlichen Enzyme sowie deren Expression sehr aufwändig, zum anderen kam es teilweise zur Selbstinaktivierung dieser Konjugate durch Abbau ihrer eigenen sequenzspezifischen Teile, wenn als enzymatischer Baustein die Staphylokokken-Nuclease gewählt wurde. ^[128]

Auch nicht-kovalent an sequenzspezifische Erkennungsbausteine gekoppelte RNA-Spalter wie Lanthanid- oder Zn(II)-Ionen können in einer sequenzselektiven RNA-Hydrolyse eingesetzt werden, wie Komiyama und Mitarbeiter zeigen konnten. ^[13] Durch zwei Acridin-Einheiten, die durch ein ODN verbunden und somit an die Ziel-RNA durch Duplex-Bildung hybridisieren konnten, wurde der Teil der RNA-Sequenz geschützt, welcher sich im Doppelstrang befand. Die Acridineinheiten sorgten an den vorgesehen "Schnittstellen" für bulge-Bildung, und die frei in der Lösung vorkommenden Lanthanid-Ionen für den Strangbruch. Auf diese Weise konnte ein Teil der RNA aus dem Strang "ausgeschnitten" werden. Dieses System funktioniert sogar bei RNA mit Sekundärstruktur.

Andere Wege, gezielt RNA abzubauen oder zu spalten, sind ebenfalls der Natur entlehnt: Ribozyme und RNA-Interferenz (RNAi). Beide Mechanismen werden in gentechnischen Verfahren schon heute eingesetzt, als Mittel in der Gen- oder Krebstherapie befinden sie sich jedoch noch im Entwicklungsstadium.

Über die Natur und Wirkungsweise von Ribozymen wurde bereits kurz in Abschnitt 2.4 "RNA als drug target" berichtet. RNAi ist ein körpereigener Regulationsmechanismus, der zum selektiven Abbau von mRNAs eingesetzt wird. Es kommen hierbei sogenannte miRNAs (micro RNA) oder siRNAs (small interfering RNA) zum Einsatz, die beide etwa 17-28 Nucleotide lang sein können. Ihre Funktionsweisen zeigen deutliche Ähnlichkeit, beispielsweise werden die Vorläufer RNAs dieser beiden Spezies durch Dicer geschnitten und so in ihre aktive Form

Künstliche Ribonucleasen

überführt. Nachdem die siRNA in den RISC (RNA-induced silencing complex) integriert sind, bindet dieser an abzubauen Transkripte, die dann geschnitten und somit unbrauchbar gemacht werden.

Auch miRNA wird in einen Komplex mit einem Protein aufgenommen (miRNP = Ribonukleoproteinkomplex) und somit aktiv, ganz analog zum RISC und siRNA. Sind die Basenpaarung zwischen miRNA und Transkript nicht exakt, kann es auch zu einer Inhibition der Translation kommen, ohne dass das Transkript tatsächlich geschnitten wird. Neben den normalen natürlichen Prozessen der Zelle wie deren Proliferation, Entwicklung, Differenzierung und Apoptose spielt RNAi auch eine Rolle bei der Krebsentstehung, miRNA kann dabei als Tumorsuppressor oder –aktivator auftreten.^[130] Da es sich um einen sequenzspezifischen Mechanismus handelt, sollte man davon ausgehen, dass die Hochregulation einer bestimmten miRNA zur Verringerung der Expression ihres Targets und somit auch zur Verringerung des entsprechend exprimierten Proteins kommt, während bei der Herabregulation die Proteinexpression verstärkt wird. Allerdings wurde bereits beobachtet, dass mehrere miRNAs für den Abbau eines einzigen Transkriptes beteiligt sind, wodurch diese einfache Betrachtungsweise nur teilweise zutrifft und ein gezielter Einsatz der miRNAs als Werkzeuge erschwert wird.

5 Eigene Arbeiten

5.1 Spezifische RNA-Spaltung

5.1.1 Herstellung „maßgeschneiderter“ Trisbenzimidazol- Konjugate

Wie bereits in Abschnitt 4.1 („Unselektive künstliche Ribonucleasen“) erläutert wurde, ist das von A. Strick im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisierte Trisbenzimidazol **15a** (Abb. 44) einer der besten, heute bekannten metallfreien RNA-Spalter. Die Fähigkeit dieses Moleküls zur Kupplung an Sequenz-erkennende Motive wie DNA- oder Peptidsequenzen wurde dann in den Doktorarbeiten von Herrn Dr. S. Peter und Herrn Dr. C. Gnaccharini erschlossen, und zwar durch die Ergänzung um eine Carboxylgruppe an einer der Benzimidazoleinheiten ^[18] bzw. durch Erweiterung dieses Strukturmotives um eine Maleimid- oder eine Disulfid-Funktion, um weitere Kupplungsarten ermöglichen zu können. ^[19]

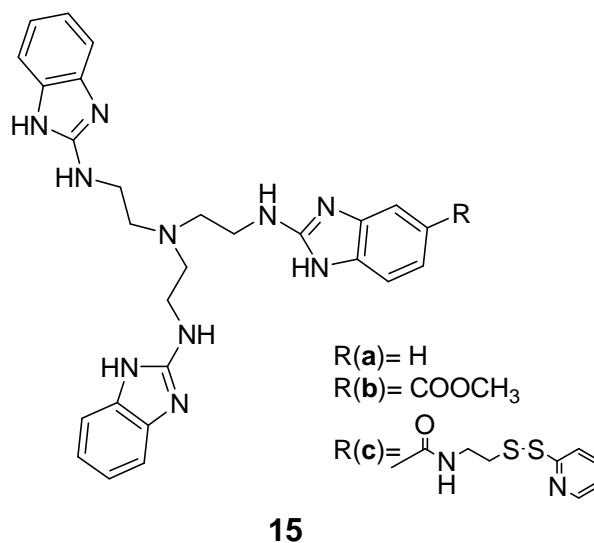


Abb. 44: Struktur von Trisbenzimidazol (**15a**) und seinen Derivaten **15b** und **15c**, die kupplungsfähig sind; **15b** muss zunächst in die Carbonsäure überführt werden.

Verbindung **15b** liegt aus Synthese-technischen Gründen als Carbonsäureester vor und muss vor der Kupplung verseift und somit in die freie Carbonsäure überführt werden; gekuppelt wird diese durch Reaktion mit einer Aminogruppe zur Amidbindung, die zum einen leicht zu generieren ist und zum anderen auch Stabilität bietet.

Auf diese Weise wurden auch die in dieser Arbeit synthetisierten und verwendeten DNA-Konjugate gewonnen. Die DNA wurde dabei auf einem DNA-Synthesizer (*Applied Biosystems 381A DNA-Synthesizer*, s. a. Kapitel 8.2.1 „Arbeitsmethoden mit Oligonucleotiden“), mittel standardmäßiger Festphasensynthese hergestellt. Man verwendete hierbei Phosphoramidite der Firma Proligo und mit der entsprechenden Anfangsbasis beladene Säulen, und betrieb das Gerät im „Trityl OFF“-Modus, um das Oligonucleotid mit freier 5'-terminaler Aminogruppe zu synthetisieren.

Das Oligonucleotid wurde zunächst auf der festen Phase belassen und wurde dort mit der Tribenzimidazol-Carbonsäure zum Konjugat **51** umgewandelt. Dies geschah in mehreren Stunden durch das Bewegen der Reaktionslösung (0.1 M Tribenzimidazol-Carbonsäure **15**, DIC, HOBT, drei Tropfen TEA in 0.5 ml DMF) über zwei an die Säule angeschlossene Spritzen. Man spaltete über Nacht in 32%iger NH_3 und 55°C von der festen Phase ab und sorgte so dafür, dass auch die letzten Schutzgruppen von den Nucleobasen entfernt wurden.

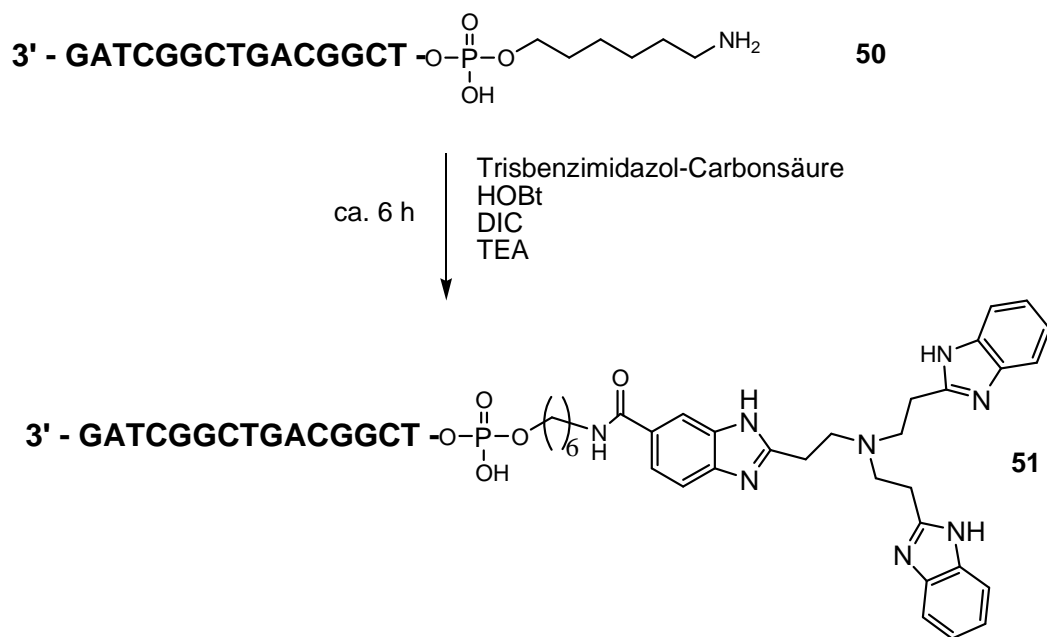


Abb. 45: Reaktionsschema von Oligonucleotid **50** zu Konjugat **51**.

Nach einem Entsalzungsschritt wurde die Konzentration des Reaktionsgemisches per UV-Photometrie (Wellenlänge = 260 nm) bestimmt und über eine PAGE aufgereinigt. Die Banden, die man für das Produkt hielt, wurden ausgeschnitten und mit Hilfe eines Elutionspuffers aus der Polyacrylamid-Matrix eluiert. Nach einem weiteren Entsalzungsschritt und einer weiteren Bestimmung der Konzentration wurden die einzelnen Produktbanden (sofern es mehrere gab) mittels MALDI auf ihre Identität hin untersucht.

Eigene Arbeiten

Die Spaltungsexperimente, die mit dem Konjugat **51** aus Abb. 45 durchgeführt wurden, werden im Abschnitt 5.1.3 „Spaltungsexperimente mit Trisbenzimidazol-DNA-Konjugat **53**“ näher beschrieben.

5.1.2 RNA–Spaltung und deren Messung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Spaltung von RNA durch kleine Moleküle und durch deren Konjugate mit DNA untersucht. Um dies zu tun, benötigt man eine Möglichkeit, die Spaltprodukte sowie das Substrat in seiner ungespaltenen Form „sichtbar“ zu machen und zu quantifizieren.

Zu diesem Zweck kam ein DNA–Sequenzer, der *ALFexpress* ^[136] zum Einsatz. Seine Funktionsweise beruht zunächst auf einer normalen Polyacrylamid–Gelmatrix, welche durch Anlegen von Spannung die RNA–Fragmente der Größe nach auftrennt. Kleine Fragmente durchwandern die Matrix schneller, größere Fragmente entsprechend langsamer. Da hier aber die Detektion durch Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffes (Cy5, s. Abb. 47) mittels Laser erfolgt, wird entsprechend gelabelte RNA als Substrat verwendet.

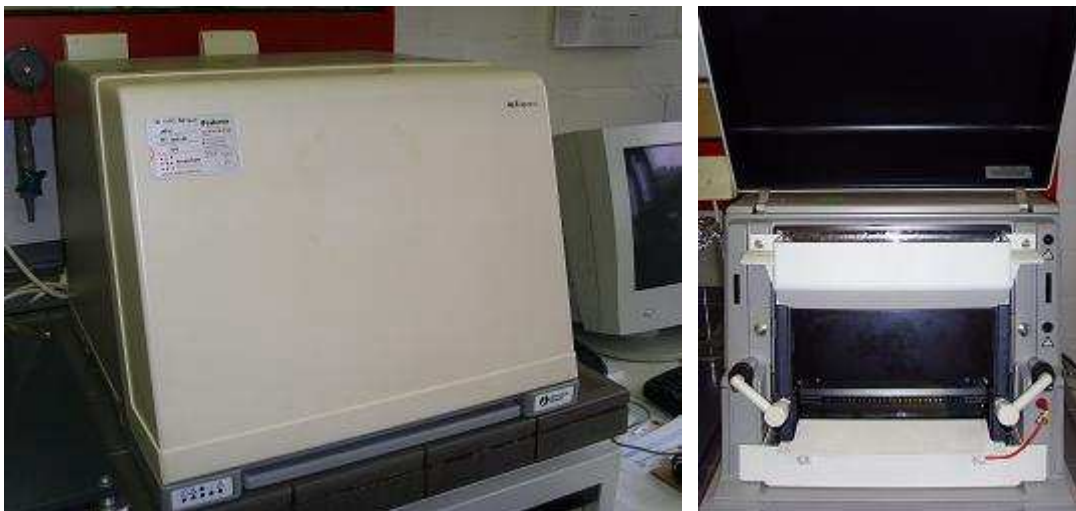


Abb. 46: *ALFexpress* im geschlossenen (links) und im geöffneten (rechts) Zustand mit eingehängter Gelkassette.

Bestandteil des *ALFexpress* ist eine temperierbare Gelkassette, deren Thermostat über einen separat gelegenen Wasserkreislauf verfügt und so das Gel auf konstanter Temperatur halten kann. Es können bis zu 40 Proben gleichzeitig analysiert werden, da ein Kamm für 40 Taschen zum Einsatz kommt, wobei jede Tasche 10 μ l Ladevolumen fassen kann. Durch die lange Laufstrecke von 26 cm und die konstant gehaltene Temperatur ist die Auflösung der einzelnen Banden ausgezeichnet. Wie oben erwähnt, werden die Fragmente über das Fluoreszenz–Label detektiert, da ein horizontal durch das Gel verlaufender Laserstrahl den Fluoreszenzfarbstoff bei 633 nm anregt und die Fluoreszenz über Photodetektoren (jede Bahn verfügt über einen

eigenen) registriert wird. Die Registrierung der Daten erfolgt über einen PC mit entsprechender Software-Ausrüstung (ALFwin).

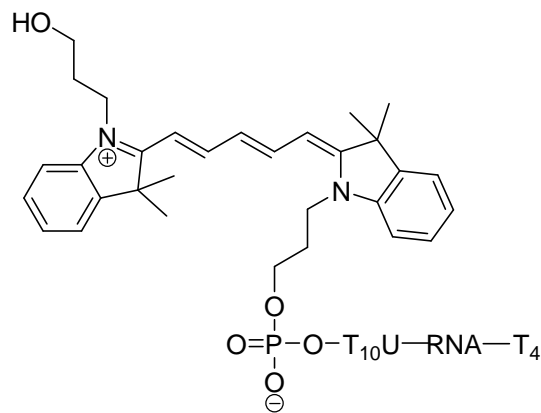


Abb. 47: Grundsätzlicher Aufbau eines Cy5-gelabelten RNA-Substrates; der Farbstoff ist dabei am 5'Ende des Stranges angebracht, der RNA-Teil des Substrates wird von T₁₀- bzw. T₄-Spacern flankiert, um Probleme bei der Detektion zu vermeiden, die aufgrund von zu kleinen Fragmenten bzw. zu kleinen Fragmentunterschieden herrühren könnten.

Die Auswertung in Hinblick auf die Spaltaktivität wurde mit einem weiteren Programm (AlleleLinks Vers. 1.0) vorgenommen. Die Banden werden in der Standardeinstellung des Programms als Peaks dargestellt, wodurch die Quantifizierung der einzelnen oder auch gesamten Spaltprodukte durch Integration über die Fläche der Peaks erfolgte.

Des Weiteren ist bei dieser Methode darauf zu achten, dass die zu analysierenden Fragmente nicht zu klein werden. Zwischen Cy5-Label am 5'-Ende und der Substratsequenz befindet sich deshalb mindestens ein T₁₀-Fragment, welches durch seinen DNA-Charakter nicht durch künstliche oder natürliche Ribonucleasen gespalten werden kann und erhalten bleibt, so dass das kürzeste Fragment elf Nucleoside lang ist und eine akzeptable Grundgröße aufweist. Am 3'-Ende befindet sich ein etwas kürzeres Stück DNA (T₄), um die bessere Unterscheidbarkeit zwischen Spaltprodukten und dem Volllängenssubstrat zu gewährleisten, die durch die derart verstärkte Laufstreckendifferenz zustande kommt.

Zur Vermeidung von Kontaminationseffekten wurden neben den standardmäßigen Vorsichtsmaßnahmen (steriles Arbeiten) auch andere ergriffen. Wo es möglich war, wurden die Stammlösungen der künstlichen RNA-Spalter ultrafiltriert („Microcon YM3“ Säulen, Millipore); allerdings war dies wegen der niedrigen Toleranz der Filtermembrane gegenüber organischen Lösungsmitteln (Methanol, DMSO) nur selten möglich.

In etlichen Fällen kam enantiomere RNA als Substrat zum Einsatz, da sie durch ihre nicht-natürlichen Zuckerbausteine (L-Ribose statt D-Ribose) nicht als Substrat natürlicher Ribonucleasen erkannt wird und somit von diesen nicht abgebaut werden kann. Diese RNA-Substrate wurden freundlicherweise von S. Pitsch und Noxon (**16'** s. Abb. 25, S.28, **17'** s. Abb. 48) zur Verfügung gestellt und dienten häufig als Hauptsubstrat bei der Untersuchung der kleinen Moleküle auf RNA-Spaltaktivität, da die hier beobachteten Spaltungsraten zumindest nicht auf RNase-Aktivität zurückzuführen sind und Artefakte dieser Natur ausgeschlossen werden können.

Cy5-d(5'CTAGCCGACTGCCGA)-ent-r(UCUCGCUGACAGAC)-T₄3' **17'**

Abb. 48: Sequenz von **17'**.

Sowohl bei diesen nicht-natürlichen Substraten als auch bei denen, die ausschließlich über die natürlichen Zuckerbausteine verfügen, wurden bei jeder Experimenten-Serie Kontrollexperimente angefertigt. Zu diesem Zweck wurde die RNA unter denselben Bedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, Inkubationszeit etc.) inkubiert wie die anderen Proben, nur dass der RNA-Spalter weg gelassen wurde. Man setzte meist zwei Blindproben an, von denen die eine mit den restlichen Proben inkubiert wurde und die andere bei -20°C bis zur Analyse gelagert wurde, um festzustellen, ob die Kontamination (falls vorhanden) durch die RNA-spaltenden Verbindungen eingeschleppt wurde oder gar aus einer anderen Quelle (z.B. kontaminierter Puffer) stammte. Sofern bei beiden ähnliche Abbauraten bzw. Spaltmuster erkennbar waren, wurde zur Festlegung des Untergrundes die RNA-Hydrolyse über beide Proben gemittelt und zur Korrektur der Werte aus den Spaltungsexperimenten dieser Wert von den ermittelten Spaltungsraten abgezogen.

Falls keine andere Form des Untergrundes vorlag (z.B. aus tatsächlicher Kontamination durch Ribonucleasen → verstärktes Auftreten von Pyrimidin-A-Spaltungsmustern), wurde diese Art der Korrektur angewendet, in allen anderen Fällen wurden die entsprechenden Experimente gekennzeichnet.

5.1.3 Spaltungsexperimente mit Trisbenzimidazol-DNA-Konjugat 53

Auf Affinitätsspaltung beruhende RNA-Hydrolyse lässt sich gut mit Oligonucleotidkonjugaten durchführen, wie bereits in Abschnitt 4.2 „Selektive künstliche Ribonucleasen“ beschrieben wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte aber ein Konjugat erstellt werden, welches in der Lage sein sollte, Turnover - also katalytischer Abbau der Substrat-RNA - zu erzeugen. In der Vergangenheit gelang das nicht durch Verwendung von einfachen Oligonucleotidkonjugaten mit Aminolinker, weswegen an der genauen Topologie des Duplexes gefeilt werden sollte.

Wie Häner *et. al.* bereits vor 10 Jahren beschrieben, konnten sie mit einem 2'-Methoxyethoxy-derivatisierten Oligonucleotidkonjugat mit Europium(III)-tragender Spaltereinheit an einer RNA, mit der das Konjugat durch Fehlpaarung einen 2-Nucleotide großen bulge induziert, Turnover induzieren. [91]

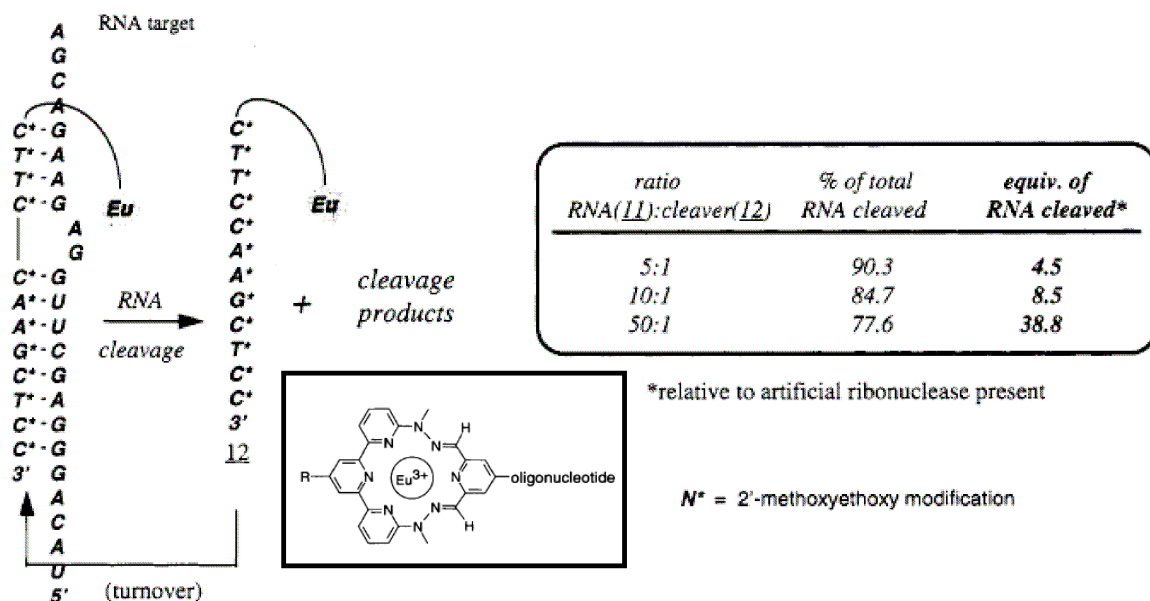


Abb. 49: Europium(III)-Konjugat nach Häner *et.al.*, welches Turnover zeigt. [91]

In Anlehnung an dieses Projekt wurden Sequenzen für Substrat und Oligonucleotideil des Konjugates derart gewählt, dass die beiden Stränge räumlich in einer Weise wechselwirkten, die einen zwei Nucleotide großen bulge induzieren sollte. Das Konjugat wurde in unserem Fall mit Trisbenzimidazol als Spalteinheit bestückt. Die Sequenzen von Konjugat und Ziel-RNA wurden dabei komplett aus der Arbeit von Häner *et. al.* übernommen.

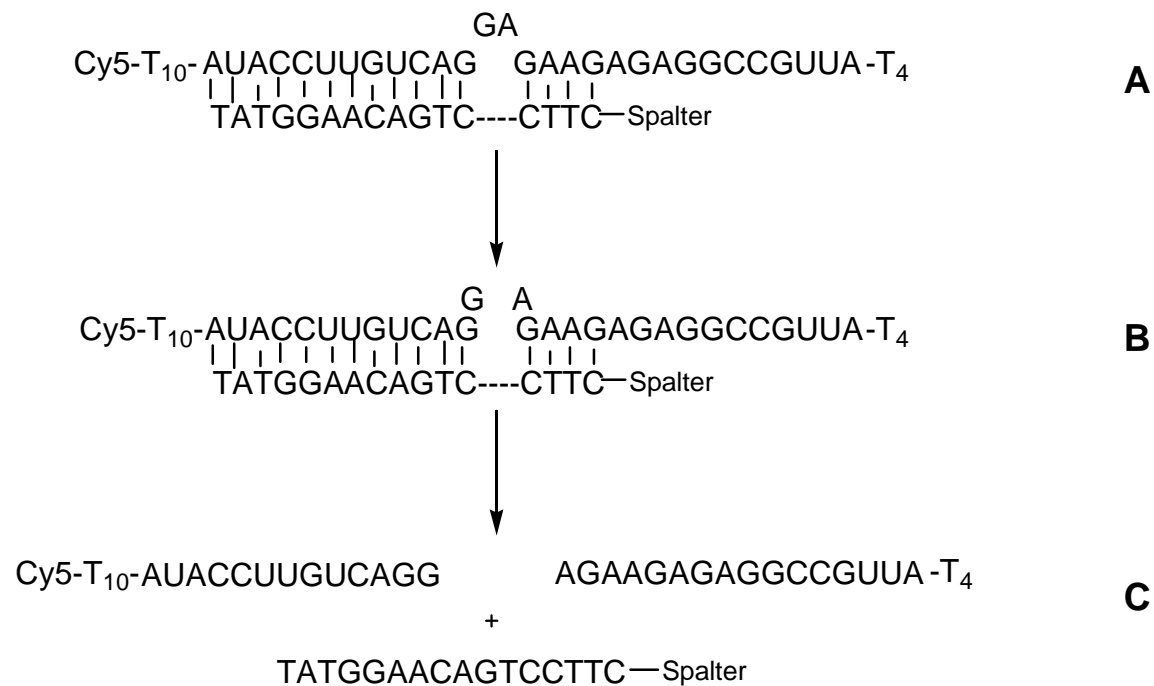


Abb. 50: **A**: Schematische Darstellung des geplanten Hybrides zwischen antisense-Konjugat **53** und Substrat **49**. „Spalter“ steht für Trisbenzimidazol **15** (am 5'-Ende über einen Aminolinker angebracht). **B**: Spaltung des Substrates in der Mitte des induzierten bulges durch räumlich nahe Spaltereinheit. **C**: Auflösung des Duplexes und Freisetzung des Konjugates.

Es sollte ganz analog wie in der Arbeit von Häner *et. al.* ein bulge induziert werden, der durch die räumliche Nähe zur Spaltereinheit bevorzugt gespalten werden und die Bildung zweier schwächerer Duplexe zur Folge haben sollte, die sich daraufhin leicht lösen würden, um den Katalysator freizusetzen und ihn so in die Lage zu versetzen, an ein weiteres Substrat-Molekül zu binden und den Turnover-Zyklus auf diese Weise zu schließen.

Der DNA-Teil des Konjugates wurde mit einem DNA-Synthesizer *Applied Biosystem 381A* hergestellt und wurde zur Kupplung mit dem RNA-Spalter zunächst an der festen Phase belassen. Nach der Kupplung wurde das Konjugat durch Behandlung mit wässriger NH₃-Lösung abgespalten und dann wie im Abschnitt 5.1.1 beschrieben aufgereinigt und analysiert.

Im hier vorliegenden Falle erhielt man zwei Produkt-Banden, deren Untersuchung mittels MALDI einen Massenunterschied von etwa 70 g/mol ergab. Es wurde vermutet, dass es sich hier um eine Isobutyryleinheit handelte, also eine unvollständig abgespaltene Schutzgruppe an Guanosin, da im Gegensatz zu späteren Versuchen die Abspaltung des Konjugates von der festen Phase bei Raumtemperatur geschah, was wohl als Temperatur für die Abspaltung dieser einen Schutzgruppe nicht ausreichend hoch war. Aus diesem Grund wurde in der Folge nur

noch bei 55°C von der festen Phase abgespalten (in Abschnitt 5.1.1 beschrieben). Da man nun aber diese beiden Produkte hatte, wurde auch das unvollständig entschützte Konjugat (im Folgenden mit **53'** bezeichnet) auf RNA-Spaltung getestet. In der folgenden Abbildung ist das Chromatogramm der ersten Tests zu finden.

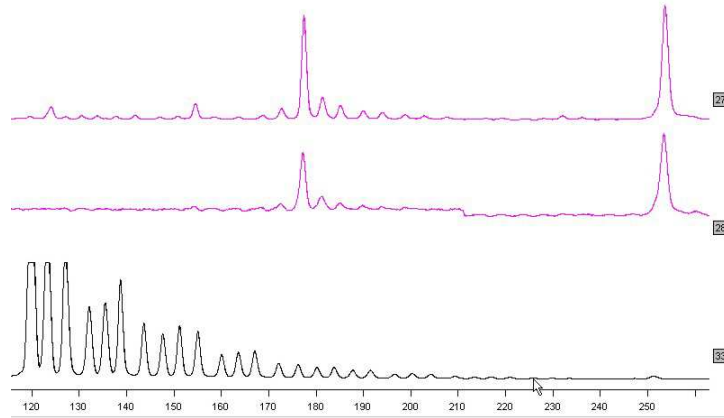


Abb. 51: Grafische Darstellung des ALF-Laufes aus den Experimenten mit Konjugat **53** und Substrat **49**. Oberste lane: Unvollständig entschützes Konjugat (**53'**); mittlere lane: Gewünschtes Konjugat **53**; untere lane: Basenleiter von Substrat **49**. Spaltexperimente wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 150 nM Substrat **49**, 1,5 µM Konjugat **53** (bzw. **53'**), Tris-HCl-Puffer pH 8.0, Inkubationszeit 20h, 37°C.

Die Auswertung dieses Plots zeigte deutlich, dass die Hauptspaltstelle nicht an Nucleotid 13 oder 14 saß, sondern an Nucleotid 15, zumal die Spaktaktivität hauptsächlich auf diese eine Stelle beschränkte und sich nicht – wie es unter bulge-Bildung der Fall sein sollte – auf zwei Nucleotide bzw. Bindungen ausdehnte. Diese Feststellung legte nahe, dass das Hybrid nicht in der geplanten Weise gebildet worden war, sondern eine andere Hybridisierungsform vorlag.

An dieser Stelle nahm man ein Berechnungstool zur Hilfe, das die Sekundärstruktur des Hybrids vorhersagen sollte, und zwar *RNAstructure*[®], ein Programm, welches in der Gruppe um M. Zuker entwickelt wurde und als Grundlage zur Berechnung der Hybridstrukturen die freie Bildungsenergie einsetzt.^[20] Das Programm erstellt eine Liste von 20 möglichen Hybridisierungsstrukturen, wobei die mit der niedrigsten Energie – also die wahrscheinlichste – an erster Stelle aufgeführt wird, die mit der zweitniedrigsten an zweiter Stelle usw. In Abbildung 52 ist die erste durch das Programm

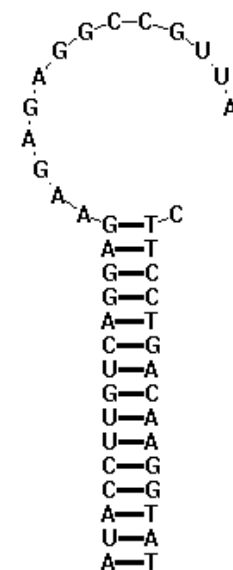


Abb. 52: Von *RNAstructure*[®] vorhergesagte Hybridstruktur des Duplexes aus **49** und **53**.

vorhergesagte Struktur abgebildet.

Wie man sieht, handelt es sich hierbei tatsächlich um eine Struktur ohne bulge, laut Berechnung wird am wahrscheinlichsten ein einfacher Doppelstrang mit einem Nucleotid Überhang gebildet. Diese Beobachtung passt haargenau zu denen, die in den Spaltexperimenten gemacht wurden, also eine vorwiegende Spaltung der Bindung nach Nucleotid 15. Auffällig ist hierbei die Bildung eines G-T-wobble-Basenpaares, einer Fehlpaarung, die zwar vorhersehbar, aber durch die zu Häner *et. al.* analogen Bedingungen für unwahrscheinlich gehalten wurde, denn Häner und Mitarbeiter beobachteten ausschließlich eine bulge-Bildung und keine wobble-Paarung. Das letzte Basenpaar kann dadurch auch nicht gebildet werden, da ein A-C-Basenpaar sehr ungünstig wäre, so dass das letzte Nucleotid des Konjugates also einzelsträngig bleibt.

Da nun dieser Befund vorlag, stellte sich die Frage, wie trotz dieser offensichtlich Präferenz für diese Struktur eine Umgebung geschaffen werden könnte, um doch noch einen bulge zu induzieren und den gewünschten turnover erzielen zu können.

Man nahm zu diesem Zweck MgCl_2 in unterschiedlichen Konzentrationen zur Hilfe, in der Hoffnung, dass sich durch die Mg^{2+} -Ionen die Bildung eines bulges begünstigen ließe.

Es wurden drei unterschiedliche Konzentrationen an MgCl_2 -Lösungen in den folgenden Spaltexperimenten verwendet: 10 mM, 5 mM und 1 mM; diese Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration der Salzlösung im Experiment.

Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Anstrengungen abgebildet (Abb. 53).

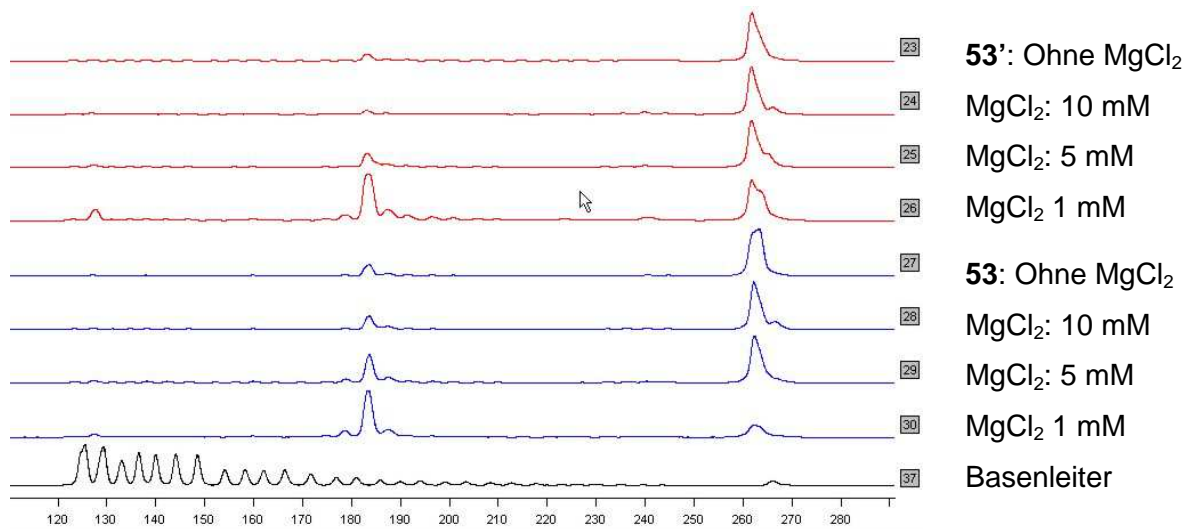


Abb. 53: Experimente von **53'** (**53** +70 g/mol) (ersten vier lanes, 23-26) und **53** (vier lanes darunter, 27-30) mit Substrat **49**. Nebenstehend Bedingungen bezüglich MgCl₂-Konzentration; 150 nM Substrat **49**, 1.5 μM Konjugat, Tris-HCl-Puffer pH= 8, Inkubationszeit 20 h bei 37°C.

Betrachtet man Abb. 53, so fällt auf den ersten Blick kein Unterschied in den Spaltungsmustern von **53** und **53'** auf. Eindeutig ist jedoch der Anstieg der Spaltaktivität mit sinkender Magnesiumkonzentration, wobei ein Maximum an Spaltaktivität bei einer Mg²⁺-Konzentration von 1 mM zu verzeichnen ist. Es geht aus dieser Grafik allerdings auch eindeutig hervor, dass auch durch Zugabe von MgCl₂ keine bulge-Induktion statt gefunden hat.

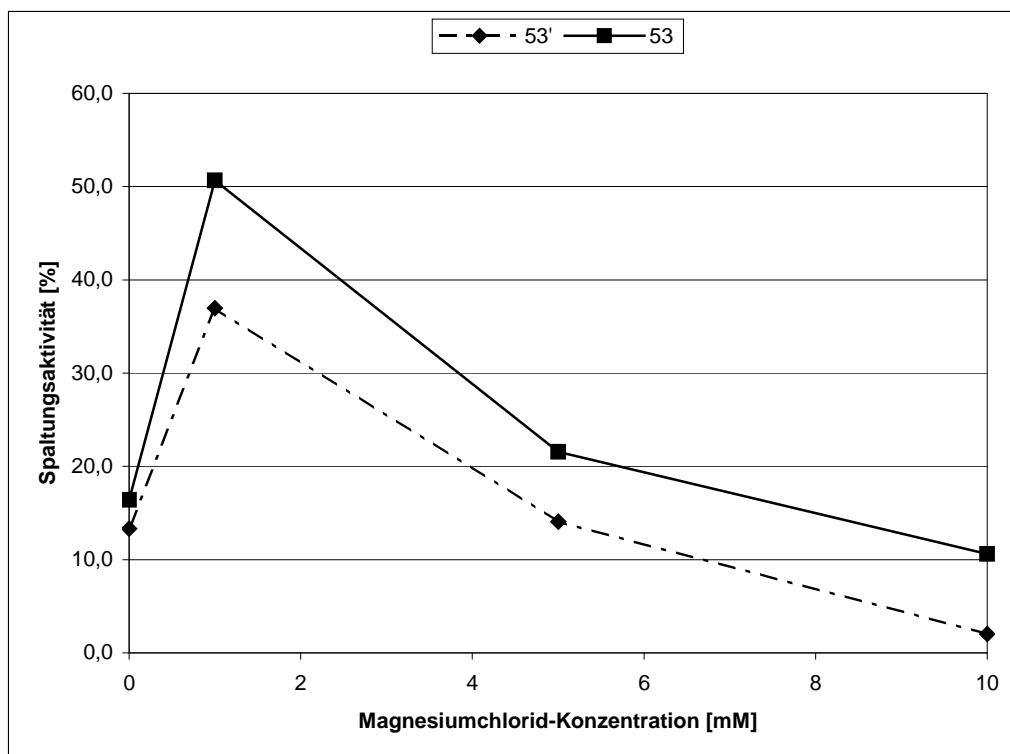


Abb. 54: Grafische Auswertung der Spaltungsexperimente von Konjugat **53** und **53'**. Gezeigt ist die Abhängigkeit der Spaltungsaktivität von der MgCl₂-Konzentration im Experiment. Alle anderen experimentellen Bedingungen wie in Abb.53 beschrieben.

In Abb. 54 sind die Spaltungswerte dieses Experimentes gegen die Magnesiumchlorid-Konzentration aufgetragen. Man sieht gleich, dass sich die Formen der beiden Graphen deutlich ähneln, jedoch ist die Spaltungsaktivität mit Konjugat **53** ohne Schutzgruppe insgesamt höher als mit **53'**. Erklärt werden kann diese Abweichung dadurch, dass das Konjugat mit der noch daran befindlichen Schutzgruppe weniger gut in Wechselwirkung mit dem Substrat treten bzw. Wasserstoffbrückenbindungen mit diesem aufbauen kann, wodurch die Spaltungsrate natürlich gesenkt werden kann.

Da nun klar war, dass mit solchen Mitteln keine bulge-Induktion erreicht werden konnte, wurde von einer Serie Turnover-Experimenten – also Experimente unter Verwendung des Konjugates im Unterschuss bzw. katalytischen Mengen – abgesehen, da man nicht davon ausging, dass der T_m -Wert des 15mer Duplexes in einem Bereich befand, in dem er sich unter den Reaktionsbedingungen (37°C) wieder lösen könnte, um den Katalysator frei zu setzen. Nicht umsonst wurde bei der Planung dieses Projektes darauf geachtet, dass man nach der Spaltung lediglich ein 12mer-Duplex und einen 4mer-Duplex erhielt.

5.1.4 Spaltungsexperimente mit Trisbenzimidazol-DNA-Konjugat 55

Mit den Erkenntnissen, die man durch das im voran gegangenen Abschnitt beschriebene Projekt gewonnen hatte, wurde ein neuer Plan für die Durchführung eines bulge-induzierenden Substrat-Konjugat-Duplexes gefasst.

Im vorherigen Projekt wurde aus praktischen Erwägungen ein Substrat ausgewählt, welches bereits zur Hand war und auf das die Sequenz des DNA-Teiles des Konjugates abgestimmt wurde.

Im Folgenden wurden sowohl Substrat als auch Konjugat neu synthetisiert, und zwar nachdem man mögliche Kandidaten für die Paarung mit Hilfe des Programmes *RNAstructure*[®] ermittelt hatte. Auf diese Weise erhielt man einen Treffer für das Duplex-Paar aus Konjugat 55 und Substrat 54 (Abb. 55a und 55b).

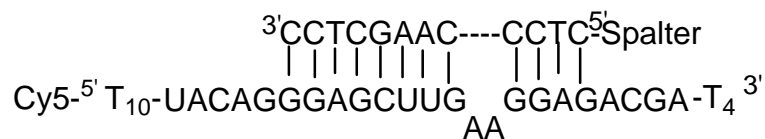


Abb. 55a: Schematische Darstellung des Duplexes aus Konjugat 55 und Substrat 54.

Die in Abbildung 55b gezeigte Struktur war die beste bzw. bezüglich ihrer Bildungsenergie die günstigste, weshalb man sich für dieses Paar entschied. Das Substrat wurde als 5'-Cy5-gelabelte Sequenz bei BioSpring (Frankfurt) bestellt, während der DNA-Teil des Konjugates erneut am Arbeitskreis eigenen DNA-Synthesizer hergestellt wurde.

Die Verknüpfung zwischen diesem Teil des zukünftigen Konjugates und dem Spalter erreichte man wieder durch die in Abschnitt 5.1.1 („Herstellung „maßgeschneiderter“ Trisbenzimidazol-Konjugate“) beschriebene Syntheseroute.

In diesem Fall erhielt man nach Aufreinigung über ein PAGE-Maxigel ein einziges Produkt mit der passenden Masse, die durch MALDI bestätigt wurde.

Nach dieser Aufreinigung folgten die Spaltungstests von Konjugat 55 an Substrat 54. Es wurden vergleichbare experimentelle Bedingungen

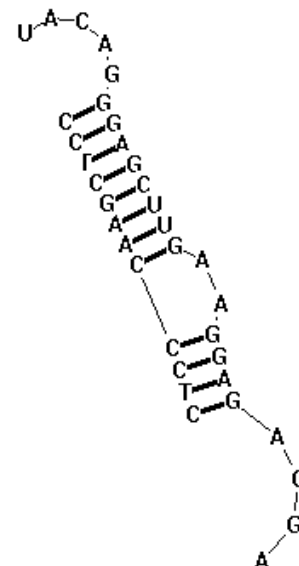


Abb. 55b: Strukturvorhersage von *RNAstructure*[®] für Duplex aus Substrat 54 und Konjugat 55.

gewählt wie in den voran gegangenen Experimenten mit DNA-Konjugaten: 160 nM Substrat **54**, 1.5 μM Konjugat **55**, Tris-HCl-Puffer pH 8, 37°C und 20 h Inkubationszeit. Es wurden zusätzlich die Unterschiede in der Spaltaktivität durch unterschiedliche Ionenstärke – durch Zugabe von 100 mM NaCl – und unterschiedliche Mg^{2+} -Konzentration untersucht, die sich zwischen 0 und 10 mM bewegten.

Im der folgenden Abbildung wurde zunächst ein Beispiel ausgewählt, um die räumliche Spaltaktivität von Konjugat **55** zu charakterisieren (Abb. 56).

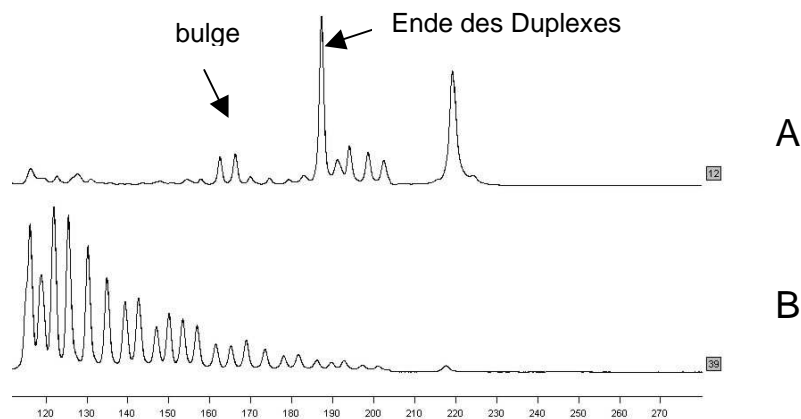


Abb. 56: Spaltungsexperimente an Substrat **54** durch Konjugat **55**. Obere lane (A): Bedingungen: 160 nM Substrat, 1,5 μM Konjugat, pH 8, $\text{MgCl}_2 = 3 \text{ mM}$, 37°C, 20 h. Untere lane (B): Basenleiter durch basische Hydrolyse. Pfeile markieren die Regionen, an denen sich der bulge bzw. das Ende des Substrat-Konjugat-Hybrids befindet.

Auffällig hierbei ist, dass zwar wie erhofft Spaltungsaktivität in der bulge-Region des Duplexes vorhanden war, diese aber deutlich durch die Spaltaktivität am Ende des Duplexes und sogar jenseits desselben überrundet wurde. Ganz überraschend ist dies nicht, da man davon ausgehen kann, dass die räumliche Nähe der Spaltereinheit Trisbenzimidazol zum Ende des Duplexes immerhin noch größer ist als zum induzierten bulge. Die Reichweite der Spaltereinheit des Konjugates wird auch dadurch bestätigt, dass die Spaltaktivität jenseits des Duplexes, also mehrere Bindungen im einzelsträngigen Bereich, ebenfalls gespalten wurden. Dennoch führten diese Erkenntnisse dazu, dass auch für dieses Projekt keine Turnover-Erfolge erwartet wurden, da sich der Duplex nicht auflösen vermochte, wenn der Hauptspaltungsbereich nicht mit dem bulge übereinstimmte; auf diese Weise wurden nicht zwei Hybride mit geringeren T_m -Werten (8mer und 4mer) erzeugt, das Konjugat konnte sich nicht vom Substrat lösen und in einen Katalysezyklus zurückgeführt werden, sofern man das Konjugat in katalytischen Mengen eingesetzt hätte.

Eigene Arbeiten

Auch bei Zugabe von MgCl_2 änderte sich dieses Bild nicht, ganz analog zum Projekt vorher (Abschnitt 5.1.3), lediglich die Spaltungsaktivität wurde hierdurch beeinflusst.

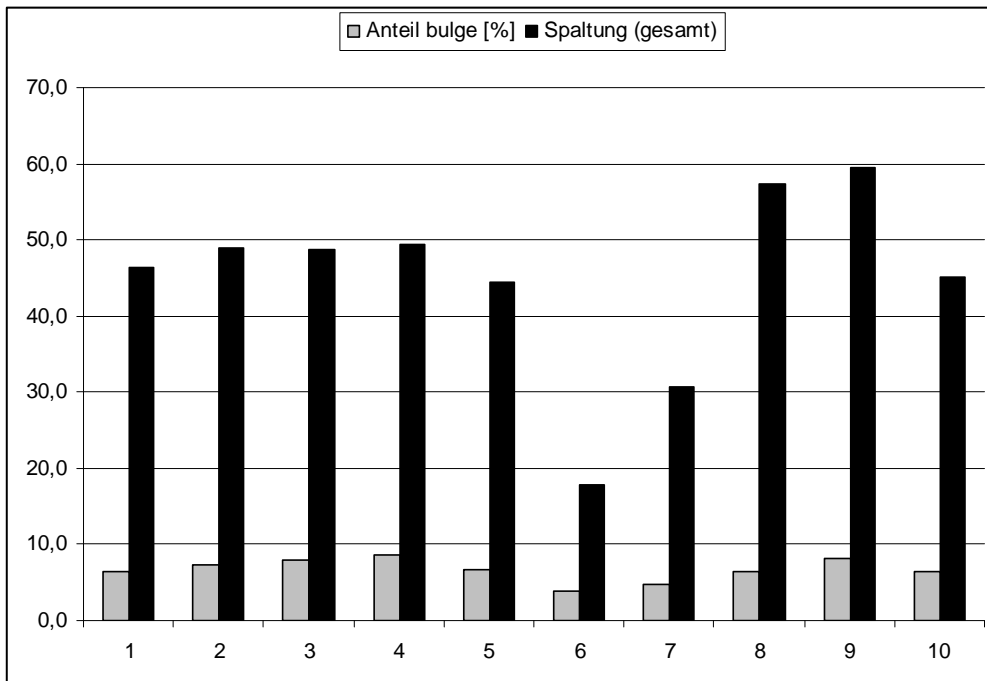


Abb. 57: Grafische Darstellung der Experimentereihe mit Substrat **54** und Konjugat **55**. 1-5: 100 mM NaCl; 6-10: ohne NaCl; 1+6: ohne MgCl_2 , 2+7: 10 mM MgCl_2 ; 3+8: 5 mM MgCl_2 ; 4+9: 3 mM MgCl_2 ; 5+10: 1 mM MgCl_2 . Sonstige Bedingungen: 160 nM Substrat **54**, 1,5 μM Konjugat **55**, Tris-HCl-Puffer pH 8, 37°C, 20 h. Alle Werte wurden durch Abzug des Untergrundes (Blindprobe) korrigiert.

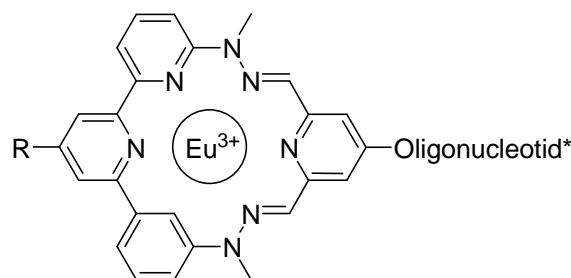
Auffällig ist, dass durch die Zugabe von 100 mM NaCl die Spaltaktivität trotz unterschiedlicher Mg^{2+} -Konzentration immer in etwa gleich bleibt (ca. 46-50%), während die Spaltaktivität ohne Zugabe von NaCl stark variiert: So ist sie zunächst ohne Zugabe von MgCl_2 recht niedrig, ist unter Zugabe von 5-3 mM Magnesiumchlorid im Maximalbereich (57-59%) und sinkt bei sehr hohen Konzentrationen stark (10 mM, 17%), bei niedrigen Konzentrationen (1 mM, 45%) nur leicht ab. Da die NaCl-Konzentration insgesamt um ein Vielfaches höher war (100 mM) als die MgCl_2 -Konzentration (1-10 mM), ist das homogene Bild der Spaltungsaktivitäten dieser Reihe im Vergleich ohne Kochsalzzugabe nicht weiter verwunderlich, da die Ionenstärke bei den Experimenten 6-10 viel stärker variiert und auch der Einfluss des Mg^{2+} als möglicher Unterstützer der Spaltung hier stärker zum Tragen kommt.

Weshalb die beiden zuletzt beschriebenen Projekte - besonders das letzte - nicht den Erwartungen gerecht wurden trotz der doch starken Analogie zu den durch Häner *et. al.* gemachten Experimenten (vgl. Abschnitt 5.1.3, Abb. 49), kann unterschiedliche Gründe haben.

Eigene Arbeiten

Zum einen verwendete die Arbeitsgruppe um Häner eine 2'-Ethoxymethoxy-modifiziertes Konstrukt als sequenzerkennenden Teil des Konjugates. Man geht allerdings davon aus, dass dies nicht der Grund für die unterschiedlichen auf dem Gebiet der RNA-Spaltung gemachten Beobachtungen ist, da diese Modifikation wohl eher positiven Einfluss auf die Stabilität des Konjugates ausübt und weniger auf dessen Reaktivität.

Zum anderen unterscheidet sich unsere Spaltereinheit, das Trisbenzimidazol, deutlich von der, die Häner und Mitarbeiter verwendeten: Ein Eu^{3+} -Komplex mit heteroaromatischem Ringsystem (Abb.58).



* mit 2'-Ethoxymethoxymodifikation

Abb. 58: Von Häner und Kollegen verwendete Spaltereinheit. ^[91]

Es wird für wahrscheinlicher gehalten, dass dieser Unterschied der Grund für die unterschiedlichen Reaktivitäten ist. Das heteroaromatische Ringsystem könnte eine bulge-Struktur binden, diese stabilisieren und deshalb eine Bevorzugung der Spaltung auf diesen Bereich hervorrufen. Das würde auch den von jener Arbeitsgruppe beobachteten Turnover erklären, zumal eine Erhöhung der Spaltaktivität durch Eu^{3+} -Ionen diesen Effekt weiter verstärken könnte.

Weil dies weiter untersucht werden sollte, wurden Versuche unternommen, die Trisbenzimidazoleinheit mit einer aromatischen Struktur zu koppeln, die dann eine erhöhte bulge-Bildung ermöglichen und bessere Voraussetzungen für das Erhalten von turnover bieten könnte (s. folgender Abschnitt 5.1.5 "Versuche zur Herstellung eines Pyren-Benzimidazol-Hybrid-Konjugates").

5.1.5 Versuche zur Herstellung eines Pyren-Benzimidazol-Hybrid-Konjugates

Wie im voran gegangenen Abschnitt beschrieben, zog man in Betracht, dass der Einbau einer größeren aromatischen Struktur die bulge-Bildung in einem Konjugat-RNA-Hybrid unterstützen und somit die Ausbildung von Turnover begünstigt werden könnte. Darüber hinaus sollte der Spalter dadurch zum bulge hin dirigiert werden.

Glücklicherweise wurden in unserem Arbeitskreis in der Vergangenheit künstliche Aminosäuren mit aromatischen Resten synthetisiert, welche für diesen Zweck hervorragend einsetzbar sind.

Dr. M. Suhartono beschäftigte sich während seiner Dissertation genau mit der Synthese solcher Aminosäuren, unter anderem auch mit der Synthese einer Aminosäure, die einen Pyrenrest in der Seitenkette trug.^[21] Dieser Rest war wegen seiner Größe und Planarität besonders attraktiv als Baustein für ein Konjugat mit den gewünschten Eigenschaften. Des Weiteren hat Pyren sehr charakteristische UV-Eigenschaften, die die Untersuchung eines entsprechenden Konjugates erleichtern und seine Einsetzbarkeit erweitern könnten.

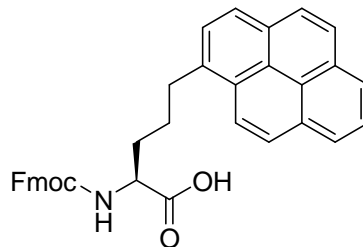


Abb. 59: Fmoc-geschützte Pyren-Aminosäure **56** [M. Suhartono].

Da die Ankupplung der Spaltereinheit an einen DNA-Strang standardmäßig über einen Aminolinker an der DNA-Sequenz und eine Carbonsäurefunktion an der Spaltereinheit erfolgte, lag der Gedanke nahe, die Aminosäure **56** zwischen DNA und Trisbenzimidazoleinheit einzufügen, und zwar über bewährte Peptidbindungschemie.

Folgendes Syntheschema wurde erdnen:

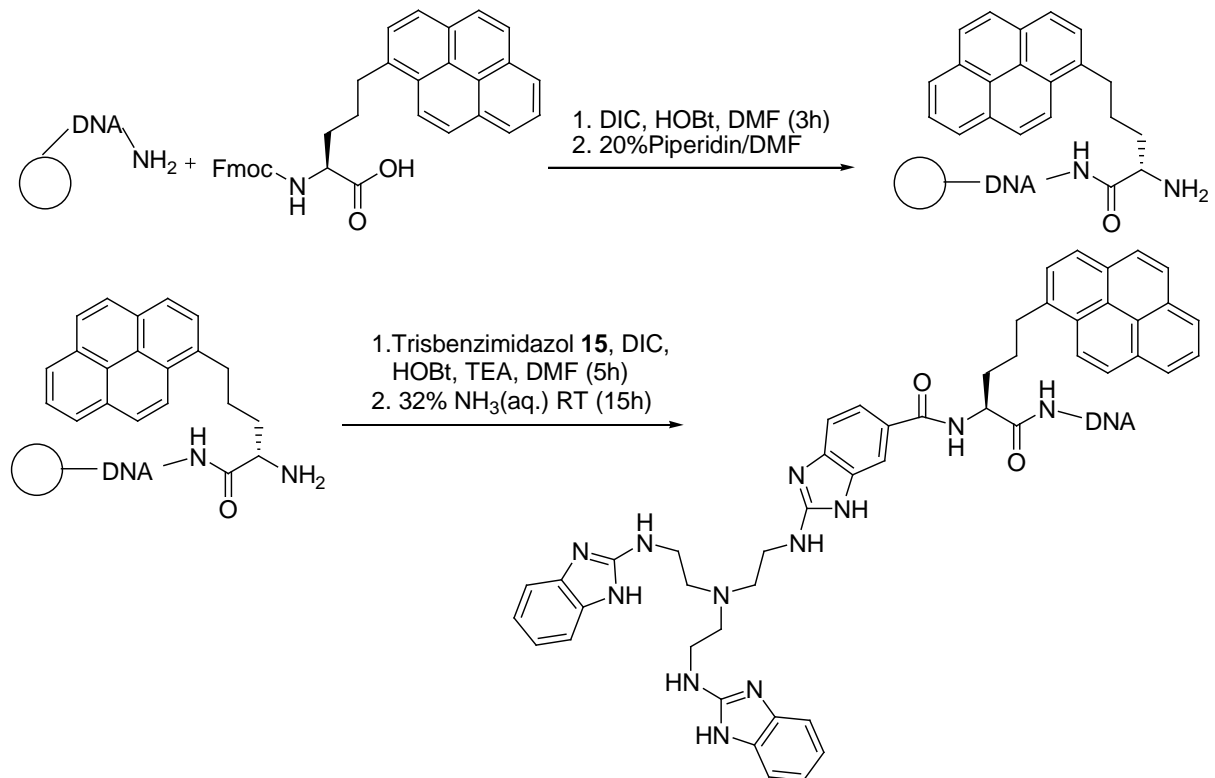


Abb. 60: Geplantes Syntheschema zur Herstellung eines DNA-Pyrenaminosäure-Konjugates. Die DNA an der festen Phase verfügt über einen 5'-terminalen C6-NH₂-Linker.

Diesmal stammte die DNA-Sequenz für das Konjugat von der Firma BioSpring (Frankfurt), die dort aus Gründen der Zeitersparnis bestellt worden war. Die DNA-Bausteine verfügten über schnell-entschützende Schutzgruppen, was die spätere Abspaltung von der festen Phase in sofern erleichtern sollte, dass weniger drastische Bedingungen gewählt werden konnten.

Die zunächst noch Fmoc-geschützte Aminosäure **56** sollte zunächst innerhalb von 3 Stunden mit DIC und HOBt in DMF als Lösungsmittel an die sich an der festen Phase befindende DNA gekuppelt werden. Dies geschah nach dem bereits in Abschnitt 5.1.1 („Herstellung ‚maßgeschneiderter‘ Trisbenzimidazol-Konjugate“) beschriebenen Verfahren durch Bewegung der Reaktionslösung mittels zweier Spritzen durch die sich in der Säule befindliche feste Phase. Nach Waschen des Säulenmaterials mit DMF und Acetonitril führte man die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch. Man verwendete hierzu eine kommerziell erhältliche Lösung von 20% Piperidin in DMF (Fluka) über Molsieb. Die feste Phase wurde 30 Minuten lang mit dieser Lösung behandelt, bevor sich ein weiterer Waschschrift anschloss.

Nach Trocknung der festen Phase im Vakuum sollte nun die vorbereitete Trisbenzimidazol-Carbonsäure **15** aufgekuppelt werden, und zwar innerhalb von 5 Stunden, ganz analog zu der bekannten Methode aus Abschnitt 5.1.1. Nach Abspaltung der DNA bzw. des erhofften Konjugates mit 32%iger wässriger, ammoniakalischer Lösung über Nacht bei Raumtemperatur, wurden die Abspaltungs- und Waschlösungen vereinigt und bis zur Trockne im Vakuum eingengt. Der zurückgebliebene Feststoff wurde über eine NAP-Säule entsalzt und einer Konzentrationsbestimmung unterworfen, wobei sich das Maximum der Absorption nicht mehr bei 260 nm, sondern bei 272 nm befand, ein Effekt, der wohl auf den Pyrenbaustein zurück zu führen war.

Die Aufreinigung erfolgte über ein präparatives Minigel (s.a. „Materialien und Methoden“) und es wurden zwei Banden isoliert, wobei nach der Intensität der Fluoreszenz zu urteilen die vermutete Produktbande 10% und die zweite Bande 90% der Gesamtausbeute ausmachten.

Von beiden Banden wurden Massenspektren angefertigt. Die zweite Bande enthielt tatsächlich keine zum Produkt passende Masse, man fand hingegen die Massen des ungekuppelten Oligonucleotids sowie weitere, unter anderem auch eine, die zu einem Konjugat ohne Trisbenzimidazol passen würde.

Die mutmaßliche Produktbande enthielt einen Hauptpeak, der aber etwas zu klein war, um der Masse des Produktes zu entsprechen. Rechnerisch würde die Masse der eines Produktes mit einem Cytosin weniger in der DNA-Sequenz entsprechen. Da aber nicht eindeutig war, ob dieses Ribonucleosid tatsächlich am 3'-Ende des Konjugates fehlte, oder ob es sich um einen Messfehler handelte (z.B. durch das „Abschießen“ eines Cytosins bei der Messung), wurde ein hochaufgelöstes Massenspektrum (durchgeführt von Dr. Ute Bahr) der Verbindung angefertigt.

Auch hier zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei diesmal der Hauptpeak etwas kleiner war. Er stimmte mit der Masse eines Konstruktes überein, welches über ein Cytosin sowie ein zusätzliches Cytidin weniger am 3'-Ende verfügte.

Unklar blieb, ob die fehlenden (Ribo-)Nucleobasen durch die Reaktion abgespalten wurden, ob es sich doch um eine Art Messfehler handelte oder ob schon bei der Synthese des DNA-Stranges an der festen Phase ein Fehler aufgetreten war.

Es wurde ein weiterer Versuch unternommen, dieses Konjugat herzustellen, und zwar nach der gleichen Methode wie hier bereits beschrieben. Dies geschah zum einen, um die Reproduzierbarkeit dieser Methode zu untersuchen, und zum anderen

diente es der näheren Untersuchung, ob sich das Phänomen der fehlenden Nucleobasen wiederholen ließ oder ob es sich um ein einmaliges Artefakt handelte. Obwohl man genau die gleichen Mengen und Arten von Reagenzien verwendete, erhielt man diesmal kein Produkt, statt dessen erhielt man eine Masse, die zu groß war, um mit der Masse der unkonjugierten DNA überein zu stimmen, und zu klein, um ein mögliches Produkt sein zu können. Wahrscheinlich schien es aber, dass es sich beim erhaltenen Produkt um ein Konjugat ohne Trisbenzimidazol handelte.

Zu einem späteren Zeitpunkt stellte sich heraus, dass die zweite isolierte Bande des präparativen Gels, die 90% der Gesamtausbeute ausmachte, hauptsächlich eine Verbindung enthielt, die zur Aufklärung des Synthesefehlschlages beitragen sollte. Als eine weitere Mitarbeiterin unseres Arbeitskreises Probleme bei der Synthese mit dem von Firma BioSpring gelieferten DNA-Material bekam, wurden Nachforschungen bezüglich verwendeter Schutzgruppen und Reagenzien angestellt. Man fand heraus, dass die hauptsächlich vorkommende Verbindung durch das Wandern einer Aminoschutzgruppe auf die 5'-terminale Aminogruppe bebildet worden war, und zwar irreversibel. Zusätzlich dazu verwendete BioSpring das Anhydrid dieser Schutzgruppe als Capping-Reagenz während der Festphasensynthese. Erst ein zusätzlicher Waschschrift spült die Reste dieses Reagenzes vom festphasengebundenen Material und man hat keine Reaktion mit der 5'-terminalen Aminogruppe zu befürchten. All diese Umstände waren zum Zeitpunkt der Durchführung der hier beschriebenen Kupplungsversuche noch unbekannt. Im Anhang sind Abbildungen mit der Struktur der gewünschten sowie tatsächlich erhaltenen Verbindungen und ihrer Molmassen angefügt, ebenso wie ein MALDI-Spektrogramm der gebildeten Verbindung. Unter diesen Voraussetzungen konnte eine Kupplung also gar nicht gelingen, da die benötigte Aminogruppe irreversibel blockiert war.

Die hier angewendete Methode ist sehr aufwändig, grundsätzlich kann man nicht zwischendurch Reaktionskontrollen durchführen um zu sehen, an welcher Stelle der Reaktion etwas nicht geklappt haben könnte, da sich die ganze Reaktion an der festen Phase abspielt. Des weiteren gelang es nicht, im Rahmen dieser Arbeit die Reaktion soweit in den Griff zu bekommen, dass genau geklärt werden konnte, ob die erste Reaktion dieser Art ohne die beschriebene Problematik nun erfolgreich gewesen wäre oder nicht.

Eigene Arbeiten

Eine Alternative zur hier beschriebenen Vorgehensweise wäre eventuell eine Reaktion in flüssiger Phase, hierzu wäre aber noch die Entwicklung einer adäquaten Methode nötig.

5.1.6 Sequenzspezifische Spalter unter Verwendung von „Helfer“-Sequenzen

In den voran gegangenen Abschnitten wurde bereits die Schwierigkeit erörtert, durch die Bildung eines Duplexes zwischen Substrat und ODN-Konjugat einen Turnover zu erzwingen. Neben der Festigkeit der Bindung dieser beiden Teile – die wiederum vom T_m -Wert des Duplexes abhängt – liegt das Problem in der Bildung einer Vielzahl von Spaltprodukten begründet. Das Konjugat kann mit seiner katalytisch aktiven Einheit nicht nur direkt am Ende des Duplexes spalten, sondern auch an den weiter entfernten Bindungen im einzelsträngigen Bereich, was auf die Flexibilität des Linkers zwischen dem ODN- und dem Spalter-Fragment des Konjugates zurück zu führen ist. Diese Flexibilität scheint zunächst ein Vorteil zu sein, da sich die katalytische Gruppe genau an die benötigte Trajektorie des Übergangszustandes (bzw. der Zwischenstufe) anpassen kann und somit überhaupt ihre Aufgabe zu erfüllen vermag.

Aus diesen Grund kam folgende Idee auf: Würde man stattdessen eine ganz eingeschränkte Anzahl von Spaltungsmöglichkeiten anbieten, würde sich im Laufe der Reaktionszeit – idealerweise – ein einzelnes Produkt bei der Spaltung akkumulieren, wodurch zum einen die effektive Spaltaktivität (bezogen auf das Substrat) gesteigert werden könnte, und zum anderen hätte man den Vorteil, eine genau definierte Spaltstelle generiert zu haben, was sich für die Anwendbarkeit im Bereich der Biotechnologie oder anderen Gebieten als großer Vorteil erweisen würde.

Diese Idee wurde folgendermaßen umgesetzt: Zu einer bekannten RNA-Sequenz, bei der man bereits ein entsprechendes DNA-Konjugat mit Trisbenzimidazol (hergestellt von Dr. C. Gnaccharini) synthetisiert hatte, wurden in drei verschiedenen Experimenteserien drei unterschiedlich lange „Helfer“-DNA-Sequenzen hinzu gegeben, die den Rest der Substrat-RNA absättigen sollten und somit eine starke Einschränkung der Anzahl der spaltbaren Bindungen zur Folge haben sollte (s. Abb. 61, folgende Seite).

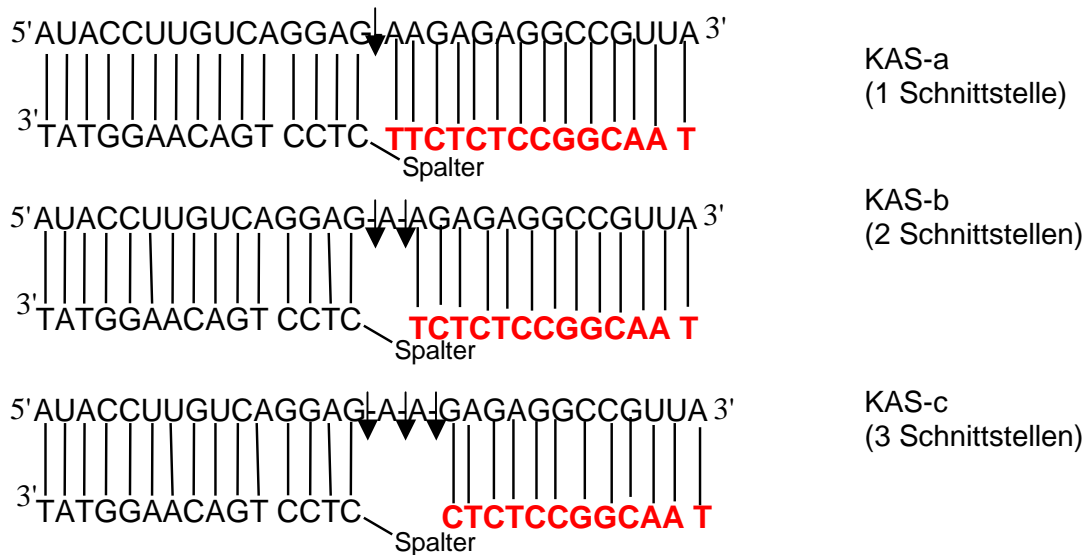


Abb. 61: Schematische Darstellung der Duplexe von Substrat **49** mit Konjugat **53** und Helfer-Sequenzen (KAS= Komiyama antisense); die Pfeile zeigen die möglichen Spaltstellen an.

Die Helfersequenzen wurden mit „KAS“ (Komiyama antisense) a-c betitelt, da die Substratsequenz auf die Gruppe um Komiyama zurückgeht und wurden kommerziell erworben (BioSpring, Frankfurt). KAS-a war dabei die längste Helfer-Sequenz, sie deckte die nicht vom Konjugat hybridisierte Substratsequenz komplett ab und ließ damit kein Nucleotid frei. Da keine Bindung zwischen der Helfersequenz und der Konjugatsequenz besteht, war die Spaltbarkeit dieser Bindung durch Verdrillung der Helix denkbar. Trotzdem ließ sich auch vermuten, dass dies nicht der Fall sein könnte, da sich die hybridisierten Teile in nächster Näherung zu einander wie eine ungebrochene, ideale Helix verhalten könnten und ein O-P-O-Bindungswinkel von 180°, in dem die stereoelektronische Voraussetzung für den Bindungsbruch nicht gegeben wären.

KAS-b und -c verfügten jeweils über ein bzw. zwei Nucleotide weniger am 3'-Ende und ließen damit zwei bzw. drei freie Bindungen zu. Diese freien Stellen sollten eine ausreichende Flexibilität für die Hydrolyse durch den RNA-Spalter ermöglichen, wobei zunächst unklar war, ob dafür mehr als ein Nucleotid ungebunden sein musste, weswegen eben mehrere Alternativen getestet wurden.

Zunächst wurden Experimente im Überschuss von Konjugat zu Substrat durchgeführt, wobei die Helfer-Sequenzen in etwa dreifacher Menge im Bezug auf das Konjugat und in 30facher Menge in Bezug auf die Menge des Substrates zum Einsatz kamen. Der starke Überschuss wurde eingesetzt, um sicher zu stellen, dass das komplette Substrat durch die Helfersequenz abgesättigt wurde, zudem handelte es sich um Verbindungen, die käuflich erworben waren und somit kein Mangel an

ihnen bestand. Zunächst einmal war interessant, an welchen Stellen das Substrat gespalten worden war.

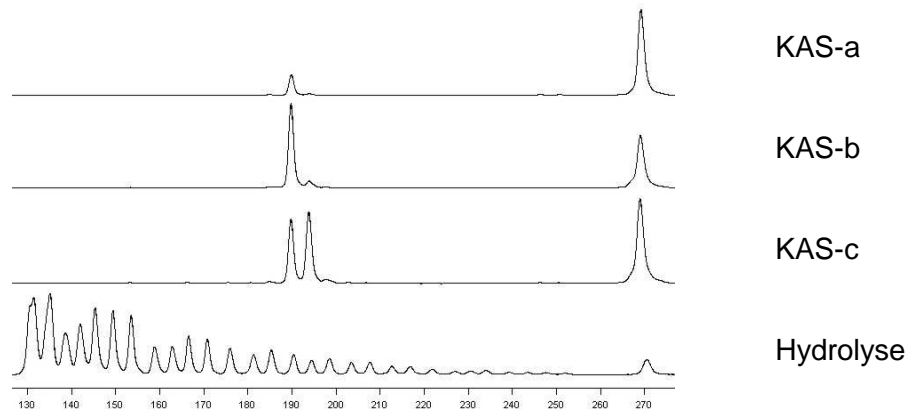


Abb. 62: Spaltungsmuster der ersten KAS-Experimente. 150 nM Substrat **49**, 1500 nM Konjugat **53**, 4600 nM KAS-a, KAS-b bzw. KAS-c, 20h, 37°C, Tris-HC I-Puffer pH 8.0.

In Abb. 62 sind die Ergebnisse aus dem entsprechenden Experiment zu sehen. Man kann erkennen, dass auch bei KAS-a – also der Sequenz, die kein Nucleotid frei lässt – Spaltung auftrat, wobei diese deutlich geringer ausfällt als bei den anderen beiden Experimenten mit den an übrigen Helfersequenzen. Bei KAS-b sieht man ziemlich sauber eine einzelne Spaltstelle, ein sehr kleiner, weiterer Produktpeak zu höheren Retentionszeiten verschoben ist dennoch zu sehen, während mit KAS-c zwei Hauptschnittstellen auftreten. Dies deckt sich fast vollständig mit den im Vorhinein getroffenen Annahmen. Die leichte Spaltaktivität im Experiment mit KAS-a ist vermutlich auf die Überwindung von co-axialem base-stacking zurück zu führen (s.a. Abb. 61). Es gibt zwar eine Spaltstelle, doch da die beiden nicht verbundenen Helices untereinander stacken, gilt es es erst diese Wechselwirkung zu überwinden, bevor der Spalter angreifen kann. Daher ist die Spaltung insgesamt sehr gering, besonders im Vergleich zu den beiden anderen Konstrukten.

Die Experimente wurden wiederholt und erweitert. Man untersuchte die Spaltaktivität weiterhin auf Einflüsse durch veränderte Ionenstärken, indem man unterschiedliche Konzentrationen an NaCl zugab. Durch einen hohen Gehalt an NaCl versprach man sich eine Verbesserung der Hybridisierung und somit ein Herabsetzen unspezifischer Effekte, wie sie beispielsweise durch unhybridisiertes Konjugat zustande kommen könnten, und zwar hinsichtlich aller beteiligten Komponenten. Das Konjugat und die Helfersequenzen sollten dadurch also besser mit der Substrat-RNA wechselwirken. Es wurden drei unterschiedliche Salzkonzentrationen getestet (1M, 0.5 M, 0.25 M). Alle anderen Bedingungen (pH-Wert, Konzentrationen der beteiligten Komponenten, Inkubationszeit) ließ man unverändert.

Eigene Arbeiten

In Abbildung 63 sind die Ergebnisse dieser Tests zusammengefasst. Als Hauptspaltstelle wurden Nucleotid 15 und 16 definiert, da dort hauptsächlich – je nach Helfersequenz – die Spaltung stattfand. Die Angabe dieses Wertes soll verdeutlichen, wie sequenzspezifisch die Spaltung ist. Sie wurde in Relation zur Gesamtsplaltung gesetzt. Die Werte wurden durch Abzug der Spaltungswerte in Blindproben von den Spaltungswerten der mit Spalter inkubierten Proben korrigiert.

Die schwarz unterlegten Balken zeigen die jeweilige Spaltaktivität nach Korrektur der Werte durch Abzug des Untergrundes. Die zugehörigen grau unterlegten Balken zeigen die relativ zur Gesamtsplaltung stehende Aktivität bezüglich der Hauptspaltstelle, d.h. den relativen Anteil der Spaltprodukte mit Spaltstellen an Nucleotid 15 und 16 (die als Hauptspaltstellen definiert wurden). Bei identischer Höhe zweier zusammengehöriger Balken würde die Spaltaktivität ausschließlich an der Hauptspaltstelle stattfinden.

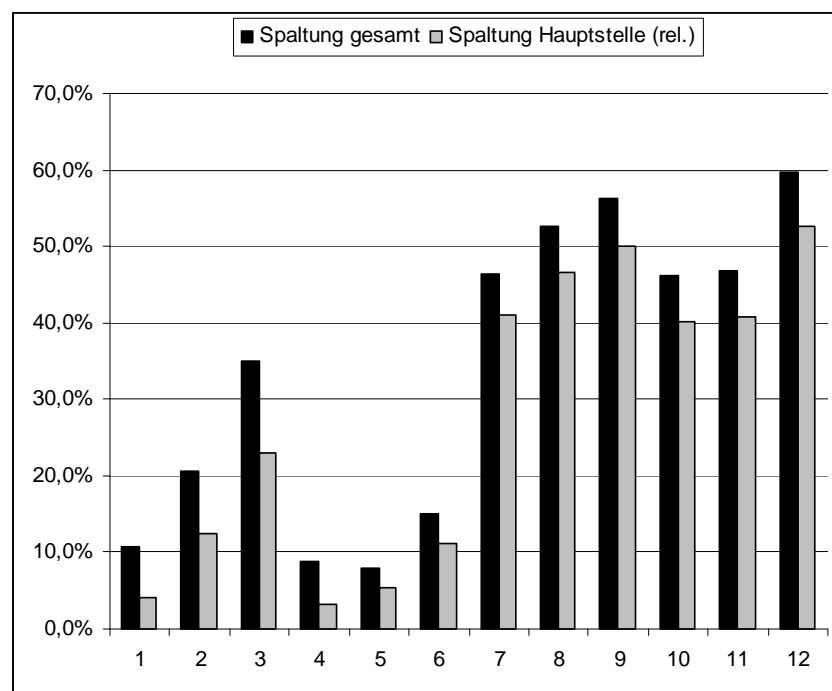


Abb. 63: Zusammenfassung der Spaltexperimente von Konjugat **53** mit Substrat **49** und KAS-Helfersequenzen. Legende: 1: 1M NaCl; 2: 0.5 M NaCl, 3: 0.25 M NaCl, 4: KAS-a, 1M NaCl, 5: KAS-a, 0.5 M NaCl, 6: KAS-a, 0.25 M NaCl; 7: KAS-b, 1M NaCl 8: KAS-b, 0.5 M NaCl; 9: KAS-b, 0.25 M NaCl; 10: KAS-c, 1 M NaCl; 11: KAS-c, 0.5 M NaCl; 12: KAS-c, 0.25 NaCl.

Andere Bedingungen: 150 nM Substrat **49**, 1500 nM Konjugat **53**, 4600 nM KASa-c (wenn angegeben), 37°C, 150 mM Tris-HCl-Puffer pH 8.0, 20 h Inkubationszeit. Werte wurden durch Abzug des Untergrundes (aus Blindprobe) korrigiert.

Jeweils drei Experimente gehören zusammen: 1-3 zeigen die Spaltaktivität ohne KAS-Sequenzen, 4-6 die mit KAS-a, 7-9 mit KAS-b und 10-12 mit KAS-c. Diese drei in eine Gruppe gehörenden unterscheiden sich nur durch die Konzentration an NaCl,

wobei mit hoher Konzentration (1M) begonnen wird und mit niedrigster Konzentration (0.25 M) geschlossen wird.

Die Grafik verdeutlicht, dass die Spaltaktivität des Konjugates ohne zusätzliche Verwendung von Helfer-Oligonucleotiden ziemlich stark durch die Salzkonzentration beeinflusst wird: Lag die Spaltaktivität unter 1M NaCl bei knapp 11%, stieg sie bei 0.25 M NaCl bis auf etwa 35% an. Die Spezifität der Spaltung stieg ebenfalls mit reduzierter Konzentration an NaCl an, wobei sie insgesamt in Übereinstimmung mit den Experimenten im Vorfeld eher moderat war und maximal zwei Drittel der Gesamtspaltaktivität ausmachte.

Die Spaltaktivität bei Verwendung von KAS-a, also der Sequenz, die das gesamte Substrat abdeckte, ging bei allen Konzentration stark zurück, was nicht weiter verwunderlich ist, wenn man sich die Tatsache vor Augen führt, dass die räumliche Anordnung zur Spaltung durch internes stacking der beiden nicht verbundenen Helices nicht gegeben sein könnte, was hier der Grund für die reduzierten Spaltraten sein könnte. Die Salzkonzentration scheint einen deutlich geringeren Einfluss auf die Spaltaktivität zu haben als bei der Spaltung durch das Konjugat allein.

Dieser zuletzt genannte Eindruck setzt sich auch bei den anderen beiden KAS-Sequenzen fort. Tendenziell lässt sich zwar ein leichter Anstieg der Spaltaktivität mit Abnahme der NaCl-Konzentration verzeichnen, doch der Effekt ist nicht besonders groß.

Die Spaltaktivität steigt unter Verwendung von KAS-b und auch -c stark an, sowohl bezogen auf das Konjugat allein als auch auf die Spaltung mit Hilfe von KAS-a. Die Spezifität der Spaltung stieg beinahe bis auf 90% an, die Spaltung fand also fast ausschließlich an der gewünschten Stelle statt.

Es ließ sich also feststellen, dass sowohl Spezifität als auch Spaltausbeute im ganzen gesehen durch die Verwendung der Helfer-Sequenzen anstieg, sofern sie einen „Spalt“ von einem oder zwei Nucleotiden ließen, der die nötige Flexibilität bereitstellte, um Spaltung zu ermöglichen.

Da wie bereits eingangs erwähnt das Konjugat **53** allein nicht zu Turnover-Entwicklung führte, war die Hoffnung jetzt groß, dass unter Verwendung der KAS-Sequenzen -b und -c Turnover möglich wäre. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst eine Kinetik angefertigt, und zwar unter denselben Bedingungen wie bei den oben genannten Experimenten, wobei die NaCl-Konzentration mit 150 mM gewählt wurde. Das ganze wurde auf ein Langzeitexperiment über drei Wochen

Eigene Arbeiten

ausgelegt, um die Halbwertszeit des Substrates unter Einwirkung von Konjugat mit KAS-b oder -c zusammen zu bestimmen. In der folgenden Grafik werden die Ergebnisse dieser Experimentenreihe zusammengefasst.

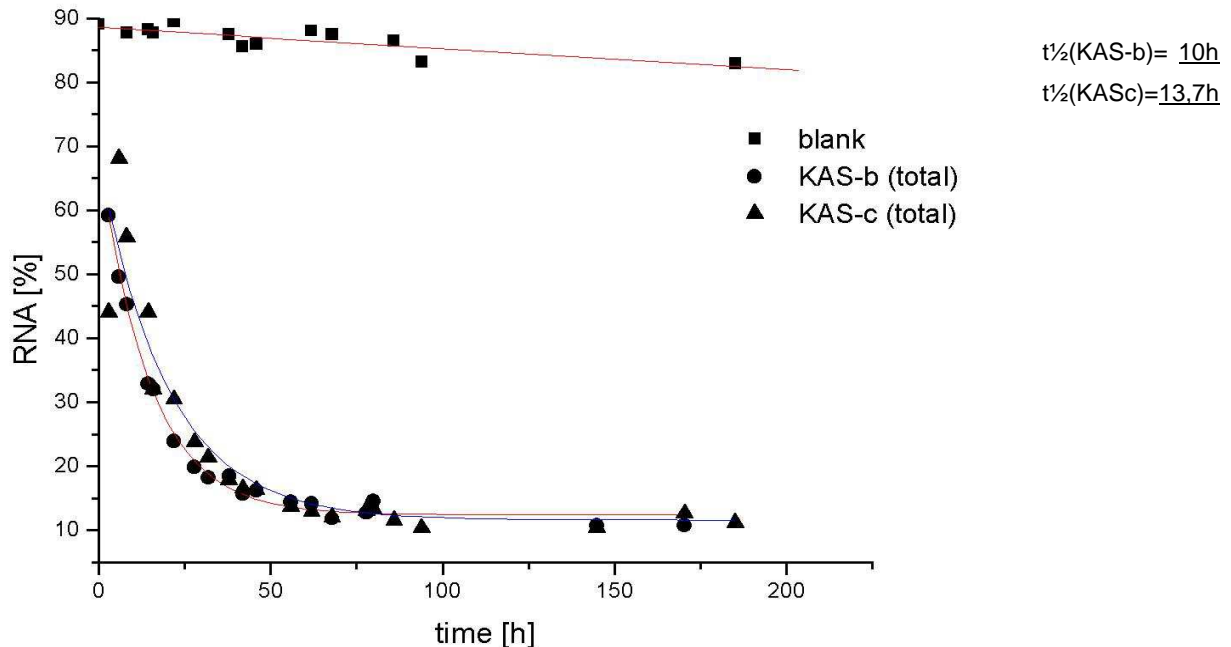


Abb. 64: Grafische Auswertung der Kinetikexperimente mit KAS-b und -c. Quadrate: Blindprobe, Kreise: mit KAS-b, Dreiecke: mit KAS-c. Experimentelle Bedingungen: Tris-HCl-Puffer pH 8.0, 37°C, 150 nM Substrat **49**, Zeit wie angegeben; KAS-b und KAS-c: jeweils 1.5 μM Konjugat **53**, 20 μM KAS. Blindprobe (blank): Substrat **49** ohne Konjugat und KAS.

Die RNA in Prozent wurde gegen die Zeit aufgetragen. Je eine Zerfallskurve wurde an die Werte für die beiden Kinetikreihen angefügt. Als Vergleich wurde die Blindprobe mit abgebildet, sie zeigt, dass ohne Zusatz von Konjugat keine nennenswerte Spaltung des Substrates auftrat. Darüber hinaus dienten die mit inkubierten Blindproben jeweils als Festlegung des Untergrundes und wurden von den Spaltungswerten als Korrektur abgezogen. Diese korrigierten Werte fanden dann Eingang in die oben gezeigte Grafik. Die Halbwertszeit wurde aus der Auswertung der angepassten Zerfallskurve entnommen. Sie lag bei KAS-b bei 10 Stunden und mit KAS-c bei 13.7 Stunden. Dieser Werte decken sich auch mit den zuvor gemachten Erkenntnissen bei einer Inkubationszeit von 20h.

Der nächste Schritt war nun die Durchführung eines Turnover-Experiments. Zu diesem Zweck wurde das Substrat mit einem Überschuss an Konjugat inkubiert, damit das Konjugat in katalytischer Menge vorhanden war. Es wurde direkt eine Kinetik angefertigt, da diese erstens Erkenntnisse über die quantitativen

Eigene Arbeiten

Zusammenhänge (Turnover-Zahl) erlauben würde und darüber hinaus auch unklar war, wie lang die Inkubationszeit zu sein hätte, um eine nennenswerte Spaltungsaktivität sehen zu können.

Tab. 3: Ergebnisse des ersten Turnover-Experimentes mit den Helfer-Sequenzen KAS-b und KAS-c.

KAS-b			KAS-c		
Zeit [h]	Spaltung [%]	Anteil Hauptschnittstelle [%]	Zeit [h]	Spaltung [%]	Anteil Hauptschnittstelle [%]
21,6	31,3	69,2	21,6	25,9	21,3
43,3	38,9	72,7	43,3	30,2	32,8
72,5	41,7	69,6	72,5	34,3	39,1
83,3	45,8	72,1	83,3	39,3	41,6
107,6	44,7	71,2	107,6	43,4	48,5
157,9	48,9	73,1	157,9	47,4	54,0
180,3	50,4	71,2	180,3	54,4	56,4
203,9	48,4	74,7	203,9	52,5	60,3
228,2	54,7	72,4	228,2	56,3	59,5
254,2	48,1	72,4	254,2	51,4	61,6
324,0	56,0	70,4	324,0	61,2	61,6
349,2	58,1	75,8	349,2	62,4	61,3
378,7	61,8	76,7	378,7	67,0	58,9

Reaktionsbedingungen wie im Text beschrieben; Spaltung in % korrigiert durch Abzug der Blindprobe vom jeweiligen Wert; Anteil an Hauptschnittstelle [%] gibt den Anteil an der Gesamtspaltung in % an und ist nicht als absolute Spaltung zu verstehen. Die Werte beziehen sich auf 300 nM Substrat **49**.

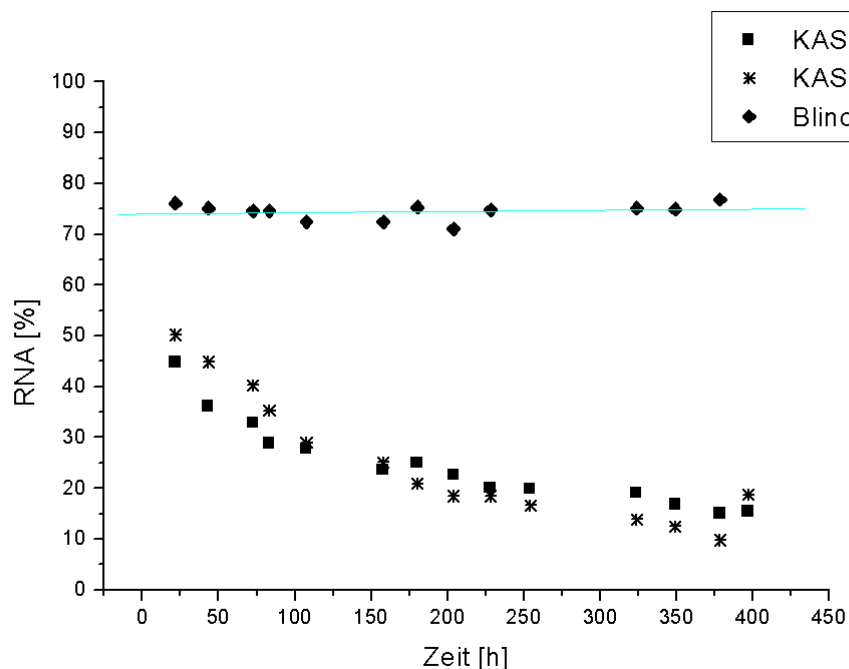


Abb. 65: Grafische Darstellung der Turnover-Experimente. Experimentelle Bedingungen: 50 nM Konjugat **53**, 300 nM Substrat **49**, 1µM KAS, 150 mM NaCl, Tris-HCl-Puffer pH=8.0, 37°C, Zeit wie angegeben. 25% RNA-Degradation vor Beginn des Experimentes.

Eigene Arbeiten

Die experimentellen Bedingungen wurden folgendermaßen gewählt: 50 nM Konjugat **53**, die sechsfache Konzentration an Substrat **49** (300 nM) sowie 1 µM KAS-b bzw.-c. Die weiteren Bedingungen wurden wie bei der normalen Kinetik gewählt: 150 mM NaCl, 37°C und Tris-HCl-Puffer pH 8.

Die Langzeitmessung zeigt eine eindeutige Degradation der RNA, obwohl das Konjugat als Minderkomponente eingesetzt wurde, man erhielt also Turnover. An der Position der Blindproben-Geraden zeigt sich jedoch ein großes Problem, dass interessanterweise nur mit diesem Substrat auftrat: Sofern die Probe nicht frisch (nicht älter als eine Woche) aufgereinigt oder aus dem getrockneten Zustand neu aufgelöst worden war, lag der Untergrund bei extrem hohen 25%. Es bleibt unklar, warum dieser Effekt, der wie gesagt ausschließlich bei diesem Substrat auftrat, zustande kam und woher er stammt. Es lässt sich nur sagen, dass es sich um regelmäßige Degradation handelt, die sich auf alle Phosphodiesterbindungen des RNA-Teiles des Substrates erstreckte und sich deshalb auch mit Leichtigkeit von den aufgenommenen Spaltwerten abziehen ließ.

Es ließ sich daher dennoch eine kinetische Auswertung an diesen Werten durchführen, die natürlich unter Vorbehalt gesehen werden muss, worauf an dieser Stelle ausdrücklich hingewiesen sein soll. Sie folgt im nächsten Abschnitt „Kinetische Analyse der Turnover-Reaktion“.

Zeit [h]	Spaltung [%]	
	KAS-b korr.	KAS-c korr.
0	5,1	4,0
20	23,2	21,9
43,5	25,7	29,0
67,5	31,9	33,1
91	34,8	35,1
163,5	38,9	37,0
186,75	39,7	36,7
211	42,6	38,9
235,5	44,5	41,5
306	47,4	46,5
336,5	49,9	40,5
475	51,8	45,4

Tab.4: Werte des zweiten Turnover-Experimentes mit KAS. Der Blindwert (Untergrund) lag bei 22.8% und wurde von allen Werten zur Korrektur abgezogen.

zeigten einen langsameren Reaktionsverlauf. Ebenso verhielt es sich in Bezug auf die Spezifität (hier nicht gezeigt), die zunächst gering war und sich im Laufe der

Einige Besonderheiten dieses Projektes sind in Tabelle 4 ersichtlich und sollen hier noch kurz Erwähnung finden. Es wird deutlich, dass in den Experimenten mit KAS-b - also der Helfersequenz, die nur ein Nucleotid frei ließ – zu Beginn im Vergleich zu KAS-c eine etwas größere Spaltaktivität verzeichnet werden konnte. Die Spezifität in Bezug auf die Spaltungsaktivität im Bereich der Hauptspaltstelle (aus der Tabelle nicht ersichtlich) war aber von Anfang an sehr hoch und stieg auch im Verlauf der Experimenteserie nicht mehr stark an. Die Experimente mit KAS-c

Eigene Arbeiten

Reaktion zu einem in etwa gleich bleibenden Sättigungswert steigerte und insgesamt verdreifachte. Auch wurden die Erwartungen bestätigt, dass KAS-b insgesamt eine höhere Spezifität bezüglich der Hauptspaltstelle haben sollte, da es ja nur ein Nucleotid der Substratsequenz frei ließ und nicht zwei, wie es unter Verwendung von KAS-c der Fall war. Dieser Verlauf ließ sich beim Turnover-Experiment besonders gut verfolgen und findet deswegen an dieser Stelle Erwähnung.

5.1.7 Kinetische Analyse der Turnover-Reaktion

Bereits in der Doktorarbeit von Herrn C. Gnaccharini wurden aus den Daten von vergleichbaren Experimenten eine angenäherte Analyse der Kinetik eines Turnoverexperimentes angestrebt^[19].

Berücksichtigen müsste man bei einer genauen Analyse unter anderem die Rückreaktion, die als ersten Schritt eine erneute Hybridisierung der Produkte mit dem Konjugat beinhaltet. Sofern es sich bei den Produkten um die 2'-3'-Cyclophosphate handelt, ist es weiterhin nicht auszuschließen, dass der Katalysator/der RNA-Spalter zur erneuten Ligation der beiden Hydrolyseprodukte beitragen kann, welche zur Rückreaktion zum Edukt bzw. zum 2',5'-Isomer führen würden.^[138] Dies ist nur ein Teilaspekt der Betrachtung welcher zeigt, dass eine kinetische Analyse beliebig komplex werden kann.

Zur Vereinfachung wurde die Theorie nach Henry, Michaelis und Menten sowie Modifizierungen dieser Theorie durch Briggs und Haldane heran gezogen,^[140] da diese eine Abschätzung für K_m und damit auch für k_{cat} erlaubt, was zu einer grundsätzlichen Einstufung der katalytischen Aktivität des in dieser Arbeit angewendeten Systems der ortsspezifischen RNA-Spaltung führt.

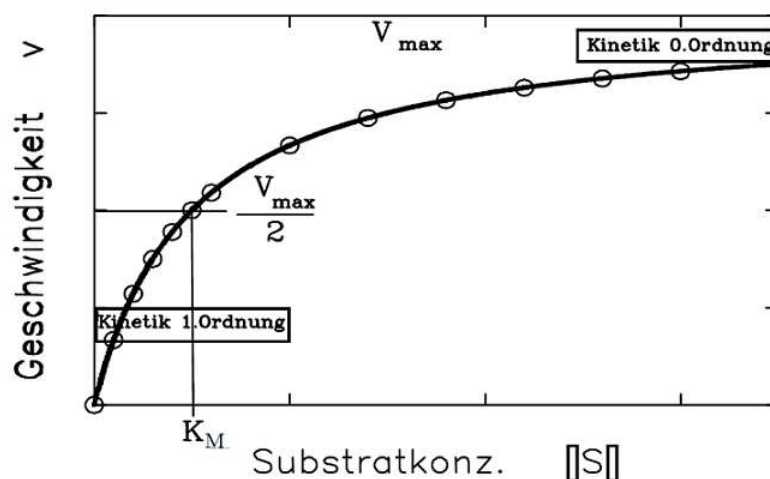


Abb.66: Schematische Darstellung des Reaktionsverlaufs einer Enzymgesteuerten Reaktion nach Michaelis und Menten (Auftragung Substratkonzentration gegen die Reaktionsgeschwindigkeit).^[143] K_M ist dabei aus dem x-Achsenabschnitt bei halber Maximalgeschwindigkeit der Reaktion extrahierbar.

Den Annahmen von Michaelis und Menten nach stellt sich im ersten Reaktionsschritt ein schnelles, reversibles Gleichgewicht zwischen Substrat und Enzym zum Komplex der beiden ein. Der sich anschließende Katalyseschritt folgt einer Kinetik 1. Ordnung mit k_{cat} als Geschwindigkeitskonstante. Bei hoher Substratkonzentration ist die

Eigene Arbeiten

Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von ihr und folgt einer Kinetik 0. Ordnung (Abb. 66).

Im Einklang mit dieser Theorie sollten die Experimente unter stationären Bedingungen durchgeführt werden, d. h. die Konzentration des Enzym-Substratkomplexes sollte bei einem Überschuss an Substrat immer konstant sein, da das Gleichgewicht auf die Seite des gebildeten Komplexes verschoben ist. Am Anfang der Reaktion liegt das Substrat im Bezug auf die Produkte im großen Überschuss vor, was praktischerweise dazu führt, dass man in diesem Bereich Rückreaktionen vernachlässigen kann. Trägt man nun die Produktbildung gegen die Zeit auf, sollte sich im Anfangsbereich der Spaltung die Steigung noch linear verhalten. Dieser Umstand macht es möglich, auf diese Weise Werte für K_m und k_{cat} zu erhalten.

Andere Autoren haben in Hinblick auf diese Art von Fragestellung ^[138,139,141], einen modifizierten Eadie-Hofstee linear plot verwendet (s. Abb. 67). In diesem plot wird k_{obs} gegen $k_{obs}/[S]$ aufgetragen, wobei die Steigung dieser linearen Regression $-K_m$ (negative Michealis-Menten-Konstante) und der y-Achsenabschnitt der Maximalgeschwindigkeit V_{max} entspricht. Die Reaktionsrate k_{cat} erhält man durch teilen von V_{max} durch die Anfangskonzentration an Enzym/RNA-Spalter, also:

$$k_{cat} = V_{max} / [E]$$

Im Idealfall würde man nun k_{obs} aus einer ganzen Reihe von Kinetiken mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen extrahieren, die aber alle größer oder gleich einem 10fachen Überschuss an Substrat gegenüber dem Katalysator sein sollten, und würde dann in einem Eadie-Hofstee plot wie in Abb. 67 aus den ersten 10% der Reaktion diese Werte errechnen.

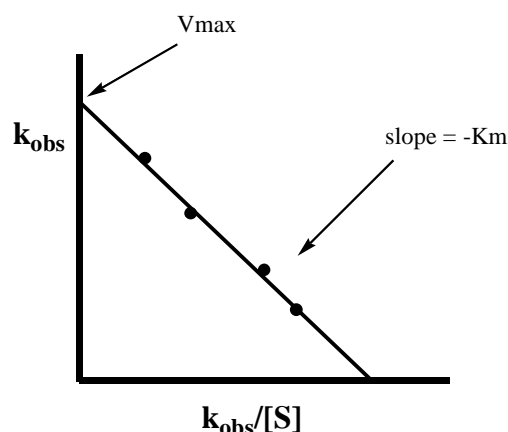


Abb. 67: Modifizierter Eadie-Hofstee linear plot.

In der Vergangenheit wurden in unserem Arbeitskreis die RNA-Spaltung als Funktion der Konjugat-Konzentration untersucht. In diesem Fall war die Absättigung des Substrates/RNA durch Konjugat/Enzym untersucht worden, die bei unterschiedlichen RNAs aber jeweils bei einem zwei- bis vierfachen Überschuss von Konjugat gegenüber RNA erreicht war. ^[137] Bei Turnoverexperimenten liegt es in der Natur der Sache, dass der Spalter/das Enzym im Unterschuss eingesetzt wird. Doch hier kann bei den verwendeten Konzentrationen von 50 nM Konjugat **53** und 300 nM Substrat **49** (6-facher Überschuss) entsprechend der in der Vergangenheit gemachten Beobachtungen von einer Absättigung des Konjugates durch Substrat gesprochen werden. Auch die Verwendung eines etwa 30fachen Überschusses der KAS-Helfer-Sequenzen gegenüber dem Substrat **49** (1 µM KAS zu 300 nM Substrat) stellt sicher, dass man konzentrationstechnisch im Sättigungsbereich liegt.

Im durchgeführten Experiment lag das Substrat S (die RNA) also im 6fachen Überschuss zum Katalysator E (das Konjugat) vor. Da unter diesen Bedingungen der Katalysator in Sättigung arbeitet – wie es für eine Analyse dieser Art gefordert ist – stimmen die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} und die generelle Reaktionsgeschwindigkeit V in den ersten 10% der Reaktion noch überein. Für diesen Bereich gilt:

$$\Delta[P] = C_0 * (\% \text{ Spaltung} / 100\%) \quad \text{und} \quad V = V_{\max} = \Delta[P] / \Delta t$$

mit $[P]$ = Konzentration an Produkt, C_0 = Anfangskonzentration an Substrat. Setzt man nun die Werte aus Tabelle 4 (S.81) ein, ergibt sich für Helfersequenz KAS-b (s. S. 75) ein V_{\max} von 4.35 nM h⁻¹ und 3.48 nM h⁻¹, für Helfersequenz KAS-c (s.S. 75) ergibt sich Werte von 3.60 nM h⁻¹ und 3.29 nM h⁻¹. Teilt man V_{\max} nun durch die Konzentration an Katalysator (50 nM), erhält man die Reaktionsraten k_{cat} : Für KAS-b ist diese 0.070 - 0.087 h⁻¹, für KAS-c 0.066 - 0.072 h⁻¹.

Dies sind grobe Abschätzungen, deren Richtigkeit und/oder Genauigkeit durch Sammeln weiterer Daten überprüft werden sollte.

5.1.8 Versuche zur Konjugation in flüssiger Phase

Die in dieser Arbeit durchgeführten Konjugationen von DNA an eine RNA-Spaltereinheit – in diesen Fällen Trisbenzimidazol **15** – mittels Amidbindungsbildung erfolgten ausschließlich durch Kupplung von RNA-Spalter an die sich noch an fester Phase befindlichen DNA. Die Kupplung fand also heterogen statt. Trotzdem wurden Versuche unternommen, die DNA erst von der festen Phase abzuspalten und dann in flüssiger Phase – homogen – mit der Spaltereinheit zu verknüpfen.

Dies hätte vor allem synthesespezifische Vorteile, denn durch die Konjugation in flüssiger Phase hätte man mehr Freiheiten, die Kupplung ließe sich nicht nur einfacher durchführen (z.B. durch Rühren über Nacht), sondern ließe sich auch einfacher kontrollieren. Man könnte viel leichter in die Reaktion eingreifen und den einen oder anderen Reaktionsparameter nachjustieren, falls die als Ausgangspunkt gewählten Bedingungen nicht zum gewünschten Ergebnis führen würden. Diese Möglichkeiten hat man bei der Kupplung an fester Phase nicht, man muss bis nach dem Abspalten von dieser warten, um Erkenntnisse über die Ausbeute und die Identität der Produkte zu gewinnen. Selbstverständlich ist diese Art der chemischen Reaktion alles andere als trivial, da man in der Regel in viel kleineren Reaktionsvolumina und –konzentrationen arbeitet, genauso wie eine simple Reaktionskontrolle (beispielsweise per DC) durch diese Parameter stark beschränkt ist.

Die verwendete DNA-Sequenz wurde nach den bekannten Methoden am DNA-Synthesizer hergestellt, und zwar wie immer mit einem C6-Aminolinker am 5'-Ende der Sequenz und im „Trityl-OFF“- Modus.

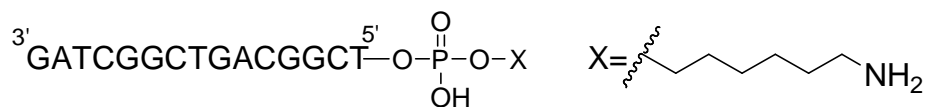


Abb. 68: DNA-Konstrukt **82** mit Aminolinker.

Nach Aufreinigung und Abspaltung von der festen Phase wurde die DNA-Sequenz auf ihre Konzentration und per MALDI auf ihre Identität hin untersucht und als wässrige Lösung in der Reaktion eingesetzt.

Man stellte Stammlösungen der Reagenzien in DMSO her, es kamen DCC und N-Hydroxysuccinimid als Kupplungsreaktionen für die Amidbildung zum Einsatz. Der

Trisbenzimidazolmethylester wurde zunächst in die Carbonsäure überführt und anschließend in DMSO aufgelöst.

Beim ersten Versuch wurden je die gleichen Menge von N-Hydroxysuccinimid, DCC und Trisbenzimidazol in DMSO zusammen gefügt und mit Triethylamin zum Anbasen versetzt. Nach dem Stehen der Reaktionsmischung über Nacht wurde das Oligonucleotid in DEPC-behandeltem Wasser und TEA zugesetzt. Nach dem Stehen der Reaktionslösung über Nacht wurde das gesamte Lösungsmittel entfernt und der Rückstand der normalen Oligonucleotid-Aufreinigungsprozedur unterworfen. Das darauf folgende MALDI der gesammelten, mutmaßlichen Produktfraktionen ließ allerdings kein Produkt oder Edukt erkennen.

Da diese Vorgehensweise nicht zielführend gewesen zu sein schien, änderte man die Bedingungen nun so, dass eine größere Menge Oligonucleotid für die Reaktion eingesetzt wurde, da die Vermutung nahe lag, dass eine zu geringe Konzentration dieses Bausteins in der Reaktionslösung eine Reaktion verhindert haben könnte. Außerdem mutmaßte man, dass die völlige Trocknung des Reaktionsgemisches unter Vakuum zu einer Zersetzung der Edukte und möglichen Produkte geführt haben könnte, da man die Reagenzien auf diese Weise zu stark aufkonzentriert hatte.

Da allerdings ein Mangel an Oligonucleotid dieser Art bestand, wurde neues am Synthesizer synthetisiert, was in den anschließenden Überlegungen zu diesem Thema noch eine Rolle spielen wird.

Der erste Schritt der folgenden Reaktion - die Aktivierung des Trisbenzimidazols – wurde ausschließlich in DMSO durchgeführt, ganz analog dem ersten Versuch. In einem Gesamtvolumen 250 µl wurden jeweils 5 eq N-Hydroxysuccinimid, DCC und Trisbenzimidazolcarbonsäure **15** mit Hünigbase versetzt und 6 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Diese Lösung wurde mit einer Lösung des Oligonucleotids (1 eq) in DEPC-behandeltem Wasser versetzt, woraufhin sich die Reaktionsmischung eintrübte. Zur Beseitigung dieser Trübung wurden DEPC-Wasser und wenig DMSO hinzu gefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nach dem Entsalzen der Lösung (fraktionierende NAP-Säule) wurde ihre Konzentration über eine UV-Messung bestimmt und ein MALDI der mutmaßlichen Produktfraktionen aufgenommen.

Die Masse des Hauptpeaks stimmte mit der Oligonucleotidstruktur ohne Aminolinker überein. Unklar ist, ob der Aminolinker bei der Reaktion abgespalten wurde oder ob es schon bei der Synthese des Oligonucleotids Probleme gegeben hatte, durch die der Aminolinker erst gar nicht an die Oligonucleotidsequenz ansynthetisiert worden war. Es gab Hinweise auf letzteren Fall, die aber zunächst auf teilweise Zersetzung des Konstruktes beim Messen des MALDI zurück geführt wurden und durch die Kontrolle des Aminolinkerbausteins (Phosphoamidit) per ^{31}P -NMR Zweifel an der Einsatzfähigkeit dieses Moleküls zerstreut wurden.

Ein weiterer Versuch wurde unternommen, um die Konjugation in flüssiger Phase in den Griff zu bekommen. Es wurde dabei ähnlich wie im vorher beschriebenen Fall vorgegangen, mit dem Unterschied, dass man nun DIC statt DCC und HOBt statt N-Hydroxylsuccinimid verwendete. Man wich jetzt auch von der vorherigen DNA-Sequenz ab, da man diese ohnehin neu synthetisieren musste, sie ist in Abb. 69 zu sehen und ist mit der Sequenz für Konjugat **51** (Abschnitt 5.1.1 „Herstellung ‚maßgeschneiderter‘ Trisbenzimidazol- Konjugate“) identisch.

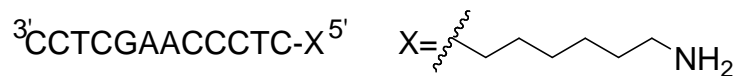


Abb. 69: DNA-Konstrukt **50** mit Aminolinker.

Hier wurde darauf geachtet, dass man nach der Abspaltung der DNA von der festen Phase genau die Masse des Eduktes im MALDI-Spektrum wieder fand, was auch der Fall war, der Aminolinker fehlte diesmal definitiv nicht. Nicht desto weniger wurden neben den Eduktpeak auch Abbruchsequenzen entdeckt, die aber ebenfalls durch eine zu hohe Laserintensität bei der MALDI-Messung hervorgerufen sein könnten. Man setzte dieses Oligonucleotid ohne weitere Behandlung ein.

Die Aktivierungslösungen wurden wieder in DMSO angesetzt, es kamen 5 eq von DIC, HOBt und Trisbenzimidazol-Carbonsäure **15** zum Einsatz in einem Gesamtvolumen von 70 μl , die mit 7 μl Hünigbase versetzt wurden. Man ließ 6 Stunden bei Raumtemperatur schütteln und gab dann die Oligonucleotid- Lösung sowie dieselbe Menge an DEPC-Wasser hinzu, als sich das Reaktionsgemisch eintrübte. Das Reaktionsgefäß samt Inhalt wurde mit Hilfe eines Schüttlers über Nacht in Bewegung gehalten. Zum Entsalzen musste man nun auf 1 ml Volumen mit Wasser auffüllen, man riskierte also hier keine Aufkonzentration der Reaktanten.

Eigene Arbeiten

Leider konnte auch hier kein Produkt isoliert oder auch nur in der Masse gefunden werden.

Das Projekt wurde an dieser Stelle zurück gestellt und bedürfte in der Zukunft weiterer Untersuchungen, um die Art und Behebung der erlebten Hindernisse näher zu beleuchten.

5.1.9 Synthese der Maleimide und Peptid-Konjugate

Bereits in der Vergangenheit kamen Peptidkonjugate des Trisbenzimidazols als potentielle RNA-Spalter zum Einsatz. ^[19,18] Im Unterschied zu den Oligonucleotidkonjugaten, die nur an einzelsträngiger RNA Anwendung finden können, da sie mit dieser hybridisieren und so eine Wechselwirkung eingehen, sind die Peptidkonjugate als affine Spalter für RNA mit Sekundärstruktur konzipiert.

Die Idee dahinter ist einfach: Der Peptidteil des Konjugates sollte eine Wechselwirkung mit der Ziel-RNA eingehen können, d.h. sie müssen eine Affinität zu der entsprechenden RNA Struktur haben, um an diese zu binden. Die passenden Sequenzen können z.B. durch Screeningmethoden wie Affinitätschromatographie oder Phagen-Display ^[19] aufgespürt werden. Man aber auch durch eine erreichte RNA-Spaltung die Affinität der Peptid-Sequenz zu der Ziel-RNA beweisen oder finden. Im vorliegenden Fall ging man aber von bekannten RNA-Peptid-Paaren aus, um die Spaltungsaktivität der Konjugate zu testen, außerdem sollte mit diesem Konzept eine mögliche Ortsspezifität aufgedeckt werden.

Ein solches Paar ist zum Beispiel TAR und das Tat-Peptid, die im Replikationszyklus des HI-Virus eine wichtige Rolle spielen (s.a. Abschnitt 3.2 „Die Transactivational Response Region (TAR)“). Es lag also nahe, ein Konjugat herzustellen, das im Peptidteil mit der Tat-Sequenz identisch oder analog zu dieser war. Es wurden bereits verkürzte Varianten der ursprünglichen Tat-Sequenz in Konjugate eingebettet und an Modell-RNA (36mer) untersucht. ^[19]

Die Spaltereinheit des Trisbenzimidazols wurde derart modifiziert, dass sie sich durch eine Maleimid-Einheit über eine Thiolgruppe eines Cysteins in der Peptidsequenz binden ließ.

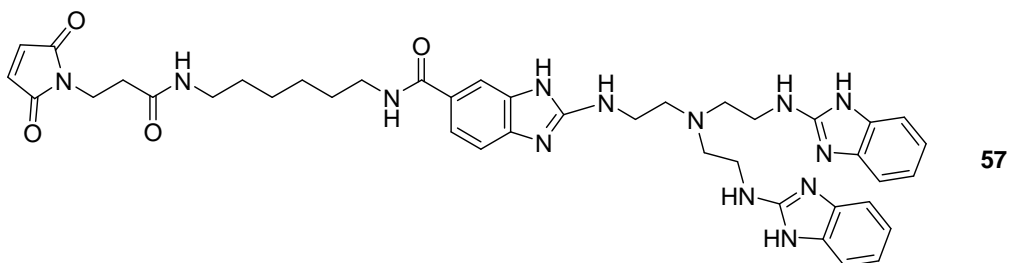


Abb. 70: Maleimid **57** (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Gnaccharini).

Um eine gewisse Varianz in die Spaltereinheit zu bringen, wurde der eine Linker verkürzt, um zu untersuchen, welchen Einfluss dies auf die Spaltaktivität haben würde: Möglich war es, dass ein kürzerer Linker eine direktere Nachbarschaft zur

Eigene Arbeiten

Spaltungstelle herstellen könnte, er könnte aber auch eine zu starke Steifigkeit aufweisen, weswegen ein längerer Linker in einem solchen Falle von Vorteil wäre und die notwendige Flexibilität mitbringen würde.

Es wurde also zum bereits vorhandenen Maleimid **57** (CG37) mit einer C₆-Einheit als Linker auch ein Maleimid mit einem C₂-Linker synthetisiert (s. Abb.71).

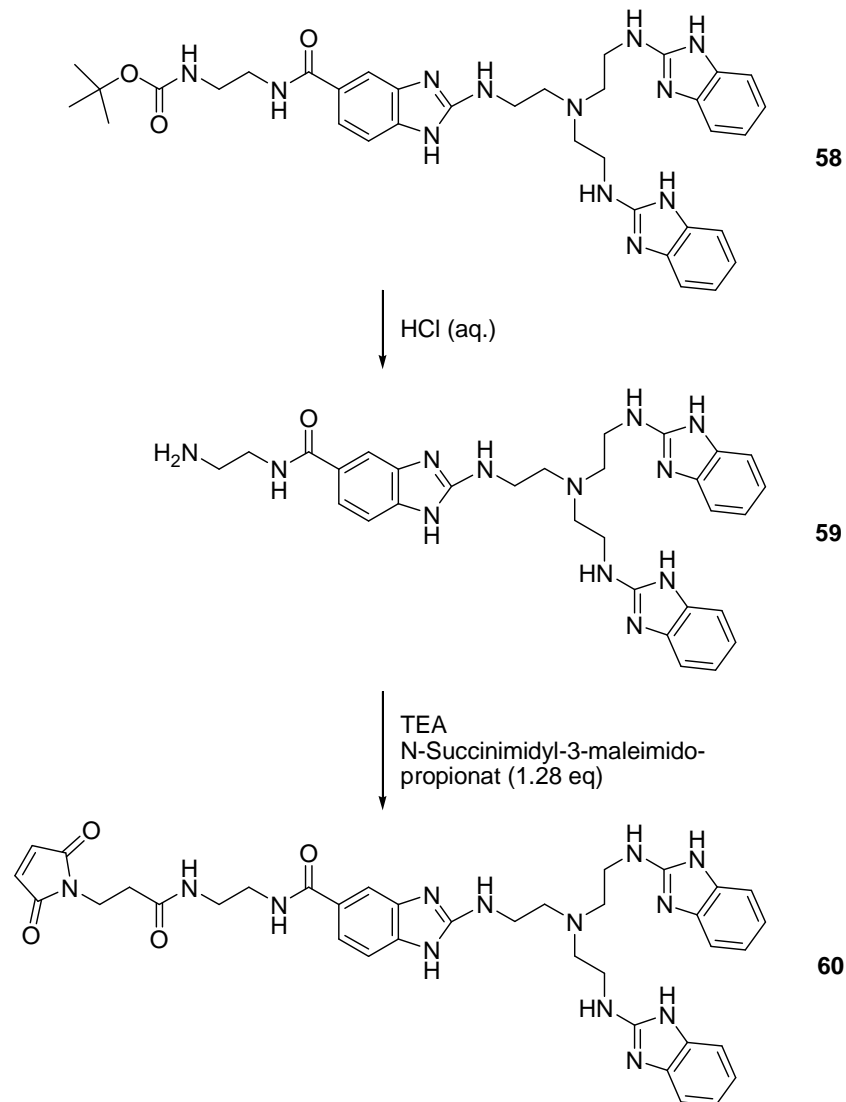


Abb. 71: Syntheschema für Maleimid **60**.

Die Ausgangsverbindung **58** wurde wieder freundlicherweise von C. Gnaccharini zur Verfügung gestellt.

Die eingesetzten Peptide wurden in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7) gelöst, um sie mit dem Maleimid zur Reaktion zu bringen und sie außerdem vorweg per HPLC analysieren zu können. Sie stammten alle aus der chemischen Synthese am Peptidsynthesizer (Neda Bakthiari, AK Schwalbe) und wurden teilweise noch an fester Phase gebunden erhalten. Die Peptide mussten dann mit einer Abspalllösung freigesetzt und anschließend durch Fällen mit Ether isoliert werden.

Die hochreinen Maleimide konnten nun mit den entsprechenden Peptiden gekuppelt werden. Zu diesem Zweck mussten die reduzierten Formen der Peptide zum Einsatz kommen, da das Thiol frei sein muss, um mit dem Maleimid zu reagieren. Peptide, die Cystein oder andere SH-tragende Aminosäuren enthalten, neigen zur Dimerisierung unter Ausbildung einer Disulfidbrücke. Um zu kontrollieren, ob die reduzierte Form vorlag und nicht etwa noch ein Reduktionsschritt mit NaBH_4 vorgeschaltet werden musste, wurde das Peptid zunächst per HPLC untersucht. Glücklicherweise wurde in keinem Chromatogramm ein weiterer Peak gefunden, der von einer oxidierten Peptidspezies herrühren könnte, man setzte also die Peptide ohne Reduktionsschritt direkt ein.

Zu der Lösung des Peptides im Puffer wurden 2 eq des Maleimides in DMF zugesetzt. Die Reaktion wurde nach kräftigem Mischen der Komponenten teilweise über Nacht bei Raumtemperatur durch einfaches Stehenlassen gestattet, aber teilweise auch direkt per HPLC auf seine Vollständigkeit untersucht. Im kürzesten Fall schien die Reaktion schon nach 10 Minuten abgeschlossen, im längsten direkt untersuchten Fall erst nach ca. 2.5 Stunden.

Das Reaktionsgemisch wurde nach Beendigung der Reaktion in der Speed-Vac von Lösungsmitteln befreit und per HPLC aufgereinigt. Die Peptidkonjugate erhielt man auf diese Weise in moderaten (62%) bis exzellenten (99%) Ausbeuten.

Es wurden vier verschiedene Konjugate hergestellt, jeweils zwei mit einem Tat11mer und den beiden Maleimiden (C6-Linker, Konjugat **61**, C2-Linker, Konjugat **62**) sowie mit dem Peptid KWPWC und den beiden Maleimiden (C6-Linker, Konjugat **63**, C2-Linker, Konjugat **64**).

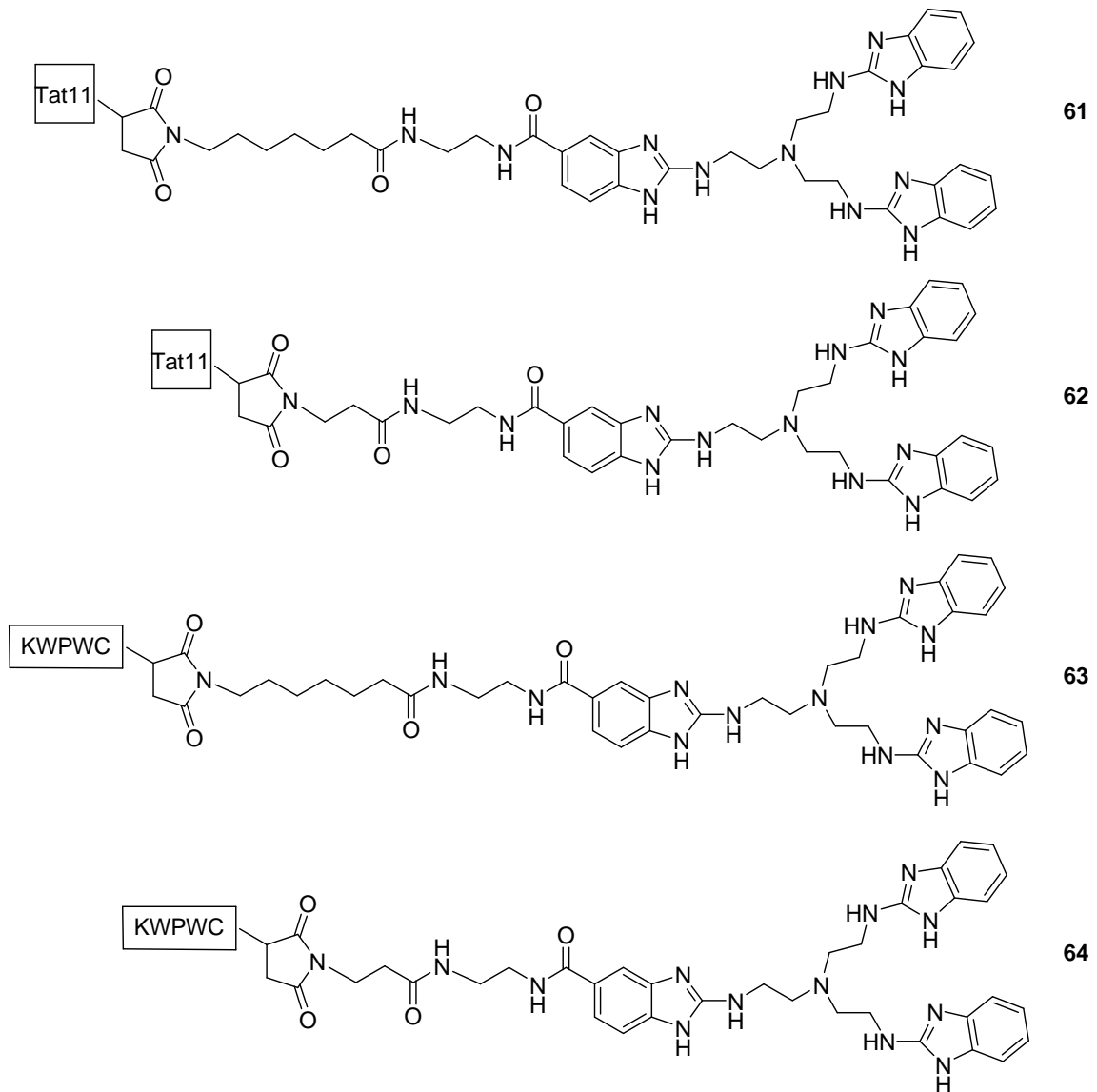


Abb. 72: Alle synthetisierten Peptidkonjugate auf einen Blick.

Tat11 wurde als Affinitätsmotiv für TAR ausgewählt, während KWPWC in entsprechenden Experimenten mäßige Affinität ($K_d = 40 \mu\text{M}$) zur PSI-RNA (s.a. Kapitel 3.3 „Das Verpackungssignal Ψ “) gezeigt hatte.^[15] In Spaltungsexperimenten mit den passenden RNAs, aber auch Kreuzexperimenten mit der jeweils anderen RNA sollten diese Affinitäten näher untersucht werden, insbesondere auf Spezifität und mögliche Kreuzreaktionen.

Auf die Synthese der entsprechenden gelabelten Ziel-RNAs wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

5.1.10 Synthese und Labeling großer RNAs

Um zu untersuchen, inwiefern die Maleimid-Konjugate als RNA-Spalter geeignet waren, sollten sie an großen, Vollängen-RNAs getestet werden. Bisher hatte man bloß kürzere Modelle (z.B. TAR 31mer), die zwar im Bereich von bulge und loop über dieselbe charakteristische Sequenz verfügten, ansonsten aber von der Sequenz der Vollängen-RNA abwichen.

Problematisch an diesen Vollängen-RNAs, deren Sequenzen zwischen 100 und 200 Nucleotiden lang sein sollten, war zunächst die Synthese. Bei den kürzeren RNAs bis 50 Nucleotide ist eine chemische Synthese am Synthesizer problemlos machbar, hingegen nimmt die Ausbeute bei Sequenzen >50 Nucleotiden deutlich ab und wird mit zunehmender Länge der Sequenzen schließlich praktisch undurchführbar.

Bei den chemisch synthetisierten RNAs mit kürzeren Sequenzen ist durch die Art der Herstellung auch die Einführung von Modifikationen wie Fluoreszenzlabeln einfach durchführbar, wenn es sich um eine endständige Modifikation handelt, denn in der Synthese wird diese wie eine weitere Base behandelt, die in den Strang eingefügt werden muss.

Für die Art von Untersuchung, die wir mit der Laser-assistierten DNA/RNA-Sequenzierung betreiben, ist ein Cy5-Label am 5'-Ende des Stranges zur Detektion von Vollängen-Sequenz und Abbruchstücken absolut notwendig.

Bei der Synthese von langen RNA-Sequenzen muss man auf die In-Vitro-Transkription zurückgreifen, um GMP-geprimte Sequenzen zu erhalten. (s. Abschnitt 8.2.1 „Arbeitsmethoden mit Oligonucleotiden“).

Nach der Isolierung der RNA wurden diese zunächst unaufgereinigt dem Labeling unterzogen.

Die folgende Abbildung zeigt die Sequenzen der isolierten RNAs. Ihre Sequenzen stimmen nicht eins zu eins mit den natürlichen Sequenzen von TAR- und PSI-RNA überein. In ihnen sind aufgrund der verwendeten Synthese Vektorsequenzen sowie die Sequenz des Abschnitts enthalten, der durch die Ligation des Cy5-Labels an die RNA hinzu kommt (vgl. Abb.73). Da für TAR und PSI derselbe Vektor verwendet wurde, konnte auch dieselbe Cy5-Label-Sequenz und dieselbe Matrize verwendet werden. Dies führte außerdem dazu, dass die ersten 43 Ribobasen am 5'-Ende sowie Cy5-T₁₀ in beiden synthetisierten RNAs identisch sind.

Eigene Arbeiten

TAR-wt: Cy5-T₁₀-GGCCA GUAGG GAGCU CGAGA AUUAC CCUCA CUA AAA GGGAA UUCUG
GGUCU CUCUG GUUAG ACCAG AUCUG AGCCU GGGAG CUCUC UGGCU AACUA GGGAA
CCCAA AGCU (109mer RNA)

PSI: Cy5-T₁₀-GGCCA GUAGG GAGCU CGAGA AUUAC CCUCA CUA AAA GGGAA UUCUC UCGAC
GCAGG ACUCG GCUUG CUGAA GCGCG CACGG CAAGA GGCGA GGGGC GGCGA CUGGU
GAGUA CGCCA AAAAU UUUGA CUAGC GGAGG CUAGA AGGAG AGAGA UGGGU GCGAG
AGCGU CAGUA UUAAG CU (177mer RNA)

Abb. 73: Sequenzen der gewünschten Labeling-Produkte. In rot: Vektorsequenz und Sequenzteil, der aus der chemischen Synthese stammt.

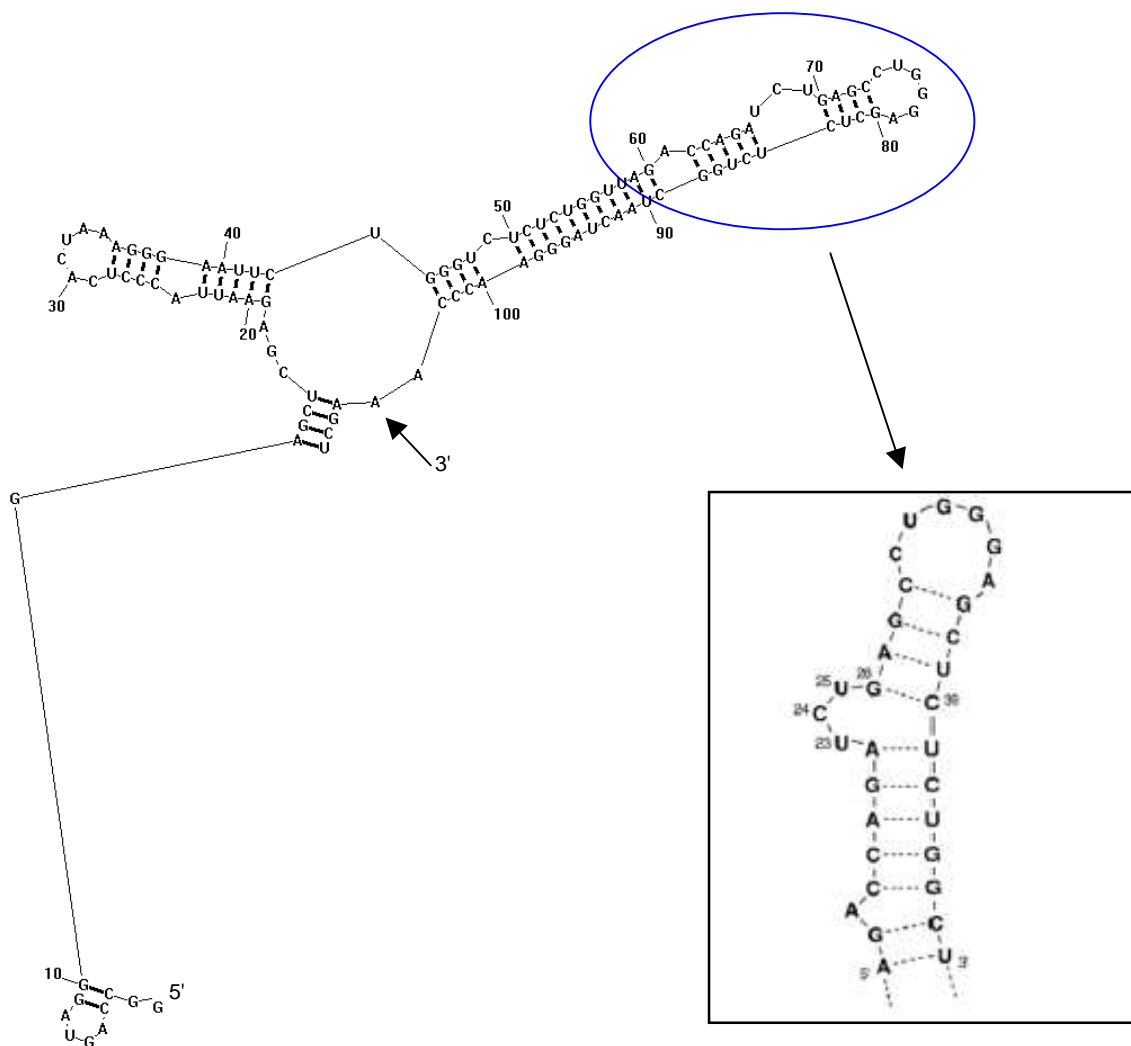


Abb. 74 (oben): Vollängen-TAR-RNA mit Vektorsequenz und Label (109mer) und Binderegion der TAR-RNA (Kasten); die Sekundärstrukturvorhersage für die Vollängensequenz stammt von dem Programm *RNAstructure*[®]. In der Abb. nicht zu sehen: Cy5-T₁₀-Modifikation am 5'-Ende.

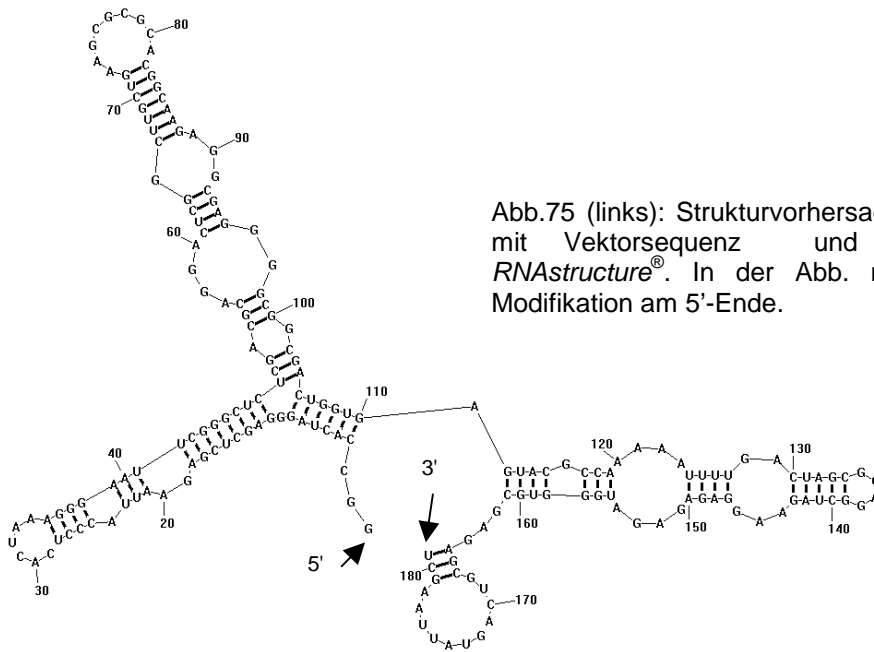


Abb.75 (links): Strukturvorhersage für Vollängen PSI-RNA mit Vektorsequenz und Label (177mer) nach *RNAstructure*[®]. In der Abb. nicht zu sehen: Cy5-T₁₀-Modifikation am 5'-Ende.

Man verwendete zu diesem Zweck das Enzym T4 RNA-Ligase 2, welches auch in anderen Gruppen schon erfolgreich zur Ligation von RNA-Strängen oder auch DNA-RNA-Hybridsträngen verwendet wurde.^[22] Man hielt sich auch bei der Durchführung

des Labelings in etwa an die von Bullard *et. al.* gemachten Vorgaben.

In Abbildung 76 ist die Durchführung graphisch erläutert. DNA-Sequenzen sind hier dunkelblau, RNA-Sequenzen hellblau dargestellt. Zunächst brauchte man ein DNA-Templat, das mit der GMP-geprimten RNA annealt werden musste (Abb. 76,A). Wie bereits eingangs erwähnt, konnte für beide RNAs dasselbe Templat verwendet werden, da es an die Vektorsequenz annealt wurde, die ja bei beiden RNAs identisch war. Im selben Schritt fand auch das Annealing der kurzen RNA-Sequenz (T₁₀-DNA, 8mer-RNA + Cy5-Label) an das

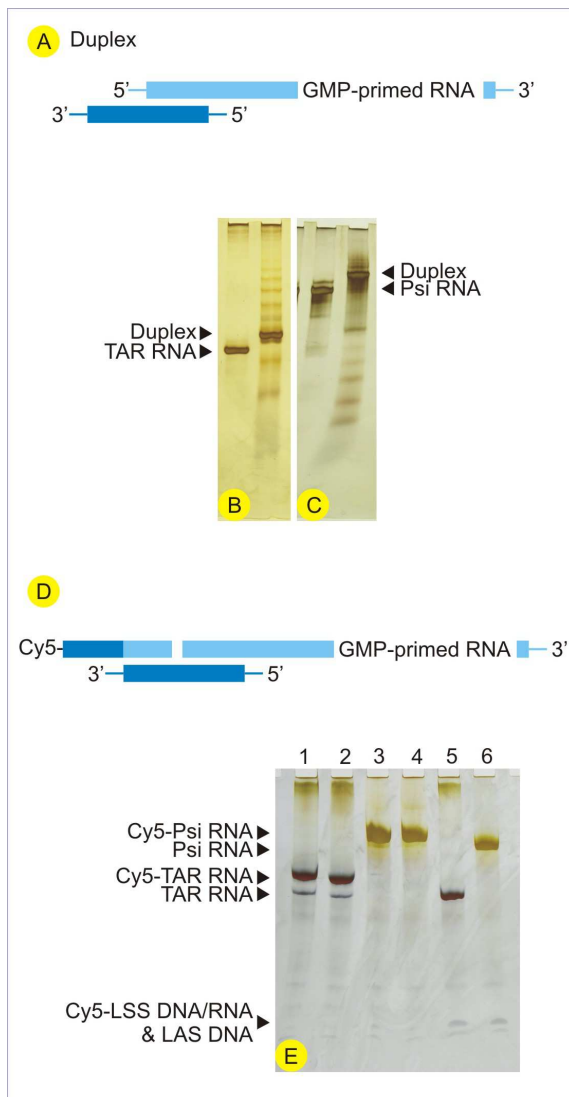


Abb. 76: Schematische Darstellung des Labelings großer RNAs sowie zugehörige Analytik-Gele für TAR- und PSI-RNA. B,C: Duplex meint das Hybrid aus Templat und GMP-geprimter RNA; E: Cy5-LSS DNA/RNA: Cy5-Label-T₁₀-RNA-Baustein; LAS DNA: Templat. (Abb. von Dr. U. Scheffer)

Templat statt (Abb. 76, D). Hierzu wurden die Bestandteile (Templat, Vollängen-RNA, Label) in Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) für 5 Minuten auf 90°C im Thermoblock erhitzt und danach über einen Zeitraum von 2-3 Stunden langsam abkühlen gelassen.

Man kontrollierte den Verlauf des Annealings über ein natives PAGE-Gel (8%-er, s. Abb 76, B und C) und konnte so sicher gehen, dass Templat und Label an der Vollängen-RNA angebracht waren.

Jetzt folgte die Ligation, die das Label nun mit der RNA kovalent verbinden sollte.

Zu Anfang verwendete man – um die optimal Dosierung des Enzyms festzustellen – 2 bzw. 5 Units der Ligase 2 für einen Ligationsansatz. Die Ligase wurde mitsamt dem passenden Enzympuffer den Proben zugesetzt, bevor diese für 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Im Anschluss daran erstellte man abermals ein Analytikgel (denaturierende Bedingungen, 8%-er) der Ansätze welches zeigen sollte, ob die Ligation erfolgreich verlaufen war. Abb. 76E zeigt das entsprechende Gel nach der Silberfärbung: Spur 1 und 2 zeigen das Ergebnis für das Labeling der TAR-RNA, in Spur 1 wurden zwei Units Ligase und in Spur 2 fünf Units Ligase eingesetzt. Wie man sieht, ist kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden erkennbar, also konnte das Labeling in Zukunft auch mit nur 2 Units durchgeführt werden. Dennoch war ein geringer Anteil (ca. 10%) von TAR ungelabelt geblieben. Besser sah es noch für das Labeling von PSI aus. Laut Gel erhielt man eine quantitative Umsetzung zur Cy5-gelabelten Spezies. Auch hier war kein Unterschied zwischen den Ansätzen mit 2 (Spur 3) und 5 (Spur 4) Einheiten Ligase 2 erkennbar. Auf den Spuren 5 und 6 wurden zum Vergleich noch einmal die ungelabelten RNAs aufgetragen, um den Laufunterschied zwischen gelabelten Produkt und ungelabelter RNA besser einordnen zu können.

Nach dem Upscaling dieser Labeling-Prozesse konnten zunächst strukturelle Untersuchungen an der gelabelten RNA vorgenommen werden, beispielsweise das Erstellen einer G-Leiter mittels RNase T1 Verdau (Abb.77, folgende Seite oben).

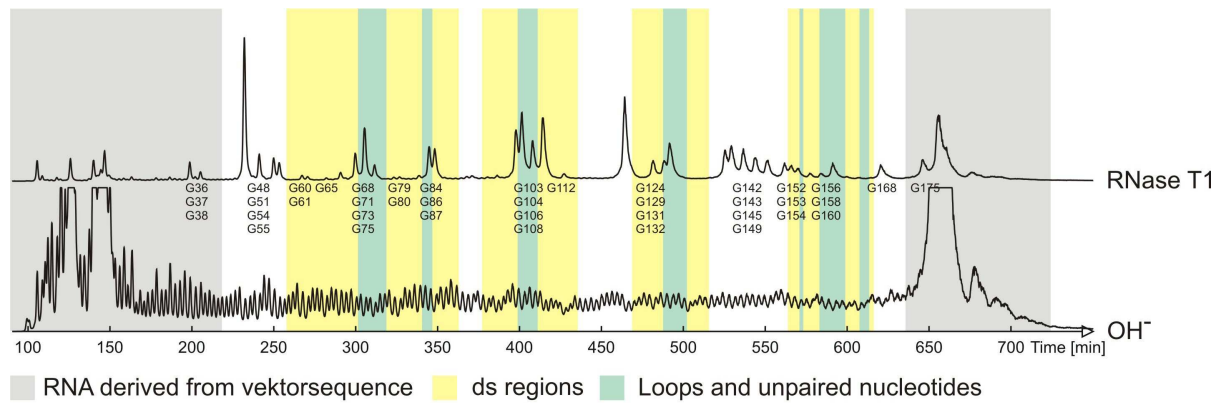


Abb. 77: G-Leiter der PSI-RNA (oben) und basische Hydrolyse (unten) zum Vergleich. Die Einteilung doppelsträngigen Bereiche (ds regions, gelb unterlegt) und der einzelsträngigen, sekundärstrukturellen Bereiche (loops and unpaired nucleotides, grün unterlegt) wurden anhand von Literaturbekannten Daten zugeordnet.^[15]

Für diese Art von Untersuchung war es prinzipiell nicht nötig, die RNA zuvor aufzureinigen. Die breiten Signale zwischen 100 und ca. 160 min Laufzeit wurden durch das überschüssige kurze Stück RNA mit dem Cy5-Label hervorgerufen, das nicht an die lange RNA ligiert war. Da dieses Signal aber mitten im Vektorsequenzbereich lag, hatte dies keine Konsequenzen für die Auswertung des eigentlichen Sequenzbereiches der RNAs. Im Folgenden soll der Vektorsequenzbereich als „Vektorbereich“ und der RNA-spezifische Teil der Sequenz als „Sequenzbereich“ betitelt werden.

5.1.11 Spaltungsexperimente der Peptidkonjugate an Vollängen-RNA

Für das Erstellen einer G-Leiter sowie einer alkalischen Hydrolyse war es wie erwähnt nicht notwendig, die RNA zuvor aufzureinigen. Für die Zuordnung der Sekundärstrukturmerkmale sowie der Basen im Sequenzbereich der RNA konnte der Signalüberlagerte Vektorbereich des Konstruktes außer Acht gelassen werden. Dies galt jedoch nicht für Spaltungsversuche mit Peptidkonjugaten.

Aus diesem Grund ging man dazu über, die Experimente mit PAGE-aufgereinigter RNA durchzuführen.

Die Experimente wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Peptidkonjugaten und konstanter Konzentration an RNA durchgeführt: Man variierte die Konzentrationen der Konjugate zwischen 25 nM, 50 nM, 125 nM und 250 nM, während die Konzentration der RNA konstant bei 250 nM gehalten wurde. Man führte dabei Experimente mit RNA und passendem Ligand (Tat/TAR bzw. KWPWC/ Ψ) durch sowie Kreuzexperimente mit RNA und nicht-passender Peptidsequenz im Konjugat durch (Tat/ Ψ bzw. KWPWC/TAR).

Man wählte diese Bedingungen aus folgenden Gründen: 1. Wollte man durch den Überschuss an Konjugat eine Mehrfachanlagerung desselben an die RNA vermeiden und so eine weitestgehend spezifische Bindung erzwingen und 2. kann man im Fall von Tat/TAR bei Betrachtung des Konjugates als Minderkomponente (Verhältnis Konjugat zu RNA 1:10, 1:5, 1:2) davon ausgehen, dass das Konjugat vollständig durch RNA abgesättigt ist und dadurch eine Reaktion ebenfalls stattfinden muss, sofern die beiden Komponenten wie erwartet miteinander wechselwirken. ^[33]

Für ein ähnliches Tat/TAR-Modell ($K_D = 0.8$ nM) wurden unter diesen Bedingungen signifikante Konzentrationen an Komplex gebildet. ^[33] Geht man für den Komplex Tat/TAR im vorliegenden Fall von einem $K_D = 1$ nM aus, liegt der Komplex bei einer Konzentration von 25 nM Konjugat und 250 nM RNA bei ca. 9.8% assoziiert vor, während bei einer 1:1 Konzentration (250 nM Konjugat/ 250 nM RNA) 94% Komplex vorliegen würden. Bei einem K_D von 10 nM wären es entsprechend 9.5% bzw. 82% assoziierter Komplex.

Mit Sicherheit würde die zu erwartende Spaltaktivität gering ausfallen im Vergleich zu einer Spaltaktivität bei einem Experiment mit Konjugat im Überschuss, doch auch eine geringe Spaltausbeute sollte bei einer vorhandenen Regioselektivität des Konjugates in der Auswertung des ALF-Geles sichtbar sein, da die verwendete Methode (Laser-assistierte RNA-Sequenzierung) sehr sensibel ist.

In Abb. 78 ist die erste Serie dieser Experimente mit den tat11-Konjugaten **61** und **62** (s. a. Abb. 72) an Volllängen-TAR abgebildet.

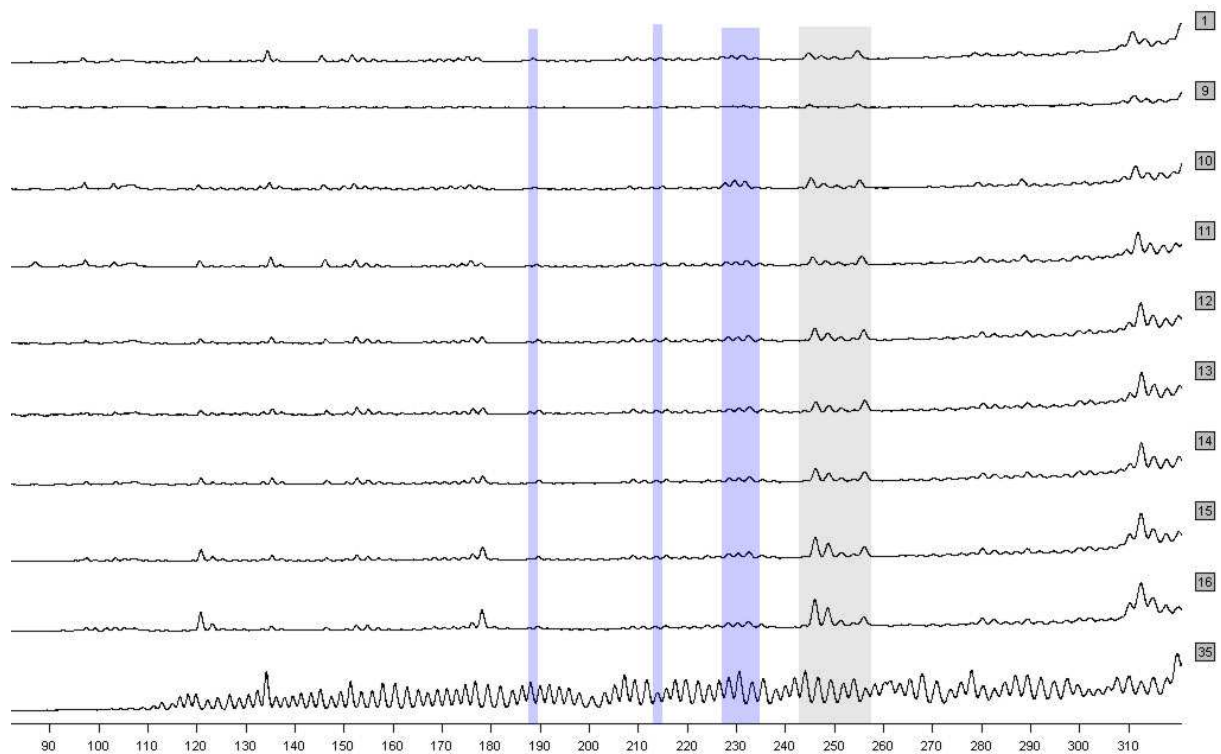


Abb. 78: Tests mit Konjugaten **61** und **62** (tat11-Konjugate); ohne Zugabe von RNasin; Cy5-109mer-TAR (250 nM), lane 1: Blindprobe; 9: 25 nM **61**; 10: 50 nM **61**; 11: 125 nM **61**; 12: 250 nM KB **61**; 13: 25 nM **62**; 14: 50 nM **62**; 15: 125 nM **62**; 16: 250 nM **62**; 35: Basenleiter. 48 h Inkubationszeit, 37°C, TKx5 Puffer, pH 7.4. Violett unterlegt: bulge-Region, grau unterlegt: loop-Region.

Der Substrat-Peak am Ende der Laufstrecke ist bewusst grafisch abgeschnitten, um die kleinen Peaks in der Übersicht besser erkennbar zu machen. Wie man sieht, sind die Effekte ausserordentlich klein. Die Spaltungen durch Konjugat **61** (Konjugat mit C6- Linker, lane 9-12) sind so gering, wenn überhaupt vorhanden, dass man keinen Unterschied zur Blindprobe (lane 1) erkennen kann. Bei Konjugat **62** sieht es etwas besser aus: In lane 15 und 16 (Konzentrationen Konjugat 125 nM bzw. 250 nM) erkennt man, dass Peaks im Vektorbereich (ca. 120 min) und im Sequenzbereich (ca. 180 und Doppelpeak um 250 min) stärker hervor treten. Die Effekte sind nur grafisch auswertbar, die Spaltung liegt deutlich unter einem Prozent und wurde nicht näher quantifiziert.

In der nun folgenden Abbildung 79 (nächste Seite) sind die entsprechenden Experimente an Volllängen-PSI-RNA dargestellt.

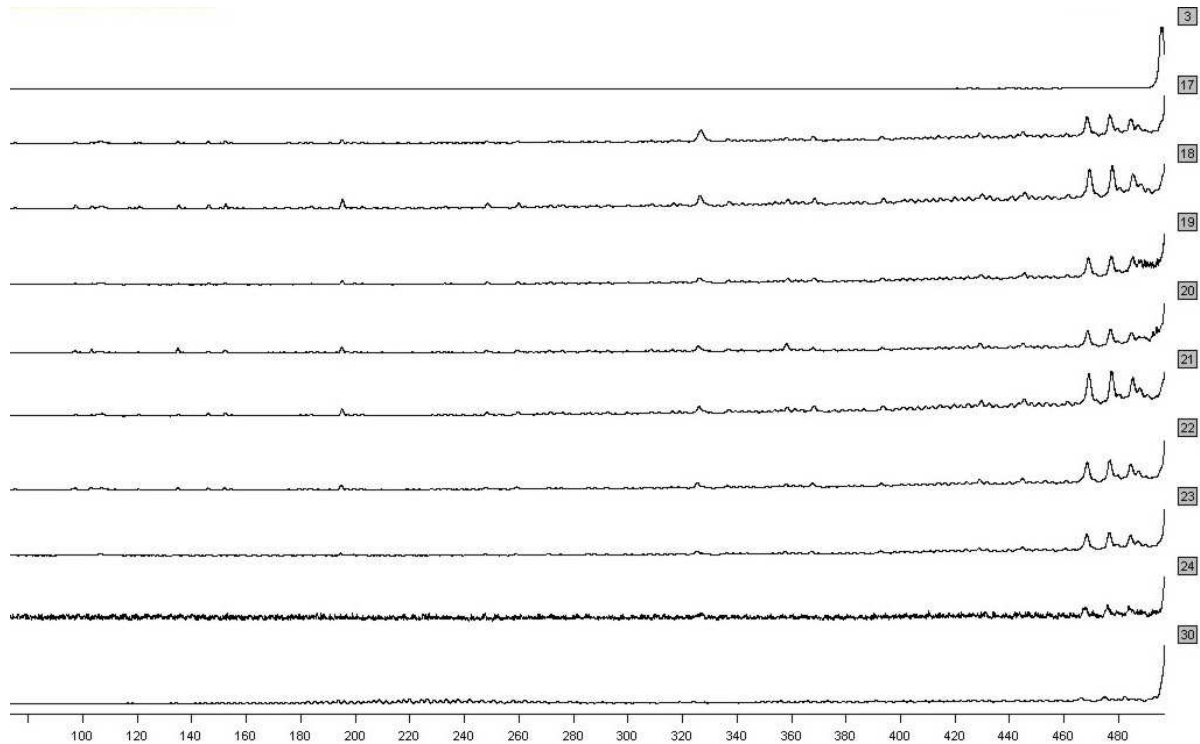


Abb. 79: Tests mit Konjugaten **61** und **62** (tat11-Konjugate); ohne Zugabe von RNasin; Cy5-177mer-PSI (250 nM), lane 3: Blindprobe; 17: 25 nM **61**; 18: 50 nM **61**; 19: 125 nM **61**; 20: 250 nM **61**; 21: 25 nM **62**; 22: 50 nM **62**; 23: 125 nM **62**; 24: 250 nM **62**; 30: Basenleiter. 48 h Inkubationszeit, 37°C, TKx5 Puffer, pH 7.4.

An der Undeutlichkeit der Peaks lässt sich erkennen, dass die Qualität der gewonnenen Daten nicht unbedingt ideal ist, das Rauschen ist viel zu stark (s. besonders lane 24), um eindeutige Aussagen zu erlauben. Versucht man es dennoch, muss man zu dem Schluss kommen, dass keine Spaltung durch Konjugate **61** und **62** an PSI festgestellt werden kann. Dies lässt die Hoffnung aufkommen, es handle sich deshalb um ein klassisches Kreuzexperiment zwischen zwei nicht kompatiblen Komponenten, d.h. die tat11-Konjugate würden nur spezifisch an die TAR-RNA binden und deshalb auch nur diese spalten.

Um diese Aussagen zu bestätigen oder zu widerlegen, wurden noch weitere Experimente gemacht, bei denen zusätzlich der RNase-Inhibitor RNasin zugesetzt wurde, um Spaltungen durch Kontaminationen zu unterbinden und so mögliche Artefakte aufzudecken bzw. echte Spaltung durch das jeweilige Konjugat zu identifizieren.

Die Ergebnisse sind in den nächsten beiden Abbildungen zu sehen (Abb. 80 und 81, folgende Seiten).

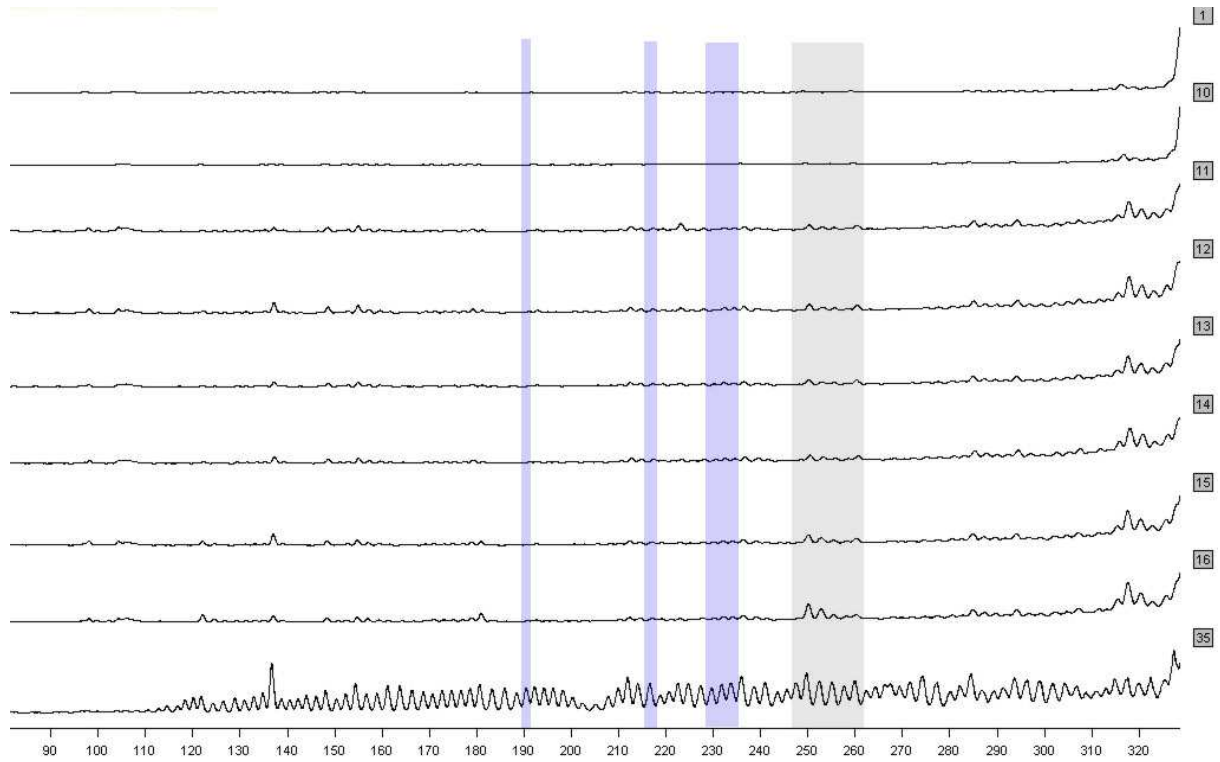


Abb.80: Tests mit Konjugaten **61** und **62** (tat11-Konjugate); mit RNasin; Cy5-109mer-TAR (250 nM), lane 1: Blindprobe; 10: 25 nM **61**; 11: 50 nM **61**; 12: 125 nM **61**; 13: 250 nM **61**; 14: 25 nM **62**; 15: 50 nM **62**; 16: 125 nM **62**; 35: Basenleiter. 20 h Inkubationszeit, 37°C, TKx5 Puffer, pH 7.4. Violett unterlegt: bulge-Region, grau unterlegt: loop-Region.

Die Serie der Spaltungsexperimente an Cy5-109mer-TAR mit Zugabe von RNasin zeigen ebenfalls sehr geringe Effekte. Die Blindprobe sowie das Experiment unter Verwendung von 25 nM **61** wirken außergewöhnlich frei von Untergrund, was allerdings eine fehlerhafte Interpretation ist, wenn man sich die Peaks zwischen 310 und 320 min ansieht: In den anderen lanes sind diese alle gleich hoch und viel höher als in den ersten beiden lanes, man kann sie deshalb als Referenz für die Signalstärke betrachten. Ein minimaler Peak taucht beim Experiment mit 50 nM **61** auf (lane 11, ca. 225 min) sowie in lane 16 beim Experiment mit **62** (hier: 125 nM **62**) bei ca. 250 min (Doppelpeak). Dass diese kleinen Effekte wirklich auf Spaltungsaktivität der Konjugate zurück zu führen und nicht nur Artefakte durch eingeschleppte Nucleasen sind, konnte durch Wiederholung der Experimente nicht eindeutig geklärt werden. Dies wiederum lag an der schlechten Reproduzierbarkeit der Daten durch technische Probleme mit dem Analysegerät (*ALFexpress*) und erschwerten so die eindeutige Interpretation der Daten.

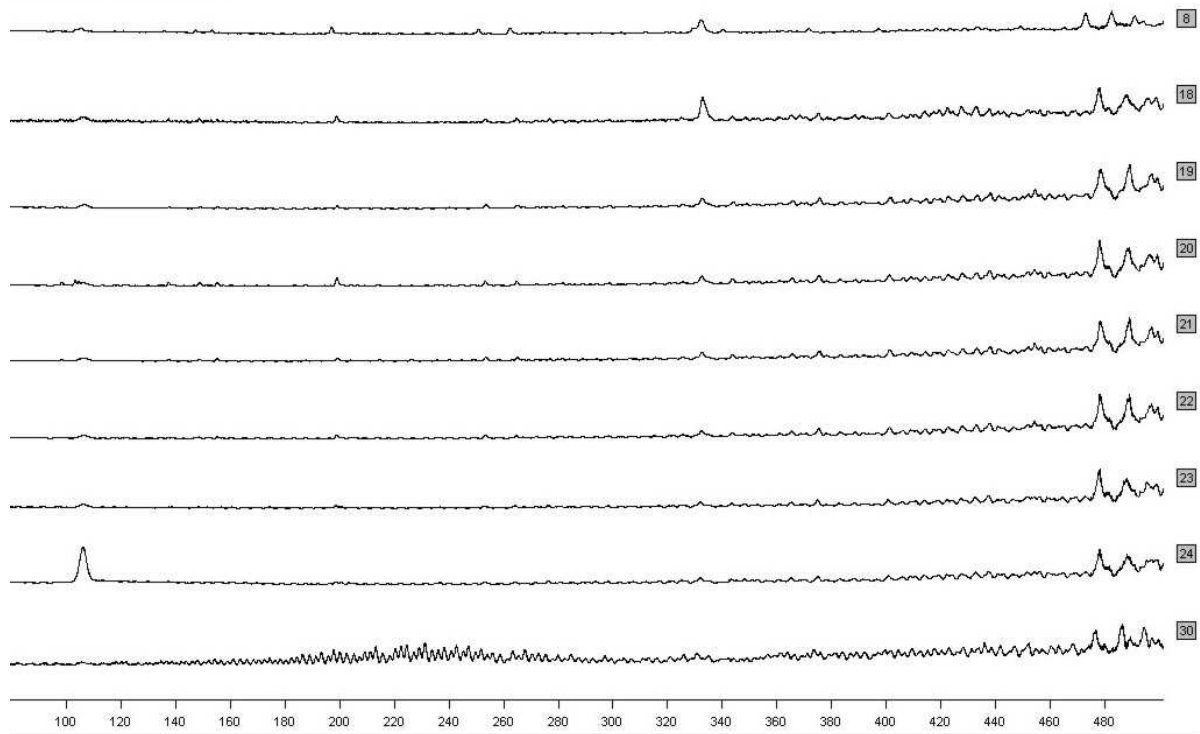


Abb. 81: Tests mit Konjugaten **61** und **62** (tat11-Konjugate); mit RNasin; Cy5-177mer-PSI (250 nM), lane 8: Blindprobe; 18: 25 nM **61**; 19: 50 nM **61**; 20: 125 nM **61**; 21: 250 nM **61**; 22: 25 nM **62**; 23: 50 nM **62**; 24: 125 nM **62**; 30: Basenleiter. 20 h Inkubationszeit, 37°C, TKx5 Puffer, pH 7.4.

Der oben abgebildete Lauf mit den Spaltexperimenten an Cy5-177mer-PSI erhärtet aber die Vermutung, dass trotz Verwendung des RNasen-Hemmers RNasin Kontaminationen für den einen oder anderen sichtbaren Effekt verantwortlich sind.

Zunächst einmal ist jedoch zu erwähnen, dass die Peaks bei ca. 335 min in lane 8 und 18 von einem Überlaufen der Spuren herrührten, welche mit Cy5-109mer-TAR beladen waren; dieser Effekt taucht bei der Verwendung des ALFexpress leider immer wieder auf und verdeutlicht, wie schwierig eine Interpretation der Daten ist, sofern man nicht alle Tücken kennt und Artefakte in der Messung deutlich ausgrenzen kann. Der Peak in lane 24 bei um die 100 min ist ein deutlicher Pyrimidin-Pyrimidin-Spaltungspeak, da er eindeutig zu hoch ist, um von einem der Konjugate verursacht worden zu sein. Insgesamt lässt sich also für diese Serie an Cy5-177mer-PSI sagen, dass keine Spaltaktivität durch die Konjugate verzeichnet werden kann, was sich auch anhand des Replolaufs bestätigen ließ. Diese Aussage ist zunächst mit den Vorhersagen zur Kreuzreaktivität von Tat-Konjugaten an PSI-RNA konsistent.

In den folgenden Abbildungen sind Ergebnisse zu den Experimenten mit den KWPWC-Konjugaten unter Zugabe von RNasin zu sehen (folgende Seiten).

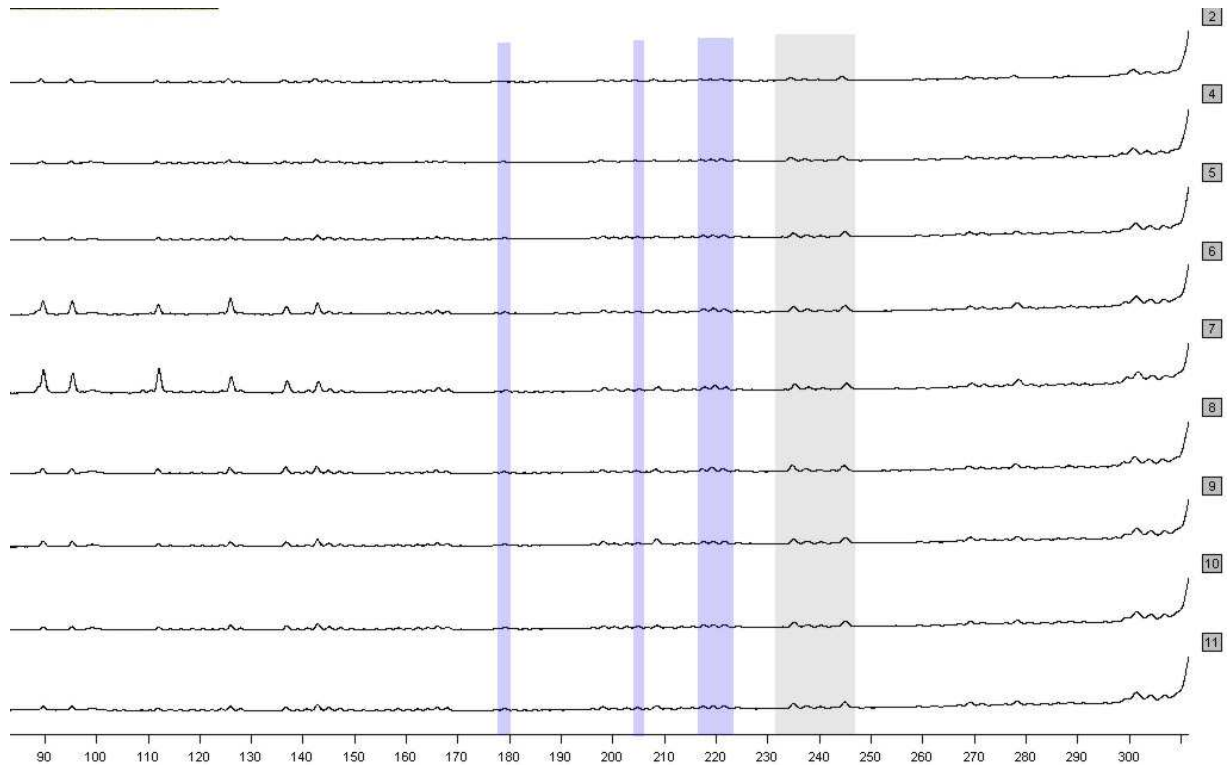


Abb. 82: Tests mit Konjugaten **63** und **64** (KWPWC-Konjugate); mit RNasin; Cy5-109mer-TAR (250 nM), lane 2: Blindprobe; 4: 25 nM **63**; 5: 50 nM **63**; 6: 125 nM **63**; 7: 250 nM **63**; 8: 25 nM **64**; 9: 50 nM **64**; 10: 125 nM **64**; 11: 250 nM **64**. 48 h Inkubationszeit, 37°C, TKx5 Puffer, pH 7.4. Violett unterlegt: bulge-Region, grau unterlegt: loop-Region.

Das KWPWC-Konjugat mit C6-Linker **63** scheint eine Spaltung an Cy5-109mer-TAR in lane 6 und 7 (125 bzw. 250 nM **63**) zwischen ca. 90 und 145 min zu verursachen. Dies ist allerdings wieder ein Artefakt, welches durch den Vergleich der Ergebnisse der Experimente an Cy5-177mer-PSI (folgende Abbildung 83) entlarvt werden kann. Zum Einen ist der Bereich, in dem die Aktivität auftritt, der Bereich der Vektorsequenz, die ja bei beiden RNA-Konstrukten identisch ist und deshalb in beiden Serien auftaucht, auch das Muster der Spaltung ist identisch. Zum Anderen ist die Höhe der Peaks in den beiden offensichtlich kontaminierten lanes gleich groß, weshalb es sich hier nicht um einen Effekt durch das Konjugat handeln kann, welches in lane 7 in doppelter Konzentration vorliegt wie in lane 6. Ein deutlicher Hinweis für eine Kontamination ist auch die Nicht-Reproduzierbarkeit dieses Effektes, er taucht nur in diesem Lauf auf (beide Experimente-Serien wurden auf einem Gel gefahren).

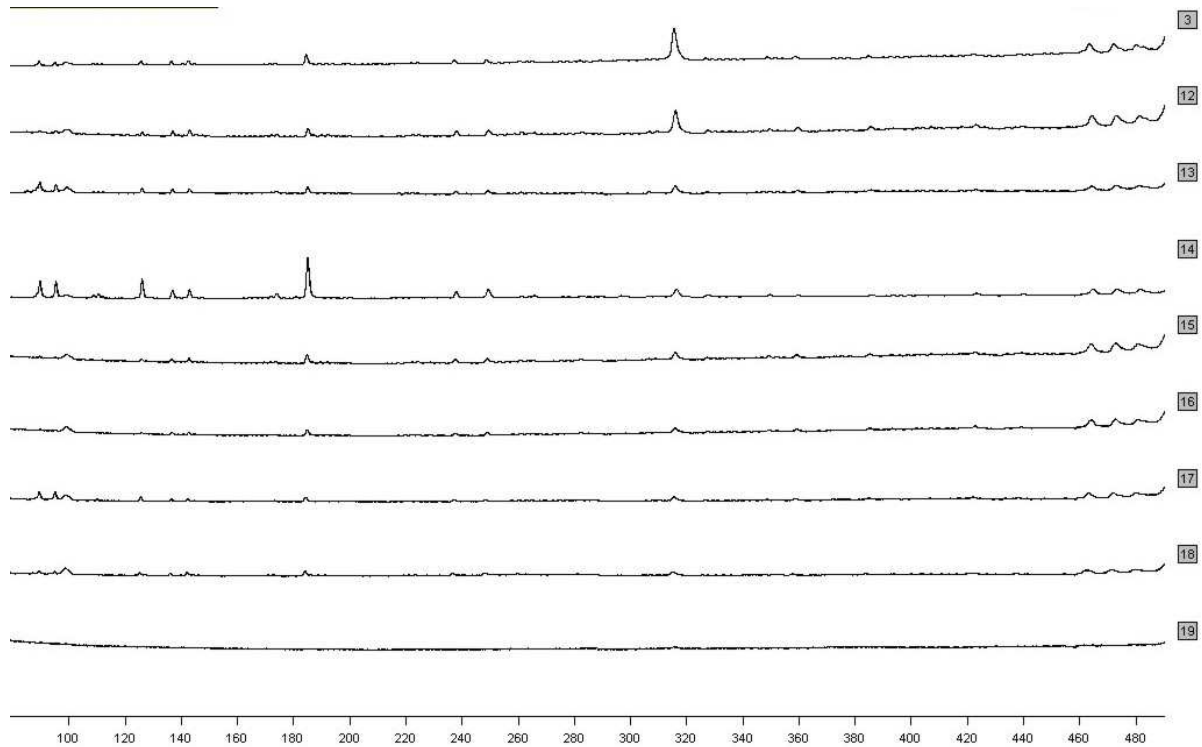


Abb. 83: Tests mit Konjugaten **63** und **64** (KWPWC-Konjugate); mit RNasin; Cy5-177mer-PSI (250 nM), lane 3: Blindprobe; 12: 25 nM **63**; 13: 50 nM **63**; 14: 125 nM **63**; 15: 250 nM **63**; 16: 25 nM **64**; 17: 50 nM **64**; 18: 125 nM **64**; 19: 250 nM **64**. 48 h Inkubationszeit, 37°C, TKx5 Puffer, pH 7.4.

Zum Vergleich hier nun Abb. 83 mit den Kurven von PSI-RNA. Peaks in lane 3 und 12 bei ca. 320 min wieder durch Überlaufen von Spuren, die mit TAR-RNA beladen waren (Substrat-Peak), oder Überstrahlen des Signals auf Nachbardioden in fast allen lanes dasselbe Spaltmuster im Vektorbereich zwischen 90 und 140 min wie bei TAR-RNA, also die Bestätigung für die Befürchtung, Kontamination eingeschleppt zu haben.

Neben den Befunden der Artefakte konnte keine nennenswerte Spaltaktivität der KWPWC-Konjugate an TAR- oder PSI-RNA festgestellt werden, was auch nicht weiter verwunderlich ist, da es sich bei KWPWC um keinen identifizierten Liganden für TAR handelt und sich im Vorfeld nur als schwacher Ligand von PSI herausgestellt hat.

Die Ergebnisse dieser Experimenteserien bleiben dennoch weit hinter den Erwartungen zurück, hatte man doch gehofft, dass sich ein deutlicherer Unterschied zwischen den Aktivitäten der Konjugate und somit auch der Liganden feststellen ließe. Des weiteren hätte man vermutlich bei einem deutlicheren Effekt eine Regioselektivität feststellen können, welche z.B. Aufschluss über die Faltung der jeweiligen RNA hätte geben können. Um bessere Ergebnisse erzielen zu können (also Ergebnisse, die man eindeutiger interpretieren kann), müsste man eventuell

eine höhere Konzentration an Konjugaten einsetzen, was allerdings zu unspezifischen Wechselwirkungen und somit auch zu unspezifischer Spaltung führen könnte. Aus diesem Grund wurde hierauf im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Die anfänglichen Ergebnisse der Experimente mit Tat/TAR sprechen mit aller Vorsicht dafür, dass im loop gespalten wird (wahrscheinlich eingeleitet durch die Bindung des Konjugates im bulge-Bereich). Weitere Spaltungsmuster sprechen aber dafür, dass es mindestens eine weitere Spaltungsstelle zu geben scheint, die im Übergangsbereich von Vektor- zu Sequenzbereich liegen dürfte.

Es bleibt zu sagen, dass die großen RNA-Konstrukte zwar erfolgreich aufgebaut werden konnten, diese sich allerdings als sehr empfindlich im Umgang herausstellten. Ein weiteres Problem für die Interpretation der Daten war der geringe Effekt der Konjugate, der insbesondere im Falle der tat11-Konjugate **61** und **62** verwunderlich schien, da tat nun einmal als Ligand für TAR bekannt ist und deshalb gut daran binden und somit auch spalten sollte. Für möglich wird deshalb auch der Gedanke gehalten, dass die Spaltung, die so gering war, dass sie sich im niedrigen einstelligen Prozentbereich bewegte, durch die Verteilung auf die einzelsträngigen Bereiche der RNA im Untergrund (vgl. besonders eingeschleppte Kontamination) verschwand und deshalb nicht detektierbar war. Dieser Ansatz impliziert allerdings auch, dass die Spaltung eben nicht hoch regiospezifisch abläuft, sondern überall an der RNA stattfinden kann und auch wird.

5.2 Neue RNA-spaltende Amidin- und Guanidinanaloga

5.2.1 Einführung

Affinitätsspaltung bedeutet, dass ein Ligand (mit Spalter) mit hinreichender Bindungsstärke regiospezifisch an ein Wirtsmolekül (hier: RNA) bindet und so ein spezifisches Spaltmuster generiert wird. Dieses Prinzip wurde in der Vergangenheit sowie auch im Rahmen dieser Doktorarbeit hinreichend durch DNA-Konjugate validiert. Ist der Ligand zu schwach, wird kein spezifisches Spaltmuster ausgebildet. Für eine pharmakologische Anwendung müsste ein hochaffiner Ligand mit einem hervorragendem Spalter in einer künstlichen Ribonuclease vereint werden, mit der man gezielt bestimmte mRNA zerstören könnte. Dieses Ziel ist jedoch bisher unerreicht. Dieser Abschnitt der Arbeit widmet sich der Findung neuer Werkzeuge zur Vorhersage der Eigenschaften von möglichen RNA-Spaltern, um einen „guten“ Kandidaten von einem „schlechten“ zu unterscheiden und so die Anzahl der möglichen Leitstrukturen im kleinen Rahmen zu halten.

Als erstes Auswahlkriterium der zu untersuchenden Kandidaten diene das Strukturmotiv der Guanidiniumeinheit; dieses hatte sich in der Vergangenheit aus unterschiedlichen Gründen häufig als guter Anhaltspunkt für eine mögliche RNA-Spaltaktivität erwiesen. [8] Untersucht wurden deshalb zunächst folgende Kandidaten, die kommerziell erhältlich waren:

- 2-Aminoimidazol (als Hemisulfat) **65**
- 2-Aminobenzimidazol **66**
- 2-Aminoperimidin (als Hydrobromid) **67**
- 2-Aminopyrimidin **68**

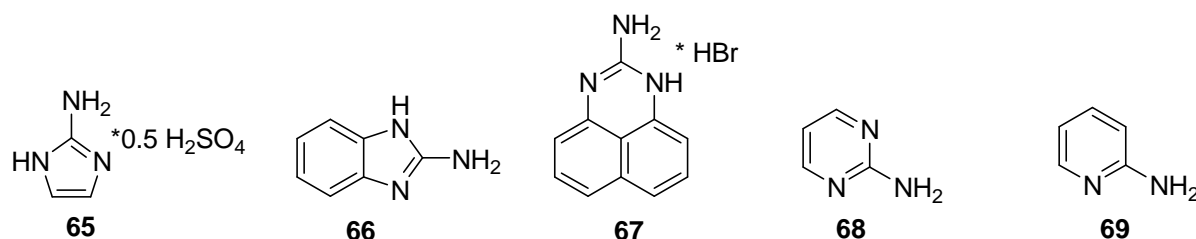


Abb. 84a: Verwendete Substanzen für das Screening der RNA-Spalter: **65**: 2-Aminoimidazol (als Hemisulfat); **66**: 2-Aminobenzimidazol; **67**: 2-Aminoperimidin (als Hydrobromid); **68**: 2-Aminopyrimidin; **69**: 2-Aminopyridin.

Darüber hinaus wurde auch der pKa-Wert der Kandidaten für die RNA-Spaltung untersucht. Bisher hatte sich ein pKa-Wert, der sich um einen physiologischen Bereich von 7.4 befindet, als besonders günstig für eine gute Spaltungsaktivität erwiesen. ^[8,18] Ungeklärt war dabei die unzureichende Spaltaktivität von 2-Aminopyridin **69**.

Bei Derivaten von **69**, die an der exozyklischen Aminogruppe substituiert waren, vermutete man, dass deren schlechte Spaltaktivität auf die mangelnde C2-Symmetrie zurückzuführen sei, da zwei parallel ausgerichtete H-Donorgruppen für eine Bindung benötigt werden. Die Bevorzugung des Z-Konformers dieser Verbindungen könnten sie als Phosphatbinder ungeeignet machen und somit wäre die Affinität zum RNA-Rückgrat geschwächt (s.a. Abb. 84b).^[8]

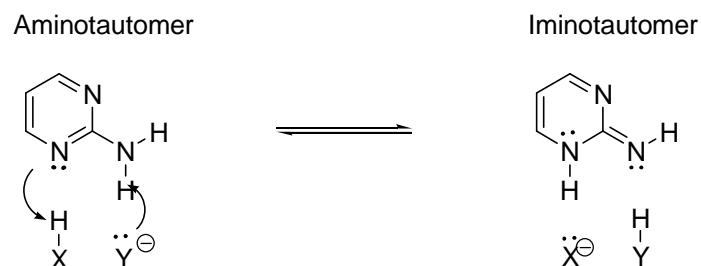


Abb.84b: 2-Aminomethyliertes Pyridin (protoniert) in seiner Z-Konformation (links) und 2-Aminomethyliertes Benzimidazol (protoniert, rechts). Man erkennt, dass das substituierte Benzimidazol durch seine lokale C2-Achse trotz der Methylgruppe an der exozyklischen Aminofunktion als Phosphatbinder fungieren kann.

Da **69** aber über eine unsubstituierte exozyklische Aminogruppe verfügt, greift diese Erklärung für ihr schwaches Abschneiden bei der RNA-Spaltung nicht.

Als Erklärungsansatz nahm man ein Modell zur Hilfe, das im Folgenden als „Protonen-Shuttle“ bezeichnet wird:

Für die basische Katalyse sollte der RNA-Spalter ein Proton aufnehmen können, für die saure Katalyse ein Proton abgeben können. Indem die Verbindung zwischen der Enamin- und Imin-Form hin und her „shiftet“, kann sie beide Katalysearten bedienen und ist somit von höherer Güte für diesen Mechanismus, wenn die Energiebarriere (hier in Form der Bildungsenthalpie) zwischen Imin- und Enamin-Form möglichst niedrig ist. Es sollten also die Unterschiede in der Bildungsenthalpie zwischen der Enamin- und der Imin-Form der Kandidaten berechnet werden, um eine Aussage darüber treffen zu können, wie gut die jeweilige Verbindung von der einen in die andere Form übergehen kann.



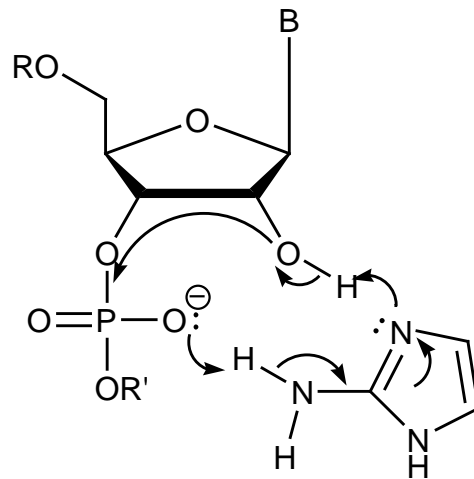
Schema 2: Überführung des Aminotautomers eines Guanidiniumanalogons (hier: 2-Aminopyrimidin) in sein Iminotautomer in Anwesenheit von Protonendonor und -akzeptor. Säure und Base können – anders als hier abgebildet – auch in einem Molekül enthalten sein und müssen nicht notgedrungen aus zwei unterschiedlichen Molekülen stammen.

Die *ab-initio*-Berechnungen dazu wurden im Vorfeld von Prof. Dr. R. Berger vorgenommen.^[134] Die daraus resultierenden Erkenntnisse sprachen für eine mögliche Tragfähigkeit des neuen Werkzeugs zur Findung neuer RNA-Spalter.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Programm *Chem3D Ultra 8.0* für die AM1-Rechnungen verwendet. Man wählte aus gutem Grund ein so einfach zu bedienendes Programm aus. Sollte sich die gewählte Methode als gutes Vorhersagewerkzeug für potentielle RNA-Spalter erweisen, könnte diese auch von jedermann mit minimalem Aufwand eingesetzt werden. Von der Tendenz her deckten sich die so gewonnenen Werte für die Bildungsenthalpie der beiden Grenzstrukturen mit den exakteren *ab-initio*-Berechnungen von Prof. Dr. Berger. Da im Rahmen dieser Arbeit mehrere Verbindungen verglichen werden sollten, reichte diese Form der Datengewinnung völlig aus, um eine Aussage über das neue Vorhersagewerkzeug treffen zu können.

So hatte man gleich zwei Herangehensweisen an das Modell erschlossen: Zum einen die Beurteilung bereits ausgewählter Verbindungen und zum anderen die Findung neuer Substanzen, die aufgrund dieses Modells als vielversprechend einzustufen waren und deshalb ebenfalls in die Liste der zu untersuchenden Verbindungen aufgenommen wurden.

Wie ein Angriff eines Guanidiniumanalogons mit „Protonen-Shuttle“-Funktion an einem RNA-Rückgrat mechanistisch aussehen könnte, ist im folgenden Schema zu sehen.

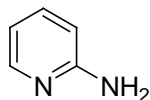


Schema 3: Angriff von 2-Aminoimidazol **65** an einem RNA-Phosphatrückgrat (B= Base). Pfeile kennzeichnen den Elektronenfluss. Das Produkt des Angriffs der 2'-OH-Gruppe am Phosphat ist das Cyclophosphat. Aus dem Cyclophosphat entstehen die 2'- und 3'-Monophosphate.

5.2.2 Untersuchungen der pKa–Werte der möglichen RNA–Spalter

In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass der pKa–Wert potentiell RNA spaltender Moleküle sich vorzugsweise im physiologischen Bereich – also um 7.4 – bewegen sollte. Der Grund hierfür ist in der Aufgabe des RNA–Spalters begründet: Er sollte in der Lage sein, für alle drei Katalysearten (allgemeine Säure-/ Basenkatalyse, elektrophile Katalyse) den geforderten Protonierungsgrad annehmen zu können, also auch eine Protonen–„Shuttle“–Funktion übernehmen zu können, d.h. einerseits Protonenakzeptor und andererseits –donor sein sollte (s.a. vorangehender Abschnitt 5.2.1).

Dennoch ist der pKa nicht das alleinige Kriterium für die Güte einer RNA spaltenden Verbindung, wie sich am Beispiel von 2–Aminopyridin gezeigt hat.



69

pKa \approx 6.5

Abb. 85: 2-Aminopyridin (**69**).

Der pKa dieser Verbindung bzw. dieses Verbindungstypes liegt zwar mit etwa 6.5 im annähernd physiologischen Bereich, doch erreichte deren Spaltaktivität niemals vergleichbar gute Werte wie die 2-Aminobenzimidazole^[18]

Die Durchführung der pKa-Wert-Bestimmungen erfolgte analog der in unserem Arbeitskreis etablierten Methode. Zunächst nahm man ein UV-Spektrum der Verbindung in saurer Pufferlösung auf, alkalisierte die 50–150 μ M Lösung mit einigen Tropfen NaOH-Lösung und nahm ein weiteres Spektrum auf. Die Wellenlänge, bei der die pK-Titration stattfinden sollte, wurde durch das Vorhandensein eines möglichst großen Messfensters, also einer großen Differenz zwischen den Extinktionen im sauren und im basischen pH-Bereich, ermittelt. Zur Bestimmung des pH-Wertes wurde eine vor jeder Bestimmung geeichte pH-Elektrode verwendet. Der pKa-Wert wurde durch die Auftragung der Extinktion gegen der pH-Wert in Form einer sigmoidalen Kurve ermittelt, deren Wendepunkt dem pKa-Wert entspricht. Es wurden immer mindestens zwei Titrations je Verbindung durchgeführt, um den zunächst bestimmten Wert zu bestätigen und zu mitteln. Es wurden ausschließlich die pK-Werte bestimmt, die noch nicht Literaturbekannt waren.

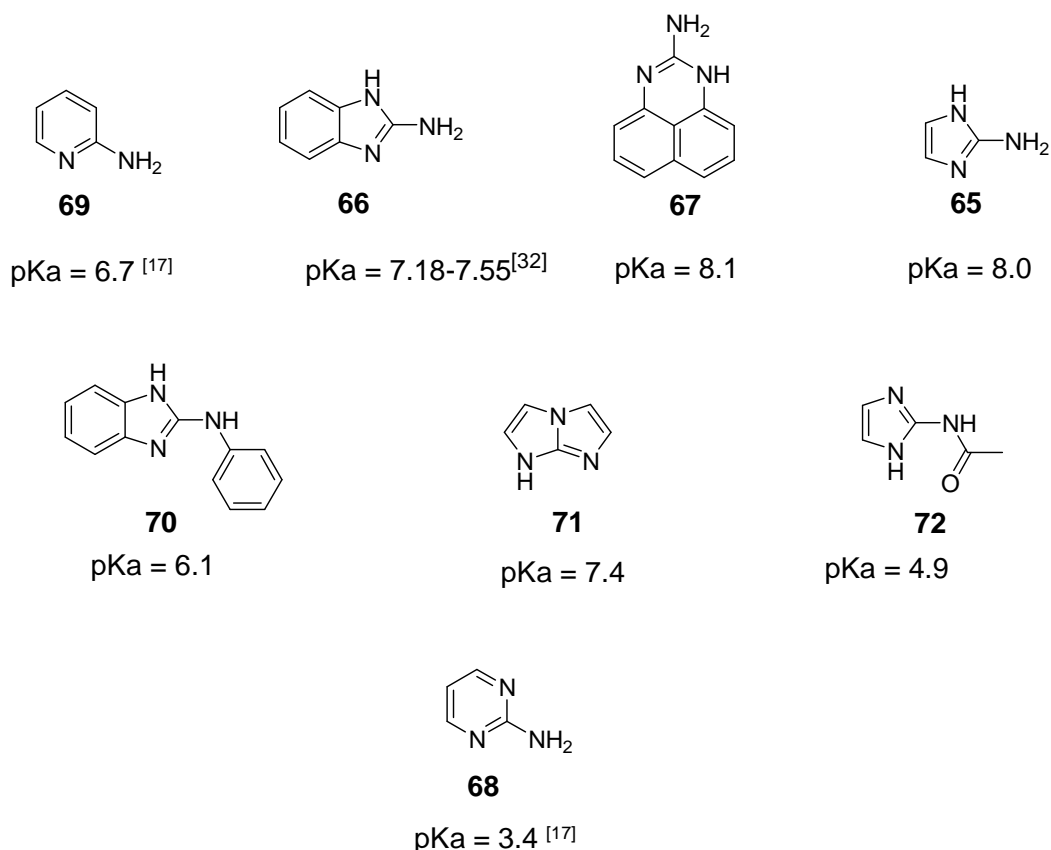


Abb. 86: pKa-Werte einiger auf RNA-Spaltfähigkeit untersuchte Verbindungen; die Werte wurden nach dem im Text beschriebenen Procedere ermittelt; die Werte, welche mit Literaturverweis versehen sind, wurden nicht selbst gemessen.

Verbindung **68** (2-Aminopyrimidin) wurde bereits in der Vergangenheit auf seine Spaltaktivität untersucht, wobei man hier feststellen musste, dass trotz der vorhandenen Guanidiniumeinheit keine Spaltaktivität vorhanden war. Auf den ersten Blick macht es den Anschein, es könne sich um einen RNA-Spalter handeln (C2-Symmetrie, Guanidiniumeinheit). Der viel zu niedrige pKa-Wert könnte ein Grund für die mangelnde RNA-Spaltaktivität sein, auf deren genaue Werte und Bedeutung im Abschnitt 5.2.5 eingegangen wird.

An Beispielen wie diesem wird die große Bedeutung des passenden pKa-Wertes für die Spaltaktivität der jeweiligen Substanz deutlich.

5.2.3 Berechnung der Bildungsenthalpie (ΔH_f -Werte)

In der Einführung zu diesem Teil der Arbeit (Abschnitt 5.2.1) wurden die Gründe und Methoden für die Berechnung der Bildungsenthalpie-Differenzen zwischen der Enamin- und der Iminform eines Guanidiniumanalogons besprochen.

Wie bereits erwähnt wählte man für die AM1-Berechnungen das Programm *ChemDraw Ultra 8.0* aus, da es für den angestrebten Zweck ausreichend genaue Werte lieferte und zum anderen auch einfach zu verwenden ist. Die genaue Vorgehensweise hierbei kann im experimentellen Teil nachgelesen werden.

Die auf diese Weise gewonnenen Werte dürfen selbstverständlich nicht als absolute Zahlenwerte verwendet werden, es ging hier ausschließlich um eine relative Bestimmung der Bildungsenthalpien (ΔH_f) der beiden Formen einer einzigen Substanz. Die ΔH_f -Werte unterschiedlicher Verbindungen werden auf der folgenden Seite verglichen.

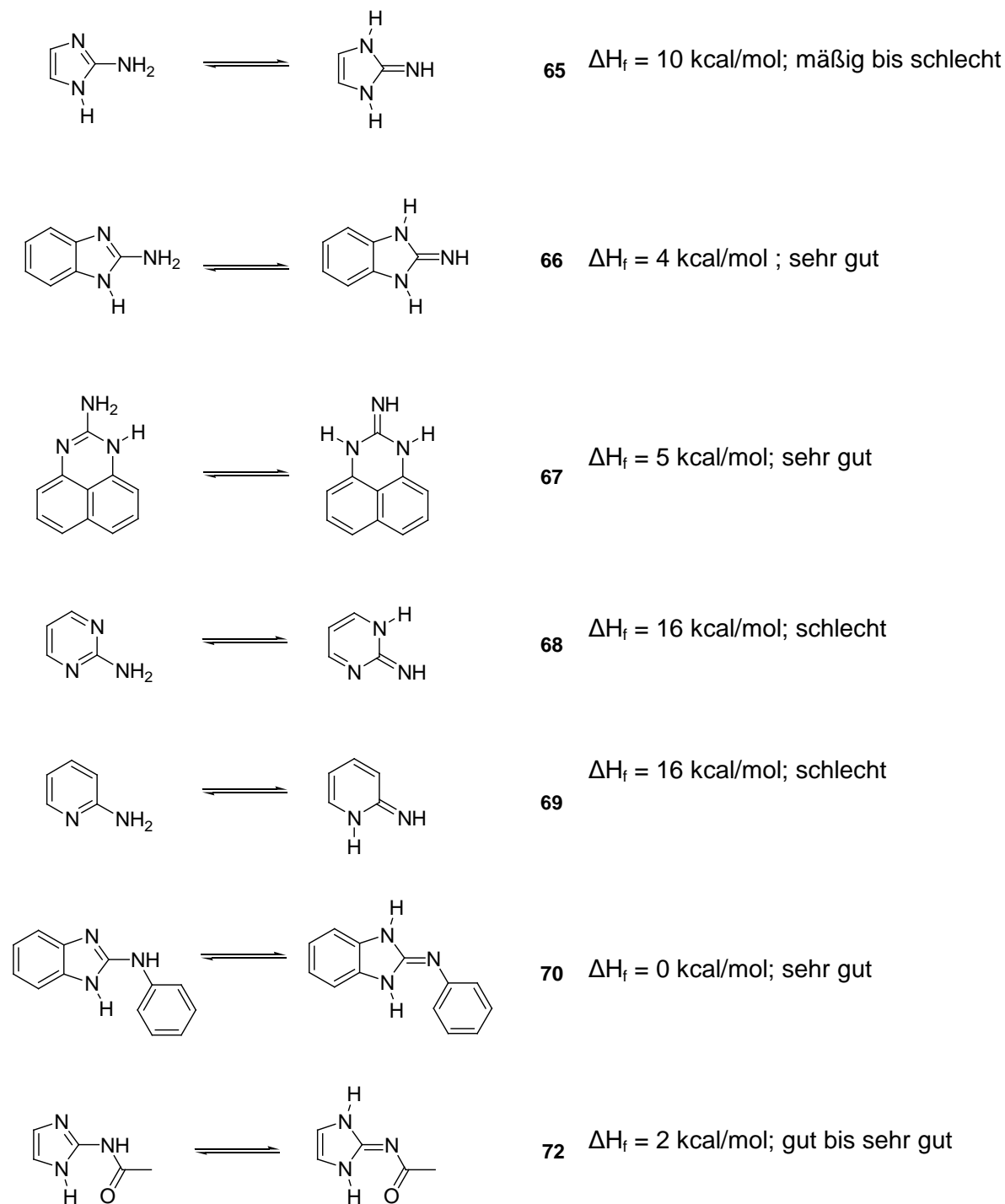


Abb. 87: Enamin- (links) und Imin-(rechts) Formen verschiedener Verbindungen. Rechts daneben die ΔH_f -Werte (auf ganze Zahlen gerundet) und die daraus resultierende Einschätzungen der RNA-Spaltaktivität .

In Abbildung 87 sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen aufgelistet, die ebenfalls mit der hier genannten Methode untersucht wurden. Die gemachten Einschätzungen der Spaltungsaktivität wurden zunächst einigermaßen willkürlich vorgenommen und bedurften zu einem so frühen Zeitpunkt weiterer Beobachtung und Verfeinerungen. Verbindungen **65-69** sind die käuflich erwerblichen, die bei einem ersten „Screening“ der Kataloge ins Auge fielen und

deshalb ausgewählt wurden. Verbindung **70** und **72** kamen nach näherer Betrachtung der Methode ins Gespräch, da besonders bei Verbindung **70** – die ebenfalls kommerziell erworben wurde – die Differenz ΔH_f so klein war, dass man auf eine gute Spaltaktivität schließen musste, sollte sich das Vorhersage-System als tragfähig erweisen. Verbindung **72** schien aus diesem Grund auch vielversprechend, wobei sie zugleich auch durch Acetylierung der Verbindung **65** leicht zugänglich war.

Verbindungen wie 2-Aminobenzimidazol **66**, die ihre Spaltaktivität bereits in vorangegangenen Experimenten unter Beweis gestellt hatten, oder 2-Aminopyrimidin **68**, die einen Mangel dieser Eigenschaft aufgewiesen hatten, stellten sich auch bei der Bestimmung der ΔH_f -Werte als Treffer bzw. Verlierer heraus. Dieser Umstand ließ hoffen, dass das Modell tragfähig sein würde und auch die Kategorisierung anderer, noch nicht untersuchter Verbindungen wie 2-Aminoperimidin **67** oder 2-Aminoimidazol **65** als nützlich erweisen könnte.

Ein Sonderfall in dieser Betrachtung stellt das 1H-Imidazo[1,2-a]imidazol **71** dar. Das Molekül weist eine C2-Symmetrie auf und seine Enamin- und Iminform sind deshalb identisch, folglich ist sein ΔH_f -Wert 0.

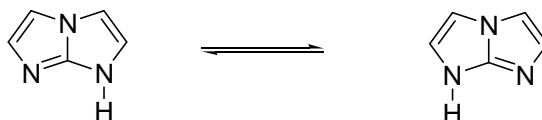


Abb. 88: Enamin- bzw. Iminformen von Verbindung **71**.

Aus diesem Grund lag es nahe, die Verbindung zu synthetisieren und ihre anderen Eigenschaften wie ihren pKa-Wert und ihre Eignung für die RNA-Spaltung zu untersuchen.

5.2.4 Synthese von **71** und Derivatisierung käuflicher Verbindungen

Die Synthese von Verbindung **71** wurde von Herrn Dr. M. Suhartono durchgeführt und gestaltete sich als nicht trivial, was an der wenig zufrieden stellenden Ausbeute im ersten Schritt zu erkennen ist.

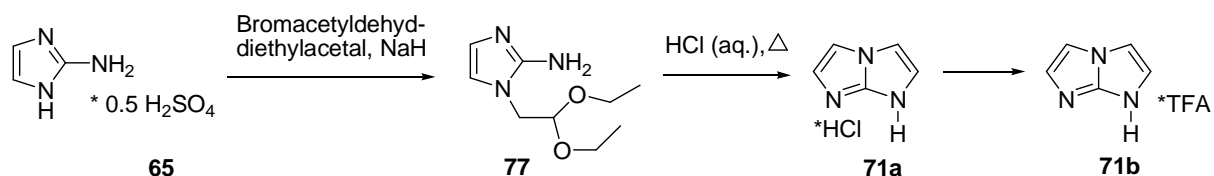


Abb. 89: Reaktionsschema für die Bildung von **71a**, welches über einen Aufreinigungsschritt per HPLC in das TFA- Salz **71b** überführt wird.

Die erste Reaktion fand unter Ausschluss von Luft und Wasser statt, man arbeitete in trockenem DMF und über Molsieb. 2-Aminoimidazol **65** wurde als Hemisulfat dabei mit einem eq Bromoacetaldehyddiethylacetal und ca. 2.5 eq NaH bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach Quenchen der Reaktionslösung wurde das isolierte Rohprodukt mit einer Ausbeute von 12% im nächsten Schritt eingesetzt. Zwischenprodukt **77** wurde in 2M wässriger Salzsäure-Lösung zum Sieden erhitzt, bevor man den gewonnenen Rückstand in Methanol aufnahm und dieses mit Chloroform coevaporierte. Der Rückstand (das Hydrochlorid von Verbindung **71**) wurde in Ether ber Nacht gerührt und durch Filtration gewonnen. Zur endgültigen Aufreinigung nutzte man die HPLC, wodurch man das TFA-Salz **71b** als hellgelben Feststoff in einer Ausbeute von 93% erhielt.

Einige Verbindungen, denen ebenfalls durch die Vorhersagemethoden gute Eigenschaften zugesprochen wurden, konnten in einfachen Umwandlungen aus den gekauften Substanzen gewonnen werden.

Ein solcher Fall ist beispielsweise das 2-Acetylaminoimidazol **72**. Durch Acetylierung konnte dieses aus dem käuflich erworbenen 2-Aminoimidazol **65** hergestellt werden (s. Abb. 90).

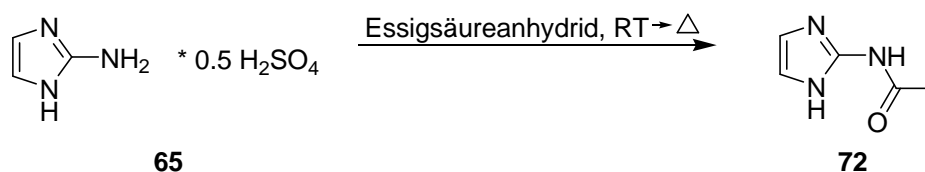


Abb. 90: Reaktionsschema für Überführung von **65** zu **72**.

Verbindung **65** wurde als Hemisulfat in Essigsäureanhydrid unter Zugabe von katalytischen Mengen TEA zunächst bei Raumtemperatur und im Anschluss unter Sieden zu Produkt **72** umgesetzt. Das reine Produkt konnte man nach Umkristallisation aus Isopropanol in 27% Ausbeute erhalten werden.

Van der Eycken und Mitarbeiter erschlossen Synthesewege für mehrfach substituierte Aminoimidazole ausgehend von substituiertem 2-Aminopyrimidin und α -Bromcarbonylverbindungen in Mikrowellen-assistierten Reaktionen. [24]

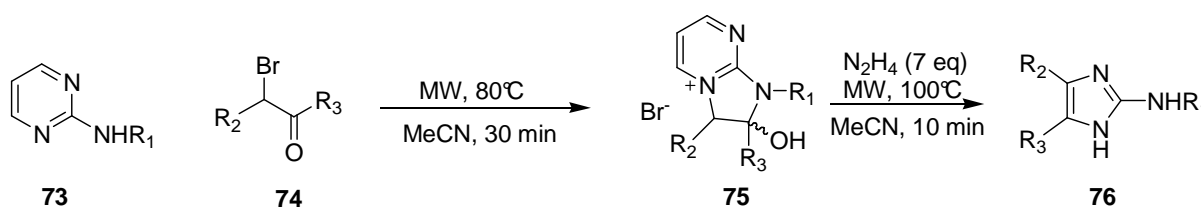


Abb. 91: Syntheschema für mehrfach substituierte Aminoimidazole nach Van der Eycken *et. al.*

Durch Behandlung des Reaktionsgemisches mit Mikrowellenstrahlung bei 80°C sowie mit MeCN und anschließende Spaltung durch Hydrazin (ebenfalls unter Einwirkung von Mikrowellenstrahlung) kann das dreifach substituierte Molekül **76** aufgebaut werden. Die Autoren gehen beim letzten Schritt davon aus, dass sich ein Dimroth-Umlagerungsartiger Mechanismus anschließt und so nach der Hydrazinolyse das Produkt **76** ausbildet.

Sollten sich die 2-Aminoimidazol-stämmigen Verbindungen als gute RNA-Spalter herausstellen, könnte dieser Syntheseweg den Zugang zu einer Vielzahl neuer Derivate eröffnen.

Neben der beschriebenen Derivatisierung von 2-Aminoimidazol **65** wurden außerdem im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn M. Zeiger einige Derivate von 2-Aminoperimidin **67** hergestellt. Auf die Synthese dieser Verbindungen soll hier nicht eingegangen werden, ihre Spaltungsergebnisse an RNA werden jedoch im Kapitel 5.2.5 diskutiert.

5.2.5 Spaltungsexperimente mit unspezifischen RNA-Spaltern

Nach Abklärung der pKa-Werte der zu testenden Verbindungen konnten diese auf ihre Spaltaktivität bezüglich RNA untersucht werden. Da aber der Reinheitsgrad der käuflich erworbenen Substanzen praktisch nie bei 100% lag (man erhielt Verbindungen im Reinheitsgrad von 97-99%), mussten die Substanzen zuvor durch Umkristallisation aufgereinigt werden, bis der Schmelzpunkt der jeweiligen Substanz als konstant und scharf anzusehen war.

Ein grundlegendes Problem war die Löslichkeit der Substanzen. Die wenigsten waren in Wasser löslich, oder wenn doch, dann nur unter Zugabe eines Äquivalentes HCl, um sie in ihr Hydrochlorid-Salz zu überführen. Aus diesem Grund griff man auf Co-Solventien zurück, und zwar entweder Methanol oder DMSO. Selbstverständlich musste zunächst geprüft werden, inwiefern der Einsatz dieser Co-Solventien die Laufeigenschaften der RNA in der Gelmatrix beeinflussen würde, oder ob sich sogar eine Veränderung der Spaltaktivität durch direkte Einflüsse auf die RNA während der Inkubationszeit ergeben würden. Diese Einflüsse wurden durch Versetzen der Blindproben mit derselben Menge an Methanol oder DMSO (je nach Experiment) ausgeschlossen, man stellte fest, dass ein Volumenanteil von 20% Co-Solventien keinen erkennbaren Einfluss auf die Spaltungsexperimente hatte. Der Einfachheit halber wurden deshalb die Stammlösungen und Verdünnungen der jeweiligen Substanzen in 100% Co-Solvens angesetzt, und anschließend mit Puffer, RNA usw. so versetzt, dass der Gesamtvolumenanteil an Methanol oder DMSO bei genau 20% lag. Konnte eine Stammlösung hingegen in Wasser angesetzt werden, wurde der Ansatz mit dieser Substanz dann mit 20% Co-Solvens versetzt, um in einer Experimenteserie dieselben Bedingungen zu schaffen wie jene mit den zu vergleichenden Substanzen.

Weiterhin wurde zum Ausschluss von Kontaminationseffekten häufig enantiomere RNA verwendet (s.a. Abschnitt 5.1.2 "RNA-Spaltung und ihre Messung"), also RNA, die nicht als Substrat für natürlich vorkommende RNasen geeignet ist. In einigen Fällen wurden aber auch normale RNA-Substrate verwendet, da der Untergrund mancher enantiomerer RNAs mit der Zeit so hoch wurde, dass die Auswertung der Ergebnisse dadurch erschwert wurde, und durch den Griff zu den normalen Substraten häufig ein besseres Ergebnis mit geringeren Untergründen in den Blindproben erzielt werden konnte.

Eigene Arbeiten

An manchen Stellen wechselte man das Co-Solvens aus Löslichkeitsgründen. Meist war es so, dass bei der Untersuchung höherer Konzentrationen der Substanzen die Löslichkeit in Methanol an einem bestimmten Punkt erschöpft war, während man noch einiges an Kapazität durch DMSO erschließen konnte. Dementsprechend sind die Ergebnisse streng genommen nicht miteinander vergleichbar, doch die Bedingungen innerhalb einer Experimenteserie waren bei allen Substanzen identisch und somit auch zum bedingten Vergleich geeignet.

Tab. 5: Ergebnisse der ersten Spaltungstests mit den käuflichen Sunstanzen.

Verbindung	Konzentration im Experiment [mM]	Spaltung [%] bei pH 6	Spaltung (abzüglich Untergrund) [%]
2-Aminoimidazol 65	10	7,5	6,2
	2	3,2	1,9
2-Aminobenzimidazol 66	10	4,2	2,9
	2	1,1	0
2-Aminoperimidin 67	10	n.a.	n.a.
	2	11,4	10,1
2-Aminopyrimidin 68	10	n.a.	n.a.
	2	2,7	1,4
2-Aminopyridin 69	10	2,9	1,6
	2	2,8	1,5

Substrat: RNA **17**, 150 nM. n.a.=nicht auswertbar, in diesem Fall durch Präzipitation und ein daraus resultierendes geringes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis. Untergrund: 1.3 %.

Wie man in Tabelle 5 sieht, ist die Spaltaktivität insgesamt nicht sehr hoch, wobei der Wert von 2-Aminoperimidin **67** bei 2 mM mit 10.1% doch deutlich hervor sticht. Dennoch fällt auf, dass bei höheren Konzentrationen (10 mM) für **67** und 2-Aminopyrimidin **68** keine Daten erhoben werden konnten, da durch Präzipitation zu viel der RNA ausgefällt wurde, und somit das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis für eine Auswertung zu schlecht wurde.

Zunächst wurden aus den vorliegenden Erkenntnissen heraus die Hydrochlorid-Salze von 2-Aminobenzimidazol **66** und 2-Aminopyridin **69** durch Zugabe von 6M-Salzsäure mit anschließender pH-Kontrolle hergestellt (s.a. Experimenteller Teil „pH-Kontrolle“), um die Löslichkeit der Substanzen in Wasser bzw. wässrigem Puffer weiter zu erhöhen und so die möglicherweise in der ersten Versuchsreihe dominierenden lipophilen Wechselwirkungen weiter zu verringern und eine stärkere Dominanz der polaren Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Katalysator-Molekülen und dem negativ geladenen RNA-Rückgrat zu bewirken. Diese Problematik fiel deshalb so auf, da das 2-Aminobenzimidazol viel schlechter

Eigene Arbeiten

abschnitt, als es dies in voran gegangenen Untersuchungen getan hatte. Die anderen Substanzen lagen entweder bereits als Salze vor (2-Aminoperimidin-Hydrobromid, 2-Aminoimidazol-Hemisulfat) oder waren generell unproblematisch in ihrer Löslichkeit.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der entsprechenden Experimente zusammengefasst.

Tab. 6: Spaltungsergebnisse der Experimente mit den Salzen in 20% MeOH.

Verbindung	Konzentration [mM]	Spaltung [%]
2-Aminoimidazol 65	10	1,7
(als Sulfat)	2	0,2
2-Aminobenzimidazol 66	10	2,6
(als HCl-Salz)	2	1,9
2-Aminoperimidin (*HBr) 67	10	43,9
(in MeOH 20%)	2	13,9
2-Aminopyrimidin 68	10	0,4
(in MeOH 20%)	2	n.a.
2-Aminopyridin 69	10	n.a.
(als HCl-Salz)	2	0

Sonstige Bedingungen: 150 nM Substrat (RNA **17**), Tris-HCl-Puffer pH 6.0, 20 h Inkubationszeit bei 37°C. Alle Werte nach Abzug des Untergrundes (1.6 %). n.a. = nicht auswertbar.

In grau unterlegt ist die herausragende Spaltungsaktivität von 2-Aminoperimidin **67** zu sehen. Die anderen Substanzen zeigen bei den gewählten Bedingungen keine brauchbare Aktivität, selbst 2-Aminobenzimidazol **66** scheint bei diesem pH-Wert und diesen Konzentrationen kein RNA-Spalter zu sein. Dies zeigt, dass **67** in Experimenten, in denen die Präzipitation weitestgehend unterbunden werden kann, ein potenter RNA-Spalter ist und den anderen untersuchten Substanzen um mehr als eine Zehnerpotenz überlegen ist. Leider ließen sich diese Ergebnisse eben aus Präzipitationsgründen nur schlecht reproduzieren. Eine Alternative, um zuverlässige Vergleichswerte zu erhalten, wird in einem folgenden Abschnitt Erwähnung finden.

Im folgenden wurde auf die Untersuchung von **67** wegen seiner Vorreiterrolle im Vergleich verzichtet. Um das Konzept der ΔH_f -Werte zu stützen oder zu widerlegen, sollte jedoch ein Unterschied zwischen den vorhergesagten Spaltern (z.B. 2-Aminobenzimidazol **66**) und den vorhergesagten schlechten Spaltern (z.B. 2-Aminopyrimidin **68**, 2-Aminopyridin **69**) zu erkennen bzw. nicht zu erkennen sein. Zu diesem Zweck wurde die Konzentration der Substanzen im Experiment noch einmal um Faktor fünf gesteigert, so dass ihre Konzentration im Experiment bei 50 mM lag. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls mit 20% MeOH durchgeführt.

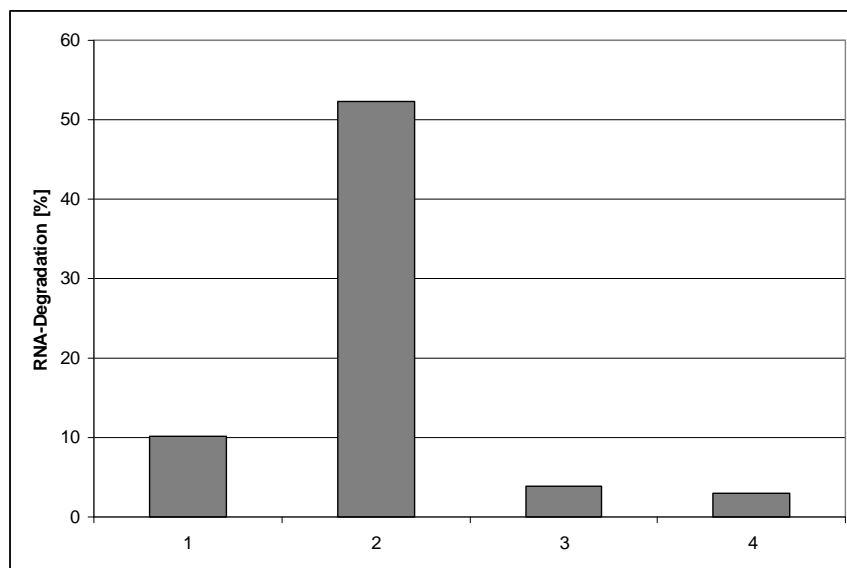


Abb. 92: RNA-Spaltungsexperimente mit 50 mM zu untersuchende Substanz im Experiment. 1: 2-Aminoimidazol **65**, 2: 2-Aminobenzimidazol **66**, 3: 2-Aminopyrimidin **68**, 4: 2-Aminopyridin **69**. Substrat: RNA **17**, 150 nM im Experiment; Tris-Puffer pH=6.0; Inkubationszeit: 20 h bei 37°C, 20% MeOH. Alle Werte korrigiert durch Abzug des Untergrundes (2.2%) vom jeweiligen Wert.

Die oben gezeigte Grafik verdeutlicht, wie stark 2-Aminobenzimidazol **66** unter diesen Bedingungen hervorsticht: mit 52% Spaltungsaktivität entspricht es genau den Vorhersagen aus den ΔH_f -Werten und steht in der Gruppe der hier untersuchten Substanzen an erster Stelle in Bezug auf die RNA-Spaltungsaktivität. 2-Aminoimidazol **65** zeigt von den „abgeschlagenen“ Substanzen noch immerhin dreimal soviel Aktivität (10% Spaltung) wie 2-Aminopyrimidin **68** und 2-Aminopyridin **69** (3.8 bzw. 3%) und ordnet sich hier ebenfalls entsprechend den Vorhersagen in die Reihe ein.

2-Aminoperimidin **67** wurde daraufhin etwas mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Es wurden Experimente mit einer Verdünnungsreihe angefertigt, um genauere Aussagen über die Abhängigkeit seiner Spaltungsfähigkeit von der Konzentration zu untersuchen. Diese Experimente wurden bei pH 8 durchgeführt, da der pK-Wert der Verbindung um 8 liegt. Außerdem kam hier auch wieder die enantiomeren RNA-Substrate **16'** und **17'** zum Einsatz, um Artefakte durch RNasen auszuschließen. Zusätzlich dazu wurde die Stammlösung zuvor ultrafiltriert, um Kontaminationen durch RNasen zu entfernen.

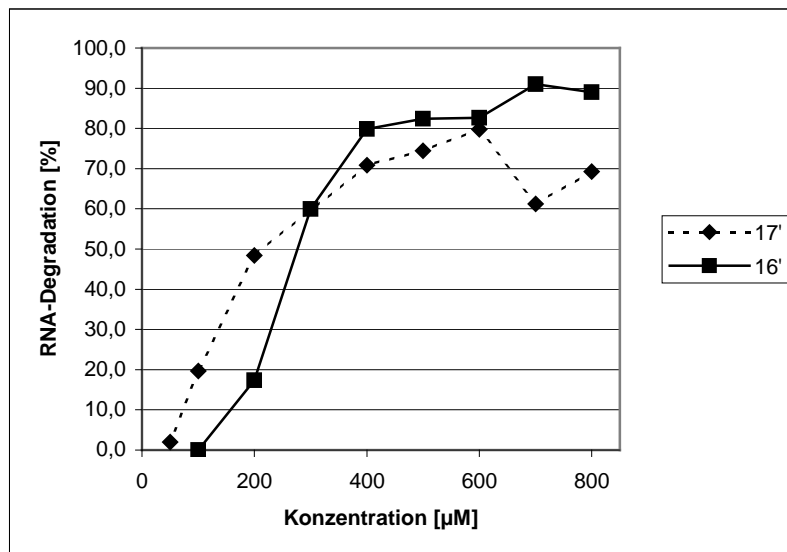


Abb. 93: RNA-Spaltung durch **67** in Abhängigkeit von der Konzentration. Bedingungen: Substrat RNA **17'**: 100 nM, Substrat enantiomere TAR-RNA **16'**: 150 nM, Tris-HCl-Puffer pH 8.0, 20h Inkubationszeit bei 37°C, 150 mM NaCl, 20% MeOH im Experiment. Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Im Verlauf der beiden Kurven erkennt man trotz leichter Abweichungen, dass Verbindung **67** auch bei niedrigeren Konzentrationen immer noch sehr gute RNA-Spaltungseigenschaften aufweist. Darüber hinaus wird bei einer niedrigeren Konzentration das Problem des Ausfällens von RNA weitestgehend vermieden.

Zum Vergleich wurde der in der Doktorarbeit von Dr. S. Peter hergestellte Spalter Trisbenzimidazol-Methylester-Hydrochlorid **15b** unter ähnlichen Bedingungen getestet. Die einzige Abweichung von den Bedingungen für das 2-Aminoperimidin ist der Anteil an MeOH: Darauf wurde bei den Experimenten mit **15b** verzichtet, da dieses eine ausreichende Löslichkeit in rein wässrigen Medien besitzt.

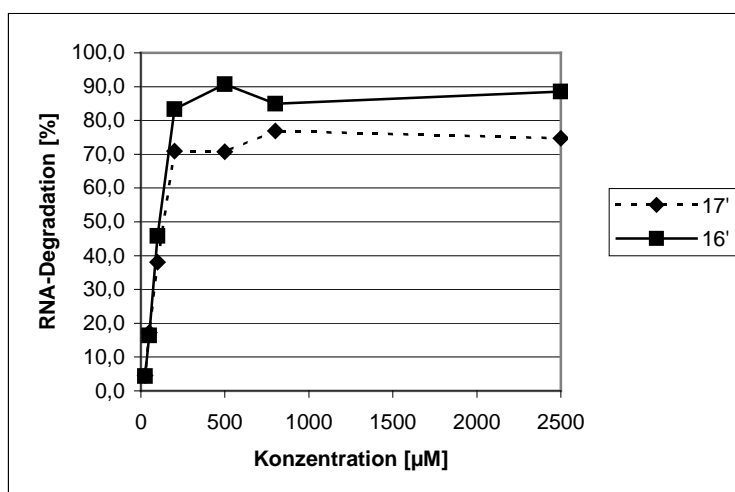


Abb. 94: RNA-Spaltung durch Trisbenzimidazol-Methylester-Hydrochlorid **15b**. Bedingungen: Substrat **17'**: 100 nM, Substrat enantiomere TAR **16'**: 150 nM, Tris-HCl-Puffer pH 8.0, 20h Inkubationszeit bei

37°C, 150 mM NaCl. Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Durch die nicht ganz identischen Versuchsbedingungen ist ein Vergleich nur bedingt zulässig. Allerdings wurde – wie desöfteren erwähnt – bisher kein Unterschied in den Experimenten mit oder ohne MeOH in der verwendeten Menge von 20% Volumenanteil beobachtet, weswegen an dieser Stelle zwar eine eigene Grafik erstellt wurde, jedoch ein paar vergleichende Bemerkungen gemacht werden sollen.

Zunächst fällt auf, dass sich Trisbenzimidazol **15b** im Verlauf viel gleichmäßiger verhält, als das bei 2-Aminoperimidin **67** der Fall ist. **15b** bewegt sich auf einer klar erkennbaren Sättigungskurve, während die Kurven zu **67** Sprünge aufweisen. Sein Verhalten nähert sich bei großen Konzentrationen auch einer Sättigungskurve an.

Herausgestellt werden sollte an dieser Stelle, dass die Skalierung der beiden Grafiken nicht identisch ist. Bei großen Konzentrationen von über 1mM werden die Daten zu **67** unauswertbar, was wieder auf Ausfällung und Aggregation der Substanz mit der RNA zurück zu führen ist. Zu erkennen ist aber auch, dass Verbindung **67** bei den gleichen Konzentrationen wie **15b** eine etwa gleich hohe Spaltungsaktivität aufweist als letzteres: Bei 800 μM spaltet Trisbenzimidazol Substrat **17'** zu 77%, Substrat TAR **16'** zu 85%. **67** spaltet bei dieser Konzentration 69 bzw. 89% des jeweiligen Substrates. Bemerkenswert ist dabei, dass 2-Aminoperimidin nur über eine funktionelle Gruppe bzw. eine Guanidiniumeinheit verfügt, während Trisbenzimidazol **15b** drei dieser Einheiten besitzt. Damit schneidet **67** im Vergleich besser ab, obwohl **15b** weniger Probleme in Bezug auf Präzipitationseffekte verursacht.

Eine andere Art von Untersuchung unternahm man mit **67** als „Co-Faktor“. Durch sein großflächiges Aromatensystem sollte es in der Lage sein, zwischen Nucleobasen zu stacken. Seine Größe und Ladung sollte aber eventuell auch die Stabilisierung eines Sekundärstrukturmotives ermöglichen, und eine künstliche Nuclease dazu befähigen, dieses Strukturmotiv leichter zu attackieren.

In einem Projekt aus der Doktorarbeit von C. Gnaccharini wurden von ihm zwei verschiedene DNA-Konjugate hergestellt, die als Gegensequenz und damit Substrat **17** haben. Diese Konjugate tragen ihre katalytische Einheit (Trisbenzimidazol **15**) nicht am 5'-Ende, sondern in in der Mitte zwischen den DNA-Abschnitten (s. Abb. 95).

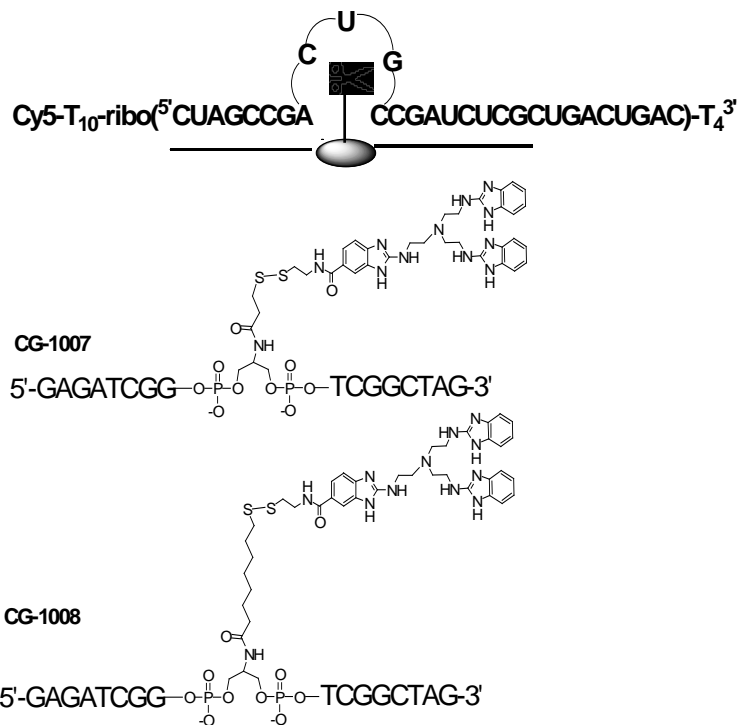


Abb. 95: Von Dr. C. Gnaccharini hergestellte Konjugate und ihre geplante Funktionsweise (oben). (Abb.: C. Gnaccharini)

Wie im oberen Bereich der Abbildung zu sehen ist, soll das Konjugat den Strang in einem drei-Nucleotide-bulge schneiden. Das geschieht auch, doch nur Konjugat **CG-1007** gab Turnover.^[19] Von einer Stabilisierung des internen bulges versprach man sich, dass es auch durch **CG-1008** zu Turnover in der Reaktion kommen könnte. Dieser Effekt sollte zum einen auf der Stabilisierung des bulges beruhen, zum

anderen sollte 2-Aminoperimidin zusätzlich Spaltungsaktivität an Substrat **17** zeigen und so die Gesamtsplatausbeute erhöhen.

Zu diesem Zweck wurde **67** in drei verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Experimente wurden alle mit 20-Vol.% MeOH durchgeführt.

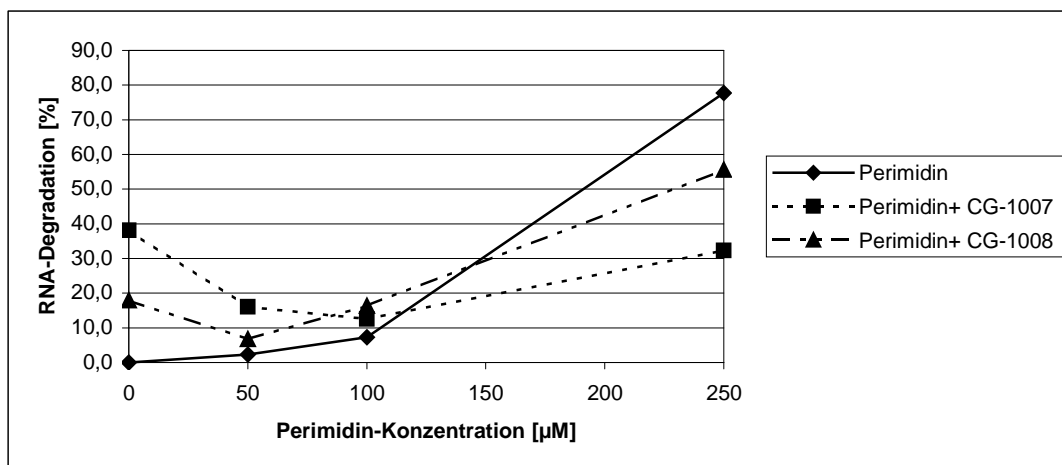


Abb. 96: Grafische Darstellung der Versuche zu **67** als bulge-Stabilisator. Bedingungen: 150 nM Substrat **17**, Konjugate: 1.5 µM, 150 mM NaCl, Tris-HCl-Puffer pH 8.0, 20 h bei 37°C inkubiert, 20% MeOH im Experiment. Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Der Einsatz von **67** zeigt bei den beiden Konjugaten etwas unterschiedliche Ergebnisse: Während bei **CG-1008** die Spaltungsausbeute durch 250 µM **67** deutlich

verstärkt wird (von 18% ohne Zusatz auf etwa 55%), verschlechtert sich die Ausbeute bei den Versuchen mit **CG-1007** unter niedrigen Konzentrationen von **67** (<38%) und hält sich in etwa die Waage mit dem ursprünglichen Wert bei 250 μM **67**. Die Spaltungsausbeute ist bei der hohen Konzentration an Perimidin **67** außerdem niedriger als Ausgangsspaltung von **CG-1007** allein. Insgesamt sinkt die Spaltungaktivität von 2-Aminoperimidin unter zusätzlicher Verwendung von Konjugaten, sofern man **67** als Haupt-Spalter in diesem System betrachtet.

Ganz offensichtlich behindern sich die beiden Spalter (Konjugate und Perimidin) gegenseitig in ihrer Arbeit. Sowohl Perimidin **67** als auch beide Konjugate spalten effektiver, wenn sie getrennt von einander eingesetzt werden. Grund dafür ist höchstwahrscheinlich eine Denaturierung der RNA bzw. des RNA-Konjugat-Komplexes durch **67**. In den verwendeten hohen Konzentrationen konnte in anderen Experimenten gezeigt werden (vgl. u.a. 5.2.6 "Studien zum Aggregationsverhalten verschiedener kleiner Moleküle") dass **67** die Sekundärstruktur von TAR-RNA **16** zu stören vermag und es zu fraying oder anteiliger Denaturierung kommt. Ebenso wird es ein Hybrid von Konjugat **CG-1007** bzw. **CG-1008** mit Substrat **17** auflösen, so dass die Konjugate dieses nicht mehr spalten können. Darüber hinaus bildet **67** wahrscheinlich Aggregate mit der Substrat-RNA, die wiederum zum Ausfällen derselben aus der Lösung führen und sie so auch nicht mehr zur Spaltung zur Verfügung steht. Dies geschieht wohl besonders in Anwesenheit eines Konjugates bzw. einer weiteren Nucleinsäurespezies, was erklärt, warum auch bei der höchsten Konzentration an **67** mit Konjugaten nicht das Maximum seiner möglichen Spaltungsausbeute erreicht wird.

Der Zusatz von **67** zu den Experimenten mit Konjugaten **CG-1007** und **CG-1008** führte also nicht zu gewünschtem Turnover.

Da 2-Aminoperimidin **67** in voran gegangenen Experimenten gute Spalteigenschaften zeigte, wurden auch Derivate der Verbindung hergestellt und untersucht. Dies geschah unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten: Einerseits wollte man Moleküle generieren, die über mehr als eine katalytische Funktion verfügten und versprach sich davon, die Spaltaktivität in Bezug auf **67** noch zu potenzieren bzw. die Wechselwirkung mit der RNA zu verbessern. Andererseits wollte man untersuchen, inwiefern sich die Spaltaktivität veränderte, wenn man die exozyklische Aminofunktion weiter substituierte. Von letzterem erhoffte man sich vor allem, auf einfache Art und Weise DNA-Konjugate von 2-Aminoperimidin über

Eigene Arbeiten

Anhängen an das primäre Amin herzustellen, ohne Verluste in der Reaktivität zu verzeichnen.

Die Derivate wurden alle von Herrn M. Zeiger im Rahmen seiner Diplomarbeit hergestellt. Charakterisiert wurden die Verbindungen alle per NMR, Elementaranalyse und IR, sie entsprachen alle den geforderten Ansprüchen an Reinheit und konnten deshalb ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden.

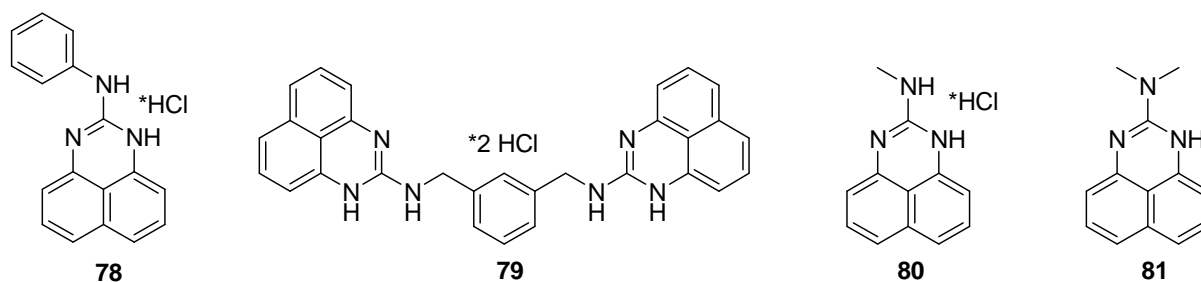


Abb. 97: Auf RNA-Spaltung untersuchte Derivate von 2-Aminoperimidin **67** (M. Zeiger).

Verbindung **80** (Monomethylperimidin) wurde an zwei verschiedenen Substraten mit enantiomeren RNA-Bausteinen getestet, und zwar an einem ohne Sekundärstruktur (**17'**) und einem mit Sekundärstruktur (enantiomere TAR **16'**), um mögliche Denaturierung durch **80** untersuchen zu können. Man wählte die enantiomere RNA, um Artefakte durch RNase Kontamination zu unterbinden. Die in Abb. 98 gezeigten Ergebnisse wurden in drei Experimentierreihen gewonnen, denen folgende Bedingungen zugrunde lagen: Tris- HCl-Puffer pH 8.0, 150 mM NaCl, 100-150 nM Substrat, 20% MeOH, 20 h Inkubationszeit, 37°C. Alle Werte wurden nach Möglichkeit gemittelt, bei offensichtlichen Ausreißern wurde der Wert ausgelassen.

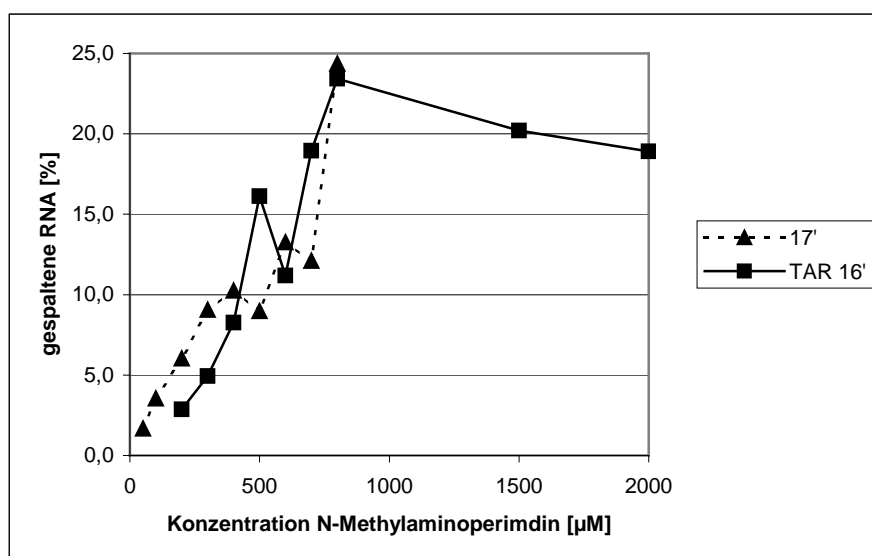


Abb. 98: Grafische Darstellung der experimentellen Ergebnisse mit Verbindung **80**. Bedingungen siehe Text. Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Wie man sieht, ergeben sich ähnliche Ergebnisse für beide Substrate. Das Spaltmuster deutete daraufhin, dass Verbindung **80** auf die enantiomere TAR denaturierend wirkte. Ein anderer Befund, der aus Abb. 98 hervorgeht, ist das Fehlen einiger Messpunkte im höheren Konzentrationsbereich (800-2000 μM) an linearer RNA **17'**. Auch hier wurde die RNA durch die Substanz vor oder während der Reaktion so stark ausgefällt, dass keine auswertbaren Daten gewonnen werden konnten.

Im Vergleich zu N-Methylaminoperimidin **80** hatte N,N-Dimethylaminoperimidin **81** praktisch keine RNA-Spaltaktivität mehr (ohne Abbildung). Bei einer Konzentration von 1 mM spaltete **81** nur 2.3% von Substrat **17'** im Gegensatz zu Verbindung **80**, die bei 800 μM noch um die 25% spaltete. Dieser Wert bezieht sich auf ein Experiment, in dem man statt MeOH wegen der besseren Löslichkeit DMSO als Co-Solvens einsetzte (ebenfalls in 20% Volumenanteil), ansonsten waren die Bedingungen identisch mit denen für Verbindung **80**. Allerdings musste man sich auch hier mit Präzipitationseffekten auseinandersetzen, weshalb auch nur der Wert für 1 mM ermittelt werden konnte.

Die Erkenntnisse lassen vermuten, dass Konjugate von 2-Aminoperimidin, die über die exozyklische Aminogruppe gebunden wären, auch weiterhin aktiv sein würden.

Nun wenden wir uns den Experimenten an den Derivaten zu, die zur Verbesserung der RNA-Spaltaktivität beitragen sollten.

In Abb. 99 ist die Auswertung der Daten mit N-Phenylaminoperimidin **78**.

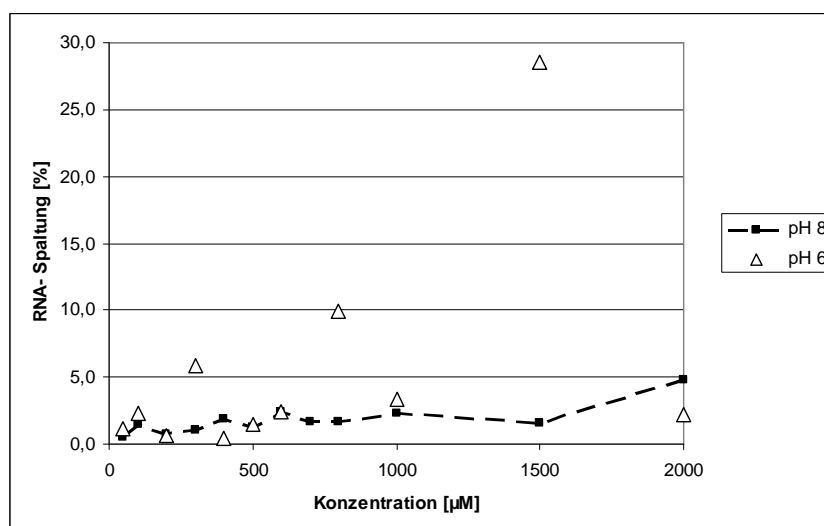


Abb. 99: Grafische Darstellung der erhaltenen Daten von Verbindung **78**. Auf das Verbinden der Datenpunkte für die Werte bei pH 6 wurde wegen der großen Streuung der Werte verzichtet.

Diesmal wurde nur **17'** als Substrat verwendet, dafür wurden zwei unterschiedliche Puffer-pH-Werte untersucht. Die weiteren Bedingungen: 100 nM Substrat, 20 h

Eigene Arbeiten

Inkubationszeit bei 37°C, Tris- HCl- Puffer pH 6.0 bzw. 8.0, 150 mM NaCl., 20% MeOH. Es sind deutliche Unterschiede in den beiden Auftragungen sichtbar. Da der Effekt pH-abhängig ist, liegt der Schluss nahe, dass es sich wieder um ein Präzipitations- bzw. Aggregationsphänomen handelt. Bei pH 8 ist die Spaltaktivität von **78** nahe null und sehr gleichmäßig, während bei pH 6 Sprünge in der Kurve zu beobachten sind, die Spaltungsraten gehen bis auf 28 % (bei 1500 μM) hinauf. Es wird vermutet, dass sich bei pH 6 größere Aggregate bilden, die bei einigen Konzentrationen eine deutlich verstärkte Spaltaktivität hervorrufen können, allerdings sind diese Einflüsse unberechenbar und alles andere als linear abhängig von der Konzentration des verwendeten Spalters. Bei pH 8 liegt keine nennenswerte Spaltungsaktivität dieses Moleküls vor. Dies ist möglicherweise auf den sperrigen Phenylrest an der exocyclischen Aminogruppe zurückzuführen, der wohl die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen negativ geladenem RNA-Rückgrat und positiver Guanidiniumeinheit zu stören scheint. Ein positiver Effekt durch die zusätzliche pi-stacking-fähige Fläche scheint hier nur untergeordnet zu sein.

Zuletzt sollen die Ergebnisse für das sogenannte „Bis-Perimidin“ **79** diskutiert werden. Hier kam ebenfalls DMSO als Co-Solvens in 20-Volumen-% zum Einsatz, die weiteren experimentellen Bedingungen waren mit den bereits beschriebenen identisch, werden aber der Vollständigkeit halber noch mal erwähnt: 150 mM NaCl, Tris- HCl- Puffer pH 8.0, 100 nM **17'** (Substrat), 20 h Inkubationszeit bei 37°C.

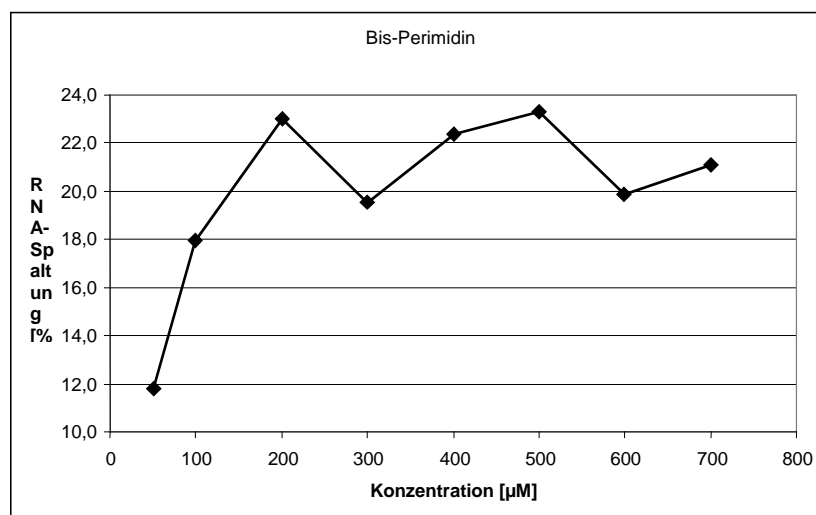


Abb. 100: Grafische Darstellung der Daten zu Verbindung **79** (Bis-Perimidin). Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Auffällig ist die Form der Kurve, die in etwa der einer Sättigungskurve entspricht. Der nicht-lineare Verlauf ist ein deutlicher Hinweis auf Präzipitationseffekte. Die Spaltaktivität pendelt sich bei einem bestimmten Wert ein (ca. 22%), da bei einer

weiteren Steigerung der Konzentration die Ausfällung der RNA und ihre Spaltung sich die Waage halten. Ein weiteres starkes Argument für diese These ist die Tatsache, dass bei höheren Konzentrationen aufgrund starker Präzipitation keine Werte für die Spaltungsaktivität mehr erhalten werden konnten, denn es wurden neben den oben angegebenen Konzentrationen auch welche über 800 μM getestet (bis 2 mM). In diesen Fällen ist das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis so schlecht, dass kein brauchbarer Wert mehr bestimmt werden kann.

Trotzdem kann man jedoch von einer akzeptablen RNA-Spaltungsaktivität sprechen, auch wenn sie sich nicht wie erhofft mit der des reinen 2-Aminoperimidins **67** messen kann. Eine Untersuchung dieser Verbindung als Teil eines DNA-Konjugates ist deshalb interessant und sollte in der Zukunft durchaus in Betracht gezogen werden.

In einer weiteren Serie von Experimenten wurden 2-Aminoperimidin **67**, Bisperimidin **79**, Monomethylaminoperimidin **80** und Dimethylaminoperimidin **81** noch einmal unter Verwendung eines neuen Harnstoffladepuffers von Frau E-Kalden vermessen. Dieser Ladepuffer sollte Präzipitation unterbinden, die durch das Auftragen auf das Elektrophoresegel auftreten. Er enthielt hohe Konzentrationen an Harnstoff (vgl. auch Anhang "Puffer und Lösungen") wodurch sich die Löslichkeit anderer Substanzen bei Experimenten von Frau Dr. U. Scheffer verbesserte, ein Effekt, den man sich hier auch zu nutze machen wollte.

Man versprach sich hiervon, dass man die Spaltungsfähigkeit dieser Verbindungen durch weitestgehendes Unterdrücken der Präzipitation besser beuteilen könnte. Dabei wurde auch in einem niedrigeren Konzentrationsbereich (bis maximal 500 μM) wie zuvor gearbeitet, um Präzipitationen zu vermeiden, die tatsächlich im Experiment auftraten und nicht erst beim Auftragen in der Geltasche.

In der folgenden Abbildung wurden N-Methylperimidin **80** und Bisperimidin **79** miteinander verglichen. Als Substrat wurde die lineare RNA **17** verwendet.

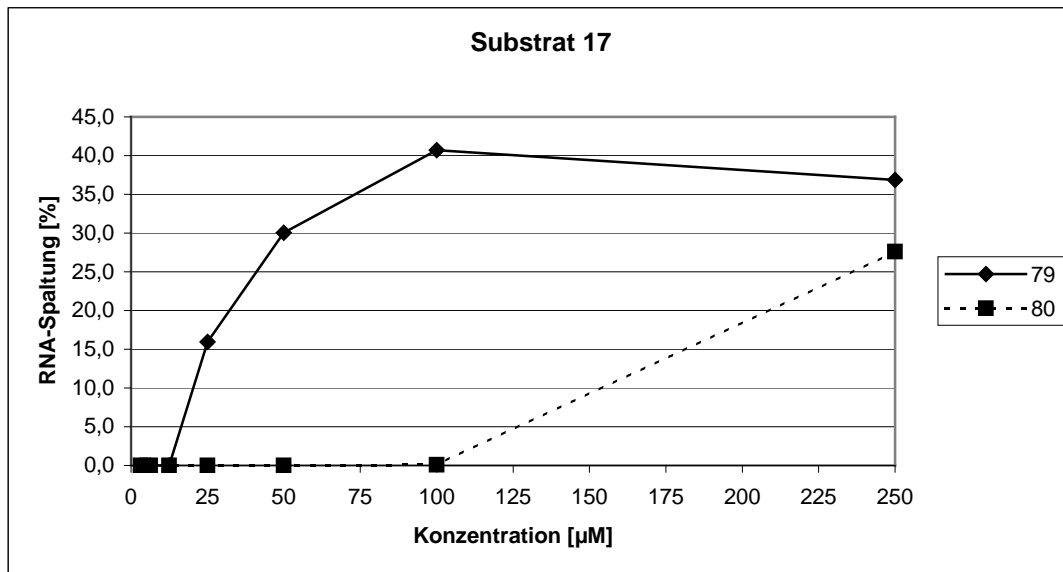


Abb. 101: Spaltungstests von Verbindungen **79** (Bisperimidin) und **80** (N-Monomethylperimidin) auf lineares Substrat **17**. Experimentelle Bedingungen: Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 37°C, 20h Inkubationszeit. Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Aus den Kurven in Abb. 101 ist ersichtlich, dass beide Substanzen im niedrigen μM -Bereich inaktiv sind. Bisperimidin **79** ist mit seinen beiden Guanidiniumeinheiten dabei deutlich aktiver als das monomethylierte Perimidin **80**, wobei letztes bei einer Konzentration von 100 μM noch keine RNA-Spaltung verursacht. Bei 250 μM ist plötzlich ein sprunghafter Anstieg von über 25% RNA-Spaltung durch **80** zu verzeichnen. Bei dieser höchsten gemessenen Konzentration ist bei Bisperimidin **79** allerdings schon ein leichter Abfall der Aktivität zu verzeichnen, was auf beginnende Präzipitation hinweist. Insgesamt verursachen beide Verbindungen RNA-Spaltung in beachtlichem Maße.

Weiterhin wurde die Denaturierung einer Sekundärstrukturhaltigen RNA (hier: TAR-RNA **16**) durch Bisperimidin **79** untersucht. Wie bereits oben erwähnt, sind Präzipitationseffekte durch **79** bei 250 μM zu beobachten, was wohlmöglich mit einer Denaturierung einhergehen könnte. In der folgenden Abbildung sind die Spaltungsergebnisse von **79** bezüglich RNA **16** zusammengetragen.

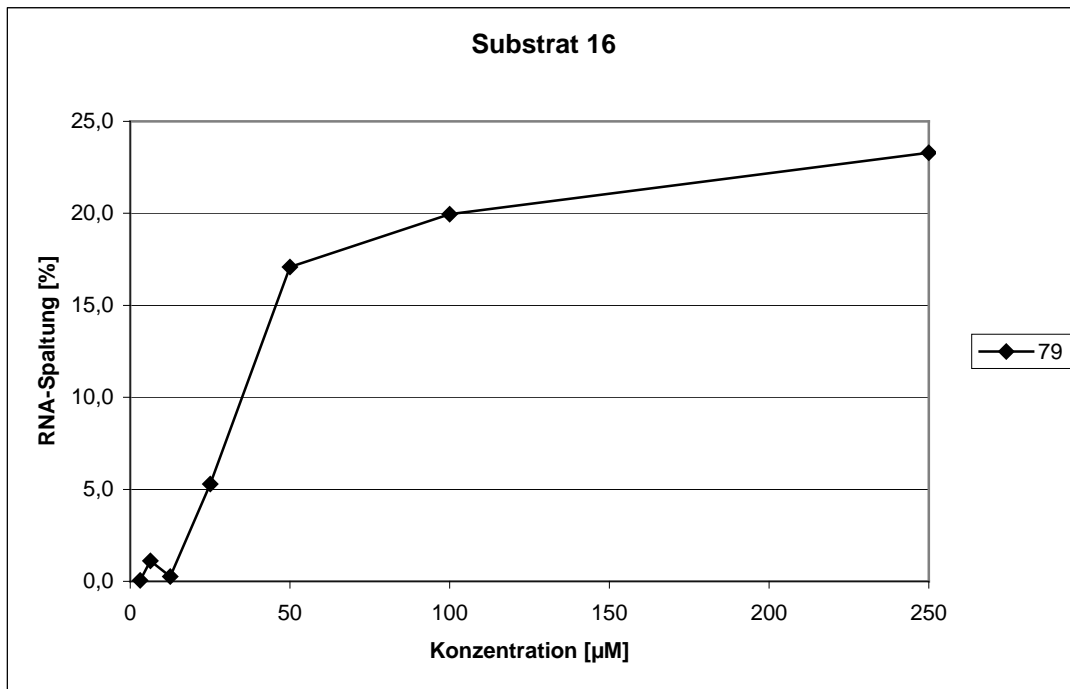


Abb.102: Spaltungstests von Verbindungen **79** (Bisperimidin) TAR-RNA **16**. Experimentelle Bedingungen: Tris-HCl-Puffer pH 8.0, 37°C, 20h Inkubationszeit. Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Die Spaltungsausbeute ist hier insgesamt niedriger (max. 23% gegenüber 41% bei Substrat **17**), da ja auch die möglichen Spaltstellen durch die Sekundärstruktur begrenzt sind. Denaturierung der Sekundärstruktur (nur teilweise, ein kompletter Verlust der Sekundärstruktur wurde in keinem dieser Experimente beobachtet) konnte bis hinab auf 50 µM **79** beobachtet werden (aus der Abb. nicht ersichtlich). Das ist ein Konzentrationsbereich, in dem noch keine Präzipitation im Experiment zuvor erkennbar war und der Sättigungsbereich der Kurve in Abb. 102 noch nicht erreicht ist. Zur Denaturierung von **16** durch Monomethylperimidin **80** kommen wir zu einem späterem Zeitpunkt.

Zunächst wurden Stammverbindung 2-Aminoperimidin **67** mit seinen monomethylierten und dimethylierten Derivaten **80** bzw. **81** verglichen. Man verwendete hier wieder den Harnstoffladedepuffer, um Präzipitation in der Geltasche einzudämmen. In der ersten Serie wurde wieder das lineare Substrat **17** verwendet (folgende Abb.).

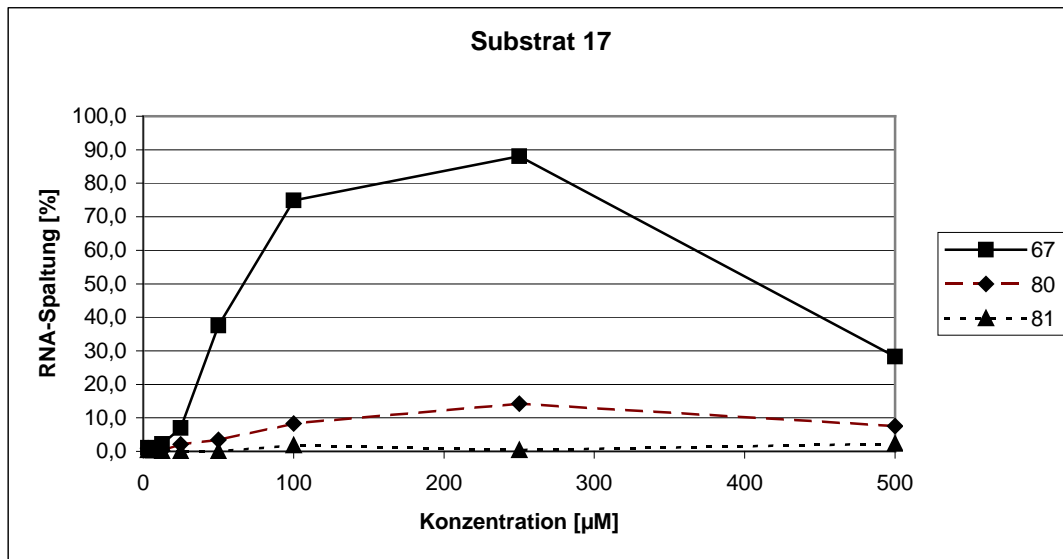


Abb.103: Spaltungstests von Verbindungen **67** (2-Aminoperimidin) und **80** (N-Monomethylperimidin) und **81** (N,N-Dimethylperimidin) auf lineares Substrat **17**. Experimentelle Bedingungen: Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 37°C, 20h Inkubationszeit. Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Während man bei 2-Aminoperimidin **67** maximale Spaltungsausbeute von knapp unter 90% bei einer Konzentration von 250 μM verzeichnet, sind die beiden methylierten Derivate deutlich abgeschlagen. Das N,N-Dimethylperimidin **81** verursacht praktisch keine Spaltung (geringfügige Spaltung kann durchaus durch eingeschleppte Kontamination hervorgerufen sein), was nicht wundert, da es durch seine doppelt methylierte exozyklische Aminogruppe nicht als Phosphatbinder geeignet ist. Monomethylperimidin **80** verursacht hingegen eine geringe Spaltung, da es immerhin noch ein exozyklisches Amino-Proton hat und damit zumindest in einer Orientierung an das Phosphatrückgrat der RNA binden kann. Interessant ist der deutliche Aktivitätsverlust von 2-Aminoperimidin **67** bei 500 μM : Hier kommt wieder zur Ausfällung von RNA durch Aggregation, wodurch diese nicht mehr in großen Mengen zur Spaltung zur Verfügung steht. Dieser Effekt ist tatsächlich auf eine Ausfällung während des Experimentes zurück zu führen, welcher nicht erst in der Geltasche beim Auftragen der Probe auftrat, da man Harnstoffladedepuffer verwendete.

Im Folgenden wurden **67**, **80** und **81** gegen TAR-RNA **16** getestet, insbesondere um Denaturierung zu untersuchen.

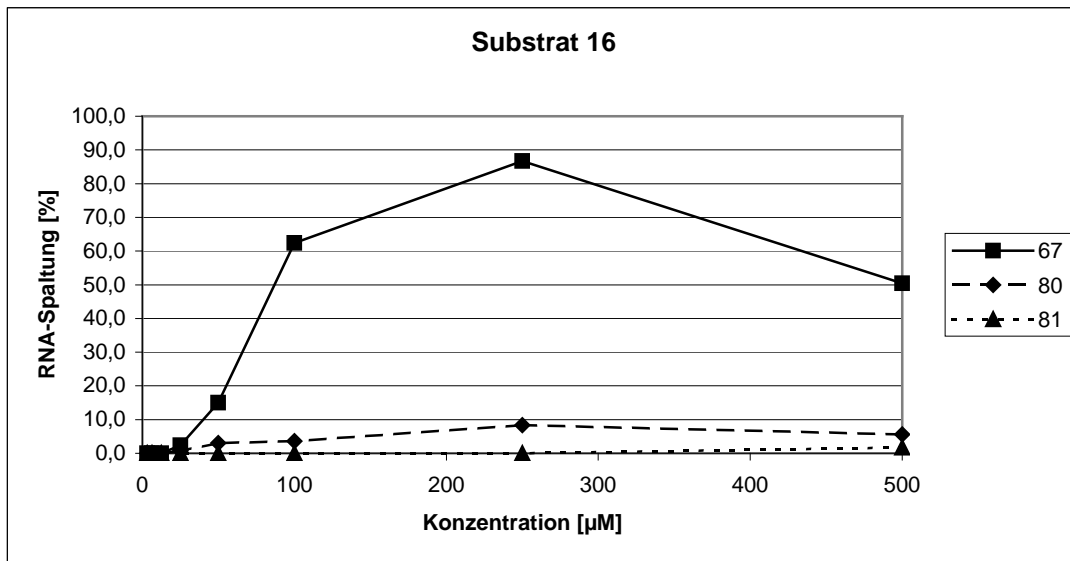


Abb. 104: Spaltungstests von Verbindungen **67** (2-Aminoperimidin) und **80** (N-Monomethylperimidin) und **81** (N,N-Dimethylperimidin) auf TAR-RNA **16**. Experimentelle Bedingungen: Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 37°C, 20h Inkubationszeit. Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Was hier zunächst ins Auge fällt, ist die verblüffende Ähnlichkeit der Kurvenverläufe in Abb. 103 (vorherige Seite) und Abb. 104. Die Maximalspaltung durch **67** liegt wieder bei etwas unter 90% und 250 µM Konzentration, geht allerdings nur bis ca. 50% zurück (auf RNA **17** bis runter auf 30%). Die methylierten Verbindungen **80** und **81** verhalten sich ebenfalls ganz ähnlich wie bei der Spaltung der linearen RNA **17** (knapp 9% bzw. keine zu berücksichtigende Spaltung). Betrachtet man die Spaltungsmuster (nicht gezeigt), ist deutliches fraying bzw. anteilige Denaturierung von RNA **16** durch Aminoperimidin **67** bis hinab auf 25 µM Konzentration zu sehen. Es kommt also hier über einen weiten Konzentrationsbereich (25-500 µM) zu Aggregation von RNA und Spalter **67**, wodurch nicht von einem Einzelmolekülspalter die Rede sein kann. Die methylierten Verbindungen **80** und **81** verursachen hingegen über den gesamten Konzentrationsbereich keinerlei Denaturierung der Sekundärstruktur. Beim dimethylierten Perimidin **81** ist das auch nicht weiter bemerkenswert, da es nicht als Phosphatbinder geeignet ist und damit auch nicht an RNA binden und mit dieser in der zur Denaturierung benötigten Weise wechselwirken kann. Verbindung **80** hingegen spaltet RNA, und das wohl als Einzelmolekül, da weder Präzipitation noch Denaturierung in den Experimenten auftraten. Als Fazit dieser Experimenteserie lässt sich noch anmerken, dass die Verwendung von Harnstoffladedepuffer beim Auftragen der Proben in die Geltaschen sowie der niedrigere Konzentrationsbereich (sub-mM) sich als besonders geeignet

für die Untersuchung dieser Verbindungen herausgestellt haben. Diese Bedingungen sollten auch in Zukunft und bei der Untersuchung anderer unspezifischer RNA-Spalter gewählt werden.

Weitere in dieser Arbeit untersuchte Derivate von bereits besprochenen Verbindungen sind **70** und **72**. N-Phenyl-2-aminobenzimidazol **70** leitet sich strukturell von 2-Aminobenzimidazol **66** ab und wurde käuflich erworben. Das zweite Molekül, das an dieser Stelle diskutiert wird, ist 2-Acetamidoimidazol **72**. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert (s. Abschnitt 5.2.4). Wie alle anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanzen wurde die Identität und Reinheit der Verbindungen mittels NMR, Elementaranalyse und anderen Methoden bestätigt, bevor sie zum Einsatz kamen.

Die ΔH_f - und pK_a -Werte von Verbindung **70** wurden bereits in den entsprechenden Kapiteln (5.2.2 und 5.2.3) besprochen und wiesen das Molekül als möglichen RNA-Spalter aus (ΔH_f ca. 0 kcal/mol und $pK_a=6.1$). Getestet wurde das Molekül an Substrat **17**, und zwar bei pH 6, was in etwa seinem pK_a -Wert entspricht, und pH 7 (nicht abgebildet). Darüber hinaus testete man die Substanz unter Verwendung zweier Co-Solventien: Einmal mit MeOH (20% (v/v)) und einmal DMSO (20% (v/v)). Die Ergebnisse sind in den folgenden Grafiken dargestellt.

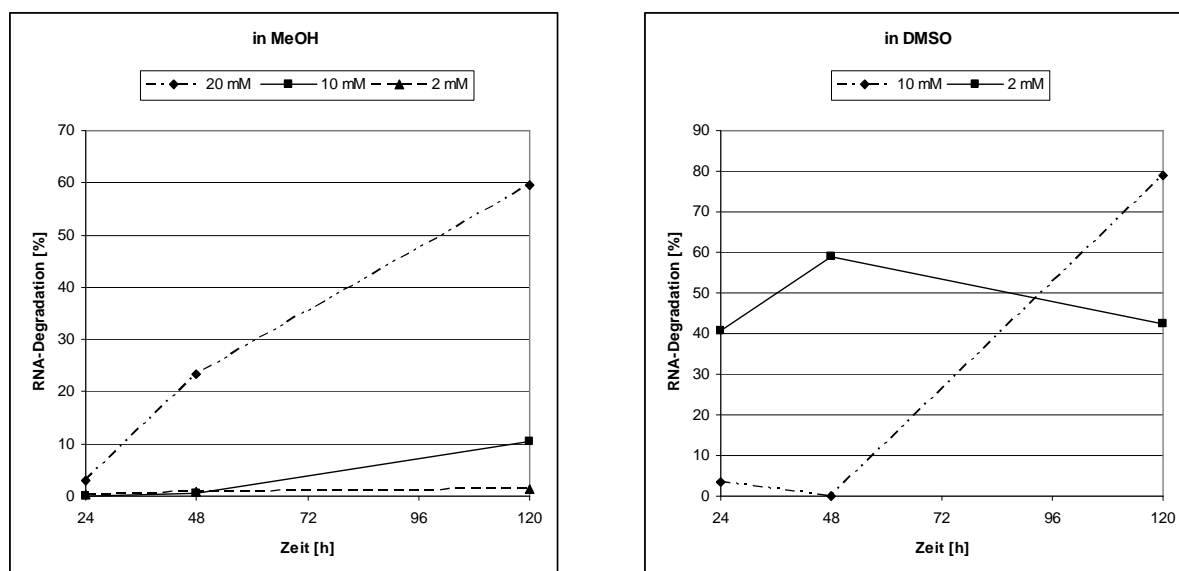


Abb. 105: Grafische Darstellung der Spaltungsexperimente von Verbindung **70** an Substrat **17**. Bedingungen: 20% MeOH bzw. DMSO, 150 nM, Substrat, Tris-HCl-Puffer pH 6.0, 37°C, Zeit und Konzentration von **70** wie angegeben. Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Bereits beim Pipettieren fiel die Substanz in noch höheren Konzentrationen (50 mM in MeOH, 50 und 20 mM in DMSO) aus der Reaktionslösung aus, was sich durch

einen weißen Niederschlag bemerkbar machte. Dieser war deshalb so gut erkennbar, da man bei diesen Experimenten ein größeres Startvolumen einsetzte, um mehrere Proben im zeitlichen Verlauf entnehmen zu können. Die Proben mit Präzipitat wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen, sie sind aber dennoch ein Hinweis dafür, dass auch bei geringeren Konzentrationen Präzipitationseffekte auftreten können, die dann nicht mit dem Auge sichtbar waren.

Besonders bei Verwendung von DMSO als Co-Solvens machen sich diese Effekte deutlich in der Auswertung bemerkbar. Mit verstreichender Zeit sollte die Spaltungsrate entweder gleich bleiben oder steigen, in der Grafik rechts sieht man jedoch bei beiden auswertbaren Konzentrationsbereichen ein Absinken im Verlauf der Zeit. Dieses Verhalten kann mit ziemlicher Sicherheit Präzipitationseffekten zugeschrieben werden. Die einzelnen entnommenen Proben waren wohl zusätzlich zur voran gegangenen Ausfällung beim Auftragen auf das Elektrophoresegel ausgefallen oder gar im Laufe der Zeit im Stammansatz ausgefallen, was den unsteten Verlauf der Kurve erklärt. Die Werte für die Experimente mit MeOH entsprechen eher dem Verhalten, welches man für einen RNA-Spalter mit untergeordneten Präzipitationseffekten erwartet. Bei 20 mM und 120 Stunden geht die Spaltungsrate von **70** bis auf ca. 60% hinauf. In Zukunft sollte also diese Verbindung eher mit MeOH als Co-Solvens untersucht werden. Dennoch scheint das Molekül ein relativ starkes Aggregationsverhalten aufzuweisen, was auf den zusätzlichen Aromaten an der Aminofunktion zurück zu führen ist und deshalb in Zukunft vielleicht noch näher untersucht werden sollte.

2-Acetamidoimidazol **72** wurde durch Acetylierung der Aminogruppe aus 2-Aminoimidazol **65** hergestellt. Hierzu verwendete man Essigsäureanhydrid und TEA und erhielt das Produkt nach Umkristallisation als hellbraunen Feststoff in einer Ausbeute von 27%. Trotz seines guten Abschneidens bei der ΔH_f -Wert-Bestimmung (s. Abschnitt 5.2.3) und seiner strukturellen Ähnlichkeit zu einem Literaturbekannten RNA-Spalter ^[76] kamen Zweifel an seiner Fähigkeit auf, RNA zu spalten. Sein pKa-Wert lag mit 4.9 nicht gerade im physiologischen Bereich, was an der elektronenziehenden Acetylgruppe liegen mag. Trotzdem wurde das Molekül untersucht, und zwar bei pH-Werten von 5 bis 7.

72 zeigte im Gegensatz zu **70** keinerlei Anzeichen von Präzipitation, weder beim Pipettieren der Proben noch nach dem Auftragen auf das Gel, was man in den Auswertungen erkennen konnte. Die gemachten Versuche fanden mit DMSO als Co-

Eigene Arbeiten

Solvens statt, mit dem man Konzentrationen von **72** im Experiment von 50 bzw. 10 mM untersuchen konnte. Leider wurden die Befürchtungen bestätigt, **72** zeigte keine nennenswerte Spaltaktivität an Substrat **17'**. Die Erfahrungen mit dieser Substanz zeigen allerdings auch, wie wichtig der pKa-Wert für die Aktivität als RNA-Spalter ist. Der ΔH_f -Wert allein ist nicht ausreichendes Kriterium zur Vorhersage der Güte eines RNA-Spalters.

Kommen wir nun zu den Spaltungsexperimenten mit Imidazoimidazol **71**. **71b** (TFA-Salz) wurde für die Spaltungstests eingesetzt, seine Identität und Reinheit wurden mit ESI-Massenspektrometrie und NMR bzw. per HPLC nachgewiesen.

Die ersten Versuche mit **71** als RNA-Spalter wurden bei pH 8 und 20% DMSO durchgeführt.

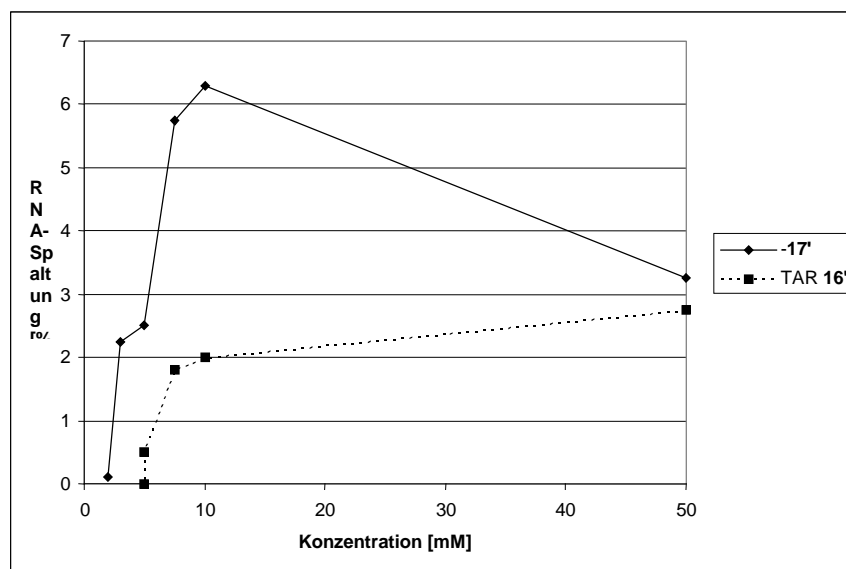


Abb. 106: Grafische Darstellung der RNA-Spaltungsexperimente mit Imidazoimidazol **71**. Bedingungen: Tris-HCl-Puffer 8.0, 20h bei 37°C, 20% DMSO, Substrate: **17'**: 100 nM, entantiomere-TAR (**16'**): 100 nM. Datenpunkte einer Reihe wurden der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

Auch bei dieser Substanz kam es zu starker Präzipitation in der Reaktion oder in der Geltasche, was sich in einer deutlichen Signal-Abschwächung in den Plots der Elektrophoreseläufe bemerkbar machte. Denaturierung von TAR **16'** konnte nicht beobachtet werden, abgesehen von einem leichten fraying der Enden blieb die Struktur auch bei hohen Konzentrationen an **71** erhalten. Ganz eindeutig ist jedoch die vergleichsweise schwache Spaltungsaktivität von **71**. mit maximal 6.3% bei 10 mM war sie eher gering und konnte – auf dem ersten Blick - die hohen Erwartungen nicht erfüllen, zumal der pKa-Wert der Verbindung mit 7.4 ideal im physiologischen Bereich liegt. Das Absinken der Spaltung bei 50 mM ist auch auf Ausfällen der RNA

zurück zu führen, was eine Verschlechterung des Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses bewirkt. Zum Vergleich: **13** (Spalter mit einer Benzimidazoleinheit) spaltete bei pH 7 und ansonsten gleichen Bedingungen die enantiomeren RNAs **17'** und TAR **16'** zu 15% bzw. 13%.^[8] Letzteres spaltet jedoch in aggregierter Form, während **71** auch bis in hohe Konzentrationsbereiche als Einzelmolekül RNA spaltet. Aus diesem Grund ist **71** mechanistisch als RNA-Spalter auch deutlich positiver einzuschätzen, als es die zunächst niedrig erscheinende Spaltungsausbeute rechtfertigen würde.

Eine andere Erklärung für die schlechten Signalstärken ist eine mögliche Reaktion der Verbindung **71** mit den Nucleobasen der RNA, wobei sich beide Komponenten miteinander verbinden. Hinweise hierauf gaben HPLC-Untersuchungen, die mit einem großen Überschuss an Guanosin (als RNA-Ersatz) und der Verbindung gemacht wurden. Nach Stunden bildete sich ein neuer Peak, der allerdings nur in Spuren auftauchte und deshalb nicht isoliert werden konnte. In Zukunft sollte man dieses Experiment noch einmal mit einer großen Menge Imidazoimidazol – die zum Zeitpunkt des Experimentes nicht vorlag und in der Kürze der Zeit nicht herstellbar war – wiederholt werden, damit die Identität des Peaks aufgeklärt werden kann und Aufschluss darüber gewonnen wird, ob es sich tatsächlich um das Produkt aus der Reaktion von Guanosin und Imidazoimidazol **71** handelt, ob sich eine der beiden Substanzen einfach zersetzt oder ob es sich um ein Artefakt aus der Messung handelt.

Um genauere Vergleichsdaten zu verschiedenen RNA-Spaltern zu erhalten, wurden diese von Frau E. Kalden noch einmal gemeinsam unter denselben Bedingungen untersucht und unter Verwendung von Harnstoffladedepuffer vermessen (vgl. S. 129). Im Vorfeld waren auch Experimente gemacht worden, bei denen die Versuchsansätze vor dem Versetzen mit Formamid-Ladedepuffer und dem Laden auf das Gel noch einmal verdünnt wurden. Die Daten waren dennoch teilweise nicht auswertbar, weswegen man auf den anderen Ladedepuffer auswich.

Getestet wurden 2-Aminoimidazol **65**, 2-Aminobenzimidazol **66**, 2-Aminoperimidin **67** und Imidazoimidazol **71** bei pH 6 und 20% MeOH als Co-Solvens, die genauen experimentellen Bedingungen sind in der Bildunterschrift zu entnehmen.

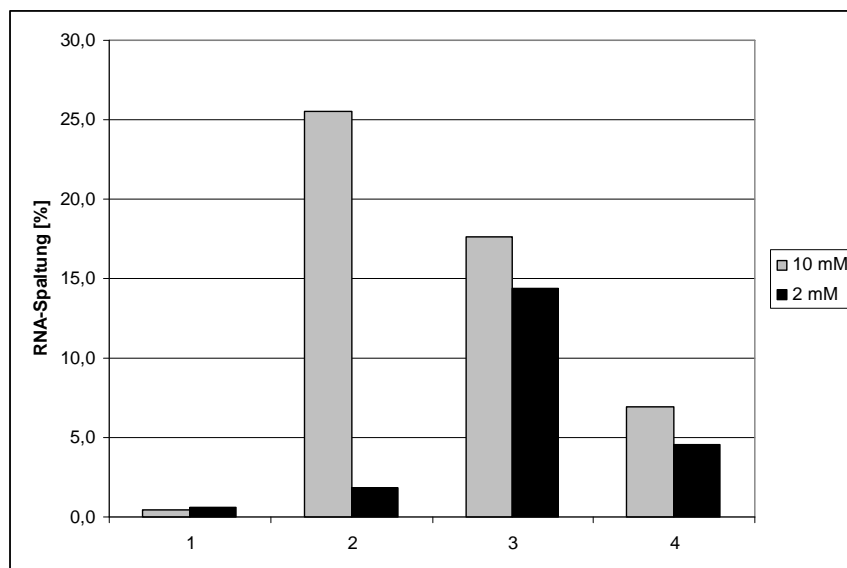


Abb. 107: Grafische Darstellung der vergleichenden Experimente mit Verbindungen: 1) 2-Aminoimidazol **65**, 2) 2-Aminobenzimidazol **66**, 3) 2-Aminoperimidin **67** und 4) Imidazoimidazol **71**. Bedingungen: Tris-HCl-Puffer 6.0, 20h Inkubationszeit, 150 nM Substrat **17**, 20 % MeOH.

2- Aminoimidazol **65** (1 in Abb. 107) lag dabei in Bezug auf die Spaltungsrate weit zurück, seine Werte bewegten sich im niedrigen, einstelligen Prozentbereich. Die höchste Spaltungsausbeute erreichte 2-Aminobenzimidazol **66** (2 in Abb. 107) bei 10mM Konzentration im Experiment mit knapp 26%. Anders verhielt es sich bei einer Konzentration von nur 2 mM: Hier sank die Spaltungsaktivität auf ca. 2% ab. 2-Aminoperimidin **67** (3 in Abb. 107) zeigte hingegen bei beiden Konzentrationen hohe Spaltungsausbeuten: Es erreichte ca. 18% bei 10mM und 14% bei 2 mM. Es besitzt damit das höchste RNA-Spaltungspotential bei niedrigeren Konzentrationen. Imidazoimidazol **71** (4 in Abb. 107) weist bei diesen Experimenten ähnliche Aktivität (7% bei 10 mM, 4.5% bei 2 mM) auf wie bei den Experimenten, die im Vorfeld mit dem gängigen Formamid-Ladepuffer gemacht wurden. Das deutet darauf hin, dass die Präzipitation im Falle von **71** evtl. während des Experimentes auftritt und weniger mit der Beschaffenheit des Ladepuffers zu tun hat; **71** denaturiert aber nicht TAR.

Zu sagen bleibt, dass auch bei den Versuchen mit dem Harnstoff- Ladepuffer Präzipitationseffekte bei der Auswertung des Elektrophoreselaufs beobachtet werden konnten. Die Signalintensität fiel bisweilen auf 11% ab (im Fall von Imidazoimidazol **71** bei 2 mM Konzentration). Die Läufe ließen sich aber insgesamt gut auswerten und gut reproduzieren, was eindeutig für die weitere Verwendung des Harnstoff-Ladepuffers bei der Untersuchung der RNA-Spaltungsaktivität von kleinen Molekülen spricht.

5.2.6 Studien zum Aggregationsverhalten verschiedener kleiner Moleküle

Trotz der Verwendung von Co-Soventien wie DMSO oder MeOH kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich kleine Moleküle aufgrund ihres partiellen lipophilen Charakters zu Aggregaten zusammenlagern. Diese Gebilde haben durch ihre höhere Ladungsdichte und ihre Ansammlung funktioneller Gruppen eine größere Wahrscheinlichkeit, an RNA zu binden und diese zu spalten. Um die Spezifität der Spaltung zu steuern, können RNA spaltende Moleküle an größere, Regioselektivität gebende Moleküle wie DNA oder Peptide konjugiert werden. Durch den hydrophilen Charakter der Konjugate und ihre niedrige, absolute Konzentration im Experiment wird Aggregation vermieden. Da ein solches Konjugat nicht mehr im Aggregatverband angreift bzw. angreifen kann, sollte ein RNA-Spalter daher idealerweise auch als Einzelmolekül in der Lage sein, RNA zu spalten. Die Spezifität des Sequenzerkennenden Teils des Konjugates führt zu einer hohen lokalen Konzentration am Bindeort und man erhält Affinitätsspaltung.

Um zu untersuchen, wie stark eine Verbindung zu Aggregation unter den gewählten experimentellen Bedingungen neigt, wurde bereits in der Vergangenheit die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) eingesetzt.^[18]

Bei dieser Methode wird mit Hilfe eines speziellen Spektroskops (ConfoCor II-Spektroskop (Zeiss)) die Diffusionsgeschwindigkeit fluoreszenzmarkierter Moleküle in Lösung gemessen. Durch die Brown'sche Molekularbewegung wandern diese durch das confokale Volumen des Spektroskops und werden dann – sofern sie farbstoffmarkiert sind – von einem Laser (hier: HeNe-Laser mit einem auf Cy5 abgestimmten Emissionbereich) angeregt. Die vom Farbstoff (Cy5, Absorptionsmaximum 633 nm) emittierte Fluoreszenz wird durch eine Photodiode registriert und über den Computer ausgewertet. Man verwendet den Autokorrelationsmodus des Gerätes, der die Diffusionsgeschwindigkeit eines einzelnen Farbstofflabels bzw. einer einzelnen farbstoffgelabelten Verbindung registriert. Die Diffusionsgeschwindigkeit einzelner Moleküle ist deutlich größer als die von mittleren bis großen Aggregaten, weshalb man durch einen sprunghaften Anstieg der Diffusionszeiten letztere ausmachen kann.

Um vergleichbare Konzentrationen an Nucleinsäuren wie in den Spaltungsexperimenten zu untersuchen, verwendet man eine Mischung von

Eigene Arbeiten

farbstoffgelabelter Spezies (T₂₀U-Cy5 **82**) und ungelabelter DNA (Primer 2 **83**), um zu hohe Zählraten durch den Laser zu vermeiden.

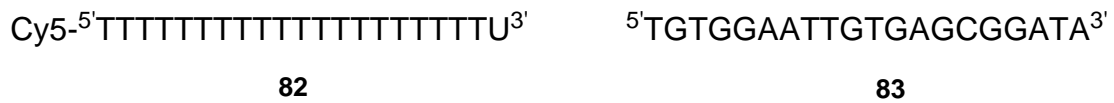


Abb. 108: Sequenzen der bei den FCS-Messungen verwendeten DNAs.

DNA verwendet man aus dem Grund, dass sie unanfälliger und billiger ist als RNA, die unmarkierte dient hier ausschließlich als „Füllmaterial“ zum Erreichen der gewünschten Gesamtkonzentration. Die untersuchten Substanzen werden dann in unterschiedlich gestaffelten Konzentrationsschritten zugesetzt. Sie werden ebenfalls nicht durch den Laser detektiert. Die Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Frau E. Kalten. Man dokumentierte Countrate des Lasers, counts per molecule, Diffusionszeit in μs und die Partikelzahl; der Einfachheit halber soll hier nur die Entwicklung der Diffusionszeiten über einen Konzentrationsbereich gezeigt und diskutiert werden.

Standardmäßig verwendete man 20 nM gelabeltes **82**, 100 nM Primer 2 **83**, 0 bzw. 20% Co-Solvens und eine variable Konzentration an zu untersuchender Verbindung in einem Untersuchungsvolumen von 30 μl . Es kam außerdem der jeweilige Puffer in dem pH-Wert zum Einsatz, der auch bei den Spaltungsexperimenten eingesetzt worden war.

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse für Imidazoimidazol **71** gezeigt (Puffer: Tris-HCl pH 8).

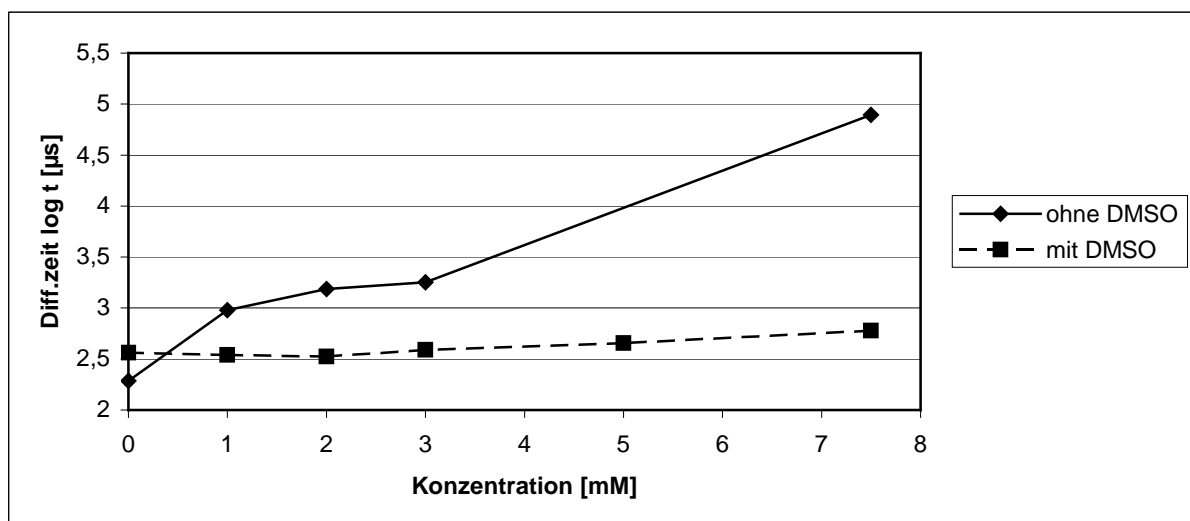


Abb. 109: Diffusionszeit bei Verwendung von **71** in Abhängigkeit von der Konzentration.

Es fällt auf, dass bei der Reihe ohne DMSO eine deutliche Aggregatbildung im Bereich von 3 bis 7.5 mM Imidazoimidazol **71** zu verzeichnen ist, während dies im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich der Reihe mit DMSO nicht der Fall zu sein scheint. Für die Untersuchungen der Spaltaktivität von Verbindung **71** in 20% DMSO in diesem Konzentrationsbereich bedeutet dies, dass von Spaltung durch Einzelmoleküle oder sehr kleine Aggregate ausgegangen werden kann. Allerdings war die Spaltaktivität von **71** in zwischen 3 und 7.5 mM gering (vgl. Abb. 98). Man muss jedoch dem Umstand Rechnung tragen, dass **71** unter diesen Bedingungen eben als Einzelmolekül bzw. in sehr kleinen Aggregatverbänden Spaltung verursacht und dass damit die niedrige Spaltungsausbeute nicht negativ beurteilt werden darf. Des weiteren wurde eine Reihe der auf RNA-Spaltaktivität untersuchten Verbindungen in einem hohen Konzentrationsbereich gemeinsam untersucht, d.h. am selben Tag im selben Satz an Experimenten. So konnte man systematische Fehler wie Schwankungen der Laserintensität ausschließen und erhielt ein einheitliches Bild für die untersuchten Proben. Man versprach sich hiervon eine bessere Vergleichbarkeit der Daten für diese Verbindungen. Dabei wurden folgende Rahmenbedingungen gewählt wie im voran gegangenen Abschnitt bei den Spaltungsexperimenten: Tris-HCl-Puffer pH 6, 20% MeOH. Die untersuchten Verbindungen waren: 2-Aminoimidazol **65**, 2-Aminoperimidin **67**, 2-Aminobenzimidazol **66** und Imidazoimidazol **71**. Für den Vergleich wurden drei Konzentrationen ausgewählt: 10, 1 und 0.2 mM.

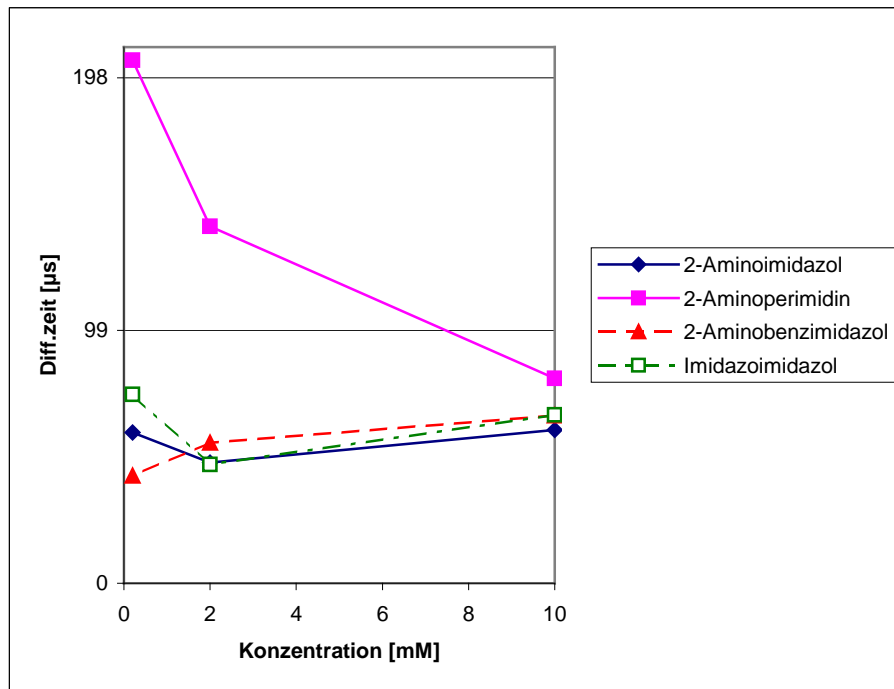


Abb. 110: Diffusionszeiten in Abhängigkeit von der Konzentration an den Verbindungen 2-Aminoimidazol **65**, 2-Aminoperimidin **67**, 2-Aminobenzimidazol **66** und Imidazoimidazol **71**. 117 µs gibt die Diffusionszeit an, die die gelabelte DNA ohne Zugabe einer der Substanzen aufwies. Alle Experimente mit 20% MeOH, Tris-HCl-Puffer pH 6. Mittlere Diffusionszeit ohne Spalter: 99 µs.

Die hier gewonnenen Daten basieren wieder auf zwei unabhängigen Messungen und wurden gemittelt. Auffällig ist zunächst, dass sich die Verbindungen alle ähnlich verhalten bis auf das 2-Aminoperimidin **67**. Mit steigender Konzentration nimmt die Diffusionszeit sogar ab und sinkt unter einen Wert, den die gelabelte DNA **82** allein erreicht (99 µs). Diese Erkenntnisse scheinen zunächst paradox, zeigen jedoch nur, dass die Diffusionszeit allein kein hinreichendes Indiz für die Bildung oder Nicht-Bildung von Aggregaten ist.

Um ein genaueres Bild von der Tendenz der Verbindungen zu Aggregatbildung zu erhalten, soll an dieser Stelle auf die Partikelzahl eingegangen werden. Diese sagt aus, wie viele Partikel am Detektor ankommen und lässt deshalb auch eine Aussage zu, ob es sich um große oder kleine Gebilde (Partikel oder Aggregate) handelt. Ist die Partikelzahl klein, so ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass Aggregate aufgetreten sind, schließlich kommt es bei ihrer Bildung zur Verringerung der Teilchenzahl. Für die Verbindungen **65-67** sowie **71** ergibt sich deshalb folgendes Bild (Abb. 111, S.143).

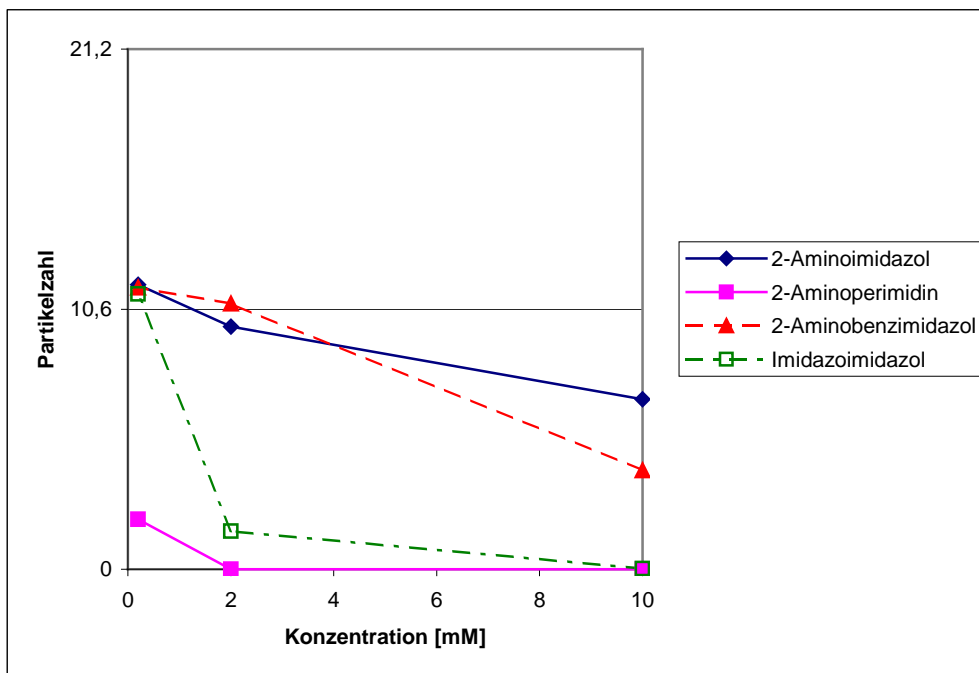


Abb. 111: Partikelzahl in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanzen **65**, **66**, **67** und **71**. 10,6 Partikel kennzeichnet die Anzahl, die ohne Zugabe von Substanz detektiert wird. Alle Experimente mit 20% MeOH, Tris-HCl-Puffer pH 6. Mittlere Partikelzahl ohne Spalter: 10,6.

Bei der Betrachtung der Partikelzahlen zeigt sich gleich ein anderer Zusammenhang: Alle untersuchten Verbindungen neigten bei hohen Konzentration (2-10 mM) zu Aggregation, wobei besonders 2-Aminoperimidin **67** und Imidazoimidazol **71** deutlich herausstachen. Ersteres zeigte sogar bei der niedrigsten untersuchten Konzentration (0,2 mM) eine deutliche Absenkung der Partikelzahl und ist damit der Spitzenreiter unter den untersuchten Substanzen bezüglich Aggregatbildung. Durch seine große lipophile Fläche (pi-stacking fähiger, polyzyklischer Aromat) entspricht dieser Befund auch den Erwartungen. Verbindungen mit kleinerem aromatischen Anteil (2-Aminoimidazol **65** und 2-Aminobenzimidazol **66**) scheinen hier nicht sehr stark zu Aggregation zu neigen. **71** hingegen bewegt sich hier an der Grenze zwischen beiden Extremen: Bei niedrigen Konzentrationen kommt es genauso wenig zu Aggregationsbildung wie bei **65** und **66**, doch bei hohen Konzentrationen sinkt die Partikelzahl vergleichbar stark ab wie bei **67**. Dies wiederum ist eher überraschend, ist doch Imidazoimidazol **71** ein vergleichsweise kleines Molekül, das zwar über ein heteroaromatisches pi-System verfügt, welches seine Lipophilie erhöht, sollte aber durch seine geringe Größe und den heteroatomaren Charakter auch wieder in der Lage sein, die Lipophilie auszugleichen.

Ergänzend kann zudem festgestellt werden, dass bei den hohen Konzentrationen (10 und 2 mM) an 2-Aminoimidazol **65** kleinere Aggregate bilden, deren

Diffusionszeiten zwischen 100 und 160 μs liegen. Bei 2-Aminoperimidin **67** bilden sich große Aggregate: Bei einer Konzentration von 10 mM liegen deren Diffusionszeiten zwischen 500 und 6000 μs , ähnlich sieht es für 2 mM aus. 2-Aminobenzimidazol bildet ausschließlich kleine Aggregate und davon nur wenige (vgl. Diffusionszeiten 2-Aminoimidazol), während bei Imidazoimidazol **71** viele kleine Aggregate gebildet werden (Diffusionszeiten 100- 500 μs).

Abschließend lässt sich sagen, dass sich mit dieser Methode hervorragend Aggregatbildungsverhalten an einzelnen oder mehreren Verbindungen untersuchen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass in hohen Konzentrationsbereichen (mM) trotz der Verwendung von Co-Solventien die Aggregatbildung nicht unterbunden werden kann. Deshalb ist es für solche Konzentrationsbereiche nicht zulässig, einen Spaltungs-Mechanismus mit einzelnen Molekülen zu formulieren. Geht man allerdings zu geringeren Konzentrationen über (nM oder μM -Bereich), kann diese Einschränkung aufgehoben sein. Ganz sicher ist jedoch, dass sich jede Substanz anders verhält was Eigenschaften wie Lösungs-, Spaltungs- und Aggregationsverhalten bei unterschiedlichen pH-Werten angeht. Selbstverständlich ist für einen Vergleich eine Übereinstimmung aller Untersuchungsparameter unabdingbar. Jedoch soll hier darauf hingewiesen sein, dass ein ausgewählter Satz an Parametern (also pH-Wert, Puffer, Co-Solventien usw.) für die eine Substanz ideal sein kann, während er dies für einen anderen Spalter nicht ist. Dieser Umstand liegt in der Natur der einzelnen Substanzen begründet. So ist beispielsweise der gewählte Puffer-pH-Wert für die eine Substanz im Bereich seines pKa-Wertes (was einen positiven Effekt auf seine Spaltungsfähigkeit ausübt), während dies für die andere Substanz keinesfalls zutrifft. Dieses Dilemma ist leider nicht überbrückbar und muss daher hingenommen werden. Beim Vergleich von strukturähnlichen, aber dennoch unterschiedlichen Spaltern sollte man diesen Umstand im Hinterkopf behalten.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Regiospezifität und Spaltungsausbeute von 5'-modifizierten Trisbenzimidazolkonjugaten wie **53** unter Verwendung von Helfer-Sequenzen verbessert werden (S.74 ff). Mit dieser Technik gelang es, Turnover zu erzielen und so eine echte katalytische Aktivität der DNA-Konjugate nachzuweisen. Die verwendeten Helfer-DNA-Sequenzen sind günstig zu erwerben oder mit einem DNA-Synthesizer leicht selbst herzustellen und können so der jeweiligen Aufgabe perfekt angepasst werden.

Weiterhin wurden verschiedene Versuche unternommen, ein 5'-modifiziertes Konjugat maßzuschneidern, so dass es durch interne bulge-Bildung mit seinem Substrat ebenfalls Turnover erreichen könnte und so katalytische Aktivität zeigte (S.59 ff). Diese Projekte wurden in Anlehnung an Arbeiten von Häner ^[91] durchgeführt, der damit Turnover erzielte, da das Konjugat nach Spaltung des bulges wieder in den katalytischen Zyklus eingegliedert werden konnte. Leider waren diese Versuche nicht von Erfolg gekrönt, obwohl man sich bei der Konzipierung der Substrat-Konjugat-Hybriden an die Sequenzen von Häner *et.al.* hielt. Statt dessen beobachtete man im Falle von Konjugat **51** bei der Hybridisierung die Ausbildung einer Helix; ein bulge konnte nicht erhalten werden (S. 61). Dieser Unterschied könnte auf die große, planare Spaltereinheit mit Europium(III) von Häner *et. al.* zurück zu führen sein, die im Falle der von uns untersuchten Konjugat-Substrat-Hybride fehlte, denn die 2-Aminobenzimidazol-Einheiten von Trisbenzimidazol **15** waren im Vergleich als klein anzusehen.

Diese Vermutung führte schließlich zu zwei unterschiedlichen Ansätzen. Einer davon war es, eine größere intercalationsfähige Teilstruktur in das Konjugat einzuführen. Man versuchte deshalb ein Konjugat zu synthetisieren, welches zwischen der katalytischen Einheit und dem sequenzerkennenden Teil die Pyrenaminosäure **56** von Dr. M. Suhartono trug (S. 69 ff). Dieses sollte den großen, Häner'schen Rest imitieren und so einen bulge erzeugen. Leider gelang die Synthese dieses Konjugates nicht. Wie sich heraus stellte, war das kommerziell erworbene DNA-Material nicht geeignet für die angewendete Synthese. Eine Basen-Schutzgruppe bzw. das Anhydrid derselben, welches bei der Festphasensynthese als Capping-Reagenz verwendet wurde, führte zu einer irreversiblen Reaktion mit der

Zusammenfassung

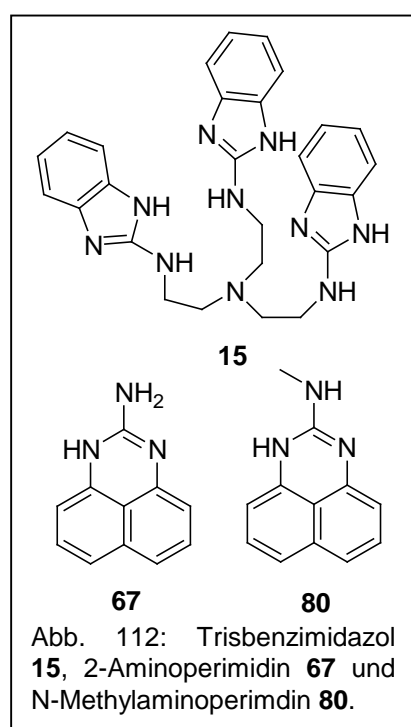
5'-NH₂-Funktion an der DNA und machten das Material daher für eine Kupplung unbrauchbar.

Eine andere Herangehensweise war es, die Faltung des Konjugat-Substrat-Hybrides voraus zu berechnen und so ein Hybrid zu erhalten, welches einen bulge ausbildete (S. 65 ff). Konjugat **55** und Substrat **54** wurden nach dieser Strukturvorhersage synthetisiert bzw. erworben und entsprachen genau den Erwartungen, ein interner bulge wurde ausgebildet. Dennoch konnte man auch mit diesem System keinen Turnover erreichen.

Ein weiteres großes Teilgebiet dieser Arbeit war die Untersuchung kleiner Moleküle als unspezifische RNA-Spalter. Im Rahmen dieser Arbeit wurden speziell Guanidiniumanaloga auf ihre RNA-Spaltungsfähigkeit untersucht.

In der Vergangenheit hatte man als Gütekriterium dieser Verbindungen das Augenmerk auf ihre pKa-Werte gerichtet. Sofern sich diese annähernd im physiologischen Bereich befanden, konnten häufig gute bis sehr gute RNA-Spaltungsausbeuten erzielt werden. ^[8]

Erstmals kam das Konzept der Energiedifferenz zwischen den tautomeren Formen eines guanidiniumtragenden Moleküls als Werkzeug zur Vorhersage der Güte eines RNA-Spalters zum Einsatz (S.113 ff). Sofern die beiden Strukturen (Amino- und Iminotautomer) sehr geringe Energieunterschiede aufwiesen, sollten sie sich besser als „Protonen-Shuttle“ eignen und so die Phosphorsäuretransesterifikation katalytisch besser unterstützen. Zusammen mit dem pKa-Wert der Verbindungen wurde untersucht, ob dieses Konzept als Vorhersagemethode tragfähig ist.



Unter den mit diesen Methoden gefundenen sowie kommerziell erhältlichen Molekülen konnte 2-Aminoperimidin **67** als sehr guter Spalter identifiziert werden. Verglichen mit Trisbenzimidazol **15** erreichte es ebenso gute Spaltungsraten wie letzteres, wobei **67** nur über eine einzige Guanidiniumeinheit verfügt. Dieser so identifizierte neue Kandidat für den Einbau in DNA-Konjugate enttäuschte auch nach Untersuchungen seines N-Methyl-Aminoderivates **80** nicht: Das Derivat zeigte eine ausreichend hohe Spaltungsaktivität, um es in Zukunft als Baustein für antisense-Konjugate in Frage kommen zu lassen.

Es gab allerdings auch Schwierigkeiten bei der Untersuchung der kleinen Moleküle. Problematisch gestaltete sich ihre Löslichkeit in hohen Konzentrationen. Man ging deshalb dazu über, Co-Solventien wie Methanol oder DMSO zu verwenden, um auch während des Experimentes eine ausreichende Löslichkeit der Verbindungen zu gewährleisten. Ein Volumenanteil von 20% Co-Solvens stellte sich als ideal heraus, das Experiment wurde dadurch nicht negativ beeinflusst.

Außerdem kam es zu Präzipitation einiger Substanzen (u.a. 2-Aminoperimidin **67**) beim Auftragen auf das Sequenzierergel, welche die Auswertbarkeit dieser Experimente einschränkte. Die Verwendung eines neuen Harnstoffladedepuffers beim Auftragen der Proben auf das Gel und das Senken der Substanzkonzentration (von mM auf μ M) im Experiment verbesserten diese Situation deutlich. Häufig beobachtete Präzipitationseffekte waren danach größtenteils verschwunden, was die Auswertung der Spaltungsexperimente mit kleinen Molekülen erleichterte (S. 129 ff). Einige Verbindungen konnten mit der Kombination von ΔH_f -Wertbestimmung und pKa-Wert-Bestimmung als schlechte RNA-Spalter korrekt vorhergesagt werden (z.B. 2-Aminopyridin **69**, 2-Aminopyrimidin **68**).

Nicht ganz klar ist das mittelmäßige Abschneiden von Imidazoimidazol **71** als RNA-Spalter (S.136 ff). Durch seine Symmetrie liegt sein ΔH_f -Wert bei 0 und auch sein pKa-Wert liegt mit 7.4 perfekt im physiologischen Bereich. Dennoch konnte es nur Spaltungsausbeuten von unter 10% bei Konzentrationen im höheren mM-Bereich erreichen. Es ist aber auch die einzige untersuchte Verbindung, die signifikant RNA schneidet, ohne diese gleichzeitig zu aggregieren oder zu denaturieren.

Untersuchungen des Aggregationsverhaltens der kleinen Moleküle mittels FCS-Messungen (S. 139 ff) zeigten, dass fast alle bei hohen Konzentrationen – etwa im mM- oder hohem μ M-Bereich – Aggregate bilden, und das auch bei Verwendung von Co-Solventien, wie es im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde. Man kann also bei den kleinen Katalysatoren nicht davon ausgehen, dass isolierte Moleküle für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Vielmehr agieren diese Moleküle bei solchen Konzentrationen als große oder kleine Aggregate, die durch die Vielzahl ihrer katalytischen Einheiten an der Oberfläche ihr Potential vervielfachen. Erst bei niedrigen Konzentrationen lösen sich die Aggregate auf, man kann hier wieder von einem Ein-Molekül-ein-Substrat-Mechanismus ausgehen (s. Schema 3 S. 110).

Dies wird allerdings nicht als Ausschlusskriterium gesehen, diese Moleküle auch weiterhin als potentielle Kandidaten für antisense-Konjugatbausteine zu betrachten.

Zusammenfassung

In Konjugaten verhalten sie sich wie Einzelmoleküle, bei denen man streng mechanistische Betrachtungen anstellen kann und darf.

7 Ausblick

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse gibt es verschiedene Gesichtspunkte, die in Zukunft näher untersucht werden sollten.

Da sich 2-Aminoperimidin **67** als sehr guter RNA-Spalter gezeigt hat, sollte in Zukunft versucht werden, ihn in ein DNA-Konjugat einzubinden. Dies würde Erkenntnisse dazu liefern, ob die Verbindung als Einzelmolekül ebenso aktiv ist wie in Aggregaten, die man bei den Untersuchungen der Verbindung größtenteils erhielt. Ein Vergleich mit dem bewährten Trisbenzimidazol **15** wäre in einem solchen Fall noch besser möglich.

Des Weiteren sollte bei der Untersuchung von kleinen Molekülen als RNA-Spalter der Harnstoffladedepuffer verwendet werden. Es zeigte sich, dass einige die Auswertung erschwerende Präzipitationseffekte dadurch reduziert wurden. Auch die Reproduzierbarkeit der Experimente wurde dadurch erleichtert.

Darüber hinaus sollte das symmetrische Imidazoimidazol **71** näher beleuchtet werden. In analytischen HPLC-Untersuchungen zeigte sich, dass es mit einem Überschuss an Guanosin als Oligonucleotid-Ersatz zur Entstehung eines neuen Peaks kommt, der leider wegen seiner geringen Intensität nicht isoliert und untersucht werden konnte. In einer Wiederholung dieses Experimentes mit einer größeren Menge an **71** könnten vergleichbare Bedingungen wie in den Spaltungsexperimenten geschaffen werden. Mit der Klärung der Identität des neu aufgetretenden Peaks können Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob sich **71** zersetzt oder mit der Nucleobase reagiert. Auf diese Weise könnten auch die Gründe geklärt werden, weshalb **71** nicht die erwartete hohe Spaltungsaktivität gezeigt hat. Es besteht die Möglichkeit, dass die unerwartet geringe Spaltungsaktivität von **71** in erster Linie auf seine geringe Aggregationsneigung zurückzuführen ist und es somit als Monomer spaltet. Weiterhin wäre es interessant, Konjugate mit intercalatorischen oder bulge-stabilisierenden Resten zu erstellen. Wie bereits diskutiert wären diese möglicherweise in der Lage, Turnover wie in den Arbeiten von Häner und Moser^[91] zu induzieren. Eventuell wäre es ratsam, die Erstellung eines solchen Konjugates über eine homogene Flüssigphasen-Synthese zu versuchen, da hierdurch eine Reaktionskontrolle während der Synthese möglich wäre. Eine Anknüpfung wäre neben der bewährten Amidbindungsanknüpfung auch über Click-Chemie oder Aktiv-Ester-Chemie denkbar. Natürlich sollte auch weiterhin die Tragfähigkeit des ΔH_f -

Ausblick

Wertes als Vorhersagewerkzeug für RNA-Spalter an anderen kleinen Molekülen untersucht werden.

Die Verwendung von Ladepuffer mit hohem Harmstoffgehalt beim Auftragen der Proben in die Geltaschen sowie der niedrigere Konzentrationsbereich (sub-mM) haben sich als besonders geeignet für die Untersuchung kleiner, RNA-spaltender Moleküle herausgestellt – insbesondere zu Präzipitation neigende wie 2-Aminoperimidin **67**. Diese Bedingungen sollten auch in Zukunft bei Untersuchungen anderer unspezifischer RNA-Spalter gewählt werden.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeine Experimentelle Bedingungen

Schmelzpunkte: Kofler Heiztischmikroskop, unkorrigiert.

Dünnschichtchromatographie (DC): Kieselgel auf Alufolie 60 F254 (Merck); die Verbindungen wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht.

Kernresonanzspektroskopie (NMR): Bruker AM 250 (250 MHz ¹H-NMR) oder Bruker 300 Avance II. Die chemischen Verschiebungen (δ) wurden in ppm und die Kopplungskonstanten (J) in Hertz (Hz) angegeben. Als interner Standard wurde das Signal des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels (DMSO: δ : 2.50, MeOD: δ : 4.84) verwendet. Die Multiplizitäten wurden mit (b)s = (breites) Singulett, d = Dublett, t = Triplett und m = Multiplett bezeichnet.

Elementaranalyse (EA): *HERAEUS CHN Rapid*. Die Elementaranalysen wurden am Institut für organische Chemie und chemische Biologie der Universität Frankfurt/Main von Frau M. Christoph durchgeführt.

Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR): *Perkin Elmer 1600 Series*. Die Wellenzahlen wurden auf ganze Zahlen gerundet und in reziproken cm angegeben. Die Intensitäten der Banden wurden mit s für stark, m für mittel und w für schwach angegeben. Feststoffe und hochviskose Öle wurden in Form von KBr-Presslingen vermessen.

Spektroskopie im Bereich des ultravioletten und sichtbaren Spektralbereiches (UV-vis-Spektroskopie): *Cary 1-E UV-VIS-Spektrometer* mit Steuersoftware (*Scan* und *Simple Reads*).

Weitere Instrumentarisierung: Biometra TB1 Thermoblock, Hettich Zentrifuge Mikro220R, Schüttelplatte Heidolph Polymax 1040, Safire² (Tecan), ALFexpress

Experimenteller Teil

(Pharmacia Biotech), pH-Meter CG 841 (Schott), Speed Vac Thermo Savant (Thermo Life Science).

8.2 Arbeitsmethoden

8.2.1 Arbeitsmethoden mit Oligonucleotiden

Steriles Arbeiten: Grundsätzlich wurde zur Vermeidung von Kontamination mit RNasen Einweghandschuhe getragen (Nitril oder Latex). Alle verwendeten Glasgeräte waren sterilisiert (mind. 6 Stunden bei 180°C) oder autoklaviert. Sofern mit RNA gearbeitet wurde, kam DEPC-behandeltes Wasser zum Einsatz; hierzu versetzte man Millipore-Wasser (stark deionisiertes Wasser, 18.2 µΩ) mit 0.1 Vol.-% DEPC, ließ über Nacht stehen und autoklavierte es (20 min bei 121°C und 2.1 bar). Sofern eine Kontamination durch RNasen kein Problem bei den jeweiligen Experimenten darstellte - beispielsweise bei ausschließlichem Arbeiten mit DNA – wurde nur sterilisiertes Wasser verwendet. Die Einwegpipettenspitzen wurden zuvor mit über Nacht mit DEPC-Wasser behandelt und im Anschluss autoklaviert, später wurden zertifiziert RNase-freie Pipettenspitzen (Roth/ Sorensen Bioscience Inc.) verwendet, die nur noch autoklaviert wurden.

Herstellung von Oligonucleotiden (DNA): Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide wurden teilweise käuflich erworben (*BioSpring*, Frankfurt) und teilweise - für die Oligonucleotidkonjugate - selbst synthetisiert. Hierbei wurden Phosphoramidite der Firma *Proligo* verwendet, die am Arbeitskreis eigenen DNA-Synthesizer *Applied Biosystem 381A* eingesetzt wurden. Dieser Synthesizer wurde im Trityl-OFF-Modus betrieben. Die Phosphoramidite wurden zügig in trockene Vials eingewogen, mit Argon überschichtet und mit trockenem, über Molsieb gelagertem Acetonitril versetzt, so dass eine 0.1 M Lösung entstand. Die Vials wurden im Synthesizer angebracht. Die Phosphoramidit-Lösungen befinden sich vom Zeitpunkt des Einbringens im Synthesizer bis zum Ende der Synthese unter Argon-Atmosphäre. Die Detritylierungslösung, die nach jeder einzelnen Basenaufkupplung vom Gerät abgegeben wird, wurde jeweils separat aufgefangen und mit den anderen Capping-Lösungen in Farbintensität verglichen. So überprüfte man während der Synthese, ob diese gleichmäßig und mit kontinuierlich hoher Ausbeute verlief. Bei einem Abblässen der gelblichen Farbe der Lösung im Verlauf der Basenstrang-Synthese wurde abgebrochen, die verwendeten Aktivierungs- und Capping-

Experimenteller Teil

Lösungen durch frische ersetzt und die Synthese mit neuen Startmaterialien (Phosphoamiditlösungen, Säule mit fester Phase etc.) wiederholt.

Die Konjugation selbst erfolgte noch auf der Säule, also heterogen, und zwar durch Aufsetzen zweier Spritzen mit Luer-Anschlüssen auf beide Enden der Säule und manuelles Bewegen der Reaktionslösung durch erstere mittels alternierenden Drückens bzw. Ziehens der beiden Kolben der Spritzen.

Die Cy5-gelabelten Substrate für die RNA-Spaltungsexperimente wurden ebenfalls von BioSpring hergestellt oder waren – im Falle der ent-TAR (**16'**) - eine Spende von Prof. S. Pitsch (EPFL Lausanne) bzw. im Fall von **17'** der *NOXXON-Pharma AG*, Berlin.

Entsalzen von Proben: Nach Durchführung der Konjugationen mussten die Konjugate entsalzt werden. Dies geschah über fertig präparierte *NAP-10* Säulen (Sephadex-G25-Säulen, Pharmacia Biotech). Zunächst musste man diese mit ca. 25ml sterilem Wasser konditionieren. Man löste die Probe in 1000 µl sterilem Wasser, lud diese auf die Säule und eluierte viermal mit je 500 µl sterilem Wasser. Die vier Fraktionen wurden auf den Gehalt an DNA-Konjugat über Photometrie (OD_{260}) untersucht, die geeigneten Fraktionen vereinigt und in der SpeedVac getrocknet.

Analytische Minigele (16% PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese), 100*100*1 mm): 10 ml Acrylamid-Stammlösung wurden mit 100 µl APS-Lösung und 10 µl TEMED versetzt und mit einer Pasteurpipette zwischen die Gelplatten gegeben, wo man das Gel innerhalb von 45 min auspolymerisieren ließ. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass maximal 10 µg pro Spur aufgetragen werden konnten. Die Proben wurden mit 5 µl Wasser und 5µl Ladepuffer (80% Formamid, 20 mM EDTA, 0.1% Bromphenolblau) gemischt und 10 µl je Probe in die Geltaschen pipettiert. Als Laufpuffer wurde 0.5* TBE-Puffer verwendet. Man ließ die Elektrophorese bei 200V für eine bis 1.5 h laufen.

Silberfärbung (silver staining): Das Minigel wurde von den Glasplatten befreit und 20 min lang mit 20%iger Trichloressigsäure fixiert. Man wusch dreimal je 5 min lang mit Millipore-Wasser. Es folgte der Färbeschritt, in dem man das Gel mit frischer 0.1%iger Silbernitratlösung für 20 min bedeckte. Zur Entwicklung wurde das Gel mit

Experimenteller Teil

ca. 10°C kalter Entwicklerlösung (3% Natriumcarbonat, 0.03% Formaldehyd) solange behandelt, bis eine deutliche Färbung der Banden zum Vorschein trat. Die Fixierung erfolgte, indem das Gel mit 10%iger Essigsäure 5 min lang behandelt wurde. Es schlossen sich noch zwei Waschschrirte mit Millipore-Wasser an, bevor das Minigel mit einer Digitalkamera fotografiert wurde.

Präparative Maxigele (16% PAGE, 200*250*1.5 mm): Zunächst gab man 60 ml Acrylamid-Stammlösung und 600 µl APS-Lösung zusammen. Zu 5 ml dieser Mischung wurden 5 µl TEMED gegeben und damit das Bodengel gegossen, welches man ca. 10–15 min auspolymerisieren ließ. Anschließend wurde zur restlichen Lösung 60 µl TEMED gegeben und mit diesem Gemisch das restliche Gel hergestellt. Nach dem Polymerisieren (ca. 2h) ließ man das Gel mit Laufpuffer (0.5% TBE) vorlaufen (1h, 100 V). Die Proben wurden in 125 µl Wasser gelöst und demselben Volumen Ladepuffer (s.a. analytische Minigele) versetzt und in die Geltaschen pipettiert (maximale Ladekapazität: 50 µg/Spur). Die Elektrophorese wurde bei 110 V für ca. 6h durchgeführt.

UV-Shadowng: Zum Nachweis der Nucleinsäurebanden wurde das Gel auf eine mit Klarsichtfolie bedeckte DC-Platte (mit Fluoreszenzindikator) gelegt und mit UV-Licht bestrahlt. Die Nucleinsäurebanden waren durch ihre UV-Aktivität als dunkle Flecken sichtbar und konnten so leicht identifiziert werden.

Extraktion der Nucleinsäurekonjugate aus PAGE-Gelen: Bei Extraktion aus Maxigel-Banden wurden die mit dem Skalpell ausgeschnittenen Banden in 2ml-Eppendorfgefäße überführt und dann mit einem Mikrohomogenisator (Roth) fein zerkleinert, um die Oberfläche zu vergrößern. Über Nacht wurden die mit Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 mM EDTA) bedeckten Gelfragmente geschüttelt. Im Anschluss entfernte man die Gelfragmente über Freeze 'n' Squeeze-Säulen (Quantum Prep/ Biorad) und den Rückstand engte man bis zur Trockne an der SpeedVac ein. Es schloss sich die Entsalzung an (s.o.), bevor man eine Quantifizierung vornahm.

Quantifizierung von Nucleinsäure(konjugaten): Die Probe wurde derart verdünnt, dass bei einer Bestimmung der OD₂₆₀ am UV-vis-Photometer der Wert zwischen 0.1

Experimenteller Teil

und 0.9 lag, um die Linearität nach Lambert-Beer zu gewährleisten, in der Regel aber 1 : 100. Man berechnete die Konzentration folgendermaßen:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} * 33 \text{ }\mu\text{g/ml} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Abspaltung der Peptide vom Trägerharz: 100 mg des Trägerharzes werden in eine mit einem Filterpad ausgelegte 5 ml-Spritze eingewogen. Nach dreimaligem Waschen mit DCM und anschließendem kurzem Trocknen des Harzes im Vakuum wird die Abspatlösung (s. Abschnitt 9.2: „Verwendete Puffer und Lösungen“) aufgezogen, die Spritze dicht verschlossen und 2-3 Stunden geschüttelt (elektrischer Schüttler).

Die so entstandene gelbe Lösung wird langsam in 20 ml Ether eingetroppt, wodurch sie sich wieder entfärbt und sich ein flockiger Niederschlag bildet. Zur vollständigen Ausfällung des Niederschlages wird die Mischung über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wird im Anschluss zentrifugiert (5 min/ 4000 U/min), der Ether abdekantiert und der Niederschlag wieder mit 20 ml Ether gewaschen. Nach dem Zentrifugieren und Abdekantieren des Ethers wird der Niederschlag an der Luft getrocknet und dann in 1.5 ml einer Acetonitril/ Wasser-Gemisches (1:1 v/v) aufgenommen und in ein Cap überführt. Das Lösungsmittelgemisch wird im Vakuum entfernt und der Rückstand per HPLC aufgereinigt, um das Peptid zu isolieren.

Alkalische Hydrolyse von Cy5-gelabelter RNA: Um auf dem ALF-Gel die Zuordnung der einzelnen Nucleotide zu erleichtern, wurde mittels alkalischer Hydrolyse eine Basenleiter angefertigt. Für RNAs mit um die 30 Nucleotiden wird wie folgt verfahren: Zu 20 µl der jeweiligen RNA- Arbeitslösung (Verdünnung 1:50; ca. 10 ng RNA) werden 20 µl 200 mM Na₂CO₃-Lösung (pH 10-11) gegeben. Das Gemisch wird für 12 Minuten bei 90°C im Thermoblock behandelt. Die Reaktion wird im Anschluss mit 10 µl 1M HOAc gestoppt, mit 75 µl ALF-Gel Ladepuffer versetzt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Ähnlich ist die Durchführung für *lange Transkripte*, die aus in-vitro-Transkription stammen (~100-200 Nucleotide), hier ist die Reaktionszeit im Thermoblock jedoch auf 1.5-2 Minuten verkürzt, um auch die langen Abbruchstücke gut darstellen zu können.

In-vitro-Transkription langer RNAs: Lange RNAs ab einer Basenzahl von ca. 50 sind chemisch nur noch in schlechten Ausbeuten darstellbar. Man greift deshalb für

Experimenteller Teil

die Synthese langer RNA-Sequenzen (hier: ca. 100- 200 Nucleotide) auf die In-vitro-Transkription zurück.

Die benötigten Vektoren für PSI und TAR wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. U. Dietrich (Georg-Speyer-Haus) kloniert und zur Verfügung gestellt.

Die Transformation der Vektoren in *E.coli* (DH5alpha) wurde im Arbeitskreis von Prof. R. Marschalek vorgenommen.

Die Experimente mit lebenden Bakterienkulturen wurden bis zu deren Abtötung durch Lyse im S1-Labor des Arbeitskreis von Prof. J. Engels durchgeführt.

Die Bakterien wurden in Ansätzen über Nacht kultiviert, um eine größere Menge Plasmid zu erhalten. Das Nährmedium wurde hierzu mit dem Antibiotikum Kanamycin versetzt und die Ansätze bei 37°C über Nacht im Bakterienschüttler inkubiert. Nach Isolation der Plasmide wurden diese mittels Restriktionsenzym linearisiert. Hierzu verwendete man HindIII (Einsatz von 5 Einheiten je µg Plasmid), das die Plasmide in entsprechend gepufferten Lösungen (Puffer 2) verdaute. Die verdauten Plasmide wurden hierauf einer Aufreinigung mittels Qiagen-Kit unterzogen. Nach einer Konzentrationsbestimmung über Photometrie oder Fluoreszenz-Messung mit dem PicoGreen-System kann die eigentliche Transkription statt finden. Man verwendete hierzu das Ribo Max-Kit von Promega (Large scale RNA production system–T7). Mit diesem Kit werden Guanodin-Monophosphat (GMP) geprimte Konstrukte aufgebaut, die für das Labeling mit Cy5 mittels Ligation durch T4 Ligase 2 benötigt werden. Die Transkription fand innerhalb von 3.5 Stunden bei 37° statt. Zur Entfernung der Plasmide aus dem Transkriptionsansatz schloss sich ein DNase-Verdau an. Der DNA-RNA-Doppelstrang wurde zuvor für 5 Minuten bei 90°C aufgeschmolzen und anschließend mit DNase in DNAase-Puffer versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung nahm man mit dem Quiagen-Kit nach Handbuch vor, woran sich eine weitere Konzentrationsbestimmung mit Ribo-Green anschloss.

Auswertung der Spaltungsexperimente: Die Messung der RNA-Spaltung erfolgte mit dem DNA-Sequenziergerät *ALFexpress* (s.a. Abschnitt 5.1.2). Die Auswertung dieser Messungen wurde mit dem zugehörigen Programm *Allele Links* ausgeführt. Prinzipiell verfuhr man dabei nach Handbuch. Man integrierte über die Flächen unter den Peaks („peak area“) und stellte die Gesamtfläche (in relativen Zahlen angegeben) ins Verhältnis zur Fläche unter den zur Spaltung gehörenden Peaks, um

Experimenteller Teil

eine Spaltungsausbeute in % zu ermitteln. Zur Auswertung und genaueren Analyse z.B. einzelner Spaltungsstellen nutzte man *Microsoft Excel*, wobei man die jeweilige Peakfläche (in relativen Zahlen) den einzelnen Basen in der Substratsequenz bzw. dem ungespaltenen Substrat zuordnete.

pH-Kontrolle: Einige der Stammlösungen kleiner unspezifischer RNA-Spalter wurden in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt, so dass trotz durchgängiger Verwendung von Puffer eine pH-Wert-Veränderung der Spaltungsansätze zu befürchten war. Dies hätte immer Falle einer pH-Verschiebung ins Basische evtl. eine alkalische Hydrolyse der RNA-Substrate zur Folge, die nicht auf RNA-Spaltungsaktivität, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurde, zurückzuführen wäre. Aus diesem Grund setzte man Kontrollexperimente an, die über die genaue Zusammensetzung (in Volumen und Konzentration) der Spaltungsexperimente verfügten und testete sie gegen Proben ohne Zusatz von RNA-Spalter. Da die verwendeten Volumina sehr klein waren (10 µl), wurde mit Universalindikatorpapier (pH-Bereich 1-14, Macherey-Nagel, Düren) gearbeitet. Waren die beiden Teststreifen von exakt derselben Farbe, ging man davon aus, dass der pH-Wert sich durch Zugabe des RNA-Spalter nicht verändert hatte. Bei Ansetzen voluminöserer Spaltungsexperimente (ca. 30 µl), konnte sogar mit einer pH-Elektrode (pH-Meter CG 841 (Schott)) gearbeitet werden. Die pH-Wert-Verschiebungen hielten sich auch hierbei innerhalb einer Fehlertoleranz von einer Nachkommastelle.

Die in dieser Arbeit gemachten Angaben zu Spaltungsergebnissen beziehen sich ausschließlich auf Fälle, bei denen keine pH-Wert-Veränderungen durch Zugabe der Spalterlösung beobachtet werden konnten.

Aggregationsstudien am Confocor: Bei dieser Methode wird mit Hilfe eines speziellen Spektroskops (ConfoCor II-Spektroskop (Zeiss)) die Diffusionsgeschwindigkeit fluoreszenzmarkierter Moleküle in Lösung gemessen. Durch die Brown'sche Molekularbewegung wandern diese durch das confokale Volumen des Spektroskops und werden dann – sofern sie farbstoffmarkiert sind – von einem Laser (hier: HeNe-Laser mit einem Emissionsmaximum von 633 nm) angeregt. Die vom Farbstoff (Cy5) emittierte Fluoreszenz wird durch eine Photodiode registriert und über den Computer ausgewertet. Man verwendete den Autokorrelationsmodus des Gerätes, der die Diffusionsgeschwindigkeit eines

Experimenteller Teil

einzelnen Farbstofflabels bzw. einer einzelnen farbstoffgelabelten Verbindung registriert.

Man verwendete als farbstoffgelabelte Spezies T₂₀U-Cy5 **82** und als ungelabelte DNA Primer 2 **83**. Die untersuchten Substanzen wurden in unterschiedlich gestaffelten Konzentrationsschritten zugesetzt. Man dokumentierte die Counterate des Lasers, die counts per molecule, die Diffusionszeit in μs und die Partikelzahl.

Standardmäßig verwendete man 20 nM gelabeltes **82**, 100 nM Primer 2 **83**, 0 bzw. 20% Co-Solvens und eine variable Konzentration an zu untersuchender Verbindung in einem Untersuchungsvolumen von 30 μl . Es kam außerdem der jeweilige Puffer in dem pH-Wert zum Einsatz, der auch bei den Spaltungsexperimenten eingesetzt worden war.

Berechnung der ΔH_f -Werte: Die jeweilige Struktur wurde in *ChemDraw Ultra 8.0* gezeichnet und dann in *Chem3D Ultra 8.0* eingefügt. Die Bildungsenthalpie wurde mit MOPAC berechnet (AM1, closed shell) und durch das Programm in kcal/mol angegeben. Man wiederholte nun das ganze Procedere mit der anderen Form (also der Enamin- bzw. der Imin-Form) und erhielt so einen zweiten Wert für die Bildungsenthalpie, den man mit dem ersten vergleichen konnte.

Die Daten beziehen sich auf Vakuum, es wurden keine Lösungseffekte einbezogen. Dieser methodisch sehr einfache Ansatz wurde in der Hoffnung gewählt, dass sich die Absolutfehler der sehr groben AM1-Methode bei der Bildung der Energiedifferenzen aufheben würden. Eine Nachprüfung einzelner Werte durch Herrn Prof. Dr. R. Berger in ab-initio-Rechnungen mit komplexen Basissätzen ergab tendenziell die gleichen Aussagen wie die einfachen AM1-Rechnungen. ^[134]

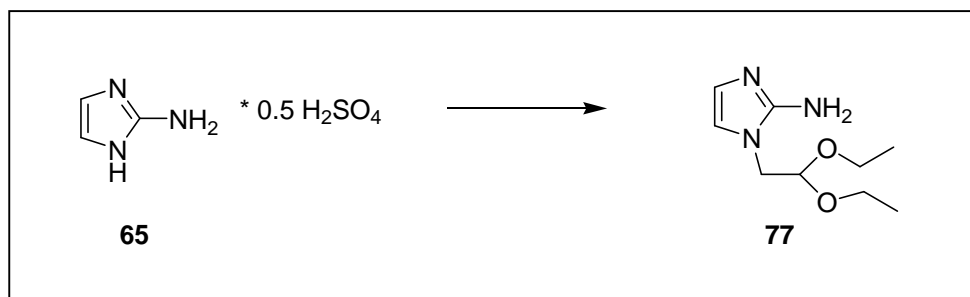
HPLC-Bedingungen: Die Herstellung insbesondere der Peptidkonjugate machte eine Reaktionskontrolle sowie eine abschließende präparative Trennung per HPLC notwendig. Diese wurden unter Anleitung bzw. von Dr. G. Dürner durchgeführt. Da hierzu eine Gradientenelution gewählt wurde, soll an dieser Stelle das Elutionsschema, welches im Folgenden nur noch als Gradient #1 bezeichnet wird, Erwähnung finden (folgende Seite):

Experimenteller Teil

Zeit [min]	Wasser [vol-%]	Acetonitril [vol-%]
0	99	1
5	99	1
20	30	70
25	30	70
30	99	1
40	99	1

8.3 Synthese

8.3.1 Synthese von 1-(2,2-Diethoxyethyl)-2-aminoimidazol (**77**)^{[30, 31]*}



In einem mit Molsieb (4Å) befüllten, ausgeheizten Schlenkcolben wurden 200 mg (1.51 mmol) 2-Aminoimidazol-Hemisulfat **65** in 2.5 ml abs. DMF gelöst und mit 0.25 ml (1.67 mmol) Bromacetaldehyddiethylacetal (97%) versetzt. Es wurden 159 mg (4.09 mmol) Natriumamid (90%) in mehreren Portionen hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Aufarbeitung erfolgte durch Gießen auf Eis und Zugabe von ca. 5 ml 1 M Na₂CO₃-Lösung. Es wurde mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Man erhielt 40 mg (0.18 mmol, 12% Ausbeute) in Form eines sehr zähen bräunlichen Öls. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

* In Kooperation mit Dr. M. Suhartono

Analytik:

R_f: 0.3 (2:1 Ethylacetat/DCM)

¹H-NMR (DMSO, 250 MHz, ppm): 6.55 (d, 1 H, J = 1.3 Hz, H-(C5)); 6.34 (d, 1 H, J = 1.5 Hz, H-(C4)); 4.63 (t, 1 H, J = 5.4 Hz, Acetal-H); 3.75 (d, 2 H, J = 5.3 Hz, Methylengr. an N1); 3.68-3.59 (m, 2 H, Methylengr. an Acetyl 1); 3.48-3.38 (m, 2 H, Methylengr. an Acetyl 2); 1.08 (t, 6 H, J = 7 Hz, Methylgr.).

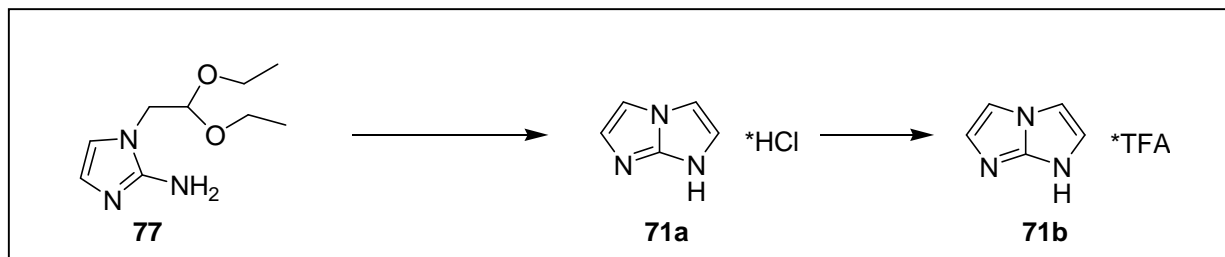
IR (KBr, cm⁻¹): 3399s, 3327m, 3146s, 2978s, 2928s, 2882m, 1660s, 1560s, 1492m, 1445w, 1375m, 1344w, 1312w, 1275w, 1167m, 1131s, 1110s, 1062s, 1029s, 937w, 892w, 830w, 786w, 717m, 701m, 600w.

Experimenteller Teil

MS (ESI+): Ges. $C_9H_{17}N_3O_2^+$ ($M+H^+$) 200.1

Gef.: 199.5

8.3.2 Synthese von 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol (**71**) [30, 31]*



200 mg (1 mmol) von Verbindung **77** wurden eine Stunde in 3 ml 2 M wässriger HCl zum Sieden erhitzt. Im Anschluss wurde das Solvenz unter reduziertem Druck entfernt und der ölige Rückstand in MeOH gelöst. Das MeOH wurde wieder im Vakuum entfernt, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und das Solvenz ein weiteres Mal im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über Nacht in Ether gerührt und das Produkt **71a** durch Filtration isoliert. Man erhielt 144 mg (1 mmol, quantitativ) des Hydrochloridsalzes der Zielverbindung, die per HPLC weiter aufgereinigt wurde. Dabei erhielt man das TFA-Salz **71b** (205 mg, 0.9 mmol, 93% Ausbeute nach Aufreinigung) als hellgelben Feststoff.

*In Kooperation mit Dr. M. Suhartono

Analytik:

¹H-NMR (DMSO, 250 MHz, ppm): 13.51 (bs, 2 H, austauschbar mit D₂O; NH); 7.64 (d, 2 H, J = 1.8 Hz, H-(C5+8)); 7.50 (d, 2 H, J = 2 Hz, H-(C4+6)).

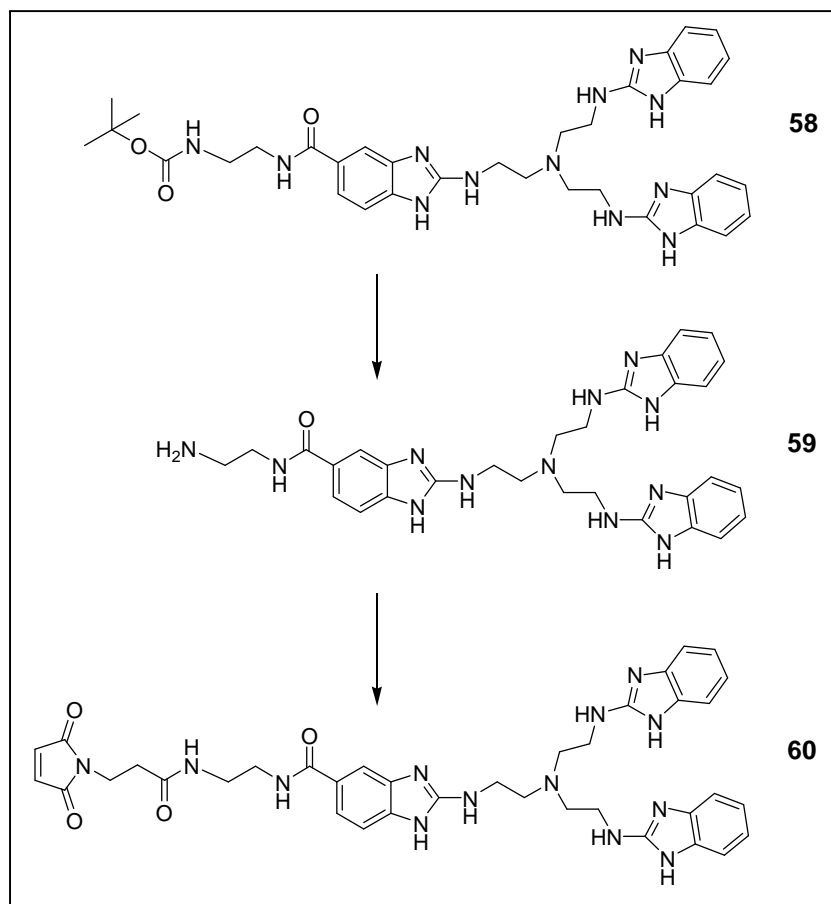
IR (KBr, cm⁻¹): 3140m, 2956m, 2893m, 2737m, 1658s, 1412m, 1309w, 1188s, 1134s, 1088w, 963w, 916w, 867m, 833m, 815m, 793m, 760w, 722m, 688s, 590m.

MS (ESI+): Ber. $C_5H_6N_3^+$ ($M+H^+$): 108.1

Gef.: 107.6

HPLC-Bedingungen: Nucleodur (C18-Säule, 250*21 mm, Macherey-Nagel, Düren) Isocratische Elution (98:2 H₂O/CH₃CN, 0.1 %TFA), Flussgeschwindigkeit: 0.6 ml/min, Retentionszeit für Produkt **71**: 5.33 min.

8.3.3 Synthese von 2-(2-{Bis-[2-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-ethyl]-amino}-ethylamino)-1*H*-benzimidazol-5-carboxylsäure {2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionylamino]-ethyl}-amid (**60**)



100 mg (0.136 mmol) von Verbindung **58** (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Gnaccharini ^[19]) wurden in 10 ml MeOH gelöst und mit 1 ml 1 M wässriger HCl versetzt. Die rote Lösung wurde 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und zur Reaktionskontrolle ein NMR-Spektrum (MeOD) aufgenommen, anhand dessen die Vollständigkeit der Entschützung überprüft wurde. Verbindung **59** wurde dann ohne ausführliche Charakterisierung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Hierzu löste man Verbindung **59** in 6 ml DMF und versetzte die violette Lösung mit 1 ml TEA, wodurch sich die Lösung grün färbte. Es wurden 50 mg N-Succinimidyl-3-maleimidopropionat hinzugefügt und 1.5 Stunden bei RT gerührt (DC-Kontrolle: BuOH/AcOH/H₂O 5:2:3). Anschließend wurden weitere 9.16 mg (insgesamt 0.221 mmol) des Propionats hinzugegeben und über Nacht weiter gerührt.

Experimenteller Teil

Man entfernte durch Kugelrohrdestillation DMF sowie TEA und das Rohprodukt wurde per HPLC aufgereinigt. Man erhielt 40 mg des TFA-Salzes (bezogen auf freie Base: 55 μ mol, entsprechend 40% Ausbeute über beide Stufen).

Analytik:

MS (ESI+) von Zwischenprodukt **59** (Rohprodukt, weitere Peaks vorhanden):

Ber. für $C_{30}H_{37}N_{12}O^+$ (M+H ⁺):	581.3	Gef.: 581.4
Ber. für m/2z:	291.1	Gef.: 291.1

¹H-NMR von Produkt **60** (250 MHz, MeOD-*d*₄): 7.59 (m, 2 H), 7.20-7.07 (m, 9 H, Aryl-H), 6.65 (s, 2 H, Maleimid), 3.65 (t, 2 H, J = 6.9 Hz, Methylen-H), 3.54 (m, 6 H, Methylen-H), 3.36 (t, 2 H, J = 5.1 Hz, Methylen-H), 3.27 (t, 2 H, J = 6.7 Hz, Methylen-H), 2.99 (m, 6 H, Methylen-H), 2.36 (t, 2 H, J = 6.9 Hz, Methylen-H).

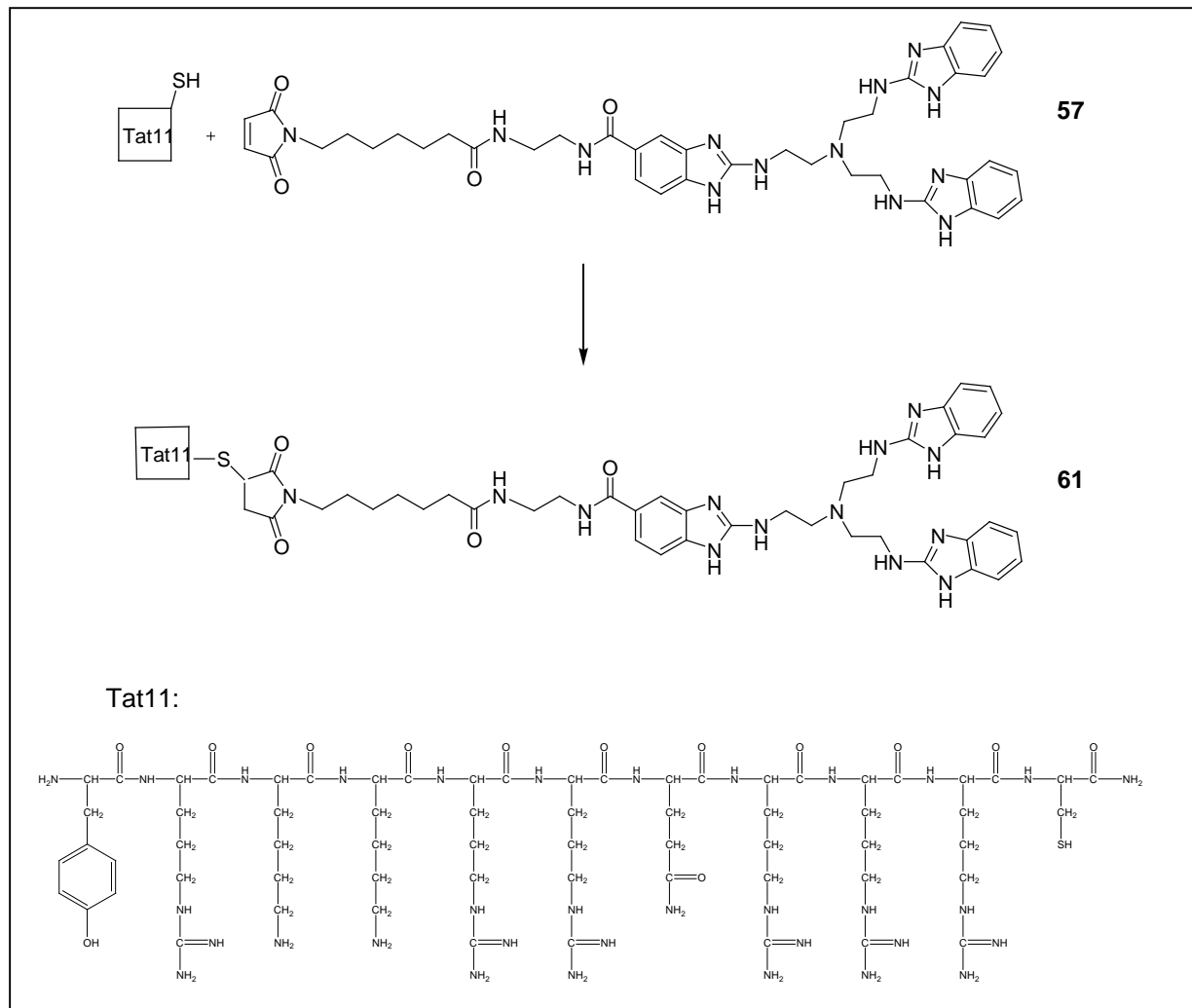
MS (ESI+) von Produkt **60**:

Ber. für $C_{37}H_{42}N_{13}O_4^+$ (M+H ⁺):	732.4	Gef.: 732.5
Ber. für m/2z:	366.2	Gef.: 366.7

HPLC-Bedingungen: Reprosil (C18-Säule, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch), isocratische Elution (75:25 H₂O/CH₃CN, 0.1 %TFA).

Retentionszeit für Produkt **60**: 5.91 min.

8.3.4 Synthese von Maleimidkonjugat mit C₆-Linker und Tat11 (**61**)



Diese Synthese wurde analog zu der von Herrn Dr. C. Gnaccharini entwickelten Synthese dieses Moleküls durchgeführt.^[19] 245 µl einer Lösung von Tat11 (reduzierte Form, 1.61 mg, 1 µmol) in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7) wurden mit einer Lösung von 1.77 mg **57** (zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. C. Gnaccharini^[19]) in 88.5 µl DMF (2 µmol) versetzt. Nach guter Durchmischung wurde die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels HPLC überprüft. Nach Reaktion über Nacht war diese abgeschlossen und das Produkt per HPLC-Aufreinigung gewonnen. Man erhielt 2.48 mg (0.99 µmol, 99% bezogen auf einfaches TFA-Salz) des TFA- Salzes von **61**.

HPLC-Bedingungen: Polaris (C18-Säule, Metachem), Gradient #1, Flussgeschwindigkeit: 0.8 ml/min.

Experimenteller Teil

Retentionszeiten:

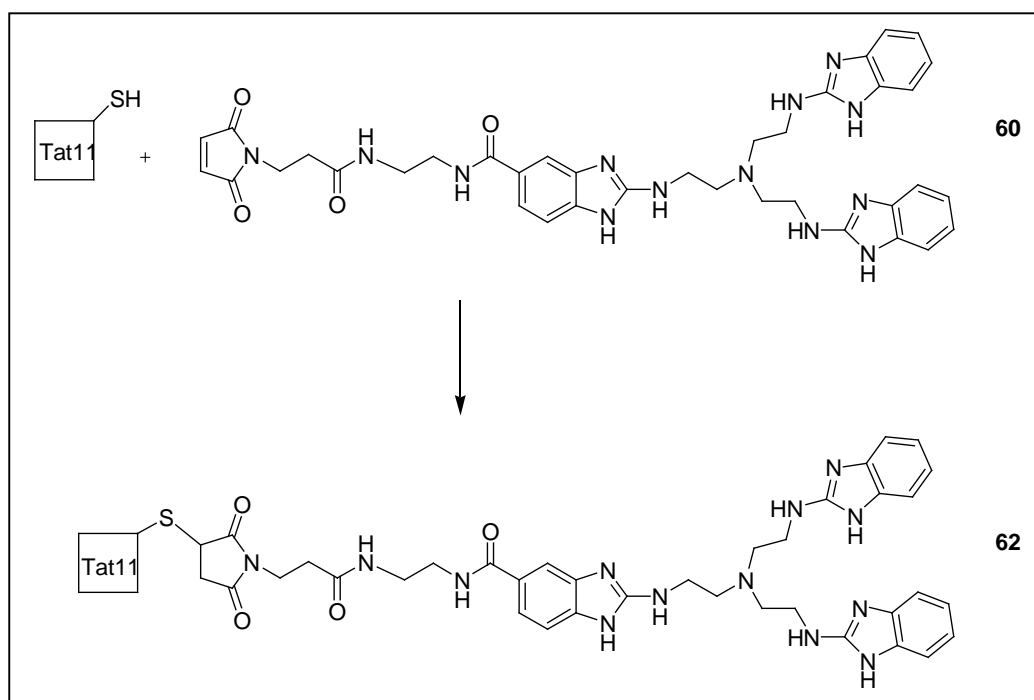
Tat11 (reduziert): 13.5 min

Konjugat **61**: 16.5 min

Maleimid **57**: 17.4 min

MS (MALDI): Ber. ($C_{106}H_{170}N_{46}O_{17}S$): 2392.8 Gef.: 2395.0

8.3.5 Synthese von Maleimid-Konjugat mit (C_2)-Linker und Tat11 (**62**)



Die Synthese erfolgte analog zur oben genannten 8.3.4.

Verwendet wurden:

1.61 mg Tat 11 (1 μ mol) in 245 μ l 50 mM Tris-HCl-Puffer-Lösung;

1.66 mg Maleimid **60** (2 μ mol) in 83 μ l DMF.

HPLC- Bedingungen wie in 8.3.4; Retentionszeiten:

Tat11 (reduziert): 13.5 min

Konjugat **62**: 16.3 min

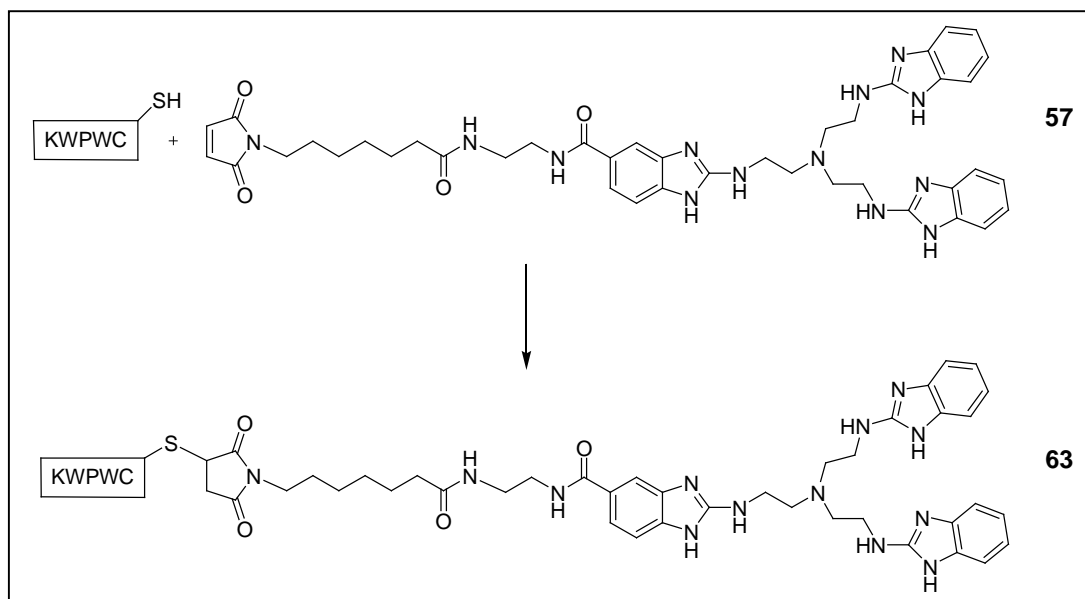
Maleimid **60**: 16.7 min

Es wurden 2.00 mg (0.82 μ mol bezogen auf einfaches TFA-Salz, 82%) Konjugat **62** isoliert.

MS (MALDI): Ber. für $C_{102}H_{162}N_{46}O_{17}S$: 2336.7

Gef.: 2332.9

8.3.6 Synthese von Konjugat mit C₆-Linker und KWPWC (**63**)



Die Synthese erfolgte analog zur oben genannten (8.3.4).

Verwendet wurden:

1.8 mg KWPWC (2.5 μmol) in 643 μl 50 mM Tris-HCl-Puffer-Lösung;

4 mg Maleimid **57** (4.5 μmol) in 200 μl DMF.

Die Reaktion war nach 10 min abgeschlossen (Reaktionskontrolle per HPLC).

HPLC-Bedingungen: Gemini-Säule (C18, 250*10mm, Phenomenex, Aschaffenburg), 0.8 ml/min, isocratische Elution (67:33 H₂O/CH₃CN, 0.1% TFA).

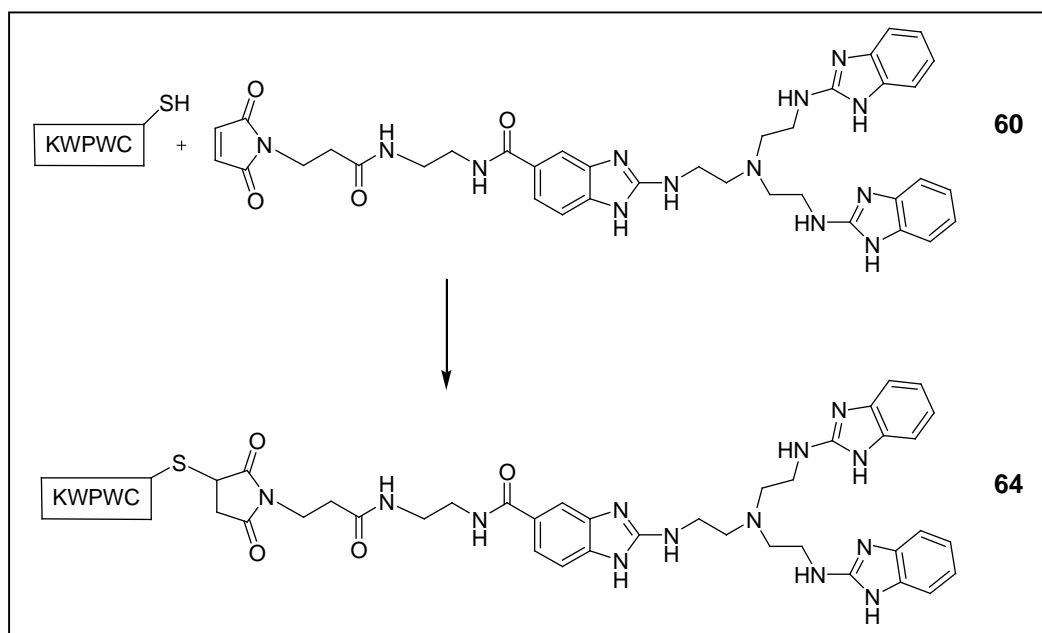
Konjugat **63**: 2.76 min

Es wurden 2.5 mg (1.56 μmol bezogen auf einfaches TFA-Salz, 62%) Konjugat **63** isoliert.

MS (MALDI): Ber. für C₇₇H₉₆N₂₂O₉S: 1505.8

Gef.: 1505.2

8.3.7 Synthese von Konjugat mit C₂-Linker und KWPWC (**64**)



Die Synthese erfolgte analog zur oben genannten (8.3.4).

Verwendet wurden:

1.4 mg KWPWC (2 μ mol) in 500 μ l 50 mM Tris-HCl-Puffer-Lösung;

3.3 mg Maleimid **60** (4 μ mol) in 166 μ l DMF.

Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht stehen gelassen, bevor es zwecks Reaktionskontrolle per HPLC analysiert wurde.

HPLC-Bedingungen: Prontosil-Säule (C18, 125*4.6 mm, Bischoff, Leonberg), Gradient #1, 0.8 ml/min.

KWPWC (reduziert): 14.1 min (nur durch spiking erkennbar)

Konjugat **64**: 15.3 + 15.6 min (Doppelpeak)

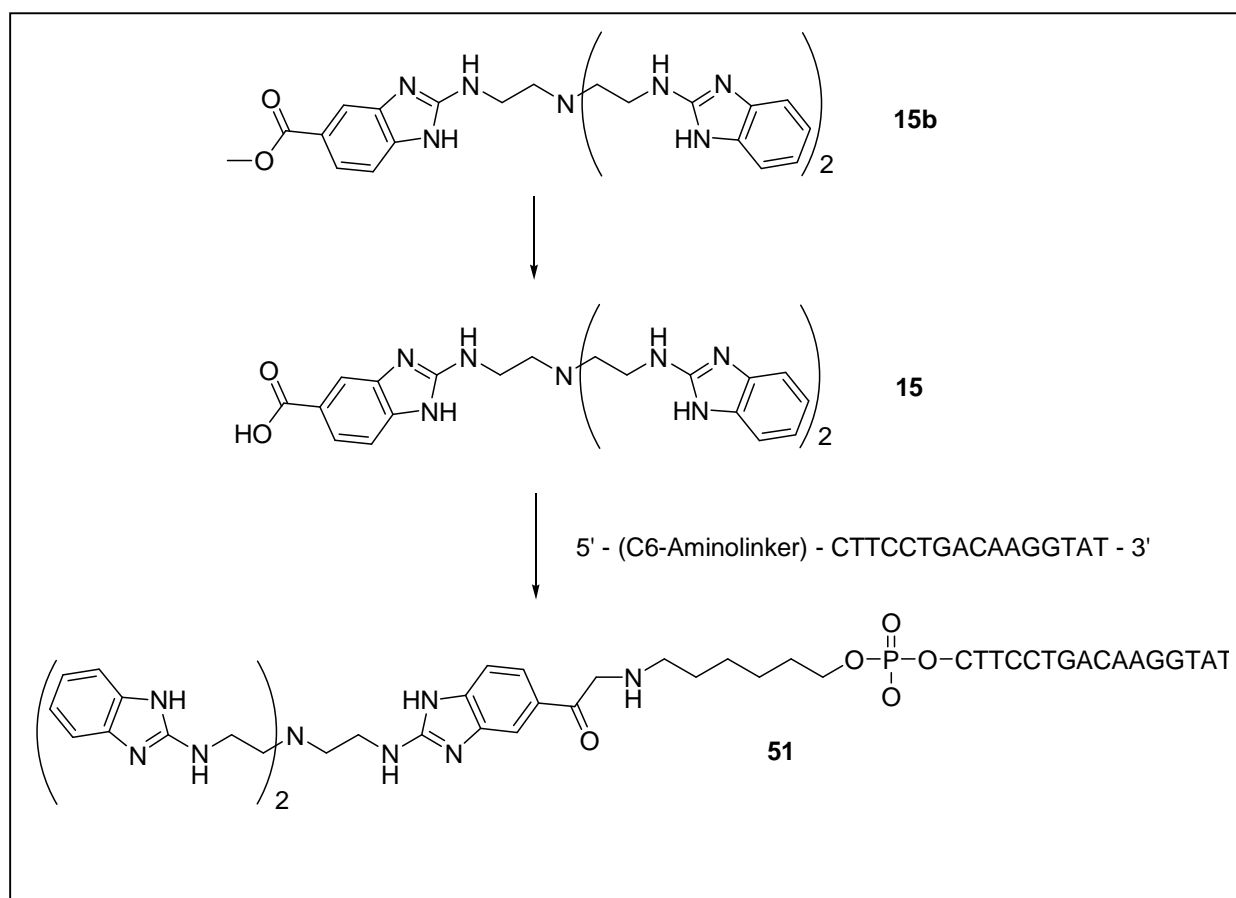
Maleimid **60**: 12.0 min

Es wurden 2.2 mg (1.42 μ mol bezogen auf einfaches TFA-Salz, 71%) Konjugat **64** isoliert.

MS (ESI+): Ber. für C₇₃H₈₉N₂₂O₉S⁺ (M+H⁺): 1450.7

Gef.: 1449.2

8.3.8 Herstellung von DNA-Konjugat **51**



27 mg (49 μ mol) des Tris(2-Aminobenzimidazol)-Methylesters **15b** wurden mit 8 ml halbkonz. wässriger HCl versetzt und unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Beim Erwärmen färbte sich die Lösung rosa. Nach 1.5 Stunden wurde das Heizen eingestellt und das Wasser im Vakuum vollständig entfernt. Zur Reaktionskontrolle wurde ein NMR-Spektrum des Rohproduktes in MeOD aufgenommen; es konnte kein Signal für die Ester-Methylgruppe beobachtet werden. Man setzte das erhaltene Carbonsäure-Derivat **15** ohne weitere Analytik im nächsten Schritt ein.

Man setzte eine Lösung von 7.7 mg HOBt, 6.3 mg DIC, dem Carbonsäure-Derivat **15** und drei Tropfen TEA in 0.5 ml DMF an. Durch die Zugabe der Base verfärbte sich die zuvor rote Lösung grün-bräunlich. Man zog die Lösung in einer 1 ml- Spritze auf und setzte die Öffnung der Spritze fest auf die eine Seite der DNA-Säule. Man versah die zweite Seite der Säule mit einer weiteren Spritze und bewegte die Kolben der Spitzen alternierend, so dass sich die Reagenzien-Lösung immer wieder durch die Säule bewegte. Dies geschah über einen Zeitraum von 6 bis 7 Stunden. Im Anschluss wurde die Lösung verworfen und die feste Phase mit je 5 ml DMF und Acetonitril gewaschen und die gesamte Säule für einige Minuten im Vakuum

Experimenteller Teil

getrocknet. Man öffnete daraufhin die Säule vorsichtig mit einem Skalpell, überführte die feste Phase in ein Schraubdeckelgläschen und versetzte zur Abspaltung des Konjugates von der festen Phase mit 2 ml wässriger ammoniakalischer Lösung (32%ig). Nach ca. 1 h bei Raumtemperatur wurde in einem Thermostaten 15 h bei 55 °C inkubiert. Die Lösung wurde über einen Spritzenfilter filtriert und die feste Phase wurde noch zwei Mal mit je 1 ml Ammoniak-Lösung gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden im Vakuum eingeeengt und getrocknet, bevor man den Rückstand über eine NAP-Säule entsalzte und einer Konzentrationsbestimmung durch UV-Photometrie unterwarf. Zunächst wurde zur Bestätigung der erfolgten Kupplung ein Mini-Gel mit Silberfärbung angefertigt, welches eine grobe Abschätzung der Kupplungsausbeute erlaubte (ca. 50%). Die Aufreinigung erfolgte über ein PAGE-Maxigel (s. 8.2.1 „Arbeitsmethoden mit Oligonucleotiden“). Man isolierte zwei Produkte.

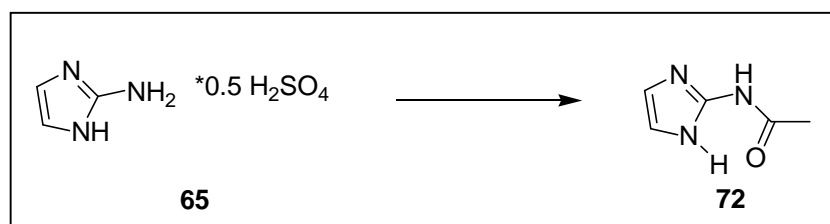
Analytik:

(MS) MALDI: Ber. für $C_{190}H_{240}N_{68}O_{99}P_{16}$: 5556.9

Gef.: 5558.9 (Hauptprodukt)

Gef.: 5627.4 (M+70 g/mol; Nebenprodukt)

8.3.9 Synthese von 2-Acetylaminoimidazol (**72**)



1.02 g (7.75 mmol) 2-Aminoimidazol-Hemisulfat wurden in 10 ml Essigsäureanhydrid suspendiert und mit 1.25 ml TEA versetzt. Die Suspension wurde gerührt, bis sich der ganze Feststoff gelöst hatte (über Nacht). Anschließend wurde die braune Lösung mit 25 ml EtOH (abs.) versetzt und es wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt, woraufhin man drei Stunden zum Sieden erhitzte (DC: DCM/MeOH 9:1). Nach Stehenlassen über Nacht wurde das EtOH unter reduziertem Druck entfernt. Das zurückbleibende, braune Öl erstarrte beim Stehenlassen bei Raumtemperatur. Der Rückstand wurde mit DCM behandelt und abgesaugt. Die derben Kristalle wurden aus Isopropanol umkristallisiert, wodurch man 260 mg (2.08 mmol, 27%) eines hellbraunen Feststoffes erhielt.

Analytik:

R_f: 0.25 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (DMSO, 250 MHz, ppm): 11.46 (bs, 1 H, NH(2), austauschbar mit D₂O); 11.14 (bs, 1 H, NH(1), austauschbar mit D₂O); 6.69 (s, 2 H, H-(C4+5)); 2.04 (s, 3 H, Methylgr.).

IR (KBr, cm⁻¹): 3328s, 2939w, 2803m, 1673s, 1611s, 1536m, 1507m, 1458m, 1368m, 1338m, 1294s, 1254m, 1162w, 1118w, 1072s, 1027w, 991m, 944w, 846w, 799w, 772m, 703s, 590m.

Schmelzpunkt: 235-238°C (Zersetzung) (Lit.: 238-240°C)

EA: C₅H₇N₃O, 125.13 g/mol

Berechnet: C: 47.99 H: 5.64 N: 33.58

Gefunden: C: 48.20 H: 5.76 N: 33.58

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
abs.	absolut
AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytidin; Cystein
CTP	Cytidintriphosphat
DCM	Dichlormethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisation Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
GTP	Guanosintriphosphat
HAART	Highly Active Anti Retroviral Therapy
HeNe	Helium-Neon
HEPES	2-(4-[2-Hydroxy]-1-piperazyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HOBt	N-Hydroxylbenzotriazol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IR	Infrarot
K	Lysin
LTR	long terminal repeats
Lys	Lysin
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MeOD	deuteriertes Methanol
MeOH	Methanol

Anhang

miRNA	mikro RNA
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NMR	Nukleare Magnetresonanz
NNRTI	Nicht-nucleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
NRTI	nucleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
NTP	Nucleosidtriphosphat
NtRTI	Nucleotidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
P	Prolin
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase; Raumtemperatur
SDS	Natrium-n-dodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
TAR	Transactivational Response Region
TBE-Puffer	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TK-Puffer	Tris/KCl-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
UTP	Uridintriphosphat
UTR	Untranslated Region
W	Tryptophan

9.2 Verwendete Puffer und Lösungen

9.2.1 Puffer und Lösungen für die Sequenzierung von RNA

Verdünnungspuffer für Sequenziergele

7 M Harnstoff, 1x TBE-Puffer

Herstellung von 250 ml Lösung:

1. 105 g Harnstoff werden in 125 ml DEPC-behandeltem Wasser gelöst.
2. Zusetzen einer Spatelspitze Amberlite IRN-150L (Pharmacia) und weiteres Rühren für 30 Minuten.
3. Filtrieren der Lösung durch einen Faltenfilter (Schleicher&Schuell).
4. Zugabe von 25 ml TBE x 10 und mit DEPC-behandeltem Wasser auf das Endvolumen bringen.

ALF Gel Ladepuffer für denaturierende Gele (gelber Aufkleber)

5 mg/ml Dextran Blau 2000 in Formamid

Herstellung von 10 ml Lösung:

1. Lösen von 50 mg Dextran Blau 2000 in 10 ml deionisiertem Formamid.
2. Aufteilen der Lösung in 1 ml Aliquots und Lagerung bei -20°C.

Hydrolysepuffer x2 für alkalische Hydrolyse von RNA

200 mM Na₂CO₃, Na₂CO₃

Herstellung von 40 ml Lösung:

1. Lösen von 0.85 g Na₂CO₃ in 30 ml DEPC-behandeltem Wasser.
2. Einstellen des Endvolumens durch Zugabe von DEPC-behandeltem Wasser.

TBE Puffer x10 für ALFexpress

1M Tris Base, 830 mM Borsäure, 10 mM Na₂EDTA * 2 H₂O

Herstellung von 1 l Lösung:

1. Lösen von 121.1 g Tris, 51.3 g Borsäure und 3.7 g Na₂EDTA * 2 H₂O in ca. 800 ml DEPC-behandeltem Wasser.

Anhang

2. Mit DEPC-behandeltem Wasser bis zum Endvolumen von 1 l auffüllen.
3. Filtration der Lösung durch einen 0.45 µm Membranfilter (ME25, Schleicher&Schuell).

Bindesilan, Arbeitslösung

0.3% Bindsilan

Herstellung von 10 ml Lösung:

1. Zugabe von 30 µl Bilsilan (GE Healthcare) zu 10 ml EtOH (abs.).
2. Lagerung unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur.

Das Bindsilan (γ -Methacryloxy-propyl-trimethoxysilan) wird verwendet, um Polyacrylamidgele covalent an die Glasoberfläche der Gelplatte zu binden.

TK-Puffer x5 (wo=ohne Triton X-100)

250 mM Tris-HCl, pH 6.0 oder 7.0, 100 mM KCl

Herstellung von 9 ml Lösung:

1. Zu 2.3 ml 1 M Tris-HCl werde 0.3 ml 3 M, DEPC-behandelter KCl-Lösung gegeben.
2. Mit 6.4 ml DEPC-behandeltem Wasser auf das Endvolumen von 9 ml bringen.
3. Ionenstärke des TK-Puffers x1: 0.065.

Tris-HCl-Puffer (pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)

250 mM Tris- HCl

TE-Puffer (x1)

10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA

Herstellung von 100 ml Lösung:

1. Zusammenfügen von 1 ml Tris-HCl (pH 8.0) und 200 µl 0.5 M EDTA-Lösung in 80 ml sterilem Milli-Q-Wasser.
2. Mit sterilem Milli-Q-Wasser auf das Endvolumen von 100 ml bringen.

RNase T1 Inkubationspuffer x5

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1.5 M NaCl

Herstellung von 10 ml Lösung:

1. Zu 500 µl 1M Tris-HCl (pH 8.0) werden 2 µl EDTA- und 3 ml NaCl-Lösung gegeben.
2. Mit DEPC-behandeltem Wasser auf das Endvolumen von 10 ml bringen.

Harnstoff-Ladepuffer

für 1.1 ml Lösung:

1 ml 10 M- Harnstofflösung

100 µl Glycerin (100%ig)

20 mg Dextranblau

9.2.2 Puffer und Lösungen zur in-vivo-Herstellung von RNA

Kanamycin Stammlösung

10 mg/ml Kanamycin in Wasser (17 mM)

Herstellung von 10 ml Lösung:

1. MW 582.6 g/mol
2. Lösen von 100 mg Kanamycin in 10 ml sterilem Wasser.
3. Sterilisieren der Lösung durch Filtration mittels 0.22 µm Filter. Lagerung bei -20°C.
4. Endkonzentration: 50 µg/ml (1:200)

dNTP Mix

2.5 mM ATP; 2.5 mM CTP, 2.5 mM GTP, 2.5 mM UTP

Herstellung von beliebigem Volumen an Lösung:

1. Gleiche Volumenanteile der 100 mM Stammlösungen an ATP, CTP, GTP und UTP werden zusammen gemischt.
2. Die Mischung wird 1:10 mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt; man erhält so eine Endkonzentration aller NTPs in dieser Lösung von je 2.5 mM.
3. Lagerung erfolgt bei -20°C.

LB Medium

1% Tryptone, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% NaCl, 1 mM NaOH

Herstellung von 500 ml Lösung:

1. Lösen von 5 g Tryptone, 2.5 g Hefeextrakt und 2.5 g NaCl in ca. 400 ml Milli-Q-Wasser. Nach dem vollständigen Auflösen werden 0.5 ml 1M NaOH zugegeben.
2. Mit Milli-Q-Wasser auf das Endvolumen von 500 ml bringen.
3. 20 Minuten autoklavieren bei 121°C und 2.1 bar.

9.2.3 Nucleinsäure-Quantifizierungskits

OliGreen dsDNA Quantifizierungs-Reagenz und Kit

OliGreen ssDNA Quantifizierungs-Kit (O-11492, Molecular Probes)

PicoGreen dsDNA Quantifizierungs-Reagenz und Kit

PicoGreen RNA Quantifizierungs-Kit (P7589, Molecular Probes)

RiboGreen RNA Quantifizierungs-Reagenz und Kit

RiboGreen RNA Quantifizierungs-Kit (R-11490, Molecular Probes)

9.2.4 Puffer und Lösungen für analytische und präparative Gele

TBE Laufpuffer x0.5

50 mM Tris, 41.5 Borsäure, 0.5 mM EDTA

Herstellung von 2 l Lösung:

1. Verdünnung von 100 ml der 10x Stammlösung (TBEx10 für ALFexpress) 2 l Milli-Q-Wasser.
2. Mit Milli-Q-Wasser auf das Endvolumen von 2 l bringen.

Färbelösung für Silberfärbung (silver staining)

0.1% AgNO₃

Herstellung von 100 ml Lösung:

1. Herstellung muss direkt vor der Verwendung statt finden.
2. Lösen von 100 mg Silbernitrat in 100 ml Milli-Q-Wasser.

Fixierlösung für Silverfärbung (silver staining) (1)

3% Na₂CO₃, 0.3% Formaldehyd

Herstellung von 150 ml Lösung:

1. Lösen von 4.5g Na₂CO₃ in 150 ml Milli-Q-Wasser.
2. Versetzen der Lösung mit 120 µl Formaldehyd.

Fixierlösung für Silberfärbung (silver staining) (2)

20% TCA

Herstellung von 1 l Lösung:

1. Lösen von 200 g TCA in 800 ml Milli-Q-Wasser.
2. Einstellen des Endvolumens durch evtl. Zugabe von Milli-Q-Wasser.

20% TCA (1.22 M)

1.22 M TCA

Herstellung von 1 l Lösung:

1. Lösen von 200 g TCA in ca. 800 ml Milli-Q-Wasser.
2. Mit Milli-Q-Wasser auf das Endvolumen von 1 l bringen.

9.2.5 Andere Lösungen

MgCl₂-Stammlösung (1 M)

MgCl₂

Herstellung von 100 ml Lösung:

1. Lösen von 20.3 g MgCl₂*6 H₂O in 80 ml Milli-Q-Wasser.
2. Mit Milli-Q-Wasser auf das Endvolumen von 100 ml bringen.

3. Optional: 100 µl DEPC zugeben und über Nacht bei Raumtemperatur unter dem Abzug stehen lassen, anschließend autoklavieren (20 min, 121°C, 2.1 bar).

Abspaltlösung für Peptide von Trägerharz

für 100 mg Harz:

4.5 ml TFA

125 µl EDT

125 µl TIS

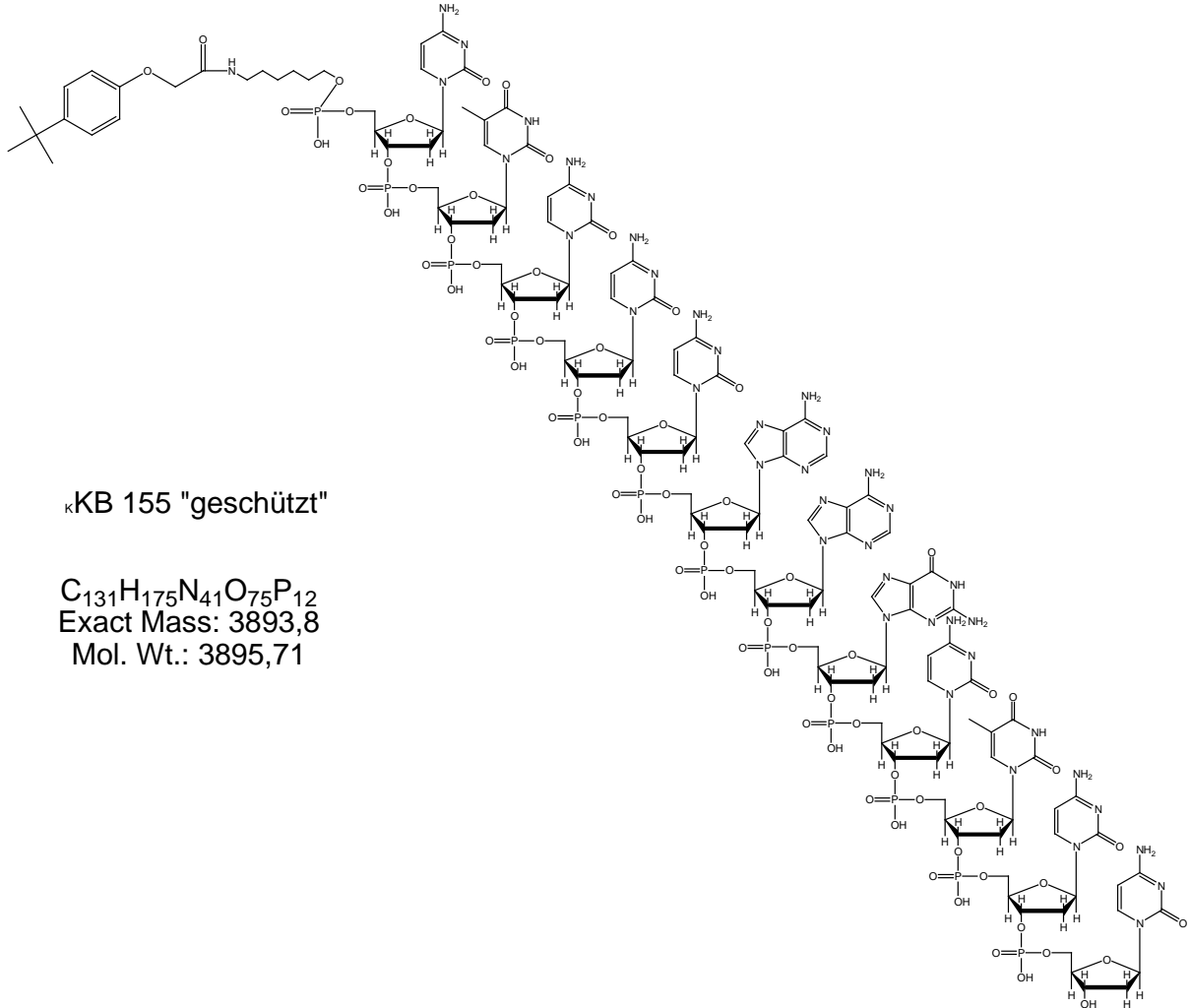
125µl Thioanisol

125 µl Wasser

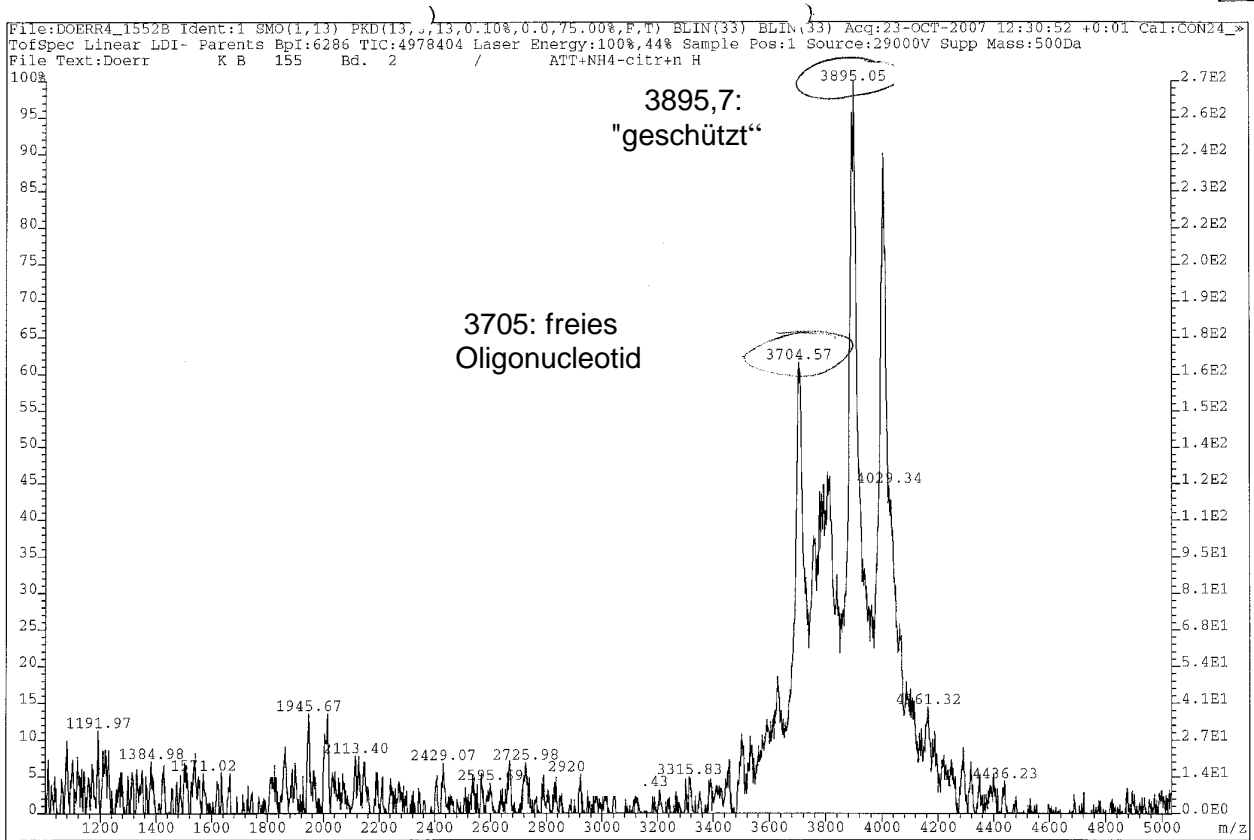
125 mg Phenol

9.3 Spektren und Chromatogramme

Anhang zu 5.1.5 "Versuche zur Herstellung eines Pyren-Benzimidazol-Hybrid-Konjugates" (KB 155)



MALDI-Spektrum der Hauptbande des Projektes 5.1.5 "Versuche zur Herstellung eines Pyren-Benzimidazol-Hybridkonjugates"



9.4 Literaturverzeichnis

- [1] T. Niittymäki, H. Lönnberg, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 15-25
- [2] Takayama, H.; Sakamoto, S.; Kitamura, M.; Inoue, H., *Nuc. Acids Symp. Series*, **2007**, 51, 203-204
- [3] J. Weston, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 2151–2174
- [4] E. H. Bayne, R. C. Allshire, *Trends Genet.*, **2005**, 21, 370
- [5] M. Jovanovic, M. O. Hengartner, *Oncogene*, **2006**, 25, 6176
- [6] M. Oivanen, S. Kuusela, H. Lönnberg, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 961
- [7] J. R. Thomas, P. Hergenrother, *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 1171
- [8] U. Scheffer, A. Strick, V. Ludwig, S. Peter, E. Kalden, M. W. Göbel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 2211
- [9] G. L. Sen, H. M. Blau, *FASEB J.*, **2006**, 20, 1293
- [10] L. Manche, S. R. Green, C. Schmedt, M. B. Mathews, *Mol. Cell. Biol.*, **1992**, 12, 5238
- [11] E. De Clerq, *Nature Rev.*, **2007**, 6, 1001
- [12] C. A. Sledz, M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, B. R. Williams, *Nat. Cell. Biol.*, **2003**, 5, 834
- [13] A. Kuzuya, R. Mizoguchi, T. Sasayama, J.-M. Zhou, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 1430
- [14] A. Krebs, V. Ludwig, O. Boden, M. W. Göbel, *ChemBioChem*, **2003**, 4, 972
- [15] J. Dietz, J. Koch, C. Raja, S. Stein, M. Grez, A. Pustowa, S. Mensch, J. Ferner, L. Möller, N. Bannert, R. Tampé, G. Divita, Y. Mély, H. Schwalbe, U. Dietrich, *ChemMedChem*, **2008**, 3, 749
- [16] G. Thiel, O. G. Rössler, *Biol. Unserer Zeit*, **2007**, 4, 241
- [17] R. Stewart, M. G. Harris, *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 16, 3125
- [18] Dissertation S. Peter, **2007**
- [19] Dissertation C. Gnaccharini, **2007**
- [20] Mathews, D.H.; Disney, M.D.; Childs, J.L.; Schroeder, S.J.; Zuker, M.; and Turner, D.H., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **2004**, 101, 7287
- [21] Dissertation M. Suhartono, **2009**
- [22] Bullard, D. R. and Bowater, R. P. , *Biochem. J.*, **2006**, 398, 135

- [23] a) I.L. Hofacker, W. Fontana, P.F. Stadler, S. Bonhoeffer, M. Tacker, P. Schuster, *Monatshefte f. Chemie*, **1994**, 125, 167; b) D.H. Mathews, J. Sabina, M. Zucker and H., *J. Mol. Biol.*, **1999**, 288, 911; c) Gruber, A.R.; Lorenz, R.; Bernhart S.H.; Neuböck, R.; Hofacker, I.L.; *Nucleic Acids Res.*, **2008**
- [24] D. S. Ermolat'ev, E.V. van der Eycken, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 6691
- [25] G. Löffler, P. E. Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag, 7. Auflage, **2003**
- [26] Dissertation A. Krebs, **2004**
- [27] Dissertation V. Ludwig, **2005**
- [28] <http://www.hiv-info.de/index.jsp?nodeid=12&CID=530>
- [29] H. Aït-Haddou, J. Sumaoka, E.V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 21, 4014
- [30] F. Compennolle, S. Toppet, *J. Heterocyclic Chem.*, **1986**, 23, 541
- [31] T. Mas, R. M. Claramunt, M. D. Santa María, D. Sanz, S. H. Alarcón, M. Pérez-Torralba, J. Elguero, *ARKIVOC*, **2002**, 48
- [32] www.acdlabs.com/products/phys_chem_lab/pka/exp_table.html
- [33] V. Ludwig, A. Krebs, M. Stoll, U. Dietrich, J. Ferner, H. Schwalbe, U. Scheffer, G. Dürner, M. W. Göbel, *ChemBioChem*, **2007**, 8, 1850
- [34] www.HIVinfo.net
- [35] M. J. Fedor, J. R. Williamson, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2005**, 6, 399
- [36] J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2006**, 5, 993
- [37] Q. Vicens, E. Westhof, *ChemBioChem*, **2003**, 4, 1018
- [38] Y. Tor, *Biochimie*, **2006**, 88, 1045
- [39] A. Brisson-Noel, P. Trieu-Cuot, P. Courvalin, *J. Antimicrob. Chemother.*, **1988**, 22 (Suppl B), 13
- [40] D. E. Brodersen, W. M. Clemons Jr., A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Cell*, **2000**, 103, 1143
- [41] B. Bozdogan, P. C. Appelbaum, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2004**, 23, 113
- [42] P. B. Dervan, R. M. Doss, M. A. Marques, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2005**, 5, 373
- [43] K. Chin, K. A. Sharp, B. Honig, A. M. Pyle, *Nat. Struct. Biol.*, **1999**, 6, 1055
- [44] K. Taira, T. Uchimaru, J.W. Storer, K. Tanabe; *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 3009

- [45] U. Kaukinen, T. Venäläinen, H. Lönnberg, M. Peräkylä, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 2439
- [46] D.M. Brown A.R. Todd; *J. Chem. Soc.*, **1952**, 52
- [47] C. Autexier, N. F. Lue, *Annu. Rev. Biochem.*, **2006**, 75, 493
- [48] S. Yoshizawa, D. Fourmy, J. D. Puglisi, *Science*, **1999**, 285, 1722
- [49] J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. Clemons Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Science*, **2001**, 292, 897
- [50] N. E. Mikkelsen, K. Johansson, A. Virtanen, L. A. Kirsebom, *Nat. Struct. Biol.*, **2001**, 8, 510
- [51] S. R. Kirk, Y. Tor, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 1979
- [52] J. P. Dworkin, A. Lazcano, S. L. Miller, *J. Theor Biol.*, **2003**, 222, 127
- [53] T. K. Stage, K. J. Hertel, O. C. Uhlenbeck, *RNA*, **1995**, 1, 95
- [54] N. E. Mikkelsen, M. Brannvall, A. Virtanen, L. A. Kirsebom, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, 65, 6155
- [55] K. M. Weeks, D. M. Crothers, *Cell*, **1991**, 66, 577
- [56] S. Richter, H. Cao, T. M. Rana, *Biochemistry*, **2002**, 41, 6391
- [57] K. Strebel, *AIDS*, **2003**, 17 (Suppl 4), S25
- [58] H. Y. Mei, D. P. Mack, A. A. Galan, N. S. Halim, A. Heldsinger, J. A. Loo, D. W. Moreland, K. A. Sannes. Lowery, L. Sharmeen, H. N. Truong, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem*, **1997**, 5, 1173
- [59] S. Wang, P. W. Huber, M. Cui, A. W. Czarnik, H. Y. Mei, *Biochemistry*, **1998**, 37, 5549
- [60] C. Faber, H. Sticht, K. Schweimer, P. Rosch, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 20660
- [61] L. A. Cupelli, M.-C. Hsu, *J. Virol.*, **1995**, 69, 2640
- [62] L. S. Radmeyer, R. Vinakyak, G. Zon, W. D. Wilson, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 966
- [63] J. L. Darlix, J. L. Garrido, N. Morellet, Y. Mély, H. De Rocquigny, *Adv. Pharmacol.*, **2007**, 55, 299
- [64] J. L. Darlix, M. Lapadat- Tapolsky, H. De Rocquigny, B. P. Roques, *J. Mol. Biol.*, **1995**, 254, 523
- [65] G. K. Amarasinghe, R. N. De Guzman, R. B. Turner, K. J. Chancellor, Z. R. Wu, M. F. Summers, *J. Mol. Biol.*, **2000**, 301, 491
- [66] R. N. De Guzman, Z. R. Wu, C. C. Stalling, L. Pappalardo, P. N. Borer, M. F. Summers, *Science*, **1998**, 279, 384

- [67] S. Campbell, V. M. Vogt, *J. Virol.*, **1995**, 69, 6487
- [68] J. Q. Hang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 352, 341
- [69] A.M. Piątek, M. Gray, E.V. Anslyn; *J. Am Chem Soc.*, **2004**, 126, 9878
- [70] E.H. Serpersu, D. Shortle, A.S. Mildvan; *Biochemistry*, **1987**, 26, 1289
- [71] B. Trawick, A. Daniher, J.K. Bashkin; *Chem Rev.*, **1998**, 98, 939
- [72] H. Aït-Haddou, J. Sumaoka, E.V. Anslyn; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 21, 4014
- [73] M. Komiyama, K. Yoshinari, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 2155
- [74] K. Shinozuka, K. Shimizu, Y. Nakashima, H. Sawai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 1979
- [75] M. Endo, K. Hirata, T. Ihara, S. Sueda, M. Takagi, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 5478
- [76] T. Kato, T. Takeuchi, I. Karube, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1996**, 953
- [77] M. A. Podyminogin, V. V. Vlassov, R. Giege, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 5950
- [78] A. Lorente, J. F. Espinosa, M. Fernandez-Saiz, J.-M. Lehn, W. D. Wilson, Y. Y. Zhong, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 4417
- [79] M.-S. Muche, M. W. Göbel, *Angew. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 2126
- [80] S. Patai, Z. Rappaport, „The Chemistry Amindines and Imidates“, **1991**, John Wiley&Sons, Chichester
- [81] B. Lenarcik, J. Glowacki, M. Garbyszewski, R. Czopek, *Pol. J. Chem.*, **1990**, 64, 43
- [82] H. Nakamura, Y. Oda, S. Iwai, H. Inoue, E. Ohtsuka, S. Kanaga, S. Kimura, C. Katsuda, K. Katayanagi, K. Morikawa, H. H. Miyashiro, M. Ikehara, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1991**, 88, 11535
- [83] G.L. Eichhorn, J.J. Butzow, *Biopolymers*, **1965**, 3, 79
- [84] J. R. Morrow, L. A. Buttney, V. M. Shelton, K. A. Berback, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1903
- [85] K. Matsumara, M. Endo, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **1994**, 2019
- [86] J. Hall, D. Hüsken, U. Pielles, H. E. Moser, R. Häner, *Chem Biol.*, **1994**, 1, 185
- [87] D. Magda, R. A. Miller, J. L. Sessler, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 7439
- [88] D. Magda, S. Crofts, A. Lin, D. Miles, M. Wright, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 2293

- [89] D. Magda, M. Wright, S. Crofts, A. Lin, J. L. Sessler *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 6947
- [90] J. Hall, D. Hüsken, R. Häner, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 3522
- [91] R. Häner, J. Hall, A. Pfützer, D. Hüsken, *Pure Appl. Chem.*, **1998**, 70, 111
- [92] J. K. Bashkin, E. I. Frolova, U. Sampath, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 5981
- [93] A. T. Daniher, J. K. Bashkin, *Chem. Commun.*, **1998**, 1077
- [94] W. C. Putnam, J. K. Bashkin, *Chem. Commun.*, **2000**, 767
- [95] B. N. Trawick, T. A. Osiek, J. K. Bashkin, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 900
- [96] W.C. Putnam, A. T. Daniher, B.N. Trawick, J.K. Bashkin, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, 29, 2199
- [97] B. Linkletter, J. Chin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, 37, 472
- [98] H. Inoue, T. Furukawa, T. Tamura, A. Kamada, E. Ohtsuka, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **2001**, 20, 833
- [99] H. Inoue, T. Furukawa, M. Shimizu, T. Tamura, M. Matsui, E. Ohtsuka, *Chem. Commun.*, **1999**, 45
- [100] S. Sakamoto, T. Tamura, T. Furukawa, Y. Komatsu, E. Ohtsuka, M. Kitamura, H. Inoue, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 1416
- [101] H. Åström, N. H. Williams, R. Strömberg, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 1461
- [102] H. Åström, R. Strömberg, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1901
- [103] A. Whitney, G. Gavory, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.*, **2003**, 36
- [104] J. Hovinen, A. Guzaev, E. Azhayeva, A. Azhayev, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 2205
- [105] H. Irving, D. Mellor, *J. Chem. Soc.*, **1962**, 5222
- [106] M. Kodama, E. Kimura, *J. Chem Soc. Dalton Trans.*, **1977**, 2269
- [107] T. Niittymäki, U. Kaukinen, P. Virta, S. Mikkola, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 174
- [108] T. Niittymäki, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 1275
- [109] E. Kimura, M. Kikuchi, H. Kitamura, T. Koike, *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 3113
- [110] S. Matsuda, A. Ishikubo, A. Kuzuya, M. Yashiro, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 3284
- [111] M. Endo, Y. Azuma, Y. Saga, A. Kuzuya, G. Kawai, M. Komiyama, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 846
- [112] J. C. Verheijen, B.A. L. M. Deiman, E. Yeheskiely, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 369

- [113] R. T. Raines, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1045
- [114] V. Vlassov, T. Abramova, R. Giege, V. Silnikov, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **1997**, *7*, 39
- [115] L. Yurchenko, V. Silnikov, T. Godovikova, G. Shishkin, J.-J. Toulme, V. Vlassov, *Nucleosides Nucleotides*, **1997**, *16*, 1721
- [116] N. G. Beloglazova, N. N. Polushin, V. N. Silnikov, M. A. Zenkova, V. V. Vlassov, *Dokl. Akad. Nauk*, **1999**, *369*, 827
- [117] N. G. Beloglazova, N. N. Polushin, M. A. Zenkova, V. V. Vlassov, *FEBS Lett.*, **2000**, *481*, 277
- [118] N. G. Beloglazova, A. Y. Epanchintsev, V. N. Silnikov, M. A. Zenkova, V. V. Vlassov, *Mol. Biol. Engl. Ed.*, **2002**, *36*, 731
- [119] I. Y. Garipova, V. N. Silnikov, *Russ. Chem. Bull.*, **2002**, *51*, 1112
- [120] N. G. Beloglazova, M. M. Fabani, M. A. Zenkova, E. V. Bichenkova, N. N. Polushin, V. N. Silnikov, K. T. Douglas, V. V. Vlassov, *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, 3887
- [121] B. Verbeure, C. J. Lacey, M. Froeyen, J. Rozenski, P. Herdewijn, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 333
- [122] M. A. Reynolds, T. A. Beck, P. B. Say, D. A. Schwartz, B. P. Dwyer, W. J. Daily, M. M. Vaghefi, M. D. Metzler, R. E. Klem, L. J. Arnold, Jr., *Nucleic Acids Res.*, **1996**, *24*, 760
- [123] N. L. Mironova, D. V. Pyshnyi, E. M. Ivanova, M. A. Zenkova, H. J. Gross, V. V. Vlassov, *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, 1982
- [124] N. L. Mironova, D. V. Pyshnyi, E. M. Ivanova, V. F. Zarytova, M. A. Zenkova, H. J. Gross, V. V. Vlassov, *Russ. Chem. Bull.*, **2002**, *51*, 1177
- [125] N. L. Mironova, Y. I. Boutorine, D. V. Pyshnyi, E. M. Inanova, M. A. Zenkova, V. V. Vlassov, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **2004**, *23*, 885
- [126] E. Riguet, S. Tripathi, B. Chaubey, J. Desire, V. N. Pandey, J.-L. Decout, *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 4806
- [127] H. -Y. Mei, A. A. Galan, N. S. Halim, D. P. Mack, D. W. Moreland, K. B. Sanders, H. N. Truong, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, *5*, 2755
- [128] R. N. Zuckermann, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1989**, *86*, 1766
- [129] R. N. Zuckermann, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 6594

- [130] R. Garzon, M. Fabbri, A. Cimmino, G. A. Calin, C. M. Croce, *Trends Mol. Med.*, **2006**, 12, 580
- [131] M. Komiyama, T. Inokava, K. Yoshinari, *Chem. Commun.*, **1995**, 77
- [132] M. Komiyama, T. Inokava, *J. Biochem.*, **1994**, 116, 719
- [133] R. J. Jarvest, J. M. Berge, V. Berry, H. F. Boyd, M. J. Brown, J. S. Elder, A. K. Forrest, A. P. Fosberry, D. R. Gentry, M. J. Hibbs, D. D. Jaworski, P. J. O'Hanlon, A. J. Pope, S. Rittenhouse, R. J. Sheppard, C. Slater- Radosti, A. Worby, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1959
- [134] Prof. Dr. R. Berger, *persönliche Mitteilung*, **2009**
- [135] S. Pitsch, U. Scheffer, M. Hey, A. Strick, M. W. Göbel, *Helv. Chim. Acta*, **2003**, 86, 3740
- [136] *Handbuch ALFexpress*, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden, **1995**, Edition AA
- [137] C. Gnaccharini, S. Peter, U. Scheffer, S. Vonhoff, S. Klussmann, M. W. Göbel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 8063
- [138] L. A. Hegg, M. J. Fedor, *J. Biochemistry*, **1995**, 34, 15813
- [139] S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 9, 4262
- [140] R. A. Copeland, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, Wiley-VCH, **2000**, chapter 4
- [141] W. F. Lima, S. T. Crooke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 10010
- [142] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello: *Nature* , **1998**, 391, 806
- [143] <http://online-media.uni-marburg.de/physiolchem/praktikum/Enzyme.pdf>

9.5 Lebenslauf

Zur Person: Kathrin Dörr geb. Beier
geboren am 8. September 1980 in Menden
verheiratet

Schulische und berufliche Ausbildung:

1987-1991: Grundschule Kronberg im Taunus

1991-2000: Altkönigschule Kronberg, Gymnasialzweig der Gesamtschule
(Allgemeine Hochschulreife)

Okt. 2000: Beginn des Studiums der Chemie an der J. W. Goethe
Universität Frankfurt/Main

Okt. 2002: Diplom-Chemiker Vorprüfung

Aug. 2005: Diplom-Chemiker Hauptprüfung
Diplomarbeit im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel am
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie mit dem
Thema „Zur Synthese RNA-spaltender Bisbenzimidazole mit
Benzophenongrundgerüst“

Okt. 2005-
Juli 2009: Promotion bei Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für
Organische Chemie und Chemische Biologie mit dem Thema
„Optimierung von Kinetik und Spezifität künstlicher metallfreier
Ribonucleasen“

April 2010-
April 2011: Elternzeit

9.6 Publikationen

Posterbeitrag: "NMR-spectroscopic investigations of RNA and RNA-ligand-complexes - Labeling of full length Ψ -RNA", Jan Ferner, Henry Jonker, Raja Karrupiah, Kathrin Dörr, Ute Scheffer, Harald Schwalbe *et. al.*, SFB 579 „RNA-Ligand-Wechselwirkungen“, 2010

9.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation zum Thema „Optimierung von Kinetik und Spezifität künstlicher metallfreier Ribonucleasen“ selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Kronberg im Taunus, den 21.10.2011