Multifunktionale Nukleinsäure-Konjugate zur Selektion von katalytischen Oligonukleotiden

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Felix Hausch

geb. am 21.2.1971

in Stuttgart

April 2000

Diese Arbeit wurde in der Zeit von November 1996 bis März 2000 am Institut für Chemie/Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt. Der Verfasser versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

Gutachter: Prof. Dr. V. A. Erdmann
Prof. Dr. H.-U. Reißig

Tag der Disputation: 26. Juni 2000

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Dr. Andres Jäschke für die interessante Themenstellung und für sein intensives Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit. Unsere wissenschaftlichen Diskussionen über die Schreibtische hinweg waren extrem wertvoll zur Erlangung einer akademischen Reife.

Mein herzlicher Dank gilt auch Prof. Dr. V. A. Erdmann für seine wohlwollende Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Jäschke für die angenehme Atmosphäre, die ein konstruktives Arbeiten erst ermöglicht. Insbesondere zu erwähnen sind hierbei Dr. Burckhard Seelig und Christian Frauendorf, die mir während der ganzen Zeit der Promotion zur Seite standen und mit denen ich viele schöne Erinnerungen auch außerhalb des Labors teile. Dr. Fritz Struhlmann war stets ein kompetenter Ratgeber und hervorragender Lektor.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die ausgezeichneten MALDI-TOF-spektroskopischen Untersuchungen von Dr. E. Nordhoff, Dr. S. Hahner und Dr. P. Franke. Sehr wichtig waren auch die Massen- und NMR-spektroskopischen Charakterisierungen durch Dr. Holzmann bzw. Dr. Schäfer. Tiefen Dank schulde ich Dr. S. Ring für seine Unterstützung bei den ersten Laser-Experimenten sowie Dr. W. Schröder für die Hilfestellung bei Problemen mit der Oligonukleotid-Synthese. G. Buchlow war sehr hilfsbereit bei den Fluoreszenzanalysen. Herrn O. Landt sei gedankt für die Benutzung des präparativen Synthese-Automaten.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen studentischen Mitarbeitern C. Schatz, J. Schlatterer, N. Gül und T. Willemsen für ihr Engagement in den jeweiligen Projekten.

Besonderen Dank schulde ich Peter Maleh für seine Hilfestellung bei verschiedenen Software-Problemen.

Bedanken möchte ich mich ferner bei meiner Freundin A. Blioumi für ihren Rückhalt in Phasen der wissenschaftlichen Stagnation und der experimentellen Rückschläge.

Da diese Dissertation einen wichtigen Abschluss in meiner Ausbildung darstellt, richte ich an dieser Stelle einen besonderen Dank an meine Eltern, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Biokombinatorik und katalytische Oligonukleotide 1

1.2 In vitro Selektion von funktionellen Nukleinsäuren 3

1.3 Direkte Selektion von Ribozymen 7

1.4 Selektion mit linkergekoppelten Reaktanten 9

1.5 Selektion mit spaltbaren Linkern (Linker der zweiten Generation) 11

1.6 Katalytische Desoxyribonukleinsäuren 13

2 AUFGABENSTELLUNG 14

3 METHODEN 15

3.1 Allgemeines 15

3.2 Organische Synthesen 15

3.2.1 Dünnschicht-Chromatographie (DC) 15
3.2.2 1-*o*-Nitrophenyl-3-buten-1-ol 5 15
3.2.3 1-*o*-Nitrophenyl-1,3-propandiol 6 16
3.2.4 1-*o*-Nitrophenyl-3-O-dimethoxytrityl-1,3-propandiol 7 17
3.2.5 1-*o*-Nitrophenyl-1-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidyl) -3-O-dimethoxytrityl-1,3-propandiol 9 17
3.2.6 4-[2-Methoxy-4-(1-hydroxyethyl)-5-nitrophenoxy]-butanol 12 18
3.2.7 1-[4,4'Dimethoxytrityloxy]-4-[2-methoxy-4-(1-hydroxyethyl)-5-nitrophenoxy]-butan 14 19
3.2.8 1-[4,4'-Dimethoxytrityloxy]-4-[2-methoxy-4-(1-[2-cyanoethyl-N,N'-diisopropylphosphoramiditoxy]-ethyl)-5-nitrophenoxy]-butan 16 20
3.2.9 4-[2-Methoxy-4-(1-[4,4'-dimethoxytrityl]-ethyl) -5-nitrophenoxy]-butansäure 11 21
3.2.10 4-[2-Methoxy-4-(1-[4,4'-dimethoxytrityl]-ethyl) -5-nitrophenoxy]-butanol 13 22
3.2.11 1-[2-Cyanoethyl-N,N'-diisopropylphosphoramiditoxy]-4-[2-methoxy -4-(1-[4,4'-dimethoxytrityl]-ethyl)-5-nitrophenoxy]-butan 15 22
3.2.12 4-DMTr-O-buttersäure 23 23
3.2.13 4-Hydroxybutyryl-amidoalkyl-CPG 500 24 24
3.2.14 Synthese der carboxyl-generierenden Festphasen 25 24
3.2.15 N-(6-Purinyl)-capronsäure 30a 25
3.2.16 N-(6-Purinyl)-caproyl-N-oxysuccinimid 31a 25
3.2.17 Nicotinyl-N-oxy-succinimid 31b 26
3.2.18 Orotidyl-N-oxy-succinimid 31c 26
3.2.19 ω-(9-Methylanthracen)-PEG600-(2-cyanoethyl -N,N-diisopropyl)-phosphoramidit 44 27

3.3 Festphasensynthese von Oligonukleotiden und deren Modifikation 27
3.3.1 Synthese der Dinukleotidanaloga 1 und 3 27
3.3.2 Synthese des amino-terminalen Dinukleotides 2a 29
3.3.3 Präparative Synthese von 2b 29
3.3.4 Synthese des randomisierten DNA Pools 29
3.3.5 Synthese des Anthracen-modifizierten Primers 45 30
3.3.6 Synthese des amino-funktionalisierten, photospaltbaren Primers 47 30
3.3.7 Biotinylierung mit N-Hydroxy-sulfosuccinimid-estern 30
3.3.8 Derivatisierung mit NHS-Estern 31
3.3.9 EDC-Kopplung der carboxylierten Dinukleotide 31

3.4 Aufarbeitung und Charakterisierung von Nukleinsäuren 32
3.4.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) 32
3.4.2 MALDI-TOF Massenspektroskopie 32
3.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 33
3.4.4 Autoradiogramme 33
3.4.5 Gelelution 33
3.4.6 Ethanolfällung 34
3.4.7 Phenol/Chloroform-Extraktion 34
3.4.8 Radioaktivitätsmessungen 34
3.4.9 Agarose-Gelelektrophorese 35
3.4.10 Photometrische Quantifizierung 35
3.4.11 Nachweis durch das HABA/Avidin-Reagenz 36

3.5 Molekularbiologische Methoden 36
3.5.1 T7-Transkription 36
3.5.2 T4-RNA-Ligation 37
3.5.3 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (PCR) 37
3.5.4 Radioaktive 5’-Markierung 38

3.6 In vitro Selektion mit photospaltbaren Linkern 39
3.6.1 Laserspaltung in Lösung 39
3.6.2 Laserspaltung von der Festphase 39
3.6.3 Immobilisierung und photolytische Selbstspaltung 39
3.6.4 Klonierung 40
3.6.5 Charakterisierung selbstspaltender RNA-Sequenzen 41
3.6.6 Herstellung einzelsträngiger Anthracen-DNA-Konjugate 41
3.6.7 Selektion von Diels-Alder-Reaktionsprodukten 42

4 ERGEBNISSE 43

4.1 Konzeption der photospaltbaren Linker 43
4.1.1 Synthese des photoaktiven Phosphoramidits 44
4.1.2 Synthese von photospaltbaren Phosphoramiditen auf Nitroveratryl-Basis 46
4.1.3 Automatisierte Festphasensynthesen der Dinukleotidanaloga 47
4.1.4 Charakterisierung der photospaltbaren Dinukleotide 51
4.1.5 Synthese der carboxylderivatisierten Dinukleotide 53

4.2 Derivatisierung der Dinukleotidanaloga 55
4.2.1 Kopplung mit aktivierten NHS-Estern 55

4.2.2 Synthese NHS-aktivierter Reaktanten 56
4.2.3 Konjugation mit komplexen Reaktanten 58

4.3 Selektionsschema mit photospaltbaren Linkern 60
4.3.1 Ligation mit T4-RNA-Ligase 60
4.3.2 Photospaltung der Oligonukleotidkonjugate 61
4.3.3 Simulation eines Selektionzyklus 62

4.4 Präparation der kombinatorischen Nukleinsäurebibliotheken 65

4.5 Selektion nach Photoredoxribozymen 67

4.6 Selektion nach Desoxyribozymen 70
4.6.1 Synthese modifizierter Primer-Derivate 70
4.6.2 Herstellung einzelsträngiger DNA-Konjugat Bibliotheken 72
4.6.3 Selektion nach DNA Diels-Alderasen 74

5 DISKUSSION 77

5.1 Theorie der *in vitro* Selektion 77

5.2 Modifikation von Nukleinsäuren 78

5.3 Selektion von Ribozymen 82

5.4 DNA-Selektion mit linkergekoppelten Reaktanten 84

5.5 Ausblick 85

6 ZUSAMMENFASSUNG 88

7 SUMMARY 89

8 LITERATURVERZEICHNIS 90

9 ANHANG 103

9.1 Materialien 103
9.1.1 Geräte: 103
9.1.2 Chemikalien: 104
9.1.3 Chemikalien für die Oligonukleotidsynthese: 106
9.1.4 Enzyme: 106
9.1.5 Oligonukleotide: 106
9.1.6 Wasser: 107
9.1.7 Sonstige Materialien: 107

9.2 Lebenslauf 108

9.3 Eigene Publikationen 109

Abkürzungs-Verzeichnis

Soweit nicht anderweitig angegeben, wurden SI-Einheiten und Präfixe verwendet.

A	Adenosin, Absorption
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
Ci	Curie, 1Ci = 37 MBq
CPG	controlled pore glass
cpm	Zählimpulse pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCE	1, 2-Dichlorethan
DHB	2,6-Dihydroxybenzoesäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4‘-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ε	Molarer Extinktionskoeffizient
E. coli	Escherichia coli
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtCN	Cyanoethyl
g	Gramm, Erdbeschleunigung
FMN	Flavinmononukleotid
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
G, GTP	Guanin, Guanosintriphosphat
GPC	Gelpermeationschromatographie
HABA	2-[4’-Hydroxyphenylazo]-benzoesäure
HBTU	2-(1-H-Benzotriazol-1yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HEG, Heg	Hexaethylenglykol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N’-2-ethansulfonsäure
HEX	Hexyl
HMPT	Hexamethylphosphamid
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HTS	Screening mit hohem Druchsatz
iPr	Isopropyl
IR	Infrarot
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight
MS	Massenspektrometrie
MeIm	1-Methyimidazol
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMN	Nikotinmononukleotid
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD_{260}	optische Dichte bei 260 nm
ODS	Octadecylsilyl-
p	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Primerbindungsstellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
Py	Pyridin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Umkehrphase (reversed Phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription, Raumtemperatur
SELEX	systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
SNP	Singulärer Nukleotid-Polymorphismus
ssDNA	einzelsträngige DNA
SuccA	Bernsteinsäure
T, TTP	Thymidin, Thymidintriphosphat
Taq	Thermophilus aquaticus
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBE	Tris Borat EDTA-(Puffer)
TBDMS	t-Butyldimethylsilyl
TBS	Triisopropyl-benzolsulfonsäure
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Trietyhlamin
TEAAc	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
TSTU	N, N, N’, N’-Tetramethy (succinimido) uronium tetrafluoroborat
U	Units, Uridin
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
X	Photospaltstelle
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid