
5. ERGEBNISSE

5.1. Synthese und Charakterisierung der D-A649_38 Derivate

5.1.1. Chemische Synthese der Oligoribonukleotide

Die Oligoribonukleotide wurden chemisch mittels automatisierter Festphasensynthese nach dem Phosphoramidit-Verfahren hergestellt. Es wurde eine Reaktionssäule verwendet, an deren Trägermaterial das geschützte Startnucleosid über eine Succinyl-aminopropyl-Brücke gekoppelt war. Während des Standardsynthesesyklus wurden Reagenzien und Lösungsmittel so durch die Säule gepumpt, daß die sukzessive Kopplung geschützter Phosphoramidite gewährleistet war. Jeder Zyklus bestand dabei aus mehreren Schritten, der Detritylierung, der Aktivierung, der Kopplung, des Cappings und der Oxidation (Abb. 8). Durch Waschschrte zwischen den einzelnen Syntheseschritten wurden überschüssige Reagenzien und Nebenprodukte der einzelnen Reaktionen entfernt. Der Kopplungsschritt, der bei der DNA-Standardsynthese 15 s benötigt, wurde für die RNA-Synthese auf 900 s erhöht, um trotz sterischer Hinderung durch die voluminösen Schutzgruppen an den 2'-Hydroxylgruppen eine gute Kopplungsausbeute zu gewährleisten. In Abbildung 9 sind die Synthese dargestellt, die zur erfolgreichen Synthese des RNA-Liganden D-A649_38εA25 geführt haben. Die freien Aminofunktionen dieser Phosphoramidit-Bausteine waren durch *tert*-Butylphenoxyacetylgruppen geschützt. Weiter waren die 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe für die 5'-Hydroxylgruppe, die β-Cyanoethylgruppe zum Schutz des Phosphors und die *tert*-Butyldimethylsilylgruppe zum Schutz der 2'-Hydroxylfunktion gewählt worden.

Die Synthesen wurden im 1 μmol Maßstab an derivatisiertem 500 Å CPG (controlled glass support) durchgeführt. Nach Abschluß der Synthese wurden die Oligoribonukleotide in zwei Schritten entschützt. Zuerst wurden sie durch alkalische Hydrolyse von der Festphase abgespalten. Bei diesem Schritt wurden gleichzeitig die Schutzgruppen von den Basen und den Phosphatgruppen entfernt. Anschließend fand die Abspaltung der *tert*-Butyldimethylsilylgruppen mit Tetrabutylammoniumfluorid (1,1 M in Tetrahydrofuran) statt.

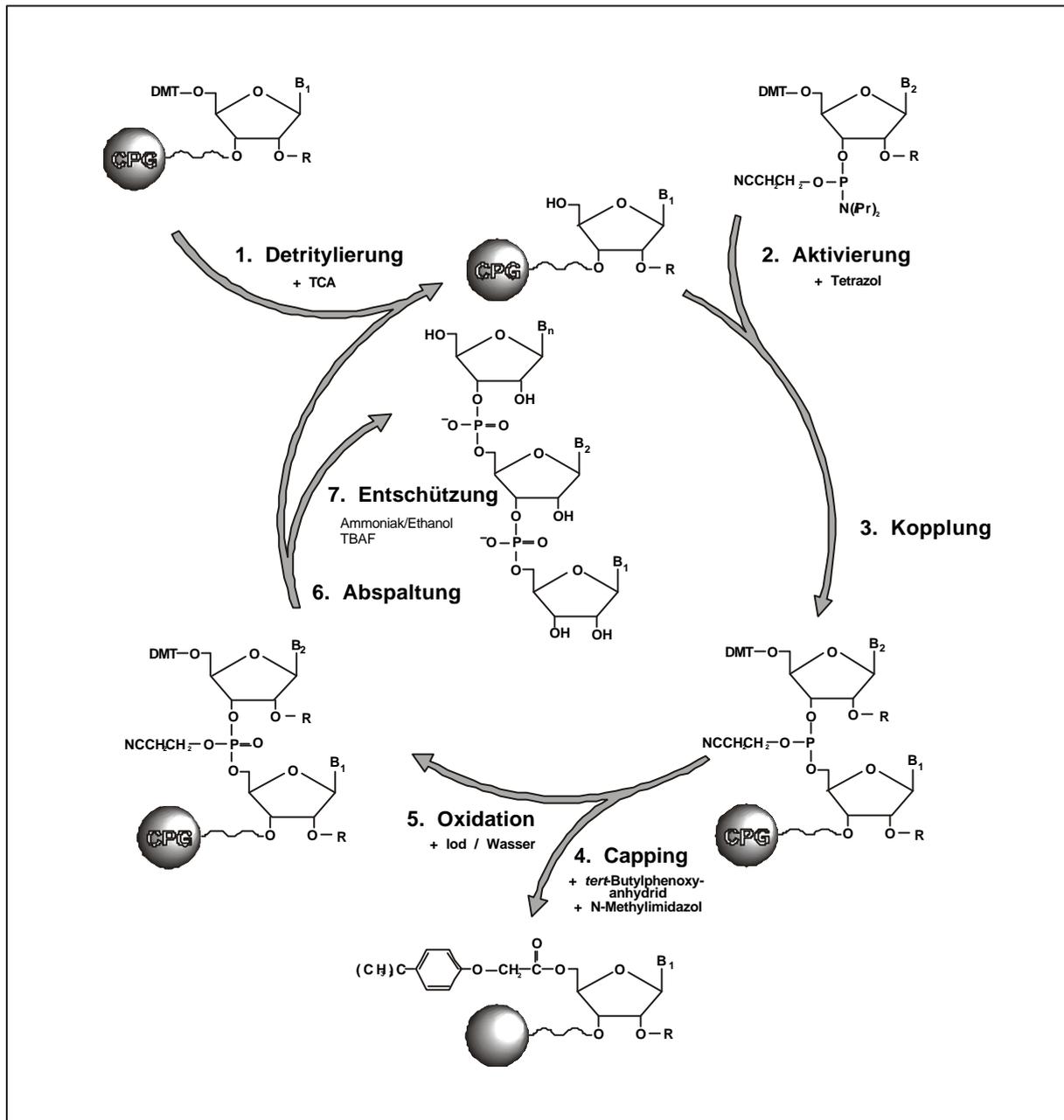


Abbildung 8: Syntheszyklus für Oligoribonukleotide mittels *t*BPA-geschützter Phosphoramidite. Das Startnucleosid ist über eine Succinylaminopropyl-Brücke an das Säulenmaterial (CPG, controlled pore glass) gebunden. Zu Beginn des Zyklus wird die Dimethoxytritylgruppe (DMT) mit Trichloressigsäure (TCA) vom Startnucleosid abgespalten. Anschließend wird das nächste Phosphoramidit zusammen mit Tetrazol als aktivierendes Agens der Synthesesäule zugeführt. Der folgende Schritt ist ein Kopplungsschritt. Die freie 5'-Hydroxylgruppe des träge gebundenen Nucleosids kann nukleophil an den aktivierten Phosphor des zu koppelnden Amidits angreifen. Die Kopplung erfolgt unter Abspaltung von Diisopropylamin. Nicht umgesetzte 5'-Hydroxylgruppen werden in einem Cappingsschritt mit einem Gemisch aus *tert*-Butylphenoxyanhydrid und N-Methylimidazol acetyliert und stehen damit in folgenden Zyklen nicht mehr für eine weitere Kopplung zur Verfügung. Der fünfte Syntheseschritt ist eine Oxidationsreaktion. Der bei der Kopplung entstandene Phosphitriester wird durch Iod in den stabileren Phosphatdiester umgewandelt. Der Oxidationsschritt ist der letzte Schritt des Synthesesyklus. Ihm folgt eine erneute Detritylierung sowohl zum Start eines neuen Zyklus als auch zum Abschluß der Oligoribonukleotidsynthese. Das Oligomer wird alkalisch vom Säulenmaterial hydrolysiert, ebenso wie die Basenschutzgruppen und die Phosphatschutzgruppen. Die *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe (R) wird mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) abgespalten. Die Basen sind mit B_{1-n} abgekürzt.

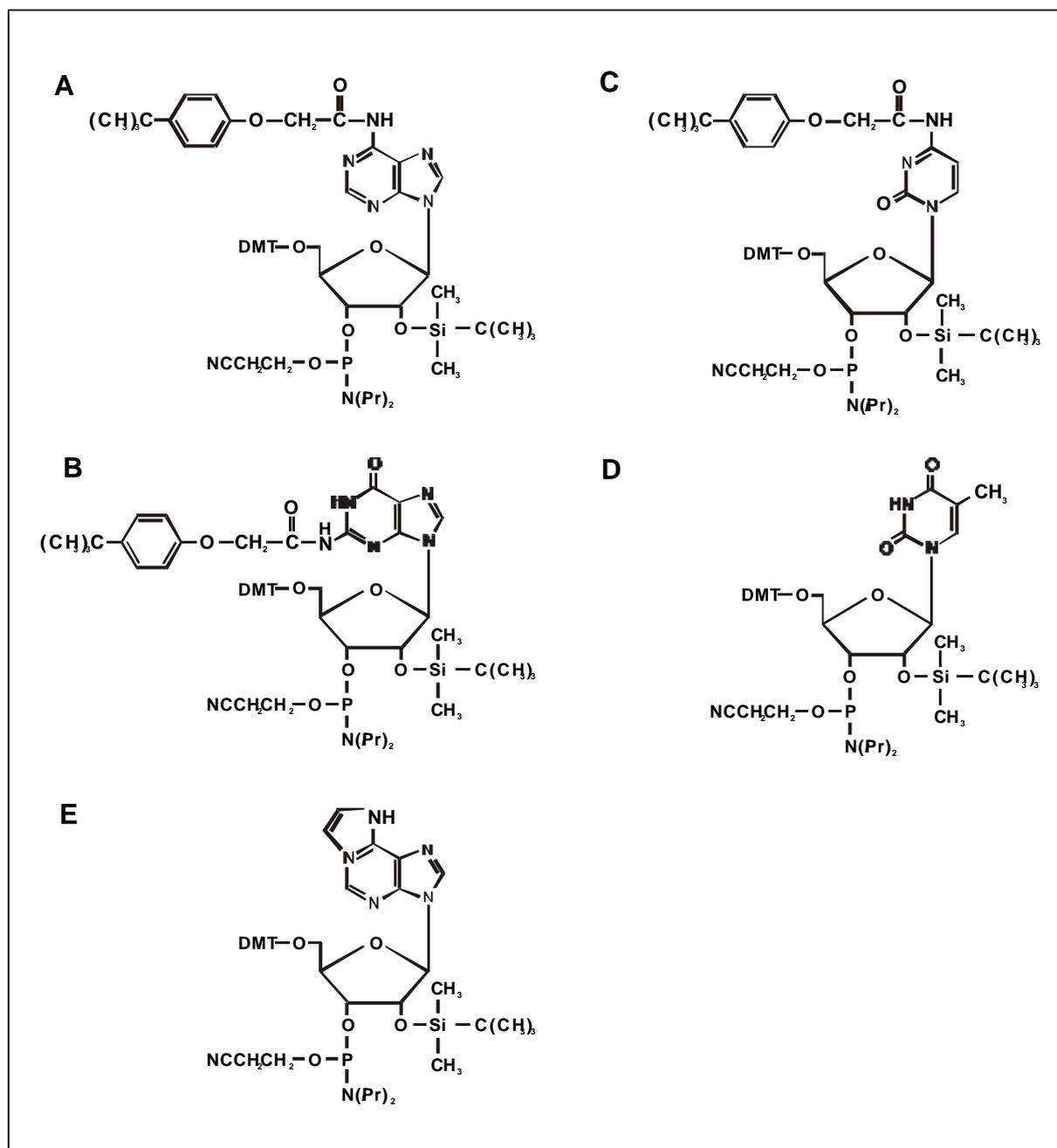


Abbildung 9: Die 2'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-β-D-ribonukleosid-3'-O-β-cyanoethyl-N,N'-diisopropyl-phosphoramidite der einzelnen Basen.

- A: N⁶-*tert*-Butylphenoxyacetyl-adenyl
 B: N⁴-*tert*-Butylphenoxyacetyl-cytosyl
 C: N²-*tert*-Butylphenoxyacetyl-guanyl
 D: Uracyl
 E: 1,N⁶-Ethenoadenosyl

5.1.2. Alkalische Entschützung der Syntheseprodukte

Bezeichnung	Sequenz
<u>„Standard“-Phosphoramidite</u>	
10e A1	(ϵ A)UACCAGCAU
10e A6	AUACC(ϵ A)GCAU
10e A9	AUACCAGC(ϵ A)U
<u>„PAC“-Phosphoramidite</u>	
rP1	AUGCU(ϵ A)GCAU
rP2	AUUCU(ϵ A)GCAU
rP3	AUUCU(ϵ A)GCAU
rP4	A(ϵ A)CCU(ϵ A)ACAU
<u>Expedite[®]-Phosphoramidite</u>	
mTe A1	GGUG(ϵ A)UACCAGCAUCGUCUUGAUGCCCUUGGCAGCACC
mTe A3	GGUGAUACC(ϵ A)GCAUCGUCUUGAUGCCCUUGGCAGCACC
D-A649_38(u)	GUACCGGACACGGAGUCCC
D-A649_38(l)	GGGGCUGACCUAGCGGUAC
e A23	GUACCGG(ϵ A)CACGGAGUCCC
e A25	GUACCGGAC(ϵ A)CGGAGUCCC
e A48	GGGGCUG(ϵ A)CCUAGCGGUAC
e A53	GGGGCUGACCU(ϵ A)GCGGUAC

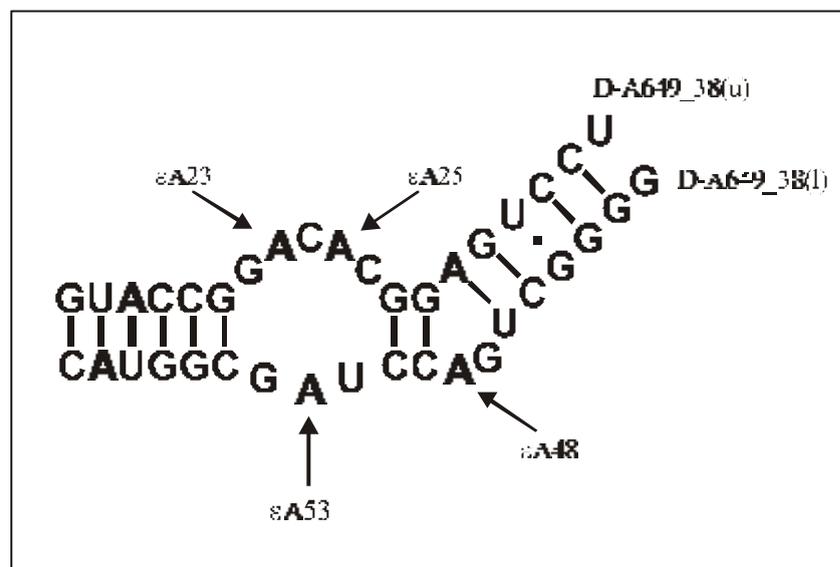
Tabelle 2: Synthetisierte Sequenzen

Der fluoreszierende Nukleosidbaustein ist äußerst instabil in alkalischem Milieu. Bereits nach zweistündiger Inkubation mit wässrigem Ammoniak (28 %) zeigen sich erste Zersetzungserscheinungen (Srivastava *et al.*, 1994). Durch Variation der Basenschutzgruppen, sowie der

Entschützungsreagenzien und -zeiten bei der alkalischen Entschätzung, wurden die optimalen Bedingungen gesucht, um eine möglichst hohe Ausbeute an unzersetztem RNA-Liganden nach Synthese und Aufreinigung der Nukleinsäuren zu erhalten. In Tabelle 2 sind die synthetisierten Sequenzen dargestellt. Tabelle 3 zeigt die alkalischen Entschätzungsbedingungen, denen die Oligoribonukleotide nach der Synthese unterworfen wurden.

Bei den kurzen Decameren, die als Testsequenzen synthetisiert wurden, ergaben sich bei der Verwendung der „Standard“-Phosphoramidite und der Entschätzung der „PAC“-Syntheseprodukte mit absolutem ethanolischen Ammoniak sehr starke Zersetzungserscheinungen der Reportergruppe (siehe Abschnitt 5.1.3.).

Abbildung 10:
Sekundärstruktur des RNA-Liganden D-A649_38. Das Modell zeigt alle sechs synthetisierten Oligoribonukleotidstränge. Die Struktur wurde mit dem Computerprogramm *RNA FOLD* berechnet. Die Positionen, an denen ein Adenosin gegen ein 1,N⁶-Ethenoadenosin ausgetauscht wurde, sind mit der Bezeichnung des Oligomers gekennzeichnet. Die Namen der unmodifizierten Ligandenhälften wurden mit den Suffixen (u) bzw. (l) versehen.
 (u): oberer Strang (upper)
 (l): unterer Strang (lower)



Bei allen anderen Synthesen und den jeweils zur Entschätzung gewählten Bedingungen (Tab. 3) war nicht der Zersetzungsgrad des 1,N⁶-Ethenoadenosins problematisch für eine mögliche Anwendung zur Synthese fluoreszierender RNA-Liganden, sondern die Syntheseausbeute nach Aufreinigung der entschätzten Produkte. Wurden diese Methoden angewendet zur Synthese von RNAs, deren Länge über die der Testsequenzen hinausging, so war die Ausbeute so gering, daß es nicht möglich war, Nukleosidanalysen und Bindungsstudien durchzuführen. Bei der Aufreinigung mittels HPLC oder denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigten sich viele Nebenprodukte, die entweder auf

Verzweigungen der Oligoribonukleotidketten oder eine unvollständige Entschützung der RNAs hinwiesen.

Sequenz	Bedingungen bei der alkalischen Entschützung
10e A1 10e A6 10e A9	Ammoniak _{aq} /Ethanol (3:1), 24 h, 55 °C
rP1	ethanolischer Ammoniak _{nonaq} , 6 h, 37°C
rP2	methanolischer Ammoniak _{nonaq} , 6 h, 37 °C
rP3	methanolischer Ammoniak _{nonaq} , 5 h, 37 °C
rP4	methanolischer Ammoniak _{nonaq} , 4 h, 37 °C
mTe A1 mTe A3	Ammoniak, 6-8 bar, 40 min, RT
D-A649_38(u) D-A649_38(l) e A23 e A25 e A48 e A53	Ammoniak _{aq} /Ethanol (3:1), 30 min, 55 °C

Tabelle 3: Bedingungen für die alkalische Entschützung.

Einzigste Ausnahme hierbei bildeten die RNAs, die mit den *t*BPA-geschützten Expedite[®]-Amiditen synthetisiert wurden. Unter den gewählten Entschützungsbedingungen war eine ausreichende Syntheseausbeute und Fluoreszenzintensität der markierten RNA-Stränge gewährleistet. Die vier chemisch synthetisierten Oligoribonukleotide εA23, εA25, εA48 und εA53 enthielten jeweils ein 1,N⁶-Ethenoadenosin als Reportergruppe in definierter Position.

Es wurde dazu ein ungepaartes Adenosin des ursprünglichen D-A649_38 RNA-Liganden durch 1,N⁶-Etheno-adenosin ersetzt (Abb. 10). Durch die Verwendung *tert*-Butylphenoxyacetyl-geschützter Synthone konnte die Zeit für die Entschützung der freien exozyklischen Aminofunktionen mit wäßrigem Ammoniak auf 30 Minuten gesenkt werden, und somit der Zerstörungsgrad des Fluorophors minimiert werden.

5.1.3. Nukleosidanalyse der Syntheseprodukte

Nach Synthese, Entschützung und Aufreinigung der Oligoribonukleotide wurden Nukleosidanalysen durchgeführt, um die Qualität der Syntheseprodukte zu überprüfen. Die Synthese von Oligoribonukleotiden kann prinzipiell zu Nebenprodukten führen, die auf folgende Ursachen zurückzuführen sind:

- (a) Die eingesetzten Phosphoramidite waren nicht homogen.
- (b) Die Oligoribonukleotide wurden während der Synthese oder Entschützung modifiziert.
- (c) Eine unvollständige Entschützung führte dazu, daß sich noch Schutzgruppen am Oligoribonukleotid befinden.

Einige dieser Nebenprodukte können auch durch die Reversed-Phase HPLC nicht vom Hauptprodukt entfernt werden. So zeigen zum Beispiel Oligoribonukleotide, die 2',5'-Verknüpfungen aufweisen, ähnliche Retentionszeiten unter den gewählten HPLC-Bedingungen wie die entsprechenden ausschließlich 3',5'-verknüpften Ribonukleinsäuren. Die Entstehung unerwünschter 2',5'-Verknüpfungen kann entweder durch Isomeren-verunreinigte Synthone oder aufgrund von Wanderung der Phosphatbindung während der Synthese oder Entschützung entstehen. Unvollständige Trennung der 2'-*O*- und der 3'-*O*-silylgeschützten Synthone bei der Synthese der Nukleosidphosphoramidite kann zu Inhomogenitäten führen. Da die Isomerenreinheit entscheidend ist für die Bildung der richtigen Phosphodiester Verknüpfungen im Produkt, wirkt sie sich stark auf den Erfolg der Synthese aus.

Die Stabilität der Schutzgruppe am 2'-Sauerstoffatom während der Synthese und der Entschützung ist ebenfalls ein kritischer Faktor bei der Bildung unerwünschter Verknüpfungen. Die Silylschutzgruppe muß insbesondere unter den Bedingungen der

alkalischen Entschützung stabil sein, da ihr Verlust eine Spaltung zwischen zwei Nukleotiden oder eine Transesterifizierung zur Folge haben kann. (Milecki *et al.*, 1989).

Von besonderem Interesse bei der Synthese der 1,N⁶-Ethenoadenosin enthaltenden Oligoribonukleotide war der Zersetzungsgrad des Fluorophors nach Synthese und Entschützung, da die Zersetzung des Moleküls eine Fluoreszenzlöschung zur Folge hat.

Die Reinheit der chemisch synthetisierten Oligoribonukleotide wurde durch enzymatischen Verdau und anschließender Analyse mittels Reversed-Phase HPLC überprüft. Die Ribonuklease T2 spaltet spezifisch die 3',5'-Phosphodiester Verknüpfungen von Ribonukleinsäuren auf. 2',5'-Verknüpfungen hingegen werden nicht durch das Enzym angegriffen (Davis *et al.*, 1993). Zur besseren Analyse der verdauten Produkte, wurden die Nukleotide anschließend durch Zugabe alkalischer Phosphatase zu ihren entsprechenden Nucleosiden dephosphoryliert. Enthalten die Syntheseprodukte unverdauliche 2',5'-Verknüpfungen, unvollständig entschützte Nucleosidbausteine oder Zersetzungsprodukte des Fluorophors, so werden diese aufgrund anderer Retentionszeiten unter den gewählten HPLC Bedingungen von den normalen Nucleosiden getrennt.

Bedingungen bei der alkalischen Entschützung	Zersetzungsgrad des 1,N ⁶ -Ethenoadenosins
Ammoniak _{aq} /Ethanol (3:1), 24 h, 55 °C	> 90 %
ethanolischer Ammoniak _{nonaq} , 6 h, 37°C	72 %
methanolischer Ammoniak _{nonaq} , 6 h, 37 °C	21 %
methanolischer Ammoniak _{nonaq} , 5 h, 37 °C	17 %
methanolischer Ammoniak _{nonaq} , 4 h, 37 °C	14 %
Ammoniak _{aq} /Ethanol (3:1), 30 min, 55 °C	3 %

Tabelle 4: Zersetzungsgrad des 1,N⁶-Ethenoadenosins. Dargestellt ist das Ausmaß der Zersetzung des Fluorophors abhängig von den jeweils gewählten Bedingungen bei der alkalischen Entschützung der synthetisierten RNAs. Die Werte ergaben sich durch vergleichende Auswertung der Flächen unter dem HPLC-Peak des 1,N⁶-Ethenoadenosins. Als Vergleich wurde ein HPLC-Diagramm einer Referenzlösung des Nucleosids mit definierter Konzentration hinzugezogen. Die Konzentration wurde zuvor mittels UV-Absorptionmessung bestimmt.

Am schlechtesten waren die Ergebnisse nach Synthese mit „Standard“-Phosphoramiditen und der Entschützung mit Ammoniak_{aq}/Ethanol (3:1) bei 55 °C und 24 h Inkubation. Wie bereits 1994 von Srivastava *et al.* beschrieben, zersetzt sich 1,N⁶-Ethenoadenosin in diesem System nahezu vollständig.

Die mit den „PAC“-Amiditen durchgeführten Synthesen zeigten bei Hydrolyse mit wasserfreiem ethanolischem Ammoniak eine starke Zersetzung des Fluorophors (72 %). Bei Verwendung von wasserfreiem methanolischem Ammoniak zeigten sich bereits deutlich bessere Ergebnisse (Tab. 4). Je nach Inkubationsdauer konnten dabei 79 bis 86 % des 1,N⁶-Ethenoadenosins unzerstört aus der Synthese und anschließenden Entschützung hervorgehen.

Der enzymatische Verdau von εA23, εA25, εA48 und εA53 zeigte nur eine geringfügige Zersetzung des 1,N⁶-Ethenoadenosins, wie aus Abbildung 11, die ein HPLC Chromatogramm des Verdau von εA53 zeigt, zu ersehen ist.

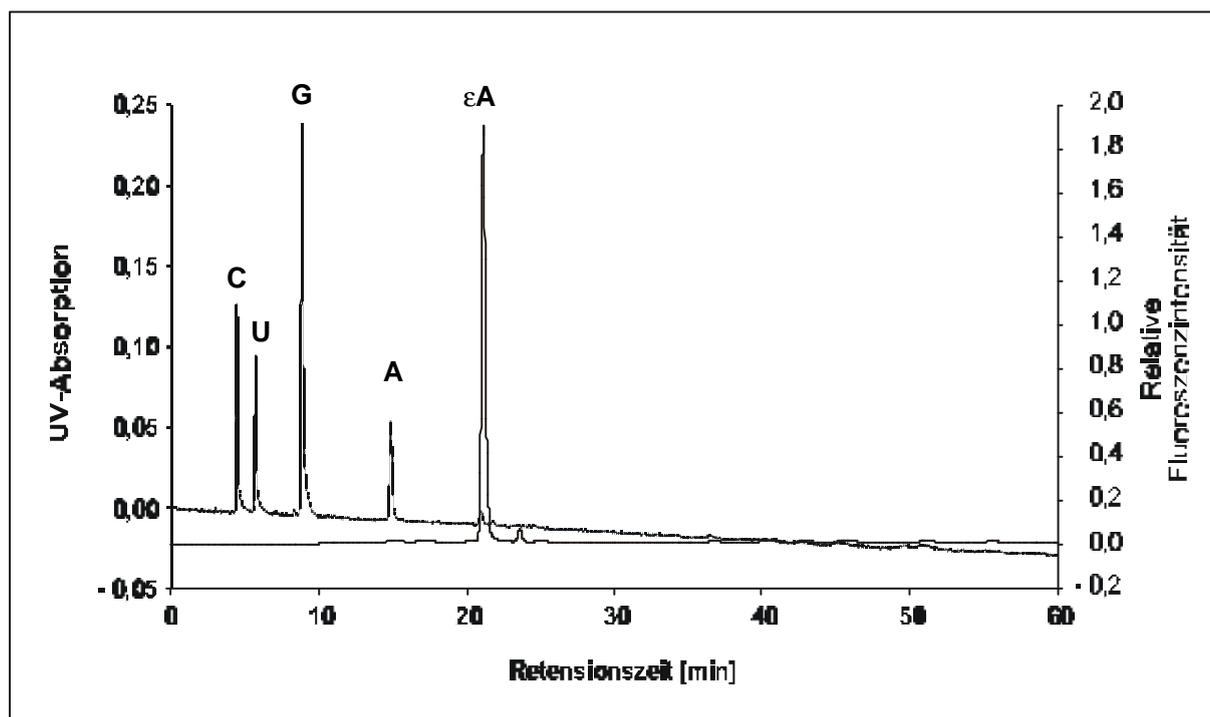


Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm des Oligomers εA53 nach Verdau mit Ribonuklease T2 und alkalischer Phosphatase (Nucleosidanalyse). Die Trennung wurde auf einer RP-C18-Säule (4,6 mm x 250 mm, 5 µm, 8 nm) mit einem Gradienten von 1 % - 15 % Puffer B in 60 min durchgeführt. Die Absorption wurde bei 260 nm detektiert (dicke Linie). Zur Fluoreszenzdetektion wurde bei 300 nm angeregt und bei 410 nm detektiert (dünne Linie). Die Signale der einzelnen Nucleoside sind mit A (Adenosin), G (Guanosen), C (Cytidin), U (Uridin) und εA (1,N⁶-Ethenoadenosin) gekennzeichnet.

Die Verwendung der *tert*-Butylphenoxyacetyl-geschützten Phosphoramidite ermöglichte somit die Synthese und Aufreinigung von Oligoribonukleotiden ausreichender Länge zur Bildung eines RNA-Liganden. Durch Minimierung der 1,N⁶-Ethenoadenosinsetzung unter den gewählten Bedingungen wurde außerdem ein Ligand erhalten, dessen meßbare relative Fluoreszenzintensität ausreichend hoch für analytische Studien war.

Für die Analyse der 1,N⁶-Ethenoadenosin enthaltenden Oligoribonukleotide, die Bestandteil der untersuchten RNA-Liganden waren, wurde zusätzlich zur Detektion der Nukleoside mittels Absorptionsmessung ein Fluoreszenzdetektor verwendet. Da 1,N⁶-Ethenoadenosin nur eine schwache Absorption bei 260 nm aufweist, wurde seine fluoreszierende Eigenschaft ausgenützt, um deutlich stärkere Signale zu erhalten. Dies ermöglichte eine bessere Auswertung der Nukleosidanalyse.

5.1.4. Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten

Da die Mengen an Oligoribonukleotiden, mit denen gearbeitet wird, sich im allgemeinen im Nano-, Pico- oder gar Femtogrammbereich befinden, ist eine absolute Massenbestimmung durch Wiegen nicht mehr möglich. Statt dessen wird eine Konzentrationsbestimmung einer zumeist wäßrigen Lösung des entsprechenden Oligonukleotids mittels Absorptionsspektroskopie bei 260 nm durchgeführt. Für eine exakte Konzentrationsbestimmung, wie sie zum Beispiel für die Bindungsstudien wichtig ist, ist die Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten der jeweiligen RNA notwendig. Der Extinktionskoeffizient geht in das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung 3) ein.

$$A = \epsilon c d \quad \text{(Gleichung 3)}$$

Hierbei bezeichnet ϵ den molaren Absorptions- oder Extinktionskoeffizienten der absorbierenden Lösung bei der jeweiligen Anregungswellenlänge, c die Konzentration der Lösung und d die Schichtdicke der verwendeten Küvette.

Anhand dieser Gleichung kann die molare Konzentration einer Probenlösung über ihre gemessene Absorption berechnet werden. Die jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten lassen sich experimentell ermitteln. Diese Vorgehensweise geht von der Kenntnis der 2'- bzw.

3'-Nukleosidmonophosphate sowie der Basenzusammensetzung aus. Es wird die Absorption der jeweiligen Oligonukleotidlösung bei einer Wellenlänge von 260 nm vor und nach einer vollständigen alkalischen Hydrolyse bestimmt. Anhand der Absorption der Hydrolyseprodukte läßt sich die Konzentration der Lösung berechnen. Bei Kenntnis der Konzentration und der Absorption der unhydrolysierten Oligonukleotidlösung wiederum kann der molare Extinktionskoeffizient der gelösten Nukleinsäure ermittelt werden (Gleichung 4 bis 6). Anhand der molaren Masse des Moleküls wurde schließlich auch die Masse pro A_{260} berechnet (Tab. 5).

Sequenz: $A_a G_b C_c U_d (\epsilon A)_e$

Extinktionskoeffizient
der hydrolysierten RNA: $\epsilon_{\text{gesamt}} = a \epsilon_A + b \epsilon_G + c \epsilon_C + d \epsilon_U + e \epsilon_{(\epsilon A)}$ (Gleichung 4)

Konzentration: $c = A_{\text{hydrolysiert}} / \epsilon_{\text{gesamt}}$ (Gleichung 5)

Extinktionskoeffizient
der unhydrolysierten RNA: $\epsilon_{\text{RNA}} = A_{\text{unhydr.}} / c$ (Gleichung 6)

Oligoribonukleotid	Extinktionskoeffizient e [l/mol cm]	molare Masse [g/mol]	$\mu\text{g}/A_{260}$
D-A649_38(u)	184000,0	6413,1	34,9
D-A649_38(l)	179696,0	6451,0	35,9
ϵA_{23}	159537,2	6437,1	40,3
ϵA_{25}	131398,6	6437,1	49,0
ϵA_{48}	170734,8	6475,0	37,9
ϵA_{53}	113917,3	6475,0	56,8

Tabelle 5: Molare Extinktionskoeffizienten und molare Massen der für die Bindungsanalysen synthetisierten Oligoribonukleotide. Die Oligoribonukleotide ϵA_{23} , ϵA_{25} , ϵA_{48} und ϵA_{53} sind modifiziert. Anhand der Werte der letzten Spalte konnte die gemessene Absorption bei 260 nm direkt in die Masse umgerechnet werden.

5.2. Bindungskonstantenbestimmung durch Gleichgewichtsdialyse

Die Affinität zwischen einem Makromolekül und seinem Targetmolekül wird durch die Dissoziationskonstante des gebildeten Komplexes beschrieben. Wenn dieser Komplex nicht zu einem weiteren Produkt umgesetzt wird, kann die Dissoziationskonstante mittels direkter „Steady-State“-Studien bestimmt werden. Die Komplexbildung und ihre Dissoziation kann durch folgende allgemeine Gleichung beschrieben werden:



K_a steht hierbei für die Assoziationskonstante des Komplexes und K_d für dessen Dissoziationskonstante ($1/K_a$). Die Dissoziationskonstante, die in der Dimension M (molar) angegeben wird, kann über das Massenwirkungsgesetz beschrieben werden (Gleichung 8).

$$K_d = \frac{[\text{L-Adenosin}] \times [\text{RNA}]}{[\text{RNA} \bullet \text{L-Adenosin}]} \quad (\text{Gleichung 8})$$

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wird das Gleichgewicht zwischen Ligand und Target als Funktion der Ligandenkonzentration bei gleichbleibender Targetkonzentration betrachtet. Hierbei müssen die Konzentrationen des RNA-Liganden, des Targetmoleküls sowie die des gebildeten Komplexes im Gleichgewichtszustand bestimmt werden. Eine Methode, die relativ zuverlässige Bestimmungen der Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-3} M zulässt, ist die Gleichgewichtsdialyse (Uhlenbeck *et al.*, 1970; Bisswanger, 1994). Bei dieser Methode wird die Konzentration des freien und des komplexierten Targets direkt gemessen.

Für die Gleichgewichtsdialyse wurden Mikrodialysekammern aus durchsichtigem Plexiglas, mit einem maximalen Gesamtvolumen von 100 μl verwendet (Abb. 12). Die Kammern ließen sich in zwei Hälften auseinanderschrauben (Wrede *et al.*, 1978). Eine geeignete semi-permeable Dialysemembran, deren Porengröße so gewählt wurde, dass sie nur Moleküle mit einem Molekulargewicht von kleiner 2000 Dalton hindurchließ, trennte die beiden Kammerkompartimente. Durch die gewählte Porengröße wurde die freie Diffusion der

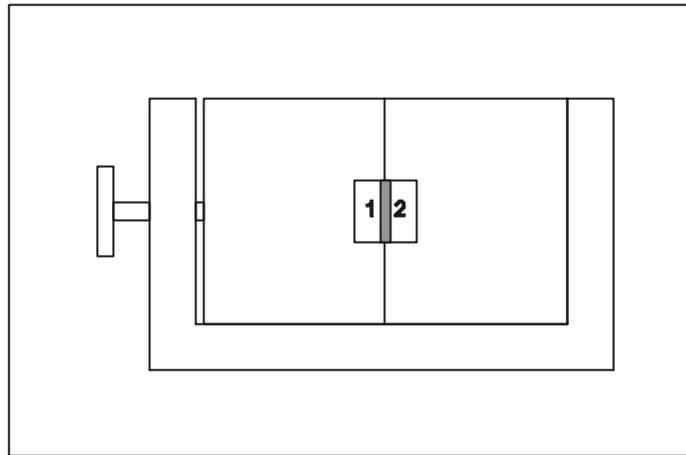
radioaktiv markierten L-Adenosinmoleküle durch die Dialysemembran sichergestellt. Gleichzeitig war die Membran für die deutlich größeren RNA-Moleküle undurchlässig. Eine Diffusion des RNA-Liganden zwischen den beiden Kammerkompartimenten war also nicht möglich.

Abbildung 12: Mikrodialysekammer für die Gleichgewichtsdialyse.

Kompartiment 1 und 2 sind durch eine semi-permeable Membran (graue Fläche) voneinander getrennt.

Kompartiment 1: enthält bei Füllung der Kammer in Bindungspuffer gelösten RNA-Liganden. Im Gleichgewichtszustand befindet sich in diesem Kompartiment sowohl RNA-Ligand, als auch der Ligand-Target-Komplex und freies Target

Kompartiment 2: enthält freies Target.



24 Stunden nach Füllen der Kammer lag in der RNA-enthaltenden Kammerhälfte der Gleichgewichtszustand für die Komplexbildungsreaktion vor. Beide Kammerhälften enthielten in diesem Zustand die gleiche Konzentration an freiem radioaktiv markiertem Targetmolekül. Da die Ausgangskonzentration und die Aktivität des Targets bekannt war, ließ sich anhand der gemessenen Radioaktivität in dem RNA-freien Kompartiment die Konzentration an freiem L-Adenosin berechnen. Die zu messende Radioaktivität im RNA-enthaltenden Kompartiment setzte sich aus der des freien und der des sich im Komplex befindlichen L-Adenosin zusammen. Die Komplekonzentration errechnete sich somit aus der Differenz zwischen der in dieser Kammerhälfte befindlichen Gesamtkonzentration an L-Adenosin und der freien L-Adenosinkonzentration. Die prozentuale Bindung wird durch das Verhältnis der Komplekonzentration zur Gesamtkonzentration des Targetmoleküls im Kammerkompartiment beschrieben. Sie kann auch direkt über das Verhältnis der entsprechenden cpm-Werte (counts per minute) ermittelt werden. Bei diesen Experimenten wurde die Konzentration an L-Adenosin konstant gehalten, die RNA-Ligandenkonzentrationen hingegen variiert. Die bei diesen Experimentreihen erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der allgemeinen Bindungs-

gleichung anhand nicht-linearer Regression mit dem Softwarepaket *GraFit* ausgewertet. Die Variation des Parameters, der nicht markiert und somit auch nicht Meßparameter war, ermöglichte eine sehr genaue K_d -Bestimmung. Die allgemeine Bindungsgleichung, die für die Berechnungen verwendet wurde, lautet wie folgt:

$$[\text{L - Adenosin}]_{\text{geb}} = [\text{RNA} \bullet \text{L - Adenosin}] \quad (\text{Gleichung 9})$$

$$[\text{L - Adenosin}]_{\text{geb}} = \frac{[\text{RNA}]_0 \times [\text{L - Adenosin}]_{\text{frei}}}{K_d([\text{RNA} \bullet \text{L - Adenosin}] + [\text{L - Adenosin}]_{\text{frei}}} \quad (\text{Gleichung 10})$$

Für einige RNA-Liganden wurde eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten anhand eines Meßpunktes (Einpunktbestimmung) unter Verwendung der oben erwähnten Gleichung 8 durchgeführt. Die fehlenden Werte zur Berechnung der Bindungskonstanten ergaben sich aus der Messung der Radioaktivität der beiden Kammerhälften und der Kenntnis der eingesetzten Ausgangskonzentrationen an L-Adenosin und Oligoribonukleotid. Die Herleitung der Gleichung zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (Gleichung 11- 15) verwendet dabei folgende Abkürzungen:

$[x]_0$ eingesetzte Konzentration von x

$[x]_{\text{frei}}$ Konzentration an freiem x

$[x]_{\text{geb.}}$ Konzentration an gebundenem x

cpm_1 Aktivität des RNA-enthaltenden Kammerkompartiments

cpm_2 Aktivität des ausschließlich L-Adenosin-enthaltenden Kammerkompartiments

$$[\text{L - Adenosin}]_{\text{frei}} = \frac{\text{cpm}_2}{\text{cpm}_2 + \text{cpm}_1} \times [\text{L - Adenosin}]_0 \quad (\text{Gleichung 11})$$

$$[\text{RNA} \bullet \text{L - Adenosin}] = [\text{L - Adenosin}]_{\text{geb}} = \frac{\text{cpm}_1 - \text{cpm}_2}{\text{cpm}_1 + \text{cpm}_2} \times [\text{L - Adenosin}]_0 \quad (\text{Gleichung 12})$$

$$[\text{RNA}]_{\text{frei}} = [\text{RNA}]_0 - [\text{RNA}]_{\text{geb}} = [\text{RNA}]_0 - [\text{RNA} \bullet \text{L - Adenosin}] \quad (\text{Gleichung 13})$$

Setzt man dieses Verhältnis in Gleichung 8 ein, so folgt:

$$K_d = \frac{\text{cpm}_2}{\text{cpm}_1 - \text{cpm}_2} \times \left([\text{RNA}]_0 - \frac{\text{cpm}_1 - \text{cpm}_2}{\text{cpm}_1 + \text{cpm}_2} \times [\text{L - Adenosin}]_0 \right) \quad (\text{Gleichung 14})$$

Durch Umwandeln von Gleichung 14 gelangt man schließlich zu der bei der Einpunktmessung verwendeten Formel zur Berechnung der Dissoziationskonstanten.

$$K_d = \text{cpm}_2 \times \left(\frac{[\text{RNA}]_0}{\text{cpm}_1 - \text{cpm}_2} - \frac{[\text{L - Adenosin}]_0}{\text{cpm}_1 + \text{cpm}_2} \right) \quad (\text{Gleichung 15})$$

Die mit dieser Methode erhaltenen Werte wiesen eine relativ starke Streuung aus. Es wurden deshalb Mittelwerte aus drei Bestimmungen gebildet. Um genauere Werte für die Dissoziationskonstante zu erhalten, wurden bei dem unmodifizierten Liganden D-A649_38 und dem zur Fluoreszenztitration verwendeten Liganden D-A649_38εA25 Meßreihen von je sieben Meßpunkten durchgeführt. Hierbei wurden Doppelbestimmungen gemacht und ebenfalls die Mittelwerte der einzelnen Meßpunkte der Berechnung des K_d -Wertes zugrunde gelegt. Die ermittelten Bindungskonstanten werden in Tabelle 6 aufgeführt.

RNA-Ligand	K_d [μM]
D-A649_38εA23 ^{a)}	~ 76
D-A649_38εA48 ^{a)}	~ 81
D-A649_38εA53 ^{a)}	~ 128
D-A649_38 ^{b)}	4,1 ± 0,2
D-A649_38εA25 ^{b)}	6,6 ± 0,5

Tabelle 6: Dissoziationskonstanten der Liganden-Target-Komplexe. Dargestellt sind die Dissoziationskonstanten für die einzelnen RNA-Liganden. Die Werte wurden entweder durch Einpunktbestimmungen (a) oder Meßreihen (b) ermittelt.

5.3. Fluoreszenzspektroskopische Verfahren

5.3.1. Theorie der Fluoreszenzspektroskopie

Im Gegensatz zur UV-Spektroskopie, die zu den absorptionspektroskopischen Verfahren zählt, gehört die Fluoreszenzspektroskopie zu den emissionsspektroskopischen Verfahren. Einige Moleküle strahlen nach Absorption eines Photons Licht einer höheren Wellenlänge ab. Erfolgt dieser Vorgang ohne vorherigem Übergang der Elektronen aus dem Singulett- in den Triplettzustand unter Spinumkehr, so spricht man von Fluoreszenz.

Eine mit Licht bestrahlte Substanz nimmt Energie auf. Durch diese Energieaufnahme können Elektronen unter Erhalt ihres Spins auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Ein Teil dieser Energie wird sofort nach der Absorption durch Energietransfer bei Kollision mit anderen Molekülen und durch Wärmeabgabe an das umliegende System wieder abgegeben. Dadurch gehen die Elektronen zunächst in den energieärmsten Schwingungszustand innerhalb ihres Anregungszustandes über. Erst dann kann der Übergang in den Grundzustand unter Abgabe von Strahlung, der Fluoreszenz, erfolgen. Dies hat zur Folge, daß das emittierte Licht in der Regel energieärmer, also langwelliger ist, als das bei der Anregung absorbierte (Stokes'sche Verschiebung).

Der Grundzustand eines Moleküls ist normalerweise mit zwei Elektronen entgegengesetzten Spins besetzt (Singulettzustand S_0). Die durch direkte Anregung erreichten Zustände werden ebenfalls als Singulett (S_1, S_2, \dots) charakterisiert (Abb. 13). Die verschiedenen Schwingungsmöglichkeiten innerhalb eines Moleküls resultieren sowohl im Grundzustand als auch in den angeregten Zuständen in Feinstrukturen. Bei genügend großem Abstand bestimmen diese unmittelbar das Aussehen des Absorptionsspektrums, das in der Fluoreszenzspektroskopie als Anregungs- oder auch Excitationsspektrum gezeichnet wird.

Das emittierte Licht kann als Fluoreszenz- oder Emissionsspektrum aufgezeichnet und analytisch ausgewertet werden. Die Intensität des ausgestrahlten Lichts wird dabei in Abhängigkeit der Emissionswellenlänge geplottet.

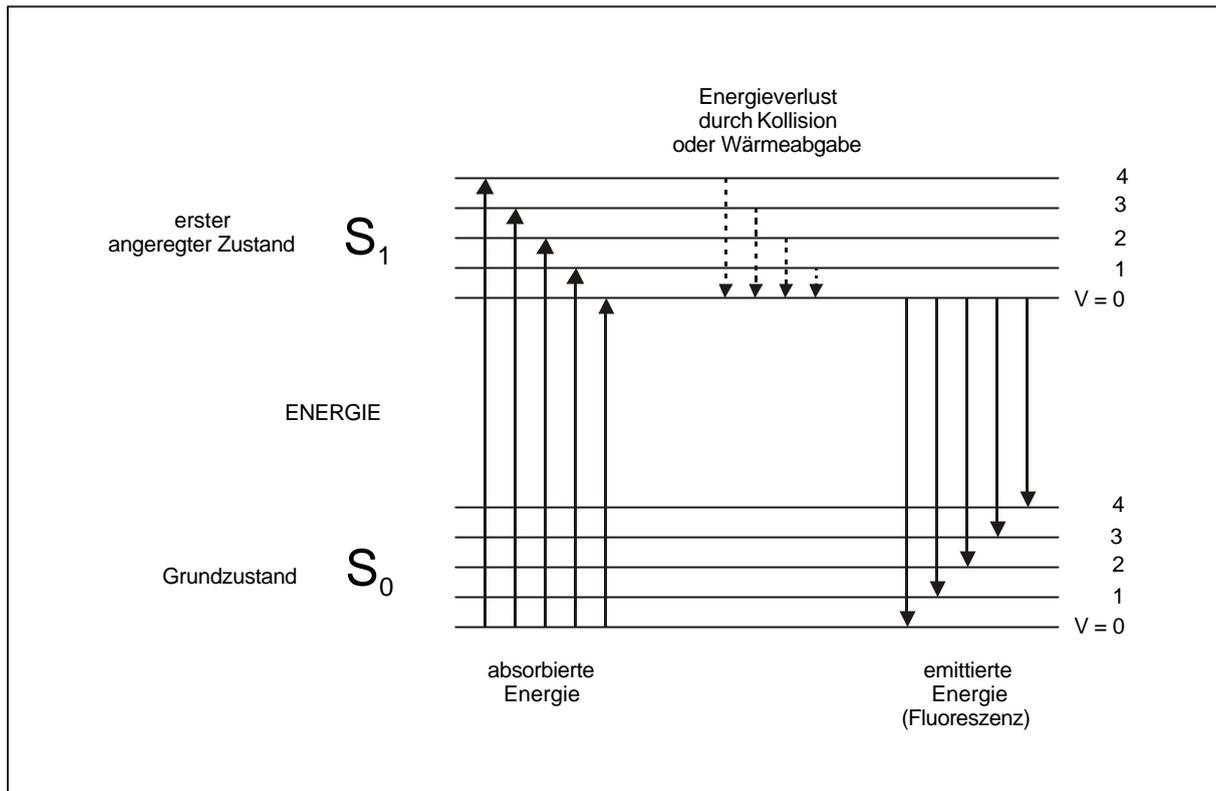


Abbildung 13: Jablonski-Termschema. Energiezustände und –übergänge von Elektronen eines fluoreszierenden organischen Moleküls.

Nicht jedes angeregte Molekül fluoresziert. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Fluoreszenzphänomens wird durch den Quantenwirkungsgrad Q beschrieben. Q definiert das Verhältnis von emittierten (q_e) zu absorbierten (q_a) Quanten oder Photonen (Einheit des Lichtes mit der Energie $E = h \nu$).

$$Q = q_e/q_a \quad (\text{Gleichung 16})$$

Der Quantenwirkungsgrad wird beeinflusst durch die Eigenschaften des Moleküls selbst sowie durch äußere Einflüsse, wie dem pH-Wert, dem Lösungsmittel, der „Selbstabsorption“ (z. B. durch Zusammenlagerung von Chromophoren) oder dem Quenching. Werden Energieübertragungen durch Zusammenstöße oder Resonanz möglich, so hat dieses eine Herabsetzung von Q zur Folge und somit wird auch die Fluoreszenz verhindert. Dieser Effekt wird als Quenching oder Fluoreszenzlöschung bezeichnet.

$$I_{\lambda} \sim \varepsilon I_0 Q K \quad (\text{Gleichung 17})$$

ε : molarer Absorptionskoeffizient bei Anregungswellenlänge

(je größer ε desto mehr Energie kann absorbiert werden und auch wieder emittieren)

I_0 : Intensität des Anregungslichts

(je mehr Anregungslicht zur Verfügung steht, desto stärker ist die Fluoreszenz)

Q : Quantenwirkungsgrad

K : Gerätekonstante

Ein wichtiger Anwendungsbereich der Fluoreszenzspektroskopie liegt in der quantitativen Analyse. Es bestehen hierzu folgende Möglichkeiten:

- a) Bestimmung einer Substanz aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz (direkte Methode)
- b) Fluoreszenzmarkierungen einer nicht fluoreszierenden Substanz durch Derivatisierung mit einem fluoreszierenden Reagenz (chemische Methode)
- c) Bestimmung einer nicht fluoreszierenden Substanz aufgrund der Fluoreszenzlöschung einer fluoreszierenden Indikatorsubstanz (indirekte Methode)

Aufgrund höherer Genauigkeit, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit ist die Fluoreszenzspektroskopie besser zur Bestimmung kleiner Mengen biochemisch interessanter Substanzen geeignet als die Absorptionsspektroskopie (siehe 5.3.2.).

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten werden als relative Werte angegeben. Sie ermöglichen den Vergleich einer Substanzmenge in unterschiedlichen Umgebungen. Zusätzlich hängt die Intensität der Fluoreszenz von Parametern ab, die durch das Meßinstrument bestimmt werden. Dazu zählen unter anderem die Lichtquelle, die Filter und der Detektor.

5.3.2. Fluoreszenzspektrometer

Der Aufbau eines Spektralfluorimeters ähnelt stark dem eines Spektralphotometers. Es sind hierfür jedoch zwei optische Systeme erforderlich, eines für die Anregung (Excitation, Absorption) und eines für die Fluoreszenzstrahlung (Emission) (Abb. 14). Man arbeitet mit sehr verdünnten Lösungen, die nur einen Teil des durchfallenden Lichts absorbieren und von dem absorbierten Licht wiederum entsprechend ihrer Quantenausbeute nur einen Bruchteil emittieren. Das Fluoreszenzlicht strahlt in alle drei Richtungen des Raumes und nur ein Anteil dieser Strahlung gelangt letztendlich in den Photomultiplier und wird detektiert. Dieses macht die sehr hohen Ansprüche an die Intensität der Lichtquelle und an die Empfindlichkeit des Photomultipliers deutlich.

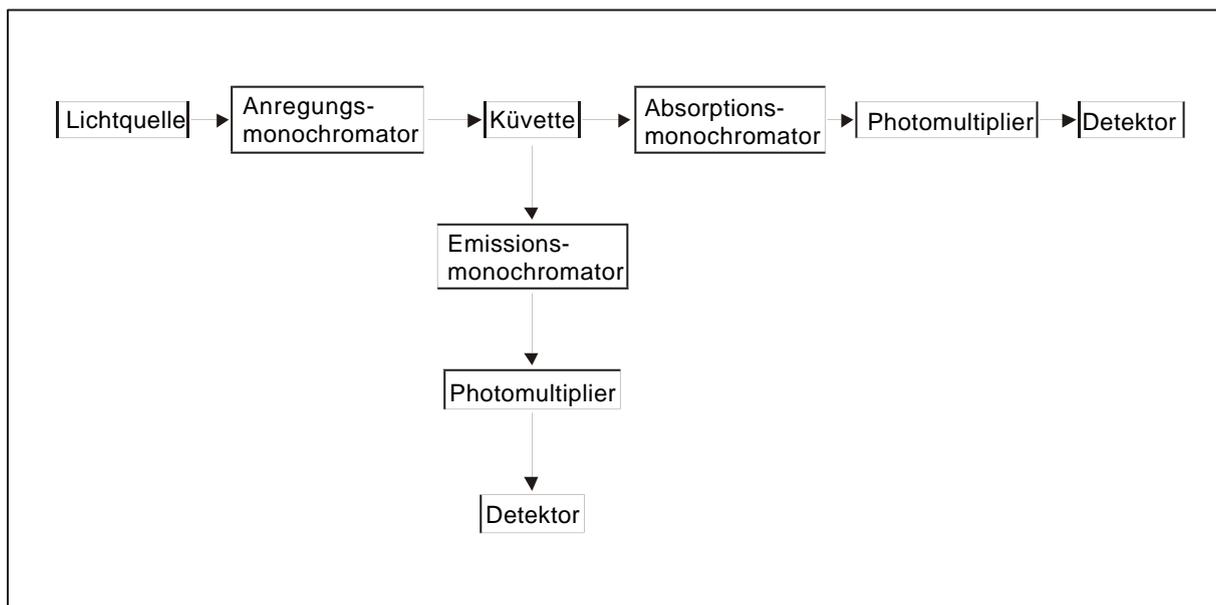


Abbildung 14: Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

Bei der Absorptionsmessung liegt der Nullpunkt der Extinktion dann vor, wenn in den Photomultiplier die volle Intensität der Lampe gelangt, die Probe also 100 % des einfallenden Lichtes auch durchläßt. Der eigentliche Meßwert bei der UV-Spektroskopie ist also nur eine relative Abschwächung dieser Strahlung. Da Schwankungen der Lichtintensität und des Photomultiplierstroms mit in die Basislinie eingehen, ist die Messung mit einem hohen

Rauschen behaftet. Bei der Fluoreszenzspektroskopie hingegen liegt der Nullpunkt der Emission bei völliger Dunkelheit vor. Findet keine Fluoreszenz statt, so empfängt der Photomultiplier kein Signal. Jegliches Licht, das detektiert wird, ist somit auch ein direktes Maß der Probenlösung. Dies hat zur Folge, daß wesentlich empfindlichere Photomultiplier eingesetzt werden können, was die Fluoreszenzspektroskopie um mindestens zwei bis drei Zehnerpotenzen empfindlicher macht als vergleichbare Absorptionsmessungen.

Die Werte, die man bei der Fluoreszenzmessung erhält, sind jedoch im Gegensatz zum Extinktionskoeffizienten bzw. zu den A_{260} -Einheiten keine absoluten Werte. Es werden relative Fluoreszenzintensitäten gemessen, die spezifisch für das verwendete Gerät sind und sich auch zeitbedingt ändern können. Während man bei der Absorption zwei Eichpunkte hat, 0 % Transmission (absolute Dunkelheit) und 100 % Transmission (volle Lichtintensität), gibt es bei der Fluoreszenz nur einen Eichpunkt. Eine allgemeine obere Grenze der Emission ist nicht definierbar.

Bei der Fluoreszenzspektroskopie muß verhindert werden, daß das einstrahlende Licht direkt oder durch Reflexion und Streuung in den Photomultiplier, der für die Emissionsmessung zuständig ist, gelangen kann. Dieses wird durch ‚Lichtfallen‘, Filter und Monochromatoren im Strahlengang des Fluoreszenzlichts verhindert. Das Emissionslicht wird im rechten Winkel zum einfallenden Licht seitlich oder vom Küvettenboden entnommen.

5.3.3. 1,N⁶-Ethenoadenosin

1,N⁶-Ethenoadenosin zeigt in neutralem Milieu nach Anregung durch Licht der Wellenlänge 300 nm ein Emissionsmaximum bei 410 nm. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs ist dabei sehr hoch und kann bis zu Konzentrationen unterhalb von 10^{-8} M gemessen werden. Die Lebenszeit der Fluoreszenz ist ebenfalls relativ hoch. Sie beträgt 20 nsec in Wasser. In basischem Milieu zersetzt sich 1,N⁶-Ethenoadenosin schnell und verliert dabei seine Fluoreszenzeigenschaften (Barrio *et al.*, 1992).

5.3.3.1. Änderung der Fluoreszenzintensität durch Einbau in den RNA-Liganden

Abbildung 15 zeigt das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung, die durch Einbau von 1,N⁶-Ethenoadenosin in das ϵ A25 Oligoribonukleotid entsteht. Bei der Freisetzung der fluoreszierenden Reportergruppe nach vollständiger Spaltung des RNA-Stranges mit der Phosphodiesterase erhöhte sich die relative Fluoreszenzintensität bei 410 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 300$ nm) um mehr als den Faktor 2.

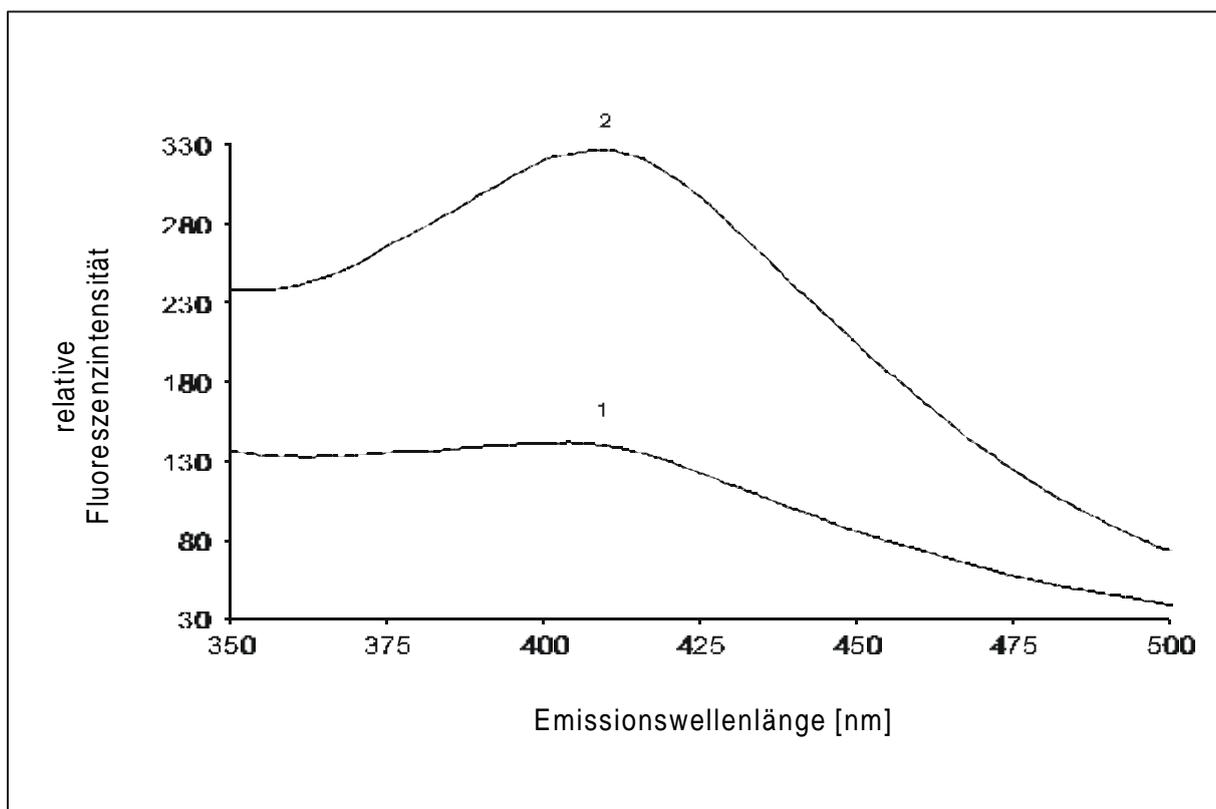


Abbildung 15: Verdau von ϵ A25 mit Phosphodiesterase. Fluoreszenzspektra von 0,2 μ M ϵ A25 vor (1) und nach (2) vollständiger enzymatischer Spaltung mit Phosphodiesterase. Die Exitationswellenlänge betrug 300 nm.

Abbildung 16 zeigt Fluoreszenzspektren von 0,2 μ M freiem ϵ A25 und 0,2 μ M hybridisiertem D-A649_38 ϵ A25 RNA-Liganden. Die Hybridisierung von ϵ A25 und D-A649_38(l) bewirkt eine Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität bei 410 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 300$ nm) um 11,5 %. Der unmodifizierte RNA-Ligand D-A649_38 zeigte unter gleichen Meßbedingungen keinerlei Fluoreszenzemission.

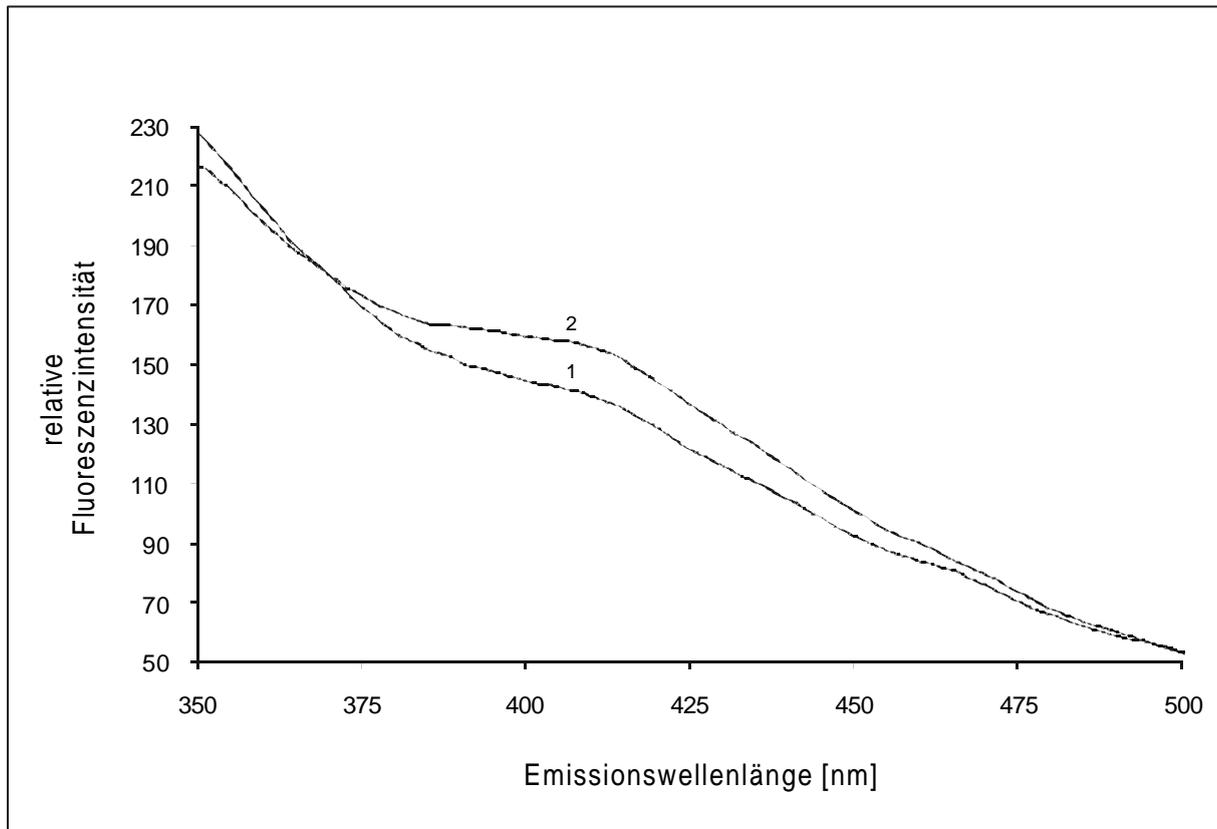


Abbildung 16: Hybridisierung von D-A649_38(I) mit ϵ A25. Fluoreszenzspektra von 0,2 μ M ϵ A25 vor (1) und nach (2) Hybridisierung mit 0,2 μ M D-A649_38(I). Die Exitationswellenlänge betrug 300 nm.

5.3.4. Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Fluoreszenztitration

Bei der Titration des D-A649_38 ϵ A25 RNA-Liganden mit L-Adenosin konnte ein Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität bei 410 nm ($\lambda_{ex} = 300$ nm) festgestellt werden. Da der Fluoreszenzbaustein integrierter Bestandteil des RNA-Liganden war, war es nicht notwendig ein zusätzliches Reportermolekül an das Target zu hängen. Es stand eine funktionelle hochaffine RNA zur Verfügung, die eine direkte Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch fluorimetrische Titration mit unmodifiziertem Target zuließ (Abb. 17).

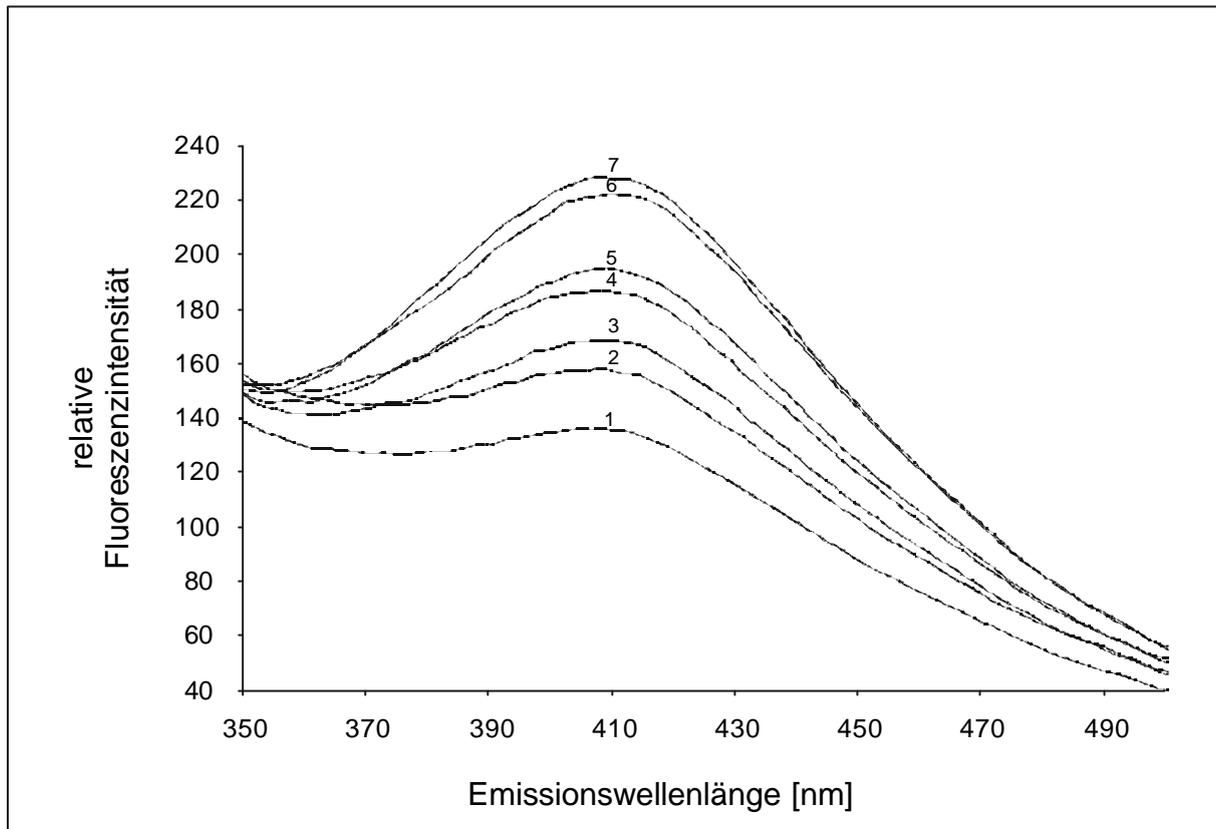


Abbildung 17: Fluoreszenztitration des RNA-Liganden D-A649_38eA25 mit L-Adenosin.

Fluoreszenzspektren von 0,2 μM RNA-Ligand nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von L-Adenosin (1: 0,2 μM ; 2: 1 μM ; 3: 4 μM ; 4: 6 μM ; 5: 10 μM ; 6: 20 μM ; 7: 50 μM). Die Proben wurden bei 300 nm angeregt.

Aus den bei der Fluoreszenztitration erhaltenen Emissionsspektren wurde der Unterschied der relativen Fluoreszenzintensität bei 410 nm als Ausgangswert für die Bestimmung der Bindungskonstanten herangezogen. Dabei ergab sich für den Liganden D-A649_38eA25 ein K_d von $6,6 \mu\text{M} \pm 1,0 \mu\text{M}$. Bei der Berechnung der Dissoziationskonstanten anhand der bei der Gleichgewichtsdialyse erhaltenen Werte wurde ein K_d -Wert von $6,6 \mu\text{M} \pm 0,5 \mu\text{M}$ erhalten (Abb. 18). Die Gleichgewichtsdialyse wurde als Referenzmethode durchgeführt.

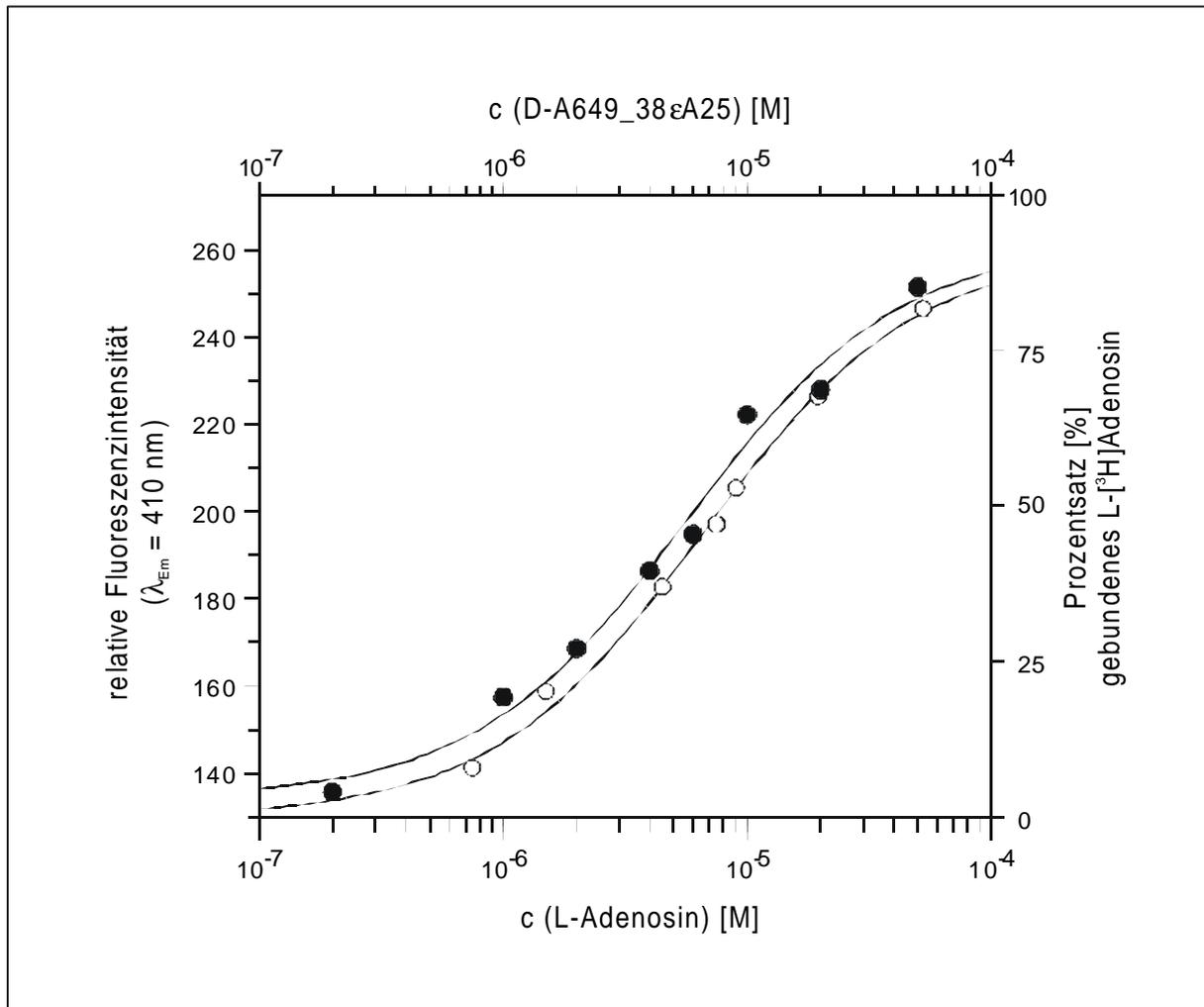


Abbildung 18: Bindungskurven für den RNA-Liganden DA649_38εA25 und L-Adenosin. Mit den weißen Kreisen sind die bei der Gleichgewichtsdialyse erhaltenen Daten dargestellt. Der Prozentsatz an L-[³H]-Adenosin, der bei dieser Methode an den RNA-Liganden gebunden hat, wurde gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration aufgetragen. Die bei der Fluoreszenztitration erhaltenen Daten sind durch schwarze Kreise dargestellt. Hierbei wurde die relative Fluoreszenzintensität gegen die eingesetzte L-Adenosinkonzentration aufgetragen. Die Proben wurden bei 300 nm zur Fluoreszenz angeregt, die Datenpunkte bei einer Emissionswellenlänge von 410 nm gesammelt.

Der unmodifizierte D-A649_38 RNA-Ligand zeigte keine Fluoreszenz während der Titration mit L-Adenosin. Die Gleichgewichtsdialyse hingegen ergab einen K_d von $4,1 \mu\text{M} \pm 0,2 \mu\text{M}$. Die drei modifizierten Liganden D-A649_38εA23, D-A649_38εA48 und D-A649_38εA53 zeigten bei der Gleichgewichtsdialyse Dissoziationskonstanten von über $75 \mu\text{M}$ und wurden daher keiner Fluoreszenztitration unterzogen (Tab. 7)

RNA-Ligand	K_d [μM]
D-A649_38 ^{b)}	$4,1 \pm 0,2$
D-A649_38εA23 ^{a)}	~ 76
D-A649_38εA25 ^{b)}	$6,6 \pm 0,5$
D-A649_38εA25 ^{c)}	$6,6 \pm 1,0$
D-A649_38εA48 ^{a)}	~ 81
D-A649_38εA53 ^{a)}	~ 128

Tabelle 7: Dissoziationskonstanten der synthetisierten RNA-Liganden. Die Dissoziationskonstanten wurden mittels Gleichgewichtsdialyse als Einpunktbestimmung (a), mit variierenden RNA Konzentrationen (b) oder mittels Fluoreszenztitration (c) ermittelt.

Sowohl aus den Meßdaten der Gleichgewichtsdialyse wie auch der Fluoreszenztitration wurde für den Komplex aus DA649_38εA25 eine Dissoziationskonstante von $6,6 \mu\text{M}$ ermittelt. Für die Bestimmung des K_d -Wertes mittels Fluoreszenztitration war eine Inkubationszeit über Nacht angesetzt worden. Die einzelnen Messungen dauerten eine Minute (Scan-geschwindigkeit = 150 nm/min , Wellenlängenbereich pro Scan = 150 nm). Bei der Gleichgewichtsdialyse hingegen war eine Inkubationszeit von 24 h notwendig. Die Messung einer Probe im Szintillationszähler betrug 10 min. Betrachtet man zusätzlich zum höheren Zeitaufwand noch die ebenfalls höhere Belastung der Umwelt und des Personals, so bietet die Nutzung eines fluoreszierenden RNA-Liganden große Vorteile gegenüber einem radioaktiven Verfahren mit einer nichtfluoreszierenden Ligandenvariante.