

4. METHODEN

4.1. Synthese und Entschützung von Nukleinsäuren

4.1.1. Automatisierte Festphasensynthese der Oligoribonukleotide

Die Festphasensynthesen der Oligoribonukleotide wurden an einem Syntheseautomaten durchgeführt (PCR-MATETM 391 und 394, Applied Biosystems). Die Ribonukleinsäuren wurden nach dem Phosphoramidit-Verfahren (Beaucage & Caruthers, 1981) unter Verwendung der Standardlösungsmittel synthetisiert. Bei den Synthesen, bei denen *tert*-Butylphenoxyacetyl-geschützte Phosphoramidite verwendet wurden, wurde abweichend vom Standardprotokoll *tert*-Butylphenoxyacetanhydrid statt Acetanhydrid als Capping-Reagenz A eingesetzt. Dadurch wurde sichergestellt, daß auch die Capping-Gruppe unter den kurzen alkalischen Entschützungszeiten abgespalten wird.

Die Synthese der Oligomere fand in Reaktionssäulen statt, in denen sich das trägergebundene geschützte Startribonukleosid befand. Die reaktive 5'-Hydroxylgruppe dieses Nukleosids wurde durch eine Dimethoxytritylgruppe (DMT) geschützt. Die 3'-Hydroxylgruppe war kovalent über eine Succinylaminopropyl-Brücke mit einem CPG-Trägermaterial (controlled pore glass) der Porengröße 500 Å verbunden. Die Schutzgruppen für die Basen sowie die 2'-Hydroxylfunktionen entsprachen denen der bei der jeweiligen Synthese verwendeten Phosphoramidite. Für die Synthesen wurde 1 µmol des trägergebundenen Nukleosids in eine Synthesensäule eingewogen. Die Synthesensäulen wurden beidseitig mit einem Filter versehen, verschlossen und mit Metallhülsen abgedichtet. Auf Vorrat gefüllte Synthesensäulen wurden bei – 20 °C gelagert. Zur Synthese wurden die Säulen in den Syntheseautomaten eingebaut.

Als Phosphoramidit Bausteine wurden die nachfolgend aufgeführten Synthone verwendet:

- „Standard“-Phosphoramidite, hergestellt von Dr. R. Bald und K. Beyer:
N⁶-Benzoyl-adenyl-, N⁴-Benzoyl-cytosyl-, N²-Isobutryl-guanyl- und Uracil-Phosphoramidite

- „PAC“-Phosphoramidite, bezogen von den Firmen Eurogentech oder ChemGenes:
N⁶-Phenoxyacetyl-adenyl-, N⁴-Benzoyl-cytosyl-, N²-Isopropyl-phenoxyacetyl-guanyl- und Uracil-Phosphoramidite
- Expedite[®]-Phosphoramidite, angeboten von der Firma PerSeptive:
N⁶-*tert*-Butylphenoxyacetyl-adenyl-, N⁴-*tert*-Butylphenoxyacetyl-cytosyl-, N²-*tert*-Butylphenoxy-acetyl-guanyl- und Uracil-Phosphoramidite.

Das verwendete 1,N⁶-Ethenoadenosin-Phosphoramidit wurde von der Firma ChemGenes hergestellt.

Bei den „Standard“-Phosphoramiditen wurde zum Schutz der 2'-Hydroxylgruppen eine Triisopropylsilylgruppe verwendet. Bei allen anderen Phosphoramiditen wurde diese Position durch eine *tert*-Butyldimethylsilylgruppe (*t*BDMS) geschützt. Die 5'-Hydroxylgruppen aller Phosphoramidite wurden durch eine Dimethoxytritylgruppe und der Phosphor durch eine β -Cyanoethyl- und eine Diisopropylamingruppe geschützt.

Die Phosphoramidite wurden direkt vor Synthesebeginn in trockenem Acetonitril (Wassergehalt < 0,001%; Aldrich) unter Argon gelöst. Die Endkonzentration betrug 0,15 M für Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uracil bzw. 0,2 M für 1,N⁶-Ethenoadenosin in absolutem Acetonitril. Es wurde der Standardsyntheszyklus verwendet (Nolte *et al.*, 1996). Die Kopplungszeit der Phosphoramidite wurde auf 900 sec festgesetzt, um trotz sterischer Hinderung der voluminösen 2'-Hydroxylschutzgruppen eine ausreichend gute Kopplung zu ermöglichen.

Die Synthese begann mit der Abspaltung der säurelabilen DMT-Schutzgruppe mittels Trichloressigsäure (TCA) am Startnukleosid. Anschließend wurde das Phosphoramidit des folgenden Nukleosids gemeinsam mit aktivierendem Tetrazol auf die Synthesäule gegeben. Tetrazol protoniert als schwache Säure die Aminogruppe des Phosphoramidites. Dadurch wird die Diisopropylamingruppe am Phosphoratom bei der nukleophilen Substitution durch die 5'-Hydroxylgruppe des gekoppelten Nukleosids zur leichten Abgangsgruppe. Für diesen Reaktionsablauf ist es wichtig, in einem hydroxylfreiem Milieu zu arbeiten, weshalb trockenes Acetonitril als Lösungsmittel verwendet wurde und alle Reagenzien und Lösungsmittel unter Argon wasserfrei gehalten werden mußten.

Im Anschluß wurden mit einer Mischung von Acetanhydrid bzw. *tert*-Butylphenoxy-acetanhydrid mit N-Methylimidazol die nicht gekoppelten 5'-Hydroxylgruppen acyliert (Capping). Die Acylierung verhindert eine spätere Reaktion der OH-Gruppen und dadurch die

Verlängerung dieser Ketten. Die kleinere Kettenlänge der die Synthese verunreinigenden Oligomere erleichtert die Aufreinigung des Syntheseproduktes. Nach Kopplung und Capping wurde die trivalente Phosphortriester-Bindung mittels Iodlösung zu einer stabileren pentavalenten Phosphorbindung oxidiert und der Synthesesyklus damit beendet.

Durch zwischengeschaltete Waschschritte wurden alle überschüssigen Reagenzien und Nebenprodukte, die bei den einzelnen Reaktionen entstanden waren, entfernt. Der Synthesesyklus wurde so lange wiederholt, bis die erwünschte Kettenlänge erreicht wurde. Abschließend wurde die DMT-Schutzgruppe, die sich am letzten Nukleosid befand, abgespalten. Das Syntheseprodukt wurde unter Argon getrocknet. Danach wurde die Säule aus dem Syntheseautomaten ausgebaut. Wenn die Entschützung nicht direkt im Anschluß an die Synthese durchgeführt wurde, wurden die Synthesesäulen in Parafilm® eingewickelt und bei -20 °C gelagert.

4.1.2. Entschützung der Syntheseprodukte

Das bei der Festphasensynthese erhaltene Substanzgemisch muß vor der Aufreinigung vom Säulenmaterial abgespalten und von Schutzgruppen befreit werden. Die Abspaltung des Trägermaterials sowie die Entfernung der Basen- und Phosphatschutzgruppen findet durch alkalische Hydrolyse statt. Es wurden hierbei mehrere Methoden angewendet, um Bedingungen zu finden, bei denen sowohl eine möglichst geringe Zersetzung des im basischen Milieu instabilen Fluorophors 1,N⁶-Ethenoadenosin als auch eine ausreichend gute Syntheseausbeute gewährleistet war. Fand die alkalische Hydrolyse in Lösung statt, so wurde das noch am Trägermaterial gekoppelte Synthesegemisch von der Säule in ein verschließbares Glasröhrchen überführt. Bei der gasförmigen Methode hingegen verblieben die Syntheseprodukte bis zum Ende der Abspaltung in der Reaktionssäule. Nach der alkalischen Entschützung wurden die Silylschutzgruppen an der 2'-OH-Position der Ribosen abgespalten.

4.1.2.1. Alkalische Entschützung

Bei der alkalischen Entschützung wurde das Protokoll variiert, um optimale Bedingungen für die Darstellung der fluoreszierenden RNAs zu finden. Die nachfolgende Aufzählung ist unterteilt nach verwendeten Synthonen und Entschützungsvarianten.

1. Synthese mit „Standard“-Phosphoramiditen:

Alkalisches Reagenz: Ammoniak_{aq}/Ethanol (3:1),

Inkubationsbedingungen: 55 °C, 24 h

2. Synthese mit „PAC“-Phosphoramiditen:

a) Alkalisches Reagenz: absoluter ethanolischer Ammoniak

Inkubationsbedingungen: 6 h, 37 °C

Die Bedingungen entsprachen den von ChemGenes empfohlenen Entschützungsbedingungen für RNAs, die 1,N⁶-Ethenoadenosin enthalten.

b) Alkalisches Reagenz: absoluter methanolischer Ammoniak

Inkubationsbedingungen: 6 h, 37 °C

c) Alkalisches Reagenz: absoluter methanolischer Ammoniak

Inkubationsbedingungen: 5 h, 37 °C

d) Alkalisches Reagenz: absoluter methanolischer Ammoniak

Inkubationsbedingungen: 4 h, 37 °C

3. Synthese mit Expedite[®]-Phosphoramiditen

a) Alkalisches Reagenz: Ammoniak_g.

Inkubationsbedingungen: 6 bis 8 bar, RT, 40 min

Für diese Entschütungsmethode wurde das Synthesegemisch mitsamt der Synthesäule in einen Laborautoklaven (Modell O der Firma Carl Roth) gegeben (Boal *et al.*, 1996). Das Gas wurde von der Fa. Messer Griesheim GmbH bezogen. Nach der Entschützung wurde das Syntheseprodukt durch mehrmaliges Spülen mit Millipore Wasser vom Säulenmaterial abgetrennt.

b) Alkalisches Reagenz: Ammoniak_{aq}/Ethanol (3:1),

Inkubationsbedingungen: 55 °C, 30 min.

Die Bedingungen entsprachen den von PerSeptive empfohlenen Entschützungsbedingungen für RNA-Synthesen mit Expedite[®]-Amiditen.

Nach der alkalischen Entschützung wurde das CPG-Trägermaterial von den gelösten Syntheseprodukten abgetrennt und die Lösung in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingeeengt.

4.1.2.2. Entfernung der Silylschutzgruppen

Im Anschluß an die alkalische Entschützung wurde das Nukleinsäurepellet in einem Wasser-Ethanol-Gemisch (1:1, ca. 1 µl/A₂₆₀) suspendiert. Zur Abspaltung der *tert*-Butyldimethylsilylgruppe wurde die Suspension mit etwa 10 µl/A₂₆₀ Tetrabutylammoniumfluoridlösung (TBAF) in Tetrahydrofuran (1,1 M) vermischt und für mindestens 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abspaltung der stabileren Triisopropylsilylschutzgruppe war eine Entschützungszeit von 72 h notwendig. Nach Inkubation fand eine Entsalzung über QIAGEN-tip 500 Säulen statt. Hierzu wurden die verwendeten Säulen zunächst mit 10 ml 0,1 M Triethylammoniumacetat (TEAAc, pH 7,0) equilibriert. Anschließend wurden die mit 0,1 M TEAAc (pH 7,0) auf 10 ml verdünnten Proben aufgetragen. Die beladenen Säulen wurden zweimal mit je 30 ml 0,1 M TEAAc (pH 7,0) gewaschen und das Rohprodukt schließlich mit 10 ml 2 M TEAAc (pH 7,0) eluiert.

Das aufgefangene Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt und entweder durch mindestens zweimalige Ethanolfällung oder mehrfachem Waschen mit Millipore Wasser und anschließendem Einengen bis zur Trockne entsalzt. Das entsalzte Gemisch an Oligoribonukleotiden wurde in Millipore Wasser gelöst, um eine photometrische Konzentrationsbestimmung bei 260 nm durchzuführen.

4.2. Aufreinigung von Nukleinsäuren

4.2.1. Reversed Phase HPLC

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) als eine mit Druck arbeitende Sonderform der Säulenchromatographie wird zur Trennung von Substanzgemischen sowie deren qualitativer und quantitativer Analyse eingesetzt. Die Auftrennung von Substanzgemischen ist dabei das Ergebnis von physikalischen und chemischen Interaktionen zwischen einer mobilen und einer stationären Phase.

Es gibt in der Chromatographie zwei Phasensysteme:

1. ‚Normal-Phase‘: Bei diesem System besitzt die stationäre Phase hydrophile und polare Eigenschaften, während die mobile Phase, mit der die Substanzen eluiert werden, ein unpolares Lösungsmittel ist.
2. ‚Reversed-Phase‘: Bei der Reversed-Phase HPLC ist die Phasenverteilung genau umgekehrt. Während die stationäre Phase unpolar und hydrophob ist, besteht die mobile Phase aus einem polaren Lösungsmittel.

HPLC-Säulen sind mit einer stationären Phase, die aus kleinen Feststoffpartikeln besteht, gefüllt. Die Korngröße und die Korngrößenverteilung der stationären Phase haben starken Einfluß auf die Trennleistung der Säule. Je kleiner und gleichmäßiger die Partikel geformt sind, desto größer ist die Trennleistung der jeweiligen Säule (Engelhardt, 1977). Da kleinere Korngrößen gleichzeitig eine größere Packungsdichte in der Trennsäule bedeuten, wird das Elutionsmittel mit Hilfe von Pumpen zur Aufrechterhaltung und Regulierung einer ausreichenden Strömungsgeschwindigkeit durch die Säulen gedrückt.

Zur Aufreinigung der synthetisierten Oligomere wurden Ultrasphere[®](C-18)-Säulen der Firma Beckman verwendet. Sie wiesen einen Partikeldurchmesser von 5 µm (sphärisch) mit einer Porengröße von 80 Å auf. Der Innendurchmesser der Säulen beträgt 4,6 mm bei einer Säulenlänge von 45 mm (Vorsäule, zur Abtrennung von Verunreinigungen) bzw. 250 mm (Hauptsäule).

Die verwendete HPLC-Anlage der Firma Beckman Instruments Inc., arbeitet mit einem programmierbarem Pumpenmodul mit zwei analytischen Pumpen, einer UV-Detektoreinheit, einem programmierbarem Säulenofen sowie dem System Gold[®]-Software Paket. Zeitweise wurde eine zweite Detektoreinheit über ein Analog Interface Modul mit dem System verknüpft, so daß eine fluorimetrische Auswertung der Analysen möglich war.

Die Flußrate des Elutionsmittels lag bei 1 ml/min, die Temperatur der Säulen wurde konstant auf 45°C gehalten. Als Elutionsmittel wurden Puffer A (100 mM TEAAc, pH 7,0) sowie Puffer B (80 % Acetonitril in Puffer A) verwendet. Beide Puffer wurden nach Herstellung sterilfiltriert. Zur Aufreinigung der Syntheseprodukte wurde ein Gradient von 1 – 15 % Puffer B in Puffer A (entsprechend 0,8 – 12 % Acetonitril in 0,1 M TEAAc) über 60 min gewählt. Jeder Lauf endete mit einem Spülgradienten von 15 - 100 % Puffer B in 5 min, 100 % Puffer B für 5 min und 100 – 1 % Puffer B in 5 min.

4.2.2. Gelelektrophorese

4.2.2.1. Gelelektrophoretische Methoden

Elektrophoretische Verfahren beruhen auf der Wanderung geladener Teilchen einer Lösung, einer kolloidalen Lösung oder einer Dispersion in einem elektrischen Feld. Die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit der Teilchen ermöglicht ihre Auftrennung. Diese kann sowohl analytisch als auch präparativ ausgewertet werden.

Die Gelelektrophorese gehört zu den Trägerelektrophoresen, bei denen eine elektrophoretische Wanderung der Substanzen auf einem Träger (Gel), der mit einer Untersuchungslösung (Puffer) getränkt ist, stattfindet. Sie basiert auf der Tatsache, daß Nukleinsäuren bei allen pH-Werten polyanionisch sind, daß heißt an ihren vielen Phosphatgruppen im Zucker-Phosphodiester-Rückgrat negative Ladungen tragen. Diese Polarität bedingt eine Wanderung der Moleküle im elektrischen Feld zur positiven Elektrode (Anode) hin.

Das Wanderungsverhalten von Makromolekülen hängt unter anderem ab von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes, Nettoladung, Form und Größe der Oligomere, sowie der Ionenstärke, der Porengröße und der Temperatur der verwendeten Matrix. Polyacrylamidgele wirken hierbei aufgrund ihrer Porenstruktur wie Molekularsiebe.

Bei der Gelelektrophorese gelten im wesentlichen zwei elektrische Gesetze:

$$U = R \times I \quad \text{(Gleichung 1)}$$

$$P = U \times I \quad \text{(Gleichung 2)}$$

I stellt die Stromstärke in Ampere, U die Spannung in Volt, R den Widerstand in Ohm und P die Leistung in Watt dar. Einer dieser Parameter wird während der Elektrophorese konstant gehalten. Bei konstanter Spannung verringert sich die Wanderungsgeschwindigkeit ohne das eine zusätzliche Wärmeentwicklung stattfindet. Bei konstanter Stromstärke hingegen bleibt die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren durch die Gelmatrix konstant, da diese proportional zur Stromstärke ist. Im Laufe der Elektrophorese kommt es jedoch zur Wärmeentwicklung.

Bei den verwendeten Polyacrylamidgelen besteht die Gelmatrix aus polymeren Acrylamidsträngen, die durch N,N'-Methylenbisacrylamid miteinander vernetzt sind. Die Porengröße kann durch unterschiedliche Konzentrationen an Gelbildner (Acrylamid) und Vernetzer (N,N'-Methylenbisacrylamid) so eingestellt werden, daß sie der jeweiligen Trennproblematik

angepaßt ist. Zusätzlich besteht bei der Auftrennung von Nukleinsäuren die Möglichkeit native Polyacrylamidgele zu verwenden, bei denen die Nukleinsäuren weitgehend unter Erhaltung ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur aufgetrennt werden, oder denaturierende Polyacrylamidgele, bei denen eine Auftrennung der Nukleinsäuren nach Kettenlänge in Gegenwart denaturierender Reagenzien, wie zum Beispiel Harnstoff oder Formamid, erfolgt. Die farblosen Substanzen im Elektropherogramm können durch verschiedene Anfärbemethoden oder Adsorption von UV-Licht (UV-Shadowing) sichtbar gemacht werden.

4.2.2.2. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die präparative Reinigung bzw. die Reinheitskontrolle von Oligonukleotiden nach chemischer RNA-Synthese erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese. Hierbei konnten einzelsträngige Nukleinsäuren nach ihrer Kettenlänge aufgetrennt werden, da die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen unterdrückt wurde. Es wurden Hochgelkammern der Firma ITC bzw. entsprechende Nachbauten verwendet. Die gegossenen Gele enthielten 6 – 12 % Polyacrylamid und hatten eine Größe von 19 cm x 21,5 cm x 1 mm bzw. 16 cm x 24 cm x 1 mm. Sie als enthielten als denaturierendes Agens 7 M Harnstoff.

Die Gelmatrix bestand aus Polyacrylamid, das durch radikalische Polymerisation von Acrylamid mit N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt wurde. N,N'-Methylenbisacrylamid diente hierbei als Quervernetzer und beeinflusste damit die Porengröße des Gels. Die Polymerisation der Gele wurde nach vollständigem Lösen des Harnstoffs in der Gellösung durch Zugabe von 300 µl einer 10 prozentigen Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS) als Polymerisationsstarter und 30 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Radikalstabilisator, initiiert. Der Ansatz für ein Gel betrug 50 ml. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 30 mM EDTA) verwendet.

Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die Proben in 50 % Formamid oder in einer 7 M Harnstoff-TBE-Lösung aufgenommen. Nach Polymerisation der Gele fand für mindestens 20 Minuten eine Präelektrophorese statt. Anschließend wurden die Geltaschen gründlich mit 1x TBE-Puffer gespült und die denaturierten Proben aufgetragen. Als Längenmarker wurde eine Bromphenolblau-Xylencyanol-Lösung (in 50 % Formamid oder in einer

7 M Harnstoff-TBE-Lösung) verwendet. Je nach Trennproblematik wurde eine konstante Spannung von 500 – 900 V angelegt.

Acrylamidkonzentration	6 %	8 %	10 %	12 %
Acrylamid/Bisacrylamid (40:2), filtriert	7,5 ml	10 ml	12,5 ml	15 ml
5 x TBE	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Harnstoff	21 g	21 g	21 g	21 g
Millipore Wasser	ad 49,5 ml	ad 49,5 ml	ad 49,5 ml	ad 49,5 ml
APS (10 %)	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
TEMED (100 %)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Tabelle 1: Standardpipettierschema für denaturierende Polyacrylamidgele

4.2.3. Nachweis von Nukleinsäuren in Gelen

4.2.3.1. Fluoreszenzdetektion nach Färbung mit Ethidiumbromid

Die Färbung mit Ethidiumbromid ist die am häufigsten verwendete Methode zum analytischen Nachweis von Nukleinsäuren in Elektrophoresegelen. Ethidiumbromid gehört zu den Sequenz-unspezifischen DNA-Interkalatoren. Der heterozyklische, kationische Fluoreszenzfarbstoff lagert sich zwischen einzelne Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls ein. Auch mit einzelsträngige Nukleinsäuren kann Ethidiumbromid einen, wenn auch wesentlich schwächeren, Komplex bilden. Schon kleinere Mengen an Nukleinsäuren ($> 0,01 A_{260}$) können mit Ethidiumbromid angefärbt und somit direkt in einem Gel sichtbar gemacht werden.

Zum analytischen Nachweis von Nukleinsäuren wurden die Polyacrylamidgele nach der Elektrophorese mindestens 20 Minuten lang in ein Bad mit einer Ethidiumbromidlösung (0,5 bis 1 µg/ml 1x TBE) gelegt. Anschließend wurden die Gele auf dem Transilluminator mit

Durchlicht der Wellenlänge 306 nm bestrahlt und fotografiert. Durch Komplexbildung mit Ethidiumbromid konnten die Nukleinsäuren als rot-orange fluoreszierende (590 nm) Banden identifiziert werden.

4.2.3.2. „Stains-All“ Methode zur Färbung von Polyacrylamidgelen

„Stains-All“ (1-Ethyl-2-[3-(1-Ethyl-naphthol[1,2d]thiazol-2-(1H)yliden)-2-methyl-1-propenyl]-naphtho[1,2-d]thiazoliumbromid) ist ein Universalfarbstoff für die Elektrophorese. Die Fixier-, Farbstoff- und Entfärbelösungen wurden laut Herstellerinformation zubereitet. Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese vorsichtig aus den Gelplatten gelöst und während etwa 15 min unter langsamen Schütteln mit Fixierlösung behandelt und anschließend vorsichtig abgespült. Danach wurde es in einem mit Aluminiumfolie zugedecktem Färbebad über Nacht inkubiert und anschließend mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch (10/130, v/v) entfärbt. Der Farbstoff färbt Nukleinsäuren blau bis blauviolett.

4.2.3.3. Detektion durch UV-Shadowing

Bei präparativen Polyacrylamidgelen wurde die Methode des UV-Shadowings zur Detektion der Produktbanden herangezogen. Hierbei können Oligonukleotide aufgrund ihres hohen Absorptionskoeffizienten direkt, also ohne vorheriges Anfärben, detektiert werden.

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten abgelöst und auf eine in Cellophanfolie eingeschlagene Kieselgelplatte gelegt. Die Kieselgelplatten enthielten einen Fluoreszenzfarbstoff (60 F₂₅₄), der bei Anregung durch aufgestrahltes Licht der Wellenlänge 254 nm hellgrün fluoreszierte. Da Nukleinsäuren in der Lage sind, Licht dieser Wellenlänge zu absorbieren, waren die Banden als Schatten in den Gelen zu detektieren. Die Schattenbanden, die dem gewünschten Produkt entsprachen, wurden markiert und aus den Gelen ausgeschnitten. Anschließend wurden die Oligoribonukleotide aus den Gelen eluiert. Um UV-bedingte Schädigungen der Oligoribonukleotide zu vermeiden, wurde die Identifizierung und Markierung der Schattenbanden möglichst schnell durchgeführt.

Ein großer Nachteil dieser Methode ist ihre geringe Empfindlichkeit ($> 0,5 A_{260}$), wodurch sie hauptsächlich bei der präparativen Aufreinigung von Nukleinsäuren anzuwenden ist.

4.2.4. Gelelution von Nukleinsäuren

Die mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgereinigten Oligonukleotide wurden im Freeze-Squeeze-Verfahren aus den Gelen eluiert. Hierzu wurden die entsprechenden Gelbanden ausgeschnitten, zerkleinert, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit ca. 1 ml Millipore Wasser vermischt. Wurden mehrere Banden des gleichen Oligoribonukleotids eluiert, so wurden die zerkleinerten Gelbanden in einem Probenröhrchen vereinigt und mit Millipore Wasser bedeckt. Die zu eluierenden Gelstückchen wurden dreimal für mindestens 15 min bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut. Durch dieses Verfahren wird die Gelmatrix weiter aufgebrochen, was eine bessere Durchdringung des Gels durch die Elutionsflüssigkeit zur Folge hat. Die Nukleinsäuren wurden mindestens 12 h bei 4°C aus dem Gel eluiert. Das Eluat wurde anschließend abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstückchen wurden dann abermals für 30 min mit ca. 500 μl Millipore Wasser bei Raumtemperatur unter Schütteln eluiert. Die Eluatfraktionen wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde anschließend entweder in Wasser aufgenommen und über Gelfiltrationssäulen entsalzt oder mindestens zweimal einer Ethanol-fällung unterzogen, um den Harnstoff zu entfernen.

4.2.5. Gelfiltration

Die Gelfiltration wird auch als Gelchromatographie oder Größenausschlußchromatographie bezeichnet. Sie unterscheidet sich prinzipiell dadurch von den anderen flüssigchromatographischen Verfahren, daß die Probenmoleküle nicht in Wechselwirkung (Adsorption, Verteilung) mit der stationären Phase treten. Als Trennmaterial dienen polymere Gele mit definierten Porengrößen. Der Trennvorgang beruht auf der unterschiedlichen Eindringmöglichkeit und -dauer von Probenmolekülen unterschiedlicher Größe in die Poren der Gelmatrix. Moleküle, die zu groß sind, um in diese Poren einzudringen, werden somit zuerst von der Säule eluiert. Dieses unterschiedliche Wanderungsverhalten wird zur Entfernung niedermolekularer Komponenten, wie z. B. Harnstoff, Mononukleotiden oder Nukleosiden, aus wäßrigen Nukleinsäurelösungen genutzt. Verwendet wurden standardisierte mit Sephadex[®] G-25 (NAPTM 5, 10 und 25) oder Sephadex[®] G-50 (NICK) gefüllte Gelfiltrationssäulen. Es wurde das jeweilige Filtrationsprotokoll des Herstellers verwendet.

4.2.6. Ethanolfällung

Die Ethanolfällung ist ein Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen. Dabei kommt es in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen zur Aggregation der Nukleinsäuremoleküle und ihrer nachfolgenden Präzipitation. Kurze Polynukleotide, Mononukleotide, Nukleoside und Salze bleiben unter diesen Bedingungen in Lösung. Das Verfahren dient der Entfernung unerwünschter NebenkompONENTEN.

Zur Reinigung wurde die Nukleinsäurelösung mit einem Zehntel ihres Volumens an 3 M Natriumacetatpuffer, pH 5,5, und dem 2,5-fachen Volumen an absolutem Ethanol (vorgekühlt auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) vermischt. Die anschließende Fällung fand für 30 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt. Nach erfolgter Präzipitation wurde das Oligoribonukleotid für mindestens 30 min bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13000 U/min durch Zentrifugation sedimentiert. Nach Abtrennung der flüssigen Phase wurde das erhaltene Pellet mit etwa 200 μl Ethanol (70 %) gewaschen, nochmals für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei sehr geringen Mengen an Oligoribonukleotid konnte die Präzipitation durch Zugabe von Glykogen als Fällhilfe initiiert beziehungsweise verbessert werden.

Standardpipettierschema	Inkubationsbedingungen
x μl Nukleinsäurelösung	
x/10 μl 3 M Natriumacetat, pH 5,5	
2,5x μl absoluter Ethanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)	
20 μg Glykogen (bei Bedarf)	30 min, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
	Z $\geq$ 30 min, 13000 U/min, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.3. Enzymatische Spaltung

4.3.1. Nukleosidanalyse mit Ribonuklease T2 und alkalischer Phosphatase

Die Reinheit der 3',5'-verknüpften Oligoribonukleotide und der Zersetzungsgrad des 1,N⁶-Ethenoadenosins wurde mittels Spaltung mit Ribonuklease T2 (aus *Aspergillus oryzae*) und Dephosphorylierung durch alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) geprüft. Ribonuklease T2 spaltet unspezifisch einzelsträngige RNA-Regionen. Hierbei werden Nukleosid-3'-phosphate (HO-N_P) freigesetzt. Da keine 2',5'-verknüpften Oligoribonukleotide von der Ribonuklease T2 gespalten werden (Wang *et al.*, 1990), dürfen nach vollständiger enzymatischer Hydrolyse eines reinen Oligoribonukleotids und der darauf folgenden Dephosphorylierung der Nukleotide bei einer HPLC-Analyse nur die diskreten Signale für die in der RNA-Sequenz enthaltenen Nukleoside erscheinen.

Für die Nukleosidanalysen wurden jeweils 0,1 - 0,3 A₂₆₀ RNA in RNase T2 Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 25 mM Magnesiumchlorid) gelöst und mit 1 U Ribonuklease T2 pro 0,1 A₂₆₀ RNA in einem 20 µl Ansatz für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Dephosphorylierung wurde anschließend 1 U alkalische Phosphatase pro 0,1 A₂₆₀ RNA hinzugegeben und erneut für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Standardpipettierschema	Inkubationsbedingungen
0,1 – 0,3 A ₂₆₀ RNA	
1 U/0,1 A ₂₆₀ Ribonuklease T2	
2 µl 10 x RNase T2 Puffer	
ad 20 µl Millipore Wasser	1,5 h, 37 °C
1 U/0,1 A ₂₆₀ alkalische Phosphatase	1 h, 37 °C
	Z HPLC Analyse

Die entstandenen Spaltprodukte wurden anschließend mit einem Beckman Gold HPLC-System über eine Reversed-Phase-Säule (Beckman Ultrasphere[®]-C-18) bei einem Gradienten von 1 – 15 % Puffer B in Puffer A über 60 Minuten analysiert. Die HPLC-Bedingungen

entsprachen denen der Aufreinigung von Nukleinsäuren (siehe 4.2.1). Um den Zersetzungsgrad des 1,N⁶-Ethenoadenosins besser bestimmen zu können, wurde bei der Analyse entsprechender Oligoribonukleotide zusätzlich zur UV-Detektion (260 nm) ein Fluoreszenzdetektor verwendet. Die Extinktionswellenlänge betrug hierbei 300 nm, die Fluoreszenzemission wurde bei 410 nm erfasst.

Die Basenzusammensetzung der hydrolysierten RNA konnte dann mit Hilfe der Peakintegrale und unter Berücksichtigung der molaren Extinktionskoeffizienten der Nukleoside bei 260 nm (A: 14900 l/mol cm, C: 9100 l/mol cm, G: 13600 l/mol cm, U: 10100 l/mol cm (Fasman, 1975), ϵ A: 5040 l/mol cm) errechnet werden.

4.3.2. Enzymatische Spaltung durch Phosphodiesterase

Die Phosphodiesterase aus Schlangengift ist eine Exonuklease und greift an der 3'-terminalen Hydroxylgruppe einer Nukleinsäure an. Durch den Verdau werden 5'-Mononukleotide (pN_{OH}) freigesetzt.

60 pmol D-A469_38εA25 wurden mit 0,04 µg Phosphodiesterase (aus *Crotalus durissus*) in 30 µl SVP-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,0, 5 mM Magnesiumchlorid) für 4,5 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Standardpipettierschema	Inkubationsbedingungen
60 pmol RNA	
1 µl Phosphodiesterase (0,04 µg/µl)	
3 µl 10 x SVP-Puffer	
ad 30 µl Millipore Wasser	4,5 h, 37 °C
	Z Fluoreszenzmessung

Nach dem Verdau wurde die Probe mit Millipore Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Die RNA-Konzentration betrug daraufhin 0,2 µM. Als Referenzlösung wurden 0,2 µM des unverdauten Oligoribonukleotids unter gleichen Pufferbedingungen gelöst. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der beiden Probenlösungen zeigt den Quenchingeffekt durch Einbau von 1,N⁶-Ethenoadenosin in das RNA-Molekül.

4.4. Tritiierung von L-Adenosin

Die Firma Amersham International (Cardiff, Großbritannien) markierte 10 mg L-Adenosin (37,5 μmol) mit 370 Gbq (10 Ci) Tritiumgas durch katalytischen Austausch in Lösung. Die Abtrennung des Tritiums erfolgte ebenfalls durch Amersham International.

Es folgte eine präparative Reinigung von 370 Mbq (10 mCi) der insgesamt erhaltenen 15,7 Gbq (425 mCi) L-[2,8(n)- ^3H]-Adenosin über eine Kieselgel-Dünnschichtchromatographie (PSC-Fertigplatte, Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Laufmittel Chloroform:Methanol = 7:3). Die Produktbande wurde mittels UV-Licht lokalisiert, von der Platte abgetrennt und in ein 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Pulverisieren mit einem Spatel wurde das Produkt in einem Glasgefäß mit Chloroform:Methanol (1:1) aus der pulverisierten Bande eluiert. Das aufgearbeitete L-[2,8(n)- ^3H]-Adenosin wurde von Dr. Klußmann zur Verfügung gestellt.

4.5. Spektralphotometrische Bestimmungen

4.5.1. Grundlagen der UV-Vis-Spektroskopie

Die Energie des sichtbaren (400 – 800 nm) und ultravioletten (200 – 400 nm) Lichtes wird teilweise von organischen Molekülen absorbiert und regt π - und n-Elektronen an. Die durch graphisches Auftragen der Lichtabsorption (A) gegen die Wellenlänge (λ) erhaltenen Absorptionsspektren können sowohl quantitativ wie auch qualitativ ausgewertet werden.

Die Absorptionsbanden im UV-Vis-Spektrum sind durch ihre Lage (λ_{max}), ihre Höhe (ϵ_{max}) und ihre Form gekennzeichnet. Die Lage des Absorptionsmaximums (λ_{max}) hängt von der Energie ab, die erforderlich ist, um ein Molekül aus seinem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand zu überführen. Der Vorteil dieser spektralphotometrischen Methode liegt in ihrer relativ großen Empfindlichkeit und schnellen Durchführbarkeit, der Nachteil in ihrer oft geringen Substanzspezifität.

4.5.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Basen der Nukleinsäuren zeigen im UV-Bereich um 260 nm ein starkes Absorptionsmaximum. Daher kann die Konzentration einer wässrigen Oligonukleotidlösung durch Absorptionsbestimmung bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt werden. Die Messungen wurden mit einem Zweistrahl-Photometer UV-160A der Firma Shimadzu, mit der entsprechenden Software durchgeführt. Das Meßvolumen betrug bei allen Bestimmungen 1 ml.

4.5.3. Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Oligoribonukleotiden

RNA-Moleküle lassen sich mittels totaler alkalischer Hydrolyse in ihre 2'- und 3'-Nukleosidmonophosphate aufspalten. Bei Kenntnis der molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleosidmonophosphate und der genauen Basenzusammensetzung der Oligonukleotide kann über eine Absorptions-Differenzanalyse mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($A = \epsilon \cdot c \cdot d$) der molare Extinktionskoeffizient (ϵ) der RNA bestimmt werden. Hierzu werden die Absorption der Hydrolyseprodukte und die Absorption einer gleichen Menge an unhydrolysiertem Oligoribonukleotid bei 260 nm zueinander in Verhältnis gesetzt. Berücksichtigt man weiterhin das jeweilige Molekulargewicht des Oligomers, so kann außerdem eine Beziehung zwischen Absorption bei 260 nm und der absoluten Masse der Substanz hergestellt werden. Da sich 1,N⁶-Ethenoadenosin unter den erforderlichen alkalischen Bedingungen zersetzt, wurde durch eine weitere Absorptionsvergleichsmessung einer 1,N⁶-Ethenoadenosinmonophosphat-Lösung und ihres entsprechenden alkalischen Hydrolysats der molare Extinktionskoeffizient des Hydrolyseproduktes ermittelt.

Zur alkalischen Hydrolyse wurden 0,1 bis 0,2 A₂₆₀ RNA mit 25 µl 0,1 M Natriumhydroxid versetzt und 90 min bei 90 °C inkubiert. Nach Neutralisation mit 25 µl 0,1 M Salzsäure und Auffüllen des Volumens auf 1000 µl mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) wurde die Probenlösung in eine 1 ml Quarzküvette überführt und vermessen. Zur Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten der RNAs wurden die folgenden Extinktionskoeffizienten für 3'-Mononukleotide bei pH 7,0 und 260 nm verwendet: AMP: 15400 l/mol cm, CMP: 9000 l/mol cm, GMP: 13400 l/mol cm, UMP: 10000 l/mol cm (Fasman, 1975), ϵ AMP: 5160 l/mol cm und ϵ AMP_{hydr.}: 5600 l/mol cm.

Standardpipettierschema	Inkubationsbedingungen
0,1 – 0,2 A ₂₆₀ RNA	
25 µl 0,1 M NaOH	90 min; 90 °C
25 µl 0,1 M HCl	
ad 1000 µl 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0)	Z Absorptionsmessung

4.6. Bestimmung der Dissoziationskonstanten

4.6.1. Gleichgewichtsdialyse

Die Gleichgewichtsdialyse (Wrede *et al.*, 1978) wurde als Referenzmethode zur fluorimetrischen Bestimmung der Dissoziationskonstanten durchgeführt. Die hierbei verwendeten Mikrodialysekammern bestanden aus zwei Halbkammern der Maße 1,9 x 1,9 x 0,9 cm und einem Volumen von jeweils 50 µl. Als Membran wurde eine SpectraPor CE Membran mit einem molekularen Ausschlußgrenze (Cut-Off) von 2000 Dalton verwendet. Die Randbereiche der Membranstücke wurden zur Abdichtung so mit mittelviskosem Silikonfett (Baysilone-Paste) bestrichen, daß nach ihrem Einspannen zwischen die beiden Kammerhälften kein Fett mit den Lösungen in den Kompartimenten in Berührung kam.

Die Konzentration der Oligoribonukleotide wurde UV-spektroskopisch bei 260 nm bestimmt. L-[2,8(n)-³H]Adenosin (tritiert von Amersham Buchler) wurde bei jeder Messung mit einer konstanten Konzentration von 10 nM eingesetzt. Die RNA-Liganden Konzentration variierte innerhalb der Meßreihen von 0,75 µM bis 52,5 µM. Das eingesetzte Probenvolumen lag in beiden Kammerkompartimenten bei jeweils 40 µl.

Vor Beladen der Kammer wurde die RNA in 40 µl Bindungspuffer (40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 250 nM Natriumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid, 0,5 mM EDTA) gelöst, bei 90 °C für 10 Minuten im Thermomixer denaturiert und anschließend in etwa 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Während dieser Zeit konnten die beiden Oligoribonukleotidstränge zur aktiven Konformation des RNA-Liganden hybridisieren. Das radioaktiv markierte L-Adenosin wurde ebenfalls in 40 µl Bindungspuffer gelöst. Anschließend wurde jeweils eine Kammerhälfte mit der Ligandenlösung und die andere mit der Targetlösung befüllt.

Die gefüllten und mit Parafilm[®] abgedichteten Dialysekammern wurden für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt, damit das L-Adenosin zwischen den beiden Kammerkompartimenten äquilibrieren konnte. Zur Auswertung wurde aus beiden Kammerhälften ein Aliquot von jeweils 30 µl entnommen, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Ready Protein⁺™) in einem Szintillationsröhrchen vermischt und einer zehnmütigen Zählung im Szintillationszähler LS 6000 SC der Firma Beckman unterzogen. Die Differenz zwischen der Radioaktivität der Gesamtkammer und der Radioaktivität der RNA enthaltenden Kammerhälfte gibt Auskunft über das Ausmaß der L-Adenosin-Bindung an. Die mit diesem Verfahren erhaltenen Daten wurden über nicht-lineare Regression nach der allgemeinen Bindungsgleichung mit dem Computerprogramm *GraFit* (Version 3.04, Erithacus Software Ltd.) für eine 1:1 Stöchiometrie (Connors, 1987) gefittet und ausgewertet.

4.6.2. Fluoreszenztitration

4.6.2.1. Fluoreszenzspektroskopische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fluoreszenzspektroskopische Verfahren zur Analyse des Abbaus von Oligoribonukleotiden mit Phosphodiesterase und zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Fluoreszenztitration angewandt. Außerdem fand bei einigen HPLC-Analysen eine fluorimetrische Detektion statt (siehe auch Absatz 4.2.1.)

Bei den beiden erstgenannten Methoden wurde mit einem LS-50B Spektrofluorimeter der Firma Perkin Elmer gearbeitet. Das Probenvolumen betrug bei allen Messungen 200 µl, die RNA-Konzentration 0,2 µM. Die Proben wurden in einer Suprasil Halbmikro-Quarzküvette (104F) der Firma Hellma mit 1 cm Durchmesser und 1 ml Fassungsvermögen vermessen. Die Wellenlänge des Anregungslichtes betrug 300 nm, der Anregungsschlitz 13 nm, der Emissionsschlitz 10 nm und die Scangeschwindigkeit 150 nm pro Minute. Die Emissionsspektren wurden von 350 nm bis 500 nm aufgenommen. Die relative Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anregungswellenlänge aufgetragen. Zur Auswertung der Analysen wurde die relative Fluoreszenzintensität bei 410 nm Emissionswellenlänge herangezogen.

4.6.2.2. Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Jeweils 60 pmol der beiden Stränge des RNA-Liganden wurden in Bindungspuffer gelöst, bei 90 °C für 10 Minuten erwärmt und anschließend in etwa 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine möglichst gute Hybridisierung beider RNA-Stränge zur Bildung der aktiven Ligandenkonformation zu erreichen. Anschließend wurden unterschiedliche Mengen an L-Adenosin hinzugefügt. Pro Meßreihe wurde dabei die Konzentration des L-Adenosin von 0,2 µM bis 50 µM variiert. Nach Zugabe des Targets wurde die Probe über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann in eine Suprasil Halbmikroküvette überführt und wie oben beschrieben vermessen.

Standardpipettierschema	Inkubationsbedingungen
60 pmol RNA-Ligand 30 µl 10 x Bindungspuffer ad 250 µl Millipore Wasser	10 min, 90 °C ≥ 30 min, Raumtemperatur
x mol L-Adenosin ad 300 µl Millipore Wasser	über Nacht, Raumtemperatur Z Fluoreszenzmessung

Das Ausmaß der relativen Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts bei 410 nm bei den unterschiedlichen Konzentrationen an hinzugegebenen L-Adenosin wurde zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels nicht-linearer Regression mit der *GraFit* Software verwendet.