

**Synthese und Charakterisierung
biologischer Hybridpolymere zur
gentechnologischen Anwendung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz

Andreas Böckler

Geb. in Bad Windsheim

Mainz, Juni 2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2011 bis Juni 2014 am Institut für Physikalische Chemie unter der Betreuung von [REDACTED] und am Institut für Molekulargenetik in Kooperation mit [REDACTED] an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen entnommen sind, sind als solche deutlich gekennzeichnet. Die Dissertation ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Mainz, 20. Juni 2014

Meinen Eltern

I can accept failure,
But I can not accept not trying.

(Michael Jordan)

Kurzfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine gezielte, hochspezifische Inhibierung der Proteinbiosynthese zu erreichen. Dies kann durch eine Blockierung des mRNA-Strangs durch komplementäre DNA/RNA-Stränge (ähnlich zur Antisense-Methode) oder durch die Hydrolyse des mRNA-Strangs mit Hilfe spezieller Enzyme (RNasen) realisiert werden. Da jedoch beide Methoden nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen führen, wäre deshalb eine Kombination aus beiden Methoden ideal, welche in einer spezifischen, gezielten und permanenten Ausschaltung der Proteinbiosynthese resultieren würde. Um dieses Ziel zu verwirklichen, ist es nötig, ein Molekül zu synthetisieren, welches in der Lage ist selektiv an einer spezifischen Position an den RNA-Strang zu hybridisieren und anschließend den RNA-Strang an dieser zu hydrolysieren. Der große Vorteil dieses Konzepts liegt darin, dass die DNA-Sequenz für die Hybridisierung an die entsprechende RNA maßgeschneidert hergestellt werden kann und somit jede RNA gezielt angesteuert werden kann, was letztendlich zu einer spezifischen Inhibierung der korrespondierenden Proteinbiosynthese führen soll.

Durch die Verwendung und Optimierung der Nativen Chemischen Ligation (NCL) als Konjugationsmethode konnten zwei Biomakromoleküle in Form einer 46-basenlangen DNA (komplementär zum RNA-Strang) und einer 31-aminosäurelangen RNase kovalent verknüpft werden. Durch unterschiedliche chemische und molekularbiologische Analysemethoden, wie PAGE, GPC, CE, MALDI-ToF-MS etc., war es zudem möglich, die erfolgreiche Synthese dieses biologischen Hybridpolymers als monodisperses, reines Produkt zu bestätigen.

Die Synthese des ca. 800-basenlangen RNA-Strangs, der als Modell-Matrize für die selektive und spezifische Degradierung durch das DNA-RNase-Konjugat dienen sollte, konnte unter Zuhilfenahme gentechnologischer Standard-Methoden erfolgreich bewerkstelligt werden. Weiterhin konnte durch die Verwendung der radioaktiven cDNA-Synthese gezeigt werden, dass das DNA-RNase-Konjugat an die gewünschte Stelle des RNA-Strangs hybridisiert. Die Identifizierung einer anschließenden spezifischen Hydrolyse des RNA-Strangs durch die an den DNA-Strang angeknüpfte RNase war aufgrund der geringen katalytischen Aktivität des Enzyms bisher allerdings nicht möglich.

Summary

The aim of the present work was to specifically inhibit the protein biosynthesis. This can be achieved by either blocking the mRNA strand with a complementary DNA/RNA strand (similar to antisense) or by hydrolyzing the mRNA strand with specific enzymes (RNases). Both methods have their respective flaws. Ideally, a combination of both methods would result in a specific, target-oriented and permanent break down of protein biosynthesis. In order to achieve this goal it is necessary to synthesize a molecule capable of selective hybridization and subsequently able to hydrolyze the RNA strand at a known position. The major advantage of this technique would be that the DNA sequence can be tailored for hybridizing to specific RNA sequences thus making it possible to target and inhibit a specific protein biosynthesis.

By using and optimizing native chemical ligation (NCL) as a coupling technique a 46-base long DNA (complementary to the RNA strand) and a 31-amino acid long RNase were covalently linked. Chemical and molecular biological characterization methods including PAGE, GPC, CE, MALDI-ToF-MS were used to confirm the successful and monodisperse synthesis of this biological, highly pure hybrid polymer (DNA-RNase-conjugate).

Genetic engineering was used to create a 800-base long RNA strand as a model system to be exposed to specific cleavage by the DNA-RNase-conjugate. Furthermore, it was shown by radioactive cDNA synthesis that the DNA-RNase-conjugate hybridized to the desired sequence of the RNA strand. Unfortunately, a following hydrolyzation of the RNA strand by the RNase part of the DNA-RNase-conjugate was not clearly detectable due to the lack of catalytic activity of the enzyme.

Abkürzungsverzeichnis:

A	<u>A</u> denin
„Ac“-Lösung	Lösung bestehend aus ca. 50% Acetonitril und Wasser
AcCN	Acetonitril
AG	<u>A</u> garose- <u>G</u> elelektrophorese
Amp	<u>A</u> mpicillin
aRNA	<u>A</u> ntisense- <u>R</u> NA
APS	<u>A</u> mmoniumperoxo <u>s</u> ulfat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BT	<u>B</u> enzyl <u>t</u> hioester
C	<u>C</u> ytosin
cDNA	<u>C</u> omplementary- <u>D</u> NA
CE	<u>C</u> apillary <u>e</u> lectrophoresis/Kapillarelektrophorese
CEE	<u>C</u> ontinuous <u>E</u> lution <u>E</u> lectrophoresis/ Kontinuierliche Elutionselektrophorese
CPG	<u>C</u> ontrolled <u>P</u> ore <u>G</u> lass
Cys	<u>C</u> ystein
DMAP	4-(<u>D</u> imethyl <u>a</u> mino) <u>p</u> yridin
DMT	<u>D</u> imethoxy <u>t</u> ryl
DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid/Desoxyribonukleinsäure
DHB:	2,5- <u>D</u> ihydroxy <u>b</u> enzoesäure
<i>E. coli</i>	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
EDTA	<u>E</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
EF1 α	<u>E</u> longations <u>f</u> aktor 1 α
G	<u>G</u> uanin
GPC	<u>G</u> el <u>p</u> ermeations <u>c</u> hromatografie
GTP	<u>G</u> uanin <u>t</u> risphosphat
HIV	<u>H</u> umane <u>I</u> mmundefizienz- <u>V</u> irus
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography/ Hochleistungsflüssigchromatografie
IL-8	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin 8
IPTG	<u>I</u> sopropyl- β -D- <u>t</u> hiogalactopyranosid

IR	<u>I</u> n <u>f</u> r <u>a</u> r <u>o</u> t
IVT	<u>I</u> n <u>v</u> itro <u>T</u> r <u>a</u> n <u>s</u> k <u>r</u> i <u>p</u> t <u>i</u> o <u>n</u>
Lac-Operon	<u>L</u> actose- <u>O</u> peron
MALDI-ToF-MS	<u>M</u> atrix- <u>a</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption/ <u>I</u> onisation- <u>T</u> ime of <u>F</u> light – <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry
MCS	<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite
MES	2-(<u>N</u> - <u>M</u> orpholino) <u>e</u> thansulfonsäure
„Mix“-Lösung	Lösung bestehend aus ca. 25 % Acetonitril
MOPS	3-(<u>N</u> - <u>M</u> orpholino)- <u>p</u> ropan <u>s</u> ulfonsäure
MPAA	4- <u>M</u> ercaptophenyl <u>a</u> cetic <u>a</u> cid/ 4-Mercaptophenyllessigsäure
mRNA	<u>M</u> essenger-RNA
NCL	<u>N</u> ative <u>C</u> hemical <u>L</u> igation
NHS	<u>N</u> - <u>H</u> ydroxysuccinimid
NP-HPLC	<u>N</u> ormalphasen-HPLC
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
ODN	<u>O</u> ligodeoxynukleotid
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction/ Polymerase-Kettenreaktion
PrepCell	Präparative Gelelektrophorese
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid/ Ribonukleinsäure
rRNA	<u>R</u> ibosomale RNA
RNAi	RNA <u>i</u> nterference
RISC	<u>R</u> NA- <u>i</u> nduced <u>s</u> ilencing <u>c</u> omplex/ RNA-induzierender Stilllegungskomplex
RNase	<u>R</u> ibonuklease
rNTP	<u>R</u> ibonukleotid <u>t</u> riphosphat
RP-HPLC	<u>R</u> eversed <u>p</u> hase-HPLC/ Umkehrphasen-HPLC
SEC	<u>S</u> ize <u>e</u> xclusion <u>c</u> hromatography/ Größenausschlusschromatografie
siRNA	<u>S</u> mall <u>I</u> nterference RNA
SPPS	<u>S</u> olid <u>P</u> hase <u>P</u> eptide <u>S</u> ynthesis/ Festphasenpeptidsynthese
T	<u>T</u> ymin
Taq	<u>T</u> hermus <u>a</u> quaticus
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA

TEMED	<u>T</u> etramethylethylend <u>ia</u> min
TCEP	<u>T</u> ris (2- <u>c</u> arboxy <u>e</u> thyl) <u>p</u> hosphin
THAP	<u>T</u> ri <u>h</u> ydroxy <u>a</u> cetop <u>h</u> enon
TRIS	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<u>T</u> ransfer-RNA
U	<u>U</u> racil
UV/Vis	<u>U</u> ltraviolett/ <u>V</u> isible
ZFY	<u>Z</u> inc <u>f</u> inger <u>Y</u> -chromosomal

Abkürzungen in Formeln

A	Absorption
c	Konzentration
d	Schichtdicke der Küvette
e	Elementarladung
E	Elektrisches Feld
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient
ϵ_0	Dielektrizitätskonstante im Vakkum
ϵ_r	Relative Dielektrizitätskonstante
f	Reibungskoeffizient
F	Faraday-Konstante
F_e	Elektrische Kraft
F_f	Reibungskraft
I_s	Ionenstärke
I	Intensität der Strahlung
k_B	Boltzmann-Konstante
ζ	Zeta-Potential
η	Viskosität
κ	Debye-Hückel-Abschirmlänge
M	Molmasse
m	Masse

N_A	Avogadro-Konstante
n	Stoffmenge
q	Ladung des Ions
R_H	Hydrodynamischer Radius
U	Spannung
μ	Elektrophoretische Mobilität
V	Volumen
v	Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen
v_{EOF}	Elektroosmotischer Fluss

Inhalt

Inhalt	
1 Einleitung	1
2 Motivation und Problemstellung.....	3
3 Theoretischer Hintergrund.....	8
3.1 Eigenschaften, Aufbau, Struktur und Synthese von Nukleinsäuren	8
3.1.1 Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	8
3.1.2 Ribonukleinsäuren (RNA).....	11
3.1.2.1 Biologische RNA-Synthese (Transkription).....	12
3.1.2.2 Molekularbiologische RNA-Synthese	13
3.2 Eigenschaften, Aufbau, Struktur und Synthese von Proteinen.....	18
3.2.1 Eigenschaften, Aufbau und Struktur	18
3.2.2 Proteinbiosynthese.....	21
3.2.3 Katalytisch aktive Protein (Enzyme)	23
3.2.4 RNasen	25
3.3 Konjugationsmethoden.....	27
3.4 Charakterisierungsmethoden	29
3.4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)	29
3.4.2 Gelpermeationschromatografie (GPC)	31
3.4.3 Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spektroskopie (MALDI-ToF-MS).....	33
3.4.4 UV/Vis-Spektroskopie	35
3.4.5 Elektrophorese	36
3.4.5.1 Gelelektrophorese.....	38
3.4.5.2 Präparative Gelelektrophorese (PrepCell)	40
3.4.5.3 Kapillarelektrophorese.....	41
4 Ergebnisse und Diskussion	45
4.1 Synthesen	45
4.1.1 Darstellung des ODN-RNase-Konjugats.....	45
4.1.1.1 Darstellung des CPG-ODN-Benzylthioesters	45
4.1.1.2 Variation der Reaktionsbedingungen der Nativen Chemischen Ligation zur Optimierung der Ausbeute an ODN-RNase-Konjugat	46
4.1.1.2.1 Konjugation der blockierten RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ an einen Benzylthioester - Reaktionsbedingungen der NCL nach Kent	48
4.1.1.2.2 Untersuchung des Einflusses der Porengröße des Trägers	50

4.1.1.2.3	Untersuchung des Einflusses des Reaktionsmediums, der Porengröße des Trägers und der Reaktionsdauer	52
4.1.1.2.4	Untersuchung des Einflusses der Konzentration und des Überschusses der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ während der NCL.....	61
4.1.1.2.5	Konjugation der deblockierten RNase „Cys-ZFY-6“ und Variation der Reaktionsbedingungen bei der NCL.....	68
4.1.1.2.6	Untersuchung des Einflusses weiterer Lösemittel in Abhängigkeit der Konzentration, der Molarverhältnisse und der Anwesenheit an TCEP	71
4.1.1.2.7	Synthese des ODN-RNase-Konjugats im größerem Maßstab zur gentechnologischen Anwendung.....	74
4.1.1.2.8	Zusammenfassung: Synthese des ODN-RNase-Konjugats.....	76
4.1.1.3	Aufreinigung und Isolierung des ODN-RNase-Konjugats mittels präparativer Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Entsalzung	78
4.1.1.4	Charakterisierung des ODN-RNase-Konjugats.....	89
4.1.1.4.1	Gelpermeationschromatografie (GPC)	89
4.1.1.4.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	93
4.1.1.4.3	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass spectroscopy (MALDI-TOF-MS)	94
4.1.1.4.4	UV/Vis-Spektroskopie	96
4.1.1.4.5	Kapillarelektrophorese (CE)	100
4.1.1.4.6	Selektive Färbungsmethoden von DNA und Peptiden.....	102
4.1.2	Synthese der RNA	105
4.2	Prüfung der Primerspezifität durch radioaktive cDNA-Synthese	111
4.3	Prüfung der Enzymaktivität der RNase „Cys-ZFY-6“	116
4.3.1	Blockierte RNase „Cys-ZFY6-Acm“	116
4.3.2	RNase „Cys-ZFY-6“.....	117
4.3.2.1	Reduzierte Form (Monomer)	117
4.3.2.2	Oxidierter Form (Dimer).....	120
4.3.2.3	ODN-RNase-Konjugat.....	129
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	138
6	Experimenteller Teil.....	141
6.1	Synthesen	143
6.1.1	Darstellung des ODN-RNase-Konjugats.....	143
6.1.1.1	Darstellung des CPG-ODN-Benzylthioesters	143
6.1.1.2	Variation der Reaktionsbedingungen der Nativen Chemischen Ligation zur Optimierung der Ausbeute an ODN-RNase-Konjugats.....	144
6.1.1.2.1	Konjugation der blockierten RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ an einem Benzylthioester – Reaktionsbedingungen nach Kent.....	145
6.1.1.2.2	Untersuchung des Einflusses der Porengröße des Trägers	146

6.1.1.2.3	Untersuchung des Einflusses des Reaktionsmediums, der Porengröße des Trägers und der Reaktionsdauer	146
6.1.1.2.4	Untersuchung des Einflusses der Konzentration und des Überschusses der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ während der NCL.....	154
6.1.1.2.5	Konjugation der deblockierten RNase „Cys-ZFY-6“ und weitere Variation der Reaktionsbedingungen während der NCL.....	157
6.1.1.2.6	Untersuchung des Einflusses weiterer Lösemittel in Abhängigkeit der Konzentration, der Molarverhältnisse und der Anwesenheit von TCEP	158
6.1.1.2.7	Synthese des ODN-RNase-Konjugats im größerem Maßstab zur gentechnologischen Anwendung.....	160
6.1.1.2.8	Selektive Färbung von DNA und Peptiden	161
6.1.1.3	Purifikation des ODN-RNase-Konjugats mittels präparativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PrepCell)	162
6.1.1.4	Entsaltung des ODN-RNase-Konjugats nach präparativer PAGE.....	164
6.1.2	Synthese der RNA	166
6.1.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	166
6.1.2.2	Ligation in den Vektor pGEM®-T Easy.....	168
6.1.2.3	Transformation elektrokompenter Zellen	168
6.1.2.4	Plasmid-Isolierung.....	168
6.1.2.5	Restriktion und Ethanol-Fällung	169
6.1.2.6	In vitro Transkription und RNA-Fällung.....	170
6.2	Prüfung der Priming-Spezifität des ODNs und des ODN-RNase-Konjugats durch radioaktive cDNA-Synthese	172
6.2.1	Reines 46-basenlanges ODN und ODN-RNase-Konjugat	172
6.2.2	ODN-RNase-Konjugat.....	174
6.3	Prüfung der Enzymaktivität der RNase und des ODN-RNase-Konjugats.....	175
6.3.1	Enzymaktivität der blockierten RNase „Cys-ZFY-6-Acm“	175
6.3.2	Enzymaktivität der RNase „Cys-ZFY-6“	176
6.3.2.1	Reduzierte Form (Monomer)	176
6.3.2.2	Oxidierter Form (Dimer).....	176
6.3.3	Enzymaktivität des ODN-RNase-Konjugats.....	180
6.3.3.1	Zinkchlorid als Reaktionsmedium	180
6.3.3.2	Lima's Phosphatpuffer als Reaktionsmedium.....	182
6.4	Methoden und Materialien	185
6.4.1	Chemische Analysemethoden.....	185
6.4.1.1	GPC-Messungen.....	185
6.4.1.2	HPLC-Messungen.....	185
6.4.1.3	MALDI-TOF-MS	186

Inhalt

6.4.1.4	CE-Messungen	186
6.4.1.5	UV/Vis-Spektroskopie	186
6.4.2	Molekularbiologische Materialien und Methoden	187
6.4.2.1	Färbemittel und -methoden	187
6.4.2.2	Puffer und andere molekularbiologische Materialien	190
6.4.2.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	194
6.4.2.4	Präparative Gelelektrophorese (PrepCell)	195
6.4.2.5	Precast-NuPAGE	196
6.4.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	196
6.4.2.7	Nanodrop ND-1000	197
6.4.2.8	Agilent Bioanalyzer 2100.....	197
6.4.2.9	Sonstige verwendete Chemikalien	199
7	Anhang.....	201

1 Einleitung

Eine Vielzahl physiologischer, biochemischer sowie katalytischer Funktionen wird im Organismus von Proteinen gesteuert und beeinflusst^[1]. So sind sie als biologische Katalysatoren (Enzyme), Neurotransmitter, Transport- und Strukturelemente oder als Boten- und Signalstoffe im Organismus im Einsatz^[2]. Dabei ist nicht nur die Erforschung ihrer Funktion, ihres Aufbaus oder ihrer Biosynthese von wissenschaftlichem Interesse, sondern auch deren gezielte Modifizierung, Herunterregulierung oder Ein- bzw. Ausschaltung. Zur erfolgreichen Biosynthese eines bestimmten Proteins wird der entsprechende DNA-Abschnitt (Gen) durch eine RNA-Polymerase in eine RNA transkribiert (Transkription) und anschließend zur „reifen“ mRNA prozessiert. Diese Basensequenz der mRNA dient anschließend als Matrize für die Translation, bei der das entsprechende Protein synthetisiert wird^[2]. Eines der bekanntesten Beispiele (Medizin-Nobelpreis 2007) für die gezielte Ausschaltung eines Gens (und letztendlich der Proteinbiosynthese) stellen die sog. „Knockout -Mäuse“ dar, bei denen durch homologe Rekombination eines DNA-Abschnitts bestimmte Eigenschaften eines Gens ausgeschaltet werden können^[3]. So wurde z.B. in den von der Presse als „Muskelmäuse“^[4] bezeichneten Tieren das Gen für die Expression des Proteins Myostatin, welches für die Regelung des Muskelwachstums verantwortlich ist, ausgeschaltet. Dadurch kam es zu einem bis zu vierfachen Zuwachs an Muskelmasse. Dies könnte durchaus auch nützlich für die Tierzucht von Schweinen und Rindern sein, die dadurch mehr Fleisch als der Wildtyp produzieren könnten. Eine weitere Alternative sind sogenannte transgene Mäuse, bei denen z.B. das Gen für das Wachstumshormon der Ratte eingebracht wird. Diese wogen nahezu doppelt so viel wie der Wildtyp^[2]. Die Ein- und Ausschaltung von Genen ist besonders bedeutsam für die Erforschung genetischer Grundlagen von vielen Krankheiten wie Krebs, Diabetes sowie Erkrankungen des Herzkreislaufsystems^[5], bei denen genetische Ursachen als Krankheitsauslöser bekannt sind oder vermutet werden. Gen „knock out“ oder Gen „knock down“ ist natürlich auch bei andere Organismen möglich. Der zurzeit im Fokus der Medien stehende und sehr umstrittene „Gen-Mais 1507“ ist ein Beispiel bei dem durch gentechnologische Methoden fremde Eigenschaften, wie z.B. Resistenzen gegen bestimmte Schädlinge oder Krankheitserreger, eingebracht werden^[6]. Bei transgenen oder K.o.-Organismen ist die Grundlage stets eine Veränderung des Ursprungsgenoms, sprich einer Modifizierung auf DNA-Basis.

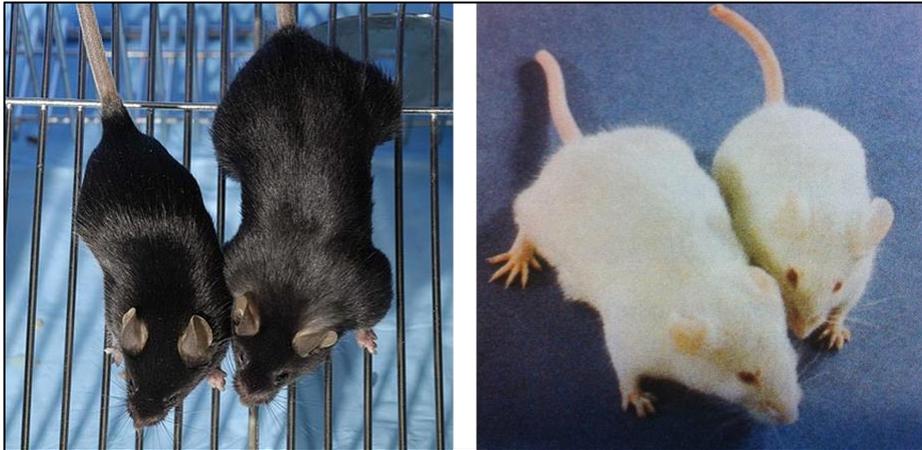


Abbildung 1-1: Bild links^[7]: Vergleich des Wildtyps (links) mit der gentechnisch veränderten Variante, bei der das Gen für die Expression des Proteins Myostatin ausgeschaltet wurde („Knock-Out-Maus“); Bild rechts^[2]: Vergleich des Wildtyps (rechts) mit der gentechnisch veränderten Variante, bei der das Gen für die Expression des Wachstumshormons der Ratte („rat growth factor“) eingebracht wurde („transgene Maus“)

Eine alternative und ebenfalls vielversprechende Methode zur gezielten Hemmung der Biosynthese eines Proteins stellt die Möglichkeit einer Blockierung der Translation durch synthetische Oligonukleotide (vorwiegend als RNA) komplementär zur mRNA dar (Antisense-Methode^[8]). Durch die (teilweise reversible) Hybridisierung der Oligonukleotide an den mRNA-Strang wird im Gegensatz zu den „Knockout-Mäusen“ nicht das Genom modifiziert, sondern die Inhibition der Genexpression wird hierbei vielmehr durch einen Eingriff auf mRNA-Ebene erzielt. Ein Beispiel für die kommerzielle Anwendung der Antisense-Methode ist die „Flavr-Savr-Tomate“^[9]. Die DNA wird hier in der umgekehrten Orientierung (mit einem Promotor auf der „falschen“ Seite) inkloniert, so dass der falsche, komplementäre Strang transkribiert wird und dadurch eine Antisense-RNA entsteht. Eine relativ neue Methode zum Ausschalten der Genexpression, welche auch in natürlichen eukaryotischen Zellen vorkommt, ist die „RNA-interference“ (RNAi) oder auch das „RNA-Silencing“ (Nobelpreis 2006). Hier wird ähnlich zur Antisense-Methode eine kurze, doppelsträngige RNA (siRNA) durch unterschiedliche Enzymkomplexe (RISC) und Proteinkomplexe (Argonautenproteine) an die mRNA hybridisiert, was wiederum zu dessen spezifischem Abbau führt^[10].

2 Motivation und Problemstellung

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der gezielten Hemmung der Proteinbiosynthese durch selektive und spezifische Degradation eines bestimmten mRNA-Strangs. Dabei soll mit Hilfe eines Oligonukleotid-Polypeptid-Hybridmoleküls eine spezifische Bindung an ein RNA-Molekül über molekulare Hybridisierung (Antisense-Methode) mit der Degradierungsaktivität von RNasen kombiniert werden. Der Nachteil der Antisense-Methode ist die unter Umständen lediglich nur reversible Hybridisierung (Gleichgewicht), was nach Freisetzung wieder einen Start der Proteinbiosynthese zur Folge hätte. Der Nachteil der Hydrolyse der mRNA durch RNasen ist ihre fehlende Spezifität. Es würde nicht nur der gewünschte mRNA-Strang fragmentiert werden, sondern auch alle anderen in der Zelle vorkommenden Arten der RNA, was aufgrund der hohen Konzentration an RNase zum Zelltod führt. Durch eine Kombination beider Eigenschaften, also einem Konstrukt aus komplementärer, einzelsträngiger DNA und peptidischer RNase, wäre es möglich, eine spezifische und vor allem permanente Blockierung der Translation zu erreichen, da durch die Hybridisierung lediglich die Ziel-mRNA spezifisch hydrolysiert und somit funktionsunfähig wird. Um dieses Konzept zu verwirklichen, ist es nötig, eine RNase an eine Oligonukleotid-Sequenz zu koppeln, die komplementär zu einer Region der Ziel-RNA in der Nähe des zu erzeugenden Schnitts liegt. Dabei wäre eine Hybridisierung mittels der Oligonukleotide an die mRNA möglich und die RNase könnte katalytisch aktiv werden und die mRNA spezifisch an einer Stelle schneiden (Abbildung 2-1).

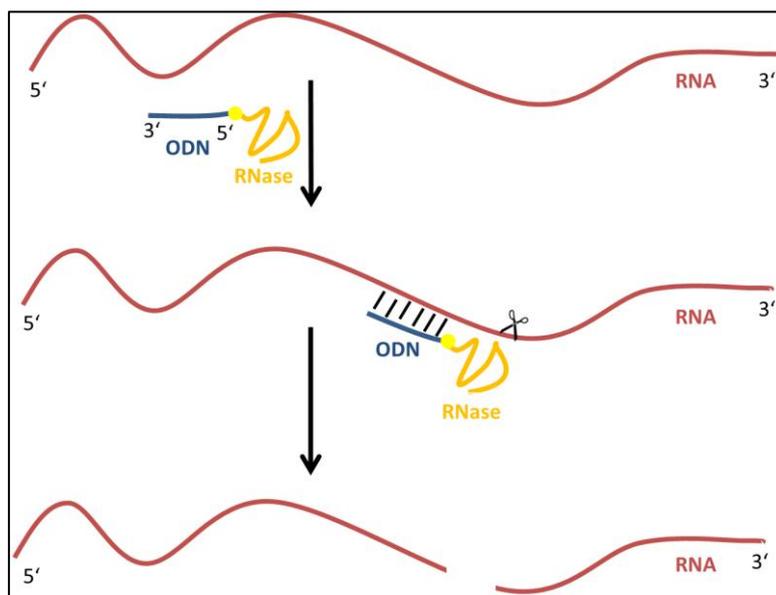


Abbildung 2-1: ODN-RNase-Konjugat hybridisiert an die RNA und hydrolysiert diese selektiv und spezifisch an einer bestimmten Stelle

Die Konjugation einer enzymatisch aktiven RNase an eine 46-basenlange DNA soll in dieser Arbeit über die „Native chemische Ligation“ (NCL) durchgeführt werden (Abbildung 2-3). Dabei sind bei der NCL zwei Bedingungen für eine erfolgreiche Umsetzung zu erfüllen. Eine Komponente trägt einen Thioester, die andere ein N-terminales Cystein. Entgegen etablierter Techniken in wässrigem Medium soll die Konjugation an einem festen Träger (controlled pore glass, CPG) stattfinden, was eine sehr breite und in der Durchführung sehr einfache Möglichkeit der Synthese bei stark erniedrigter Kontamination der Produkte durch Nutzung trägerbasierter Synthesekonzepte ermöglichen sollte. Dies erleichtert vor allem die Aufreinigung des Kopplungsprodukts erheblich. Eine weitere Neuerung soll darin bestehen, dass das Oligodesoxynukleotid (ODN) den Thioester, und das Peptid das N-ständige Cystein einbringen. Der entsprechende ODN-Thioester soll, wie folgt, synthetisiert werden: zu einer NHS-Ester-modifizierten ODN-Sequenz wird Benzylmercaptan zugegeben (Abbildung 2-2).

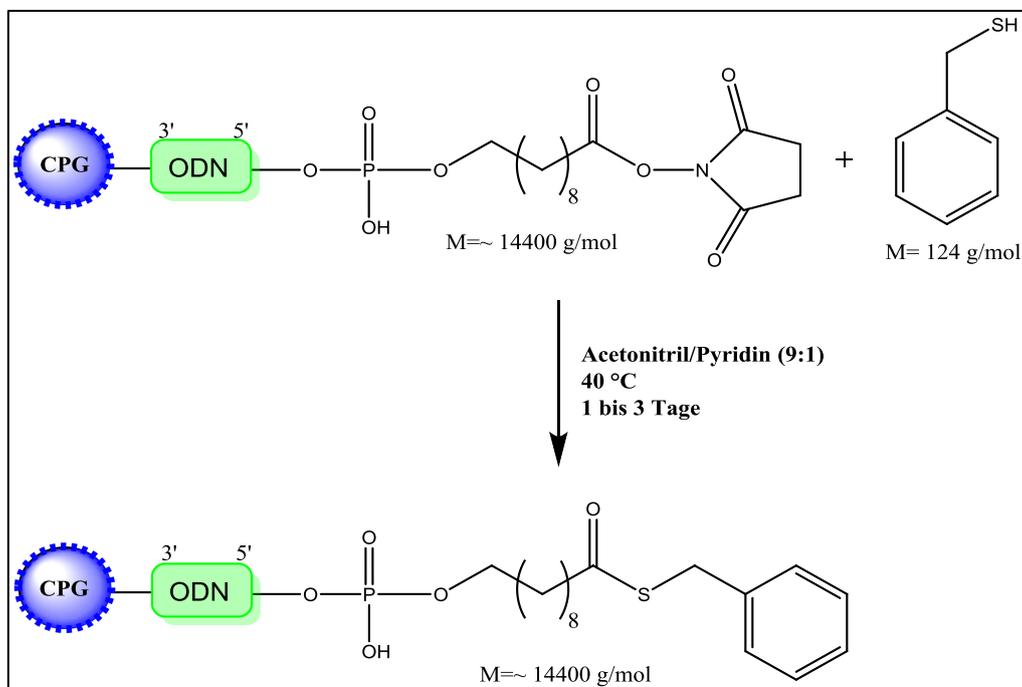


Abbildung 2-2: Darstellung eines CPG-ODN-Benzylthioesters aus dem kommerziell erhältlichen CPG-ODN (46-Basen)-NHS-Ester mit Benzylmercaptan

Ganz wesentliche Vorteile gegenüber etablierten Methoden sind die einfache Durchführbarkeit, die Verfügbarkeit hoher struktureller Variabilität und die bei kurzen Peptiden (<20 AS) garantiert hohe Ausbeute an Konjugaten als Zweiblockcopolymeren. Zudem sollte die Anwendung der NCL am Träger in der vorliegenden Arbeit auch deren hohe Spezifität und Selektivität garantieren, und die Ausbildung von möglichen Nebenprodukten verhindern.

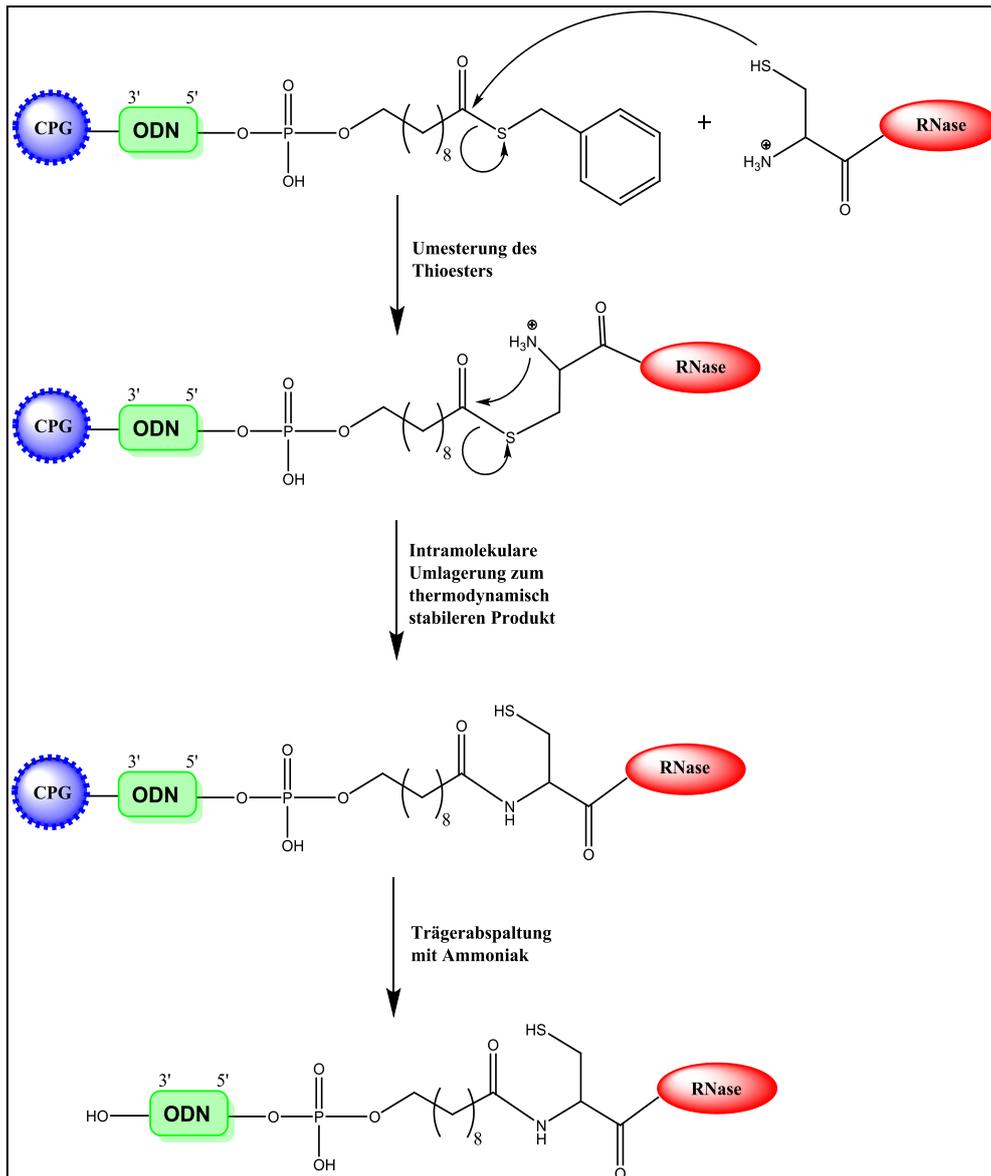


Abbildung 2-3: Native Chemische Ligation des 46-basenlangen ODNs und der RNase mit N-terminalem Cystein.

Sowohl die ODN-Thioester-Darstellung als auch die Konjugation der Oligodesoxynukleotide mit der RNase über das CPG-Verfahren stellen bislang unveröffentlichte synthetische Neuentwicklungen dar, auf deren Basis neue Strukturen mit vielversprechenden pharmakologischen und therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten zugänglich werden können. So könnte dieses Konzept durch die gezielte Inhibierung der Proteinbiosynthese (mRNA als Target-RNA) einen „Gene knock out“ bzw. „Gene knock down“ auslösen, was eine Reihe an medizinischen Anwendungsbereichen zur Folge hätte. Denkbar wäre die Hemmung der Proteinbiosynthese von Onkogenen^[11], welche Wachstumsfaktoren, Rezeptoren oder Transkriptionsfaktoren exprimieren und somit zu einer unkontrollierten Zellproliferation beitragen können. Ein weiterer Anwendungsbereich wäre die gezielte Degradierung bestimmter Virus-RNAs (z.B. HI-Virus). Dabei sollte aufgrund der Spezifität

des Biokonjugats lediglich die Virus-RNA und nicht die Wirts-RNA degradiert werden. Eine Degradierung der Virus-RNA, welche bei den meisten Viren als Erbinformationsspeicher dient, würde eine weitere Vermehrung eindämmen. Die Methode der RNAi (mit siRNA) ist hier nicht durchführbar, da entsprechende eukaryotische Mechanismen und Bausteine (RISC; Argonautenproteine) für einen erfolgreichen Abbau der RNA fehlen.

Literatur in Kapitel 1 und 2:

- [1] N. S. Hans-Dieter Jakubke, *Peptides, Chemistry and Biology*, WILEY-VCH Verlag, **2009**.
- [2] Spektrum Akademischer Verlag (Ed.) *Biochemie Stryer*.
- [3] K. R. Thomas, M. R. Capecchi, *Cell* **1987**, *51*, 503–512.
- [4] Spiegel Musklemäuse, can be found under <http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/manipulierte-nager-muskel-maeuse-jetzt-noch-staerker-a-502754.html>.
- [5] Nobelpreis Knockout Maus, can be found under http://download.springer.com/static/pdf/286/art%253A10.1007%252Fs00105-007-1444-4.pdf?auth66=1401134579_42a85e17d1ec5f3a24fde4e0e3464aa8&ext=.pdf.
- [6] Gen-Mais, "Spiegel", can be found under <http://www.spiegel.de/wissenschaft/natur/wie-gefaehrlich-genmais-wirklich-ist-a-952745.html>.
- [7] Bild muskelmaus, can be found under <http://de.wikipedia.org/wiki/Gen-Knockout>.
- [8] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584.
- [9] transgen, "Tomate Antisensemethode", can be found under <http://www.transgen.de/datenbank/pflanzen/70.doku.html>.
- [10] a) H. Siomi, M. C. Siomi, *Nature* **2009**, *457*, 396–404. b) M. Jinek, J. A. Doudna, *Nature* **2009**, *457*, 405–412. c) S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- [11] Onkogene, can be found under <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/onkogene/8402>.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Eigenschaften, Aufbau, Struktur und Synthese von Nucleinsäuren

3.1.1 Desoxyribonucleinsäuren (DNA)

Als Träger der Erbinformation ist die DNA einer der bedeutsamsten Biopolymere in der Natur. Sie besteht aus vier verschiedenen Monomerbausteinen (Nucleotide), die beliebig in 5'-3'-Richtung miteinander kombiniert werden können. Die Nucleotide selbst bestehen aus einem Phosphatrest, einer 2-Desoxy-β-D-Ribose und einer der vier verschiedenen Basen (Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin), welche über eine β-N-glykosidische Bindung mit der Desoxyribose-Einheit verbunden sind. Die einzelnen Nucleotide sind schließlich über eine 5'-3'-Phosphordiesterbindung miteinander verknüpft (Abbildung 3-1).

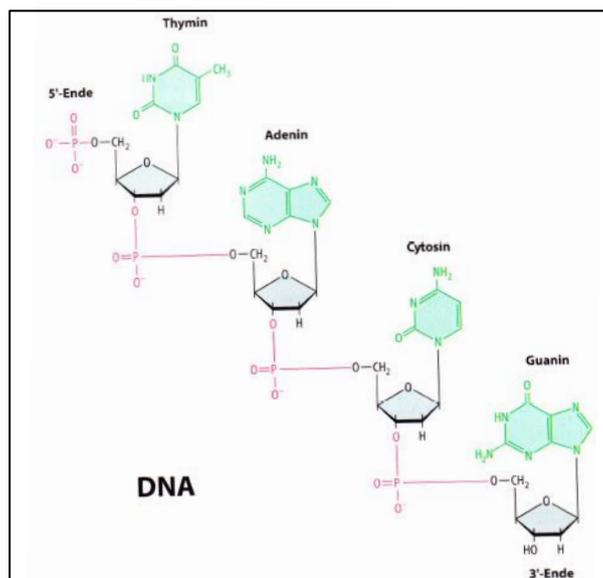


Abbildung 3-1: Aufbau eines DNA-Stücks aus vier Nucleotiden mit den entsprechenden Nucleobasen (grün), die über eine Phosphordiesterbrücke (rot) mit einander verknüpft sind^[2].

Die einzelnen, antiparallel angeordneten Nucleotidstränge bilden aufgrund von Van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Basen eine Doppelhelix. Des Weiteren ist die DNA durch eine große und kleine Furche in der Doppelhelix gekennzeichnet. Diese Furchen sind für die Interaktion der DNA mit Proteinen wichtig, um z.B. die erfolgreiche Verpackung der DNA im Chromatin zu gewährleisten. Sie kommen dadurch zustande, dass die komplementären Basenpaare zur unterschiedlichen Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigt sind. So können Adenin und Thymin zwei H-Brücken

ausbilden, Cytosin und Guanin dagegen drei (Abbildung 3-2). Diese Tatsache erklärt auch, weshalb DNA-Bereiche mit einem hohen GC-Gehalt thermodynamisch stabiler sind als Bereiche mit einem hohen AT-Gehalt und deshalb entsprechend höhere Schmelztemperaturen aufweisen^[2,3].

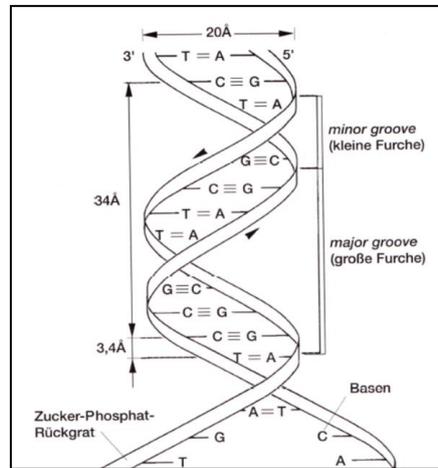


Abbildung 3-2: Strukturmodell der DNA-Doppelhelix^[2].

Die chemische Synthese der Oligodesoxynukleotide (ODN) ist heutzutage durch etablierte Festphasensynthesen (Abbildung 3-3), die Merrifield^[4] 1963 erstmals an Peptiden (SPPS) einföhrte, so ausgereift, dass nahezu jede ODN-Sequenz (bis 100 Basen) in guten Ausbeuten darstellbar ist. Durch den Einsatz eines inerten Trägers, zumeist „Controlled Pore Glass“ (CPG), wird das gewünschte Oligonukleotid über repetitive Kopplungsreaktionen aufgebaut und nach erfolgreicher Synthese vom Träger abgespalten. Die wiederholten Kopplungsreaktionen beruhen auf der von Khorana^[5] Ende der 70er-Jahre eingeföhrten DNA-Synthese in Lösung und von Caruthers 1984^[6] schließlich optimierten Phosphoramiditmethode an der Festphase. Durch die Festphasensynthese können Neben- und Zwischenprodukte durch Waschschrötte einfach abgetrennt werden, wodurch der Arbeitsaufwand deutlich minimiert wird. Die chemische Synthese wird im Gegensatz zur biologischen Synthese von 3'- in 5'-Richtung dargestellt. Dabei reagiert im entscheidenden Schritt der Kopplung eine freie 5'-Hydroxylgruppe mit einem 3'-Phosphoramidit. Ein kompletter Reaktionszyklus umfasst vier einzelne Schritte. Im ersten Schritt, der Tritylabspaltung, wird die säurelabile Dimethoxytrityl (DMT)-Schutzgruppe der am Träger gebundenen Nukleobase durch Trichloressigsäure in Dichlormethan abgespalten, um eine freie, reaktive Hydroxylgruppe am 5'-Ende zu erhalten. Diese freie Gruppe kann im zweiten Schritt, der Kopplung, mit dem zugesetzten Phosphoramidit reagieren und ein Dinukleotid bilden, welches über eine Phosphitbröcke verbunden ist. Im dritten Schritt muss verhindert werden, dass noch nicht umgesetzte Hydroxylgruppen in nächsten Syntheseschritten doch noch eine Kopplungsreaktion ermöglichen und so zu Oligonukleotiden mit fehlenden Basen

führen. Deshalb wird dieser kleine Prozentsatz (ca. 1%) durch ein sogenanntes Capping mit einer Acylgruppe blockiert. Im vierten und letzten Schritt, der Oxidation, muss schließlich noch die Phosphitbindung durch Iod zur Phosphatbindung oxidiert werden. Ein neuer Reaktionszyklus wird wieder vom ersten Schritt an gestartet und so lange wiederholt, bis die gewünschte Oligonukleotidsequenz synthetisiert wurde^[7].

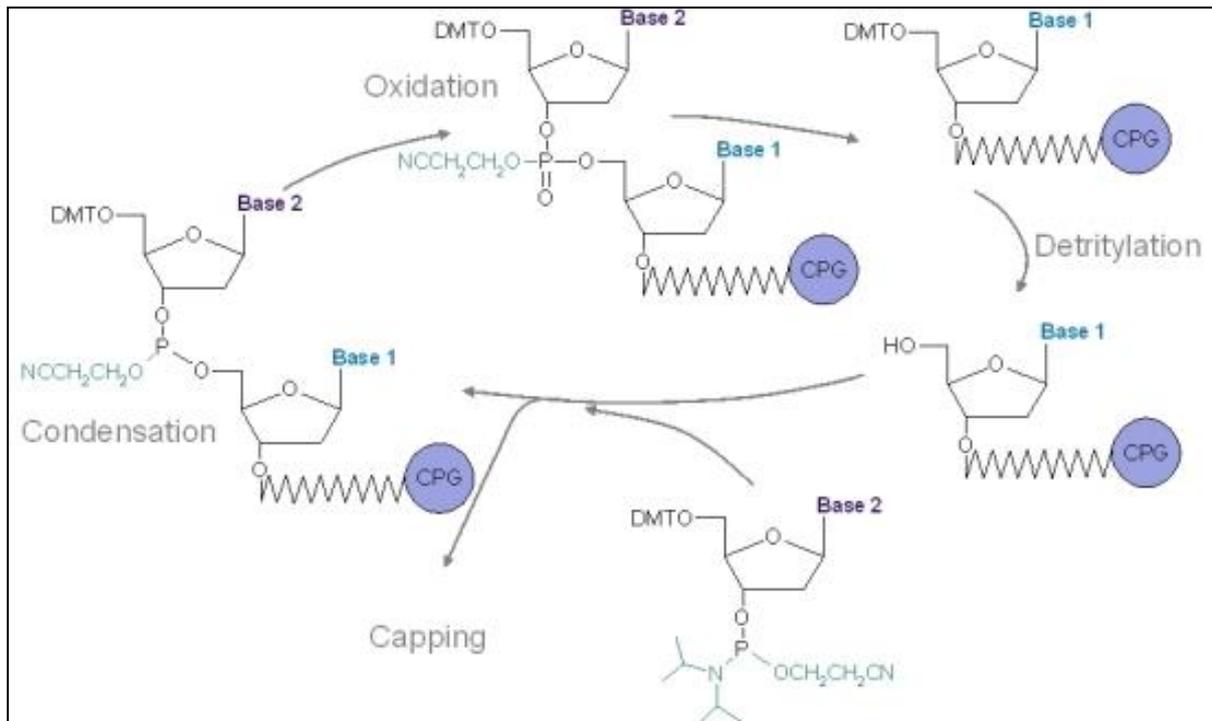


Abbildung 3-3: Syntheszyklus der chemischen Oligonukleotidsynthese an der Festphase (CPG)^[7].

3.1.2 Ribonukleinsäuren (RNA)

Zwischen den DNA- und RNA-Bausteinen gibt es grundlegend zwei strukturelle Unterschiede. Zum einen trägt der Riboserest am 2'C-Atom eine Hydroxygruppe, wodurch die RNA aufgrund der zusätzlichen Hydrolysemöglichkeit durch Basen deutlich instabiler wird. Zum anderen ist die DNA-Base Thymin in der RNA durch Uracil ersetzt, was essentiell für das DNA-Reparatursystems ist (Abbildung 3-4). Die zusätzliche Methylgruppe des Thymins dient als Markierung, die es von einem oxidativ desaminierten Cytosin, was zu einem merklichen Prozentsatz spontan geschieht, unterscheidet. Wäre diese Markierung nicht vorhanden, könnte man ein ordnungsgemäß eingebautes Uracil von einem durch Desaminierung gebildeten nicht unterscheiden. Der Defekt würde unbemerkt bleiben, sodass zwangsläufig in einem der Tochter-DNA-Moleküle aus einem GC-Basenpaar ein AU-Paar bzw. AT-Paar entstünde. Reparaturenzyme wie die Uracilglycosilase erkennen Uracile in der DNA und entfernen diese gezielt, so dass diese „Substitutionen“ nahezu gänzlich vermieden werden können. RNA wird aus energetischen Gründen hingegen nicht repariert. Des Weiteren ist die RNA im Gegensatz zur DNA bis auf wenige Ausnahmen (siRNA) einzelsträngig aufgebaut^[2,8].

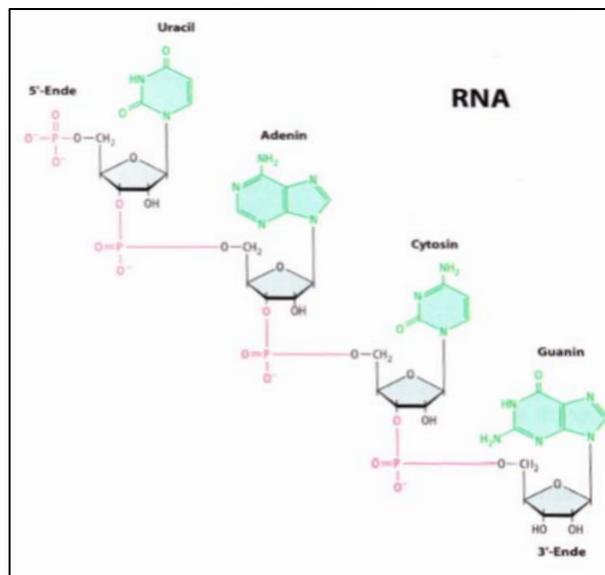


Abbildung 3-4: Struktur der RNA, am Beispiel der vier verschiedenen RNA-Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil^[2]

3.1.2.1 Biologische RNA-Synthese (Transkription)

Bei der Transkription wird die Sequenzinformation der DNA in RNA umgeschrieben. Katalysiert wird dieser dreistufige Prozess von Enzymen, den RNA-Polymerasen. Prokaryoten besitzen nur eine RNA-Polymerase, Eukaryoten hingegen vier. RNA-Polymerase II ist dabei das am besten untersuchte Enzym, da es für die Transkription von nahezu allen proteincodierenden Genen verantwortlich ist. Der Prozess der Transkription bei Eukaryoten ist recht kompliziert, insbesondere die Steuerung, ob und wann ein DNA-Abschnitt transkribiert wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Grundsätzlich lässt sich die Transkription in drei Stufen einteilen. Zunächst beginnt die Initiation an bestimmten Stellen der DNA, den Promotorstellen. Der entstandene Promotor/RNA-Polymerase-Komplex unterliegt strukturellen Veränderungen die für den Fortgang der Initiation wichtig sind. Durch das „Aufschmelzen“ der DNA-Doppelhelix entsteht die so genannte „Transkriptionsblase“ (Abbildung 3-5)^[8].

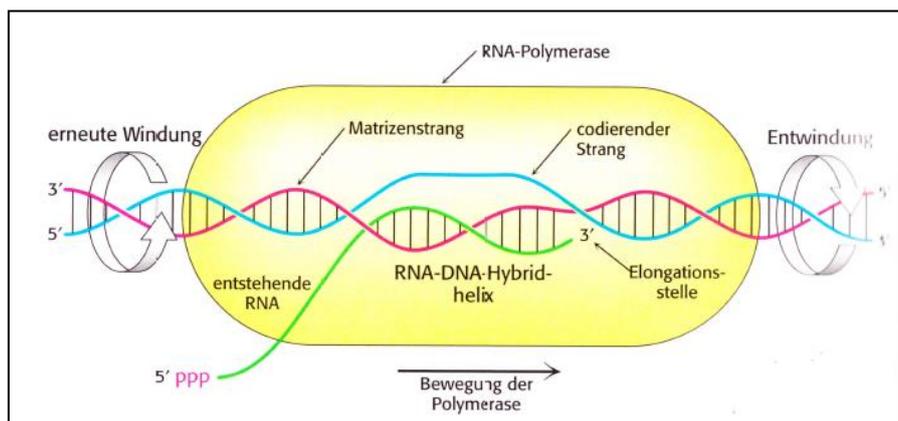


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der Transkriptionsblase während der Transkription^[8]

Nachdem die RNA-Polymerase einen kurzen RNA-Abschnitt (ca. 10 Nukleotide) transkribiert hat beginnt die zweite Phase, die Elongation. Die neu synthetisierte RNA bildet mit dem DNA-Matrizenstrang eine RNA-DNA-Hybridhelix, welche ca. 8 Basen lang ist. Das 3'-Hydroxyende der RNA ist so angelegt, dass es das α -Phosphoratom eines ankommenden Ribonukleosidphosphats attackieren kann. Pro Sekunde können so etwa 50 Nukleotide aneinandergereiht werden. Im Vergleich zur DNA-Synthese (800 Nukleotide pro Sekunde) ist sie relativ langsam. Die Transkriptionsblase bleibt während des kompletten Vorgangs gleich groß, d.h. die Entwindung und Rückwindung erfolgt gleich schnell. Der letzte Schritt, die Termination, ist mit der Polyadenylierung gekoppelt. Da der genaue Mechanismus der Termination noch nicht vollständig geklärt ist, sind grundsätzlich zwei verschiedene Mechanismen denkbar („Torpedomodell“ und „allosterisches Modell“)^[8].

3.1.2.2 Molekularbiologische RNA-Synthese

Eine rein chemische Synthese der RNA ist aufgrund der geringen Ausbeute der Festphasensynthese bedingt durch die Bildung vieler Fehlsequenzen im Bereich von hundert bis tausend Basen nahezu unmöglich. Deshalb ist das Nutzen molekularbiologischer Methoden eine sehr elegante und gut funktionierende Alternative. Die RNA-Synthese ist dabei in mehrere Schritte unterteilt die im Folgenden näher erläutert werden.

a) Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Man amplifiziert zunächst aus einer genomischen DNA (z.B. der Maus) durch geeignete Wahl der „Primer“ die gewünschte Nukleotidsequenz via Polymerase-Kettenreaktion (PCR)^[9]. „Primer“ sind Oligodesoxynukleotide, die an den komplementären DNA-Strang binden und somit den Startpunkt für DNA-Polymerasen vorgeben. Das generelle Funktionsprinzip ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Dabei wird im ersten Schritt der DNA-Doppelstrang bei 94-96°C denaturiert (Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindung), was zu dessen Auftrennung in zwei Einzelstränge führt. Nach raschem Abkühlen der Lösung auf 55-60°C können nun die „Primer“ an die Einzelstränge der DNA binden. Da die „Primer“, meist 20 bis 30 Nukleotide lang, im hohen Überschuss eingesetzt werden, kommt es nicht zur Reassoziaton des DNA-Doppelstrangs. Anschließend wird die Lösung auf 72°C erhitzt, bei eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-DNA-Polymerase) optimal arbeiten kann. Die Polymerase verlängert beide hybridisierten Primer in 3'-Richtung, da die biologische DNA-Synthese immer von 5' nach 3' erfolgt. Diese drei Schritte der Denaturierung, Hybridisierung der „Primer“ und der letztendlichen DNA-Synthese können beliebig oft wiederholt werden, wobei die Amplifikation des flankierten DNA-Stücks exponentiell verläuft. Das bedeutet, dass z.B. nach 35 Zyklen aus einem DNA-Doppelstrang $2^{36} = 68$ Milliarden Kopien erzeugt werden^[2].

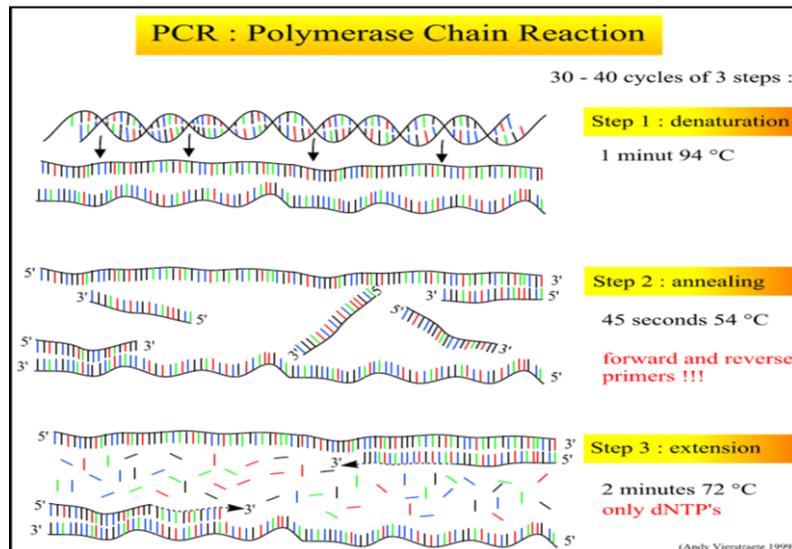


Abbildung 3-6: Die einzelnen Schritte eines Zyklus während der (PCR)^[10]

b) Ligation in ein Vektorsystem

Nach Vervielfältigung mittels PCR kann das gewünschte DNA-Stück in einen Vektor ligiert werden. Als Vektor wird in der Molekulargenetik ein Transportvehikel zur Übertragung von Fremd-DNA in eine lebende Empfängerzelle durch Transformation (Übertragung in Bakterienzellen) oder Transfektion (Übertragung in eukaryotische Zellen) bezeichnet. Ein sehr gängiges Vektorsystem stellt der von Promega kommerziell vertriebene Vektor pGEM®-T Easy dar (Abbildung 3-7). Das „T-Easy“ des Vektors leitet sich dabei von den Thymin(T)-Überhängen des nicht-zirkulären Vektors ab, da dadurch eine Einklonierung des PCR-Produkts, welches aufgrund von DNA-Polymerasen wie der Taq-Polymerase, die häufig ein zusätzliches Adenin(A) am 3'-Ende anhängen, erleichtert wird. Der linear vorliegende Vektor kann dadurch mit Hilfe von DNA-Ligasen, welche 3'-Hydroxy-Enden mit 5'-Phosphat-Enden verknüpfen, aufgrund der Hybridisierung der AT-Paarung leichter geschlossen werden. Dabei unterscheiden die DNA-Ligasen nicht zwischen Vektor-DNA und der mittels PCR amplifizierten DNA. Somit ist es grundsätzlich möglich, dass der Vektor auch ohne Intergrat (= PCR-Produkt) in der „Multiple Cloning Site“ (MCS) geschlossen wird. Die MCS ist dabei ein künstlich geschaffenes DNA-Stück, welches in einem Vektor integriert wird und dessen Sequenz mehreren Schnittstellen für Restriktionsenzyme, welche bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und spezifisch schneiden, dient^[8].

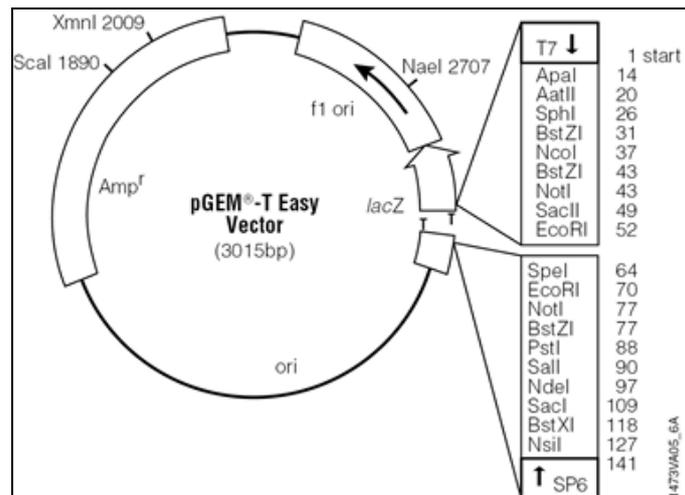


Abbildung 3-7: pGEM®-T Easy Vektorkarte^[11]; Amp^r: Gen zur Expression der Ampicillin-Resistenz; lacZ: lacZ-Gen zur Expression der β -Galaktosidase

c) Transformation in Zellen

Der Vektor wird anschließend durch Transformation in elektrokompente Zellen eingebracht. Eine sehr weit verbreitete Methode ist die Elektroporation^[12], da sie weitaus effektiver als die chemische Methode mit Calciumchlorid oder Rubidiumchlorid^[13] ist. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden dabei die Zellmembranen der Bakterienstämme (z.B. *E.coli*) vorübergehend permeabel, so dass Fremd-DNA in die Zelle eingeschlossen werden kann. Durch die Transformation des Vektors in die Zellen werden ebenfalls ausgewählte Eigenschaften durch Expression bestimmter DNA-Abschnitte des Vektors von den Bakterien übernommen. Diese in die Zellen neu eingebrachten Eigenschaften werden im weiteren Verlauf als Auswahlkriterien zur Ermittlung des gewünschten Klons herangezogen. Die als Blau-Weiß-Selektion bezeichnete Methode identifiziert dabei diejenigen Bakterien, welche den Vektor inkorporiert haben, und unterscheidet zusätzlich noch zwischen Bakterienzellen, die den Vektor ohne bzw. mit PCR-Intergrat aufgenommen haben. Für die Bestimmung vektortragender Zellen trägt dieser ein Gen, welches eine Antibiotika-Resistenz (im Falle von pGEM®-T Easy eine Ampicillin-Resistenz) vermittelt. Durch das Fehlen dieser Antibiotika-Resistenz der Zellen, die keinen Vektor aufgenommen haben, sterben die vektorlose Zellen beim Kultivieren auf einem Kulturmedium mit entsprechendem Antibiotikum ab. Es überleben somit nur diejenigen Bakterien, deren Zellmembran während der Elektroporation durchlässig für die Inkorporation des Vektors war. Als zweites Differenzierungskriterium wird die Expression der β -Galaktosidase durch das sogenannte lacZ-Gen herangezogen. Dabei handelt es sich um ein Operon, welches in Bakterien sowohl

beim Abbau als auch beim Transport von Laktose eine wichtige Rolle spielt. Die β -Galaktosidase erkennt und hydrolysiert Laktose in Glukose und Galaktose. Die Expression des Enzyms kann nur erfolgen, wenn das *lacZ*-Gen ohne DNA-Intergrat geschlossen wird. Eine Intergration der Fremd-DNA führt zu einer Unterbrechung des Gens und somit zu einer Fehlexpression des Enzyms. Nach erfolgter Expression der β -Galaktosidase ist sie in der Lage XGal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo und Galaktose zu spalten, d.h. blaue Klone tragen aufgrund der korrekten Schließung des *lacZ*-Gens keine Fremd-DNA (Abbildung 3-8).

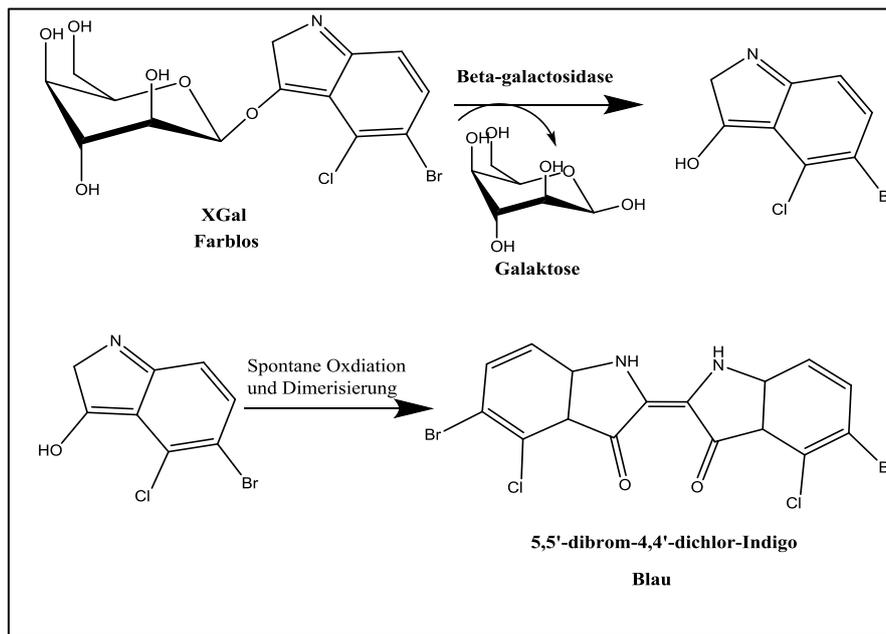


Abbildung 3-8: Reaktionsgleichung zur Spaltung von XGal durch β -Galaktosidase in Galaktose und 5,5'-dibrom-4,4'-dichlor-Indigo (blauer Farbstoff)

Eine weitere Kontrolle der Expression des *lacZ*-Gens erfolgt durch einen Promotor, bei dem die Genexpression durch einen Induktor (meist Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, IPTG oder Allolaktose) eingeleitet wird. Durch die Bindung des Induktors an den *lacZ*-Repressor *lacI* kommt es zu einer Konformationsänderung, was zu einer Inaktivierung des Repressors führt und den Start der Transkription zur Folge hat (Abbildung 3-9 rechts). Fehlt die Inaktivierung des Repressors, so bindet dieser an den Promoter, was zu einer Blockierung der RNA-Polymerase, und somit der Transkription und letztendlich der Translation führt (Abbildung 3-9 links). Folglich muss zur Expression der β -Galaktosidase ein Induktor zur Inaktivierung des Repressors vorhanden sein, um die Transkription des Gens starten zu können^[2].

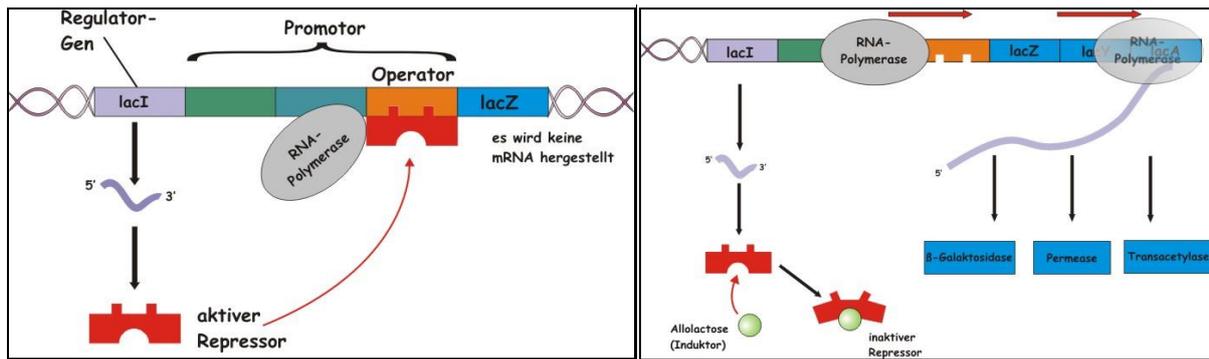


Abbildung 3-9^[14]: Steuerung der Expression des lacZ-Gens durch Inaktivierung des Repressors durch einen Induktor (hier Allolaktose); Links: Aktiver Repressor hemmt die Expression; Rechts: Inaktivierung des Repressors durch einen Induktor aktiviert die Expression des Gens.

d) Linearisierung des Vektors und abschließenden *in vitro* Transkription (IVT)

Restriktionsenzyme erkennen, wie oben schon beschrieben, bestimmte Basensequenzen in einem DNA-Doppelstrang und schneiden diesen an spezifischen Stellen. Dabei reichen in der Regel vier bis acht Basen zur spezifischen Erkennung aus, wobei jeweils die Phosphordiesterbindung hydrolysiert wird^[2]. Dadurch ist eine spezifische Linearisierung des Vektors durch Restriktionsenzyme für die abschließende *in vitro* Transkription (IVT) möglich. Bei der IVT wird die DNA-Sequenz in die entsprechende RNA-Sequenz durch RNA-Polymerasen umgeschrieben, die an bestimmte Promotorstellen, welche ebenfalls im Vektor enthalten sind, binden^[8]. Nachdem alle Materialien, wie Puffer, Ribonukleosid-triphosphate (rNTP), RNA-Polymerase und linearisierte DNA-Matrize, zur Verfügung gestellt wurden, läuft die *in vitro* Transkription, wie in Abbildung 3-5 beschrieben, ebenfalls in drei Schritten ab.

3.2 Eigenschaften, Aufbau, Struktur und Synthese von Proteinen

3.2.1 Eigenschaften, Aufbau und Struktur

Neben den Nukleotiden (DNA und RNA) ist die Familie der Proteine eine der wichtigsten Biopolymere in Lebewesen. Dabei haben sie eine große Vielfalt an Funktionen und Aufgaben; als Enzyme beispielsweise katalysieren sie chemische Reaktionen, als Strukturelemente bilden sie das Cytoskelett oder steuern als Signal- und Botenstoffe viele wichtige Funktionen im Organismus^[15]. Dabei sind sie aus 20 verschiedenen Bausteinen, den Aminosäuren (Abbildung 3-10), aufgebaut und bilden somit hochmolekulare Biopolymere.

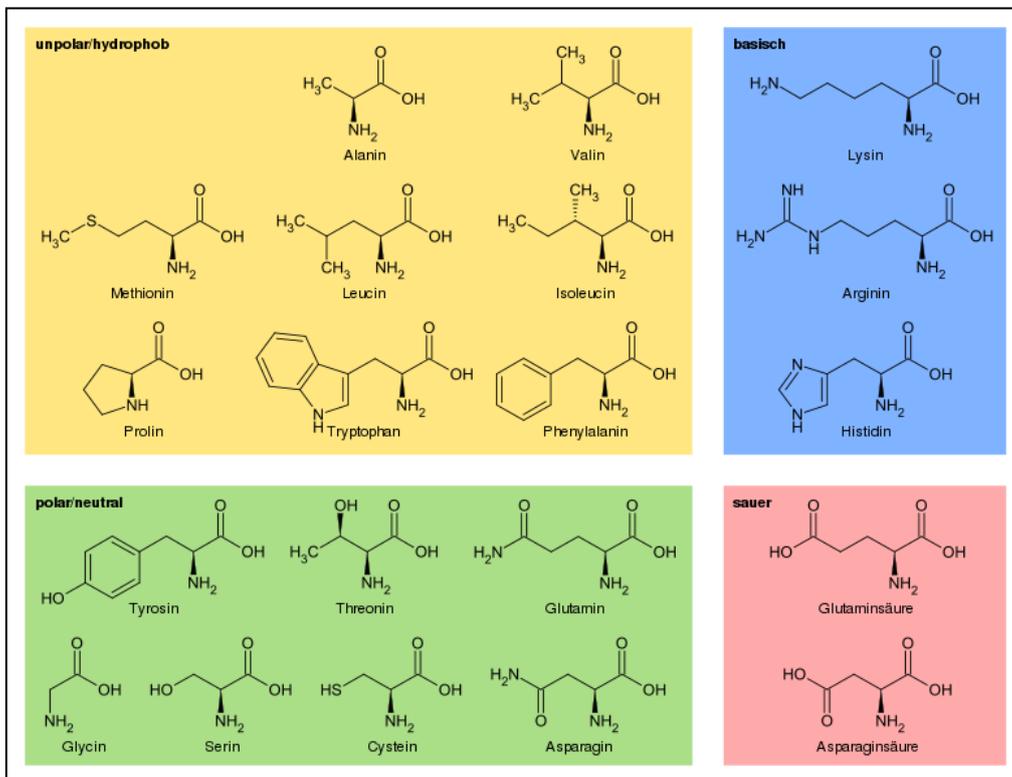


Abbildung 3-10: Übersicht über die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren geordnet nach ihren physikalisch/chemischen Eigenschaften^[16]

Die Aminosäuren sind untereinander über eine sehr stabile Säureamid-Bindung (sogenannte Peptidbindung) verknüpft und können Molmassen von mehreren Millionen Dalton (Da) erreichen. Diese Peptidbindung entsteht formal durch die Abspaltung von Wasser zwischen der Carboxy-Gruppe am C-Terminus der einen Aminosäure und der N-terminalen Aminogruppe der nächsten Aminosäure^[15].

Man unterteilt die Struktur von Proteinen in folgende vier Klassen:

Primärstruktur:

Die Primärstruktur der Proteine ist im Grunde ihre Aminosäuresequenz vom N-Terminus (links) zum C-Terminus (rechts). Im Allgemeinen dient ein Dreibuchstabencode zur Kennzeichnung. In Einzelfällen, z.B. bei der graphischen Darstellung von Raumstrukturen und für Vergleiche von Sequenzen, wird aus Platzgründen der Einbuchstabencode verwendet^[15].

Sekundärstruktur:

Als Sekundärstruktur bezeichnet man die Faltung der Peptidkette selbst. Sie ist durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den C=O und HN-Gruppen der Peptidbindungen stabilisiert. Je nach Aminosäuresequenz können sich unterschiedliche Sekundärstrukturen bilden. Die wichtigsten sind die β -Faltblattstruktur und die α -Helix.

Bei der β -Faltblattstruktur sind mehrere Peptidketten so nebeneinander gelegt, dass sich Wasserstoffbrücken ausbilden können. Durch die ziehharmonika-ähnliche Struktur sind die Aminosäureseitenketten senkrecht nach oben oder nach unten angeordnet. Durch die Abfaltung der jeweiligen Ebenen ist es möglich, dass sich Wasserstoffbrückenbindungen sowohl bei gegenläufigen, antiparallelen angeordneten Ketten als auch bei gleichläufigen, parallelen Ketten ausbilden können (Abbildung 3-11).

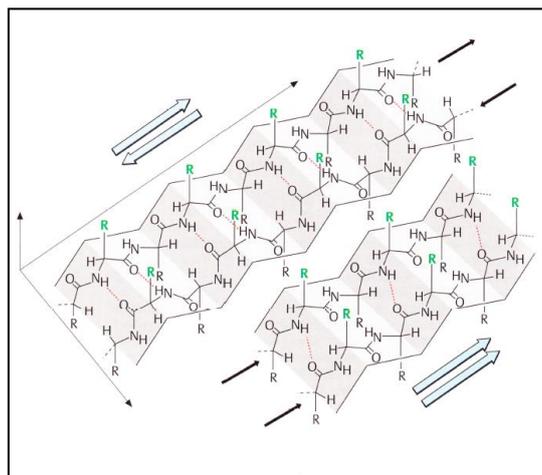


Abbildung 3-11: Oben: Faltblattstruktur mit gegenläufigen, antiparallelen Ketten. Die Aminosäureseitenketten (R) stehen nahezu senkrecht nach oben oder unten weg. Unten: Faltblattstruktur mit parallelen Ketten. Die breiten Pfeile deuten die symbolische Schreibweise der Faltenblätter an^[15]

Bei der α -Helix stehen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den C=O- und NH-Gruppen von Windung zu Windung im jeweils passenden Abstand gegenüber (Abbildung 3-12). Zumeist besteht eine Windung aus 3,6 Aminosäureresten. Die besondere Stabilität der α -Helix ergibt sich aus der Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen in Richtung der Schraubenachse. Die Aminosäureseitenketten stehen dabei nach außen von der Schraubenachse weg und können dadurch mit ihrer Umgebung, z.B. in Membranlipiden, wechselwirken. Die Aminosäure Prolin lässt sich aufgrund ihrer Ringstruktur nicht in die Helix einfügen und wird daher als Helixbrecher bezeichnet^[2].

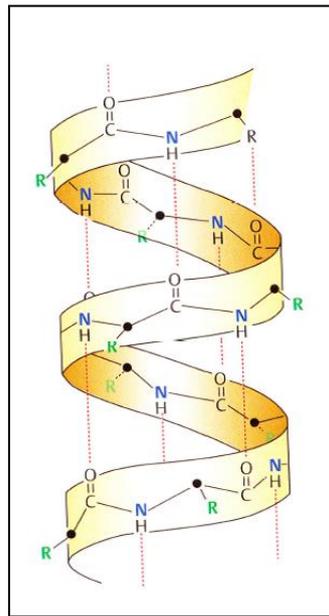


Abbildung 3-12: Schematische Darstellung der α -Helix als Peptidkette. Die Seitenketten (R) zeigen dabei von der Helix weg^[15].

Tertiärstruktur:

Die Lage aller Atome des Peptids im Raum wird durch die Tertiärstruktur beschrieben. Die Bindungskräfte, welche die Tertiärstruktur stabilisieren sind, wie oben bereits erwähnt, Wasserstoffbrückenbindungen. Des Weiteren wird die Tertiärstruktur durch Disulfidbindungen zwischen zwei Cysteinen, durch Ionenbeziehungen zwischen einer positiven (z.B. Lysin) und einer negativ geladenen Seitengruppe (z.B. Asparagin) und durch hydrophobe Wechselwirkungen (z.B. zwischen Isoleucin und Valin) zusammengehalten (Abbildung 3-13).

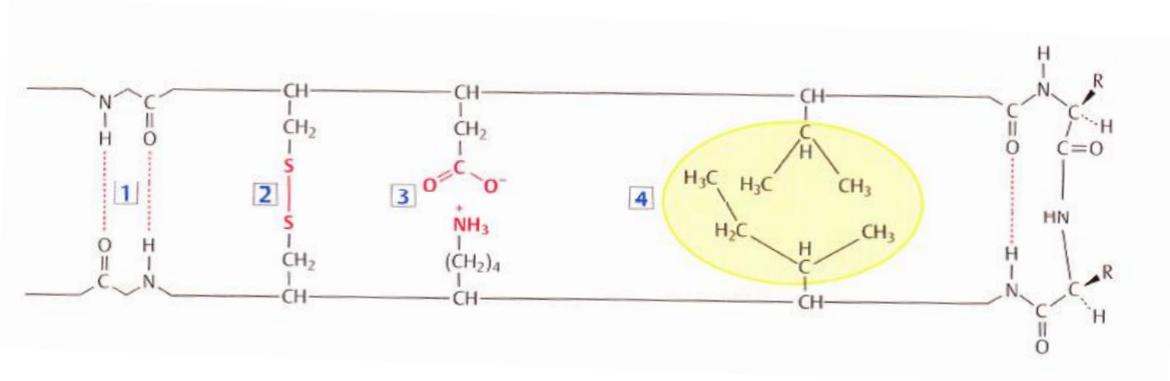


Abbildung 3-13: Verschiedene Bindungen und Wechselwirkungen in einer Peptidkette.
1: Wasserstoffbrückenbindungen; 2: Disulfidbindungen; 3: Ionische Wechselwirkung;
4: Hydrophobe Wechselwirkung^[15]

Quartärstruktur:

Die gefalteten Peptidketten eines globulären Proteins bilden häufig noch höhere Aggregate. Diese räumliche Gestalt wird als Quartärstruktur bezeichnet, wobei die einzelnen Peptidketten als Untereinheiten betitelt werden. Diese Untereinheiten müssen nicht zwangsläufig identisch sein, so gibt es beim Hämoglobin z.B. α - und β -Untereinheiten^[15].

3.2.2 Proteinbiosynthese

Die Biosynthese von Proteinen ist in zwei Schritte unterteilt, die zudem räumlich voneinander getrennt sind (Abbildung 3-14). Die in Kapitel 3.1.2.1 bereits erläuterte Transkription findet im Zellkern statt. Die transkribierte mRNA (Prä-mRNA) erhält an ihrem 5'-Ende eine Cap-Struktur, an ihrem 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz. Am wichtigsten aber ist, dass nahezu alle Prä-mRNAs gespleißt werden (RNA-Prozessierung), bevor sie durch die entsprechenden Proteine vom Zellkern zu den Ribosomen im Cytoplasma transportiert werden, an denen schließlich die Übersetzung der reifen mRNA in das entsprechende Protein (Translation) stattfindet^[8].

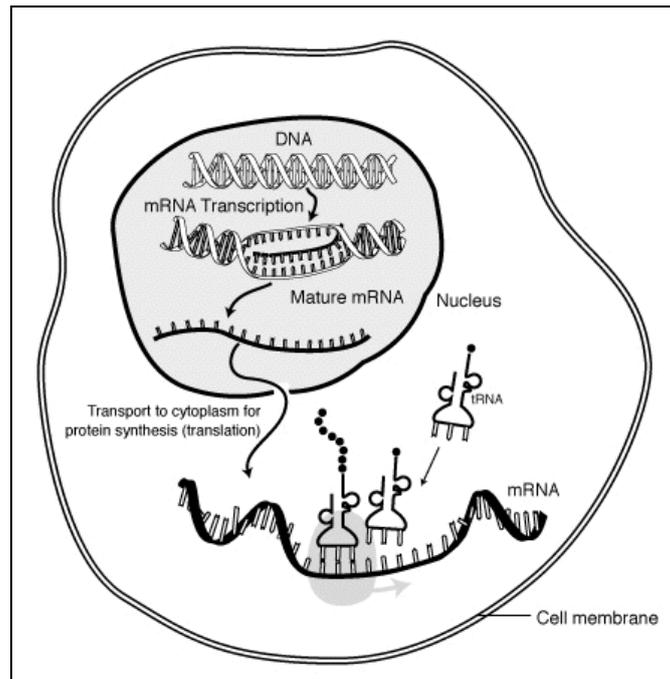


Abbildung 3-14: Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese ausgehend von der Transkription der DNA im Zellkern und anschließendem Transport ins Cytoplasma zu den Ribosomen zur Translation der reifen mRNA^[17].

Dieser komplizierte Prozess der Translation kann nur durch ein außergewöhnlich koordiniertes Zusammenspiel von mehreren hundert Makromolekülen (mRNA, tRNA, rRNA, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Proteinfaktoren) an den Ribosomen erfolgreich bewältigt werden. Außerdem muss der Fehler der Synthese sehr gering sein, da die meisten Proteine aus mehr als 100 bzw. teilweise sogar aus mehr als 1000 Aminosäuren bestehen und jede falsch eingebaute Aminosäure zu einer Fehlfaltung und somit zum Abbau des Proteins führen würde. Wie die Transkription ist auch die Translation in drei Abschnitte eingeteilt. Bei der Initiation startet das sogenannte Initiationscodon (Codon ist ein bestimmtes Basentriplett) die Translation. Dabei ist das Initiationscodon bei Eukaryoten immer AUG. Im Gegensatz zu prokaryotischen mRNAs enthält die eukaryotische mRNA in den meisten Fällen nur ein Initiationscodon, d.h. jede reife mRNA kodiert nur ein Protein. Nachdem das Initiationscodon durch das sogenannte „Absuchen“, d.h. die Wanderung eines 40S-Ribosoms, welches sich an die Cap-Struktur am 5'-Ende anheftet und in 3'-Richtung bis zum AUG-Codon fortbewegt, (ATP-Hydrolyse durch Helikasen als Antrieb), gefunden wurde, startet der zweite Schritt der Translation, die Elongation (Abbildung 3-15). In diesem Schritt werden neu eintreffende Aminoacyl-tRNAs von GTP-abhängigen Elongationsfaktoren (EF1 α bei Eukaryoten) eskortiert und bei erfolgreicher Bindung an die mRNA durch GTP-Hydrolyse wieder freigesetzt. Im nächsten Schritt wird die Peptidbindung zwischen den beiden Aminosäuren

gebildet. Dabei greift die Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA die Esterbindung der Peptidyl-tRNA nukleophil an. Nach erfolgter Ausbildung der Peptidbindung wandert das Ribosom um ein Codon in 3'-Richtung weiter und der Prozess beginnt von vorne bis ein Stoppcodon (UAG, UAA, UGA) erreicht wird. Dabei bindet nicht die tRNA, sondern sogenannte Terminationsfaktoren (Proteine) an die mRNA. Abschließend hydrolysieren Peptidyltransferasen die Peptidyl-tRNA und das Protein wird freigesetzt^[8,15,18].

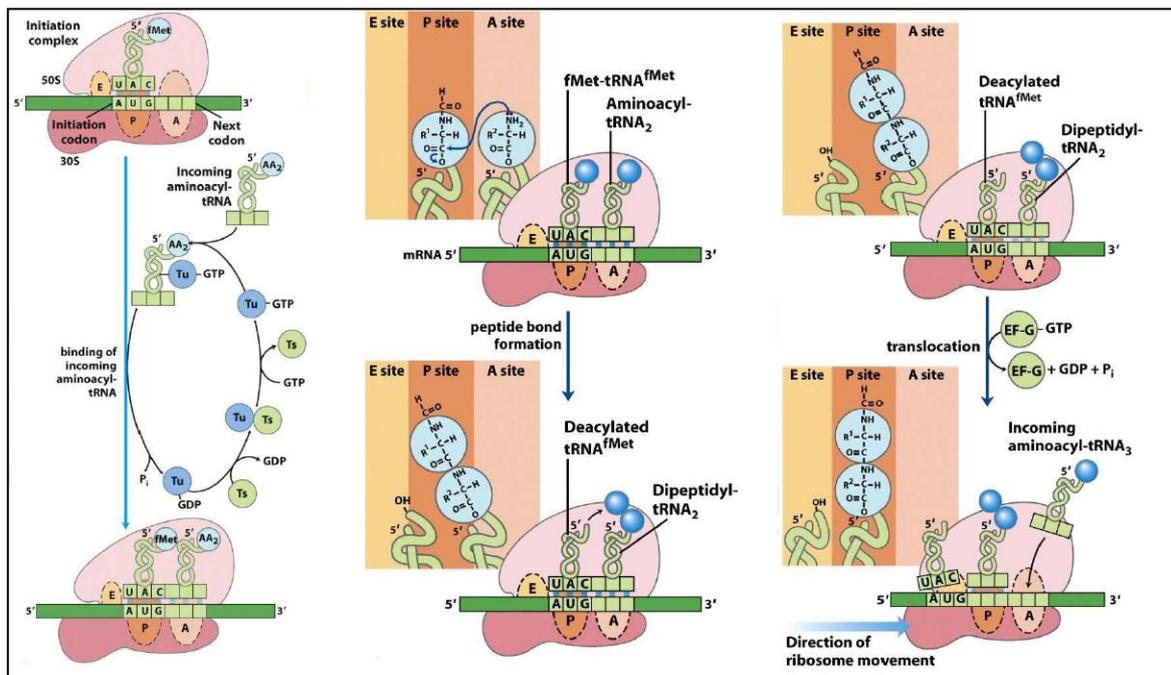


Abbildung 3-15: Detaillierte schematische Darstellung der Elongation bei der Translation. Im linken Bild ist der Transport der zweiten Aminoacyl-tRNA mit Hilfe von Elongationsfaktoren dargestellt. Im mittleren Bild erkennt man die Verknüpfung beider Aminosäuren über eine Peptidbindung. Im rechten Bild ist die Wanderung des Ribosoms um ein Basentriplett (Codon) gezeigt^[18].

3.2.3 Katalytisch aktive Protein (Enzyme)

Alle chemischen Reaktionen im Organismus werden von einer bestimmten Klasse von Proteinen, den Enzymen, katalysiert. Allerdings sind damit nur die Enzyme auf Proteinbasis gemeint. Enzyme auf Nukleinsäurebasis, speziell auf RNA-Basis, werden Ribozyme genannt. Für die katalytische Wirksamkeit der Enzyme ist das aktive Zentrum verantwortlich, das aus bestimmten Bereichen der Proteinkette durch Faltung entsteht. Sobald das Enzym denaturiert wird, geht die Konformation verloren und die katalytische Aktivität erlischt. Die meisten Enzyme bestehen aus einer dauerhaft gebundenen, prosthetischen Gruppe, andere

binden diese prosthetische Gruppe reversibel (Coenzym) und werden daher als Apoenzym bezeichnet. Ferner besitzen Enzyme im Vergleich zu chemischen Katalysatoren eine sehr hohe Substratspezifität. Sie sind sogar so spezifisch, dass Stereoisomere unterschieden werden können und nur das gewünschte Stereoisomer umgesetzt wird. Dabei wurde das von Emil Fischer 1894 vorgeschlagene „Schlüssel-Schloss-Prinzip“^[19] durch das von Koshland^[20] 1953 aufgestellte Modell des „Induced fit“ abgelöst. Bei dem neueren Modell werden sowohl die Struktur des Substrats als auch die des Enzyms selbst minimal verändert. Dabei wird das Substrat vom aktiven Zentrum des Enzyms von mehreren Seiten durch bindende Gruppen umschlossen (Abbildung 3-16). Dies hat mehrere Konsequenzen zur Folge:

- Das Substrat wird aus der wässrigen Umgebung entnommen und in einer anderen chemischen Umgebung eingeschlossen, in der sich die Aktivierungsenergie für diese Reaktion ändert.
- Die Wechselwirkungen funktioneller Gruppen im aktiven Zentrum führen zu einer sterischen und elektronischen Verformung im reaktiven Teil des Substrat-Moleküls (als „conformational stress“ bezeichnet).
- Durch die beiden oben genannten Prozesse wird ein Übergangszustand erreicht und das System kann unter Energiefreisetzung zu den Produkten weiter reagieren.

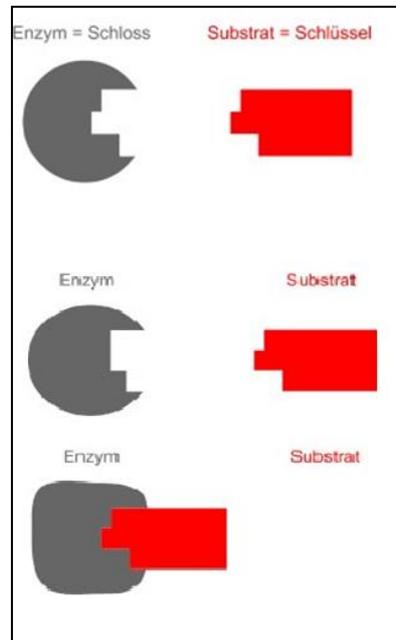


Abb. 3-16: Schematische Darstellung der Enzym-Substrat-Wechselwirkung. Oben: Schlüssel-Schloss-Prinzip nach Fischer; Unten: „Induced fit“-Modell nach Koshland^[20].

3.2.4 RNasen

RNasen sind Enzyme, die in der Lage sind RNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zu spalten. Es gibt eine große Anzahl (>50) natürlich vorkommender RNasen. RNase P war die erste RNase, die auf ihre RNA-Hydrolyseaktivität untersucht wurde^[21]. Dabei wurde festgestellt, dass die RNase P nicht nur aus Aminosäuren aufgebaut ist, sondern noch RNA als Untereinheit besitzt (Ribozym), die bei der Katalyse eine wichtige Rolle spielt. Sie ist bei der Reifung der tRNA beteiligt, indem sie die Abspaltung des 5'-tRNA-Precursors katalysiert und so ein reifes 5'-Ende der tRNA kreiert. Da die Reifung der tRNA in allen Lebewesen, sogar in Bakterien, notwendig ist, ist die RNase P ubiquitär auffindbar^[22]. Es gibt noch eine weitere große Anzahl an natürlich vorkommende RNasen^[23].

Eine im Labor häufig verwendete RNase ist die einzelstrang- und pyrimidin-spezifische RNase A. Sie erkennt die beiden Pyrimidine Uracil und Cytosin und hydrolysiert die in 5'-Richtung darauffolgende Phosphordiesterbindungen. Die ubiquitär vorkommende RNase findet sich unter anderem in Schweiß. Somit ist die Sekretion des Schweißes und damit verbunden die Sekretion von RNase A ein wirksamer Abwehrmechanismus des Körpers gegen Viren, da die Virus-RNA von der RNase A prophylaktisch zerstört wird^[23].

RNase H hingegen ist eine Endoribonuklease, die RNA-DNA-Hybride erkennt, die RNA hydrolytisch spaltet und von der DNA entfernt. Dies ist vor allem bei der Replikation der DNA wichtig, da der angelagerte RNA-Primer wieder entfernt werden muss^[24].

Die in dieser Arbeit verwendete RNase war ein künstlich hergestelltes Enzym, bestehend aus 30 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz ähnelt einem „single zinc finger“-Motiv des ZFY-Proteins. ZFY ist ein humaner Transkriptionsfaktor mit einer Zinkfingerdomäne, der bei der Spermatogenese und der Regulation der männlichen Geschlechtsbestimmung entscheidend ist^[25]. In Abbildung 3-17 sind die unterschiedlichen Modifikationen der RNase ZFY-6 und deren katalytische Aktivität aufgeführt.

Peptide	Initial Rate (V_0) $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ *	Structure	Sequence
ZN-ZFY-6	Below detection limit	Monomer	KTYQCQYCEYRSADSSNLKTHIKTKHSKEK
ZFY-6	6000 \pm 130	Dimer	KTYQCQYCEYRSADSSNLKTHIKTKHSKEK
E9A	1800 \pm 90	Dimer	KTYQCQYCA Δ YRSADSSNLKTHIKTKHSKEK
H21,26A	800 \pm 30	Dimer	KTYQCQYCEYRSADSSNLKTA Δ IKTK Δ SKEK
C5,8A	Below detection limit	Monomer	KTYQA Δ QYA Δ EYRSADSSNLKTHIKTKHSKEK
Reduced ZFY-6	Below detection limit	Monomer	KTYQA Δ QYA Δ EYRSADSSNLKTA Δ IKTK Δ SKEK

Abbildung 3-17: Beziehung zwischen der Peptidstruktur und der RNA-Hydrolyseaktivität (V_0) der RNase ZFY-6 und deren Modifikationen^[26].

Ferner haben Lima et al.^[26] die RNase auf ihre Sequenzspezifität untersucht und dabei herausgefunden, dass die RNase nicht in der Lage ist effizient DNA hydrolysieren und dass die RNA-Hydrolyseaktivität am größten ist, wenn die RNase nach dem Triplet UCC oder ACC zur Hydrolyse fähig ist (vgl. Abbildung 3-18).

Substrate	Initial rate (V_0) $\mu\text{M min}^{-1}$ *	Sequence Specificity
DNA	Below detection limit	ACTCCACCATAGTACACTCC ACTCCACCATAGTACACTCC
Double-stranded DNA	Below detection limit	TGAGGTGGTATCATGTGAGG ACUCCACCAUAGUACACUCC
Double-stranded RNA	Below detection limit	UGAGGUGGUAUCAUGUGAGG ACUCCACCAUAGUACACUCC
2'OMe	Below detection limit	ACUCCACCAUAGUACACUCC
RNA	153	GGGCGCCGUCGGUGUGG ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
RNA	422	UGGUGGGCGCCGUCGGUGUGGGCAA ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
RNA	1,200	UGGUGGGCAAUGGGCGUGUU ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
RNA	6,100	ACUCCACCAUAGUACACUCC ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Abbildung 3-18: Hydrolysespezifität des ZFY-6-RNase-Dimers für verschiedene Substrate. Die Pfeile deuten die Position der Spaltung an, dabei ist die Länge der Pfeile proportional zur Menge des Spaltprodukts^[26].

Mechanismus der Nukleasen:

Nukleasen spalten generell die Phosphodiesterbindung in DNA oder RNA Molekülen. Nukleasen, die DNA spezifisch nach oder in bestimmten Nukleotidsequenzen spalten, wurden in Kapitel 3.1.2.2 bereits kurz angesprochen (Restriktionsenzyme). Diejenigen Nukleasen wiederum, die in der Lage sind, RNA zu hydrolysieren, werden als Ribonukleasen, kurz RNasen, bezeichnet. Sie verwenden dabei die 2'OH-Gruppe der Ribose in einem Säure-Base-Mechanismus (Abbildung 3-19). Zunächst wird durch die starke Base Histidin das Proton der 2'OH-Gruppe abstrahiert. Durch die erhöhte Nukleophilie der nun deprotonierten vorliegenden 2'OH-Gruppe ist ein nukleophile Addition an das Phosphor-Atom unter Bildung eines 2'-3'-Cyclophosphatübergangszustandes möglich, der unter Spaltung der P-O-Bindung schließlich zerfällt und zu einem Bruch des RNA-Strangs führt. Abschließend wird das Cyclophosphat durch Protonierungs- und Deprotonierungsschritte mit Hilfe von Lysin und Histidin wieder zum Phosphat regeneriert.

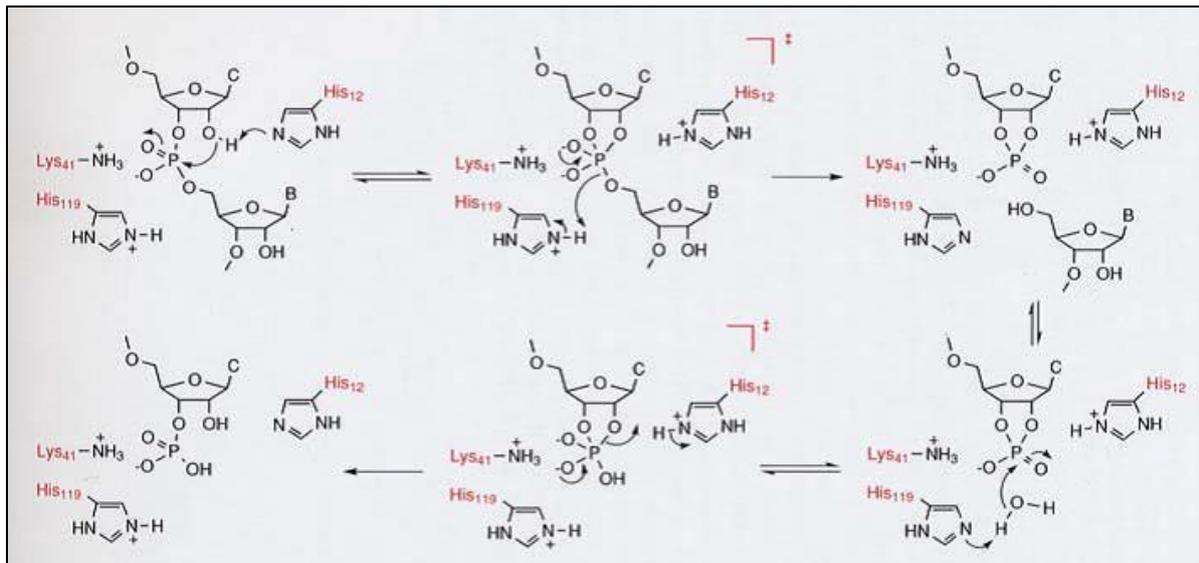


Abbildung 3-19: Mechanismus zur Spaltung der RNA durch RNasen^[27]

3.3 Konjugationsmethoden

Die Methode der Wahl zur Konjugation der beiden Makromoleküle (ODN und RNase) war in dieser Arbeit die native chemische Ligation (NCL). Das Grundkonzept der NCL wurde bereits 1953 von Theodor Wieland^[28] an sehr kleinen Oligopeptiden eingeführt. Jedoch geriet diese elegante Methode in Vergessenheit und wurde erst 1994 von Stephen Kent^[29] durch die erfolgreiche Synthese eines 72-aminosäurelangen Proteins (IL-8) wieder ins Bewusstsein der Wissenschaftswelt gerufen. Dabei ist der erste Schritt der NCL die chemoselektive Reaktion eines ungeschützten Peptid- α -Thioesters mit einem zweiten ungeschützten Peptid, welches N-terminal ein Cystein trägt. Aus dieser Umesterung resultiert ein Intermediat, welches unter den gleichen Reaktionsbedingungen eine spontane, rapide, intramolekulare Umlagerung zur stabileren Peptidbindung eingeht. Bei der Konjugation zweier Peptide ist keine anschließende Modifikation mehr nötig, da das umgelagerte Produkt formal einem Cystein entspricht (Abbildung 3-20). Durch diesen Vorteil ist der Variation und der Synthese von Proteinen nahezu keine Grenze mehr gesetzt. Der einzige Nachteil dieser Reaktion ist die Einführung eines Thioesters, welcher aber mittlerweile durch den ausgereiften Stand der Peptid-Festphasen-Synthese (SPPS) kein Problem mehr darstellt^[29,30]. Die Technik der NCL erlaubt die Synthese von Peptiden mit Molekulargewichten weit jenseits der durch konventionelle SPPS hergestellten Peptide^[31,32].

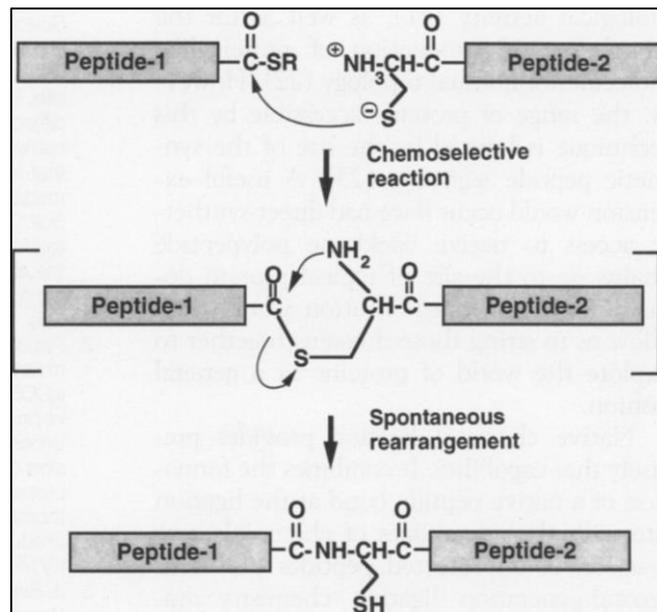


Abbildung 3-20: Reaktionsmechanismus der NCL am Beispiel zweier beliebiger Peptide^[29].

Grundsätzlich ist es möglich die NCL nicht nur auf die Synthese von Peptiden, sondern auch auf die Konjugation eines Oligonukleotids mit einem Protein anzuwenden. Dabei kann, wie Gait et al.^[30] gezeigt haben, das Oligonukleotid am 5'-Ende ein Cystein tragen und das Peptid mit einem Benzylthioester modifiziert sein. Des Weiteren ist es auf diesem Weg auch möglich, wie Kent 1999^[31] nachgewiesen hat, Glykoproteine mit Hilfe der NCL erfolgreich zu synthetisieren.

Die stetig wachsende Zahl an Publikationen mit biologischem und medizinischem Hintergrund, die die NCL als Methode der Wahl zur erfolgreichen Konjugation wählen, ist eine großartige Bestätigung für den sinnvollen Gebrauch dieser äußerst eleganten und effizienten Konjugationsmethode^[33].

Die in dieser Arbeit verwendete Methodik wird auf dem Einsatz eines ODN-Benzylthioesters und einem Peptid mit N-terminalem Cystein beruhen. Die Konjugation sollte aber nicht in Lösung, sondern gebunden am Träger durchgeführt werden, um so all die Vorteile der Festphasensynthese zu nutzen.

3.4 Charakterisierungsmethoden

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Charakterisierungsmethoden waren Bestandteil dieser Arbeit. Aufgrund der Größe, der Zusammensetzung und der physiko-chemischen Eigenschaften der synthetisierten Biokonjugate wurden sowohl chemische als auch molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung herangezogen.

3.4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) ermöglicht die Trennung der zu untersuchenden Moleküle (Analyt) aufgrund ihrer Wechselwirkung mit der stationären und der mobilen Phase. Ein schematischer Aufbau einer HPLC ist in Abbildung 3-21 gezeigt.

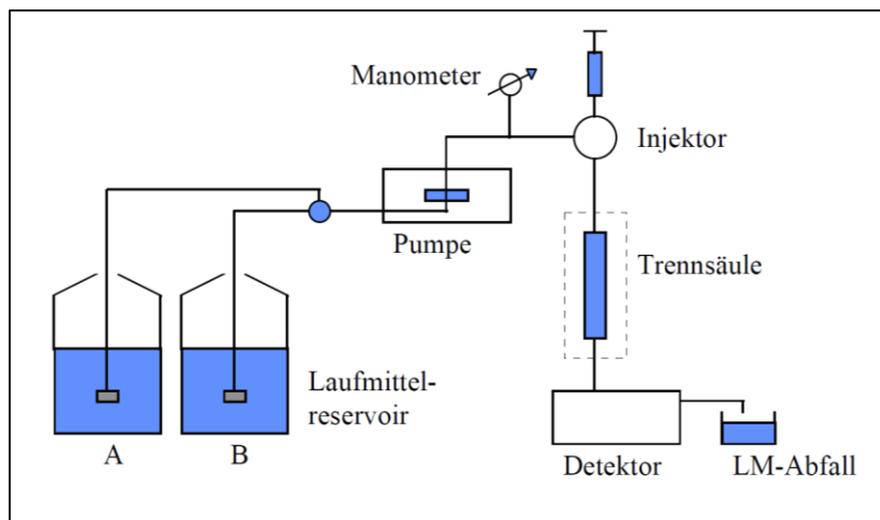


Abbildung 3-21: Schematischer Aufbau einer Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-Messanlage^[34]

Die stationären Phasen bestehen zumeist aus Silicagelen mit definierten Porengrößen. Dabei sind kleinere Korngrößen aufgrund der van-Deemter-Gleichung vorteilhaft, da so die möglichen Lauf- und Diffusionswege des Analyten minimiert werden können (A- und C-Term in der Van-Deemter-Gleichung). Dadurch entsteht eine höhere Trennleistung (Abbildung 3-22).

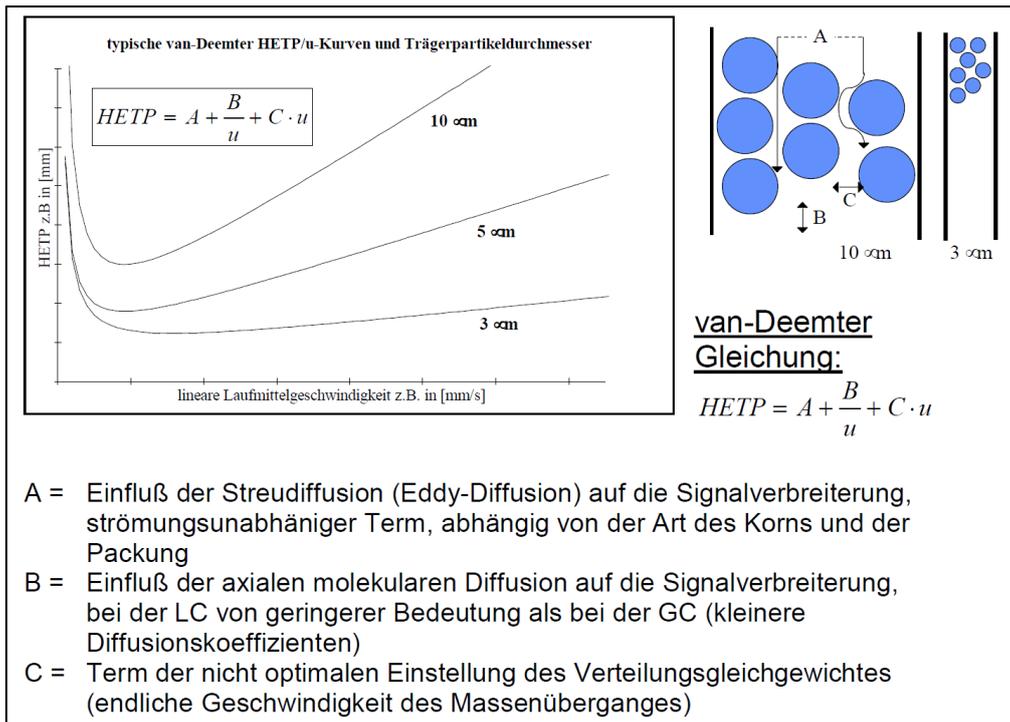


Abbildung 3-22: Van-Deemter-Gleichung und –Diagramm in Abhängigkeit der Porengröße der stationären Phase^[34]

Bei der HPLC wird zwischen zwei Methoden unterschieden. Die Normalphasen-HPLC (NP-HPLC) besitzt eine polare stationäre Phase (Silanol-Gruppen), bei der die Elutionskraft der mobilen Phase von der Polarität abhängt. Je polarer der Analyt, desto höher die polaren Wechselwirkungen mit der stationären Phase, d.h. desto länger die Elutionszeit (Abbildung 3-23). Bei der Umkehrphasen-HPLC (reversed phase-HPLC, RP-HPLC) wird die Polarität der stationären Phase durch die Funktionalisierung der polaren Hydroxyl-Gruppen der Silanole durch hydrophobe Alkane (meist C18) umgekehrt. Folglich eluieren zuerst polare Analyten^[34].

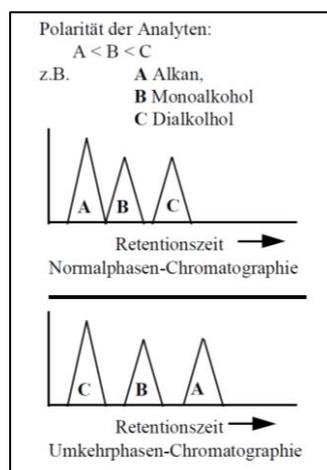


Abbildung 3-23: Retentionszeit in Abhängigkeit der Polarität des Analyten^[34]

Durch die Auswahl der entsprechenden Lösemittel und damit der Polarität der mobilen Phase lässt sich das Trennvermögen der RP-HPLC deutlich erhöhen (Abbildung 3-24)^[34]. Auch eine nicht-isokratische Lösemittelzusammensetzung, d.h. ein Lösemittelgradient, kann zu einer Optimierung des Trennvermögens führen.

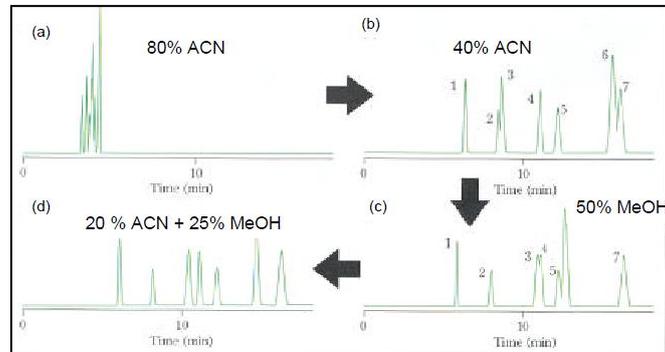


Abbildung 3-24: Beispiel einer verbesserten Trennung der Analyten durch die Variation der mobilen Phase^[34]

3.4.2 Gelpermeationschromatografie (GPC)

Die auch als Größenausschlusschromatografie (Size exclusion chromatography, SEC) bezeichnete Methode ist eine Trenntechnik, die es erlaubt hochmolekulare Verbindungen aufgrund ihrer Größe (genauer: hydrodynamisches Volumen) zu trennen. Kleinere Moleküle diffundieren während des Transports in die Poren des Füllmaterials und eluieren deshalb später als Moleküle mit größerem hydrodynamischen Radius (Abbildung 3-25, rechts). Im Idealfall entstehen keine Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der stationären Phase, d.h. es handelt sich um eine wechselwirkungsfreie Chromatografie-Methode. Sind die Moleküle zu klein, diffundieren sie in jede Pore und verweilen dort (untere Ausschlussgrenze). Sind die Moleküle jedoch zu groß für die Poren, d.h. sie können nicht in die Poren diffundieren, eluieren sie ungehindert durch die Säule (obere Ausschlussgrenze). Die Ausschlussgrenzen sind jeweils abhängig von der durchschnittlichen Porengröße der stationären Phase (Abbildung 3-25, links)^[34].

Typ	durchschnittliche Porengröße [Å]	Molekularmasse Ausschlußgrenze [amu] (atomic mass units)
Polystyrol/ Divinylbenzol- Copolymerisate	10^2 10^4 10^6	700 (1 bis 20) $\times 10^4$ (5 bis 10) $\times 10^6$
Kieselgel	125 500 1000	(0.2 bis 5) $\times 10^4$ (0.05 bis 5) $\times 10^5$ (5 bis 20) $\times 10^5$

Abbildung 3-25: links: Übersicht über die unterschiedlichen stationären Phasen und deren durchschnittlichen Porengrößen; rechts: Trennprinzip der GPC^[34]

Das Elutionsvolumen V_E errechnet sich dabei aus dem freien Volumen außerhalb der Partikel V_0 plus dem Volumen der Poren V_P multipliziert mit einem Faktor K , der die Zugänglichkeit der Analytmoleküle zu dem Porenvolumen beschreibt^[34].

$$V_E = V_0 + K \cdot V_P \quad (3.1)$$

Dabei ist $K=0$, wenn der Analyt vollständig ausgeschlossen wird (obere Ausschlußgrenze), und $K=1$, wenn der Analyt vollständig in die Poren eindringen kann (Abbildung 3-26). Da es sich bei der GPC um eine Relativmethode handelt, muss zur Bestimmung des Molekulargewichts vorher mit einem Standard kalibriert werden.

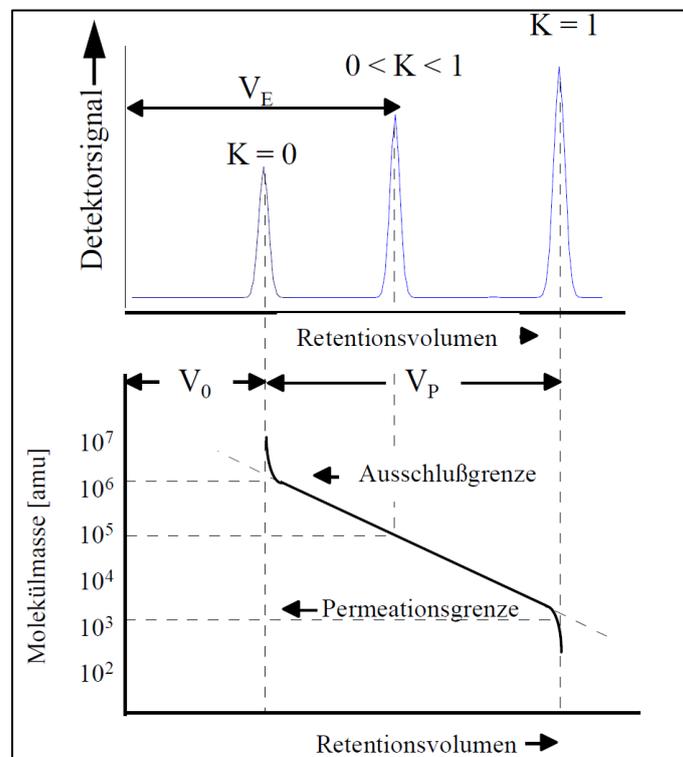


Abbildung 3-26: Retentionsvolumen abhängig von der Größe des Analyten^[34]

3.4.3 Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spektroskopie (MALDI-ToF-MS)

Das Grundprinzip der MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry) ist wie bei den meisten massenspektrometrischen Trennverfahren die Auftrennung der beschleunigten, elektrisch geladenen Teilchen in der Gasphase nach ihren Molmassen. Dabei werden die Analyten mit konzentrierten wässrigen Lösungen der gewählten Matrix verdünnt (Matrix:Analyt 1000:1 bis 10000:1) und auf einem metallischen Probenhalter getrocknet. Anschließend wird die Probenmischung ins Vakuum überführt und mit gepulsten UV-oder IR-Lasern beschossen (UV: 0,5-20 ns; IR: 5-200 ns). Die Absorption des Laserlichts durch die Matrix führt entweder zu elektronisch angeregten Matrixmolekülen bei UV-Lasern (durch resonante Anregung der Elektronen des aromatischen Systems der Matrices) oder zu schwingungs-angeregten Matrixmolekülen bei IR-Lasern (OH und NH-Streckschwingungen bei ca. 3 μm). Die Energieübertragung von der Matrix auf die Analytionen führt zur Desorption und Ionisation der Analytmoleküle. Für die Anregung via UV-Laser dienen organische Verbindungen wie Nikotinsäure und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrices. Unter Verwendung eines IR-Lasers nutzt man Verbindungen wie Malonsäure, Glycerin oder Harnstoff aufgrund der OH-und NH-Streckschwingen als Matrices^[35]. Das grundsätzliche Prinzip der MALDI ist in Abbildung 3-27 dargestellt.

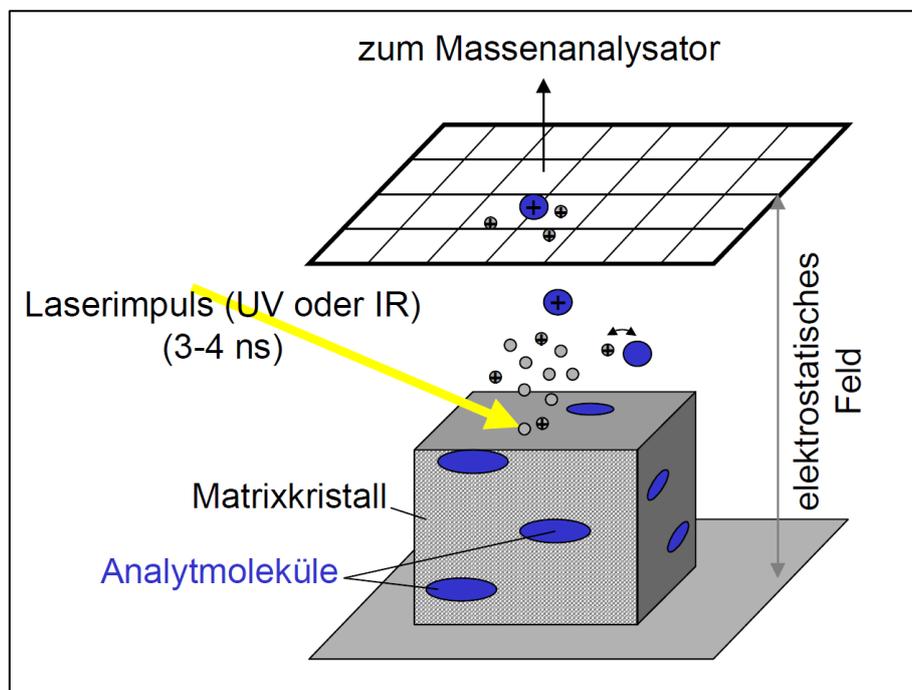


Abbildung 3-27: Prinzip des MALDI-Prozesses^[35]

Nach erfolgter Desorption und Ionisation werden die Analytmoleküle in einem starken elektrischen Feld linear beschleunigt. Da die kinetische Energie des beschleunigten Ions

$$E_{kin} = z \cdot e \cdot U \quad (3.2a)$$

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \quad (3.2b)$$

ist, ist die Geschwindigkeit der Ionen (v) proportional zu $(m/z)^{-1/2}$ (m = Molmasse des Ions, z =Ladung des Ions, U =angelegte Spannung; e =Elementarladung). Nun muss nur noch die Zeit zwischen Desorption/Ionisation der Ionen und Erreichen des Detektors exakt gemessen werden. Nach der Kalibrierung des Systems ist die jeweilige Masse aus der Flugzeit bestimmbar, da die Flugzeit proportional dem Verhältnis Masse zu Ladung (m/z) ist (Abbildung 3-28)^[35,36].

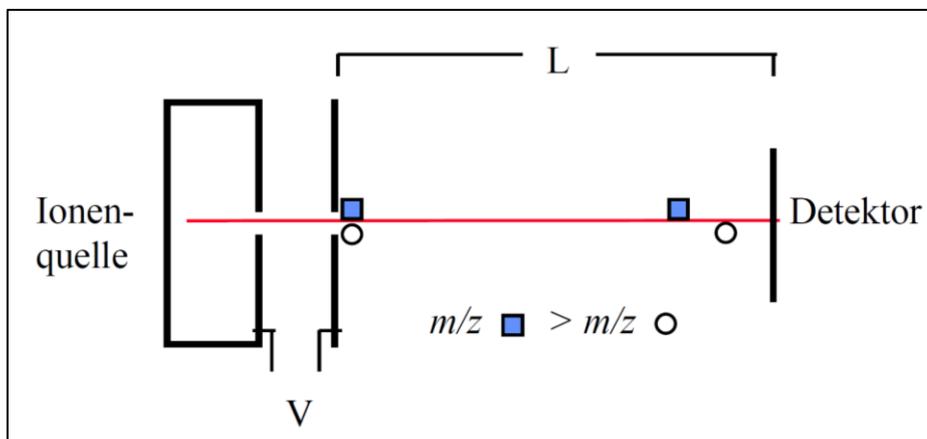


Abbildung 3-28: Schematische Darstellung eines TOF-MS. Dabei ist angedeutet, dass leichtere Massen aufgrund ihrer höheren kinetischen Energie schneller fliegen und den Detektor früher erreichen als schwerere^[36].

3.4.4 UV/Vis-Spektroskopie

Moleküle besitzen die Fähigkeit, elektromagnetische Strahlung zu absorbieren. Liegt diese im Bereich des ultravioletten/sichtbaren (UV/Vis) Lichts, werden die Valenzelektronen des Moleküls angeregt, d.h. die Elektronen werden von ihrem besetzten Orbital (Grundzustand) in ein höher liegendes Orbital angehoben. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gleichung 3.3) gilt für monochromatisches Licht, dass die Abschwächung der Intensität des einfallenden Lichts (entspricht der Absorption A durch ein homogenes, isotropes Medium) proportional zur Konzentration c und der Schichtdicke d der Küvette ist.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3.3)$$

Dabei beschreiben I und I_0 jeweils die Intensität der Strahlung vor und nach dem Durchgang durch die Küvette. ε ist der molare dekadische Extinktionskoeffizient.

Die UV/Vis-Spektroskopie stellt wegen des linearen Zusammenhangs zwischen Extinktion und Konzentration eine wichtige Methode zur Bestimmung der DNA-Konzentration dar. Die optische Dichte (OD) wird oft in Zusammenhang mit DNA-Konzentrationsbestimmungen erwähnt. Sie ist definiert als der Wert, der für 1 mL Probe in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke bei einer bestimmten Absorption (z.B. wie bei der DNA bei 260 nm) gemessen wird. Die Konzentration wird unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt. Da aber nicht jedes Oligonukleotid gleich aufgebaut ist, d.h. die Anzahl an Purin und Pyrimidinbasen (welche unterschiedlich stark absorbieren) unterscheiden sich, muss der Extinktionskoeffizient für jedes Oligonukleotid neu bestimmt werden. Häufig werden aber genormte Werte für die optische Dichte angegeben. Bei der einzelsträngigen DNA geht man von 37 $\mu\text{g/mL}$, bei doppelsträngiger von 47 $\mu\text{g/mL}$ aus. In dieser Arbeit wurden basierend auf diesen Werten die DNA-Konzentrationen mit Hilfe des Eppendorf Biophotometers bestimmt^[1].

3.4.5 Elektrophorese

Bereits 1937 entwickelte Arne Tiselius^[37] die erste Elektrophorese (Nobelpreis 1948), die als die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld definiert ist (Abbildung 3-29). Die elektrophoretische Mobilität der Teilchen hängt dabei von der Ladung, Größe und Struktur ab. Aufgrund ihres hohen Auflösungsvermögens hat sich die Elektrophorese in einem weiten Spektrum an analytischen und präparativen Anwendungen etabliert und wird vor allem in der Biochemie, der Molekularbiologie und in der forensischen Medizin eingesetzt^[38].

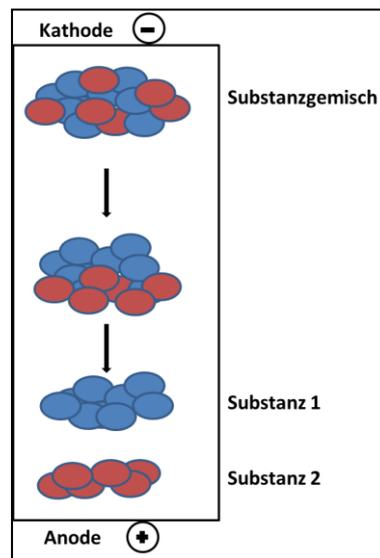


Abbildung 3-29: Trennprinzip der Elektrophorese. Geladene Teilchen unterschiedlicher Ladung und Größe wandern im elektrischen Feld mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten.

Bei der Trenntechnik der Elektrophorese werden die Moleküle durch das Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes aufgetrennt. Auf die Teilchen wirkt einerseits eine beschleunigende Kraft F_e . F_e ist dabei proportional zur Ladung q des Teilchens und des angelegten elektrischen Feldes E .

$$F_e = q \cdot E \quad (3.4)$$

Die Reibungskraft F_f bremst andererseits die Wanderung der geladenen Moleküle. Sie ist proportional zur Geschwindigkeit v und des Reibungskoeffizienten f .

$$F_f = f \cdot v \quad (3.5)$$

Es stellt sich daraufhin ein Gleichgewicht zwischen beiden Kräften ein, was wiederum dazu führt, dass die Teilchen mit einer konstanten Geschwindigkeit im elektrischen Feld bewegt werden.

$$v = \frac{q}{f} \cdot E \quad (3.6)$$

$$v = \mu \cdot E \quad (3.7)$$

μ ist die substanzspezifische elektrophoretische Mobilität des Moleküls. Sie ist proportional zu der Ladung q und umgekehrt proportional zum Reibungskoeffizienten f . Dieser lässt sich mit Hilfe des Stokes'schen Gesetz für kugelförmige Teilchen wie folgt bestimmen. Dabei ist η die Viskosität der Lösung und R_H der hydrodynamische Radius des geladenen Teilchens.

$$f = 6 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot R_H \quad (3.8)$$

Aus Gleichung 3.6 und 3.8 folgt schließlich

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot R_H} \quad (3.9)$$

Daraus kann man schließen, dass Moleküle mit größerem hydrodynamischem Radius eine geringere elektrophoretische Mobilität besitzen. Die Gleichung 3.9 ist jedoch nur für kugelförmige Teilchen in unendlich verdünnter Lösung aufgrund der molekül- und pufferspezifischen Größen zulässig.

Um eine entsprechende Gleichung für alle Teilchengemetrien zu erhalten, wurde von Muthkumar^[39] unter Berücksichtigung der Geometrie der Teilchen und deren elektrostatischen Wechselwirkungen die Funktion $M(\kappa R_g)$ eingeführt. Dies liefert für die elektrophoretische Mobilität eines Teilchens folgende Gleichung.

$$v = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot R_g} M(\kappa R_g) \quad (3.10)$$

Dabei ist q die Gesamtladung und R_g der Trägheitsradius.

3.4.5.1 Gelelektrophorese

a) Agarose-Gelelektrophorese (AG)

1%ige Agarose-Gele haben eine Porengröße von ca. 150 nm und sind damit relativ großporig. Dadurch sind sie ideal zur Trennung hochmolekularer Proteine oder Nucleinsäuren über 500 kDa. Ein weiterer Vorteil der Agarosegele ist ihre Ungiftigkeit und einfache Herstellung. Das Polysaccharid Agarose wird durch Aufkochen in Wasser gelöst und geliert beim Abkühlen, wobei Polysaccharid-Doppelhelices entstehen, die sich zu dicken Fäden zusammenlagern^[38] (Abbildung 3-30).

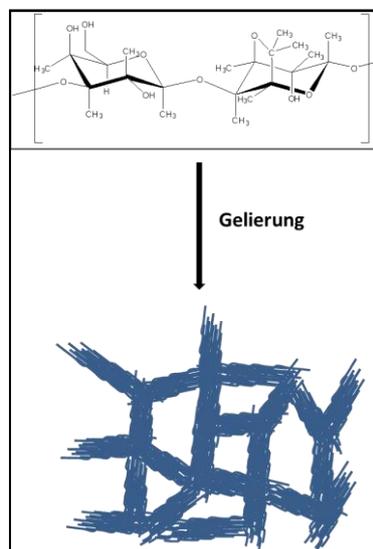


Abbildung 3-30: Struktur der Agarose und eines Agarosegels nach erfolgter Gelierung

b) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

20%ige PAGE-Gele besitzen einen Porendurchmesser von ca. 5 nm. Dadurch sind sie ideal geeignet, um kleine Polymere bis zu 100 kDa elektrophoretisch aufzutrennen. Sie werden durch radikalische Copolymerisation von Acrylamid (Monomer) mit N,N'-Methylenbisacrylamid (Vernetzer) hergestellt (Abbildung 3-31), wobei das Verhältnis Monomer zu Vernetzer entscheidend für die Porengröße ist. Je mehr Vernetzer zugegeben wird, desto kleiner werden die Poren. Die radikalische Polymerisation erfolgt unter Sauerstoffausschluss, da Sauerstoff als Diradikal zum Kettenabbruch führt.

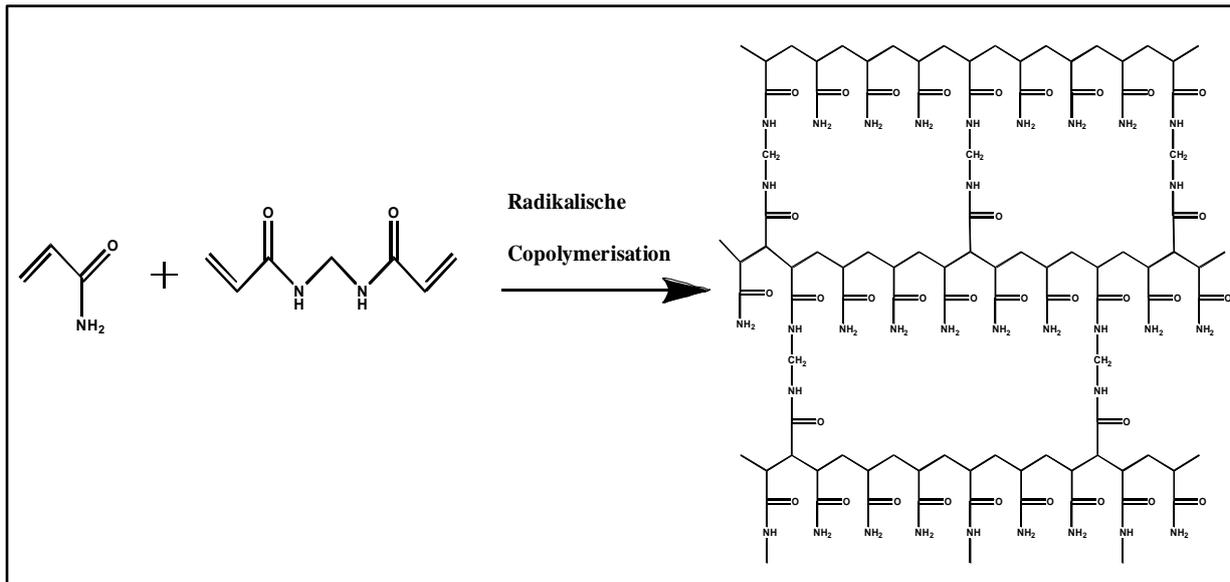


Abbildung 3-31: Radikalische Copolymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid zu einem vernetzten Polyacrylamid

Ferner ist zu beachten, dass das angelegte elektrische Feld Wärme (Temperaturabhängigkeit des spezifischen Widerstands) abstrahlt, die durch die Wände des Gelsystems freigesetzt wird. Durch den Temperaturunterschied ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen im Zentrum größer als auf den Außenseiten. Dieser Effekt lässt sich zusätzlich durch die Betrachtung der Arrhenius-Andrade-Beziehung erklären, bei der die Viskosität umgekehrt proportional zur Temperatur ist. Da laut Gleichung 3.9 die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen sowohl von der Viskosität als auch vom elektrischen Feld (bzw. der Spannung) abhängt, beeinflusst letztendlich die Temperatur die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen.

Die DNA-PAGE wurde in dieser Arbeit zur Analyse von Oligonukleotiden und deren Derivaten eingesetzt^[38]. Die DNA in den PAGE-Gelen wurden nach erfolgter Gelelektrophorese mit Fluoreszenzfarbstoffen (meist Gelred[®]) angefärbt. Durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Nukleotiden werden die einzelnen DNA-Stränge sichtbar gemacht. Da die Bandenintensität und damit die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an die DNA stark von den Färbebedingungen, der DNA-Konzentration, der Konzentration des Farbstoffes und der Ionenstärke abhängt, wurde auf eine genaue Ausbeutebestimmung verzichtet, da diese nur äußerst grob abgeschätzt werden konnte^[40]

3.4.5.2 Präparative Gelelektrophorese (PrepCell)

Zur Aufreinigung des Reaktionsgemisches wurde in dieser Arbeit eine Methode verwendet, die als präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PrepCell) oder als „Continuous Elution Electrophoresis“ (CEE) bekannt ist. Der schematische Aufbau und das Funktionsprinzip sind in Abbildung 3-32 dargestellt. Im Gegensatz zu den analytischen PAGE-Gelen wird bei der PrepCell das Gel in eine Glasröhre gegossen, so dass eine Gelsäule gebildet wird. Aufgrund der deutlich größeren Mengen und der deutlich größeren Oberfläche kann eine größere Anzahl an Molekülen durch das Gel wandern. Die angelegte Spannung wird dabei so lange aufrechterhalten, bis alle Analyten aus der Säule in Richtung Anode gewandert sind. Durch die unter der Gelsäule direkt befindlichen Elutionskammer, die zur Verhinderung der Vermischung des Elutions- mit dem Anodenpuffer durch eine Dialysemembran und eine Glasritze vom Anodenpuffer getrennt ist, wird ein kontinuierlicher Puffer geleitet, der die dort ankommenden, aufgetrennten Teilchen in Richtung Detektor und schließlich zum Fraktionsammler transportiert.

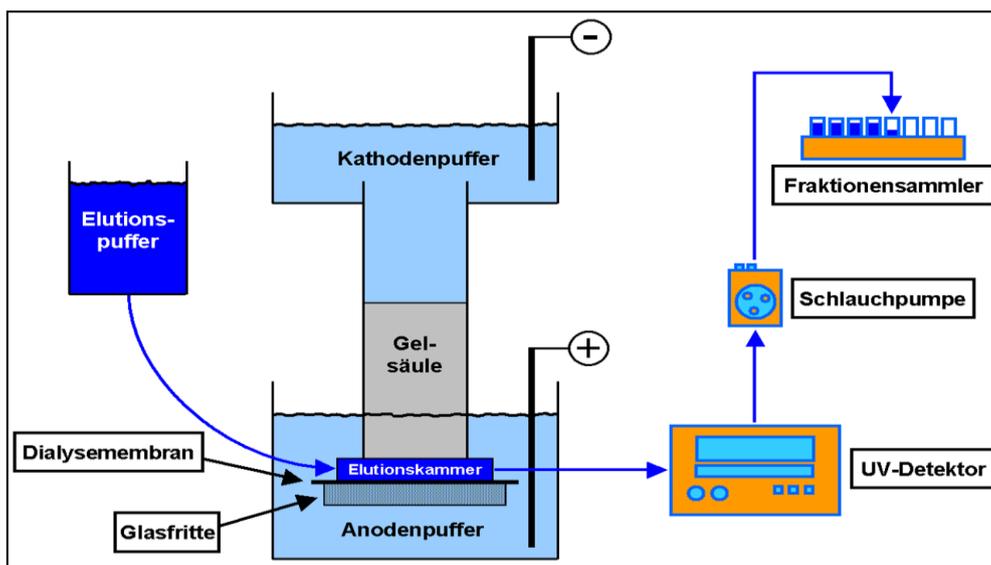


Abbildung 3-32: Schematischer Aufbau und Funktionsprinzip der Präparativen Gelelektrophorese^[41]

3.4.5.3 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese wird im Gegensatz zur klassischen Gelelektrophorese trägerfrei in einem offenen, kleinen ($< 100 \mu\text{m}$) Rohr durchgeführt. Je kleiner der Innendurchmesser der Kapillare, desto höher das Oberflächen-Volumenverhältnis, desto besser die Joulsche Wärmeableitung, welche die Voraussetzung für eine hervorragende Trennleistung ist. Mittlerweile sind Kapillaren kleiner als $5 \mu\text{m}$ kommerziell erhältlich, was die Trennleistung im Vergleich zu früher verwendeten dicken Kapillaren ($100 \mu\text{m}$) deutlich erhöht. Bei den meisten Anwendungen verwendet man 30 bis 100 cm lange, mit Polyimid beschichtete „fused silica“ Kapillaren. Als Trennmedium dienen wässrige Puffersysteme (z.B. Borat-Puffer mit basischem pH), welche den konstanten Stromtransport gewährleisten. Dabei werden Spannungswerte von 30kV bei konst. Stromstärke erhalten. Die unterschiedlich geladenen Teilchen migrieren im elektrischen Feld unterschiedlich schnell und werden von einem „on-column“-Detektor, z.B. UV-Detektor, direkt detektiert (Abbildung 3-33)^[38].

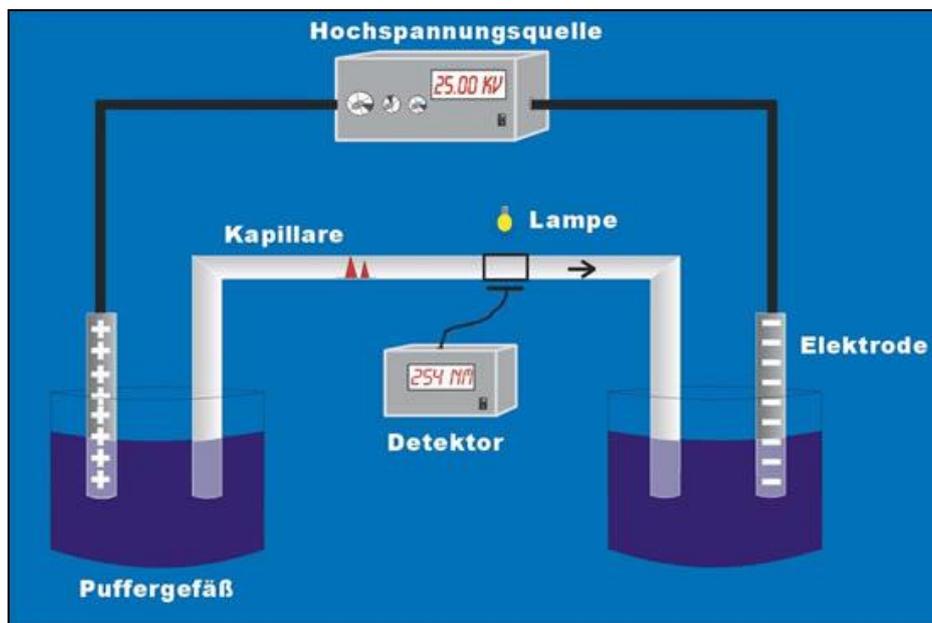


Abbildung 3-33: Schematischer Aufbau der Kapillarelektrophorese^[42]

Für die Kapillarelektrophorese muss aufgrund der Verwendung einer Kapillare die in Kapitel 3.5.4. erläuterte Theorie erweitert werden. Effekte, wie der elektrophoretische Effekt bzw. der Relaxationseffekt, beeinflussen die Wanderungsgeschwindigkeit der geladenen Teilchen sowohl in der klassischen als auch in der Kapillarelektrophorese. Der Effekt der Elektroosmose ist jedoch in der Kapillarelektrophorese von entscheidender Bedeutung. Es handelt sich hierbei um einen elektrokinetischen Effekt, der die Bewegung der Elektrolytlösung relativ zu einer geladenen Oberfläche durch ein angelegtes elektrisches Feld beschreibt. Die Silanolgruppen der „fused-silica“-Kapillaren liegen aufgrund ihres niedrigen pKs-Wertes bei einer Pufferlösung mit einem pH-Wert größer als vier deprotoniert und somit negativ geladen vor. Dadurch kommt es zu einer Absorption der Kationen bzw. zu einer Repulsion der Anionen. Eine teilweise Fixierung der Kationen in der Nähe der Kapillarwand durch elektrostatische Anziehungskräfte führt zu einer starren Grenzschicht, die auch als Sternschicht bezeichnet wird. Ein Ausgleich der restlichen negativen Ladungen und somit eine weitere Anlagerung der Kationen kann aufgrund der Hydrathülle der Kationen nicht komplett erfolgen, was zu einer diffusen Grenzschicht, der Gouy-Chapman-Schicht, führt. Mit größer werdender Entfernung zwischen negativ geladener Kapillarwand und positiv geladenen Ionen der Gouy-Chapman-Schicht verringert sich die Coulombsche Wechselwirkung und erlaubt eine Wanderung der Gouy-Chapman-Schicht zur Kathode. Es entsteht durch die Wanderung der Gouy-Chapman-Schicht über die fixierte erste Schicht eine Scherfläche. Das Potential an der Scherfläche zwischen den beiden Schichten wird als zeta-Potential (ζ) bezeichnet. Es gilt, dass das zeta-Potential und damit auch der elektroosmotische Fluss (v_{EOF}) umgekehrt proportional zur Ionenstärke (I_s) und direkt proportional zur Ladungsdichte (ω) der Kapillarwand sind (Gleichung 3.11). Folglich bewirkt eine Konzentrationserhöhung des Puffers eine Verringerung, eine Steigerung des pH-Wertes hingegen eine Erhöhung des elektroosmotischen Flusses.

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot E \cdot \zeta}{\eta} = \frac{\omega \cdot E}{\eta \cdot \kappa} \quad (3.11)$$

Dabei ist in der Gleichung (3.11) ε_r die relative Dielektrizitätskonstante, ε_0 die Dielektrizitätskonstante im Vakuum und $1/\kappa$ der Debye-Hückel-Parameter (Debye-Abschirmlänge), der als

$$\kappa = \sqrt{\frac{2 \cdot N_A \cdot e^2 \cdot I_s}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot k_B \cdot T}} = F \sqrt{\frac{2 \cdot I_s}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot R \cdot T}}$$

definiert ist. $F = N_A \cdot e$ ist hierbei die Faraday-Konstante, $R = k_B \cdot N_A$ die ideale Gaskonstante und T die Temperatur. k_B ist die Boltzmann-Konstante, N_A die Avogadro-Konstante.

Literaturverzeichnis Kapitel 3:

- [1] B. Z. H. Meier, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [2] J. Graw, *Genetik*, Springer, Berlin, **2006**.
- [3] a) S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Academic Press, **2007**. b) W. Saeger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, **1988**.
- [4] a) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 304–305. b) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [5] H. G. Khorana, *Science* **1979**, *203*, 614–625.
- [6] M. A. Dorman, S. A. Noble, L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 95–102.
- [7] Biomers GmbH, can be found under www.biomers.net.
- [8] a) L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag (Ed.) b) J. Watson, *Molekularbiologie*, Pearson Studium Verlag, 6. Auflage
- [9] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science* **1988**, *239*, 487–491.
- [10] PCR bild, can be found under <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
- [11] pGem Teasy Vektor sequenz, can be found under https://www.promega.de/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-easy-vector-systems/?origUrl=http%3a%2f%2fwww.promega.com%3a81%2fproducts%2fpcr%2fpcr-cloning%2fpgem_t-easy-vector-systems%2f.
- [12] E Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, *EMBO J.* **1982**, *1*, 841–845.
- [13] a) elektroporation, can be found under <http://www.vaudaux.ch/script/cms-newspic.php?id=584&col=DOWNLOADFILE&PHPSESSID=e401796768331588b4ac9eb533cea62c>. b) Spektrum Akademischer Verlag (Ed.) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, Heidelberg, **2008**.
- [14] lacZ-operon, can be found under <http://www.guidobauersachs.de/bio-ecke.html>.
- [15] P. K. D. Doenecke, *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [16] aminosäure bild, can be found under http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Overview_proteinogenic_amino_acids-DE.svg.
- [17] proteinbiosynthese bild, can be found under <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MRNA-interaction.png>.
- [18] M. C. A. L. D.L. Nelson, *Principles of biochemistry*, Freeman, New York, **2008**.
- [19] C. M. G. H.J. Roth, *Stereochemie & Arzneistoffe. Grundlagen - Betrachtungen - Auswirkungen*, Wiss.Verl.-Ges., Stuttgart, **1998**.

- [20] D. E. KOSHLAND, *Biological Reviews* **1953**, 28, 416–436.
- [21] H. D. Robertson, S. Altman, J. D. Smith, *Journal of Biological Chemistry* **1972**, 247, 5243–5251.
- [22] N. R. a. B. J. W. Pace, *Journal of bacteriology* **1995**, 177, 1919–1928.
- [23] J. R. G. D'Alessio, *Ribonucleases: structures and functions*, Academic Press, San Diego, **1997**.
- [24] R. F. Goodwin E.C., *Nucleic Acids Research* **1992**, 20, 916.
- [25] a) M. S. Palmer, A. H. Sinclair, P. Berta, N. A. Ellis, P. N. Goodfellow, N. E. Abbas, M. Fellous, *Nature* **1989**, 342, 937–939. b) P. Koopman, A. Ashworth, R. Lovell-Badge, *Trends in Genetics* **1991**, 7, 132–136.
- [26] W. F. a. C. S. T. Lima, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 10010–10015.
- [27] RNase Mechanismus, can be found under <http://online-media.uni-marburg.de/chemie/bioorganic/bioorg/pdf/kapitel4.pdf>.
- [28] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 583, 129–149.
- [29] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [30] D. A. Stetsenko, M. J. Gait, *J ORG CHEM* **2000**, 65, 4900–4908.
- [31] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J AM CHEM SOC* **1999**, 121, 11684–11689.
- [32] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 923–960.
- [33] a) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47, 10030–10074. b) S. B. H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 338–351.
- [34] GPC und HPLC, can be found under http://www.ak-hoffmann.chemie.uni-mainz.de/Dateien/AC_-_Teil_2_%28bis_SFC%29.pdf.
- [35] MALDI-TOF-MS, can be found under http://www.ak-hoffmann.chemie.uni-mainz.de/Dateien/AC_-_Teil_4__%28Ionenquellen%29.pdf.
- [36] TOF, can be found under http://www.ak-hoffmann.chemie.uni-mainz.de/Dateien/AC_-_Teil_5_%28Analysatoren%29.pdf.
- [37] A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.* **1937**, 33, 524–531.
- [38] J. E. F. Lottspeich, *Bioanalytik*, Elsevier, München, **2006**.
- [39] M. Muthukumar, *Electrophoresis* **1996**, 1167–1172.
- [40] M. D. Dutton, R. J. Varhol, D. G. Dixon, *Analytical Biochemistry* **1995**, 230, 353–355.
- [41] Nils Heimann, *Dissertation*, **2009**.
- [42] CE Aufbau, can be found under <http://www.pharmchem.tu-bs.de/forschung/waetzig/kpep/>.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthesen

4.1.1 Darstellung des ODN-RNase-Konjugats

4.1.1.1 Darstellung des CPG-ODN-Benzylthioesters

Der CPG-ODN-Benzylthioester wurde, wie in Kapitel 6.1.1. beschrieben, durch Reaktion des CPG-ODN-NHS-Esters an der Festphase mit Benzylmercaptan synthetisiert. Dabei addierte in einer Substitutionsreaktion das weiche, nukleophile Thiol des Benzylmercaptans an die NHS-Ester-Gruppe unter gleichzeitiger Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid (Abbildung 4-1). Aufgrund der Trägeranbindung, der Größe und Komplexität des Makromoleküls war bei diesem Schritt allerdings kein direkter Nachweis für eine erfolgreiche Umsetzung möglich. Der indirekte Nachweis konnte allerdings nach erfolgter nativer chemischer Ligation, z.B. mit einem weiteren Biomakromolekül, etwa der RNase „Cys-ZFY-6“ (Abbildung 4-2), erfolgen. Durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie des Benzylthioesters konnte jedoch in einer analogen, niedermolekularen Modellreaktion an Laurinsäure-NHS-Ester^[1] eindeutig nachgewiesen werden, dass die erfolgreiche Transformation des NHS- in den Benzylthioester stattgefunden hat.

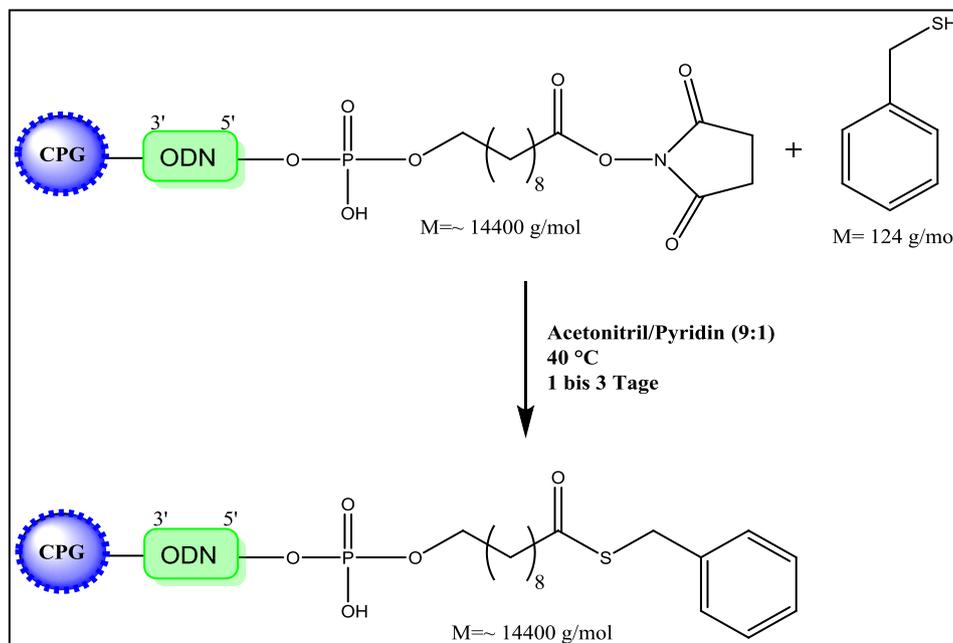


Abbildung 4-1: Reaktion von CPG-ODN-NHS (46 Basen) mit Benzylmercaptan in Acetonitril/Pyridin (9:1 v/v) mit DMAP als Katalysator bei 40 °C am festen Träger.

4.1.1.2 Variation der Reaktionsbedingungen der Nativen Chemischen Ligation zur Optimierung der Ausbeute an ODN-RNase-Konjugat

Der synthetisierte CPG-ODN-Benzylthioester wurde im Anschluss mit einem Peptid, zumeist einer synthetischen RNase (ZFY-6), zur Konjugation mittels Nativer Chemischer Ligation (NCL)^[2] umgesetzt. Die von der Firma Bachem bzw. Panatecs erhaltene RNase war durch ein zusätzliches Cystein am N-Terminus modifiziert, das essentiell für die NCL ist. Zudem waren in den ersten Ordnern die beiden Cysteine an Stelle 6 und 9 durch einen Acetamidomethyl(Acm)-Gruppe blockiert, um eventuelle Nebenreaktionen zu unterdrücken. Die komplette Aminosäuresequenz der RNase ZFY-6 ist im Experimentellen Teil (Seite 140) nachzulesen. Im Folgenden soll die mit der Acm- Schutzgruppe blockierte RNase mit „Cys-ZFY-6-Acm“, die ungeschützte, freie RNase mit „Cys-ZFY-6“ bezeichnet werden. In Abbildung 4-2 ist der ausführliche Reaktionsmechanismus der Nativen Chemischen Ligation exemplarisch dargestellt. Hierbei addiert zunächst das Thiol des N-terminalen Cysteins des Peptids als weiches Nucleophil an die Carbonylfunktion des CPG-ODN-Benzylthioesters (chemo- und regioselektive Schwefelumesterung). Anschließend findet eine spontane intramolekulare Umlagerung zum thermodynamisch stabileren Produkt statt („N→S Acyl Shift“). Die darauffolgende Trägerabspaltung mit konz. Ammoniak bei 47 Grad über Nacht liefert schließlich das gewünschte ODN-RNase-Konjugat mit freiem 3'-OH am ODN, welches später für die radioaktive cDNA-Synthese benötigt wird (siehe Kapitel 4.2).

Zur Optimierung der Ausbeute wurden in dieser Arbeit verschiedene Reaktionsparameter (Reaktionszeit, Größe des CPG, Lösemittelzusammensetzung, Konzentration, molares Verhältnis und die Anwesenheit von TCEP) sukzessive variiert.

Die primäre Analyse der Produkte erfolgte über eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Andere durchgeführte chemische Analysemethoden des ODN-RNase-Konjugats, wie zum Beispiel GPC, CE und MALDI-TOF-MS, sind in einem separaten Kapitel (siehe 4.1.1.4) zusammengefasst.

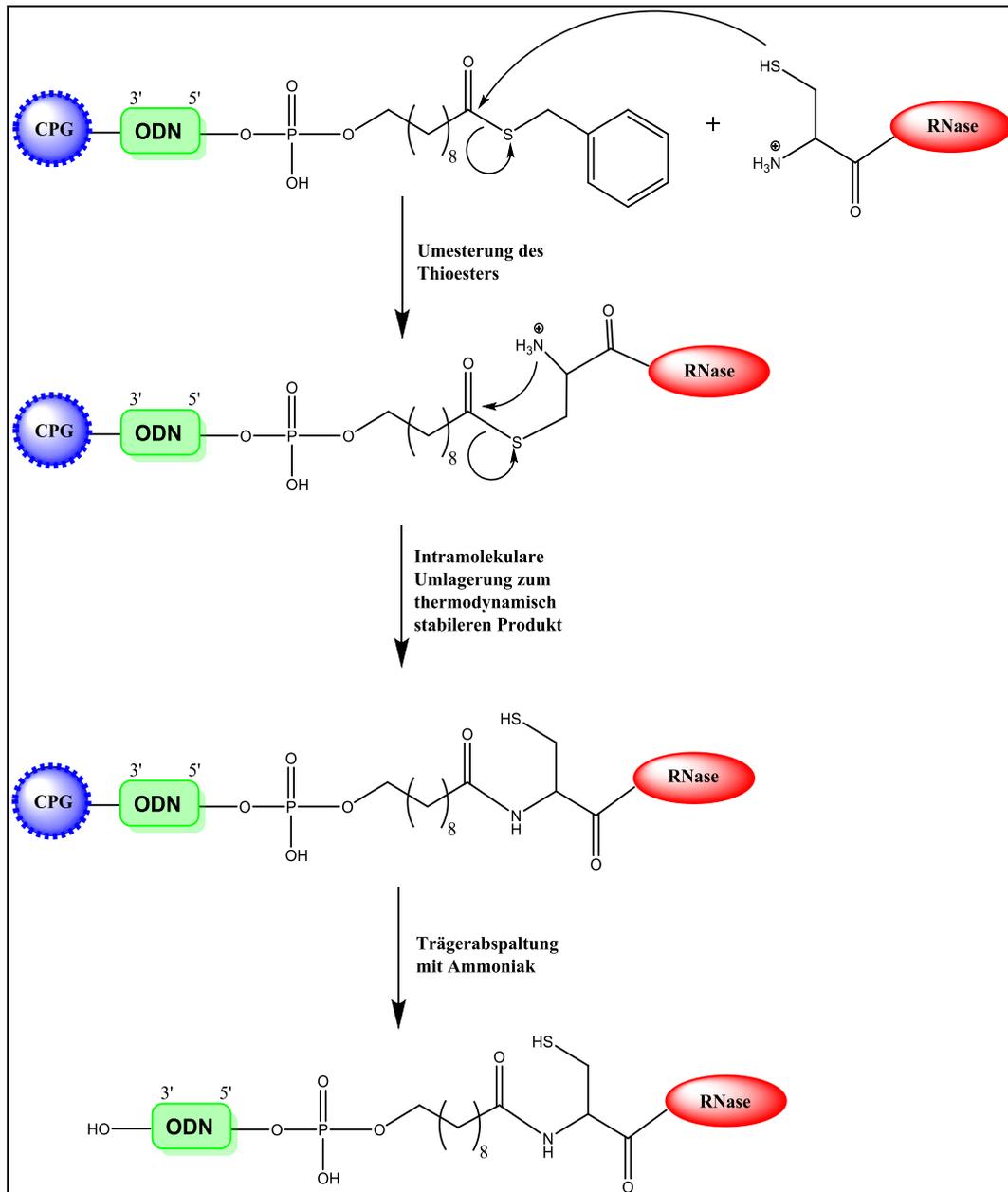


Abbildung 4-2: Reaktionsmechanismus der Nativen Chemischen Ligation mit anschließender Trägerabspaltung am Beispiel der Konjugation von CPG-ODN-Benzylthioester und RNase „Cys-ZFY-6“.

4.1.1.2.1 Konjugation der blockierten RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ an einen Benzylthioester - Reaktionsbedingungen der NCL nach Kent

In der Diplomarbeit von Andreas Böckler^[1] wurde die NCL zumeist in 0,1 M PBS-Puffer durchgeführt - mit größtenteils geringen Ausbeuten bzw. keinem Umsatz bei länger-kettigen Peptiden, wie z.B. der 31-Aminosäurelangen RNase „Cys-ZFY-6-Acm“. Um die Ausbeute auch bei länger-kettigen Peptiden signifikant zu erhöhen, wurde zunächst das Reaktionsmedium der NCL variiert. Stephen Kent optimierte einen Puffer^[3], in welchem die NCL effektiver funktionieren soll. Hierzu wurde zunächst analog der CPG-ODN-Benzylthioester (Darstellung entsprechend 6.1.1.1. für zwei Tage) in einer sogenannten „Stock Solution“ gelöst. Das darin enthaltene Guanidin sollte vor allem die Solubilisierung verbessern, während das Dinatriumhydrogenphosphat die Lösung in einem pH-Bereich von 6,8 bis 7,0 abpufferte. Ferner sollte in der sogenannten „NCL Buffer Solution“ das solvatisierte Peptid mit N-terminalem Thiol durch Zugabe von 20 mM TCEP stets in reduzierter Form vorliegen. Zugewetztes MPAA (Mercaptophenyllessigsäure) sollte als Katalysator die NCL beschleunigen^[4]. Ausgehend von einem Deca-Peptid (Aminosäuresequenz siehe 6.1.1.2.1), das unter anderem als Kontrollprobe dienen sollte, wurden die Konjugationsbedingungen angepasst und auf die RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ übertragen. Die Reaktionszeit der NCL betrug für beide Peptide 1 bzw. 3 Tage.

Wie in Abbildung 4-3 durch das Fehlen der Konjugatsbande bei ca. 75-80b zu erkennen ist, war keine der sechs unterschiedlichen Reaktionsansätze erfolgreich. Eine mögliche Hydrolyse des CPG-ODN-Benzylthioesters als Ursache ist dabei auszuschließen, da zwei unterschiedliche CPG-ODN-Benzylthioester eingesetzt wurden, wobei der eine frisch synthetisiert wurde. Die beiden Peptide sollten aufgrund der Zugabe von TCEP zur „NCL Buffer Solution“ ebenfalls in ihrer reduzierten, reaktiveren Spezies vorliegen. Ein möglicher Grund für den fehlenden Umsatz könnte der unterschüssige Einsatz der Peptide sein. Das Molverhältnis des am Trägermaterial gebundenen ODNs zu Peptid betrug nahezu 2:1. Einen anderen, gravierenderen Einfluss könnte allerdings der Grenzflächenspannung des Wassers und der damit geringen Benetzung des erheblich hydrophoberen ODN-Trägermaterials zugeschrieben werden. Die reaktionsfähigen Gruppen des CPG-ODN-Benzylthioesters liegen zu einem großen Teil in den Poren des CPGs verborgen, zu denen die N-terminalen Cysteingruppen des Peptids aufgrund der Grenzflächenspannung des Wassers keinen Zugang haben und somit nicht reagieren können. Bei der Synthese des CPG-ODN-Benzylthioesters aus CPG-ODN-NHS-Estern mit Benzylmercaptan hingegen kommen die beiden Reaktionspartner aufgrund der geringen Grenzflächenspannung des Acetonitrils als

Reaktionsmedium gut in Kontakt und können folglich effizienter reagieren. Wenn die Reaktion, wie von Kent (allerdings in freier Lösung mit homogener Reaktionsführung) beschrieben, in Wasser durchgeführt wird und nicht wie in dieser Arbeit am Träger, führt der Puffer zu relativ hohen Ausbeuten^[4,5]. Für die Konjugation am Träger sollte man sich jedoch wegen der vorgegebenen, zwangsweise heterogenen Reaktionsführung an der stark hydrophoben, trägergebundenen Komponente Alternativen überlegen, die die Ausbeute deutlich verbessern könnten.

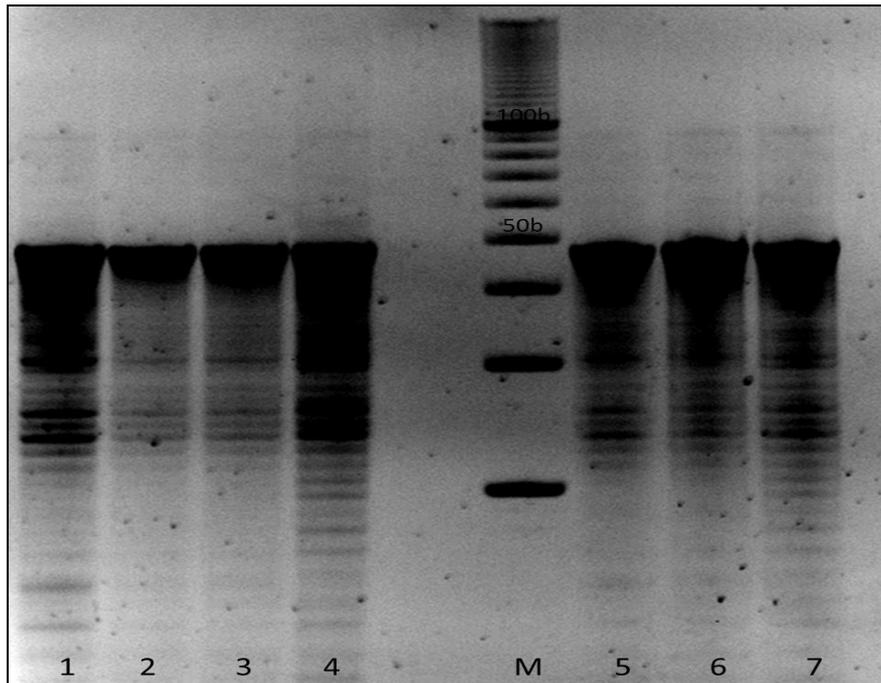


Abbildung 4-3: Denaturierende, 20%ige PAGE Analyse der Konjugation eines 46-basenlangem ODN mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ und einem 10-Peptid in dem von Kent entwickelten Konjugationspuffer. Spur 1: Reaktion des frisch synthetisierten CPG-ODN-Benzylthioesters mit dem 10-Peptid für einen Tag; Spur 2 und Spur 3: Reaktion des frisch synthetisierten CPG-ODN-Benzylthioesters mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ für einen Tag; Spur 4: Reaktion des älteren CPG-ODN-Benzylthioester mit dem 10-Peptid für einen Tag; Spur M: 10b-Marker; Spur 5: Reaktion des frisch synthetisierten CPG-ODN-Benzylthioester mit dem 10-Peptid für drei Tage; Spur 6: Reaktion des frisch synthetisierten CPG-ODN-Benzylthioesters mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ für drei Tage; Spur 7: Reaktion des älteren CPG-ODN-Benzylthioesters mit dem 10-Peptid für drei Tage.

4.1.1.2.2 Untersuchung des Einflusses der Porengröße des Trägers

Um die Zugänglichkeit der reaktiven Gruppen im CPG zu untersuchen, wurden zwei CPGs verwendet, die sich in ihrer Porengröße (2000 Å bzw 3000 Å) unterschieden. Beide wurden für vier Wochen mit N-(6-Aminoethyl)rhodamin 6G- amid bis(trifluoroacetat), kurz „Amino“-Rhodamin, in Acetonitril bei 40 Grad versetzt (Abbildung 4-4). Der Farbstoff wurde dabei im 20fachen Überschuss eingesetzt. Da die Reaktionsbedingungen für beide CPGs identisch waren, hatte lediglich die unterschiedliche Porengröße einen Einfluss auf die Reaktion. Dabei sollte eine höhere Porengröße und somit verbesserte Penetration die Reaktivität und Ausbeute erhöhen.

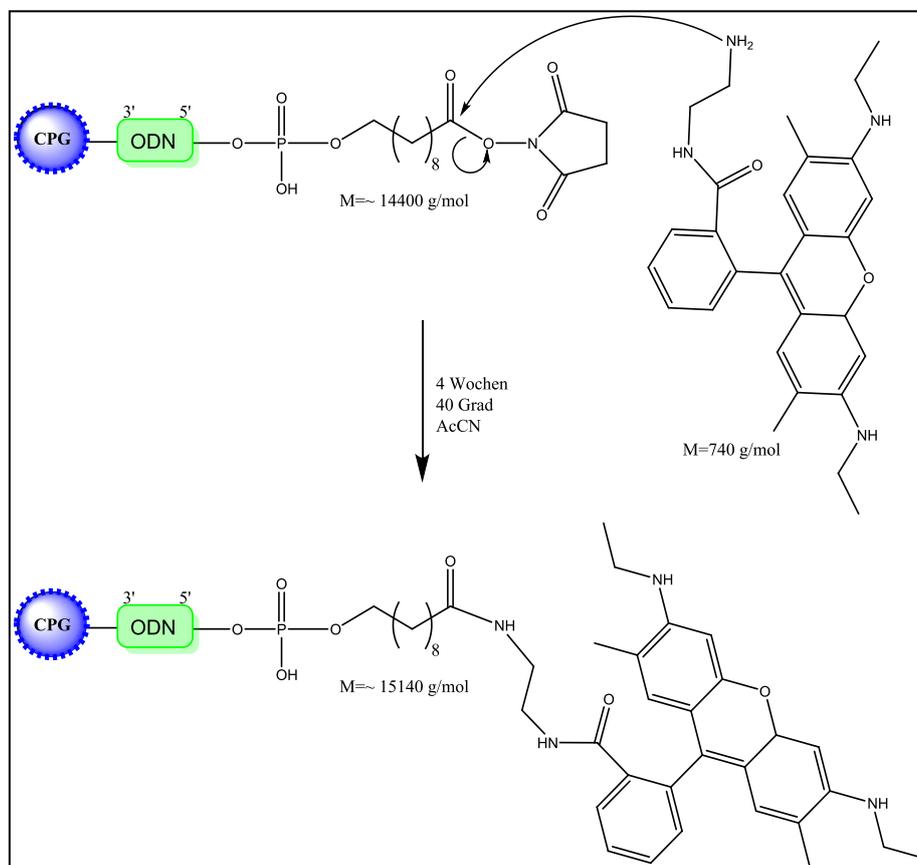


Abbildung 4-4: Reaktion des CPG-ODN-NHS-Esters mit „Amino“-Rhodamin

In Abbildung 4-5 sind die gelelektrophoretischen Analysen der Reaktionsprodukte der Reaktion von CPG-ODN-NHS-Esters und „Amino“-Rhodamin mit unterschiedlichen Porengrößen zu sehen. Auffällig ist, dass bei dem 3000 Å porengroßem CPG (Spur: DNA-Rhod.(3000)) nahezu vollständiger Umsatz erhalten wurde. Die reine DNA-Bande (Edukt) ist kaum zu erkennen, im Gegensatz zur Reaktionsmischung des 2000 Å porengroßen CPGs.

Hier sind beide Banden (Produktbande kurz über der Eduktbande) deutlich erkennbar, was auf einen unvollständigen Umsatz schließen lässt. Da das „Amino“-Rhodamin in 20fachem Überschuss eingesetzt wurde ist ein Verbrauch an „Amino“-Rhodamin auszuschließen. Wahrscheinlicher ist konkurrierende, zumindest partiell ablaufende Hydrolyse des NHS-Esters während der langen Reaktionszeit. Folglich muss die Reaktionsgeschwindigkeit der NCL am 3000 Å CPG höher im Vergleich zum 2000 Å CPG sein bzw. höher als die jeweilige NHS-Ester-Hydrolyse. Höherer Reaktionsumsatz könnte auf bessere Zugänglichkeit der Reaktionspartner schließen. Somit ist der Träger mit größeren Poren besser für die NCL geeignet.

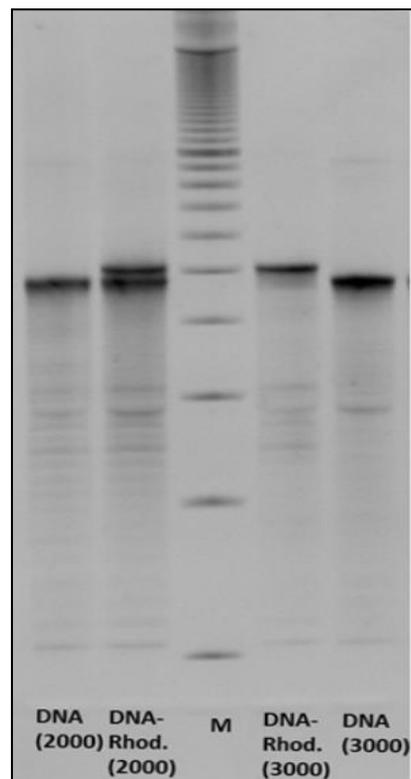


Abbildung 4-5: Denaturierende, 20 % PAGE der Konjugationsprodukte der beiden CPG-ODN-NHS-Ester mit „Amino“-Rhodamin und der jeweiligen unreaktierten DNA als Kontrolle. DNA (2000): Unreagierte 46-basenlange DNA als Kontrollbande (2000 Å CPG); DNA-Rhod. (2000): Reaktionsprodukt aus einer 46-basenlangen DNA und „Amino“-Rhodamin (2000 Å CPG); DNA (3000): Unreagierte 46-basenlange DNA als Kontrollbande (3000 Å CPG); DNA-Rhod. (3000): Reaktionsprodukt aus einer 46-basenlangen DNA und „Amino“-Rhodamin (3000 Å CPG).

4.1.1.2.3 Untersuchung des Einflusses des Reaktionsmediums, der Porengröße des Trägers und der Reaktionsdauer

Eine weitere Möglichkeit die Ausbeute der NCL zu erhöhen, besteht darin, die Grenzflächenspannung des Wassers durch sukzessiven Zusatz organischer Lösemittel zu senken und somit ein verbessertes Benetzungsverhalten und Eindringen des Lösemittels in die Poren zu ermöglichen. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine längere Reaktionsdauer der beiden Stufen (Benzylthioestersynthese und NCL) einen Einfluss auf die Ausbeute haben könnte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nachfolgend ein Flussdiagramm zu sehen, bei dem die einzelnen Ansätze grafisch dargestellt werden und jeder Ansatz eine Codierung erhält (Abbildung 4-6). Zunächst wurde die Reaktion zum CPG-ODN-Benzylthioester für 1, 3 und 7 Tage (im Diagramm mit 3BT1, 3BT3 und 3BT7 abgekürzt) durchgeführt. Die Synthesen fanden in gleicher Weise auf den 2000 und 3000 Å porengroßen Trägern statt. Nach erfolgter CPG-ODN-Benzylthioestersynthese wurden die Ansätze aufgeteilt und in unterschiedlichen Reaktionsmedien äquimolar mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ und zur Kontrolle mit einem Hexapeptid zur Reaktion gebracht. Die Reaktionsdauer variierte hierbei zwischen einem und 21 Tagen. Die drei unterschiedlichen Reaktionsmedien unterschieden sich im Gehalt an Acetonitril. So enthielt die mit „Stock Solution (SS)“ betitelt Lösung kein Acetonitril, die „Mix“-Lösung ca. ein Viertel und die „Ac“-Lösung nahezu die Hälfte. Dagegen misslang wie erwartet der Versuch, die RNase in den gewünschten Konzentrationen in reinem Acetonitril zu lösen. Wie anhand des Flussdiagramms zu erkennen, wird das Produkt der Benzylthioestersynthese auf 20 weitere Ansätze zur Weiterreaktion mittels NCL aufgeteilt. So ergeben sich 60 Ansätze je Träger. Die Beschriftung der Proben lief hierbei systematisch ab und soll an folgendem Beispiel nochmals verdeutlicht werden.

Probe: 3BT7Mix7d:

Die Reaktion fand auf dem 3000 Å CPG statt. Dabei verlief die erste Stufe, die Benzylthioestersynthese (BT), sieben Tage. Die anschließende Reaktion der NCL wurde in der Mix-Lösung, die ein Viertel Acetonitril enthielt, für sieben Tage durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Proben ist im experimentellen Teil zu finden.

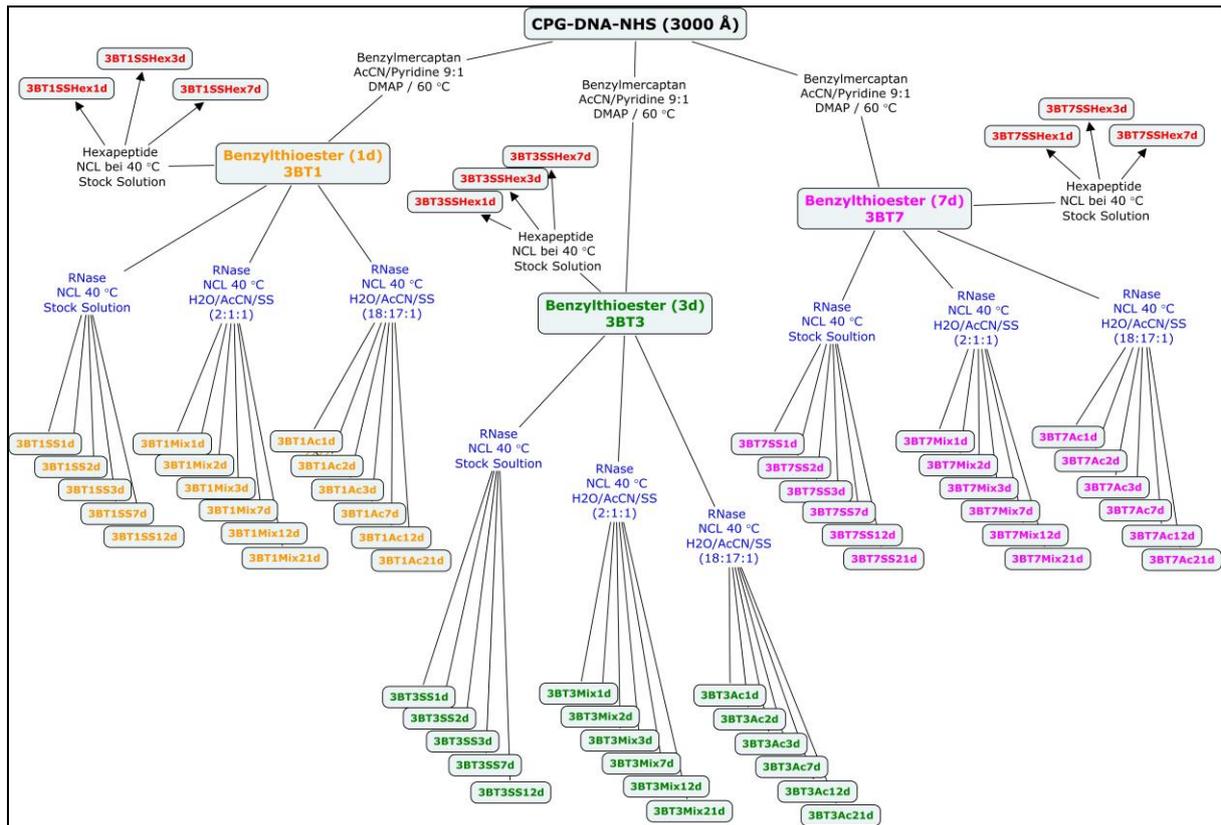


Abbildung 4-6: Flussdiagramm zur grafischen Darstellung der Reaktionsdurchführung zur Synthese des ODN-RNase-Konjugats auf dem 3000 Å CPG.

Die Analyse der ca. 120 Ansätze erfolgte durch sechs denaturierende, 20%ige Polyacrylamidgelelektrophoresen. Dabei wurden die jeweiligen Ansätze so geordnet, dass jeweils zwei PAGEs mit den Proben beladen wurden, die die gleiche Reaktionszeit der Benzylthioestersynthese hatten.

a) 2BT1 und 3BT1

Im Folgenden sind beide PAGE-Gelbilder (Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8) der eintägigen Benzylthioester-Synthese dargestellt. Die Codierung der einzelnen Ansätze ist zur besseren Übersicht in den Gelbildern mit angegeben. Die Bande des ODNs bzw. des ODN-RNase-Konjugats ist jeweils mit einem schwarzen Pfeil angedeutet.



Abbildung 4-7: Denaturierende, 20 % PAGE Analyse der Konjugation von CPG-ODN-NHS-Ester mit Benzylmercaptan für einen Tag und anschließender NCL mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ bzw. einem Hexapeptid bei unterschiedlichen Reaktionsparametern.

Es ist direkt zu erkennen, dass die Reaktion in der wässrigen „Stock Solution“ (A1-A5 und B1-B5) deutlich schlechter funktioniert als die Reaktion in der „Ac“-Lösung (D1-D6). Hier ist bei allen sechs Ansätzen deutlich eine Konjugatsbande bei ca. 80 b zu erkennen. Die Banden knapp unter 100b sind die Dimerbanden des 46-ODNs, auch „Geisterbanden“ genannt. Wie es scheint nimmt die Intensität der Konjugatsbande mit längerer Reaktionszeit der NCL nicht sichtbar zu (Vergleich D1 mit D6). Somit ist anzunehmen, dass ein Tag Reaktionszeit der NCL ausreichend ist. Die Proben C1-C6 zeigen die Reaktion des CPG-ODN-Benzylthioester mit dem Hexapeptid für 1, 3 und 7 Tage. Der Vergleich von C2 mit C3 zeigt, dass eine Konjugatsbande erst nach 3 Tagen auftaucht und nach 7 Tagen nicht zugenommen hat. Wenn man weiterhin die drei Proben (C1-C3) auf dem großen Träger (3000 Å) mit den drei Proben auf dem kleinen Träger (C4-C6) vergleicht, ist zu erkennen, dass die NCL auf Ersterem effizienter abläuft.

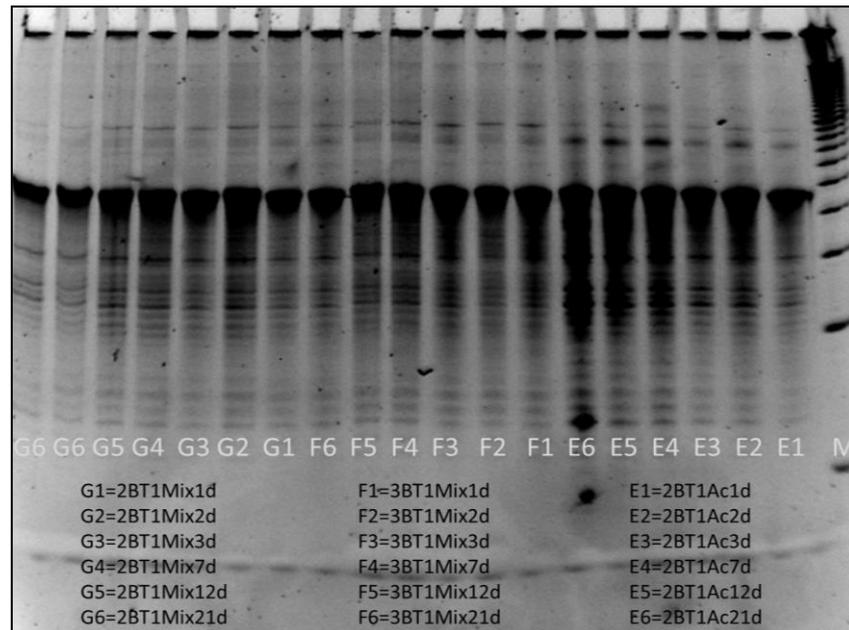


Abbildung 4-8: Denaturierende, 20 % PAGE Analyse der Konjugation von CPG-ODN-NHS-Ester mit Benzylmercaptan für einen Tag und anschließender NCL mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ bzw. einem Hexapeptid bei unterschiedlichen Reaktionsparametern.

Auch in der Abbildung 4-8 ist zu erkennen, dass die Reaktionen (E1-E6) in der „Ac“-Lösung mit nahezu 50% Acetonitrilzusatz zu höheren Konjugatsausbeuten geführt haben im Vergleich zu den jeweiligen Reaktionen in der Mix-Lösung (G1-G6 und F1-F6). Bei den Ansätzen, die in der „Mix“-Lösung stattgefunden haben, lässt sich ein leichter Unterschied zwischen dem großen und kleinen CPG erkennen. Die Ausbeuten an ODN-RNase-Konjugat sind bei dem 3000 Å CPG etwas höher (F1-F6), jedoch aber deutlich geringer als die Ausbeuten der Reaktionen in der „Ac“-Lösung. Weiterhin ist zu beobachten, dass die Konjugatsbanden von E4, E5, E6 intensiver sind als die von E1 oder E3. Jedoch ist hier zu erwähnen, dass in diesen Spuren deutlich mehr aufgetragen wurde als bei E1.

Zusammenfassung 2BT1 und 3BT1:

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Reaktionen im „Ac“-Medium die besten Ausbeuten liefern. Weiterhin ist eine leichte Favorisierung des 3000 Å CPGs gegenüber dem 2000 Å zu erkennen. Am schlechtesten sind die Ausbeuten in der von Kent vorgeschlagenen „Stock Solution“. Alle Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zugänglichkeit der beiden Reaktionspartner durch Variation des Lösungsmittels und Größe des Trägers erhöht wurden.

b) 2BT3 und 3BT3

Nachfolgend sind beide PAGE-Gelbilder der dreitägigen Benzylthioester-Synthese dargestellt. Zur besseren Übersicht sind erneut die Codierungen in den Gelbildern angegeben.

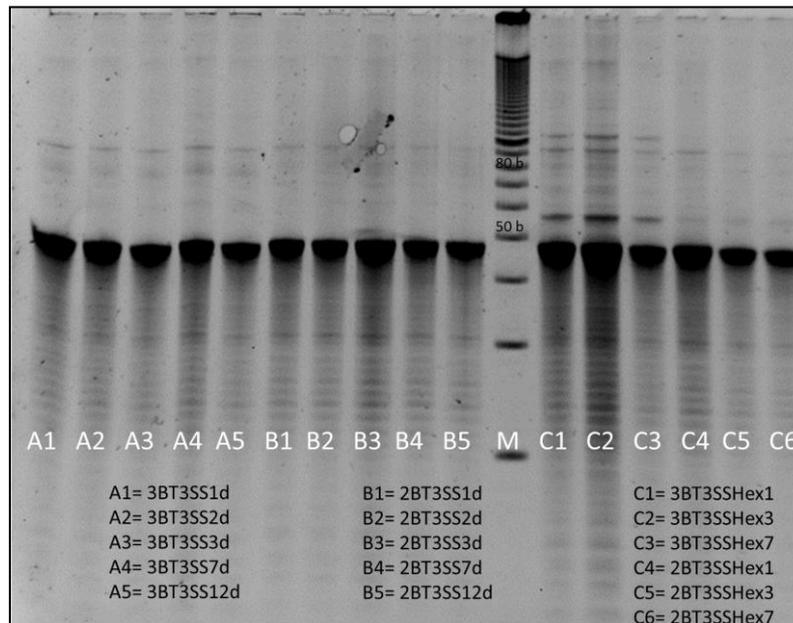


Abbildung 4-9: Denaturierende, 20 % PAGE Analyse der Konjugation von CPG-ODN-NHS-Ester mit Benzylmercaptan für drei Tage und anschließender NCL mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ bzw. einem Hexapeptid bei unterschiedlichen Reaktionsparametern.

Wenn man zunächst die Serie A1-A5 mit der Serie B1-B5 in der Abbildung 4-9 vergleicht, lässt sich wieder eine leichte Favorisierung des 3000 Å CPG bei der Konjugatsdarstellung (bei ca. 80b) erkennen. Deutlicher wird diese Favorisierung, wenn man C1-C3 mit C4-C6 vergleicht. Hier sieht man ganz klar, dass die Ansätze auf dem 3000 Å CPG zu höheren Konjugatsausbeuten mit dem Hexapeptid (bei ca. 55b) geführt haben.

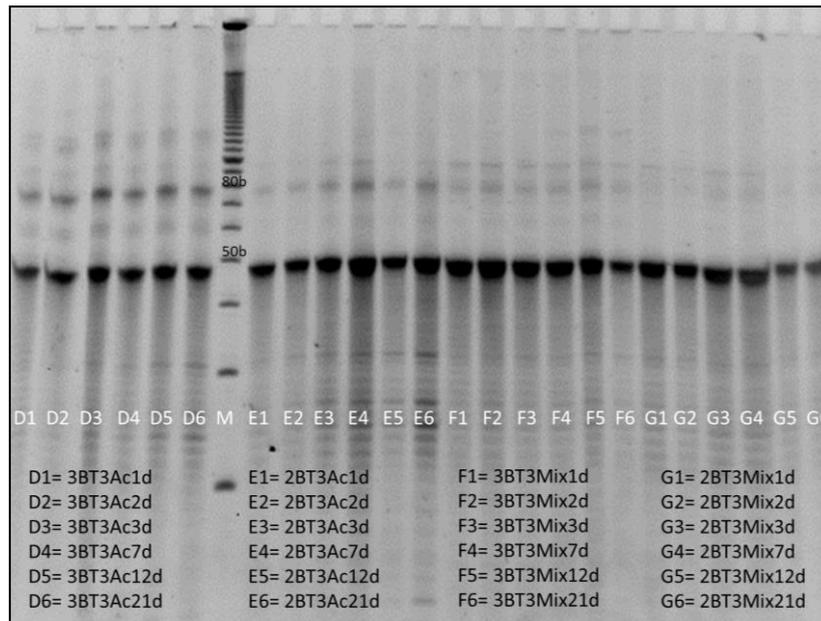


Abbildung 4-10: Denaturierende, 20 % PAGE Analyse der Konjugation von CPG-ODN-NHS-Ester mit Benzylmercaptan für drei Tage und anschließender NCL mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ bei unterschiedlichen Reaktionsparametern.

Aus dem Elektropherogramm (Abbildung 4-10) sind folgende Schlussfolgerungen zulässig: Die Konjugation im „Ac“-Lösemittel auf dem 3000 Å CPG liefert die höchsten Ausbeuten an ODN-RNase-Konjugat bei ca. 80b (D1-D6). Ferner ist zu erkennen, dass die Konjugation auf dem 3000 Å CPG sowohl beim Lösemittel „Ac“ als auch beim „Mix“-Lösemittel besser funktioniert als jene auf dem 2000 Å CPG. Dazu sind die Konjugatsbanden von D1-D6 mit denen von E1-E6 zu vergleichen, bzw. jene von F1-F6 mit den G1-G6-Banden.

Zusammenfassung 2BT3 und 3BT3:

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, wie in a) schon beschrieben, die Konjugationen auf dem 3000 Å CPG besser zu funktionieren scheinen als auf dem 2000 Å CPG. Beeindruckender jedoch ist, dass die Konjugation im Ac-Lösemittel, was nahezu zur Hälfte aus AcCN besteht, entscheidend besser funktioniert als in den beiden anderen. Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit der aus a).

c) 2BT7 und 3BT7

Abschließend sind beide Elektropherogramme der siebentägigen Benzylthioester-Synthese dargestellt. Auch hier sind zur besseren Übersicht die Codierungen in den Elektropherogrammen angegeben.

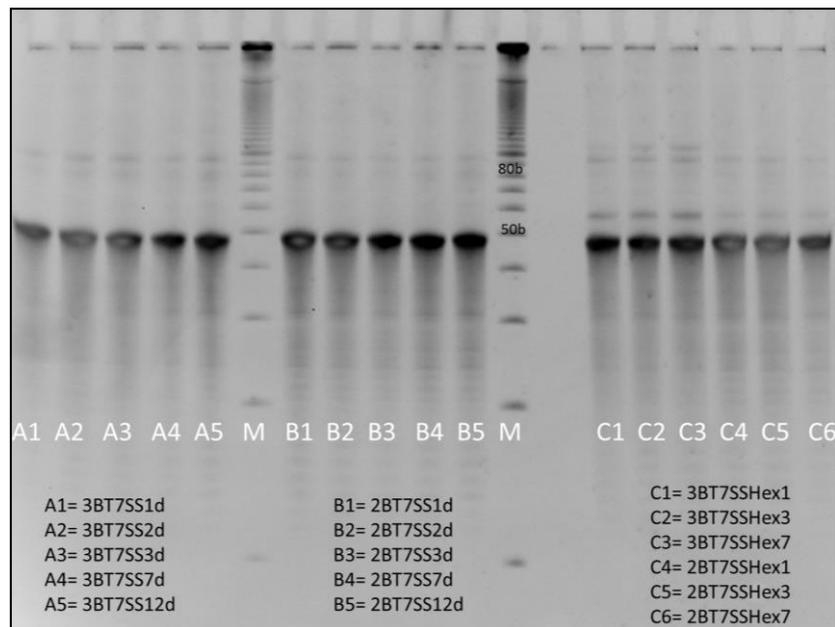


Abbildung 4-11: Denaturierende, 20 % PAGE Analyse der Konjugation von CPG-ODN-NHS-Ester mit Benzylmercaptan für sieben Tage und anschließender NCL mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ bzw. einem Hexapeptid bei unterschiedlichen Reaktionsparametern.

Es lässt sich aus Abbildung 4-11 erkennen, dass die Konjugatssynthese in der von Kent entwickelten „Stock Solution“ nur schlecht funktioniert. Es sind kaum Konjugatsbanden bei ca. 80b im obigen Elektropherogramm zu erkennen (A1-A5 bzw. B1-B5). Ansonsten ist bei der C-Serie zu erkennen, dass die Reaktionen auf dem 3000 Å CPG (C1-C3) bessere Ausbeuten liefern als auf dem 2000 Å CPG. Dies deckt sich mit den Beobachtungen aus a) und b)

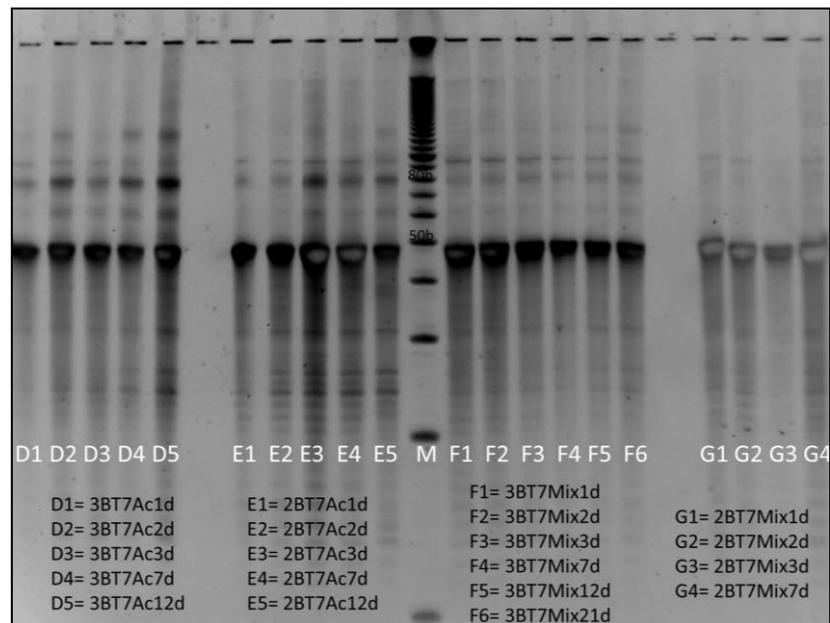


Abbildung 4-12: Denaturierende, 20 % PAGE Analyse der Konjugation von CPG-ODN-NHS-Ester mit Benzylmercaptan für sieben Tage und anschließender NCL mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ bei unterschiedlichen Reaktionsparametern.

Wie schon in a) und b) beschrieben, ist auch in dem obigen Elektropherogramm (Abb. 4-12) die effizienteste Methode die beiden Makromoleküle (ODN und RNase „Cys-ZFY-6-Acm“) in einem teilweise organischen Lösemittel („Ac“-Lösung) reagieren zu lassen. Die Konjugatsbanden der D- und E-Serie sind deutlich stärker im Vergleich zur F- und G-Serie. Über eine effizientere Kupplung auf dem 3000 Å CPG im Vergleich zum 2000 Å CPG lässt sich für die D- und E-Serie nur spekulieren. Die F-Serie hingegen deutet darauf hin, dass der größere CPG höhere Ausbeuten an Konjugat liefert. Etwas verwunderlich ist das Auftreten einer unbekanntes Bande bei ca. 60b. Möglicherweise sind hier durch die langen (7 Tage) Reaktionszeiten des CPG-ODN-NHS-Esters mit Benzylmercaptan eventuelle DNA-Einzelstrangbrüche durch die Anwesenheit der Base Pyridin im Reaktionsmedium aufgetreten, welche aber dennoch als Benzylthioester funktionalisiert wurden und anschließend über die NCL mit der RNase reagiert haben könnten. Eine ODN-Dimer-Geisterbande von einer 30-basenlangen ODN-Fehlsequenz würde eine weitere Möglichkeit darstellen. Da die Banden bei 60b nur bei den Reaktionen nach siebentägiger Benzylthioestersynthese auftreten, sollte die Reaktionszeit des CPG-ODN-Benzylthioesters nicht länger als drei Tage betragen. Ferner ist die ODN (46 Basen) Dimerbande knapp unter 100b leicht erkennbar. Weiter oben, sprich mit der geringsten elektrophoretischen Mobilität, ist zusätzlich eine Bande bei ca. 140b zu erkennen, was auf eine Dimerisierung des Konjugats (Oxidation der Thiole zu Disulfidbrücken) hindeuten könnte. Die Struktur dieses Konjugatsdimers ist in Abbildung 4-13 dargestellt. Zu Verdeutlichung der einzelnen Banden

wurde ein Ausschnitt des Elektropherogramms aus Abbildung 4-12 vergrößert dargestellt und die einzelnen Banden markiert und beschriftet.

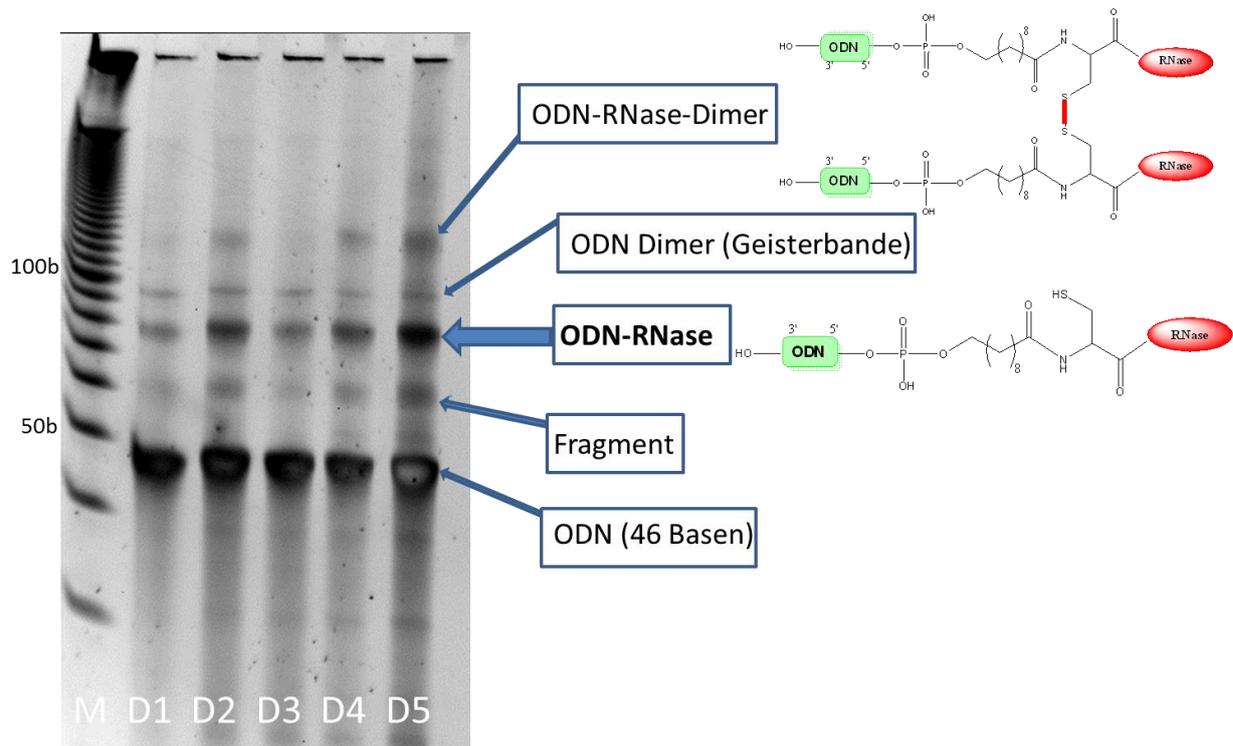


Abbildung 4-13: Detaillierte Betrachtung der Konjugationsprodukte aus der Konjugation CPG-ODN-NHS-Ester mit Benzylmercaptan für sieben Tage und anschließender NCL in der AC-Lösung mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“

Nachdem von ausgewählten Proben GPC-Messungen durchgeführt wurden (siehe Kapitel 4.1.1.5.1.), wurden alle Proben vereint, bis zur Trockene einrotiert, gewogen (21,3 mg) und schließlich über die Präparative Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe Kapitel 4.1.1.3.).

Zusammenfassung:

In allen sechs Elektropherogrammen sind folgende Trends deutlich erkennbar:

- Reaktionen auf dem 3000 Å CPG liefern höhere Ausbeuten als auf dem 2000 Å CPG.
- Je höher der organische Anteil des Lösemittels bei der NCL, desto höher sind die Ausbeuten der jeweiligen Reaktion. Folglich ergeben sich für die Reaktionen im Ac-Lösemittel (nahezu zur Hälfte aus AcCN) die intensivsten Konjugatsbanden bei knapp unter 80b. Grund hierfür könnte die verbesserte Penetration des Peptids in die Poren des CPG durch Herabsetzen der Grenzflächenspannung sein.
- Ein Tag Reaktionszeit für die Synthese des Benzylthioester und ein Tag Reaktionszeit für die NCL liefern bereits durchaus akzeptable Ausbeuten

(3BT1Ac1d). Ferner sollte die Reaktionszeit der Benzylthioestersynthese nicht länger als drei Tage betragen, da sonst undefinierte Produkte (unerklärliche Banden), durch mögliche DNA-Einzelstrangbrüche aufgrund der langen Reaktionszeit, bei ca. 60b auftreten.

4.1.1.2.4 Untersuchung des Einflusses der Konzentration und des Überschusses der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ während der NCL

Die Reaktionen fanden nach den Ergebnissen der vorherigen Experimente nun auf dem 3000 Å CPG sowie im Lösemittel „Ac“ statt. Als nächstes galt es zu erkunden, ob ein Überschuss an RNase die Reaktion möglicherweise auf die Produktseite verschieben könnte. So wurde die RNase, auch aus Kostengründen, nur im zweifachen und im fünffachen Überschuss eingesetzt. Zusätzlich wurde die Konzentration noch variiert. In dem Ansatz mit zweifachem Überschuss an „Cys-ZFY-6-Acm“ lag die Konzentration bei 7,6 g/L, in dem fünffachen sogar bei 19 g/L. Die Reaktionszeit der NCL betrug zunächst zwei Tage. Nachdem festgestellt wurde, dass bei beiden Lösungen eine Suspension aufgetreten ist, wurde vermutet, dass eine disulfidische Dimerbildung über das N-terminale Cystein zur Unlöslichkeit führt. Da damit aber auch das im Sinne der NCL reaktive Peptid der Reaktion entzogen wird, sollte dies näher untersucht werden. Dazu wurde eine Spatelspitze herausgenommen und mit Ammoniak über Nacht geschüttelt, um die Produkte vom Träger abzuspalten. Die Codierung der Probe soll 2x für den Ansatz mit zweifachem Überschuss an RNase sein, die mit fünffachem Überschuss wird mit 5x betitelt (Abbildung 4-14). Um die These einer disulfidischen Dimerbildung zu bestätigen, wurden mehrmals 20 µL aus den Überständen (welche die RNase im Überschuss enthalten sollten) entnommen, entsprechend mit TCEP behandelt und auf einem NuPAGE Precast Gel analysiert (Abbildung 4-15). Anschließend wurden zur Reduktion der möglicherweise gebildeten Dimere 50 µL TCEP (0,5 M) hinzugegeben und für weitere zwei Tage reagiert und abschließend zur Analyse via denaturierender 20%iger PAGE über Nacht mit Ammoniak vom Träger abgespalten. Die Codierung hierfür ist 2xTCEP bzw. 5xTCEP. In folgendem Flussdiagramm (Abbildung 4-14) sollen die einzelnen Schritte der Durchführung bzw. der Herausnahme und Analyse von Proben grafisch übersichtlich dargestellt werden.

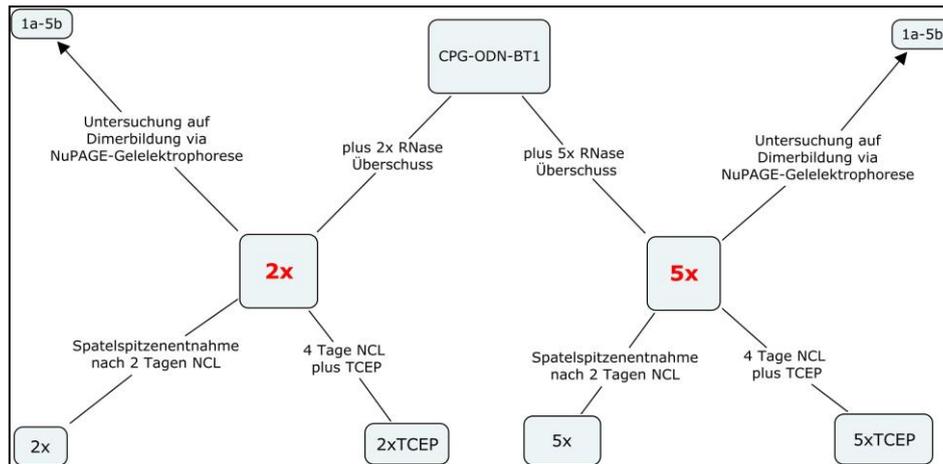


Abbildung 4-14: Übersicht über die Reaktionsdurchführung und jeweiligen zwischenzeitlichen Probenentnahmen der Konjugationsreaktion der NCL mit zweifachem bzw. fünffachem RNase-Überschuss.

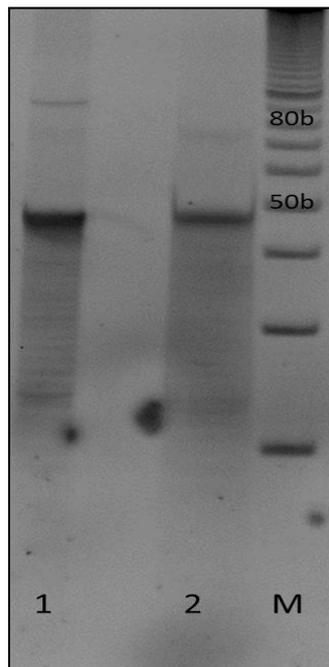


Abbildung 4-15: Denaturierende, 20 %ige PAGE Analyse der Konjugation des CPG-ODN-Benzylthioesters mit RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ in zwei unterschiedlichen Konzentrationen und Molarverhältnissen. Spur 1: Reaktionsprodukte aus der Reaktion eines 46-basenlangem ODN mit „Cys-ZFY-6-Acm“ im fünffachem Überschuss (5x); Spur 2: Reaktionsprodukte aus der Reaktion eines 46-basenlangem ODN mit Cys-ZFY-6-Acm im zweifachem Überschuss (2x); M: 10b Marker

Es soll zunächst untersucht werden, ob die durch Disulfidverbrückung verursachte Dimerbildung der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ tatsächlich stattgefunden hat. Hierzu wurden aus beiden Lösungen Proben entnommen und mit bzw. ohne Zusatz an TCEP auf einem 12%igen NuPAGE Bis-Tris Precast Gel analysiert. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Abbildung 4-16).

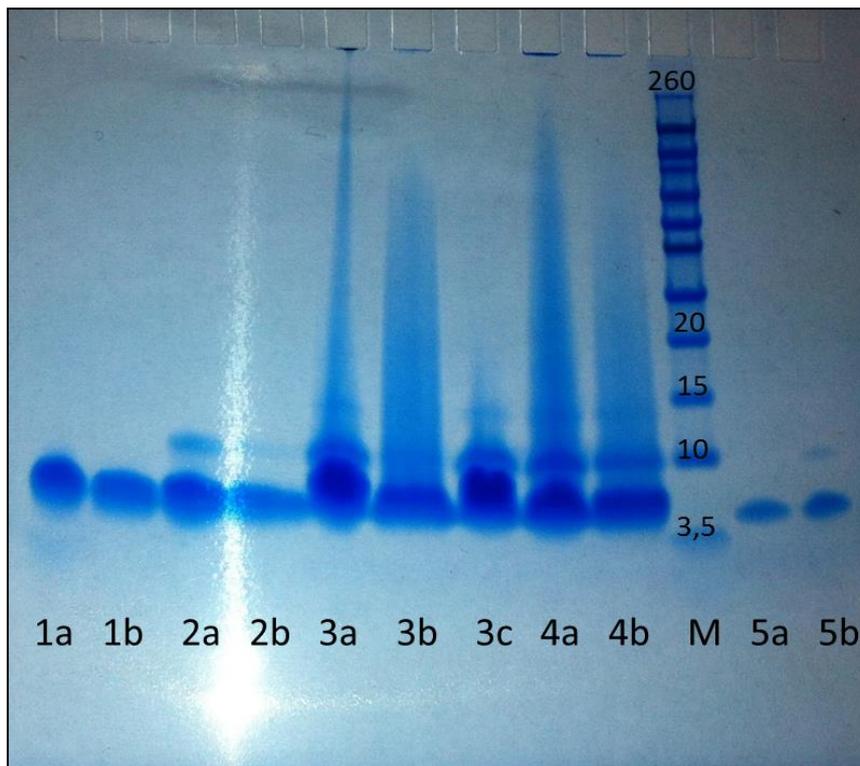


Abbildung 4-16: 12%ige NuPAGE Bis-Tris Precast Gelelektrophoreseanalyse der unterschiedlich behandelten Überstände der Reaktionsansätze aus CPG-ODN-Benzylthioester mit „Cys-ZFY-6-Acm“. Spur 1a: Zentrifugierter Überstand aus Probe „5x“; Spur 1b: Zentrifugierter Überstand aus Probe „5x“ plus TCEP; Spur 2a: Zentrifugierter Überstand aus Probe „2x“; Spur 2b: Zentrifugierter Überstand aus Probe „2x“ plus TCEP; Spur 3a: Unbehandelte, trübe Überstandslösung aus Probe „5x“; Spur 3b/3c: Trübe Lösung aus Probe „5x“ mit unterschiedlichen Mengen an TCEP; Spur 4a: Unbehandelte, trübe Überstandslösung aus Probe „2x“; Spur 4b: Trübe Überstandslösung mit TCEP; Spur 5a/5b: Waschrückstände auf CPG; M: Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard (in kDa).

Um zu untersuchen, ob das „Cys-ZFY-6-Acm“-Dimer in der Lösung ausfällt und folglich zur Trübung der Lösung führt, wurden die entnommenen Proben wie folgt behandelt. Es wurden zunächst 20 µL der 5x-Lösung entnommen und die trübe Lösung zentrifugiert, bis ein Pellet entstanden ist. 5 µL des nun klaren Überstandes wurden auf das NuPAGE-Gel geladen (Spur 1a). Bei der Spur 1b wurden zusätzlich noch 5 µL TCEP zur Lösung gegeben. Das gleiche Prozedere wurde für die Proben der 2x-Lösung angewandt (Spur 2a und 2b). In den Spuren 3a, 3b und 3c wurde der Überstand der 5x-Lösung nicht zentrifugiert. In Spur 3a sind 5 µL aus der trüben Lösung des Überstandes der 5x-Lösung unbehandelt aufgetragen, in 3b wurden 20 µL der trüben Lösung mit 10 µL TCEP versetzt, wovon 5 µL dieser Lösung, welche nach TCEP-Zugabe auch klar wurde, aufgetragen sind. In 3c wurden zu den entnommenen 20 µL der 5x-Lösung nur 1 µL TCEP hinzugegeben und hiervon 5 µL aufgetragen. Das gleiche gilt für die Spuren 4a und 4b für die 2x-Lösung; 4b wurde zusätzlich noch mit 5 µL TCEP versetzt. Bei den Spuren 5a und 5b handelt es sich um Rückstände auf dem Trägermaterial der beiden Lösungen. Somit sind diese für die nähere Betrachtung der Dimerbildung irrelevant.

Die NuPAGE Bis-Tris Precast Gel Analytik liefert den direkten Beweis, dass die Trübung der Lösung durch das Ausfallen der RNase-Dimere aus der Lösung hervorgerufen wird (vgl. 1a mit 3a). Der Überstand der zentrifugierten 5x-Lösung enthält lediglich RNase-Monomer (1a), wohingegen die trübe, unzentrifugierte Lösung sowohl Monomer als auch Dimer enthält (3a). Ergo können die Dimere als Pellet abzentrifugiert werden. Mit der entsprechenden Menge an TCEP können die Dimere zu Monomeren reduziert werden (siehe 3b), was auch zum Klären der Lösung geführt hat. Ferner ist nicht nur ein Dimer aus zwei RNase-Einheiten denkbar, sondern auch ein Dimer aus RNase mit Benzylmercaptan, welches durch die Hydrolyse des Benzylthioesters bzw. nach erfolgreicher NCL entstehen kann. Möglicherweise sind noch Rückstände an Benzylmercaptan auf dem Träger, das nicht vollständig in der vorherigen Stufe gewaschen werden konnte. Dies würde den breiten, nach oben gezogenen „Schmier“ in 3a erklären, welcher aber nach erfolgter Reduktion mit TCEP in 3b wieder auf die Höhe des Monomers wandert. Die entstandenen Banden stimmen gut mit der Molmasse der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ als Monomer ($M=3851$ g/mol) bzw. als Dimer mit dem Marker überein.

Nachfolgend ist die denaturierende 20%ige PAGE-Analyse der vier Proben 2x, 2xTCEP, 5x und 5xTCEP gezeigt (Abbildung 4-17). Hier lässt sich erkennen, dass die zusätzliche Reduktion der Dimere in der 2x-Lösung letztendlich noch zur Bildung des Konjugats geführt hat. Bei der 5x-Lösung scheint dies nicht der Fall zu sein. Möglicherweise war hier der Benzylthioester eventuell schon hydrolysiert und folglich nicht mehr zur Reaktion via NCL in der Lage.

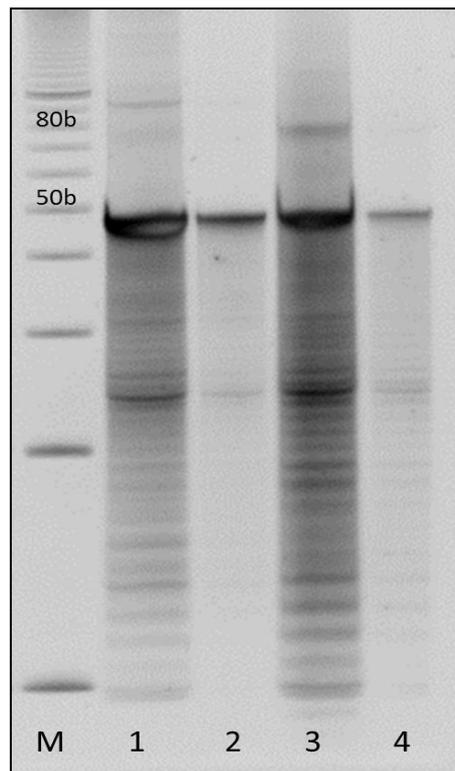


Abbildung 4-17: Denaturierende, 20%ige PAGE Analyse der Konjugation eines CPG-ODN-Benzylthioesters mit der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ in zwei unterschiedlichen Konzentrationen und Molarverhältnissen. M: 10b Marker; Spur 1: Reaktionsprodukte aus der Reaktion eines 46-basenlangem ODN mit „Cys-ZFY-6-Acm“ im fünffachen Überschuss mit anschließender Zugabe von TCEP (5xTCEP); Spur 2: Reaktionsprodukte aus der Reaktion eines 46-basenlangem ODN mit „Cys-ZFY-6-Acm“ im fünffachen Überschuss (5x); Spur 3: Reaktionsprodukte aus der Reaktion eines 46-basenlangem ODN mit „Cys-ZFY-6-Acm“ im zweifachen Überschuss mit anschließender Zugabe von TCEP (2xTCEP); Spur 4: Reaktionsprodukte aus der Reaktion eines 46-basenlangem ODN mit „Cys-ZFY-6-Acm“ im zweifachen Überschuss (2x)

Um grundsätzlich auszuschließen, dass die bei ca. 80b entstandene Bande nicht auch die reine RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ sein kann wurde eine denaturierende, 20%ige PAGE Analyse durchgeführt, auf welcher die reine DNA (46 Basen), die Konjugatsmischung (2xTCEP) und die reine RNase in unterschiedlichen Mengen (1 mg, 2 mg und 10 mg) aufgetragen wurden. Ferner wurde zum Vergleich der Überstand der NCL und reines TCEP (1,2 g) zum Vergleich aufgetragen.

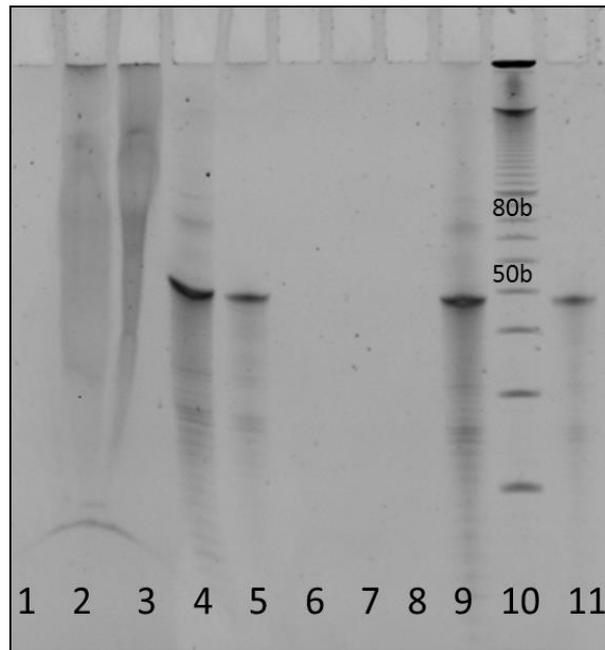


Abbildung 4-18: Denaturierende, 20%ige PAGE Analyse unterschiedlicher Analyten. Spur 1: TCEP; Spur 2: 20 μ L NCL-Überstand; Spur 3: 15 μ L NCL-Überstand; Spur 4 und Spur 9: Probe „2xTCEP“; Spur 5: ODN (46 Basen); Spur 6: RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ (10 μ g); Spur 7: RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ (2 μ g); Spur 8: RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ (1 μ g); Spur 10: 10b Marker; Spur 11: ODN (46 Basen)

In Abbildung 4-18 ist zu erkennen, dass in den Spuren 6, 7 und 8 keine Banden der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ auftreten, was bedeutet, dass die reine RNase keine Banden auf einer denaturierenden 20%igen PAGE, welche mit GelRed gefärbt wurde, zeigt. Wie zu erwarten war, färbt das GelRed lediglich DNA (bzw. RNA) an. Folglich ist davon auszugehen, dass die Bande bei knapp unter 80b mit hoher Wahrscheinlichkeit die Bande des ODN-RNase-Konjugats ist. Seltsam verhält sich hingegen der NCL-Überstand, welcher einen langen „Schmier“ über nahezu das komplette Gel zeigt. Eventuell ist hierfür das Benzylmercaptan, welches UV-aktiv sein könnte, verantwortlich. Das reine TCEP zeigt keinerlei Banden.

Zusammenfassung:

Durch die Kombination der verschiedenen Analysemethoden, wie der denaturierenden, 20%igen PAGE (als DNA-Nachweis) und der 12 %igen NuPAGE Bis Tris Precast Gele (als Peptidnachweis), lassen sich folgende Aussagen treffen:

- Durch Erhöhung der Konzentration an RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ bilden sich – in Konkurrenz zur gewünschten Reaktion (NCL) - disulfidverbrückte Dimere aus, welche nicht mehr über die NCL mit dem Benzylthioester reagieren können.
- Die Disulfidbrückenbildung der Dimere geht dabei schneller von statten als die NCL an sich. Wäre die NCL schneller als die Bildung der Dimere wären bei knapp unter 80b Konjugatsbanden aus ODN und RNase deutlich sichtbar.
- Reine RNase zeigt, wie erwartet, keinerlei Banden in einer mit GelRed gefärbten, denaturierenden, 20%igen PAGE-Analyse

4.1.1.2.5 Konjugation der deblockierten RNase „Cys-ZFY-6“ und Variation der Reaktionsbedingungen bei der NCL

In diesem Projekt wurde die RNase („Cys-ZFY-6“) zum ersten Mal ungeschützt, also ohne Acm-Blockierung an den beiden Cysteinen (Cys6 und Cys9) zur Reaktion gebracht. Die NCL sollte am N-terminalen Cystein regio- und chemoselektiv ablaufen und eine Nebenreaktion der freien Thiole der beiden anderen Cysteine (Cys6 und Cys9) ausbleiben. Ein Fehlen der Nebenreaktionen hätte in der PAGE-Analyse zur Folge, dass lediglich ein ODN-RNase-Konjugatpeak, also ein Produktpeak, sichtbar wäre. Da aber grundsätzlich die Möglichkeit der Dimersierung nach erfolgter Konjugation mittels NCL besteht, wurden die Proben sowohl unbearbeitet (Crude product) als auch mit TCEP reduziert aufgetragen. Die mit TCEP reduzierten Proben sollten folglich nur als Konjugatmonomer vorliegen und nur einen Peak bei knapp unter 80b liefern. Die Reaktionen fanden erneut auf einem 3000 Å CPG statt, wobei die CPG-ODN-Benzylthioestersynthese (wie in 6.1.1.1. beschrieben) für drei Tage stattfand. Die darauffolgende NCL erfolgte sowohl im „Ac“-Lösemittel (halb Wasser, halb Acetonitril) als auch in Methanol. Zusätzlich wurde in diesem Projekt untersucht, ob ein Überschuss an RNase „Cys-ZFY-6“ bei gleichbleibender Konzentration zu höheren Ausbeuten führt. Dies wurde sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von TCEP untersucht. In folgender Tabelle 4-1 sind die unterschiedlichen Ansätze detailliert dargestellt.

Tabelle 4-1: Übersicht über die verschiedenen Reaktionsansätze der NCL zur Optimierung der Ausbeute

Probe:	Lösemittel	c_{RNase} (g/L)	m_{RNase}(mg)	TCEP-Zugabe während der NCL	n_{ODN}:n_{RNase}
AcRed1	„Ac“-Lösung	2	0,37	JA	1:1
AcRed2	„Ac“-Lösung	2	0,74	JA	1:2
AcRed4	„Ac“-Lösung	2	1,48	JA	1:4
AcRed8	„Ac“-Lösung	2	2,96	JA	1:8
Ac1	„Ac“-Lösung	2	0,37	NEIN	1:1
MeRed1	MeOH	2	0,37	JA	1:1
MeRed2	MeOH	2	0,74	JA	1:2
MeRed4	MeOH	2	1,48	JA	1:4
MeRed8	MeOH	2	2,96	JA	1:8
Me1	MeOH	2	0,37	NEIN	1:1

In Abbildung 4-19 ist deutlich zu erkennen, dass eine direkte Zugabe an TCEP im „Ac“-Lösemittel die Ausbeuten der Konjugation verschlechtert. Die Konjugationen der Proben „AcRed1-AcRed8“ (Spur 1-4 sowie als reduzierte Form aufgetragen 1R-4R) verliefen mit geringen bis gar keinen Ausbeuten an ODN-RNase-Konjugat (Fehlen einer Bande bei knapp 80b). Wenn man nun die Probe AcRed1 (Spur 1 bzw. Spur 1R) mit der Probe Ac1 (Spur 5 bzw. Spur 5R) vergleicht und bedenkt, dass der einzige Unterschied der beiden Proben im Zusatz von dem Reduktionsmittel TCEP besteht, erkennt man, dass die Zugabe von TCEP die NCL in irgendeiner Weise behindert. Möglicherweise reduziert TCEP nicht nur Disulfidbrücken, sondern forciert unter Umständen auch die Hydrolyse des Benzylthioesters. Da für die Hydrolyse des Benzylthioesters Wasser von Nöten ist, scheint es logisch, dass sich dieser Effekt im wasserfreien Methanol aufgrund des Fehlens der Hydroxid-Ionen eher schwach auswirkt. Dies wird deutlich, wenn man die Spuren 1-4 („Ac“-Lösemittel) mit den Spuren 6-9 (Methanol) vergleicht. Im Gegensatz zu den Spuren 1-4 ist bei den Spuren 6-9 eine Konjugatsbande knapp unter 80b erkennbar. Allerdings sind diese schwächer als die jeweiligen Banden, bei denen die Reaktion der NCL ohne TCEP stattgefunden hat (Spur 5 und Spur 10 welche ohne Zusatz an TCEP sind, haben die prominentesten Banden). Ferner scheint ein Überschuss an RNase „Cys-ZFY-6“ keinen großen Unterschied bezüglich der Ausbeute an Konjugat zu machen (Vergleich der Spuren 6, 7, 8 und 9). Der Vergleich der Konjugatsbanden bei knapp unter 80b ist nur in Methanol möglich, da beim „Ac“-Lösemittel keine bis kaum Banden entstanden sind. Ferner ist zu vermuten, dass durch die Zugabe von TCEP nach erfolgreicher NCL zu allen Proben eine Reduktion möglicher ODN-RNase-Dimere bzw. ODN-RNase-Oligomere erfolgt. In den Spuren 5-10 sind leicht verschmierte Banden oberhalb von 120b erkennbar, welche auf Dimere/Oligomere hindeuten könnten, welche aber durch die Zugabe von TCEP nach der NCL zu verschwinden scheinen (Spuren 6R-10R).

Die Proben wurden anschließend zusätzlich mittels Kapillarelektrophorese charakterisiert. Dabei werden vor allem die beiden Proben „AcRed1“ (keine Konjugatsbildung) und „Ac1“ (Konjugatsbildung) verglichen und diskutiert (siehe Kapitel 4.1.1.4.5). Die restlichen Proben wurden erneut vereint, im Eppendorf Concentrator 5301 bis zur Trockene eingedampft und im Anschluss über die präparative Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Ergebnisse hierzu sind in Kapitel 4.1.1.3. nachzulesen.

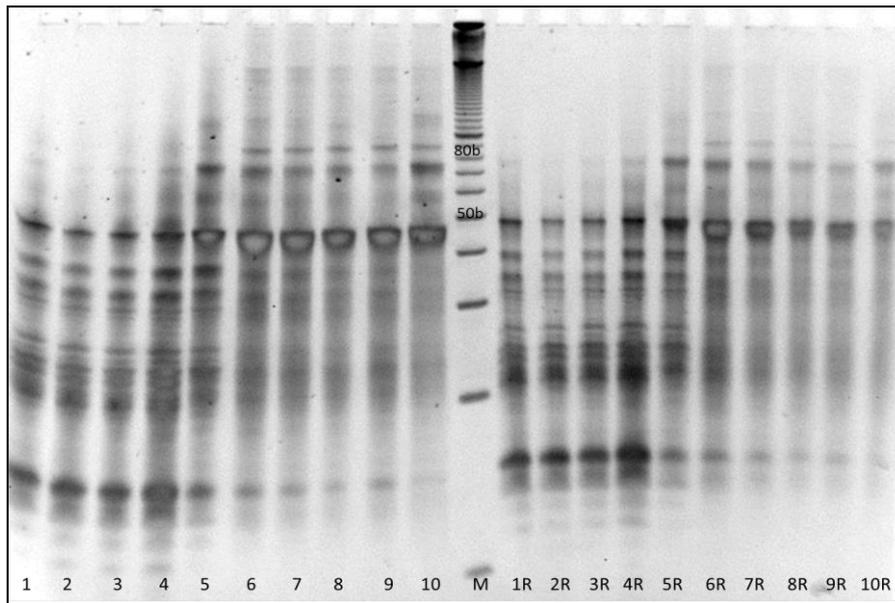


Abbildung 4-19: Denaturierende, 20% PAGE Analyse der Konjugationsprodukte in unterschiedlichen Lösemitteln bei unterschiedlichem RNase-Überschuss mit/ohne TCEP während der NCL. Spur 1: AcRed1; Spur 2: AcRed2; Spur 3: AcRed4; Spur 5: Ac1; Spur 6: MeRed1; Spur 7: MeRed2; Spur 8: MeRed4; Spur 9: MeRed8; Spur 10: Me1; Spur 1R-10R: Reduktion der Proben aus Spur 1-10 mit 1 μ L TCEP vorm Beladen der PAGE

Zusammenfassung:

- Die Konjugation des ODNs mit der entschützten RNase „Cys-ZFY-6“ via NCL verläuft regio- und chemoselektiv. Es treten keine Nebenprodukte auf.
- Die Anwesenheit von TCEP während der NCL verschlechtert deutlich die Ausbeuten. Eine mögliche Forcierung der Hydrolyse des Benzylthioesters durch TCEP ist durchaus vorstellbar. Folglich sind die intensivsten Banden jene ohne TCEP-Zusatz (Spur 5 und Spur 10).
- Die Reaktion verläuft ohne Zusatz von TCEP gleichermaßen gut in Methanol sowie in der Ac-Lösung ab. Mit TCEP-Zusatz sind in Methanol bessere Ausbeuten als im Ac-Lösemittel möglich.
- Ein Überschuss an RNase scheint die Reaktion nicht deutlich auf die Produktseite zu schieben.

4.1.1.2.6 Untersuchung des Einflusses weiterer Lösemittel in Abhängigkeit der Konzentration, der Molarverhältnisse und der Anwesenheit an TCEP

Im nachfolgenden Experiment sollte der Einfluss des Lösemittels, der Konzentration, der Molarverhältnisse und die Zugabe an Reduktionsmittel in Form von TCEP während der NCL untersucht werden. Die Precursorstufe des CPG-ODN-Benzlythioesters wurde dabei analog zu 6.1.1.1. für zwei Tage synthetisiert. Die Reaktionszeit für alle Reaktionen der NCL betrug drei Tage. Die unterschiedlichen Ansätze und ihre Variationen sind in nachfolgender Tabelle 4-2 dargestellt. Die einzelnen Abweichungen sollen jeweils separat diskutiert werden.

Tabelle 4-2: Übersicht über die Variation der Reaktionsparameter während der NCL

Probe:	Lösemittel (äquivolumentar)	c_{RNase} (g/L)	m_{RNase}(mg)	V_{RNase}(mL)	TCEP (1 µL)	n_{ODN}:n_{RNase}
P1	MeOH	10	0,74	0,074	NEIN	1:1
P2	MeOH	10	0,74	0,074	JA	1:1
P3	MeOH/H ₂ O	5	0,74	0,148	NEIN	1:1
P4	MeOH/H ₂ O	5	0,74	0,148	JA	1:1
P5	MeOH	10	2,96	0,296	NEIN	1:4
P6	MeOH	10	2,96	0,296	JA	1:4
P7	MeOH/EtOH	10	0,74	0,074	NEIN	1:1
P8	MeOH/EtOH	10	0,74	0,074	JA	1:1
P9	MeOH/EtOH/H ₂ O	5	0,74	0,148	NEIN	1:1
P10	MeOH/EtOH/H ₂ O	5	0,74	0,148	JA	1:1
P11	MeOH/EtOH	5	0,74	0,148	NEIN	1:1
P12	MeOH/EtOH	5	0,74	0,148	JA	1:1
P13	EtOH	2	0,148	0,074	NEIN	1:0,2
P14	EtOH/H ₂ O	1	0,148	0,148	NEIN	1:0,2
P15	EtOH	1	0,148	0,148	NEIN	1:0,2

Um zunächst den Einfluss des Reduktionsmittels TCEP auf die Ausbeute der NCL zu erörtern, sind die Spuren mit gerader Zahl mit den ungeraden (ohne TCEP) Spuren bis P12 zu vergleichen. Es wird folglich Spur P1 mit Spur P2, Spur P3 mit Spur P4, Spur P5 mit Spur P6 usw. verglichen. Hier zeigt sich durchweg der Trend, dass die „ungeraden“ Spuren (ohne TCEP) bessere Ausbeuten an ODN-RNase-Konjugat (Bande knapp unter 80b) liefern als die

Spuren, in denen bei der NCL TCEP zugesetzt wurde. Ferner scheint, wie in Kapitel 4.1.1.2.5 bereits gezeigt, der negative Einfluss des TCEPs in Lösungen mit Wasseranteil gravierender zu sein als in Lösungen ohne Wasser. Hierzu vergleiche man die Spur P4 (TCEP plus Wasser) mit der Spur P6 (TCEP ohne Wasser). In der Spur P4 ist nahezu keine Konjugatsbande zu erkennen. Möglicherweise verläuft die Hydrolyse des Thioesters mit Wasser in Anwesenheit von TCEP deutlich schneller ab. Als nächstes soll der Einfluss der Konzentration bei gleichem Molarverhältnis und gleichem Lösemittel diskutiert werden. Hierzu vergleiche man die Spuren P7 mit P11 bzw P8 mit P12. Die Ansätze P7 und P11, ebenso wie P8 und P12, scheinen annähernd gleich gut zu funktionieren bzw. ist kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Das bedeutet, dass selbst bei hohen Konzentrationen von 10 g/L keine Dimerbildung stattfindet und die NCL gleichermaßen effizient ist. Es ist durchaus denkbar, dass für die Oxidation zu Dimeren Wasser benötigt wird und deshalb in wasserfreien Lösemittel unabhängig von der Konzentration ist. Als nächstes soll der Einfluss an RNase-Überschuss untersucht werden. Hierzu sind die Spuren P1/P2 (ODN: RNase 1:1) mit den Spuren P5/P6 (ODN:RNase 1:4) zu vergleichen. Man könnte dabei mit Wohlwollen eine leichte Erhöhung der Ausbeute bei den Konjugationen mit RNase-Überschuss erkennen. Die Konjugatsbande in P5 scheint etwas intensiver als jene in P1 zu sein. Leider sind die Spuren an den Seiten des Gels etwas verzogen, was das Einschätzen erschwert. Nichtsdestotrotz ist eine leichte Favorisierung des RNase-Überschusses erkennbar. Zuletzt soll der Einfluss des Lösemittels diskutiert werden. Hierzu vergleiche man die Spuren der Konjugationen, welche ohne TCEP während der NCL stattgefunden haben. Beim Vergleich der Spuren P3 (MeOH/H₂O), P5 (MeOH), P7 (MeOH/EtOH), P9 (MeOH/EtOH/H₂O) und P11(MeOH/EtOH) lässt sich kein eindeutiger Unterschied in den Konjugatsausbeuten feststellen.

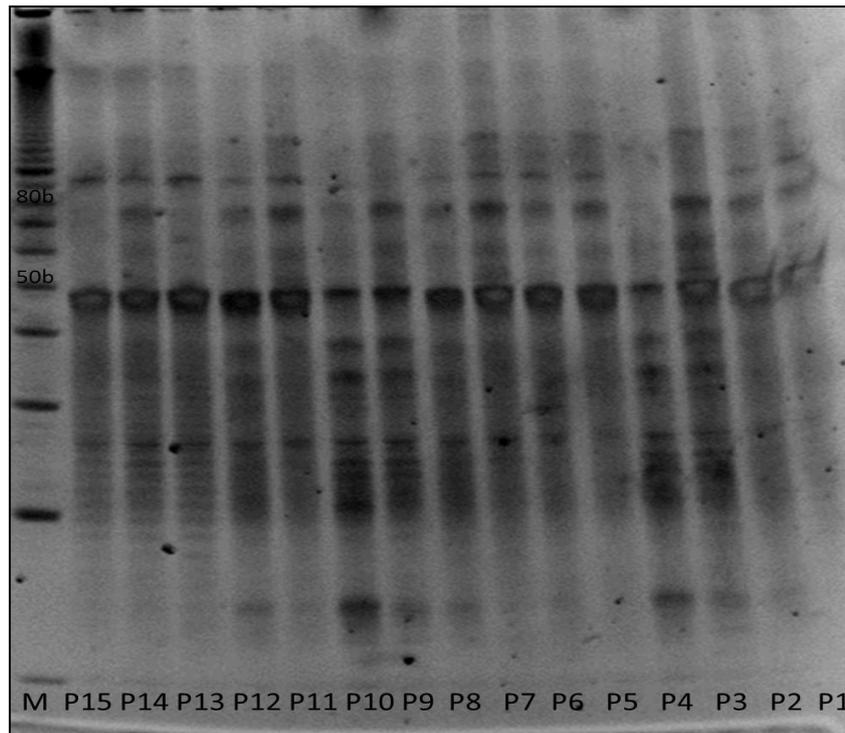


Abbildung 4-20: Denaturierende, 20 %ige PAGE der Konjugationsprodukte aus einem 46-Basenlangem ODN und der RNase „Cys-ZFY-6“ bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle 4-2)

Interessant sind auch die Spuren P13, P14 und P15. Hier scheint es nur in Anwesenheit von Wasser (P14) zur Konjugatsbildung zu kommen, obwohl hier die RNase im fünffachen Unterschuss eingesetzt wurde.

Zusammenfassung:

- TCEP behindert eindeutig die NCL und führt zu schlechteren Ausbeuten.
- Leichter Überschuss an RNase verbessert minimal die Ausbeuten der NCL.
- Höhere Konzentrationen in wasserfreien Lösemitteln haben keine Auswirkung und führen auch scheinbar nicht zur Dimerbildung.
- Die NCL in den unterschiedlichen Lösemitteln wie MeOH, MeOH/H₂O, MeOH/EtOH liefern alle gute Ausbeuten.

4.1.1.2.7 Synthese des ODN-RNase-Konjugats im größerem Maßstab zur gentechnologischen Anwendung

In diesem Projekt sollte das ODN-RNase-Konjugat für die gentechnologische Anwendung im größeren Maßstab unter den aus den vorangegangenen optimierten Bedingungen synthetisiert werden. Dabei wurde der CPG-ODN-Benzylthioester, wie in 6.1.1.1. beschrieben, für zwei Tage dargestellt. Die anschließende NCL wurde mit unterschiedlichen Lösemitteln und Konzentrationen für drei Tage reagiert. Hierzu wurde eine bereits vor Monaten angesetzte RNase-Lösung aus Kapitel 4.1.1.2.5 im „Ac“-Lösemittel („alter Batch“) als auch neu eingewogene RNase „Cys-ZFY-6“ in Methanol zur Reaktion gebracht. Die unterschiedlichen Reaktionsparameter sind in der folgenden Tabelle 4-3 übersichtlich dargestellt.

Tabelle 4-3: Variation der Reaktionsbedingung während der NCL

Probe:	Lösemittel	c_{RNase} (g/L)	m_{RNase}(mg)	V_{RNase}(mL)	n_{ODN}:n_{RNase}	Batch
SP 1	AcCN	2	2,0	1	1:1,1	Alt
SP 2	MeOH	2	2,0	1	1:1,1	Neu
SP 3	MeOH	2	3,0	1,5	1:1,5	Neu
SP 4	MeOH	1	2,0	2	1:1,1	Neu

In Abbildung 4-21 ist klar zu erkennen, dass die Konjugation des CPG-ODN-Benzylthioesters mit der RNase „Cys-ZFY-6“ am besten in Spur SP4 funktioniert. In Spur SP2 ist ebenfalls eine Konjugatsbande knapp unter 80b zu erkennen. Der einzige Unterschied in beiden Ansätzen war die jeweilige Konzentration. Eine RNase-Konzentration von 1 g/L scheint deutlich bessere Ausbeuten zu liefern als 2 g/L. Wahrscheinlich unterdrückt, wie in Kapitel 4.1.1.2.5 geschlussfolgert, eine geringere Konzentration die Oxidation der Thiole zu Disulfidbrücken. Die Reaktion mit dem „alten Batch“ der RNase „Cys-ZFY-6“ scheint gar nicht funktioniert zu haben. Womöglich sind hier die Cysteine während der langen Lagerzeit von fast 6 Monaten (trotz -20°C) oxidiert. Ein Überschuss an RNase scheint ebenfalls die Reaktion während der NCL zu verschlechtern (SP3). Die beiden Ergebnisse (Einfluss der Konzentration und RNase-Überschuss) decken sich hier nicht mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.1.2.6. Dort hatte die Konzentration keinen Einfluss und der Überschuss an RNase einen minimal positiven Einfluss. SP2 und SP4 wurden vereint, eingengt und über die präparative Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.1.1.3.).

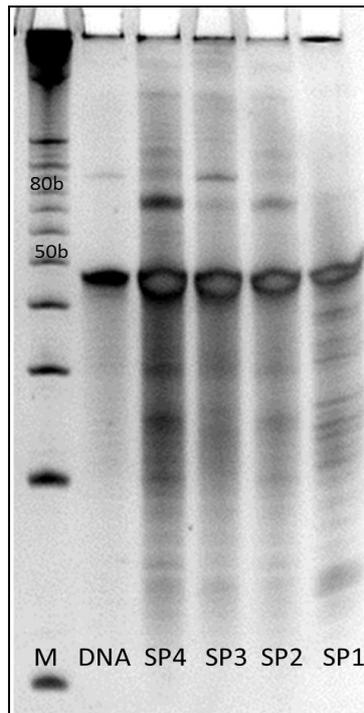


Abbildung 4-21: Denaturierende, 20 %ige PAGE der Konjugationsprodukte aus einem 46-basenlangem ODN mit „Cys-ZFY-6“ bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (Tabelle 4-3); Spur M: 10b Marker; Spur DNA: 46-basenlanges ODN (Referenz)

4.1.1.2.8 Zusammenfassung: Synthese des ODN-RNase-Konjugats

Eine kurze Zusammenfassung aller Ergebnisse zur Optimierung der Ausbeute der Konjugatsdarstellung ist nachfolgend gegeben:

- Ein Tag Reaktionszeit für die CPG-ODN-Benzylthioestersynthese und die NCL scheinen bereits ausreichend zu sein (vgl. Kapitel 4.1.1.2.3.; Probe: 3BT1Ac1d).
- Die Größe der Poren des CPGs hat einen Einfluss auf die Reaktion. So erhöhen größere Poren (3000 Å vs. 2000 Å) die Ausbeuten bei der NCL (vgl. Kapitel 4.1.1.2.3.) sowie bei der Reaktion mit „Amino“-Rhodamin (4.1.1.2.2) aufgrund der herabgesetzten Grenzflächenspannung.
- Der Zusatz an TCEP während der NCL verschlechtert die Ausbeuten deutlich (siehe Kapitel 4.1.1.2.6). Hier scheint eine Forcierung der Hydrolyse des Benzylthioesters durch das Reduktionsmittel TCEP sehr wahrscheinlich. Da für die Hydrolyse des Thioesters Wasser nötig ist, würde dies den Umstand erklären, weshalb die Ausbeuten in Gegenwart von Wasser und TCEP deutlich schlechter sind als jene in organischen, wasserfreien Lösemitteln.
- Der Einsatz von organischen Lösemitteln wie Acetonitril, Methanol und Ethanol erhöhen gravierend die Ausbeuten der NCL im Vergleich zu der 0,1M PBS-Puffer-Lösung und der Stock Solution von Kent (siehe Kapitel 4.1.1.2.3; 4.1.1.2.5 und 4.1.1.2.6). Durch das Herabsetzen der Grenzflächenspannung und der Hydrophobisierung des Lösemittels kann der ebenfalls hydrophobe CPG besser benetzt werden und dementsprechend die jeweiligen Reaktionspartner besser in die Poren des CPGs eindringen und somit deutlich effizienter reagieren.
- Die Konjugationen mittels NCL mit der entschützten RNase „Cys-ZFY-6“ verlaufen ebenso chemo- und regioselektiv wie die Reaktionen mit Acm-geschützter RNase „Cys-ZFY-6-Acm“. Es entstehen somit keine Nebenprodukte während der NCL.
- Über den Einfluss der Konzentration und den Einfluss eines RNase-Überschusses lässt sich kontrovers diskutieren, da hier die Ergebnisse teilweise widersprüchlich sind. So führt ein Überschuss an RNase im Kapitel 4.1.1.2.4 eindeutig zu Dimeren (Nachweis über NuPAGE Bis-Tris-Gel) und einer deutlichen Senkung der Ausbeute, während im Kapitel 4.1.1.2.6 eine leichte Optimierung der Ausbeute bei RNase-

Überschuss feststellbar ist. Womöglich ist die Anwesenheit von Wasser (4.1.1.2.4) für eine disulfidische Dimerbildung nötig. In Kapitel 4.1.1.2.6 wurde hingegen wasserfreies Methanol für die NCL verwendet. Allerdings scheint der leichte RNase-Überschuss ebenfalls in wasserfreiem Methanol (SP3) im Kapitel 4.1.1.2.7 wiederum die Ausbeute zu minimieren. Bessere Ausbeuten werden hier bei einer nahezu äquimolaren Zusammensetzung der Reaktionspartner der NCL erzielt (SP4). Zusammenfassend lässt sich keine klare Aussage über den Einfluss des RNase-Überschusses bzw. der Konzentration an RNase während der NCL treffen. Jedoch sei erwähnt, dass äquimolare Mengen bereits sehr gute Ausbeuten liefern und eine geringere Konzentration die Wahrscheinlichkeit der Dimerbildung verringert. Dies ist auch aus Kostengründen ein entscheidendes Argument.

4.1.1.3 Aufreinigung und Isolierung des ODN-RNase-Konjugats mittels präparativer Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Entsalzung

Da man das ODN-RNase-Konjugat in Reinform ohne restliche ODN-Edukte (46 Basen und weniger) für die gentechnologische Anwendung mit der IVT-RNA benötigt, wurden die synthetisierten ODN-RNase-Konjugate von den nicht-reagierten ODN-Fehlsequenzen mittels präparativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PrepCell) abgetrennt. Die prinzipielle Funktionsweise und der detaillierte Aufbau der PrepCell sind im Theorieteil (Kapitel 3.4.5.2) ausführlich erläutert. Nach erfolgter PrepCell müssen die Proben, die im Laufpuffer 1xTBE-Puffer gelöst vorliegen, noch entsalzt werden. Hierzu wurden unterschiedlich Entsalzungsmethoden getestet.

a) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.3

Da alle Ansätze das gleiche Produkt liefern, konnten diese vereint und über die PrepCell aufgereinigt werden. Dazu wurden die Proben im Eppendorf Concentrator 5301 bis zur Trockne eingedampft und anschließend die Masse gravimetrisch bestimmt (21,3 mg), im Ladepuffer gelöst und auf die PrepCell gegeben. Die Proben wurden über den Fraktionensammler gesammelt und anschließend auf einer denaturierenden, 20%igen PAGE analysiert (Abbildung 4-21).

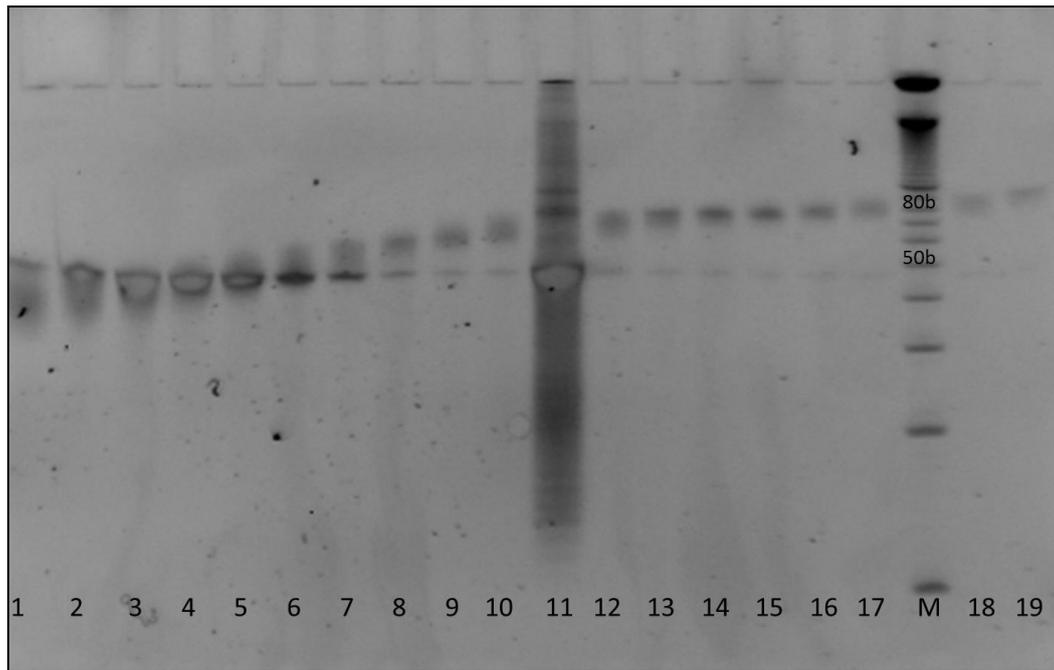


Abbildung 4-21: Denaturierende, 20 %ige PAGE der einzelnen Fraktionen nach der PrepCell-Aufreinigung. Spur 1: Fraktion nach 105 Minuten; Spur 2: Fraktion nach 110 Minuten; Spur 3: Fraktion nach 115 Minuten; Spur 4: Fraktion nach 120 Minuten; Spur 5-10: Fraktionen nach 125-150 Minuten; Spur 11: Gepoolte, unaufgereinigte Konjugatsmischung (Crude product); Spur 12 - Spur 17: Fraktionen nach 155-180 Minuten; Spur M: 10b Marker; Spur 18-19: Fraktionen nach 185-190 Minuten.

Nach erfolgter elektrophoretischer Analyse über eine denaturierende 20 %ige PAGE wurden die Fraktionen 1-5 (Code: DNA-VS) und die Fraktionen 13-16 (Code: Konjugat-VS) vereint. Die 46-basenlangen ODN-Banden eluieren folglich zwischen 105-125 Minuten, die ODN-RNase-Banden nach ca. 160-175 Minuten. Es ist ferner zu erkennen, dass minimale Menge an der 46-basenlangen DNA weiterhin co-eluieren. Dies könnte an einer Überladung der Polyacrylamid-Gelsäule liegen. In den Dissertationen von Tina Kiefer^[6] bzw. Nils Heimann^[7] wurden bis zu 1,5 mg auf der kleinen Säule der PrepCell ohne Anzeichen einer Überladung aufgereinigt. Die vereinten Proben (DNA- und Konjugatfraktionen) wurden anschließend nach Vorschrift mit den Centricon Plus-70 Zentrifugen-Filtereinheiten^[8] (NMGG=10.000 g/mol) entsalzt. Die aufkonzentrierten Proben wurden anschließend mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Dabei ergab sich für die DNA-Probe eine Konzentration von 1,5 µg/µL (in 1,75 mL) und für die Konjugatsprobe eine Konzentration von 0,075 µg/µL (in 1,6 mL). Wenn man davon ausgeht, dass 21,3 mg ursprünglich eingesetzt wurden, blieb letztendlich aufgereinigt und entsalzt nur ein Zehntel übrig. Es wird vermutet, dass ein Großteil in den Centricons Plus 70 Zentrifugen-Filtereinheiten auf der Membran (regenerierte Zellulose) adsorbiert.

b) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.5

Es wurden alle Ansätze aus Kapitel 4.1.1.2.5 vereint und über die PrepCell aufgereinigt. In Abbildung 4-22 ist deutlich die 46-basenlange ODN-Bande in Spur 2 sowie die ODN-RNase-Bande bei knapp unter 80b in Spur 5 zu erkennen. Die jeweiligen Fraktionen wurden wieder vereint und wie in a) über die Centricon Plus-70 Zentrifugen-Filtereinheiten entsalzt.

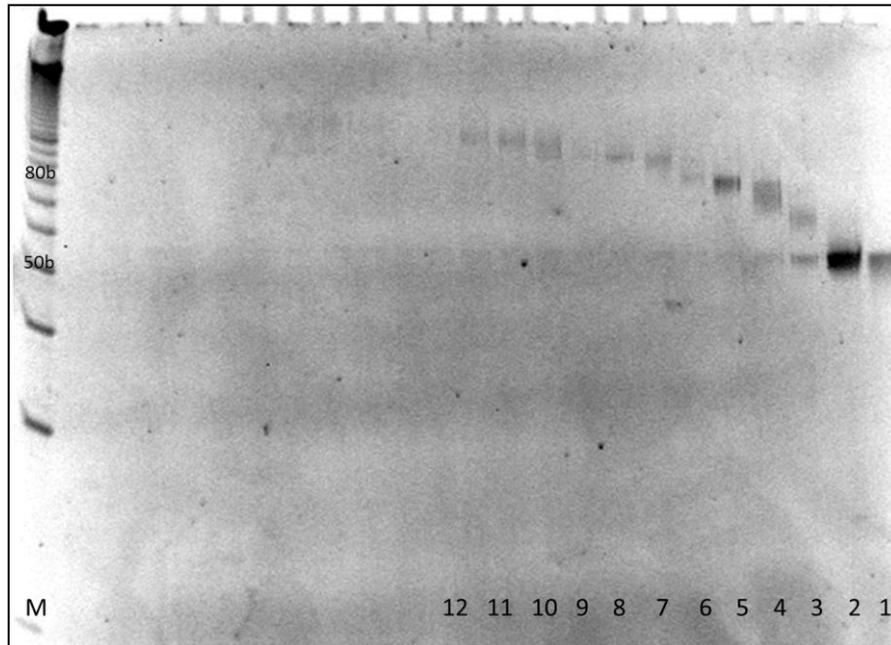


Abbildung 4-22: Denaturierende, 20 %ige PAGE der einzelnen Fraktionen nach der PrepCell-Aufreinigung. Spur 1: Fraktion nach 85 Minuten; Spur 2: Fraktion nach 95 Minuten; Spur 3: Fraktion nach 110 Minuten; Spur 4: Fraktion nach 120 Minuten; Spur 5: Fraktion nach 130 Minuten; Spur 6: Fraktion nach 140 Minuten; Spur 7: Fraktion nach 150 Minuten; Spur 8 – Spur 12: Fraktionen nach 160 – 180 Minuten; Spur M: 10b Marker

c) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.6

Die vereinten Proben wurden über Nacht gefriergetrocknet und anschließend gewogen (18,7 mg). Da die anschließende Entsalzung der Proben nach erfolgter PrepCell bisher einen großen Ausbeutenverlust zur Folge hatte, wurde der Lauf- und Elutionspuffer in Form von 1xTBE-Puffer durch einen flüchtigen Puffer wie Ammoniumhydrogencarbonat ersetzt. Die ersten Versuche, welche nur als Blindversuche mit Ladepuffer (ohne Probe) statt gefunden haben, waren nicht sehr viel versprechend. Es war nahezu unmöglich, bei konstanter Spannung und Stromstärke die PrepCell zu betreiben. Dies liegt möglicherweise an der Zersetzung des Puffers bei 50°C - und dem damit verbundenen Auftreten von Gasblasen. Als nächstes wurde versucht, den Laufpuffer klassisch mit 1xTBE-Puffer zu betreiben und nur den Elutionspuffer durch Ammoniumhydrogencarbonat zu ersetzen. Leider wurde hier festgestellt, dass trotzdem, wenn auch deutlich weniger, 1xTBE-Puffer co-eluiert. Zur Untersuchung wurden 50 mL Elutionspuffer gesammelt und anschließend am Rotationsverdampfer abgedampft. Beim flüchtigen Puffer sollte kein Salz zurückbleiben, da er sich in die gasförmigen Bestandteile Ammoniak (NH_3) und Kohlendioxid (CO_2) zersetzt (Abbildung 4-23).



Abbildung 4-23: Vergleich der beiden Elutionspuffer und deren Salzurückstand nachdem das Wasser abgedampft wurde

Trotz der leichten Co-Eluierung des 1xTBE-Laufpuffers wurde die PrepCell letztendlich mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer als Elutionspuffer betrieben. In Abbildung 4-24 ist die anschließende denaturierende, 20 %ige PAGE Analyse der einzelnen Fraktionen gezeigt. Hier lässt sich deutlich erkennen, dass die 46-basenlange DNA in den Spuren 3-6 und das ODN-RNase-Konjugat in den Spuren 13-15 eluiert. Im Vergleich zu vorherigen Purifikationen über die präparative Gelelektrophorese ist in diesem Fall die 46-basenlange DNA als Bande in allen Spuren deutlich zu erkennen. Mögliche Ursachen für die schlechte Auftrennung sind

eventuell die leichte Schwankung der Spannung während der Elektrophorese (bedingt durch den flüchtigen Elutionspuffer) oder ein kleiner Riss im Polyacrylamidgel selbst. Die Fraktionen zwischen Spur 13 und Spur 16 wurden anschließend vereint (ca. 30 mL), erneut über Nacht gefriergetrocknet und in 1 mL MilliQ-Wasser gelöst (Bezeichnung: „KonPana2“). Auffallend bei dieser PrepCell ist auch, dass die Elutionszeiten im Vergleich zu vorherigen PrepCells deutlich höher sind. Dies liegt an der geringeren Spannung (bedingt durch den flüchtigen Elutionspuffer), welche für die Wanderungsgeschwindigkeit der Proben durch das Gel verantwortlich ist.

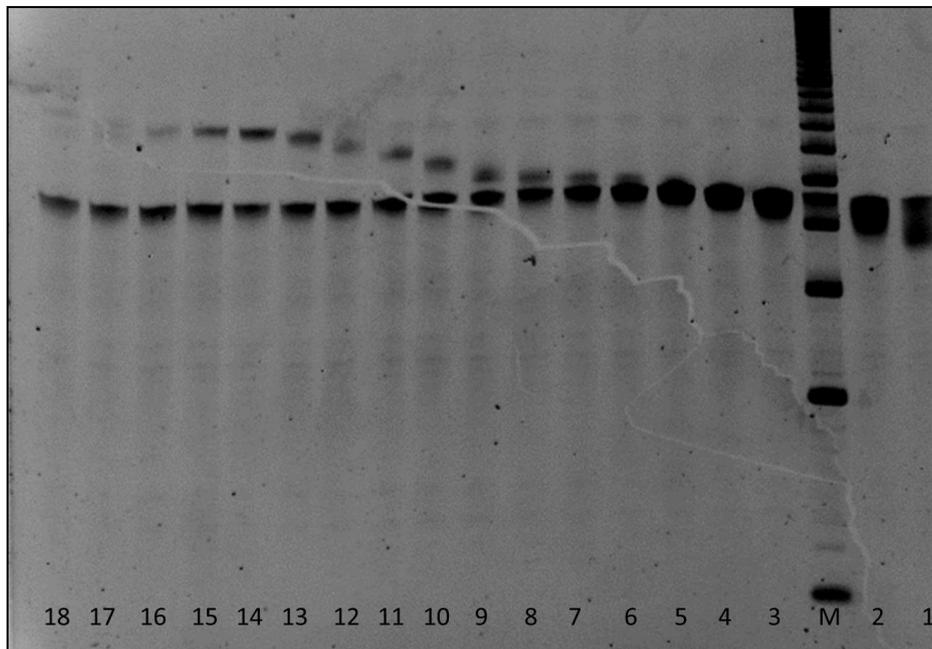


Abbildung 4-24: Denaturierende, 20 %ige PAGE der einzelnen Fraktionen nach der PrepCell-Aufreinigung. Spur 1,2: Fraktion nach 165 und 170 Minuten; Spur M 10b Marker; Spur 3-7: Fraktion nach 180 bis 200 Minuten (entspricht 46-Basenlangem ODN); Spur 8 – Spur 12: Fraktionen nach 205 – 245 Minuten; Spur 13-15: Fraktion nach 255 Minuten - 275 Minuten (entspricht ODN-RNase-Konjugat); Spur 16-18: Fraktion nach 285 Minuten - 305 Minuten

Die Probe „KonPana2“ sollte nun anschließend für die Anwendung mit der IVT-RNA verwendet werden. Um eine Modifizierung der Probe durch die Gefrierdrying, die Aufreinigung über die präparative Polyacrylamidgelelektrophorese und abschließende Entsalzung auszuschließen, wurde erneut über eine denaturierende 20 %ige PAGE analysiert. Scheinbar ist aber durch die Behandlung das ODN-RNase-Konjugat auf unbekannte Weise degradiert worden. Möglicherweise ist die Methode der Gefrierdrying

nicht schonend genug, was zu DNA-Brüchen führen könnte. Ferner könnte durch die Gefriertrocknung und demzufolge eine deutliche Erhöhung der Konzentration, das ODN-RNase-Konjugat sich selbst hydrolysieren, was den Ergebnissen von Lima^[9], bei denen die RNase nicht in der Lage ist, ss-DNA zu degradieren, widersprechen würde. Die Degradierung ist in Abbildung 4-25 deutlich durch das Auftreten einer Bande (ca. 60b) zwischen der Konjugatsbande (bei knapp unter 80b) und der ODN-Bande (knapp unter 50b) in den Spuren 1 („KonPana2“ wurde vorher mit 1µL TCEP reduziert) und 2 zu erkennen. Als guter Richtwert für die Höhe der Konjugatsbande ist in Spur 3 die Probe 3BT3Ac3d aufgetragen.

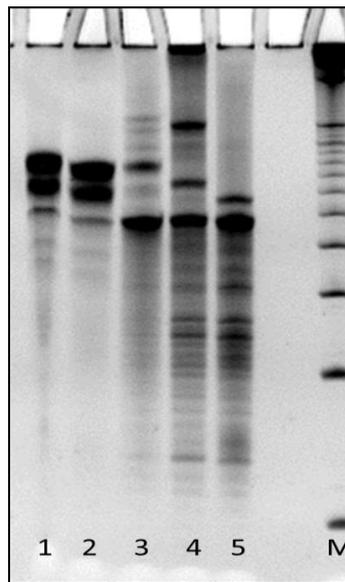


Abbildung 4-25: Denaturierende, 20 %ige PAGE Analyse. Spur 1: KonPana2 mit TCEP reduziert; Spur 2: KonPana2; Spur 3: 3BT3Ac3d; Spur 4: B19; Spur 5: B10

In Spur 4 und 5 sind zum Vergleich zwei Proben aus der Diplomarbeit von Andreas Böckler^[1] aufgetragen, dabei wurde das 46-basenlange ODN einerseits mit einem 10-Peptid (B10, Spur 5) und andererseits mit einem 19-Peptid (B19, Spur 4) über die NCL reagiert. Auf eine Entsalzung wurde aufgrund der Degradierung bei „KonPana2“ verzichtet und stattdessen nochmal über die PrepCell aufgereinigt (siehe 4.1.1.3. d).

d) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.7

Die beiden Proben SP2 und SP4 wurden vereint und über die präparative Gelelektrophorese aufgereinigt. Nachdem die Versuche vorher mit dem flüchtigen Puffer (NH_4HCO_3) keinen entscheidenden Vorteil lieferten, wurde die PrepCell klassisch mit 1xTBE-Puffer als Lauf- und Elutionspuffer betrieben. Die Fraktionen der 46-basenlangen DNA aus Spur 2 und Spur 3 (entspricht den Fraktionen von Minute 155 bis 171) wurden vereint und mit SP DNA betitelt. Für das ODN-RNase-Konjugat wurden die Fraktionen zwischen Spur 6 und Spur 7 (entspricht Minute 219 bis 235) vereint und mit SP AB1 bezeichnet (Abbildung 4-26).

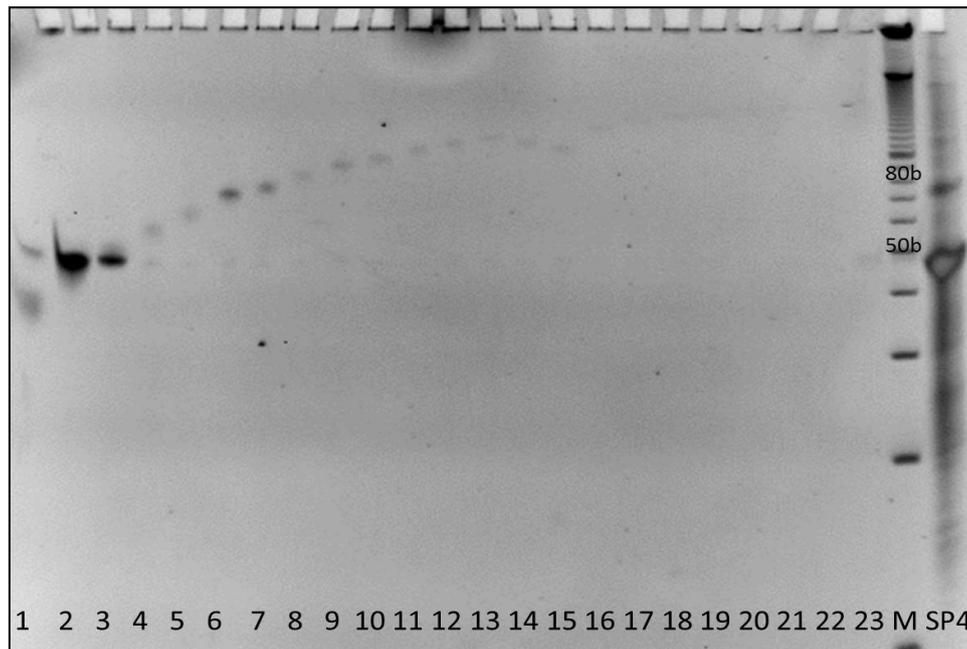


Abbildung 4-26: Denaturierende, 20 %ige PAGE Analyse der einzelnen Fraktionen nach erfolgter präparativer Gelelektrophorese. Spur 1: Fraktion nach 131 Minuten; Spur 2: Fraktion nach 147 Minuten; Spur 3: Fraktion nach 163 Minuten; Spur 4: Fraktion nach 179 Minuten; Spur 5: Fraktion nach 195 Minuten; Spur 6: Fraktion nach 211 Minuten; Spur 7: Fraktion nach 227 Minuten; Spur 8 – Spur 23: Fraktionen nach 243 Minuten – 530 Minuten; Spur M: 10b Marker; Spur SP4: Probe SP4

Da die Probe „KonPana2“ durch die Gefriertrocknung unbekannte Spaltprodukte (Abbildung 4-25) aufwies, wurde diese erneut über die präparative Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Fraktionen aus Spur 4, 5 und 7 wurden vereint und wurden aufgrund der rätselhaften Bande als SP Unb betitelt. Die Fraktionen auf Konjugatshöhe (10, 11, 12, 15) wurden ebenfalls vereint und als SP AB2 bezeichnet (Abbildung 4-27).

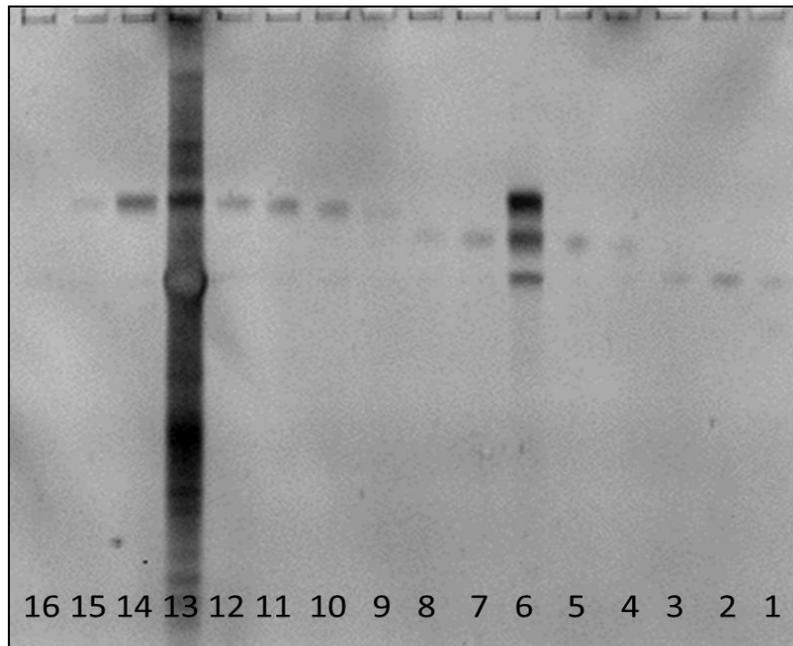


Abbildung 4-27: Denaturierende, 20 %ige PAGE Analyse der einzelnen Fraktionen nach erfolgter präparativer Gelelektrophorese von KonPana2. Spur 1-3: Fraktion nach 140 Minuten - 156 Minuten; Spur 4,5: Fraktion nach 164 Minuten - 172 Minuten; Spur 6: Probe KonPana2; Spur 7: Fraktion nach 180 Minuten; Spur 8,9: Fraktion nach 188 Minuten - 196 Minuten; Spur 10: Fraktion nach 204 Minuten; Spur 11: Fraktion nach 212 Minuten; Spur 12: Fraktion nach 220 Minuten; Spur 13: Probe SP 4; Spur 14: Probe SP AB1; Spur 15: Fraktion nach 228 Minuten; Spur 16: Fraktion nach 236 Minuten

Wie man in dem PAGE-Gelbild (Abbildung 4-27) nach erfolgter präparativer Gelelektrophorese gut erkennen kann, war es möglich, die Probe „KonPana2“ in weitere Banden aufzutrennen. Durch den Vergleich der Spuren 13 und 14 ist zu erkennen, dass das aufgereinigte ODN-RNase-Konjugat SP AB1 (Spur 14) im Vergleich zu dem nicht-aufgereinigten Produkt SP 4 (Spur 13) durch das Auftreten einer einzelnen Bande extrem monodispers ist. Von allen vier Proben, welche noch in 1xTBE-Puffer gelöst sind, wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie am Eppendorf Biophotometer über die optische Dichte der Lösung die Konzentration bestimmt und deren Gesamt-Masse über das Elutionsvolumen aus der PrepCell ausgerechnet.

SP DNA: $90 \mu\text{g/mL} * 23 \text{ mL} = 2070 \mu\text{g}$

SP AB1: $6 \mu\text{g/mL} * 23 \text{ mL} = 138 \mu\text{g}$

SP AB2: $5 \mu\text{g/mL} * 34 \text{ mL} = 170 \mu\text{g}$

SP Unb: $2 \mu\text{g/mL} * 23 \text{ mL} = 46 \mu\text{g}$

e) Entsalzung des aufgereinigten ODN-RNase-Konjugats

Eine anschließende Entsalzung der in 1xTBE-Puffer gelösten Proben ist nötig, um eventuelle Inhibierung der enzymatisch aktiven RNase „Cys-ZFY-6“ durch Puffersalze vorzubeugen.

BioRad Bio-Spin-6:

Die vier oben genannten Proben wurden nach Vorschrift^[10] mit den BioRad Bio-Spin-6-Säulen entsalzt. Dadurch dass die Säulen aus Polyacrylamidgelkugeln mit unterschiedlichen Porengrößen bestehen (Funktionsprinzip ähnlich zur GPC), war eine Herabsetzung der Adsorption des ODN-RNase-Konjugats am Säulenmaterial im Vergleich zu Regenerat-Zellulose denkbar. Nur bei der reinen DNA-Probe (SP DNA) trat keine Adsorption auf und die Probe wurde komplett zurückgewonnen. Das ODN-RNase-Konjugat wurde nur zu knapp 25% wieder zurückerhalten. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie zuvor über UV/Vis-Spektroskopie. In Tabelle 4-4 sind die Konzentrationen (nachdem im Eppendorf Concentrator auf ca. 100 µL eingeengt wurde) und absoluten Mengen vor und nach der Entsalzung für einen Fall exemplarisch dargestellt. Die Rückgewinnung war bei anderen Entsalzungen stets in der gleichen Größenordnung. Durch die hohe Anzahl an basischen Aminosäuren (9 von 31) in der RNase „Cys-ZFY-6“ könnte die positive Ladung elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Gelsäulenmaterial eingehen und somit am Säulenmaterial adsorbieren. Eine Molmassenbestimmung der entsalzten Proben mittels MALDI-TOF-MS erfolgte durch die Fa. [REDACTED] (siehe Kapitel 4.1.1.4.3.)

Tabelle 4-4: Übersicht über die Rückgewinnung bei der Entsalzung mittels BioRad-Bio Spin-6-Säulen

Probe:	Konzentration	Menge	Konzentration (entsalzt)	Menge (entsalzt)	Rückgewinn
SP DNA	148 µg/mL	14,4 µg	152 µg/mL	15,2 µg	105 %
SP AB1	15,4 µg/mL	4,62 µg	12,1 µg/mL	1,21 µg	26 %
SP AB2	10,5 µg/mL	2,10 µg	3,8 µg/mL	0,38 µg	18 %
SP Unb	8,4 µg/mL	0,84 µg	2,0 µg/mL	0,20 µg	24 %

Ethanol-Fällung:

Die Proben wurden zudem mehrmals mit Hilfe der klassischen Ethanol-Fällung entsalzt. Auch hier bestand das Problem die Konjugatsproben effizient und in hohen Ausbeuten fällen zu können. Exemplarisch soll hier nur eine der vielen Fällungen diskutiert werden.

Tabelle 4-5: Übersicht über den Rückgewinn bei der Entsatzung durch Ethanol-Fällung

Probe:	Konzentration	Menge	Konzentration (entsalzt)	Menge (entsalzt)	Rückgewinn
SP DNA	90 µg/mL	81 µg	1042 µg/mL	104 µg	128 %
SP AB1	6 µg/mL	5,4 µg	7,8 µg/mL	0,78 µg	14 %
SP AB2	5 µg/mL	4,5 µg	12,6 µg/mL	1,26 µg	28 %
SP Unb	2 µg/mL	1,8 µg	4,9 µg/mL	0,49 µg	27 %

Die DNA-Proben konnten im Gegensatz zu den Konjugatsproben wie erwartet in hohen Ausbeuten ohne Verluste gefällt werden. Die unrealistische Rückgewinnung von über 100 % ist möglicherweise auf die unterschiedlich verwendeten UV-Messgeräte zurückzuführen. So wurden die Proben vor der Entsatzung mit einem Eppendorf Biophotometer vermessen. Nach der Entsatzung jedoch wurde zur Konzentrationsbestimmung mittels UV ein NanoDrop-Gerät verwendet. Um zu untersuchen, ob das Ausfällen aus der Lösung oder das Pelletieren mittels Zentrifugation den Grund für die schlechten Fällquoten der Konjugate dargestellt, wurde die Ethanol-Fällung zunächst wie gewohnt angesetzt (1/10 Dialysepuffer plus 3faches Volumen an absoluten Ethanol) und mit der Ultrazentrifuge bei 173.000 g zentrifugiert. Bei diesen hohen Zentrifugationskräften sollte das gesamte ausgefällte Konjugat pelletiert werden können. Nachdem die Ausbeuten im obengenannten Größenbereich (~10%) lagen, wurde angenommen, dass das Löslichkeitsprodukt des Konjugats durch den Zusatz der 31 Aminosäuren erhöht wird und das Konjugat somit in Lösung bleibt. Grund dafür könnten die hohe Zahl an negativ bzw. positiv geladenen Aminosäuren sein. Deshalb wurde versucht, das Konjugat mitsamt 1xTBE-Puffer komplett aus der Lösung zu präzipitieren. Hierzu wurde Aceton im 12fachen Überschuss auf Trockeneis zugesetzt. Das ausgefällte, zentrifugierte Pellet, welches TBE-Puffer und Konjugat enthält, wurde anschließend sofort mit 70% EtOH gewaschen bis alle Salze des Puffers entfernt waren. Nach Lösen des Pellets wurde die Konzentration über eine NanoDrop-UV-Messung bestimmt. Jedoch waren hier die Verluste noch höher als in den anderen Varianten (nur ca. 5% Rückgewinnung). Wahrscheinlich löste sich das Konjugat in den Waschgängen mit 70% EtOH trotz des geringen Wasseranteils und wurde zusammen mit den TBE-Salzen, sukzessive aus dem Pellet gewaschen. Eine der besten Rückgewinnungsquoten wurde durch eine Kombination der Aussatzung mit 12fachem

Volumen an Aceton und der Verwendung der BioRad Bio-Spin 6 Säulen zur Entsalzung erhalten. Auf diese Weise konnten bspw. aus eingesetzten 14 µg, 5,7 µg nach Entsalzung zurück gewonnen werden, was einer Quote von etwa 40% entspricht (Tabelle 4-6). Möglicherweise ist die hohe TBE-Salzkonzentration in der Lage, die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Konjugat und Säule abzuschirmen. Im Falle niedrigerer Salzkonzentrationen erfolgt diese Abschirmung nur unvollständig und verbleibende wechselwirkende Gruppen des Säulenmaterials sind in der Lage das Konjugat zu binden.

Tabelle 4-6: Übersicht über die Entsalzung des Konjugats AB1 durch komplettes Ausfällen mit TBE-Salz und Entsalzung mit Hilfe der Bio-Spin-6 Säulen

Konzentration (anfangs)	Menge (anfangs)	Konzentration (2. Entsalzung)	Menge (2. Entsalzung)	Rückgewinn (2. Entsalzung)
2,34 µg/mL	14,04 µg	28,6 µg/mL	5,7 µg	41 %

Zusammenfassung Purifikation und Entsalzung:

- Die Abtrennung der nicht-reagierten DNA-Basen (46 Basen und kleiner) konnte erfolgreich über die präparative Gelelektrophorese bewerkstelligt werden. Nach erfolgter Auftrennung wird ein monodisperses ODN-RNase-Konjugat erhalten, welches in 1xTBE-Puffer gelöst ist.
- Die Abtrennung des 1xTBE-Puffers stellt sich als schwieriger dar als angenommen. Durch klassische Ethanol-Fällung lassen sich nur Rückgewinnungsquoten von ungefähr 20 % erhalten. Eine gute Kombination liefert die komplette Aussalzung durch Aceton und anschließende Entsalzung mittels BioRad Bio-Spin-6 GPC-Säulen. Durch diese Kombination sind zumindest Rückgewinnungsraten von über 40 % erreicht worden.

4.1.1.4 Charakterisierung des ODN-RNase-Konjugats

Das ODN-RNase-Konjugat wurde hauptsächlich mittels denaturierender, 20%ige Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert, jedoch wurden auch andere Charakterisierungsmethoden herangezogen, um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um das monodisperse ODN-RNase-Konjugat handelt.

4.1.1.4.1 Gelpermeationschromatografie (GPC)

Als erste zur PAGE alternative Charakterisierungsmethode wurde zunächst die Gelpermeationschromatografie (GPC) verwendet. Die GPC erlaubt unter wechselwirkungsfreien Elutionsbedingungen Moleküle aufgrund ihrer hydrodynamischen Größe aufzutrennen. Da sich das ODN-RNase mit ca. 3.700 g/mol von dem reinen 46-basenlangem ODN unterscheidet, sollte die Massendifferenz zur Charakterisierung ausreichen. Als Säule wurde zunächst eine auf Polyhydroxymethacrylat-Basis der Firma Shodex gewählt, bei der aber Molmassenwerte jenseits von 100.000 g/mol (Pullulan-Standard als Eichung) erhalten wurden. Vermutlich sind für die hohen Molmassen repulsive Wechselwirkungen des Analyten (negatives Phosphatrückgrat) mit teilweise negativen Carboxyrestgruppen des Säulenmaterials verantwortlich. Dadurch wird ein Eindringen in die Poren der Säule verhindert und der Analyt eluiert früher, das heißt bei scheinbar höheren Molmassen. Wechselwirkungsärmere Säulenmaterialien basieren auf (doppelt endgecappten) modifizierten Silicagelen definierter Porosität, wie z.B. die PROTEEMA 300Å Säule der Fa. PSS Mainz. Die Messungen erfolgten mit der PROTEEMA-Säule in mehreren Lösemitteln wie MilliQ-Wasser (sauer/neutral/basisch) und PBS-Puffer (0,1 M/0,05 M). Je nach Lösemittel, Salzgehalt und pH-Wert änderten sich die Retentionszeiten. So eluiert die DNA bei einem pH-Wert zwischen 7 und 9 in MilliQ-Wasser relativ zeitgleich, bei Zugabe von Salz (in Form von PBS-Puffer) bzw. saurem pH-Wert (mit TFA) jedoch unverkennbar später, was sofort als Hinweis auf Wechselwirkung zwischen Analyt und Träger gewertet werden muss, wobei sowohl hydrophobe als auch elektrostatische Interaktionen denkbar sind. Letztere sind durch die effektive Ladung des Phosphatrückgrates erklärbar. So ist bei pH=7 bzw. pH=9 das Phosphatrückgrat negativ geladen, die negativen Ladungen strecken das Knäuel und der hydrodynamische Radius nimmt zu, was in kürzeren Retentionszeiten resultiert. Neben der Streckung des Moleküls ist auch, wie bei der Säule auf

Polyhydroxymethacrylatbasis beschrieben, eine Repulsion zwischen Analyt und Träger ein entscheidender Faktor. Wenn jedoch die negativen Ladungen durch den pH-Wert (pH=4) oder durch Salz (PBS) abgeschirmt werden, kann sich das Molekül stärker knäulen, das hydrodynamische Volumen wird kleiner und es eluiert zu späteren Zeiten. Zudem wird die Repulsion zwischen Analyt und Säulenmaterial stark geschwächt, was eine Verbesserung der Diffusion der Teilchen in die Poren zur Folge hat und sie somit zu späteren Retentionszeiten eluieren. Das gleiche Verhalten wurde auch für das ODN-RNase-Konjugat beobachtet. Die einzelnen Graphen sind im Anhang (Abb. A-1 bis A-8) gezeigt und sollen hier nicht näher besprochen werden. Interessanter hingegen ist der Vergleich der DNA-Probe, der unaufgereinigten ODN-RNase-Konjugatsprobe und der durch die präparative Gelelektrophorese aufgereinigte ODN-RNase-Konjugatsprobe um zu bestimmen, bei welchen Retentionszeiten die jeweiligen Moleküle eluieren und in welchen Ausbeuten das Konjugat vorliegt. Dazu soll nun zunächst auf die Messungen der reinen 46-basenlangen DNA in 0,1 M PBS-Puffer eingegangen werden. Wie in Abbildung 4-28 zu erkennen ist, eluiert die reine DNA zwischen 30 und 40 Minuten relativ breit, was sich auch im hohen PDI von 2,31 widerspiegelt. Hierfür sind die während der Festphasensynthese durch Nichtumsetzung einzelnen Basen und Endcapping (vgl. Abbildung 3-3) der entstandenen Fehlsequenzen (46 Basen und kleiner) verantwortlich. Die Molmassen (mit Pullulan als Eichstandard) betragen für M_n 7.814 g/mol, für M_w 18.093 g/mol und für M_p 22.252 g/mol. Damit liegen sie deutlich näher im tatsächlichen Rahmen von 14.400 g/mol.

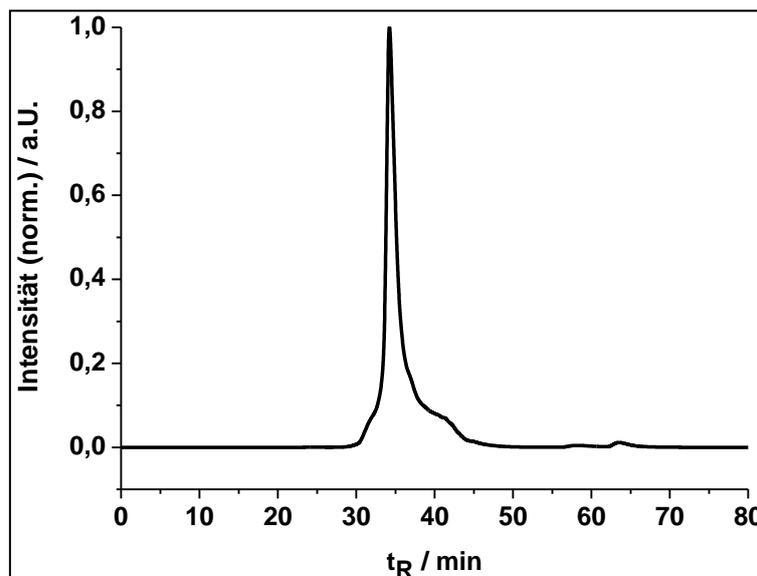


Abbildung 4-28: Normierte GPC-Elutionskurve von einem 46-basenlangem ODN (2BT7 Ref) in 0,1 M PBS-Pufferlösung bei einem Fluss von 0,5 mL/min.

Als nächstes soll auf die synthetisierte ODN-RNase-Konjugatsmischung 3BT1Ac1d aus Kapitel 4.1.1.2.3 (Abbildung 4-7) eingegangen werden. Hier lässt sich ab 40 Minuten ein zusätzlicher Peak erkennen, welcher auf das ODN-RNase-Konjugat hindeuten könnte, auch wenn das Konjugat aufgrund seiner Größe im klassischen Sinne der GPC vor dem DNA-Peak eluieren müsste (Abbildung 4-29).

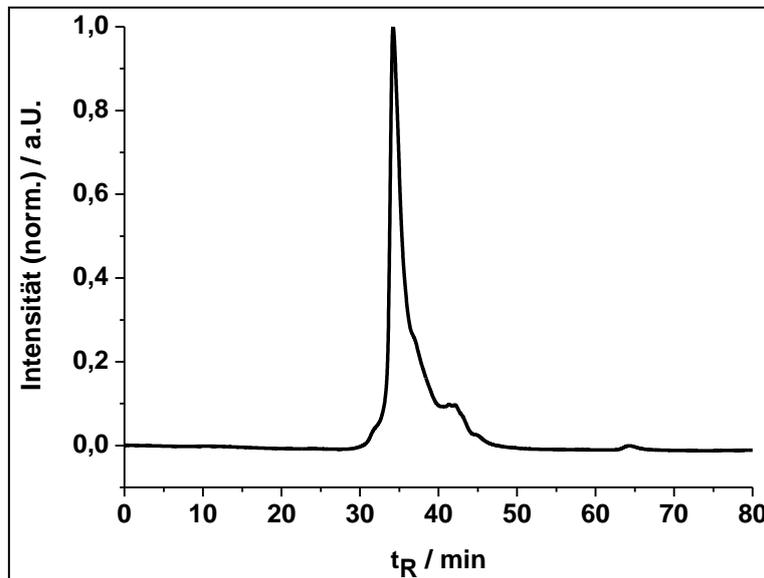


Abbildung 4-29: Normierte GPC-Elutionskurve der Probe 3BT1Ac1d in 0,1 M PBS-Pufferlösung bei einem Fluss von 0,5 mL/min.

Um zu bestimmen, ob der kleine Peak bei ca. 40 Minuten der ODN-RNase-Konjugatspeak ist, wurde das über die präparative Gelelektrophorese aufgereinigte ODN-RNase-Konjugat (Name: Konjugat-VS) ebenfalls über die GPC vermessen (Abbildung 4-30). Wie auch im PAGE-Gelbild (Abbildung 4-21) durch eine Bande bei knapp unter 50 Basen zu erkennen ist, konnte die 46-basenlange DNA nicht komplett abgetrennt werden. Dies scheint der Graph der GPC zu bestätigen (DNA-Peak bei 31 Minuten). Interessant ist auch, dass das Tailing, das in Abbildung 4-28 durch die Fehlsequenz hervorgerufen wurde, durch die Abtrennung dieser mittels präparativer Gelelektrophorese hier ausbleibt. Dies wird noch deutlicher, wenn man den PDI von 1,09 betrachtet, was auf eine nahezu monodisperse Probe hindeutet. Ferner sind die Molmassen, aufgrund der Engverteilung der Kurve, näher zusammengedrückt. In Tabelle 4-7 sind die Werte zusammengefasst.

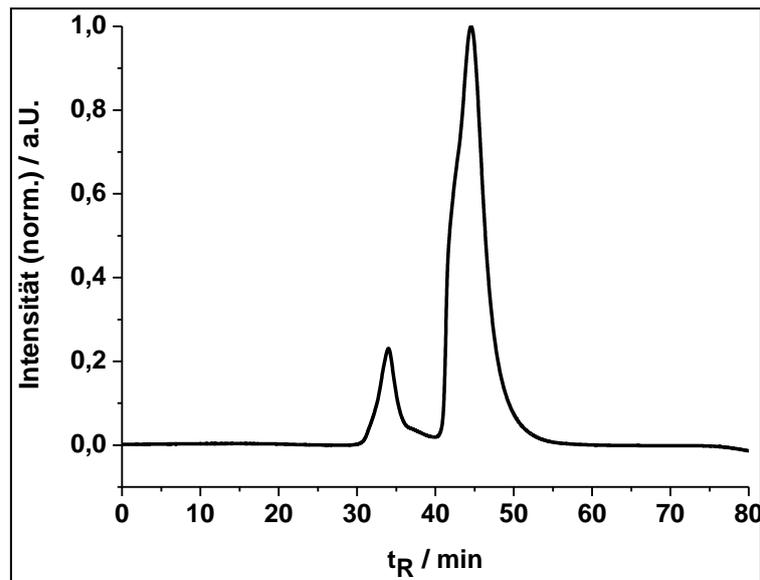


Abbildung 4-30: Normierte GPC-Elutionskurve der Probe Konjugat-VS in 0,1 M PBS-Pufferlösung bei einem Fluss von 0,5 mL/min.

Tabelle 4-7: Übersicht über die Molmassen, PDIs und der Verhältnisse der Peakflächen aus Abbildung 4-30

	DNA-Peak (30 Minuten)	DNA-RNase-Peak (40 Minuten)
M_n	21.342 g/mol	303 g/mol
M_w	23.270 g/mol	575 g/mol
M_p	23.187 g/mol	162 g/mol
PDI	1,09	1,89
Peak Area (P.A.)	3033388 (12%)	22466248 (88%)

Legt man die drei Chromatogramme normiert in einem Diagramm übereinander, lässt sich erkennen, dass die DNA nach 31 Minuten und das ODN-RNase-Konjugat nach 41 Minuten eluiert (Abbildung 4-31). Eine Ausbeutenberechnung aufgrund der Peakflächen ist infolge der zeitgleichen Elution der DNA-Fehlsequenzen nicht durchführbar. Der Grund für die erhöhte Retentionszeit des Konjugats könnte einerseits durch Adsorption am Säulenmaterial (durch die positiven Ladungen der Lysine) oder andererseits durch eine Faltung/Kollaps des Konjugats sein. Dabei könnten die negativen Ladungen des Phosphatrückgrats die positiven Ladungen der Lysine (und Histidine) anziehen und so zu einer Abnahme des hydrodynamischen Volumens führen. Denkbar ist natürlich auch eine Kombination aus beiden genannten Effekten. Der hohe PDI von 1,89 könnte durch unterschiedlich gefaltete Strukturen, welche entsprechend unterschiedlich große hydrodynamische Volumina

aufweisen erklärt werden. Eine teilweise Dimerisierung durch Oxidation der freien Thiole der Cysteine des ODN-RNase-Konjugats könnte ebenfalls den PDI erhöhen.

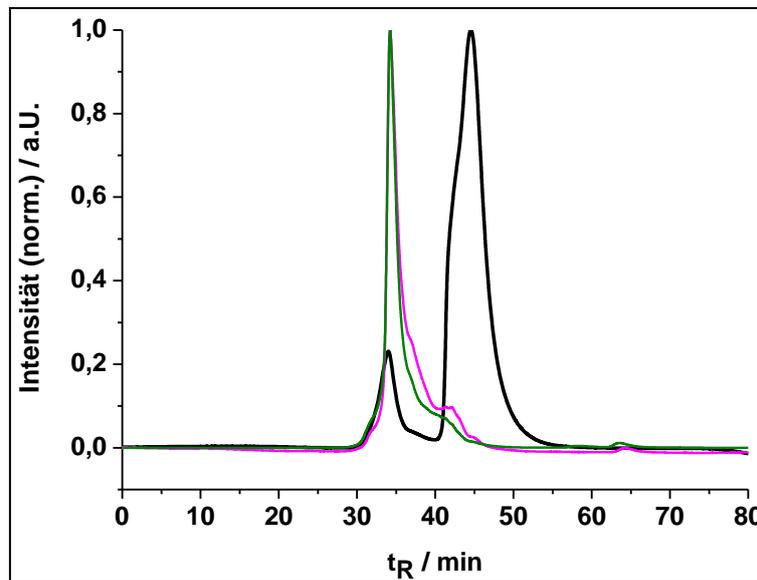


Abbildung 4-31: Normierte GPC-Elutionskurve der Proben 2BT7 Ref (oliv), 3BT1Ac1d (magenta) und Konjugat-VS (schwarz) in 0,1 M PBS-Pufferlösung bei einem Fluss von 0,5 mL/min.

4.1.1.4.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Um die Reinheit der bestellten RNase „Cys-ZFY-6“ bzw. „Cys-ZFY-6-Acm“ zu kontrollieren, wurde diese mittels HPLC vermessen (siehe Anhang Abbildung A7 und A8)

Eine Charakterisierung des ODN-RNase-Konjugats war aufgrund der fehlenden Peakseparation in der HPLC nicht möglich.

4.1.1.4.3 Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass spectroscopy (MALDI-TOF-MS)

Die RNase Cys-ZFY-6 bzw. Cys-ZFY-6-Acm wurde neben der HPLC zusätzlich noch durch MALDI-TOF-MS charakterisiert. Die dazugehörigen Graphen sind im Anhang zu finden. Grundsätzlich ist festzustellen, dass das Peptid zu über 90% rein war und jeweils im Massenbereich von 3851 g/mol für die Acm-geschützte RNase Cys-ZFY-6-Acm bzw. 3707 g/mol für die RNase Cys-ZFY-6 lag (Anhang Abbildung A9).

Da eine Untersuchung der DNA bzw. des DNA-RNase-Konjugats am institutseigenen Gerät nicht möglich war, wurden durch präparative Gelelektrophorese aufgereinigte Proben (SP DNA und SP AB1) zur Charakterisierung an die Firma ██████ geschickt. Ferner war es ██████ nur möglich, die entsalzten Proben (durch BioRad Bio-Spin-6-Säulen) zu charakterisieren (Proben in 1xTBE-Puffer waren nicht charakterisierbar, da möglicherweise die Puffersalz bei der Ionisation/Desorption stören).

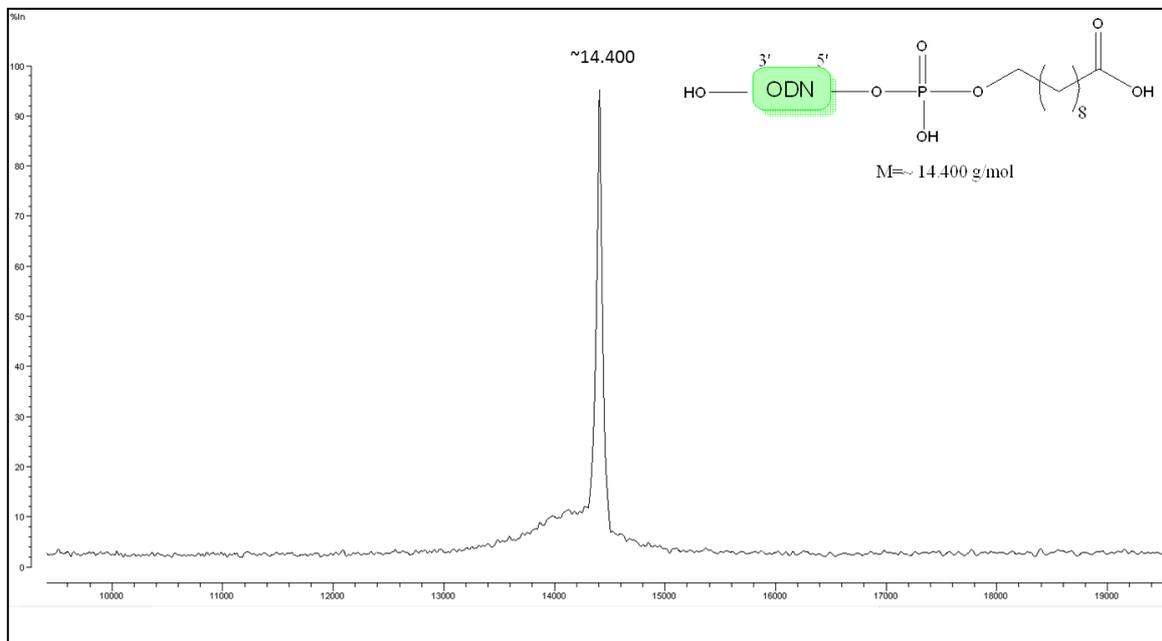


Abbildung 4-32: MALDI-TOF-MS-Spektrum der entsalzten Probe SP DNA in 2,3,4-THAP und 2,4,6 THAP gemessen durch die Firma ██████.

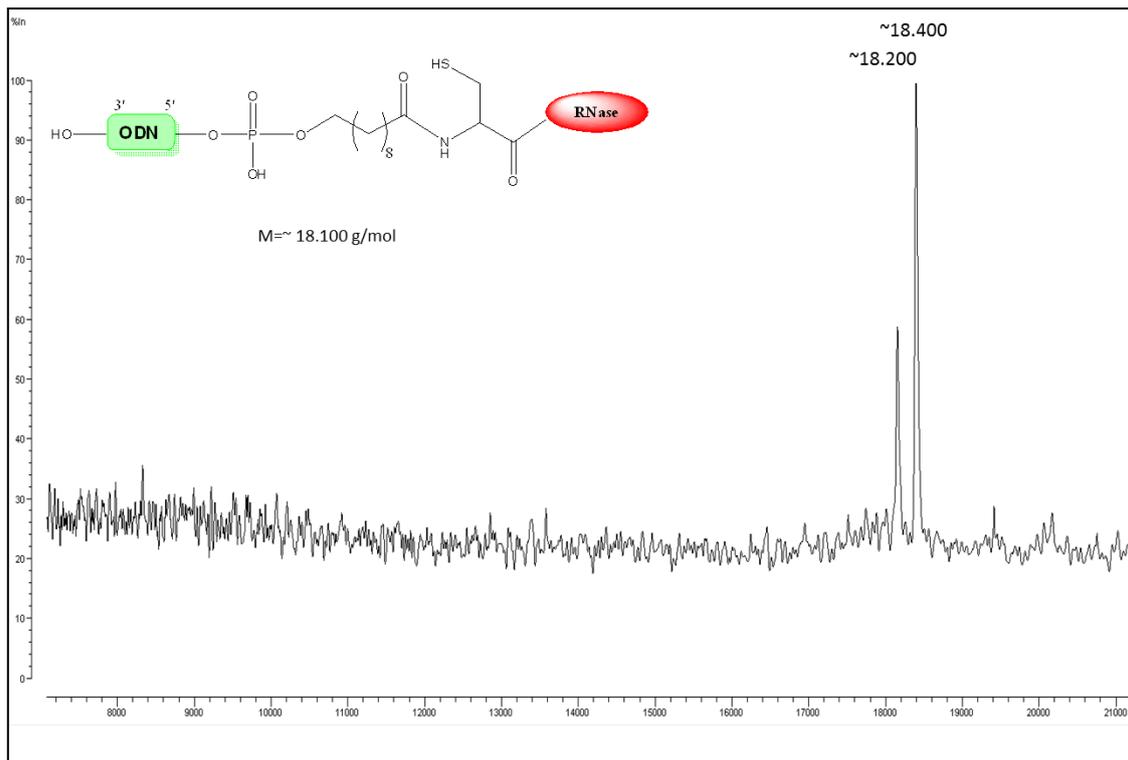


Abbildung 4-33: MALDI-TOF-MS-Spektrum der entsalzten Probe SP AB1 in 2,3,4-THAP und 2,4,6 THAP gemessen durch die Firma [REDACTED].

Die reine 46-basenlange DNA (Abbildung 4-32) zeigt erwartungsgemäß einen Peak bei ihrer theoretisch errechneten Molmasse von ca. 14.400 g/mol. Dieser Edukt-Peak ist im Spektrum (Abbildung 4-33) des Konjugats SP AB1 nicht mehr sichtbar, da dieser mittels präparativer Gelelektrophorese abgetrennt wurde. Der erste Peak bei ca. 18.200 g/mol setzt sich aus der Molmasse von ca. 18.100 g/mol des ODN-RNase-Konjugats (SP AB1) plus Silber (107 g/mol), welches als Kationisierungsagens bei der MALDI-TOF-MS-Messung hinzugegeben wurde, zusammen. Der zweite Peak bei ca. 18.400 g/mol unterscheidet sich mit einer Massendifferenz von knapp 300 g/mol vom ODN-RNase-Molekül. Diese Differenz könnte durch die THAP-Matrix (168 g/mol) plus Silber (107 g/mol) hervorgerufen werden, welche zusammen mit dem Analyten ionisiert.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Messungen belegen die hohe Reinheit und die gelungene Synthese, Aufreinigung und Isolierung des ODN-RNase-Konjugats.

4.1.1.4.4 UV/Vis-Spektroskopie

Die optische Dichte (und daraus die Konzentration) der DNA bzw. der DNA-RNase-Konjugate wurden über ein Eppendorf Biophotometer bestimmt um gleiche Mengen (meist 1 µg) je Probe auf die analytischen Polyacrylamidgelelektrophoresen aufzutragen.

Ferner wurde ein komplettes UV-Vis-Spektrum (200 nm – 700 nm) der DNA, der RNase und einer äquimolaren Mischung aus beiden Biomakromolekülen aufgenommen. Die unterschiedlichen Absorptionswerte bei unterschiedlichen Wellenlängen bzw. deren jeweiligen Extinktionskoeffizienten für DNA und Peptide können in der nachfolgenden Charakterisierung durch Kapillarelektrophorese (CE) genutzt werden. In Abbildung 4-34 ist das Spektrum der 46-basenlangen DNA gegeben. Das Absorptionsmaximum liegt bei ca. 260 nm, das Minimum bei ca. 230 nm.

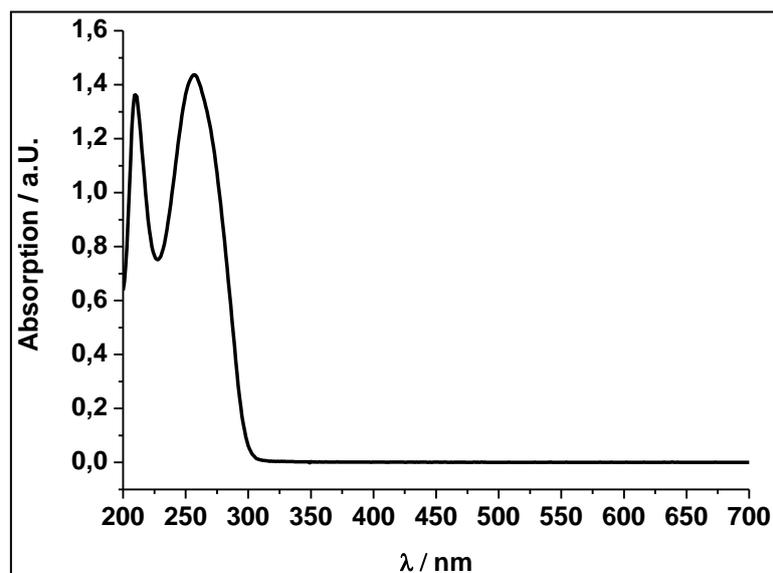


Abbildung 4-34: UV-Vis-Spektrum (200-700nm) des 46-basenlangen ODN bei einer Konzentration von $3,125 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

Im nächsten Spektrum ist die reine RNase in gleicher Konzentration wie die DNA vermessen worden (Abbildung 4-35). Das Absorptionmaximum liegt bei ca. 210 nm, das Minimum bei ca. 250 nm. Bei 260 nm ist die Absorption der RNase vernachlässigbar gering.

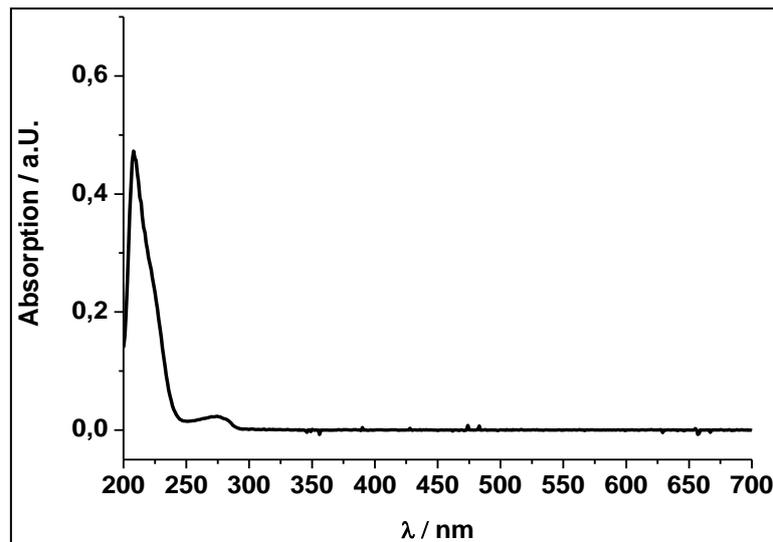


Abbildung 4-35: UV-Vis-Spektrum (200-700 nm) der 31-Aminosäurelangen RNase bei einer Konzentration von $3,125 \cdot 10^{-6}$ mol/L ($C_{RNase}=C_{DNA}$).

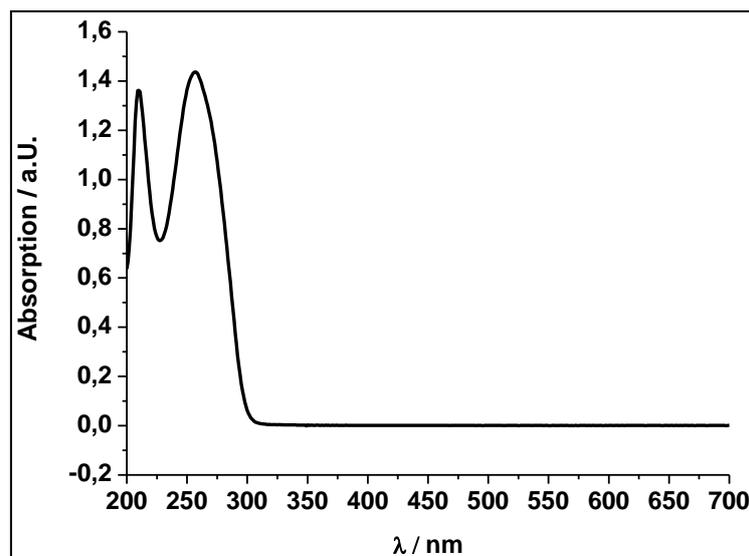


Abbildung 4-36: UV-Vis-Spektrum aus einer äquimolaren Mischung aus der 46-Basenlangen DNA und der 31-Aminosäurelangen RNase bei einer Konzentration von $3,372 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

Augenscheinlich ist die Absorption der RNase bei gleicher Konzentration deutlich geringer als die der DNA (Abbildung 4-36). Um die Extinktionskoeffizienten zu bestimmen, muss eine Konzentrationsreihe des jeweiligen Biomoleküls bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen werden. Dabei wird die Absorption A gegen die Konzentration c (in $\mu\text{mol/L}$) aufgetragen. Die Steigung der resultierenden Geraden liefert den Extinktionskoeffizienten.

Exemplarisch sollen hier die beiden Graphen bei einer Wellenlänge von 230 nm gezeigt werden (Abbildung 4-37 und Abbildung 4-38), die Graphen für die Wellenlängen bei 210 nm, 220 nm und 260 nm sind im Anhang zu finden (Abbildung A-10 bis A-15)

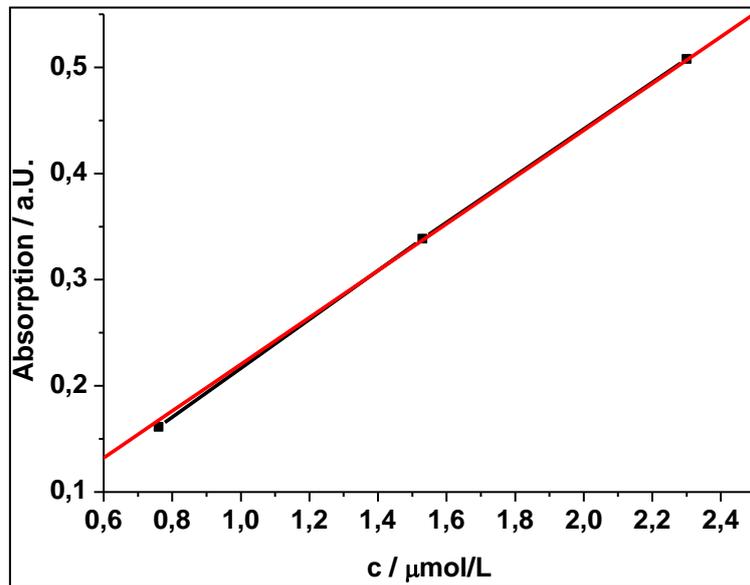


Abbildung 4-37: UV-Vis-Spektrum der 46-Basenlangen DNA bei $\lambda = 230$ nm in unterschiedlichen Konzentrationen; Linear Fit durch den Ursprung (rot): $Y=220358 \cdot X$; $\epsilon = 220358 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$

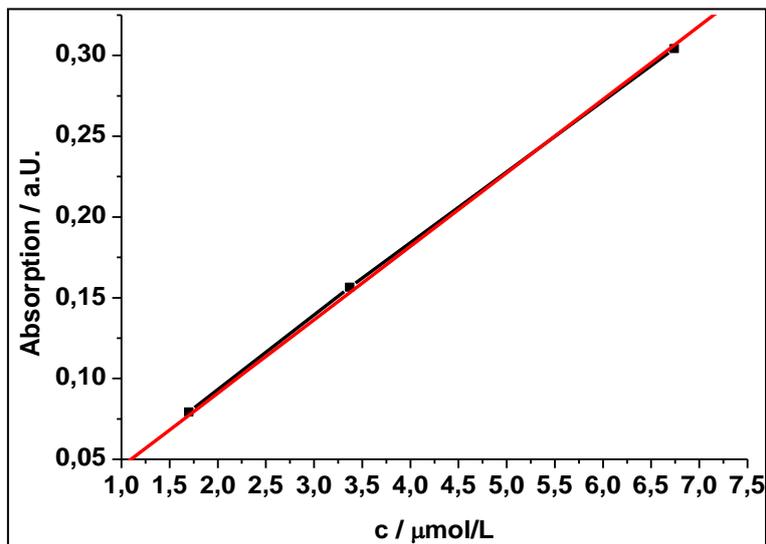


Abbildung 4-38: UV-Vis-Spektrum der 31-Aminosäurelangen RNase Cys-ZFY-6 bei $\lambda = 230$ nm in unterschiedlichen Konzentrationen; Linear Fit durch den Ursprung (rot): $Y=45460 \cdot X$; $\epsilon = 45460 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$

Tabelle 4.8 liefert eine Zusammenfassung der Extinktionskoeffizienten und deren jeweiligen Quotienten der DNA und der RNase bei unterschiedlichen Wellenlängen. Je höher der Quotient aus DNA/RNase, desto geringer ist der Einfluss der RNase auf die Absorption. Es ist zu erkennen, dass der Einfluss der RNase bei 260 nm zu vernachlässigen ist, d.h. bei $\lambda = 260$ nm misst man im Grunde nur die Absorption der DNA. Zwischen $\lambda = 210$ nm und 230 nm ist der Einfluss der RNase deutlich größer. Der Großteil der Absorption ist jedoch immer noch der DNA zuzuschreiben.

Tabelle 4-8: Übersicht über die molaren Extinktionskoeffizienten der 46-Basenlangen DNA und der RNase Cys-ZFY-6 sowie deren Quotienten

	210 nm	220 nm	230 nm	260 nm
DNA	417500	266000	220400	416300
RNase	126900	83340	45460	5143
DNA/RNase	3,290	3,192	4,848	80,94

4.1.1.4.5 Kapillarelektrophorese (CE)

Die DNA und DNA-RNase-Konjugatsproben aus Kapitel 4.1.1.2.5 wurden mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Da bei der GPC das ODN-RNase-Konjugat zeitgleich mit den Fehlsequenzen der DNA eluiert und somit keine Ausbeutenbestimmung durch die GPC möglich war, wurde davon ausgegangen, dass das bei der CE nicht der Fall sei, da die CE nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) trennt. Das m/z -Verhältnis sollte für die 46-basenlange DNA ähnlich zu den m/z -Verhältnissen der Fehlsequenz sein und somit in einen Peak resultieren. Zunächst sollen zwei Ansätze miteinander verglichen, werden bei denen die Konjugatsdarstellung laut PAGE-Gel (Abbildung 4-19) einerseits kaum und andererseits sehr gut funktioniert hat. Hierfür eignen sich die Proben AcRed1 und Ac1. Um herauszufinden, wie hoch die elektrophoretische Mobilität der reinen 46-basenlangen DNA ist, wurde die aus der PrepCell-Aufreinigung erhaltene DNA analysiert und über das Chromatogramm der Probe AcRed1 gelegt (siehe Anhang A-16). Hier lässt sich der DNA-Peak bei einer elektrophoretischen Mobilität von ca. $0,035 \text{ mm}^2/\text{Vs}$ detektieren. In Abbildung 4-39 soll wie oben beschrieben AcRed1 und Ac1 (Konjugatssynthese laut PAGE) bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ verglichen werden. Dabei zeigt nur der Peak bei $0,025 \text{ mm}^2/\text{Vs}$ eine erhöhte Diskrepanz, weshalb vermutet wird, dass es sich hierbei um das ODN-RNase-Konjugat handelt.

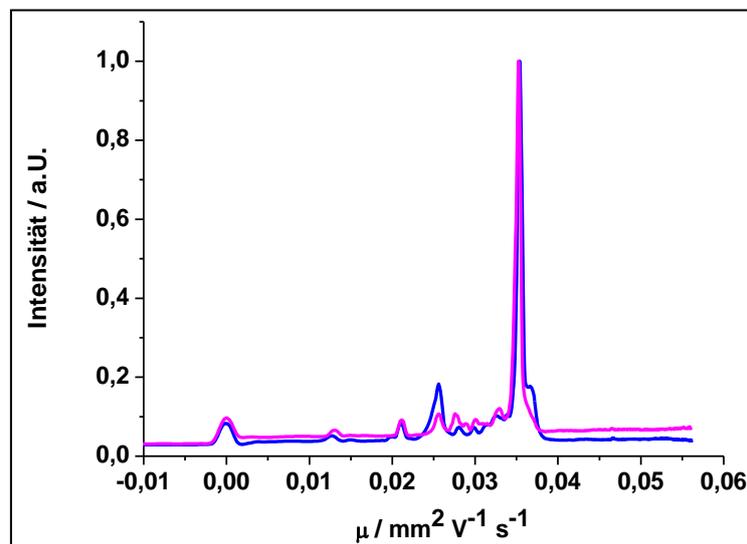


Abbildung 4-39: CE-Chromatogramme: Elektrophoretische Mobilität μ der Proben Ac1 (blau) und AcRed1 (magenta) bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (Natriumboratpuffer pH=9,2; Kapillarlänge 45 cm; 20 °C; 15 min).

Eine Bestätigung dieser Vermutung liefert die Überlagerung der beiden Chromatogramme gemessen bei einer Wellenlänge von 230 nm (Abb. 4-40). Da das Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten von DNA und RNase (siehe Kapitel 4.1.1.4.4.) bei $\lambda = 260$ nm deutlich höher (Faktor 16,7) liegt als bei $\lambda = 230$ nm, muss der ODN-RNase-Peak bei $0,025 \text{ mm}^2/\text{Vs}$ im Vergleich zum DNA-Peak ($0,035 \text{ mm}^2/\text{Vs}$) bei 230 nm größer werden, wenn die Graphen normiert sind.

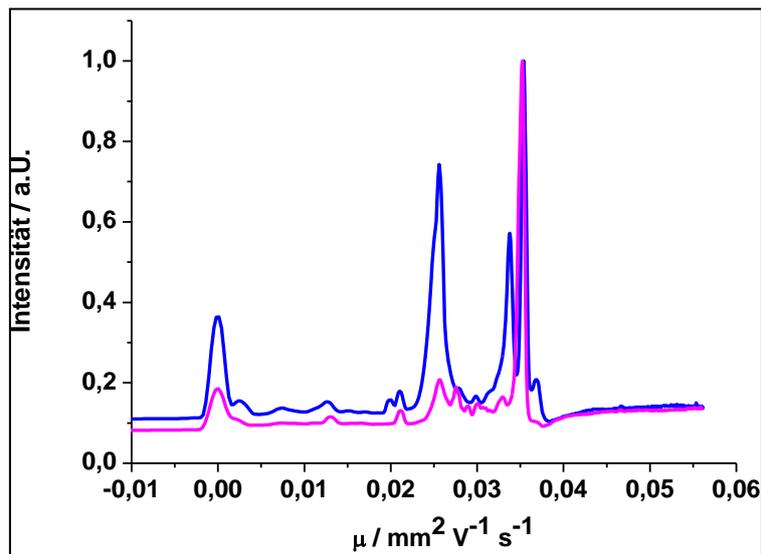


Abbildung 4-40: CE-Chromatogramme: Elektrophoretische Mobilität μ der Proben Ac1 (blau) und AcRed1 (magenta) bei $\lambda = 230$ nm (Natriumboratpuffer pH=9,2; Kapillarlänge 45 cm; 20 °C; 15 min).

Bei der CE werden die Analyten aufgrund des Masse-Ladungsverhältnis getrennt. Wegen der positiven Ladungen der Lysine bzw. der Gesamtpositiven Ladung der RNase „Cys-ZFY-6“ eluiert diese im Vergleich zur reinen DNA früher. Die nun mögliche Ausbeutenberechnung aufgrund der Peakseparation von DNA und DNA-RNase-Konjugat über die Peakflächen bei $\lambda = 260$ nm führt zu einem Ergebnis von 30,4 % für die Probe Ac1.

4.1.1.4.6 Selektive Färbungsmethoden von DNA und Peptiden

Auf der Suche nach einer Färbemethode, welche DNA und Peptide unterschiedlich anfärbt, um die Bildung des ODN-RNase-Konjugats nachzuweisen, wurden folgende Färbemethoden verwendet, welche jedoch aus unterschiedlichen Gründen kein eindeutiges Ergebnis lieferten:

- Stains-All: Färbt DNA blau und Proteine rot an. Das ODN-RNase Konjugat konnte nicht eindeutig als solches identifiziert werden, da die Bande ebenfalls blau/violett war.
- Coomassie-Blue: Färbt Proteine an, jedoch war die Färbeintensität für die verwendeten Mengen zu schwach.
- Silver-Staining: Bekannt als klassische Proteinfärbemethode, färbt es indes ebenso DNA an. Womöglich wechselwirkt das Ag^+ -Ion mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat. Reduktion des angelagerten Ag^+ zum elementaren Silber liefert letztlich die schwarzen Banden.

Schließlich wurde eine Färbemethode in Form von „SYPRO® Ruby Stain“ gefunden, welche selektiv und in geringen Mengen (bis 1 ng)^[11] ausschließlich Peptide anfärbt. Dadurch ist es möglich, PAGE-Gele mit Ruby Stain und anschließend mit GelRed (DNA-Färbung) zu färben. In Abbildung 4-41 ist ein denaturierendes, 20%iges PAGE-Gel gezeigt welches mit beiden Färbemethoden gefärbt wurde. Als Proben wurden B10, B19 und 3BT3Ac3d verwendet. B10 und B19 sind DNA-Peptid-Konjugate aus der Diplomarbeit von Andreas Böckler^[1], bestehend aus 46-Basenlanger DNA und 10 bzw. 19 Aminosäuren. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der konjugierten Peptide sind die Wanderungsgeschwindigkeiten der drei Konjugate unterschiedlich. B10 hat die höchste, 3BT3Ac3d folglich aufgrund der Größe die geringste. Vergleicht man nun die Migrationshöhen der jeweiligen Konjugatsbanden, so lassen sich diese in beiden unterschiedlich gefärbten Gelen erkennen. Legt man zur Orientierung horizontale Linien in die Gele (Originalbild siehe Abb. A-17), lässt sich eindeutig erkennen, dass die Konjugate in beiden Gelen auf der gleichen Höhe laufen. Ein weiteres Indiz dafür, dass Ruby Stain nur Peptide färbt, ist, dass im rechten Gel die DNA-Marker-Spur keine fluoreszierenden Banden aufweist, d.h. Ruby Stain färbt keine DNA an. Interessant ist auch die Bande bei knapp 100 Basen in der B19-Spur. Es scheint sich hierbei um das über die Disulfidbrücke des Cysteins oxidierte Dimer zu handeln, da es ebenfalls im mit Ruby Stain gefärbten Gel erkennbar ist. Die Ergebnisse aus GPC, CE und MALDI-TOF-MS sind hiermit eindeutiger Beweis für die erfolgreiche Darstellung des ODN-RNase-Konjugats. Es bleibt lediglich die Frage offen, warum die Aminosäuren des ODN-

B19-Konjugats in der Lage sind zu fluoreszieren, wohingegen beim ODN-B10-Konjugat und dem ODN-RNase-Konjugat die Banden nur zu einer Extinktion führen und keine Fluoreszenz beobachtet wird. Die Besonderheit des ODN-B19-Konjugats liegt darin, dass es weder Phenylalanin noch Tyrosin enthält, welche beide häufig in der Lage sind Fluoreszenzen zu quenchen.

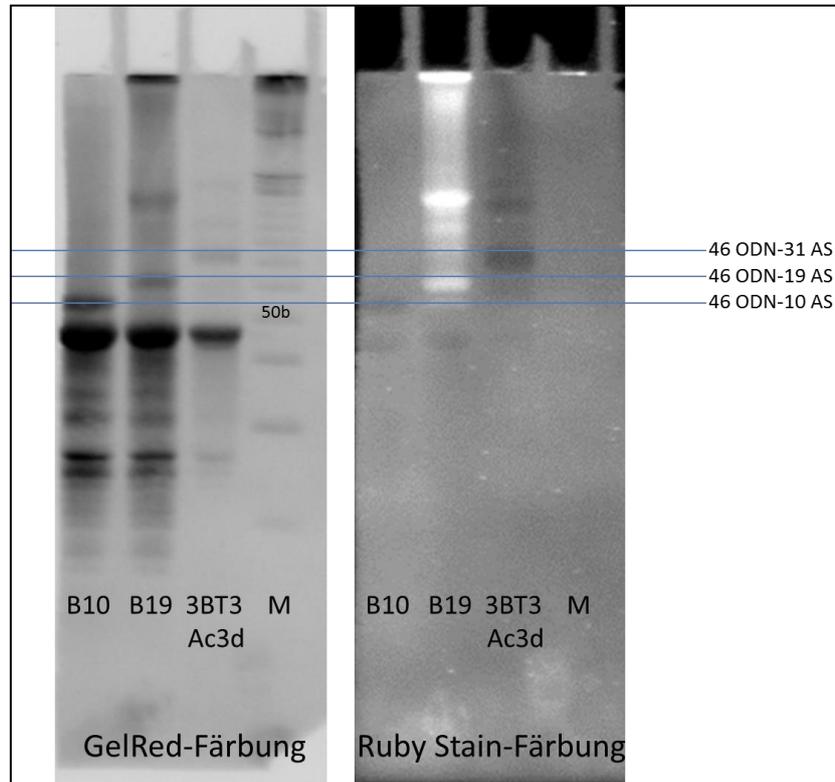


Abbildung 4-41: Denaturierende, 20%ige PAGE-Analyse der Proben B10, B19, 3BT3Ac3d unter Verwendung von unterschiedlichen „Post-Staining“-Methoden.

Zusammenfassung Charakterisierung und Analyse des ODN-RNase-Konjugats:

- Es konnten mit der GPC und CE zwei chemo-analytische Methoden zur Analyse und Charakterisierung des ODN-RNase-Konjugats etabliert werden. Außerdem war es möglich durch unterschiedliche Färbemethoden die Existenz des Konjugats nachzuweisen.
- GPC: Das ODN-RNase-Konjugat eluiert zeitgleich mit den Fehlsequenzen. Erst nach Abtrennung dieser via PrepCell ist eine Peak-Separation zwischen ODN und ODN-RNase möglich.
- CE: Das ODN-RNase-Konjugat eluiert aufgrund der positiven Ladung früher als das reine ODN, wodurch eine Peakseparation und dadurch eine Ausbeutenberechnungen möglich ist.
- MALDI-TOF-MS: Das ODN-RNase-Konjugat mit einer Molmasse von 18.100 g/mol konnte mittels MALDI-TOF-MS von der Firma Biomers gemessen werden.
- Ruby Stain: Durch die unterschiedliche Färbung der PAGE-Gele mit Ruby Stain und GelRed konnte ein weiteres Indiz für die erfolgreiche Darstellung des ODN-RNase-Konjugats geliefert werden.

4.1.2 Synthese der RNA

Die Synthese der RNA, welche für die Hybridisierung des ODN-RNase-Konjugats einen komplementären Bereich zur ODN-Sequenz aufweisen muss, erfolgte in sechs Schritten (Abbildung 4-42). Zunächst wurde die gewünschte Sequenz in der genomischen Maus-DNA mit zwei Primern flankiert und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Danach wird das PCR-Produkt in einen Vektor ligiert (pGEM®-T Easy) und mittels Elektroporation in Bakterienzellen (*DH10B*) transformiert, welche anschließend zur Amplifizierung des Vektors im entsprechenden Medium über Nacht kultiviert wurden. Um den Vektor von den restlichen Nucleinsäuren und Zellbestandteilen zu isolieren, wurde eine Plasmid-Isolierung durchgeführt. Für die darauffolgende *in vitro* Transkription (IVT) muss der Vektor vorher linearisiert werden. Je nach Restriktionsenzym und RNA-Polymerase erhält man schließlich die gewünschte RNA („Target-IVT-RNA“) bzw. die dazu komplementäre RNA („Komp.IVT-RNA“)

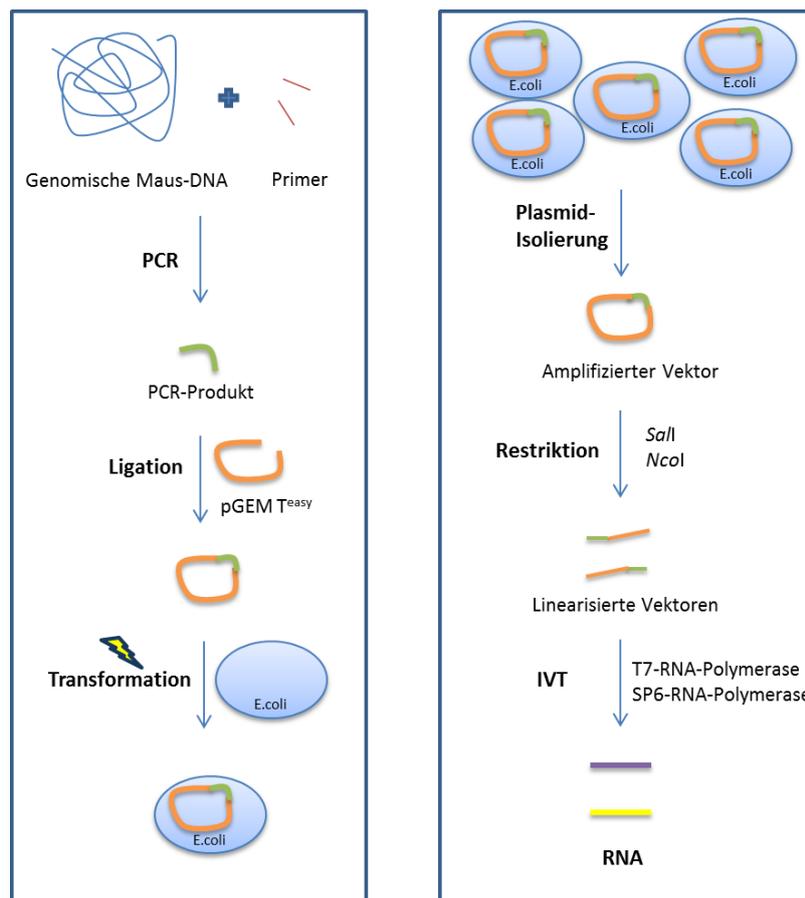


Abbildung 4-42: Übersicht der einzelnen gentechnologischen Schritte zur RNA-Synthese.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation gewünschter DNA-Fragmente durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide („Primer“)^[12]. Zu Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnitts aus der 28S rRNA der Maus (*Mus musculus*) wurden mehrere verschiedene Matrizen der genomischen Maus-DNA und je zwei verschiedene Primerpaare eingesetzt. Die „Primer“ wurden anschließend systematisch mit den drei verschiedenen Maus-DNA-Matrizen kombiniert, woraus sich 12 unterschiedliche PCR-Ansätze ergaben, die alle dem PCR-Standardprogramm (siehe Tabelle 6-27) unterzogen wurden.

Nach erfolgter PCR wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch auf einem Agrose-Gel aufgetrennt (Abbildung 4-43). Ansatz 3AA (Spur 3) liefert ein eindeutiges Produkt im gewünschten Bereich von ca. 700 Basenpaaren mit entsprechender Ausbeute. Dieses wurde im Anschluss mittels Ethanol-Fällung aufgereinigt und von der Firma Starseq sequenziert. Die Richtigkeit der Nukleotid-Sequenz wurde durch das Alignment mit dem Genabschnitt der 28S rRNA der Maus (Abbildung 4-44) bestätigt und ist im elektronischen Anhang (Ab_1) nachzulesen.

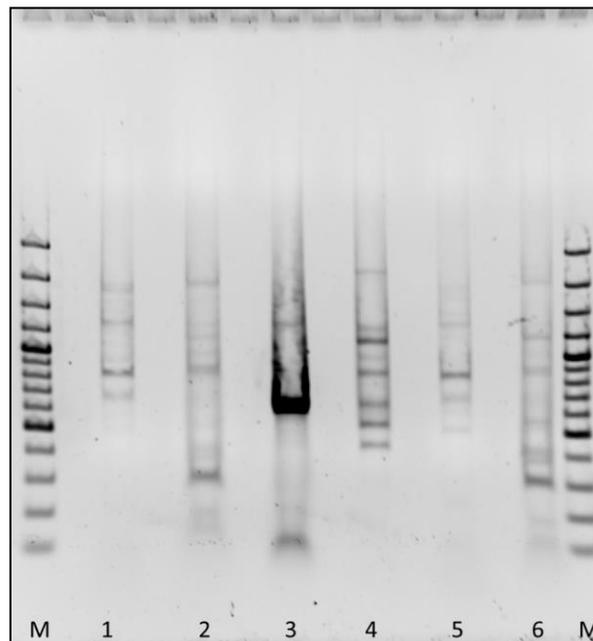


Abbildung 4-43: 1%ige Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte; Spur M: 100bp Marker; Spur 1: 2AB; Spur 2: 2BA; Spur 3: 3AA; Spur 4: 3BB; Spur 5: 3AB; Spur 6: 3BA

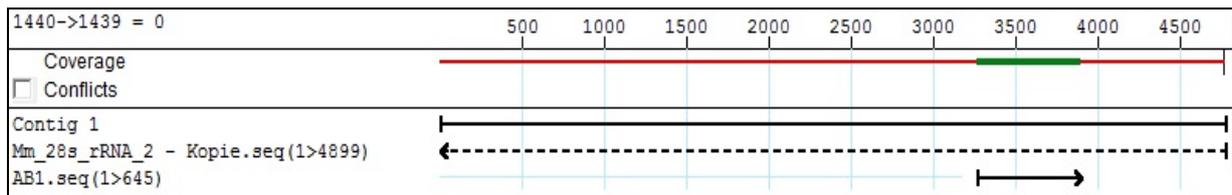


Abbildung 4-44: Alignment des sequenzierten PCR-Produkts (AB_1) und der DNA-Sequenz der 28S rRNA der Maus

Das PCR-Produkt wird anschließend in den linearen Vektor pGEM®-T Easy mit Hilfe der T4 DNA-Ligase ligiert.

Nach erfolgreicher Blau-Weiß-Selektion^[13], bei der insgesamt 7 weiße Klone gepickt wurden, wurden diese zur Vermehrung über Nacht im flüssigen L-Medium kultiviert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des PeqGOLD Plasmid Miniprep Kits^[14] der Firma peqLab isoliert. Die Konzentration wurde mittels NanoDrop-Messung ermittelt und lag bei 114 ng/μL. Über eine Sequenzierung durch die Firma Starseq konnten bakterielle Kontaminationen ausgeschlossen werden und es wurde somit bestätigt, dass der Vektor das korrekte Integrat trägt (Abbildung 4-46).

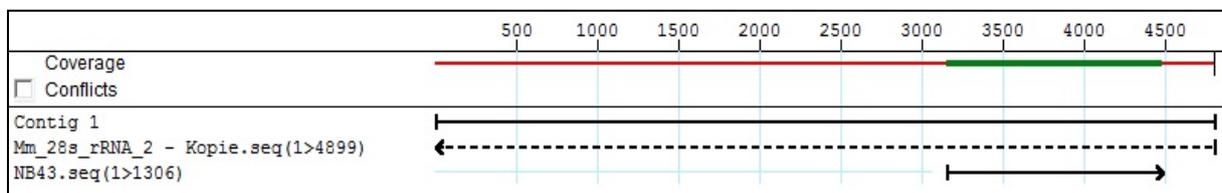


Abbildung 4-46: Alignment des PCR-Intergrats in pGEM® T Easy (NB43) und der DNA-Sequenz der 28S rRNA der Maus

Da nun sichergestellt war, dass der Vektor pGEM® T Easy das korrekte PCR-Intergrat trägt, muss dieser für die abschließende IVT linearisiert werden. In Abbildung 4-47 sind die Promotorstellen der jeweiligen RNA-Polymerasen dargestellt. Restringiert man nun den Vektor mit *Sall*, so muss für die Transkription des Intergrats die T7-RNA-Polymerase im nächsten Schritt der IVT gewählt werden. Schneidet man den Vektor auf der anderen Seite, mit *NcoI* zum Beispiel, muss entsprechend die SP6-RNA-Polymerase verwendet werden. Ferner wurde zur Kontrolle der Integratgröße das komplette Integrat mit dem Restriktionsenzym *NotI* restringiert, welches auf beiden Seiten der Multiple Cloning Site (MCS) schneidet (vgl. Abbildung 4-48).

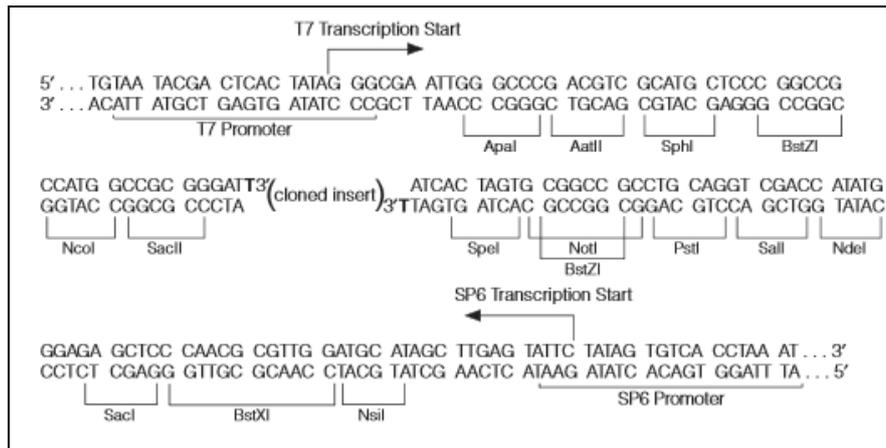


Abbildung 4-47: Promotor und MCS von pGEM® T Easy^[15]

In Abbildung 4-48 sind die einzelnen unterschiedlichen Restriktionsverdau elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei ist in Spur 1 der Restriktionsverdau durch das Restriktionsenzym *NotI* gezeigt, das auf beiden Seiten der MCS aktiv ist und somit das Intergrat aus dem Vektor schneidet. Das Intergrat (Spur 1) liegt dabei im richtigen Massenbereich (ca. 600-700 Basen). Der reine Vektor hat zudem eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit als der Vektor, der zusätzlich noch das PCR-Intergrat trägt (Vergleich Spur 1 mit Spur 2/3).

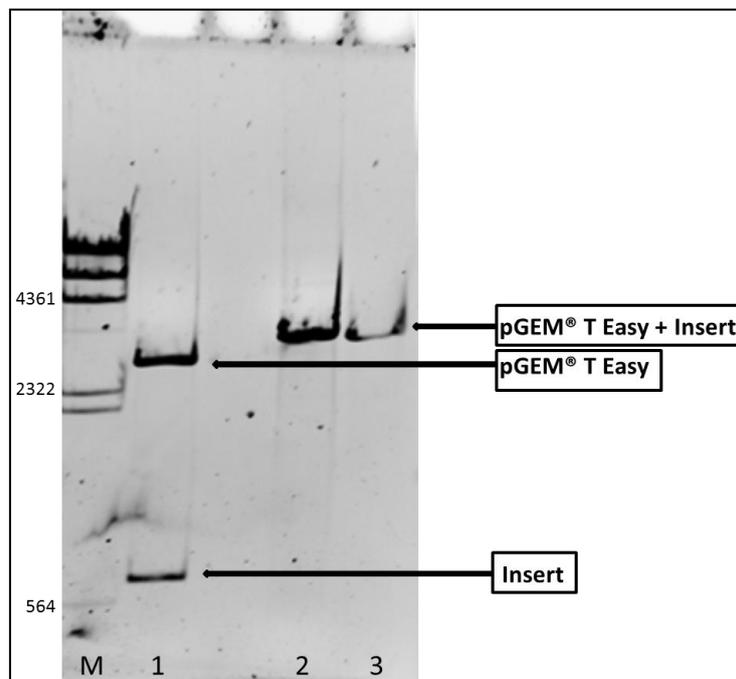


Abbildung 4-48: 1%ige Agarose-Gelelektrophorese-Analyse der Restriktionsverdau des Vektors pGEM® T Easy plus Intergrat (der Klon AB_3) durch unterschiedliche Restriktionsenzyme; Spur M: Marker λ Hind; Spur 1: Restriktion durch *NotI*; Spur 2: Restriktion durch *Sall*; Spur 3: Restriktion durch *NcoI*

Je nach Restriktionsenzym wird für die IVT die zugehörige RNA-Polymerase gewählt. Dadurch ergeben sich zwei zueinander komplementäre RNA Stränge. Das ODN-RNase-Konjugat ist zu dem SP6-transkribierten RNA-Strang komplementär und kann folglich an diesen hybridisieren. Für diesen RNA-Strang wurde die Bezeichnung „Target-IVT-RNA“ gewählt. Der zur „Target-IVT-RNA“ komplementäre RNA-Strang (durch T7-RNA-Polymerase transkribiert) wurde entsprechend mit „Komp.-IVT-RNA“ bezeichnet. Beide RNA-Stränge wurden hinsichtlich Größe und Konzentration mittels Agilent Bioanalyzer 2100 analysiert. Für die späteren Tests zur Enzymaktivität der RNase bzw. des ODN-RNase-Konjugats wurden die beiden RNA-Stränge wiederholt transkribiert. Exemplarisch ist in Abbildung 4-49 das Elektropherogramm der beiden unterschiedlich transkribierten RNAs dargestellt. Hierfür wurden die Proben vorher bei 65°C für 5 Minuten denaturiert, da sich ansonsten Dimere, Trimere und Oligomere der RNA über Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können (Abbildung 4-50).

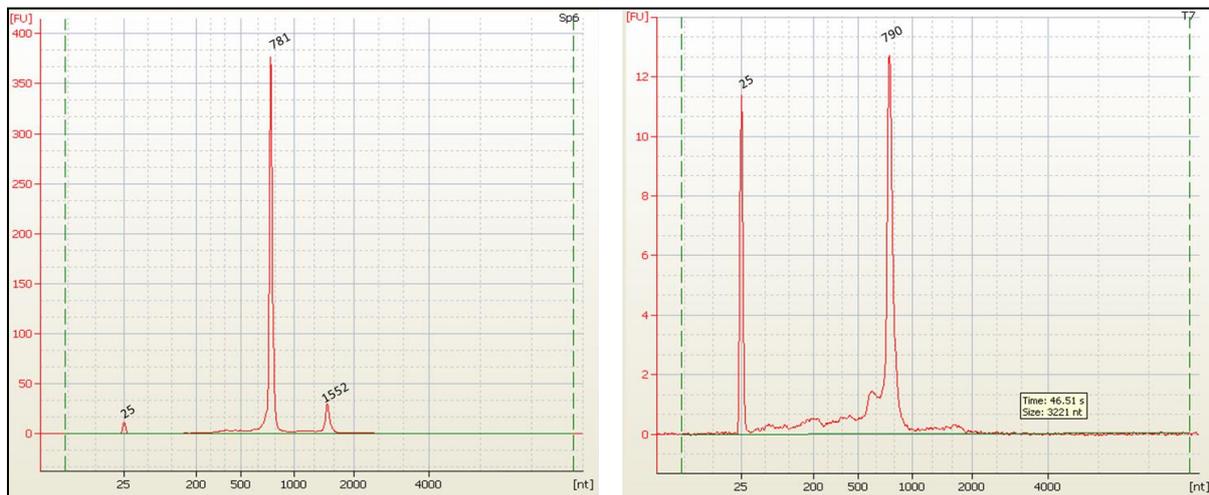


Abbildung 4-49: Elektropherogramm der durch SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase transkribierten RNA; Marker bei 25 nt

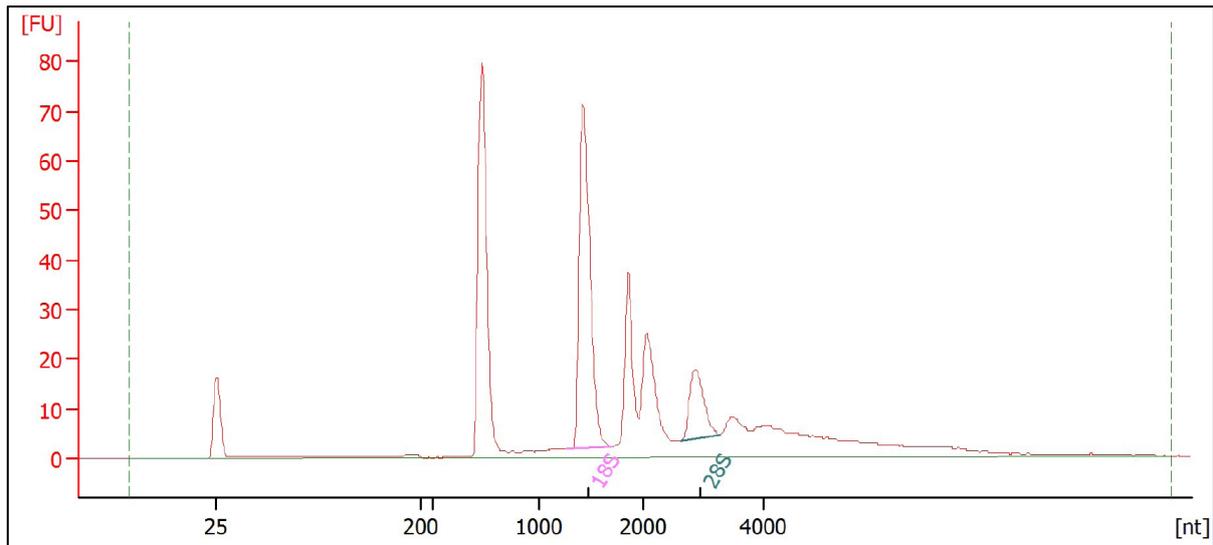


Abbildung 4-50: Elektropherogramm der durch SP6-transkribierten RNA („Target-IVT-RNA“); Marker bei 25 nt

Zusammenfassung Synthese der RNA:

- Es konnten beide zueinander komplementäre RNA-Stränge durch die Nutzung der *in vitro* Transkription erfolgreich dargestellt werden.
- Dabei ist der mit SP6-RNA-Polymerase transkribierte RNA-Strang komplementär zur ODN-Sequenz des ODN-RNase-Konjugats.
- Der mit T7-RNA-Polymerase transkribierte RNA-Strang zeigt keine möglichen Hybridisierungssequenzen für das ODN-RNase-Konjugat und dient somit als Negativkontrolle.
- Der RNA-Strang neigt zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und somit zur Ausbildung von Dimeren und Oligomeren. Durch Denaturierung der RNA-Stränge kann der RNA-Einzelstrang (ss-RNA) erhalten werden.

4.2 Prüfung der Primerspezifität durch radioaktive cDNA-Synthese

Die DNA-Sequenz im ODN-RNase-Konjugat wurde so gewählt, dass alle 46 DNA-Basen komplementär zu einem bestimmten Sequenzabschnitt der „Target-IVT-RNA“ sind und somit durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen hybridisieren können. Dies sollte dagegen bei der „Komp-IVT-RNA“ aufgrund der fehlenden Hybridisierungsmöglichkeiten nicht der Fall sein. Zur Prüfung dieser Hybridisierungsspezifität, auch Primerspezifität genannt, wurde die Methode der radioaktiven complementary-DNA-Synthese (cDNA-Synthese)^[12] gewählt. Hierbei dient das 46-basenlange ODN als „Primer“, welches den Startpunkt der cDNA-Synthese markiert. Dabei wird anschließend beginnend vom 3'-OH des ODNs ein DNA-Strang in 5'-Richtung der RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase synthetisiert, wobei der entstehende DNA-Strang komplementär zur Matrize-RNA ist. Der Einbau von radioaktiven Desoxy-Nukleotiden (α -³²P-dATP) dient einerseits zur Differenzierung von Matrizen-RNA und frisch synthetisierter cDNA, andererseits zur Erhöhung der Nachweisgrenze, was das Arbeiten im Pico- bis Femtomol-Bereich erlaubt. In Abbildung 4-51 ist die radioaktive cDNA-Synthese schematisch dargestellt.

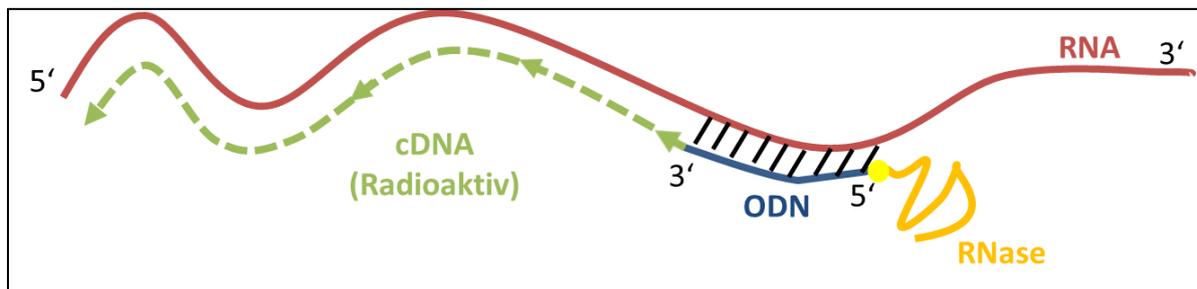


Abbildung 4-51: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese mit dem ODN-RNase-Konjugat als Primer

Zunächst wurde die cDNA-Synthese mit dem reinen 46-basenlangem ODN sowie mit RNase-Anknüpfung (ODN-RNase) an der „Target-IVT-RNA“, bei der eine Hybridisierung auftreten soll, und der „komp.-IVT-RNA“ (ohne Hybridisierung) durchgeführt (vgl. Tabelle 4-11). Durch die Hybridisierung des ODNs an den komplementären Bereich der Matrize-RNA wird der Startpunkt der cDNA-Synthese vorgegeben. Wie sich im nachfolgenden Autoradiogramm zeigt (Abbildung 4-52), kann lediglich in Spur 3 (46-basenlange ODN als Primer und „Target-IVT-RNA als Matrize) radioaktive cDNA-Synthese nachgewiesen werden. Tabelle 4-11 gibt eine Übersicht über die anderen drei cDNA-Synthese-Komponenten. Erst bei einer Expositionszeit von einer Stunde zeigen sich in den anderen Spuren im Vergleich zur Spur 3 leichte Banden. Hier hat nur eine geringe cDNA-Synthese stattgefunden. Die

hohe radioaktive Strahlung in Spur 3 ist im Vergleich zu den anderen Spuren so stark, dass durch die Überstrahlung in den danebenliegenden Spuren kaum eine Aussage über die Spezifität getroffen werden kann. Es lässt sich aber sicher sagen, dass die cDNA-Synthese mit reinem 46-basenlangem ODN und passender RNA-Matrize („Target-IVT-RNA“) wie erwartet gut funktioniert (Spur 3). Dagegen ist die cDNA-Synthese mit dem ODN-RNase-Konjugat in diesem Experiment unter Verwendungen der richtigen Matrize (Spur 1) nur sehr schwach. Positiv hingegen ist, dass nur zwei Banden entstehen, was auf eine spezifische cDNA-Synthese hindeutet. Die Bande mit der höchsten Wanderungsgeschwindigkeit ist hierbei die reine, radioaktive cDNA, die mit der geringsten das Hybrid aus radioaktiver cDNA und Matrizen-RNA. Der durch den Marker angedeutete Größenbereich ist allerdings nicht sehr aussagekräftig, da dieser aufgrund der Verwendung eines DNA-Markers auf einem RNA-Gel leicht verschoben ist. Im nächsten Versuch wird aus diesem Grund die reine, unbehandelte Matrize-RNA als Anhaltspunkt dienen.

Tabelle 4-11: Übersicht über die verschiedenen Ansätze zur radioaktiven cDNA-Synthese

	Matrize	Primer	Erwartete cDNA-Synthese
Spur 1	„Target-IVT-RNA“	ODN-RNase	Ja
Spur 2	„Komp.-IVT-RNA“	ODN-RNase	Nein
Spur 3	„Target-IVT-RNA“	ODN	Ja
Spur 4	„Komp.-IVT-RNA“	ODN	Nein

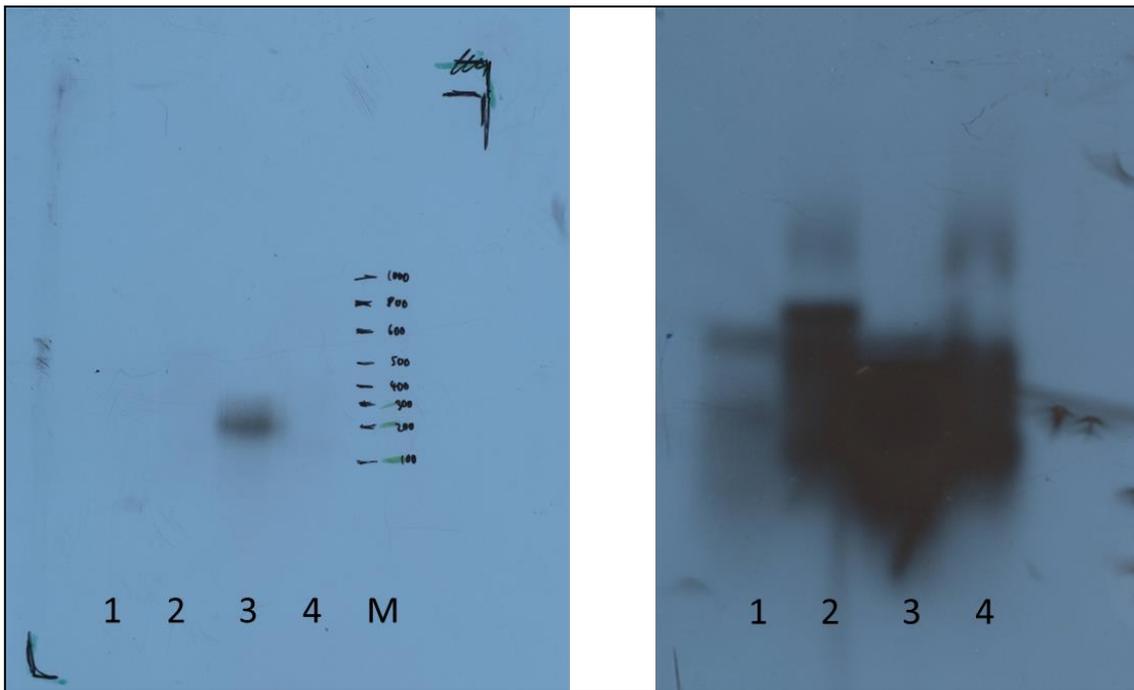


Abbildung 4-52: Autoradiogramme nach radioaktiver cDNA-Synthese und elektrophoretischer Auftrennung auf einem denaturierenden, 1,2%igen Agarose-MIDI-Gel; Links: Expositionszeit 10 Minuten; Rechts: Expositionszeit eine Stunde

Da in diesem ersten Versuch wider Erwarten nahezu kein Produkt bei der Kombination „Target-IVT-RNA“ und ODN-RNase-Konjugat nachgewiesen werden konnte, wurde diese Kombination als nächstes abermals auf dessen Primingspezifität getestet. Hierbei wurden wiederum beide RNA-Matrizen, „Target-IVT-RNA“ und „Komp.-IVT-RNA“, für die cDNA-Synthese mit dem ODN-RNase-Konjugat als Primer eingesetzt. Im Vergleich zum vorherigen Ansatz wurde nun die zweifache Menge an ODN-RNase-Konjugat eingesetzt. In Abbildung 4-53 sind die beiden Autoradiogramme mit unterschiedlichen Expositionzeiten gezeigt. Dabei ist in den Spuren 1-3 die RNA-Matrize in unterschiedlichen Mengen aufgetragen. In Spur 4 ist die cDNA-Synthese mit „Komp.-IVT-RNA“ als Matrize aufgetragen, in Spur 5 mit dem „Target-IVT-RNA“ als Matrize. Wie bereits in Abbildung 4-50 leicht erkennbar war, treten auch hier in Spur 5 zwei eindeutige Banden auf, welche als cDNA-Bande und als cDNA-Matrizen-RNA-Hybridbande klassifiziert werden können. In Spur 4 sind bei einer Expositionszeit von einer Stunde keine Banden zu erkennen. Erst nach drei Stunden ist eine vernachlässigbar kleine Bande erkennbar, die auf unspezifische cDNA-Synthese hindeuten könnte. Beim Vergleich der entstandenen Banden mit der als Anhaltspunkt aufgetragen RNA-Matrize (Spur 1-3 Abbildung 4-54) lässt sich direkt erkennen, dass die beiden Banden in Spur 5 sowohl unterhalb (entspricht der cDNA) als auch oberhalb (entspricht dem cDNA-RNA-Hybrid) liegen. Dabei sind die Autoradiogramme und Gelbilder nach DNA-

Fluoreszenzfärbung weitgehend deckungsgleich, sprich die jeweiligen Banden liegen übereinander. Ferner wurde die Tatsache bestätigt, dass es sich bei der Bande mit der geringsten elektrophoretischen Mobilität in Spur 5 um das cDNA-RNA-Hybrid handelt, überprüft. Hierzu wurde das Syntheseprodukt vor der Elektrophorese bei 85 °C für 10 Minuten denaturiert und anschließend auf einem 1,2%igen denaturierendem Agarose-RNA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle diente eine nicht-denaturierte Probe. Dabei ist deutlich ersichtlich, dass die vermutete cDNA-RNA-Hybrid-Bande verschwand und nur noch die cDNA-Bande auf dem Autoradiogramm sichtbar war (Autoradiogramm im Anhang Abbildung A-18).

Tabelle 4-12: Übersicht über die verschiedenen Beladungen der einzelnen Spuren des 1,2%igen, denaturierenden Agarose-RNA-Gels bzw. die Ansätze der radioaktiven cDNA-Synthese mit dem ODN-RNase-Konjugat als Primer (Spur 4-5)

	Matrize	Menge	Erwartete cDNA-Synthese
Spur 1	„Target-IVT-RNA“	1 µg	Nein, da kein Primer zugegeben
Spur 2	„Target-IVT-RNA“	3 µg	Nein, da kein Primer zugegeben
Spur 3	„Target-IVT-RNA“	5 µg	Nein, da kein Primer zugegeben
Spur 4	„Komp.-IVT-RNA“	2 µg	Nein, da Primer nicht komplementär
Spur 5	„Target-IVT-RNA“	2 µg	Ja, da Primer komplementär

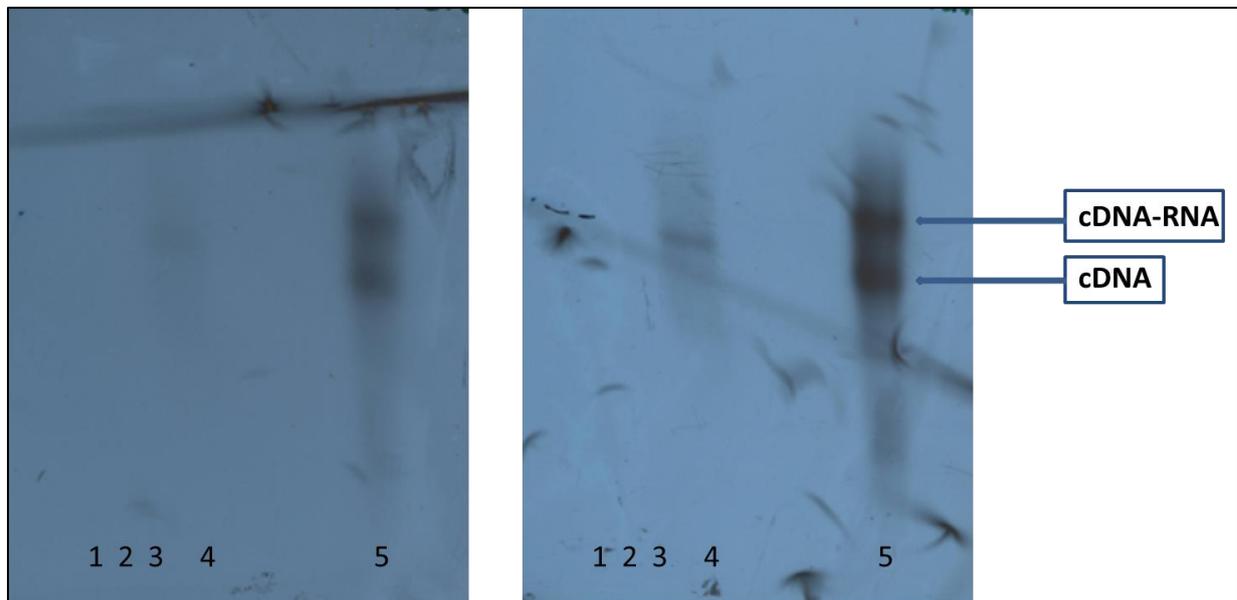


Abbildung 4-53: Autoradiogramme nach radioaktiver cDNA-Synthese und elektrophoretische Auftrennung auf einem denaturierenden, 1,2%ige Agarose-RNA-MIDI-Gel; Links: Expositionszeit 1 Stunde; Rechts: Expositionszeit 3 Stunden

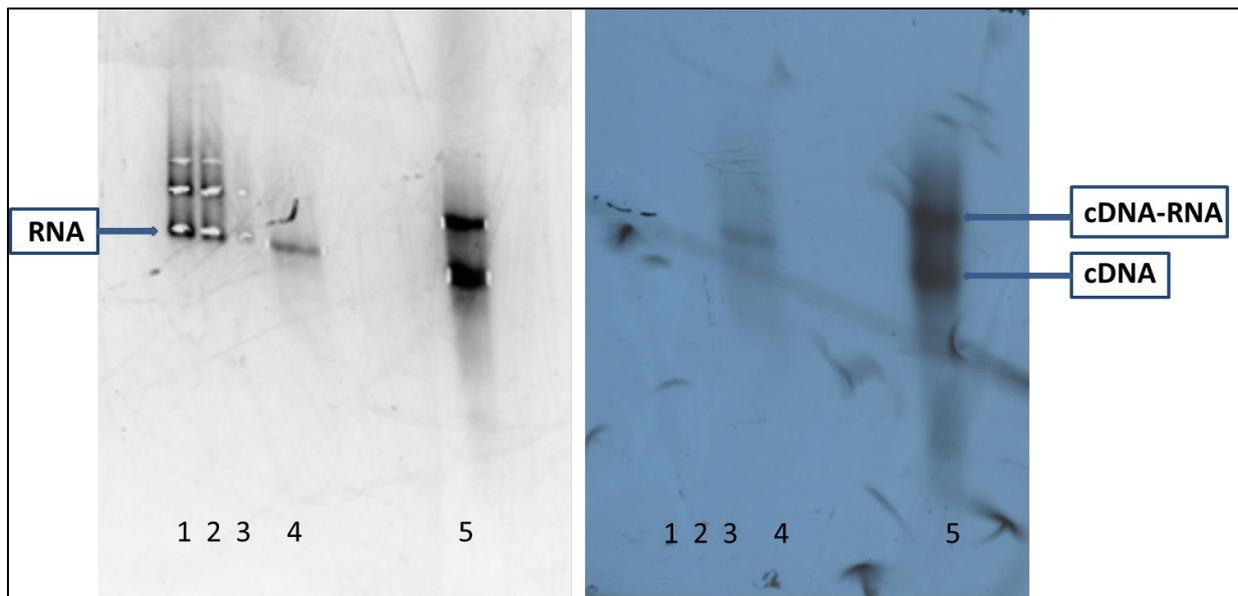


Abbildung 4-54: Vergleich des durch UV-Belichtung aufgenommenen Gelbildes (links) mit dem zugehörigen Autoradiogramm (rechts) nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem 1,2%igen, denaturierenden Agarose-RNA-Gel

Zusammenfassung Prüfung der Priming-Spezifität:

- Das reine 46-basenlange ODN dient für die cDNA-Synthese als optimaler „Primer“ bei der Verwendung der „Target-IVT-RNA“ als Matrize. Die „Komp.-IVT-RNA“ zeigt als Matrize kein „Priming“, so dass von einer spezifischen Bindung an die Ziel-RNA ausgegangen werden kann.
- Das ODN-RNase-Konjugat zeigt wie das reine 46-basenlange ODN gute Primereigenschaften. Auch hier findet nur bei der „Target-IVT-RNA“ eine cDNA-Synthese statt.
- ODN und ODN-RNase-Konjugat hybridisieren wie erwartet spezifisch an die Zielsequenz auf der „Target-IVT-RNA“.

4.3 Prüfung der Enzymaktivität der RNase „Cys-ZFY-6“

4.3.1 Blockierte RNase „Cys-ZFY6-Acm“

Die RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ wurde im Folgenden auf ihre Enzymaktivität mit HeLa-RNA als Matrize überprüft. Die beiden Thiole an Cys6 und Cys9 liegen bei der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ nicht in Form freier Thiole vor, sondern sind durch eine Acetamidomethyl(Acm)-Gruppe blockiert und könnten somit möglicherweise die Enzymaktivität behindern. Als RNA-Matrizen wurden je Ansatz 500 ng HeLa-Total-RNA verwendet. Die RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ wurde sowohl als Monomer in ihrer reduzierten Form mit freiem Thiol am N-Terminus als auch als Dimer in ihrer oxidierten Form verwendet. Die Oxidation erfolgte über einen Zeitraum von ein bis drei Tagen in Wasser durch Einleitung elementaren Sauerstoffs. Die Kontrolle des Oxidationsfortschritts erfolgte über ein NuPAGE® Bis-Tris-Mini-Gel (siehe Anhang A-19). Die RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ wurde sowohl äquimolar (1pM-Lösung) als auch im 1000fachen Überschuss (1nM-Lösung) eingesetzt und für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert (Tabelle 4-13). Wie sich in den Chromatogrammen (Abbildung 4-55) erkennen lässt, bleiben alle Peaks der 18S und 28S RNA unverändert, d.h. es fand bei keinem der elf verschiedenen Ansätze ein Abbau der HeLa-RNA statt. Wie bereits vermutet, scheint die Blockierung der freien Thiole der Cysteine durch eine Acm-Gruppe die Enzymaktivität beträchtlich zu beeinflussen.

Tabelle 4-13: Übersicht über die Inkubationsbedingungen der RNA-Degradation durch die blockierte RNase „Cys-ZFY-6-Acm“

RNA	RNase-Form	Konzentration der RNase	Inkubations-Dauer	Probe
HeLa-RNA	Reduziert	1 nM	1 Minute	Sample 1
HeLa-RNA	Reduziert	1 nM	5 Minuten	Sample 2
HeLa-RNA	Reduziert	1 nM	15 Minuten	Sample 3
HeLa-RNA	Reduziert	1 pM	1 Minute	Sample 4
HeLa-RNA	Reduziert	1 pM	5 Minuten	Sample 5
HeLa-RNA	Reduziert	1 pM	15 Minuten	Sample 6
HeLa-RNA	Oxidiert	1 nM	1 Minute	Sample 7
HeLa-RNA	Oxidiert	1 nM	5 Minuten	Sample 8
HeLa-RNA	Oxidiert	1 nM	15 Minuten	Sample 9
HeLa-RNA	Oxidiert	1 pM	1 Minute	Sample 10
HeLa-RNA	Oxidiert	1 pM	5 Minuten	Sample 11

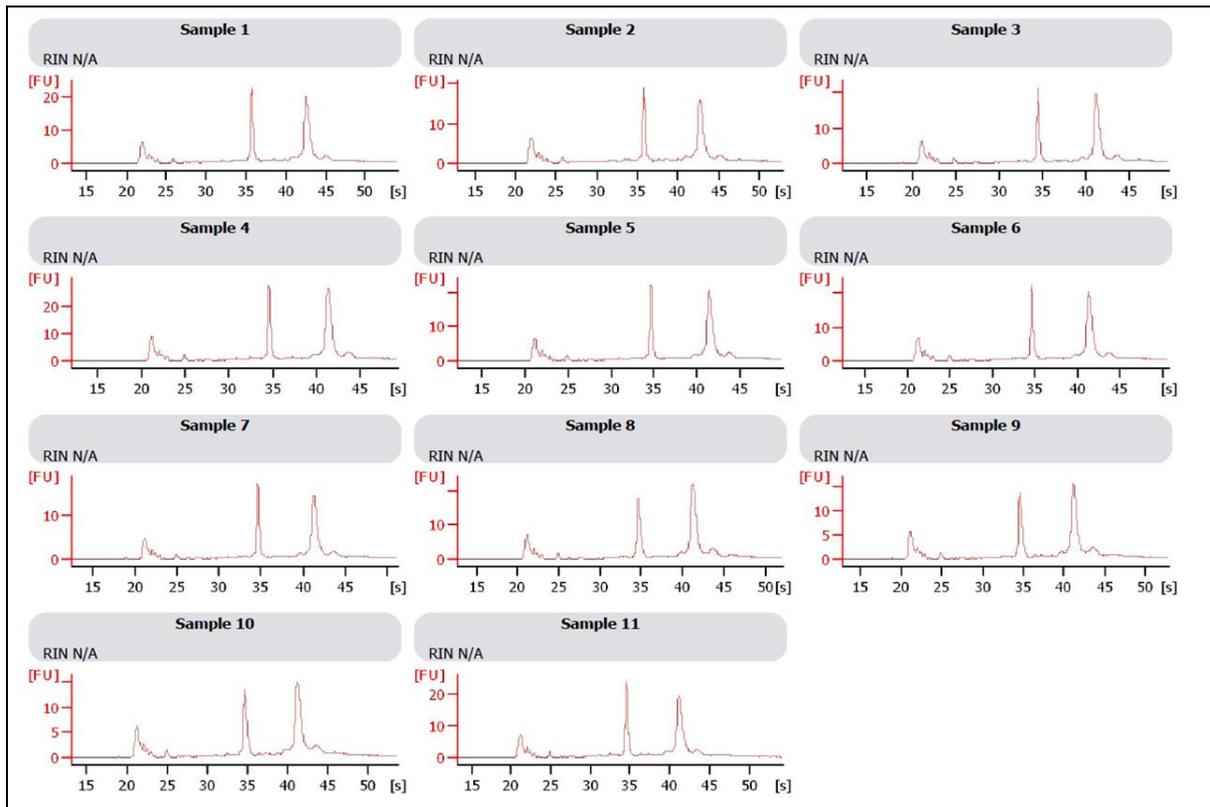


Abbildung 4-55: Analyse der RNA-Degradation mittels Agilent Bioanalyzer 2100

4.3.2 RNase „Cys-ZFY-6“

4.3.2.1 Reduzierte Form (Monomer)

Die RNase „Cys-ZFY-6“ wurde nachfolgend als Monomer in ihrer reduzierten Form (mit freien Thiolgruppen an allen Cysteinen) auf ihre Enzymaktivität in drei unterschiedlichen Reaktionsmedien (1xTBE-Puffer, HPLC-Wasser und Zinkchlorid-Lösung) geprüft. Ferner wurde die RNase (0,5 µg) im Vergleich zur Matrize-RNA (0,2 µg „Komp.-IVT-RNA“) im 150fachen molaren Überschuss eingesetzt und für je eine halbe Stunde, eine Stunde und zwei Stunden inkubiert. Nachfolgende Tabelle 4-14 gibt eine Übersicht über die Reaktionsparameter der einzelnen Ansätze.

Tabelle 4-14: Übersicht über die Inkubationsbedingungen der RNA-Degradation durch die reduzierte RNase „Cys-ZFY-6“ in unterschiedlichen Reaktionsmedien

RNA	Reaktionsmedium	Inkubationsdauer	Probename
„Komp.-IVT-RNA“	Keine RNase zugegeben	0 Minuten	Kontrolle
„Komp.-IVT-RNA“	1xTBE-Puffer	0,5 Stunden	T 1/2h
„Komp.-IVT-RNA“	Wasser	0,5 Stunden	H 1/2h
„Komp.-IVT-RNA“	Zinkchlorid	0,5 Stunden	Zn 1/2h
„Komp.-IVT-RNA“	1xTBE-Puffer	1 Stunde	T 1h
„Komp.-IVT-RNA“	Wasser	1 Stunde	H 1h
„Komp.-IVT-RNA“	Zinkchlorid	1 Stunde	Zn 1h
„Komp.-IVT-RNA“	1xTBE-Puffer	2 Stunden	T 2h
„Komp.-IVT-RNA“	Wasser	2 Stunden	H 2h
„Komp.-IVT-RNA“	Zinkchlorid	2 Stunden	Zn 2h
Keine RNA	Nur RNase	0 Minuten	H-Red

Da eine mögliche Degradierung der Proben durch Denaturierung vermieden werden sollte, wurden alle Proben in nativer Form mit dem Bioanalyser 2100 analysiert (Abbildung 4-56). In den Ansätzen, die im Reaktionsmedium Zinkchlorid (Spuren 4, 7, 10) stattgefunden haben, lässt sich kein RNA-Abbau beobachten. Die RNA-Hydrolyse basiert, wie im Kapitel 3.2.4 beschrieben, auf einem Säure-Base-Mechanismus, bei dem der Startpunkt der Hydrolyse die Abstraktion des Protons am 2'OH der RNA durch das freie Elektronenpaar des Stickstoff am Histidin ist. Durch Zugabe von Zinkchlorid zur RNase „Cys-ZFY-6“ wird eine Koordination der Zn^{2+} -Ionen durch beide Cysteine und Histidine der RNase unter Ausbildung eines Zinkfingermotivs forciert. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffs am Histidin ist durch die Koordination des Zn^{2+} nicht mehr für die Abstraktion des Protons am 2'OH der RNA verfügbar, was somit zu einer Blockierung der enzymatisch aktiven Bereiche der RNase „Cys-ZFY-6“ führt. Bei Betrachtung der Ansätze in Wasser bzw. in 1xTBE-Puffer lässt sich ein gewisser RNA-Abbau erkennen. Dabei ist der Abbau im leicht basischen 1xTBE-Puffer (pH=7,6) deutlich stärker als im pH-neutralen HPLC-Wasser. Womöglich hydrolysiert im 1xTBE-Puffer nicht nur die RNase „Cys-ZFY-6“ die RNA, sondern auch die freien im 1xTBE-Puffer enthaltenen Hydroxid-Ionen. Die stärkste Degradation von RNA ist in 1xTBE-Puffer nach zwei Stunden (T 2h; Spur 8) zu beobachten. Zur Kontrolle ist in Spur 1 die reine, unbehandelte RNA und in Spur 11 die reine RNase ohne RNA aufgezeigt. Leider wurde von der Auswerte-Software die Molekulargewichtsleiter nicht korrekt erkannt, was zu einer gewissen Verzerrung der Größenabschnitte führt. Für die Analyse des RNA-Verdaus ist

diese jedoch nicht entscheidend, da nur das Verschwinden bzw. Entstehen neuer Peaks von Bedeutung ist.

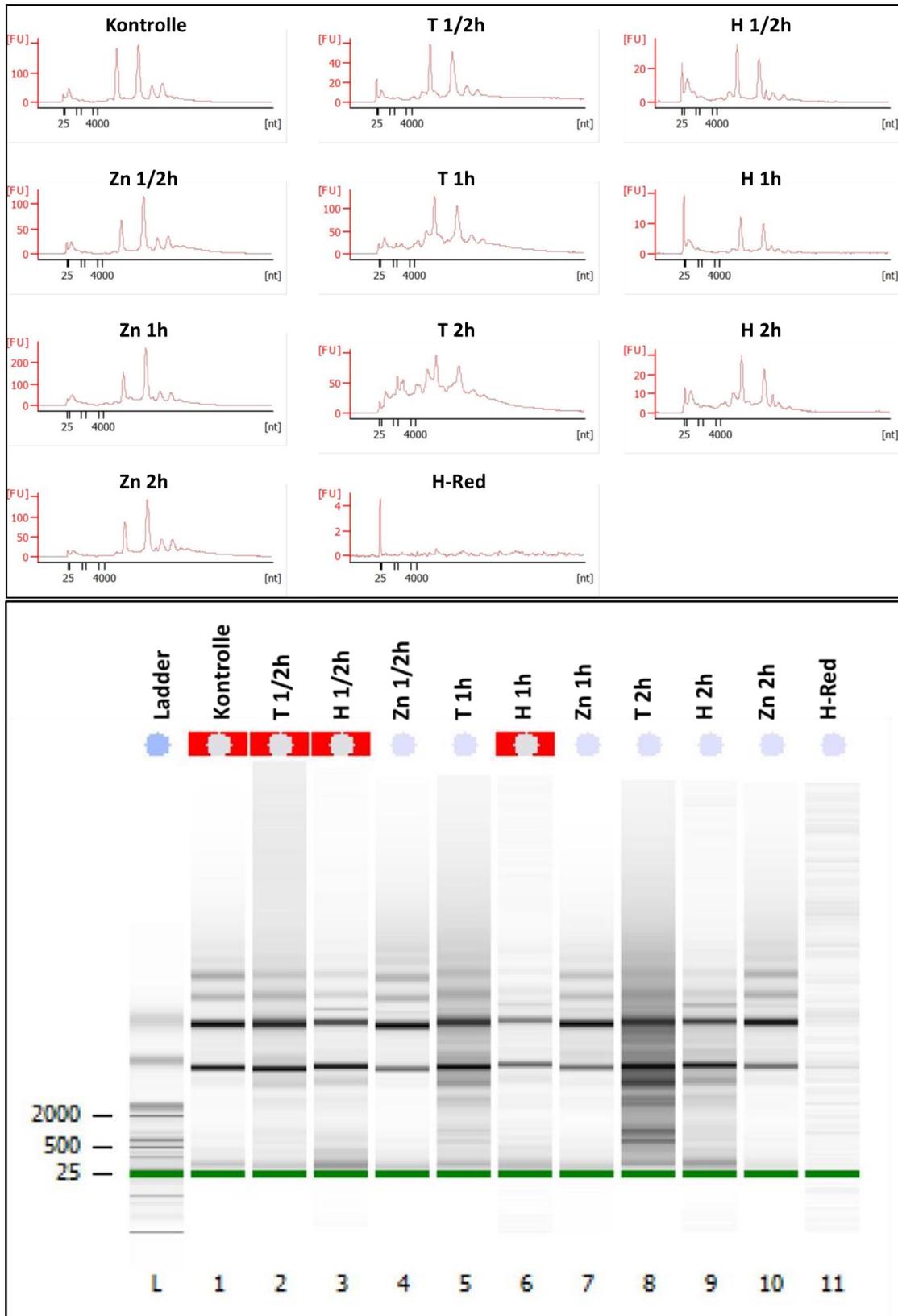


Abbildung 4-56: Analyse der RNA-Degradation mittels Agilent Bioanalyzer 2100; oben: Elektropherogramm; unten: Aus dem Elektropherogramm errechnete „Gel-Ansicht“

4.3.2.2 Oxidierte Form (Dimer)

Laut Lima^[9] ist die von ihm verwendete RNase ZFY-6 nur in ihrer oxidierten Form enzymatisch aktiv. Um dies zu prüfen, wurde die in dieser Arbeit am N-Terminus durch die Anknüpfung eines zusätzlichen Cysteins leicht modifizierte RNase „Cys-ZFY-6“ durch Einleiten elementaren Sauerstoffs in drei unterschiedliche Reaktionsmedien (1xTBE-Puffer, Wasser und Zinkchlorid-Lösung) für drei bzw. fünf Tage oxidiert. Die Analyse des Oxidationsfortschritts konnte elektrophoretisch durch die Verwendung von 4-12%igen NuPAGE® Bis-Tris-Mini-Gelen erfolgen (Abbildung. 4-57). Die Oxidation durch Sauerstoff im Zinkchlorid-Medium liefert offenkundig nur ein Dimer (Spur Z3 und Z5). Grund hierfür ist die Koordination der beiden Cysteine Cys6 und Cys9 durch Zn^{2+} , das zur Ausbildung des Zinkfingermotivs führt, wodurch die freien Thiole nicht bzw. schwerer oxidiert werden können. Die Oxidation der RNase in Wasser verläuft ebenfalls sehr selektiv, da hierbei die Bildung von Trimeren bzw. Oligomeren vernachlässigbar klein ist - im Gegensatz zu der Oxidation im leicht basischen 1xTBE-Puffer, bei dem eine Reihe von Oligomeren entstehen.

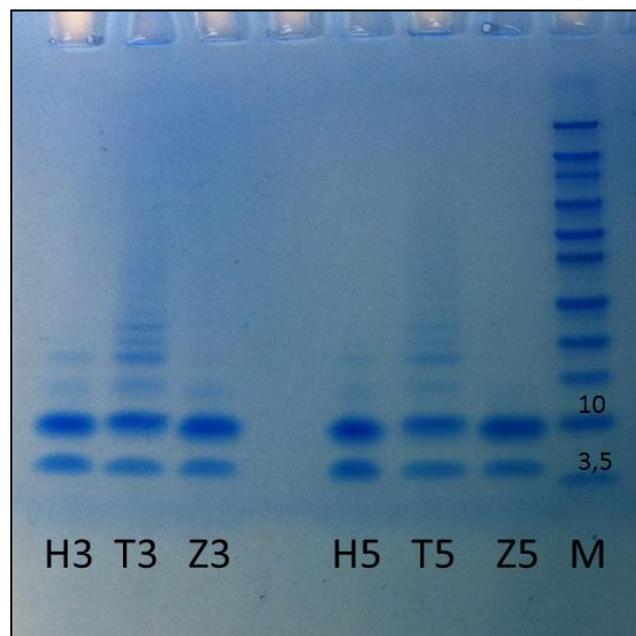


Abbildung 4-57: 4-12%iges NuPAGE® Bis-Tris-Mini-Gel: Analyse des Oxidationsfortschritts durch elektrophoretische Auftrennung der RNase „Cys-ZFY-6“; Spur H3: Oxidation in Wasser für 3 Tage; Spur T3: Oxidation in 1xTBE-Puffer für 3 Tage; Spur Z3: Oxidation in Zinkchlorid-Lösung für 3 Tage; Spur H5: Oxidation in Wasser für 5 Tage; Spur T5: Oxidation in 1xTBE-Puffer für 5 Tage; Spur Z5: Oxidation in Zinkchlorid-Lösung für 5 Tage; Spur M: Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard

Die jeweilig unterschiedlich stark oxidierten RNasen wurden im Folgeexperiment mit der „Komp.-IVT-RNA“ im 50fachen molaren Überschuss für ein bzw. zwei Stunden inkubiert (Tabelle 4-15).

Tabelle 4-15: Übersicht über die Inkubationsbedingungen der RNA-Degradation durch das oxidierte RNase-Dimer „Cys-ZFY-6“ in unterschiedlichen Reaktionsmedien

RNA	RNase	Reaktionsmedium	Zeit	Beschriftung
„Komp.-IVT-RNA“	Keine	Wasser	0 Minuten	RNA pur
„Komp.-IVT-RNA“	H3	Wasser	1 Stunde	H3 1h
„Komp.-IVT-RNA“	T3	1xTBE-Puffer	1 Stunde	T3 1h
„Komp.-IVT-RNA“	Z3	Zinkchlorid	1 Stunde	Z3 1h
„Komp.-IVT-RNA“	H3	Wasser	2 Stunden	H3 2h
„Komp.-IVT-RNA“	T3	1xTBE-Puffer	2 Stunden	T3 2h
„Komp.-IVT-RNA“	Z3	Zinkchlorid	2 Stunden	Z3 2h
„Komp.-IVT-RNA“	H5	Wasser	1 Stunde	H5 1h
„Komp.-IVT-RNA“	T5	1xTBE-Puffer	1 Stunde	T5 1h
„Komp.-IVT-RNA“	Z5	Zinkchlorid	1 Stunde	Z5 1h
„Komp.-IVT-RNA“	H5	Wasser	2 Stunden	H5 2h

Es lässt sich ein ähnlicher Trend zu den Ergebnissen der reduzierten Form der RNase beobachten (Abbildung 4-58). Im Reaktionsmedium Zinkchlorid ist die Enzymaktivität offensichtlich gehemmt. Dies liegt sehr wahrscheinlich an der Koordination des Zinks zum Zinkfingermotiv, wodurch nur das N-Terminale Cystein oxidiert werden kann. Somit sind, wie auch bei der vollständig reduzierten Form, die an der Hydrolyse beteiligten Imidazol-Ringe des Histidins blockiert und es kommt zum Verlust der Enzymaktivität. Leichte Degradierung der RNA lässt sich hingegen bei den Reaktionsansätzen in Wasser bzw. 1xTBE-Puffer beobachten. Die Degradierungseffizienz ist ähnlich schwach zur Effizienz der reduzierten Form. Es scheint somit der Abbau der RNA in irgendeiner Weise behindert zu werden.

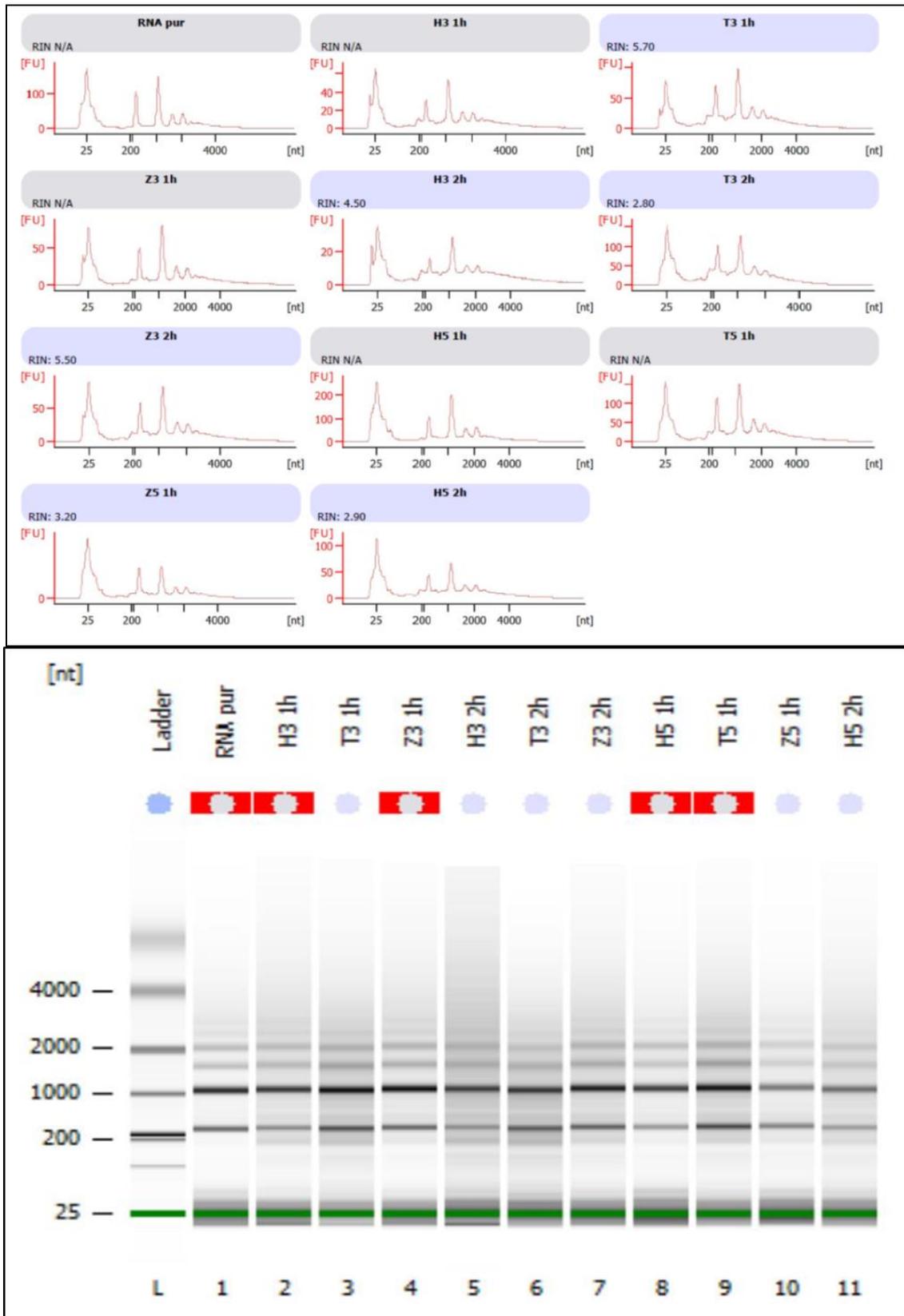


Abbildung 4-58: Analyse der RNA-Degradation mittels Agilent Bioanalyzer 2100; oben: Elektropherogramm; unten: Aus dem Elektropherogramm errechnete „Gel-Ansicht“.

Aufgrund des erneut geringen Abbaus der „Komp.-IVT-RNA“ wurde vermutet, dass durch Selbst-Hybridisierung der „Komp.-IVT-RNA“ zu Dimeren, Trimeren und Oligomeren eventuelle RNase-Schnittstellen blockiert sein könnten. Deshalb wurde in einem Kreuzexperiment einerseits die „Komp.-IVT-RNA“ mit RNase A (500facher Überschuss) und andererseits die RNase „Cys-ZFY-6“ im 100fachen molaren Überschuss mit *C.thummi*-Total-RNA inkubiert. Als Reaktionsmedium wurde jeweils der von Lima entwickelte Phosphatpuffer verwendet, jedoch zunächst ohne das Detergenz Nonidet-P (NP-40). Wie erwartet, degradiert die RNase A die „Komp.-IVT-RNA“ bereits nach einer Minute komplett (siehe Anhang Abb. A-19). Die *C.thummi*-Total-RNA wurde wiederum kaum durch die oxidierte RNase „Cys-ZFY-6“ (H5/T5/Z5) degradiert (Abbildung. 4-59).

Tabelle 4-16: Reaktionsparameter zur Degradierung der Total-RNA von *C. thummi* durch die unterschiedlich oxidierten RNasen „Cys-ZFY-6“ im Phosphatpuffer von Lima (ohne NP-40)

RNA:	RNase	Inkubationsdauer	Code
Total-RNA <i>C. thummi</i>	T05	½ Stunde	T ½
Total-RNA <i>C. thummi</i>	H05	½ Stunde	H ½
Total-RNA <i>C. thummi</i>	Z05	½ Stunde	Z ½
Total-RNA <i>C. thummi</i>	T05	1 Stunde	T1
Total-RNA <i>C. thummi</i>	H05	1 Stunde	H1
Total-RNA <i>C. thummi</i>	Z05	1 Stunde	Z1
Total-RNA <i>C. thummi</i>	T05	2 Stunden	T2
Total-RNA <i>C. thummi</i>	H05	2 Stunden	H2
Total-RNA <i>C. thummi</i>	Z05	2 Stunden	Z2
Total-RNA <i>C. thummi</i>	H05	3 Stunden	H3

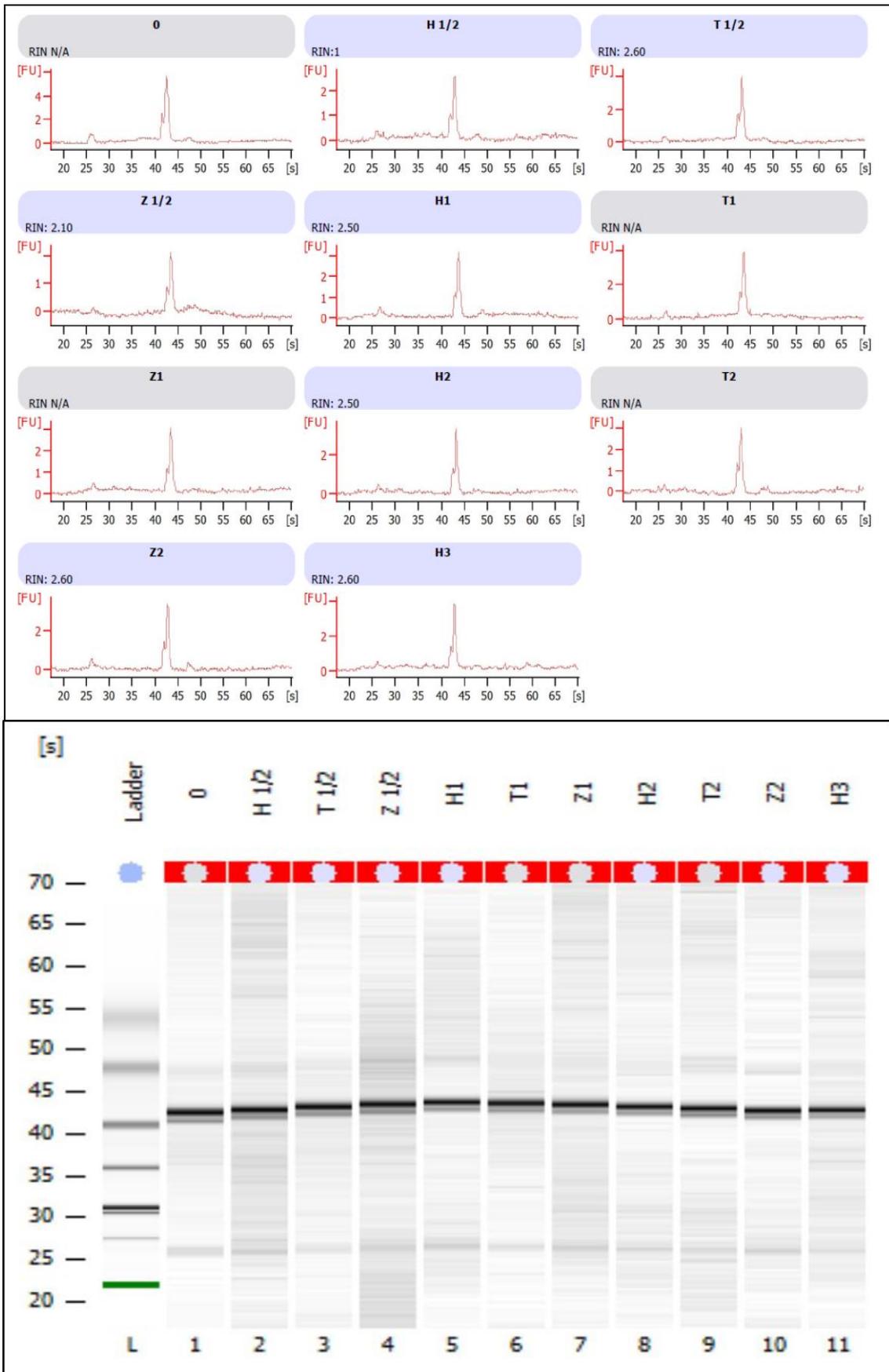


Abbildung 4-59: Analyse der RNA-Degradation mittels Agilent Bioanalyzer 2100; oben: Elektropherogramm; unten: Aus dem Elektropherogramm errechnete „Gel-Ansicht“.

Schließlich wurde der RNA-Verdau der Total-RNA von *C. thummi* im Phosphatpuffer mit NP-40 als Reaktionsmedium durchgeführt. Außerdem wurde im Gegensatz zu vorherigen Proben zu jedem Zeitpunkt eine Blindprobe ohne RNase-Zusatz inkubiert. Nachfolgende Tabelle 4-17 liefert eine Übersicht.

Tabelle 4-17: Reaktionsparameter zur Degradierung der Total-RNA von *C. thummi* durch die oxidiert RNase H05 im Phosphatpuffer (nach Lima)

RNA:	RNase	Inkubationsdauer	Beschriftung
<i>Total-RNA C. thummi</i>	H05	1 Stunde	1 RNase
<i>Total-RNA C. thummi</i>	Blindprobe	1 Stunde	2
<i>Total-RNA C. thummi</i>	H05	3 Stunden	3 RNase
<i>Total-RNA C. thummi</i>	Blindprobe	3 Stunden	4
<i>Total-RNA C. thummi</i>	H05	5 Stunden	5 RNase
<i>Total-RNA C. thummi</i>	Blindprobe	5 Stunden	6
<i>Total-RNA C. thummi</i>	H05	7 Stunden	7 RNase
<i>Total-RNA C. thummi</i>	Blindprobe	7 Stunden	8
<i>Total-RNA C. thummi</i>	H05	Über Nacht	9 RNase
<i>Total-RNA C. thummi</i>	Blindprobe	Über Nacht	10

Die Reaktionsprodukte des RNA-Verdau wurden zunächst über ein 1,2%iges, denaturierendes RNA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 4-60). Dabei sind in den geradzahigen Spuren die Blindproben für die jeweiligen Zeitabstände bzw. in Spur 0 die unbehandelte RNA zum Zeitpunkt $t=0$ aufgetragen. Die Spuren mit RNase-Zusatz zeigen bereits nach einer Stunde (Spur 1RNase) einen Verdau an RNA. Nach sieben Stunden (Spur 7RNase) scheint der Großteil der RNA degradiert zu sein. In Spur 8 ist die RNA ohne RNase-Zusatz für sieben Stunden inkubiert worden. Auch hier ist auf der Höhe der RNA (vergleiche mit Spur 1) nahezu keine RNA-Edukt-Bande mehr zu erkennen, d.h. allein durch die lange Inkubationsdauer hat hier ein gewisser Abbau der RNA stattgefunden. Generell ist anzumerken, dass die Enzymaktivität bzw. die Enzymkinetik der RNase „Cys-ZFY-6“ im Vergleich zur RNase A extrem gering ist. Daher ist auch schwer zwischen unspezifischen Abbau aufgrund der langen Inkubationszeit (z.B. durch kontaminierende RNasen) oder einem spezifischen, auf den Zusatz an RNase „Cys-ZFY-6“ zurückzuführenden Abbau, zu differenzieren.

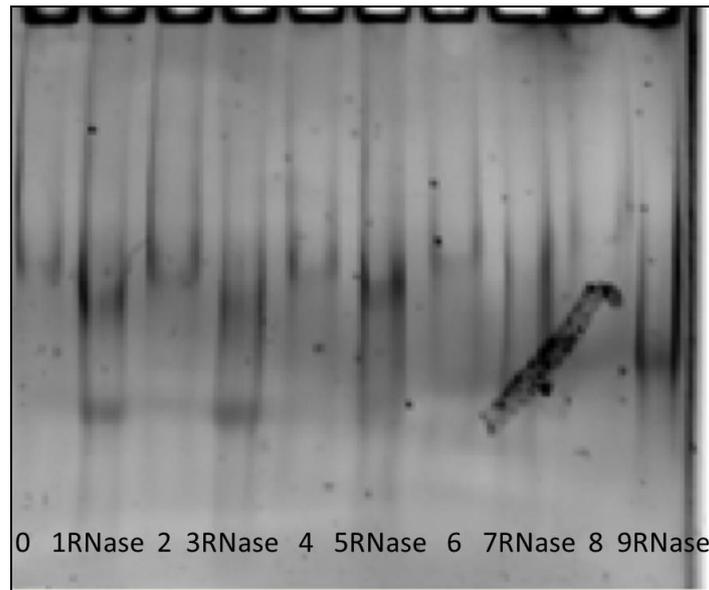


Abbildung 4-60: Elektrophoretisch Auftrennung der Reaktionsprodukte (Tabelle 4-17) auf einem 1,2%igen, denaturierenden Agarose-RNA-Gel

Zur Überprüfung bzw. zur Bestätigung der Ergebnisse der elektrophoretischen Analyse mittels 1,2%igen, denaturierenden RNA-Gel wurden die gleichen Proben mit Agilent Bioanalyzer 2100 analysiert (Abbildung 4-61). Auch hier zeigt sich der Trend, dass eine Stunde nach RNase-Zugabe ein Abbau (Probe 1RNase) erkennbar ist. Allerdings ist, wie im RNA-Gel-Bild bereits angedeutet, in den nächsten sechs Stunden (Probe 7RNase) keine deutliche Zunahme der RNA-Abbauprodukte zu beobachten. Vergleicht man beide Elektropherogramme der Proben 1RNase und 7RNase, so scheint nach einer Stunde ein stärkerer Abbau sichtbar zu sein als nach sieben Stunden. Lediglich bei einer Inkubation der Proben über Nacht (ca. 24 Stunden) mit RNase „Cys-ZFY-6“ ist der RNA-Edukt-Peak vollständig verschwunden. Jedoch ist auch dieser bei der Inkubation über Nacht ohne RNase-Zusatz deutlich geschwunden.

Beide Analysemethoden (RNA-Gelelektrophorese und Bioanalyzer) zeigen den gleichen Trend. Es findet ein gewisser Abbau der Edukt-RNA statt, allerdings extrem langsam, wobei nicht exakt differenziert werden kann, ob der RNA-Abbau tatsächlich nur durch die Zugabe der RNase bedingt ist.

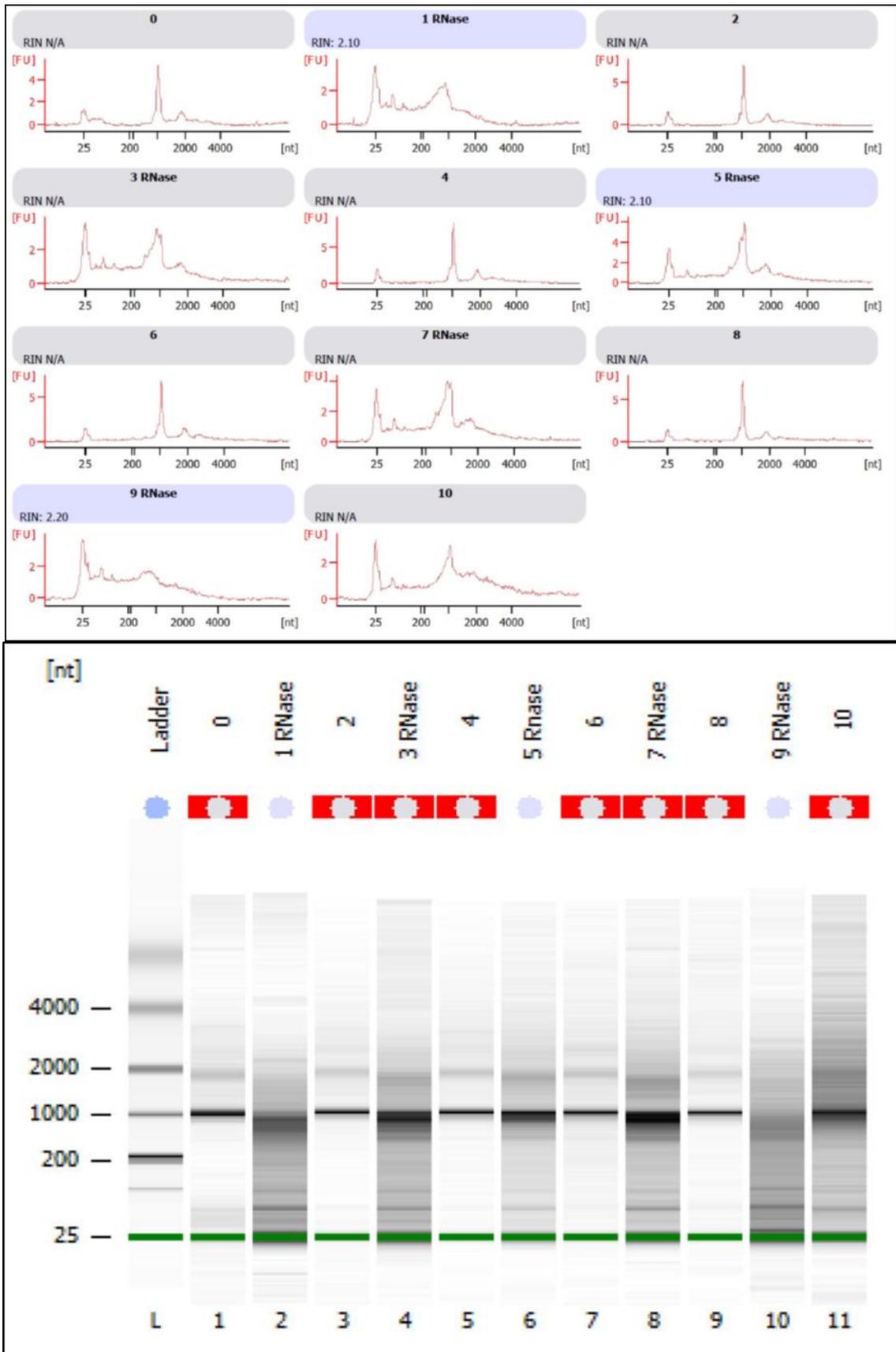


Abbildung 4-61: Analyse der RNA-Degradation mittels Agilent Bioanalyzer 2100; oben: Elektropherogramm; unten: Aus dem Elektropherogramm errechnete „Gel-Ansicht“.

Zusammenfassung Enzymaktivität der RNase:

- Die blockierte RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ zeigt keine Enzymaktivität.
- Die reduzierte RNase „Cys-ZFY-6“ zeigt minimale Enzymaktivität in den entsprechenden Reaktionsmedien (am besten in 1xTBE-Puffer). Zink-Ionen hingegen inhibieren sämtliche Enzymaktivitäten durch Ausbildung des Zinkfingermotivs.
- Die oxidierte RNase „Cys-ZFY-6“ zeigt ebenfalls marginale Enzymaktivität in den entsprechenden Reaktionsmedien (Phosphatpuffer nach Lima).
- Für beide Oxidationsstufen ist jedoch anzumerken, dass die RNase-Aktivität extrem gering ist. Erst nach einigen Stunden lässt sich ein gewisser, jedoch kein absoluter Abbau der RNA beobachten. Möglicherweise ist die Modifizierung am N-Terminus der RNase ZFY-6 durch das zusätzliche Cystein für die Erniedrigung der Enzymaktivität verantwortlich. Dadurch könnten eventuell Fehlfaltungen oder Strukturen mit einer gewissen sterischen Hinderung zum Reaktionsort entstehen, die anschließend nicht mehr in der Lage sind, effizient RNA zu degradieren.

4.3.2.3 ODN-RNase-Konjugat

Wie in den vorherigen Kapiteln bereits beschrieben, ist die Aktivität der RNase „Cys-ZFY-6“ außerordentlich gering. Es bestand trotzdem die Hoffnung, dass durch die Anbindung an das 46-basenlange ODN und anschließender Hybridisierung an die „Target-IVT-RNA“ sich ein spezifischer Abbau aufgrund der lokal erhöhten Konzentration der RNase (Proximitätseffekt) nachweisen lässt. Die ersten Experimente fanden dabei in einem Reaktionsgefäß mit Zinkchlorid als Reaktionsmedium statt, aus dem nach bestimmten Zeitintervallen jeweils Teile entnommen und auf Abbau von RNA geprüft wurden (sog. „Probenziehen“). Dabei wurde in einem Teil der Experimente versucht, eine Prä-Hybridisierung des ODN-RNase-Konjugat bei 4°C an die RNA zu erreichen. Jedoch zeigten weder die „Target-IVT-RNA“ noch die „Komp.-IVT-RNA“ einen Abbau (siehe Anhang Abb. A-21 und A-22). Dies ist insofern nicht überraschend, da die nicht ans ODN gebundene, freie RNase „Cys-ZFY-6“ in Zinkchlorid auch nur marginalen RNA Abbau zeigt. Grund hierfür ist wie vorher beschrieben die Koordination des Zn²⁺ an die Cysteine und Histidine, was zu durch deren Blockierung zu einem Verlust der Enzymaktivität führen könnte. Deshalb wurde in folgenden Experimenten auf eine Verwendung des Phosphatpuffers (nach Lima) als Reaktionsmedium zurückgegriffen. Um Kontaminationen durch ubiquitär vorkommende RNasen durch ständiges Öffnung und Schließen der Reaktionsgefäße zu vermeiden, wurde für jeden Messpunkt ein separates Reaktionsgefäß genutzt. Das ODN-RNase-Konjugat wurde äquimolar und semi-äquimolar mit der „Target-IVT-RNA“ für 1, 3, 5, 7 Stunden sowie über Nacht inkubiert. Ferner wurde als Blindprobenkontrolle die „Target-IVT-RNA“ ohne ODN-RNase-Konjugat für den gleichen Zeitraum inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte zunächst mit Hilfe eines 1%igen, denaturierenden RNA-MIDI-Gel (Abb. 4-58). In Tabelle 4-18 findet sich eine Übersicht über die unterschiedlichen Reaktionsansätze und deren Codierung.

Tabelle 4-18: Übersicht über die unterschiedlichen Reaktionsparameter für den Abbau der „Target-IVT-RNA“ durch das ODN-RNase-Konjugat

RNA-Matrize	Molverhältnis $n_{\text{RNA}}:n_{\text{Konjugat}}$	Inkubationszeit	Beschriftung
„Target-IVT-RNA“	1:1	0 Minuten	1.0
„Target-IVT-RNA“	1:1	1 Stunde	1.1
„Target-IVT-RNA“	1:1	3 Stunden	1.3
„Target-IVT-RNA“	1:1	5 Stunden	1.5
„Target-IVT-RNA“	1:1	7 Stunden	1.7
„Target-IVT-RNA“	1:1	Über Nacht	1 üN
„Target-IVT-RNA“	2:1	0 Minuten	2.0
„Target-IVT-RNA“	2:1	1 Stunde	2.1
„Target-IVT-RNA“	2:1	3 Stunden	2.3
„Target-IVT-RNA“	2:1	5 Stunden	2.5
„Target-IVT-RNA“	2:1	7 Stunden	2.7
„Target-IVT-RNA“	2:1	Über Nacht	2 üN
„Target-IVT-RNA“	-	0 Minuten	3.0
„Target-IVT-RNA“	-	1 Stunde	3.1
„Target-IVT-RNA“	-	3 Stunden	3.3
„Target-IVT-RNA“	-	5 Stunden	3.5
„Target-IVT-RNA“	-	7 Stunden	3.7
„Target-IVT-RNA“	-	Über Nacht	3 üN

Bei Betrachtung der Reaktionsprodukte des Verdauens der „Target-IVT-RNA“ sind vor allem die Proben 1.7, 2.7 und 3.7 bzw. die jeweilig über Nacht inkubierten Proben 1üN, 2üN und 3üN von Interesse (Abbildung 4-62). Bei kürzeren Inkubationszeiten ist kaum ein Abbau der RNA erkennbar. Nach sieben Stunden allerdings ist deutlich das Auftreten einer Bande (mögliches spezifisches Abbauprodukt) mit der höchsten Ionenwanderungsgeschwindigkeit unterhalb der RNA-Edukt-Bande zu erkennen, die dagegen erwartungsgemäß bei der Kontroll-Probe 3.7 (ohne Zusatz an ODN-RNase-Konjugat) vollkommen fehlt. Dies könnte auf einen spezifischen Abbau der Edukt-RNA nach sieben Stunden hindeuten. Bei Betrachtung der Spuren der Reaktionsprodukte, die über Nacht inkubiert wurden (1üN, 2üN, 3üN), wird diese Bande zudem deutlich stärker und die RNA-Edukt-Banden (ds-RNA und ss-RNA) verschwinden nahezu komplett. In Spur 3üN ist die Edukt-RNA allerdings vollständig degradiert.

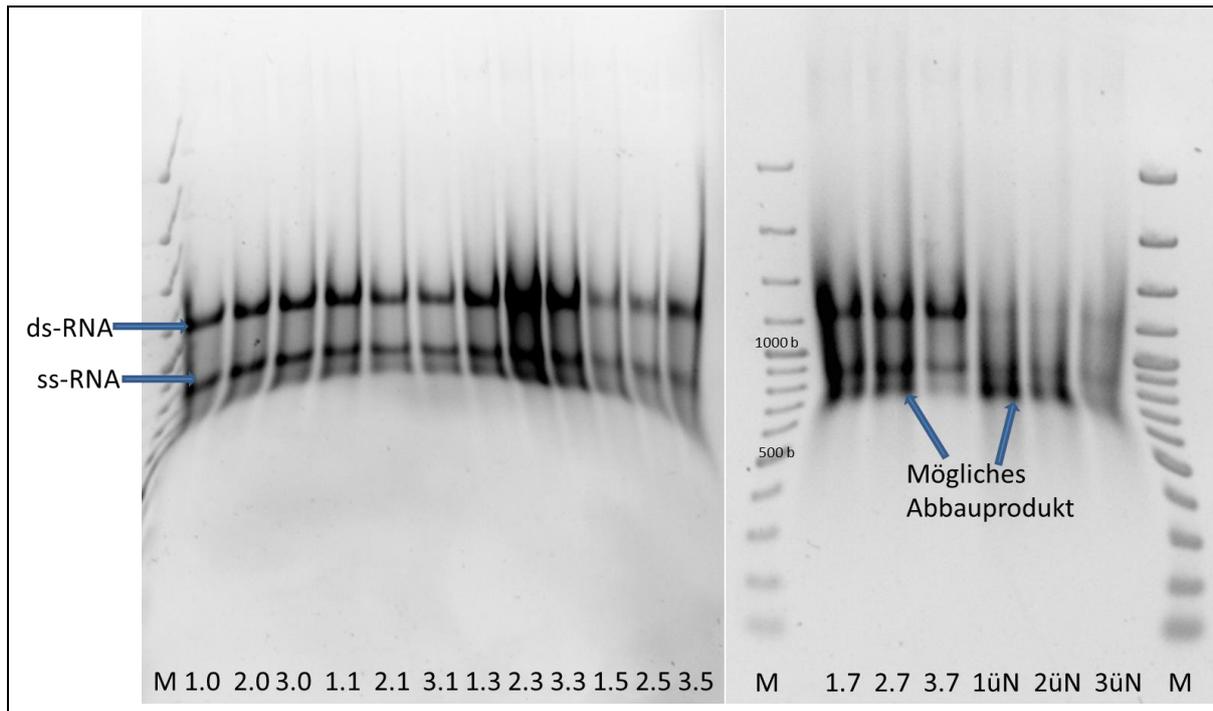


Abbildung 4-62: Elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte (Tab. 4-18) auf 1%igen, denaturierenden Agarose-RNA-Gelen

Um die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese zu bestätigen, wurden die Proben mit Hilfe des Bioanalyzer 2100 von Agilent vermessen (Abbildung 4-63 und Abbildung 4-64). Überraschenderweise ist hier eine Degradierung der Probe 3üN nicht zu erkennen. Vermutlich ist es während der Beladung der Taschen bei der Agarose-Gelelektrophorese zu einer Kontamination mit ubiquitär vorkommenden RNasen gekommen, die für die Degradierung der RNA verantwortlichen sind. Ferner ist im Vergleich zur elektrophoretischen Analyse (Abb. 4-62) keine Degradation der RNA ersichtlich. Auch das Auftreten einer zusätzlichen Bande nach 7 Stunden bzw. über Nacht ist in den Elektropherogrammen des Bioanalyzer 2100 nur ganz leicht zu erkennen. Somit ist bei Betrachtung beider Analysemethoden erneut keine eindeutige Aussage bezüglich des spezifischen RNA-Abbaus aufgrund der Anwesenheit des ODN-RNase-Konjugats möglich. Betrachtet man hingegen lediglich die Analyse mittels Gelelektrophorese (Abb. 4-62) so könnte man aufgrund des Auftretens einer einzigen Bande einen möglichen spezifischen Abbau der RNA vermuten.

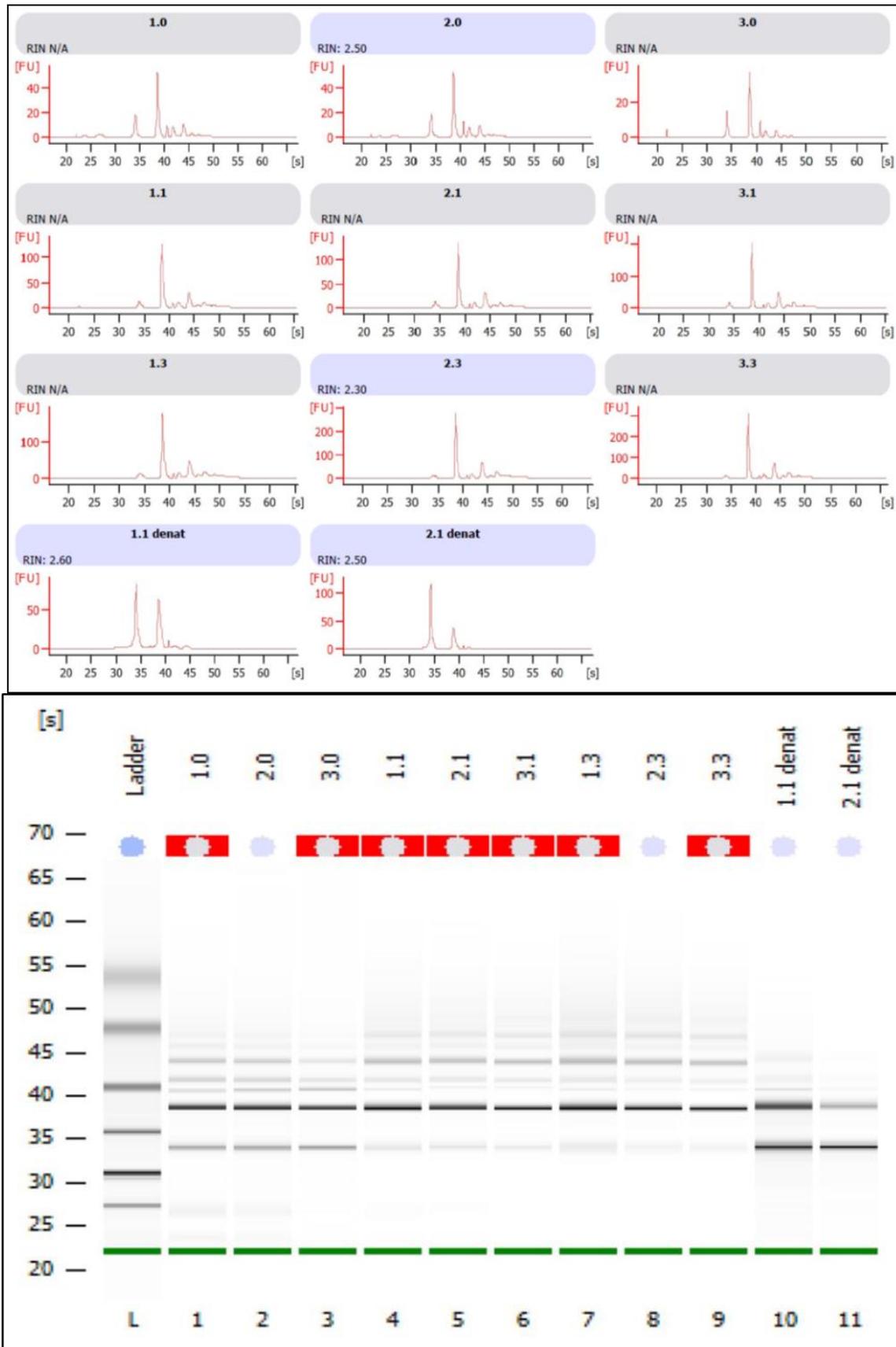


Abbildung 4-63: Analyse der RNA-Degradation mittels Agilent Bioanalyzer 2100; oben: Elektropherogramm; unten: Aus dem Elektropherogramm errechnete „Gel-Ansicht“.

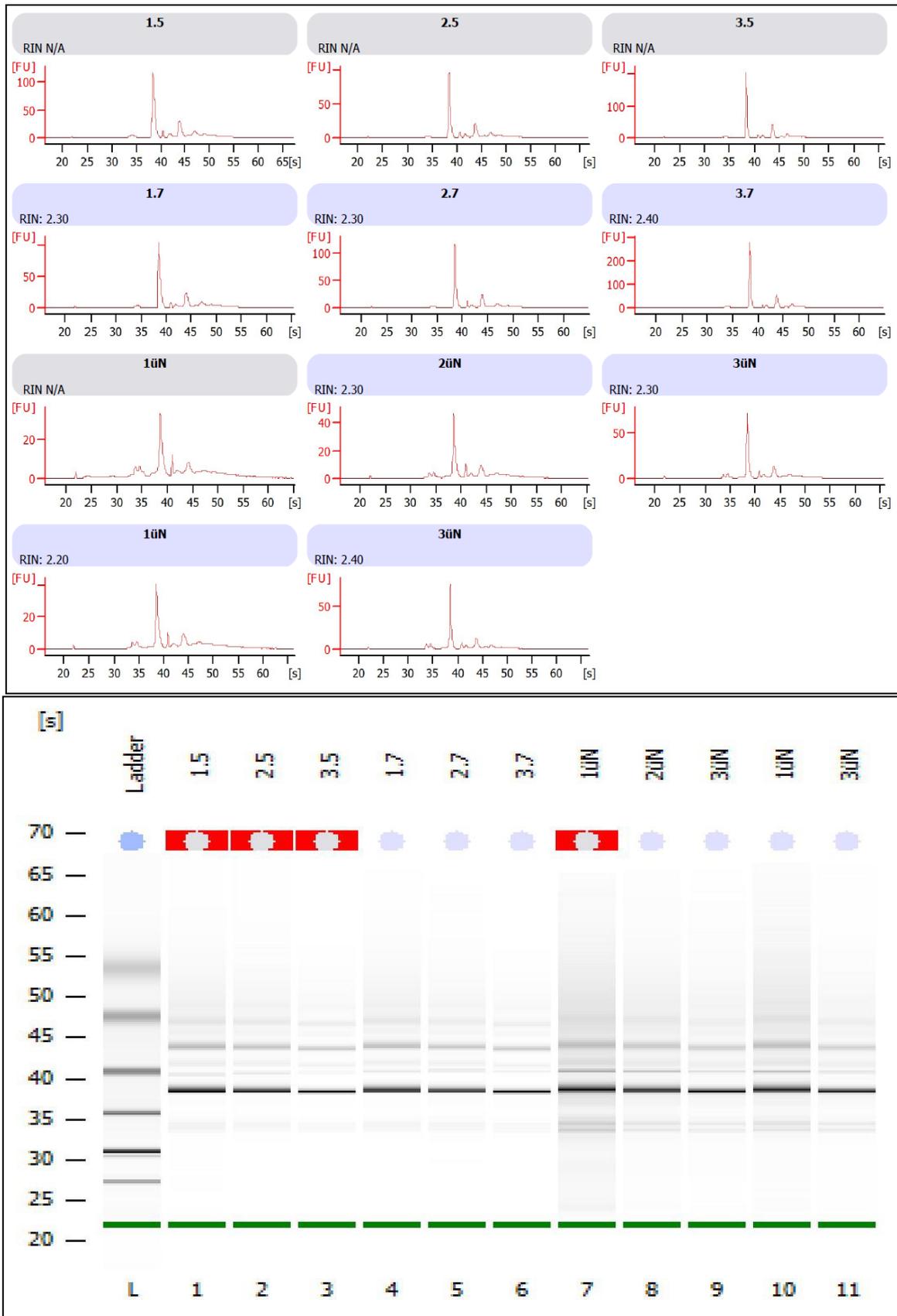


Abbildung 4-64: Analyse der RNA-Degradation mittels Agilent Bioanalyzer 2100; oben: Elektropherogramm; unten: Aus dem Elektropherogramm errechnete „Gel-Ansicht“.

Als abschließendes Experiment zur Untersuchung der Enzymaktivität des ODN-RNase-Konjugats wurde die RNA-Matrize („Target-IVT-RNA“) vor ihrer Degradierung durch das ODN-RNase-Konjugat an ihrem 5'-Ende radioaktiv markiert. Dabei wird die RNA zuerst am 5'-Ende durch eine Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wird das erhaltene 5'-OH durch die T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK) phosphoryliert, wobei der zugegebene Phosphordonorator in Form von γ - ^{32}P -ATP radioaktiv ist. Damit können mittels Autoradiografie selektiv nur jene RNA-Abschnitte dargestellt werden, die das radioaktive 5'-Phosphat tragen. Schematisch ist dies in Abbildung 4-65 dargestellt.

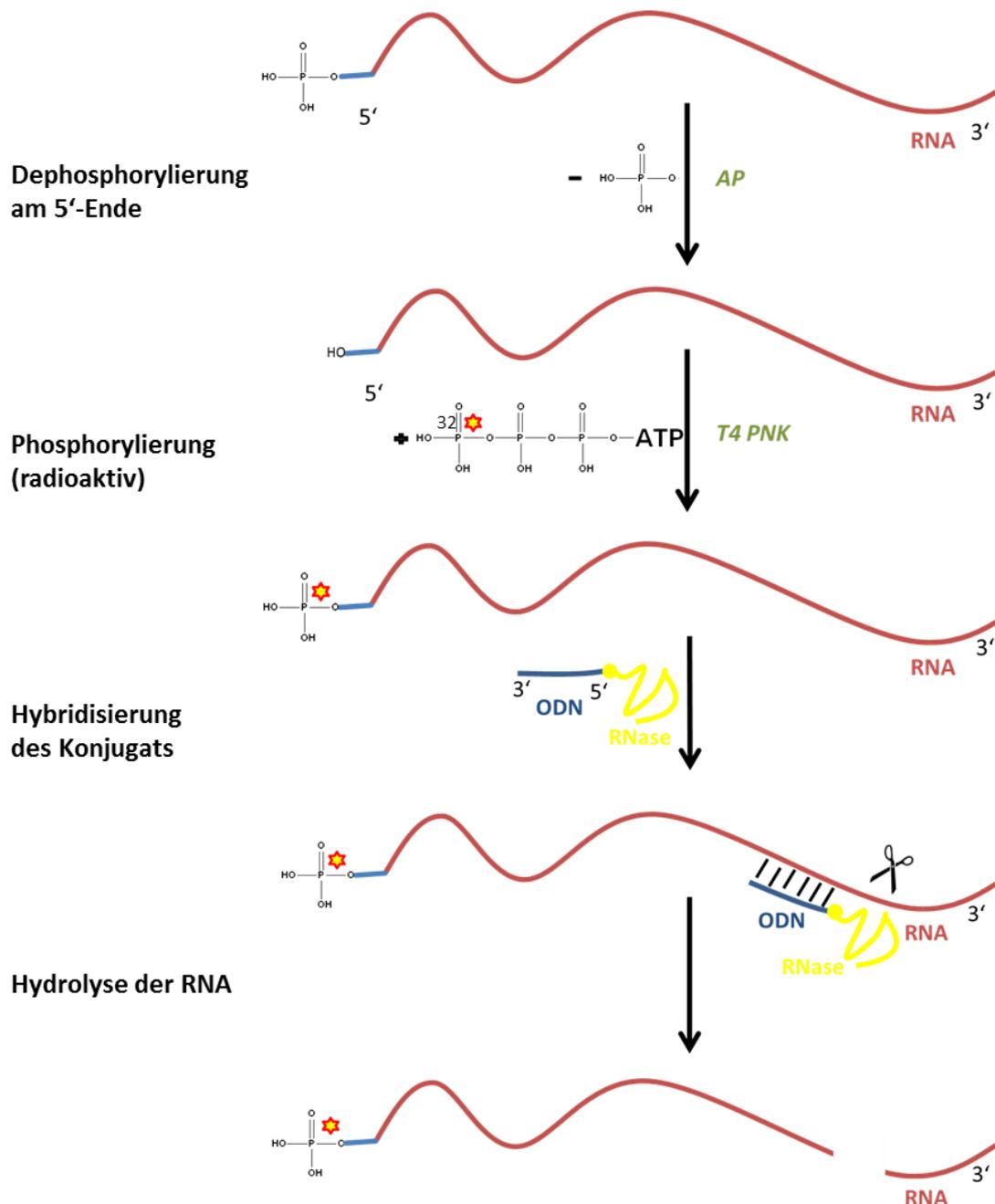


Abbildung 4-65: Schematische Darstellung der radioaktiven Markierung des 5'-Endes der RNA und anschließende Hydrolyse durch das ODN-RNase-Konjugat.

Die Inkubationszeiten sind in der nachfolgenden Tabelle 4-19 übersichtlich dargestellt. Als Blindprobenkontrolle wurde die radioaktive „*Target-IVT-RNA“ auch ohne Konjugatzusatz entsprechend inkubiert.

Tabelle 4-19: Übersicht über die verschiedenen Reaktionsansätze zur Degradierung der radioaktiven „*Target-IVT-RNA“

RNA (radioaktiv)	$n_{\text{RNA}}=n_{\text{Konjugat}}$	Inkubationszeit	Beschriftung
„*Target-IVT-RNA“	1:1	1 Stunde	1h
„*Target-IVT-RNA“	1:1	3 Stunden	3h
„*Target-IVT-RNA“	1:1	5 Stunden	5h
„*Target-IVT-RNA“	1:1	7 Stunden	7h
„*Target-IVT-RNA“	1:1	Über Nacht	üN
„*Target-IVT-RNA“	-	0 Minuten	0hB
„*Target-IVT-RNA“	-	5 Stunden	5hB
„*Target-IVT-RNA“	-	7 Stunden	7hB
„*Target-IVT-RNA“	-	Über Nacht	üNB

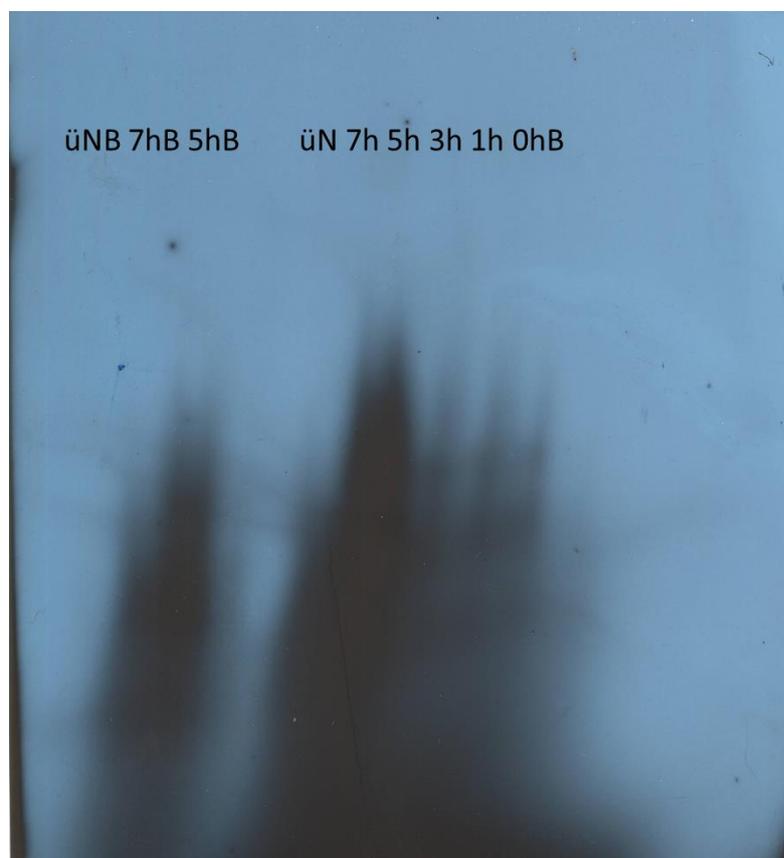


Abbildung 4-66: Autoradiogramm (dreistündige Expositionsdauer) der unterschiedlichen Degradierungsansätze (Tab. 4-19)

Da bereits die Blindprobe zum Zeitpunkt $t=0$ (Spur 0hB), erkennbar an der breit verschmierten Elution im Gel, einen gewissen RNA-Verdau zeigte, können die Einflüsse bei zusätzlicher Anwesenheit des ODN-RNase-Konjugats nicht diskutiert werden (Abbildung 4-66). Ursache für die sehr breite Fragmentverteilung war vermutlich ein bereits teilweiser Abbau während der Dephosphorylierung und radioaktiven Rephosphorylierung. Dies führt schließlich dazu, dass die 5'-Markierung sowohl am kompletten RNA-Strang als auch an bereits degradierten Fragmenten wirksam wurde. Folglich kann nicht mehr zwischen vorheriger Degradation und spezifischer Degradation durch das ODN-RNase-Konjugat freigesetzten radioaktiven Fragmenten unterschieden werden.

Zusammenfassung Prüfung der Enzymaktivität:

- Die freie, nicht an ODN-gebundene RNase „Cys-ZFY-6“ zeigte unter verschiedenen Reaktionsbedingungen bereits nur marginale Enzymaktivität. Im Vergleich zu hochaktiven RNasen wie z.B. RNase A ist die Enzymaktivität praktisch nicht bestimmbar.
- Das ODN-RNase-Konjugat konnte ebenfalls nicht effizient und eindeutig RNA spezifisch schneiden. Es kann nicht zwischen spontaner Degradation der RNA einerseits und durch den Einfluss der ODN-RNase andererseits während langer Inkubationszeiten unterschieden werden.

Literatur Kapitel 4:

- [1] Andreas Böckler, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, **2011**.
- [2] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [3] Prof. Stephen Kent, "Protocol Native Chemical Ligation", can be found under [http://kentlab.uchicago.edu/videos%20files/NCL%20Protocol%20\(Kalyan%20+%20Steve%20edited\).doc](http://kentlab.uchicago.edu/videos%20files/NCL%20Protocol%20(Kalyan%20+%20Steve%20edited).doc).
- [4] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640–6646.
- [5] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J AM CHEM SOC* **1999**, 121, 11684–11689.
- [6] Tina Kiefer, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz **2010**.
- [7] Nils Heimann, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz **2009**.
- [8] Millipore, *Centricon Plus-70*, can be found under [http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/e2d4b0e139a5e2718525777b00539487/\\$FILE/PR03221.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/e2d4b0e139a5e2718525777b00539487/$FILE/PR03221.pdf).
- [9] W. F. a. C. S. T. Lima, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 10010–10015.
- [10] BioRad, *Bio Spin-P6 Säulen*, can be found under <http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT-507G.pdf>.
- [11] Agilent Ruby Stain, can be found under <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp12000.pdf>.
- [12] Spektrum Akademischer Verlag (Ed.) *Biochemie Stryer*.
- [13] Spektrum Akademischer Verlag (Ed.) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, Heidelberg, **2008**.
- [14] peqLAB Plasmid MiniPrep, can be found under http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6942-01_m.pdf.
- [15] pGEM Promotor MCS Sequenz, can be found under <https://www.promega.de/~-/media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/pGEM-T%20and%20pGEM-T%20Easy%20Vector%20Systems%20Protocol.pdf>.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte das ODN-RNase-Konjugat erfolgreich durch die Verwendung der nativen chemischen Ligation (NCL) als Konjugationsmethode dargestellt werden. Die NCL weist dabei eine hohe Chemo- und Regioselektivität auf, so dass keine Nebenprodukte durch Reaktionen anderer funktioneller Aminosäureseitenketten erhalten wurden. Die zu Beginn der Arbeit geringen Ausbeuten (Vorschrift nach Kent) konnten durch sukzessive Variation der Reaktionsbedingungen optimiert werden. Dabei ist die Darstellung des trägergebundenen ODN-Benzylthioesters (vgl. Abb.4-1) sowie die generelle Reaktionsabfolge auf einem festen Trägersystem (CPG) eine bis dato noch nicht publizierte Methode Biomakromoleküle über die NCL miteinander zu verknüpfen. Das Reaktionsgemisch, bestehend aus DNA (Edukt) und DNA-RNase-Konjugat (Produkt), konnte im Weiteren durch den Einsatz der präparativen Gelelektrophorese von einander getrennt werden. Zudem konnte das ODN-RNase-Konjugat durch eine Reihe an Charakterisierungsmethoden wie GPC, CE, MALDI-TOF-MS bzw. selektiven Färbemethoden (SYPRO® Ruby Stain) als monodisperses Produkt nachgewiesen werden. Zusammenfassend war die Synthese und Charakterisierung des ODN-RNase Hybridpolymers erfolgreich.

Zur gentechnologischen Anwendung dieses biologischen Hybridpolymers musste zunächst die Synthese der „Target-IVT-RNA“ erfolgen, welche zur Hybridisierung des ODN-RNase-Konjugats eine komplementäre Nukleotidsequenz aufweist. Hier konnte durch den Einsatz von gentechnologischen Standardmethoden, wie PCR, Ligation in den Vektor pGEM®-T Easy, Transformation in elektrokompente Zellen und abschließender *in vitro* Transkription, die „Target-IVT-RNA“ sowie dessen komplementäres Pendant „Komp.-IVT-RNA“ synthetisiert werden. Somit wurden alle benötigten Komponenten zur Verifizierung des Konzepts (Abb. 2-1) dargestellt. Zudem konnte eine selektive und spezifische Hybridisierung des ODN-RNase-Konjugats an die gewünschte Stelle der „Target-IVT-RNA“ durch radioaktive cDNA-Synthese nachgewiesen werden. Die Prüfung der Enzymaktivität der RNase ZFY-6 erwies sich dagegen als weniger erfolgreich. Es konnte lediglich eine geringe Enzymaktivität in mehreren unterschiedlichen Reaktionsmedien für die durch ein zusätzliches Cystein am N-Terminus (essentiell für die NCL) modifizierte RNase ZFY-6 festgestellt werden. Dies steht im Widerspruch zu der von Walt F. Lima^[1] als hocheffiziente Endonuklease beschriebene RNase ZFY-6. Durch die Hybridisierung des ODN-RNase-Konjugats an die „Target-IVT-RNA“ kam es nicht zu der erhofften Steigerung der

Enzymaktivität aufgrund der lokal erhöhten Enzymkonzentration und der räumlichen Nähe (Proximitätseffekt^[2]) zur gewünschten Schnittstelle. Eine Unterscheidung des RNA-Verdaus aufgrund der langen Inkubationszeiten (Selbstdegradation oder Degradation durch kontaminierende RNasen) und/oder der Anwesenheit des ODN-RNase-Konjugats war nur schwer möglich.

5.2 Ausblick

Die Grundlagen zur Prüfung des Konzepts wurden durch die Etablierung einer gut funktionierenden ODN-RNase-Synthese sowie der Nachweis der selektiven und spezifischen Hybridisierung des ODN-RNase-Konjugats an die komplementäre RNA bereits geliefert. Zur letztendlichen Überprüfung dieses Konzepts ist die Auswahl und Verwendung einer hocheffizienten RNase von entscheidender Bedeutung, um ss-RNA effizient und schnell zu degradieren. Vorteilhaft wäre zudem eine fehlende Enzymaktivität im Hinblick auf ss-DNA, um eine Selbstdegradierung des ODN-RNase-Konjugats zu vermeiden. Außerdem wäre aus synthetischer Sicht ein kurzkettiges Peptid (max. 30 AS) – am besten ohne weitere Cysteine, die zur disulfidischen Dimerbildung neigen - wünschenswert. Das synthetische Peptid NH₂-Gly-[ArgLeu]₄-COOH^[3] wäre ein potentieller Kandidat, der beide Vorteile vereinen und nachgewiesene RNase-Aktivität zeigen würde. Im Allgemeinen ist das Konzept flexibel und anpassungsfähig, so dass auch nicht-peptidische Komponenten, wie z.B. Imidazol-Gruppen^[4], die in der Lage sind spezifisch ss-RNA zu degradieren, als Kopplungsreagenzien für das ODN-Konstrukt in Betracht kommen. Die Attraktivität dieses Konzepts wurde bereits im Kapitel „Motivation“ diskutiert und in Anbetracht der Vielfältigkeit möglicher medizinischer, pharmakologischer und therapeutischer Anwendungen scheint dieses Ziel immer noch sehr lohnenswert.

Literatur in Kapitel 5:

- [1] W. F. a. C. S. T. Lima, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 10010–10015.
- [2] Uni Marburg Proximitätseffekt, can be found under <http://online-media.uni-marburg.de/chemie/bioorganic/bioorg/kapitel3.html?/chemie/bioorganic/bioorg/k3-03.html>.
- [3] N. L. Mironova, D. V. Pyshnyi, E. M. Ivanova, M. A. Zenkova, H. J. Gross, V. V. Vlassov, *Nucleic Acids Research* **2004**, 32, 1928–1936.
- [4] a) R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24, 317–324. b) V. V. Vlassov, G. Zuber, B. Felden, J.-P. Behr, R. Giegè, *Nucleic Acids Research* **1995**, 23, 3161–3167.

6 Experimenteller Teil

Bevor in diesem Kapitel auf die einzelnen Experimente eingegangen wird, sind zunächst die verwendeten Schlüsselsubstanzen und ihre jeweilige Sequenz aufgelistet

a) Oligodesoxynukleotid (ODN)

Der CPG-ODN-NHS-Ester wurde von der Firma [REDACTED] über eine Festphasensynthese synthetisiert deren Reaktionszyklus in Kapitel 3.1.1 dargestellt ist. Die Nukleotidsequenz des 46-basenlangen Oligodesoxynukleotids ist wie folgt, wobei der NHS-Ester am 5'-Ende sitzt.

5'-TGC-GCC-CTC-GGC-GGA-CTG-GAG-AGG-CCT-CGG-GAT-CCC-ACC-TCG-GGC-C-3'.

b) RNase

Die zu Beginn der Arbeit verwendete RNase wurde von Bachem über die sogenannte „Solid Phase Peptide Synthesis“ (SPPS) dargestellt und war zunächst an beiden Cysteinen über eine Acetoamidomethylschutzgruppe (Acm) geschützt. Aus Kostengründen wurde die ungeschützte RNase später von der Firma Panatecs dargestellt. Die Aminosäuresequenz der aus 31-Aminosäuren bestehende RNase ist im Folgenden dargestellt:

H-Cys-Lys-Thr-Tyr-Gln-Cys-Gln-Tyr-Cys-Glu-Tyr-Arg-Ser-Ala-Asp-Ser-Ser-Asn-Leu-Lys-Thr-His-Ile-Lys-Thr-Lys-His-Ser-Lys-Glu-Lys-OH

c) RNA

Die RNA wurde wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben über gentechnische Methoden dargestellt.

Dabei wurde in den Vektor pGEM®-T Easy folgende DNA-Sequenz (NB43), aus welcher die RNA anschließend über *in vitro* Transkription synthetisiert wird, einkloniert. Die Richtigkeit des DNA-Integrats wurde durch eine DNA-Sequenzanalyse der Firma StarSeq bestätigt.

GGGTATACTATAGGGCGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGC
CGCGGGAATTCGATTGGGAACTTCGGAGGGAACCAGCTACTAGATGGTTTCGATTAGT
CTTTCGCCCCTATACCCAGGTCGGACGACCGATTTGCACGTCAGGACCGCTACGGACC
TCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCGCCCTGCCAGGCATAGTTCACCATCTTTCGGGTC
CTAACGCGTACGCTCGTGCTCCACCTCCCCGGCGCGGGCGGAGACGGGCCGGTG
GTGCGCCCTCGGCGGACTGGAGAGGCCTCGGGATCCCACCTCGGGCCCCCGGGCGG
GGCCCTTCACCTTCATTGCGCCACGGCGGCTTTCGGACGAGCCCCTGACTCGCGCACG
CGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCCGGTGGGTAGCCGACATCGCCGC
CGACCCCGTGCGCTCGGCTTCGTGCGGAGACGCGTGACCGACGGTCCCCCGGGACC
CGACGGCGCGACGACGCCGGGGCGCACTGGGGACAGTCCGCCCCGCCCCCCACCG
GGCCCCGAGAGAGGCGACGGAGGGGGGGTGGGAGAGCGGTTCGCGCCGTGGGAGGG
GCGGCCCGGCCCCACCCACGCCAGCCGGGAGGCGGACGGGGGGAGAGAGAGA
GCGCGGCGACGGGTATCTGGCTTCCTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGT
CGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTC
ACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC
TCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGGTGCCTA
ATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAA
ACCTGTCGTGCCAGCTGCATAATGAATCGGCAACGCGCGGGGGAGAGGCGGTTTGCG
TATTGGGCGCTCTCGCTTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGTTCGGCTGCG
GCGAGGCGTATCAGCTCACTCAAAGCGTTAATACGCTTATCCAAGGATCAGGATACGCA
GAAGAACATGGTGAGCCAGGCAGCAAAGCAGAACGTAAGCCGTGCTGGCATTCCAGGA
TCCGCCTCCTGACAGACTTCCATATGCGAGCTCAAGTCCAGGTTGCGA

6.1 Synthesen

6.1.1 Darstellung des ODN-RNase-Konjugats

6.1.1.1 Darstellung des CPG-ODN-Benzylthioesters

Die Synthese des CPG-ODN-Benzylthioesters erfolgte grundsätzlich in Gegenwart von 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) als Katalysator in Pyridin/Acetonitril (9:1 v/v) am Träger (CPG= controlled pore glass). Dazu wurden zumeist 10^{-6} mol CPG-ODN-NHS mit 1 mL Acetonitril/Pyridin (9:1 v/v), 0,1 mL Benzylmercaptan und 5 mg DMAP versetzt. Die Reaktionen fanden bei 40 °C in einem Eppendorf Thermomixer statt. Anschließend wurde das Produkt mehrmals mit jeweils 1 mL Dichlormethan, Methanol, Wasser, wieder mit Methanol und abschließend mit Diethylether am Träger gewaschen.

Tabelle 6-1: Ansatz zur Darstellung des ODN-Benzylthioesters mit DMAP als Katalysator

ANSATZ:	M (g/mol)	m (mg)	n (mol)	V (mL)	
CPG-ODN-NHS(46 Basen)	14480	14,5	$1,00 \cdot 10^{-6}$		
Benzylmercaptan	124,2	105	$8,05 \cdot 10^{-4}$	0,1	
Acetonitril/Pyridin				1,0	9:1v/v
DMAP (Kat.)	122,2	5,00	$4,00 \cdot 10^{-5}$		

Zur Optimierung der CPG-ODN-Benzylthioester-Synthese wurde je nach Projekt die Reaktionsdauer variiert.

6.1.1.2 Variation der Reaktionsbedingungen der Nativen Chemischen Ligation zur Optimierung der Ausbeute an ODN-RNase-Konjugats

Ein direkter Nachweis des primären CPG-ODN-Benzylthioesters ist aufgrund der Trägeranbindung des Biomakromoleküls nicht möglich. Deshalb muss anschließend über die Native Chemische Ligation (NCL) ein weiteres Biomakromolekül addiert werden. Hierzu diente die synthetische RNase ZFY-6, welche am N-Terminus mit einem zusätzlichen Cystein modifiziert wurde. Zu Beginn der Arbeit waren die beiden Cysteine an Stelle 6 und 9 mit einer Acetamidomethyl-Schutzgruppe (Acm) versehen. Im Folgenden soll die geschützte RNase mit „Cys-ZFY-6“-Acm“, die ungeschützte mit „Cys-ZFY-6“ bezeichnet werden. Nach abgeschlossener NCL, bei 40°C im Eppendorf Thermomixer, wurde der Überstand verworfen und der Träger zweimal mit MilliQ-Wasser gewaschen. Die Trägerabspaltung erfolgte im Anschluss immer mit 0,3 mL Ammoniak über Nacht bei 47°C. Der überschüssige Ammoniak wurde über einen Eppendorf Concentrator 5301 unter Vakuum bei 60 °C entfernt. Die Konjugate, welche nun im wässrigen Überstand solvatisiert vorliegen, wurden entnommen und die Konzentration mittels UV/Vis-Spektroskopie ($\lambda = 260\text{nm}$, $1 \text{ OD} = 37 \mu\text{g/mL}$) bestimmt. Zur elektrophoretischen Analyse wurden pro Probe ein Mikrogramm auf ein 20%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Bei diesen selbstgegossenen PAGE-Gelen dient immer 1xTBE-Puffer als Laufpuffer.

Weil eine Analyse über die erfolgreich Darstellung der ODN-RNase erst nach der dritten Stufe, der Trägerabspaltung in Ammoniak, möglich ist, sind in den nachkommenden Versuchsdurchführungen immer die Reaktionszeiten der ersten Stufe, der CPG-ODN-Benzylthioestersynthese, mit aufgeführt. Bei der zweiten Stufe, der NCL, wurden neben der Reaktionszeit folgende Reaktionsparameter variiert: Lösungsmittelzusammensetzung, Größe des Trägers (CPG), Konzentration, molares Verhältnis und die Anwesenheit von Reduktionsmitteln (TCEP).

6.1.1.2.1 Konjugation der blockierten RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ an einem Benzylthioester – Reaktionsbedingungen nach Kent

Man ließ die Reaktion in der von Prof. Dr. Stephen Kent (University of Chicago)^[1] entwickelten Stock Solution und NCL Buffer Solution reagieren. Die wässrige Lösung besteht aus 6 M Guanidin Hydrochlorid (GuHCl), 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) beziehungsweise aus 50 mM 4-Mercaptophenyllessigsäure (MPAA) und 20 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP).

Tabelle 6-2: Ansatz für 100 mL Stock Solution

ANSATZ:	M (g/mol)	m (g)	n (mol)
Dinatriumhydrogenphosphat	141,96	2,84	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Guanidin Hydrochlorid	95,53	57,4	$0,6 \cdot 10^{-2}$

Tabelle 6-3: Ansatz für 10 mL NCL Buffer Solution

ANSATZ:	M (g/mol)	m (mg)	n (mol)
Tris(2-carboxyethyl)phosphin	258,49	57,4	$2,0 \cdot 10^{-4}$
Mercaptophenyllessigsäure	168,21	84,2	$5,2 \cdot 10^{-4}$

Die Synthese des CPG-ODN-Benzylthioesters erfolgte analog zu 6.1.1.1. Die Reaktionszeit betrug in diesem Fall zwei Tage. Anschließend wurden die 10^{-6} mol CPG-ODN-Benzylthioester auf sechs Eppendorf Reaktionsgefäße (entspricht jeweils $1,66 \times 10^{-7}$ mol) mit jeweils 1,5 mL vorgelegter Stock Solution (pH=7,1) aufgeteilt. Als NCL-Reaktionspartner, welcher in der NCL Buffer Solution vorgelegt wurde, diente einerseits die 31-aminosäurenlange RNase (mit Acm-Schutzgruppen an Cys6 und Cys9) als auch ein 10-Peptid (H-Cys-Lys-Lys-Gly-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH). Jeweils 20 µL der beiden Peptide wurden zusammen mit den 1,5 mL des CPG-ODN-Benzylthioester für einen Tag, zwei Tage bzw. für drei Tage reagiert.

Tabelle 6-4: Ansatz zur Darstellung der beiden ODN-Peptid-Konjugate in Kent's NCL Puffer

ANSATZ:	M (g/mol)	m (mg)	n (mol)	Größe CPG (Angström)	Peptid-Konz.
CPG-ODN-Benzylthioester	14400	14,5	$1,0 \cdot 10^{-6}$	2000	
Cys-ZFY-6-Acm	3851	0,154	$4,0 \cdot 10^{-8}$		2 mM
10-Peptid	1034	0,362	$3,5 \cdot 10^{-7}$		17 mM

6.1.1.2.2 Untersuchung des Einflusses der Porengröße des Trägers

Die CPG-ODN-NHS-Ester mit unterschiedlicher Porengröße (2000 und 3000 Angström) wurden im 20-fachen Überschuss mit „Amino-Rhodamin“ (N-(6-Aminoethyl)rhodamin 6G-amide bis(trifluoroacetat)) für vier Wochen bei 40 Grad in Acetonitril im Eppendorf Thermomixer geschüttelt.

Tabelle 6-5: Variation der CPG-Trägergröße

ANSATZ:	M (g/mol)	m (mg)	n (mol)	Größe CPG (Angström)
CPG-ODN-NHS-Ester	14400	1,5	$1,0 \cdot 10^{-7}$	2000
CPG-ODN-NHS-Ester	14400	1,5	$1,0 \cdot 10^{-7}$	3000
„Amino-Rhodamin“	740,7	1,5	$2,0 \cdot 10^{-6}$	
Acetonitril	41,1	0,78		

6.1.1.2.3 Untersuchung des Einflusses des Reaktionsmediums, der Porengröße des Trägers und der Reaktionsdauer

In diesem Projekt wurde die Reaktionsdauer der CPG-ODN-Benzylthioestersynthese und die Reaktionsdauer der Nativen Chemischen Ligation (NCL) über mehrere Tage in unterschiedlichen Lösemitteln bei unterschiedlicher Größe des Trägers (CPG) variiert. Es wurde für die Synthese des CPG-ODN-Benzylthioesters, wie in 6.1.1.1. beschrieben, jeweils 10^{-6} mol CPG-ODN-NHS-Ester mit 0,1 mL Benzylmercaptan und DMAP in AcCN/Pyridin für einen, drei und sieben Tage reagiert. Nach abgeschlossener Reaktion wurden die jeweiligen 10^{-6} mol des CPG-ODN-Benzylthioesters auf 20 Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Dies entspricht 5×10^{-8} mol an CPG-ODN-Benzylthioester pro Eppendorf-Reaktionsgefäß. Jedes dieser Reaktionsgefäße wurde dann jeweils mit 5×10^{-8} mol Cys-ZFY6-Acm (mit Acm-Schutzgruppen an Cys6 und Cys9) äquimolar zur Reaktion gebracht. Ferner wurde bei den Lösemitteln das Verhältnis von wässriger Phase zu organischer Phase sukzessiv erhöht. Nach abgeschlossener Synthese der NCL wurde der Träger zweimal mit MilliQ-Wasser gewaschen. Die Trägerabspaltung erfolgte abschließend jeweils mit 0,3 mL konz. Ammoniak über Nacht bei 47°C. Die elektrophoretische Analyse wurde mit Hilfe eines 20%igen Polyacrylamidgels durchgeführt bei dem jeweils 1 µg der Probe aufgetragen wurde.

Tabelle 6-6: Ansatz zur Darstellung des ODN-RNase-Konjugats je Eppendorf-Reaktionsgefäß

ANSATZ:	M (g/mol)	m (mg)	n (mol)	V (mL)	C(g/L)
CPG-ODN-Benzylthioester	14500	0,72	$5,0 \cdot 10^{-8}$	Träger	
Cys-ZFY-6-Acm	3851	0,20	$5,0 \cdot 10^{-8}$	0,1	2
Ammoniak	122,2			0,3	

Im nachfolgenden Abschnitt sind alle Variationsmöglichkeiten der NCL dargestellt. Die Stoffmengenverhältnisse des CPG-ODN-Benzylthioesters und der RNase sind wie in Tabelle 6-6 gezeigt immer äquimolar. Jeweils nur die Reaktionsdauer, das Lösemittel oder die Größe des Trägers (2000 Å vs 3000 Å) wurden variiert.

a) Stock Solution

Das zunächst verwendete Lösemittel war die „Stock Solution“, welche nach dem Protokoll von Prof. Dr. Stephen Kent der Universität Chicago^[1] hergestellt wurde (siehe 6.1.1.2.1.). Die Synthese der Vorstufe, des CPG-ODN-Benzylthioesters, betrug zunächst einen Tag. Die Reaktionsdauer der NCL wurde über mehrere Tage variiert.

Tabelle 6-7: Variation der Reaktionsdauer im Lösemittel „Stock Solution“

Probe:	Dauer Vorstufe (Benzylthioester)	Dauer NCL	Lösemittel	$n_{\text{ODN}}=n_{\text{RNase}}$ (mol)
3BT1SS1d	1 Tag	1 Tag	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1SS2d	1 Tag	2 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1SS3d	1 Tag	3 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1SS7d	1 Tag	7 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1SS21d	1 Tag	21 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$

Als nächstes wurde die Vorstufe für 3 Tage reagiert. Die Reaktionsdauer der NCL wurde erneut für mehrere Tage variiert.

Tabelle 6-8: Variation der Reaktionsdauer im Lösemittel „Stock Solution

Probe:	Dauer Vorstufe (Benzylthioester)	Dauer NCL	Lösemittel	$n_{\text{ODN}}=n_{\text{RNase}}$ (mol)
3BT3SS1d	3 Tage	1 Tag	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3SS2d	3 Tage	2 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3SS3d	3 Tage	3 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3SS7d	3 Tage	7 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3SS21d	3 Tage	21 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$

Schließlich ließ man die Vorstufe für 7 Tage reagieren. Auch hier wurde die Reaktionsdauer der NCL für mehrere Tage variiert.

Tabelle 6-9: Variation der Reaktionsdauer im Lösemittel „Stock Solution

Probe:	Dauer Vorstufe (Benzylthioester)	Dauer NCL	Lösemittel	$n_{\text{ODN}}=n_{\text{RNase}}$ (mol)
3BT7SS1d	7 Tage	1 Tag	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7SS2d	7 Tage	2 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7SS3d	7 Tage	3 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7SS7d	7 Tage	7 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7SS21d	7 Tage	21 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$

b) Mix-Solution

Als nächstes wurde der organische Anteil des Lösemittels mit Acetonitril erhöht. Das Lösemittel „Mix“ besteht aus zwei Teilen MilliQ-Wasser, einem Teil Acetonitril und zu einem weiteren Teil „Stock Solution“. Das Gesamtverhältnis von wässriger zu organischer Phase beträgt somit 3:1. Die Reaktionszeiten von der CPG-ODN-Benzylthioestersynthese und der NCL waren an den Vorversuchen der „Stock Solution“ angelehnt, sprich der CPG-ODN-Benzylthioester wurde für 1, 3 bzw. 7 Tage reagiert. Die Reaktionsdauer der NCL betrug 1, 2, 3, 7 und 21 Tage.

Tabelle 6-10: Variation der Reaktionsdauer im Lösemittel „Mix“

Probe:	Dauer Vorstufe (Benzylthioester)	Dauer NCL	Lösemittel	$n_{\text{ODN}}=n_{\text{RNase}}$ (mol)
3BT1Mix1d	1 Tag	1 Tag	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1Mix2d	1 Tag	2 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1Mix3d	1 Tag	3 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1Mix7d	1 Tag	7 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1Mix21d	1 Tag	21 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 6-11: Variation der Reaktionsdauer im Lösemittel „Mix“

Probe:	Dauer Vorstufe (Benzylthioester)	Dauer NCL	Lösemittel	$n_{\text{ODN}}=n_{\text{RNase}}$ (mol)
3BT3Mix1d	3 Tage	1 Tag	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3Mix2d	3 Tage	2 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3Mix3d	3 Tage	3 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3Mix7d	3 Tage	7 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3Mix21d	3 Tage	21 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 6-12: Variation der Reaktionsdauer im Lösemittel „Mix“

Probe:	Dauer Vorstufe (Benzylthioester)	Dauer NCL	Lösemittel	$n_{\text{ODN}}=n_{\text{RNase}}$ (mol)
3BT7Mix1d	7 Tage	1 Tag	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7Mix2d	7 Tage	2 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7Mix3d	7 Tage	3 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7Mix7d	7 Tage	7 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7Mix21d	7 Tage	21 Tage	Mix	$5 \cdot 10^{-8}$

c) AcCN-Solution

Abschließend wurde der organische Anteil noch weiter erhöht. Das Lösemittel „AcCN“ besteht aus 18 Teilen MilliQ-Wasser, 17 Teilen Acetonitril und zu einem Teil „Stock Solution“. Somit betrug das Verhältnis von organischer Phase annähernd 1:1. Analog zu den vorherigen Experimenten wurden auch hier die Reaktionszeiten variiert.

Tabelle 6-13: Variation der Reaktionsdauer im Lösemittel „AcCN“

Probe:	Dauer Vorstufe (Benzylthioester)	Dauer NCL	Lösemittel	$n_{\text{ODN}}=n_{\text{RNase}}$ (mol)
3BT1AcCN1d	1 Tag	1 Tag	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1AcCN2d	1 Tag	2 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1AcCN3d	1 Tag	3 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1AcCN7d	1 Tag	7 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1AcCN21d	1 Tag	21 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 6-14: Variation der Reaktionsdauer im Lösemittel „AcCN“

Probe:	Dauer Vorstufe (Benzylthioester)	Dauer NCL	Lösemittel	$n_{\text{ODN}}=n_{\text{RNase}}$ (mol)
3BT3AcCN1d	3 Tage	1 Tag	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3AcCN2d	3 Tage	2 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3AcCN3d	3 Tage	3 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3AcCN7d	3 Tage	7 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3AcCN21d	3 Tage	21 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 6-15: Variation der Reaktionsdauer im Lösemittel „AcCN“

Probe:	Dauer Vorstufe (Benzylthioester)	Dauer NCL	Lösemittel	$n_{\text{ODN}}=n_{\text{RNase}}$ (mol)
3BT7AcCN1d	7 Tage	1 Tag	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7AcCN2d	7 Tage	2 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7AcCN3d	7 Tage	3 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7AcCN7d	7 Tage	7 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7AcCN21d	7 Tage	21 Tage	AcCN	$5 \cdot 10^{-8}$

d) Hexapeptid statt RNase Cys-ZFY-6-Acm als Kontrollreaktion in der Stock Solution

Außerdem wurde zur Kontrolle der ersten Stufe (CPG-ODN-Benzylthioester) die NCL mit einem Hexapeptid der Aminosäuresequenz $\text{H}_2\text{N-Cys-Ala-Val-Glu-Ser-Thr-COOH}$ im Lösemittel „Stock Solution“ bei verschiedenen Reaktionszeiten durchgeführt.

Tabelle 6-16: Variation der Reaktionsdauer im Lösemittel „Stock Solution“ (Hexapeptid)

Probe:	Dauer Vorstufe (Benzylthioester)	Dauer NCL	Lösemittel	$n_{\text{ODN}}=n_{\text{Hexapeptid}}$
3BT1SSHEx1d	1 Tag	1 Tag	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1SSHEx3d	1 Tag	3 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT1SSHEx7d	1 Tag	7 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3SSHEx1d	3 Tage	1 Tag	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3SSHEx3d	3 Tage	3 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT3SSHEx7d	3 Tage	7 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7SSHEx1d	7 Tage	1 Tag	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7SSHEx3d	7 Tage	3 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$
3BT7SSHEx7d	7 Tage	7 Tage	Stock Solution	$5 \cdot 10^{-8}$

Die verschiedenen Reaktionsschritte, -partner und -zeiten sind in folgendem Diagramm graphisch dargestellt. Alle Reaktionen aus 6.1.1.2.1 wurden in gleicher Weise zum Vergleich auch auf einem 2000 Å großen CPG durchgeführt.

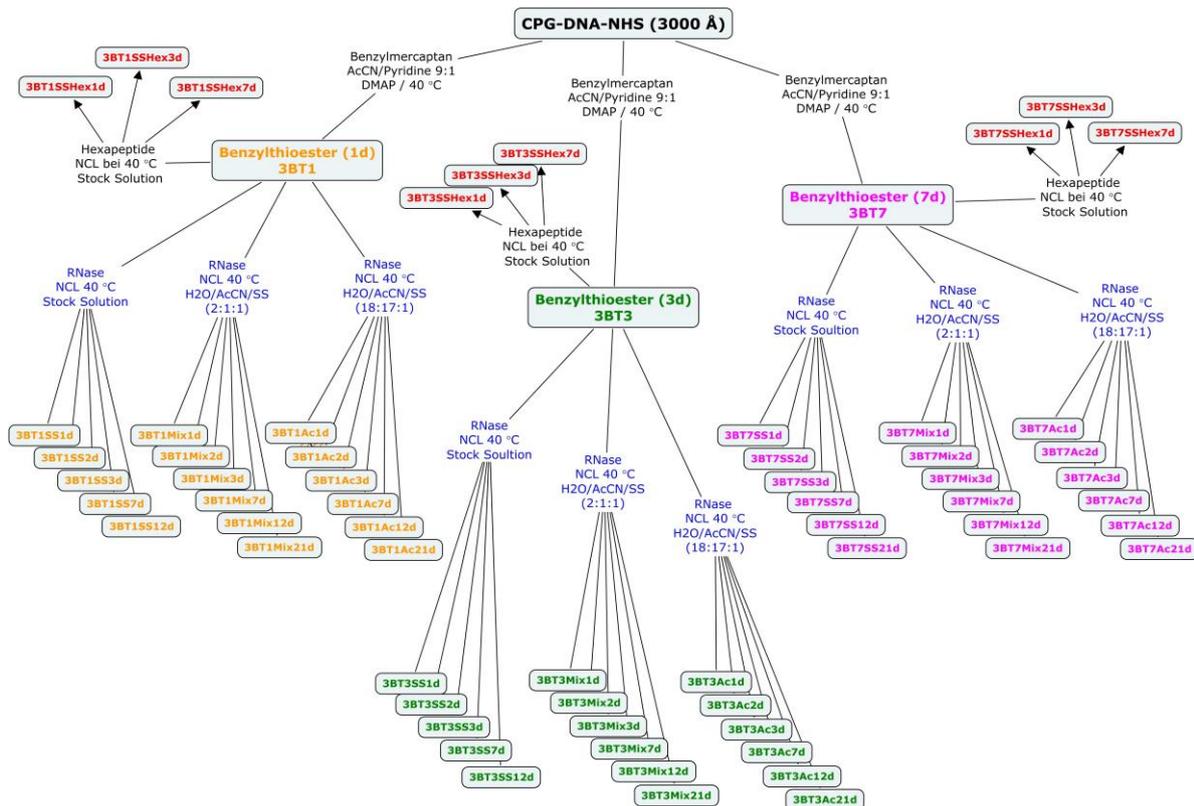


Abbildung 6-1: Diagramm über die Variation von Lösemittel und Reaktionsdauer bei einem CPG von 3000 Angström (gleiches Diagramm für 2000 Angström)

Legende: 2/3 BT1/3/7 SS/Mix/AcCN 1d/2d/3d/7d/21d

2/3: Größe des CPG in Tausend-Angström

BT1/3/7: Dauer in Tagen der CPG-ODN-Benzylthioester-Darstellung

SS: wässrige Stock Solution (nach Kent)

Mix: Wässrige zu organische Phase 3:1

Ac: Wässrige zu organische Phase fast 1:1

1d/2d/3d/7d/21d: Reaktionsdauer der NCL

Alle Proben wurden nach erfolgter Analyse per Polyacrylamidgelelektrophorese (für Details siehe 6.4.2.3) vereint und über einen Eppendorf Concentrator 5301 bei 30°C bis zur Trockne einrotiert. Die auf diese Weise gewonnen 21,3 mg wurden in 3 mL Ladepuffer gelöst und auf die präparative Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetragen. Nähere Details zur Aufreinigung des Konjugats mittels PrepCell sind in 6.1.1.3 beschrieben.

6.1.1.2.4 Untersuchung des Einflusses der Konzentration und des Überschusses der RNase „Cys-ZFY-6-Acm“ während der NCL

Der CPG-ODN-Benzylthioester wurde aus 10^{-6} mol CPG-ODN-NHS-Ester standardmäßig nach 6.1.1.1. innerhalb eines Tages hergestellt, auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit der zweifachen bzw. der fünffachen Stoffmenge an Cys-ZFY-6-Acm versetzt. Anschließend fand die NCL in 0,5 mL „AcCN“ (siehe 6.1.1.2.3. c)) für zwei bis vier Tage bei 40°C im Eppendorf Thermomixer statt. Um den zwischenzeitlichen Reaktionsfortschritt zu kontrollieren wurde nach zwei Tagen aus beiden Eppendorf Reaktionsgefäßen eine Spatelspitze (ca. 1,5-3 µg) der Probe herausgenommen und über Nacht in konz. Ammoniak bei 47 Grad geschüttelt. Das vom Träger abgespaltene ODN-RNase-Konjugat wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht und zusätzlich 1 µg auf einem 20%igen Polyacrylamidgel analysiert.

Tabelle 6-17: Ansatz zur Darstellung der ODN-RNase in „AcCN“ je Eppendorf-Reaktionsgefäß

ANSATZ:	M (g/mol)	m (mg)	n (mol)	V (ml)	c (g/L)	Größe CPG (Angström)
CPG-ODN-Benzylthioester	14480	0,72	$5,0 \cdot 10^{-7}$	Träger		3000
Cys-ZFY-6-Acm (2-fach)	3851	3,85	$1,0 \cdot 10^{-6}$	0,50	7,7	
Cys-ZFY-6-Acm (5-fach)	3851	9,63	$2,5 \cdot 10^{-6}$	0,50	19	
Tris(2-carboxyethyl)phosphin	258,5			0,05	0,50 M	
Ammoniak	122,2			0,30		

50 µL 0,5 M TCEP-Lösung wurden der Lösung zugesetzt und zwei weitere Tage reagiert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend über ein 20%igen Polyacrylamidgel analysiert.. Ferner wurden die Überstände wie folgt behandelt und anschließend 5 µL der Lösung auf ein 12%iges NuPAGE® Bis-Tris Precast Gel („Peptid-Gel“) aufgetragen. Als Ladepuffer wurden jeweils 2,5 µL Lithiumdodecylsulfat (LDS), als Laufpuffer wurde einfacher MES-Puffer (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) verwendet. Die Spannung wurde dabei bei 200 V konstant gehalten, was einer Stromstärke von 130 mA zu Beginn entsprach. Die Laufzeit des NuPAGE-Gels betrug ungefähr 50 Minuten.

1a: 20 μL aus dem Überstand der trüben 5x-Lösung wurden zentrifugiert und davon 5 μL aus dessen Überstand auf das NuPAGE-Gel aufgetragen. Das Pellet wurde dabei nicht resuspendiert.

1b: 20 μL aus dem Überstand der trüben 5x-Lösung wurden mit 5 μL TCEP versetzt und dann zentrifugiert und davon 5 μL aus dessen Überstand auf das NuPAGE-Gel aufgetragen. Das Pellet wurde dabei nicht resuspendiert.

2a: 20 μL aus dem Überstand der trüben 2x-Lösung wurden zentrifugiert und davon 5 μL aus dessen Überstand auf das NuPAGE-Gel aufgetragen. Das Pellet wurde dabei nicht resuspendiert.

2b: 20 μL aus dem Überstand der trüben 2x-Lösung wurden mit 5 μL TCEP versetzt und zentrifugiert und davon 5 μL aus dessen Überstand auf das NuPAGE-Gel aufgetragen. Das Pellet wurde dabei nicht resuspendiert.

3a: 20 μL aus dem Überstand der trüben 5x-Lösung wurden herausgenommen und davon 5 μL auf das NuPAGE-Gel aufgetragen.

3b: 20 μL aus dem Überstand der trüben 5x-Lösung wurden mit 10 μL TCEP versetzt und davon 5 μL auf das NuPAGE-Gel aufgetragen.

3c: 20 μL aus dem Überstand der trüben 5x-Lösung wurden mit 1 μL TCEP versetzt und davon 5 μL auf das NuPAGE-Gel aufgetragen.

4a: 20 μL aus dem Überstand der trüben 2x-Lösung wurden herausgenommen und davon 5 μL auf das NuPAGE-Gel aufgetragen.

4b: 20 μL aus dem Überstand trüben der 2x-Lösung wurden mit 5 μL TCEP versetzt und davon 5 μL auf das NuPAGE-Gel aufgetragen.

5a: Der Überstand wurde komplett abgezogen und der Träger mit Wasser gewaschen. 20 μL dieses Waschganges wurden aufgehoben und davon 5 μL auf das NuPAGE-Gel aufgetragen.

5b: Der Überstand wurde komplett abgezogen und der Träger mit Wasser gewaschen. 20 μL dieses Waschganges wurden mit 5 μL TCEP-Lösung versetzt und davon 5 μL auf das NuPAGE-Gel aufgetragen.

Die Überstände (1a-5b) wurden zusätzlich zu dem 12%igen NuPAGE® Bis-Tris Precast Gel zusammen mit der reinen RNase-Lösung, dem ODN-RNase-Konjugat und der reinen 46-basen DNA auf ein 20%iges Polyacrylamidgel. Die auf das PAGE-Gel aufgetragenen Mengen sind in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 6-18: Übersicht über die verschiedenen Mengen und Volumina zur PAGE-Analyse

Ansatz:	m (µg)	V (µL)	Kürzel
46-Basen DNA	1	5	DNA
ODN-RNase	1	5	K
Cys-ZFY-6-Acm	2	2	R1
Cys-ZFY-6-Acm	4	4	R2
Cys-ZFY-6-Acm	10	10	R3
NCL-Überstand	?	15	NCL15
NCL-Überstand	?	20	NCL20
TCEP (0,5M)	1290	10	TCEP

6.1.1.2.5 Konjugation der deblockierten RNase „Cys-ZFY-6“ und weitere Variation der Reaktionsbedingungen während der NCL

In diesem Projekt wurde die RNase das erste Mal ohne jegliche Schutzgruppen an beiden Thiolgruppen zur Reaktion gebracht. Dazu wurde zusätzlich zu dem bereits bekannten Lösemittel „AcCN“ noch das Lösemittel Methanol verwendet. Ferner wurde der Überschuss an RNase bei gleichbleibender Konzentration, sprich größerem Volumen untersucht. Die Reaktionen fanden sowohl in äquimolarer Anwesenheit als auch in Abwesenheit von einem Reduktionsmittel (TCEP) statt. Dabei erfolgte die Darstellung der Precursorstufe, des CPG-ODN-Benzylthioesters, standardmäßig nach 6.1.1.1. für drei Tage statt 10^{-6} mol des entstandenen CPG-ODN-Benzylthioesters wurden anschließend auf 10 Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit der ungeschützten RNase zur Reaktion gebracht.

Tabelle 6-19: Ansatz zur Darstellung des ODN-RNase-Konjugats je Eppendorf Reaktionsgefäß

ANSATZ:	M (g/mol)	m (mg)	n (mol)	Größe CPG (Angström)
CPG-ODN-Benzylthioester	14480	1,44	$1,0 \cdot 10^{-7}$	3000
Cys-ZFY-6	3707	0,37-2,96	$1,0-8,0 \cdot 10^{-7}$	
Tris(2-carboxyethyl)phosphin	258,5		0,50 M	

Tabelle 6-20: Variation der verschiedenen Reaktionsparameter der NCL

Probe:	Lösemittel	c_{RNase} (g/L)	m_{RNase}(mg)	V_{RNase}(mL)	TCEP (1 μL)	ODN-RNase (mol)
AcRed1	AcCN	2	0,37	0,187	JA	1:1
AcRed2	AcCN	2	0,74	0,375	JA	1:2
AcRed4	AcCN	2	1,48	0,750	JA	1:4
AcRed8	AcCN	2	2,96	1,50	JA	1:8
Ac1	AcCN	2	0,37	0,187	NEIN	1:1
MeRed1	MeOH	2	0,37	0,187	JA	1:1
MeRed2	MeOH	2	0,74	0,375	JA	1:2
MeRed4	MeOH	2	1,48	0,750	JA	1:4
MeRed8	MeOH	2	2,96	1,50	JA	1:8
Me1	MeOH	2	0,37	0,187	NEIN	1:1

Nach der jeweiligen Analyse auf einem 20%igen Polyacrylamidgel, wurden sämtlich Proben vereinigt und im Eppendorf Concentrator 5301 konzentriert. Die vereinte Probe wurde anschließend in 200 μL Ladepuffer gelöst und über eine präparative Polyacrylamidgelelektrophorese aufgereingt. Als Puffer diente einfacher Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer. Weitere Details zur Auftrennung der Konjugate mittels PrepCell siehe Kapitel 6.1.1.3.

6.1.1.2.6 Untersuchung des Einflusses weiterer Lösemittel in Abhängigkeit der Konzentration, der Molarverhältnisse und der Anwesenheit von TCEP

In diesem Projekt wurden oben aufgeführte Parameter während der Nativen Chemischen Ligation variiert. Dazu wurde nach 6.1.1.1. innerhalb von zwei Tagen der CPG-ODN-Benzylthioester aus 3×10^{-6} mol CPG-ODN-NHS-Ester dargestellt. Dieser wurde auf 15 Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt (jeweils $2,0 \times 10^{-7}$ mol) und mit unterschiedlichen Lösemitteln in unterschiedlichen RNase-Konzentrationen und –Über bzw. Unterschüssen in Ab- bzw. Anwesenheit von TCEP zur Reaktion gebracht.

Tabelle 6-21: Ansatz zur Darstellung des ODN-RNase-Konjugats je Eppendorf Reaktionsgefäß

ANSATZ:	M (g/mol)	m (mg)	n (mol)	Größe CPG (Angström)
CPG-ODN-Benzylthioester	14480	2,88	$2,0 \cdot 10^{-7}$	3000
Cys-ZFY-6	3707	0,148-2,96	$1,0-8,0 \cdot 10^{-7}$	
Tris(2-carboxyethyl)phosphin	258,5		0,50 M	

Tabelle 6-22: Variation der verschiedenen Reaktionsparameter der NCL

Probe :	Lösemittel (äquivolumentar)	C_{RNase} (g/L)	m_{RNase} (mg)	V_{RNase} (mL)	TCEP (1 μ L)	ODN:RNase (mol)
P1	MeOH	10	0,740	0,074	NEIN	1:1
P2	MeOH	10	0,740	0,074	JA	1:1
P3	MeOH/H ₂ O	5,0	0,740	0,148	NEIN	1:1
P4	MeOH/H ₂ O	5,0	0,740	0,148	JA	1:1
P5	MeOH	10	2,96	0,296	NEIN	1:4
P6	MeOH	10	2,96	0,296	JA	1:4
P7	MeOH/EtOH	10	0,740	0,074	NEIN	1:1
P8	MeOH/EtOH	10	0,740	0,074	JA	1:1
P9	MeOH/EtOH/H ₂ O	5,0	0,740	0,148	NEIN	1:1
P10	MeOH/EtOH/H ₂ O	5,0	0,740	0,148	JA	1:1
P11	MeOH/EtOH	5,0	0,740	0,148	NEIN	1:1
P12	MeOH/EtOH	5,0	0,740	0,148	JA	1:1
P13	EtOH	2,0	0,148	0,074	NEIN	1:0,2
P14	EtOH/H ₂ O	1,0	0,148	0,148	NEIN	1:0,2
P15	EtOH	1,0	0,148	0,148	NEIN	1:0,2

Nachdem alle Proben auf einem 20%igen Polyacrylamidgel analysiert worden waren, wurden diese vereinigt und gefriergetrocknet. Die vereinten Proben wurden anschließend gravimetrisch gewogen (18,7 mg) und in 250 μ L Ladepuffer gelöst. Anschließend wurde die Probe über präparativer Polyacrylamidgelelektrophorese aufgereinigt. Als Puffer wurde Ammoniumhydrogencarbonat verwendet. Weitere Details zur Aufreinigung der Konjugate mittels PrepCell siehe Kapitel 4.1.1.3.

6.1.1.2.7 Synthese des ODN-RNase-Konjugats im größerem Maßstab zur gentechnologischen Anwendung

In diesem Projekt erfolgte die Synthese der ODN-RNase für die finale Anwendung mit RNA.. Hierzu wurden 2×10^{-6} mol CPG-ODN-NHS-Ester wie in 6.1.1.1. beschrieben über zwei Tage dargestellt. Anschließend wurde der CPG-ODN-Benzylthioester auf 4 Eppendorf Reaktionsgefäße (je 5×10^{-7} mol) aufgeteilt und mit der ungeschützten RNase über drei Tage bei 40°C zur Reaktion gebracht. Dabei wurde eine bereits vor Wochen angesetzte RNase-Lösung im Lösemittel „AcCN“ verwendet (Probe 1), als auch neu eingewogene RNase welche in Methanol gelöst wurde.

Tabelle 6-23: Ansatz zur Darstellung des ODN-RNase-Konjugats je Eppendorf Reaktionsgefäß

ANSATZ:	M (g/mol)	m (mg)	n (mol)	Größe CPG (Angström)
CPG-ODN-Benzylthioester	14480	7,2	$5,0 \cdot 10^{-7}$	3000
Cys-ZFY-6	3707	2,0-3,0	$5,4 \cdot 10^{-7}$ - $8,1 \cdot 10^{-7}$	

Tabelle 6-24: Variation der Reaktionsparameter der NCL

Probe:	Lösemittel	c_{RNase} (g/L)	m_{RNase}(mg)	V_{RNase}(mL)	ODN-RNase (mol)	Batch
SP 1	AcCN	2	2,0	1,0	1:1,1	Alt
SP 2	MeOH	2	2,0	1,0	1:1,1	Neu
SP 3	MeOH	2	3,0	1,5	1:1,5	Neu
Sp 4	MeOH	1	2,0	2,0	1:1,1	Neu

Jeweils ein Mikrogramm der Proben wurde auf ein 20%iges Polyacrylamidgel aufgegeben. Die Proben 2 und 4 wurden anschließend vereint, im Eppendorf Concentrator 5301 eingengt und in 250 μ L Ladepuffer gelöst. Diese wurden mittels PrepCell elektrophoretisch aufgereinigt. Nähere Details hierzu in Kapitel 6.1.1.3

6.1.1.2.8 Selektive Färbung von DNA und Peptiden

In diesem Projekt wurden Proben aus früheren Projekten verwendet und mit unterschiedlichen Färbemitteln angefärbt. Als Proben dienten einerseits die Proben 3BT3SSH₃ und 3BT3Ac_{3d} aus Kapitel 4.1.1.2.3 und zwei Proben aus der Diplomarbeit von Andreas Böckler mit der Bezeichnung B10 und B19. Dabei hatte B10 ein 10-Peptid ans ODN (46 Basen) gekoppelt, B19 ein 19-Peptid.

Die Aminosäuresequenzen lautet wie folgt:

B10: ODN-Cys-Gln-Asp-Ser-Glu-Thr-Arg-Thr-Phe-Tyr

B19: ODN-Cys-Ser-Arg-Ala-Arg-Lys-Gln-Ala-Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Ser-Ala-Asp-Arg

Als Färbemittel wurde zunächst standardmäßig GelRed verwendet. Hierzu wurden in der Reihenfolge B10, B19, 3BT3SSH₃, 3BT3Ac_{3d} (einfache und doppelte Menge), DNA-Marker und Protein-Marker jeweils 1 bzw. im Fall von 3BT3Ac_{3d} 2 µg auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Anschließend wurde das gleiche Gel über Nacht mit Stains All gefärbt und direkt danach, sowie nach einstündiger Ausbleichung an Tageslicht, fotografiert. Bei Stains-All handelt es sich um ein Reagenz zur Anfärbung von DNA, RNA und Proteinen. Um Proteine sensitiv anzufärben wurde anschließend noch eine Silberfärbung durchgeführt. Eigentlich als Proteinfärbemethode beschrieben, stellte man fest, dass auch DNA angefärbt werden. Ferner wurde auf einem neuen PAGE-Gel das Färbemittel Coomassie Blue (speziell zur Proteinfärbung gedacht) verwendet.

Als nächstes Färbemittel kam „Ruby Stain“ zum Einsatz, ein Färbemittel welches ausschließlich Proteine und keine Nukleinsäuren anfärben soll. Hierzu wurden auf dem Polyacrylamidgel jeweils 1 µg folgender Proben aufgetragen. B10, B19, 3BT3Ac_{3d} und der DNA Marker.

6.1.1.3 Purifikation des ODN-RNase-Konjugats mittels präparativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PrepCell)

In einigen Projekten wurden die erhaltenen Konjugate von den nicht-reagierenden DNA-Fehlsequenzen mittels präparativer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die prinzipiell Funktionsweise und der detaillierte Aufbau der präparativen Gelelektrophorese ist in Kapitel 3.4.5 ausführlich erläutert.

a) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.3

Da in diesem Projekt alle entstanden Konjugate nur unterschiedlichen Reaktionsparameter ausgesetzt waren, jedoch dasselbe Produkt lieferten, konnten alle Ansätze vereint werden. Die Massenbestimmung geschah einerseits durch simples Wiegen (nachdem das Wasser abgedampft wurde) sowie vorher in wässriger Lösung mittels UV/Vis-Spektroskopie. Das trockene Produkt wurde anschließend in 3 mL Ladepuffer gelöst und auf die Gelsäule aufgetragen. Der Strom wurde so eingestellt dass er 500 V und 60 mA nicht überschreitet. Der Fraktionensammler wurde nach 100 Minuten gestartet. Die Wechselfrequenz lag bei 5 Minuten pro Fraktion wobei der Fluss auf 9,6 mL pro 10 Minuten eingestellt war. Nach 300 Minuten wurde die Elektrophorese beendet und die einzelnen Fraktionen auf ein analytisches Polyacrylamidgel aufgetragen. Hierbei wurden 5 µL aus den mit 1x TBE-Puffer stark verdünnten Fraktionen plus 5 µL Ladepuffer aufgetragen. Nach erfolgter PAGE wurden die Fraktionen der jeweiligen Produkte vereint. Aufgrund der großen Verdünnung mussten die Produkte vor dem Aufkonzentrieren entsalzt werden.

b) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.5

Wieder wurden alle Proben aus dem Projekt vereint nachdem das Lösemittel nahezu komplett abgedampft wurde. Die Massebestimmung der einzelnen Proben (vor dem Vereinen) wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt. Das auf ca. 0,5 mL stark einkonzentrierte Produkt (ca. 10 g/L) wurde anschließend mit 10 µL TCEP sowie mit 300 µL Ladepuffer versetzt und auf die Gelsäule gegeben. Der Fraktionensammler, welcher auf 5 Minuten pro Röhrchen eingestellt war, startete nach 65 Minuten. Nach 285 Minuten wurde

die Elektrophorese beendet und die einzelnen Fraktionen auf einer analytischen PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Auch hier wurden wieder 5 µL der mit 1xTBE-Puffer stark verdünnten Probe mit 5 µL Ladepuffer aufgetragen. Nach Auswertung der PAGE wurden die Fraktionen der DNA-Banden (Vial 6 und 7) und die der Konjugats-Banden (Vial 13 und 14) vereint. Nach Entsalzung der Proben (siehe Kapitel 6.1.1.4.) wurden diese mittels Kapillarelektrophorese analysiert.

c) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.6

Die vereinten Proben wurden über Nacht gefriergetrocknet und gewogen (18,7 mg), in 250 µL Ladepuffer gelöst und auf die Gelsäule aufgegeben. Als Elutionspuffer wurde der 1x TBE-Puffer durch einen flüchtigen Puffer, 1 mM Ammoniumhydrogencarbonat, ersetzt. Es war zu beobachten dass während der Elektrophorese bei konstanter Stromstärke (40mA) die Spannung konstant gehalten werden konnte (Sprunghafte, oszillierende Steigerung von 259 V auf 313 V). Der Sampler wurde nach 15 Minuten gestartet, die Wechselfrequenz lag bei 5 Minuten pro Röhrchen bei einem Fluss von 9,6 mL pro 10 Minuten. Nach beendeter Elektrophorese wurden 5 µL aus den Fraktionen mit 5 µL Ladepuffer aufgetragen. Danach wurden Fraktionen 33-36 zur DNA-Fraktion und Fraktionen 48-54 zur Konjugats-Fraktion vereinigt. Die Konjugats-Fraktion (ca. 30 mL) wurde über Nacht gefriergetrocknet und in 1 mL MilliQ-Wasser gelöst.

d) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.7

Die Proben SP2 und SP4 welche die größte Ausbeute an Konjugat aufwiesen wurden vereint und im Eppendorf Concentrator bis auf ca. 225 µL eingeeengt. Nach Zugabe von 250 µL Ladepuffer konnten die 475 µL auf die Gelsäule gegeben und die elektrophoretische Auftrennung mit 1x TBE-Puffer als Lauf- und Elutionspuffer gestartet werden. Der Fraktionensammler wurde nach 131 Minuten gestartet und die Frequenz auf 8 Minuten pro Röhrchen bei einem Fluss von 9,6 mL/10 Minuten eingestellt. Nach 530 Minuten kam es zur Beendigung der Elektrophorese und die einzelnen Fraktionen konnten auf einer analytischen PAGE untersucht werden. Dabei wurden die DNA-Peaks 1-3 (Name: SP DNA) und die Konjugat-Peaks 11-13 (Name: SP AB1) vereint. Da AB1 zum Testen an der synthetischen RNA herangezogen werden soll, wurde anschließend mit BioSpin-6 GPC-Säulen entsalzt.

Die gleiche Gelsäule diente im zweiten Durchgang zur Aufreinigung der Probe KonPana2. Dazu wurde das Produkt mittels Eppendorf Concentrator eingeeengt, in 200 µL Ladepuffer

gelöst und wie oben beschrieben elektrophoretisch getrennt. Die Konjugat-Peaks 18-21 wurden vereint und mit SP AB2 neu betitelt. Zusätzlich wurde der unbekannte Peak zwischen DNA und Konjugat ebenfalls vereint (Fraktion 14-16) und mit SP Unb betitelt.

6.1.1.4 Entsalzung des ODN-RNase-Konjugats nach präparativer PAGE

a) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.3

Nach beendeter präparativer Gelelektrophorese wurden die jeweils vereinten Proben (DNA- und Konjugatsfraktion) mittels Centricon Plus-70 Zentrifugen-Filtereinheiten (NMGG=10.000) in mehreren Waschschritten entsalzt. Beim ersten Waschschriffte wurden die Proben von knapp 20 mL auf ca. 350 μ L in der Zentrifuge bei 3.500 g konzentriert. Je nach Volumen und Salzgehalt dauerte dies zwischen 15 und 40 Minuten. Das Filtrat konnte verworfen werden und das Retentat, welches die Probe enthält, mit 70 mL MilliQ-Wasser aufgefüllt und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der erste Waschschriff entfernt bereits mehr als 95% der Anfangssalzkonzentration; der darauffolgende Waschschriff mehr als 99%. Um einen Probenverlust zu vermeiden und das Retentat komplett aus dem Filter zurückzugewinnen, wird die Kapsel mit dem Retentat bei 1000g für 2 Minuten invertiert zentrifugiert. Die Massenbestimmung wurde abschließend mittels UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt. Die nun entsalzten Konjugats- und DNA-Proben wurden für die analytische Charakterisierung mittels GPC und MALDI-TOF-MS verwendet.

b) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.5

Die vereinten DNA- und Konjugats-Fraktion wurden wie oben beschrieben mittels Centricon-Plus-70 Zentrifugen-Filtereinheiten (NMGG=10.000) entsalzt. Die entsalzten Proben dienen zur Charakterisierung mittels Kapillarelektrophorese.

c) Verwendung der Proben aus Kapitel 4.1.1.2.7

Aus den vier Proben SP AB1, SP AB2, SP DNA und SP Unb wurden jeweils 1,6 mL entnommen und per UV/Vis-Spektroskopie vermessen und aufgrund der niedrigen Konzentration im Eppendorf Concentrator auf ca. 100 µL weiter eingeeengt. Diese wurden anschließend mittels Bio-Spin P-6 Säulen von BioRad entsalzt. Die Entsalzung wurde wie in der mitgelieferten Gebrauchsanweisung^[2] beschrieben durchgeführt. Die nun entsalzten Proben (ca. 120 µL) konnten zur Konzentrationsbestimmung abermals per UV/Vis-Spektroskopie analysiert werden.

Eine Alternativmethode der Entsalzung ist die klassische Ethanol-Fällung entsalzt. Dazu wurden die Proben mit 10 Volumenprozent an sogenanntem Dialysepuffer (bestehend aus 3 M NaCl, 0,25 M TRIS und 0,1 M EDTA.) und dreifachem Volumen an absolutem unvergälltem Ethanol versetzt und über Nacht auf -20 bzw. auf -80°C gekühlt. Am nächsten Morgen wurden die Proben für ca. 2 Stunden bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert. Nach Bildung eines Pellets konnte der Überstand verworfen werden. Anschließende Überschichtung des Pellets mit 70%igem Ethanol und 15 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 g lieferte eine salzfreie Probe. Nach Abtrennung des Überstandes wurde das restliche Lösungsmittel an Luft getrocknet, in HPLC-Wasser gelöst und mittels NanoDrop-Messung analysiert.

Eine alternative Ethanol-Fällung mit einer Ultrazentrifuge (173.000 g bei 4 °C) als Zentrifugiergerät wurde ebenfalls durchgeführt.

Ein weiterer Alternativversuch bestand darin, das Konjugat samt TBE-Salz auszufällen. Hierzu gab man das 12fache Volumen an Aceton auf Trockeneis (-78,5 °C) hinzu. Die Fälllösung wurde bei 4 °C und 4.600 g für 2 Stunden zentrifugiert. Das Präzipitat, bestehend aus TBE-Salz und Konjugat, wurde nachdem der Aceton-Überstand verworfen wurde, sooft mit 70% EtOH gewaschen bis nahezu alle Salze ausgewaschen waren. Das Präzipitat wurde in 20 µL HPLC-Wasser gelöst und mittels NanoDrop-Messung die Konzentration bestimmt.

Wie zuvor beschrieben wurde das AB1-Konjugat ebenfalls mit Hilfe von 12fachem Volumenüberschuss an Aceton auf Trockeneis ausgefällt. Jedoch wurde anschließend, im Gegensatz zu vorherigen Fällungen, das Präzipitat nicht mit 70 % EtOH gewaschen, sondern mittels Größenausschlusschromatografie (BioRad Bio Spin P-6 GPC-Säulen) entsalzt. Hierzu wurden 6 mL der AB1-Konjugatslösung in 1x TBE-Puffer bei einer Konzentration von 3,2 µg/mL eingesetzt. Aufgrund der hohen Salzkonzentration wurde die Probe zur Sicherheit ein zweites Mal mit den BioRad Bio Spin P-6 Säulen entsalzt.

6.1.2 Synthese der RNA

6.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Es wurden mehrere verschiedene Maus-DNA-Matrizen (NR 54; NR 58; NR 60) und je zwei verschiedene Primer (forward und reverse) eingesetzt.

In nachfolgender Tabelle sind die verschiedenen Primer mit ihren Sequenzen angegeben.

Tabelle 6-25: Übersicht über die verwendeten Primer (PCR)

Primer (Firma)	Orientierung	DNA-Sequenz (5'-3')	Code
██████	Forward	GGGAAACTTCGGAGGGAACC	A _{for}
██████	Reverse	AGGAAGCCAGATACCCGTCG	A _{rev}
██████	Forward	ATCCCGGGGCCGAGGAAGCC	B _{for}
██████	Reverse	TATCCTGAGGGAAACTTCGG	B _{rev}

Die Primer wurden anschließend systematisch mit den drei verschiedenen Maus-DNA-Matrizen kombiniert, woraus sich 12 unterschiedliche PCR Ansätze ergeben.

Tabelle 6-26: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus Matrize und Primer

Matrize	Primer (Forward)	Primer (Reverse)	Code
NR 54	A _{for}	A _{rev}	1 AA
NR 54	B _{for}	B _{rev}	1 BB
NR 54	A _{for}	B _{rev}	1 AB
NR 54	B _{for}	A _{rev}	1 BA
NR 58	A _{for}	A _{rev}	2 AA
NR 58	B _{for}	B _{rev}	2 BB
NR 58	A _{for}	B _{rev}	2 AB
NR 58	B _{for}	A _{rev}	2 BA
NR 60	A _{for}	A _{rev}	3 AA
NR 60	B _{for}	B _{rev}	3 BB
NR 60	A _{for}	B _{rev}	3 AB
NR 60	B _{for}	A _{rev}	3 BA

Die verschiedenen Matrizen und Primer wurden wie folgt angesetzt und im PCR-Cycler dem Standardprogramm (Tabelle 6-27) unterzogen

1 μL Klear Taq Polymerase

5 μL Puffer B

1 μL dNTP (10 mmol)

2x je 1 μL Primer

5 μL Matrize

36 μL HPLC-Wasser

$V_{\text{Ges}} = 50 \mu\text{L}$

Tabelle 6-27: Standardprogramm einer PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	3 Min	1x
Denaturierung	96 °C	0,5 Min	30x
Annealing	55 °C	0,5 Min	30x
Elongation	72 °C	1 Min	30x
Finale Elongation	72 °C	5 Min	1x
	4 °C	∞	

Nach erfolgter PCR wurden jeweils 5 μL der verschiedenen PCR-Produkte (plus 2 μL 6x Loading Dye) auf ein 1%iges Agarose Gel gegeben. Als Marker diente eine 100 bp Leiter.

6.1.2.2 Ligation in den Vektor pGEM®-T Easy

Die Ligation des PCR-Produkts 3 AA erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Vektor pGEM®-T Easy der Firma Promega. Der Ansatz der Ligation wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

1 µL PCR-Produkt 3 AA

1 µL pGEM-T Easy

1 µL 10x Ligationspuffer

1 µL T4 DNA-Ligase

6 µL HPLC-Wasser

$V_{\text{Ges}} = 10 \mu\text{L}$

6.1.2.3 Transformation elektrokompenter Zellen

Der ligierte Vektor wurde anschließend mittels Elektroporation in die Zellkultur DH10B des E.coli-Stamms transformiert. Hierzu wird 1 µL des Ligationsansatzes zu 40 µL der DH10B-Lösung (elektrokompetente Zellen) in einer sterilen Küvette (Gene Pulser®Cuvette) gegeben und mittels Elektroporation (bei 1,8kV) im Elektroporator Micro Pulser™ der Firma Bio-Rad für 3 Sekunden transformiert. Die elektroporierten Zellen werden anschließend in 1 mL L-Medium gelöst, auf den vorgewärmten XGal/Amp/IPTG-Platten ausplattiert (ca.100 µL) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 7 weiße Klone gepickt und in jeweils 5 mL L-Medium (mit 50 µL Ampicilin-Stammlösung) gegeben und wieder bei 37 °C über Nacht zur Amplifikation inkubiert (Übernachtskultur).

6.1.2.4 Plasmid-Isolierung

Die Plasmid-Isolierung der 7 über Nacht kultivierten Klone (AB_1 – AB_7) wurde nach Vorschrift des PeqGOLD Plasmid Miniprep Kits^[3] bewerkstelligt. Hierzu wurden die DH10B-Zellen bei 5000 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde anschließend sorgfältig in 250 µL der Lösung 1 (enthält RNase A)

resuspendiert. Für die anschließende Zellyse und -denaturierung wurden 250 μL der Lösung 2 (enthält 0,2 N NaOH und 1 %SDS) zugefügt und solange vorsichtig invertiert bis ein klares Lysat entstand. Abschließend wurden zur Neutralisierung der Lösung noch 350 μL der Lösung 3 hinzugegeben, woraufhin sich ein weißes Präzipitat bildete, welches für 10 Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand der Lösung, welcher die Plasmid-DNA enthielt, wurde nun auf einer PerfectBind®-Säule pipettiert und für eine Minute zentrifugiert. Der Säulendurchfluss konnte verworfen werden, da die Plasmid-DNA auf der Säule bindete. Um restliche Zellreste zu entfernen wurde die Säule mit 500 μL PW-Puffer und mit 750 μL DNA Waschpuffer gewaschen. Zum Schluss wurde die Säule mit 30 μL HPLC-Wasser beladen, für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in ein frisches Eppendorf-Gefäß für zwei Minuten zentrifugiert.

Die 7 Plasmid-Isolierungen wurden spektroskopisch mit einem NanoDrop ND 1000 Gerät vermessen. Bei allen 7 Proben war die Plasmid-Konzentration sehr gering, woraufhin der Klon AB_3 nochmal retransformiert, ausplattiert, gepickt und wieder über 7 Plasmid Miniprep Kits isoliert wurde. Um größere Mengen an klonierten Vektor zu erhalten lohnt es sich das Promega Pure Yield Plasmid MIDIPrep Kit^[4] zu verwenden.

6.1.2.5 Restriktion und Ethanol-Fällung

Zur Linearisierung des zirkulären Vektors pGEM® T Easy (mit gewünschtem PCR-Produkt) wurden die beiden Restriktionsenzyme *Sall* und *NcoI* verwendet. Diese schneiden dabei den Vektor auf unterschiedlichen Seiten der Multiple Cloning Site. Der Restriktionsansatz, welcher für 3 Stunden im Wasserbad bei 37 °C inkubiert wurde, sieht wie folgt aus.

8,7 μL Plasmid AB_3 (entspricht 1 μg)

2 μL *Sall* bzw. *NcoI*

2 μL 10x Restriktionspuffer

8,3 μL HPLC-Wasser

$V_{\text{Ges}} = 20 \mu\text{L}$

5 μL des Restriktionsansatzes wurden anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen um die erfolgreiche Restriktion zu überprüfen. Im Falle einer erfolgreichen Restriktion wurde das Restriktionsgemisch über Nacht mit 100 % EtOH gefällt um restliche Salze und Enzyme zu entfernen.

6.1.2.6 *In vitro* Transkription und RNA-Fällung

MAXIscript® SP6/T7 Kit^[5]:

Ein Mikrogramm des gefällten, linearisierten Restriktionsansatzes wurde anschließend für die *In vitro* Transkription eingesetzt. Je nach Konzentration des Fällprodukts musste mit HPLC-Wasser auf 13 µL aufgefüllt werden. Der Ansatz der mit NcoI restringiert wurde, wurde mit SP6-Transkriptase transkribiert, der mit Sall restringiert entsprechend mit T7-Transkriptase. Der Ansatz der IVT war wie folgt:

13 µL linearisierte Matrize AB_3

4x 1 µL 10mM rNTP's

2 µL 10x Transkriptionspuffer

1 µL Transkriptase (T7/SP6)

$V_{\text{Ges}} = 20 \mu\text{L}$

Nach erfolgter IVT (bei 37 °C für 1 Stunde im Wasserbad) muss das Matrize durch Zugabe von 1 µL TURBO-DNase (15 Minuten bei 37 °C) verdaut werden. Abschließend wird zur Aufreinigung der Ansatz gefällt. Hierzu gibt man 80 µL HPLC-Wasser, 10 µL LiCl (8 M) und 250 µL EtOH (100%) hinzu und verfährt anschließend wie bei der DNA-Fällung weiter.

Die gefällte RNA wird in 20 µL HPLC-Wasser gelöst und mit dem Bioanalyzer 2100 von Agilent analysiert.

MEGAscript® SP6 Kit:

Um größere Mengen an RNA zu transkribieren wurde später das MEGAscript SP6-Kit verwendet. Für die Transkription mit T7-Transkriptase wurde das Enzym aus dem MAXIscript verwendet. Für den MEGAscript-IVT-Ansatz wurden dabei mehr Matrize, mehr Transkriptase, höher konzentrierte rNTP's und längere Inkubationszeiten benötigt.

21 µL linearisiertes Matrize AB_3

3 µL Transkriptase (SP6/T7)

3 µL 75 mM rNTP's

3 µL 10x Transkriptionspuffer

$V_{\text{Ges}} = 30 \mu\text{L}$

Nachdem der IVT-Ansatz für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert, wurde dieser wie oben beschrieben mittels RNA-Fällung aufgereinigt. Das Präzipitat wurde in 100 µL HPLC-Wasser gemessen, a 4x25 µL aliquotiert und mittels Bioanalyzer analysiert.

6.2 Prüfung der Priming-Spezifität des ODNs und des ODN-RNase-Konjugats durch radioaktive cDNA-Synthese

6.2.1 Reines 46-basenlanges ODN und ODN-RNase-Konjugat

Die ersten Versuche zur Bestimmung der Priming-Spezifität des ODN-RNase-Konjugats fanden zunächst mit dem reinen 46-basenlangem ODN (SP DNA) an der Target-IVT-RNA und der Komp.-IVT-RNA statt. Dazu wurden jeweils 0,5 µg der Target-IVT-RNA und 0,5 µg der Komp.-IVT-RNA als Matrize für die cDNA-Synthese eingesetzt. Als Primer dienten in beiden Fällen 60 ng an reinem ODN. Die rNTPs wurden im Überschuss von 10 mM eingesetzt, wobei das ATP mit α -³²P radioaktiv markiert war. Der Ansatz wurde mit HPLC-Wasser auf 13 µL aufgefüllt und für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Danach wurden 4 µL 5x FS-Buffer, 1 µL 0,1 M DTT und 1 µL an SSIII-Reverse Transkriptase^[9] hinzugegeben und für eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Der Ansatz ist nachfolgend kurz zusammengefasst.

8 µL IVT-RNA als Matrize (1 µg)

1 µL ODN (60 ng) bzw. 1 µL ODN-RNase (46 ng)

1 µL 10mM rNTPs (Ohne ATP)

4 µL 2,5 mM α -³²P-ATP

65 °C für 5 Minuten

4 µL 5x FS-Buffer

1 µL 0,1 M DTT

1 µL SSIII Reverse Transkriptase

$V_{\text{Ges}} = 20 \mu\text{L}$

Der komplette Ansatz wurde anschließend mittels Fällung aufgereinigt. Hierzu gab man 160 µL HPLC-Wasser, 20 µL Dialyse-Puffer und 550 µL EtOH (100%) dazu und stellte das Gemisch über Nacht bei 4°C in den Kühlschrank. Am nächsten Morgen wurde standardmäßig wie bei jeder Fällung weiterverfahren. Außerdem wurde ebenfalls die radioaktive Strahlung (in Becquerel) vor der Fällung, nach der Fällung (Pellet und Überstand)

sowie nach dem Waschschritt mit 70%igem EtOH gemessen. Das Pellet wurde anschließend in 20 µL HPLC-Wasser gelöst wovon die Hälfte mit 10 µL 2x RNA-Ladepuffer (enthält bereits Ethidiumbromid) auf ein denaturierendes RNA-Gel gegeben wurde. In Tabelle sind die einzelnen Werte zusammengefasst.

Tabelle 6-51: Übersicht über die radioaktive Strahlung während der Aufreinigung des cDNA-Ansatzes

	ODN + „Komp.-IVT“	ODN + „Target-IVT“	ODN-RNase + „Komp.-IVT“	ODN-RNase + „Target-IVT“
Vor der Fällung	4000 Bq	6500 Bq	4400 Bq	3600 Bq
Nach der Fällung (Pellet)	1400 Bq	6000 Bq	1300 Bq	1250 Bq
Nach der Fällung (Überstand)	2000 Bq	200 Bq	2100 Bq	2000 Bq
Nach dem Waschen (Pellet)	1200 Bq	5000 Bq	1300 Bq	1000 Bq
Nach dem Waschen (Überstand)	100 Bq	40 Bq	100 Bq	160 Bq
Lösen in 20 µL HPLC-H ₂ O	1000 Bq	5400 Bq	900 Bq	600 Bq
10 µL gelöste Probe + 10 µL LP	300 Bq	1600 Bq	260 Bq	100 Bq

6.2.2 ODN-RNase-Konjugat

Als nächstes wurde das Experiment nur mit dem ODN-RNase Konjugat durchgeführt. Dabei sind der Ansatz zur radioaktiven cDNA-Synthese sowie die anschließende Fällung exakt gleich zu 4.2.3.1. und wird daher nicht nochmal angegeben. Die gemessenen radioaktiven Strahlungen sind in nachfolgender Tabelle angegeben:

Tabelle 6-52: Übersicht über die radioaktive Strahlung während der Aufreinigung des cDNA-Ansatzes

	ODN-RNase + Komp.IVT-RNA	ODN-RNase + Target-IVT-RNA
Vor der Fällung	1500 Bq	2500 Bq
Nach der Fällung (Pellet)	300 Bq	1000 Bq
Nach der Fällung (Überstand)	1000 Bq	1500 Bq
Nach dem Waschen (Pellet)	100 Bq	500 Bq
Nach dem Waschen (Überstand)	100 Bq	100 Bq
Lösen in 20 µL HPLC-H ₂ O	100 Bq	500 Bq

Die gelösten Proben wurden ebenfalls mit 2x RNA-Ladepuffer versetzt und auf ein denaturierendes, 1,2%iges RNA-Gel aufgetragen. Ferner wurden zusätzlich noch die reine, unbehandelte RNA sowie eine 100b Leiter zur Orientierung aufgetragen.

Das Experiment wurde um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten identisch wiederholt. Auf das denaturierende Gel wurden dabei die Proben sowohl denaturiert als auch nicht denaturiert aufgetragen. Auch die reine, unbehandelte RNA wurde denaturiert und nicht denaturiert auf das Gel geladen.

6.3 Prüfung der Enzymaktivität der RNase und des ODN-RNase-Konjugats

6.3.1 Enzymaktivität der blockierten RNase „Cys-ZFY-6-Acm“

Die ersten enzymatischen Tests wurden mit der Acm-geschützten RNase Cys-ZFY-6-Acm (bei welcher die beiden Cysteine Cys6 und Cys9 durch Acm-Schutzgruppe blockiert sind) an HeLa-RNA durchgeführt. Hierzu wurden 500 ng HeLa-RNA vorgelegt und mit 10 µL der RNase Cys-ZFY-6-Acm (in 0,1 M PBS-Puffer; pH=7,6) in der oxidierten und reduzierten Form in unterschiedlich hohen Konzentration für unterschiedliche Zeitintervalle bei 60 °C inkubiert. In der untenstehenden Tabelle sind die unterschiedlichen Reaktionsparameter angegeben.

Tabelle 6-27: Übersicht über die Inkubationsbedingungen

	Zeit	Konzentration RNase Cys-ZFY-6-Acm	Molverhältnis $n_{RNase}:n_{RNA}$
Cys-ZFY-6-Acm (Red.)	1 Minute	1 nM	Ca. 1000:1
Cys-ZFY-6-Acm (Red.)	5 Minuten	1 nM	Ca. 1000:1
Cys-ZFY-6-Acm (Red.)	15 Minuten	1 nM	Ca. 1000:1
Cys-ZFY-6-Acm (Red.)	1 Minute	1 pM	Ca. 1:1
Cys-ZFY-6-Acm (Red.)	5 Minuten	1 pM	Ca. 1:1
Cys-ZFY-6-Acm (Red.)	15 Minuten	1 pM	Ca. 1:1
Cys-ZFY-6-Acm (ox.)	1 Minute	1 nM	Ca. 1000:1
Cys-ZFY-6-Acm (ox.)	5 Minuten	1 nM	Ca. 1000:1
Cys-ZFY-6-Acm (ox.)	15 Minuten	1 nM	Ca. 1000:1
Cys-ZFY-6-Acm (ox.)	1 Minute	1 pM	Ca. 1:1
Cys-ZFY-6-Acm (ox.)	5 Minuten	1 pM	Ca. 1:1

Die Proben wurden anschließend mit Hilfe des Bioanalyzers 2100 von Agilent auf einem Pico 6000 RNA-Chip analysiert.

6.3.2 Enzymaktivität der RNase „Cys-ZFY-6“

6.3.2.1 Reduzierte Form (Monomer)

Die RNase ZFY-6 wurde zunächst in ihrer reduzierten Form als Monomer, d.h. mit freien Thiolgruppen an den Cysteinen Cys6 und Cys9, auf ihre Enzymaktivität getestet. Dabei dienten unterschiedliche Puffer und Wasser als Reaktionsmedien. In folgender Tabelle sind die einzelnen Variationen der Reaktionsparameter dargestellt. Dabei wurden bei jeder Reaktion 200 ng RNA (S2) vorgelegt und für die jeweilige Zeit im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die RNase lag somit im ca. 150fachen Überschuss vor.

Tabelle 6-.28: Übersicht über die unterschiedlichen Reaktionsparameter

Medium	Zeit	Konzentration	Menge	Code
1x TBE Puffer	½ Stunde	1 µg/µL	500 ng	T-Red ½
Wasser	½ Stunde	1 µg/µL	500 ng	H-Red ½
Zinkchlorid	½ Stunde	1 µg/µL	500 ng	Z-Red ½
1x TBE Puffer	1 Stunde	1 µg/µL	500 ng	Z-Red 1
Wasser	1 Stunde	1 µg/µL	500 ng	H-Red 1
Zinkchlorid	1 Stunde	1 µg/µL	500 ng	Z-Red 1
1x TBE-Puffer	2 Stunden	1 µg/µL	500 ng	T-Red 2
Wasser	2 Stunden	1 µg/µL	500 ng	H-Red 2
Zinkchlorid	2 Stunden	1 µg/µL	500 ng	Z-Red 2

Die Proben wurden anschließend mit Hilfe des Bioanalyzers 2100 von Agilent auf einem Pico 6000 RNA-Chip analysiert.

6.3.2.2 Oxidierte Form (Dimer)

Die RNase ZFY-6 wurde ebenfalls in ihrer oxidierten Form auf ihrer Enzymaktivität analysiert. Dabei liegen die Cysteine nicht mehr als Thiole sondern als Disulfidbrücken vor. Die Oxidation der RNase erfolgte für mehrere Tage durch Einleiten von elementarem Sauerstoff in die Lösung. Dabei wurden zur Analyse des Oxidationsfortschrittes Precast NuPAGE® Novex® 12% Bis-Tris-Gele verwendet. Als Laufpuffer für die Gele diente 1x MES-Puffer. Die RNase wurde in verschiedenen Lösungen mehrere Tage oxidiert.

Tabelle 6-29: Oxidation der RNase ZFY-6 durch Einleitung von Sauerstoff

Medium	Oxidationsdauer	Code
1x TBE Puffer	1 Tag	T01
Wasser	1 Tag	H01
Zinkchlorid	1 Tag	Z01
1x TBE Puffer	3 Tage	T03
Wasser	3 Tage	H03
Zinkchlorid	3 Tage	Z03
1x TBE Puffer	5 Tage	T05
Wasser	5 Tage	H05
Zinkchlorid	5 Tage	Z05

Zur Analyse der Enzymaktivität setzte man (aufgrund des Oxidationsfortschritts) nur jene Proben ein, welche für 3 bzw. 5 Tage oxidiert wurden. Hierzu wurden zu jeweils 4 μL IVT-RNA-Matrize S3 (entspricht 300 ng) 1 μL RNase (250 ng) gegeben und für ein bis zwei Stunden bei 37 °C in dem jeweiligen Medium inkubiert. Die RNase lag somit im ca. 30fachen Überschuss vor.

Tabelle 6-30: Reaktionsparameter zur Degradierung der IVT-RNA durch die oxidierte RNase Cys-ZFY-6

RNase-Proben:	Medium	Inkubationsdauer	Code
T03	1x TBE Puffer	1 Stunde	T3 1h
H03	Wasser	1 Stunde	H3 1h
Z03	Zinkchlorid	1 Stunde	Z3 1h
T03	1x TBE Puffer	2 Stunden	T3 2h
H03	Wasser	2 Stunden	H3 2h
Z03	Zinkchlorid	2 Stunden	Z3 2h
T05	1x TBE Puffer	1 Stunde	T5 1h
H05	Wasser	1 Stunde	H5 1h
Z05	Zinkchlorid	1 Stunde	Z5 1h
H05	Wasser	2 Stunden	H5 2h

Die Analyse der Reaktionen zur RNase-Aktivität wurde mit Hilfe eines Bioanalyser 2100 von Agilent auf einem Pico 6000 RNA Chip bewerkstelligt.

Änderung des Reaktionsmediums und der zu degradierenden RNA:

Lima verwendete^[6] als Reaktionspuffer 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Kaliumchlorid, 1 mM EDTA und 0,1 % NP-40. Die nachfolgenden Reaktionen wurden analog dazu angesetzt. Zu Beginn fanden die Reaktionen allerdings ohne NP-40 statt.

Im nachfolgenden Experiment wurden jeweils 0,5 µg der oxidierten RNasen T05, H05 und Z05 an 0,7 µg der Total-RNA von *Chironomus thummi* (*C.thummi*) in dem oben genannten Phosphatpuffer getestet. Wenn man von einer ungefähren, gemittelten Nukleotidlänge von 3000 Basen der RNA und somit von einer ungefähren Molmasse von 1.000.000 g/mol ausgeht, liegt die RNase im ca. 100fachen Überschuss vor. In nachfolgender Tabelle sind die einzelnen Reaktionsparameter angegeben.

Tabelle 6-31: Reaktionsparameter zur Degradierung der Total-RNA von *C. thummi* durch die oxidierte RNase Cys-ZFY-6

RNase	RNA:	Inkubationsdauer	Code
T05	Total-RNA <i>C. thummi</i>	½ Stunde	T ½
H05	Total-RNA <i>C. thummi</i>	½ Stunde	H ½
Z05	Total-RNA <i>C. thummi</i>	½ Stunde	Z ½
T05	Total-RNA <i>C. thummi</i>	1 Stunde	T1
H05	Total-RNA <i>C. thummi</i>	1 Stunde	H1
Z05	Total-RNA <i>C. thummi</i>	1 Stunde	Z1
T05	Total-RNA <i>C. thummi</i>	2 Stunden	T2
H05	Total-RNA <i>C. thummi</i>	2 Stunden	H2
Z05	Total-RNA <i>C. thummi</i>	2 Stunden	Z2
H05	Total-RNA <i>C. thummi</i>	3 Stunden	H3

Da zu Beginn der RNA-Degradierungsreaktionen das Detergenz NP-40 im Phosphatpuffer nicht enthalten war, wurde dies in folgendem Experiment hinzugegeben. Ferner wurden auf 1,5 µg Total-RNA 5 µg RNase H05 hinzugegeben (RNase Überschuss: 500) bzw. zur Blindprobe entsprechend Wasser und für unterschiedliche Zeitintervalle bei 37 °C inkubiert. In nachfolgender Tabelle ist dies verdeutlicht.

Tabelle 6-32: Übersicht über den Reaktionsaufbau

RNase	RNA:	Inkubationsdauer	Code
H05	Total-RNA C. thummi	1 Stunde	1 RNase
Blindprobe	Total-RNA C. thummi	1 Stunde	2
H05	Total-RNA C. thummi	3 Stunden	3 RNase
Blindprobe	Total-RNA C. thummi	3 Stunden	4
H05	Total-RNA C. thummi	5 Stunden	5 RNase
Blindprobe	Total-RNA C. thummi	5 Stunden	6
H05	Total-RNA C. thummi	7 Stunden	7 RNase
Blindprobe	Total-RNA C. thummi	7 Stunden	8
H05	Total-RNA C. thummi	Über Nacht	9 RNase
Blindprobe	Total-RNA C. thummi	Über Nacht	10

Die Analyse geschah sowohl durch ein 1,2%iges denaturierendes Agarosegel als auch über einen Pico 6000 RNA durch den Agilent Bioanalyser.

RNase A:

Um die generelle Verdaubarkeit der durch In vitro Transkription hergestellten RNA zu testen wurden jeweils 750 ng der „Kom.-IVT-RNA“ mit 20 µg der kommerziell erhältlich RNase A zur Reaktion gebracht. Die RNase A lag somit im 500fachen Überschuss vor. Die Inkubationszeiten bei 37 °C im Wasserbad betragen 1, 2, 4, 8, 16, 30 und 60 Minuten.

6.3.3 Enzymaktivität des ODN-RNase-Konjugats

6.3.3.1 Zinkchlorid als Reaktionsmedium

Die ersten Enzymaktivitätstests mit dem ODN-RNase-Konjugat fanden sowohl mit der Target-IVT-RNA (Restriktion durch *NcoI* und IVT durch SP6-Polymerase) als auch mit der dazu komplementären IVT-RNA (Restriktion durch *Sall* und T7-Polymerase) statt. Dazu wurde zunächst nach Zugabe des ODN-RNase-Konjugats ($c = 7,8 \text{ ng}/\mu\text{L}$) bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für ca. zwei Stunden hybridisiert. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 4, 8, 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten inkubiert. Die nach dem jeweiligen Zeitintervall aus der Reaktionslösung herausgenommenen $3 \text{ } \mu\text{L}$ („Probenziehen“) wurden direkt gekühlt. Das ODN-RNase-Konjugat lag dabei leicht in 1,5molarem Überschuss vor. Die nachfolgende Tabelle gibt Aufschluss über die einzelnen Reaktionsparameter.

Tabelle 6-33. Übersicht über die verschiedenen Reaktionsparameter der Degradierung der durch SP6-Polymerase transkribierten IVT-RNA (Target-IVT-RNA)

RNA	Menge RNA	Inkubationsdauer	ODN-RNase	Code
Target-IVT-RNA	1,4 μg	0 Minuten	0,11 μg	N0
Target-IVT-RNA	1,4 μg	0 Minuten (nach Konjugatzugabe)	0,11 μg	N0,1
Target-IVT-RNA	1,4 μg	4 Minuten	0,11 μg	N4
Target-IVT-RNA	1,4 μg	8 Minuten	0,11 μg	N8
Target-IVT-RNA	1,4 μg	15 Minuten	0,11 μg	N15
Target-IVT-RNA	1,4 μg	30 Minuten	0,11 μg	N30
Target-IVT-RNA	1,4 μg	1 Stunde	0,11 μg	N1
Target-IVT-RNA	1,4 μg	2 Stunden	0,11 μg	N2
Target-IVT-RNA	1,4 μg	4 Stunden	0,11 μg	N4

Tabelle 6-34: Übersicht über die verschiedenen Reaktionsparameter der Degradierung der durch T7-Polymerase transkribierten IVT-RNA („Komp. IVT-RNA“)

RNA	Menge RNA	Inkubationsdauer	ODN-RNase	Code
Komp. IVT-RNA	1,4 µg	0 Minuten	0,11 µg	S0
Komp. IVT-RNA	1,4 µg	0 Minuten (nach Konjugatszugabe)	0,11 µg	S0,1
Komp. IVT-RNA	1,4 µg	4 Minuten	0,11 µg	S4
Komp. IVT-RNA	1,4 µg	8 Minuten	0,11 µg	S8
Komp. IVT-RNA	1,4 µg	15 Minuten	0,11 µg	S15
Komp. IVT-RNA	1,4 µg	30 Minuten	0,11 µg	S30
Komp. IVT-RNA	1,4 µg	1 Stunde	0,11 µg	S1
Komp. IVT-RNA	1,4 µg	2 Stunden	0,11 µg	S2
Komp. IVT-RNA	1,4 µg	4 Stunden	0,11 µg	S4

Die Analyse der Abbauprodukte erfolgte durch ein 1,2%iges RNA-Gel sowie durch RNA 6000 Pico Chip auf dem Bioanalyser von Agilent

6.3.3.2 Lima's Phosphatpuffer als Reaktionsmedium

a) Verwendung hoher Mengen an RNA zur Analyse mittels Gelelektrophorese

Als Reaktionsmedium wurde der Phosphatpuffer (plus KCL, EDTA, NP-40) von Lima^[6] anstatt Zinkchlorid verwendet. Es wurden drei unterschiedliche Ansätze durchgeführt, wobei die Molverhältnisse RNA zu ODN-RNase einerseits äquimolar und andererseits die RNA doppelt-überschüssig eingesetzt wurden. Die Mengen an eingesetzter RNA wurden zur erfolgreichen Analyse mittels 1,2 % Agarose-RNA-Gel deutlich erhöht. So wurden je Ansatz 12,5 µg Target-IVT-RNA und 0,9 µg bzw. 0,45 µg ODN-RNase eingesetzt. Die Inkubationszeiten im 37 °C Wasserbad betragen 0, 1, 3, 5 und 7 Stunden sowie über Nacht. Nachfolgende Tabelle fasst die Reaktionsansätze übersichtlich zusammen.

Tabelle 6-42: Übersicht über die verschiedenen Reaktionsparameter der Degradierung der Target-IVT-RNA bei äquimolarem ODN-RNase-Einsatz

RNA	Menge RNA	Inkubationsdauer	ODN-RNase	Code
Target-IVT-RNA	12,5 µg	0 Stunden	0,9 µg	1.0
Target-IVT-RNA	12,5 µg	1 Stunde	0,9 µg	1.1
Target-IVT-RNA	12,5 µg	3 Stunden	0,9 µg	1.3
Target-IVT-RNA	12,5 µg	5 Stunden	0,9 µg	1.5
Target-IVT-RNA	12,5 µg	7 Stunden	0,9 µg	1.7
Target-IVT-RNA	12,5 µg	Über Nacht	0,9 µg	1 ün

Tabelle 6-43: Übersicht über die verschiedenen Reaktionsparameter der Degradierung der Target-IVT-RNA bei semi-äquimolarem ODN-RNase-Einsatz

RNA	Menge RNA	Inkubationsdauer	ODN-RNase	Code
Target-IVT-RNA	12,5 µg	0 Stunden	0,45 µg	2.0
Target-IVT-RNA	12,5 µg	1 Stunde	0,45 µg	2.1
Target-IVT-RNA	12,5 µg	3 Stunden	0,45 µg	2.3
Target-IVT-RNA	12,5 µg	5 Stunden	0,45 µg	2.5
Target-IVT-RNA	12,5 µg	7 Stunden	0,45 µg	2.7
Target-IVT-RNA	12,5 µg	Über Nacht	0,45 µg	2 ün

Ferner wurden ebenfalls 12,5 µg an Target-IVT-RNA unter gleichen Bedingungen ohne ODN-RNase-Zusatz als Blindprobe inkubiert. Die entsprechenden Abkürzungen sind hierfür 3.0, 3.1, 3.3, 3.5, 3.7 und 3 üN. Die Analyse der RNA-Degradierung erfolgte anschließend über ein denaturierendes, 1%iges Agarose-RNA-Gel sowie über den Agilent Bioanalyser 2100 (RNA Pico 6000 Chip).

b) Radioaktive Markierung der 5'-Enden

In folgendem Experiment sollte die Target-IVT-RNA vor der Degradierung mit dem ODN-RNase-Konjugat radioaktiv am 5'-Ende markiert werden. Dazu wurden 10 µg an Target-IVT-RNA eingesetzt und nach Protokoll^[7] mit der Alkalischen Phosphatase am 5'Ende dephosphoryliert.

10 µL Target-IVT-RNA (= 10 µg)

30 µL HPLC-Wasser

5 µL 10x FastAP-Puffer

5 µL FastAP-Enzym (5 Units)

V_{Ges} = 50 µL

Nach erfolgter RNA-Fällung und Lösen in 20 µL HPLC-Wasser wurde der Ansatz nach Protokoll^[8] mit Hilfe des Enzyms T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK) radioaktiv phosphoryliert.

20 µL Target-IVT-RNA (5'-Ende dephosphoryliert)

4,5 µL 10x Puffer A

1 µL T4 PNK

20 µL *γ-ATP

V_{Ges} = 45,5 µL

Nach erneuter RNA-Fällung und Lösen in 20 µL „Lima's“-Phosphatpuffer wurde die nun am 5'-Ende radioaktiv markierte Target-IVT-RNA mit dem ODN-RNase-Konjugat äquimolar bei 37 °C in unterschiedliche Zeitintervallen inkubiert. Nachfolgende Tabelle gibt Aufschluss über die Reaktionsbedingungen.

Tabelle 6-50: Übersicht über die verschiedenen Reaktionsparameter der Degradierung der am 5'-Ende radioaktiv markierten *Target-IVT-RNA bei äquimolarem ODN-RNase-Einsatz

RNA	Menge RNA	Inkubationsdauer	ODN-RNase	Code
*Target-IVT-RNA	1,6 µg	0 Stunden	0,14 µg	*0h
*Target-IVT-RNA	1,6 µg	1 Stunde	0,14 µg	*1h
*Target-IVT-RNA	1,6 µg	3 Stunden	0,14 µg	*3h
*Target-IVT-RNA	1,6 µg	5 Stunden	0,14 µg	*5h
*Target-IVT-RNA	1,6 µg	7 Stunden	0,14 µg	*7h
*Target-IVT-RNA	1,6 µg	Über Nacht	0,14 µg	*üN
*Target-IVT-RNA	1,6 µg	3 Stunden	-	*B5h
*Target-IVT-RNA	1,6 µg	7 Stunden	-	*B7h
*Target-IVT-RNA	1,6 µg	Über Nacht	-	*BüN

Die Analyse erfolgte anschließend über ein denaturierendes 1,2 %iges Agarose-Gel, bei dem die reine unbehandelte Target-IVT-RNA und ein Marker ebenfalls aufgetragen wurden.

6.4 Methoden und Materialien

6.4.1 Chemische Analysemethoden

6.4.1.1 GPC-Messungen

Die DNA und DNA-RNase-Konjugate wurden zunächst mit einer Polymersäule auf Polyhydroxymethacrylat-Basis der Firma Shodex (OHpaq SB-804 HQ) vermessen. Dabei betrug die Partikelgröße des Säulenmaterials 10 µm, die Säulenlänge 300 mm und der Durchmesser 8,0 mm. Das Laufmittel, bestehend aus 10 mM TRIS-HCl-Puffer (pH=7,4) und 0,2 M NaCl, wurde mit einem EC3114 Degasser entgast und mit einer Pumpe der Firma Hitachi (Modell L7100) über einen 40 °C warmen Ofen bei einem Fluss von 0,5 mL/min über die Säule zum UV Detektor (UV Waters 481) befördert.

Danach wurden die DNA und DNA-RNase-Konjugate mit einer GPC-Säule PROTEEMA 300Å von der Firma PSS gemessen. Die Partikelgröße betrug 5 µm, die Länge lag bei 300 mm und der Durchmesser bei 8,0 mm. Das Laufmittel und die Flussraten wurden je nach Bedarf variiert. So wurden in reinem MilliQ-Wasser, in PBS-Pufferlösungen und in Wasser/Methanol-Mischungen bei einem Fluss zwischen 0,3 mL/min und 0,5 mL/min Messungen durchgeführt. Der Aufbau der GPC-Anlage ist wie oben beschrieben der gleiche, lediglich Säule, Laufmittel und Flussrate wurden verändert.

6.4.1.2 HPLC-Messungen

Zur Charakterisierung der RNase ZFY-6 wurde von der Firma Grace Davison Discovery Sciences die Säule Vydac 218TP C18 mit einer Partikelgröße von 5µm verwendet. Die Länge der Säule betrug 250 mm, der Durchmesser 4,6 mm. Als Eluent A wurde 0,1% TFA, 1% AcCN in Wasser, als Eluent B 0,1% TFA in AcCN verwendet, wobei der Gradient von 10% B auf 40% B innerhalb von 40 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min variiert wurde. Die Laufmittel werden mit einem EC3114 Degasser entgast und mit einer Pumpe L7100 der Firma Hitachi über einen Ofen bei 60 °C zum Detektor (UV Waters 481 Detektor) transportiert und bei einer Wellenlänge von 220 nm vermessen.

6.4.1.3 MALDI-TOF-MS

Die MALDI-TOF-MS-Messungen wurden in 1,8,9-Trihydroxyanthracen (Dithranol), 2-(4'-Hydroxybenzazo)benzoesäure (HABA), 2,3,4-Trihydroxyacetophenon (THAP), 2,4,6-THAP und/oder α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA) durchgeführt. Ca. 1 μ g des Analyten wurde in 1 mL THF oder Chloroform gelöst und mit der Matrix (25 g/L) äquimolar gemischt. 1 μ L dieser Lösung wurden auf dem metallischen Träger an Luft getrocknet. Das hier im Institut verwendete Gerät stammt von der Firma Micromass (Bruker REFLEX; Micromass ToFSpec E). Die Messungen fanden zumeist im Reflektionsmodus statt, es konnte aber auch linear gemessen werden.

Proben welche nicht mit dem obengenannten, institutsangehörigen Gerät vermessen wurden konnten, wurden zu je 100 μ L einer 1-10 μ M-Lösung in MilliQ-Wasser bzw. in 1x TBE-Puffer aliquotiert und an die Firma ████████ in Ulm geschickt. Das dort verwendete Gerät ist von der Firma Shimadzu, die Matrix welche verwendet wurde ist eine Mischung aus 2,3,4-THAP und 2,4,6-THAP.

6.4.1.4 CE-Messungen

Die Analysen durch Kapillarelektrophorese (CE) wurden mit Hilfe einer Apparatur der Firma Agilent Technologies (Modell G7100A) durchgeführt. Die im UV-Detektor (im Gerät integriert) gemessenen Wellenlängen lagen zwischen 200 nm und 280 nm. Es wurde falls nicht anders angegeben bei 20 °C in Natriumboratpuffer (pH=9,2) gemessen.

6.4.1.5 UV/Vis-Spektroskopie

Die Konzentrationen der DNA bzw. der DNA-Peptide wurden mit Hilfe eines Eppendorf Biophotometers bestimmt. Der Wert der Absorption bei 260nm wurde dazu bei der ssDNA mit der optischen Dichte (37 μ g/mL) multipliziert. Da die Absorption der Peptidketten (beim DNA-RNase-Konjugat) von der der ssDNA abweicht, besteht hier ein geringer statistischer Fehler, welcher aber für die Auftragung der Proben auf die analytische PAGE vernachlässigt werden kann.

Ferner wurde zur Bestimmung der DNA- und Peptid-Konzentration bzw. zur Messung der entsprechenden Absorptionsdiagramme bei einer Wellenlänge von 200-700 nm das UV/Vis-Gerät Carry 100Bio UV-VIS-Spectrophotometer der Firma Virian verwendet. Je nach Konzentration wurden die Proben verdünnt oder unverdünnt in den beiden verschiedenen Kammern der „Micro-Rotaphor™ Preparative IEF-Cell“ gemessen.

6.4.2 Molekularbiologische Materialien und Methoden

6.4.2.1 Färbemittel und -methoden

a) GelRed

Zur Herstellung der GelRed-Stammlösung wurden 75 µL GelRed™ (10000x in DMSO) von der Firma Biotium in 250 mL MilliQ-Wasser gelöst. Die Stammlösung wird solange verwendet bis ein deutlicher Performanceverlust erkennbar ist. Meist ist das durch ein mangelndes Anfärben des Markers zu beobachten. Die Gele aus der PAGE wurden zwischen 12-15 Minuten in der Färbelösung unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend im Transilluminator von PeqLab fotografiert. Als Auswerteprogramm diente E-Capt der Firma ImageCraft.

b) Ethidiumbromid

Als Alternative zur GelRed-Färbung diente eine 1%ige Ethidiumbromid-Färbelösung. Hierzu werden 1 mL der Ethidiumbromid-Stammlösung in einem Liter Elektrophoresepuffer (bestehend aus 0,36 M TRIS, 0,3 M Natriumdihydrogenphosphat und 0,1 M EDTA-Dinatriumsalz) gelöst. Wie auch bei den durch GelRed-gefärbeten Gelen wurden auch diese unter einem Transilluminator (Bachofer) fotografiert und mit dem Auswerteprogramm Carestream analysiert.

c) Stains All

Es wurden zur Herstellung der 0,1%igen Stock Solution 50 mg Stains All eingewogen und in 50 mL Formamid (pH=7,3) gelöst. Diese wurde anschließend 1:20 mit der Verdünnungslösung, bestehend aus 10% Formamid, 25% Isopropanol und 15 mM TRIS-HCl-Lösung, auf pH=8,8 verdünnt. Die letztendliche Färbelösung bestand somit aus 20 mL Stock Solution, 40 mL Formamid, 100 mL Isopropanol, 728 mg TRIS-HCl und 240 mL MilliQ-Wasser. Die selbstgegossenen Polyacrylamid-Gele wurden über Nacht unter Lichtausschluss gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Gele unter Lichteinfluss solange ausgebleicht bis der Hintergrund verschwand und eindeutige Banden erkennbar waren.

d) Ruby Stain

SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Molecular Probes) ist eine direkt verwendbare, einfache und sehr sensitive (bis 1 ng) Methode um Proteine zu färben. Ein weiterer großer Vorteil ist hierbei dass es ausschließlich Proteine anfärbt, Nukleinsäuren (sowohl DNA als auch RNA) werden im Gegensatz zur Silberfärbung nicht angefärbt, da es ausschließlich an basische Aminosäuren und das Polypeptidrückgrat bindet. Hierzu muss das Gel zunächst zweimal mit jeweils 100 mL Fixierlösung (50% Methanol und 7% Essigsäure) für je 30 Minuten unter schütteln fixiert werden. Das fixierte Gel wird anschließend über Nacht mit 60 mL Ruby Stain unter ständigem Schütteln gefärbt. Am nächsten Morgen wird das Gel mit 100 mL Waschlösung (10% Methanol und 7% Essigsäure) für 30 Minuten geschüttelt und abschließend fotografiert

e) Silver Staining

Zur Silberfärbung wurde das SilverQuest™ Silver Staining Kit von Invitrogen verwendet. Hierzu wurde nach beendeter Elektrophorese das Gel in 100 mL der Fixierlösung (40% Ethanol, 10 % Essigsäure) über Nacht leicht geschüttelt. Längeres Fixieren hat in vielen Fällen den Vorteil, dass die Sensitivität deutlich erhöht wird, da störende Ionen und Detergenzien entfernt werden und die Diffusion der Proteine in der Gelmatrix reduziert wird. Am nächsten Morgen wurde die Fixierlösung dekantiert und mit 30%igem Ethanol für 10 Minuten gewaschen. Die Waschlösung wird verworfen und 100 mL der „Sensitizer-Solution“ (30% Ethanol, 10% „Sensitizer“, 60% Wasser) wird unter Schütteln für 10 Minuten

hinzugegeben. Anschließend wird die „Sensitizer-Solution“ dekantiert und mit 30%igem Ethanol und darauffolgend mit Wasser für jeweils 10 Minuten gewaschen. Nun wird das Gel in der letztendlichen Färbelösung (1% Stainer, 99% Wasser) für 15 Minuten inkubiert. Hierbei lagern sich die in der „Stainer-Solution“ vorhandenen Silberionen an die Proteine an. Nachdem das Färben beendet ist wird die Lösung verworfen und mit Wasser für 20-60 Sekunden gewaschen. Zu langes Waschen kann eventuell Silber-Ionen aus dem Gel waschen und die Sensitivität erniedrigen. Dies ist auch bei zu kurzem Waschen aufgrund des höheren Backgrounds der Fall. Abschließend muss das Gel noch entwickelt werden, in dem die an die Proteine angelagerten Silber-Ionen mit der „Developing-Solution“ (10% „Developer“, 1 Tropfen „Developer Enhancer“, 90% Wasser) zu Silber reduziert werden. Die Entwicklung der Banden wird nach Auftreten der gewünschten Banden nach 4-8 Minuten durch Zugabe von 10 mL der „Stopp-Solution“ beendet.

f) SimplyBlue™ SafeStain

SimplyBlue™ SafeStain der Firma Invitrogen ist eine direkt verwendbare, einfache und schnelle Möglichkeit Proteine nach erfolgter Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Coomassie Blue G-250 anzufärben. Dabei wird das Gel einfach in der SimplyBlue™ SafeStain-Lösung über Nacht geschüttelt und am nächsten Morgen analysiert.

6.4.2.2 Puffer und andere molekularbiologische Materialien

a) Puffer

1x TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer):

Der 10x TBE-Puffer wurde von der Firma Roth kommerziell erworben und entsprechend 1:10 verdünnt. Der 10x TBE-Puffer besteht aus 1,0 M Tris-Borat und 20 mM EDTA in destilliertem, deionisiertem Wasser; pH 8,3.

1x PBS-Puffer (Phosphate buffered saline):

Der PBS-Puffer enthält 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Phosphationen (in Form von HPO_4^{2-} und H_2PO_4^-). Dazu wurden 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na_2HPO_4 , 1,78 g NaH_2PO_4 und 0,27 g KH_2PO_4 eingewogen und auf einen Liter mit MilliQ-Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit HCl bzw. NaOH auf 7,4 eingestellt.

1x MES-Puffer (2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure):

Der NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X) wurde kommerziell von der Firma Life Technologies erworben. Um den einfachen Elektrophorese-Laufpuffer zu erhalten wurde dieser entsprechend 1:20 verdünnt. Somit enthält der 1x MES-Puffer 50 mM MES, 50 mM TRIS, 0.1% SDS, 1 mM EDTA bei einem pH-Wert von 7,3.

1x MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure):

Der NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X) wurde ebenfalls kommerziell von der Firma Life Technologies erworben. Um den einfachen Laufpuffer zu erhalten wurde dieser entsprechend 1:20 verdünnt. Folglich enthält dieser 50 mM MOPS, 50 mM TRIS, 0.1% SDS, 1 mM EDTA bei einem pH-Wert von 7.7

Dialysepuffer:

3 M Natriumchlorid, 0,25 M TRIS und 0,1 M EDTA, pH-Wert 7,4

Ladepuffer (PAGE):

90% Formamid, 10mM NaOH, 1mM EDTA, 0,1% w/v Bromphenolblau

Ladepuffer (Agarose-GE, DNA-Gel):

40 % (w/v) Saccharose, 0,1 M EDTA, 0,5 % SDS und 0,05% Bromphenolblau

Ladepuffer (Agarose-GE; RNA-Gel):

95% Formamid, 0,025% SDS, 0.025% Bromophenolblau, 0.025% Xylen Cyanol FF, 0.025% Ethidiumbromid, 0.5 mM EDTA

PCR-Puffer:

1x ThermoPol Puffer: 20 mM Tris-HCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Triton® X-100, pH 8.8

Ligase-Puffer:

10x E. coli Ligase Puffer: 30 mM Tris-HCl, 4 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 26 μM NAD^+ , 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA pH 8

10x T4 DNA Ligase Puffer: 660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl_2 , 50 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,5

Natriumboratpuffer:

100mM H_3BO_3 , 10mM NaOH, pH=9,2

10X FastAP Buffer:

100 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 37°C), 50 mM MgCl_2 , 1 M KCl, 0.2% TritonX-100

10x Puffer A (T4 PNK):

500 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 25°C), 100 mM MgCl_2 , 50 mM DTT, 1mM Spermidin

b) Kits und EnzymeIn vitro Transkription:- *MAXIscript® SP6/T7 Kit (Invitrogen):*

Enthält: SP6 Enzyme Mix, T7 Enzyme Mix, 10X Transcription Buffer, ATP Solution, CTP Solution, GTP Solution, UTP Solution, TURBO DNase, Gel Loading Buffer II, pTRI-b-actin und Nuclease-freies Wasser

- *MEGAscript® SP6 Transcription Kit (Invitrogen):*

Enthält: SP6 Enzyme Mix, 10X Reaction Buffer, ATP Solution, CTP Solution, GTP Solution, UTP Solution, pTRI-Xef, TURBO DNase, Ammonium Acetate Stop Solution, Lithium Chloride Precipitation Solution, Gel Loading Buffer II und Nuclease-freies Wasser

cDNA-Synthese:

- *SuperScript® III First Strand Synthesis System (Invitrogen):*

Enthält: Oligo(dT)20 (50 µM), Random hexamers (50 ng/µl), 10X RT buffer, 0.1 M DTT, 25 mM magnesium chloride, 10 mM dNTP mix, SuperScript III RT (200 U/µl), RNaseOUT (40 U/µl), E. coli RNase H (2 U/µl), DEPC-treated water, Total HeLa RNA, Sense Control Primer (10 µM), Antisense Control Primer (10 µM)

Sonstige Enzyme:

- *NcoI*
- *Sall*
- *NotI*
- *T4 DNA-Ligase*
- *Taq-DNA-Polymerase*

c) Sonstige molekularbiologische Materialien

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung:

Die gebrauchsfertige wässrige 40%ige Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 19:1 wurde von der Firma Roth kommerziell erworben.

TEMED:

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (99%, p.a., für Elektrophorese) wurde von der Firma Roth kommerziell erworben.

APS:

Ammoniumperoxodisulfat (for molecular biology, >98%) wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Zur Herstellung der 10%igen (w/v) APS-Stammlösung werden 1 Gramm APS mit 10 mL MilliQ-Wasser zusammengegeben.

DEPC-Wasser:

1 mL Diethylpyrocarbonat auf 1 L MilliQ-Wasser lösen.

Ampicillin-Stammlösung:

Für die Ampicillin-Stammlösung werden 10 mg in einem Liter deionisiertem Wasser gelöst.

LB-Medium:

Um ein Liter LB-Medium herzustellen werden hierfür 5 g NaCl, 5 g Hefe-Extrakt und 10 g Trypton in deionisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert ist neutral.

X-Gal-Platten:

Die Nährlösung der X-Gal-Platten besteht aus 13 g Agar-Agar, 10 mL Ampicillin-Stammlösung, 0,0476 g IPTG und 0,1 g X-Gal welches in 1 mL N,N-Dimethylformamid gelöst ist. Dies wird anschließend auf einen Liter mit LB-Medium aufgefüllt und in die Platten gegossen.

6.4.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Alle Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden in einem PerfectBlue Twin L vertikalen Doppeltgelsystem durchgeführt (200x200x0,8; Peqlab). Die Gele wurden immer am selben Tag gegossen und nach erfolgter Elektrophorese aus den Gelkassetten herausgenommen und mit GelRed angefärbt. Die Bilder der Gele wurden mit einem E-Box 1000/20M Gel Imaging System (Peqlab) aufgenommen. Die Analyse und Auswertung der Bilder erfolgte durch die Software E-Cap (Vilbert Lourmat).

Durch Verdünnung der 40%igen Acrylamid/Bisacrylamid (n:n=19:1) Stammlösung mit 10x TBE-Puffer (pH=8,3), mit 50% w/v Harnstoff und Milli-Q-Wasser erhielt man die gewünschte Konzentration. Durch anschließende Zugabe von 1% v/v des Radikalstarters APS-Lösung und 0,1% v/v des Polymerisationskatalysators Tetramethylethylendiamin (TEMED) konnte die Polymerisation gestartet werden. Nach 1-2 Stunden bei Raumtemperatur war die Polymerisation beendet. Ein Mikrogramm der ODN- bzw. der ODN-Peptid-Konjugat-Proben wurden mit denaturierendem Ladepuffer (PAGE) versetzt und bei 90-100 °C für ca. 5 Minuten denaturiert. Die Gelelektrophorese fand bei 50 °C und konstanter Spannung (U=600V) in 1x TBE-Laufpuffer für ungefähr eineinhalb Stunden statt. In Tabelle 6-53 sind die genauen Volumenangaben zu finden.

Tabelle 6-53: Gelzusammensetzung der PAGE

Reagenz	15%	20%
20% Acryl/Bisacrylamidlösung mit Urea	24 mL	32 mL
1x TBE + Urea (50% w/v)	8 mL	0
APS	250 µL	250 µL
TEMED	25 µL	25 µL
Laufzeit (t)	1 h	1,5 h

6.4.2.4 Präparative Gelelektrophorese (PrepCell)

Die präparativen Gelelektrophoresen (zur Trennung von DNA und Konjugat) wurden in dem Model 491 PrepCell der Firma Bio-Rad durchgeführt. Abhängig von der Trennmenge kam je nach Bedarf die kleine (28 mm) bzw. die große (37 mm) Säule zum Einsatz.

Für eine ca. 5 cm hohe Gelsäule mussten für die kleine Säule 20 mL (bzw. 40 mL für die große) der Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung bei 30 mbar für eine Stunde entgast werden. Hierdurch wurde eine eventuelle Blasenbildung während der Polymerisation vermieden. Um eine gleichmäßige Polymerisation zu erreichen wurde der Thermostat auf 22 °C temperiert. Ferner sollten sämtliche Utensilien (Kühlfinger, Säule, Platte etc.), welche mit dem Gel in Kontakt kommen, sauber, staubfrei und trocken sein, um Polymerisationsdefekte zu vermeiden. Die entgaste Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung wurde anschließend mit 0,2 Vol% der APS-Stammlösung und 0,02 Vol% der TEMED-Lösung vermischt und langsam und gleichmäßig in die Säule gegossen. Um eine Meniskusbildung zu vermeiden wurde das Gel mit 2 mL n-Butanol (gesättigt mit Wasser) überschichtet. Nach ein bis zwei Stunden konnte das n-Butanol durch 50% Harnstoff-/TBE-Puffer (gleicher Harnstoff- und Salzgehalt wie im Gel) ersetzt werden und das Gel über Nacht polymerisieren. Ebenfalls über Nacht wurden die Fritten und die Membran, sowie ein Liter des Elutionspuffers (1x TBE-Puffer) bei 30 mbar entgast. Dadurch wurden Laufblasenpeaks im UV-Detektor vermieden. Am nächsten Morgen wurde die fertig polymersierte Gelsäule vorsichtig von der Gießplatte genommen und auf den Sockel mit den entgasten Fritten/Membran gestellt. 3 Liter des vorgewärmten Laufpuffers füllte man anschließend in die Laufpufferkammer, schloss den Kühlfinger an den Kühlkreislauf an und heizte den Thermostat auf 49 °C. Der Elutionspuffer wurde entsprechend an den Elutionskreislauf angeschlossen. Nach dem Auftragen der Probe (gelöst in PAGE-Ladepuffer) stellte man die für die PrepCell zulässigen Maximalwerte an der Spannungsquelle ein (500 V, 40 mA, 20 W). Dabei war stets die Stromstärke der limitierende Faktor, sprich die Elektrophorese erfolgte bei einem konstanten Strom von 40 mA. Der Fluss des Elutionspuffers wurde über eine Pumpe auf 9,6 mL pro 10 Minuten eingestellt. Der Fraktionensammler wechselt je nach Bedarf, zumeist nach 5 Minuten, die Fraktionen. Der UV-Detektor zeichnete simultan das UV-Chromatogramm auf. Nach erfolgter Elektrophorese lag die Probe stark verdünnt in 1x TBE-Puffer vor und sollte anschließend entsalzt werden. Ferner sollte zusätzlich zum Chromatogramm des UV-Detektors eine analytische PAGE im Anschluss zeigen in welchen Fraktionen die aufgetrennten DNA- bzw. Konjugatsproben vorliegen. Hierzu wurden immer 5 µL direkt aus der Fraktion entnommen und mit 5 µL PAGE-Ladepuffer aufs Gel gegeben.

Tabelle 6-54: Gelzusammensetzung bei der PrepCell

Reagenz	28 mm Säule	37 mm Säule
20% Acryl/Bisacrylamidlösung mit Urea	20 mL	40 mL
APS	40 µL	80 µL
TEMED	4 µL	8 µL
n-Butanol (gesättigt mit Wasser)	2 mL	2 mL
1x TBE + Urea (50% w/v)	2 mL	2 mL

6.4.2.5 Precast-NuPAGE

Um den Zustand der ZFY-6 RNase (Monomer/Dimer) zu analysieren wurden dazu vorgefertigte Gele der Firma Life Technologies verwendet. Die NuPAGE® Novex® 12% Bis-Tris-Gele wurden dabei in ein XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophorese System gesteckt und bei einer konstanten Spannung von 200 V für ca. 35-40 Minuten betrieben. Für kleinere Massenbereiche (3,5-40 kDa) wurde 1x MES-Puffer verwendet, für große (10-80 kDa) 1x MOPS-Puffer. Als Marker wurde stets Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard (3,5-260 kDa) der Firma Life Technologies verwendet.

6.4.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

a) DNA-Gel

Je nach Anwendung und Größe der zu trennenden DNA Fragmente wurden unterschiedlich prozentige (1,0 – 1,5 %) Agarosegele gegossen. Die entsprechende Menge Agarose wurde eingewogen, durch aufkochen in der Mikrowelle in 1xTBE-Puffer gelöst und anschließend in die Midi-Gelkassetten (10,4 cm x 10,2 cm x 0,4 cm) gegossen. Nachdem die Agarose ausgehärtet war, konnte das Gel mit den Proben plus Standard beladen werden und in 1xTBE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Detektion der DNA erfolgte durch Ethidiumbromid-Färbung.

b) RNA Gel

RNA-Gele wurden ähnlich zu DNA-Gelen gegossen. Für ein 1,2 %ige RNA-Midi-Gel wurden 0,35 g Agarose eingewogen, mit 18,75 mL DEPC-Wasser versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem eine klare Lösung entstand, wurden 2,5 mL 10x MOPS-Puffer dazugegeben und der Sockel gegossen. Danach gab man 3,75 mL Formaldehyd zur Denaturierung der RNA dazu. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden bei einer konstanten Spannung von 130 V die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS Puffer, als Ladepuffer wurde 2x RNA Loading Dye von Thermo Scientific (enthält bereits EtBr) verwendet. Bei der Verwendung von Maxi-Gelen (18 cm x 13 cm x 0,4 cm) wurde der Ansatz entsprechend angepasst.

6.4.2.7 Nanodrop ND-1000

Zur Messung der Konzentrationen an Nukleinsäuren (DNA) wurde ein NanoDrop ND-1000 der Firma PeqLab verwendet. Zur Analyse der Konzentration reicht bereits 1 µL des Analyten aus, welcher dann photometrisch vermessen wird.

6.4.2.8 Agilent Bioanalyzer 2100

Der Agilent 2100 Bioanalyzer System ist ein Chip Elektrophorese System mit dem es möglich ist Proteine, DNA und RNA aufzutrennen. Ferner ist es auch möglich Durchflusszytometrie zu messen. Je nach Analyt wird der entsprechend dafür designte Chip verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Chips sind nachfolgend aufgelistet:

DNA High Sensitivity:

Durch die hohe Sensitivität (bis zu 5 pg/µL) und die hohe Size Range (50-7000 bp) lassen sich auch kleinste Mengen an DNA-Fragmenten relativ genau messen. Pro DNA-HS-Chip können 11 Proben à 1 µL plus DNA-Ladder aufgebracht werden. Für die Gelmatrix müssen dazu 15 µL HS-DNA-Dye Concentrate in die dazugehörige Gelmatrix pipettiert, gevortexet und für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert werden. Davon werden 9 µL in die zwei Gelkammern geben. In jede der 11 Probenkammer werden 5 µL Marker plus 1 µL Probe

gegeben. Der geladene Chip wird anschließend auf dem IKA Vortexer geschüttelt und innerhalb der nächsten 5 Minuten in den Bioanalyser gelegt und analysiert.

RNA 6000 Nano:

Der RNA 6000 Nano Chip kann in einem Bereich von 5-500 ng/μL verwendet werden. Es können pro Chip 12 Proben à 1 μL plus RNA Nano Ladder vermessen werden. Zur Herstellung der Gelmatrix werden 1 μL des RNA Dye Concentrate in 65 μL eines bereits vorher gefilterten Gels gegeben und bei 13000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend werden 9 μL der Gelmatrix in die drei Gelkammern gegeben. In jede der 12 Probenkammern werden 5 μL Marker plus 1 μL des Analyten gegeben. Der geladene Chip wird auf dem IKA Vortexer geschüttelt und innerhalb von 5 Minuten im Bioanalyser analysiert.

RNA 6000 Pico:

Die Sensitivität des RNA 6000 Pico Chips ist im Vergleich zum RNA 6000 Nano Chip deutlich erhöht. So lassen sich mit dem Pico Chip Konzentration im Picogramm-Bereich (50-5000 pg/μL) messen. Pro Chip können 11 Proben à 1 μL plus RNA Pico Ladder gemessen werden. Die Gelmatrix wird wie oben beschrieben hergestellt und in die drei Gelkammern gegeben. Zusätzlich muss eine Kammer mit 9 μL der Conditioning Solution befüllt werden. Die restlichen 11 Probenkammern werden mit 5 μL Marker und 1 μL des Analyten bestückt. Der Chip wird ebenfalls geschüttelt und in den nächsten 5 Minuten im Bioanalyser analysiert.

Tabelle 6-56: Zusammenfassung der verschiedenen Chips

Chip	Volumen	Probenanzahl	Konzentrationsbereich	Massenbereich
DNA HS	1 μL	11	5-500 pg/μL	50-7000 nt
RNA Nano	1 μL	12	5-500 ng/μL	25-6000 nt
RNA Pico	1 μL	11	50-5000 pg/μL	25-6000 nt

6.4.2.9 Sonstige verwendete Chemikalien

In nachfolgender Tabelle sind alle verwendeten Chemikalien aufgelistet. Puffer und sonstige molekularbiologische Chemikalien die weiter oben schon im Detail beschrieben worden sind, sowie Chemikalien die in Kits enthalten sind, sind in der nachfolgenden Tabelle nicht aufgeführt.

Chemikalie	Reinheit	Firma
Ammoniak	28 %	Sigma Aldrich
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	98 %	Sigma Aldrich
Iod	99 %	Sigma Aldrich
Harnstoff (für Elektrophorese)	99,995 %	Sigma Aldrich
4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP)	99 %	Sigma Aldrich
4-Mercaptophenyllessigsäure (MPAA)	97 %	Sigma Aldrich
Benzylmercaptan	99 %	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	99 %	Sigma Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat	99 %	Sigma Aldrich
Natriumphosphat	96%	Sigma Aldrich
Guanidin Hydrochlorid (Gu-HCl)	99 %	Sigma Aldrich
Ethylenediaminetetraacetat (EDTA)	99 %	Sigma Aldrich
Formamid	99 %	Sigma Aldrich
Formaldehyd	37 %	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	99 %	Sigma Aldrich
N-(6-Aminohexyl)rhodamin 6G-amid bis(trifluoroacetat)	95 %	Sigma Aldrich
Acetonitril	99,8 %; p.a.	Sigma Aldrich
Pyridin	99,8 %; p.a.	Sigma Aldrich
Dichlormethan	99,5 %; p.a.	Sigma Aldrich
Methanol	99,8 %; p.a.	Sigma Aldrich
Diethylether	p.a.	Sigma Aldrich
Isopropanol	99 %	Sigma Aldrich
Ethanol	96%	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	99 %	Roth
Ammoniumperoxosulfat (APS)	98 %	Roth
Agarose (High Resolution)		Roth
Acryl/Bisacrylamid	19:1; 40 %	Roth

TCEP-Lösung	0,5 M	Pierce
Pullulan Standards		PSS Mainz
RNase „Cys-ZFY-6-Acm“		Bachem
RNase „Cys-ZFY-6“		Bachem/Panatecs
CPG-ODN-NHS		Biomers

Literatur Kapitel 6:

- [1] Prof. Stephen Kent, "Protocol Native Chemical Ligation", can be found under [http://kentlab.uchicago.edu/videos%20files/NCL%20Protocol%20\(Kalyan%20+%20Steve%20edited\).doc](http://kentlab.uchicago.edu/videos%20files/NCL%20Protocol%20(Kalyan%20+%20Steve%20edited).doc).
- [2] BioRad, *Bio Spin-P6 Säulen*, can be found under <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT-507G.pdf>.
- [3] peqLAB Plasmid MiniPrep, can be found under http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6942-01_m.pdf.
- [4] Promega Plasmid MIDI pree, can be found under <http://www.promega.de/~media/Files/Resources/ProtCards/PureYield%20Plasmid%20Midiprep%20System%20Quick%20Protocol.pdf>.
- [5] IVT MAXIscript, can be found under http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_055602.pdf.
- [6] W. F. a. C. S. T. Lima, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, 10010–10015.
- [7] FastAP Alkalische Phosphatase, can be found under <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/prodinfo-ef0651-FastAP-Thermosensitive-Alkaline-Phosphatase.pdf>.
- [8] T4 PNK, can be found under http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/EK003_TS_6.pdf.
- [9] SuperScript Reverse Transkriptase, can be found under http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/superscriptIIIfirststrand_pps.pdf.

7 Anhang

a) GPC-Spektren der DNA und DNA-RNase-Messungen:

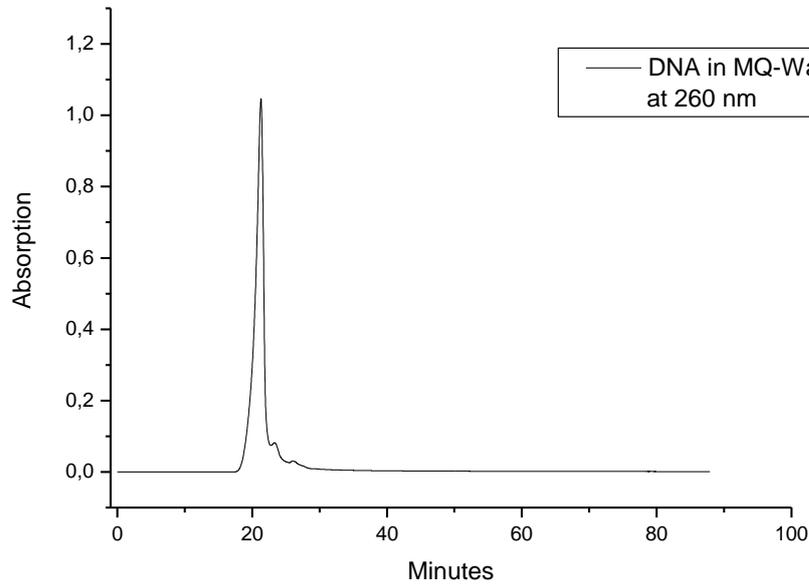


Abbildung A-1: GPC von DNA in MilliQ-Wasser (pH=7)

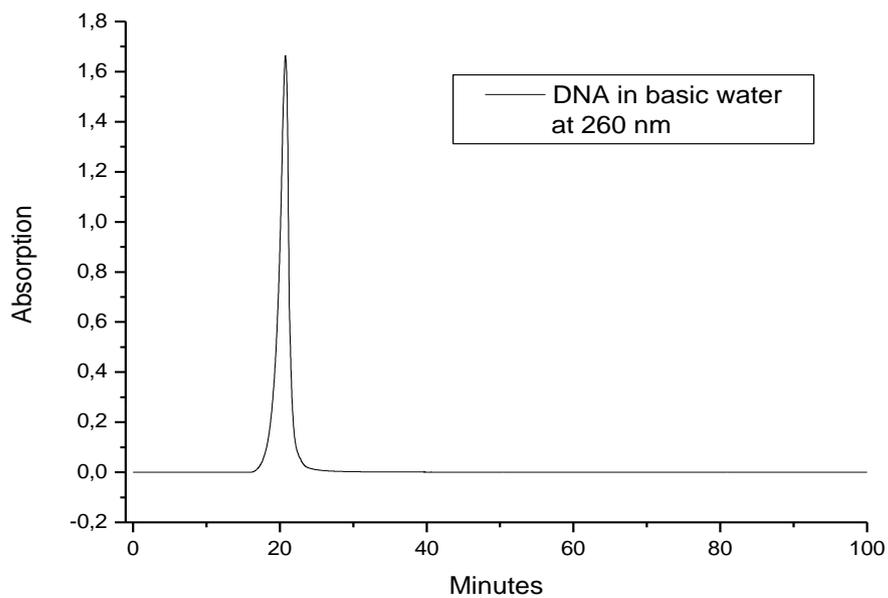


Abbildung A-2: GPC von DNA in MilliQ-Wasser (pH=9)

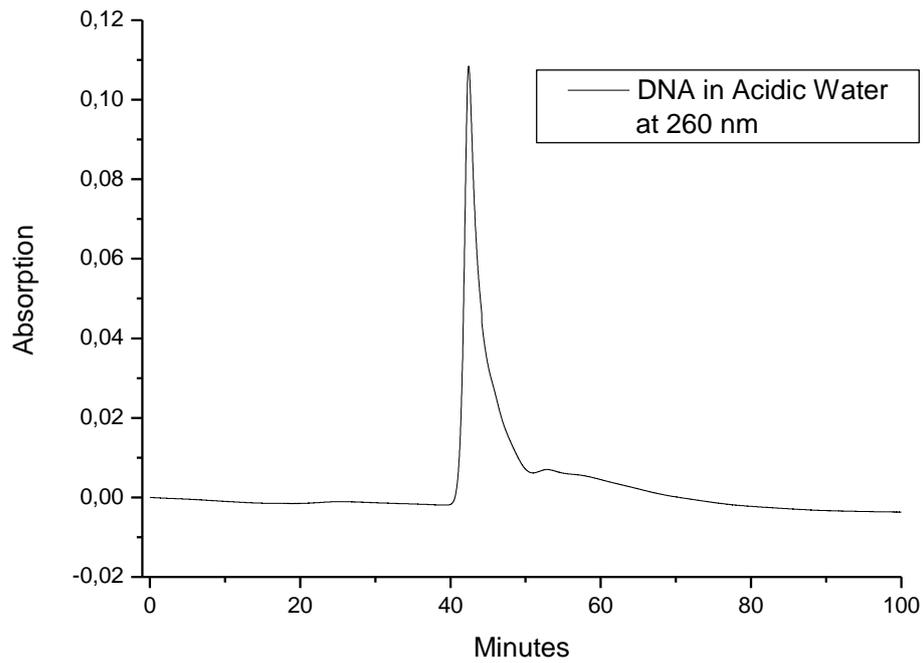


Abbildung A-3: GPC von DNA in MilliQ-Wasser (pH=4)

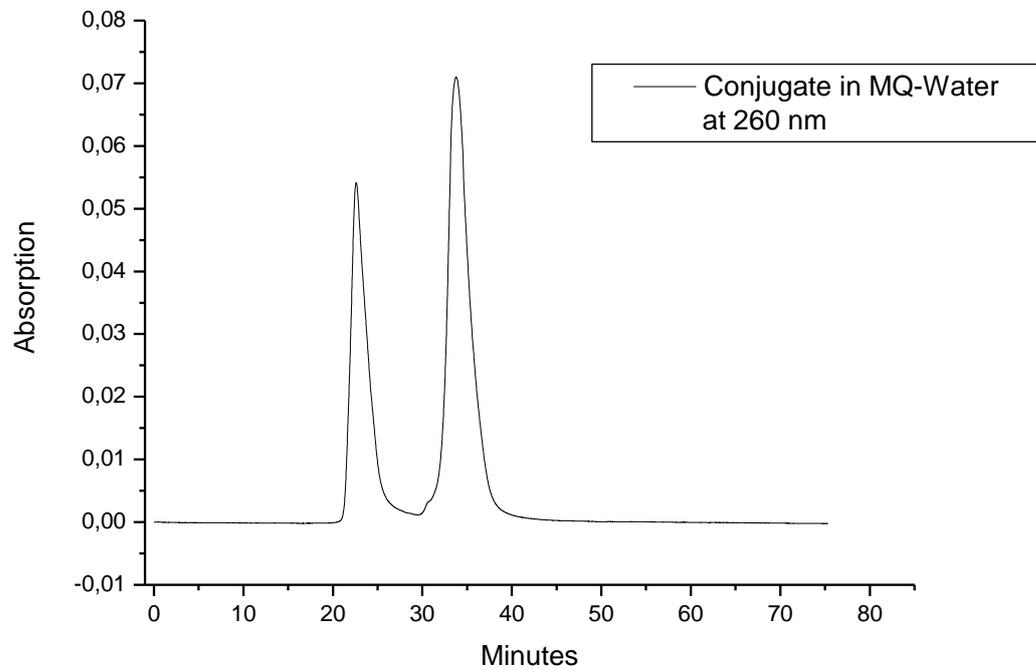


Abbildung A-4: GPC vom aufgereinigten ODN-RNase-Konjugat in MilliQ-Wasser (pH=7)

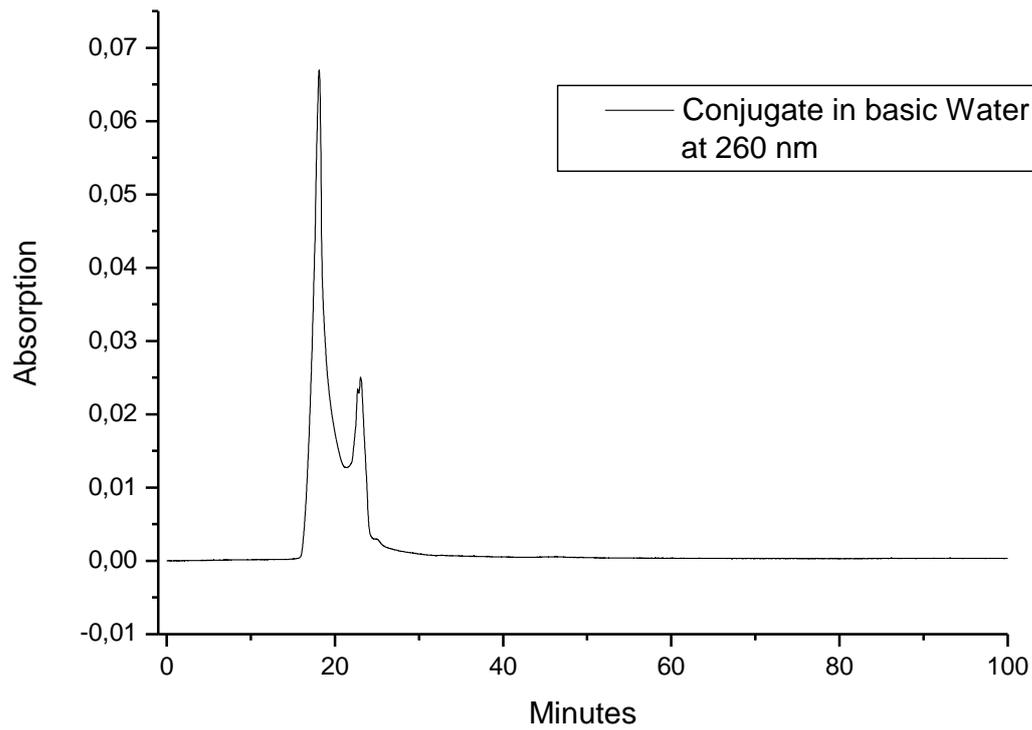


Abbildung A-5: GPC vom aufgereinigten ODN-RNase-Konjugat in MilliQ-Wasser (pH=9)

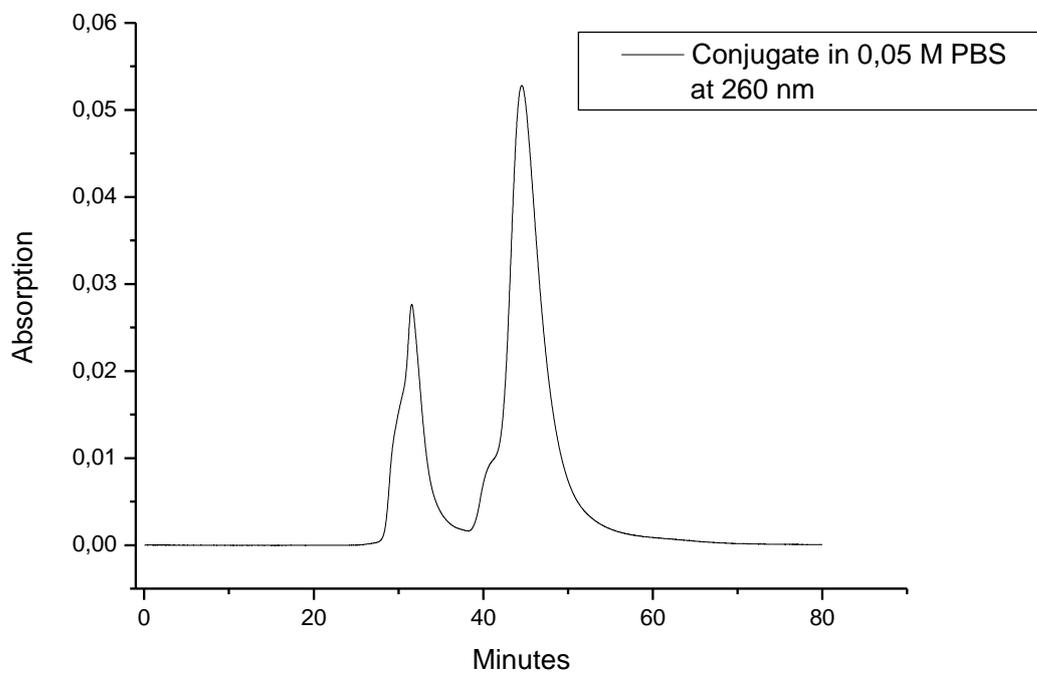


Abbildung A-6: GPC vom aufgereinigten ODN-RNase-Konjugat in 0,05 M PBS-Puffer

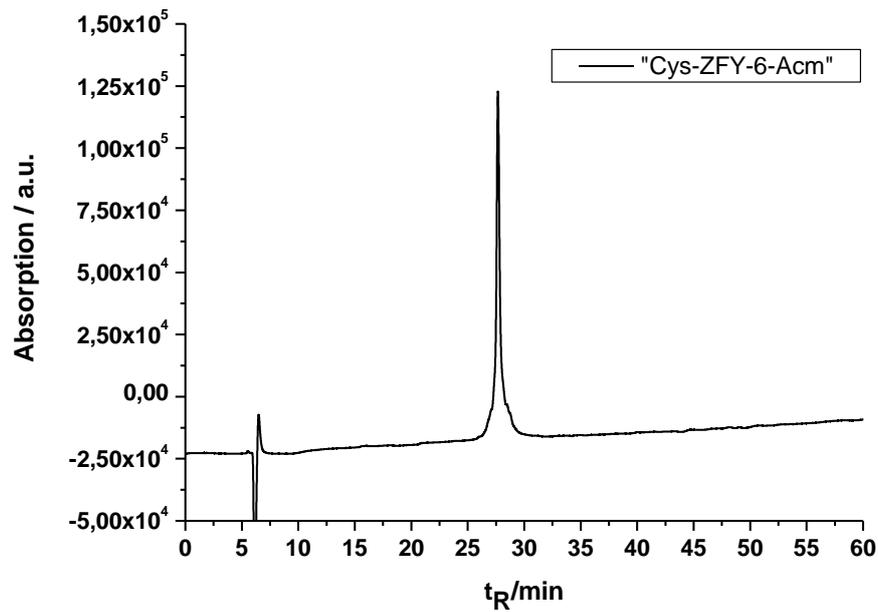
b) HPLC-Graphen der RNase

Abbildung A-7: HPLC-Messung der blockierten RNase „Cys-ZFY-6-Acm“

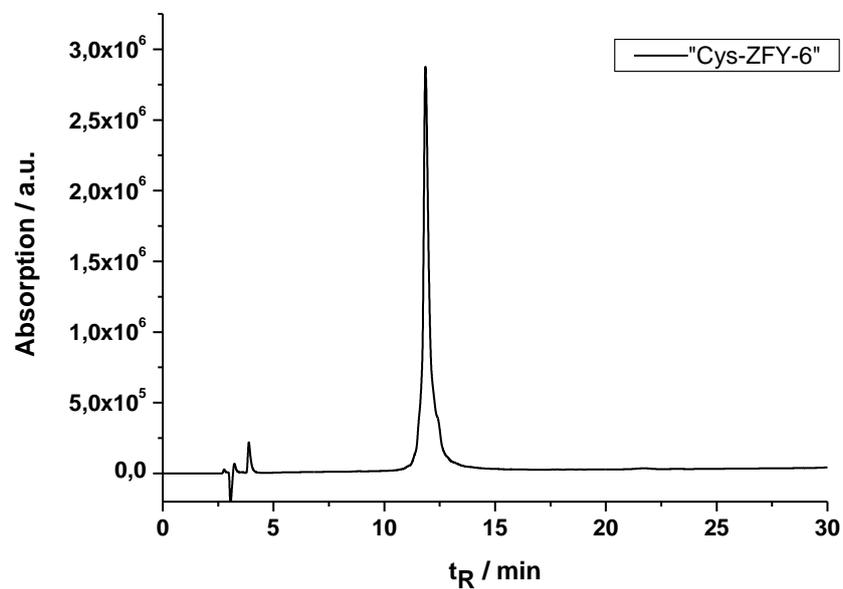


Abbildung A-8: HPLC-Messung der RNase „Cys-ZFY-6“

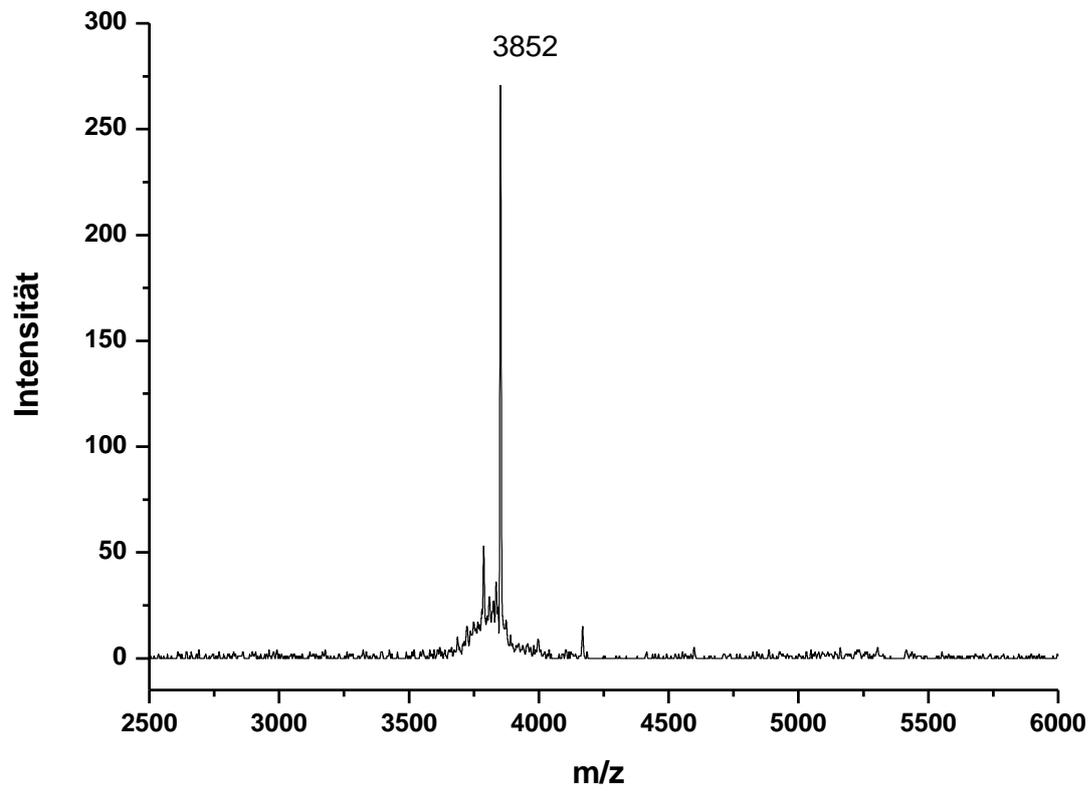
c) MALDI-TOF-MS-Spektren der RNase

Abbildung A-9: MALDI-Tof-MS der blockierten RNase „Cys-ZFY-6-Acm“

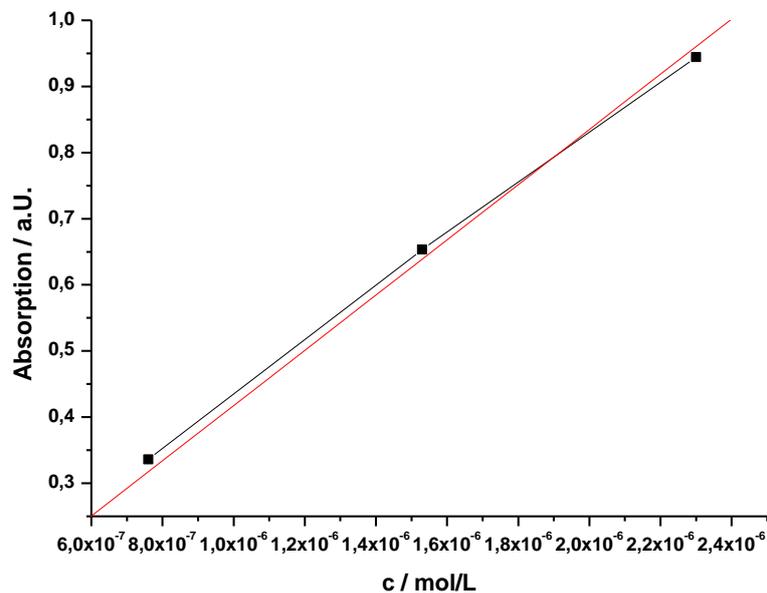
d) UV-Vis-Spektren zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten

Abbildung A-10: UV-Vis-Spektrum der 46-Basenlangen DNA bei 210 nm in unterschiedlichen Konzentrationen; Linear Fit durch den Ursprung (rot): $Y=417507 \cdot X$; $\epsilon = 417507 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$

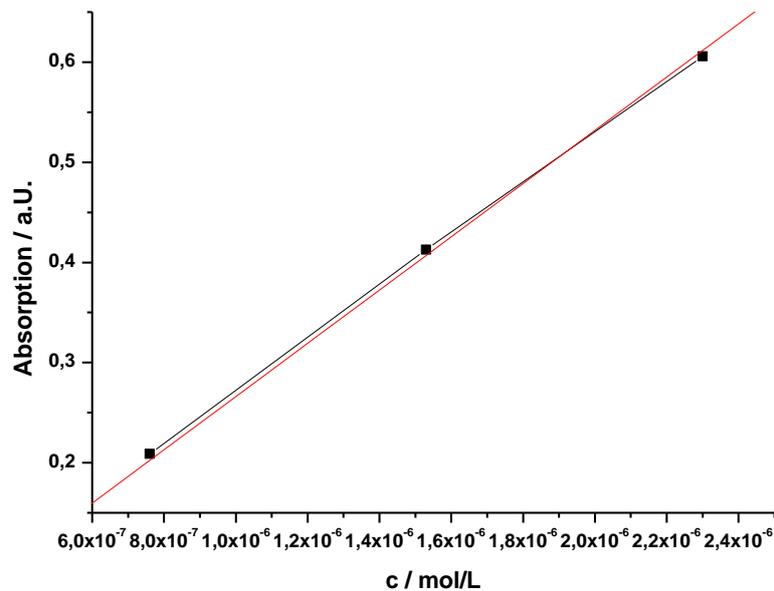


Abbildung A-11: UV-Vis-Spektrum der 46-Basenlangen DNA bei 220 nm in unterschiedlichen Konzentrationen; Linear Fit durch den Ursprung (rot): $Y=265990 \cdot X$; $\epsilon = 265990 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$

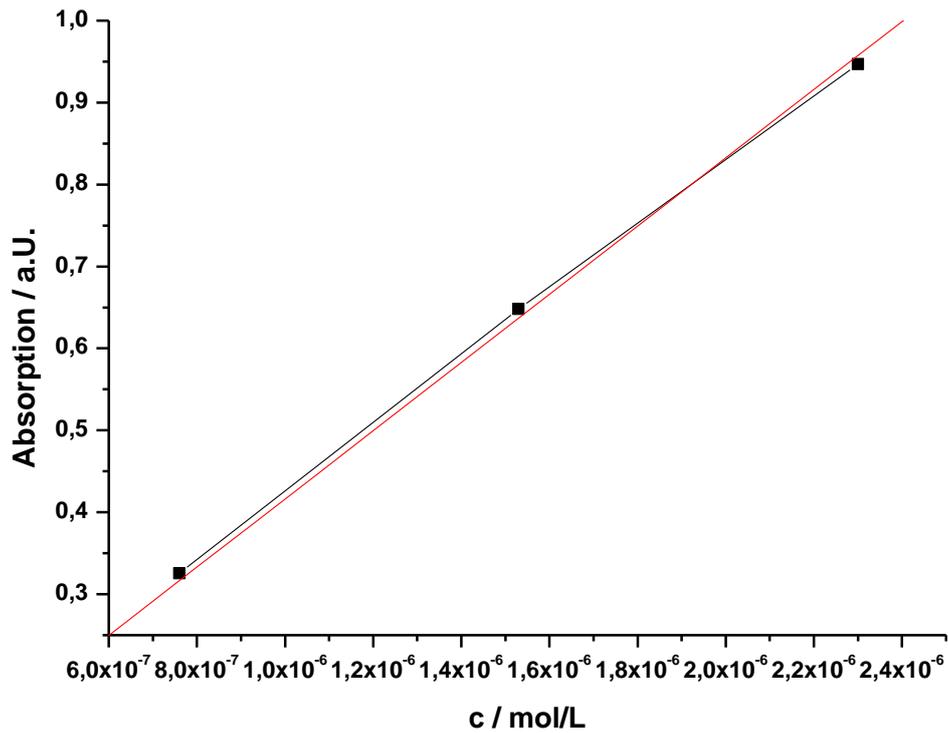


Abbildung A-12: UV-Vis-Spektrum der 46-Basenlangen DNA bei 260 nm in unterschiedlichen Konzentrationen; Linear Fit durch den Ursprung (rot): $Y=416266 \cdot X$; $\epsilon = 416266 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$

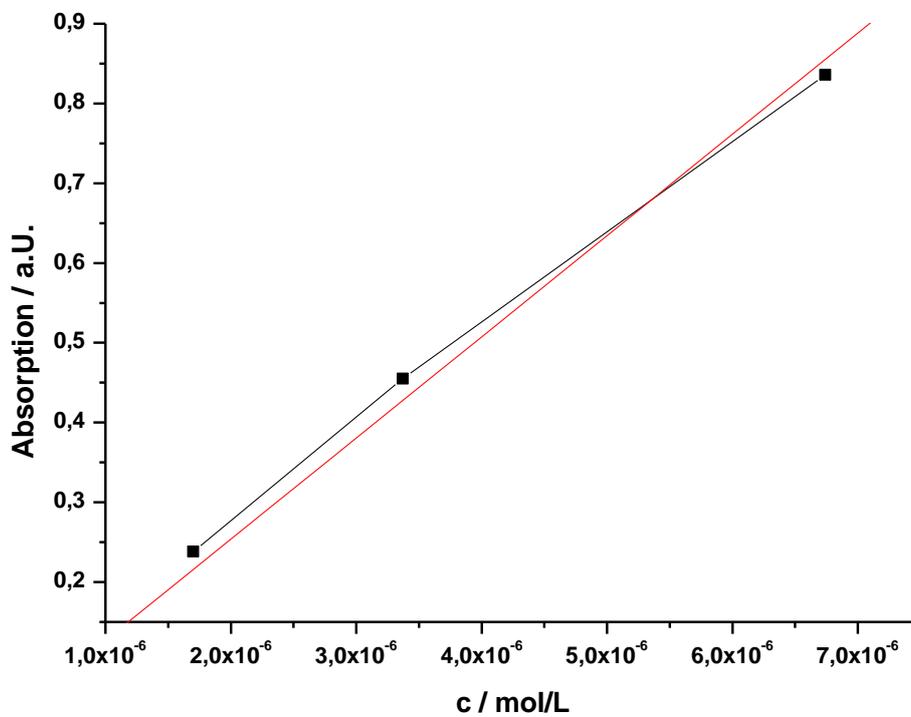


Abbildung A-13: UV-Vis-Spektrum der 31-Aminosäurelangen RNase Cys-ZFY-6 bei 210 nm in unterschiedlichen Konzentrationen; Linear Fit durch den Ursprung (rot): $Y=126886 \cdot X$; $\epsilon = 126886 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$

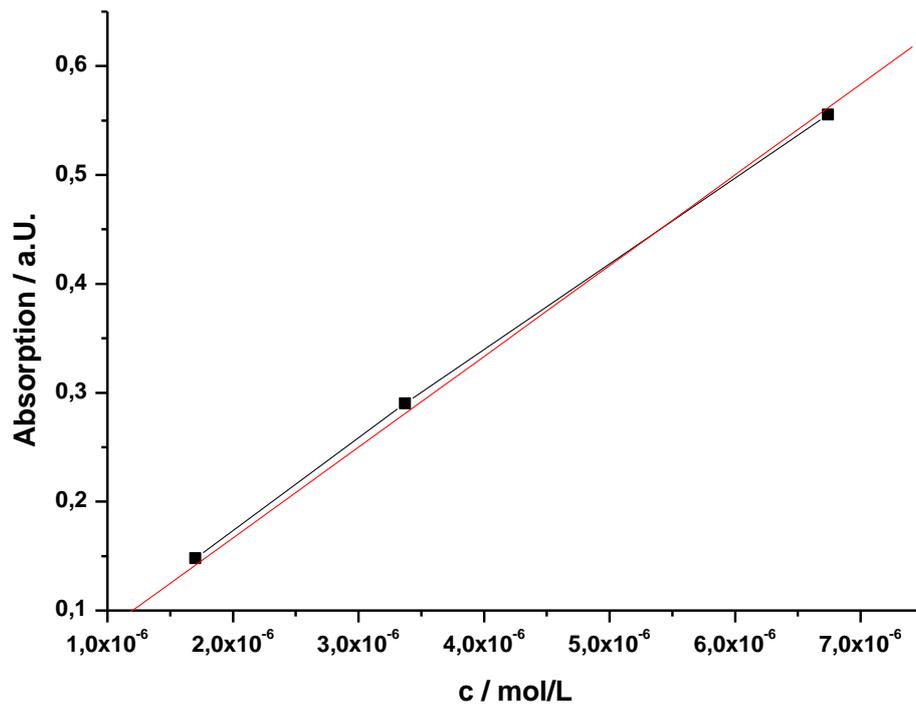


Abbildung A-14: UV-Vis-Spektrum der 31-Aminosäurelangen RNase Cys-ZFY-6 bei 220 nm in unterschiedlichen Konzentrationen; Linear Fit durch den Ursprung (rot): $Y=83343 \cdot X$; $\epsilon = 83343 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$

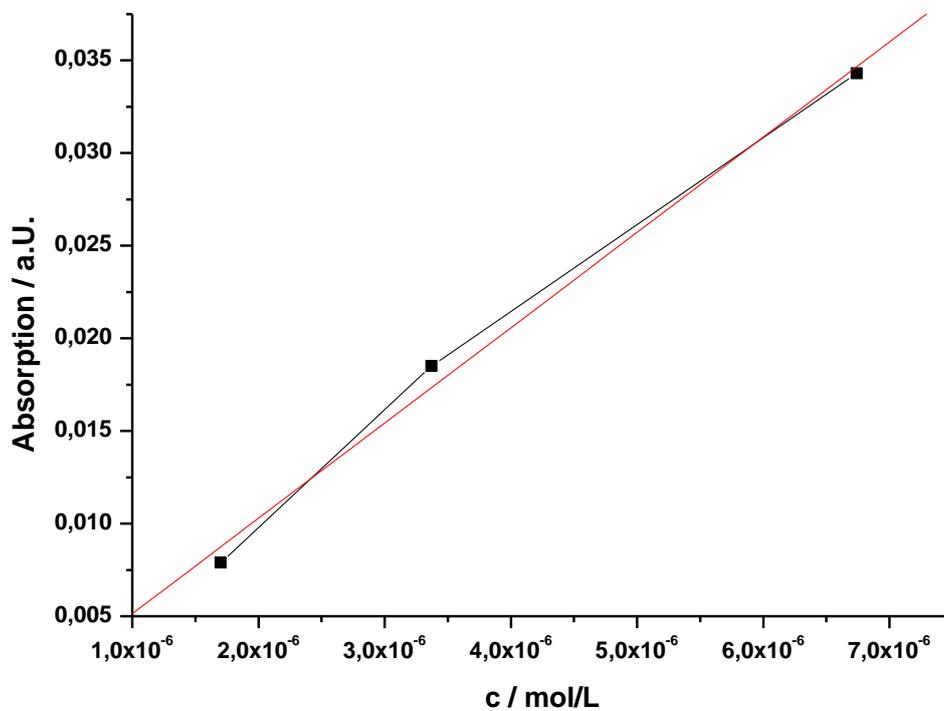


Abbildung A-15: UV-Vis-Spektrum der 31-Aminosäurelangen RNase Cys-ZFY-6 bei 260 nm in unterschiedlichen Konzentrationen; Linear Fit durch den Ursprung (rot): $Y=5143 \cdot X$; $\epsilon = 5143 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$ Kapillarelektrophorese

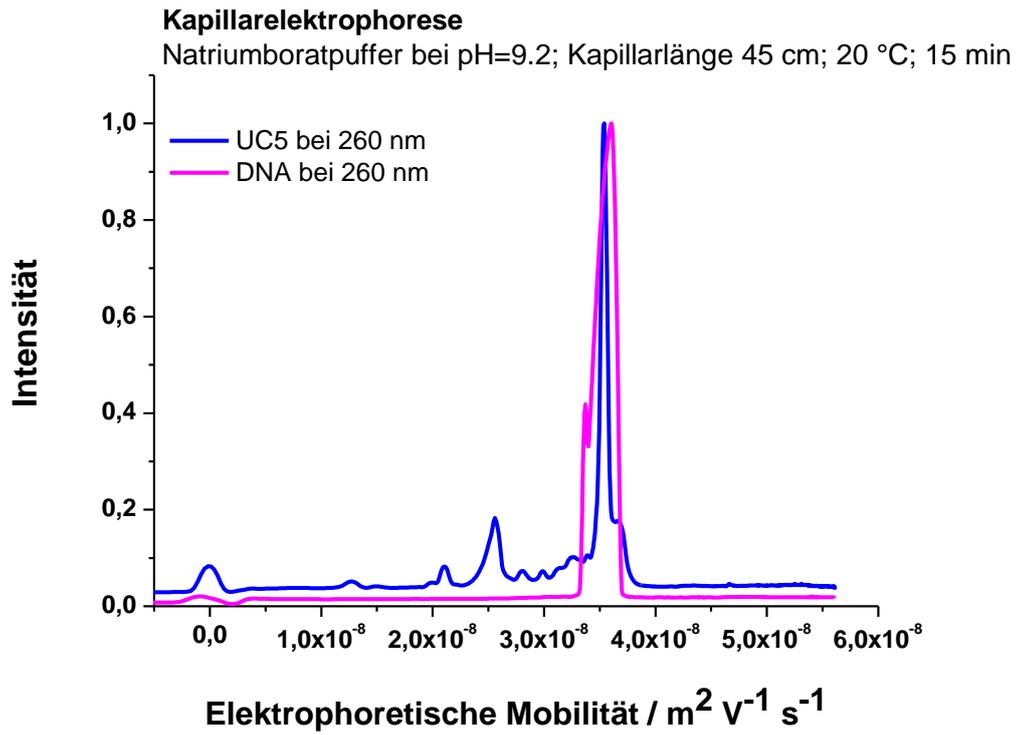


Abbildung A-16: CE-Spektrum der DNA und der Probe UC5 bei 260 nm

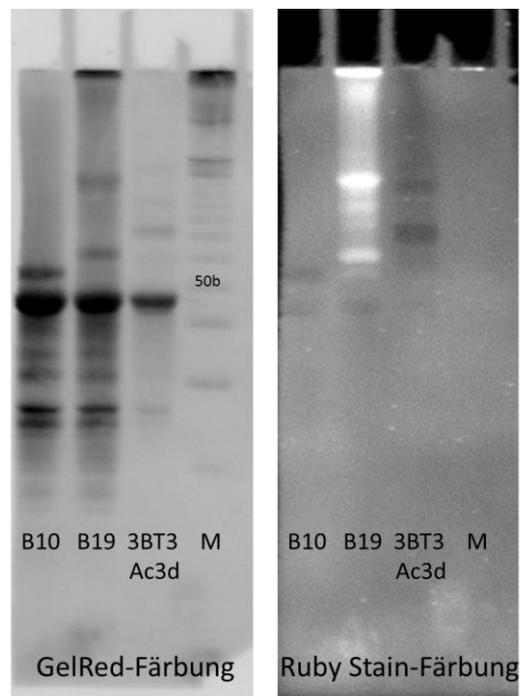


Abbildung A-17: Abbildung 4-38 ohne Orientierungslinien

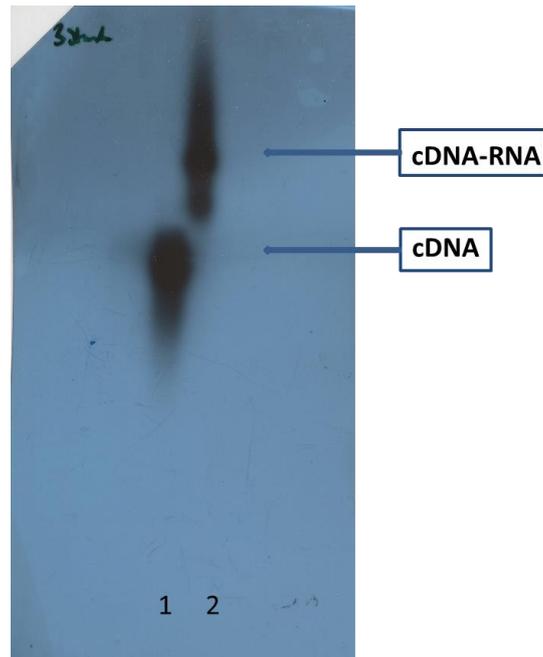


Abbildung A-18: Autoradiogramm mit einer Expositionszeit von 3 Stunden. Spur 1: Denaturierte Probe nach radioaktiver cDNA-Synthese; Spur 2: Nicht denaturierte Probe nach radioaktiver cDNA-Synthese

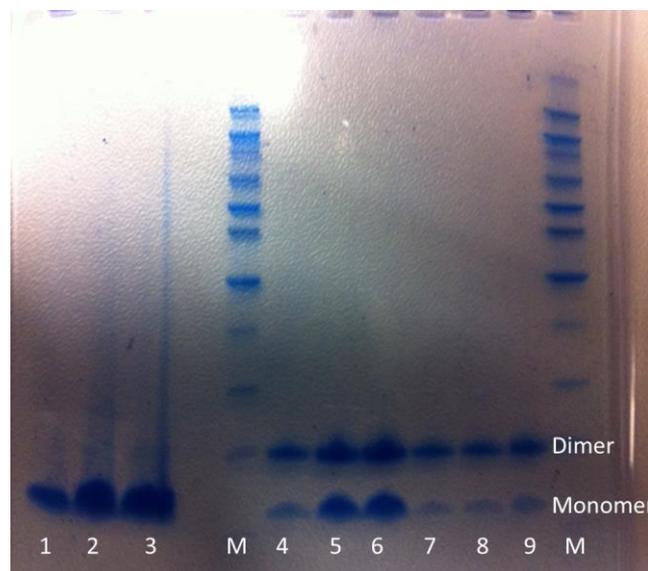


Abbildung A-19: NuPAGE® Bis Tris Mini-Gel: Analyse der Oxidation der RNase Cys-ZFY-6-Acm; Spur 1-3: Mit TCEP-reduzierte RNase in unterschiedlichen Mengen (1, 5, 10 µg); Spur 4-6: Für einen Tag mit Sauerstoff oxidierte RNase in unterschiedlichen Mengen (1, 5, 10 µg); Spur 7-9: Für drei Tage mit Sauerstoff oxidierte RNase in unterschiedlichen Mengen (1, 5, 10 µg); Spur M: Marker Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard

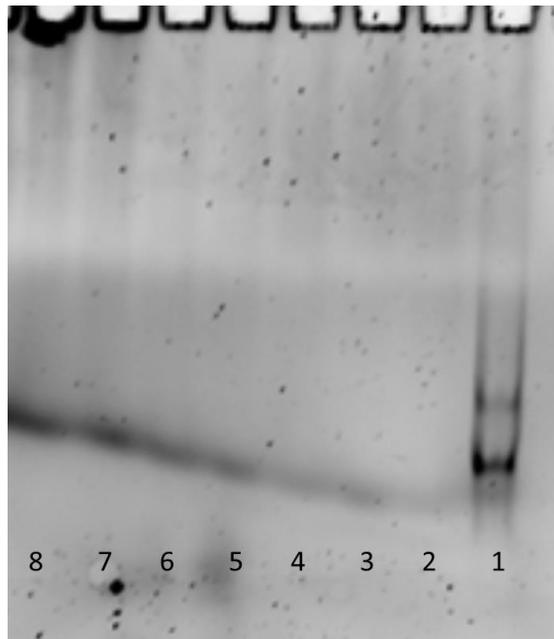


Abbildung A-20: 1,2%iges Agarose RNA-Gel: Verdau der RNA „Komp.-IVT-RNA“ durch RNase A; Spur 1: Ohne RNase A; Spur 2: Inkubation für 1 Minute; Spur 3: 2 Min; Spur 4: 4 Min; Spur 5: 8 Min; Spur 6: 15 Min; Spur 7: 30 Min; Spur 8: 60 Min

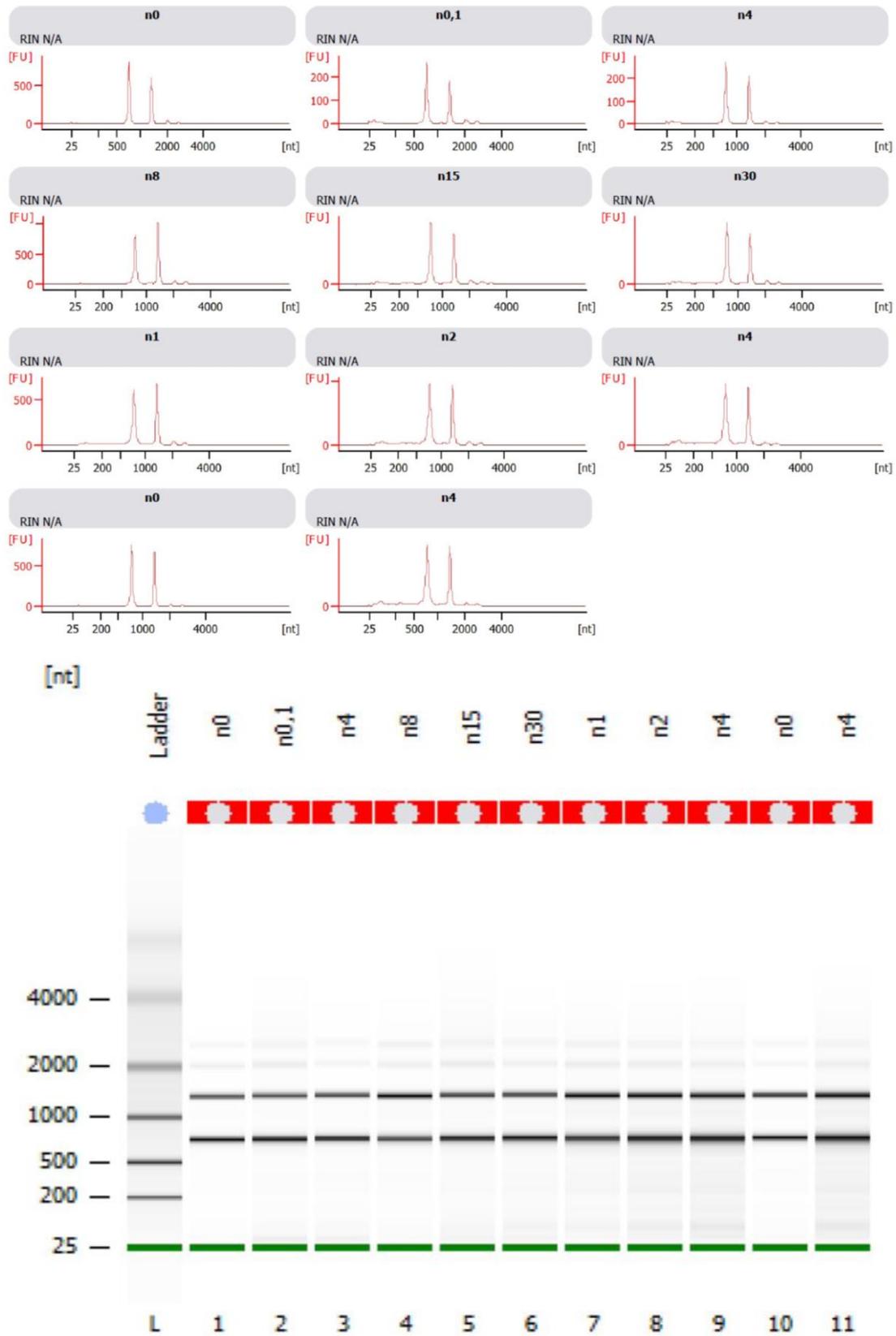


Abbildung A-21: Analyse der „Target-IVT-RNA“-Degradation (Prä-Hybridisierung bei 4°C) durch das ODN-RNase-Konjugat in Zinkchlorid durch den Agilent Bioanalyser 2100; oben: Chromatogramme; unten: Chromatogramme überführt in „Gel-Ansicht“

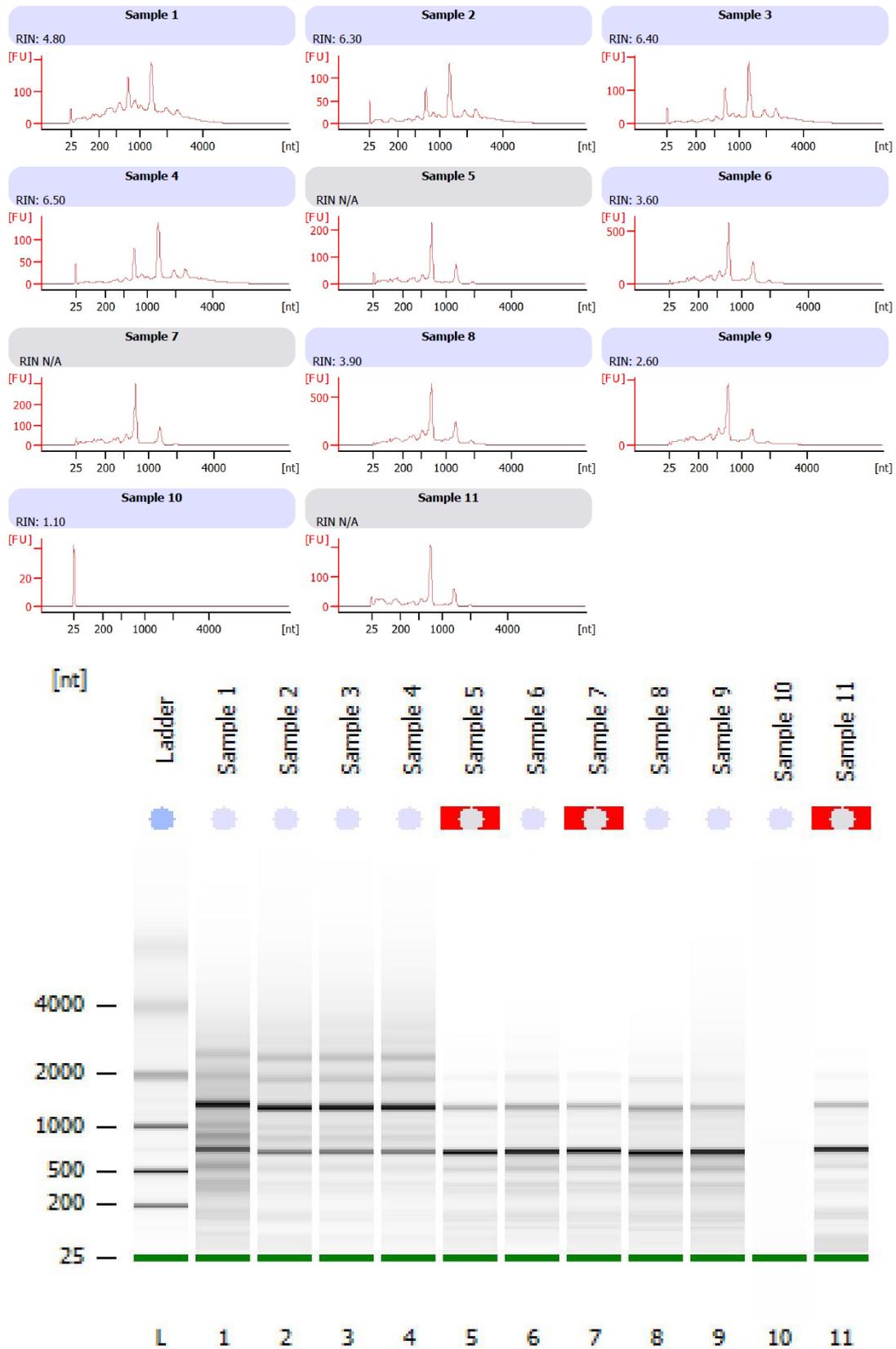


Abbildung A-22: Analyse der „Komp.-IVT-RNA“-Degradation durch das ODN-RNase-Konjugat in Zinkchlorid durch den Agilent Bioanalytiker 2100; oben: Chromatogramme; unten: Chromatogramme überführt in „Gel-Ansicht“