INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen – Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg

vorgelegt von
Apothekerin Stephanie Pfander
geboren in Böblingen

Tag der mündlichen Prüfung: ……

In vitro Selektion von Ribozymen mit Proteaseaktivität

Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke
Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

Danksagung

Ein großes Dankeschön an all diejenigen, die mich in den letzten Jahren bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Ganz besonderst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Andres Jäschke für die Betreuung meiner Arbeit und das interessante und herausfordernde Thema bedanken.

Herrn Prof. Nils Metzler-Nolte danke ich für die Zusammenarbeit bei der Peptidsynthese und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Dr. Roberto Fiammengo, Dr. Srećko Kirin und Dr. Mark Helm möchte ich mich ganz besonders bedanken, für alles was sie mir beigebracht haben, die vielen Hilfestellungen, inspirierende Ideen und fruchtbaren Diskussionen. Danke, dass ihr mit so viel Freude und Engagement euer Wissen mit anderen teilt!

Mein herzlicher Dank gilt den „guten Geistern“ unseres Arbeitskreises Viola Funk, Karin Weiß, Heiko Rudy und Tobias Timmermann für ihre hervorragende Arbeit, ihre gute Laune und Unterstützung.

Markus Petermeier, Martin Hengesbach, Alexander Nierth und Pierre Fournier danke ich für ihre Kollegialität in den letzten Jahren, ihre Unterstützung beim Bewerben, beim Korrigieren meiner Arbeit und für die gute Nachbarschaft im Pfaffengrund.

Bei Armine Hayrapetyan und Heike Einberger möchte ich mich für ihr Interesse und ihren Zuspruch beim morgendlichen Kaffeetrinken bedanken.

Ein ganz besonders liebes und herzliches Dankeschön geht an Mihaela Caprioara und Anna Wiesmayr für die vielen gemeinsamen Stunden und ihre Freundschaft.

Für den sportlichen Ausgleich während meiner Zeit in Heidelberg möchte ich der ersten Damenmannschaft des TSV Handschuhsheim danken. Liebe Mädels, lieber Sven, es hat mir immer Spass mit euch gemacht.

Margit Breckel danke ich für ihre Expertise in deutscher Grammatik.

Ein großes Dankeschön gebührt meinen Eltern, die mich zu einem offenen und hilfsbereiten Menschen erzogen haben, mir in jeder Lebenslage ihr volles Vertrauen schenken und mich unterstützen.

Und nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank Heiko, der es jetzt schon so lange mit mir und meinem Ehrgeiz aushält und mich all die Jahre durch seine Geduld und Liebe bestärkt hat.

Für meine Eltern

Für Heiko

Zusammenfassung

Pfander, Stephanie; Apothekerin

Titel: *In vitro* Selektion von Ribozymen mit Proteaseaktivität

Ribonukleinsäuren (RNA) gehören zu den faszinierendsten und spannendsten Biopolymeren der aktuellen Forschung. Ihre mannigfaltigen Funktionen sind für eine Vielzahl von biochemischen Prozessen von essentieller Bedeutung. Zu den bekanntesten Aufgaben der RNA gehört die Umsetzung genetischer Information in Proteine. Dabei ist RNA neben der Eigenschaft als Informationsträger auch aktiver Katalysator für die Knüpfung der Peptidbindung im Ribosom. Die funktionelle Vielfältigkeit von RNA wurde in den letzten Jahren durch die Erforschung der Genregulation mittels RNA-Interferenz bedeutend erweitert; deren Beteiligung an verschiedenen zellulären Mechanismen und Krankheiten wird aktuell intensiv erforscht. Die Entdeckung katalytisch aktiver RNA Sequenzen, so genannter Ribozyme, war ein weiterer Meilenstein in der Erforschung des multifunktionellen Potentials von RNA. Das zunächst durch die Natur eingeschränkte Katalysespektrum von Reaktionen an Phosphodiestern konnte durch die Anwendung der *in vitro* Selektion oder SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) und die dadurch mögliche Entdeckung neuer künstlicher Ribozyme um ein Vielfaches erweitert werden. Diese Erkenntnisse über die vielfältigen Funktionen von Ribonukleinsäuren stützen die Hypothese einer RNA-Welt, wobei das entsprechende Ribozym für jede hierfür essentielle Reaktion noch nicht gefunden werden konnte.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erweiterung des Repertoires katalytisch aktiver RNA-Spezies durch die Selektion von Ribozymen mit proteolytischer Aktivität.

Aufgrund der hohen Stabilität der Peptidbindung stellte dies eine besondere Herausforderung dar. Um das Repertoire an funktionellen Gruppen, die der RNA zur Verfügung stehen, zu erweitern und eine Peptidspaltung in Analogie zu Serinproteasen zu ermöglichen, wurde ein neuartiger Cofaktor entwickelt und hergestellt, der zwei unterschiedliche funktionelle Einheiten miteinander verbindet. Zum einen wurde eine katalytische Triade integriert, deren Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat durch kurze Linker miteinander verbunden sind. Zum anderen ermöglicht eine kurze PNA- (Peptide Nucleic Acid) Sequenz eine Verankerung der Triade an der RNA-Bibliothek und bringt dadurch Cofaktor und Katalysator in räumliche Nähe zueinander.

Zur Realisierung dieses Projekts wurde der verbesserte Ansatz der direkten *in vitro* Selektion mit linkergekoppelten Substraten gewählt und hierfür ein geeignetes Selektionsschema konzipiert. Die einzelnen Selektionsschritte konnten durch Vorversuche etabliert werden. Dies beinhaltete zunächst die Synthese multifunktioneller Peptidsubstrate, die neben zwei unterschiedlichen Affinitätsmarkern auch inerte Linker und eine geeignete funktionelle Gruppe für die kovalente Verknüpfung mit der RNA-Bibliothek enthielten. Als nächster Schritt erfolgte die Optimierung der Konjugation von Peptidsubstrat und RNA-Bibliothek. Hierfür wurde ein Protokoll gewählt, das mit RNA-Molekülen, die durch *in vitro* Transkription gewonnen werden, kompatibel ist und in dieser Arbeit durch die Anwendung eines neu synthetisierten Initiatornukleotids realisiert wurde. Die auf diese Weise generierte Bibliothek von RNA-Peptid-Konjugaten diente als Ausgangspunkt eines jeden Selektionszyklus, der nach Transkription und Konjugation durch eine doppelte Immobilisierung, zunächst der inaktiven und anschließend der aktiven Sequenzen, sowie der spezifischen Anreicherung aktiver Moleküle durch Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion komplettiert wurde. Eine erste durchgeführte Testselektion über 10 Runden und anschließende Analytik des minimal angereicherten RNA-Pools ermöglichten eine Konkretisierung potentieller Fehlerquellen, sowie die weitere Optimierung der einzelnen Selektionsschritte.

Das in dieser Arbeit etablierte Selektionsschema bietet nun eine exzellente Ausgangsposition für die Durchführung einer *in vitro* Selektion für die Generierung von Ribozymen mit Proteaseaktivität.

Summary

In Vitro Selection of Ribozymes with Proteolytic Activity

Ribonucleic acids (RNAs) are among the most fascinating biopolymers of the current research. Their diverse functions are responsible for a variety of essential biochemical processes. The most prominent task of RNA is the expression of genetic information into proteins, with RNA acting both as information carrier and as catalyst, enableing the formation of peptide bonds in the ribosome. Over the past years the functional diversity of RNA was importantly extended by the discovery of gene regulation by RNA interference, whose participation in cellular mechanism and diseases is currently intensively investigated. The discovery of catalytic active RNA sequences, the so-called ribozymes, was a further milestone in the investigation of RNA's multi-functional capability. The limited spectrum of natural ribozymes, catalyzing basically only reactions on phosphodiester bonds, was enlarged by the application of *in vitro* selection or SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), which enabled the discovery of new, artificial ribozymes of diverse functions. All these findings about the versatile functions of ribonucleic acids support the hypothesis of a RNA world, although ribozymes have not yet been found for all essential reactions.
The aim of this thesis was to expand the repertoire of catalytically active RNA species by selecting a ribozyme with proteolytic activity.
Due to the high stability of the peptide bond, the *in vitro* selection of such ribozymes appears to be a demanding task. To enlarge the variety of functional groups that are naturally available in RNA and to enable a peptide bond cleavage in analogy of serine proteases, a novel cofactor was designed and synthesized. This cofactor combines two different functional units: a catalytic triad consisting of the amino acids serine, histidine and aspartic acid, connected to each other by short linkers, and a short PNA (peptide nucleic acid) sequence, that enables the anchoring of the triad by hybridisation with the RNA pool. In this way the cofactor and the catalyst are held in close proximity to each other.
To realize this project, the improved approach of direct *in vitro* selection with linker-coupled substrates was chosen and a novel selection scheme developed. The single steps of the selection procedure were established by preliminary tests. This includes initially the synthesis of multi-functional peptide substrates, containing two different affinity tags, inert linkers and a versatile functional group for the covalent coupling with the RNA pool. In the next step the conjugation of the peptide substrate with the RNA pool was optimized. For this purpose a protocol was chosen that is compatible with the *in vitro* transcribed RNA molecules and uses a novel aldehyde-carrying initiator nucleotide. The library of the RNA-peptide conjugates generated in this way constitutes the starting point for each selection cycle. Each round is completed, after transcription and conjugation, by a double immobilization strategy, first of the inactive and afterwards of the active sequences, and the specific amplification of active molecules by reverse transcription and polymerase chain reaction. The test selection (over 10 rounds) carried out in this work and the subsequent analysis of the slightly enriched RNA pool allowed the detection of potential error sources and led to an immediate optimization of the single selection steps.
The selection scheme established in this work provides an excellent starting point for achieving an *in vitro* selection generating ribozymes with proteolytic activity.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Auf den Spuren der RNA-Welt 1

Natürliche Ribozyme 3

Künstliche Ribozyme 4

In vitro Selektion 6

In vitro Selektion mit modifizierten Nukleotiden und Cofaktoren 9

1.2 Die Peptidbindung: eine „harte Nuss“ für Proteasen 11

Die Peptidbindung 11

Serinproteasen 13

Katalytische Antikörper 16

Künstliche Serinproteasen – Serinprotease-Mimetika 17

2 Zielsetzung 23

3 Ergebnisse 25

3.1 Konzeption der Selektionsstrategie 25

3.2 Design und Synthese multifunktioneller Peptidsubstrate 27

3.3 Initiatornukleotid 31

3.3.1 Synthese 32

3.3.2 Modellreaktionen 34

3.3.3 Einbau des Initiatornukleotids durch T7 Polymerase 36

3.3.4 Stabilität der RNA nach Inkubation mit TFA 37

3.4 Synthese von RNA-Peptid-Konjugaten 39

3.4.1 Konjugation am 3’-Ende der RNA 39

3.4.2 Konjugation am 5’-Ende der RNA 42

3.4.2.1 GMPS als Initiatornukleotid 42

3.4.2.2 Aldehyd-GMP als Initiatornukleotid 45

3.5 Aminosäure-basierte PNA-Hybrid-Cofaktoren 47

3.5.1 Design und Synthese 47

3.5.2 Charakterisierung von PNA/DNA und PNA/RNA Hybriden 51

3.5.2.1 Bestimmung der Schmelztemperatur 51

3.5.2.2 Nachweis der Hybridbildung mittels Interkalation 54

3.5.2.3 Reverse Transkription in Gegenwart von Cofaktoren 56

3.6 Affinitätschromatographie 58

3.6.1 Immobilisierung von RNA-Peptid-Konjugaten auf Streptavidin-Agarose ... 58
3.6.1.1 Stabilitätsuntersuchungen von immobilisierten RNA-Peptid-Konjugaten ... 58
3.6.1.2 Freisetzung der immobilisierten RNA durch Trypsinspaltung des Peptids ... 60
3.6.1.3 Streptavidin-Shift mit Biotin-markierten RNA-Peptid-Konjugaten ... 60
3.6.2 Immobilisierung auf Streptavidin-Agarose und Ni^{2+}-Sepharose ... 62

3.7 In vitro Selektion ... 65
3.7.1 Ausarbeitung und Optimierung des Selektionsprotokolls ... 65
3.7.1.1 Optimierung der Transkription ... 65
3.7.1.2 Optimierung der Polymerase-Kettenreaktion ... 67
3.7.2 Durchführung der *in vitro* Selektion ... 74
3.7.3 Analytik der Proteaseaktivität der angereicherten Bibliothek ... 76
3.7.3.1 Verlängerung der Reaktionszeit während der Selektion ... 76
3.7.3.2 DNAzym-Assay ... 77
3.7.4 Erkenntnisse der ersten Durchführung ... 82
3.7.4.1 Immobilisierung auf Streptavidin-Agarose ... 83
3.7.4.2 Immobilisierung auf Ni^{2+}-Sepharose ... 84
3.7.4.3 Verbessertes Immobilisierungsprotokoll ... 85

4 Diskussion und Ausblick ... 89

4.1 Die Selektionsstrategie ... 90
4.1.1 Besonderheiten ... 91
4.1.2 Probleme ... 96
4.1.3 Chancen ... 99

4.2 Ausblick ... 100
4.2.1 Charakterisierung der Proteaseaktivität ... 100
4.2.2 Alternative Selektionsansätze ... 102

5 Material und Methoden ... 107

5.1 Standard-Methoden und Reagenzien ... 107

5.2 Initiatornukleotid 10 ... 108
5.2.1 Synthese ... 108
5.2.2 Zubereitung wässriger Lösungen des Initiatornukleotids ... 111
5.2.3 Modellreaktionen des Initiatornukleotids mit Stickstoff-Nukleophilen ... 111

5.3 Festphasen-Peptidsynthese ... 112
5.3.1 Allgemeiner Arbeitsablauf[132] ... 112
5.3.2 Synthesezyklus ... 113
5.3.3 Aufarbeitung ... 114
5.3.4 Übersicht der synthetisierten Peptide und PNA-Peptidhybride ... 117

5.3.5 Charakterisierung der PNA und PNA-Peptidhybride 119
5.3.5.1 Quantifizierung von PNA- und DNA-Oligonukleotiden durch UV-Absorption 119
5.3.5.2 Charakterisierung von PNA/DNA Duplexen mithilfe von Schmelzpunkt-analysen 120
5.3.5.3 Charakterisierung von PNA/DNA Duplexen durch Interkalation[157-159] 121
5.3.5.4 Primer-Elongations in Anwesenheit von PNA 122
5.3.5.5 Fluoreszenz-Labeling von PNA 24 und 25 123

5.4 In vitro Transkription 124

5.5 Herstellung von RNA-Peptid-Konjugaten.....128
5.5.1 3'-RNA-Peptid-Konjugate 128
5.5.2 5'-RNA-Peptidkonjugate 128
5.5.2.1 Native Chemical Ligation[148] 128
5.5.2.2 Kondensation Aldehyd-modifizierter RNA.....129

5.6 Immobilisierung von RNA-Peptid-Konjugaten 129
5.6.1 Immobilisierung von RNA-Peptid-Konjugaten auf Streptavidin.....129
5.6.1.1 Stabilitätsuntersuchungen von RNA-Peptid-Konjugaten auf der Festphase 129
5.6.1.2 Freisetzung der immobilisierten RNA durch Trypsinspaltung des Peptids.....130
5.6.1.3 Proteaseverdau von RNA-Peptid-Konjugaten in Lösung 131
5.6.2 Streptavidin-Shift mit Biotin-markierten RNA-Peptid-Konjugaten.....131

5.7 Durchführung der in vitro Selektion 133
5.7.1 Transkription.....133
5.7.2 Konjugation 135
5.7.3 Selektionsreaktion / Spaltungsreaktion 136
5.7.4 Immobilisierung.....137
5.7.5 Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion 138
5.7.6 Analytik des angereicherten Pools der Runde 10.....139
5.7.7 Verbessertes Immobilisierungsprotokoll.....140

5.8 DNAzym-Assay 141

6 Referenzen 143

7 Anhang 153

7.1 Abkürzungen 153

7.2 Publikationen.....156

Die natürliche Auslese sorgt dafür,
dass immer die Stärksten oder die am
besten Angepassten überleben.
Charles Darwin

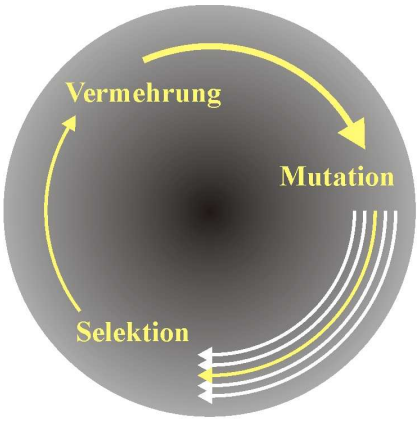


Abb. 1.1: nach G. F. Joyce, Angew. Chem. Int. Ed. 2007.

1 Einleitung

1.1 Auf den Spuren der RNA-Welt

Charles Darwin veröffentlichte vor 150 Jahren die von ihm entwickelte **Evolutionstheorie** „On the Origin of Species by Means of Natural Selection“[1]. Der Grundsatz seiner Theorie über die Entwicklung und Vielfalt des Lebens beruht auf den drei Prinzipien Vererbung (Vermehrung), Veränderung (Mutation) und Auslese (Selektion) (Abbildung 1.1) und besagt, dass diejenigen Spezies bevorzugt überleben und sich vermehren, die sich am besten ihrer Umwelt anpassen können. Was die Natur über einen Zeitraum von mehreren Milliarden Jahren vollbracht hat, ist jedoch auch in einem kleineren Maßstab, im Reagenzglas, möglich. Zum ersten Mal wurde vor 40 Jahren über die Durchführung einer solchen ***in vitro*** **Evolution** berichtet. Spiegelman und Mitarbeiter hatten außerhalb von Zellen einen Weg gefunden, Nukleinsäuremoleküle zu vermehren und durch gewählte äußere Bedingungen diejenigen Sequenzen über mehrere Vermehrungszyklen zu selektieren, die sich durch Mutationen an ihre Umwelt angepasst hatten[2].

Die modernen molekularbiologischen Prozesse, die das Leben, wie wir es heute kennen, ermöglichen, beruhen hauptsächlich auf einem dualen System. Hierbei sind für die Speicherung und Weitergabe der Erbinformation DNA (Desoxyribonukleinsäuren) und RNA (Ribonukleinsäuren) verantwortlich, wohingegen der überwiegende Teil aller katalytischen Prozesse durch Proteine (Enzyme) ermöglicht werden. Dass solch ein komplexes System als Ausgangspunkt der Entwicklung moderner Lebensformen diente, wird jedoch als unwahrscheinlich angesehen. Bereits 1967/68 vermuteten Woese[3], Crick[4] und Orgel[5], dass RNA-Moleküle ursprünglich die Position von Proteinen eingenommen haben könnten. Diese Hypothese wurde Anfang der achtziger Jahre untermauert, als Cech[6] und Altmann[7] tatsächlich natürliche, katalytisch aktive RNA entdeckten, die so genannten **Ribozyme** in Anlehnung an Ribonukleinsäure-Moleküle mit enzym-artigen Eigenschaften. Im Vergleich zu Proteinen, die aus zwanzig verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind, setzen sich RNA-Sequenzen lediglich aus vier verschiedenen Nukleotiden zusammen und sind dennoch in der Lage, komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen auszubilden. Dadurch entstehen spezifische Bindungsstellen und katalytische Zentren, die die Grundlage für die Katalyse chemischer Reaktionen bilden. Die Hypothese der **RNA-Welt**, in der alle essentiellen Funktionen von Ribonukleinsäuren übernommen wurden, beruht auf der Tatsache, dass RNA in der Lage, ist die Speicherung von Informationen und die Katalyse von Reaktionen in einem Molekül zu vereinen. Ein möglicher Ansatz, die Existenz der RNA-Welt zu bekräftigen, besteht darin, Ribozyme für die Katalyse aller lebensnotwendigen Reaktionen zu finden. Diese Reaktionen sind Bestandteile folgender Bereiche: die eigene Reproduktion, die Synthese und der Gebrauch von Nukleotid-basierten Cofaktoren, der Acylgruppentransfer für die Synthese von Peptiden und die Katalyse grundlegender Stoffwechselwege[8]. Mit anderen Worten, es mussten verschiedene katalytisch aktive RNA-Spezies vorhanden sein, die unter anderem Phosphodiesterbindungen spalten und knüpfen können, um neue RNA-Moleküle zu synthetisieren. Zusätzlich sollten sich Ribozyme, wie auch moderne Enzyme heute, Nukleotid-basierter Cofaktoren wie Coenzym A bedienen können, um die Übertragung funktioneller Gruppen zu erleichtern und ihre katalytische Vielfältigkeit zu erhöhen. Die Knüpfung von Peptidbindungen ist vor allem in der „späten“ RNA-Welt von Bedeutung, da diese den Übergang in die ersten Protein-basierten Lebensformen

ermöglicht hätte. Nicht zuletzt stellt die Katalyse grundlegender Stoffwechselreaktionen die erforderliche Energie und Bausteine für den Erhalt des Lebens zur Verfügung.
Ribozyme für die Katalyse all dieser Reaktionen können auf zwei verschiedenen Wegen gefunden werden: durch die Suche nach weiteren natürlichen Ribozymen oder die Entwicklung neuer künstlicher Ribozyme. Somit ermöglichen die Studien zur Durchführung einer *in vitro* Evolution nach Spiegelman und die Entdeckung natürlicher Ribozyme in Kombination die Untermauerung der RNA-Welt Theorie.

Natürliche Ribozyme

Nach der Entdeckung der ersten Ribozyme wurde eine Vielzahl weiterer katalytisch aktiver RNA natürlichen Ursprungs gefunden. Das katalytische Repertoire der bisher bekannten natürlichen Ribozyme umfasst hauptsächlich die Hydrolyse und Umesterung von Phosphodiestern. Die einzige Ausnahme bildet das wohl zugleich bedeutendste Ribozym, das Ribosom. Mit der Veröffentlichung der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass das Peptidyltransferase-Zentrums, wo die Knüpfung der Amidbindung erfolgt, vor allem aus der 23S rRNA des Ribosoms besteht und sich der Großteil der Proteinbausteine außerhalb der funktionellen Zentren befinden[9]. Vor allem diese Entdeckung untermauert stark die Existenz der RNA-Welt, da man nun der Antwort auf die Frage: was war zuerst vorhanden, „Huhn oder Ei“, RNA oder Protein, einen großen Schritt näher gekommen ist[10]. Es ist davon auszugehen, dass das Ribosom ursprünglich nur aus RNA bestand und die Proteinbausteine erst in der späteren Entwicklung zur Erhöhung der Leistung hinzugekommen sind.
Durch neue Kristallstrukturen mit annähernd atomarer Auflösung für die meisten der bekannten natürlichen Ribozyme ist es nun möglich, den genauen Mechanismus der RNA-Katalyse aufzuklären. Dabei zeigt sich, dass nicht wie zunächst angenommen alle Ribozyme Metalloenzyme sind, welche divalente Ionen für die Katalyse benötigen und positionieren, sondern die funktionellen Gruppen der Nukleotide selbst aktiv an Säure-Base-katalysierten Reaktionen teilnehmen können[11]. Ein Beispiel sei hierbei besonders hervorgehoben: mit der Kristallstruktur des glmS-Ribozyms wurde ein weiteres Katalyseprinzip erstmals bei natürlichen Ribozymen entdeckt. Das glmS-Ribozym ist gleichzeitig auch ein so genannter Riboswitch, der erst durch die Bindung des Cofaktors Glucosamin-6-Phosphat aktiv wird. In diesem Fall jedoch nicht durch

Konformationsänderung, wie es normalerweise bei den Riboswitches erfolgt, sondern durch Bindung des Cofaktors innerhalb einer vorgeformten Tasche und dessen direkter, aktiver Beteiligung an der Katalyse im aktiven Zentrum[12, 13]. Dieses Beispiel zeigt, dass RNA in der Lage ist, räumliche Strukturen auszubilden und unter Einbindung von Cofaktoren Reaktionen zu katalysieren.

Tabelle 1.1 **Natürliche Ribozyme und Ribonukleoprotein-Enzyme (modifiziert nach[14])**

Ribozym	*Aktivität (Reaktionsprodukt)*
Hammerhead Hepatitis Delta Virus Hairpin Varkud satellite *glmS* Riboswitch-Ribozym	Selbstspaltung durch Umesterung (2',3' zyklisches Phosphat)
Gruppe I Intron Gruppe II Intron	Selbstsplicing durch Umesterung (3'-OH)
RNase P*	Prozessieren primärer tRNA durch Hydrolyse (3'-OH)
Spliceosom* (U2 + U6 snRNAs)	RNA Splicing durch Umesterung (3'-OH)
Ribosom* (23S rRNA)	Peptidyltransfer (Amid)

** Ribonukleoprotein-Enzyme; In Abwesenheit der Proteineinheiten zeigt RNase P in manchen Spezies relevante Aktivität, Spliceosom (U2 und U6 snRNA alleine) Splicing-verwandte Aktivität, die mechanistisch dem Spliceosome ähnelt[15] und rRNA keine Aktivität.*

Künstliche Ribozyme

Das Repertoire an Reaktionen natürlicher Ribozyme, das wir bis jetzt kennen, reicht bei weitem nicht aus, um alle Funktionen, die in der RNA-Welt ausgeführt werden mussten, abzudecken. Mit Hilfe der *in vitro* Evolution war es jedoch möglich, weitere Ribozyme mit den gewünschten katalytischen Eigenschaften aus einer RNA-Bibliothek zu selektieren, so genannte **künstliche Ribozyme**. Durch die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) eröffneten sich im Vergleich zu den ersten Experimenten von Spiegelman enorme Möglichkeiten. Gold[16], Szostak[17] und

Joyce[18] etablierten Anfang der Neunziger die Methode der ***in vitro* Selektion** oder **SELEX** (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) und waren dadurch erstmals in der Lage, gezielt nach RNA-Molekülen mit bestimmten Eigenschaften zu suchen. Dabei können zwei unterschiedliche Zielsetzungen verfolgt werden. Zum einen die Suche nach so genannten Aptameren, das sind RNA-Sequenzen, die in der Lage sind, bestimmte Moleküle spezifisch zu binden. Zum anderen die Suche nach neuen Ribozymen, die gewünschte Substrate umsetzen und ausgewählte Reaktion katalysieren können. Seitdem wurde eine Vielzahl neuer künstlicher Ribozyme gefunden, die das Spektrum an katalysierten Reaktionen immens erweiterten. Tabelle 2 zeigt neben einer Auswahl von Reaktionen, die durch künstliche Ribozyme bisher katalysiert werden können, auch deren mögliche Funktion in einer RNA-Welt.

Tabelle 1.2 **Reaktionen künstlicher Ribozyme und ihre möglichen Funktionen in der RNA-Welt[8]**

Reaktion	*Ref.*	*Funktion RNA-Welt*
5'→ 3' RNA Ligation	[19-21]	Replikation
5'→ 5' RNA Ligation	[22]	
AMP-capped 5'→3' Ligation	[23]	
Polymerisierung	[24-26]	
5'→ 5' Self-capping	[27]	Cofaktoren Synthese: CoA, NAD
	[28, 29]	Cofaktoren Gebrauch: Moleküle mit Phosphat
Redox Reaktionen	[30, 31]	Cofaktoren Gebrauch: NAD^+, NADH
Thioester Bildung	[32, 33]	Cofaktoren Synthese: Acetyl-CoA
Acyl-Aktivierung	[33]	Evolution der Translation
Acyl-CoA Synthese	[32, 34]	
Aminoacyl-Transfer	[35-37]	
Amid-Bindungsknüpfung	[38-41]	
Acyl-Transfer	[42, 43]	
		andere Stoffwechselwege:
N-gykosid.	[44]	Nukleosid Biosynthese
Bindungsknüpfung	[45]	Fettsäure Biosynthese
Claisen-Kondensation	[46]	Zucker Metabolismus
Aldol-Kondensation		

***In vitro* Selektion**

Die Methode der *in vitro* Selektion beruht auf einer festen Abfolge mehrerer Schritte, in denen alle Kriterien der Darwin'schen Evolutionstheorie enthalten sind. Zunächst wird eine Bibliothek von Nukleinsäuresequenzen benötigt, die aus einem randomisierten Bereich in der Mitte und konstanten Primerregionen an den Enden besteht. Diese wird durch Standard-DNA-Oligonukleotidsynthese[47] erzeugt und kann mittels PCR amplifiziert werden. Die dadurch entstandene doppelsträngige DNA (dsDNA) dient als Matrize für die sich anschließende *in vitro* Transkription[48, 49]. Hieraus resultiert die RNA-Bibliothek, die den Ausgangspunkt der Selektion bildet (Abbildung 1.2). Im ersten Schritt der Selektion erfolgt die Zugabe eines spezifischen Substratmoleküls, mit dem die gesuchten aktiven RNA-Sequenzen eine Reaktion oder Bindung eingehen. Dabei erwerben aktive RNA-Spezies gleichzeitig eine Ankergruppe, wodurch sie im zweiten Schritt, der Immobilisierung, aus dem RNA-Pool isoliert und von inaktiven Molekülen unterschieden werden können (Selektion). Aktive Sequenzen werden dann durch Reverse Transkription wieder in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben und somit der Vervielfältigung mittels PCR zugänglich. Der an aktiven Sequenzen angereicherte DNA-Pool dient nun erneut als Ausgangspunkt für den nächsten Selektionszyklus. Der Aspekt der Mutation wird in der Methodik der *in vitro* Selektion einerseits durch den Einsatz einer Bibliothek realisiert. Dies ermöglicht die Umsetzung einer sehr großen Anzahl verschiedener Sequenzen (bis zu 10^{16}) zu Beginn der Selektion. Während des PCR-Schritts besteht andererseits auch die Möglichkeit, durch den Einsatz von Enzymen ohne „proof-reading" Aktivität, Mutationen einzuführen und somit die Diversität der Sequenzen weiter zu erhöhen. Dieser zusätzliche Schritt macht die *in vitro* Selektion (nach Szostak) zur *in vitro* Evolution (nach Joyce).

Anhand dieses Selektionsschemas können RNA-Moleküle selektiert werden, die ein bestimmtes Substrat spezifisch binden können, so genannte Aptamere. Zusätzlich sind auch katalytisch aktive Sequenzen, die selbst eine Reaktion mit dem Substrat eingehen, anhand dieser Selektionsstrategie zugänglich (Ribozyme). Dieser Ansatz wird auch als **direkte Selektion** bezeichnet, da das Selektionskriterium die Katalyse einer bestimmten Reaktion ist. Folglich wird direkt nach katalytisch aktiven RNA-Sequenzen gesucht. Im Gegensatz dazu besteht die Möglichkeit, gegen den Übergangszustand einer Reaktion zu selektieren. Indirekt wird dabei davon ausgegangen, dass das resultierende Aptamer

auch die gewünschte Reaktion katalysieren kann. Dieses Konzept wurde bereits sehr erfolgreich bei der Entwicklung katalytischer Antikörper angewendet (siehe Kapitel 1.2). Bei der Selektion katalytisch aktiver Nukleinsäuren wurde es jedoch nur in wenigen Fällen erfolgreich eingesetzt[50-54].

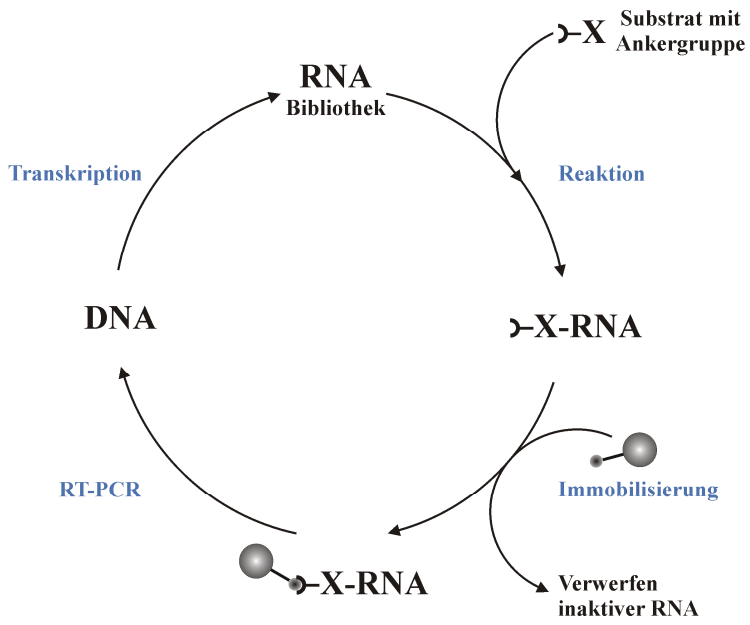


Abbildung 1.2: Allgemeines Schema der direkten *in vitro* Selektion. Ausgehend von einer chemisch synthetisierten DNA-Bibliothek überführt man diese mittels Transkription in die entsprechende RNA-Bibliothek. Durch Zugabe des mit einer Ankergruppe modifizierten Substrats erwerben diejenigen RNA-Sequenzen die Ankergruppe, welche mit dem Substrat eine Bindung (→Aptamer) oder eine Reaktion (→Ribozym) eingehen können. Im anschließenden Immobilisierungsschritt werden aktive RNA-Spezies selektiv von inaktiven Sequenzen über die Ankergruppe getrennt und mit RT-PCR vervielfältigt. Die resultierende DNA-Bibliothek, die an aktiven Verbindungen angereichert ist, dient nun als Vorlage für die nächste Selektionsrunde.

Eine Einschränkung der direkten Selektion ist die Tatsache, dass die RNA dabei stets selbst die Funktion eines Reaktanten erfüllt. Damit die Methode der *in vitro* Selektion einem breiteren Spektrum an Reaktionen zugänglich wird, wurde in den Arbeitsgruppen von Eaton und Jäschke das Prinzip **der direkten Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden** entworfen[38, 55, 56]. Dieses ermöglicht die Generierung von Katalysatoren für die Umsetzung zweier beliebiger Reaktanden, indem einer der beiden Reaktionspartner A über einen inerten Linker kovalent mit der RNA verbunden wird.

Der zweite Reaktant B trägt wiederum eine Ankergruppe. Katalysieren nun aktive RNA-Sequenzen die gewünschte Reaktion A + B, erwerben diese gleichzeitig die Ankergruppe und können isoliert werden. Durch den Linker werden dabei Reaktant und Katalysator räumlich voneinander getrennt, so dass keine sterische Hinderung bei der Faltung der RNA und der Katalyse auftritt.
Soll nun auf eine Bindungsspaltung anstelle einer Bindungsknüpfung selektiert werden, kommt ein etwas anderes Schema zum Einsatz. In diesem Fall sind alle RNA-Sequenzen der Bibliothek bereits zu Beginn über das zu spaltende Substrat mit einer Ankergruppe versehen und nur aktive Spezies verlieren diese durch Abspaltung des Substrats. Anschließend werden inaktive Moleküle durch Immobilisierung aus dem Pool entfernt. Bei der Durchführung einer solchen Selektion auf eine Spaltungsreaktion ist dabei stets zu beachten, dass RNA-Moleküle am effektivsten sich selbst spalten können. Aus diesem Grund ist in vielen Fällen die Isolierung von Ribozymen mit RNaseaktivität der wahrscheinlichere Ausgang einer solchen *in vitro* Selektion.

Seit der ersten *in vitro* Selektion 1990 konnten neben Ribozymen auch zahlreiche **Aptamere** isoliert werden, die mittlerweile mehr als 100 verschiedene Zielmoleküle spezifisch binden können[57]. Dabei unterscheiden sich die Substrate erheblich in ihren Eigenschaften, beispielsweise in ihrer Molekülgröße. Es existieren Aptamere sowohl für einzelne Aminosäuren (L-Arginin), kleine Peptide (Substanz P), aber auch ganze Proteine (HIV-1 Reverse Transkriptase)[58]. Diese Vielfältigkeit zeigt, dass Nukleinsäuren nahezu jedes Targetmolekül gezielt erkennen und spezifisch binden können. Dabei sind sie durch *in vitro* Selektion schnell und einfach zugänglich und haben daher großes Potential für eine breite Anwendung, zum Beispiel auch als Arzneimittel. Der bekannteste Vertreter ist wohl das Aptamer Pegaptanib (Macugen®), das spezifisch VEGF (vascular endothelial growth factor) bindet und zur Behandlung der altersabhängigen Makuladegeneration eingesetzt wird.

Durch *in vitro* Selektion konnten neben Ribozymen und RNA-Aptameren auch DNAzyme[59-61] und DNA-Aptamere[62] isoliert werden, obwohl bisher keine natürlichen Vertreter bekannt sind. Hierfür kann ein ähnliches Selektionsschema wie oben beschrieben verwendet werden. Dabei entfällt jedoch der Schritt der Transkription, durch die DNA in RNA umgeschrieben wird. Anstelle dessen ist die Isolierung des

Sense-Stranges aus der dsDNA erforderlich[63]. Aufgrund der fehlenden 2'-Hydroxylgruppe ist die Möglichkeit der aktiven Beteiligung durch funktionelle Gruppen an der Katalyse sowie die Ausbildung komplexer Sekundär- und Tertiärstrukturen eingeschränkt im Vergleich zur RNA. Deshalb wurde bisher angenommen, dass die katalytischen Fähigkeiten von DNAzymen dem katalytischen Repertoire von Ribozymen unterlegen sind. Neueste Ergebnisse von Silverman und Mitarbeitern konnten diese Vermutung jedoch für die Knüpfung einer C-C-Bindung durch eine Diels-Alder-Reaktion entkräften[64]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Diels-Alder DNAzym in der Lage ist, die gewünschte Reaktion mit der gleichen Effizienz bekannter Ribozyme zu katalysieren.

Die größte Bedeutung von DNAzymen kommt bisher der sequenzspezifischen Spaltung von RNA mithilfe von divalenten Kationen als Cofaktoren zu. Die DNAzyme 17-8 und 10-23, die 1997 von Joyce und Mitarbeitern[65] selektiert wurden, werden heute als biotechnologische Werkzeuge in Laboratorien eingesetzt, um RNA Sequenzen an einer gewünschten Position gezielt zu schneiden.

In vitro Selektion mit modifizierten Nukleotiden und Cofaktoren

Wie bereits erwähnt, sind chemische Diversität und somit auch katalytisches Potential von Nukleinsäuren, Ribozymen und DNAzymen im Vergleich zu Proteinen deutlich eingeschränkt. Vor allem funktionelle Gruppen, die als Säure-Base Katalysator bei neutralem pH (z. B. Histidin), als primäres Alkyl-Amin (z. B. Lysin), als Carboxylat (z. B. Aspartat) oder als Thioalkohol (z. B. Cystein) fungieren können, fehlen den Nukleinsäuren[66]. Dies hat zur Folge, dass ein Großteil der katalytisch aktiven Nukleinsäuren divalente Metallionen als Cofaktoren zur Durchführung von Reaktionen verwenden. Fehlende funktionelle Gruppen können jedoch auch anderweitig zugeführt werden, beispielsweise indem modifizierte Nukleotide[67] eingesetzt werden. Joyce und Mitarbeiter selektierten auf diese Weise ein DNAzym, das in der Lage ist, durch einen ähnlichen Mechanismus wie RNase A Ribonukleinsäuren mithilfe eines aktiven Histidinrestes zu spalten. Dabei fungiert ein Imidazol, das durch Modifikation von Deoxyuridin eingeführt wurde, als Base. Auch Serinproteasen sollen auf diese Weise nachgeahmt werden. Madder und Mitarbeiter[68] synthetisierten 2'-Amino-2'-Desoxyuridin-Derivate, die mit Serin, Histidin und Aspartat modifiziert wurden. In

weiteren Versuchen soll durch den Einbau der entsprechenden Phosphoramidite in DNA Oligomere die Formierung von DNA-Duplexen ermöglicht werden, innerhalb derer die katalytische Triade korrekt positioniert ist und die dadurch in der Lage sein sollen, die Funktion einer Serinprotease zu erfüllen. Eine weitere Möglichkeit der Bereitstellung von Cofaktoren ist die Zugabe kleiner organischer Moleküle während der Selektion. Auch durch diesen Ansatz konnten DNAzyme generiert werden, die den Mechanismus der RNase A übernehmen und mithilfe von L-Histidin als Cofaktor in der Lage sind, Ribonukleinsäuren zu spalten[69]. Ein weiteres Beispiel für das Miteinbeziehen von Cofaktoren sind Arbeiten von Silverman und Mitarbeitern[70], die ein Deoxyribozym selektiert haben, das die Periodat-abhängige Elimination von Purinbasen (Depurinierung) ermöglicht.

1.2 Die Peptidbindung: eine „harte Nuss“ für Proteasen

Proteasen erfüllen durch Spaltung von Peptidbindungen im lebenden Mechanismus eine Vielzahl wichtiger Funktionen. Sie sind ubiquitäre Enzyme, d. h. sie kommen in allen Geweben und Zellen, in allen Arten von Organismen vor. Ihr allgegenwärtiges Auftreten spiegelt sich auch in ihren vielfältigen Funktionen wider. Zu den Aufgaben von Proteasen im Proteinstoffwechsel zählt die hydrolytische Spaltung von Nahrungsbestandteilen, wodurch die Absorption einzelner Aminosäuren und kleiner Peptide aus dem Magen-Darm-Trakt ermöglicht wird. Außerdem werden durch proteolytische Reaktionen bestimmte Proteine nach der Biosynthese durch Abspalten von Peptidfragmenten aktiviert bzw. deaktiviert. Weiterhin werden durch den Abbau nicht mehr benötigter Proteine durch Proteasen Aminosäuren für die Neu-Synthese von Proteinen bereitgestellt. Die Entwicklung von Protease-Inhibitoren in der medizinischen Forschung ist von großer Bedeutung, da Proteasen unter anderem an der Bildung von Tumoren und deren Metastasierung beteiligt sind. Darüber hinaus spielen proteolytische Reaktionen bei der Regulation der Blutgerinnung, des Komplementsystems, der Fibrinolyse und intrazellularen Signalwegen (wie beispielsweise der Apoptose) eine wichtige Rolle[71].

Die Peptidbindung

Eine Peptidbindung entsteht formal durch die Reaktion der α-Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der α-Aminogruppe einer zweiten Aminosäure unter Freisetzung eines Wassermoleküls. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt energetisch auf der Seite der Hydrolyse und erfordert daher bei der Bildung der Peptidbindung Energie. Während der Biosynthese von Proteinen, genauer bei der Beladung der 3’-Hydroxylgruppe der tRNA mit der entsprechenden Aminosäure, wird ATP verbraucht, um die Carboxylgruppe der Aminosäure als Aminosäureester für das Fortschreiten der Proteinsynthese zu aktivieren. Die eigentliche Knüpfung der Peptidbindung im Ribosom ist dann eine thermodynamisch spontan ablaufende Reaktion, die vom Peptidyltransferasezentrum katalysiert wird, das sich ausschließlich aus 23S rRNA (ribosomale RNA) zusammensetzt. Neueste Erkenntnisse[72] befürworten die Vorstellung, dass sich das

Ribosom für die Ausbildung einer Peptidbindung hauptsächlich Mechanismen bedient, die entropischen Ursprungs sind. Dazu gehören die exakte Positionierung der reaktiven Gruppen in räumlicher Nähe zueinander (durch Wechselwirkungen der rRNA mit den konservierten CCA-Enden der tRNAs und der α-Aminogruppe in der P- und A-Stelle), die Bereitstellung eines elektrostatischen Umfeldes, (um die benötigte freie Energie für die Ausbildung des stark polaren Übergangszustandes zu vermindern), die Abschirmung des reaktiven Zentrums gegen einen Großteil der Wassermoleküle und die leichtere Ausbildung der Abgangsgruppe durch Protonentransfer. Ein anderer Mechanismus, der bereits Einzug in Lehrbücher der Biochemie gehalten hat, nämlich dass das Stickstoffatom N3 des Adenosin-Restes A2451 der rRNA im aktiven Zentrum in Form einer allgemeinen Base an der Katalyse beteiligt ist, konnte in neuesten Untersuchungen nicht bestätigt werden[72].

Trotz der energetisch bevorzugten Hydrolyse sind Peptidbindungen in wässriger Lösung und ohne Zugabe von Katalysatoren sehr stabil und besitzen Halbwertszeiten zwischen 7 und 600 Jahren (pH 7 und 25°C) [73-76]. Die Spaltung einer Peptidbindung, beispielsweise von Glycin-Glycin, geschieht erst unter Verwendung von 1 M Natronlauge ($t_{½}$ ~ 2 Tage bei 25 °C), 1 M Salzsäure ($t_{½}$ ~ 150 Tage bei 25 °C) oder in Anwesenheit von Metallkomplexen, die beispielsweise Kobalt, Palladium oder Kupfer enthalten[77]. Diese hohe kinetische Stabilität erklärt sich durch die mesomeren Resonanzstrukturen der Peptidbindung und deren ausgeprägten Doppelbindungscharakter. Daraus ergeben sich eine planare Anordnung der an der Peptidbindung beteiligten Atome sowie eine verkürzte C-N-Bindung der Peptidgruppe in Vergleich zur N-C_{α}-Einfachbindung. Diese Konformation führt zu einer maximalen Überlappung der π-Orbitale, welche die Starrheit der Peptidbindung erklärt. Die partielle Doppelbindung zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffatom stabilisiert die Bindung, während gleichzeitig die Carbonylgruppe der Peptidbindung wenig zugänglich für einen nukleophilen Angriff ist.

Serinproteasen

Proteasen spalten Proteine durch eine Hydrolysereaktion, nämlich der Addition eines Wassermoleküls an eine Peptidbindung. Die Einteilung erfolgt in vier Hauptklassen:

1. Serinproteasen
2. Aspartatproteasen
3. Cysteinproteasen
4. Metalloproteasen

Dabei gehören nahezu ein Drittel aller Proteasen zur Klasse der Serinproteasen[78-81], die einen stark nukleophilen Serinrest im katalytischen Zentrum ausnutzen, um bei der Spaltung die nicht reaktive Carbonylfunktion der Peptidbindung angreifen zu können. Dabei wird während der Katalyse das Acylpeptid kurzfristig kovalent auf das Enzym übertragen. Durch röntgenkristallographische Strukturanalysen konnte bereits in den Sechziger Jahren gezeigt werden, dass dieser reaktive Serinrest Teil einer **katalytischen Triade**[82-84] ist, welche eine besonders hohe Nukleophilie ermöglicht (Abbildung 1.3). In dieser Anordnung ist der Serinrest über eine Wasserstoffbrücke mit einem Histidinrest verknüpft, so dass die Serinseitenkette positioniert und deren Hydroxylgruppe polarisiert wird. Die NH-Gruppe des Histidinrests wiederum bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Carboxylatgruppe einer Aspartatseitenkette, wodurch die Eigenschaften des Histidins als Protonenakzeptor zusätzlich verstärkt werden. Die exakte Charakterisierung aller während der Katalyse auftretenden Wechselwirkungen ist bis heute nicht erschöpfend geklärt und wird immer noch genauer untersucht (z. B. [85]).

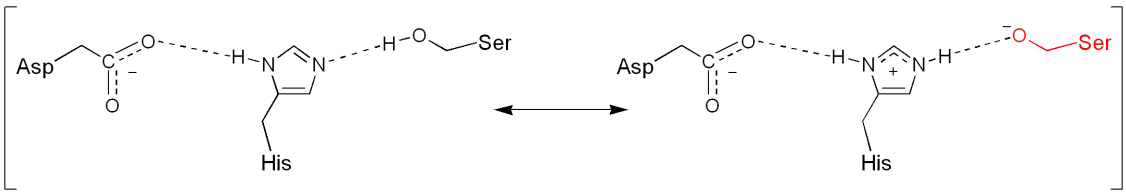


Abbildung 1.3: Die katalytische Triade. Im aktiven Zentrum von Serinproteasen ermöglicht die katalytische Triade die Bildung eines stark nukleophilen Serinrests.

Aufgrund der spezifischen Anordnung der katalytischen Triade kann auf den Mechanismus der Hydrolyse durch Serinproteasen geschlossen werden (Abbildung 1.4), welcher von Fastrez und Fersht[86] 1973 experimentell durch die Spaltung von Peptiden bestätigt wurde.

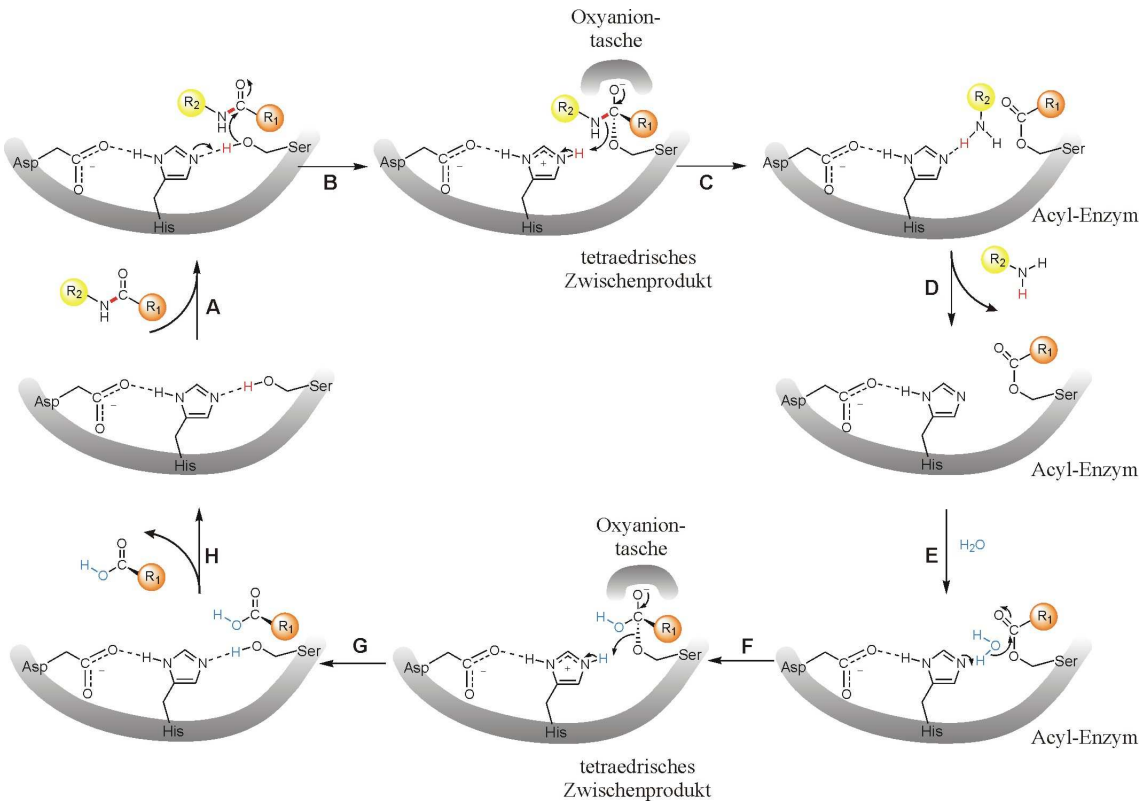


Abbildung 1.4: Mechanismus der Hydrolyse einer Peptidbindung durch Serinproteasen[71].

Zunächst erfolgt nach der Substratbindung (A) der nukleophile Angriff der Hydroxylgruppe des Serinrests auf das Carbonylkohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung (B), wodurch ein tetraedrisches Zwischenprodukt gebildet wird. Dieses trägt formal eine negative Ladung am Sauerstoff der Carbonylgruppe und wird durch Wechselwirkungen mit der so genannten Oxyaniontasche des Enzyms stabilisiert. Die Interaktionen finden dabei zwischen der negativen Ladung des Zwischenprodukts und den NH-Gruppen des Proteinrückgrates statt. Im Anschluss resultiert aus dem Zerfall des Zwischenprodukts und der Übertragung eines Protons vom Histidin auf die entstandene Aminogruppe das Acylenzym und das C-terminale Spaltprodukt mit der freien Aminofunktion kann sich vom Enzym lösen (C und D). Die Hydrolyse der Estergruppe des Acylenzyms erfolgt unter Mitwirkung eines Wassermoleküls (E)

prinzipiell nach dem gleichen Mechanismus wie die Spaltung der Peptidbindung zuvor: Das Wassermolekül greift die Carbonylgruppe des Esters an, wobei wiederum der Histidinrest durch Abstraktion eines Protons dessen Nukleophile erhöht und erneut ein tetraedrisches Zwischenprodukt gebildet wird (F). Diese Struktur zerfällt in Analogie zu Schritt C, wodurch die freie Carbonsäure gebildet wird (G) und durch deren Freisetzung das Enzym schließlich in seinen Ausgangszustand zurückversetzt wird (H).
Dem Reaktionsmechanismus der Serinproteasen lassen sich zwei allgemeine und weit verbreitete Katalyseprinzipien zuordnen: die kovalente Katalyse, wobei im Verlauf der Katalyse eine reaktive Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms vorübergehend eine kovalente Bindung mit dem Substrat eingeht, und die allgemeine Säure-Base-Katalyse, wobei ein anderes Molekül als Wasser (in Fall der Serinproteasen das Histidin), die Funktion eines Protonendonors oder -akzeptors übernimmt.

Trotz der strukturellen Homologie verwandter Serinproteasen (z. B. Chymotrypsin, Trypsin und Elastase) beeindrucken diese Enzyme durch ihre hohe Substratspezifität, welche entscheidend durch Wechselwirkungen mit Aminosäureresten an der aminoterminalen Seite der zu spaltenden Peptidbindung determiniert wird. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die direkt angrenzende Seitenkette, welche die speziellen Anforderungen der jeweils entsprechenden Bindungsstelle im Enzym erfüllt. So spaltet beispielsweise Trypsin spezifisch Peptidbindungen nach Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten wie Arginin und Lysin, weil diese mit einem Aspartatrest der S1-Bindungstasche ionische Wechselwirkungen eingehen und so die zu spaltende Bindung im aktiven Zentrum optimal positionieren. Auch wenn in Lehrbüchern Enzymspezifität oft anhand des Beispiels der Wechselwirkungen zwischen Substrat und S1-Bindungstasche der Chymotrypsin-verwandten Serinproteasen veranschaulicht wird, zeigten Mutationsstudien der entsprechenden Aminosäuren, dass es nicht so einfach ist, die Spezifität der einen Protease in eine andere zu überführen. Neben der S1-Bindungsstelle sind noch weitere Elemente an Substratbindung und Substraterkennung beteiligt. Dazu gehören die weiteren Bindungstaschen auf der aminoterminalen Seite der zu spaltenden Peptidbindung, sowie Wechselwirkungen des Enzyms mit den Aminosäureresten auf der carboxyterminalen Seite der Abgangsgruppe.

Katalytische Antikörper

Natürlich vorkommende proteolytische Aktivität wird nicht nur im Zusammenhang mit Enzymen beobachtet, sondern konnte auch bei deren strukturellen und funktionellen Verwandten, den Antikörpern, gezeigt werden. Das mögliche katalytische Potential von Antikörpern (CAbs catalytic antibodies, Abzym) wurde zum ersten Mal in den Siebzigern von S. Erhan und L. D. Greller[87] beschrieben. Sie agieren einerseits wie Antikörper, indem sie ihr komplementäres Antigen zunächst erkennen und binden. Andererseits können sie zusätzlich wie ein Enzym eine Reaktion an ihrem Substrat katalysieren. Unspezifische katalytische Antikörper treten ubiquitär bei gesunden Menschen auf, als Teil ihrer angeborenen Immunabwehr. Weit häufiger werden jedoch antigenspezifische CAbs in Verbindung mit Autoimmunkrankheiten beobachtet, bei denen sie sowohl schädliche als auch heilsame Wirkung haben können. Von größter Bedeutung ist hierbei die Aktivität als Proteasen, neben den Funktionen als DNasen, RNasen, Esterasen oder Amylasen[88].

Ihre proteolytischen Eigenschaften machen katalytische Antikörper zu vielseitig einsetzbaren Werkzeugen in Medizin, Diagnostik und chemischer Industrie. Hierfür ist es jedoch notwendig, „maßgeschneiderte“ katalytische Antikörper künstlich herstellen zu können[89-92]. Der allgemeine Grundsatz der enzymatischen Katalyse wurde ursprünglich 1946 von Pauling beschrieben und später von Jencks[93] ausgebaut. Er besteht darin, dass durch molekulare Bindung und Stabilisierung des Übergangszustandes einer Reaktion diese ermöglicht wird. Diesen Grundsatz machten sich Lerner[94] und Schultz[95] zunutze und gewannen die ersten katalytischen Antikörper. Dabei werden Analoga von Übergangszuständen der gewünschten Reaktionen, beispielsweise Phosphonamidite zur Spaltung von Amiden, als Haptene für Immunisierungen eingesetzt[90], bei denen auf das natürliche Reservoir von 10^8-10^{10} verschiedenen Antikörpern zurückgegriffen wird. Die Hydrolyse von Amiden durch CAbs erfolgt dabei mit einer Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} von 0.08 min^{-1} und einem k_M-Wert von 562 µM. Spezifische katalytische Antikörper zur Spaltung krankheitsassoziierter Peptide und Proteine können ebenfalls durch Immunisierung angefertigt werden (z. B. [96]). Die Analyse der Aminosäuresequenzen und Molecular Modelling Untersuchungen zeigten, dass sich diese gewonnenen Antikörper, ebenso wie einige natürliche CAbs, des gleichen Mechanismus wie Serinproteasen bedienen und ebenfalls katalytische Triaden, bestehend aus Serin, Histidin und Aspartat, besitzen.

Diese Erkenntnis macht man sich zur Entwicklung weiterer katalytischer Antikörper mit Proteaseaktivität zunutze, indem die Aminosäuren der Triade mittels ortsspezifischer Mutagenese gezielt in nicht katalytisch aktive Antikörper (gegen ein bestimmtes Peptid) eingebaut werden. Durch diesen Ansatz konnte eine gewisse proteolytische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Antikörper erhalten werden[97]. Durch das Vorhandensein einer Triade liegt es nahe, dass sich katalytische Antikörper im Allgemeinen ähnlicher katalytischer Mechanismen bedienen wie Serinproteasen. Sie besitzen eine größere Affinität für den Übergangszustand der Peptidbindung als für deren Grundzustand und stabilisieren somit das tetraedrische Zwischenprodukt. Außerdem konnte auch bei katalytischen Antikörpern eine kovalente Bindung des Substrats und die Bildung eines Acyl-Antikörpers durch den nukleophilen Angriff der reaktiven Aminosäuren der katalytischen Triade nachgewiesen werden.

Zu den möglichen klinischen Anwendungen katalytischer Antikörper[88, 90] gehören aufgrund ihrer Fähigkeiten:

1. der Abbau oder die Spaltung kleiner toxischer Moleküle im menschlichen Körper zu dessen Entgiftung (beispielsweise Kokain oder Nikotin)
2. die Aktivierung von Prodrugs bei der zielgerichteten Chemotherapie und
3. die Bekämpfung von Krankheiten wie HIV-Infektionen oder Alzheimer durch gezielte Spaltung krankheitsassoziierter pathogener Peptide und Proteine.

Künstliche Serinproteasen – Serinprotease-Mimetika

Die große Effizienz und Selektivität, mit der die Natur in der Lage ist, Reaktionen unter milden Bedingungen zu katalysieren, hat Forscher schon immer dazu inspiriert, enzymatische Mechanismen auch für die organische Synthese nutzbar zu machen. Das angestrebte Ziel ist dabei stets die Entwicklung „maßgeschneiderter“, künstlicher Enzyme oder Enzym-Mimetika [89, 98, 99]. Hierfür müssen die ausgeklügelten dreidimensionalen Strukturen, die die Natur in Milliarden von Jahren hervorgebracht hat, imitiert werden. Die besondere Herausforderung dabei ist, dies innerhalb einer Zeitskala zu realisieren, die für die Forschung praktikabel ist. Als Modellreaktion ist die Hydrolyse von Amiden besonders geeignet, da sie zum einen im wässrigen Medium nur durch geeignete Katalysatoren erreicht werden kann und zum anderen der

Mechanismus, mit dem Serinproteasen eine solche Spaltung ermöglichen, sehr gut untersucht ist und dadurch leichter nachgeahmt werden kann.

Für die Entwicklung solcher künstlicher Serinproteasen oder Mimetika gibt es verschiedene Ansätze (Abbildung 1.5), die jedoch vom selben Prinzip ausgehen: Enzyme sind Makromoleküle, die Reaktionen durchführen, indem sie durch Abschirmung eines Großteils der wässrigen Phase hydrophobe „Reaktionsräume“ schaffen und somit die für die Reaktion nötige thermodynamische Stabilität des Übergangszustandes ermöglichen[98]. Dabei können die katalytisch funktionellen Gruppen, die in diesen „Reaktionsräumen“ lokalisiert sind, sowohl aktive Aminosäurereste des Enzyms selbst, als auch hinzugefügte Cofaktoren (wie in Holoenzymen) sein. Als Konsequenz hieraus ergibt sich, dass jede Substanzklasse, die eine Gerüststruktur ausbilden kann und abschirmende Eigenschaften besitzt, für die Entwicklung künstlicher Enzyme genutzt werden kann. Die Einführung katalytisch aktiver Gruppen ist hierbei durch Modifikation der Gerüstsubstanz oder durch Zugabe von Cofaktoren möglich. Künstliche Enzyme können nach der Art des verwendeten Gerüstmoleküls in folgende Gruppen eingeteilt werden:

1. Makromoleküle: Proteine und proteinähnliche Strukturen (synthetische Polymere)
2. weniger komplizierte Systeme wie Peptide
3. nicht peptidische makromolekulare Rezeptoren.

Letztere bestehen aus einer Substratbindungsstelle und können mit funktionellen Gruppen modifiziert werden (Cyclodextrine, Kronenether, usw.). Die nachfolgenden Beispiele geben nur einen kleinen Einblick in das Forschungsgebiet künstlicher Enzyme und beschäftigen sich ausschließlich mit der Hydrolyse von Ester-, Amid- oder Peptidbindungen durch Serinprotease-Mimetika mittels Serin, Histidin und/oder Aspartat oder deren funktioneller Gruppen.

Als makromolekulare Gerüstverbindungen kommen sowohl **synthetische Polymere** als auch **Proteine** zum Einsatz. Zu Letzteren zählen die **katalytischen Antikörper** als semisynthetische, künstliche Enzyme (siehe vorheriges Kapitel), welche die bisher erfolgreichsten Protease-Mimetika darstellen[100] (Abb. 1.5 A). Nach wie vor ist rationales Design „maßgeschneiderter“ Enzyme nur bedingt möglich, da anhand der Aminosäuresequenz die Faltung eines Enzyms nicht genau vorhergesagt werden kann. Deshalb kommen bei der Optimierung enzymatischer Eigenschaften einerseits

evolutionäre Methoden (gerichtete Evolution, **directed evolution**) zum Einsatz, wobei Zufalls-basierte Mutationen in ein natürliches Enzym eingebaut werden und die daraus entstandene Bibliothek an veränderten Enzymen auf Mutanten mit verbesserten Eigenschaften untersucht wird[101-103]. Zum anderen kann ein natürliches Enzym, dessen Struktur genau bekannt ist, mittels **Protein-Engineering** (Abb. 1.5 B) neue katalytische Aktivität erlangen, indem durch ortsspezifische Mutagenese aktive Aminosäuren eingeführt werden. Beispielsweise wurde Cyclophilin, eine Prolin-Isomerase ohne hydrolytische Aktivität, durch den gezielten Einbau von Serin, Histidin und Aspartat in die Peptidbindungstasche in eine Prolin-spezifische Endopeptidase umgewandelt[104]. Bei der Spaltung des Dipeptides Alanin-Prolin konnten dabei eine katalytische Effizienz (Substratspezifität) (k_{cat}/K_m) von $0.2 \cdot 10^4$ M^{-1} s^{-1} und eine verbesserte Reaktionsrate (k_{cat}/k_{uncat}) von $8 \cdot 10^8$-fach erreicht werden.

Synthetische Polymere sind die weiteren Makromoleküle neben Proteinen, die für die Gewinnung von Enzym-Mimetika verwendet werden. Entscheidende Vorteile synthetischer Polymere sind ihre einfachere Zugänglichkeit, die höhere Stabilität, und dass sie in der Lage sind, ein größeres Spektrum an Reaktionen zu katalysieren, vorausgesetzt es gelingt, die Prinzipien enzymatischer Katalyse auf sie zu übertragen.

Die Einführung katalytisch aktiver Gruppen erfolgt meist durch Copolymerisation geeigneter Monomere, die die gewünschte Funktionalität tragen. Um eine geeignete Bindungsstelle für das gewünschte Substrat zu schaffen, kommt häufig die Methode des „Prägens“ oder **Imprinting** zum Einsatz (Abb. 1.5 C). Dabei wird die Vernetzung des Polymers in Anwesenheit des Substrates bzw. eines Analogons des Übergangszustandes durchgeführt[105]. Lele und Mitarbeiter[106, 107] benutzten hierfür *N*-Methacryloyl-Derivate von L-Serin, L-Histidin und L-Aspartat und führten die Polymerisation in Anwesenheit eines Templates (*N*-Nicotinyltyrosylbenzylester) durch, welches ein Substratanalogon darstellt, das in der Lage ist, Metallionen zu koordinieren. Die zusätzliche Beigabe von Cobalt-II-Ionen ermöglicht die Koordination der Aminosäurereste und des Templates und somit auch eine räumliche Annäherung der katalytisch aktiven Gruppen und des Substrats. Die Untersuchungen zur hydrolytischen Aktivität der Polymere wurde jedoch nur anhand von Estern als Substrat durchgeführt, und nicht mit Amiden oder Peptiden.

Zahlreiche Versuche wurden bereits unternommen, Serinprotease-ähnliche Aktivität durch **Peptide** zu imitieren, in die die Aminosäurereste der katalytischen Triade

eingebaut wurden. Als Grundlage hierfür können helikale, zyklische, verzweigte oder gefaltete Peptide[108] dienen, entworfen durch Molecular Modelling (Abb. 1.5 D), kombinatorische Ansätze mit zwei oder drei unabhängigen Peptidketten[108, 109] oder Peptid- Dendrimere[110, 111]. Allerdings wurden auch diese Experimente meist mit aktivierten Estern durchgeführt und zeigten bisher nur moderate katalytische Aktivität. Diese musste teilweise revidiert werden, da die Ergebnisse nicht reproduziert werden konnten[112-117]. In einem Übersichtsartikel von 1996 beurteilen M. J. Corey und E. Corey die aktuellen Fortschritte zum *de novo* Design von Peptiden als Biokatalysatoren und vergleichen diese mit katalytischen Antikörpern, rekonstruierten Enzymen, nicht peptidischen Mimetika und Ribozymen[118]. Sie schlussfolgerten, dass katalytische Aktivität nur möglich ist, wenn Peptide eine feste Konformation aufweisen, woraufhin vermehrt Screening oder Modelling vorgeformter Strukturen zum Einsatz kamen[119-121].

Die Entwicklung von **makromolekularen Rezeptoren** als Enzym-Mimetika zählt ebenfalls zum traditionellen „Design-Ansatz“. Hierbei kommen eine Vielzahl makrozyklischer Verbindungen wie Cyclodextrine[122-125], Cylophane[98], Kronenether, Kryptanden[100] und viele mehr zur Anwendung. Allen ist gemein, dass sie in der Lage sind, hydrophobe Hohlräume zur Verfügung zu stellen, die als Bindungsstelle und aktives Zentrum dienen. So sind nicht modifizierte Cyclodextrine (Abb. 1.5 E) beispielsweise in der Lage, die Hydrolyse von Estern und aktivierten Amiden[126, 127] zu katalysieren. Optional können geeignete funktionelle Gruppen wie Imidazole, Histidine, Peptide[128], Metallkomplexe und viele mehr als aktive Gruppen eingeführt werden.

Das einzige System von Mimetika, das es bisher mit der Reaktionsrate von Enzymen aufnehmen kann, sind einfache, **intramolekulare Reaktionen** wie beispielsweise Zyklisierungen und dabei im Speziellen nukleophile Reaktionen[100] (Abb. 1.5 F). Hierbei wird die zu katalysierende Reaktion Teil einer thermodynamisch begünstigten Zyklisierungsreaktion, wodurch Systeme geschaffen werden, die in der Lage sind, extrem stabile Bindungen innerhalb von Sekunden zu spalten. Diese Intramolekularität kann auch durch kovalente Bindung des Mimetikums an das Substrat induziert werden (induced intramolecularity), wodurch eine Hydrolyse nicht aktivierter Amidbindungen bei neutralem pH möglich ist. Dabei wird die Enzym-Substrat Bindung imitiert[129].

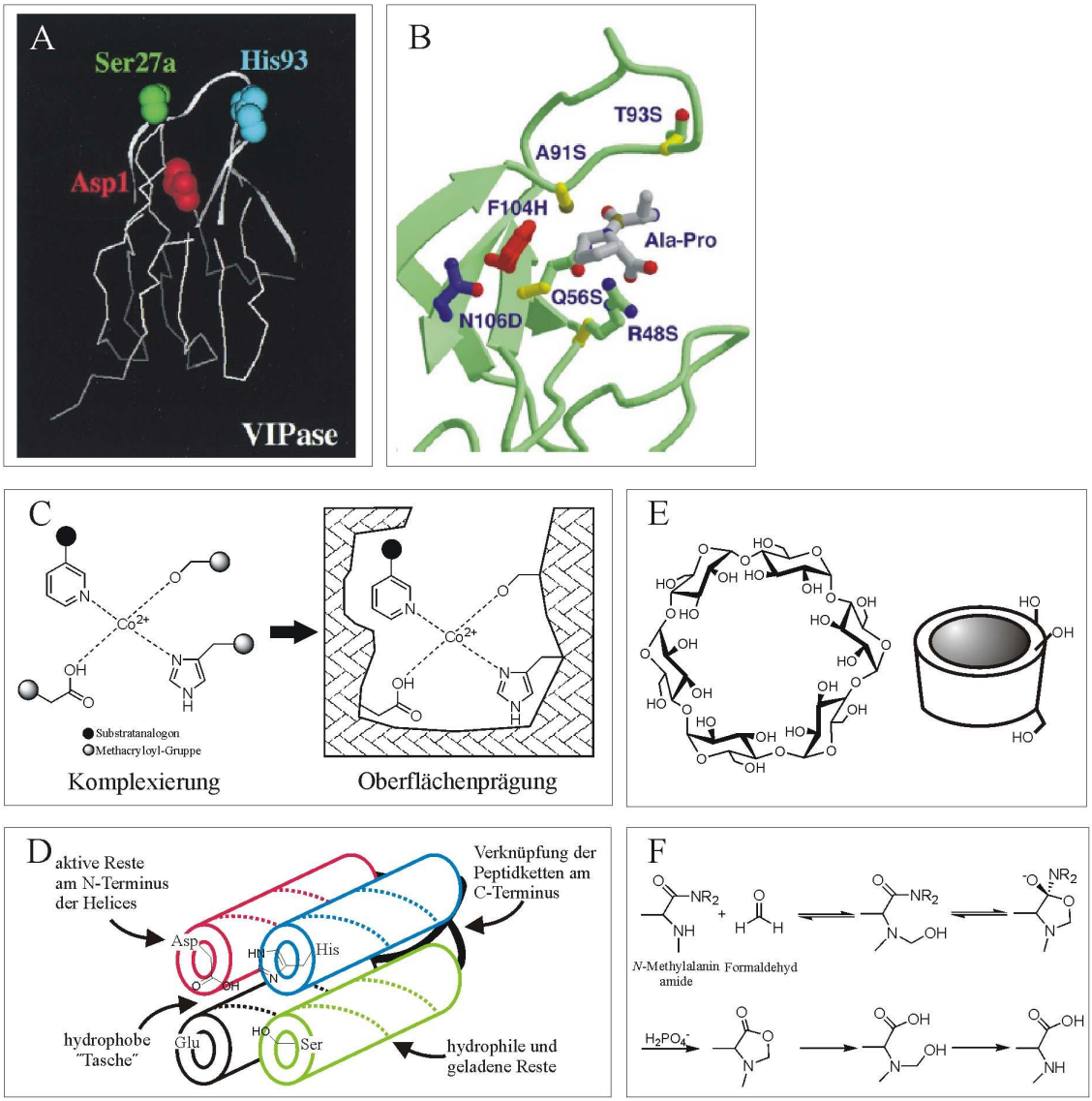


Abbildung 1.5: **Künstliche Serinproteasen und Serinprotease-Mimics**. A: Katalytischer Antikörper VIPase: Spaltet Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) mithilfe einer Triade bestehend aus Ser, His, Asp; gewonnen durch Immunisierung[96]; B: Protein-Engineering von Cyclophilin: Umwandlung einer Prolinisomerase in eine prolinspezifische Peptidase durch Einführung einer katalytischen Triade mittels ortsspezifischer Mutagenese[104]; C: Imprinting-Verfahren von synthetischen Polymeren: Copolymerisation in Anwesenheit modifizierter Methacryloylmonomer (mit Ser, His, Asp), Substratanalogon und Co^{2+}-Ionen (abgewandelt übernommen aus[106]); D: Helikale Peptide mit Esteraseaktivität: die vier amphiphilen Peptidhelices sind C-terminal miteinander kovalent verknüpft; die Innenseite des Komplexes bildet eine hydrophobe Tasche; jeweils ein Aminosäurerest der Triade befindet sich N-terminal an einer Helix (abgewandelt übernommen aus[112]); E: α-Cyclodextrin[100]; F: Induzierte Intramolekularität: Amidhydrolyse in neutralem Phosphatpuffer durch Formaldehyd[129].

Trotz zahlreicher Anstrengungen konnten bisher keine künstlichen Enzyme geschaffen werden, die es mit der komplexen Leistung natürlicher Enzyme aufnehmen könnten. In Anbetracht dessen, dass *de novo* Synthesen von Enzymen beim aktuellen Stand der Forschung kaum möglich und Berechnungen über deren zu erwartende Struktur immer noch zu ungenau sind, geht der Trend neuer Techniken hin zu *in vitro* Evolutionsmethoden. Dabei steht nicht mehr das spezifische Binden des Substrates als Selektionskriterium im Vordergrund, sondern die direkte und gezielte Isolation aufgrund der gewünschten Funktion des Enzyms[101]. Dies entspricht exakt den Vorteilen der direkten linkergekoppelten *in vitro* Selektion von Ribozymen, deren Prinzipien nun versucht werden auf die Evolution von Enzymen zu übertragen. Allerdings erfordert dieses Vorhaben, durch die Trennung von Genotyp und Phenotyp bei Proteinen, einen weitaus größeren methodischen Aufwand[130].

Letzten Endes spricht für die Methodik der Selektion, sowohl für Ribozyme als auch für künstliche Enzyme, dass sich natürliche Enzyme mit ihren extrem spezialisierten Funktionen auch im Laufe der Evolution durch Selektion, Vervielfältigung und Mutationen entwickelt haben[99].

2 Zielsetzung

Die Hypothese einer RNA-Welt, die im Laufe der Evolution der heutigen Form des „modernen“ Lebens vorausgegangen sein könnte, konnte durch die Entdeckung natürlicher und künstlicher Ribozyme bereits entscheidend untermauert werden. Allerdings ist nach wie vor ungewiss, in welcher Form sich der Übergang hin zu DNA- und Protein-basierten Lebensformen vollzogen hat. Aufschluss darüber könnten Ribozyme geben, die Reaktionen an Peptidbindungen katalysieren können und Ribozyme, die ihr eingeschränktes katalytisches Potential, bedingt durch ihre geringe Anzahl funktioneller Gruppen, unter Verwendung von Cofaktoren erweitern. Vor diesem Hintergrund ist das Ziel dieser Arbeit die *in vitro* Selektion von Ribozymen mit Proteaseaktivität unter Einbindung von Cofaktoren. Diese sollen in Analogie zu Serinproteasen eine katalytische Triade, bestehend aus Serin, Histidin und Aspartat, enthalten. Um eine solche Selektion durchführen zu können, müssen folgende Schritte etabliert werden:

- Zunächst soll das Peptidsubstrat entworfen und mittels Festphasensynthese hergestellt werden. Neben der eigentlich zu spaltenden Sequenz enthält dieses weitere funktionelle Einheiten. Inerte Linker ermöglichen die flexible Verknüpfung des Substrats einerseits mit einer Ankergruppe und andererseits mit der RNA-Bibliothek. Hierfür wird N-terminal eine funktionelle Gruppe eingeführt, die eine Konjugation mit der RNA ermöglicht. Zusätzlich wird zwischen das Peptid und die RNA-Bibliothek eine zweite Ankergruppe eingefügt, welche bei der Isolierung aktiver Spezies die Unterscheidung zwischen Ribozymen mit der gewünschten Proteaseaktivität von denen mit RNaseaktivität erlaubt.
- Für die Herstellung von RNA-Peptid-Konjugaten bedarf es zum einen einer effizienten Methode, die die Modifikation einer *in vitro* transkribierten RNA-Bibliothek erlaubt und zum anderen einer Konjugationsstrategie, die eine quantitative und kovalente Verknüpfung mit dem Peptidsubstrat ermöglicht. Hierfür sollen verschiedene Ansätze untersucht und miteinander verglichen werden.

- Des Weiteren soll ein Cofaktor hergestellt und charakterisiert werden, der sowohl die drei Aminosäuren der Triade in räumliche Nähe zueinander bringt als auch durch Hybridisierung mit der RNA eine Verankerung ermöglicht.

Für die Durchführung der eigentlichen Selektion müssen zunächst die einzelnen Schritte eines Selektionszyklus an die speziellen Ansprüche des gesuchten Ribozyms angepasst und hierfür optimiert werden. Diese beinhalten die Transkription der RNA-Bibliothek, die Konjugation der RNA-Bibliothek mit dem multifunktionellen Peptidsubstrat, die aufeinander folgende zweifache Immobilisierung unter Verwendung unterschiedlicher Ankergruppen und Affinitätsharze sowie die Reverse Transkription und die Polymerase-Kettenreaktion.
Zusätzlich werden für die Etablierung im Vorfeld und die Analytik im Anschluss der Selektion eine Positivkontrolle für die Spaltung des Peptids und eine analytische Untersuchungsmethode für die Bestimmung der Aktivität erhaltener Ribozyme benötigt. Nach erfolgreicher Selektion sollen die Sequenzen der angereicherten Bibliothek kloniert und sequenziert werden und erste Untersuchungen zur Aktivität und Struktur der aussichtsreichsten Klone erfolgen.

3 Ergebnisse

3.1 Konzeption der Selektionsstrategie

Das Ziel dieser Arbeit ist die Generierung künstlicher Ribozyme mit Proteaseaktivität unter Verwendung der Methode der *in vitro* Selektion. Zur Realisierung dieses Projekts haben wir uns für den verbesserten Ansatz der direkten Selektion mit linkergekoppelten Substraten entschieden. Das bedeutet, dass jedes Mitglied der RNA-Bibliothek über einen inerten Linker kovalent mit dem zu spaltenden Peptidsubstrat verbunden ist und das Selektionskriterium die Spaltung des Peptids durch RNA-Katalyse darstellt. Das folgende Selektionsschema gibt die einzelnen Schritte der Selektion im Detail wieder (Abb. 3.1).

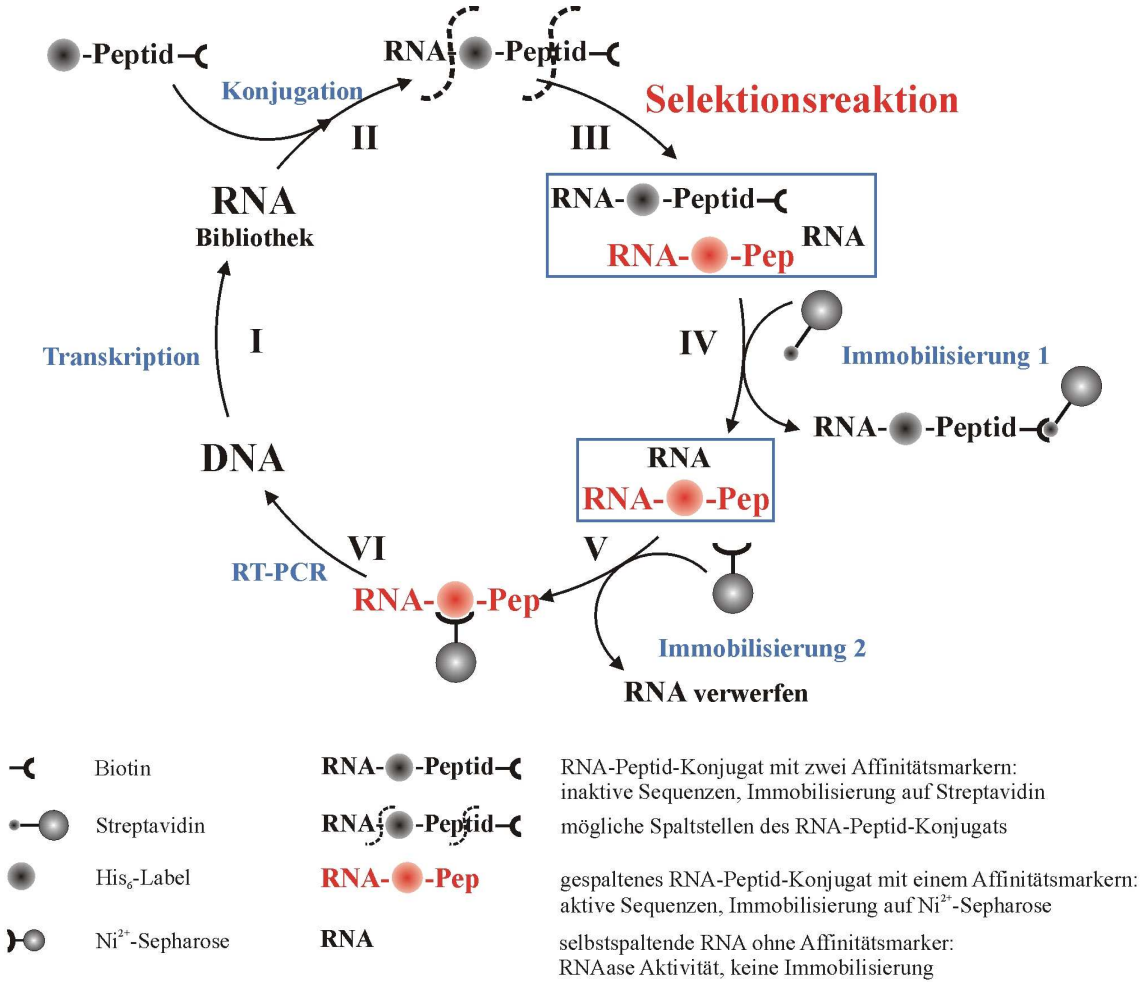


Abbildung 3.1: Allgem. Schema für die Selektion von Ribozymen mit Proteaseaktivität.

Ausgehend von einer dsDNA Matrize wird durch *in vitro* Transkription (I) unter Verwendung eines Initiatornukleotids eine RNA Bibliothek generiert, in der sämtliche Sequenzen am 5'-Ende mit einer funktionellen Gruppe modifiziert sind. In einer anschließenden Konjugationsreaktion (II) wird das zu spaltende Peptidsubstrat kovalent an die RNA gebunden. Als Besonderheit verfügt das Peptidsubstrat neben einer Funktionalität, welche die Knüpfung an die RNA ermöglicht, zusätzlich über zwei unterschiedliche Affinitätsmarker. Das Biotin, die erste Ankergruppe, befindet sich dabei am C-Terminus des Peptids, wohingegen sich die zweite Ankergruppe, der His_6-Marker, zwischen der RNA und dem Peptid befindet. Die auf die Konjugation folgende Selektionsreaktion (III), in der die Spaltung des Peptids durch aktive RNA-Spezies stattfinden soll, wird in Anwesenheit eines Cofaktors durchgeführt. Durch eine eingeschränktere Anzahl funktioneller Gruppen der Nukleobasen im Vergleich zur Vielfalt der Aminosäuren besteht die Möglichkeit, dass RNA allein nicht in der Lage ist, eine Peptidbindung zu spalten. Aus diesem Grund wird ein Cofaktor, welcher die drei Aminosäuren der katalytischen Triade von Serinproteasen enthält, der Selektionsreaktion zugegeben. Die anschließende Möglichkeit einer zweifachen Immobilisierung stellt eine Neuerung des Selektionsschemas dar, die bis dahin in unserem Arbeitskreis noch nicht verwendet wurde. Durch die besondere Anordnung der beiden unterschiedlichen Affinitätsmarker wird in den aufeinander folgenden Immobilisierungsschritten (IV und V) eine Isolierung proteolytisch aktiver Sequenzen, von nicht aktiven und sich selbst spaltenden RNA-Spezies ermöglicht. Bei der ersten Immobilisierung auf Streptavidin (IV) werden alle inaktiven Sequenzen aufgrund des noch vorhandenen Biotins entfernt. Aktive Sequenzen haben durch die Spaltung des Peptids das Biotin verloren, ebenso wie sich selbst spaltende RNA-Sequenzen. Erstere können dann durch das noch vorhandene His_6-Label mittels der Immobilisierung auf Ni^{2+}-Sepharose (V) spezifisch für die anschließende Vervielfältigung durch Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) (VI) isoliert werden.

Für die Etablierung der beschriebenen Selektionsstrategie müssen zunächst folgende Verbindungen hergestellt werden:

1. das modifizierte Peptidsubstrat,
2. ein entsprechendes Initiatornukleotid
3. geeignete Cofaktoren

Zusätzlich wird eine effiziente und reproduzierbare Methode für die Konjugation von RNA und Peptidsubstrat benötigt. Die aufeinander folgende Immobilisierung auf zwei verschiedenen Harzen mittels Affinitätschromatographie wurde in dieser Weise noch nicht durchgeführt und bedarf einer intensiven Optimierung.

3.2 Design und Synthese multifunktioneller Peptidsubstrate

Das für die Selektion benötigte Peptidsubstrat muss, wie bereits erwähnt, verschiedene Funktionalitäten enthalten (Abb. 3.2). Zunächst wurde eine kurze Peptidsequenz von fünf Aminosäuren ausgewählt, die das eigentliche, zu spaltende Peptid darstellt (Abb. 3.2 A). Hierfür diente die Substratspezifität der Serinprotease Trypsin als Orientierung. Trypsin spaltet sehr spezifisch Peptidbindungen nach Aminosäuren mit basischen Seitenketten wie Arginin (Arg, R) oder Lysin (Lys, K), welche durch ihre positive Ladung zu zahlreichen Wechselwirkungen mit Nukleobasen und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNA in der Lage sind. Zusätzlich enthält die Peptidsequenz ein Prolin (Pro, P), das durch einen „Knick“ im Peptidrückgrat das Arginin für die Spaltung prädestinieren soll und ein Phenylalanin (Phe, F), welches durch eine aromatische Seitenkette zu einer leichteren UV-photometrischen Detektion beiträgt und zusätzlich dipolare Wechselwirkungen ermöglicht.

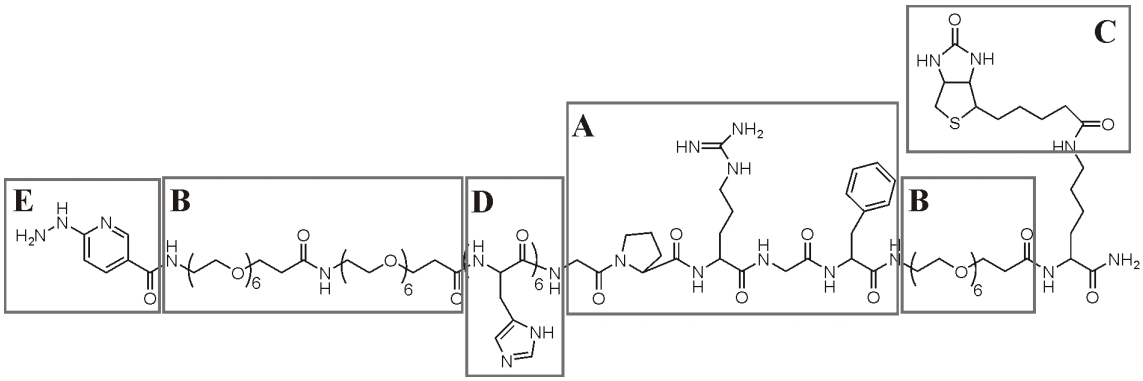


Abbildung 3.2: Multifunktionelles Design der Peptidsubstrate (am Beispiel von HNA-$(PEG_6)_2$-H_6GPRGF-PEG_6-K(Biotin); **A**: das eigentliche, zu spaltende Peptidsubstrat; **B**: flexible und inerte Polyethylenglykol-Linker; **C**: Affinitätsmarker Biotin, eingeführt durch Modifikation der Lysin Seitenkette; **D**: Affinitätsmarker His_6-tag; **E**: N-terminale, funktionelle Gruppe für die Konjugation von Peptid und RNA (z. B. Hydrazin-Nikotinsäure).

Polyethylenglykol (PEG) unterschiedlicher Länge (6, 7 oder 10 Einheiten) wurde aufgrund seiner guten Löslichkeit in wässrigen Systemen, fehlender übergeordneter Strukturen, großer Flexibilität und chemischer Beständigkeit als Linker an beiden Enden der Peptidsequenz gewählt (Abb. 3.2 B). Die terminale Modifizierung der PEG-Linker, einerseits mit einer Carbonsäurefunktion und andererseits mit einer Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc) geschützten Aminofunktion, machen sie der Festphasensynthese von Peptiden unter Standardbedingungen zugänglich. Außerdem können mittels dieser Linker sowohl RNA-Bibliothek und Peptidsubstrat als auch Peptidsubstrat und der Affinitätsmarker Biotin flexibel miteinander verbunden werden, ohne dass es bei Interaktionen der einzelnen funktionellen Einheiten untereinander zu sterischen Hinderungen kommt. Als Ankergruppe wurde zum einen Biotin ausgewählt (Abb. 3.2 C), das durch die große Affinität zum Protein Streptavidin ideale Eigenschaften für eine effiziente und spezifische Immobilisierung aufweist. Biotin ist durch modifizierte Lysinreste der Peptidsynthese leicht zugänglich und wurde bereits in zahlreichen Selektionsstrategien erfolgreich verwendet. Als weiterer Affinitätsmarker wurde eine Sequenz von sechs aufeinander folgenden Histidinen, ein so genanntes His_6-tag, zwischen RNA und Peptidsubstrat eingeführt (Abb. 3.2 D), welches eine Isolierung durch Komplexbildung mit immobilisierten Ni^{2+}-Ionen (beispielsweise auf Sepharose-Harz) ermöglicht. Diese Methode, die auch als IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) bezeichnet wird, wurde bisher hauptsächlich zur Aufreinigung von Proteinen angewendet. Als funktionelle Gruppen für die Konjugation mit der RNA-Bibliothek werden abhängig von der jeweiligen Kopplungsstrategie am N-Terminus Hydrazin-Nikotinsäure (Abb. 3.2 E), Cystein oder lediglich die freie, terminale Aminogruppe, ebenfalls durch Festphasen-Peptidsynthese, eingeführt.

Bereits 1963 entwickelte der Chemiker R. B. Merrifield die Festphasen-Peptidsynthese (SPPS, Solid Phase Peptide Synthesis)[131], welche heute die Methode der Wahl zur Herstellung synthetischer Peptide darstellt. Die entscheidenden Vorteile gegenüber der Synthese in Lösung sind die Minimierung von Nebenprodukten durch sequenzspezifische Kopplung und Entschützung, die hohen Ausbeuten durch die Verwendung eines Überschusses an Reagenzien, das leichte Entfernen dieser überschüssigen Reagenzien durch extensives Waschen und Abfiltrieren und die Möglichkeit der Automatisierung (Abb. 3.3).

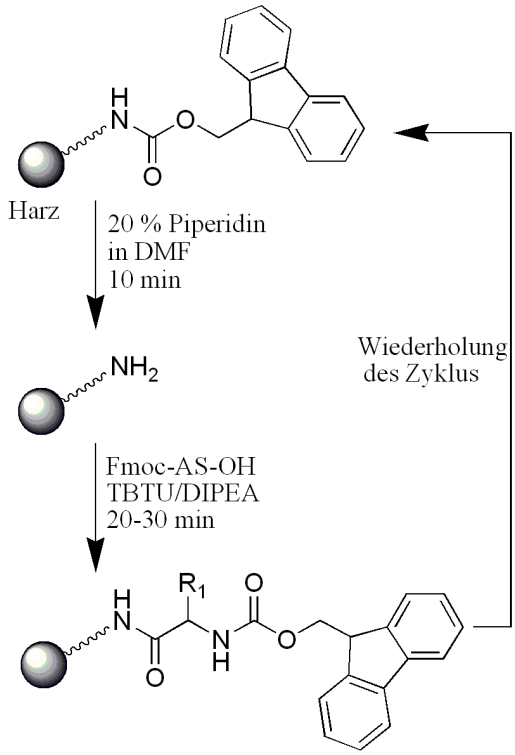


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese (SPPS).

Alle Peptide (PNA-Sequenzen und PNA-Peptid-Hybride) dieser Arbeit wurden mittels SPPS nach der Fmoc-Strategie manuell in einer Filterspritze synthetisiert[132] und werden in Kapitel 5.3 ausführlich beschrieben. (Die Tabellen 5.1–3 geben einen Überblick über die verwendeten Monomere.). Für die Etablierung der Konjugations-reaktionen und des Immobilisierungs-protokolls wurden zunächst einfachere Peptide synthetisiert, die nicht alle funktionellen Einheiten tragen oder unterschiedliche Modifikationen am N-Terminus aufweisen. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick aller synthetisierten Sequenzen. Lediglich Peptid **6** wurde zur automatisierten Synthese bei der Firma Biosyntan in Auftrag gegeben, da die Ausbeute der manuellen Synthese bei insgesamt 16 Kopplungsschritten deutlich sinkt.

Die Synthesen wurden in *N*,*N*-Dimethylformamid (DMF) durchgeführt unter der Verwendung des Standardkopplungsreagenz für Aminosäuremonomere 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborat (TBTU) sowie Diiso-propylethylamin (DIPEA) zur Aktivierung. Als Festphase wurde Rink-Amid-Harz mit einer Beladung von 0.4-0.8 mmol/mg Harz verwendet, welches eine Spaltung des fertigen Peptids in 95 %iger Trifluoressigsäure (TFA) und gleichzeitiger Entschützung

der Seitenketten ermöglicht. Die Aufarbeitung des Peptids erfolgte zunächst durch Diethyletherfällung und anschließende durch Aufreinigung mittels HPLC. Die Struktur sowie das entsprechende HPLC-Chromatogramm der isolierten Verbindungen sind beispielhaft für Peptid **2** in Abbildung 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.1: Übersicht synthetisierter Peptide

Verbindung	*Peptidsequenz*	*Ausbeute*
1	H_2N-PEG_7-GPRGF-PEG_7-K(Biotin)-F-$CONH_2$	5 %
2	H_2N-HNA-PEG_7-GPRGF-PEG_7-K(Biotin)-F-$CONH_2$	13 %
3	H_2N-C-PEG_7-GPRGF-PEG_7-K(Biotin)-F-$CONH_2$	15 %
4	AcNH-D-PEG_2-H-PEG_2-S-F-$CONH_2$	10 %
5	NH_2-HNA-PEG_{10}-H_6-GPF-$CONH_2$	10 %
6	NH_2-HNA-$(PEG_6)_2$-H_6-GPRGF-PEG_6-K(Biotin)-$CONH_2$	--
7	AcNH-D-PEG_2-H-PEG_2-S-G-$CONH_2$	50 %

HNA = Hydrazin-Nikotinsäure; H_2N- = freie Aminofunktion am N-Terminus; AcNH- = acetylierte Aminogruppe am N-Terminus; -$CONH_2$ = C-Terminus liegt nach Abspaltung vom Harz als Amid vor.

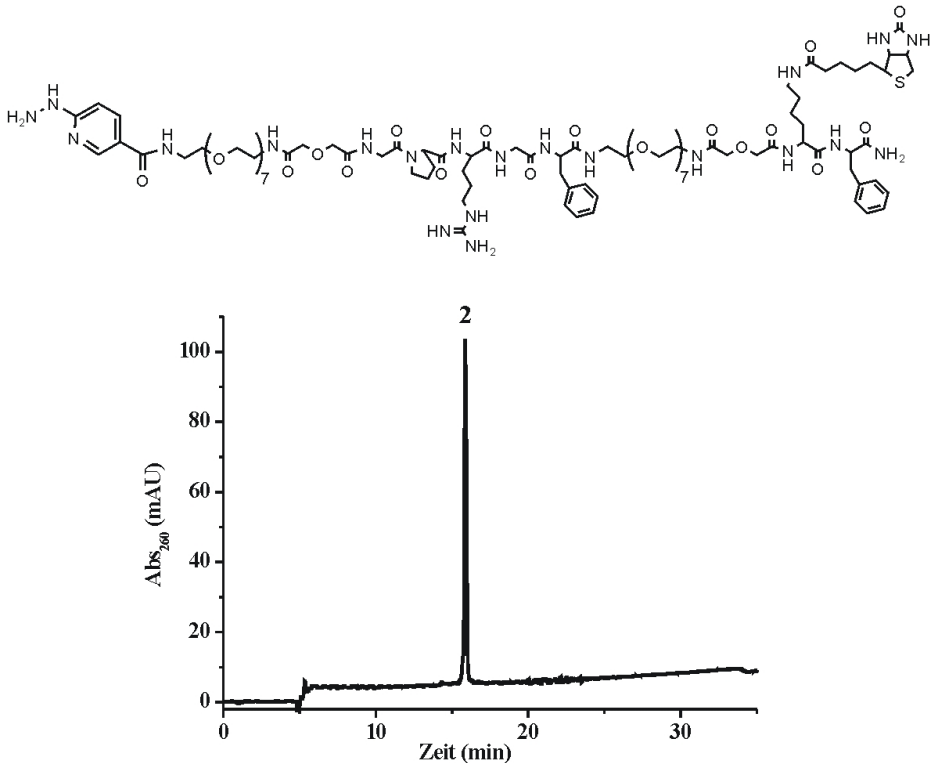


Abbildung 3.4: HPLC Chromatogramm und Struktur des aufgereinigten Peptids **2**.

3.3 Initiatornukleotid

Für die von uns entworfene Selektionsstrategie bedarf es einer effizienten und ortsspezifischen Methode zur Einführung einer funktionellen Gruppe, die eine Konjugation mit dem gewünschten Peptidsubstrat ermöglicht[133]. Eine solche Methode ist auch allgemein für Untersuchungen zur Struktur, Dynamik und biologischen Funktion von RNA von großem Nutzen, da hierfür oft Modifikationen mit nicht-natürlichen Gruppen, wie Farbstoffen, Affinitätsmarkern, Linkermolekülen oder Crosslinkern benötigt werden. Für den Einbau einer solchen Modifikation sind verschiedene Strategien denkbar. Für kleine RNA-Sequenzen, die chemisch hergestellt werden, ist dies verhältnismäßig leicht durch die Verwendung modifizierter Phosphoramidite und postsynthetische Derivatisierung zu erreichen. Andererseits bringt eine spezifische Modifizierung längerer RNA-Sequenzen, die üblicherweise mittels enzymatischer Transkription gewonnen werden, eine gewisse Herausforderung mit sich, denn nur die beiden Enden der RNA bieten leicht zugängliche Positionen. Interne Positionen können lediglich durch komplexere Ansätze modifiziert werden, beispielsweise mittels Splint-Ligation oder nicht-natürlicher Basenpaare. Modifikationen am 3'-Ende der RNA erfolgen üblicherweise durch Ligation modifizierter (Oligo-)Nukleotide oder durch spezifische Oxidation der Ribose und anschließende Derivatisierung des entstandenen Aldehyds. Eine effektive und erfolgreich angewendete Methode zur Modifikation am 5'-Ende ist der Gebrauch chemisch modifizierter Guanosinderivate, die als Initiatornukleotide verwendet werden. Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 spezifisch Guanosin als erste Base einbaut und gleichzeitig Derivatisierungen des Nukleotids akzeptiert[48]. Auf diese Weise wurde bereits die Einführung verschiedenster funktioneller Gruppen während der Transkription am 5'-Ende ermöglicht. [134-139]

Die Konjugation zweier Verbindungen durch die Reaktion eines Aldehyds mit einem Amin oder Hydrazin bietet eine orthogonale Methode zur Kopplung zwischen Aminen und NHS-Estern oder der Thiol-Maleimid Chemie und wurde bereits erfolgreich bei der Derivatisierung modifizierter Oligonukleotide mit vielen verschiedenen

Funktionalitäten wie Liganden für Metallkomplexe, Festphasen, Aminozucker oder Peptide verwendet. Die selektive Einführung von Aldehyden in lange RNA-Sequenzen konnte bisher nur durch Modifizierung von Thiophosphat-modifizierter RNA nach der Transkription oder wie bereits erwähnt durch Periodatoxidation der 3'-terminalen Ribose realisiert werden. Die folgende Synthese eines neuen Initiatornukleotids, das eine geschützte Aldehydfunktion trägt, ermöglicht erstmals die direkte Einführung einer geschützten Aldehydfunktion für die Konjugation mit Aminen, Hydrazinen oder Hydraziden.

3.3.1 Synthese

Ein Initiatornukleotid wurde konzipiert und synthetisiert, um die Möglichkeit zu schaffen eine Aldehydfunktion direkt in ein RNA-Transkript einzuführen. Hierfür sind zwei unterschiedliche Synthesestrategien denkbar, die beide erfolgreich durchgeführt wurden[135] (Abb. 3.5).

Für den Syntheseweg A wird das kommerziell erhältliche Phosphoramidit[140] **8** mit dem im Arbeitskreis bereits verfügbaren 2',3'-O-Silyl-geschützten Guanosin[141, 142] **9** durch Aktivierung mit 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) gekoppelt. Syntheseweg B hingegen geht von 4-(2-Hydroxyethoxy)-Benzaldehyd **11** aus, der zunächst durch Reaktion mit 2,2-Diethyl-1,3-propandiol **12** in Anwesenheit von *p*-Toluolsulfonsäure zum Acetal-geschützten Hydroxyethoxy-Benzaldehyd-Derivat **13** umgesetzt wird. Anschließend erfolgt die Kopplung des Alkohols mit dem 2',3'-O-Silyl-geschützten Guanosin-Phosphoramidit **14** wiederum durch Aktivierung mit DCI.

In beiden Synthesewegen folgen dann Oxidation zum Phosphat und Spaltung der Silyl-Schutzgruppen. Nach Aufreinigung mittels Umkehrphasen-Chromatographie wurde das Acetal-geschützte Initiatornukleotid **10** in 10-16 % Gesamtausbeute isoliert. Reinheit und Identität wurden durch H^1-NMR, HPLC und MALDI-TOF MS nachgewiesen.

Für den Einbau während der Transkription bieten sich nun zwei Möglichkeiten. Die Aldehydfunktion des Initiatornukleotids kann direkt entschützt und für die Transkription verwendet werden. Alternativ kann das Acetal-geschützte Initiatornukleotid eingebaut und die Entschützung erfolgt im Anschluss an die Transkription (siehe Abschnitt 3.3.3).

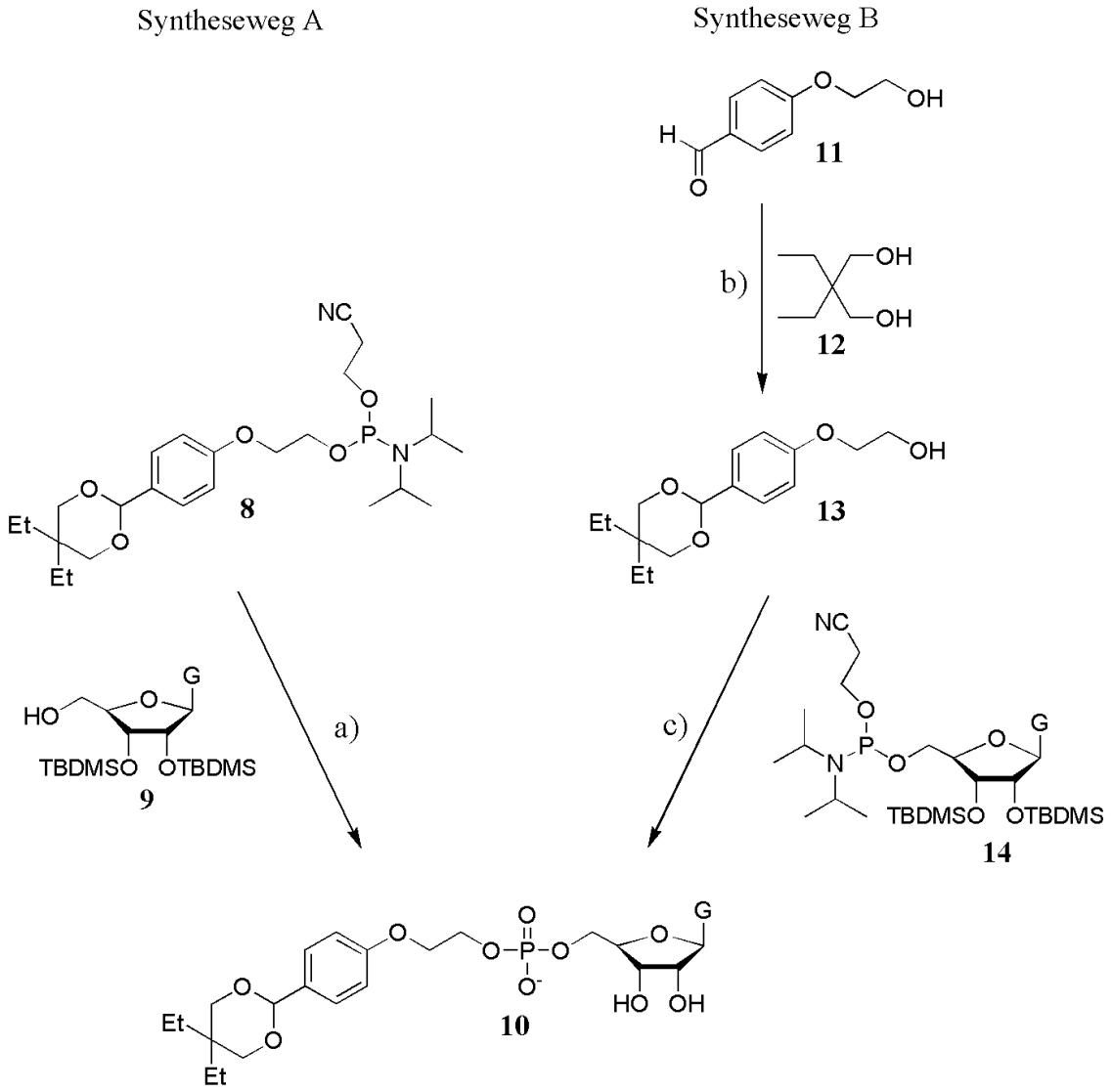


Abbildung 3.5: Synthese des Acetal-geschützten Aldehyd-Initiatornukleotids **10**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) i: **9** (2.0 equiv), DCI (10.0 equiv), Acetonitril, Rt, 10 min; ii: t-Butylhydroperoxid (TBHP, 16.0 equiv), Rt, 10 min, iii: Entfernen des Lösungsmittels; iv: Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF, 50 equiv), in Tetrahydrofuran (THF), Rt, 14 Std; (b) **11** (1.0 equiv), **12** (1.25 equiv) und p-Toluolsulfonsäure (0.05 equiv) in Toluol, 3.5 h bei 117 °C refluxieren; (c) i: **13** (1.0 equiv), **14** (1.2 equiv), DCI (1 equiv), THF, Rt, 20 min; ii: TBHP (10.0 equiv), Rt, 30 min, iii: Entfernen des Lösungsmittels; iv: TBAF (6.0 equiv), in Tetrahydrofuran (THF), Rt, 14 Std.

3.3.2 Modellreaktionen

Bevor die Chemie für die Konjugationsreaktion festgelegt werden konnte, wurden zunächst verschiedene Modellreaktionen mit kleinen Mengen des Initiatornukleotids und ausgiebiger Analytik durchgeführt. Hierfür wurde das Initiatornukleotid **10** mit 2 %iger Trifluoressigsäure-Lösung entschützt, woraus die freie Aldehydfunktion **15** resultiert, die mit verschiedenen Nukleophilen (Amin, Hydrazin und Hydrazid) zur Reaktion gebracht wurde (Abb. 3.6). Die Reaktionen wurden mittels HPLC analysiert und die Identität der Produkte durch Massenspektroskopie bestätigt (Tabelle 3.2).

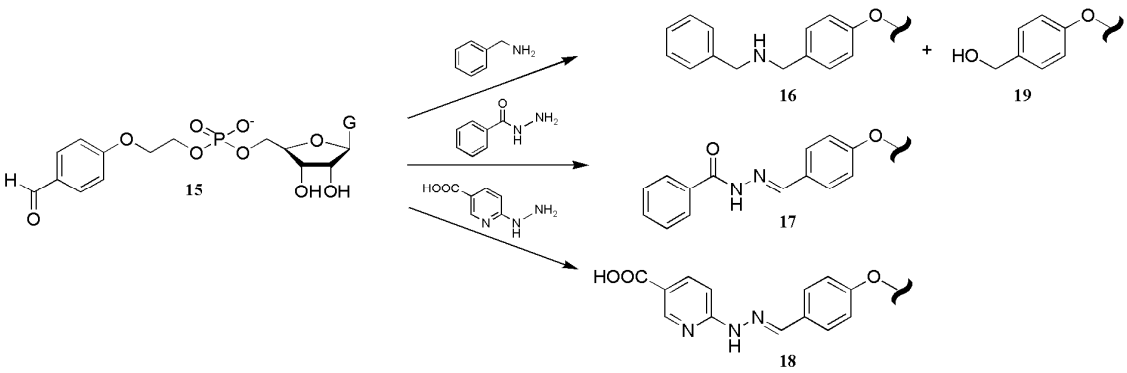


Abbildung 3.6: Durchgeführte Modellreaktionen zur Etablierung der Konjugationsstrategie. Benzylamin, Benzoylhydrazid und 6-Hydrazin-Nikotinsäure wurden mit dem entschützten Initiatornukleotid **15** gekoppelt. Die Konjugation mit Benzylamin unter reduktiven Bedingungen ergab zusätzlich das Benzylalkohol-Derivat **19** als Nebenprodukt.

Tabelle 3.2: **MALDI-TOF MS Analyse der Verbindungen 10 und 15-19**

Verbindung	*Summenformel*	$[M+H]^+$ *berechnet*	$[M+H]^+$ *MALDI*
10	$C_{26}H_{36}N_5O_{11}P$	626.22	626.1
15	$C_{19}H_{22}N_5O_{10}P$	512.12	512.1
16	$C_{26}H_{31}N_6O_9P$	603.20	603.3
17	$C_{26}H_{28}N_7O_{10}P$	630.17	630.1
18	$C_{25}H_{27}N_8O_{11}P$	647.16	647.2
19	$C_{19}H_{24}N_5O_{10}P$	514.13	514.3

Die Reaktion mit Benzylamin ergab nur unter den Bedingungen einer reduktiven Aminierung nach Zugabe von Natriumcyanoborhydrid das stabile Reaktionsprodukt **16**. Aufgrund der reduzierenden Bedingungen wurde das Initiatornukleotid **15** auch zum entsprechenden Benzylalkoholderivat **19** umgesetzt, was die Gesamtausbeute dieser Konjugationsreaktion einschränkt (Abb. 3.7 A). Im Gegensatz dazu führten die Reaktionen mit Benzoylhydrazid und 6-Hydrazin-Nikotinsäure zur quantitativen Bildung der entsprechenden Kopplungsprodukte (**17** und **18**) unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Aus diesem Grund haben wir uns für Hydrazin-modifizierte Peptide zur effizienten Kopplung mit der *in vitro* transkribierten RNA entschieden.

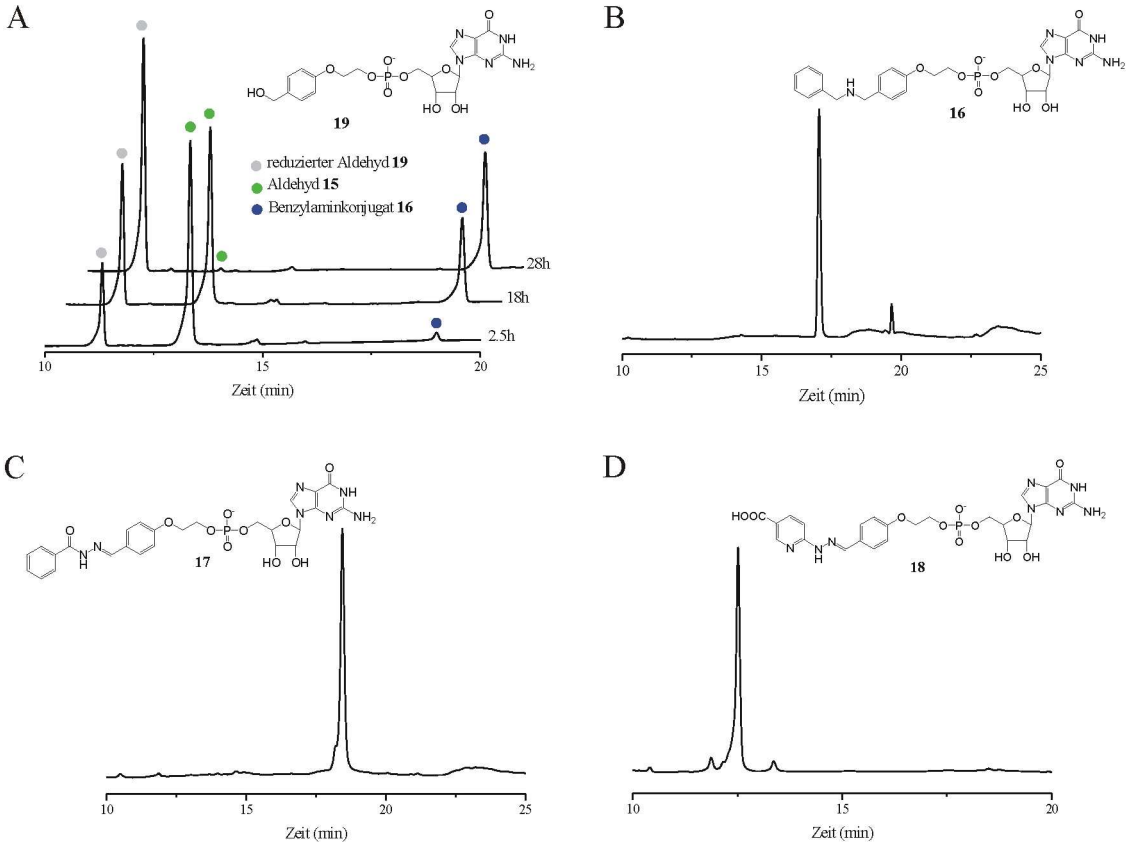


Abbildung 3.7: RP-HPLC-Chromatogramm der Initiatornukleotid-Konjugate **16-18** mit verschiedenen Nukleophilen. **A**: Reaktionsverlauf der Konjugation von **15** mit Benzylamin unter reduzierenden Bedingungen nach 2.5, 18 und 28 Stunden. Nach 28 Stunden wurde **15** komplett zum Benzylaminkonjugat **16** umgesetzt. Allerdings wurde durch die reduzierenden Reaktionsbedingungen das Benzylalkoholderivat **19** des Initiatornukleotids überwiegend gebildet. **B**, **C** und **D**: Chromatogramm der aufgereinigten und isolierten Konjugate. Die unterschiedlichen Retentionszeiten des Konjugats **16** in A und B sind durch die HPLC-Analyse an zwei unterschiedlichen Instrumenten und Säulen vom gleichen Typ bedingt. Die Identität der Produkte wurde jedoch jeweils durch Massenspektroskopie bestätigt.

3.3.3 Einbau des Initiatornukleotids durch T7 Polymerase

Für den Einbau des Initiatornukleotids in die RNA während der Transkription wurde die Acetal-geschützte Form **10** verwendet und anschließend entschützt (Abb. 3.8), da bereits berichtet wurde, dass Aldehyd-modifizierte Nukleotide mit Nukleophilen im aktiven Zentrum von Polymerasen unter Bildung einer Schiff'schen Base reagieren können[143].

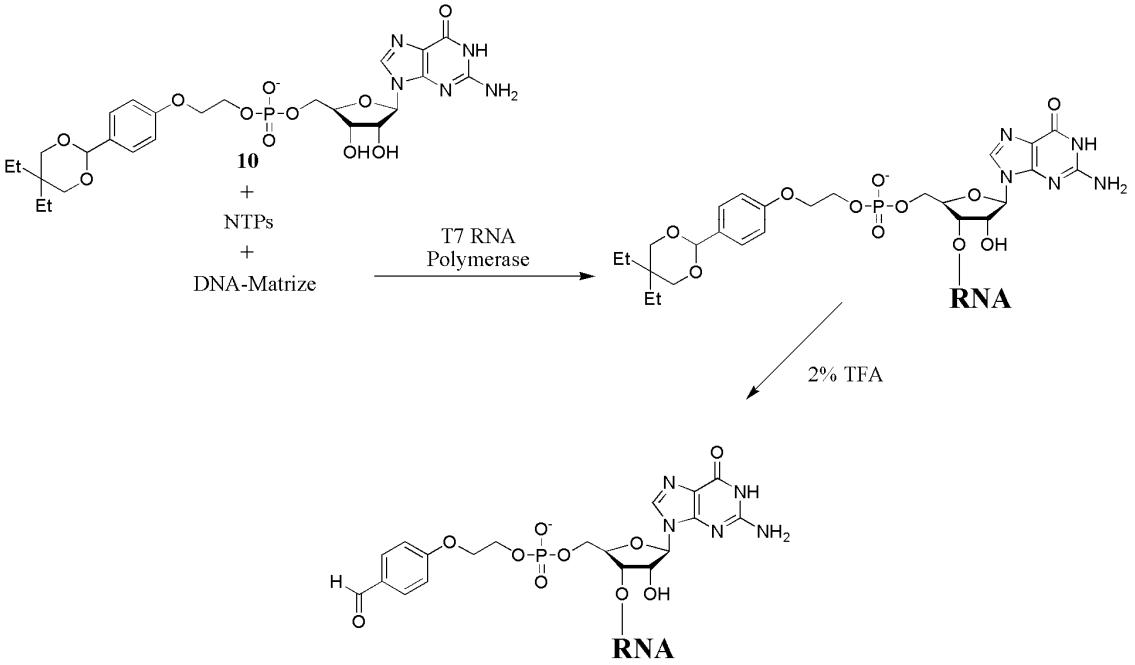


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des Einbaus des Initiatornukleotids **10** am 5'-Ende einer RNA-Sequenz während der Transkription mit der T7 RNA-Polymerase und anschließender Entschützung der Aldehydfunktion.

Das Initiatornukleotid **10** wurde für verschiedene Matrizen dem Standardansatz einer *in vitro* Transkription in einer Konzentration von 4 mM zugegeben (siehe Abschnitt 5.3). Um die Einbaurate gegenüber GTP (Guanosintriphosphat) zu erhöhen, wurde dessen Konzentration von 4 mM auf 0.4 mM reduziert. Diese Anpassung des Verhältnisses von Aldehyd-GMP zu GTP auf 10:1 hat zwar einerseits eine reduzierte Ausbeute der Transkription zur Folge, allerdings konnte dadurch die Einbaurate des Aldehyd-GMP

auf 70-75 % erhöht werden. Für die Analyse und Aufreinigung des Aldehyd-modifizierten Transkriptionsprodukts konnte keine gelelektrophoretische Methode angewendet werden, da der Mobilitätsunterschied durch den Einbau des Initiatornukleotids nicht ausreichend groß ist. Stattdessen wurden die Transkripte mithilfe von HPLC analysiert und aufgereinigt, denn die unpolare Acetalgruppe hat auf einer C18-RP-Säule (Umkehrphase) eine deutliche Verschiebung der Retentionszeit um 7.5 min (RNA_{25mer}) bzw. 3 min (RNA_{109mer}) zur Folge (Abb. 3.9). Der erfolgreiche Einbau in ein RNA_{25mer} konnte zusätzlich durch die Bestimmung der Masse mittels MALDI-TOF MS bestätigt werden (m/z 8348.4 $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{254}H_{322}N_{98}O_{177}P_{25}]^+$ 8350.26)

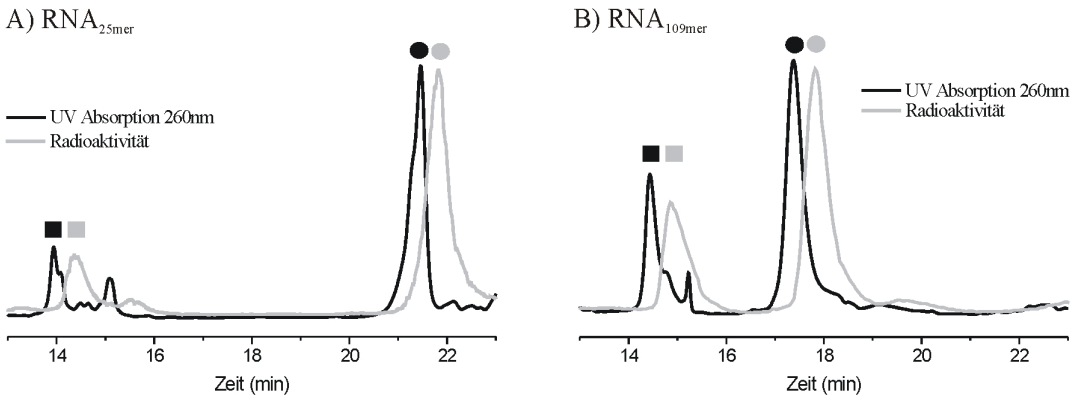


Abbildung 3.9: Selektive Modifizierung von RNA. Einbau von **10** in ein RNA_{25mer} (A) und RNA_{109mer} (B) durch *in vitro* Transkription. Transkriptionsansätze wurden mithilfe von HPLC analysiert. UV Absorption (schwarz), Radioaktivität (grau); Radioaktivitätssignale sind um ~1 min durch die Konfiguration des Radioflow Detektors verschoben. (■) nicht-initiierte Transkripte; (●) Aldehyd-initiierte Transkripte.

3.3.4 Stabilität der RNA nach Inkubation mit TFA

Im Anschluss an die Transkription tragen die Aldehyd-initiierten RNA-Sequenzen immer noch die Acetal-Schutzgruppe. Durch eine kurze Aufbereitung der Transkripte in wässriger 2 % Vol. Trifluoressigsäure-Lösung (TFA) werden diese entschützt. Um sicherzustellen, dass diese Handhabung der RNA in saurem Milieu zu keinem Schaden

führt, wurden Primer-Elongationsstudien mit der TFA-behandelten RNA_{109mer} als Matrize einer Reversen Transkription durchgeführt (Abb. 3.10). Dabei konnte keine verminderte Bildung des Volllängen-Produkts im Vergleich zur nicht TFA-behandelten RNA festgestellt werden. Dies ist gleichbedeutend mit der Tatsache, dass die RNA durch die Entschützung mit TFA funktionell intakt bleibt.

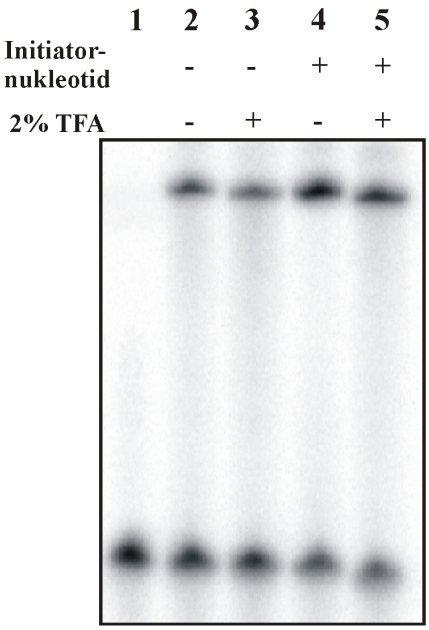


Abbildung 3.10: Elektrophoretische Analyse der Produkte der Reversen Transkription ausgehend von TFA-behandelten Matrizen. i: RNA_{109mer} Pool mit und ohne eingebautes Initiatornukleotid (10 pmol), 2 % TFA, 20°C, 15 min; ii: mit 1 M $NaHCO_3$ Lösung auf pH 7 eingestellt, direkt für die Reverse Transkription verwenden; iii: RNA-Pool (10 pmol), 3'-Primer (10 pmol, 5'-^{32}P-markiert, 200000 cpm), Standard RT-Protokoll (40 µL) nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) mit SuperScript^{TM} II Reverse Transkriptase; iv: Reaktionen mit gleichem Volumen FA-Ladepuffer stoppen. Aliquote wurden mittels 12 % denaturierender PAGE analysiert. Wenn nicht anders aufgeführt, wurden stets denaturierende Polyacrylamid-Gele verwendet. 1: ^{32}P markierter 3'-Primer; 2-5: RT-Reaktionsansätze mit und ohne Initiatornukleotid oder TFA-Aufarbeitung.

3.4 Synthese von RNA-Peptid-Konjugaten

3.4.1 Konjugation am 3'-Ende der RNA

Die Modifizierung am 3'-Ende von RNA-Transkripten ist durch die spezifische Oxidation vizinaler Hydroxygruppen der Ribose durch Periodat möglich[144]. Aus der Spaltung resultieren zwei Aldehydfunktionen, welche mit Aminen, Hydrazinen oder Hydraziden unter reduzierenden Bedingungen Konjugate bilden können (Abb. 3.11).

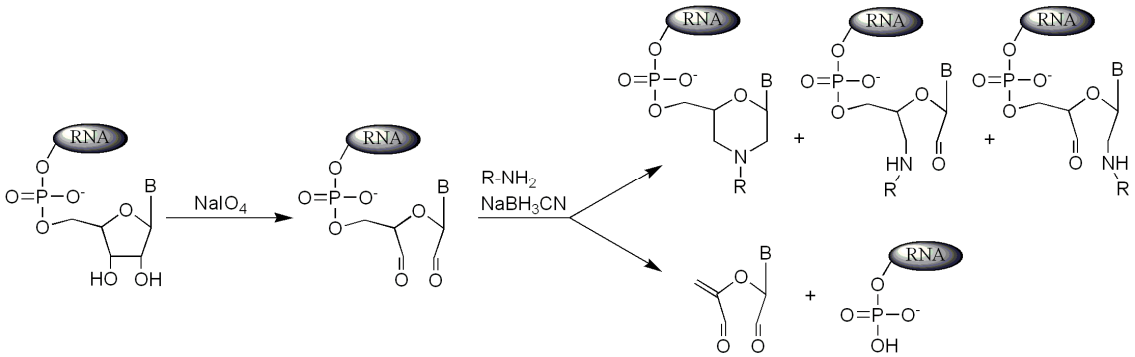


Abbildung 3.11: Reduktive Aminierung der 3'-terminal Periodat-oxidierten RNA und möglicher Verlust der 3'-terminalen Base durch ß-Elimination[145].

Eine Möglichkeit, die quantitative Oxidation der 3'-terminalen Ribose durch Periodat nachzuweisen, ist die Verwendung von Polyacrylamid-Gelen, denen N-Acryloyl-3-aminophenylboronsäure (APB) vor der Polymerisierung zugegeben wurde[146]. Bei der Durchführung der Gelelektrophorese treten Wechselwirkungen zwischen den Boronsäure-Derivaten, die kovalent mit der Gelmatrix verknüpft wurden, und den *cis*-Diolen intakter Ribose auf. Dies führt zu einer langsameren Migration von nicht oxidierten RNA-Molekülen im Vergleich zu oxidierten RNA-Molekülen durch das Gel. Abbildung 3.12 zeigt ein solches Experiment. Links wurde RNA_{25mer} vor und nach Periodatoxidation auf ein Standard 15 % Polyacrylamid-Gel aufgetragen und es ist kein Unterschied in der Laufweite der beiden Banden zu erkennen. Rechts wurden die gleichen Proben auf ein 15 % Polyacrylamid-Gel aufgetragen, dem vor der Polymerisierung 5 % APB zugemischt wurden. Hier ist eine deutlich langsamere

Migration der nicht oxidierten RNA durch Wechselwirkungen mit dem inkorporierten Boronsäurederivat erkennbar.

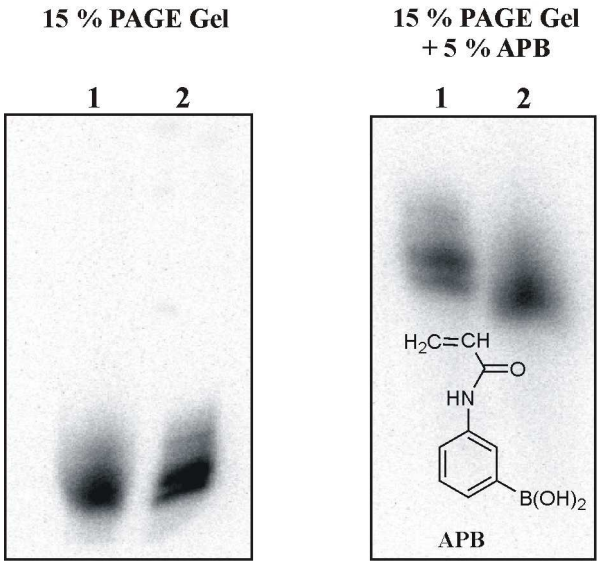


Abbildung 3.12: Nachweis der Periodatspaltung der 3'-terminalen Ribose mit APB-PAGE. Links: Standard PAGE; Rechts: Modifizierte PAGE durch Zugabe von APB. 1: RNA_{25mer}, 2: oxidierte RNA_{25mer}.

Zur Etablierung der Konjugationsstrategie wurde radioaktiv markierte RNA_{25mer} mit Natriumperiodatlösung unter Lichtausschluss oxidiert und die Reaktion durch Zugabe von 2,3-Butandiol gestoppt. Anschließend erfolgte die Konjugation mit Peptid **1** und **2** (Tab. 3.1) und die Analyse der Reaktionsprodukte durch Gelelektrophorese (Abb. 3.13 A). In der ersten Bahn (1) ist das RNA_{25mer} als Kontrolle aufgetragen, in 2 und 3 die Konjugationsreaktionen mit dem Amin-Peptid **1** bei pH 8 und pH 5.5 und in 4 die Konjugation mit dem Hydrazin-Peptid **2**. Die Kopplung mit Peptid **1** hat bei pH 5.5 nicht funktioniert, da die Aminofunktion in protonierter Form vorliegt. Aber auch bei pH 8 ist nur eine extrem dünne Produktbande zu erkennen (Kasten). Für das Hydrazin-Peptid **2** hingegen ist eine nahezu quantitative Umsetzung der RNA zu erkennen, allerdings deutet die Entstehung einer zusätzlichen Bande auf die Bildung eines Nebenprodukts hin. Aufgrund der geringeren Mobilität des Nebenprodukts liegt die Vermutung nahe, dass durch den Überschuss an Peptid beide Aldehydfunktionen der oxidierten RNA reagiert haben und somit das RNA_{25mer}-$(Peptid)_2$-Konjugat entstanden ist. Um die Bildung des Nebenprodukts zu minimieren wurde als Nächstes der Überschuss an Peptid variiert (Abb. 3.13 B und C). Die elektrophoretische Analyse

zeigt für die Bahnen 1-5 die Konjugationsansätze mit einem jeweiligen Peptidüberschuss von 0, 10, 50, 100, 200-fach im Vergleich zur eingesetzten Menge an RNA. Eine Umsetzung von > 90 % des Edukts ist bereits ab einem 50-fachen Peptidüberschuss erreicht. Wird die Peptidkonzentration weiter erhöht, nimmt die Intensität der Produktbande leicht ab und das Nebenprodukt formiert sich in einem stärkeren Ausmaß. Die quantitative Auswertung des Experiments ist in Abbildung 3.13 C dargestellt und kommt zu demselben Ergebnis. Hierfür wurden die Banden aus dem Gel (B) ausgeschnitten, die Radioaktivität der jeweiligen Banden bestimmt und zueinander in Relation gesetzt.

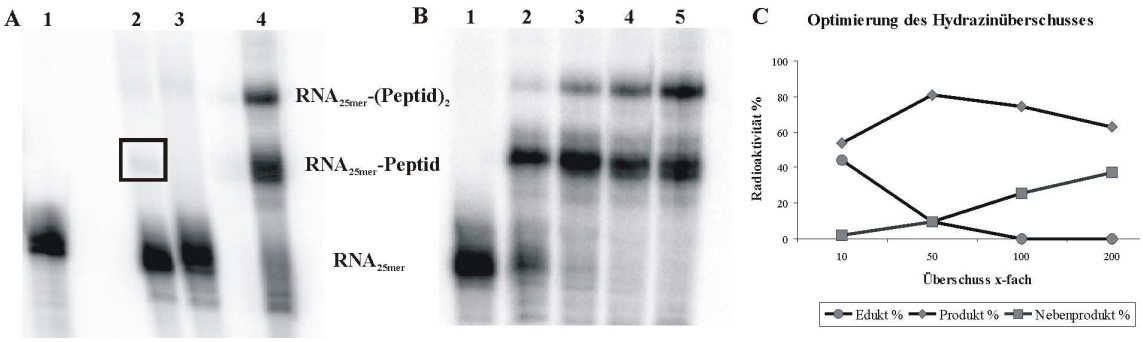


Abbildung 3.13: A: Konjugationsreaktionen von RNA_{25mer} mit Peptid **1** und **2**. 1: RNA_{25mer}; 2: Konjugation mit **1** bei pH 8; 3: Konjugation mit **1** bei pH 5.5; 4: Konjugation mit Peptid **2**. B: Optimierung des Peptidüberschusses für die Konjugation mit Peptid **2**. 1: kein Peptid (Negativkontrolle), 2-5: 10 x, 50 x, 100 x und 200 x Überschuss Peptid **2**; C: Quantitative Auswertung der Optimierung nach Ausschneiden der Banden und Bestimmung der Radioaktivität; Summe von Edukt + Produkt + Nebenprodukt = 100 %; (●) RNA_{25mer} (Edukt), (♦) RNA_{25mer}-Peptid (Produkt), (■) RNA_{25mer}-$(Peptid)_2$ (Nebenprodukt).

Für alle weiteren Konjugationsexperimente wird das Hydrazin-Peptid **2** mit einem 50-fachen Peptidüberschuss verwendet, da bei dieser Konzentration die maximale Umsetzung erreicht wurde. Mit dem Amin-Peptid **1** konnte keine ausreichende Konjugatbildung erzielt werden.

Nachdem diese Konjugationsstrategie für die kurze RNA-Sequenz von 25 Nukleotiden optimiert werden konnte, folgten als nächstes Konjugationsreaktionen mit RNA-Sequenzen unterschiedlicher Länge und teilweise randomisierten Bereichen. Abbildung 3.14 (links) zeigt PAGE-Analysen der Konjugationsreaktionen von RNA_{25mer} (A), RNA_{49mer} (B), RNA_{109mer} (Pool 1; C) und $RNA_{76\text{-}78mer}$ (Pool 2; D) nach Periodatspaltung mit Peptid **2**.

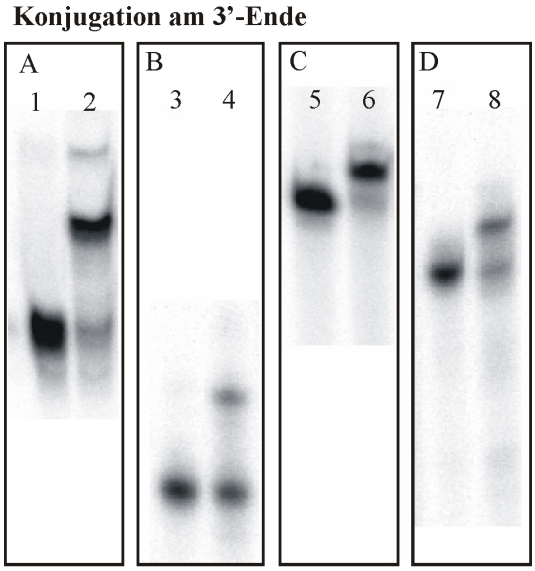


Abbildung 3.14: Konjugation am 3'-Ende nach Periodatspaltung und Kopplung mit Peptid **2**. Verwendete RNA-Sequenzen: A: RNA_{25mer}, B: RNA_{49mer}, C: RNA_{109mer} (Pool 1), D: $RNA_{76\text{-}78mer}$ (Pool 2); 1,3,5,7: Negativkontrollen RNA; 2,4,6,8: RNA-Peptid(**2**)-Konjugationsansatz; A: 18 % PAGE, B-D: 12 % PAGE.

Bei der weiteren Verwendung dieser mit Biotin modifizierten Verbindungen, beispielsweise bei der Immobilisierung durch Affinitätschromatographie, hat sich gezeigt, dass die nahezu quantitativ gebildeten Konjugate nicht ausreichend stabil sind. Diese Beobachtung entspricht den experimentellen Ergebnissen von Timofeev *et al.*[147] und lässt sich durch eine mögliche ß-Elimination[145] (Abb. 3.11) erklären.

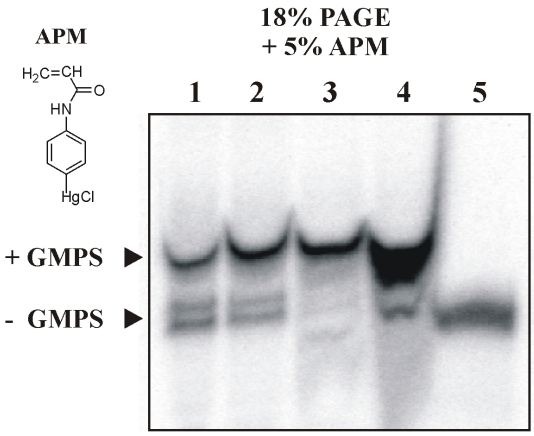
3.4.2 Konjugation am 5'-Ende der RNA

3.4.2.1 GMPS als Initiatornukleotid

Eine effiziente Methode zur ortsspezifischen Einführung funktioneller Gruppen in RNA-Transkripte stellt die Verwendung eines modifizierten Guanosinmonophosphats (GMP) als Initiatornukleotid während der Transkription dar. Das schwefelmodifizierte Guanosinphosphorothioat (GMPS) wurde bereits erfolgreich für *in vitro* Selektionsstrategien verwendet[31] und ermöglicht durch post-transkriptionale Modifikationen der Thiophosphat-Gruppe die Einführung unterschiedlicher Funktionalitäten. McPherson *et al.*[148] stellten RNA-Peptid-Konjugate mit GMPS-

modifizierten RNA-Sequenzen nach dem Mechanismus der „Native Chemical Ligation“ her. Diese Methode wurde für die zu entwickelnde Selektionsstrategie übernommen und adaptiert (Abb. 3.16).

Zunächst wurden die Bedingungen der Transkription dahingehend optimiert, dass eine maximale Einbaurate für GMPS am 5’-Ende der Transkripte erreicht wird. Hierfür wurde während der Transkription das Verhältnis von GMPS zu GTP variiert und die Ansätze im Anschluss an die Transkription auf einem APM (N-Acryloylaminophenyl-Quecksilberchlorid) enthaltenden Polyacrylamid-Gel[149] analysiert (Abb. 3.15). Durch Wechselwirkungen der Phosphorothioats mit der quecksilberhaltigen Gelmatrix resultiert eine langsamere Migration der GMPS-haltigen Transkripte, wodurch eine Auftrennung von GMPS-initiierten und nicht initiierten RNA-Sequenzen möglich ist und die Einbaurate ermittelt werden kann. Mit einem GMPS/GTP-Verhältnis von 4 mM zu 0.2 mM konnten Einbauraten von bis zu 90 % erzielt werden.



Ansatz	1	2	3	4	5
ATP, CTP, UTP (mM)	4	4	4	1	4
GTP (mM)	**4**	**2**	**1**	**0.2**	**4**
GMPS (mM)	**1**	**2**	**3**	**4**	**0**

Abbildung 3.15: Optimierung der GMPS Konzentration im Transkriptionsansatz. Links: Konzentration aller NTP und GMPS im jeweiligen Ansatz (Nr. 1-5). Rechts: APM-Gelanalyse der Transkriptionsansätze (1-5). Auftrennung der Transkripte mit (+) und ohne (-) GMPS.

Bei der eigentlichen Konjugationsreaktion (Abb. 3.16 A) wird zunächst in die 5’-GMPS modifizierte RNA durch Alkylierung des Schwefelatoms mit Phenyl-α-Bromothioacetat **20** eine Thioester-Funktion eingeführt. Anschließend erfolgt durch Zugabe des Peptids **3** (Tab. 3.1) mit N-terminalem Cysteinrest in neutraler Lösung eine Umesterung des

Phenylthioesters mit der Thiolgruppe des Cysteins. Das entstandene Intermediat führt über eine spontane, intramolekulare Umlagerung zum gewünschten RNA-Peptid-Konjugat, das über eine Peptidbindung miteinander verknüpft ist.

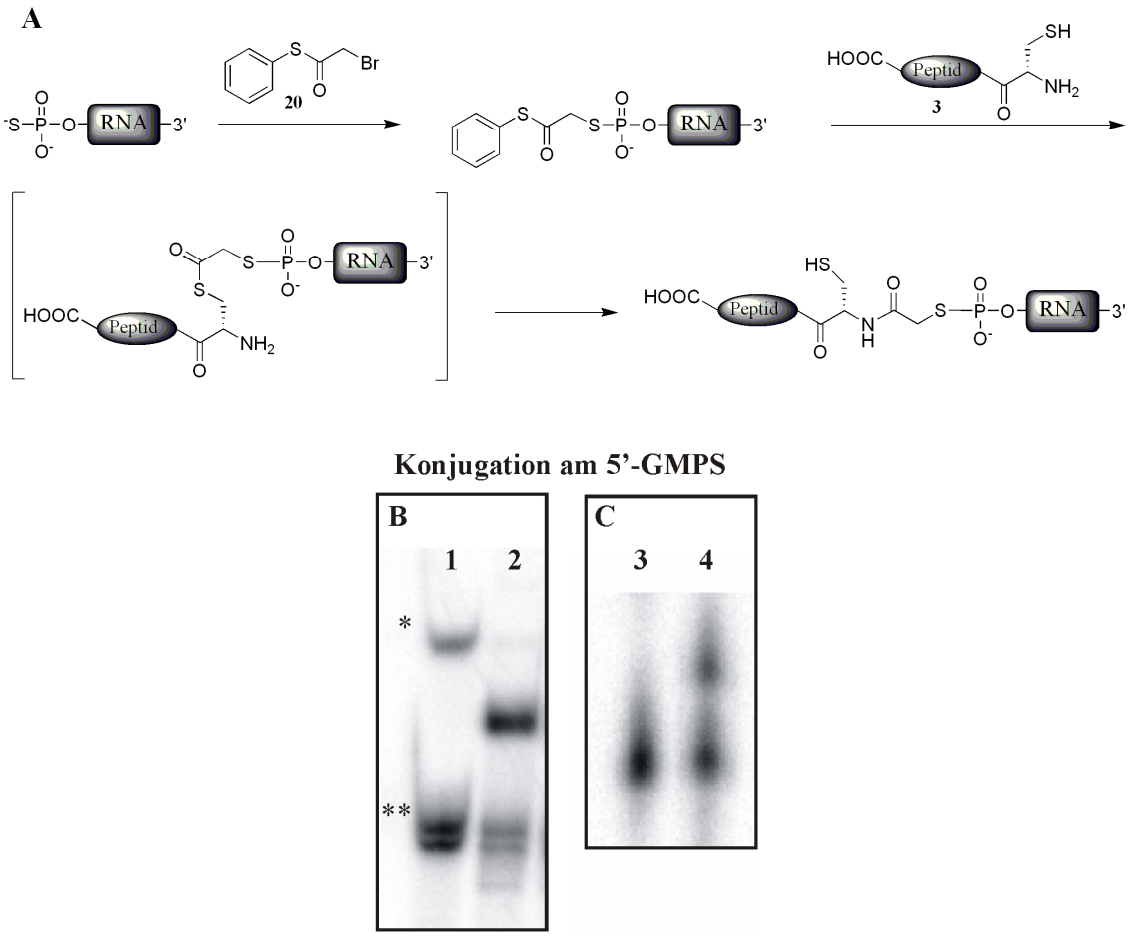


Abbildung 3.16: **A**: Synthese von RNA-Peptid-Konjugaten nach dem Mechanismus der Native Chemical Ligation[148]. **B + C**: Konjugation am 5'-GMPS mit Peptid **3** durch Native Chemical Ligation; Verwendete RNA-Sequenzen: B: RNA_{25mer}, C: $RNA_{76\text{-}78mer}$ (Pool 2); 1 und 3,: Negativ-kontrollen RNA; 2 und 4: RNA-Peptid(**3**)-Konjugationsansatz; B: 18 % PAGE, C: 12 % PAGE. * Disulfid-Dimer RNA-GMPS-GMPS-RNA, wird durch Zugabe von $NaBH_4$ während der Reaktion reduziert; ** RNA_{25mer} (n und (n+1)-mer) durch unspezifische Nukleotide, die am 3'-Ende der Transkripte durch die T7 RNA-Polymerase angefügt werden.

Die Methode wurde zunächst anhand der Konjugation von Peptids **3** und der RNA_{25mer}-Sequenz etabliert. Die Formierung des Konjugats konnte durch gelelektrophoretische Analyse und Bestimmung der Masse bestätigt werden (Abb. 3.16 B; Abschnitt 5.5.2.1). Auch die Kopplung mit der $RNA_{76\text{-}78mer}$ (Pool 2), die einen teilweise randomisierten Sequenzbereich enthält, war erfolgreich (Abb. 3.16 C; 4).

3.4.2.2 Aldehyd-GMP als Initiatornukleotid

Als Alternative zur post-transkriptionalen Einführung funktioneller Gruppen ermöglicht die Verwendung des Initiatornukleotids **10** die direkte Modifikation der RNA mit einer Aldehydfunktion und erlaubt dadurch die Konjugation mit Amino-, Hydrazin- oder Hydrazid-modifizieren Verbindungen.

Die Darstellung von RNA-Peptid-Konjugaten nach dieser Strategie erfolgt durch Kopplung der Aldehyd-modifizierten RNA-Sequenzen (siehe Abschnitt 3.3.3) über einen Zeitraum von vier bis sechs Stunden bei Raumtemperatur und 50-fachem Überschuss des Peptids (Abb. 3.17). Es wurden hauptsächlich Konjugate mit der RNA_{25mer} und der RNA_{109mer}-Bibliothek und den Peptiden **2** und **6** hergestellt. Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden durch Gelelektrophorese analysiert. Für das Konjugat RNA_{25mer}-Peptid(**2**) konnte zusätzlich die Masse mit MALDI-TOF MS bestimmt werden. Die RNA-Transkripte wurden dabei quantitativ mit den Peptiden verknüpft, was durch eine signifikant reduzierte Mobilität bei der Gelelektrophorese gezeigt werden konnte.

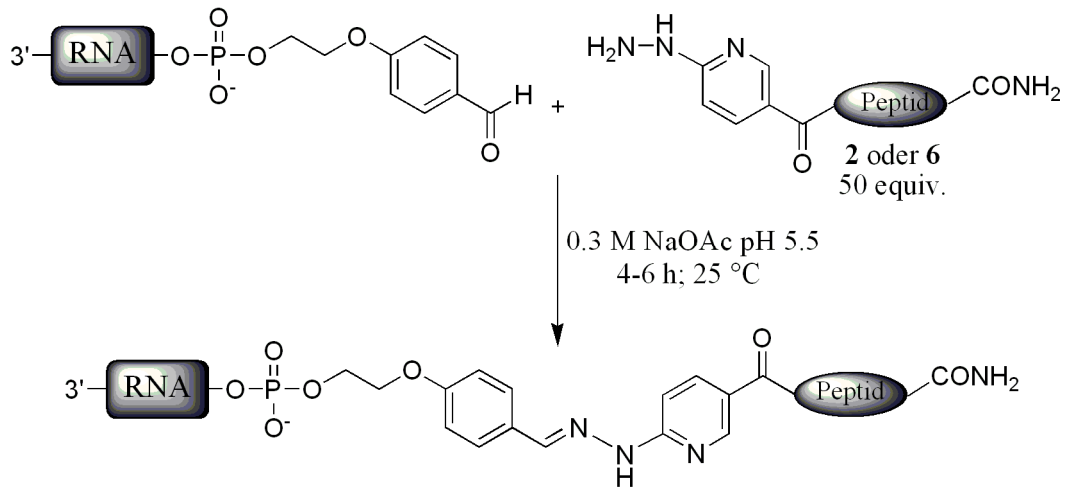


Abbildung 3.17: Konjugationsreaktion von 5'-Aldehyd-modifizierter RNA mit Hydrazin-modifizierten Peptiden **2** oder **6**.

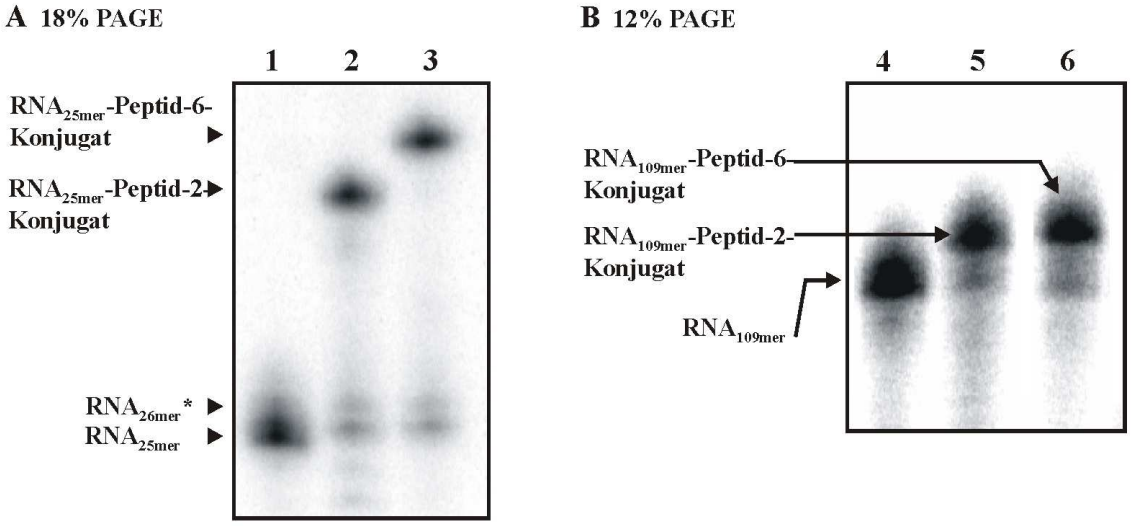


Abbildung 3.18: Konjugation von Aldehyd-derivatisierter RNA_{25mer} (A) und RNA_{109mer}-Bibliothek (B) (^{32}P-markiert) mit Peptid **2** (2 und 5) und Peptid **6** (3 und 6). Elektrophoretische Analyse der Reaktionsansätze; 1 und 3: Negativkontrolle (RNA ohne Peptid). * RNA_{25mer} (n) und RNA_{26mer} (n+1) durch unspezifische Nukleotide, die am 3'-Ende der Transkripte durch die T7 RNA-Polymerase angefügt werden.

3.5 Aminosäure-basierte PNA-Hybrid-Cofaktoren

3.5.1 Design und Synthese

Nukleinsäuren sind durch die ihnen zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen in ihrem katalytischen Repertoire eingeschränkter als Proteine. Bei der Selektion eines Ribozyms mit Proteaseaktivität kommt die hohe Stabilität der zu spaltenden Peptidbindung noch erschwerend hinzu. Proteasen bedienen sich komplexer katalytischer Zentren, um eine Peptidspaltung zu ermöglichen. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, wird hierfür ein aktivierter, nukleophiler Rest benötigt, der in der Lage ist, die nicht reaktive Carbonylfunktion der Peptidbindung anzugreifen. Dieser Rest kann eine Serin-, Aspartat- oder Cysteinseitenkette sein. Diese wird mithilfe anderer Aminosäuren in der Anordnung einer katalytischen Triade oder Duade polarisiert und erhält dadurch ihren stark nukleophilen Charakter. In einem alternativen Mechanismus gebrauchen Metalloproteasen Zink-Ionen (Zn^{2+}) als Elektrophil. Diese können Carbonylfunktion des Peptidsubstrates polarisieren oder dienen als Quelle für metallgebundene nukleophile Hydroxylionen (OH^-) und erleichtern dadurch den Angriff auf die Peptidbindung[150]. Da bereits in anderen Selektionsstrategien Cofaktoren erfolgreich verwendet wurden (Abschnitt 1.1), hat sich auch für die anspruchsvolle Aufgabe der Peptidspaltung eine solche Zugabe angeboten. Aufgrund dessen wurden Cofaktoren mit folgenden Eigenschaften konzipiert:

1. Alle drei Aminosäuren der katalytischen Triade der typischen Serinproteasen (Serin, Histidin und Aspartat) sind in der Sequenz enthalten.
2. Diese drei Aminosäuren besitzen durch kurze Polyethylen-Linker bereits die passende, räumliche Nähe zueinander, entsprechend dem Abstand im Enzym (Abb. 3.19).
3. Eine kurze PNA-Sequenz erlaubt eine „Verankerung“ des Cofaktors an der RNA durch eine ausreichend stabile Hybridisierung im konstanten Primerbereich der RNA-Bibliothek.
4. Ein längerer Polyethylenglykol-Linker verbindet die katalytische Triade und die PNA-Sequenz miteinander und verleiht dem System gleichzeitig die erforderliche Flexibilität.

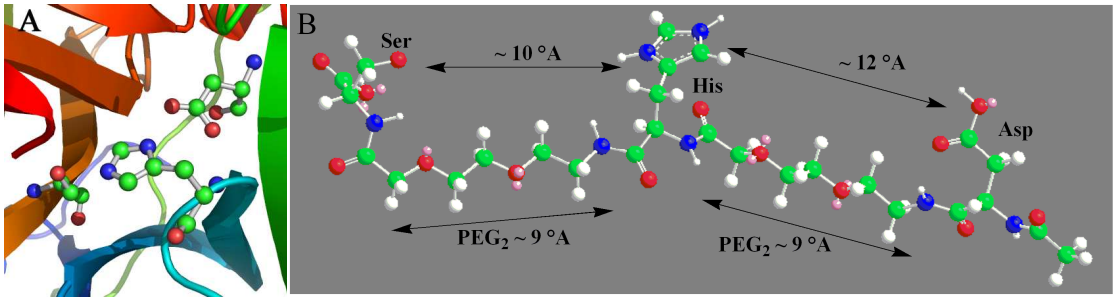


Abbildung 3.19: **A**: Katalytische Triade in der Kristallstruktur von Chymotrypsin (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do; PDB ID <1GCT>), Abstände: His(Cα)-Ser(Cα) 8.36 Å und His(Cα)-Asp(Cα) 6.45 Å; **B**: Modell der künstlichen Triade mit den jeweiligen Abständen zwischen den Aminosäuren.

Peptide Nucleic Acid (PNA) ist ein DNA- bzw. RNA-Analogon, bei dem das Phosphat-Zucker-Rückgrat durch ein achirales und ungeladenes N-(2-Aminoethyl)-Glycin-Peptid-Rückgrat ersetzt wurde[151, 152] (Abb. 3.20). Die von Nielsen *et al.*[153] 1991 entwickelten Nukleinsäurederivate weisen entscheidende Vorteile im Vergleich zu DNA- oder RNA-Polymeren auf. Da die PNA dem enzymatischen Abbau nicht zugänglich ist, ist sie in biologischen Systemen besonders stabil. Gleichzeitig zeigen PNA-Stränge eine hohe Bindungsspezifität, sowie eine erhöhte Thermostabilität gegenüber einem komplementären DNA- oder RNA-Strang. In Schmelzpunktexperimenten findet man aufgrund der mangelnden Abstoßung negativer Ladungen im PNA-Rückgrat für PNA/DNA-Duplexe eine höhere Schmelztemperatur als bei den entsprechenden DNA/DNA-Duplexen. Allerdings resultieren aus diesem Mangel an Ladungen eine deutlich schlechtere Löslichkeit in wässrigen Systemen und eine Tendenz zur Bildung von Aggregaten, was durch den Einbau von Lysinresten in die PNA-Sequenz kompensiert werden kann.

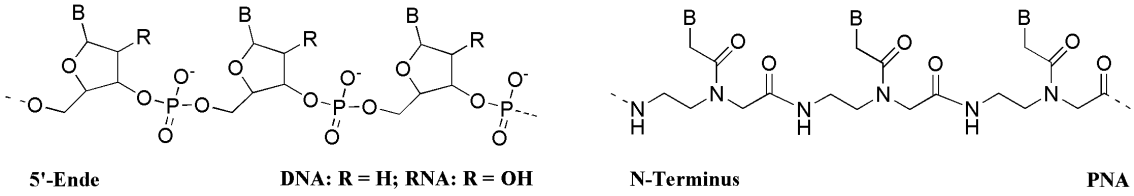


Abbildung 3.20: Strukturvergleich von DNA und PNA.

Der so konzipierte Cofaktor wird dem Pool an RNA-Peptid-Konjugaten vor der Selektionsreaktion zugegeben. Bereits ausgebildete Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA werden zunächst durch Erhitzen aufgelöst und ein Abkühlen in Anwesenheit des Cofaktors erlaubt den RNA-Sequenzen sich neu zu falten und die verankerte Triade dabei miteinzubeziehen (Abb. 3.21). Nach diesem Konzept soll die RNA dabei eine räumliche Struktur mit einer katalytischen Tasche für die Triade ausbilden, was bereits durch Kristallstrukturen verschiedener Ribozyme gezeigt werden konnte[12, 154]. Um Interaktionen zwischen dem an der RNA durch Hybridisierung verankerten Cofaktor und dem kovalent gebundenen Peptidsubstrat zu minimieren, wurden in Abhängigkeit der Konjugationsstrategie PNA-Anker-Sequenzen für den konstanten Primerbereich des jeweiligen anderen Endes der RNA-Bibliothek entworfen und synthetisiert. Für eine ausreichende Stabilität des angestrebten RNA/PNA-Hybrids ist eine Länge der PNA-Sequenz von 6-7 Nukleotiden notwendig, sowie ein hoher Anteil an G-C Basenpaaren. Dabei ist zu beachten, dass Guaninbasen im PNA-Strang mit Cytosinbasen im DNA-/RNA-Strang stabilere Basenpaare bilden als umgekehrt. Eine Hybridisierung mit PNA-Strängen ist sowohl in paralleler als auch antiparalleler Ausrichtung möglich. Dabei entspricht der N-Terminus (n’) dem 5’-Ende und der C-Terminus (c’) dem 3’-Ende bei den Nukleinsäuren. Antiparallele Hybride zeigen in Schmelzpunktexperimenten eine größere Stabilität (Abschnitt 3.5.2.1) als in der parallelen Orientierung. Die synthetisierten PNA- und PNA-Aminosäure-Sequenzen sind in Abb. 3.22 dargestellt. Sequenzen, die komplementär zur 5’-terminalen Primersequenz sind, werden in Kombination mit der Konjugationsstrategie am 3’-Ende der RNA eingesetzt (Abschnitt 3.4.1). Für die Konjugation am 5’-Ende der RNA nach Modifikation mithilfe von Initiatornukleotiden (Abschnitt 3.4.2) kommen dagegen PNA-Sequenzen komplementär zum 3’-terminalen, konstanten Primerbereich zum Einsatz. In allen PNA-Molekülen ist ein Lysinrest enthalten, der durch seine positiv geladene Seitenkette eine bessere Löslichkeit ermöglicht[155]. Eine direkte und effiziente Methode für die Herstellung dieser PNA-basierten Cofaktoren ist die Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) (ausführlich beschrieben in Abschnitt 3.2 und 5.3). Die Verwendung geeigneter Monomere ermöglicht die Synthese des Moleküls mit allen funktionellen Einheiten in nur einem Ansatz. Der Einbau von PNA-Monomeren erfolgt in Analogie zur Kopplung von Aminosäuren. Lediglich ein anderes Kopplungsreagenz (HATU, O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphat) wird für PNA-Monomere

verwendet und ein Capping-Schritt nach jeder Kopplung durchgeführt. Die Aufarbeitung im Anschluss an die Spaltung vom Harz erfolgt wie bei den Peptiden zunächst durch Fällung mit Diethylether und anschließender Aufreinigung mittels HPLC. Die Analyse von Reinheit und Identität der PNA erfolgt durch HPLC und MALDI-TOF MS. Eine Quantifizierung ist durch die Bestimmung der UV-Absorption der Nukleobasen bei 260 nm möglich und wird in Abschnitt 5.3.5 im Detail beschrieben. Abbildung 3.23 zeigt exemplarisch für den PNA-Aminosäure-Cofaktor **26** das HPLC-Chromatogramm der aufgereinigten und isolierten Verbindung sowie dessen Strukturformel.

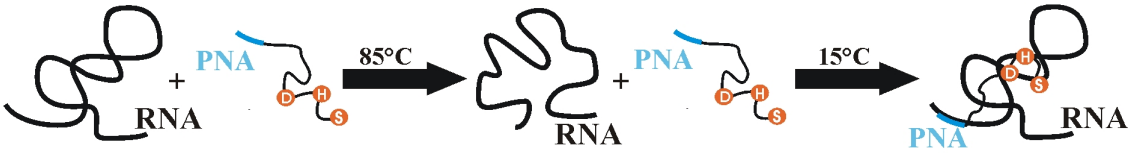


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung des Einbaus der verankerten katalytischen Triade während der Faltung der RNA.

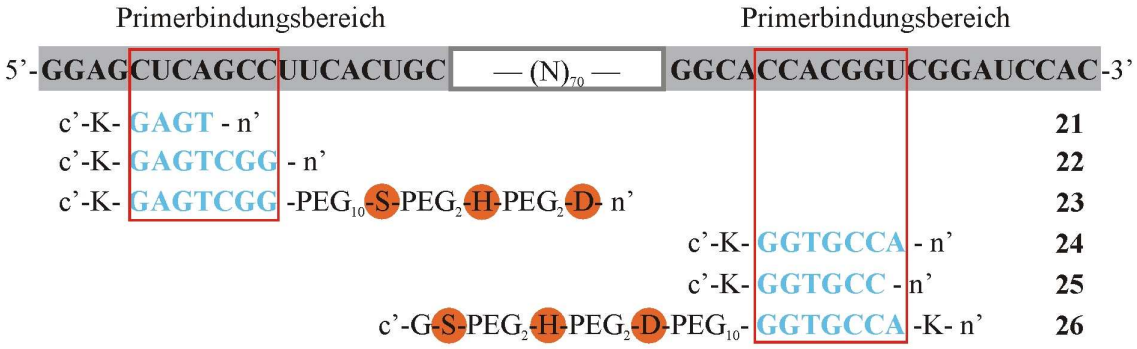


Abbildung 3.22: Sequenzen der synthetisierten PNA- und PNA-Aminosäure-Verbindungen

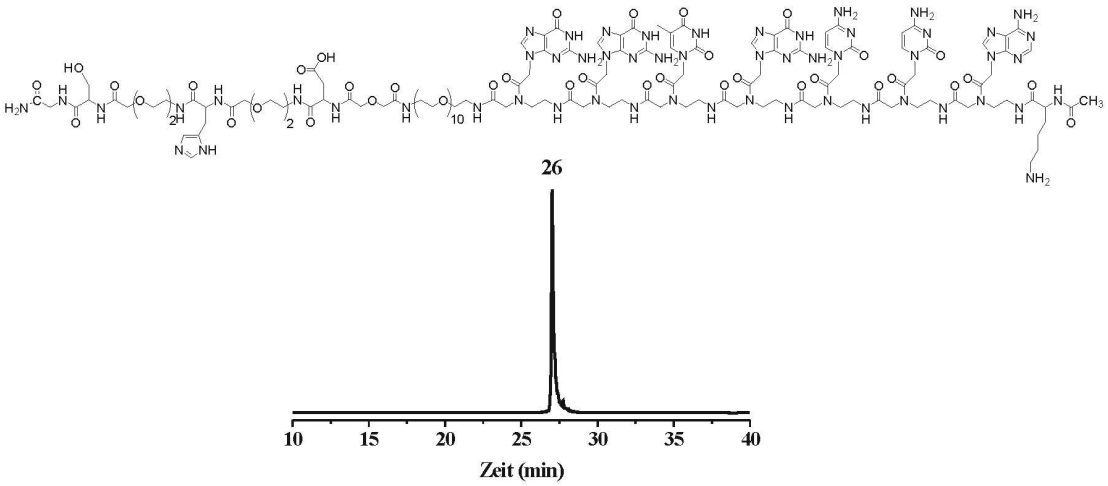


Abbildung 3.23: RP-HPLC-Chromatogramm und Struktur des aufgereinigten PNA-Peptid-Cofaktors **26**.

3.5.2 Charakterisierung von PNA/DNA und PNA/RNA Hybriden

3.5.2.1 Bestimmung der Schmelztemperatur

Ein wichtiges Merkmal zur Charakterisierung eines Nukleinsäure-Hybrids ist die Bestimmung seiner Schmelztemperatur. Für doppelsträngige Nukleinsäuren ist damit jedoch nicht der Übergang vom festen in den flüssigen Aggregatzustand gemeint, sondern das Aufbrechen der Watson-Crick-Basenpaare und die Trennung der beiden komplementären Stränge. Die Schmelztemperatur T_m beschreibt somit den Zeitpunkt der Denaturierung und gibt gleichzeitig Auskunft über die Stabilität von Duplexen. Eine Schmelzpunkt-Analyse der PNA-Aminosäure-Cofaktoren erlaubt eine Abschätzung darüber, mit welcher Stabilität die Triade an der RNA verankert ist. Dabei sind zwei Aspekte von besonderer Bedeutung:

1. Die Schmelztemperatur muss einerseits ausreichend hoch sein, so dass während einer Selektionsreaktion in einem typischen Temperaturbereich von 20-37 °C der Cofaktor stabil verankert ist.
2. Das gebildete Hybrid darf nicht zu stabil sein, da die Anlagerung der PNA-Sequenz im konstanten Primerbereich der RNA erfolgt und der Cofaktor somit mit der Bindungsstelle der Primer für die nachfolgende RT-PCR konkurriert.

Für die Bestimmung der Schmelztemperatur werden äquimolare Mengen der komplementären Einzelstränge in Phosphatpuffer pH 7.0 gelöst und die Konzentrationen so gewählt, dass eine Ausgangsabsorption der Probe von 0.4-0.7 erreicht wird. Die Hybridisierung der beiden Stränge wird gewährleistet, indem die Probe zunächst auf 85 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Die Messung der Absorption erfolgt photometrisch in verschließbaren Quarzküvetten bei 260 nm, während gleichzeitig die Temperatur der Probe erhöht wird[156]. Um mögliche Absorptionsänderungen des Puffers während des Erhitzens zu korrigieren, wird jeweils parallel eine Küvette mit Puffer vermessen und die erhaltene Basislinie von der Schmelzkurve subtrahiert. Die temperaturabhängige Absorptionskurve, die hieraus resultiert, zeigt einen typischen sigmoidalen Kurvenverlauf aufgrund der kooperativen Eigenschaften des Schmelzvorgangs. Das bedeutet, wenn bereits einige Basenpaare aufgebrochen wurden, erfolgt die Denaturierung der nachfolgenden Basenpaare umso schneller. Der damit verbundene Anstieg der Absorption während des Schmelzvorganges beruht auf dem Effekt der Hyperchromizität. Dieser wird durch den Verlust des π-Stackings, das in der helikalen Struktur vorliegt, hervorgerufen. Somit ist der Absorptionskoeffizient der Nukleobasen in einzelsträngigen Oligonukleotiden größer als in Duplexen. Die Schmelztemperatur T_m ist definiert als diejenige Temperatur, bei der die Hälfte der vorhandenen Spezies als Hybride vorliegt, und wird durch das Maximum der ersten Ableitung der Schmelzkurve bestimmt. In Abbildung 3.24 ist beispielhaft eine Schmelzkuve und deren 1. Ableitung für den Duplex aus einer DNA_{18mer} und dem PNA-Aminosäure-Cofaktor **23** gezeigt.

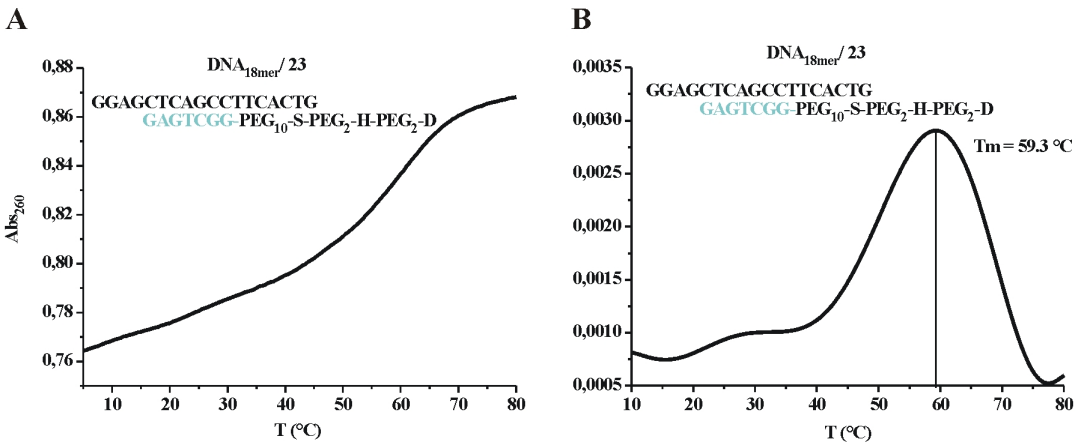


Abbildung 3.24: **A**: Schmelzkurve; **B**: 1. Ableitung von Duplex DNA_{18mer}/ **23**.

Tabelle 3.3:
Schmelzpunkte der PNA-Sequenzen 22-23, komplementär zum 5'-Ende

	DNA_{7mer} 5'-GGCTGAG-3'	**PNA_{7mer}** **22**	**PNA_{7mer}-Triade** **23**
DNA_{18mer} 5'-GGAGCTCAGCCTTCACTG-3'	28.6 ± 0.2 °C	63.3 ± 0.5 °C (Δt = +34.7 °C)	59.5 ± 0.2 °C (Δt = +30.9 °C)
DNA_{7mer} 5'-CTCAGCC-3'	32.0 ± 0.0 °C	50.3 ± 0.2 °C (Δt = 18.3 °C)	49.6 ± 0.1 °C (Δt = 17.6 °C)
DNA_{7mer} (parallel) 5'-CCGACTC-3'	--	35.0 ± 0.4 °C	33.2 ± 0.1 °C
"self-melting" PNA	--	40.0 ± 1.4 °C	34.1 ± 1.8 °C

Tabelle 3.4:
Schmelzpunkte der PNA-Sequenzen 24-26, komplementär zum 3'-Ende

	DNA_{7mer} 5'-ACCGTGG-3'	**PNA_{6mer}** **24**	**PNA_{7mer}** **25**	**PNA_{7mer}-Peptid 26**
DNA_{18mer} 5'-GGCACCACG GTCGGATCC-3'	20.6 ± 0.8 °C	43.1 ± 4.3 °C	53.4 ± 0.1 °C (Δt = +22.4 °C)	50.7 ± 1.8 °C (Δt = +30.0 °C)
RNA_{18mer} 5'-GGCACCACG GUCGGAUCC-3'			69.9 ± 0.3 °C	64.2 ± 0.3 °C

In den Tabellen 3.3 und 3.4 sind die Schmelzpunkte aller vermessenen Duplexe wiedergegeben. Die ermittelte Schmelztemperatur ist der Mittelwert aus mindestens 3 parallelen Messungen. Es wurden Messungen von Duplexen zwischen den PNA-Aminosäure-Cofaktoren **23** und **26** mit einem DNA_{18mer} und einem RNA_{18mer} durchgeführt, das in der Länge und Sequenz dem jeweiligen konstanten Primerbereich der RNA-Bibliothek entspricht. Vergleichsmessungen eines DNA_{7mer} mit jeweils gleicher Sequenz wie PNA **22** und **25** zeigten eine Erhöhung der Schmelztemperatur

(Δt) und somit eine höhere Thermostabilität von 22 – 34 °C. Experimente mit der reinen PNA-Sequenz (**22** und **25**) im Vergleich zum PNA-Aminosäure-Cofaktor (**23** und **26**) bestätigen mit einem nur geringen Unterschied in der Thermostabilität, dass die Triade durch den langen Polyethylenglycol-Linker (PEG_{10}) flexibel genug und weit genug von der PNA separiert ist, um keinen störenden Effekt auf die Duplexbildung auszuüben.

3.5.2.2 Nachweis der Hybridbildung mittels Interkalation

Eine weitere Möglichkeit des Nachweises PNA-haltiger Hybride bietet der Gebrauch des Cyano-Farbstoffes und Interkalators $DiSC_2(5)$ (3,3'-Diethylthiodicarbocyanin)[157-159] (Abb. 3.25).

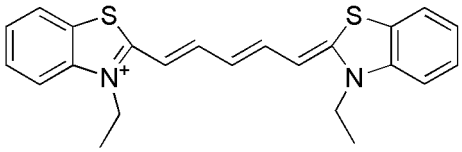


Abbildung 3.25: Interkalator $DiSC_2(5)$.

Der Farbstoff $DiSC_2(5)$ bindet mit großer Affinität an PNA/DNA-Duplexe, PNA/PNA-Duplexe und bisPNA/DNA-Triplexe wobei eine hypsochrome Verschiebung (hin zu kürzeren Wellenlängen) seiner Hauptabsorptionsbande im sichtbaren Spektralbereich von mehr als 100 nm erfolgt. Dieser Effekt wird durch die weniger polare Umgebung PNA-haltiger Hybride verursacht und ist auf das ungeladene Peptidrückgrat der PNA zurückzuführen. Die deutliche Verschiebung der Absorptionsbande verursacht einen unmittelbar sichtbaren Farbumschlag von Blau zu Violett und bietet dadurch eine direkte und einfach durchführbare Methode für die Detektion PNA-haltiger Hybride.

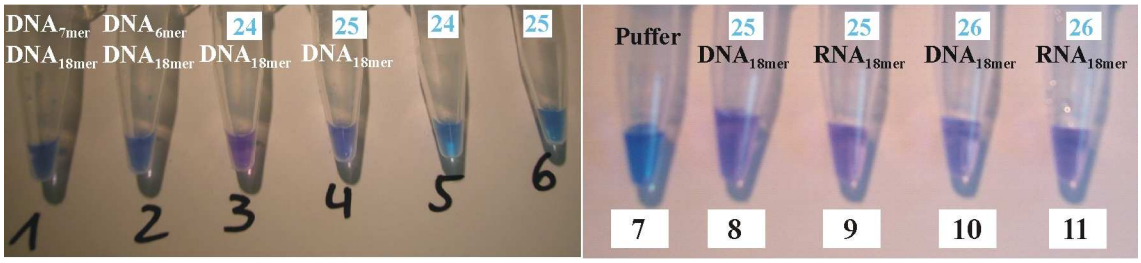


Abbildung 3.26: Nachweis PNA-haltiger Hybride mit dem Interkalator $DiSC_2(5)$.

Für die Nachweisreaktionen wurden sowohl PNA/DNA-Duplexe, PNA/RNA-Duplexe, als auch DNA/DNA-Duplexe und PNA-Einzelstränge verwendet. Um eine mögliche Hybridbildung zu gewährleisten, wurden zunächst alle Proben auf 95 °C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe der Farbstofflösung konnten die in Abbildung 3.26 gezeigten Färbungen beobachtet werden. Die Proben 5 und 6, die PNA-Einzelstränge enthalten und für die somit nur eine Bildung von Aggregaten, aber nicht von Duplexen möglich ist, zeigen die gleiche hellblau Färbung, wie die methanolische Lösung des Farbstoffes selbst. Bei DNA/DNA-Duplexen (Probe 1 u. 2*) ist eine leichte Verdunklung des Blaus zu erkennen. Für das PNA_{6mer} (**24**, Probe 4) konnte kein deutlicher Farbumschlag beobachtet werden. Dies gibt Grund zur Annahme, dass dieser Duplex nicht stabil genug ist, um eine für einen Farbumschlag ausreichend unpolarere Umgebung zu bieten, was bereits der deutlich niedrigere Schmelzpunkt von 43 °C vermuten lässt. Bei PNA-haltigen Hybriden ist für das PNA_{7mer} (**25**, Probe 3, 8, 9) und den PNA-Aminosäure-Cofaktor (**26**, Probe 10, 11) eine deutliche Violettfärbung sowohl mit komplementärer DNA_{18mer} als auch RNA_{18mer} zu erkennen, wodurch die Hybridbildung und der gemessene Schmelzpunkt bestätigt werden.

* Die Bildung eines DNA/DNA-Duplex mit einem 6mer ist unwahrscheinlich und konnte durch eine Schmelzpunktbestimmung nicht bestätigt werden.

3.5.2.3 Reverse Transkription in Gegenwart von Cofaktoren

Die Hybridisierung des 3'-DNA-Primers während der Reversen Transkription ist ein essentieller Schritt für das Gelingen einer *in vitro* Selektion, denn er wird benötigt, um die angereicherten aktiven Sequenzen im RNA-Pool zu kopieren und anschließend zu vervielfältigen. Da in der von uns gewählten Selektionsstrategie der PNA-Cofaktor ebenfalls im 3'-terminalen, konstanten Sequenzbereich des Pools hybridisiert, soll in diesem Experiment geklärt werden, ob die Anwesenheit der PNA die Reverse Transkription stört oder ob ein Anlagern des 3'-Primers ohne Hinderung möglich ist.

Hierzu wurden jeweils für die PNA_{7mer} **25** und PNA_{6mer} **24** zwei unterschiedliche Ansätze durchgeführt. Einerseits wurden der Primer nur in der halben Konzentration im Vergleich zum RNA-Template eingesetzt. Dies gewährleistet eine komplette Umsetzung des Primers (Abb. 3.29, Ansatznummer 1-4 und 10-13) für den Fall, dass keine störenden Einflüsse der PNA vorhanden sind. Andererseits wurde ein fünffacher Überschuss an Primer verwendet. In diesem Ansatz sind die Reaktionsbedingungen den Gegebenheiten während der *in vitro* Selektion angepasst. Durch den Überschuss an Primer bestehen bessere Voraussetzungen dafür, dass der Primer die PNA verdrängen kann (Abb. 3.29, Ansatznummer 5-9 und 14-18). Zusätzlich wird die zugegebene Menge an PNA in beiden Ansätzen variiert. Die in jedem Ansatz eingesetzten Mengen an RNA-Template, Primer und PNA sind in Abbildung 3.29 wiedergegeben. Zur Auswertung wurden die jeweiligen Ansätze auf ein denaturierendes 12 % Polyacrylamid-Gel aufgetragen und anschließend die Radioaktivität der Banden gescannt.

Für die erste Reihe an Experimenten, bei denen der Primer in niedriger Konzentration eingesetzt wurde, ist klar zu erkennen, dass unabhängig von der eingesetzten PNA-Konzentration die Verlängerung des Primers quantitativ erfolgte. Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch wenn der Primer im Überschuss eingesetzt wird. Hier ist das Verhältnis von verlängertem zu nicht verlängertem Primer in allen Ansätzen konstant und somit völlig unbeeinflusst von der Anwesenheit der PNA.

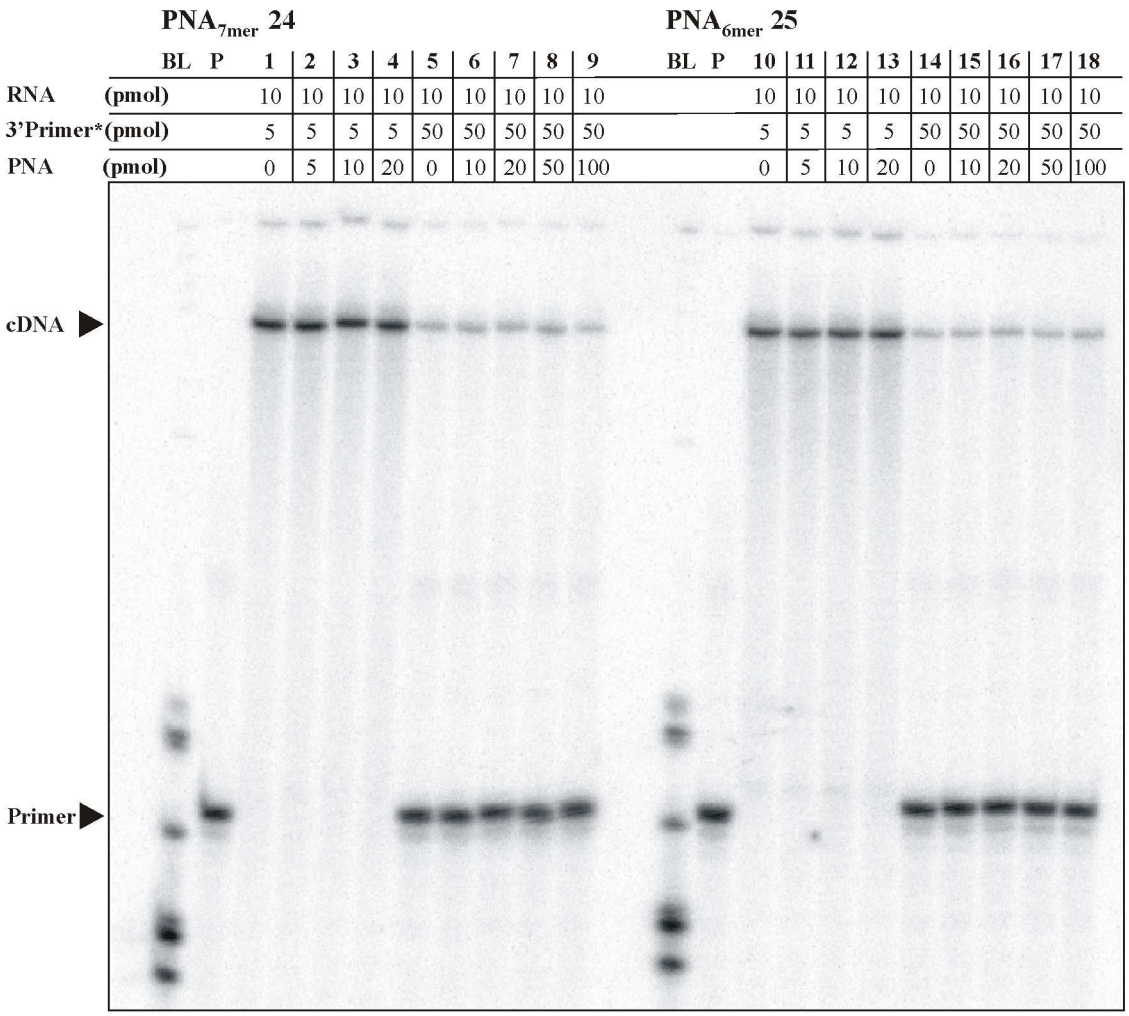


Abbildung 3.29: Reverse Transkription in Anwesenheit von PNA-Sequenzen **24** und **25**. Eingesetzte Mengen der einzelnen Komponenten: RNA: 109mer-Bibliothek (pmol); 3'-Primer* (pmol, 5'- ^{32}P-markiert, * = radioaktiv); PNA_{7mer} (**25**, links, pmol); PNA_{6mer} (**24**, rechts, pmol); BL = Basenpaarleiter; P = 3'-Primer*

3.6 Affinitätschromatographie

3.6.1 Immobilisierung von RNA-Peptid-Konjugaten auf Streptavidin-Agarose

3.6.1.1 Stabilitätsuntersuchungen von immobilisierten RNA-Peptid-Konjugaten

Für das Gelingen der Selektion ist in einem ersten Schritt eine quantitative Immobilisierung der nicht aktiven RNA-Sequenzen von essentieller Bedeutung. Zusätzlich müssen die immobilisierten RNA-Peptid-Konjugate auch eine ausreichende Stabilität besitzen, so dass nur diejenigen RNA-Sequenzen vom Harz gewaschen werden, die aktiv eine Bindung gespalten haben. Zur Überprüfung der Stabilität der Konjugate wurden folgende Versuche durchgeführt. Mithilfe der vorhandenen Biotin-Ankergruppe werden RNA-Peptid-Konjugate durch Interaktionen mit dem Protein Streptavidin auf Streptavidin-modifizierter Agarose immobilisiert. Die Immobilisierungsexperimente wurden sowohl für RNA_{25mer}-Peptid(**2**)-Konjugate als auch für Konjugate der RNA_{109mer}-Bibliothek mit Peptid **2** durchgeführt. Die Konjugation erfolgte dabei jeweils über eine Aldehydfunktion am 5'-Ende der RNA, die durch das Initiatornukleotid **10** eingeführt wurde (Abschnitt 3.4.2.2). Dabei konnte für beide ^{32}P-markierten immobilisierten Konjugate gezeigt werden, dass diese über einen Zeitraum von 24 Stunden eine ausreichende Stabilität aufweisen. Während dieser Zeit wurde trotz intensivem Waschen keine Radioaktivität in den Waschfraktionen festgestellt und gleichzeitig blieb die Menge an Radioaktivität auf dem Harz konstant (Abb. 3.30 a). Die Immobilisierung für das RNA_{25mer} wurde mit dem entsprechenden HPLC-aufgereinigten Konjugat durchgeführt und ergab eine nahezu quantitative Immobilisierung (Abb. 3.30 a, links: Die gemessene Radioaktivität in Waschfraktion Nr. 0 beträgt ca. 10 %). Für die RNA_{109mer}-Bibliothek wurde hingegen direkt das Rohprodukt aus der Konjugationsreaktion ohne weitere Aufreinigung für die Immobilisierung verwendet. Aus diesem Grund konnte hier keine quantitative Immobilisierung der Radioaktivität erreicht werden (Abb. 3.30 a, rechts: Die gemessene Radioaktivität in Waschfraktion Nr. 0 beträgt ca. 40 %).

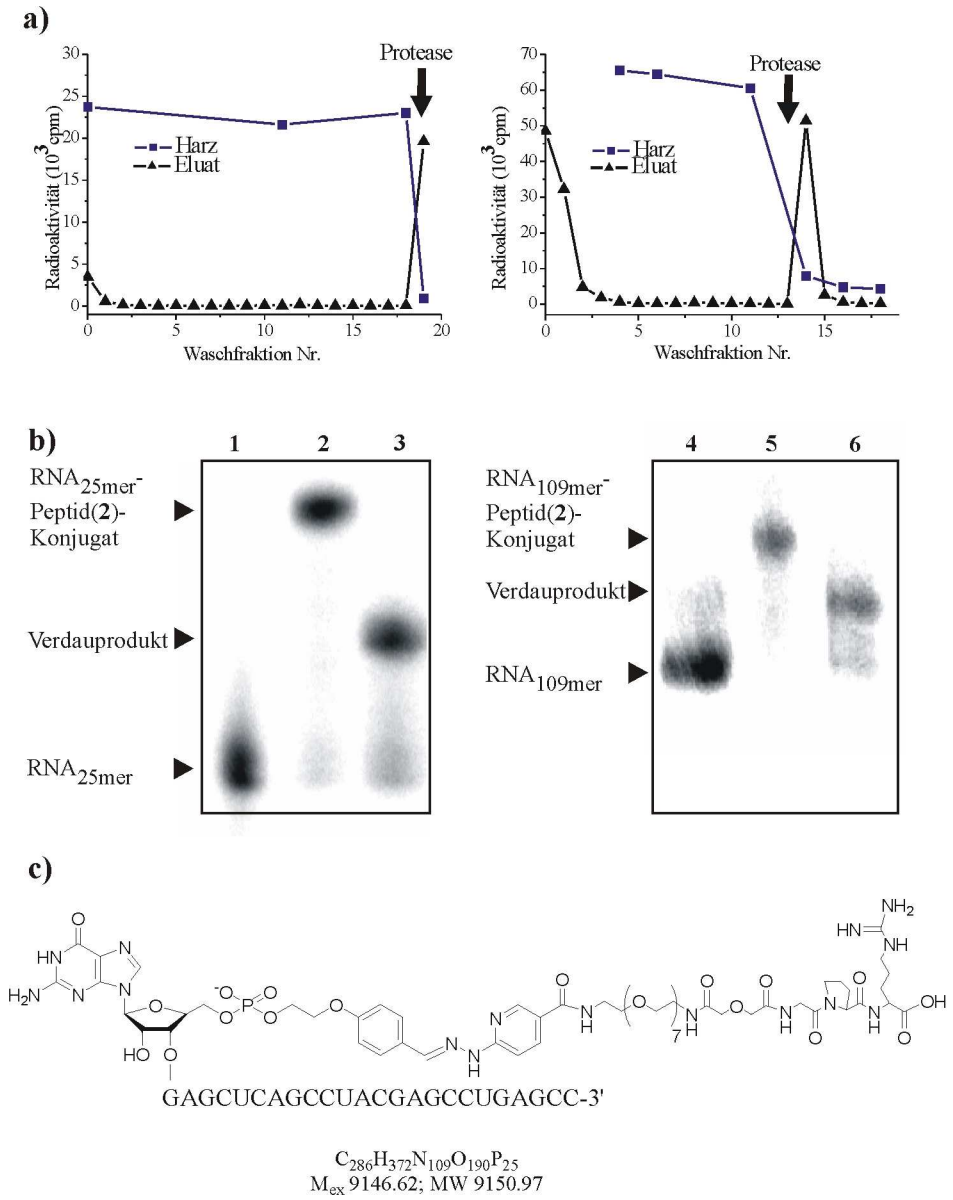


Abbildung 3.30: Immobilisierung und Stabilität ^{32}P-markierter RNA-Peptid-Konjugate. (a) Aufgereinigtes RNA_{25mer}-Peptid(**2**)-Konjugat (links) und der nicht aufbereitete Konjugationsansatz des RNA_{109mer}-Peptid(**2**)-Konjugats (rechts) wurden auf Streptavidin-Harz immobilisiert; das Harz wurde bis zum Erreichen des Hintergrundniveaus der Radioaktivität gewaschen und die Stabilität über 24 Std. in wässrigem Puffer bei 25 °C untersucht, indem die in den Waschfraktionen (▲) gemessene und auf dem Harz (■) verbleibende Radioaktivität verfolgt wurde. Der Zeitpunkt der proteolytischen Spaltung mit Trypsin ist durch Pfeile angezeigt. (b) Gelelektrophoretische Analyse der Verdauprodukte: (1) RNA_{25mer}, (2) RNA_{25mer}-Peptid(**2**)-Konjugat, (3) Verdauprodukt (eluiert in Fraktion Nr. 19), (4) RNA_{109mer}, (5) RNA_{109mer}-Peptid(**2**)-Konjugat, (6) Verdauprodukt (eluiert in Fraktion Nr. 14). c) Struktur des Verdauprodukts des RNA_{25mer}-Peptid(**2**)-Konjugats.

3.6.1.2 Freisetzung der immobilisierten RNA durch Trypsinspaltung des Peptids

Im Anschluss an das oben beschrieben Immobilisierungsexperiment wurde ein Trypsinverdau der Konjugate durchgeführt. Diese Spaltung dient als Positivkontrolle für aktive, Peptid-spaltende RNA-Sequenzen und soll eine quantitative Freisetzung der gespaltenen Konjugate, bzw. im Falle der Selektion der aktiven RNA-Sequenzen, ermöglichen. Die Versuche konnten zeigen, dass die Spaltstelle im Peptid für das Enzym trotz der Immobilisierung auf Streptavidin-Agarose leicht zugänglich ist. 85-90 % der immobilisierten RNA wurde durch den Verdau mit Trypsin vom Harz freigesetzt (Abb. 3.30 a). Die gelelektrophoretische Analyse der Waschfraktionen im Anschluss an die Spaltung zeigten für das jeweilige Konjugat eine scharfe Bande, deren Mobilität zwischen der nicht-modifizierten RNA und dem intakten RNA-Peptid-Konjugat liegt (Abb. 3.30 b). Dies deutet darauf hin, dass die Trypsinspaltung spezifisch an der vorgesehenen Spaltungsstelle und ohne Nebenreaktionen erfolgt, insbesondere ohne erkennbare RNA-Degradation. Zusätzlich wurde das Verdauprodukt des RNA_{25mer}-Peptid(**2**)-Konjugats mittels HPLC isoliert und durch Massenspektroskopie charakterisiert. Die Analyse ergab die korrekte Masse für das erwartete Spaltprodukt am C-terminalen Ende des Argininrests (Abb. 3.30 c) (MALDI-TOF MS-Analyse: m/z 9141.4 $[M+H]^+$; berechnet für $[C_{286}H_{373}N_{109}O_{190}P_{25}]^+$ 9147.63).

3.6.1.3 Streptavidin-Shift mit Biotin-markierten RNA-Peptid-Konjugaten

Eine weitere Möglichkeit Interaktionen zwischen Streptavidin und Biotin-markierten Verbindungen darzustellen, ist ein Gel-Shift Experiment. Dabei wird nicht das auf Agarose-Kügelchen immobilisierte Streptavidin sondern Fluoreszenz-markiertes Streptavidin in Lösung verwendet. Ziel dieses Experiments war die vollständige Bindung radioaktiver RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugate durch Streptavidin zu zeigen, gleichbedeutend mit einer kompletten Verschiebung der radioaktiven Bande des Konjugats und Komigration mit der Fluoreszenzbande des Streptavidins. Dabei bindet die RNA, die durch die Konjugation mit dem Peptid ein Biotin-Label erhält, an das Streptavidin und wandert während der Elektrophorese sehr viel langsamer durch die

Gelmatrix als die RNA alleine. Als Positivkontrolle wurde ein RNA_{40mer} verwendet, das sowohl ein Biotin als auch einen Fluoreszenzfarbstoff als Marker trägt. Es wurden sowohl ein Radioaktivitäts-, als auch ein Fluoreszenz-Scans des Gels durchgeführt (Abb. 3.31). Bei Betrachtung der Radioaktivität (Abb. 3.31 A) sind zunächst die nicht modifizierte RNA (1) und das RNA-Peptid-Konjugat (2) erkennbar. In Anwesenheit des Streptavidins (3 + 4) nimmt die Intensität der Konjugatbande ab und eine neue radioaktive Bande auf Höhe des Streptavidins erscheint. Die Bindung erfolgt jedoch nicht quantitativ.

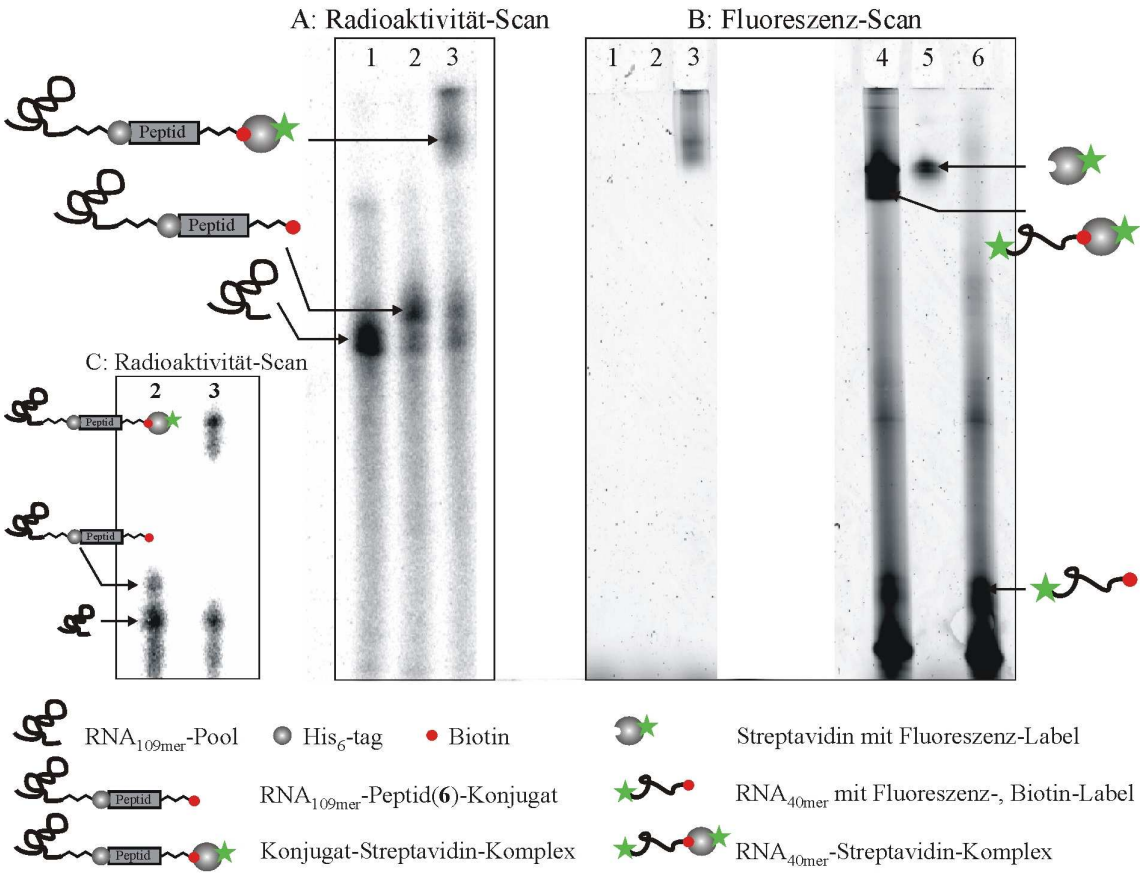


Abbildung 3.31: Streptavidin-Shift Experiment mit Biotin-markiertem RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat. 1: RNA_{109mer}-Bibliothek (^{32}P-markiert); 2: RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat und während der Konjugation nicht umgesetzte RNA_{109mer}; 3: 2 + Fluoreszenz-markiertes Streptavidin; 4: Fluoreszenz- und Biotin-markierte RNA_{40mer} + Fluoreszenz-markiertes Streptavidin; 5: Fluoreszenz-markiertes Streptavidin; 6: Fluoreszenz- und Biotin-markierte RNA_{40mer}. C: Wiederholung der Ansätze 2 und 3. 3 mit größerem Streptavidinüberschuss (~ 2.5.equiv.).

Die Fluoreszenzbanden (Abb. 3.31 B) bestätigen die Interaktionen zwischen Streptavidin und RNA-Peptid-Konjugat. Die Bande des Streptavidins (5) allein wandert schneller durch das Gel als im Komplex mit dem Konjugat. Für die Positivkontrolle RNA_{40mer} (7) ist im Komplex mit Streptavidin (5) kein eindeutiger Shift der Streptavidinbande (6) zu erkennen, jedoch belegt die deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität, dass ebenfalls eine Komplexbildung stattgefunden hat. Das Ziel dieses Versuches, die vollständige Bindung Biotin-markierter Verbindungen durch das Streptavidin wurde zunächst nicht erreicht, kann jedoch durch einen erhöhten Überschuss an Bindungsprotein (~ 2.5 equiv.) erzielt werden (Abb. 3.31 C 3) und resultiert in einem vollständigen Shift der RNA-Peptid-Konjugat Bande.
Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung eines ausreichenden Überschusses an Streptavidin für das Gelingen der Selektion.

3.6.2 Immobilisierung auf Streptavidin-Agarose und Ni^{2+}-Sepharose

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Durchführung der Selektion ist die spezifische Trennung von aktiven, nicht-aktiven und selbstspaltenden RNA-Spezies anhand der beiden unterschiedlichen Affinitätsmarker Biotin und His_6. Für die Etablierung eines Protokolls, in dem beide Immobilisierungen (auf Streptavidin-Agarose und Ni^{2+}-Sepharose) nacheinander durchgeführt werden, wurden radioaktiv markierte RNA-Peptid-Konjugate mit unterschiedlicher RNA-Länge (25mer oder 49mer) sowie mit unterschiedlichen Peptiden, die jeweils einen Affinitätsmarker (Biotin oder His_6) tragen, hergestellt. Hierbei kam als Konjugationsmethode die Kopplung am 3'-Ende nach Periodatoxidation zum Einsatz (Abb. 3.4.1), mit anschließender Aufreinigung der Konjugate mittels Gelelektrophorese. Für die Immobilisierung wurde eine Mischung folgernder Verbindungen eingesetzt:

1. RNA_{25mer}-Peptid(**2**)-Konjugat → Biotin-Marker
2. RNA_{49mer}-Peptid(**5**)-Konjugat → His_6-Marker
3. RNA_{25mer} → kein Marker

Das Protokoll für die Immobilisierung enthält die folgenden Schritte: Zunächst wird eine Mischung der oben genannten Spezies zweimal nacheinander mit Streptavidin-

Agarose-Harz inkubiert und anschließend gründlich mit Immobilisierungspuffer gewaschen (Abschnitt 5.6.1.1). Es ist zu erwarten, dass das RNA_{25mer}-Peptid(**2**)-Konjugat durch Interaktionen des Biotins mit dem Streptavidin vollständig auf dem Harz verbleibt und in den Waschfraktionen das RNA_{49mer}-Peptid(**5**)-Konjugat sowie das nicht modifizierte RNA_{25mer} wieder zu finden sind. Anschließend werden die erhaltenen Waschfraktionen zweifach mit Ni^{2+}-Sepharose-Harz inkubiert und wiederum im Anschluss gründlich mit Bindungspuffer (20 mM Na-Phosphat, 0.5 M NaCl, 30 mM Imidazol, pH 7.5) gewaschen. Nach diesem Schritt sollte das RNA_{49mer}-Peptid(**5**)-Konjugat aufgrund der Wechselwirkungen des His_6-Markers mit dem Ni^{2+}-Sepharose-Harz auf der Festphase verbleiben und ausschließlich das nicht modifizierte RNA_{25mer} in die Waschfraktionen übertreten. In einem letzten Schritt werden die immobilisierten Spezies auf dem Ni^{2+}-Sepharose-Harz durch einen Elutionspuffer mit höherem Imidazolgehalt (20 mM Natrium-Phosphat, 0.5 M NaCl, 300mM Imidazol, pH 7.5) von der Festphase gewaschen. Hierbei ist zu erwarten, dass im Eluat ausschließlich RNA_{49mer}-Peptid(**5**)-Konjugat enthalten ist. Um das entworfene Immobilisierungsprotokoll zu verifizieren, werden alle erhaltenen Waschfraktionen und Filtrate mittels Gelelektrophorese analysiert (Abb. 3.32).

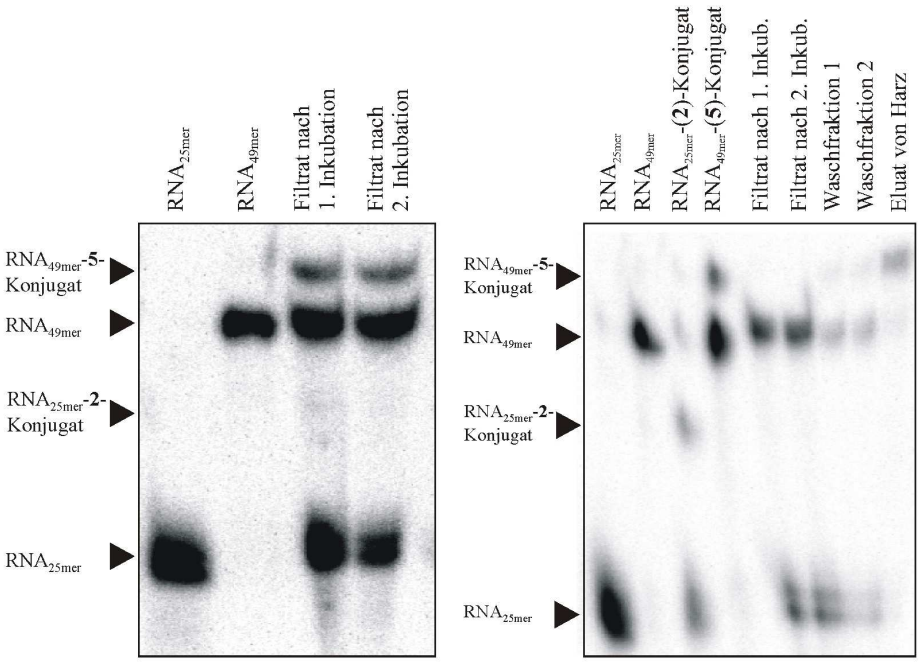


Abbildung 3.32: Gelelektrophoretische Analyse (18 % Polyacrylamid-Gel) der Filtrate und Waschfraktionen der aufeinander folgenden Immobilisierungen von RNA_{25mer}-Peptid(**2**)-Konjugat, RNA_{49mer}-Peptid(**5**)-Konjugat und nicht modifizierter RNA_{25mer} auf Streptavidin-Agarose (links) und Ni^{2+}-Sepharose (rechts).

Das Gel auf der linken Seite in Abbildung 3.32 zeigt die Analyse des Inhalts der Filtrate und Waschfraktionen nach zweimaliger Inkubation der Ausgangsmischung auf Streptavidin-Agarose. Wie erwartet enthalten die Filtrate nach der 1. und 2. Inkubation das RNA_{49mer}-Peptid(**5**)-Konjugat sowie die nicht modifizierte RNA_{25mer}. Nach der ersten Inkubation sind immer noch geringe Spuren des RNA_{25mer}-Peptid(**2**)-Konjugat im Filtrat erkennbar, die jedoch nach der zweiten Inkubation vollständig immobilisiert wurden. Bedauerlicherweise sind zusätzlich intensive Banden des nicht modifizierten RNA_{49mer} zu finden, was auf eine nur geringe Stabilität der Konjugate (hergestellt am 3'-Ende der RNA nach Periodatoxidation) hinweist.

Das auf der rechten Seite in Abbildung 3.32 dargestellte Gel zeigt die Ergebnisse der darauf folgenden Immobilisierung auf Ni^{2+}-Sepharose-Harz unter Verwendung der Filtrate und Waschfraktionen aus dem ersten Immobilisierungsschritt. Diese enthalten nun ausschließlich RNA_{49mer}-Peptid(**5**)-Konjugat und nicht modifiziertes RNA_{25mer} sowie nicht modifiziertes RNA_{49mer} aufgrund der instabilen Konjugate. Auch in den aufgetragenen Referenzen beider Konjugate sind intensive Banden der jeweils nicht modifizierten RNA detektierbar, wie auch in den Filtraten und Waschfraktionen nach der ersten und zweiten Inkubation.

Wie zu erwarten ist nach den beiden Inkubationen mit Ni^{2+}-Sepharose kein RNA_{49mer}-Peptid(**5**)-Konjugat, das mit dem His_6-Marker modifiziert ist, in den Filtraten nachweisbar. Das Konjugat konnte jedoch im Eluat detektiert werden und zeigt somit, dass eine spezifische Immobilisierung über den His_6-Marker auf Ni^{2+}-Sepharose möglich ist. Abschließend lässt sich dieses Experiment wie folgt zusammenfassen:

1. Biotin-modifizierte Konjugate können spezifisch auf Streptavidin-Agarose immobilisiert werden.
2. His_6-markierte Konjugate lassen sich spezifisch auf Ni^{2+}-Sepharose-Harz immobilisieren und anschließend mit erhöhten Konzentrationen an Imidazol oder niedrigem pH des Puffers von der Festphase eluieren.
3. Nicht modifizierte RNA wird wie erwartet in den Filtraten und Waschfraktionen angereichert.
4. Die Versuche haben auch sehr deutlich gezeigt, dass Konjugate, die durch Kopplung mit Hydrazin-modifizierten Peptiden am 3'-Ende der RNA nach Periodatoxidation erhalten werden, für Immobilisierungen nicht ausreichend stabil sind.

3.7 *In vitro* Selektion

3.7.1 Ausarbeitung und Optimierung des Selektionsprotokolls

3.7.1.1 Optimierung der Transkription

Die Etablierung des Transkriptionsprotokolls für die Herstellung der 5'-Aldehyd-modifizierten RNA-Bibliothek fand unter Verwendung der ersten Charge (StP89, Syntheseweg A) des Acetal-geschützten Benzaldehyd-Guanosinmonophosphats **10** als Initiatornukleotid statt. Auf eine Transkription mit der freien Aldehydfunktion wurde verzichtet, um mögliche Reaktion mit aktiven Resten im katalytischen Zentrum der Polymerase zu vermeiden. Nach erfolgter Transkription und Ethanolfällung wurde der Reaktionsansatz mittels HPLC aufgereinigt, um überschüssige Monomere und Reagenzien zu entfernen, aber auch um diejenigen RNA-Stränge mit Initiatornukleotid zu isolieren. Dies ist durch die unterschiedliche Polarität der beiden RNA Spezies, die durch den unpolaren Einfluss der Acetalschutzgruppe gegeben ist, möglich. Unter Verwendung der darauf folgenden Chargen, unabhängig von der Syntheseroute, veränderte sich jedoch das Chromatogramm im Anschluss an die Transkription entscheidend (Abb. 3.33 c). Nur noch ein geringer Anteil von 10 % aller Transkripte hatte eine geschützte Aldehydfunktion inkorporiert. Eine genauere Untersuchung ergab, dass die Acetalschutzgruppe schon vor der Transkription zu einem Großteil abgespalten wurde, während im Vergleich dazu das Initiatornukleotid der ersten Charge auch nach längerer Lagerung in wässriger Lösung noch zu über 90 % geschützt ist. Durch den Verlust des Acetals wird der Polaritätsunterschied von RNA-Molekülen, die eine Aldehydfunktion tragen und denen, die keine tragen, so gering, dass sie nicht mehr mittels HPLC getrennt werden können. Erfreulicherweise konnte in Konjugationsexperimenten mit diesen Transkripten gezeigt werden, dass diese genauso effizient gekoppelt werden können. Daraus ergab sich die folgende Protokolländerung: von nun an werden alle Transkriptionsansätze mittels PAGE aufgereinigt. Mithilfe dieser Aufarbeitung ist jedoch nur eine Isolierung aller Volllängen-Transkripte möglich, aber keine Unterscheidung von RNA-Spezies mit und ohne Initiatornukleotid. Somit ergibt sich keine Möglichkeit, die Einbaurate des Initiatornukleotids direkt zu

bestimmen. Allerdings kann im Anschluss an die Konjugation ein zusammengefasster Prozentsatz angegeben werden, der die Einbaurate und die Konjugationsausbeute wiedergibt. In Abbildung 3.33 (b) sind zwei exemplarische HPLC-Chromatogramme wässriger Lösungen von Initiatornukleotiden der ersten (StP89) und der darauf folgenden Charge (StP113) dargestellt, sowie die Aufreinigung der damit durchgeführten Transkription (Abb. 3.33 c) der RNA_{109mer}-Bibliothek. Links: mit Acetal-geschütztem Initiatornukleotid. Rechts: mit dem fast vollständig entschützten Initiatornukleotid.

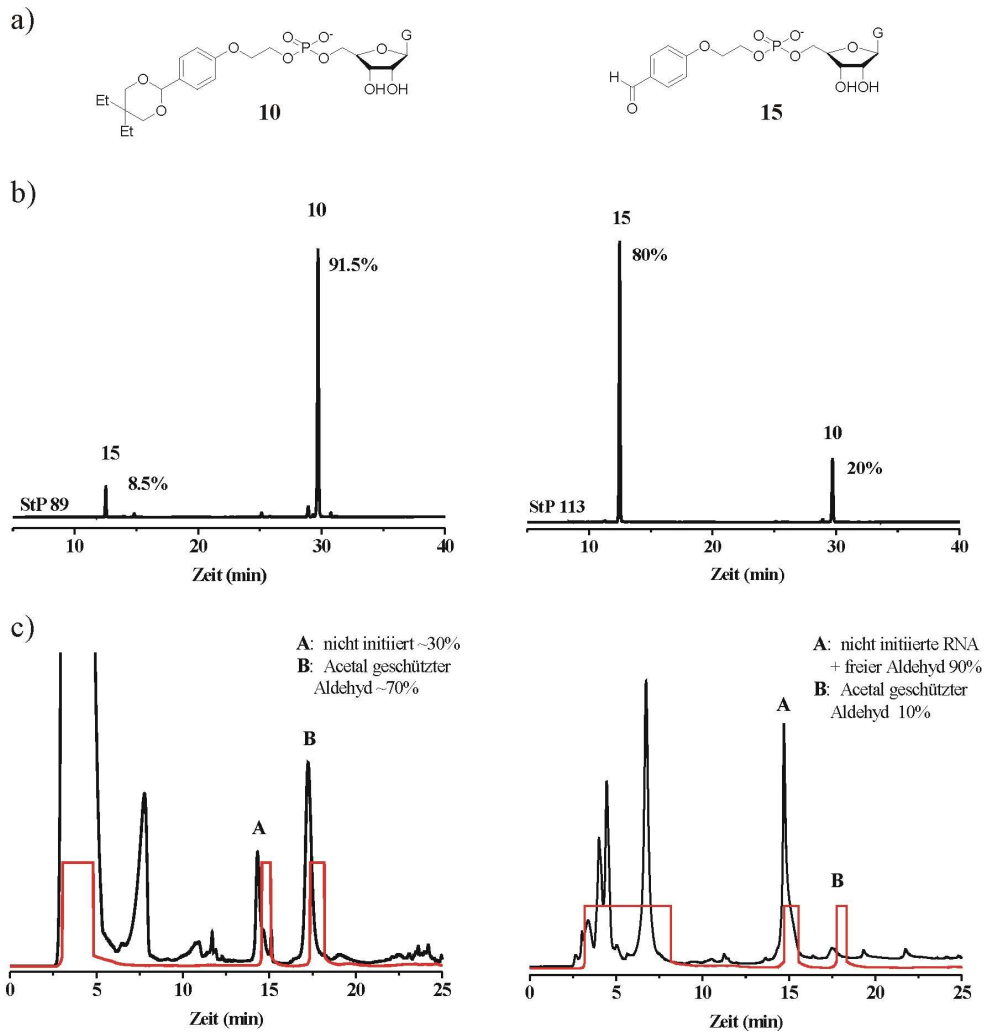


Abbildung 3.33: a) Struktur des Acetal-geschützten Initiatornukleotids **10** und mit freier Aldehydfunktion **15**; b) HPLC-Analyse wässriger Lösungen unterschiedlicher Chargen des Initiatornukleotids **10**. Links: Charge StP 89, > 90 % Acetal-geschützte Form **10**; Rechts: Charge StP 113: 80 % freie Aldehyd-Form **15**; c) Transkriptionsansätze der RNA_{109mer}-Bibliothek mit überwiegend Acetal-geschütztem Initiatornukleotid (links) und überwiegend Initiatornukleotid in der freien Aldehyd-Form (rechts). Schwarz: UV-Absorption bei 260 nm (mAU); Rot: Bestimmung der Radioaktivität mit Radioflow Detektor (cpm).

3.7.1.2 Optimierung der Polymerase-Kettenreaktion

Die Reverse Transkription (RT) und die anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglichen es im Rahmen der *in vitro* Selektion katalytisch aktive RNA-Spezies in jeder Runde zu vervielfältigen und somit den verwendeten RNA-Pool anzureichern. Die in dieser Selektion verwendeten Primer sind:

5'-Primer (A) 5'- TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGCCTTCACTGC -3'

3'-Primer (B) 5'- GTGGATCCGACCGTGGTGCC -3'

Durch den 5'-Primer wird das PCR-Produkt um 18 Basenpaare verlängert (in unserem Fall von 109 auf 128 Basenpaare) und dient in der nächsten Selektionsrunde als DNA-Matrize für die Transkription. Die angefügten Basenpaare enthalten Erkennungssequenz und Startsignal für die T7 RNA-Polymerase, den so genannten Promotor. Folglich besteht Primer A aus 38 Nukleotiden wohingegen Primer B mit 20 Nukleotiden nur halb so lang ist. Dies führt zu unterschiedlichen, optimalen Hybridisierungstemperaturen während der PCR. Ein Problem des in früheren Selektionen etablierten PCR-Protokolls ist die Formierung eines unspezifischen PCR-Produktes mit einer Länge von ca. 180-200 Nukleotiden. Dieses wird vermutlich durch unspezifisches Anlagern und Verlängern des Primers A gebildet. Deshalb wurden im Folgenden Optimierungen der entscheidenden PCR-Parameter, wie die Mg^{2+}- und Primer-Konzentration, Hybridisierungstemperatur, Template-Konzentration sowie die Anzahl der PCR Zyklen durchgeführt.

Hybridisierungstemperatur

Für die Optimierung der Hybridisierungstemperatur (annealing temperature) wurde zunächst ein Ansatz der Reversen Transkription nach Standardprotokoll durchgeführt. Als Matrize diente unmodifizierter RNA_{109mer}-Pool. Dieser RT-Ansatz wurde direkt für die PCR unter Zugabe aller Reagenzien nach Herstellerprotokoll weiterverwendet. Der PCR-Ansatz wurde auf zwölf identische Proben aufgeteilt und die Reaktion über 20 Zyklen durchgeführt. Während des Schritts, in dem die Hybridisierung der Primer erfolgt, wurden variable Temperaturen von 50-65°C gewählt und anschließend jede Probe auf einem 2% Agarose-Gel analysiert. In Abbildung 3.34 sind auf dem linken Gel

zunächst alle 12 Proben aufgetragen. Auf der rechten Seite wurden die Proben 8-11 ein zweites Mal im Vergleich mit der Basenpaarleiter (BL) und dem RT-Produkt analysiert. Es ist gut zu erkennen, dass im Allgemeinen mit steigender Hybridisierungstemperatur die Gesamtausbeute der PCR zunimmt. Ein Maximum scheint auf dem linken Gel bei 58-59 °C (= Probe 8) erreicht zu sein. Deshalb wurden die Proben 8-11 (58.75-63.75 °C) nochmals aufgetragen. Neben dem 109mer aus der Reversen Transkription ist das korrekte Produkt mit 128 Basenpaaren, allerdings nur in geringer Menge, zu erkennen. Die Hauptbande entspricht erneut dem unspezifisch verlängerten Produkt. Für alle weiteren PCR-Experimente wurde eine Hybridisierungstemperatur von 62°C gewählt, wobei andere Parameter einen weitaus größeren Einfluss auf die Bildung des unspezifischen PCR-Produkts zu haben scheinen.

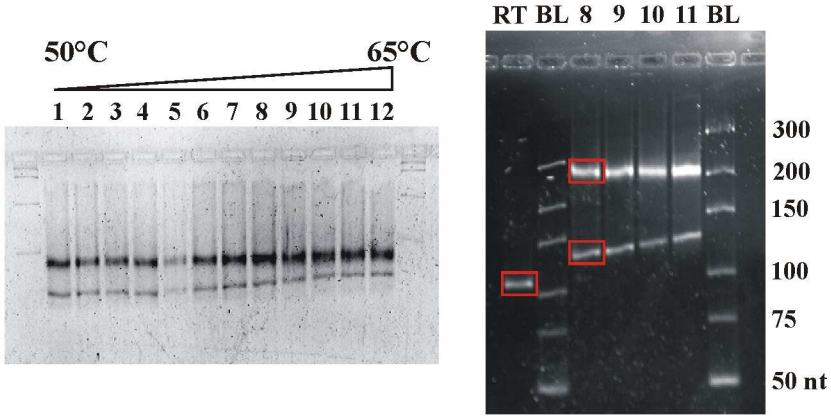


Abbildung 3.34: Optimierung der Hybridisierungstemperatur bei der PCR. Standard PCR-Ansatz wurde auf 12 Proben (1-12) aufgeteilt und die PCR mit einem Temperaturgradient von 50-65 °C während des Hybridisierungsschritts der Primer durchgeführt. Links: 2 % Agarose-Gel der Proben 1-12; Rechts: erneute Gelanalyse der Proben 8-11 mit Basenpaarleiter (BL) und cDNA aus der RT als Vergleich. Rote Kästchen: RT-Produkt: 109 nt, PCR-Produkte: 128 nt (erwünscht) und ca. 200 nt (unspezifisch).

Mg^{2+}-Konzentration

Auch für diesen Assay wurde zunächst eine RT-Reaktion mit unmodifizierter RNA_{109mer} durchgeführt und anschließend mit den Reagenzien für die PCR, mit Ausnahme der Mg^{2+}-Ionen, ergänzt. Der Ansatz wurde dann auf acht Proben aufgeteilt und die PCR mit finalen Mg^{2+}-Konzentration von 1mM, 2mM, 4mM, 6mM, 8mM, 10mM, 15mM und 20mM durchgeführt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem 2 % Agarose-Gel, welches in Abbildung 3.35 gezeigt ist.

Das Maximum der PCR-Ausbeute liegt zwischen Mg^{2+}-Konzentrationen von 4mM und 8mM. Jedoch ist auch unter diesen Bedingungen nur eine sehr schwache Bande des gewünschten Produkts zu erkennen, während die Hauptbande wieder dem unspezifischen PCR-Produkt entspricht. Für alle weiteren PCR-Experimente wurde eine Mg^{2+}-Konzentration von 4mM verwendet.

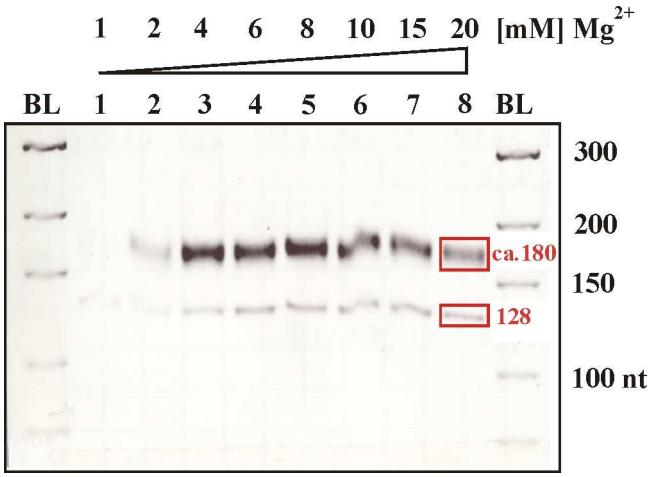


Abbildung 3.35: Optimierung der Mg^{2+}-Ionen Konzentration bei der PCR. Standard PCR-Ansatz wurde auf 8 Proben (1-8) aufgeteilt und auf Mg^{2+}-Konzentrationen von 1-20 mM eingestellt. Gelanalyse der Proben 1-8 mit Basenpaarleiter (BL); PCR-Produkte: 128 nt (erwünscht) und ca. 175 nt (unspezifisch); Maximum der PCR-Ausbeute bei 4-8 mM.

Anzahl der PCR-Zyklen

Für diesen Versuch wurden drei Ansätze parallel durchgeführt, die sich in der Art des RNA-Templates sowie in der An- oder Abwesenheit von Ni^{2+}-Sepharose-Harz, das für die Selektion verwendet wird, unterscheiden.

1. RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat + Ni^{2+}-Sepharose-Harz →RNA ist immobilisiert
2. RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat →RNA in Lösung
3. RNA_{109mer} + Ni^{2+}-Sepharose-Harz →RNA in Lösung
4. Negativkontrolle →ohne RNA und ohne Harz

Mit diesem Versuch soll geklärt werden, ob die Anwesenheit des Ni^{2+}-Sepharose-Harzes die Entstehung der Produktbande verhindert oder in irgendeiner Weise hemmt. Zusätzlich bestand die Vermutung, dass das unspezifische PCR-Produkt erst in späteren Zyklen entsteht, da Primer A erst an den bereits verlängerten Sequenzen in kompletter

Länge hybridisieren kann. Es wurde zunächst die RT mit den oben beschriebenen Ansätzen durchgeführt und die PCR Komponenten hinzugegeben. Das erste Mal wurde nach 5 Zyklen, anschließend nach jedem 3. Zyklus, ein Aliquot entnommen. In Abbildung 3.36 sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt. Für alle drei Ansätze ist zu erkennen, dass nach 5 Zyklen eine erste, schwache Produktbande entsteht, die nach 8 Zyklen stark zunimmt. Nach dem 11. Zyklus wird diese Bande dann wieder schwächer und eine neue Bande, das unspezifisch verlängerte Produkt entsteht, wie in der Gelanalyse deutlich zu sehen ist. Zusätzlich zeigt sich, dass die Präsenz des Ni^{2+}-Sepharose-Harzes mit dem RNA-Template in Lösung keinen Einfluss auf die PCR-Reaktion hat (Vergleich von 2 und 3). Allerdings macht es einen Unterschied in der Intensität der Banden und somit der PCR-Ausbeute, ob das RNA-Peptid-Konjugat auf dem Harz immobilisiert (1) ist oder frei in Lösung (2) vorliegt. Das Gel rechts zeigt erneut Ansatz 2 nach 8 Zyklen mit Basenpaarleiter (BL) und die Negativkontrolle nach 30 Zyklen. Auch hier ist nach einer großen Anzahl an Zyklen eine unspezifische Produktbildung (ca. 75 nt) erkennbar, obwohl keine RNA-Matrize sondern nur Primer enthalten ist. Für alle weiteren PCR Experimente wurde eine Anzahl von 8 PCR-Zyklen verwendet.

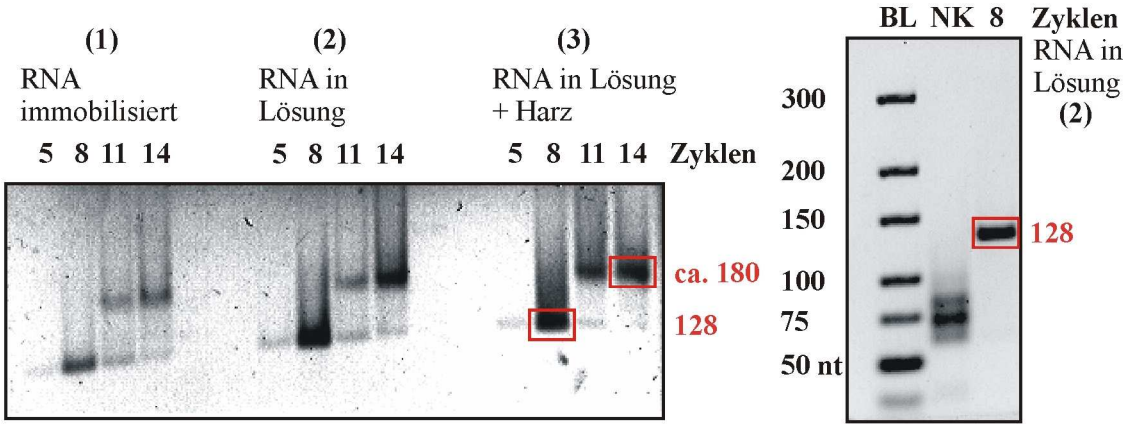


Abbildung 3.36: Optimierung der PCR-Zyklen. PCR-Ansätze: (1) RNA immobilisiert: RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat + Ni^{2+}-Sepharose-Harz, (2) RNA in Lösung: RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat und (3) RNA in Lösung + Harz: RNA_{109mer} + Ni^{2+}-Sepharose-Harz; Links: Gelanalyse der Proben nach 5, 8, 11 und 14 Zyklen für alle drei Ansätze. Rechts: Ansatz RNA in Lösung nach 8 Zyklen mit Basenpaarleiter (BL) und Negativkontrolle nach 30 Zyklen; PCR-Produkte: 128 nt (erwünscht) und ca. 180 nt (unspezifisch), unspezifische Produkte in der Negativkontrolle.

Immobilisiertes vs. eluiertes RNA-Peptid-Konjugat als RT-PCR-Template

Da das vorherige Experiment gezeigt hat, dass die PCR mit dem auf dem Harz gebundenen RNA-Template für die Reverse Transkription schlechtere Ausbeuten liefert, als das Konjugat in Lösung, soll mit diesem Versuch geklärt werden, ob die Elution mit hoher Imidazol- Konzentration oder niedrigem pH-Wert eine Verbesserung der PCR-Ausbeuten im Vergleich zur immobilisierten RNA bringt. Hierfür wurde zunächst in drei parallelen Ansätzen RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat auf Ni^{2+}-Sepharose-Harz immobilisiert. Das immobilisiert Konjugat wurde für Ansatz I direkt für die RT-PCR verwendet. Eine Elution des Konjugats vom Harz wurde für die beiden anderen Ansätze mit 500 mM wässriger Imidazol-Lösung (II) oder 0.3 M Natriumacetat-Puffer pH 4 (III) durchgeführt. Das Imidazol-Eluat wurde direkt weiterverwendet und hatte somit in der RT eine Konzentration von 250 mM und in der PCR von 125 mM Imidazol. Das Eluat mit pH 4 wurde zunächst neutralisiert und dann für die RT-PCR weiterverwendet. Abbildung 3.37 zeigt das Ergebnis dieses Experiments bei dem nach 8 und nach 20 Zyklen Aliquote der PCR-Ansätze aufgetragen wurden. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass die RT-PCR in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen von Imidazol überhaupt nicht funktioniert. Bei dieser Art von Elution müsste ein anschließendes Entfernen des Überschusses beispielsweise mittels Gelfiltration (NAP-Säule) erfolgen.

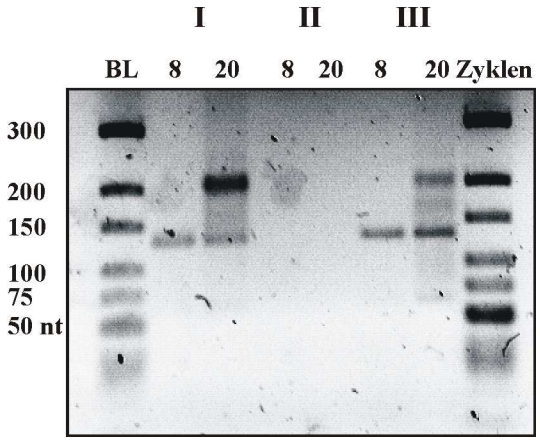


Abbildung 3.37: Immobilisierte vs. eluierte RNA als Matrize für RT-PCR. I: RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat + Ni^{2+}-Sepharose-Harz → immobilisiert, II: RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat mit 500 mM Imidazol vom Harz eluiert, III: RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat mit 0.3 M Na-Acetatpuffer pH 4 vom Harz eluiert; Agarose-Gelanalyse der Ansätze nach 8 und 20 Zyklen. PCR-Produkte: 128 nt (erwünscht) und ca. 200 nt (unspezifisch).

Bei den beiden anderen Ansätzen ist kein wesentlicher Unterschied zwischen immobilisiertem und eluiertem RT-Template in der Ausbeute nach 8 Zyklen zu erkennen. Nach 20 Zyklen zeigt sich erneut das unspezifische PCR-Produkt. Eine Elution der immobilisierten RNA-Sequenzen bei saurem pH und anschließender RT-PCR ist also möglich, allerdings wären Verluste einiger RNA-Sequenzen durch unvollständige Elution wahrscheinlich. Deshalb wurde für alle weiteren RT-PCR Experimente das immobilisierte RNA-Peptid-Konjugat verwendet.

Primer A Konzentration

Da die Ursache des zu langen PCR-Produkts vermutlich in der unspezifischen Hybridisierung und Verlängerung des 5'-Primers (A) liegt, wird im folgenden Experiment dessen Konzentration im PCR-Ansatz variiert. Primer A wurde in Konzentrationen von 0.2 bis 4 µM eingesetzt und die die daraus resultierenden PCR-Produkte nach 8 Zyklen auf einem 2 % Agarose-Gel analysiert (Abb. 3.38 links). Die Gele zeigen nicht eindeutig, ob bei einer Konzentration von 0.2-0.6 µM die Bildung des unspezifischen Produkts ausbleibt. Für diesen Versuch wurde eine Konzentration des RNA-Templates für die RT von 0.1 µM eingesetzt. Für alle weiteren RT-PCR Experimente wurde eine Primer A Konzentration von 4 µM verwendet, da dieser nur einen geringen Einfluss auf die Bildung des Nebenprodukts hat im Vergleich zur Konzentration des RNA-Templates (siehe nächster Absatz). Eventuell wäre eine Verringerung auf 0.6 µM Primer sinnvoll, um eine größere Anzahl von Zyklen durchzuführen zu können und damit die Ausbeute zu steigern.

Konzentration des RNA-Templates

Ein weiterer Grund für die Entstehung des unspezifischen PCR-Produkts könnte die mit steigender Anzahl von Zyklen ebenfalls steigende Produktkonzentration im Reaktionsansatz sein. Eine „Überladung" des PCR-Ansatzes würde dann zusätzlich zur Bildung unerwünschten Verbindungen führen. In Abbildung 3.38 (rechts) wurden deshalb RT-PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an RNA-Template (pmol/20µL Ansatz) getestet. Nach 8 Zyklen ist gut zu erkennen, dass bis zu einer Konzentration von 0.05 µM (1 pmol/20µL) und 4 µM Primer A hauptsächlich das erwünschte PCR-Produkt gebildet wird und erst bei höheren Konzentrationen diese erste Bande zugunsten der verlängerten Sequenz abnimmt. Für alle RT-PCR-

Reaktionen während der *in vitro* Selektion wurden RNA-Template Konzentrationen von maximal 0.05 µM verwendet.

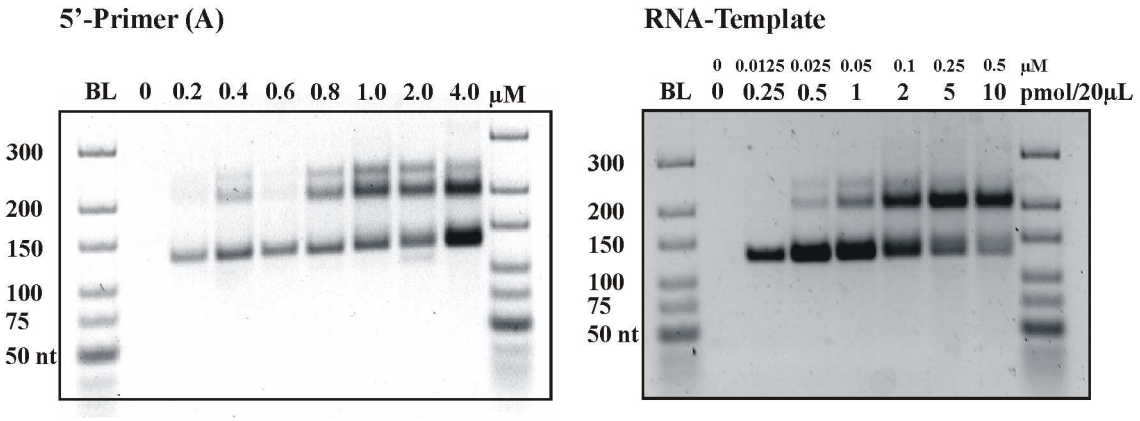


Abbildung 3.38: Optimierung der 5'-Primer Konzentration (links) und der RT-Template Konzentration (rechts).

3.7.2 Durchführung der *in vitro* Selektion

Für die *in vitro* Selektion wurde eine 109-Nukleotide lange DNA-Bibliothek verwendet, die einen zentralen, randomisierten Bereich von 70 Nukleotiden aufweist. Dieser wird zu beiden Seiten von konstanten Primerbereichen flankiert. Die eingesetzte Bibliothek besitzt eine Komplexität von $1.49 \cdot 10^{15}$ verschiedenen Sequenzen, von denen durchschnittlich 2 Kopien, das entspricht einer Stoffmenge von ~ 5 nmol, als Vorlage für die Transkription der ersten Selektionsrunde eingesetzt wurden. Die Ausbeute dieser Transkription betrug nach der Aufreinigung durch Gelelektrophorese und Elution aus dem Gel 29.5 nmol an ^{32}P-markierten RNA-Transkripten. Diese wurden vollständig bei der Konjugation mit dem zweifach markierten Peptid **6** weiter umgesetzt. Aus dem Konjugationsansatz wurde in jeder Runde ein Aliquot entnommen und mit PAGE analysiert, um die Einbaurate des Initiatornukleotids in Kombination mit der Ausbeute der Konjugation zu bestimmen. Aus dem Konjugationsansatz wurde anschließend durch Ethanolfällung der Peptidüberschuss entfernt und das erhaltene Pellet an RNA-Peptid-Konjugaten direkt in der Selektionsreaktion weiterverwendet. Hierfür wird das Konjugat in Selektionspuffer (Na-Phosphat pH 7 30 mM, NaCl 200 mM, KCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, $CaCl_2$ 5 µM, $MnCl_2$ 5 µM) unter Zugabe von 5 % Polyethylenglykol und Erhitzen auf 80 °C für 5 min vollständig gelöst, so dass keine Radioaktivität an den Wänden des Reaktionsgefäßes haften bleibt. Anschließend erfolgten die äquimolare Zugabe des PNA-Aminosäure-Cofaktors **26** sowie eine erneute Denaturierung für 5 min bei 80 °C und anschließendes Abkühlen auf Eis. Die eigentliche Selektionsreaktion wird dann für 2 Stunden bei 20 °C durchgeführt. Nach der Selektionsreaktion wird die Natriumchloridkonzentration der Lösung auf 1 M eingestellt, um elektrostatische Wechselwirkungen des negativ-geladenen RNA-Rückgrats und der Festphase zu vermeiden und somit unspezifisches Binden zu minimieren. Vor der ersten Immobilisierung mit Streptavidin wird zunächst die Radioaktivität der Lösung bestimmt. Dieser Wert wird bei der späteren Auswertung als 100 % der für die Immobilisierung eingesetzten Radioaktivität festgelegt. Die Immobilisierung auf Streptavidin erfolgte einmalig mit einem 10-fachen Überschuss an Harz, das zuvor mit tRNA vorbehandelt wurde, um unspezifische RNA-Bindungsstellen des Harzes zu

sättigen. Anschließend wird der Überstand abfiltriert und das Harz ca. 5 Mal mit Waschpuffer (Tris-HCl 50 mM, Harnstoff 8 M, pH 7.4) gewaschen. Es folgt Messung die Radioaktivität des Harzes und der Waschfraktionen. Dabei wird in jeder Runde der Wert für die Einbaurate/Konjugation und der Anteil, der auf Streptavidin immobilisiert wurde, festgehalten und verglichen (Abb. 3.39 links). Vor der anschließenden Immobilisierung auf Ni^{2+}-Sepharose-Harz werden die Waschfraktionen auf eine Imidazol-Konzentration von 40 mM eingestellt, um mögliches unspezifisches Binden zu minimieren. Alle Waschfraktionen werden nacheinander mit dem ebenfalls tRNA vorbehandelten Ni^{2+}-Sepharose-Harz inkubiert, welches anschließend mit 40 mM wässriger Imidazol-Lösung gewaschen wurde, bis die Radioaktivität in den Waschfraktionen Hindergrundniveau erreicht. Im Anschluss wird das Harz mit Wasser gewaschen, um es für die Reverse Transkription einsetzten zu können. Zuvor wird jedoch die Radioaktivität des Harzes bestimmt. Dieser Wert wird einerseits genutzt um die Menge an RNA-Matrize für die Reverse Transkription zu berechnen und dadurch die Bildung des unspezifischen PCR-Produkts zu verhindern (Abschnitt 3.7.1.2). Andererseits ist dieser Wert das Maß dafür, ob eine Anreicherung von RNA-Spezies im Verlauf der Selektion erfolgt (Abb. 3.39 rechts).

Die Selektion wurde über 10 Runden durchgeführt wobei nur ein minimaler Anstieg der Aktivität von 0.1 % in Runde 1 auf 0.9 % in Runde 10 erfolgte. Um eine genauere Aussage über die Aktivität des „angereicherten“ Pools machen zu können bedarf es weiterer Untersuchungen.

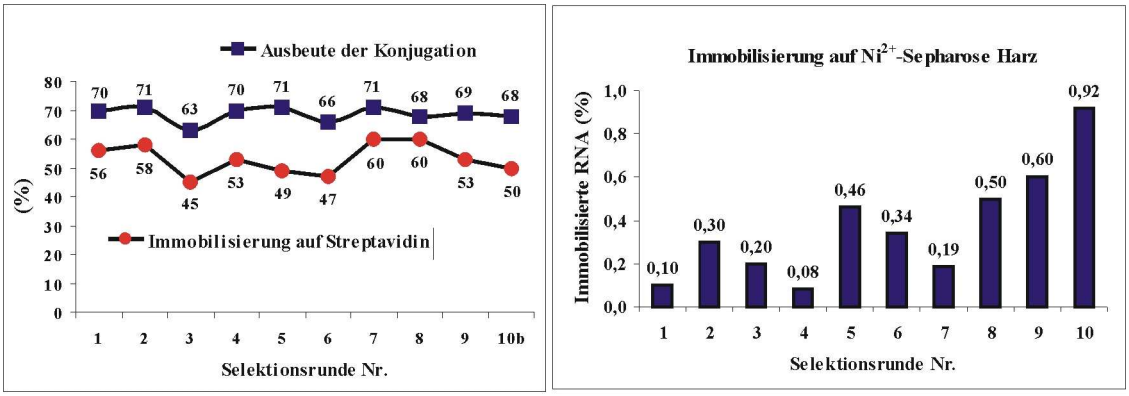


Abbildung 3.39: Links: Graphische Darstellung der Ausbeute für die Konjugationsreaktion parallel zur Immobilisierungsrate auf Streptavidin im Verlauf der Selektion. Rechts: Immobilisierungsrate auf Ni^{2+}-Sepharose im Verlauf der Selektion.

3.7.3 Analytik der Proteaseaktivität der angereicherten Bibliothek

3.7.3.1 Verlängerung der Reaktionszeit während der Selektion

Die Selektion ergab nach 10 Runden einen geringfügig angereicherten RNA-Pool mit einer Immobilisierungsrate von 0.92 % im Vergleich zum Ausgangswert von 0.1 %. Im Folgenden wurde dieser Pool auf eine erhöhte Proteaseaktivität näher untersucht. Zunächst sollte unterschieden werden, ob der erhöhten Immobilisierungsrate die gewünschte katalytische Aktivität oder eine erhöhte spezifische Bindung der RNA an das Ni^{2+}-Sepharose-Harz zugrunde liegen. Hierfür wurde mit dem PCR-Produkt aus Runde 10 erneut eine Selektionsrunde durchgeführt. Im Unterschied zum bisherigen Selektionsprotokoll wurden jedoch bei diesem Versuch Aliquote aus der Selektionsreaktion nach unterschiedlichen Zeiten entnommen, so dass Immobilisierungsraten nach 2 Std., 4 Std., 8 Std. und 24 Std. vorlagen. Für den Fall, dass tatsächlich katalytisch aktive RNA-Spezies im Verlauf der Selektion angereichert wurden, müsste die Menge an immobilisierter RNA über die Zeit zunehmen. Wurden hingegen RNA-Aptamere gegen die Oberfläche des Ni^{2+}-Sepharose-Harzes isoliert, sollte sich die Immobilisierungsrate bei einer verlängerten Reaktionszeit nicht ändern. Um einen Vergleichswert zu weniger bzw. nicht angereicherten RNA-Bibliotheken zu bekommen, wurde das Experiment parallel mit dem PCR-Produkt aus Selektionsrunde 3 durchgeführt. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 3.40 (oben) dargestellt. Es ist ein Anstieg der Immobilisierungsrate über die Zeit für beide RNA-Bibliotheken zu erkennen, allerdings ist dieser für den RNA-Pool aus Runde 10 deutlich stärker ausgeprägt und erreicht einen maximalen Wert von 1.45 %.

Um die Reproduzierbarkeit dieses Anstiegs zu bestätigen, wurde die zeitabhängige Immobilisierung für die RNA-Bibliothek aus Runde 10 in zwei weiteren Ansätzen parallel und mit den gleichen Bedingungen wiederholt (10_1 und 10_2). Diese Ergebnisse (Abb. 3.40 unten) sind jedoch widersprüchlich. Einerseits konnten die bisher höchste Immobilisierungsrate dieser Selektion von bis zu 2.5 % bestimmt werden, andererseits sind diese hohen Werte nicht für alle Messungen reproduzierbar und teilweise können nach 24 Stunden überhaupt keine signifikanten RNA-Mengen mehr auf der Festphase detektiert werden.

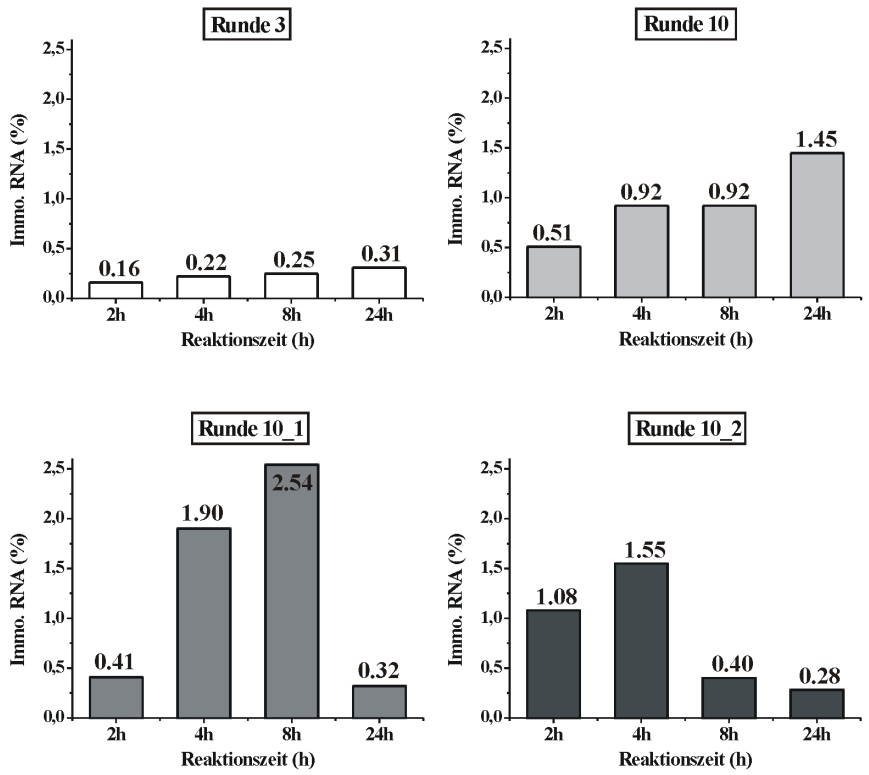


Abbildung 3.40: Verändertes Selektionsprotokoll mit Verlängerung der Reaktionszeit. Oben: Immobilisierungsraten der RNA-Bibliotheken aus Runde 3 und Runde 10 nach 2, 4, 8 und 24 Stunden. Unten: Immobilisierungsraten zweier Wiederholungsexperimente der Runde 10 (10_1 und 10_2) nach 2, 4, 8 und 24 Stunden.

3.7.3.2 DNAzym-Assay

Die Daten, die das im vorherigen Abschnitt beschriebene Immobilisierungsexperiment mit unterschiedlichen Reaktionszeiten ergab, lassen keine eindeutige Aussage über das katalytische Potential der angereicherten RNA-Bibliothek zu. Deshalb soll eine zusätzliche Prüfmethode (Assay) etabliert werden, um vorhandene Proteaseaktivität detektieren und quantitativ bestimmen zu können. Eine leicht zugängliche und mit geringem materiellem Aufwand verbundene Methode ist hierbei eine gelelektrophoretische Auftrennung des Reaktionsansatzes nach der Spaltungsreaktion. Folgende RNA-Spezies können im Reaktionsgemisch enthalten sein und müssen ausreichend gut voneinander getrennt werden:

1. intakte RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugate
2. innerhalb der Peptidsequenz gespaltene RNA_{109mer}-Pep-Konjugate
3. nicht modifizierte oder innerhalb der RNA-Sequenz gespaltene RNA (≤ 109mer).

Der Größenunterschied und somit auch die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität der oben genannten Spezies werden dabei ausschließlich durch die Länge des Peptidanteils mit einem Molekulargewicht des kompletten Peptids von 2850 g/mol bestimmt. Im Verhältnis hierzu besitzen RNA-Moleküle mit einer Länge von 109 Nukleotiden eine durchschnittliche Masse von 36-37 kDa. Somit hat die Länge des Peptids nur einen geringen Einfluss auf die Mobilität und dieser ist für eine Trennung nicht ausreichend. Diese Einschränkung kann jedoch durch eine Verkürzung der RNA-Sequenz im Vorfeld der elektrophoretischen Analyse umgangen werden. Die Spaltung der RNA muss sequenzspezifisch und unter Bildung von Spaltprodukten mit einheitlicher Länge erfolgen, damit bei einer späteren Auftrennung Unterschiede in den Migrationseigenschaften ausschließlich der unterschiedlichen Peptidlänge zugeordnet werden können. Als Ziel für eine Spaltung bieten sich bei einer RNA-Bibliothek nur die konstanten Primerbereiche an. Bei einem Konjugat, bei dem die Kopplung des Peptides am 5'-Ende der RNA erfolgte, kommt deshalb für eine Spaltung, die eine ausreichende Verkürzung der RNA-Sequenz erzielt, nur der 5'-terminalen Bereich in Betracht.
Die von Santoro und Joyce[65] 1997 durch *in vitro* Selektion gewonnenen DNAzyme 10-23 und 8-17 stellen ein exzellentes Werkzeug für eine sequenzspezifische RNA-Spaltung dar (Abb. 3.41 A). Das 10-23 DNAzym besteht aus einem konservierten, ungepaarten Motiv (15 Basen), das die katalytische Domäne des DNAzyms formt. Diese wird von zwei variablen Bindungsdomänen flankiert. Das 10-23 DNAzym ist in der Lage, Purin-Pyrimidin Bindungen mit unterschiedlicher Effektivität zu spalten: AU = GU ≥ GC >> AC. Das 8-17 DNAzym besteht aus einem katalytischen Motiv mit 12 Basen und die Spaltung erfordert eine AG-Bindung in welcher Adenin ungepaart bleibt und Guanin ein Wobble-Paar bildet[160]. Als Bindungsdomänen wurden für beide DNAzyme 7 bis 10 Nukleotide zu beiden Seiten der Spaltungsstelle komplementär zum 5'-termnialen Primerbereich der RNA gewählt (Abb. 3.41 B und C). Um die Spaltungseffizient des 10-23 DNAzyms für eine GC-Bindung zu erhöhen, wurde das Guanosin, das direkt an der Spaltungsstelle mit dem Cytidin eine Basenpaarung eingeht, gegen ein Inosin[160] ausgetauscht (Abb. 3.41 B).

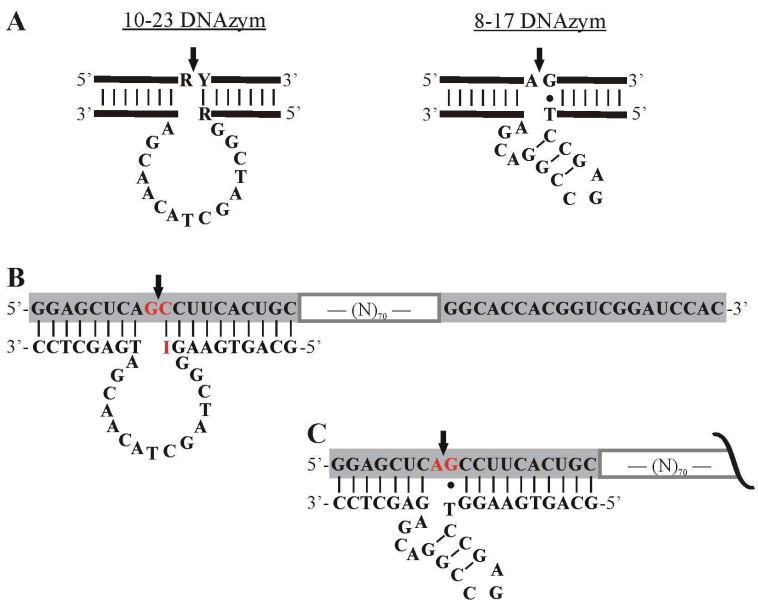


Abbildung 3.41: A: Allgemeine Darstellung der DNAzyme 10-23 und 8-17 [65]. DNAzym-Design für eine Spaltung im 5'-terminalen Bereich der RNA_{109mer}-Bibliothek: 10-23 DNAzym (B) und 8-17 DNAzym (C).

Die Spaltung selbst erfolgt durch wiederholtes Denaturieren und Anlagern des DNAzyms an die Ziel-RNA. Hierbei wird zunächst für 30 Sekunden auf 85 °C erhitzt, anschließend auf 37 °C abgekühlt (0.5 °C/s) und die Temperatur für 3 Minuten gehalten. Durch erneutes Erhitzen auf 85 °C beginnt der nächste Zyklus. In einem ersten Experiment wurde die Anzahl der Zyklen für beide DNAzyme optimiert, wobei die Aldehyd-modifizierte RNA_{109mer} als Substrat eingesetzt wurde. Der Versuch wurde parallel für 7, 20, 40 und 60 Zyklen durchgeführt und die Proben im Anschluss mittels 20 % PAGE analysiert (Abb. 3.42 links). Die erwarteten Spaltprodukte sind für das 10-23 DNAzym ein 100mer und ein 9mer und für das 8-17 DNAzym ein 101mer und ein 8mer. Bei Betrachtung des Gels ist jedoch auffällig, dass jeweils zwei kurze Spaltprodukte gebildet werden. Dies lässt sich durch die Verwendung des Initiatornukleotids **10** bei der Transkription der zu spaltenden RNA erklären. Die untere Bande entspricht dabei jeweils dem 8- bzw. 9mer ohne Einbau des Initiatornukleotids und die darüber laufende Bande dem Aldehyd-modifizierten 8*- bzw. 9*mer. Zwei Beobachtungen bekräftigen diese Theorie: zum einen entspricht das Verhältnis von 8mer/8*mer und 9mer/9*mer der typischen Einbaurate des Initiatornukleotids von ca. 70%. Zum anderen verschwindet die obere Bande nach der Konjugation mit einem Peptid nahezu vollständig. Mit steigender Anzahl der Zyklen nehmen die Intensitäten der Substrat-RNA_{109mer} ab und die Bildung der Spaltprodukte nimmt deutlich erkennbar

zu. Das 10-23 DNAzym weist dabei im Vergleich zum 8-17 DNAzym eine bessere Spaltungseffektivität auf. Nicht zu übersehen ist allerdings auch für beide DNAzyme die stärker werdende Degradation der RNA, bedingt durch das wiederholte Erhitzen. Der Abbau der RNA ist mit einem stärkeren Schmieren der Banden und einer höheren Hintergrund-Radioaktivität verbunden. Letztere könnte bei der Detektion und Quantifizierung des Spaltprodukts aktiver RNA-Sequenzen erheblich stören.

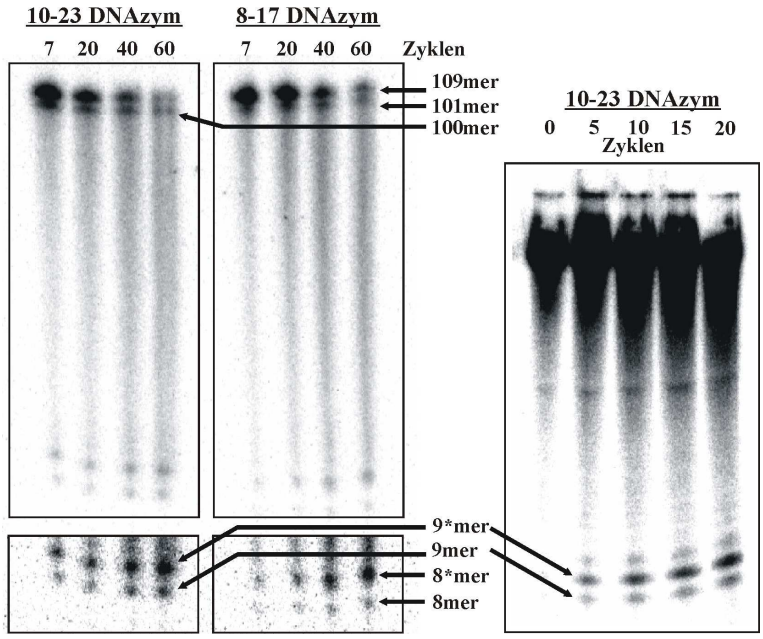


Abbildung 3.42: Links: Optimierung der Zyklenanzahl für DNAzym 10-23 und 8-17. Es wurden mit beiden DNAzymen parallel 7, 20, 40 und 60 Zyklen durchgeführt und Spaltungsprodukte mit 20% PAGE analysiert. Rechts: weitere Optimierung der Zyklenanzahl für 10-23: Proben wurden nach 0, 5, 10, 15 und 20 Zyklen analysiert. DNAzym-Substrat: RNA_{109mer} aus Transkription mit Initiatornukleotid **10**; Spaltprodukte für 10-23: 100mer, 9mer und 9*mer; Spaltprodukte für 8-17: 101mer, 8mer und 8*mer. (* Auftrennung kurzer Spaltprodukte in Oligomere mit Initiatornukleotid).

Aufgrund der effektiveren Spaltung sollen für die spätere Prüfmethode das 10-23 DNAzym und eine geringere Anzahl an Zyklen verwendet werden. Hierfür wurden erneut verschiedene Anzahlen an Zyklen zwischen 0 und 20 für das 10-23 DNAzym getestet (Abb. 3.42 rechts). Als Ergebnis dieses Experiments ist festzuhalten, dass nach 20 Zyklen eine maximale Bildung des Spaltprodukts bei noch vertretbarer Degradation der RNA erreicht ist.

Die Untersuchung der angereicherten RNA-Bibliothek aus der 10. Selektionsrunde erfolgt im Vergleich zur Aktivität des Pools aus Runde 1. Hierfür wurde das Selektionsprotokoll parallel für beide Bibliotheken bis zur Selektionsreaktion

durchgeführt und eine Reaktionszeit von 8 Stunden gewählt. Im Anschluss erfolgte die DNAzym-Spaltung über eine Dauer von 20 Zyklen mit anschließender Ethanolfällung. Das 20 % Polyacrylamid-Gel wurde über eine Strecke von 40 cm entwickelt und anschließend mittels Radioaktivitäts-Scan analysiert. Als Kontrollen wurden ebenfalls nach DNAzym-Spaltung RNA_{109mer}, RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat und als Positivkontrolle RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat nach Trypsinverdau (siehe Abschnitt 3.6.1.2) aufgetragen. In Abbildung 3.43 sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt. Links sind die Kontrollen wiedergegeben. Alle drei Spaltprodukte, für die nicht konjugierte RNA (9mer und 9*mer), das Konjugat (9*mer-Peptid) und das durch Trypsin gespaltene Konjugat (9*mer-Pep) sind erkennbar (Bahnen 2-4). Für den Vergleich der beiden Bibliotheken R1 und R10 (rechts) sind nur die Banden für das 9mer, 9*mer und 9*mer-Peptid zu erkennen. Im Bereich des gespaltenen Peptids zeichnet sich in der erhöhten Hintergrund-Radioaktivität keine definierte Bande ab. Die Radioaktivität in diesem Bereich beträgt im Verhältnis zur Radioaktivität der gesamten Spur für beide Bibliotheken (Runde 1 und Runde 10) 2 %, so dass keine erhöhte Aktivität des angereicherten Pool nachgewiesen werden konnte.

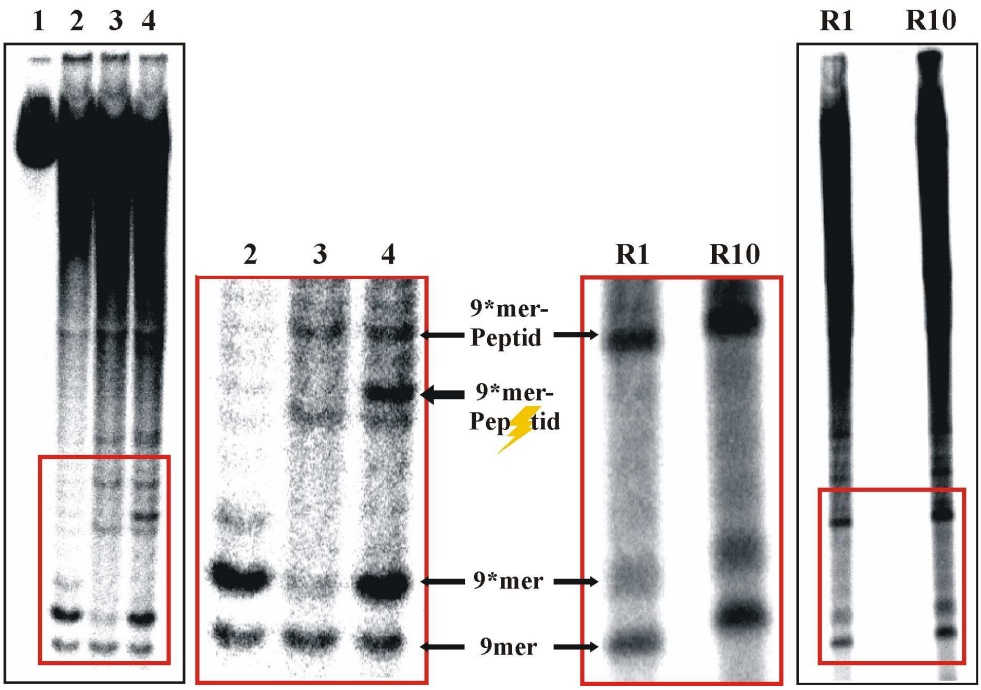


Abbildung 3.43: Links: Kontrollen für DNAzym-Assay. 1: RNA_{109mer} ohne DNAzym-Spaltung, 2: RNA_{109mer} mit DNAzym-Spaltung, 3: RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat mit DNAzym-Spaltung, 4: Trypsinverdau des RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugats mit DNAzym-Spaltung. Rechts: R1: DNAzym-Assay für RNA-Pool aus Runde 1, R10: DNAzym-Assay für RNA-Pool aus Runde 10.

3.7.4 Erkenntnisse der ersten Durchführung

Im Vorfeld der *in vitro* Selektion wurden bei der Durchführung von Testrunden keine zufrieden stellenden Immobilisierungsraten weder auf Streptavidin noch auf Ni^{2+}-Sepharose erreicht. Für das Streptavidin-Agarose-Harz wurden Immobilisierungsraten von ca. 40 % beobachtet, was im Vergleich zu Konjugationsraten von durchschnittlich 70 % überraschend wenig ist. Dagegen wurden im darauf folgenden Schritt auf Ni^{2+}-Sepharose-Harz relativ hohe Immobilisierungsraten von bis zu 7 % erzielt, wo eigentlich nur Hintergrundwerte zu erwarten sind. Um während der Selektion eine möglichst quantitative Bindung der nicht aktiven Sequenzen auf Streptavidin zu erreichen, wurde der Ansatz der Selektionsreaktion vor der Immobilisierung auf 1 M Natriumchlorid eingestellt. Die Zugabe hoher Konzentrationen monovalenter Salze verhindert unspezifische Wechselwirkungen des negativ-geladenen RNA-Rückgrates mit der Oberfläche der Festphase. Um bei der Immobilisierung auf Ni^{2+}-Sepharose unspezifische Bindung von RNA-Sequenzen weitgehend zu minimieren, wurden das Filtrat des Selektionsansatzes sowie die Waschfraktionen vom Streptavidin-Harz vor der Immobilisierung auf eine erhöhte Imidazol-Konzentration von 40 mM eingestellt.
Aufgrund dieser Anpassungen konnten während der Selektion zufrieden stellende Immobilisierungsraten von 55-60 % auf Streptavidin-Harz und 0.1 % auf Ni^{2+}-Sepharose erreicht werden (siehe Abschnitt 3.7.2).

Im Verlauf der Selektion erfolgte jedoch nur ein sehr geringer Anstieg der Immobilisierungsrate auf Ni^{2+}-Sepharose und somit keine Anreicherung aktiver RNA-Sequenzen in der Bibliothek. Gelelektrophoretische Untersuchungen der Waschfraktionen beider Immobilisierungsschritte zeigten, dass in beiden Fällen RNA-Peptid-Konjugat in nachweisbaren Mengen vorhanden war. Dies erforderte eine weitere Optimierung des jeweiligen Immobilisierungs- und Waschprotokolls.

3.7.4.1 Immobilisierung auf Streptavidin-Agarose

Eine unvollständige Bindung der Biotin-markierten, nicht aktiven RNA-Peptid-Konjugate auf Streptavidin-Harz kann im Anschluss an die Immobilisierung zu falschen Immobilisierungsraten auf Ni^{2+}-Sepharose führen. Um zu überprüfen, ob der während der Selektion verwendete 10-fache Überschuss an Streptavidin ausreichend ist, wurden Immobilisierungen des RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugats mit 10-fachem und 100-fachem Streptavidin-Überschuss durchgeführt und die erhaltenen Waschfraktionen mittels 12 % PAGE analysiert (Abb. 3.44). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass in beiden Fällen nach der Inkubation im Filtrat (F) des Selektionsansatzes ausschließlich nicht modifizierte RNA_{109mer} enthalten ist. Bei Betrachtung der ersten Waschfraktion (W1) allerdings konnte bei 10-fachem Überschuss ein Teil des Konjugats wieder vom Harz gewaschen werden, welches in den Waschfraktionen des 100-fachen Überschuss nur in Spuren wieder zu finden ist.

Für eine Verbesserung des Selektionsprotokolls sollte deshalb ein größerer Überschuss an Streptavidin-Harz verwendet werden oder eine zweite Immobilisierung mit frischem Harz erfolgen.

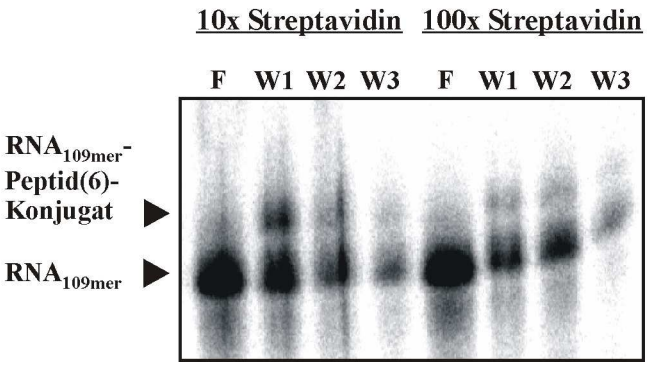


Abbildung 3.44: Immobilisierung auf Streptavidin-Agarose-Harz mit 10-fachem Überschuss (links) und 100-fachem Überschuss (rechts). Es wurde der nicht aufgereinigte Konjugationsansatz immobilisiert. RNA_{109mer} und RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat sind enthalten. F: Filtrat der Inkubationslösung, W1-3: Waschfraktionen 1-3 mit denaturierendem Waschpuffer (Tris-HCl 50 mM, Harnstoff 8 M, pH 7.4).

3.7.4.2 Immobilisierung auf Ni^{2+}-Sepharose

Während der Durchführung der Selektion konnten in den späteren Selektionsrunden nach der ersten Inkubation des Ni^{2+}-Harzes mit dem Filtrat des Selektionsansatzes (1 M NaCl, 40 mM Imidazol, aus der Immobilisierung auf Streptavidin) größere Mengen an Radioaktivität immobilisiert werden. Diese wurden jedoch bei der anschließenden, mehrfachen Inkubation mit den Waschfraktionen (8 M Harnstoff, 40 mM Imidazol) wieder vom Harz gewaschen. Die Vermutung liegt nahe, dass die Waschbedingungen zu harsch gewählt wurden, so dass die Wechselwirkungen zwischen den Nickel-Ionen und dem His_6-Marker gestört werden. Im Folgenden wurden deshalb die Einflüsse verschiedener Imidazol-Konzentrationen untersucht. Hierfür wurde das RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat direkt auf Ni^{2+}-Sepharose immobilisiert, das Harz anschließend mit den entsprechenden Imidazol-Konzentrationen gewaschen und durch die Bestimmung der Radioaktivität des Harzes die Immobilisierungsraten berechnet und vergleichen. Die erzielte Immobilisierungsrate für die Waschlösung ohne Zusatz an Imidazol oder Harnstoff wurde als maximal erreichbarer Wert angenommen und auf 100 % gesetzt.
An den Immobilisierungsraten (Abb. 3.45) ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender Imidazol-Konzentration zunehmend Konjugat vom Harz gewaschen wird und die Immobilisierungsrate sinkt. Dabei werden nur sehr geringe Konzentrationen von 5 mM bis maximal 10 mM ohne größere Verluste toleriert. Unter den Bedingungen, die bei die Selektion angewendet wurden (40 mM Imidazol + Harnstoff), verbleiben lediglich 16 % der maximal möglichen Menge an Konjugat auf dem Harz.

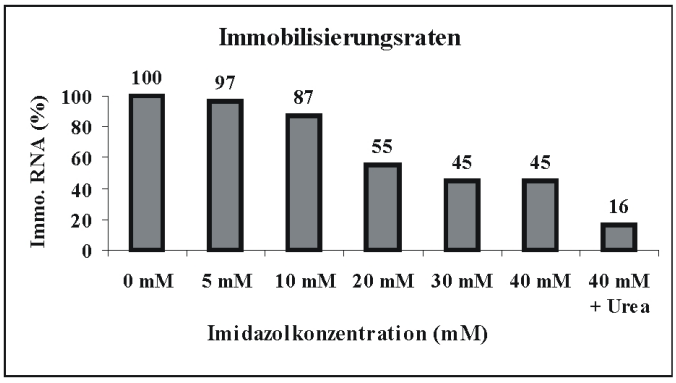


Abbildung 3.45: Immobilisierungsraten auf Ni^{2+}-Sepharose-Harz und anschließendes Waschen mit wässrigen Lösungen unterschiedlicher Imidazol-Konzentration.

3.7.4.3 Verbessertes Immobilisierungsprotokoll

Aufgrund der gewonnen Erkenntnisse über die Vorgänge während der Immobilisierung wurde ein verbessertes Protokoll mit optimierten Bedingungen entworfen und dieses in verschiedenen Immobilisierungsexperimenten überprüft. Die folgenden Änderungen wurden im neuen Protokoll berücksichtigt:

1. Die Immobilisierung auf Streptavidin erfolgt bei 10-fachem Überschuss, wird jedoch ein zweites Mal mit frischem Harz wiederholt.
2. Das aus der ersten Immobilisierung erhaltene Filtrat des Selektionsansatzes sowie die Waschfraktionen werden mit Ethanol gefällt, um den größten Teil des Harnstoffs zu entfernen. Das resultierende Pellet wird gewaschen und für die Immobilisierung auf Ni^{2+}-Sepharose weiterverwendet.
3. Das Pellet wird in Phosphat-Puffer pH 7.5 (20 mM Na-Phosphat, 0.5 M NaCl, 5 mM Imidazol) gelöst. Dieser wird auch für die Inkubation und das anschließende Waschen des Ni^{2+}-Sepharose-Harzes verwendet.
4. Das Waschen des Ni^{2+}-Sepharose-Harzes erfolgt zunächst 20 x mit 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7.5, der 0.5 M NaCl und 5 mM Imidazol enthält und abschließend 5 x mit Wasser.

Zur Überprüfung des verbesserten Protokolls wurden vier Immobilisierungsexperimente (Abb. 3.46 A-D) mit den folgenden, unterschiedlichen Zielsetzungen durchgeführt. Zunächst wurde nicht konjugierte RNA_{109mer} direkt auf Ni^{2+}-Sepharose immobilisiert (A). Da kein His_6-Marker vorhanden ist sollte die komplette RNA bzw. eingesetzte Radioaktivität in den Waschfraktionen zu finden und nichts auf dem Harz verblieben sein. Ziel dieses Experimentes war die Bestimmung der unspezifischen RNA-Bindung auf Ni^{2+}-Sepharose unter den Bedingungen der Selektion. In einem zweiten Ansatz wurde der nicht aufgereinigte Konjugationsansatz direkt auf Ni^{2+}-Sepharose immobilisiert (B). Dieser enthält sowohl RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat als auch nicht konjugierte RNA_{109mer}. Ziel dieses Versuches war die Bestimmung der maximalen Immobilisierungsrate des Konjugationsansatzes, gleichbedeutend mit der Ausbeute an Konjugat aus der Kopplungsreaktion. Im dritten Experiment (C) wurde der nicht

aufgereinigte Konjugationsansatz zunächst zweimal auf Streptavidin immobilisiert und im Anschluss das gefällte Filtrat sowie die gefällten Waschfraktionen mit Ni^{2+}-Sepharose inkubiert. Als Ergebnis ist zu erwarten, dass das komplette Konjugat auf der Streptavidin Festphase verbleibt. Ziel dieses Versuches war deshalb die Bestimmung der maximalen Immobilisierungsrate des Konjugationsansatzes auf Streptavidin sowie das Ausmaß der unspezifischen Bindung auf Ni^{2+}-Sepharose. In einem letzten Versuch (D) erfolgte zunächst wieder die zweifache Immobilisierung auf Streptavidin mit anschließender Inkubation mit Ni^{2+}-Sepharose. Dieses Mal wurde jedoch dem Konjugationsansatz ein Teil des Konjugationsansatzes, der zuvor mit Trypsin verdaut wurde, zugemischt. In der Lösung sind somit nicht modifizierte RNA_{109mer}, intaktes RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat mit Biotin-Marker und verdautes RNA_{109mer}-Pep-Konjugat mit His_6-Marker enthalten. Die Zielsetzung dieses Experiments war die spezifische Wiederfindung der einzelnen Komponenten in den Waschfraktionen, auf Streptavidin oder Ni^{2+}-Sepharose.

Im ersten Experiment (A) konnte wie erwartet gezeigt werden, dass unter den Versuchsbedingungen des verbesserten Protokolls nicht modifizierte RNA eine vernachlässigbare, unspezifische Bindung von 0.04 % mit dem Ni^{2+}-Sepharose-Harz aufweist. Die eingesetzte Radioaktivität konnte vollständig in den Waschfraktionen (WF) wieder gefunden werden. Im zweiten Versuch (B) wurde eine maximale Immobilisierungsrate des RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugats aus dem nicht aufgereinigten Reaktionsansatz von 50 % ermittelt werden. Auffallend dabei ist, dass für den gleichen Konjugationsansatz auf Streptavidin in den beiden anderen Versuchen (C + D) Immobilisierungsraten von > 60 % erreicht werden konnten. Im Anschluss an die Immobilisierung mit Streptavidin konnte im dritten Versuch (C) eine unspezifische Immobilisierung auf Ni^{2+}-Sepharose von 0.7 % gemessen werden. Im letzten Versuch (D) wurde dem bisher verwendeten Konjugationsansatz mit einer Radioaktivität von 220000 cpm (counts per minute) ein Aliquot des Konjugationsansatzes, das zuvor mit Trypsin verdaut wurde, von ca. 24 000 cpm zugemischt. Somit sind in der Mischung, die für die Immobilisierung eingesetzt wurde, aufgrund der durchschnittlichen Konjugationsraten von 60-70 %, ca. 6-7 % gespaltenes Konjugat enthalten, das keine Biotin-Gruppe sondern nur noch einen His_6-Marker trägt. Eine spezifische Immobilisierung der His_6-markierten Verbindung müsste folglich eine Immobilisierungsrate von ca. 6-7 % auf Ni^{2+}-Sepharose ergeben. Wenn dabei die

ermittelte, maximale Immobilisierungsrate von 50 % des Konjugationsansatzes (aus Versuch B) miteinbezogen wird, dann spiegelt der gefundene Wert von 5.5 % annähernd die zu erwartende Immobilisierung wider.

Die gewonnenen Daten konnten somit die Effektivität des verbesserten Immobilisierungsprotokolls belegen, welches einen guten Kompromiss darstellt, wenn einerseits eine unspezifische Bindung vermieden werden soll und andererseits aktive RNA-Sequenzen nicht von der Festphase gewaschen werden sollen.

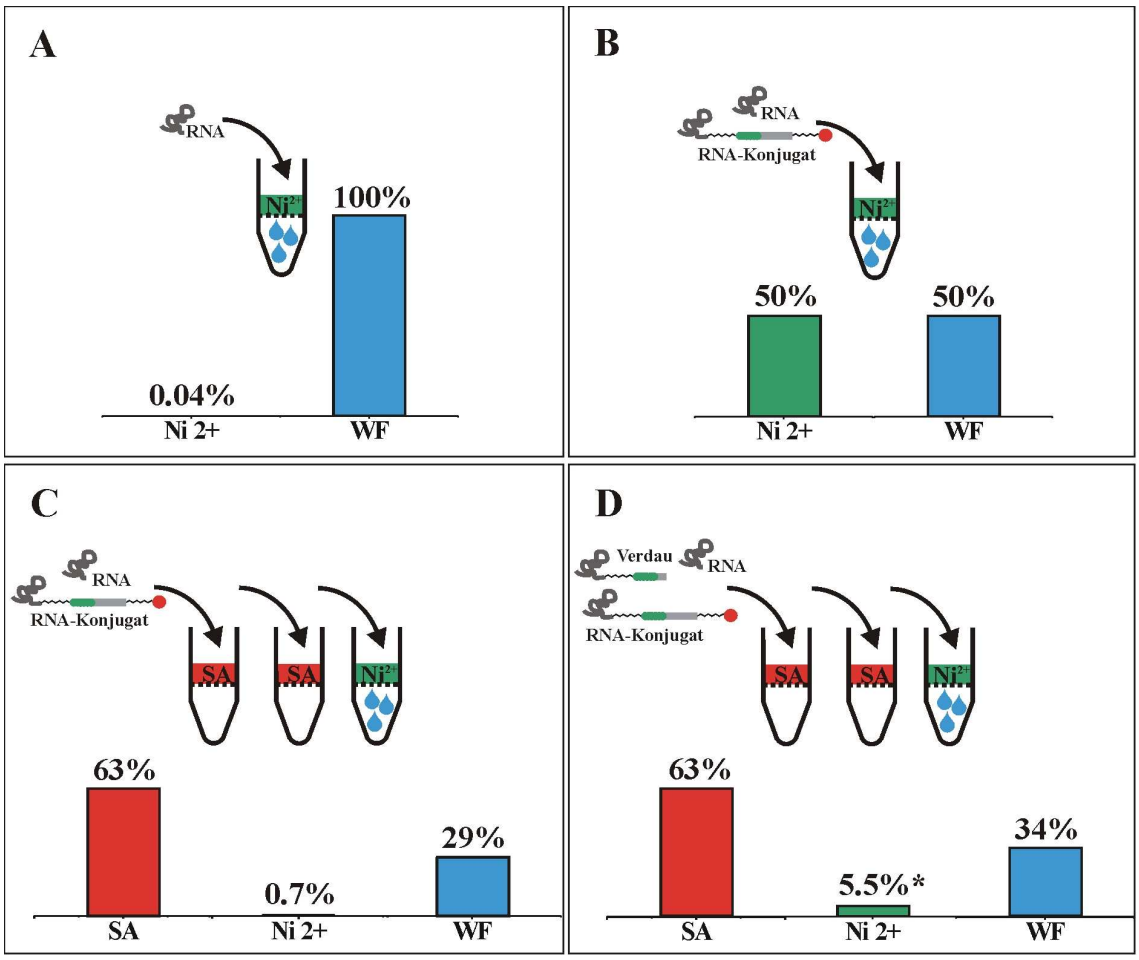


Abbildung 3.46: Immobilisierungsexperimente mit verbessertem Protokoll. A: RNA_{109mer} direkt auf Ni^{2+}-Sepharose-Harz (Ni^{2+}), unspezifische Bindung der RNA 0.04 %; B: Konjugationsansatz mit RNA_{109mer} und RNA_{109mer}-Peptid(**6**)-Konjugat direkt auf Ni^{2+}-Sepharose, max. Immobilisierung des Konjugats 50 %; C: gleiche Zusammensetzung wie B aber zweifache Immobilisierung auf Streptavidin (SA), anschließend Ni^{2+}-Sepharose, max. Immobilisierung des Konjugats auf SA 63 %, unspezifisches Binden des Konjugats auf Ni^{2+} 0.7 %; D: gleiches Experiment wie C plus Zugabe von 10% Trypsin-verdautem Konjugationsansatz, max. Immobilisierung auf SA 63 %, Immobilisierung auf Ni^{2+} 5.5 %*. (* wenn die max. Immobilisierungsrate auf Ni^{2+} von 50 % als Korrekturfaktor mit einbezogen wird, erhält man 11 % für die spezifische Immobilisierung auf Ni^{2+}). WF = Waschfraktionen.

4 Diskussion und Ausblick

Seit der Entdeckung der katalytischen Aktivität durch Nukleinsäuren wurden zahlreiche neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet gesammelt. Die erzielten Fortschritte beziehen sich dabei sowohl auf den Bereich der natürlichen Ribozyme als auch auf die erfolgreiche Anwendung von *in vitro* Selektionsmethoden. Die Fülle der kollektivierten Daten erlaubt detaillierte Einblicke in die wesentlichen Aspekte der Nukleinsäure-Katalyse. Das umfassende Repertoire der durch RNA oder DNA katalysierten Reaktionen lässt uns das katalytische Potential dieser Biopolymere erahnen. Die Realisierung der räumlichen Darstellung katalytisch aktiver Spezies in Kristallstrukturen ermöglichte genauere Untersuchungen der mechanistischen Prinzipien, die hinter der RNA-Katalyse stehen. Dabei konnte einerseits nachgewiesen werden, dass die RNA selbst in der Lage ist, die benötigten und reaktiven Funktionen für die Katalyse bereitzustellen. Andererseits wurde in zahlreichen Fällen auch gezeigt, dass Nukleinsäuren sich divalenter Metallionen oder anderer Cofaktoren bedienen können, die sie in ihre räumliche Struktur miteinbeziehen.

Die umfangreichen Untersuchungen auf dem Gebiet der Ribozyme geben jedoch keinerlei Anhaltspunkte über eine mögliche proteolytische Aktivität von Nukleinsäuren. Dabei stellt die Spaltung von Peptidbindungen ein sowohl anspruchvolles als auch interessantes Traget dar. Dies spiegelt sich auch in der intensiven, aber bisher nur mäßig erfolgreichen Suche nach künstlichen Proteasen als Alternative zu Enzymen wider, die in der Synthese oder zu therapeutischen Zwecken zur Anwendung kommen könnten.
Ribozyme mit Proteaseaktivität würden das Repertoire katalytisch aktiver Nukleinsäuren enorm bereichern und ihr Potential bedeutend erhöhen, denn die Spaltung einer Peptidbindung ist aufgrund ihrer Stabilität eine nicht einfach zu lösende Aufgabe. Proteolytische Enzyme bedienen sich hierbei komplexer katalytischer Systeme, die ein Zusammenspiel mehrerer Aminosäuren, beispielsweise in Form einer katalytischen Triade, oder das Miteinbeziehen divalenter Metallionen, beispielsweise in Metalloproteasen, beinhalten.
Aus evolutionärer Sicht bietet sich ein weiterer interessanter Aspekt der Proteolyse als Peptid-prozessierende Reaktion. Unter der Annahme, dass die Hypothese der RNA-

Welt zutrifft und damit vor der Evolution von Proteinen katalytische Aktivität hauptsächlich durch RNA realisiert wurde, würde die Spaltung von Peptiden insbesondere während des Übergangs der RNA-Welt in Protein/DNA-dominierte Lebensformen eine wichtige Rolle einnehmen. Des Weiteren liegt die Vermutung nahe, dass in einer „späten“ RNA-Welt, in der komplexere, RNA-basierte katalytische Systeme bestanden, die Verwendung von Cofaktoren bei der Erweiterung katalytischer Potentiale einen entscheidenden evolutionären Vorteil gebracht haben.

Vor diesem Hintergrund ist die *in vitro* Selektion von Ribozymen mit Proteaseaktivität unter Verwendung eines Aminosäure-basierten Cofaktors eine zugleich faszinierende, aber auch anspruchsvolle Aufgabe, für deren Gelingen eine aufwendige und durchdachte Vorarbeit nötig ist. Eine erfolgreiche Durchführung der Selektion würde einerseits eine neue Klasse künstlicher Proteasen eröffnen sowie andererseits bedeutende neue Erkenntnisse über das Potential und die katalytischen Mechanismen von Ribozymen liefern.

4.1 Die Selektionsstrategie

Die *in vitro* Selektionsstrategie, die in dieser Arbeit etabliert wurde, stellt eine Modifikation bereits bekannter Strategien dar, die eine Generierung von Ribozymen mit Proteaseaktivität ermöglichen soll. Sie beruht auf dem Prinzip der Selektion mit Linker-gekoppelten Substraten. Diese erlaubt eine freie Wahl der Reaktanten oder Substrate, die bei der Selektion zu Einsatz kommen. Sie werden über inerte und flexible Linker mit der RNA als Katalysator verbunden. Im Gegensatz zu den (meisten) anderen *in vitro* Selektionen, die bisher in diesem Arbeitskreis durchgeführt wurden, ist die hier zu katalysierende Reaktion keine Knüpfungen neuer Bindungen zwischen zwei Reaktanten, sondern die Spaltung einer Peptidbindung. Dies bringt zwei Aspekte mit sich, die diese Selektion zusätzlich erschweren. Zum einen ist eine Peptidbindung mit einer Halbwertszeit von mehreren hundert Jahren äußerst stabil und zum anderen wurde schon mehrfach anhand natürlicher und künstlicher Ribozyme gezeigt, dass RNA am effektivsten sich selbst spaltet. Die Herausforderung wird somit sein, keine Ribozyme mit RNase-Aktivität zu selektieren, sondern solche, die in der Lage sind, die sehr viel stabilere Peptidbindung zu spalten.

4.1.1 Besonderheiten

Um eine kovalente Kopplung von RNA-Bibliothek und Reaktant bzw. Substrat über einen flexiblen Linker realisieren zu können, wurden bisher in unserer Arbeitsgruppe hauptsächlich zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen ist eine enzymatische Ligation modifizierter Dinukleotide am 3'-Ende der RNA möglich. Die Dinukleotide werden hierfür mittels Festphasen-Chemie synthetisiert und im gebundenen Zustand mit dem entsprechenden Linker und Reaktanten modifiziert. Im hier vorliegenden Fall wäre eine aufwendige Modifizierung des Dinukleotids mit dem multifunktionellen Peptidsubstrat erforderlich gewesen, was sich durch die Inkompatibilität der beiden unterschiedlichen Konzepte der Peptid- und DNA/RNA-Festphasensynthese als schwierig gestalten würde. Eine Alternative zur Ligation am 3'-Ende ist die Verwendung von Initiatornukleotiden. Diese Strategie ermöglicht während der ohnehin erforderlichen Transkription die Modifizierung der RNA am 5'-Ende mit Einbauraten von bis zu 95 % [135]. Hierfür wurde ein neues Initiatornukleotid [133] **10** synthetisiert und charakterisiert, welches erstmals die direkte Modifikation der RNA mit einer Acetal-geschützten Aldehydfunktion ermöglicht. Dabei sind zwei unterschiedliche Syntheserouten (A und B) angewendet worden, die beide ähnliche Ausbeuten von 10-17 % liefern. Allerdings ist bei Syntheseweg B der Einsatz kostengünstiger Edukte von Vorteil. Für dieses spezielle Initiatornukleotid **10** wurden Einbauraten von durchschnittlich 70-75 % während der Transkription erzielt. Die Durchführung verschiedener Modellreaktionen ergab quantitative Kopplungsausbeuten für die Umsetzung des Initiatornukleotids mit Hydrazinen oder Hydraziden. Die Konjugation mit Aminen ergab unter reduktiven Bedingungen Ausbeuten von ca. 30 %. Deshalb wurde für die Konjugationsreaktion während der Selektion ein Hydrazin-modifiziertes Peptidsubstrat verwendet.

Bei der Selektion kommt das multifunktionelle Peptidsubstrat **6** zur Anwendung, welches komplett in einem Ansatz durch Festphasen-Peptidsynthese hergestellt werden kann. Es weist die folgenden funktionellen Einheiten auf:

1. Die eigentliche Substratsequenz Gly-Pro-Arg-Gly-Phe, die während der Selektion durch die RNA gespalten werden soll. Beim Design des Substrats haben wir uns an der Substratspezifität der Serinprotease Trypsin orientiert, die Peptidbindungen nach Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten, wie Arginin oder Lysin, spaltet.

2. Die Substratsequenz wird zu beiden Seiten von inerten Polyethylenglykol-Linkern flankiert. Diese ermöglichen eine flexible Verknüpfung des Substrats einerseits mit der RNA (N-terminal) und andererseits mit dem Affinitätsmarker Biotin (C-terminal).

3. Am N-Terminus des Substrats wird der Linker mit einer funktionellen Gruppe modifiziert, die durch Reaktion mit der Aldehyd-Funktion der RNA eine Kopplung von Substrat und Katalysator ermöglicht. Aufgrund der quantitativen Umsetzung des Initiatornukleotids mit Hydrazinen in den Modellreaktionen wird N-terminal Hydrazin-Nikotinsäure eingeführt.

4. Der Affinitätsmarker Biotin wurde am C-Terminus des Peptidsubstrats in Form eines Biotin-modifizierten Lysins eingeführt. Er ermöglicht das Entfernen nicht aktiver RNA-Sequenzen aus dem Pool, da alle RNA-Spezies, die nicht in der Lage sind, das Peptid zu spalten, ein Biotin aufweisen.

5. Zwischen RNA und dem Peptidsubstrat wird ein weiterer Affinitätsmarker, ein so genannter His_6-Marker eingebaut. Diese Sequenz aus sechs aufeinander folgenden Histidinresten ermöglicht eine Isolierung durch Komplexierung Festphasen-gebundener Ni^{2+}-Ionen. Dieser zusätzliche Affinitätsmarker ist erforderlich um verschiedene RNA-Spezies, die keinen Biotin-Marker aufweisen, von einander unterscheiden zu können. Es handelt sich dabei um RNA-Sequenzen, die bei der Konjugation nicht mit dem Peptid modifiziert wurden. Des Weiteren RNA-Sequenzen, die durch Selbstspaltung innerhalb der RNA-Sequenz das Peptid entfernt haben und eben die proteolytisch aktiven RNA-Sequenzen, die das Peptid gespalten haben. Nur Letztere besitzen noch das His_6-tag als zweiten Affinitätsmarker und können aufgrund dessen spezifisch aus dem Pool isoliert werden.

Für die Konjugation der RNA-Bibliothek mit dem multifunktionellen Peptidsubstrat im Anschluss an die Transkription wurden verschiedene Kopplungsstrategien ausgetestet.

Am 3'-Ende der RNA kann durch gezielte Periodatoxidation der vizinalen Alkohole der terminalen Ribose eine Dialdehyd-Funktion quantitativ eingeführt werden. Diese erlaubt eine Konjugation mit Aminen oder Hydrazinen unter Bildung einer Schiff'schen Base. Die Umsetzung mit dem Amino-funktionalisierten Peptid **1** ergab nur in Spuren das gewünschte Produkt, wohingegen eine Kopplung mit dem Hydrazin-modifizierten Peptid **2** eine vollständige Umsetzung verschiedener RNA-Sequenzen gelang. Allerdings zeigte sich in späteren Immobilisierungsexperimenten, dass die auf diese Weise gewonnenen RNA-Peptid(**2**)-Konjugate nicht ausreichend stabil genug sind, um eine *in vitro* Selektion damit durchführen zu können.

Eine weitere Konjugationsmethode bietet die Einführung eines Guanosin-phosphorothioat als Initiatornukleotid während der Transkription am 5'-Ende der RNA. Durch post-transkriptionale Modifikationen der Thiophosphat-Gruppe erfolgt nach dem Mechanismus der „Chemical Native Ligation" die Kopplung mit N-terminal Cystein-modifizierten Peptiden (**3**). Die Kopplungsstrategie konnte für kurze RNA-Sequenzen mit nahezu quantitativen Ausbeuten durchgeführt werden. Allerdings wurden diese bei der Konjugation mit dem RNA-Bibliotheken nicht erreicht und die Reproduzierbarkeit der Produktbildung war nicht in jedem Experiment gegeben. Somit ist auch diese Kopplungsstrategie für die Durchführung der *in vitro* Selektion nicht geeignet.

Schließlich wurde eine dritte, neue Kopplungsstrategie entworfen, welche die Vorteile der beiden zuvor untersuchten Methoden kombiniert. Zum einen sollte mithilfe eines Initiatornukleotids die stabile Einführung einer Modifikation mit hohen Ausbeuten erfolgen. Zum anderen hatte die Kopplung eines Aldehyds mit einem Hydrazin-Peptid auch für längere RNA-Sequenzen Konjugate in nahezu quantitativen Ausbeuten erbracht. Aus diesem Grund wurde das Initiatornukleotid **10** neu synthetisiert, wodurch die Einführung einer aromatischen Aldehydfunktion in die RNA während der Transkription möglich war. Konjugationen mit den Peptidsubstraten **2** und **6** konnten sowohl mit dem RNA_{25mer}-Oligonukleotid also auch mit dem RNA_{109mer}-Pool erfolgreich und effizient realisiert werden.

Die letztlich entwickelte Konjugationsmethode bietet eine einfache und verlässliche Möglichkeit längere RNA-Sequenzen an ihren 5'-Enden zu modifizieren. Dabei ist diese Strategie vielfältig einsetzbar, denn so gut wie jede RNA-Sequenz kann durch *in vitro* Transkription synthetisiert werden und die nahezu unbegrenzte Vielzahl an Peptiden mit unterschiedlichsten Modifikationen ist durch Festphasen-Peptidsynthese zugänglich. Die direkte enzymatische Einführung einer Aldehyd-Gruppe und deren postsynthetische Modifizierung bieten dabei eine orthogonale Methode der Modifizierung langer RNA-Sequenzen und bereichern somit das Repertoire an Konjugations- und Modifizierungsstrategien.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Entwicklung eines Selektionsprotokolls für die Generierung von Ribozymen mit Proteaseaktivität war die Etablierung einer Positivkontrolle, die es erlaubt eine Spaltung des Peptidsubstrats zu imitieren. Da die von uns konzipierte Substratsequenz sich an den Substratanforderungen der Serinprotease Trypsin orientiert hatte, bot sich die enzymatische Spaltung der RNA-Peptid-Konjugate durch Trypsin an. Diese wurde zum einen in Lösung durchgeführt und lieferte spezifisch das gewünschte Spaltprodukt, welches durch Bestimmung der Masse verifiziert werden konnte. Auch die Freisetzung von RNA-Peptid-Konjugaten, die über den Biotin-Marker auf Streptavidin-Agarose immobilisiert wurden, erfolgte quantitativ und unter Bildung einer spezifischen Produktbande. Letztlich erlaubt der Trypsin-Verdau der Konjugate die Lokalisation der katalytisch aktiven Sequenzen im DNAzym-Assay im Anschluss an die Selektion.

Die Zugabe von Cofaktoren während der Selektion konnte bereits mehrfach erfolgreich angewendet werden. Neben verschiedenen divalenten Metallionen wie Mg^{2+}, Ca^{2+} oder Mn^{2+} kommen hauptsächlich Aminosäuren und Dipeptide zu Einsatz. Auch in dieser Selektionsstrategie sollen Cofaktoren zugegeben werden, um der RNA die schwierige Aufgabe der Peptidspaltung zu erleichtern. Dabei bieten sich die Aminosäuren der katalytischen Triade von Serinproteasen an. Allerdings würde die ledigliche Zugabe von Serin, Histidin und Aspartat in den Puffer der Selektionsreaktion immer noch eine gleichzeitige und räumlich korrekte Anlagerung der drei Reste mehr als unwahrscheinlich machen. Aus diesem Grund wurden die drei Aminosäuren durch kurze Polyethylenglykol-Linker mit jeweils zwei Einheiten miteinander verbunden. Der

Vorteil dieser Anordnung ist, dass die katalytisch aktiven Reste bereits in einer räumlichen Annäherung zueinander sind, die in etwa den Abständen der Triade in der Kristallstruktur von Serinproteasen entspricht. Gleichzeitig ist die Anordnung immer noch ausreichend flexibel, so dass ein Einlagern in die RNA-Struktur erfolgen kann. Um die Wahrscheinlichkeit einer solchen Einlagerung zusätzlich noch zu erhöhen, wurde an die Triade über einen langen Polyethylenglykol-Linker von zehn Einheiten eine kurze PNA-Sequenz angehängt. Diese soll den Cofaktor durch Hybridisierung mit der RNA während der Selektionsreaktion verankern. PNA erlaubt dabei als Nukleinsäure-Analogon einerseits eine spezifische Hybridisierung und andererseits, aufgrund der erhöhten Thermostabilität durch die fehlende Abstoßung negativer Ladungen im Rückgrat, den Einsatz relativ kurzer Sequenzen mit sieben Nukleotiden. Um eine ausreichende Stabilität des Hybrids zu erhalten, sollten in der PNA-Sequenz mindestens drei bis vier GC-Basenpaare enthalten sein. Die Hybridisierung erfolgte im konstanten Bereich an den jeweiligen Enden der RNA-Bibliothek, wobei in Abhängigkeit der Konjugationsstrategie jeweils das entgegengesetzte Ende gewählt wurde. Die Synthese des PNA-Aminosäure-Cofaktors erfolgte ebenfalls komplett mithilfe der Festphasen-Peptidsynthese, wobei die Kopplung der PNA-Monomere lediglich mit einem anderen Kopplungsreagenz sowie einem zusätzlicher Capping-Schritt durchgeführt wurden. Die Hybridbildung des Cofaktors mit komplementärer DNA oder RNA wurde mithilfe unterschiedlicher Methoden analysiert. Die Durchführung von Schmelzpunktexperimenten ergab für Hybride aus PNA_{7mer} (**22** und **25**) oder PNA_{7mer}-Triaden (**23** und **26**) mit DNA_{18mer} oder RNA_{18mer} Schmelztemperaturen zwischen 50 und 69 °C, wodurch die Stabilität der formierten Hybride bei der Selektionstemperatur von 20 °C gezeigt werden konnte. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Verwendung des Cyano-Farbstoffes und Interkalators $DiSC_2(5)$, der eine spezifische Anfärbung PNA-haltiger Duplexe erlaubt, bestätigt. Die durchgeführten Reversen Transkriptionen mit dem RNA_{109mer}-Pool in Gegenwart von PNA-Sequenzen, die durch ihre Hybridisierung mit der RNA das Anlagern des 3'-Primers eventuell stören könnten, zeigten keinen Einfluss der PNA auf die Ausbeute an cDNA. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von PNA-Aminosäure-Cofaktoren während der *in vitro* Selektion sowohl die Verankerung der synthetischen, katalytischen Triade am RNA-Pool erlaubt, als auch mit den biotechnologischen Methoden des Selektionsprotokolls kompatibel ist.

4.1.2 Probleme

Nach der ersten Durchführung der *in vitro* Selektion hat sich sehr deutlich gezeigt, dass die eigentliche Herausforderung bei der Generierung von Ribozymen mit Proteaseaktivität aus einer gewissen Gratwanderung bei der Immobilisierung besteht. Zum einen soll das unspezifische Binden von RNA-Sequenzen vermieden und zum anderen das spezifische Binden durch nicht zu harsche Waschbedingungen ermöglicht werden. Für den Affinitätsmarker Biotin stellt dies nur ein geringes Problem dar, denn dieser bietet optimale Voraussetzungen. Durch die geringe Molekülgröße kann Biotin ohne störende Einflüsse in jede zu untersuchende Verbindung eingeführt werden. Was den Biotin-Marker allerdings so einzigartig macht, ist die extrem hohe Affinität mit der die Bindung an das Protein Streptavidin erfolgt. Die Stabilität dieser Bindung, die einer kovalenten Bindung sehr nahe kommt[161, 162], ermöglicht beispielsweise eine sehr spezifische Immobilisierung Biotin-markierter RNA-Sequenzen auf einer Streptavidin-modifizierten Festphase. Gleichzeitig sind aber auch harsche, denaturierende Waschbedingungen erlaubt unter denen unspezifisch gebundene RNA-Sequenzen entfernt werden können.

Die Wahl einer zweiten Ankergruppe, die für diese Selektion erforderlich ist, fällt schwerer, da keine Marker mit vergleichbar guten Eigenschaften wie die des Biotins existieren. Aufgrund der geringen Molekülgröße, der Kompatibilität mit der Festphasen-Peptidsynthese und der breiten Anwendung bei der Aufreinigung von Proteinen, haben wir uns für das so genannte His_6-tag, eine Sequenz von sechs aufeinander folgenden Histidinen, entschieden. Durch die Komplexbildung der Imidazolreste mit Ni^{2+}-Ionen ist durch die Methode der IMAC – Immobilized Metal Affinity Chromatography – eine Isolierung His_6-markierter Verbindungen auf Ni^{2+}-haltigen Festphasen möglich. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden werden den Immobilisierungs- und Waschpuffern geringe Konzentrationen an Imidazol zugegeben. Bei der Aufreinigung von Proteinen gelten dabei zwei unterschiedliche Grundsätze. Entweder erfolgt die Aufreinigung mit dem Ziel einer möglichst großen Ausbeute, dann werden geringe Imidazol-Konzentrationen von 0 – 5 mM eingesetzt und man nimmt ein gewisses Maß an Verunreinigung in Kauf. Oder die Imidazol-Konzentrationen werden

auf 30 – 40 mM erhöht, um unspezifische Bindungen zu minimieren und erhält dadurch die bestmögliche Selektivität bei gleichzeitigen Verlusten in der Ausbeute. Für das Gelingen einer *in vitro* Selektion ist allerdings beides notwendig. Die Immobilisierung muss maximal spezifisch sein, so dass nur aktive RNA-Sequenzen während der Selektionsrunden angereichert werden. Gleichzeitig dürfen keine aktiven RNA-Spezies verloren gehen, da vor allem in den ersten Selektionsrunden nur wenige Kopien der einzelnen Sequenzen vorliegen.

Bei Versuchen im Vorfeld der ersten Selektion wurden Immobilisierungsraten von bis zu 7 % auf Ni^{2+}-Sepharose bestimmt. Da dieser Wert einer viel zu hohen unspezifischen Bindung entsprechen würde, wurde die Selektion daraufhin mit einer Konzentration von 40 mM während der Immobilisierung und im Waschpuffer durchgeführt. Während der Selektion und in den anschließenden Untersuchungen hat sich dann gezeigt, dass durch diese Konzentration an Imidazol in Verbindung mit den hohen Harnstoff-konzentrationen aus dem ersten Immobilisierungsschritt letztendlich nur eine Bindungseffizienz von 16 % erreicht werden konnte. Das bedeutet nur jede sechste RNA-Sequenz, die einen His_6-Marker getragen hat, wurde auch isoliert und anschließend vervielfältigt. Damit lässt sich bei einer Anzahl von durchschnittlich zwei Kopien pro Sequenz zu Beginn der Selektion keine Anreicherung katalytisch aktiver Verbindungen erfolgreich realisieren.
Des Weiteren hat sich im Anschluss der Selektion herausgestellt, dass teilweise die Immobilisierung auf Streptavidin nicht vollständig erfolgte. Somit waren die ursprünglich zu hohen Immobilisierungsraten auf Ni^{2+}-Sepharose nicht auf eine unspezifische Bindung der RNA zurückzuführen, sondern auf eine nicht vollständige Immobilisierung der nicht aktiven Sequenzen auf Streptavidin aufgrund eines zu gering gewählten Überschusses.

Durch die Optimierung des Immobilisierungsprotokolls, sowohl für Streptavidin, also auch für Ni^{2+}-Sepharose konnten diese Einschränkungen weitgehend ausgeräumt werden. Die doppelte Inkubation mit jeweils frischem Streptavidin-Agarose-Harz garantiert eine vollständige Immobilisierung nicht aktiver RNA-Sequenzen, die das Peptidsubstrat nicht spalten konnten und deshalb immer noch ein Biotin-Label tragen. Inkubationen des Ni^{2+}-Sepharose-Harzes mit nicht konjugierter RNA haben unter den

Bedingungen des optimierten Protokolls keine unspezifische Bindung ergeben. Hierbei wird nun ein Phosphat-Puffer pH 7.5, der 5 mM Imidazol enthält, verwendet. Bei der Durchführung einer Testrunde unter Anwendung des neuen Protokolls wurde eine Immobilisierungsrate von 0.7 % auf Ni^{2+}-Sepharose bestimmt und stellt einen guten Ausgangswert für die Durchführung einer zweiten *in vitro* Selektion dar. Auch bei der Zugabe von ca. 10 % eines Trypsin-verdauten Konjugats zum Selektionsansatz konnte durch Wiederfinden dieses Prozentsatzes auf dem Ni^{2+}-Sepharose-Harz die spezifische Immobilisierung His_6-markierter Verbindungen bestätigt werden.

4.1.3 Chancen

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte und optimierte *in vitro* Selektionsstrategie bildet einen äußerst viel versprechenden Ausgangspunkt für eine erfolgreiche Generierung von Ribozymen mit Proteaseaktivität. Alle besonderen Ansprüche an die zu katalysierende Reaktion wurden bei der Konzeption der Strategie berücksichtigt, in das Verfahren integriert und sehr genau untersucht. Vorhandene Einschränkungen der Methode konnten bei der ersten Selektion ermittelt und nach weiteren Untersuchungen optimiert werden.

RNA besitzt zahlreiche Eigenschaften, die für eine Peptidspaltung hilfreich oder sogar erforderlich sind. Eine generelle Voraussetzung bei der Herstellung künstlicher Enzyme ist dabei stets die Bereitstellung einer Struktur, die einen abgegrenzten Raum für die Katalyse bietet. Eine solche katalytische Tasche kann beispielsweise das Substrat in eine für die Reaktion notwendige Konformation zwingen oder ein hydrophobes Umfeld durch Verdrängen des wässrigen Mediums ermöglichen. Dass RNA-Moleküle komplexe dreidimensionale Strukturen unter Ausbildung von Reaktionstaschen formen können, wurde bereits für bekannte Ribozyme gezeigt. Des Weiteren existieren zahlreiche Aptamere für einzelne Aminosäuren, kleine Peptide oder ganze Proteine, die belegen dass RNA aus Aminosäuren aufgebaute Strukturen äußerst effizient erkennen und binden kann. Die Entdeckung, dass an der Knüpfung der Peptidbindung im Ribosom primär ribosomale RNA beteiligt ist, bekräftigt die Annahme, dass RNA auch die entgegengesetzte Reaktion, also die Peptidspaltung, katalysieren kann. Des Weiteren haben Kristallstrukturen natürlicher und *in vitro* selektierte Ribozyme gezeigt, dass diese in der Lage sind, fixe, vorgeformte Taschen zu bilden. Diese können einerseits die Bindung von Edukten ermöglichen, andererseits aber auch die Anlagerung von Cofaktoren, die für die Durchführung der Katalyse essentiell sind.
Die Tatsache, dass RNA all diese Eigenschaften in sich vereinen kann, liefert eine fundierte Grundlage für die Annahme, dass im Verlauf der von uns konzipierten *in vitro* Selektion möglich ist RNA-Sequenzen anzureichern, die eine Peptidbindung spalten können. Dies könnte durch die katalytische Triade des Cofaktors, die während der Faltung in die RNA-Struktur mit einbezogen werden kann, realisiert werden.

4.2 Ausblick

4.2.1 Charakterisierung der Proteaseaktivität

Für den Fall einer erfolgreichen Selektion eines Ribozyms mit Proteaseaktivität ist eine Prüfmethode nötig, die eine effiziente Messung der proteolytischen Aktivität bei gleichzeitig einfacher Handhabung ermöglicht. Assays, die sich UV- oder Fluoreszenz-spektroskopischer Methoden bedienen, haben sich bei der Bestimmung von Enzym-kinetiken besonders bewährt. Um die Spaltung einer Peptidbindung photometrisch verfolgen zu können, bietet sich die Verwendung von Peptidsubstraten an, die durch ein FRET-Paar markiert sind. FRET steht in diesem Fall für Förster Resonance Energy Transfer und beschreibt einen physikalischen Prozess, bei dem die Energie eines angeregten Fluoreszenz-Farbstoffes (Donor) auf ein Akzeptormolekül strahlungsfrei übertragen wird. Da die Intensität des FRET unter anderem vom Abstand von Donor und Akzeptor abhängt, hat sich die Anwendung dieser Methode für die Bestimmung von Abständen im Nanometerbereich in der Molekularbiologie etabliert[163].

Die Spaltung einer Peptidbindung könnte unter Verwendung eines Fluoreszenz-Farbstoffs als Donor und eines Licht-absorbierenden Akzeptors (Quencher) an den jeweiligen Enden des Peptidsubstrats in Echtzeit verfolgt werden. Dabei würde die Fluoreszenz des Donors im intakten Zustand des Peptids aufgrund der Nähe des Akzeptors vollständig absorbiert werden. Erst wenn durch die Spaltung des Peptids Donor und Akzeptor von einender getrennt würden, wäre ein Fluoreszenz-Signal messbar[164-166].

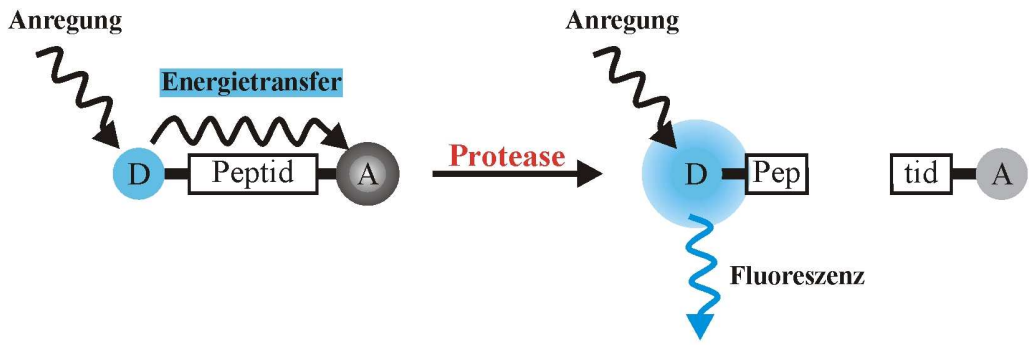


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung eines FRET-basierten Assays zur Bestimmung von Proteaseaktivität. D: Donor (Fluoreszenz-Farbstoff), A: Akzeptor (Quencher).

Aufgrund der großen Stabilität von Peptidbindungen und der damit verbundenen, sehr geringen Geschwindigkeitskonstanten für die unkatalysierte Hydrolyse von Peptiden bei neutralen pH-Werten kann unter Umständen eine sehr empfindliche Messmethode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität erforderlich sein. Denn wenn es beispielsweise gelingen würde, Ribozyme mit einer 1000-fachen Beschleunigung der nicht katalysierten Reaktion zu isolieren, besäßen diese eine katalytische Aktivität mit einer Halbwertszeit von immer noch 64 Stunden (bezogen auf die Geschwindigkeitskonstante ermittelt durch Kahne *et al.*[73]).
Eine der empfindlichsten Methoden zur Ermittlung proteolytischer Aktivität wurde von 1988 von D. Kahne *et al.* [73] vorgeschlagen. Ihnen gelang die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten einer unkatalysierten Hydrolyse von Peptidbindungen in neutralem, wässrigen Medium und bei Raumtemperatur mit einem Wert von $3 \cdot 10^{-9}\ s^{-1}$. Hierbei wurden radioaktiv markierter Peptide eingesetzt und auf einer Polymeroberfläche immobilisiert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Hydrolyse durch Messen der Radioaktivität im Überstand bestimmt.

Ein wichtiger Aspekt der von uns konzipierten Selektionsstrategie ist die Zugabe eines Cofaktors, der es der RNA ermöglichen soll den Katalysemechanismus von Serinproteasen für die Spaltung von Peptidbindungen zu adaptieren. Bei einer erfolgreichen Selektion von Ribozymen mit Proteaseaktivität wäre deshalb eine interessante Fragestellung, ob die RNA auch tatsächlich das „Charge-Relay“-System der katalytischen Triade verwendet. Der Nachweis eines aktivieren Serinrests innerhalb eines Katalysators könnte durch die Verwendung des Proteaseinhibitors Diisopropyl-fluorophosphat erfolgen, der spezifisch mit dem aktivierten Serinrest reagieren und dadurch die proteolytische Aktivität des Ribozyms hemmen würde.

4.2.2 Alternative Selektionsansätze

Die katalytische Triade ist das wohl meist verbreitete Prinzip, das von Proteasen für die Spaltung von Peptidbindungen eingesetzt wird. Einen alternativen Mechanismus hierzu gebrauchen Metalloproteasen, die mithilfe von Zink-Ionen (Zn^{2+}) den Angriff auf die Peptidbindung erleichtern. Bei der Entwicklung künstlicher Enzyme mit Proteaseaktivität wurden bereits mehrfach Metallionen in die katalytischen Zentren erfolgreich integriert[167]. Diese können bei der Hydrolyse von Peptiden die Carbonylgruppe der zu spaltenden Bindung polarisieren und aktivieren. Zusätzlich sind metallgebundene Hydroxylionen starke Nukleophile, die den Carbonyl-Kohlenstoff angreifen können. Metallgebundenes Wasser kann als Säure bei der Abstoßung der Abgangsgruppe aus dem tetraedrischen Zwischenprodukt agieren.

Eine *in vitro* Selektion zur Gerierung von Ribo-Metalloproteasen könnte mit dem in dieser Arbeit etablierten Selektionsprotokoll ebenfalls durchgeführt werden. Hierfür müsste lediglich ein anderer Cofaktor hergestellt werden, der einen Liganden zur Ausbildung eines Metallkomplexes trägt. Dieser könnte dann anstelle der Aminosäure-Triade während der Faltung in die Struktur der RNA eingebunden werden (Abb. 4.2)

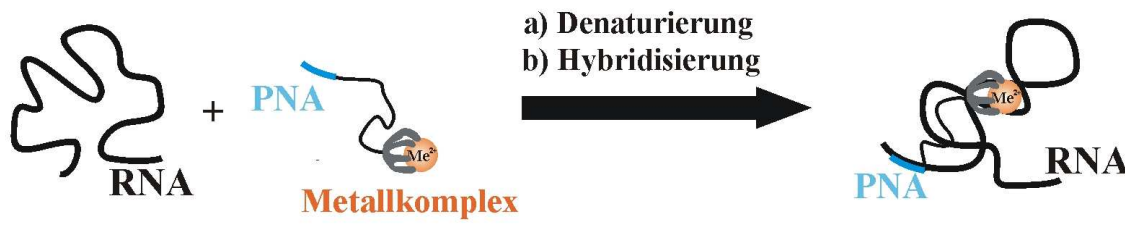


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der Integration des verankerten Metallkomplexes während der Faltung der RNA für die *in vitro* Selektion von Ribo-Metalloproteasen.

Wie bereits erwähnt ist die Stabilität der Peptidbindung eine besondere Herausforderung bei der *in vitro* Selektion von Ribozymen mit Proteaseaktivität. Ein limitierender Faktor könnte dabei sein, dass die RNA selbst eine deutlich geringere Stabilität aufweist. In wässrigen Lösungen kann einer Hydrolyse der Phosphodiester-Bindung durch allgemeine Säure-Base-Katalyse oder Metallionen (z. B. Lanthanoide) erfolgen[168-170]. Ein Grund für die geringe Stabilität liegt in der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose, auf die unter Bildung eines 2',3'-Cyclophosphats die Übertragung der Phosphatgruppe möglich ist und gleichzeitig die Bindung zum vorherigen Nukleotid gelöst wird.
Eine Alternative zur Selektion von Ribozymen wäre deshalb aufgrund der größeren Stabilität die Generierung eines DNAzyms mit Proteaseaktivität. Auch wenn bisher das katalytische Repertoire von DNAzymen im Vergleich zu Ribozymen deutlich eingeschränkter ist, konnte erst kürzlich durch die erfolgreiche Selektion eines DNAzyms für eine Diels-Alder-Reaktion gezeigt werden, dass zumindest für diese Reaktion beide Arten von katalytisch aktiven Nukleinsäuren gleichwertig sind[64].

Für die Selektion eines DNAzyms müssten lediglich die folgenden beiden Änderungen im bereits etablierten Selektionsschema berücksichtigt werden:

1. Anstelle der Transkription erfolgt im Anschluss an die PCR eine spezifische Vervielfältigung des Sense-Stranges durch Zugabe eines entsprechenden Primers und einer DNA-Polymerase. Im Anschluss an die Polymerisation erfolgt die Aufreinigung der einzelsträngigen DNA-Bibliothek, die weiter für die Konjugation eingesetzt wird.
2. Die Einführung der Aldehydfunktion erfolgt durch die Verwendung eines 5'-Aldehyd-modifizierten Primers während der Polymerisation (siehe 1.).

Alle weiteren Schritte können identisch übernommen werden. Erste Versuche, die diese beiden Änderungen einbeziehen, wurden bereits durchgeführt. Mithilfe der DNA-Festphasensynthese konnte unter Verwendung des Phosphoramidits **8** eine Acetal-geschützte Aldehydfunktion am 5'-Ende eines DNA-Primers eingeführt werden (Abb. 4.3 A). Dieser 5'-Aldehyd-modifizierte Primer wurde durch eine DNA-Polymerase erfolgreich verlängert und ergab eine DNA_{109mer}-Bibliothek mit einem internen, randomisierten Bereich von 70 Nukleotiden entsprechend dem RNA_{109mer}-Pool (Abb.

4.3 A und B). Beide DNA-Sequenzen, sowohl der DNA_{19mer}-Primer als auch die DNA_{109mer}-Bibliothek konnten im Anschluss quantitativ mit dem Peptidsubstrat **2** konjugiert werden (Abb. 4.3 C und D).

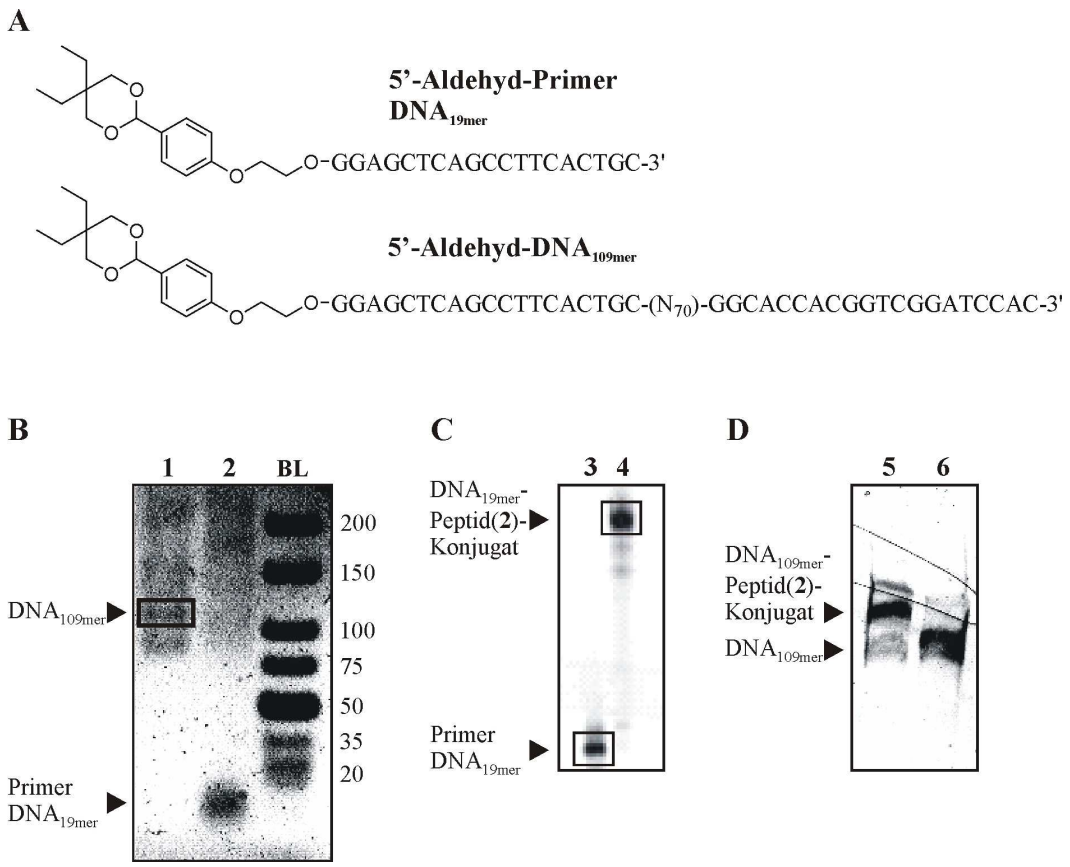


Abbildung 4.3: Vorversuche für die Selektion von DNAzymen mit Proteaseaktivität. A: Sequenz des 5'-Aldehyd-modifizierten Primers (DNA_{19mer}, oben), hergestellt durch Oligonukleotid-Festphasensynthese und Sequenz der 5'-Aldehyd-modifizierten DNA_{109mer}-Bibliothek (unten), hergestellt durch enzymatische Verlängerung des Primers. B: Agarose-Gelanalyse der enzymatischen Verlängerung des 5'-Aldehyd-modifizierten Primers, 1: Polymerisation; 2: nicht verlängerter Primer; BL: Basenpaarleiter (nt). C und D: Konjugation mit Peptidsubstrat **2**; 3: 5'-Aldehyd-modifizierten Primer; 4: Konjugationsansatz mit 5'-Aldehyd-modifiziertem Primer; 5: Konjugationsansatz mit 5'-Aldehyd-modifizierter DNA-Bibliothek; 6: 5'-Aldehyd-modifizierte DNA-Bibliothek.

Das in dieser Arbeit konzipierte, etablierte und optimierte Selektionsprotokoll bietet einen äußerst viel versprechenden Ausgangspunkt für die Durchführung einer *in vitro* Selektion für die Generierung von Ribozymen mit Proteaseaktivität. Die Verwendung von Cofaktoren, die an der RNA durch Hybridisierung verankert werden können, stellt dabei einen komplett neuen Ansatz dar. Das entwickelte Selektionsschema kann durch Variation des Cofaktors oder Einarbeitung geringfügiger Modifikation für die Selektion zahlreicher neuer Ribozyme und DNAzyme eingesetzt werden.

5 Material und Methoden

5.1 Standard-Methoden und Reagenzien

Biotechnologische Standardmethoden wie Ethanolfällung, Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Rotiphorese® DNA-Sequenziersystem, Carl Roth), NAP (nucleic acid purification) Gelfiltration (NAP™-5 colums, GE Healthcare), UV-spektrometrische Quantifizierung von Oligonukleotiden, Gelelution und UV-Shadowing wurden nach Herstelleranweisung oder nach allgemein gültigen Protokollen durchgeführt[171, 172], falls im Nachfolgenden nicht anders erwähnt. Alle verwendeten Reagenzien wurden von Aldrich, Fluka, Novabiochem, Glen Research oder Acros Organics erworben und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Trockene Lösungsmittel über Molekularsieb (Acetonitril = ACN, Tetrahydrofuran = THF) wurden von Fluka bezogen. Oligonukleotide wurden bei IBA GmbH bestellt. Peptide wurden von Biosyntan GmbH synthetisiert.

Für Umkehrphasen Dünnschichtchromatographie (RP-DC) Analysen wurden RP-18 $F_{254\ s}$ Platten (20 × 20 cm) von Merck verwendet. Präparative Umkehrphasen Chromatographie wurde mit Fertigsäulen Lobar® von Merck (LiChroprep® RP-18) durchgeführt. Für Kationenaustauschersäulen wurde DOWEX® 50WX8-200 Harz (Natrium Form) verwendet. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) Analysen wurden mit einem Agilent 1100 Serie HPLC System, ausgestattet mit einem Diodenarraydetektor und unter Verwendung von Phenomenex® Luna 5U C18 Säulen (4.6×250 mm) durchgeführt (Flussrate: 1 mL/min).

Folgende Elutionspuffer kamen dabei zum Einsatz:

	Oligonukleotide	Peptide
Puffer A	100 mM TEAA pH 7.0 (Triethylammoniumacetat)	Wasser + 0.1 % TFA (Trifluoressigsäure)
Puffer B	100 mM TEAA in 80 % Acetonitril (Triethylammoniumacetat)	Acetonitril + 0.1 % TFA (Trifluoressigsäure)

NMR Spektren wurden mit einem Varian VNMR S 500 Spektrometer aufgenommen. ^{1}H NMR Spektren wurden mit TMS (Trimethylsilan) kalibriert auf Basis der relativen chemischen Verschiebung des Lösungsmittels als interner Standard. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad signal. MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight) Massenspektren wurden mit Bruker BIFLEX III Spektrometer aufgenommen. Die Proben für MALDI-TOF Messungen wurden in Wasser gelöst und auf eine Endkonzentration von 10 µM eingestellt. Die Proben für die Analyse wurden mit der „dried droplet“ Methode vorbereitet.

Dabei kamen die folgenden Matrix-Lösungen zum Einsatz:

für RNA: 10 mg/mL 3-Hydroxypicolinsäure und 1 mg/mL Diammoniumhydrogencitrat in Wasser (Detektion im linearen Positivmodus); 1 µL der Matrix-Lösung auf ein AnchorChip™ 400 Traget spotten und an der Luft trocknen lassen. Auf den getrockneten Matrix-Spot 1 µL Probe auftragen und ebenfalls trocknen lassen.

für PNA und Peptide: gesättigte Sinapinsäure-Lösung (SA) in 2:1 ACN / Wasser + 0.1 % TFA; für Peptide: 0.3 mg α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (CCA) in Ethanol:Aceton 1:2 lösen. Lösung täglich frisch ansetzten, anschließend auf Eis lagern. Präparation: 10 µL der Matrix-Lösung mit 1 µL Probe mischen und 1 µL auf ein AnchorChip™ 400 Traget spotten und an der Luft trocknen lassen.

ESI (Elektronensprayionisation) Massenspektren wurden mit einem Finnigan TSQ 700 Gerät gemessen. Gel-Scans (Radioaktivität und Fluoreszenz) wurden mit Typhoon 9400 Variable Mode Imager (Amersham Biosiences) aufgenommen. Radioaktive Proben mit einen Beckman Coulter LS 6500 Liquid Scintillation Counter quantifiziert.

5.2 Initiatornukleotid 10

5.2.1 Synthese

Syntheseweg A (StP 89, StP 113):

2’,3’-*Bis*-(*t*-Butyldimethylsilyl)guanosin[141, 142] **9** (0.102 g, 200 µmol, 2 equiv) wurde über Nacht an der Ölpumpe in einem Schlenkkolben getrocknet und anschließend unter Argonatmosphäre in 1 mL trockenem ACN suspendiert. Zunächst wurde eine Lösung

von 2-[4-(5,5-Diethyl-1,3-dioxan-2-yl)phenoxy]ethan-1-yl-[(2-cyanoethyl)-(*N*,*N*-diisopropyl)]- Phosphoramidit **8** (48 mg, 100 µmol; Glen Research) in 1 mL trockenem ACN hinzugegeben, gefolgt von 0.124 g 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) als Aktivator (1 mmol, 10 equiv; das Pulver wurde in einem Rundkolben ebenfalls über Nacht getrocknet und mit einem Pulvertrichter in den Reaktionsansatz überführt). Die Reaktion wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch die Zugabe von 200 µL *t*-Butylhydroperoxid (1.6 mmol, 16 equiv) gestoppt. Nach weiteren 10 min rühren wurden alle flüchtigen Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der Rückstand in 5 mL Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) Lösung (1 M in THF, 5 mmol, 50 equiv) unter Argon aufgenommen. Nachdem der Ansatz bei Raumtemperatur über Nacht gerührt wurde, wurde laut RP-DC die komplette Entschützung erreicht (ACN/H_2O 4:6). Das THF wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in 3 mL einer 8:2 ACN/H_2O Mischung aufgenommen, durch einen 0.22 µm Membranfilter gefiltert und mittels präparativer RP-Chromatographie aufgereinigt (Elution von H_2O/ACN 9:1 bis H_2O/ACN 1:1). Die Fraktionen, die Produkt enthalten wurden aufkonzentriert, zunächst unter Vakuum, um einen Großteil des ACN zu entfernen, und anschließend lyophilisiert. Tetrabutylammonium-Kationen wurden auf einer Ionenaustauscherharzsäule (∅ = 1.5 cm, l = 14 cm) mit Natriumionen ausgetauscht und mit Wasser eluiert. Die Eluatfraktionen, die das Produkt enthalten, wurden lyophilisiert. Eine zusätzliche präparative RP-Chromatographie wurde abschließend durchgeführt, um Überschüsse an Salzen zu entfernen. Nach der Lyophilisation erhält man das Produkt als einen blassgelben, hygroskopischen Feststoff (10 mg, 16.2 µmol, 16 % Ausbeute). Die Reinheit des Initiatornukleotids **10** wurde mittels HPLC bestätigt (Gradient: 5 % → 40 % Puffer B in 25 min, 40 % → 80 % in 15 min, 80 % → 100 % B in 5 min) Abb. 5.1).

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.02 (s, 1H), 7.29 (m, 2H), 6.84 (m, 2H), 5.83 (d, J=5.7 Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.63 (t, J=5.7 Hz, 1H), 4.42 (t, J=4.5 Hz, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.15-4.07 (m, 6H), 3.97 (d, J=11.4 Hz, 2H), 3.74 (d, J=11.4 Hz, 2H), 1.78 (q, J=7.5 Hz, 2H), 1.19 (q, J=7.5 Hz, 2H), 0.91 (t, J=7.5 Hz, 3H), 0.82 (t, J=7.5 Hz, 3H).

MALDI-TOF MS: m/z 626.2 $[M]^+$ (berechnete Masse für $[C_{26}H_{37}N_5O_{11}P]^+$ 626.22).

<u>Syntheseweg B</u> (StP 131, StP 134):

Die alternative Syntheseroute geht von 4-(2-Hydroxyethoxy)-Benzaldahyd **11** (6 mmol, 1 equiv, TCI Europe, Prod.-Nr. H0859) aus, der mit 2,2-Diethyl-1,3-Propandiol **12** (7.5 mmol, 1.25 equiv) in Anwesenheit von *p*-Toluolsulfonsäure (0.3 mmol, 0.05 equiv) in Toluol für 3.5 h bei 117 °C refluxiert wird und ergibt das Acetal-geschützte Benzaldehyd-Derivat **13**. Für die Aufarbeitung wird der Reaktionsansatz mit Diethylether in einen Scheidetrichter überführt und 3 x mit Wasser und gesättigter NaCl extrahiert und gewaschen. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Kieselgel; Hexan:Ethylacetat 6:4). Identität und Reinheit von **13** wurden durch DC (Hexan:Ethylacetat 6:4; Nachweis mit Hydrazin-Schwefelsäurereagenz für Aldehyde; R_f = 0.27), MS und H^1-NMR bestätigt.

^{1}H NMR (300 MHz, Aceton) δ 7.37 (d, J=8.85, 2H), 6.91 (d, J=8.85, 2H), 5.35 (s, 1H), 4.06 (m, 2H), 3.89-3.83 (m, 4H), 3.76 (s, 1H), 3.60 (d, J=11.5 Hz, 2H), 1.80 (q, J=7.6, 7.6, 7.5 Hz, 2H), 1.15 (q, J=7.67, 7.67, 7.5 Hz, 2H), 0.88 (d, J=7.6 Hz, 3H), 0.81 (t, J=7.6 Hz, 3H)

FAB MS: m/z 281.1 $[M]^+$ (berechnete Masse für $[C_{16}H_{25}O_4]^+$ 281.18)

Für die Synthese des Initiatornukleotids **10** wurde der Alkohol **13** (1.0 equiv) mit 2',3'-O-Silyl-geschütztem Guanosin-Phosphoramidit **14** (1.2 equiv) und DCI (1 equiv) als Aktivator in trockenem THF bei Raumtemperatur für 20 min gerührt. Alle pulverförmigen Komponenten wurden zuvor über Nacht unter starkem Vakuum getrocknet und die Reaktionen unter Argonatmosphäre durchgeführt (vergleiche Syntheseweg A). Durch Zugabe von TBHP (10 equiv) wurde die Reaktion gestoppt und bei Raumtemperatur für 30 min weiter gerührt. Anschließend wurden alle flüchtigen Lösungsmittels entfernt und die Entschützung der Silyl-Gruppen erfolgte durch Zugabe von 1 M TBAF in THF (6 equiv) bei Raumtemperatur über Nacht und ergab das Initiatornukleotid **10** und teilweise bereits das entschützte Derivat **15**. Aufreinigung und Analyse erfolgten analog zu Syntheseweg A. Bei der präparativen RP-Chromatographie muss darauf geachtet werden, dass sowohl die Fraktionen des Acetal-geschützten **10** und nicht geschützten Aldehyd-Initiatornukleotids **15** aufgefangen werden. In einer anschließenden Transkription können beide Derivate verwendet werden.

5.2.2 Zubereitung wässriger Lösungen des Initiatornukleotids

Initiatornukleotid **10** wurde in Milli-Q® Wasser gelöst und durch einen 0.22 µm Membranfilter filtriert. Konzentrationen wurden mittels UV-Spektroskopie (Amersham Biosciences Ultrospec 2100 *pro* UV-Vis Spektrometer) bestimmt. Eine Kalibrierungskurve wurde mit Guanosin als Modellsubstanz für **10** ermittelt. Für Guanosin wurde die Absorption bei 260 nm von sechs wässrigen Lösungen in einem Bereich von 7.48-59.9 µM gemessen. Das Bestimmtheitsmaß (Determinations-koeffizient R^2) für die Kalibrierungskurve beträgt 0.999.

5.2.3 Modellreaktionen des Initiatornukleotids mit Stickstoff-Nukleophilen

Alle HPLC Analysen wurden mit dem für das Initiatornukleotid **10** beschriebenen Gradienten durchgeführt.

A) Entschützung des Aldehyds

Initiatornukleotid **10** (20 µL, 40 nmol) wurde durch die Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) (0.4 µL, 2 % v/v Endkonzentration) entschützt. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 5.4 µL einer 1 M $NaHCO_3$-Lösung gestoppt. Die komplette Entschützung der Aldehydfunktion resultiert in Initiatornukleotid **15** und wurde mittels HPLC und MALDI-TOF MS Analyse bestätigt (Abb. 3.7 und Tab. 3.2)

Zeit (min)	Puffer B (%)
0	5
25	40
40	80
45	100

Verbindung	Retentionszeit (min)
10	30.9
15	12.2

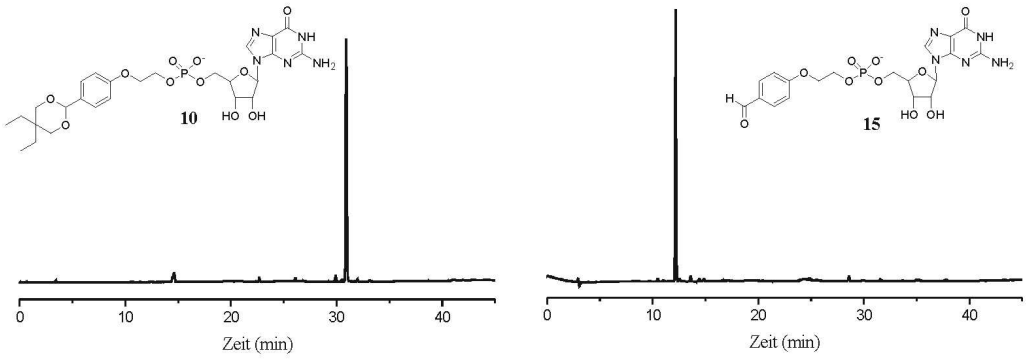


Abbildung 5.1: HPLC Chromatogramm der aufgereinigten und isolierten Initiatornukleotide **10** und **15**

B) Reaktion mit Benzylamin

1 µL einer Benzylaminlösung (0.4 M in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 9.5, 10 equiv.), 4 µL einer frisch zubereiteten 1 M $NaCNBH_3$ Lösung und 10 µL eines 0.1 M Phosphatpuffers pH 9.5 wurden zum Reaktionsansatz der zuvor beschriebenen Entschützung hinzugegeben. Nach 18 h wurden erneut Benzylaminlösung (2 µL, 10 equiv) und 1 M $NaCNBH_3$ Lösung (4 µL) zugegeben und die Reaktion für weitere 10 h fortgesetzt. Die HPLC Analyse der Reaktion zeigte, dass das gewünschte Benzylaminkonjugat **16** mit einer Umsetzung von annähernd 40 % erhalten wurde. Der restliche Aldehyd **10** wurde zum entsprechenden Benzylalkoholderivat **19** des Initiatornukleotids reduziert, was durch MALDI-TOF MS bestätigt werden konnte.

C) Reaktionen mit Benzoylhydrazid und 6-Hydrazin-Nikotinsäure.

Diese beiden Reaktionen wurden mit einer Endkonzentration des Initiatornukleotids **15** von 10 µM durchgeführt, um so exakt als möglich die Bedingungen während der Konjugationsreaktion mit der Aldehyd-modifizierten RNA zu reproduzieren (vergleiche Abschnitt: Herstellung von RNA-Peptid-Konjugaten).

Initiatornukleotid **10** (40 nmol) wurde in 1.6 mL H_2O gelöst und durch die Zugabe von 0.4 mL einer 10 % TFA-Lösung entschützt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0.64 mL einer 1 M $NaHCO_3$-Lösung gestoppt. Konjugationsreaktionen wurden durchgeführt, indem 1.36 mL 0.3 M Natriumacetatpuffer (pH 5.5) gefolgt von 8 µL 0.25 M Benzoylhydrazid-Lösung (50 equiv) oder von 40 µL 0.05 M 6-Hydrazin-Nikotinsäure-Lösung (50 equiv) zugegeben wurden. Die Reaktionen wurden über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mittel HPLC analysiert. Konjugationsprodukte **17** und **18** wurden isoliert und ihre Identität mittels MALDI-TOF MS bestätigt.

5.3 Festphasen-Peptidsynthese

5.3.1 Allgemeiner Arbeitsablauf[132]

Die Synthese wurde manuell in einer mit einem porösen Filter ausgestatteten Spritze durchgeführt (2 mL, MultiSynTech). Dabei wurden Fmoc (Fluorenylmethoxycarbonyl-) geschütztes Rink-Amid-Harz (40 mg, 0.025 mmol, Kapazität 0.63 mmol/g,

Novabiochem), Fmoc-geschützte Monomere (Novabiochem) und *N,N*-Dimethylformamid (DMF, aminfrei, Roth) als Lösungsmittel eingesetzt. Arginin wurde als Fmoc-Arg(Pbf)-OH Monomer eingebaut. Die Hydrazinfunktion wurde durch 6-Fmoc-Hydrazin-Nikotinsäure (HNA) (Novabiochem) eingeführt. Polyethylenglykol-Linker wurden als O-[2-(Fmoc-amino)-ethyl]-O′-[2-(diglycolyl-amino)ethyl]-hexaethylenglycol (Fluka) verwendet. Für das Schütteln während der Synthese wurde ein Orbital-Schüttler (IKA®; Horizontalschüttler HS 260 control) verwendet.
Das Rink-Amid-Harz wurde zunächst in eine Filterspritze eingewogen. Anschließend lässt man das Harz durch Aufziehen von ca. 1 mL Dichlormethan für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur quellen. Nach sorgfältigem Waschen mit DMF ist das Harz für die Synthese bereit.

5.3.2 Synthesezyklus

(A) *Fmoc-Entschützung:* 2 x ~1 mL einer 20 % Piperidin-Lösung in DMF werden zunächst für 2 min und dann für 10 min in die mit Harz gefüllte Spritze gezogen, ohne dazwischen zu waschen, und jeweils gleichmäßig geschüttelt;
(B) *DMF Waschschritt:* es wird sorgfältig und unter gleichmäßigem Schütteln der Spritze mit 5 × 1 mL DMF gewaschen;
(C) *Kopplung:* mit 1.05 mL der Kopplungsmischung (s. u.) wird unter ständigen Schütteln für 20-30 min gekoppelt.
(D) *DMF Waschschritt:* es wird sorgfältig und unter gleichmäßigem Schütteln der Spritze mit 5 × 1 mL DMF gewaschen;
(E) *Capping(nur für PNA-Monomere):* 2 x 1 mL Cappingmischung aufziehen und jeweils 3 min Schütteln; Cappingmischung: 0.5 mL 10 % Ac_2O (Essigsäureanhydrid) in DMF + 0.5 mL 12 % DIPEA (Diisopropylethylamin) in DMF;
(F) *DMF Waschschritt (nach Capping):* es wird sorgfältig und unter gleichmäßigem Schütteln der Spritze mit 5 x 1 mL DMF gewaschen;

Die Kopplungsmischung enthält:

- Monomer (geschützte Aminosäure, 0.125 mmol, 5-facher Überschuss),
- Aktivator
  für Aminosäuren: TBTU (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborat) (0.1225 mmol, 4.9-facher Überschuss)
  und HOBT (*N*-Hydroxybenzotriazol; 0.1225 mmol, 4.9-facher Überschuss)
  für PNA-Monomere: HATU (O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphat) (0.1225 mmol, 4.9-facher Überschuss)
- in 1 mL DMF lösen
- anschließend wird DIPEA (Diisopropylethylamin; 50 µL, 0.29 mmol, 11.7-facher Überschuss) zugegeben und für eine Dauer von 1 min aktiviert.

5.3.3 Aufarbeitung

Das Harz wird gründlich mit Dichlormethan gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet. Dann wurde das Produkt über einen Zeitraum von 3 h bei Raumtemperatur komplett entschützt und vom Harz gespalten durch Zugabe von 1 mL einer Mischung aus TFA:H_2O:TIS = 95 : 2.5 : 2.5 (TIS = Triisopropylsilan). Die Harzsuspension wurde gefiltert und das Harz mit TFA (2 x 1 mL) gewaschen. Die vereinigten TFA-Lösungen wurden zum Fällen in kalten Diethylether gegossen (Et_2O) (10 mL, -30°C) und Rohprodukt durch Zentrifugation gewonnen. Das erhaltene Pellet wurde mit kaltem Et_2O (2× 5 mL) gewaschen, an der Luft getrocknet, in Wasser gelöst, die Lösung gefiltert, lyophilisiert und das Peptid / PNA-Peptidhybrid schließlich mittels HPLC aufgereinigt. Puffer A: Wasser + 0.1 % TFA; Puffer B: Acetonitril + 0.1 % TFA; Die Quantifizierung erfolgte für Peptide durch Bestimmung der Masse und bei PNA-Sequenzen mithilfe des Extinktionskoeffizienten der entsprechenden DNA-Sequenzen bei 260 nm.

Tabelle 5.1 **Monomer für Peptid- und PNA-Synthese**

Monomer	*Firma/Prod.-Nr./CAS*	*Bemerkung*
Fmoc-Arg(Pbf)-OH N-α-Fmoc-N^G-2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl-L-arginine [$C_{34}H_{40}N_4O_7S$]; MW 648.8	Novabiochem Prod.-Nr. 04-12-1145 CAS 154445-77-9	
Fmoc-Asp(OtBu)-OH N-α-Fmoc-L-aspartic acid β-t-butyl ester [$C_{23}H_{25}NO_6$]; MW 411.5	Novabiochem Prod.-Nr. 04-12-1013 CAS 71989-14-5	
Fmoc-Cys(Trt)-OH N-α-Fmoc-S-trityl-L-cysteine [$C_{37}H_{31}NO_4S$]; MW 585.7	Novabiochem Prod.-Nr. 04-12-1018 CAS 103213-32-7	
Fmoc-Gly-OH N-α-Fmoc-glycine [$C_{17}H_{15}NO_4$]; MW 297.3	Novabiochem Prod.-Nr. 04-12-1001 CAS 29022-11-5	
Fmoc-His(Trt)-OH N-α-Fmoc-N-im-trityl-L-histidine [$C_{40}H_{33}N_3O_4$]; MW 619.7	Novabiochem Prod.-Nr. 04-12-1065 CAS 109425-51-6	
Fmoc-Lys(Boc)-OH N-α-Fmoc-N-ε-t-Boc-L-lysine [$C_{26}H_{32}N_2O_6$]; MW 468.5	Novabiochem Prod.-Nr. 04-12-1026 CAS 71989-26-9	
Fmoc-Lys(biotin)-OH N_α-Fmoc-N_ε-biotinyl-L-lysine [$C_{31}H_{38}N_4O_6S$]; MW 594.72	Fluka Prod.-Nr. 73749 CAS 146987-10-2	löst sich schlecht in DMF, 100µL DIPEA zugegeben und lange vortexen
Fmoc-Phe-OH N-α-Fmoc-L-phenylalanine [$C_{24}H_{21}NO_4$]; MW 387.4	Novabiochem Prod.-Nr. 04-12-1030 CAS 35661-40-6	
Fmoc-Pro-OH N-α-Fmoc-L-proline [$C_{20}H_{19}NO_4$]; MW 337.4	Novabiochem Prod.-Nr. 04-12-1031 CAS 71989-31-6	
Fmoc-Ser(Trt)-OH N-α-Fmoc-O-trityl-L-serine [$C_{37}H_{31}NO_5$]; MW 569.7	Novabiochem Prod.-Nr. 04-12-1092 CAS 111061-56-47	
HydraLinK™ 6-Fmoc-HNA Reagent 6-Fmoc-hydrazino Nicotinic Acid [$C_{21}H_{17}N_3O_4$]; MW 375.3	Novabiochem Prod.-Nr. 01-63-0121	
Fmoc-PEG2-OH {2-[2-(Fmoc-amino)ethoxy]ethoxy}acetic acid [$C_{21}H_{23}NO_6$]; MW 385.41	Fluka Prod.-Nr. 95003 CAS 166108-71-0	
Fmoc-PEG6-OH Fmoc-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahen-eicosanoic acid [$C_{30}H_{41}NO_{10}$]; MW 575.65	NeoMPS Prod.-Nr. FA19206	nicht selbst verwendet; Synthese durch Biosynthan

Fortsetzung Tabelle 5.1 **Monomere für Peptid- und PNA-Synthese**

Monomer	*Monomer*	*Monomer*
Fmoc-PEG7-OH O-[2-(Fmoc-amino)-ethyl]-O′-[2-(diglycolyl-amino)ethyl]hexaethylene glycol [$C_{35}H_{50}N_2O_{13}$]; MW 706.78	Fluka Prod.-Nr. 79632	
Fmoc-PEG10-OH O-[2-(Fmoc-amino)-ethyl]-O′-[2-(diglycolyl-amino)ethyl]nonaethylene glycol [$C_{41}H_{62}N_2O_{16}$]; MW 838.93	Fluka Prod.-Nr. 76708	
Adenin-PNA-Monomer Fmoc-PNA-A(Bhoc)-OH [$C_{40}H_{35}N_7O_7$] MW 725.75	ASM research chemicals Prod.-Nr. 5004029	
Cytidin-PNA-Monomer Fmoc-PNA-C(Bhoc)-OH [$C_{39}H_{35}N_5O_8$]; MW 701.72	ASM research chemicals Prod.-Nr. 5004028	löst sich schlecht in DMF, 100 - 200 µL DIPEA zugegeben und lange vortexen
Guanin-PNA-Monomer Fmoc-PNA-G(Bhoc)-OH [$C_{40}H_{35}N_7O_8$]; MW 741.75	ASM research chemicals Prod.-Nr. 5004030	
Thymin-PNA-Monomer Fmoc-PNA-T-OH [$C_{26}H_{26}N_4O_7$]; MW 506.51	ASM research chemicals Prod.-Nr. 5004027	

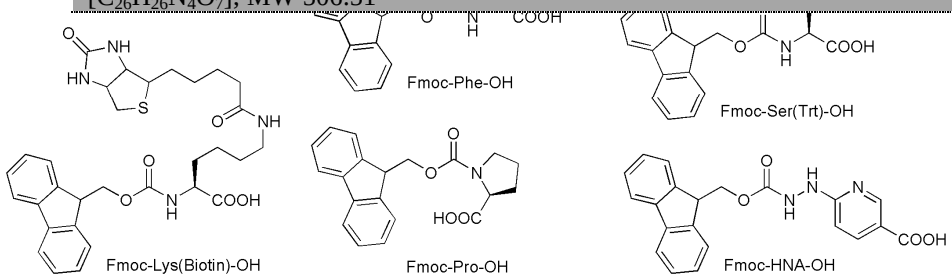


Abbildung 5.2: Monomere der verwendeten Aminosäuren

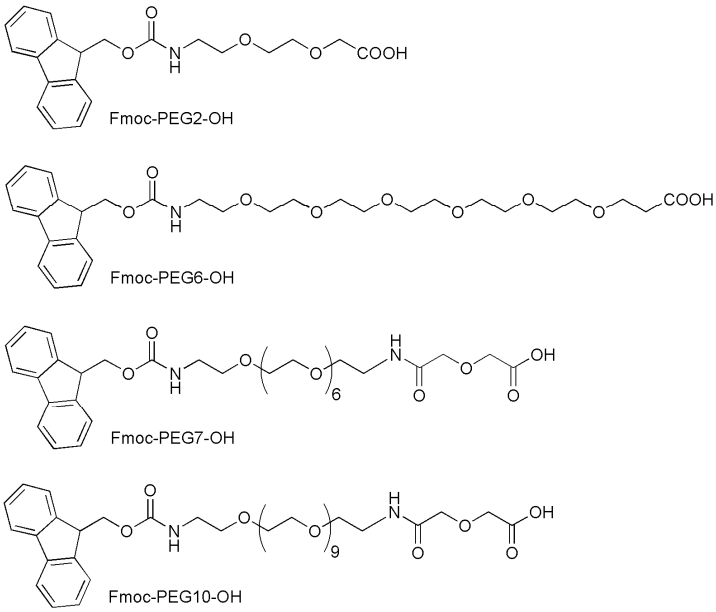


Abbildung 5.3: Monomere der verwendeten PEG-Linker

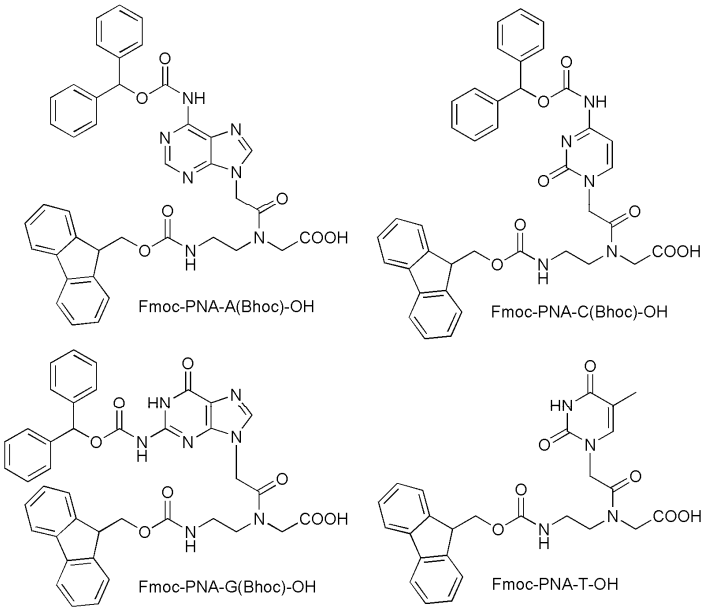


Abbildung 5.4: PNA-Monomere

5.3.4 Übersicht der synthetisierten Peptide und PNA-Peptidhybride

Peptid **1**: **H_2N-PEG$_7$-Gly-Pro-Arg-Gly-Phe-PEG$_7$-Lys(biotin)-Phe-$CONH_2$**
(StP01, StP03); Ausbeute: 5 %
HPLC: 5 % B → 60 % B in 30 min, R_t = 16.8 min;
MS ESI: m/z 984.1 $[M + 2\ H]^{2+}$, 656.4 $[M + 3\ H]^{3+}$
(berechnet für $[C_{89}H_{150}N_{18}O_{29}S]^{2+}$ 983.52 $[C_{89}H_{151}N_{18}O_{29}S]^{3+}$ 656.02)

Peptid **2**: **H_2N-HNA-PEG$_7$-Gly-Pro-Arg-Gly-Phe-PEG$_7$-Lys(biotin)-Phe-$CONH_2$**
(StP05, StP36, StP43); Ausbeute: 13 %
HPLC: 5 % B → 55 % B in 30 min, R_t = 15.9 min;
MS ESI: m/z 1051.4 $[M + 2\ H]^{2+}$, 701.4 $[M + 3\ H]^{3+}$
(berechnet für $[C_{95}H_{155}N_{21}O_{30}S]^{2+}$ 1051.05, $[C_{95}H_{156}N_{21}O_{30}S]^{3+}$ 701.03).

Peptid **3**: **H_2N-Cys-PEG_7-Gly-Pro-Arg-Gly-Phe-PEG_7-Lys(biotin)-Phe-$CONH_2$** **(**StP10); Ausbeute: 15 %

HPLC: 10 % B → 60 % B in 30 min, R_t = 17.0 min;

MALDI-TOF MS: m/z 2070.5 $[M + H]^+$; (berechnet für $[C_{92}H_{154}N_{19}O_{30}S_2]^+$ 2069.06;

Peptid **4**: **AcNH-Asp-PEG_2-His-PEG_2-Ser-Phe-$CONH_2$** (StP33)

HPLC: 10 % B → 60 % B in 30 min, R_t = 11.3 min;

MS ESI: m/z 836.6 $[M + H]^+$; (berechnet für $[C_{36}H_{54}N_9O_{14}]^+$ 836.4)

Ausbeute: 10%

Peptid **5**: **NH_2-HNA-PEG_{10}-$(His)_6$-Gly-Pro-Phe-$CONH_2$** (StP54)

HPLC: T = 45 °C; 5 % B → 20 % B in 5 min, 20 % B → 35 % B in 30 min, R_t = 10.3 min;

MS ESI: m/z 938.2 $[M + 2H]^{2+}$, 625.9 $[M + 3 H]^{3+}$;

(berechnet für $[C_{84}H_{121}N_{27}O_{23}]^{2+}$ 937.96; $[C_{84}H_{122}N_{27}O_{23}]^{3+}$ 625.64)

Ausbeute: 9.5 %

Peptid **6**: **NH_2-HNA-$(PEG_6)_2$-$(His)_6$-Gly-Pro-Arg-Gly-Phe-PEG_6-Lys(Biotin)-$CONH_2$**

nicht selbst synthetisiert: von Biosynthan: BS 5576 und BS 6813

HPLC: 12 % B → 88 % B in 30 min, R_t = 10.6 min;

MALDI-TOF MS: m/z 2850.7 $[M + H]^+$; (berechnet für $[C_{127}H_{198}N_{37}O_{36}S]^+$ 2849.45)

Peptid **7**: **AcNH-Asp-PEG_2-His-PEG_2-Ser-Gly-$CONH_2$** (IM01)

HPLC: 10 % B → 60 % B in 30 min, R_t = 5.2 min;

MALDI-TOF MS: m/z 746.3 $[M + H]^+$; (berechnet für $[C_{29}H_{48}N_9O_{14}]^+$ 746.33)

Ausbeute: 50 %

PNA **21**: **AcNH-TGAG-Lys-$CONH_2$** (StP52)

HPLC: T = 50 °C; 5 % B für 2 min, 5 % B → 15 % B in 20 min, R_t = 11.18 min;

MALDI-TOF MS: m/z 1311.4 $[M + H]^+$; (berechnet für $[C_{52}H_{71}N_{28}O_{14}]^+$ 1311.57)

Ausbeute: 21 %

PNA **22**: **AcNH-GGCTGAG-Lys-$CONH_2$** (StP52b)

HPLC: T = 50 °C; 5 % B für 2 min, 5 % B → 15 % B in 20 min, R_t = 14.98 min;
MALDI-TOF MS: m/z 2145.5 $[M + H]^+$; (berechnet für $[C_{84}H_{110}N_{47}O_{23}]^+$ 2144.89)
Ausbeute: 12 %

PNA **23**: **AcNH-Asp-PEG$_2$-His-PEG$_2$-Ser-PEG$_{10}$-GGCTGAG-Lys-CONH$_2$** (StP53)
HPLC: T = 50 °C; 5 % B → 15 % B in 5 min, 15 % B → 35 % B in 30 min, R_t = 11.6 min;
MALDI-TOF MS: m/z 3373.8 $[M + H]^+$; (berechnet für $[C_{135}H_{199}N_{56}O_{48}]^+$ 3372.49)
Ausbeute: 7.4 %

PNA **24**: Ac**NH$_2$-ACCGTGG-Lys-CONH$_2$** (IM02)
HPLC: T = 50 °C; 5 % B für 2 min, 5 % B → 15 % B in 20 min, R_t = 15.3 min;
MALDI-TOF MS: m/z 2106.2 $[M + H]^+$; (berechnet für $[C_{84}H_{110}N_{45}O_{23}]^+$ 2104.88)
Ausbeute: 2.5 %

PNA **25**: Ac**NH$_2$-CCGTGG-Lys-CONH$_2$** (IM03)
HPLC: T = 50 °C; 5 % B für 2 min, 5 % B → 15 % B in 20 min, R_t = 13.2 min;
MALDI-TOF MS: m/z 2106.2 $[M + H]^+$; (berechnet für $[C_{84}H_{110}N_{45}O_{23}]^+$ 2104.88)
Ausbeute: 8.4 %

PNA **26**: Ac**NH-Lys-ACCGTGG-PEG$_{10}$-Asp-PEG$_2$-His-PEG$_2$-Ser-Gly-CONH$_2$** (IM08); Ausbeute: 7.2 %
HPLC: T = 50 °C; 5 % B für 2 min, 5 % B → 15 % B in 20 min, R_t = 27.0 min;
MALDI-TOF MS: m/z 3390.1 $[M + H]^+$; (berechnet für $[C_{136}H_{202}N_{55}O_{49}]^+$ 3389.50)

5.3.5 Charakterisierung der PNA und PNA-Peptidhybride

5.3.5.1 Quantifizierung von PNA- und DNA-Oligonukleotiden durch UV-Absorption

Bei der einfachen und schnellen Quantifizierung von PNA- und DNA-Sequenzen mithilfe der UV-Absorption macht man sich das Absorptionsmaximum der Nukleobasen bei 260 nm zunutze. Die Absorptionsmessungen erfolgten mit einem UV-

160A Spektrophotometer (Shimadzu Deutschland GmbH) in Quarzküvetten (Quarzglas HELLMA) oder mit einem NanoDrop ND-100 Spektrophotometer (PeqLab Biotechnologie GmbH). Dabei wurde dieselbe Flüssigkeit zur Bestimmung des Nullwerts verwendet wie das Lösungsmittel, in dem die Probe gelöst wurde (meist Wasser). Mithilfe der gemessenen Absorption einer Probe bei 260 nm und des bekannten Extinktionskoeffizienten ε des entsprechenden Oligonukleotids kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentration der Lösung berechnet werden:

$$A = -\lg (I / I_0) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Anhand dieser Gleichung beschreibt der Extinktionskoeffizient ε ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) die Absorption A einer Lösung in Abhängigkeit der Konzentration c ($mol \cdot L^{-1}$) und der Schichtdicke d (cm). (I = Intensität des transmittierten Lichts, I_0 = Intensität des einfallenden Lichts)

Der Extinktionskoeffizient für PNA- und DNA-Oligonukleotide ist sequenzabhängig und lässt sich unter Einbeziehung der Anteile der einzelnen Basen nach folgender Gleichung berechnen:

$$\varepsilon = A\ (15.2) + C\ (7.05) + G(12.01) + T\ (8.4)$$

dabei stehen A, C, G und T für die Anzahl der jeweiligen dAs, dCs, dGs, und dTs in der Sequenz, die mit dem jeweiligen molaren Extinktionskoeffizient (in Klammern) jedes Nukleotid multipliziert wird.

5.3.5.2 Charakterisierung von PNA/DNA Duplexen mithilfe von Schmelzpunkt-analysen

Eine wichtige Größe zur Charakterisierung der Stabilität von Duplexen ist die Bestimmung des so genannten Schmelzpunktes. Damit ist jene Temperatur gemeint, bei der die Bindungskräfte der Wasserstoffbrücken zwischen zwei Einzelsträngen überwunden werden und sie sich voneinander trennen. Die genaue Temperatur des Schmelzpunktes T_m hängt dabei von der Dichte und Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen in der Helix ab und ist als diejenige Temperatur definiert, bei der die eine Hälfte der Basen gepaart und die andere ungepaart vorliegen.

Die Bestimmung der Schmelztemperatur erfolgt UV-spektrometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm in Abhängigkeit der Temperatur. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass ein Duplex ca. 15-20 % weniger stark absorbiert als die beiden entsprechenden Einzelstränge.

Mithilfe der Schmelzpunktanalyse wurde die Stabilität von Duplexen der synthetisierten PNA-Cofaktoren mit komplementären DNA-Sequenzen untersucht und mit den entsprechenden reinen DNA/DNA Duplexen verglichen.

Die Bestimmung wurde an einem Cary 100 Bio Spektrophotometer (Varian) durchgeführt. Für eine Messung werden äquimolare Mengen der komplementären Stränge in 25–100 mM Phosphatpuffer pH 7 gelöst und die Lösung (ca. 900 µL) in eine Quarzküvette überführt. Die PNA- bzw. DNA-Konzentration ist dabei so gewählt, dass die Probe eine Absorption zwischen 0.4–0.6 aufweist und somit dem linearen Bereich des Lambert-Beerschen Gesetz entspricht. Die Probe wird zunächst samt Küvette für ca. 10 min im Ultraschallbad entgast um Luftblasen zu entfernen, die später die Absorptionsmessung stören könnten. Anschließend wird die Probenlösung durch vorsichtiges Überschichten mit Silikonöl versiegelt und die Küvette verschlossen. Durch die Versiegelung soll ein Verdampfen der Lösung beim Erhitzen und somit eine Änderung der Konzentration und die damit verbundene Absorption vermieden werden. Die Messung erfolgt in mehreren Heiz- und Kühlzyklen mit folgenden Parametern: Zyklus 1: zunächst erfolgt ein schnelles Aufheizen und Abkühlen, um eine Hybridisierung der beiden Stränge zu gewährleisten; 15 °C → 90 °C mit 5 °C / min, 90 °C für 5 min, 90 °C → 15 °C mit 5 °C / min, 15 °C für 5 min; Zyklus 2 und 3: nun erfolgt die eigentliche Messung durch langsames Aufheizen und Abkühlen mit einem Gradienten von 0.5 °C / min.

Die resultierenden Schmelzkurven können als eine Funktion der Absorption in Abhängigkeit der Temperatur beschrieben werden (dA / dT). Die Schmelztemperatur T_m entspricht der Temperatur am Maximum der ersten Ableitung dieser Funktion.

5.3.5.3 Charakterisierung von PNA/DNA Duplexen durch Interkalation[157-159]

Mit dem Interkalator $DiSC_2(5)$ (3,3'-Diethylthiadicarbocyanin Iodid, CAS [514-73-8]) können spezifisch PNA-haltige Hybride von DNA und/oder RNA reinen Duplexen unterschieden werden. Hierfür werden die zu hybridisierenden DNA-Stränge (10 µM)

und PNA-Stränge (12 µM) in 5 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5 (50 µL) gelöst, gevortext, für 5 min auf 95 °C erhitzt und die Proben langsam für 15 min bei Raumtemperatur hybridisiert und abgekühlt. Anschließend werden 10 µL einer 0.5 mM Lösung des Farbstoffs in Methanol (hellblau) zugegeben und erneut für 1-2 min auf 95 °C erhitzt. Während des Abkühlens auf Raumtemperatur wurde der Farbumschlag der Proben beobachtet, die bei 95 °C alle eine blaue Färbung zeigen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur bleiben Lösungen mit Einzelsträngen hellblau. Lösungen, die reine DNA/DNA Duplexe enthalten verfärben sich leicht ins Dunkelblaue und Lösungen mit PNA/DNA Hybriden zeigen einen deutlichen Farbumschlag ins Violette.

5.3.5.4 Primer-Elongations in Anwesenheit von PNA

Da der PNA-Cofaktor im 3'-terminalen, konstanten Bereich der RNA-Bibliothek (109mer, Pool 1) hybridisiert, tritt er in Konkurrenz mit dem 3'-terminalen Primer (B), der während der Selektion bei der RT eingesetzt wird. Um zu gewährleisten, dass der Primer den Cofaktor verdrängen kann, wurden zwei verschiedene Primerextension Experimente jeweils mit einem PNA 6mer (**25**, IM03) und 7mer (**24**, IM02) durchgeführt:

a) Primer wird nur halb so konzentriert eingesetzt wie die RNA
→ dies ermöglicht eine komplette Umsetzung des Primers, wenn es zu keiner Störung durch die PNA kommt
b) Primer wird im fünffachen Überschuss zur RNA eingesetzt
→ dies erleichtert gegebenenfalls die Verdrängung der PNA durch den Primer

Dabei wurden bei jedem Experiment zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen von PNA eingesetzt. Durchführung: jeder Ansatz (40 µL) enthält RNA_{109mer} Pool 1 (10 pmol, 0.25 µM), 1 x First-Strand Buffer (Invitrogen; 50 mM Tris-HCl pH 8.3 bei Raumtemperatur, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$), radioaktiv markierter Primer B (0.2 pmol), dNTP Mix (0.5 mM von jedem dNTP), DTT (10 mM) und SuperScript II Reverse Transkriptase (Invitrogen, 10 U/µL).
PNA und Primer wurden nach folgendem Schema zugegeben:
a)

Ansatznummer	**1**	**2**	**3**	**4**	Ansatznummer	**10**	**11**	**12**	**13**	Endkonz.
PNA_{7mer} [pmol]	0	5	10	20	**PNA_{6mer}** [pmol]	0	5	10	20	0-0.5 µM
Primer B [pmol]	5	5	5	5	Primer B [pmol]	5	5	5	5	0.125 µM

b)

Ansatznr.	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	Endkonz.
24 [pmol]	0	10	20	50	100	0-0.5 µM
Primer [pmol]	50	50	50	50	50	0.125 µM

Ansatznr.	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	Endkonz.
25 [pmol]	0	10	20	50	100	0-0.5 µM
Primer [pmol]	50	50	50	50	50	0.125 µM

Zunächst werden RNA, PNA und Puffer gemischt und für 5 min auf 80 °C erhitzt und anschließend zum Hybridisieren auf Eis abgekühlt. Dann werden Primer B (+ radioaktiv markierter Primer B) und dNTPs zugegeben und erneut für 5 min auf 80 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Abschließend erfolgt die Zugabe von DTT und die Probe wird auf 55 °C für 2 min vortemperiert bevor die Reaktion durch Zugabe der Reversen Transkriptase gestartet wird (55 °C, 50 min). Die Analyse der Proben erfolgt mittels Gelelektrophorese mit einem denaturierenden 12 % Polyacrylamid-Gel und eine quantitative Auswertung durch Scannen der Radioaktivität der Banden.

5.3.5.5 Fluoreszenz-Labeling von PNA 24 und 25

Die Peptidnukleinsäuren wurden mit dem NHS-Ester des Farbstoffs TAMRA (5-Carboxy-tetramethylrhodamine *N*-Succinimidylester; CAS [150810-68-7]) am Lysinrest markiert. Hierfür wurden jeweils 10 nmol PNA **24** und **25** in 60 µL Wasser gelöst. Danach wurden 60 µL DMF hinzugefügt, die Lösung mittels 20 µL 1 M $NaHCO_3$-Puffer auf einen pH-Wert von 8 eingestellt und mit 18 µL einer 1 µM Lösung von Farbstoff in DMF versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt mit eiskaltem Ethanol ausgefällt, abzentrifugiert, noch zweimal mit dem Lösungsmittel gewaschen, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Danach wurde das Produkt erneut in Wasser gelöst und überschüssiger Farbstoff mittels Phenol-Extraktion abgetrennt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC aufgereinigt: Lösungsmittel: Acetonitril und Wasser mit Zusatz von je 0.1 % TFA; Gradient: 5 %

ACN → 35 % ACN in 15 min., 35 % → 60 % ACN in 40 min., 60 % → 95 % ACN in 5 min., R_t (**25***) = 15.6 min., R_t (**24***) = 16 min. Die Masse wurde mit MALDI-TOF MS (**25***: *m/z* 2243.8 (berechnet: 2240.9); **24***: *m/z* 2518.8 (berechnet: 2516.02), P/M (SA in TA) = 1/10) überprüft. *mit TAMRA Fluoreszenz-markiert

5.4 In vitro Transkription

Die T7 Transkription ermöglicht die *in vitro* Synthese von Ribonukleinsäuren und wird mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase des T7 Bakteriophagen durchgeführt[48, 49]. Hierfür wird ein doppelsträngiger, 17 Basenpaar langer Erkennungsbereich (T7-Promotor) am 3'Ende des Templates benötigt. Für den Einbau der einzelnen Basen werden Nukleosidtriphosphate (NTP) als Substrate für die T7 Polymerase verwendet. Die RNA-Synthese beginnt dabei stets im Anschluss an die Promoterregion mit einem Guanosinnukleotid. Eine radioaktive Markierung erfolgt durch die Zugabe von α-^{32}P-CTP und ermöglicht eine Quantifizierung der RNA nach folgender Formel:

$$\text{Einbaurate des α-32P-CTP} = \frac{\text{Radioaktivität der RNA [cpm]}}{\text{eingesetzte Gesamtradioaktivität [cpm]}}$$

$$\text{RNA-Stoffmenge} = \frac{\text{Einbaurate} \bullet \text{Endkonzentration CTP} \bullet \text{Ansatzvolumen}}{\text{Anzahl der Cytidine im Transkript}}$$

<u>Herstellung der doppelsträngigen DNA-Matrizen</u>

Das dsDNA Template für das 25mer und 49mer Transkript wurde durch Hybridisierung gleicher Teile des entsprechenden Sense- und Antisense-Stranges hergestellt. Dafür wurden gleiche Stoffmengen der beiden Stränge (z. B. 2 nmol) in 100 µL Transkriptionspuffer (s.u.) gelöst, für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend mit einer Rate von 0.1 °C / s auf 25 °C abgekühlt.

25mer sense

5'- TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGCCTACGAGCCTGAG CC-3'

25mer antisense

5'- GGCTCAGGCTCGTAGGCTGAGCTCCTATAGTGAGTCGTAT TAGA-3'

49mer sense

5'- TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTC-3'

49mer antisense

5’- GCCGAGTATTGCTCCGAAGAGCTGGCACGGCCTCGCCGAAGCGAGCTCC
TATAGTGAGTCGTATTAGA-3’

Die dsDNA Matrize für die 109mer RNA Bibliothek (Pool 1) und für eine 76-78mer RNA Bibliothek (Pool 2) wurde jeweils nach PCR Vervielfältigung einer chemisch synthetisierten ssDNA Bibliothek mit der folgenden Sequenz erhalten:

Pool 1 (RNA_{109mer})
5’- GGAGCTCAGCCTTCACTGC—(N_{70})—GGCACCACGGTCGGATCCAC-3’

Pool 2 ($RNA_{76-78mer}$)
5’- GGAGGGATGATACCAGCCGAAAGGCCCTT—(N_{8-10})—GCCGTGCCAGC
TCTTCGGAGCAATACTCGGCCTGCGTCG-3’

Bei der PCR kamen die folgenden Primer zu Einsatz:

Primer A: 5’-TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGCCTTCACTGC-3’

Primer B: 5’-GTGGATCCGACCGTGGTGCC-3’

Durchführung der *in vitro* Transkription

Trankriptionsreaktionen (50 µL) wurden in einem Buffer mit folgenden Endkonzentrationen durchgeführt: 80 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure (HEPES) (pH 7.5)

22 mM $MgCl_2$, 1 mM Spermidin, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 40 µg/mL bovines Serumalbumin (BSA). Die Konzentration des DNA Templates betrug 0.5 µM. ATP, CTP, GTP und UTP wurden 4 mM eingesetzt. Für eine radioaktive Markierung wurden ~40 µCi α-^{32}P-CTP hinzugegeben. Die Reaktion wurden durch die Zugabe von T7 RNA-Polymerase (Fermentas, Endkonzentration 8 U/µL) gestartet und bei 37 ºC für 4 Stunden im Wasserbad inkubiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde optional nach 2 Stunden nochmals die gleiche Menge an Enzym zugegeben. Für die Quantifizierung der RNA wurde ein Aliquot (1–2 µL) entnommen. Die Transkriptionsreaktion wurde gestoppt, indem mit 0.3 M Natriumacetatpuffer (pH 5.5) bis zu einem Volumen von 400 µL aufgefüllt und 1 mL kalter, absoluter Ethanol hinzugegeben wurde. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugation isoliert und anschließend durch HPLC oder Gelelektrophorese (mit anschließender Gelelution) aufgereinigt. HPLC: Puffer A: 100 mM TEAA pH 7.0 (Triethylammoniumacetat); Puffer B: 100 mM TEAA in 80 %

Acetonitril; Gradient: 5 % Puffer B für 5 min; 5 % → 85 % in 40 min; Detektion durch UV (260 nm) und Radioflow-Detektor (LB 509, Berthold Technologies).

Anmerkung: Transkriptionen von Templates dieser Art ergeben immer in signifikanter Menge das n+1mer RNA-Produkt, welches durch das unspezifische Anhängen eines weiteren Nukleotids durch die Polymerase entsteht.

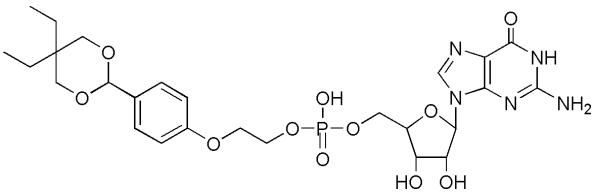
In vitro Transkription mit Initiatornukleotid

Wie bereits erwähnt, beginnt die RNA-Synthese durch die T7-Polymerase immer mit einem Guanosinnukleotid. Dies ermöglicht eine spezifische Modifizierung der RNA an ihrem 5'-Ende durch den Einbau modifizierter Guanosinmonophosphate (GMP), so genannter Initiatornukleotide. Durch die Verwendung von Monophosphaten mit hohem Überschuss im Vergleich zu Guanosintriphosphaten wird eine spezifische Modifikation am 5'-Ende mit einer hohen Einbaurate erreicht. Hierfür wird die Transkription, wie oben beschrieben, durchgeführt, allerdings mit einer angepassten NTP-Konzentration und unter Zugabe des Initiatornukleotids GMP*: ATP, CTP und UTP werden 4 mM eingesetzt, GTP 0.4 mM und das Initiatornukleotid GMP* werden 4 mM verwendet. Der Einbau eines Aldehyd-Initiatornukleotids und eines Guanosin-5'-monophosphorothioat (GMPS) in ein 25mer RNA-Transkript wurde durch MALDI-TOF MS bestätigt:

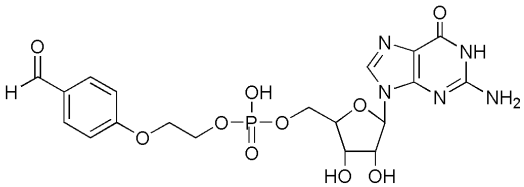
Aldehyd-25mer: m/z 8348.4 $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{254}H_{322}N_{98}O_{177}P_{25}]^+$ 8350.26)

GMPS-25mer: m/z 8105.5 $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{238}H_{300}N_{98}O_{173}P_{25}S]^+$ 8104.09)

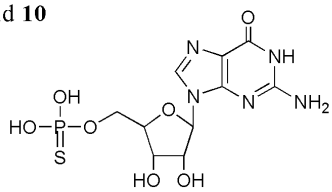
Folgende Initiatornukleotide wurden verwendet:



Aldehyd-Initiatornukleotid **10**



Aldehyd-Initiatornukleotid **15**



Guanosin-5'-monophosphorothioat

Folgende Sequenzen wurden mithilfe der in vitro Transkription hergestellt

25mer

5'-G$^{(*)}$GAGCUCAGCCUACGAGCCUGAGCC-3'

49mer

5'-GGAGCUCGCUUCGGCGAGGCCGUGCCAGCUCUUCGGAGCAAUACUCGG

76-78mer

5'- GGAGGGAUGAUACCAGCCGAAAGGCCCUU—(N_{8-10})—GCCGUGCCAGC UCUUCGGAGCAAUACUCGGCCUGCGUCG-3'

109mer

5'-G$^{(*)}$GAGCUCAGCCUUCACUGC—$(N)_{70}$—GGCACCACGGUCGGAUCCAC-3'

(der optionale Einbau eines Initiatornukleotids am 5'-Ende der RNA während der Transkription ist durch G* markiert; es wurden jeweils modifizierte und nicht modifizierte Transkripte hergestellt)

Stabilität der RNA nach Inkubation mit TFA

Beim Einbau des Acetal-geschützten Initiatornukleotids **10** ist im Anschluss an die Transkription eine Entschützung durch 2 %igen Trifluoressigsäure-Lösung (TFA) notwendig. Hierfür wurde eine Primer-Elongation mit dem TFA-behandelten Transkript als Matrize für die Reverse Transkriptase verwendet. RNA_{109mer} Pool mit und ohne eingebautem Initiatornukleotid (jeweils 10 pmol) wurden durch Aufarbeitung mit 2 % TFA bei 20 °C entschützt. Nach 15 min wurden die Lösungen auf pH 7-8 mit 1 M $NaHCO_3$ Lösung eingestellt und direkt für die Reverse Transkription verwendet. Zu jeder Probe RNA-Pool (10 pmol) wurde 3'-Primer (10 pmol, 5'-^{32}P-markiert, 200000 cpm) zugegeben und das Standard RT Protokoll nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) mit SuperScript™ II Reverse Transkriptase in einem Gesamtvolumen von 40 µL durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des gleichen Volumens an Formamid-Ladepuffer gestoppt. Aliquote wurden mithilfe von 12 % denaturierenden PAGE analysiert (Abb. 3.10).

5.5 Herstellung von RNA-Peptid-Konjugaten

5.5.1 3'-RNA-Peptid-Konjugate

Das 25mer RNA (200 pmol; 4 µM) wurde in 25 µL Natriumperiodatlösung (25 mM) und 25 µL Wasser für 30 min bei 4 °C unter Ausschluss von Licht oxidiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µL Butan-2,3-diol gestoppt und für weitere 15 min bei 4 °C und im Dunkeln geschüttelt. Ethanolfällung wurde durch Zugabe des gleichen Volumens einer 0.3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.5) und des doppelten Volumens kalten Alkohols durchgeführt und anschließend die RNA durch Zentrifugation (10000 rpm, -4 °C, 45 min) isoliert. Das Pellet wurde zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen und anschließend die oxidierte RNA (200 pmol; 4 µM) in 0.3 M Natriumacetat-Puffer pH 5.5 gelöst. Die Konjugationsreaktion wurde durch Zugabe eines Hydrazin-modifizierten Peptids (50 equiv., 200 µM) für 24 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die anschließende Reduktion der Schiff'schen Base wurde $NaBH_4$ (10 mM) hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 30 min auf Eis gegeben. Das Konjugat wurde, wie oben beschrieben, gefällt und mit HPLC aufgereinigt: Puffer A: 100 mM TEAA pH 7.0 (Triethylammoniumacetat); Puffer B: 100 mM TEAA in 80 % Acetonitril; Gradient 5 % B → 40 % B in 10 min, 40 % B → 90 % B in 25 min.

RNA_{25mer} –HNA-PEG_7-Gly-Pro-Arg-Gly-Phe-PEG_7-Lys(Biotin)-Phe-$CONH_2$:R_t = 12.1 min;

MALDI-TOF MS: m/z 10352.5 $[M+H]^+$ (berech. für $[C_{333}H_{453}N_{119}O_{210}P_{27}S]^+$ 10346.11)

5.5.2 5'-RNA-Peptidkonjugate

5.5.2.1 Native Chemical Ligation[148]

Für die Konjugation am 5'-Ende der RNA mittels des Mechanismus der "Native Chemical Ligation" wird GMPS initiierte RNA_{25mer} (200 pmol; 1 µM) mit Phenyl-α-bromothioacetat[173] (10 mM) in Natriumphosphatpuffer (10 mM; pH 6.8) für 1 h bei 37 °C S-alkyliert. Dabei wird $NaBH_4$ (10 mM) für die Reduktion des RNA-S-S-RNA Dimers zugesetzt. Der Überschuss an Alkylierungsreagenz wird durch Chloroformextraktion entfernt. Für die Konjugation werden ein Peptid mit N-terminalen Cystein (50 µM), Thiophenol (1 mM) und Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP, 1 mM)

zum extrahierten Reaktionsansatz zugegeben und lässt über Nacht bei 25 °C reagieren. Das Konjugat wird durch Ethanolfällung isoliert und mittels HPLC aufgereinigt: Puffer A: 100 mM TEAA pH 7.0 (Triethylammoniumacetat); Puffer B: 100 mM TEAA in 80 % Acetonitril; Gradient 5 % B → 25 % B in 10 min, 25 % B → 55 % B in 20 min, 55 % → 90 % B in 10 min.

RNA_{25mer} –Cys-PEG_7-Gly-Pro-Arg-Gly-Phe-PEG_7-Lys(biotin)-Phe-$CONH_2$: R_t = 19.2 min. MALDI-TOF MS: breites Signal um 10300 Da; (berech. $[C_{332}H_{453}N_{117}O_{204}P_{25}S_3]^+$ 10212.13)

5.5.2.2 Kondensation Aldehyd-modifizierter RNA

25mer RNA oder 109mer RNA Pool (50 pmol) wurden durch die Reaktion mit 2% TFA Lösung für 15 min bei 20 °C entschützt. Konjugationsreaktionen wurden durch die Zugabe von 1.6 µL 1 M $NaHCO_3$, 2.4 µL 0.3 M Natriumacetat (pH 5.5) und 1.0 µL einer 2.5 mM Peptidlösung (2.5 nmol, 50 equiv) in einem Endvolumen von 10 µL (Konzentration der RNA 5 µM) durchgeführt. Die Mischung wurde für 4 – 6 Stunden bei 750 rpm und 25 °C geschüttelt. Die Analyse von ^{32}P-markierter Proben und die Produktisolierung wurde mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Für nicht ^{32}P-markierte RNA wurde die Reaktion durch Ethanolfällung gestoppt und die Konjugate mittels HPLC isoliert: Gradient: 5 % Puffer B für 5 min; 5 % → 85 % in 40 min.

RNA_{25mer}–HNA-PEG_7-Gly-Pro-Arg-Gly-Phe-PEG_7-Lys(biotin)-Phe-$CONH_2$: R_t = 22.9 min; MALDI-TOF MS: m/z 10326.7 $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{342}H_{459}N_{119}O_{205}P_{25}S]^+$ 10318.23)

5.6 Immobilisierung von RNA-Peptid-Konjugaten

5.6.1 Immobilisierung von RNA-Peptid-Konjugaten auf Streptavidin

5.6.1.1 Stabilitätsuntersuchungen von RNA-Peptid-Konjugaten auf der Festphase

Vorbereitung des auf Agarose immobilisierten Streptavidin:

100 µL der Harzsuspension (Immobilized Streptavidin, Pierce, 15-28 µg Biotin/mL) wurden in einen Mobicol Zentrifugenfilter übertragen (MoBiTech, Prod.-Nr. M1002; 1 mL Säule), die Flüssigkeit abzentrifugiert (12000 rpm, 1 min), in 200 µL

Immobilisierungspuffer (HEPES 10 mM, NaCl 1 M, EDTA 5 mM, pH 7.2) der 2 mg/mL total tRNA enthält suspendiert, für 10 min bei 25°C inkubiert, zentrifugiert und zweimal mit 200 µL Immobilisierungspuffer gewaschen.

Immobilisierung der Konjugate:

^{32}P-markierte 25mer RNA-Peptid-Konjugate (nach Aufreinigung mittels Gelelektrophorese, 25000 cpm) und 109mer RNA-Peptid-Konjugat (nach Ethanolfällung, 150000 cpm) wurden in 200 µL Immobilisierungspuffer gelöst, zum vorbereiteten (wie oben beschrieben) Streptavidin-Harz und für 30 min bei 25 °C inkubiert.

Waschschritte:

Die ungebundene RNA wird durch Zentrifugation entfernt ("Waschfraktion" Nr. 0) und das Harz 3-5 Mal mit 200 µL Waschpuffer (Tris-HCl 50 mM, Harnstoff 8 M, pH 7.4) und 3-5 Mal mit 200 µL Wasser gewaschen bis die gemessene Radioaktivität in den Waschfraktionen einen Hintergrundwert von < 100 cpm erreicht hat (für das 25mer Konjugate waren dies die Waschfraktionen 1-5, für das 109mer Konjugate 1-6).

Stabilitätstest der immobilisierten Konjugate:

Das Harz wurde wiederum in 200 µL Immobilisierungspuffer suspendiert und die oben beschriebenen Waschschritte wurden für das 25mer Konjugat nach 60 min und nach einer Inkubation über Nacht wiederholt (Nr. 6-10 und 11-18) und für das 109mer Konjugate nach Inkubation über Nacht (Nr. 7-13). Bei allen Messungen war die Radioaktivität im Durchfluss auf Hintergrundniveau.

5.6.1.2 Freisetzung der immobilisierten RNA durch Trypsinspaltung des Peptids

Proteaseverdau:

Das Harz wird in 200 µL NH_4HCO_3 Puffer (100 mM, pH 8.5) suspendiert, 6 µL Trypsin-Lösung (proteomics grade, Sigma, 1 mg/mL in 1 mM HCl, 1:16 (w/w) Enzym-Substrat Verhältnis) wurden zugegeben und der Ansatz wird bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Der Überstand wird durch Zentrifugation entfernt und enthielt 85-90 % der immobilisierten Radioaktivität (für das 25mer Konjugat Fraktion 19, für das 109mer

Konjugat Fraktion 14). Für das 109mer Konjugat wurden zusätzliche Waschschritte (s.o.) durchgeführt (Fraktionen 15-18), um zu gewährleisten, dass die komplette RNA vom Harz gespalten wurde.

Analyse der Verdauprodukte:
Für die Analyse mittels Gelelektrophorese wurde der erhaltene Überstand nach dem Verdau lyophilisiert und in Wasser gelöst, bevor er auf ein 12 % bzw. 18 % denaturierendes Polyacrylamid-Gel geladen wurde. Die Gele wurden über eine Strecke von 20 cm bei 1000 V entwickelt.

5.6.1.3 Proteaseverdau von RNA-Peptid-Konjugaten in Lösung

RNA-Peptid-Konjugat (300 pmol, 6 µM) in 50 µL NH_4HCO_3 Puffer (100 mM, pH 8.5) gelöst und Trypsin (0.1 mg/mL in 1 mM HCl, 1:20 (w/w) Enzym-Substrat Verhältnis) zugegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C für 2 Stunden inkubiert und anschließend das „RNA-Pep“ durch Ethanolfällung isoliert.
Für MALDI MS Messungen des Produkts des Verdaus wurde nicht radioaktiv markiertes, aufgereinigtes 25mer RNA-Peptid-Konjugat verwendet. Das Enzym wurde durch Extraktion mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol 25:24:1 entfernt und die verbleibende RNA anschließend mit Ethanol gefällt. Das Verdauprodukt wurde durch HPLC isoliert (Gradient: 5 % Puffer B für 5 min; 5 % → 85 % in 40 min), lyophilisiert, erneut in Wasser gelöst und durch MALDI-TOF MS analysiert: m/z 9141.4 $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{286}H_{373}N_{109}O_{190}P_{25}]^+$ 9147.63).

5.6.2 Streptavidin-Shift mit Biotin-markierten RNA-Peptid-Konjugaten

Um die Bindung von Biotin markierten Konjugaten an Streptavidin weiter zu charakterisieren, wurden jeweils 10 pmol RNA_{109mer} (Pool 1, radioaktiv), RNA_{109mer}-Peptid Konjugat (radioaktiv, Biotin) und Cy5-RNA_{40mer}-Biotin (0.1 mM, MH 316 oder MH 318; IBA) in 9 µL Wasser gelöst und mit 1 µL Fluoreszenz markiertem Streptavidin (0.1 mg/mL ~ 6 µM; 2.4 equiv., λ_{ex} 655 nm, λ_{em} 680 nm; Atto 655-Streptavidin, Fluka, MW ~ 16.8 kDa, Helm Group) für 20 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend werden die Proben mit Formamid-Ladepuffer versetzt und mit denaturierender 12 % PAGE analysiert. Die Auswertung erfolgte durch Scannen der Radioaktivität als auch der Fluoreszenz.

5.7 Durchführung der *in vitro* Selektion

5.7.1 Transkription

Runde	**1**	**2**	**3**	**4-5; 9-10**	**6-8**
Transkriptionsansatz	10 mL	1.6 mL	500 µL	400 µL	400 L
Menge DNA-Matrize	5 nmol*	~540 pmol**	1/20***	1/10***	1/7***

* die Komplexität des Pools von 1.49 • 10^{15} Sequenzen entspricht 2.47 nmol
** entspricht ca. 20 Kopien der immobilisierten RNA-Sequenzen aus Runde 1
***Anteil der als Matrize eingesetzten Menge an PCR-Produkt aus vorheriger Runde

Protokoll für 100 µL Transkription (ein entsprechendes Vielfaches s.o. wurde verwendet; alle Angaben beziehen sich auf eine Ansatzgröße von 100 µL)

	V (µL)	**Endkonzentration**
DNA Templat	s.o.	<0.5 µM
Transkriptions-Puffer 10x	10	
• TRIS pH 8.1 (25 °C)		40 mM
• Spermidin		1 mM
• $MgCl_2$		22 mM
• Triton-X-100		0.01 %
DTT 100 mM	10	10 mM
BSA 1 mg / mL	4	0.04 mg / mL
NTPs		
• ATP 100 mM	4	4 mM
• CTP 100 mM	4	4 mM
• UTP 100 mM	4	4 mM
• GTP 100 mM	0.4	0.4 mM
Aldehyd-GMP 38 mM	11	4 mM
α-^{32}P-CTP 10 µCi/µL	1-4	10–40 µCi
T7 250 U/µL	4	10 U/µL
Wasser ad 100 µL		

Zunächst wird die entsprechende Menge an Wasser in ein Reaktionsgefäß (1.5 mL, silanisiert, Roth) oder Greiner Röhrchen / Falcon™ Tube (15 oder 50 mL) vorgelegt und dann alle Komponenten in der oben stehenden Reihenfolge zugegeben. Anschließend wird ein Aliquot von 1 µL entnommen. Die Transkription erfolgt während 3-4 Std. bei 37 °C im Wasserbad. Nach zwei Stunden wird erneut die gleiche Menge an Enzym zugegeben. Bei einer erfolgreichen Transkription sollt ein weißer Niederschlag aus Magnesiumpyrophosphat zu erkennen sein. Die Aufreinigung der Transkription erfolgt über PAGE (8-12 %; 2-3 Std. bei 800-1000 V). Dabei kann der Ansatz direkt auf das Gel aufgetragen werden, nachdem ca. 10 µL EDTA-Lösung (0.5 M) zum Auflösen des Niederschlags und 50-100 µL Fomamid-Ladepuffer zugegeben wurden. Bei großen Transkriptionsansätzen (Runde 1) wird zunächst eine Ethanolfällung durchgeführt, das erhaltene Pellet zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, in Wasser unter Zugabe von 0.5 M EDTA-Lösung vollständig gelöst, mit halbem Volumen an FA-Ladepuffer versetzen und aufs Gel aufgetragen. Die Produktbande wird nach Scannen der Radioaktivität ausgeschnitten und die RNA mit 500 µL 0.3 M Natriumacetat Lösung über Nacht bei 25 °C (1000 rpm) aus dem Gel ein erstes Mal eluiert (je nach Größe der Bande erfolgt die Elution in mehreren Eppendorfgefäßen (1.5 mL) parallel). Das Eluat wird filtriert (Pall-Filter) und mit 1 mL EtOH versetzt. (Die Gelstücke werden erneut mit Natriumacetat Lösung versetzt und bei 25 °C ein zweites Mal für ca. 4 Std. eluiert.) Die RNA wird für 2 Std. bei -20 °C gefällt und 30 min bei -5 °C und 12000 rpm zentrifugiert. Die jeweils erhaltenen Pellets werden 1–2x mit 150 µL 80 % EtOH gewaschen und 2–10 min bei -5 °C und 12000 rpm zentrifugiert und anschließend für 10–15 min an der Luft getrocknet. Die RNA wird in Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 25 µM eingestellt und für die Konjugation weiterverwendet.

5.7.2 Konjugation

Runde	**1**	**2**	**3-10**
Menge der umgesetzten RNA	29.5 nmol*	3.6 nmol	1 nmol

* komplette RNA aus der Transkription wurde umgesetzt

Protokoll für die Konjugation von 1 nmol RNA (ein entspr. Vielfaches s.o. wurde verwendet; alle folgenden Angaben beziehen sich auf eine Stoffmenge von 1 nmol)

	V (µL)	**Endkonzentration**
RNA 1 nmol (25 µM)	40	10 µM (7.2 µM)
TFA 10 %	20	2 %
Millipore Wasser	40	
→ 15 min bei 20 °C		
$NaHCO_3$ 1 M	35	pH 7-8
Na-Acetat 3 M pH 5.5	20	0.3 M
Peptid **6** 10 mM 50x Überschuss	5	0.25 mM
Millipore Wasser	40	
Σ	**200**	
→ 4 Std. bei 25 °C und 750 rpm		

Zunächst wird die Aldehydfunktion der RNA in einer 2 % TFA Lösung für 15 min bei 20 °C entschützt. Dabei fällt ein weißer Niederschlag (vermutlich RNA da radioaktiv) aus. ACHTUNG: Die Reaktion jetzt nur noch vortexen, aber nicht zentrifugieren, sonst löst sich der Niederschlag beim anschließenden Neutralisieren nicht wieder vollständig auf! Der pH-Wert wird mit Indikatorpapier überprüft und sollte bei pH 7-8 liegen. Anschließend werden Acetatpuffer und Wasser zugegeben und zuletzt das Peptid **6**. Die Konjugation wird für 4 Std. bei 25 °C mit 750 rpm geschüttelt. Nach der Reaktion wird überschüssiges Peptid durch Ethanolfällung entfernt. Hierfür werden zum Konjugationsansatz 140 µL Wasser, 60 µL Ammoniumacetat-Lösung (5 M) und 1 mL EtOH zugegeben und direkt zentrifugiert (s. o.). Anschließend wird das Pellet 1x mit 80 % EtOH gewaschen und über Nacht bei -20 °C gelagert. Vor der Fällung wurde ein Aliquot aus dem Konjugationsansatzes für die analytischen Kontrolle der Konjugationsreaktion (12 % PAGE) entnommen.

5.7.3 Selektionsreaktion / Spaltungsreaktion

Runde	**1**	**2**	**3-10**
Menge der umgesetzten RNA	29.5 nmol*	3.6 nmol	1 nmol

* komplette RNA aus der Transkription wurde umgesetzt

Da das Konjugat extrem im Reaktionsgefäß klebt, werden zunächst 40 µL PEG (MW 6000, 24 %) und 1x Selektionspuffer (158.5 µL; Zusammensetzung siehe Tabelle) zugegeben und für 5-10 min auf 80 °C erhitzt und gut vortexen. Um zu testen, ob das Konjugat komplett in Lösung ist, wird der komplette Inhalt mit der Eppendorfpipette aufgenommen, dabei sollte keine Radioaktivität im Reaktionsgefäß oder in der Pipettenspitze verbleiben. Dann erst wird die PNA-Aminosäure-Cofaktor (1.5 µL, 0.68 mM, 1 equiv **26**) zuzugeben. Erneut wird auf 80 °C für 5-10 min erhitzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wird für 2 Std. bei 20 °C und 600 rpm geschüttelt.

	1 x Puffer
Natrium Phosphat pH 7	30 mM
Natrium Chlorid	200 mM
Kalium Chlorid	100 mM
Magnesium Chlorid	5 mM
Calcium Chlorid	5 µM
Mangan Chlorid	5 µM

5.7.4 Immobilisierung

Auf Streptavidin mittels Biotin und auf Ni^{2+}-Sepharose mittel His_6-tag

Die aus der Selektionsreaktion erhaltene Konjugat-Lösung wird zunächst auf eine NaCl Konzentration von 1 M eingestellt und anschließend auf das Streptavidin-Harz in einer 1 mL Mobicol-Säule (Mo Bi Tec, Prod.-Nr. M1002) gegeben, das zuvor mit tRNA (2 mg/mL in Immo-Puffer) behandelt wurde (siehe Abschnitt 5.6.1.1). Hierbei wurde ein ca. 10-facher Überschuss an Biotin-Bindungskapazität verwendet. Die Radioaktivität der aufzutragenden Lösung wurde zuvor vermessen und die Radioaktivität des leeren Reaktionsgefäßes davon abgezogen. Dieser Wert ergibt die eingesetzte Menge an Radioaktivität bzw. RNA auf den die Immobilisierungsraten später bezogen werden. Die Selektionslösung wird für 60 min mit Streptavidin-Harz geschüttelt und die Lösung anschließend abzentrifugiert. Während der Inkubation in der Mobicol Säule das Ende immer mit dem mitgelieferten Stopfen verschließen.

Das erhaltene Filtrat wird dann auf Ni^{2+}-Sepharose-Harz gegeben (es wurden ca. 100 µL Suspension pro Spinfilter eingesetzt) und 45 min inkubiert, nachdem es auf eine Konzentration von 40 mM Imidazol eingestellt wurde. Auch dieses Harz wurde zuvor mit tRNA (2 mg/mL in 40 mM Imidazol) behandelt und mit wässriger Imidazol-Lösung (40 mM) gewaschen.

Das Streptavidin-Harz wird nach der Inkubation mit dem Konjugat sechs Mal mit Waschpuffer (Tris-HCl 50 mM, Harnstoff 8 M, pH 7.4) gewaschen und anschließend die Radioaktivität der Fraktionen sowie des Harzes bestimmt. Während der Selektion wurden meist die Waschfraktionen 1-4 ebenfalls auf 40 mM Imidazol eingestellt und nacheinander für 15-30 min mit dem Ni^{2+}-Sepharose-Harz inkubiert. Nachdem das Harz mit allen Waschlösungen inkubiert wurde, wird dieses nun mit 40 mM Imidazol Lösung (wässrig) gewaschen bis die Radioaktivität der Waschfraktionen Background (< 100-300 cpm, abhängig von der eingesetzten Radioaktivität) erreicht. Abschließend wird zwei- bis dreimal mit Wasser nachgewaschen damit das Harz für die Reverse Transkription verwendet werden kann. Von allen Waschfraktionen wird die Radioaktivität bestimmt. Die Radioaktivität der auf dem Ni^{2+} Harz immobilisierten RNA im Bezug auf die eingesetzte Gesamtmenge an RNA ergibt den Anteil an aktiven RNA Spezies pro Selektionsrunde.

5.7.5 Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion

Runde	1	2	3-10
Reverse Transkription Ansatzgröße	1 mL	300 µL	100 µL
Polymerase Kettenreaktion Ansatzgröße	2 mL	600 µL	200 µL

Die RT-PCR wurde nach folgenden optimierten Standardbedingungen durchgeführt (100 µL RT-Ansatz (für 50 µL Harzsuspension), 200 µL PCR-Ansatz). Für Runde 1 und 2 wurden Vielfache der Standardansätze durchgeführt.

Reverse Transkription

RT	V (µL)	Endkonzentration
Harz	50	
Millipore Wasser	54	
3'-Primer	6	6 µM
1st strand buffer 5x	20	50 mM Tris pH 8.3, 25°C 75 mM KCl 3 mM $MgCl_2$
BSA 1 mg/mL	5	0.05 mg/mL
DTT 0.1 M	5	5 mM
dNTP 10 mM each	5	0.5 mM
Reverse Transcriptase 200 U/µL	5	10 U/µL
Σ	**100**	

Das Ni^{2+}-Sepharose-Harz wird in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß (Roth) überführt. Zunächst durch „Schütten“ bzw. „Schnippen“ des Harzes. Der verbleibende Rest in der Mobicol-Säule wird mit 54 µL Millipore Wasser aufgeschlämmt und ebenfalls überführt. Zusammen mit 3'-Primer (B) und Puffer wird die Lösung für 10 min auf 80 °C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Bovines Serumalbumin (BSA), Dithiothreitol (DTT) und eine Mischung der dNTPs werden zugegeben. Der Ansatz wird für 2 min bei 55 °C temperiert und zuletzt die Reaktion durch Zugabe der Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) gestartet (für 1 Std. bei 55 °C mit 550 rpm schütteln).

Polymerase Kettenreaktion

PCR	V (µL)	Endkonzentration
RT-Reaktions-Mix (inkl. Harz)	100	1-1.5 pmol / 20 µL
PCR buffer 10x ohne $MgCl_2$	20	67 mM Tris pH 8.8; 16 mM $(NH_4)_2SO_4$; 0.01 % Tween 20;
$MgCl_2$ 50 mM	24	6 mM
3' primer 100 pmol/µL	2	4 µM
5' primer 100 pmol/µL	8	4 µM
dNTP 10 mM each	5	0.5 mM
Millipore Wasser	37	
Taq pol 5 U/µL	4	0.1 U/µL
Σ	**200**	

Alle Komponenten werden zum Ansatz der Reversen Transkription zugegeben und **inklusive** des Harzes in PCR-Tubes zu je 200 µL überführt. Die PCR wird nach folgendem Protokoll über 8 Zyklen durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	92 °C	2:00 min
2.	92 °C	1:00 min
3.	62 °C	1:00 min
4.	72 °C	1:00 min
5.	Go to 2	**7 times**
6.	72 °C	3:00 min
7.	0 °C	for ever
8.	END	

5.7.6 Analytik des angereicherten Pools der Runde 10

Um eine genauere Aussage über die katalytische Aktivität der RNA Sequenzen aus Selektionsrunde 10 zu bekommen, wurde ein weiterer Zyklus durchgeführt. Dabei wurde allerdings die Länge der Spaltungsreaktion variiert, so dass die Immobilisierung nach 2, 4, 8, und 24 Stunden durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Mengen an radioaktiver RNA auf dem Harz verglichen.

5.7.7 Verbessertes Immobilisierungsprotokoll

Die aus der Selektionsreaktion erhaltene Konjugat-Lösung wird zunächst auf eine NaCl Konzentration von 1 M eingestellt und anschließend auf das Streptavidin-Harz in einer 1 mL Mobicol-Säule (Mo Bi Tec, Prod.-Nr. M1002) gegeben, das zuvor mit tRNA (2mg/ml in Immo-Puffer) behandelt wurde (siehe Abschnitt 5.6.1.1). Hierbei wird ein ca. 10-facher Überschuss an Biotin-Bindungskapazität verwendet. Die Radioaktivität der aufzutragenden Lösung wurde zuvor vermessen und die Radioaktivität des leeren Reaktionsgefäßes davon abgezogen. Dieser Wert ergibt die eingesetzte Menge an Radioaktivität bzw. RNA auf den die Immobilisierungsraten später bezogen werden. Die Selektionslösung wird für 60 min mit Streptavidin-Harz geschüttelt und die Lösung anschließend abzentrifugiert. Das gewonnene Filtrat wird in Analogie zur ersten Immobilisierung ein zweites Mal mit Streptavidin-Agarose inkubiert. Während der Inkubation in der Mobicol Säule das Ende immer mit dem mitgelieferten Stopfen verschließen. Nach beiden Inkubationen wird das jeweilige Streptavidin-Harz 5-6 Mal mit Waschpuffer (Tris-HCl 50 mM, Harnstoff 8 M, pH 7.4) gewaschen und anschließend die Radioaktivität der Fraktionen sowie des Harzes bestimmt. Während der Selektion werden meist das Filtrat des Selektionsansatzes sowie die Waschfraktionen 1-4 für die Immobilisierung auf Ni^{2+}-Sepharose-Harz weiter verwendet. Hierfür werden alle Lösungen zunächst auf 0.3 M NaCl eingestellt und durch Zugabe von Ethanol gefällt. Die nach Zentrifugation erhaltenen Pellets werden mit 80 %igem EtOH gewaschen, für 5-10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 2-3 Mal 200 µL Phosphat-Puffer pH 7.5 (20 mM Na-Phosphat, 0.5 M NaCl, 5 mM Imidazol) gelöst. Dabei können ca. 2 Pellets jeweils vereint werden. Die resultierenden Lösungen werden dann auf Ni^{2+}-Sepharose-Harz gegeben (es wurden ca. 100 µL Suspension pro Spinfilter eingesetzt) und ca. 30 min inkubiert. Auch dieses Harz wurde zuvor mit tRNA (2 mg/mL in Phosphat-Puffer pH 7.5, s. o.) behandelt und gewaschen. Nachdem das Harz mit allen Lösungen inkubiert wurde, wird dieses nun ca. 20 Mal mit Phosphat-Puffer pH 7.5 (s. o.) und anschließend 5 Mal mit Millipore® Wasser gewaschen bis die Radioaktivität der Waschfraktionen Background (< 100-300 cpm, abhängig von der eingesetzten Radioaktivität) erreicht. Das Harz kann nun direkt für die Reverse Transkription eingesetzt werden. Von allen Waschfraktionen wird die

Radioaktivität bestimmt. Die Radioaktivität der auf dem Ni^{2+} Harz immobilisierten RNA im Bezug auf die eingesetzt Gesamtmenge an RNA ergibt den Anteil an aktiven RNA Spezies pro Selektionsrunde.

5.8 DNAzym-Assay

Der DNAzym-Assay ermöglicht Untersuchungen zur Proteaseaktivität der selektierten RNA-Sequenzen. Hierfür werden zunächst nach dem Protokoll der *in vitro* Selektion (siehe Abschnitt 5.7.1 – 5.7.3) Transkription, Konjugation und Selektionsreaktion (8 Std.) parallel für die Sequenzen des Pools aus Runde 1 und Runde 10 durchgeführt. Anschließend erfolgt die Spaltung der RNA durch das 10-23 DNAzym (DNAZ5'Primer10-23; Batch-No. 105234, IBA).

10-23 DNAzym

5'-GCAGTGAAGIGGCTAGCTACAACGATGAGCTCC-3' (I = Inosin)

DNAzym Spaltung

DNAzym Spaltung	**V (µL)**	**Final**
RNA-Konjugat 100 pmol	Pellet	2 µM
10-23 DNAzym 0.1 mM	10	20 µM
5x Puffer	10	50 mM Tris HCl pH 7.5 2 mM $MgCl_2$ 150 mM NaCl
Wasser	30	
Σ	**50**	

Das Pellt des RNA-Konjugats aus der Selektionsreaktion wird in Wasser gelöst und in ein PCR Tube überführt (ggf. muss auf 80 °C erhitzt werden). Dann werden DNAzym und Puffer zugegeben und 20 Spaltungszyklen nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	85 °C	0:30 min
2.	0.5 °C/s	To 37 °C
3.	37 °C	3:00 min
4.	Go to 1	19 times
5.	0 °C	for ever
6.	END	

Gelanalyse

Die Proben aus der DNAzym Spaltung werden bei großen Volumina ggf. mit Ethanol gefällt, ansonsten direkt mit FA-Ladepuffer versetzt und auf ein denaturierendes 20 % Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das Gel wird ca. 5 Std., 1000 V und 45 W über eine Laufstrecke von 40-50 cm entwickelt und anschließend durch Scannen der Radioaktivität analysiert. Durch das Auftragen einer Positivkontrolle (erhalten durch Trypsinspaltung des Peptids, siehe Abschnitt 5.6.1.3) kann die zu erwartende Bande für aktive RNA-Sequenzen lokalisiert werden und die Intensitäten für Runde 1 und 10 verglichen werden.

6 Referenzen

[1] C. R. Darwin, *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle of Life*, John Murray, London, **1859**.

[2] D. R. Mills, R. L. Peterson, S. Spiegelman, Extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule, *PNAS*, **1967**, *58*, 217.

[3] C. R. Woese, *The Genetic Code: The Molecular Basis of Genetic Expression*, Harper & Row, New York, **1967**.

[4] F. H. C. Crick, Origin of the genetic code, *J. Mol. Biol.*, **1968**, *38*, 367.

[5] L. E. Orgel, Evolution of the genetic apparatus, *J. Mol. Biol.*, **1968**, *38*, 381.

[6] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena, *Cell*, **1982**, *31*, 147.

[7] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme, *Cell*, **1983**, *35*, 849.

[8] X. Chen, N. Li, A. D. Ellington, Ribozyme catalysis of metabolism in the RNA world, *Chem. & Biodiv.*, **2007**, *4*, 633.

[9] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 .ANG. resolution, *Science*, **2000**, *289*, 902.

[10] T. A. Steitz, P. B. Moore, RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme, *Trends Biochem. Sci.*, **2003**, *28*, 411.

[11] W. G. Scott, Ribozymes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2007**, *17*, 280.

[12] D. J. Klein, A. R. Ferre-D'Amare, Structural Basis of glmS Ribozyme Activation by Glucosamine-6-Phosphate, *Science*, **2006**, *313*, 1752.

[13] W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme, *Nature*, **2004**, *428*, 281.

[14] J. A. Doudna, T. R. Cech, The chemical repertoire of natural ribozymes, *Nature*, **2002**, *418*, 222.

[15] S. Valadkhan, J. L. Manley, Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs, *Nature*, **2001**, *413*, 701.

[16] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, **1990**, *249*, 505.

[17] A. D. Ellington, J. W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, **1990**, *346*, 818.

[18] G. F. Joyce, Amplification, mutation and selection of catalytic RNA, *Gene*, **1989**, *82*, 83.

[19] D. P. Bartel, J. W. Szostak, Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences, *Science*, **1993**, *261*, 1411.

[20] M. P. Robertson, A. D. Ellington, In vitro selection of an allosteric ribozyme that transduces analytes to amplicons, *Nature Biotechn.*, **1999**, *17*, 62.

[21] E. H. Ekland, J. W. Szostak, D. P. Bartel, Structurally complex and highly active RNA ligases derived from random RNA sequences, *Science*, **1995**, *269*, 364.

[22] K. B. Chapman, J. W. Szostak, Isolation of a ribozyme with 5'-5' ligase activity, *Chem. & Biol.*, **1995**, *2*, 325.
[23] A. J. Hager, J. W. Szostak, Isolation of novel ribozymes that ligate AMP-activated RNA substrates, *Chem. Biol.*, **1997**, *4*, 607.
[24] E. H. Ekland, D. P. Bartel, RNA-catalyzed RNA polymerization using nucleoside triphosphates, *Nature*, **1996**, *382*, 373.
[25] W. K. Johnston, P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner, D. P. Bartel, RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension, *Science*, **2001**, *292*, 1319.
[26] M. S. Lawrence, D. P. Bartel, New ligase-derived RNA polymerase ribozymes, *RNA*, **2005**, *11*, 1173.
[27] F. Huang, C. W. Bugg, M. Yarus, RNA-Catalyzed CoA, NAD, and FAD Synthesis from Phosphopantetheine, NMN, and FMN, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 15548.
[28] F. Huang, M. Yarus, 5'-RNA self-capping from guanosine diphosphate, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 6557.
[29] F. Huang, M. Yarus, Versatile 5' phosphoryl coupling of small and large molecules to an RNA, *PNAS*, **1997**, *94*, 8965.
[30] S. Tsukiji, S. B. Pattnaik, H. Suga, An alcohol dehydrogenase ribozyme, *Nature Struct. Biol.*, **2003**, *10*, 713.
[31] S. Tsukiji, S. B. Pattnaik, H. Suga, Reduction of an Aldehyde by a NADH/Zn2+-Dependent Redox Active Ribozyme, *JACS*, **2004**, *126*, 5044.
[32] V. R. Jadhav, M. Yarus, Acyl-CoAs from Coenzyme Ribozymes, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 723.
[33] R. K. Kumar, M. Yarus, RNA-Catalyzed Amino Acid Activation, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 6998.
[34] T. M. Coleman, F. Huang, RNA-Catalyzed Thioester Synthesis, *Chem. & Biol.*, **2002**, *9*, 1227.
[35] M. Illangasekare, G. Sanchez, T. Nickles, M. Yarus, Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA, *Science*, **1995**, *267*, 643.
[36] H. Saito, D. Kourouklis, H. Suga, An in vitro evolved precursor tRNA with aminoacylation activity, *EMBO J.*, **2001**, *20*, 1797.
[37] N. Li, F. Huang, Ribozyme-Catalyzed Aminoacylation from CoA Thioesters, *Biochemistry*, **2005**, *44*, 4582.
[38] T. W. Wiegand, R. C. Janssen, B. E. Eaton, Selection of RNA amide synthases, *Chem. & Biol.*, **1997**, *4*, 675.
[39] B. Zhang, T. R. Cech, Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes, *Nature*, **1997**, *390*, 96.
[40] L. Sun, Z. Cui, R. L. Gottlieb, B. Zhang, A Selected Ribozyme Catalyzing Diverse Dipeptide Synthesis, *Chem. & Biol.*, **2002**, *9*, 619.
[41] M. Illangasekare, M. Yarus, A tiny RNA that catalyzes both aminoacyl-RNA and peptidyl-RNA synthesis, *RNA*, **1999**, *5*, 1482.
[42] P. A. Lohse, J. W. Szostak, Ribozyme-catalyzed amino-acid transfer reactions, *Nature*, **1996**, *381*, 442.
[43] A. Jenne, M. Famulok, A novel ribozyme with ester transferase activity, *Chem. & Biol.*, **1998**, *5*, 23.
[44] P. J. Unrau, D. P. Bartel, RNA-catalyzed nucleotide synthesis, *Nature*, **1998**, *395*, 260.

[45] Y. Ryu, K.-J. Kim, C. A. Roessner, A. I. Scott, Decarboxylative Claisen condensation catalyzed by in vitro selected ribozymes, *Chem. Comm.*, **2006**, 1439.
[46] S. Fusz, A. Eisenfuehr, S. G. Srivatsan, A. Heckel, M. Famulok, A Ribozyme for the Aldol Reaction, *Chem. & Biol.*, **2005**, *12*, 941.
[47] R. Green, A. D. Ellington, D. P. Bartel, J. W. Szostak, In vitro genetic analysis: selection and amplification of rare functional nucleic acids, *Methods*, **1991**, *2*, 75.
[48] J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck, Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates, *NAR*, **1987**, *15*, 8783.
[49] J. F. Milligan, O. C. Uhlenbeck, Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase, *Methods in Enzymology*, **1989**, *180*, 51.
[50] J. R. Prudent, T. Uno, P. G. Schultz, Expanding the scope of RNA catalysis, *Science*, **1994**, *264*, 1924.
[51] M. M. Conn, J. R. Prudent, P. G. Schultz, Porphyrin Metalation Catalyzed by a Small RNA Molecule, *JACS*, **1996**, *118*, 7012.
[52] Y. Li, D. Sen, A catalytic DNA for porphyrin metallation, *Nat. Struct. Biol.*, **1996**, *3*, 743.
[53] S.-M. Chun, S. Jeong, J.-M. Kim, B.-O. Chong, Y.-K. Park, H. Park, J. Yu, Cholesterol Esterase Activity by in Vitro Selection of RNA against a Phosphate Transition-State Analogue, *JACS*, **1999**, *121*, 10844.
[54] N. Kawazoe, N. Teramoto, H. Ichinari, Y. Imanishi, Y. Ito, In vitro selection of nonnatural ribozyme-catalyzing porphyrin metalation, *Biomacromol.*, **2001**, *2*, 681.
[55] B. Seelig, A. Jaschke, A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity, *Chem. & Biol.*, **1999**, *6*, 167.
[56] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, RNA-catalyzed carbon-carbon bond formation, *Nature*, **1997**, *389*, 54.
[57] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, Functional Aptamers and Aptazymes in Biotechnology, Diagnostics, and Therapy, *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 3715.
[58] D. S. Wilson, J. W. Szostak, In vitro selection of functional nucleic acids, *Annu. Rev. Biochem.*, **1999**, *68*, 611.
[59] J. C. Achenbach, W. Chiuman, R. P. G. Cruz, Y. Li, DNAzymes: From creation in vitro to application in vivo, *Curr. Pharm. Biotech.*, **2004**, *5*, 321.
[60] S. K. Silverman, Deoxyribozymes: DNA catalysts for bioorganic chemistry, *Org. & Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 2701.
[61] S. K. Silverman, In vitro selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA, *NAR*, **2005**, *33*, 6151.
[62] R. R. Breaker, DNA aptamers and DNA enzymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1997**, *1*, 26.
[63] R. R. Breaker, G. F. Joyce, A DNA enzyme that cleaves RNA, *Chem. & Biol.*, **1994**, *1*, 223.
[64] M. Chandra, S. K. Silverman, DNA and RNA Can Be Equally Efficient Catalysts for Carbon-Carbon Bond Formation, *JACS*, **2008**.
[65] S. W. Santoro, G. F. Joyce, A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme, *PNAS*, **1997**, *94*, 4262.
[66] G. F. Joyce, Directed evolution of nucleic acid enzymes, *Ann. Rev. Biochem.*, **2004**, *73*, 791.

[67] S. W. Santoro, G. F. Joyce, K. Sakthivel, S. Gramatikova, C. F. Barbas, III, RNA Cleavage by a DNA Enzyme with Extended Chemical Functionality, *JACS*, **2000**, *122*, 2433.

[68] M. A. Catry, A. Madder, Synthesis of functionalised nucleosides for incorporation into nucleic acid-based serine protease mimics, *Molecules*, **2007**, *12*, 114.

[69] A. Roth, R. R. Breaker, An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide, *PNAS*, **1998**, *95*, 6027.

[70] C. Hoebartner, P. I. Pradeepkumar, S. K. Silverman, Site-selective depurination by a periodate-dependent deoxyribozyme, *Chem. Comm.*, **2007**, 2255.

[71] J. M. T. Berg, John L.; Stryer, Lubert, *Biochemie, Vol. 5. Auflage*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin [u.a.], **2003**.

[72] M. V. Rodnina, M. Beringer, W. Wintermeyer, How ribosomes make peptide bonds, *Trends Biochem. Sci.*, **2007**, *32*, 20.

[73] D. Kahne, W. C. Still, Hydrolysis of a peptide bond in neutral water, *JACS*, **1988**, *110*, 7529.

[74] R. A. R. Bryant, D. E. Hansen, Direct Measurement of the Uncatalyzed Rate of Hydrolysis of a Peptide Bond, *JACS*, **1996**, *118*, 5498.

[75] R. M. Smith, D. E. Hansen, The pH-Rate Profile for the Hydrolysis of a Peptide Bond, *JACS*, **1998**, *120*, 8910.

[76] A. Radzicka, R. Wolfenden, Rates of Uncatalyzed Peptide Bond Hydrolysis in Neutral Solution and the Transition State Affinities of Proteases, *JACS*, **1996**, *118*, 6105.

[77] R. Wolfenden, Degrees of difficulty of water-consuming reactions in the absence of enzymes, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 3379.

[78] L. Hedstrom, Serine Protease Mechanism and Specificity, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 4501.

[79] J. Kraut, Serine proteases: structure and mechanism of catalysis, *Ann. Rev. Biochem.*, **1977**, *46*, 331.

[80] J. Kraut, How do enzymes work?, *Science*, **1988**, *242*, 533.

[81] R. M. Stroud, Family of protein-cutting proteins, *Scientific American*, **1974**, *231*, 74.

[82] D. M. Blow, J. J. Birktoft, B. S. Hartley, Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin, *Nature*, **1969**, *221*, 337.

[83] B. W. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson, D. M. Blow, Three-dimensional structure of tosyl-a-chymotrypsin, *Nature*, **1967**, *214*, 652.

[84] D. M. Blow, The tortuous story of Asp...His...Ser: structural analysis of a-chymotrypsin, *Trends Biochem. Sci.*, **1997**, *22*, 405.

[85] C. N. Fuhrmann, M. D. Daugherty, D. A. Agard, Subangstrom Crystallography Reveals that Short Ionic Hydrogen Bonds, and Not a His-Asp Low-Barrier Hydrogen Bond, Stabilize the Transition State in Serine Protease Catalysis, *JACS*, **2006**, *128*, 9086.

[86] J. Fastrez, A. R. Fersht, Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin, *Biochemistry*, **1973**, *12*, 2025.

[87] S. Erhan, L. D. Greller, Do immunoglobulins have proteolytic activity?, *Nature*, **1974**, *251*, 353.

[88] C. V. Hanson, Y. Nishiyama, S. Paul, Catalytic antibodies and their applications, *Curr. Opin. Biotech.*, **2005**, *16*, 631.

[89] J. D. Stevenson, N. R. Thomas, Catalytic antibodies and other biomimetic catalysts, *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, *17*, 535.
[90] F. Tanaka, Catalytic Antibodies as Designer Proteases and Esterases, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 4885.
[91] Y. Xu, N. Yamamoto, K. D. Janda, Catalytic antibodies: hapten design strategies and screening methods, *Bioorg. & Med. Chem.*, **2004**, *12*, 5247.
[92] S. Paul, Y. Nishiyama, S. Planque, S. Karle, H. Taguchi, C. Hanson, M. E. Weksler, Antibodies as defensive enzymes, *Springer Seminars in Immunopathology*, **2005**, *26*, 485.
[93] W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology (McGraw-Hill Series in Advanced Chemistry)*, **1969**.
[94] A. Tramontano, K. D. Janda, R. A. Lerner, Catalytic antibodies, *Science*, **1986**, *234*, 1566.
[95] S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, Selective chemical catalysis by an antibody, *Science*, **1986**, *234*, 1570.
[96] Y. Mitsuda, E. Hifumi, K. Tsuruhata, H. Fujinami, N. Yamamoto, T. Uda, Catalytic antibody light chain capable of cleaving a chemokine receptor CCR-5 peptide with a high reaction rate constant, *Biotech. Bioeng.*, **2004**, *86*, 217.
[97] N. Okochi, M. Kato-Murai, T. Kadonosono, M. Ueda, Design of a serine protease-like catalytic triad on an antibody light chain displayed on the yeast cell surface, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **2007**, *77*, 597.
[98] Y. Murakami, J.-i. Kikuchi, Y. Hisaeda, O. Hayashida, Artificial Enzymes, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 721.
[99] W. B. Motherwell, M. J. Bingham, Y. Six, Recent progress in the design and synthesis of artificial enzymes, *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 4663.
[100] A. J. Kirby, Enzyme mechanisms, models, and mimics, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1996**, *35*, 707.
[101] M. J. Olsen, D. Stephens, D. Griffiths, P. Daugherty, G. Georgiou, B. L. Iverson, Function-based isolation of novel enzymes from a large library, *Nature Biotechn.*, **2000**, *18*, 1071.
[102] S. V. Taylor, P. Kast, D. Hilvert, Investigating and engineering enzymes by genetic selection, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 3310.
[103] T. Matsuura, T. Yomo, In vitro evolution of proteins, *J. Biosci. Bioeng.*, **2006**, *101*, 449.
[104] E. Quemeneur, M. Moutiez, J.-B. Charbonnier, A. Menez, Engineering cyclophilin into a proline-specific endopeptidase, *Nature*, **1998**, *391*, 301.
[105] G. Wulff, Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 1.
[106] B. S. Lele, M. G. Kulkarni, R. A. Mashelkar, Molecularly imprinted polymer mimics of chymotrypsin. 1. Cooperative effects and substrate specificity, *React. & Funct. Polymers*, **1999**, *39*, 37.
[107] B. S. Lele, M. G. Kulkarni, R. A. Mashelkar, Molecularly imprinted polymer mimics of chymotrypsin 2. Functional monomers and hydrolytic activity, *React. & Funct. Polymers*, **1999**, *40*, 215.
[108] A. Madder, L. Li, H. De Muynck, N. Farcy, D. Van Haver, F. Fant, G. Vanhoenacker, P. Sandra, A. P. Davis, P. J. De Clercq, Evaluation of a two-stage screening procedure in the combinatorial search for serine protease-like activity, *J. Comb. Chem.*, **2002**, *4*, 552.

[109] A. Gea, N. Farcy, M. Roque i Rossell, J. C. Martins, P. J. De Clercq, A. Madder, Solid-supported synthesis of highly functionalized tripodal peptides with flexible but preorganized geometry: towards potential serine protease mimics, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 4135.

[110] T. Darbre, J.-L. Reymond, Peptide Dendrimers as Artificial Enzymes, Receptors, and Drug-Delivery Agents, *Acc. Chem. Research*, **2006**, *39*, 925.

[111] K. Sadler, J. P. Tam, Peptide dendrimers: applications and synthesis, *Rev. Mol. Biotech.*, **2002**, *90*, 195.

[112] K. W. Hahn, W. A. Klis, J. M. Stewart, Design and synthesis of a peptide having chymotrypsin-like esterase activity, *Science*, **1990**, *248*, 1544.

[113] M. J. Corey, E. Hallakova, K. Pugh, J. M. Stewart, Studies on chymotrypsin-like catalysis by synthetic peptides, *Appl. Biochem. Biotech.* , **1994**, *47*, 199.

[114] M. Z. Atassi, T. Manshouri, Design of peptide enzymes (pepzymes): surface-simulation synthetic peptides that mimic the chymotrypsin and trypsin active sites exhibit the activity and specificity of the respective enzyme, *PNAS*, **1993**, *90*, 8282.

[115] B. W. Matthews, C. S. Craik, H. Neurath, Can small cyclic peptides have the activity and specificity of proteolytic enzymes?, *PNAS*, **1994**, *91*, 4103.

[116] D. R. Corey, M. A. Phillips, Cyclic peptides as proteases: a reevaluation, *PNAS*, **1994**, *91*, 4106.

[117] J. A. Wells, W. J. Fairbrother, J. Otlewski, M. Laskowski, Jr., J. Burnier, A reinvestigation of a synthetic peptide (TrPepz) designed to mimic trypsin, *PNAS*, **1994**, *91*, 4110.

[118] M. J. Corey, E. Corey, On the failure of de novo-designed peptides as biocatalysts, *PNAS*, **1996**, *93*, 11428.

[119] K. S. Broo, H. Nilsson, J. Nilsson, A. Flodberg, L. Baltzer, Cooperative Nucleophilic and General-Acid Catalysis by the HisH+-His Pair and Arginine Transition State Binding in Catalysis of Ester Hydrolysis Reactions by Designed Helix-Loop-Helix Motifs, *JACS*, **1998**, *120*, 4063.

[120] L. Baltzer, K. S. Broo, De novo designed polypeptide catalysts with adopted folded structures, *Biopolymers*, **1998**, *47*, 31.

[121] A. Stavrakoudis, S. Makropoulou, V. Tsikaris, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, I. N. Demetropoulos, Computational screening of branched cyclic peptide motifs as potential enzyme mimetics, *J. Pept. Sci.*, **2003**, *9*, 145.

[122] R. Breslow, S. D. Dong, Biomimetic Reactions Catalyzed by Cyclodextrins and Their Derivatives, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 1997.

[123] R. Breslow, Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes: Catalysis by Design, *Acc. Chem. Research*, **1995**, *28*, 146.

[124] M. Komiyama, M. L. Bender, Cyclodextrin-catalyzed hydrolyses of acetanilides, *JACS*, **1977**, *99*, 8021.

[125] A. Granados, R. H. De Rossi, Effect of cyclodextrins on the hydrolysis of amides, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 1771.

[126] D. R. J. Palmer, E. Buncel, G. R. J. Thatcher, Re-Evaluation of Cyclodextrin as a Model of Chymotrypsin: Acceleration and Inhibition of Tertiary Anilide Hydrolysis, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 5286.

[127] A. Granados, R. H. de Rossi, Multiple Pathways in Cyclodextrin-Catalyzed Hydrolysis of Perfluoroalkylamides, *JACS*, **1995**, *117*, 3690.

[128] H. Tsutsumi, K. Hamasaki, H. Mihara, A. Ueno, Cyclodextrin-peptide hybrid as a hydrolytic catalyst having multiple functional groups, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 741.
[129] R. Pascal, Catalysis through induced intramolecularity: What can be learned by mimicking enzymes with carbonyl compounds that covalently bind substrates?, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 1813.
[130] B. Seelig, J. W. Szostak, Selection and evolution of enzymes from a partially randomized non-catalytic scaffold, *Nature*, **2007**, *448*, 828.
[131] R. B. Merrifield, Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *JACS*, **1963**, *85*, 2149.
[132] S. I. Kirin, F. Noor, N. Metzler-Nolte, Manual solid-phase peptide synthesis of metallocene-peptide bioconjugates, *J. Chem. Edu.*, **2006**, *84*, 108.
[133] S. Pfander, R. Fiammengo, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, A. Jaeschke, Reversible site-specific tagging of enzymatically synthesized RNAs using aldehyde-hydrazine chemistry and protease-cleavable linkers, *NAR*, **2007**, *35*, e25/1.
[134] C. Pitulle, R. G. Kleineidam, B. Sproat, G. Krupp, Initiator oligonucleotides for the combination of chemical and enzymic RNA synthesis, *Gene*, **1992**, *112*, 101.
[135] R. Fiammengo, K. Musilek, A. Jaeschke, Efficient Preparation of Organic Substrate-RNA Conjugates via in Vitro Transcription, *JACS*, **2005**, *127*, 9271.
[136] L. Zhang, L. Sun, Z. Cui, R. L. Gottlieb, B. Zhang, 5'-sulfhydryl-modified RNA: initiator synthesis, in vitro transcription, and enzymatic incorporation, *Bioconjug. Chem.*, **2001**, *12*, 939.
[137] B. Seelig, A. Jaschke, Ternary conjugates of guanosine monophosphate as initiator nucleotides for the enzymatic synthesis of 5'-modified RNAs, *Bioconjug. Chem.*, **1999**, *10*, 371.
[138] A. Eisenfuhr, P. S. Arora, G. Sengle, L. R. Takaoka, J. S. Nowick, M. Famulok, A Ribozyme with Michaelase Activity: Synthesis of the Substrate Precursors, *Bioorg. & Med. Chem.*, **2003**, *11*, 235.
[139] G. Sengle, A. Eisenfuhr, P. S. Arora, J. S. Nowick, M. Famulok, Novel RNA catalysts for the Michael reaction, *Chem. & Biol.*, **2001**, *8*, 459.
[140] M. A. Podyminogin, E. A. Lukhtanov, M. W. Reed, Attachment of benzaldehyde-modified oligodeoxynucleotide probes to semicarbazide-coated glass, *NAR*, **2001**, *29*, 5090.
[141] F. W. Kotch, V. Sidorov, Y.-F. Lam, K. J. Kayser, H. Li, M. S. Kaucher, J. T. Davis, Water-Mediated Association Provides an Ion Pair Receptor, *JACS*, **2003**, *125*, 15140.
[142] X.-F. Zhu, H. J. Williams, A. I. Scott, Facile and highly selective 5'-desilylation of multi-silylated nucleosides, *Perkin 1*, **2000**, 2305.
[143] M. Riva, A. R. Schaffner, A. Sentenac, G. R. Hartmann, A. A. Mustaev, E. F. Zaychikov, M. A. Grachev, Active site labeling of the RNA polymerases A, B, and C from yeast, *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 14377.
[144] F. Hansske, F. Cramer, Modification of the 3' terminus of tRNA by periodate oxidation and subsequent reaction with hydrazides, *Methods in Enzymology*, **1979**, *59*, 172.
[145] T. S. Zatsepin, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, Use of Carbonyl Group Addition-Elimination Reactions for Synthesis of Nucleic Acid Conjugates, *Bioconjug. Chem.*, **2005**, *16*, 471.

[146] G. L. Igloi, H. Koessel, Use of boronate-containing gels for electrophoretic analysis of both ends of RNA molecules, *Methods in Enzymology*, **1987**, *155*, 433.
[147] E. N. Timofeev, S. V. Kochetkova, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev, Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels, *NAR*, **1996**, *24*, 3142.
[148] M. McPherson, M. C. Wright, P. A. Lohse, Synthesis of an RNA-peptide conjugate by orthogonal ligation, *Synlett*, **1999**, 978.
[149] G. L. Igloi, Interaction of tRNAs and of phosphorothioate-substituted nucleic acids with an organomercurial. Probing the chemical environment of thiolated residues by affinity electrophoresis, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 3842.
[150] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science. Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, 3Rev Ed ed., Freeman WH New York, **1998**.
[151] B. Hyrup, P. E. Nielsen, Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications, *Bioorg. & Med. Chem.*, **1996**, *4*, 5.
[152] T. Ratilainen, A. Holmen, E. Tuite, G. Haaima, L. Christensen, P. E. Nielsen, B. Norden, Hybridization of peptide nucleic acid, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 12331.
[153] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide, *Science*, **1991**, *254*, 1497.
[154] A. Serganov, S. Keiper, L. Malinina, V. Tereshko, E. Skripkin, C. Hoebartner, A. Polonskaia, A. T. Phan, R. Wombacher, R. Micura, Z. Dauter, A. Jaeschke, D. J. Patel, Structural basis for Diels-Alder ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation, *Nature Struct. & Mol. Biol.*, **2005**, *12*, 218.
[155] B. D. Gildea, S. Casey, J. NacNeill, H. Perry-O'Keefe, D. Sorensen, J. M. Coull, PNA solubility enhancers, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 7255.
[156] J. D. Puglisi, I. Tinoco, Jr., Absorbance melting curves of RNA, *Methods in Enzymology*, **1989**, *180*, 304.
[157] J. O. Smith, D. A. Olson, B. A. Armitage, Molecular Recognition of PNA-Containing Hybrids: Spontaneous Assembly of Helical Cyanine Dye Aggregates on PNA Templates, *JACS*, **1999**, *121*, 2686.
[158] L. M. Wilhelmsson, B. Norden, K. Mukherjee, M. T. Dulay, R. N. Zarel, Genetic screening using the color change of a PNA-DNA hybrid-binding cyanine dye, *NAR*, **2002**, *30*, e3/1.
[159] M. Komiyama, S. Ye, X. Liang, Y. Yamamoto, T. Tomita, J.-M. Zhou, H. Aburatani, PNA for one-base differentiating protection of DNA from nuclease and its use for SNPs detection, *JACS*, **2003**, *125*, 3758.
[160] M. J. Cairns, A. King, L. Q. Sun, Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites, *NAR*, **2003**, *31*, 2883.
[161] R. M. Buckland, Strong signals from streptavidin-biotin, *Nature*, **1986**, *320*, 557.
[162] C. L. Smith, J. S. Milea, G. H. Nguyen, Immobilization of nucleic acids using biotin-strept(avidin) systems, *Top. Curr. Chem.*, **2005**, *261*, 63.
[163] T. Carell, Philipps-Universität Marburg, **WS 2000/2001**.
[164] F. M. Alves, I. Y. Hirata, I. E. Gouvea, M. F. M. Alves, M. Meldal, D. Broemme, L. Juliano, M. A. Juliano, Controlled Peptide Solvation in Portion-Mixing Libraries of FRET Peptides: Improved Specificity Determination for

Dengue 2 Virus NS2B-NS3 Protease and Human Cathepsin S, *J. Comb. Chem.*, **2007**, *9*, 627.

[165] S. Grahn, D. Ullmann, H. D. Jakubke, Design and synthesis of fluorogenic trypsin peptide substrates based on resonance energy transfer, *Anal. Biochem.*, **1998**, *265*, 225.

[166] E. J. Enyedy, I. M. Kovach, Proton Inventory Studies of a-Thrombin-Catalyzed Reactions of Substrates with Selected P and P' Sites, *JACS*, **2004**, *126*, 6017.

[167] C. E. Yoo, P. S. Chae, J. E. Kim, E. J. Jeong, J. Suh, Degradation of myoglobin by polymeric artificial metalloproteases containing catalytic modules with various catalytic group densities: site selectivity in peptide bond cleavage, *JACS*, **2003**, *125*, 14580.

[168] U. Scheffer, A. Strick, V. Ludwig, S. Peter, E. Kalden, M. W. Gobel, Metal-free catalysts for the hydrolysis of RNA derived from guanidines, 2-aminopyridines, and 2-aminobenzimidazoles, *JACS*, **2005**, *127*, 2211.

[169] B. N. Trawick, A. T. Daniher, J. K. Bashkin, Inorganic Mimics of Ribonucleases and Ribozymes: From Random Cleavage to Sequence-Specific Chemistry to Catalytic Antisense Drugs, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 939.

[170] M. Oivanen, S. Kuusela, H. Lonnberg, Kinetics and Mechanisms for the Cleavage and Isomerization of the Phosphodiester Bonds of RNA by Bronsted Acids and Bases, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 961.

[171] F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1*, John Wiley & Sons, Inc., **2004**.

[172] J. Sambrook, D. W. Russel, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Vol. 1-3*, Cold Spring Harbor, New York, **2001**.

[173] C. Gennari, A. Vulpetti, G. Pain, Highly enantio- and diastereoselective boron aldol reactions of a-heterosubstituted thioacetates with aldehydes and silyl imines, *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 5909.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AMP	Adenosinmonophosphat
APB	N-Acryloyl-3-aminophenyl-Boronsäure
APM	N-Acryloylaminophenyl-Quecksilberchlorid
Arg, R	Arginin
AS	Aminosäure
Asp, A	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Basenpaarleiter
BSA	Bovines Serumalbumin
CAb	Katalytischer Antikörper
cDNA	complementary DNA
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
DIPEA	Diisopropylethylamin
$DiSC_2(5)$	3,3'-Diethylthiadicarbocyanin
DMF	*N,N'*-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
equiv.	Äquivalent
ESI	Elektronensprayionisation
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
FAB	Fast Atom Bombardment

Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl-
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
glmS	Glucosamin
Gly, G	Glycin
GMP	Guanosinmonophosphat
GMPS	Guanosinphosphorothioat
GTP	Guanosintriphosphat
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His, H	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HNA	Hydrazin-Nikotinsäure
HPLC	High Perssure Liquid Chromatography
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante
k_M	Michaelis-Menten-Konstante
Lys, K	Lysin
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight
MS	Massenspektroskopie
NAD^+/NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NAP	Nucleic Acid Purification
NHS	N-Hydroxysuccinimid Ester
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernspinresonanz
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Phe, F	Phenylalanin
PNA	Peptide Nucleic Acid
Pro, P	Prolin
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reverse Phase, Umkehrphase
rpm	rotations per minute
rRNA	ribosomale RNA
Rt	Raumtemperatur

RT	Reverse Transkription
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
Ser, S	Serin
snRNA	small nuclear RNA
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	*tert*-Butyldimethylsilyl-
TBHP	*tert*-Butylhydroperoxid
TBTU	2-(1*H*-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborat
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
T_m	Schmelztemperatur
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol, Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett

7.2 Publikationen

Reversible site-specific tagging of enzymatically synthesized RNAs using aldehyde–hydrazine chemistry and protease-cleavable linkers

S. Pfander, R. Fiammengo, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte and A. Jäschke

Nucleic Acid Research; **2007**; 35 (4); e25

***In vitro* Selektion von Protease ähnlichen Ribozymen**

S. Pfander, A. Jäschke

Vortrag

Präsentiert Oktober 2007 bei der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) in Erlangen

Reversible and site-specific labeling of enzymatically synthesized RNA

S. Pfander, R. Fiammengo, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, A. Jäschke

Poster

Präsentiert Oktober 2006 bei der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) in Marburg

Chemoenzymatic synthesis of complex multifunctional RNA-peptide conjugates for the *in vitro* selection of protease ribozymes

S. Pfander, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte & A. Jäschke

Poster

Präsentiert Juni 2005 bei der “2nd Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School” in Odense, Dänemark und Oktober 2005 bei der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) in Mainz