

PHOSPHOROTHIOLATE ALS NEUE MARKER FÜR INTERFERENZANALYSEN

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Diana Beyer

geb. am 27.06.1970

in Berlin

2000

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1997 bis Juli 2000 am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt. Die Verfasserin versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

1. Gutachter: Prof. Dr. V.A. Erdmann
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Saenger

Tag der Disputation: 20.12.2000

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Volker A. Erdmann, der es mir durch seine wohlwollende Unterstützung ermöglicht hat diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Prof. Dr. W. Saenger danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten. Dr. Jens Peter Fürste danke ich für Ratschläge und Anregungen sowie die Betreuung dieser Arbeit.

Dr. Rolf Bald danke ich für die vielen hilfreichen Ratschläge, Diskussionen und Geschichten zum Thema Amiditsynthesen. Kerstin „Brummi“ Beyer und Iris Claußnitzer danke ich für die freundliche Hilfe in der „Außenstelle Schering“.

Den Damen und Herren der Spektrenabteilungen des Instituts für Organische Chemie möchte ich für die Anfertigung der NMR- und Massenspektren danken.

Dr. Ann De Beuckelaer danke ich für die vielen Tips und Diskussionen zu Beginn dieser Arbeit ebenso wie Dr. Rolf Knöll, der mir „über die Ferne hinweg“ viele Tips und Tricks verraten hat. Bei Dr. Jens Kurreck, Thorsten Ruppert, Dirk Scharn und Annette Matzat möchte ich herzlich für die aufmerksame und geduldige Korrektur der Arbeit danken.

Dr. Jens Kurreck und Birgit Bieber danke ich für die nette Zeit im Labor 4-5 und die anregenden Diskussionen rund um die Ribozyme.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die freundlich Atmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dirk, nicht nur für die vielen Tips und Tricks rund um die organische Synthese und die Hilfe bei der Identifikation einiger Substanzen, sondern vorallem dafür, daß er mir in den letzten Jahren immer Rückhalt gegeben hat. ♥ Mein besonderer Dank gilt Socke, weil sie sich in den letzten elf Jahren immer wieder meine chemischen Erfolge und Mißerfolge geduldig angehört hat, obwohl sie kaum etwas davon versteht. Meine Eltern gebührt der größte Dank, da ohne ihre Unterstützung und den Glauben an mich diese Arbeit vielleicht nie entstanden wäre.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bedanken, die mich als Stipendiatin im Graduiertenkolleg „Modellstudien zu Stuktur, Eigenschaften und Erkennung biologischer Moleküle auf atomarer Ebene“ finanziell unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE RNA-WELT	1
1.2	RIBOZYME	2
1.3	METALLIONEN UND RIBOZYME	3
1.4	HAMMERHEAD-RIBOZYM	5
1.4.1	<i>Metallionen-Mechanismus der Hammerhead-Spaltung</i>	7
1.4.2	<i>Struktur der Hammerhead-Ribozyme</i>	9
1.4.3	<i>Spaltstelle und NHH-Regel</i>	10
1.5	HAMMERHEAD-RIBOZYM KINETIK	10
1.6	MODIFIZIERTE RNA	12
1.6.1	<i>Synthetische Ribozyme</i>	12
1.6.2	<i>Nichtenzymatische Hydrolyse von RNA</i>	13
1.6.3	<i>Hydrolyse 3'-thio-modifizierter RNA</i>	14
1.6.4	<i>Silberspaltung von Phosphorothiolaten</i>	16
1.7	MODIFIKATIONSINTERFERENZANALYSEN	17
2	AUFGABENSTELLUNG	21
3	METHODEN	23
3.1	ORGANISCHE SYNTHESEN	23
3.1.1	<i>Chemikalien</i>	23
3.1.2	<i>Spektroskopie</i>	23
3.1.3	<i>Chromatographie</i>	23
3.1.4	<i>Synthesevorschriften</i>	24
3.2	CHEMISCHE SYNTHESE VON NUKLEINSÄUREN	30
3.2.1	<i>Syntheseeffizienz</i>	30
3.2.2	<i>Chemische Synthese unmodifizierter RNA</i>	31
3.2.3	<i>Chemische Synthese modifizierter RNA</i>	32
3.3	METHODEN ZUR KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON RNA	32
3.3.1	<i>Experimentelle Bestimmung der Extinktionskoeffizienten</i>	33
3.3.2	<i>Berechnung der Extinktionskoeffizienten</i>	34
3.4	METHODEN ZUR REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN	34
3.4.1	<i>Gelelektrophorese</i>	34
3.4.2	<i>Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	35
3.4.3	<i>Gelelution</i>	36
3.4.4	<i>Ethanol-fällung</i>	36
3.4.5	<i>RP-HPLC-Trennung und Analysen</i>	36
3.4.6	<i>Nukleosidanalyse</i>	36
3.5	METHODEN ZUM NACHWEIS VON NUKLEINSÄUREN	37

3.5.1	<i>Ethidiumbromidfärbung</i>	37
3.5.2	<i>Stains-all</i>	37
3.5.3	<i>UV-Shadowing</i>	37
3.5.4	<i>Autoradiographie</i>	38
3.6	METHODEN ZUR MARKIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	38
3.6.1	<i>5'-Markierung von Nukleinsäuren</i>	38
3.6.2	<i>3'-Markierung von Nukleinsäuren</i>	39
3.6.3	<i>Partielle alkalische Hydrolyse</i>	39
3.7	KINETIK DER HAMMERHEAD-SPALTUNG	40
3.8	PHOSPHOROTHIOLAT-INTERFERENZSTUDIEN	41
3.8.1	<i>Hammerhead-Spaltung</i>	41
3.8.2	<i>Silberspaltung</i>	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	SYNTHESE DER THIOMODIFIZIERTEN AMIDITE	44
4.2	OPTIMIERUNG DES SYNTHESZYKLUS	47
4.2.1	<i>Synthese & Charakterisierung modifizierter Oligonukleotide</i>	50
4.2.2	<i>Untersuchung der Silberspaltung und Charakterisierung der Spaltprodukte</i>	52
4.2.3	<i>Synthese partiell modifizierter Oligonukleotide und Quantifizierung des Thiolat-Einbaus</i>	53
4.3	INTERFERENZANALYSEN	55
4.3.1	<i>Partiell modifizierte Oligonukleotide</i>	58
4.3.2	<i>Hammerhead-Spaltung</i>	58
4.3.3	<i>Silberspaltung</i>	59
4.3.4	<i>Kontrollexperimente</i>	60
4.4	SINGULÄRE DESOXYURIDIN-MODIFIKATIONEN	64
5	DISKUSSION	67
	ETABLIERUNG DES NEUEN INTERFERENZVERFAHRENS	67
	INTERFERENZANALYSE DES HAMMERHEAD-RIBOZYMS	70
	AUSBlick	74
6	ZUSAMMENFASSUNG	75
7	SUMMARY	77
8	LITERATURVERZEICHNIS	79
	ANHANG	85
	LEBENSlauf	89
	PUBLIKATIONEN	90

Abkürzungsverzeichnis

% wt	Gewichtsprozent	NMI	N-Methylimidazol
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
(S)Bz	(Thio)Benzoyl	ODS	Octadecylsilan
A	Adenosin	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Å	Angström	ppm	<i>parts per million</i>
A_{260}	Absorption bei 260 nm	RNA	Ribonukleinsäure
Äq.	Äquivalent(e)	RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
abs.	absolut	RT	Raumtemperatur
APS	Ammoniumperoxodisulfat	s	Sekunde(n)
ATP	Adenosintriphosphat	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
bp	Basenpaare	TBDMS	tertiär-Butyldimethylsilyl
BPB	Bromphenolblau	TBE	Tris-Borat-EDTA
C	Cytidin	TBHP	tert.-Butylhydroperoxid
CE	β -Cyanoethyl-	TEA	Triethylamin
CPG	controlled pore glass	TEAAc	Triethylammoniumacetat
cpm	Cerenkov-Zerfälle pro Minute	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethane-1,2-diamin
DC	Dünnschicht	Tf	Triflat
DCI	4,5-Dicyanoimidazol	THF	Tetrahydrofuran
DIPEA	Diisopropylethylamin	TIPS	Triisopropylsilyl-
DMAP	Dimethylaminopyridin	TMS	Trimethylsilyl-
DMF	Dimethylformamid	Tol	Toluoyl-
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl-	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure	tRNA	Transfer-RNA
DTT	1,4-Dithiothreitol	U	unit(s)
EDTA	Ethylentetraminessigsäure	U, dU	Uridin, 2'-Desoxyuridin
EE	Essigsäureethylester	Upm	Umdrehungen pro Minute
G	Guanosin	UV	Licht im ultravioletten Spektralbereich
h	Stunde(n)	V	Volt
HMDS	Hexamethyldisilazan	v/v	Volumen pro Volumen
k_{cat}	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante	w/v	Gewicht pro Volumen
K_M	Michaelis-Menten-Konstante	XC	Xylencyanol
M	molar		
min	Minute(n)		
MS	Massenspektrometrie		

Weiterhin wurden allgemein gebräuchliche Abkürzungen, SI-Einheiten und Präfixe verwendet.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neues Modifikationsinterferenzverfahren entwickelt. Die Grundlage dieses Verfahrens bildet die Verwendung von 3'-Phosphorothiolaten als Marker für die zu untersuchende Modifikation. Der Vorteil gegenüber den bisher bestehenden Interferenzverfahren liegt, darin daß der Marker an einer Position sitzt, die nicht aktiv an der Funktion oder der Strukturbildung von RNA-Molekülen beteiligt ist. Darüberhinaus läßt sich die Schwefel-Phosphorbindung selektiv und quantitativ in Gegenwart der nativen Phosphordiesterbindung spalten. Dadurch lassen sich auftretende Interferenzeffekte direkt aus den Bandenmustern quantitativ bestimmen.

Die neue Methode wurde mittels chemischer Festphasensynthese dargestellter partiell phosphorothiolat-modifizierter Substratstränge des Hammerhead-Ribozyms etabliert. Die Synthesebedingungen für den vollständigen wie partiellen Einbau von 3'-phosphorothiolat-modifizierten Amiditen und die Quantifizierung der Silberspaltung wurde anhand einer 12 Nukleotide langen Modell-RNA durchgeführt. Die gefundenen Bedingungen wurden dann auf die Synthese des 32-mer Hammerhead-Substratstranges übertragen.

Mit der neuen Interferenzmethode wurden die 2'-Hydroxylgruppen der Uridine im konservierten Bereich des Hammerheads untersucht. Für die Position U16.1 konnte kein Interferenzeffekt, für die Position U7 ein leichter und für Position U4 ein starker Interferenzeffekt beobachtet werden. Die Zuverlässigkeit dieser Ergebnisse konnte durch Experimente mit singular desoxymodifizierten Substratstränge bestätigt werden. Die kinetischen Konstanten wurden unter *single turnover* Bedingungen ermittelt. In Kontrollexperimenten, bei denen der Substratstrang nur die 3'-Phosphorothiolat Modifikation trug, konnte kein Einfluß der Schwefel-Phosphor-Bindung auf die Hammerhead-Spaltung festgestellt werden.

Die hier vorgestellte neue Interferenzmethode läßt sich allgemein auf funktionelle Nucleinsäuren anwenden. Es dient zum einen der Identifikation von essentiellen funktionellen Gruppen und somit der Identifikation von z.B. aktiven Zentren von Ribozymen oder bindenden Regionen von Aptameren und zum anderen können funktionelle Nucleinsäuren gezielt gegen Nucleasen resistent gemacht werden.

Lebenslauf

Diana Beyer

Geburtsdatum: 27. Juni 1970

Geburtsort: Berlin

Schulbildung:

1975-1982 Renee-Sintenis-Grundschule Berlin-Frohnau

1982-1989 Gabriele-von-Bülow-Gymnasium Berlin-Tegel

24. Mai 1989 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1989-1992 Grundstudium der Chemie, FU Berlin

21. Januar 1992 Vordiplom im Studiengang Chemie

1992-1997 Hauptstudium der Chemie, FU Berlin

25. März 1997 Diplom im Studiengang Chemie

Juli 1996-März 1997 Diplomarbeit am Institut für Medizinische Immunologie der Humboldt Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Schneider-Mergener mit dem Thema: „Darstellung und Anwendung eines selektiv spaltbaren Ankersystems zur multiplen Peptidsynthese an Cellulose“

seit Juli 1997 Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. V.A. Erdmann

Tätigkeiten neben dem Studium:

1. Oktober 1993 - 31. März 1997 Studentische Hilfskraft mit Unterrichtsaufgaben (Tutor) begleitend zu den Vorlesungen „Mathematik für Chemiker, Biochemiker und Mineralogen, Teil I und II“

15. Juli 1997 - 30. September 2000 Stipendiatin der DFG im Graduiertenkolleg: „Modellstudien zu Struktur, Eigenschaften und Erkennung biologischer Moleküle auf atomarer Ebene“