

3 Methoden

Vor den Experimenten wurden alle Glasgeräte bei 170°C ausgeheizt. Reaktionen, bei denen wasserfreie Lösungsmittel verwendet wurden, fanden unter Schutzgasatmosphäre statt. Bei den Experimenten mit Oligonukleotiden wurden sterile Behältnisse und Pipettenspitzen benutzt. Lösungen und Puffer wurden mit Millipore-Wasser angesetzt und anschließend steril filtriert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer sind im Anhang angegeben.

3.1 Organische Synthesen

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Substanzen und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen und Merck™, Darmstadt, in analytischer Qualität bezogen. 1',2'-*O*-Isopropyliden- α -D-xylofuranose und 2'-Desoxyuridin wurden von der Firma Callbiochem-Novabiochem, Bad Soden, bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

3.1.2 Spektroskopie

¹H-NMR-Spektren wurden mit dem Gerät AC 250 der Firma Bruker aufgenommen. Als interner Standard dient Tetramethylsilan ($\delta = 0$). Die Auswertung der Spektren erfolgte nach Erster Ordnung. Die ¹H-NMR-Signale wurden durch folgende Abkürzungen charakterisiert: s (Singulett), d (Dublett), dd (doppeltes Dublett), t (Triplett), dt (doppeltes Triplett), m (Multipllett).

Die Massenspektren wurden mit dem Gerät MAT 711 der Firma Varian aufgenommen. Die jeweiligen Aufnahmebedingungen wie Temperatur der Ionenquelle, Elektronenanregungsart, Art der Ionisation (EI = Elektronenstoßionisation, FAB = fast atom bombardement), sowie die FAB-Matrix sind im Einzelnen aufgeführt.

3.1.3 Chromatographie

Für die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 und Fluoreszenzindikator-F₂₅₄-Beschichtung der Firma Merck™ verwendet. Als Laufmittel dienten Mischungen aus Dichlormethan/Methanol in den

Verhältnissen 98:2 (v/v), 95:5 (v/v) und 90:1 (v/v). Die Detektion erfolgte mittels einer UV-Lampe bei 254 nm bzw. durch Besprühen mit einer Lösung aus 0,5 ml Anisaldehyd und 1 ml konzentrierter Schwefelsäure in 50 ml Eisessig und anschließendem Anfärben bei 130°C.

Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0,04 – 0,063 mm; 230 – 400 mesh) der Firma Merck™ verwendet. Die Eluenten sind im Einzelnen angegeben.

Für HPLC-Analysen wurde eine Kieselgelsäule (Eurosphere 100, 250 x 4 mm) verwendet. Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Detektion erfolgte bei 260 nm. Als Eluenten wurden verwendet: Eluens A: Dichlormethan und B: 3% Isopropanol in Dichlormethan.

3.1.4 Synthesevorschriften

Natriumthiobenzoat:

Zu einer Lösung von 10 g Thiobenzoessäure in 15 ml Wasser wurde 10 M NaOH gegeben, bis die Lösung auf pH 7,0 eingestellt war. Die Lösung wurde filtriert. Das Filtrat wurde eingeeengt und der Rückstand mehrfach mit EtOH codestilliert. Der gelbe Feststoff wurde über Phosphorpentoxid getrocknet.

1',2'-*O*-Isopropyliden-5'-*O*-(4-methylbenzoyl)-*α*-D-xylofuranose (**2**):

11 mmol 4-Methylbenzoylchlorid in 1,5 ml abs. Pyridin wurden bei 0°C zu einer Lösung von 10 mmol 1',2'-*O*-Isopropyliden-*α*-D-xylofuranose (**1**) in 6 ml abs. Pyridin getropft, 1 h bei 0°C gerührt und zur anschließenden Fällung auf 60 g Eis gegossen. Das Produkt wurde filtriert, der Rückstand mit H₂O gewaschen und getrocknet. Man erhält (**2**) als weißen Feststoff in 82,5% Ausbeute der ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): *d* [ppm] = 7.90 (d, 2H, Ar), 7.25 (d, 2H, Ar), 5.95 (d, 1H, H-1), 4.90-4.55 (m, 2H, H-2 + H-4), 4.35 (t, 2H, H-5), 4.20 (dd, 1H, H-3), 2.40 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.52 (s, 3 H, C(CH₃)), 1.35 (s, 3 H, C(CH₃))

MS (EI, 80 eV, 3kV, 120°C): *m/z* = 293 (MP-CH₃, 13.38%), 172 (15.03%), 119 (100.00%), 100 (15.42%), 91 (25.09%), 59 (27.02%)

1',2'-*O*-Isopropyliden-5'-*O*-(4-methylbenzoyl)-3'-*O*-trifluoromethansulfonyl-*α*-D-xylofuranose (**3**):

Eine Lösung von 1 mmol (**2**) und 2,5 mmol DMAP in 2,7 ml abs. Methylenchlorid wurde bei 0°C über 20 min mit 2,27 mmol Trifluormethansulfonsäureanhydrid versetzt und anschließend weitere 20 min gerührt. Die Lösung wurde mit 16 ml 5%-iger NaHCO₃-Lösung versetzt und weitere 20 min bei RT gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über

Na₂SO₄ getrocknet, eingeengt und dreimal mit 1,3 ml Toluol codestilliert. Man erhält (**3**) als weißen Feststoff mit 70% Ausbeute, der ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): *d* [ppm] = 7.90 (d, 2H, Ar), 7.25 (d, 2H, Ar), 5.95 (d, 1H, H-1), 5.20 (dd, 1H, H-3), 4.90-4.55 (m, 2H, H-2 + H-4), 4.35 (t, 2H, H-5), 2.40 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.52 (s, 3 H, C(CH₃)), 1.35 (s, 3 H, C(CH₃))

MS (EI, 80 eV, 3kV, 110°C): *m/z* = 440 (MP, 0.40%), 425 (11.05%), 304 (15.78%), 289 (12.63%), 119 (100.00%), 113 (16.86%)

1',2'-O-Diacetyl-3'-desoxy-3'-S-thiobenzoyl-5'-O-tolouyl-α-D-ribofuranose (6**):**

Eine Lösung von 1 mmol (**3**) in 6,6 ml abs. DMF wurde mit 3 mmol Natriumthiobenzoat versetzt und 5 h bei 80°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Mischung mit 20 ml H₂O versetzt und zweimal mit 15 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und fast bis zur Trockene eingeengt. Der ölige dunkle Rückstand wurde in Benzol gelöst, mit dem gleichen Volumen Hexan versetzt und säulenchromatographisch gereinigt. Vor Auftragen der Substanz wurde das Kieselgel mit Benzol/Hexan 1:1 gewaschen. Als Eluens wurde erst 8% Ethylacetat in Hexan, dann 20% Ethylacetat in Hexan zum Eluieren des Produktes verwendet.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): *d* [ppm] = 8.10-7.20 (m, 9H, Ar), 5.95 (d, 1H, H-1), 4.85-4.20 (m, 5 H, H-5 + H-4 + H-3 + H-2), 2.40 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.55 (s, 3 H, C(CH₃)), 1.35 (s, 3 H, C(CH₃))

Die erhaltene Mischung wurde mit 6,6 ml Ameisensäure versetzt und 1 h bei 50°C gerührt. Die Ameisensäure wurde im Vakuum abdestilliert, der Rückstand je zweimal mit 4,5 ml 1-Butanol und 4,5 ml Toluol codestilliert und anschließend getrocknet. Der Rückstand wurde unter Argon mit 6,5 ml abs. Pyridin und 4,8 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 2 h bei RT gerührt. Die Mischung wurde auf 35 ml Eis gegossen und die Lösung dreimal mit 6,5 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockene eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel mit einem Gradienten von 10-25% Ethylacetat in Hexan erhält man (**6**) als hellbraunes Öl mit 68% Ausbeute.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): *d* [ppm] = 7.90-7.20 (m, 9H, Ar), 6.20 (d, 1H, H-1), 5.40 (dd, 1H, H-2), 4.85-4.20 (m, 4 H, H-5 + H-4 + H-3), 2.40 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.90 (s, 6H, OCH₃)

2'-O-Acetyl-3'-desoxy-3'-S-thiobenzoyl-5'-O-toluoyluridin (7**):**

1,4 mmol Uracil wurden unter Argon in 14 ml Hexamethyldisilazan suspendiert, mit 14 mg Ammoniumsulfat versetzt und so lange am Rückfluß erhitzt bis die Lösung klar war. Nach weiteren 30 min Rückfluß wurde das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand mit Toluol

codestilliert. Unter Argon wurde eine Lösung von 1 mmol des peracylierten Zuckers (**6**) in 15 ml Acetonitril zu der persilylierten Base gegeben. Es war darauf zu achten, daß die Lösung klar blieb. Die Mischung wurde mit 1,4 mmol Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäureester versetzt und 30 min am Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abgezogen, der Rückstand in 50 ml CHCl_3 aufgenommen und mit 75 ml 10 %-iger Na_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit zweimal 100 ml H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und bis zur Trockene eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel mit einem Gradienten von 0-2% Methanol in CH_2Cl_2 erhält man (**7**) als hellgelben Feststoff mit 70% Ausbeute.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 10.20 (s, 1H, NH), 7.90-7.20 (m, 10H, Ar + CH-6 Base), 5.90 (d, 1H, H-1), 5.80 (d, 1H, H-5 Base), 5.60 (dd, 1H, H-2), 4.85-4.20 (m, 4 H, H-5 + H-4 + H-3), 2.45 (s, 3H, Ar- CH_3), 1.90 (s, 3H, OCH_3)

MS (FAB pos., DMSO/Nitrobenzylalkohol): m/z = 526 (MP + H^+ , 0.65%), 391 (24.56%), 166 (19.07%), 149 (100.00%), 137 (52.63%), 105 (54.47%)

3'-Desoxy-3'-S-(pyridyl-2-disulfanyl)uridin (8**):**

1 mmol (**7**) wurde unter Argon in 20 ml abs. Methanol gelöst, mit 4 mmol Natrium-Methanolat (30 Gewichts-%) versetzt und 10 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 1,5 mmol 2,2'-Dipyridyldisulfid wurde weitere 30 min gerührt. Die Mischung wurde mit Dowex 50wX auf pH 7 eingestellt, filtriert, der Rückstand mit Methanol gewaschen und das Eluat bis zur Trockene eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel mit einem Gradienten von 0-2% Methanol in CH_2Cl_2 , dann 5 % Methanol in Methylenchlorid erhält man (**8**) als hellgelben Feststoff mit 70% Ausbeute.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 11.30 (s, 1H, NH), 8.4 (d, 1H, CH-6 Base), 7.90 (m, 1H, Py), 7.75-7.60 (m, 2H, Py), 7.20 (m, 1H, Py), 5.90 (d, 1H, H-1), 5.60 (d, 1H, H-5 Base), 4.40-3.60 (m, 4 H, H-5 + H-4 + H-3 + H-2)

MS (FAB pos., DMSO/Nitrobenzylalkohol): m/z = 413 (MP + 2 Na^+ , 5.45%), 391 (MP + Na^+ , 13.44%), 298 (13.30%), 276 (41.81%), 221 (28.83%), 167 (17.28%), 154 (30.84%), 149 (100.00%), 144 (13.62%), 136 (30.17%), 112 (49.62%)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-desoxy-3'-S-(pyridyl-2-disulfanyl)uridin (9**):**

1 mmol (**8**) wurde unter Argon in 17 ml abs. Pyridin gelöst, mit 1,5 mmol 4,4'-Dimethoxytritylchlorid und 0,3 mmol DMAP versetzt und 10 h gerührt. Die Reaktion wurde mit Methanol gestoppt, 10 min gerührt und bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 45 ml CHCl_3 aufgenommen und mit 45 ml 10%-iger Na_2CO_3 -Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde zweimal mit 45 ml H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und bis

zur Trockene eingengt. (9) wurde mit einer Ausbeute von > 95% erhalten und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

2'-(*tert.*-Butyldimethylsilyl)-3'-desoxy-3'-thio-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)uridin (10):

Eine Lösung von 1 mmol (9) in 60 ml abs. Pyridin wurde unter Argon mit 60 mmol Imidazol und 50 mmol *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid versetzt und 12 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, die wasserfreien Bedingungen wurden beibehalten, und der Rückstand über Nacht im Vakuum getrocknet. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels DC kontrolliert. Der Rückstand wurde in 150 ml CHCl₃ aufgenommen und mit 250 ml 10%-iger Na₂CO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde zweimal mit 200 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 60 ml THF 1,2 ml Triethylamin enthaltend aufgenommen, mit Argon gesättigt und mit 2,4 mmol DTT versetzt. Nach Rühren für 5 h bei RT wurde die Lösung mit 250 ml argongesättigter 10%-iger Na₂CO₃-Lösung und 125 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wurde mit 185 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockene eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einem Gradienten von 0-5% Aceton in CH₂Cl₂ über Kieselgel erhält man (10) als beigen Feststoff mit einer Ausbeute von 50%.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): *d* [ppm] = 7.98 (d, 1H, CH-6 Base), 7.45-6.75 (m, 13H, Ar), 5.70 (d, 1H, CH-5 Base), 5.25 (dd, 1H, H-1), 4.25 (d, 1H, H-2), 4.10-3.50 (m, 3H, H-5 + H-4), 3.80 (s, 6H, OCH₃), 3.35 (dt, 1H, H-3), 0.80 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.20 (s, 6H, Si(CH₃)₂)

MS (FAB neg., DMSO/Nitrobenzylalkohol): *m/z* = 829 (MP+Matrix, 3.37%), 676 (MP, 20.06%), 675 (MP-H⁻, 45.09%), 306 (104.32%), 199 (74.14%), 168 (65.25%), 153 (228.51%)

2'-(*tert.*-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxy-3'-thiouridin-3'-S-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit) (11):

Eine Lösung von 1 mmol (10) in 25 ml abs. CH₂Cl₂ wurde unter Argon mit 5 mmol Diisopropylethylamin, 1,5 mmol *b*-Cyano-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit und 0,55 mmol *N*-Methylimidazol versetzt und 1 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 10 ml Methanol gestoppt, 5 min gerührt und anschließend bis zur Trockene eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel mit einem Gradienten von 0-4% Aceton in CH₂Cl₂ erhält man (11) als weißen Feststoff mit einer Ausbeute von 80%.

HPLC (Gradient ribo) R_t = 31 min

5'-O-4-Monomethoxytriyyl-2'-desoxy-uridin (13):

Eine Lösung von 1 mmol Uridin (12) und 0,5 mmol DMAP in 5 ml abs. Pyridin wurde mit 2 mmol 4-Momomethoxytriyylchlorid versetzt und 4 h unter Argon gerührt. Die Mischung wurde in 5 ml Diethylether aufgenommen und zweimal mit 1,5 ml H₂O extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend bis zur Trockene eingengt. Man erhält (13) als gelben Feststoff mit einer Ausbeute von 95%, der ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.80 (d, 1H, H-6), 7.40-6.80 (m, 14H, Ar), 6.35 (t, 1H, H-1'), 5.30 (d, 1H, H-5), 4.55 (m, 1H, H-3'), 4.05 (m, 1H, H-4'), 3.75 (s, 3H, CH₃O), 3.40 (m, 2H, H-5'), 2.40-2.30 (m, 2H, H-2')

5'-O-4-Monomethoxytriyyl-3'-methansulfonyl-2'-desoxy-uridin (14):

Eine Lösung von 1 mmol (13) in 5 ml abs. Pyridin wurde bei 0°C mit 1,5 mmol Methansulfonylchlorid tropfenweise versetzt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde mit 0,4 ml Ethanol gequench, 1 h bei 5°C gerührt und auf 200 ml Eiswasser gegossen. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit H₂O gewaschen und getrocknet. Man erhält (14) als hellgelben Feststoff mit einer Ausbeute von 95%, der ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.85 (s, 1H, NH), 7.60 (d, 1H, H-6), 7.40-6.80 (m, 14H, Ar), 6.40 (t, 1H, H-1'), 5.30 (m, 2H, H-3' + H-5), 4.25 (m, 1H, H-4'), 3.75 (s, 3H, CH₃O), 3.45 (m, 2H, H-5'), 3.00 (s, 3H, SO₂CH₃), 2.70-2.40 (m, 2H, H-2')

5'-O-4-Monomethoxytriyyl-lyxofuranosyl-2'-desoxy-uridin (15):

1 mmol (14) wurde in 110 ml EtOH und 55 ml H₂O unter Erwärmen gelöst, mit 11 ml 1 M NaOH versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurden 22 ml 1 M NaOH dazugegeben und die Lösung wurde für 5 h am Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde mit 250 ml CH₂Cl₂ und 100 ml H₂O extrahiert, die organische Phase wurde mit zweimal 200 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockene eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit 5 % MeOH in CH₂Cl₂ über Kieselgel erhält man (15) als beigen Feststoff mit einer Ausbeute von 90%.

5'-O-4-Monomethoxytriyyl-xylofuranosyl-3'-methansulfonyl-2'-desoxy-uridin (16):

Eine Lösung von 1 mmol (15) in 5 ml abs. Pyridin wurde bei 0°C mit 1,5 mmol Methansulfonylchlorid tropfenweise versetzt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde mit 0,4 ml Ethanol gestoppt, 1 h bei 5°C gerührt und auf 200 ml Eiswasser gegossen. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit H₂O gewaschen und getrocknet. Nach säulen-

chromatographischer Aufreinigung mit 2% MeOH in CH₂Cl₂ über Kieselgel erhält man (16) als hellgelben Feststoff mit einer Ausbeute von 87%.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.55 (s, 1H, NH), 8.60 (d, 1H, H-6), 7.70-6.75 (m, 14H, Ar), 6.25 (t, 1H, H-1'), 5.60 (d, 1H, H-5), 5.25 (m, 1H, H-3'), 4.25 (m, 1H, H-4'), 3.75 (s, 3H, CH₃O), 3.55-3.40 (m, 2H, H-5'), 2.75 (s, 3H, SO₂CH₃), 2.50 (m, 2H, H-2')

5'-O-4-Monomethoxytriy-3'-S-benzoylthio-2'-desoxy-uridin (17):

1 mmol (16) und 3 mmol Natriumthiobenzoat in 12 ml abs. DMF wurden für 4 h bei 80°C erhitzt. Die Lösung wurde anschließend mit 35 ml CH₂Cl₂ und 35 ml 1 M NaHCO₃ ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde zweimal mit 35 ml ges. NaCl gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockene eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel mit 2 % MeOH in CH₂Cl₂ erhält man (17) als gelben Feststoff mit einer Ausbeute von 70%.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.25 (s, 1H, NH), 7.80 (d, 1H, H-6), 7.60-6.75 (m, 14H, Ar), 6.25 (t, 1H, H-1'), 5.60 (d, 1H, H-5), 4.50 (m, 1H, H-3'), 4.25 (m, 1H, H-4'), 3.75 (s, 3H, CH₃O), 3.55-3.45 (m, 2H, H-5'), 2.75-2.50 (m, 2H, H-2')

5'-O-4-Monomethoxytriy-2'3'-didesoxy-3'-thio-uridin (18):

1 mmol (17) in 100 ml argongesättigtem EtOH wurde mit 3 ml 10 M NaOH versetzt und für 1h bei 5°C gerührt. Die Lösung wurde mit 100 ml CH₂Cl₂ und 100 ml 1M NaHCO₃ extrahiert. die wäßrige Phase wurde mit 100 ml CH₂Cl₂ gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockene eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einem Gradienten von 0-3% MeOH in CH₂Cl₂ über Kieselgel erhält man (18) als beigen Feststoff mit einer Ausbeute von 77%.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.55 (s, 1H, NH), 8.05 (d, 1H, H-6), 7.70-6.75 (m, 14H, Ar), 6.15 (t, 1H, H-1'), 5.45 (d, 1H, H-5), 3.80 (m, 4H, H-4 + CH₃O), 3.75-3.45 (m, 3H, H-3' + H-5'), 2.75-2.50 (m, 2H, H-2'), 1.50 (d, 1H, SH)

5'-O-(4-Monomethoxytriy)-3'-desoxy-3'-thio-2'-desoxyuridin-3'-S-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit) (19):

Eine Lösung von 1 mmol (18) in 10 ml abs. CH₂Cl₂ wurde unter Argon mit 5 mmol Diisopropylethylamin, 1,5 mmol *b*-Cyano-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit und 0,55 mmol *N*-Methylimidazol versetzt und für 1 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 10 ml Methanol gestoppt, 5 min gerührt und bis zur Trockene eingengt. Nach säulen-

chromatographischer Aufreinigung über Kieselgel mit 0-15% Aceton in CH_2Cl_2 erhält man (19) als weißen Feststoff mit einer Ausbeute von 90%.

HPLC (Gradient desoxy) $R_t = 16,3$ und $17,5$ min

3.2 Chemische Synthese von Nukleinsäuren

Alle RNA-Moleküle wurden nach der Phosphoramidit-Methode mittels chemischer Festphasensynthese hergestellt^[53]. Die Synthesen wurden an einem Gerät der Firma Applied Biosystems mit kommerziell erhältlichen RNA-Phosphoramiditen durchgeführt (Modell 391 PCR-Mate™ EP). Bei diesen Amiditen wurden folgende orthogonale Schutzgruppen verwendet: 4,4'-Dimethoxytrityl-Gruppen (DMT) für die 5'-Hydroxylgruppen, *tert.*-Butyldimethylsilyl-Gruppen für die 2'-Hydroxylgruppen, *tert.*-Butylphenoxyacetyl-Gruppen für die Aminogruppen der Basen. Die modifizierten Phosphoramidite wurde nach Literaturvorschriften dargestellt^[40, 54-56]. Die dabei verwendeten Schutzgruppen entsprachen denen der Standard-Phosphoramidite^[57], mit Ausnahme von Desoxythiouridin, bei dem 4-Monomethoxytrityl als Schutzgruppe für die 5'-Hydroxylgruppe verwendet wurde.

3.2.1 Syntheseeffizienz

Die Produktausbeute der chemischen Festphasensynthese wurde über die mittlere Kopplungsausbeute bestimmt. Hierbei wurde das Verfahren des Dimethoxytrityl-Kationen-Assays angewandt. Nach jedem 5'-Entschützungsschritt wurde die abgespaltene Menge an DMT-Kationen photospektrometrisch vermessen. Die DMT-Fraktionen wurden mit 3% Trichloressigsäure in Dichlormethan (w/v) auf jeweils ein Gesamtvolumen von 10 ml verdünnt. Am Spektrophotometer wurden die einzelnen Proben gegen 3% Trichloressigsäure in Dichlormethan als Standard bei einer Wellenlänge von $\lambda=498$ nm vermessen. Der maximale Absorptionswert sollte zwischen 0,1 und 1,0 liegen. Gegebenenfalls wurde die Probe verdünnt. Die Gesamtausbeute P wurde nach Gleichung 1 bestimmt.

$$P = \frac{A_n}{A_1} \quad (1)$$

P gibt die Gesamtkopplungsausbeute, A_1 den ersten, A_n den letzten gemessenen Absorptionswert für den Kopplungsschritt an. Die mittlere Kopplungsausbeute K wurde nach Gleichung 2 berechnet. n steht hier für die Anzahl der Kopplungsschritte.

$$K = \sqrt[n]{P} \quad (2)$$

3.2.2 Chemische Synthese unmodifizierter RNA

Die Synthesen unmodifizierter Oligoribonukleotide wurden im 1 µmol-Maßstab an CPG-Trägermaterial (*controlled pore glass*) mit 500Å Porengröße durchgeführt. Die Phosphoramidite wurden als 0,1 M Lösung in Acetonitril eingesetzt. Da für die modifizierten Phosphoramidite sowohl die Verwendung eines anderen Kopplungsreagenzes als auch eines anderen Oxidationsmittels notwendig war, wurde der Synthesesyklus der Standardphosphoramiditmethode schon für die unmodifizierten Oligomere geändert. Iod als Oxidationsmittel wurde gegen eine 3 M *tert.*-Butylhydroperoxidlösung in Acetonitril ausgetauscht^[58]. Die Oxidationszeit wurde auf 3 min erhöht. Als Kopplungsreagenz wurde eine 0,25 M Lösung von Dicyanoimidazol in Acetonitril verwendet^[59]. Die Kopplungszeit für Amidite wurde für Oligomere bis 20 Nukleotide auf 7,5 min, bei Oligomeren von einer Länge größer 20 Nukleotide auf 10 min erhöht. Es fand stets ein Doppelkopplung statt. Eine Auflistung des modifizierten Synthesesyklus befindet sich im Anhang. Die modifizierten Phosphoramidite wurden an die Position 5 des Syntheseautomaten angehängt. Die DMT-Schutzgruppe der letzten Base wurde am Syntheseautomaten abgespalten.

Nach der Synthese wurde das Trägermaterial in 1 ml einer 40%igen wäßrigen Methylamin-Lösung suspendiert und für 10 min bei 65 °C inkubiert, um sowohl das Oligonukleotid vom Trägermaterial als auch die basenlabilen Schutzgruppen abzuspalten. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und der Überstand anschließend abgenommen. Der Rückstand wurde mit dreimal 1 ml einer Lösung aus Ethanol/Acetonitril/Wasser 3:1:1 nachgewaschen^[60]. Die vereinigten Überstände wurden an der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt. Zur Entfernung der 2'-Silylschutzgruppen wurde der Rückstand in 250 µl einer Lösung aus Triethylamintrihydroflourid in N-Methylpyrrolidon suspendiert. Die Lösung wurde aus N-Methylpyrrolidon/Triethylamin/Triethylamintrihydroflourid im Verhältnis 6:3:4 hergestellt^[60]. Die Suspension wurde für 1,5 h bei 65°C inkubiert und anschließend einer Butanol-Fällung unterzogen. Dazu wurde die auf Raumtemperatur abgekühlte Suspension mit 25 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,5 und 1 ml n-Butanol versetzt und bei -20°C über Nacht oder bei -80°C für 1 h gefällt. Anschließend wurde für mindestens 45 min bei 11000 g und 4°C zentrifugiert, um die gefällte Nukleinsäure zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde in Wasser aufgenommen, eine 5 µl Probe abgenommen und die UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. Mittels *reversed phase*-HPLC (RP-HPLC) wurde die Reinheit des RNA-Oligonukleotids überprüft. Die erhaltenen Oligoribonukleotide wurden mittels denaturierender Polyacrylamidgel-

elektrophorese gereinigt. Die Produktbanden wurden durch Fluoreszenzlöschung detektiert und ausgeschnitten. Die Oligoribonukleotide wurden aus den Gelstücken eluiert und im Anschluß mit Ethanol gefällt.

3.2.3 Chemische Synthese modifizierter RNA

Es wurden verschiedene modifizierte RNA-Moleküle synthetisiert.

1. Ein Testoligonukleotid zur Analyse des partiellen Einbaus der Phosphorothiolat-Modifikation.
2. Der Substratstrang des Hammerhead-Ribozyms (Abb.22) mit partieller Phosphorothiolat-Modifikation für die Interferenzanalysen.
3. Der Substratstrang des Hammerhead-Ribozyms mit singulären Desoxyuridinen an der Positionen U16.1, U7 und U4 (vgl. Abb.2).

Die Synthesen wurden nach dem in Kapitel 3.2.2 genannten Zyklus durchgeführt. Die thiolat-modifizierten Amidite wurden als 0,2 M Lösung in Acetonitril verwendet. Die Zeit für die Doppelkopplung wurde auf 15 min erhöht. Für die Quantifizierung des Phosphorothiolat-Einbaus wurden verschiedene Mischungen von thiolat-modifiziertem und unmodifiziertem Amidit verwendet. Die Quantifizierung des Phosphorothiolat-Einbaus wurde mittels RP-HPLC vorgenommen. Die Aufreinigungsschritte sind analog zu denen unmodifizierter RNA-Moleküle.

3.3 Methoden zur Konzentrationsbestimmung von RNA

Für die Durchführung von Untersuchungen an Nucleinsäuren ist eine genaue Konzentrationsbestimmung sehr wichtig. Aufgrund der geringen Mengen, die untersucht werden, ist ein Einwiegen der Substanz nicht möglich. Man bedient sich daher der Eigenschaft von Nucleinsäuren im UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm maximal zu absorbieren. Die Konzentrationsbestimmungen wäßriger Nucleinsäurelösungen wurden so durchgeführt, daß der gemessene Absorptionswert zwischen 0,1 und 1,0 A_{260} lag. Gegebenenfalls wurden die Proben verdünnt. Die Methode ermöglicht nach Gleichung 3 eine direkte Kalkulation der Konzentration der Probe^[61]:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \cdot 44,19 [\mu\text{g/ml}] \quad (3)$$

Der Wert 44,19 entsteht aus dem Quotienten der molaren Masse und dem mittleren Extinktionskoeffizienten von RNA.

3.3.1 Experimentelle Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Die direkte Kalkulation der RNA-Konzentration liefert nur dann einen exakten Wert, wenn die vier verschiedenen Basen zu gleichen Teilen in der RNA-Sequenz vorhanden sind. Bei RNA deren Sequenz ein großes Ungleichgewicht an Basen enthält, müssen andere Methoden zur Konzentrationsbestimmung angewendet werden. Um eine genauere Konzentrationsbestimmung von RNA-Molekülen vorzunehmen, benötigt man den Extinktionskoeffizienten des entsprechenden RNA-Moleküls. Mittels totaler alkalischer Hydrolyse lassen sich Oligonukleotide in ihre 2'- und 3'-Nucleosidmonophosphate spalten. Über eine Absorptionsdifferenzmessung bei 260 nm von Hydrolyseprodukt und einer gleichen Menge nicht hydrolysiertem Oligonukleotid sind durch das Lambert-Beer'sche Gesetz die Extinktionskoeffizienten der Oligonukleotide bestimmbar. Bei einer Schichtdicke von 1 cm und gleicher Konzentration $c_1 = c_2$ von nicht-hydrolysiertem und hydrolysiertem Oligonukleotid erfolgt die Berechnung nach folgender Formel:

$$e_1 = \frac{E_1 \cdot e_2}{E_2} \quad (4)$$

E_1 ist der Absorptionswert des nicht hydrolysierten Oligonukleotids, E_2 der Absorptionswert nach alkalischer Hydrolyse, e_2 ist der berechnete Extinktionskoeffizient des Nucleosidmonophosphatgemisches. Er wurde über die Summen der einzelnen Extinktionskoeffizienten bestimmt (Gl. 5). e_1 ist der Extinktionskoeffizient des Oligonukleotids bei 260 nm und pH 7.

$$e_2 = n_a(e_{AMP}) + n_c(e_{CMP}) + n_g(e_{GMP}) + n_u(e_{UMP}) \quad (5)$$

n gibt die Anzahl der Basen A, C, G, U in der Sequenz an. Folgende Extinktionskoeffizienten wurden für die Mononukleotide bei neutralem pH-Wert verwendet^[62]: AMP = 15385, CMP = 7308, GMP = 11794, UMP = 9804 [l/mol·cm]. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes kann so über den Extinktionskoeffizienten die absolute Masse berechnet werden.

Tabelle 1: Reaktionsansatz zur experimentellen Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von RNA.

10 µl Oligonukleotid (ca. 0,1-0,2 A_{260})
 10 µl 100 mM NaOH
 → 60 min, 90 °C
 10 µl 100 mM HCl
 470 µl 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0
 → A_{260} -Messung in 1ml Küvette

3.3.2 Berechnung der Extinktionskoeffizienten

Der Extinktionskoeffizient von Oligonukleotiden kann auch aus Literaturdaten berechnet werden. Bei dieser Methode wird die Wechselwirkung von Dinukleotiden in der Sequenz berücksichtigt.

$$e_1 = 2\left[\sum ne(XpY)\right] - \left[\sum ne(NMP)\right] \quad (6)$$

Der Extinktionskoeffizient berechnet sich aus der zweifachen Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen in der Sequenz vorkommenden Dinukleotide abzüglich der Summe der Extinktionskoeffizienten der in der Sequenz vorkommenden Mononukleotide (Gl. 6). Das erste und letzte Mononukleotid der Sequenz werden in der Berechnung weggelassen. Die Werte der einzelnen Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 2 aufgelistet^[63].

Tabelle 2: Extinktionskoeffizienten von Mono- und Dinukleotiden zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten eines Oligonukleotids^[63].

Dinukleotid/ Nukleotid	ϵ 10^3 [l/mol·cm]
ApA	13,65
ApC	10,67
ApG	12,79
ApU	12,14
CpA	10,67
CpC	7,52
CpG	9,39

Dinukleotid/ Nukleotid	ϵ 10^3 [l/mol·cm]
CpU	8,37
GpA	12,92
GpC	9,19
GpG	11,43
GpU	10,96
UpA	12,52
UpC	8,90

Dinukleotid/ Nukleotid	ϵ 10^3 [l/mol·cm]
UpG	10,40
UpU	10,11
Ap	15,34
Cp	7,60
Gp	12,16
Up	10,21

3.4 Methoden zur Reinigung von Nukleinsäuren

3.4.1 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine häufig angewandte Methode zur Analyse und Aufreinigung von Nukleinsäuren. Bei diesem Verfahren wird die unterschiedliche Mobilität von geladenen Molekülen in einer Gelmatrix bei einem angelegten elektrischen Feld genutzt. Durch Verwendung von Gelen anstelle von Lösungen hat man den Vorteil, daß diese wie Molekularsiebe wirken und so eine Auftrennung bewirken. Die Mobilität der Nukleinsäuren

hängt also nicht nur von der Ladung und Masse sondern auch von der Porengröße der Gelmatrix ab. Am häufigsten werden Polyacrylamidgele verwendet. Sie sind chemisch inert, leicht herzustellen und über die Konzentrationen von Acrylamid und dem Quervernetzer Methylenbisacrylamid kann die Porengröße variiert werden. Als Stabilisator wurde N,N,N',N'-Tetramethylethane-1,2-diamin (TEMED) verwendet; 10%-ige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) diene als Radikalstarter. Zur Aufreinigung und für Kinetiken wurde die Gellösung zwischen zwei Glasplatten der Größe (21,5 x 19 x 0,4) cm bzw. (19,5 x 19 x 0,4) cm mit einem Spacerabstand von 1 mm gegossen. Für die Interferenzgele wurden Glasplatten der Größe (42 x 33 x 0,4) cm bzw. (40 x 33 x 0,4) cm mit einem Spacerabstand von 0,4 mm verwendet. Der Verlauf eines Gels wurde anhand der Farbstoffbanden von Bromphenolblau und Xylencyanol verfolgt.

3.4.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich einzelsträngige Nukleinsäuren aufgrund ihrer Länge auftrennen. Durch Zugabe von 7 mol/l Harnstoff werden fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen der nativen Nukleinsäure aufgebrochen und Sekundär- wie Tertiärstrukturen werden unterbunden. Die Nukleinsäuren wurden in denaturierendem Probenpuffer auf das Gel aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 600 V mit 1xTBE als Elektrophoresepuffer verwendet. Bei allen Gelen fand ein Vorlauf von mindestens 30 min statt. Für Interferenzanalysen wurden 25%-ige Gele verwendet.

Tabelle 3: Zusammensetzung von denaturierenden Polyacrylamidgelen.

	8 %	12 %	15 %	20 %	25 %
Harnstoff	21,0 g	21,0 g	21,0 g	21,0 g	21,0 g
Acrylamid/Methylenbisacrylamid (40:2)	10,0 ml	15,0 ml	18,7 ml	25,0 ml	31,3 ml
5x TBE	10,0 ml	10,0 ml	10,0 ml	10,0 ml	10,0 ml
mit H₂O auffüllen	49,5 ml	49,5 ml	49,5 ml	49,5 ml	49,5 ml
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
10% APS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

3.4.3 Gelelution

Um Nukleinsäuren aus Gelen zu eluieren nutzt man das Prinzip der Diffusionselution. Die durch Fluoreszenzlöschung oder Autoradiographie detektierten Nukleinsäurebanden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in einem Reaktionsgefäß mit Wasser oder 0,3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,5 überschichtet, und die Nukleinsäure bei 4 °C über Nacht oder bei 50°C für 2-3 h extrahiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, um die Nukleinsäure mittels Ethanolfällung zu isolieren.

3.4.4 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung ist eine Standardmethode zur Reinigung und Isolierung von Nukleinsäuren mit der auch kleine Mengen bis zu 10 nmol/ml aus verdünnten Lösungen gewonnen werden können. Voraussetzung hierfür ist die Gegenwart von Kationen.

Zu einer wäßrigen Nukleinsäurelösung wurden 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,5, und 2 bis 2,5 Äquivalente Ethanol gegeben. Die Fällung erfolgte für mindestens 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C. Nach 45-minütiger Zentrifugation bei 11000 g und 4°C zur Sedimentierung der Nukleinsäure wurde der Überstand abgenommen und das Präzipitat getrocknet. Zur Fällung geringer Nukleinsäuremenge (< 1µg) kann Glykogen (20 µg/ml) zwecks Kopräzipitation zugegeben werden.

3.4.5 RP-HPLC-Trennung und Analysen

RP-HPLC wurde zur Trennung und Analyse von kurzen Oligonukleotiden verwendet. Als stationäre Phase wurde Octadecylsilan (ODS-C18) eingesetzt. Als mobile Phase diente ein Puffersystem bestehend aus 50 mM Triethylammoniumacetat, pH 7,0 (Puffer A) und 80% Acetonitril in 50 mM Triethylammoniumacetat (Puffer B). Die Flußrate betrug 1 ml/min und die Temperatur des Säulenofens stets 45°C. Die Gradienten wurden in Abhängigkeit von den zu untersuchenden Trennproblemen unterschiedlich gewählt. Im Anhang befindet sich die detaillierten Gradienten.

3.4.6 Nukleosidanalyse

Die Nukleosidanalyse wurde als Reinheitskontrolle für modifizierte und unmodifizierte Oligoribonukleotide verwendet. Hierzu wurden Spaltungen der Phosphordiesterbindung mit Nuklease P1 und anschließender Abspaltung der 5'-Monophosphatgruppen durch Alkalische Phosphatase durchgeführt. Die Analyse der Spaltprodukte wurde mittels HPLC vorgenommen. Der verwendete Gradient betrug 1-16,6% Puffer B in 25 min (Gradient 2). Zur

Bestimmung der Basenzusammensetzung wurden die erhaltenen Chromatogramme durch Peakintegration ausgewertet. Für die Extinktionskoeffizienten wurden folgende Werte verwendet^[62]: A = 14900, C = 9100, G = 13600, U = 10100 [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]. Da die Thiolatbindung durch Nuklease P1 nicht gespalten wird, wurde bei der Analyse ein fünfter Peak im Chromatogramm erhalten, der dem Dinukleotid entspricht.

3.5 Methoden zum Nachweis von Nukleinsäuren

3.5.1 Ethidiumbromidfärbung

Ethidiumbromid ist ein kationischer, heterozyclischer Fluoreszenzfarbstoff, der in der Lage ist mit Nukleinsäuren Interkalationsverbindungen einzugehen. Daher ist die Ethidiumbromidfärbung geeignet Nukleinsäuremengen größer 0,01 A_{260} sichtbar zu machen. Zur Färbung wurde das analytische Gel in einer Lösung von 1 $\mu g/ml$ Ethidiumbromid in 1xTBE für mindestens 30 min geschwenkt. Bei UV-Durchlicht der Wellenlänge 306 nm sind die Nukleinsäuren als leuchtende orangerote Banden zu erkennen.

3.5.2 Stains-all

„Stains-all“ (1-Ethyl-2-[3-(1-Ethylnaphtol[1,2d]thiazol-2-(1H)yliden)-2-methyl-1-propenyl]-naphtol[1,2d]thiazoliumbromid) ist ein Universalfarbstoff für die Elektrophorese. DNA- und RNA-Moleküle wurden blau bis blau-violett gefärbt. Die Färbung wurde nach Angaben des Herstellers vorgenommen.

3.5.3 UV-Shadowing

Nukleinsäuren haben einen hohen Absorptionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 260 nm. Diese Eigenschaft wurde bei der präparativen Aufreinigung von Nukleinsäuren genutzt. Das in Cellophanfolie eingeschlagene Gel wurde auf eine Dünnschichtchromatographieplatte gelegt, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthält. Bei Auflicht der Wellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes ($\lambda = 254$ nm) sind die Nukleinsäuren als dunkle Schattenbanden zu erkennen. Die Banden wurden markiert und ausgeschnitten. Um irreparable UV-induzierte Schäden der Nukleinsäure zu vermeiden, sollte darauf geachtet werden, zügig zu arbeiten.

3.5.4 Autoradiographie

Dieses Verfahren dient der Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels radioaktiver Markierung. Bei Oligoribonukleotiden wurde meist ^{32}P oder ^{35}S verwendet. Auf das in Cellophanfolie eingeschlagene Gel wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und in einer Röntgenfilmkassette fixiert. Um eine spätere Zuordnung des Filmes zum Gel zu ermöglichen, wurden auf das eingeschlagene Gel Fluoreszenzmarker geklebt. Die Expositionsdauer ist abhängig vom Grad der radioaktiven Markierung. Expositionszeiten von einigen Minuten bis zu einer Stunde können bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Bei längeren Zeiten von mehreren Stunden bis Tagen empfiehlt es sich die Filmkassette bei -80°C zu deponieren. In Abhängigkeit von der Expositionsdauer kann somit ein breites Intensitätsspektrum analysiert werden. In einer Röntgenfilmkassette fixiert kann das Gel bei -80°C mehrere Wochen bis Monate gelagert werden.

Zur Quantifizierung der Kinetik- und Interferenzgele wurde ein Phosphorimager der Firma Molecular Dynamics verwendet. Hierzu wurde ein spezieller Screen für den Phosphorimager bei Raumtemperatur auf das in Cellophanfolie eingeschlagene Gel gelegt und für 1-2 h exponiert. Die eingelesenen Daten wurden mit der zugehörigen Software ImageQuant ausgewertet.

3.6 Methoden zur Markierung von Nukleinsäuren

3.6.1 5'-Markierung von Nukleinsäuren

Die T4-Polynukleotid-Kinase des *E. coli*-Phagen T4 ist ein Enzym, das zur radioaktiven Markierung von Nukleinsäuren verwendet wurde. Bei der Reaktion wurden die γ -Phosphatreste von γ - ^{32}P -ATP auf die freien 5'-Hydroxylgruppen der Nukleinsäuren übertragen. Bei enzymatisch dargestellten Nukleinsäuren, muß zuvor eine Dephosphorylierung stattfinden.

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die 5'-Markierung von Nukleinsäuren.

1,0 μl RNA (1pmol/ μl)
1,0 μl 10x T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer
6,0 μl H_2O
1,0 μl γ - ^{32}P -ATP (10 μCi)
1,0 μl T4-Polynucleotid-Kinase (5U/ μl)

Nach Inkubation des Reaktionsansatzes für 90 min bei 37°C wurde die Reaktion mit 10 µl Probenpuffer gestoppt. Das Kinasierungsprodukt wurde über denaturierende Gelelektrophorese gereinigt, das Produkt eluiert und mittels Ethanol-fällung isoliert.

3.6.2 3'-Markierung von Nukleinsäuren

Das Enzym T4-RNA-Ligase aus dem Phagen T4 katalysiert in Anwesenheit von ATP die Verknüpfung von zwei RNA-Molekülen, sofern eine freie 3'-Hydroxylgruppe und eine freie 5'-Phosphatgruppe vorhanden sind. Verwendet man als Nukleosiddiphosphat 5'-[³²P]-pCp, kann diese Reaktion zur 3'-Markierung von Nukleinsäuren dienen^[64].

Tabelle 5: Standard-Reaktionsansatz für die 3'-Markierung von Nukleinsäuren.

6,0 µl RNA (1 pmol/µl)
6,0 µl 3x RNA-Ligase-Puffer
1,5 µl 0,15 mM ATP (frisch verdünnt)
1,5 µl T4-RNA-Ligase (12 U/µl)
3,0 µl 5'-[³² P]-pCp (30 µCi)

Nach Inkubation des Reaktionsansatzes über Nacht bei 4°C wurde die Reaktion mit 15 µl Probenpuffer gestoppt. Das Ligationsprodukt wurde über denaturierende Gelelektrophorese gereinigt, das Produkt eluiert und mittels Ethanol-fällung entsalzt.

3.6.3 Partielle alkalische Hydrolyse

Im Gegensatz zu Desoxyribonukleinsäuren werden Ribonukleinsäuren unter alkalischen Bedingungen hydrolysiert. Als Spaltprodukte werden 5'-Hydroxylgruppen und 2',3'-zyklische Phosphatgruppen erhalten. Der Vorteil der partiellen alkalischen Hydrolyse liegt darin, daß eine durchgehende Bandenleiter entsteht, deren Banden mit den Banden anderer Spaltreaktionen mittels Autoradiographie detektiert und miteinander verglichen werden können. Der Reaktionsansatz wurde für 3 min bei 95°C inkubiert, anschließend mit dem gleichen Volumen Probenpuffer auf Eis gestoppt und auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die partielle alkalische Hydrolyse.

3,0 µl RNA (1-2 · 10 ⁵ cpm)
1,5 µl tRNA (6 µg/µl)
4,5 µl Alkalipuffer (50 mM NaOH, 1 mM EDTA)

3.7 Kinetik der Hammerhead-Spaltung

Bei Kinetiken unter *single turnover*-Bedingungen, wird der Ribozymstrang im Überschuß zugegeben. Jedes Ribozymmolekül kann so maximal ein Substratmolekül umsetzen. Unter diesen Bedingungen haben die Ribozym-Substrat-Komplexbildung (k_1) und die Produktdissoziation (k_3 – k_6) keinen Einfluß auf die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit (k_{obs}). Die Konstante beschreibt lediglich die Geschwindigkeit der chemischen Spaltung der Phosphordiesterbindung (k_2) und ist somit nur von der Ribozymkonzentration abhängig. Es handelt sich hier um eine Reaktion *pseudo*-erster Ordnung. Abbildung 11 zeigt ein vereinfachtes Schema für die Kinetik der Hammerhead-Spaltung.

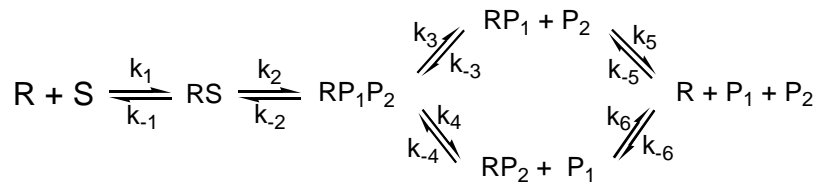


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Enzymkinetik. R steht für Ribozym, S für Substrat und P für Produkt.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} für eine bestimmte Ribozymkonzentration $[R]$ unter *single turnover*-Bedingungen erfolgt nach Gleichung 7. Dabei bezeichnet S_t den Anteil an verbleibendem Substrat zur Zeit t und S_0 den Substratanteil zur Startzeit $t=0$. Der theoretische Endpunkt der Reaktion S_{ende} wurde durch nichtlineare Regression aus einer Auftragung des Substratanteils gegen die Zeit bestimmt.

$$S_t = S_0 \cdot e^{(-k_{obs}t)} \quad (7)$$

Die kinetischen Konstanten k_{cat} und K_M wurden aus einem Sekundärdiagramm bestimmt. Durch nichtlineare Regression gemäß Gleichung 8 einer Auftragung von k_{obs} gegen die verwendete Ribozymkonzentration $[R]$ erhält man die Werte für k_{cat} und K_M .

$$k_{obs} = k_{cat} \frac{[R]}{(K_M + [R])} \quad (8)$$

Der errechnete Wert für k_{cat} gibt die maximal erreichbare Geschwindigkeit unter *single turnover*-Bedingungen an. K_M entspricht der Konzentration, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wurde.

Die Ribozymkonzentration wurde in acht Schritten von 0,1 bis 10 K_M erhöht. Die radioaktiv markierte Substratmenge (ca. 1 nM) wurde mit einem Überschuß an Ribozym in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, für eine Minute auf 65°C erwärmt und über einen Zeitraum von einer Stunde im Heizblock auf 37°C zur Hybridisierung abgekühlt. Die Spaltungsreaktion wurde durch Zugabe von einer auf 37°C temperierten Magnesiumchloridlösung zu einer Endkonzentration von 10 mM gestartet. Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} wurden zwölf verschieden Zeitwerte genommen. Die abgenommenen Volumina wurden jeweils auf die 1,5-fache Menge Stoppuffer gegeben und tiefgefroren. Die Reaktionsprodukte wurden auf 20%-igen denaturierenden Polyacrylamidgelen mittels Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme wurden am Phosphorimager analysiert und die entstandenen Banden mit der zugehörigen Software quantifiziert.

3.8 Phosphorothiolat-Interferenzstudien

3.8.1 Hammerhead-Spaltung

Der erste Schritt der Interferenzanalyse ist die Hammerhead-Spaltung. Die Spaltung wurde als Selektionsprozeß dazu verwendet, Moleküle mit einer interferierenden Modifikation von den Molekülen mit einer nicht-interferierenden Modifikation, also jene, die mit der Kinetik des unmodifizierten Hammerhead-Ribozyms spalten, zu trennen.

Dafür wurde der partiell modifizierte Substratstrang des Hammerheads eingesetzt, der dazugehörige Ribozymstrang wurde unmodifiziert verwendet. Der 5'- bzw. 3'-radioaktiv-markierte Substratstrang (ca. 1 nM) wurde mit einem Überschuß ($10 \times K_M$) an Ribozymstrang in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, für 1 min auf 65°C erwärmt und innerhalb 1 h auf 37°C abgekühlt. Die Spaltungsreaktion wurde durch Zugabe einer auf 37°C temperierten $MgCl_2$ -Lösung zu einer Endkonzentration von 10 mM gestartet. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe der 1,5-fachen Menge Stoppuffer abgebrochen. Eine Reaktionszeit von 10 min entspricht einem Umsatz von etwa 20% beim unmodifizierten Ribozym. Ungespaltene Substrat und gespaltene Produkt wurden über 20%ige denaturierende Polyacrylamidgelen voneinander getrennt, die Banden mittels Autoradiographie detektiert und ausgeschnitten. Die RNA wurde eluiert und durch Ethanol-fällung wiedergewonnen.

3.8.2 Silberspaltung

Phosphorothiolatbindungen werden im Gegensatz zur nativen Phosphordiesterbindung von Silberionen gespalten^[39]. 5'- oder 3'-radioaktiv markierte Substrat- bzw. Produktmoleküle wurden mit Silbernitratlösung zu einer Endkonzentration von 20 mM versetzt und bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Nach 1 h wurde die Reaktion mit DTT-Lösung zu einer Endkonzentration von 50 mM gestoppt. Das gefällte Silbersalz wurde für 5 min bei 9000 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit der doppelten Menge Probenpuffer versetzt. Die Silberspaltungsprodukte wurden auf 25%-igen denaturierenden Polyacrylamidgelen getrennt. Die Spaltungsbanden wurden mittels Autoradiographie detektiert und am Phosphorimager analysiert.