

4 ERGEBNISSE

4.1 Konzeption der photospaltbaren Linker

Die technische Neuerung im Konzept der Selektion mit photospaltbaren Linkern ist die Verwendung von multifunktionalen Nukleinsäure-Konjugaten. Dazu mussten neue Methoden zur Modifizierung von RNA-Transkripten, zur Kopplung der entsprechenden Reaktanten und zur selektiven Spaltung entwickelt werden. Diese Techniken sollten universell einsetzbar und unabhängig von dem jeweils untersuchten Reaktionstyp sein.

Konkret wurde die Modifizierung der RNA-Bibliotheken durch enzymatische Ligation von chemisch synthetisierten Dinukleotidanaloga erreicht. Als Spacer zwischen Reaktant und RNA wurden wegen der ausgezeichneten chemischen Stabilität, der biologischen Verträglichkeit und der strukturellen Flexibilität Polyethylenglykol-Einheiten (PEG) eingeführt [Jäschke 1997]. Die selektive Trennung der RNA von dem gekoppelten Reaktanten wurde durch Photospaltung realisiert.

Um die benötigten Eigenschaften in einem einzigen Baustein zu kombinieren, der mit den übrigen Schritten der Selektion kompatibel und in verschiedensten Selektionsprojekten anwendbar ist, wurden die modifizierten Dinukleotide 1-3 mit der allgemeinen Struktur in Abb. 6 entworfen und hergestellt. Diese Verbindungen enthalten, von 5'- in 3'-Richtung, verschiedene Bereiche mit folgenden Eigenschaften:

- das Dinukleotid (p-C-C) mit einer 5'-Phosphatgruppe, das als Substraterkennung zur Ligation mit T4-RNA-Ligase dient und die Kopplung an das 3'-Ende der RNA erlaubt [Igloi 1996]
- zwei bis fünf Hexaethylenglykolketten (Heg) als flexible Spacer, um eine freie Positionierung der RNA zu dem Reaktanten zu gewährleisten [Rumney & Kool 1995]
- der photochemisch spaltbare *o*-Nitrobenzyl-Ester (X) [Ordoukhanian & Taylor 1995]
- eine 3'-terminale funktionelle Gruppe, die die Einführung des Reaktanten ermöglicht. Dies kann abhängig vom jeweiligen Zielmolekül während der Automaten-synthese durch Verwendung geeigneter Phosphoramiditbausteine geschehen, wie im Fall von Biotin in Verbindung 1. Alternativ kann während der Synthese eine terminale primäre Amino- oder Carboxylgruppe eingeführt werden, die eine postsynthetische Derivatisierung mit verschiedenen Reaktanten erlaubt.

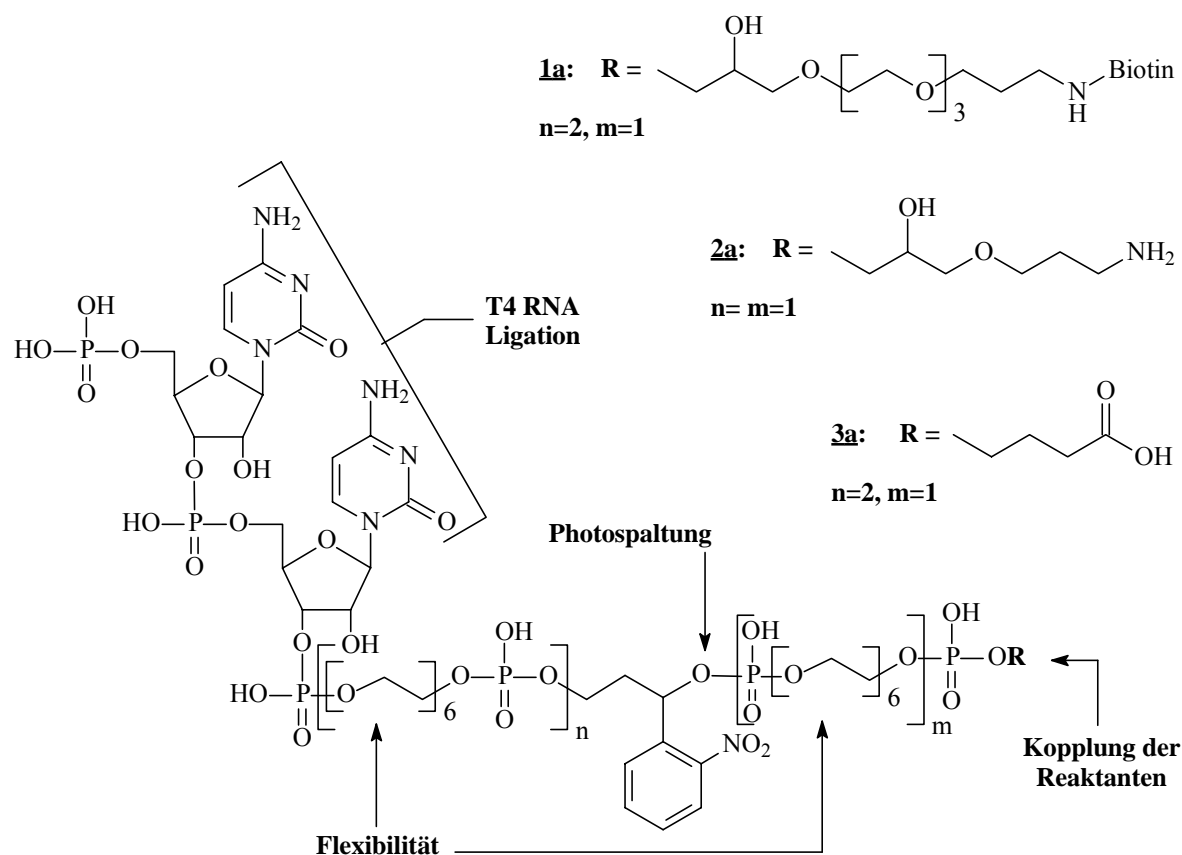


Abb. 6 Aufbau der Dinukleotidanaloga 1a, 2a und 3a; die entsprechend längeren Homologe 1b, 2b, und 3b enthalten je fünf Heg-Einheiten (n=3, m=2).

Die Verbindungen 1-3 können retrosynthetisch über die Phosphodiesterbrücken aus einzelnen Phosphoramidit-Komponenten aufgebaut werden, die bis auf den photoaktiven Baustein und die carboxyl-generierende Festphase kommerziell erhältlich sind.

4.1.1 Synthese des photoaktiven Phosphoramidits

Der für das Phosphoramidit-Verfahren geeignete photoaktive Baustein 9 wurde wie in Abbildung 7 gezeigt in vier Stufen ausgehend vom kommerziell erhältlichen *o*-Nitrobenzaldehyd 4 hergestellt [Ordoukhanian & Taylor 1995].

In der ersten Stufe wurde in einer Sakurai-Reaktion durch Trimethylallylsilan ein C₃-Fragment eingeführt und die erste OH-Gruppe erzeugt [Hosomi & Sakurai 1977]. Dabei entstand am Benzyl-Kohlenstoff ein chirales Zentrum mit racemischer Verteilung. Durch Verwendung von Schutzgas und frisch getrocknetem und destilliertem Lösungsmittel wurde die Reaktion wasserfrei durchgeführt und durch die Lewis-Säure-Katalyse mit TiCl₄ konnten Nebenreaktionen am Ringgerüst und an der Nitrogruppe unterbunden werden.

In Schritt 2 wurde durch Ozonolyse selektiv die Doppelbindung gespalten, die soeben eingeführte C₃-Seitenkette auf ein C₂-Fragment verkleinert und somit das angestrebte Kohlenstoffgerüst vervollständigt. Um unerwünschte Oxidationsprodukte zu vermeiden, wurde die Reaktion beim Auftreten der bläulichen Farbe des Ozons gestoppt. Durch reduktive Aufarbeitung mit Natriumborhydrid (NaBH₄) wurde anschließend *in situ* die zweite nötige OH-Gruppe erzeugt, ohne dabei die Nitrogruppe zu beschädigen.

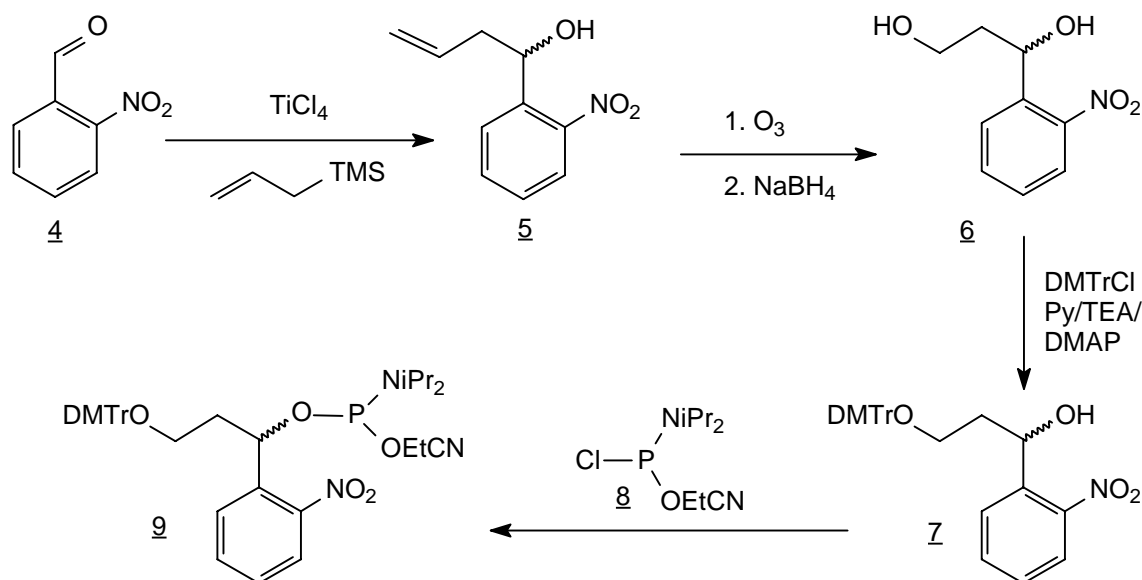


Abb. 7 Synthese des photoaktiven Phosphoramidites 9

Bei der Umsetzung der Verbindung 6 mit Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) wurde aus sterischen Gründen bevorzugt die primäre OH-Gruppe geschützt. Die Reaktion wurde mit Dünnschichtchromatographie verfolgt, und es wurde solange DMTrCl hinzugegeben, bis das Ausgangsprodukt vollständig umgesetzt war [Gait 1984].

Die verbleibende OH-Gruppe der Verbindung 7 wurde durch Umsetzung mit dem Phosphitylierungsreagenz 8 quantitativ zum gewünschten Phosphoramidit 9 funktionalisiert. Dabei entstanden Diastereomere, da die Substituenten am Phosphor bei Raumtemperatur nicht bzw. sehr langsam durchschwingen. Die Reaktion wurde luft- und wasserfrei durchgeführt, mit Dünnschichtchromatographie verfolgt und nach 15 min gestoppt.

Alle Produkte wurden durch Säulenchromatographie gereinigt und durch ¹H-NMR, ¹³C-NMR und Massenspektroskopie charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die chromatographische Aufreinigung der Rohprodukte 5 und 6 nicht notwendig ist und diese auch direkt weiterverarbeitet werden können.

Im präparativen Ansatz wurden 3 g des Phosphoramidites **9** mit 11% Gesamtausbeute hergestellt, dessen Identität und Reinheit zusätzlich durch ^{31}P -NMR nachgewiesen wurde.

4.1.2 Synthese von photospaltbaren Phosphoramiditen auf Nitroveratryl-Basis

Insbesondere zur Blockierung von Biomolekülen wurden photoaktive Schutzgruppen in letzter Zeit verstärkt durch Nitroveratryl-Einheiten realisiert [Correl & Trentham 1993]. Dabei trägt das *o*-Nitrobenzyl-Grundgerüst zwei zusätzliche Methoxy-Substituenten in meta- und para-Stellung, wodurch die Lichtempfindlichkeit erhöht wird [Holmes 1997]. Zudem ist eine Anregung mit längerwelliger Strahlung möglich. Es wurde daher untersucht, ob die Nitroveratryl-Einheit zur Synthese von photospaltbaren Linkern geeignet ist.

Der Einbau dieser Gruppe in Dinukleotidanaloga des Typs **1-3** sollte wie bei dem photoaktiven Baustein **9** durch das Phosphoramidit-Verfahren erfolgen, die Nitroveratryl-Komponente musste daher zunächst entsprechend funktionalisiert werden. Hierzu wurde, ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Nitroveratryl-Derivat **10**, wie in Abbildung 8 gezeigt in je drei Schritten die DMTr-geschützten Phosphoramidite **15** und **16** hergestellt. Diese unterscheiden sich in der Orientierung ihrer Schutzgruppen, was nach Einbau in Oligonukleotide durch automatisierte Festphasen-Synthese und anschließender Photospaltung bei **15** zu einem nativen 3'-Phosphat und im Fall von **16** zu einem nativen 5'-Phosphat. In diesen Fällen ist die Unterscheidung zwischen **15** und **16** für eine weitergehende enzymatische Prozessierung von Bedeutung.

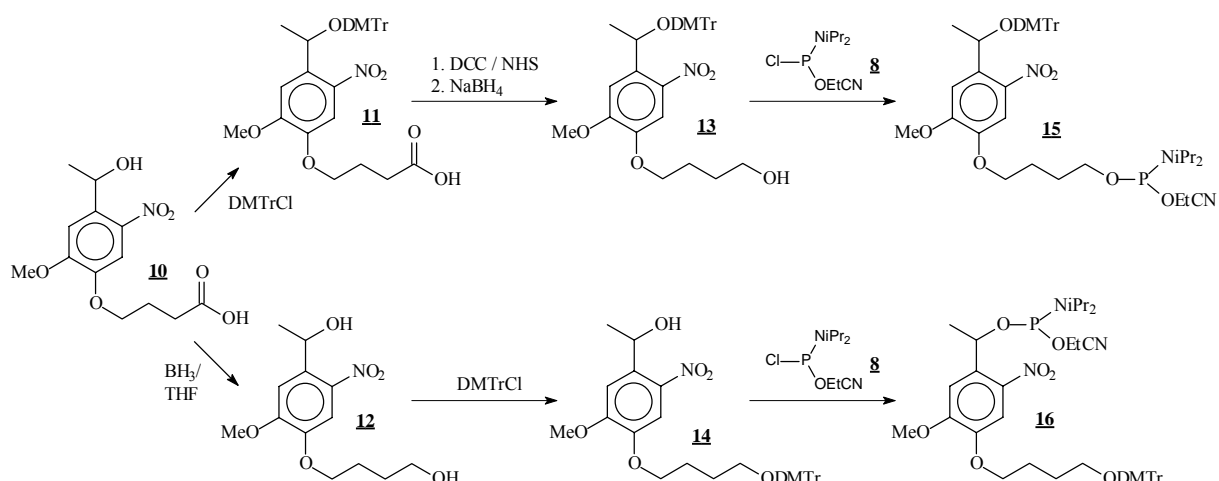


Abb. 8 Synthese der photoaktiven Nitroveratryl-Phosphoramidite **15** und **16**

Bei der Synthese von Verbindung **16** wurde zunächst die Carboxyl-Gruppe von **10** unter sauren Bedingungen mit BH₃ in THF reduziert [Brown *et al.* 1970]. Bei der anschließenden Umsetzung mit DMTrCl wurde bevorzugt die neu entstandene primäre Hydroxyl-Gruppe

geschützt. Die verbleibende, sekundäre OH-Gruppe wurde abschließend als Phosphoramidit aktiviert. Zur Herstellung von 15 wurde im ersten Schritt die einzige vorhandene Hydroxyl-Gruppe mit DMTrCl geschützt. Eine Reduktion der COOH-Gruppe mit Boran (BH_3) ist nun wegen der Empfindlichkeit der DMTr-Schutzgruppe gegenüber Säure nicht mehr möglich, während unter alkalischen Bedingungen die Reaktivität des Carboxylates gegenüber Reduktions-Reagenzien stark abnimmt. Die Verwendung von Lithium-Aluminiumhydrid (LiAlH_4) ist hier nicht möglich, da so auch die Nitro-Gruppe reduziert würde. Verbindung 11 wurde daher zunächst im basischen Milieu als NHS-Ester aktiviert, der anschließend durch NaBH_4 zum Alkohol 12 reduziert wurde [Nikawa & Shiba 1979]. Die dabei entstehende OH-Gruppe wurde im letzten Schritt zum Phosphoramidit umgesetzt. Alle Produkte wurden durch Flash-Chromatographie gereinigt und durch ^1H -, ^{13}C und ggf. ^{31}P -NMR sowie durch Massenspektrometrie eindeutig charakterisiert.

Die Einsetzbarkeit von 15 und 16 in dem in Abbildung 11 gezeigten Phosphoramidit-Verfahren wurde durch den Einbau in verschiedene Oligonukleotide getestet. In allen Fällen wurde ein deutlicher Rückgang der Kopplungsausbeuten (zwischen 10-30 % Kopplungseffizienz) beobachtet. Dies könnte durch eine erhöhte oxidative oder saure Empfindlichkeit im Vergleich zu dem photospaltbaren Phosphoramidit 9 erklärt werden. Jedoch konnte auch durch schonendere Oxidations- oder Detritylierungs-Bedingungen die Kopplungsausbeute von 15 oder 16 nicht gesteigert werden. Eine Möglichkeit, die in diesem Zusammenhang noch überprüft werden könnte, wäre die Verwendung von kürzlich entwickelten, optimierten Aktivatoren wie z.B. 5-Ethylthiotetrazol.

Die Inkompatibilität der Phosphoramidite 15 und 16 mit den Bedingungen der automatisierten Festphasensynthese ist insofern überraschend, als Nitroveratryl-modifizierte Festphasen hierbei verwendet werden können. Auch alkyl-substituierte *o*-Nitrobenzyl-Einheiten sind schon erfolgreich im Phosphoramidit-Verfahren eingesetzt worden.

4.1.3 Automatisierte Festphasensynthesen der Dinukleotidanaloga

Das gebräuchlichste Verfahren zur Oligonukleotid-Synthese ist das Phosphoramidit-Verfahren [Beaucage & Iyer 1992]. Da neben Nukleosid-Phosphoramiditen auch andere entsprechend bifunktionalisierte und geschützte Bausteine einsetzbar sind (s. Abb. 9), wurden die Verbindungen 1-3 durch schrittweisen Einbau des photoaktiven Phosphoramidites 9 sowie der kommerziell erhältlichen Verbindungen 17-21 aufgebaut:

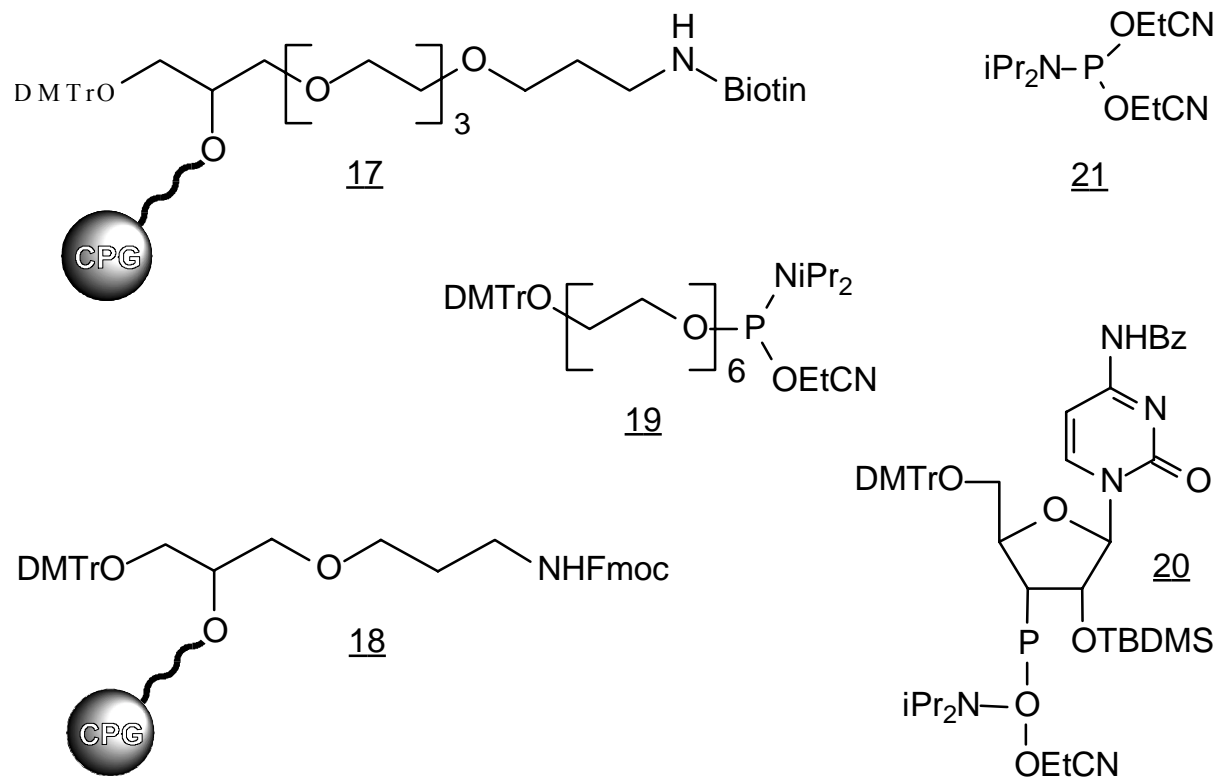


Abb. 9 Verwendete Phosphoramidite und Reagenzien bei der Festphasensynthese der Dinukleotidanaloga 1-3

Die einzelnen Schritte einer Oligonukleotid-Synthese sind in Abb. 10 gezeigt. Ein Zyklus beginnt mit der Abspaltung der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr) im sauren Milieu (Detritylierung). An die neu entstandene (5')-OH-Funktion kann durch Aktivierung mit Tetrazol der neue Baustein unter Ausbildung einer Phosphitbindung gekoppelt werden. Um nicht gekoppelte Ketten am weiteren Wachstum zu hindern, werden die nicht umgesetzten OH-Gruppen mit Acetanhydrid blockiert (Capping). Die anschließende Reaktion mit Jod oxidiert das Phosphit zum Phosphat, und ein neuer Zyklus kann beginnen.

Die Synthese erfolgt somit in 3'-5'-Richtung, d.h. umgekehrt zur Biosynthese.

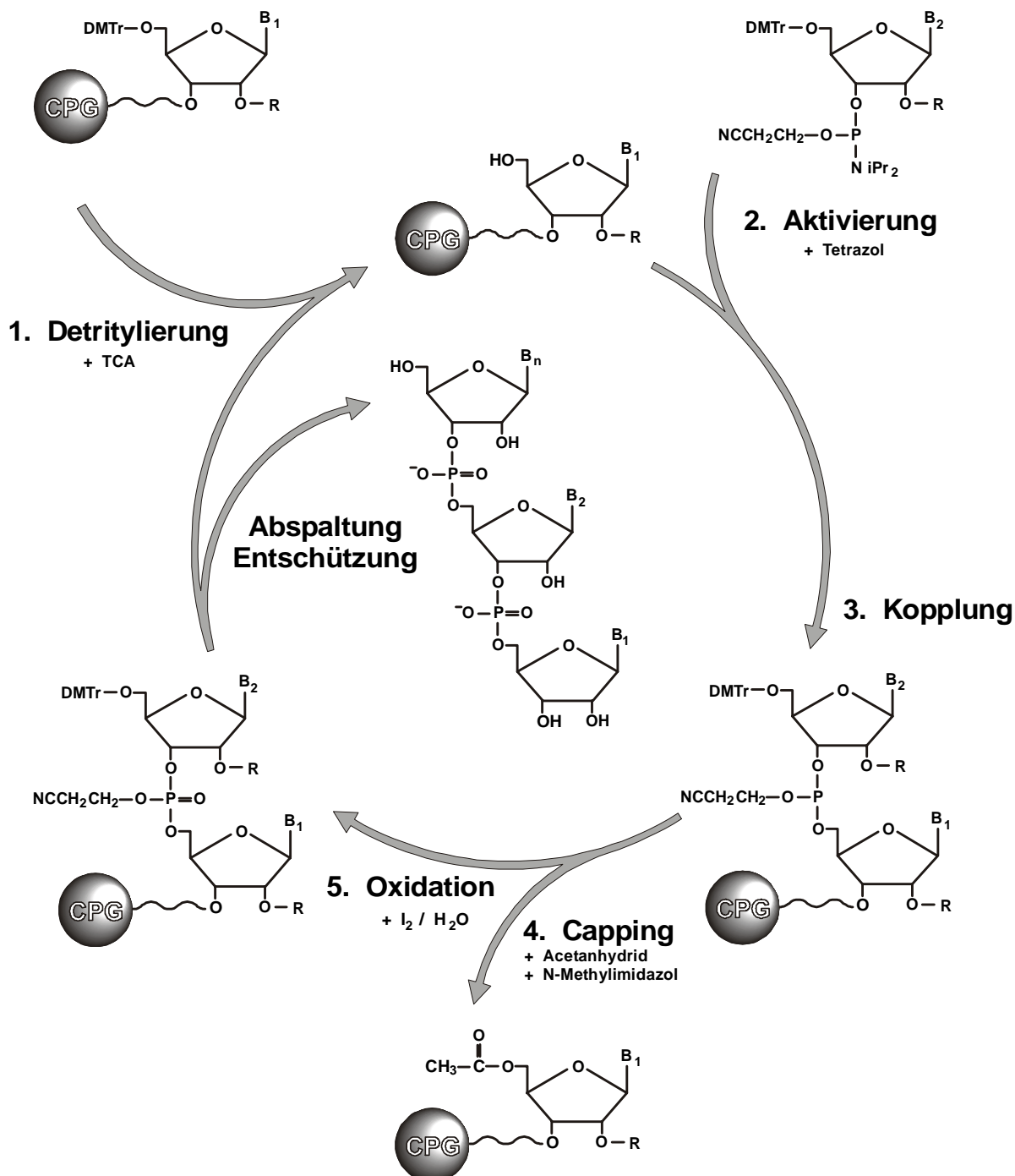


Abb. 10 Schema eines RNA-Synthesesyklus nach dem Phosphoramiditverfahren

Durch die Umsetzung an fester Phase lassen sich die Wasch- und Reaktionsschritte erheblich vereinfachen und automatisieren. So waren die Bausteine 17 und 18 bereits zu Beginn der Synthese über eine C₁₈-Alkylkette und einen Bernsteinsäureester an den festen Träger gebunden. Zur Synthese der Biotinderivates 1a wurden nun an die Festphase 17 nacheinander in einer 1,3 μmol DMTr-on Synthese die Phosphoramidite 19, 19, 9, 19, 20 und 20 gekoppelt. Da terminal eine 5'-Phosphatgruppe benötigt wird, wurde abschließend mit dem zweifach geschützten Phosphoramidit 21 gekoppelt. Durch photometrische Messung der abgespaltenen

Dimethoxytrityl-Fractionen konnte für die einzelnen Reaktionsschritte eine Kopplungsausbeute von über 98% ermittelt werden, inklusive des photoaktiven Phosphoramidites 9. Die Synthese der Dinukleotide 1b, 2a und 2b erfolgte analog, wobei für 1b und 2b zwei bzw. drei zusätzliche Hexaethylglykoleinheiten eingebaut wurden. Bei den aminoterminalen Dinukleotiden 2a und b wurde statt der biotinylierten Festphase 17 der Fmoc-geschützte Aminoträger 18 verwendet. Wegen der universellen Einsetzbarkeit der aminomodifizierten Linker wurde 2b auf einem präparativen Synthesizer im 160µmol Maßstab hergestellt.

Die Abspaltung vom Glasträger sowie der basenlabilen Schutzgruppen (Fmoc, Bz, EtCN) erfolgte bei allen Analoga manuell durch 33% Ammoniak bei 55°C, gefolgt von der Entschützung der 2'-OH-Gruppen (TBDMS) durch Fluoridionen. Dies muss getrennt geschehen, da die 2'-entschützte RNA unter basischen Bedingungen hydrolysiert würde.

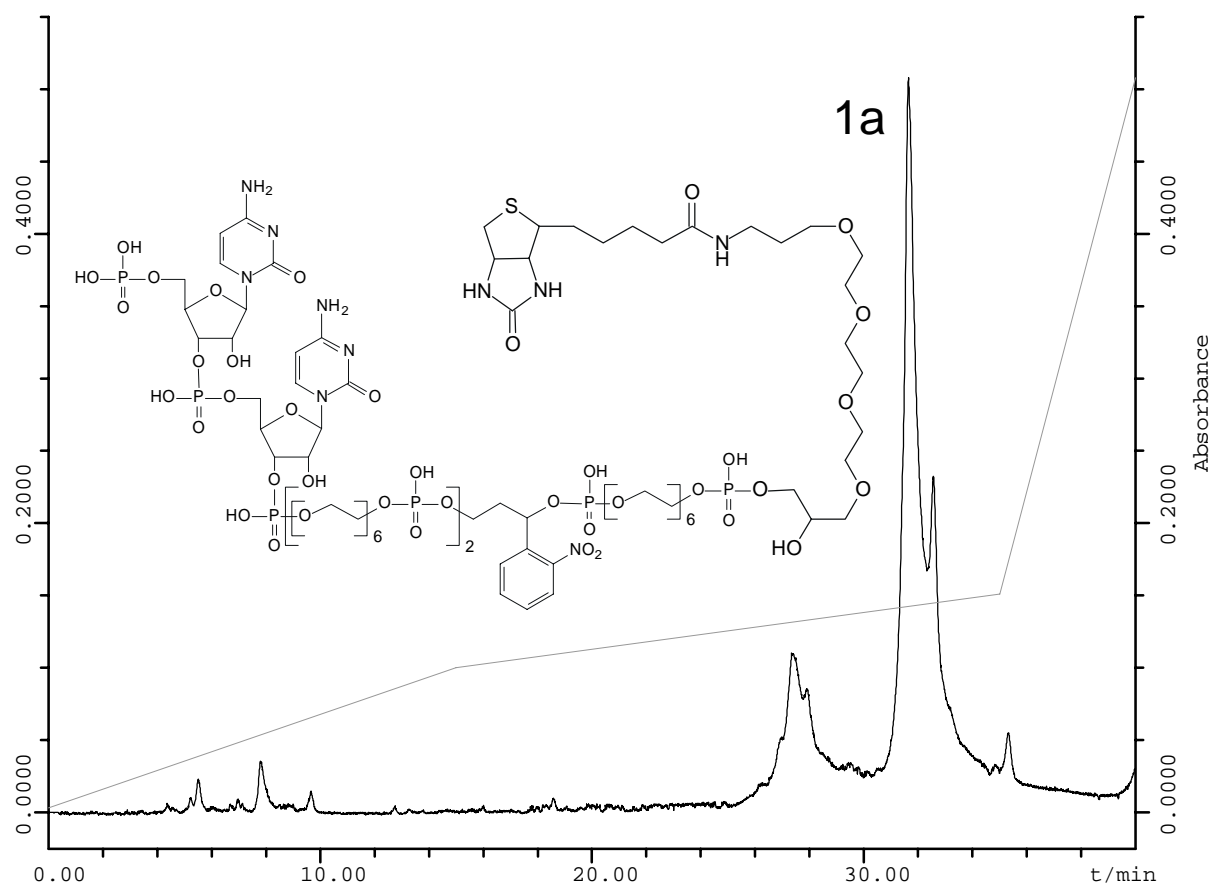


Abb. 11 HPLC-Chromatogramm des entschützten Dinukleotides 1a nach Anionenaustausch-Chromatographie.

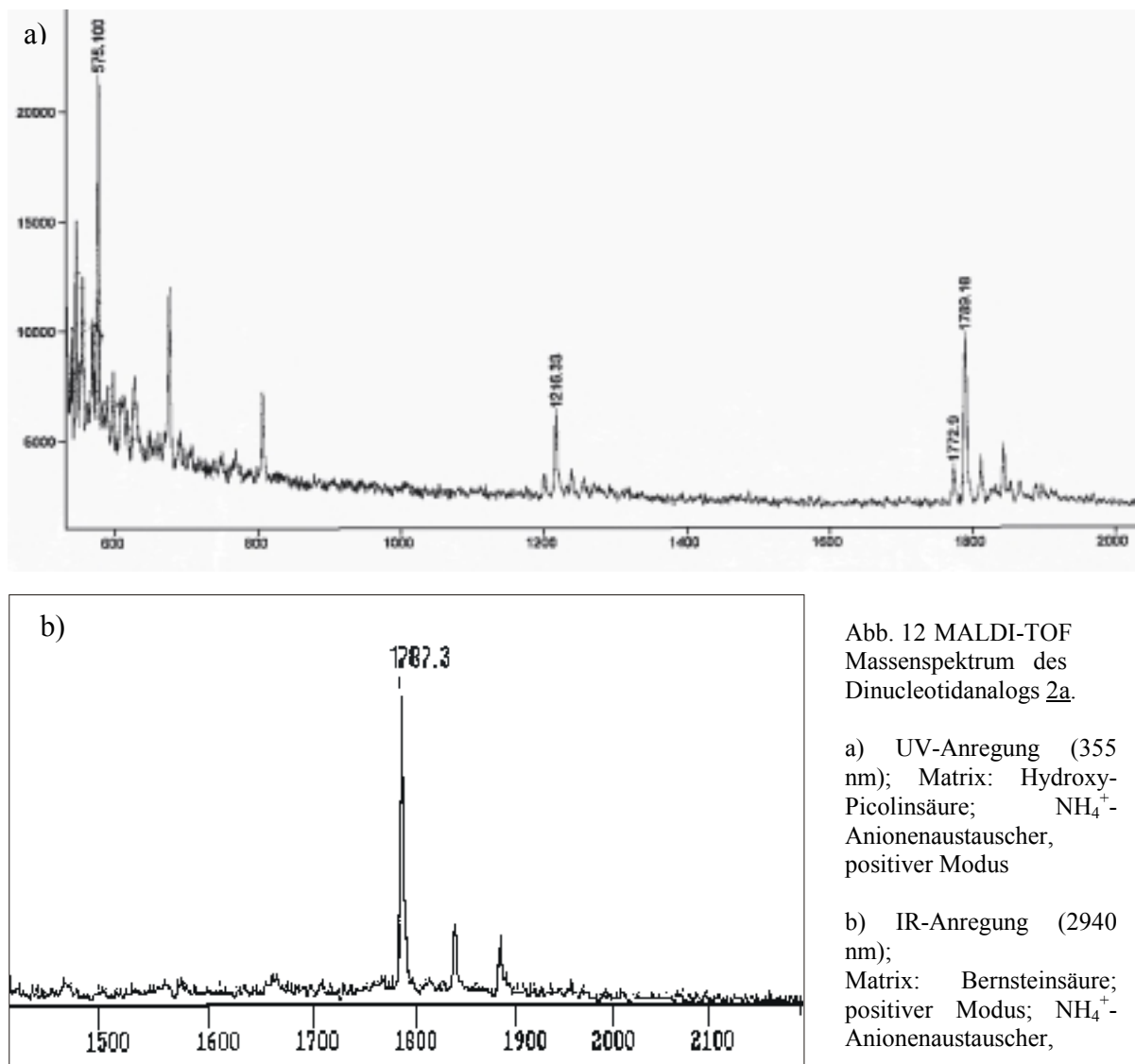
Die Reinigung der vollständig entschützten Dinucleotidanaloga 1 und 2 erfolgte über Anionenaustausch-Chromatographie und präparative HPLC an reverser Phase. Abbildung 11 zeigt das Chromatogramm des Biotinderivates 1a mit einer Retentionszeit des Produktes von 31,6 Minuten. Der Peak zwischen 31,2 bis 32,3 Minuten wurde lyophilisiert und die Gesamtausbeute durch Messung der UV-Absorption der Cytidine bei 271 nm zu 2,4 OD₂₇₂

(127 nmol, 10%) bestimmt. Durch getrennte UV-Messungen des Zwischenproduktes 4 konnte gezeigt werden, dass die Eigenabsorption des photoaktiven Bausteins X im Vergleich zu den Cytidinen vernachlässigt werden kann. Das aminomodifizierte Dinukleotid 2a eluiert unter gleichen Bedingungen bei 21,5 Minuten und konnte mit einer Ausbeute von 5.4 OD₂₇₀ (286 nmol, 22%) isoliert werden. Das entsprechende Chromatogramm des gereinigten Produktes ist in Abbildung 14b) dargestellt. Für die Reinigung der längeren Dinukleotidanaloga 1b und 2b wurde ein steilerer Gradient verwendet, die mit 20% bzw. 5% Gesamtausbeute isoliert wurden. Der Biotingehalt von 1a und 1b wurde zusätzlich durch den HABA-Avidin Assay überprüft und bestätigt. Dieser Test basiert auf der quantitativen, kompetitiven Verdrängung eines Azofarbstoffes durch Biotin aus der Avidin-Bindungstasche und ist somit hochspezifisch.

4.1.4 Charakterisierung der photospaltbaren Dinukleotide

Die Identität der isolierten Verbindungen 1 und 2 wurde durch Massenspektrometrie geklärt. Um Biopolymere massenspektroskopisch zu untersuchen, ist es notwendig, diese zu ionisieren und in die Gasphase zu bringen, ohne dass diese sich zersetzen, fragmentieren oder aggregieren. Ein besonders schonendes Verfahren hierfür ist die **Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation- Time Of Flight (MALDI-TOF)** Massenspektroskopie [Karas & Hillenkamp 1988], bei der z.B. Nukleinsäuren in eine feste Matrix eingebettet werden. Hierbei wird eine niedermolekulare, organische Säure verwendet, welche die Phosphate des Oligonukleotide-Rückrates protoniert und so die negativen Ladungen nahezu ausgleicht. Durch Laserbeschuss wird die feste Matrix verdampft und die darin isolierten Polymere mit in die Gasphase gerissen. Im Hochvakuum dissoziieren die organischen Gegenionen im Gegensatz zu Metallionen von den Oligonukleotiden ab, und die Masse der „nackten“ Nukleinsäuren kann über die charakteristische Flugzeit im elektrischen Feld bestimmt werden [Hillenkamp & Karas 1990].

Ein UV-MALDI-TOF Massenspektrum des Dinukleotidanalogs 2a ist in Abbildung 12a) gezeigt:



Deutlich zu erkennen ist der Molekülmassenpeak als Kation bei $m/z = 1789,16 \text{ g/mol}$ (berechnet: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1788,28$) sowie ein entsprechendes Natrium-Addukt bei $m/z = 1811,13 \text{ g/mol}$. Die Anregung mit 355 nm entspricht genau der Wellenlänge der Photospaltung und man beobachtet die Signale des entstehenden schwereren Fragments bei $m/z = 1216,33 \text{ g/mol}$ (berechnet $m/z [\text{p-C-C-Heg-X} + \text{H}]^+ = 1214,82$) und des leichteren Aminoterminus bei $m/z = 575,109 \text{ g/mol}$ (berechnet: $[\text{p-Heg-NH}_2 + \text{H}]^+ = 574,46$). Der Peak bei $m/z = 1772,9$ (schwach auch um $m/z = 1200$) ist charakteristisch für die UV Detektion der photospaltbaren Linker. Sie gehen durch Modifikation des Dinucleotidanalogs bzw. des entsprechenden Photofragments mit ca. 16 g/mol Massendifferenz hervor, was auf eine Sauerstoffabstraktion bzw. Reduktion an der *o*-Nitrobenzyleinheit unter MALDI-TOF Bedingungen hindeutet.

Bei Anregung im IR-Bereich [Nordhoff *et al.* 1993] (Abb. 12b) ist weder eine Photospaltung noch eine reduktive Zersetzung zu beobachten. Das detektierte Hauptsignal bei $m/z = 1787,3 \text{ g/mol}$ entspricht der berechneten Masse von $m/z [\text{M}+\text{H}]^+ = 1788,3$. Die Signale bei $m/z =$

1839,8 und $m/z = 1885,7$ sind wahrscheinlich auf eine Ablation vom Probensteller oder auf assoziierte Gegenionen zurückzuführen.

Auch die Identität der längeren oder biotinylierten Dinukleotidanaloga konnte durch MALDI-TOF Massenspektroskopie gesichert werden. So konnte z.B. für 1b die erwartete Masse bei $m/z = 3179,3$ g/mol (berechnet: $[M+H]^+ = 3179,6$) bestätigt werden, ebenso wie die entsprechenden Produkte der Photospaltung bei $m/z = 1904,2$; $1277,0$ g/mol (berechnet: $1903,4$; $1277,2$) und der reduktiven Zersetzung bei $m/z = 3164,5$ und $1889,2$ g/mol.

4.1.5 Synthese der carboxyderivatisierten Dinukleotide

Im Gegensatz zu den Biotin- oder amino-funktionalisierten Dinukleotiden 1 und 2 war bei der Synthese der carboxyl-modifizierten Dinukleotide 3 kommerziell kein modifizierter Festphasenträger verfügbar, der die Generierung einer 3'-terminalen COOH-Gruppe erlaubt hätte. Die seit kurzem käuflich erhältlichen 3'Carboxylat-Festphasen von Chemgenes führen zwar auch zu einer 3'-endständigen Carboxylgruppe, jedoch erst nach Bestrahlung mit Licht, was nicht kompatibel mit der photolabilen *o*-Nitrobenzylgruppe der Linker ist [Yoo & Greenberg 1995]. Es musste daher zunächst eine Festphase präpariert werden, die unter RNA- und photosensitiven Entschützungsbedingungen die gewünschte COOH-Funktion generiert [Hovinen *et al.* 1994]:

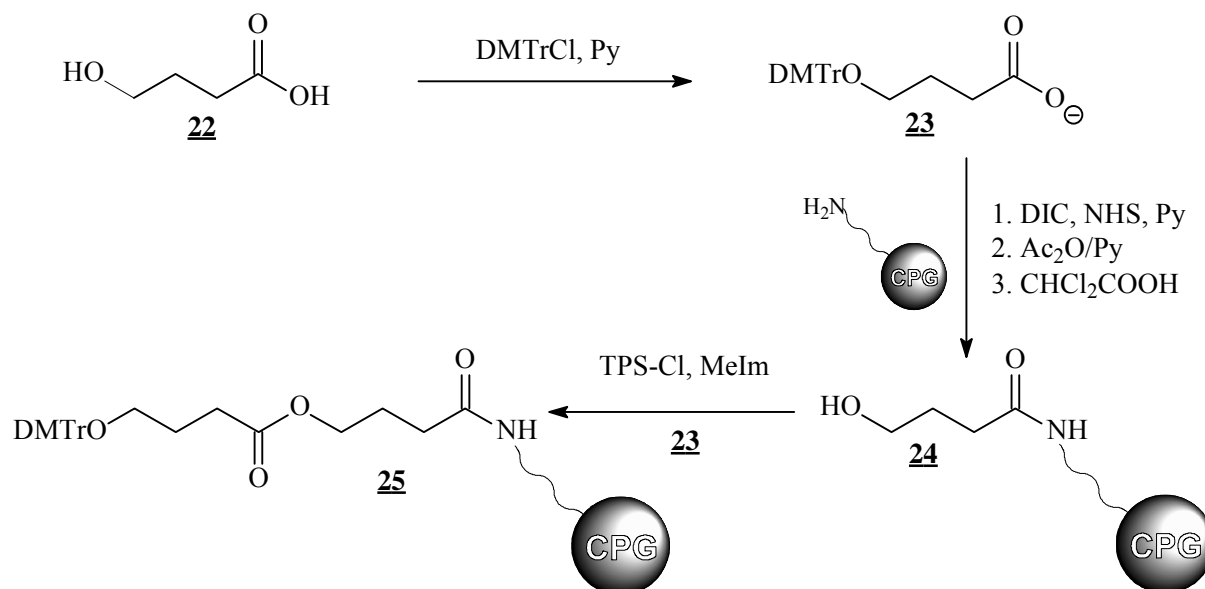


Abb. 13 Synthese der carboxyderivatisierten Festphase

Hierzu wurde zunächst die Hydroxylgruppe der Ausgangssubstanz 4-Hydroxybuttersäure 22 mit Dimethoxytritylchlorid geschützt und als Pyridinium-Salz aufgereinigt und

charakterisiert. Die Verbindung 23 wurde anschließend mit DIC an aminoalkyl-funktionalisiertes CPG gekoppelt. Das sonst übliche DCC ist hier untauglich, da das entstehende Nebenprodukt unlöslich ist und somit nicht mehr von der umgesetzten Festphase abgetrennt werden kann.

Die nicht-reagierten Aminogruppen der Zwischenstufe 24 wurden mit Acetanhydrid blockiert, bevor die terminale Hydroxylgruppe mit Dichloressigsäure detrityliert wurde. Diese wurde anschließend nach der Methode der gemischten Anhydride erneut mit Verbindung 23 unter Ausbildung einer alkalilabilen Esterbindung derivatisiert. Nach erneutem Capping wurde die Beladung der gewünschten Festphase 25 durch analytische Detritylierung zu $48\mu\text{mol/g}$ bestimmt und auf ihr aufbauend die Dinukleotide 3a und b synthetisiert.

Die derivatisierte Festphase 25 war zur Synthese von funktionalisierter DNA beschrieben worden [Hovinen *et al.* 1993], die entsprechenden Entschützungsbedingungen werden von RNA jedoch nicht toleriert. Eine Entschätzung mit Ammoniak nach dem Standard-Protokoll ist hier nicht möglich, da dies zur 3'-terminalen Amidbildung statt der geforderten COOH-Fraktion führen würde. Nach der Automaten-synthese wurden die Verbindungen 3a und 3b daher zunächst mit wässriger TEA-Lösung vom Träger abgespalten, anschließend mit 33% NH_4OH entschützt und nach Lyophilisierung standardmäßig mit TBAF desilyliert.

Die Rohprodukte von 3a wurden wie bei 1a und 2a mit Anionenaustauscher-Chromatographie und HPLC gereinigt (s. Abb. 16b), der Peak bei 23,6 Minuten lyophilisiert und mit UV-Spektroskopie quantifiziert (4 OD_{270} , 200 nmol, 16%). Durch UV-MALDI-TOF Massenspektroskopie wurde das Produkt charakterisiert und der korrekte Molmassenpeak bei 2084,8 g/mol (berechnet $[\text{M-H}]^-$: 2084,1) gefunden. Durch die Photospaltung konnte die richtige Zusammensetzung des Carboxyl-tragenden Fragments ermittelt werden (gefunden: 527,4 g/mol; berechnet: 527,1 g/mol). Somit können Nebenreaktionen oder Zersetzungen in diesem Molekülteil ausgeschlossen werden.

Der längere, fünf Hexaethylenglykoleinheiten tragende Carboxylinker 3b wurde nach präparativer HPLC mit 11,5 % Gesamtausbeute erhalten. Auch hier konnte das Carboxyl-tragende Photofragment eindeutig bei $m/z = 874,1$ g/mol (berechnet: $[\text{M+H}]^+ = 873,7$) detektiert werden.

4.2 Derivatisierung der Dinukleotidanaloga

4.2.1 Kopplung mit aktivierten NHS-Estern

Die meisten für die Selektion interessanter Reaktanten sind nicht als Phosphoramidite oder Phosphoramidit-kompatible Festphasenderivate erhältlich und können auch nicht ohne weiteres als solche hergestellt werden [Beaucage & Iyer 1993a]. Sie können folglich auch nicht, wie es im Spezialfall der Biotin-derivatisierten Dinukleotide 1 möglich ist, direkt während der automatisierten Oligonukleotidsynthese eingebaut werden, sondern müssen nachträglich an das geschützte Dinukleotidanaloga gekoppelt werden.

Eine besonders gebräuchliche Methode zur Biokonjugation [Hermanson 1996] ist die Derivatisierung von primären Aminogruppen, vorzugsweise mit präaktivierten N-Hydroxysuccinimidestern (NHS). Deren Reaktivität ist so gewählt, dass sie in wässriger Lösung moderat stabil sind, effizient und quantitativ mit primären Aminogruppen abreagieren, nicht jedoch mit sekundären oder aromatischen Aminen, Hydroxylgruppen, Sulfhydrylgruppen oder Amidgruppen. Sie werden daher häufig zur Modifizierung und zum Crosslinking von Proteinen eingesetzt und sind auch exzellent geeignet für die spezifische Derivatisierung der amino-funktionalisierten Dinukleotidanaloga.

Um zu zeigen, dass an der primären Aminogruppe der Verbindungen 2 Reaktanten eingeführt werden können, wurde 2a wie in Abbildung 14a) dargestellt exemplarisch mit Biotin umgesetzt. Durch Einsatz eines moderat aktivierten NHS-Esters wurde auch bei großen Überschüssen selektiv nur die primäre Aminogruppe umgesetzt, ohne Nebenreaktionen an den acideren NH_2 -Gruppen der Basen zu beobachten.

In den Experimenten bewährte sich der Einsatz des Sulfo-N-Hydroxysuccinimid-Esters 26, da dieser im Gegensatz zu NHS-Biotin wasserlöslich ist. Die Hexylkette zwischen dem aktivierten Ester und Biotin diente als zusätzlicher Spacer.

Entscheidend bei der Kupplung war die genaue Einstellung des pH-Wertes auf 8-8,5, da sonst entweder der aktivierte Ester hydrolysiert ($\text{pH} > 8,5$) oder das primäre Amin protoniert als Ammoniumsalz vorliegt und nicht reagieren kann ($\text{pH} < 8$).

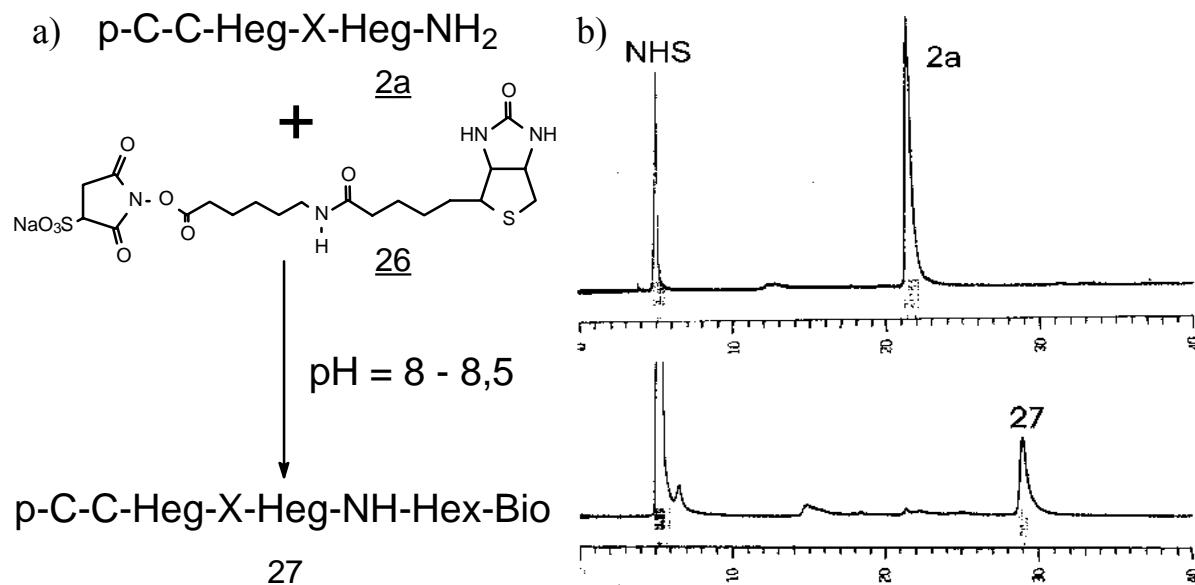


Abb. 14 a) Biotinylierung des aminoterminalen Dinucleotides **2a** mit Sulfo-NHS-Biotinhexanoat;
b) entsprechende HPLC-Chromatogramme des Ausgangsstoffes (oben) und des Reaktionsansatzes (unten).

Die Aufarbeitung des biotinylierten Dinucleotidderivats **27** erfolgte wiederum durch HPLC und ist in Abbildung 14b) gezeigt. Durch die Umsetzung der primären Aminogruppe und die Einführung des hydrophoben Restes erhöht sich die Retentionszeit deutlich von 21,5 auf 29 Minuten. Durch zwanzigfachen Überschuss des aktivierten Esters konnte die Reaktion quantitativ zugunsten des Produkts verschoben und eine Ausbeute von ca. 80% erreicht werden. Die Identität des biotinylierten Dinucleotidderivates **27** wurde durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie gesichert. Der Molekülmassenpeak bei $m/z = 2125,7$ g/mol (berechnet: $m/z [M-H]^- = 2125,5$) ist wiederum begleitet von einer Photofragmentierung mit Peaks bei $m/z = 1214,2$ und $912,2$ g/mol (berechnet: 1212,8 und 911,9 für die Cytidine und Biotin enthaltenden Fragmente), was sowohl die korrekte Umsetzung mit Biotin als auch eine Photospaltung nach dem erwarteten Mechanismus bestätigt [Pillai 1980].

4.2.2 Synthese NHS-aktivierter Reaktanten

Obwohl einige der gebräuchlichsten biochemischen Reagenzien als präaktivierte NHS-Ester käuflich erwerbbar sind (z.B. Biotin, Fluorescein, geschützte Aminosäuren), müssen für die meisten Zielmoleküle die Aktivester zunächst aus N-Hydroxysuccinimid und der entsprechenden Carbonsäure hergestellt werden, bevor diese dann mit den Dinucleotiden umgesetzt werden. Versuche zur *in situ* Aktivierung der gewünschten Carbonsäuren mit Kopplungsreagenzien wie TSTU, HBTU, EDC oder ähnlichen, die in der Peptidchemie erfolgreich eingesetzt werden [Knorr *et al.* 1989], waren unbefriedigend und führten in

Gegenwart der Dinukleotidanaloga nicht zu den gewünschten Konjugaten. Es wurde daher eine generell anwendbare Methode der NHS-Aktivierung erarbeitet und anhand der präbiotisch relevanten Nukleobasen Adenin, Orotsäure und Nicotinsäure experimentell überprüft. Im Fall von Adenin wurde zunächst die benötigte COOH-Gruppe durch Umsetzung von 6-Chloropurin 28 mit Capronsäure 29 eingeführt (s. Abb. 15a). Das erhaltene Produkt 30a sowie die Nukleobasen 30b und c wurden anschließend mit DCC in DMF bzw. HMPT aktiviert und mit N-Hydroxysuccinimid abgefangen. Der entstehende Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und die Aktivester durch Kristallisation aus einem Petroleumbenzin/Isopropanol-Gemisch (6:1) gereinigt. Alle Produkte wurden durch Massenspektroskopie und NMR charakterisiert, wobei in 31c signifikante Verunreinigungen durch den Ausgangsstoff 30c festgestellt wurden, die vermutlich auf hydrolytische Zersetzung während der Aufreinigung zurückzuführen sind. Da diese jedoch nicht die weiteren Derivatisierungsexperimente störten, wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet. Die Reaktivität der Aktivester gegenüber Hydrolyse war sehr unterschiedlich in der Reihenfolge 31a<31b<31c. Während der Adeninhexanoat-NHS-Ester 31a in wässrigen, neutralen Lösungen relativ stabil war, sodass z.B. eine HPLC Analyse möglich war, kam es bei der Reaktion mit Orotsäure-NHS-Ester 31c rasch zur Bildung von Niederschlägen, die auf eine schnelle Hydrolyse hindeuten. Bei trockener Lagerung und $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ waren alle drei Substanzen jedoch unbegrenzt lagerbar, ohne dass eine Zersetzung beobachtet worden wäre.

Die NHS-aktivierten Nukleobasen wurden bei $\text{pH}=8$ präparativ an den langen, fünf Hexaethylenglykol-Einheiten enthaltenden Aminolinker 2b gekoppelt, wobei ein ca. 40facher Überschuss an Aktivester eine fast vollständige Umsetzung ($>80\%$) der Dinukleotide garantierte. Die Analyse der Reaktionsprodukte durch HPLC zeigte wie in Abb. 15b) eine deutliche Verschiebung der Retentionszeiten durch die gekoppelten hydrophoben Nukleobasen 30a und 30b. Wegen des geringen chromatographischen Einflusses von Orotsäure 30c gegenüber dem eingesetzten Dinukleotidanalogen 2b konnten hier die Produkt- und Eduktpeaks nicht vollständig aufgelöst werden. Durch eine Koinjektion mit frischem Ausgangsstoff konnte aber klar die Umsetzung gezeigt und mit analytischer HPLC auf $>80\%$ bestimmt werden. Die präparative HPLC Reinigung ergab unter verschiedenen, leicht variierenden Reaktionsbedingungen isolierte Ausbeuten von ca. 50% nach Lyophilisierung und UV-Quantifizierung, was angesichts der deutlich höheren Umsätze durch Verluste während der Aufarbeitung erklärt werden kann. Alle Reaktionsprodukte wurden mit MALDI-TOF-Massenspektroskopie charakterisiert und gesichert, wobei durch das typische Photofragmentierungsmuster Nebenreaktionen z.B. an den Cytidinen ausgeschlossen werden

konnten. Um die Einsetzbarkeit der Nucleobasen-Konjugate in Selektionsexperimenten zu gewährleisten, wurden alle drei Dinucleotidderivate 32a-c an einen RNA-Pool mit 120 randomisierten Positionen ligiert. In allen Fällen lag die Umsetzung der RNA bei über 70% und es konnte kein Unterschied zwischen den gekoppelten Reaktanten festgestellt werden.

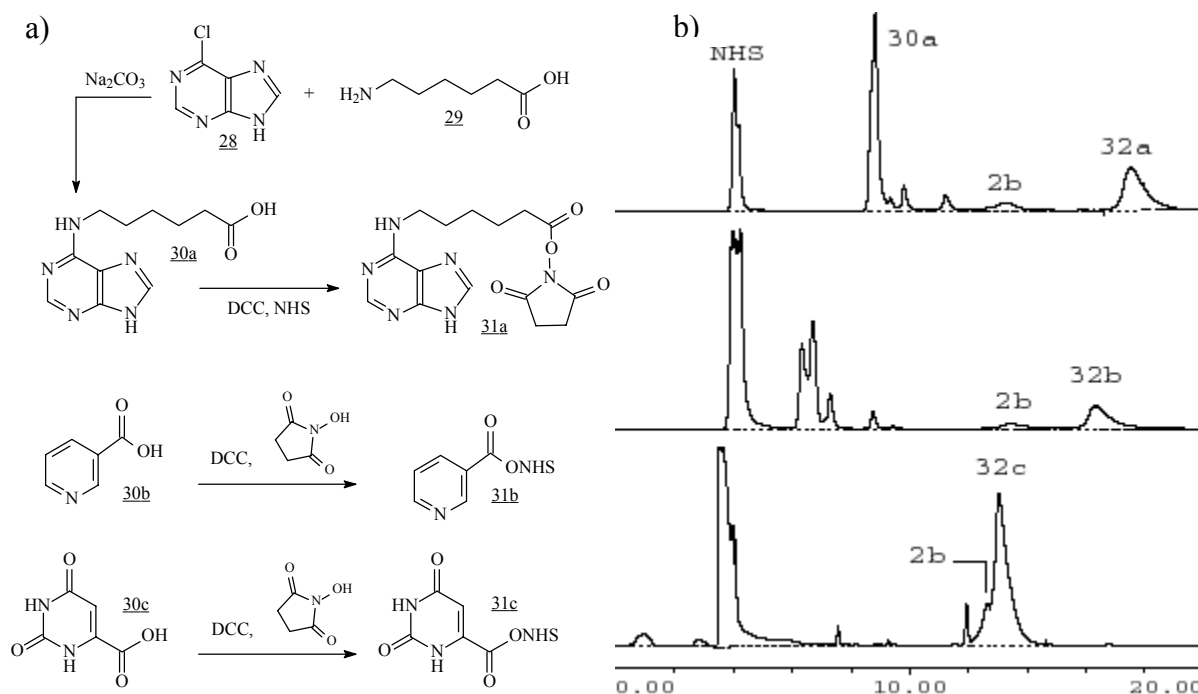


Abb. 15 a) Synthese der NHS-aktivierten Nucleobasen 31a-c
b) HPLC-Chromatogramme von Kopplungsreaktionen der Aktivester an das Dinucleotid 2b.

4.2.3 Konjugation mit komplexen Reaktanten

[Hausch & Jäschke 1998]

Nicht alle potentiellen Reaktanten sind für eine separate Aktivierung als NHS-Ester geeignet. Insbesondere Naturstoffe enthalten oft mehrere funktionelle Gruppen, die eine Aktivierung mit DCC und NHS in organischen Lösungsmitteln nicht tolerieren oder zumindest umfangreiche Schutz- und Entschützungsprotokolle voraussetzen würden. Gerade biologisch relevante Moleküle sind zudem häufig zu instabil für drastische chemische Reaktionen. Außerdem sind nur Carbonsäuren nach der in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Prozedur zugänglich, Moleküle ohne COOH-Funktion können nicht über die Aminogruppe der Dinucleotide 2a und 2b gekoppelt werden.

Aus diesem Grund wurde die Kopplungsstrategie umgekehrt, indem das carboxylderivatisierte Dinucleotid 3a mit potentiellen Reaktanten über deren primäre Aminogruppe gekoppelt wurde. Da die Aminkomponente nun im großen Überschuss gegenüber der Carboxylgruppe (des Linkers) vorliegt, ist nun eine *in situ* Aktivierung der Carbonsäure mit EDC bei pH = 6 möglich. Entscheidend für den Erfolg dieser Strategie ist eine mehrstufige

Aufreinigung der Produkte durch Gelelektrophorese (PAGE), Gelpermeationschromatographie (GPC) und HPLC, wodurch der Überschuss der Aminkomponente sowie deren Nebenprodukte zuverlässig abgetrennt werden kann. Um die Analyse der Reaktionsprodukte zu erleichtern, wurde das Dinukleotidanalogen **3a** vor der Reaktion teilweise am 5'-Ende radioaktiv markiert, indem zunächst das 5'-Phosphat enzymatisch entfernt und anschließend mit T4-Kinase durch radioaktives ^{32}P ersetzt wurde.

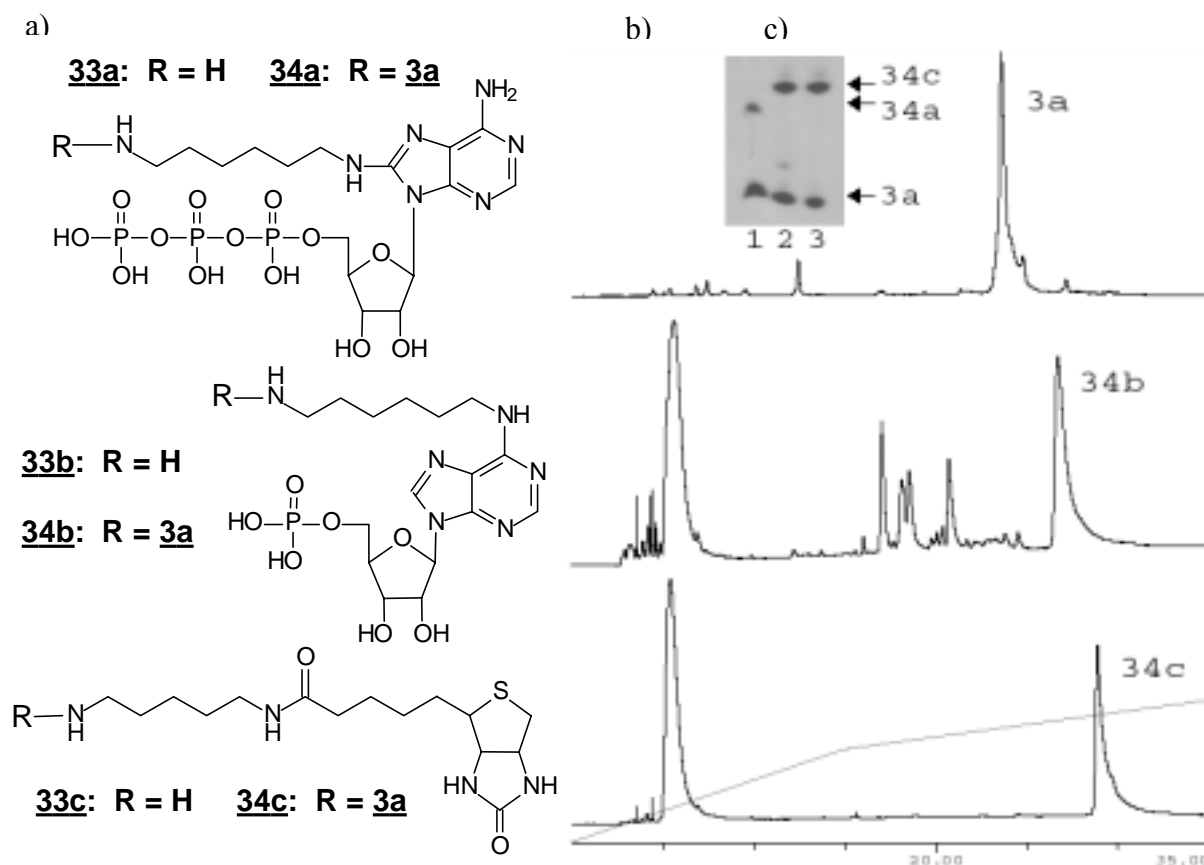


Abb.16 a) primäre Amine **33a-c** und die entsprechenden Konjugate **34a-c** mit Dinukleotid **3a**; b) HPLC-Chromatogramme des Rohproduktes **3a** und dessen Umsetzung mit den primären Aminen durch EDC (nach PAGE und GPC); c) Autoradiographie eines denaturierenden 20% PAA-Geles zur EDC-Kopplung von **3a**; Bahn 1: **33a**, 2h; Bahn 2: **33c**, 25min; Bahn 3: **33c**, 2h.

Exemplarisch wurde der Carboxylinker **3a** mit den in Abb. 16a) dargestellten primären Aminen umgesetzt, Abb. 16b) zeigt die entsprechende gelelektrophoretische Reinigung bzw. abschließende HPLC-Analyse. Wie zu erwarten, vermindert die Konjugation mit den hydrophoben Resten **33a-33c** die elektrophoretische Mobilität und erhöht die Retentionszeiten im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial **3a** (Abb. 16b). Zur Konjugation von chemisch labilen Substanzen kann die Reaktionszeit deutlich von 30 auf zwei Stunden verkürzt werden, was durch die Kopplung mit dem ATP-Derivat **33a** im analytischen Maßstab gezeigt wurde (s. Abb. 16c, Bahn 1).

Unter sehr ähnlichen Versuchsbedingungen wie den hier vorgestellten wurde in der Literatur die Umsetzung von Phosphorsäurederivaten beschrieben [Chu *et al.* 1983]. Tatsächlich wird EDC routinemäßig zur Konjugation von primären Aminen an 5'-Phosphatgruppen von Oligonukleotiden benutzt [Bruick *et al.* 1997]. Um die richtige Konnektivität der isolierten Konjugate zu überprüfen, wurden diese mit MALDI-TOF charakterisiert. Dabei konnten durch die charakteristische Photospaltung das erwartete biotinylierte Fragment bei 837,5 g/mol (berechnet: 837,6) bzw. das AMP-konjugierten Fragment bei 955,7 g/mol (berechnet: 955,5) beobachtet werden. Die Kopplung findet also eindeutig am Carboxyterminus statt, sodass eine Nebenreaktion am 5'-Phosphat der Cytidine ausgeschlossen werden kann.

4.3 Selektionsschema mit photospaltbaren Linkern

[Hausch & Jäschke 1997]

4.3.1 Ligation mit T4-RNA-Ligase

Die Einführung des linkergekoppelten Reaktanten in RNA-Pools ist der wichtigste Schritt der linkergestützten Selektion. Es sollte daher untersucht werden, ob eine Kopplung von Dinukleotidanaloga des Typs 1-3 an RNA durch T4-RNA-Ligase möglich ist [England & Uhlenbeck 1978]. Um die Analytik zu vereinfachen, wurde dazu zunächst das Dinukleotidanalogen 2a - wie in Abbildung 17a) dargestellt - an ein definiertes 25mer-Oligonukleotid ligiert [Igloi 1996], das zuvor durch T7-Transkription hergestellt und durch den Einbau von α -³²P-CTP gleichzeitig radioaktiv markiert worden war [Milligan *et al.* 1987].

Die Ligation des gelgereinigten RNA-Transkripts 35 mit einem zweifachen Überschuss an Dinukleotid 2a wurde durch gelelektrophoretische Analyse der regelmäßig entnommenen Proben verfolgt. Das entsprechende Autoradiogramm in Abbildung 17c) zeigt vor Ligasezugabe ($t = 0$) nur die Bande des unmodifizierten Transkripts 35, die im Verlauf der Ligation immer schwächer wird, während die Bande des entstehenden, langsamer laufenden Konjugates 36 in gleichem Maße zunimmt. Nach zweieinhalb Stunden ist das 25mer vollständig umgesetzt (>95%) und auch nach Ligation über Nacht sind keine zusätzlichen Banden nachzuweisen, die auf Nebenreaktionen wie z.B. Oligomerisierung oder Zirkularisierung hinweisen würden [England *et al.* 1980, Romaniuk & Uhlenbeck 1983].

Diese werden experimentell unterbunden, da das Dinukleotid 3'-terminal durch den HEG-Spacer blockiert und die RNA an ihrem 5'-Ende durch die Transkription triphosphoryliert ist. Somit stehen unter den gewählten Bedingungen als einzige ligierbare Substrate die 3'-OH-Gruppe der RNA und die 5'-Phosphatgruppe des Dinukleotids zur Verfügung. Die erhaltenen Ligationsprodukte in Abb. 17c) wurden eluiert und auf photolytische Spaltbarkeit untersucht.

4.3.2 Photospaltung der Oligonukleotidkonjugate

Die gezielte Spaltung des Linkers ist eine entscheidende Verbesserung gegenüber der direkten und der linkergestützten Selektion in Abbildung 4. Es sollte daher untersucht werden, ob RNA-Konjugate durch Bestrahlung selektiv am photochemisch aktiven Baustein gespalten werden können.

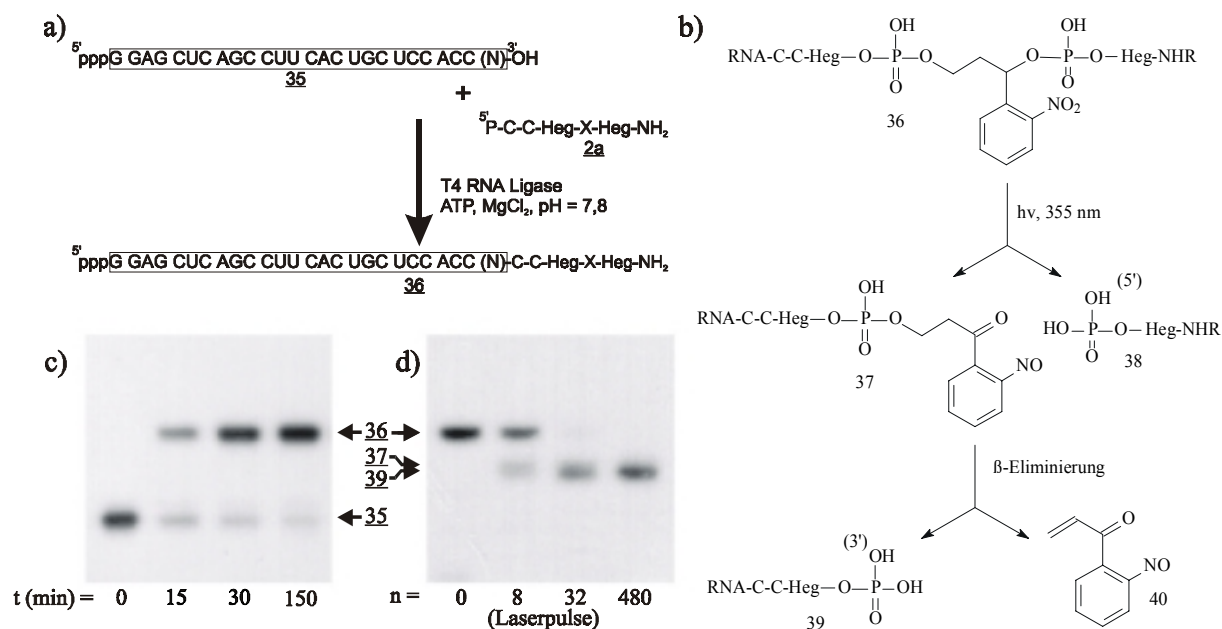


Abb. 17 Photospaltbare RNA-Konjugate: a) Schema der T4-RNA-Ligation eines 25mers an das Dinukleotid **2a**; b) Mechanismus der Photospaltung der *o*-Nitrobenzyleinheit; c) Zeitlicher Verlauf der Ligation des 25mers **35** an das Dinukleotid **2a**; dem Reaktionsansatz wurden nach den angegebenen Zeiten Proben entnommen und auf einem 15% denaturierenden PAA-Gel analysiert d) Autoradiogramm eines 15% denaturierenden PAA-Geles mit Proben einer Photospaltungs-Reaktion von **36** nach Bestrahlung mit n Nd-YAG-Laserpulsen.

Nach photolytischer Anregung reagiert dabei der *o*-Nitrobenzyl-Ester in einer intramolekularen Redoxreaktion zu einem Halbacetal ab, das sehr schnell in die Verbindungen **37** und **38** zerfällt [Pillai 1980]. Letztere kann in einer β -Eliminierung ein *o*-Nitroso-vinylacetophenon **40** abspalten. Eine besondere Eleganz dieses Spaltungsmechanismus ist die Erzeugung intakter 3'- und 5'-Phosphatgruppen, wenn man den

photochemisch aktiven Baustein statt über HEG-Spacer direkt mit Oligonukleotiden verbindet (s. Abb. 17b) [Ordoukhanian & Taylor 1995].

Ein erster Beleg für die prinzipielle Spaltbarkeit der Linker sowie die Identität der Spaltprodukte konnte bereits durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie der Dinukleotide 1-3 bzw. ihrer Derivate 27, 32 und 34 erbracht werden, wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben (vergl. auch Abb. 12a und b). Es sollte nun gezeigt werden, dass diese Spaltung auch im präparativen Maßstab und in Gegenwart von RNA möglich ist.

Daher wurde das in 4.3.1 erhaltene Ligationsprodukt 36 bei pH = 7 mit einem Nd-YAG-Laser (355 nm) in einer Quarzküvette bestrahlt. Um die Photospaltung in Abhängigkeit der Bestrahlung zu verfolgen, wurden nach n = 0, 8, 32, 480 Laserpulsen (10 ns/Puls, 8 Hz, 50 mJ/Puls) Proben entnommen und auf ein 15 % PAA-Gel aufgetragen.

Das Autoradiogramm in Abb. 17d zeigt vor der Bestrahlung (n = 0) nur die Bande des RNA-Konjugates 36, die mit zunehmender Bestrahlung verschwindet. Gleichzeitig treten zwei neue Banden auf, von denen die langsamer (höher) laufende Bande dem primären Photofragment 37 und die schneller (tiefer) laufende Bande dem β -Eliminierungsprodukt 38 zugeordnet werden kann. Durch die Photolyse des unkonjugierten, radioaktiv phosphorylierten Dinukleotides 2b war eine detaillierte Analyse der Photospaltprodukte möglich, die zusätzlich auf eine lichtinduzierte Umwandlung von 37 nach 38 durch β -Eliminierung hindeutet.

Bereits nach 32 Laserpulsen ist das Ausgangsprodukt nicht mehr zu detektieren und auch eine 15fache Überbestrahlung führte zu keinerlei neuen Banden von Nebenprodukten, wie sie etwa für die Photodimerisierung benachbarter Pyrimidinbasen formuliert werden könnten [Blackburn & Gait 1996].

4.3.3 Simulation eines Selektionzyklus

Zur Verwendung in Selektionsexperimenten müssen die Dinukleotidanaloga oder deren Derivate mit den übrigen Schritten des Selektionsschemas kompatibel sein. Insbesondere muss die Ligation mit größeren, randomisierten RNA-Pools gewährleistet und andererseits die Immobilisierung an einer Festphase mit anschließender photolytischer Freisetzung möglich sein. Um die Erweiterung der direkten Selektion durch photospaltbare Linker zu demonstrieren, wurde exemplarisch eine Selektionsrunde durchgeführt:

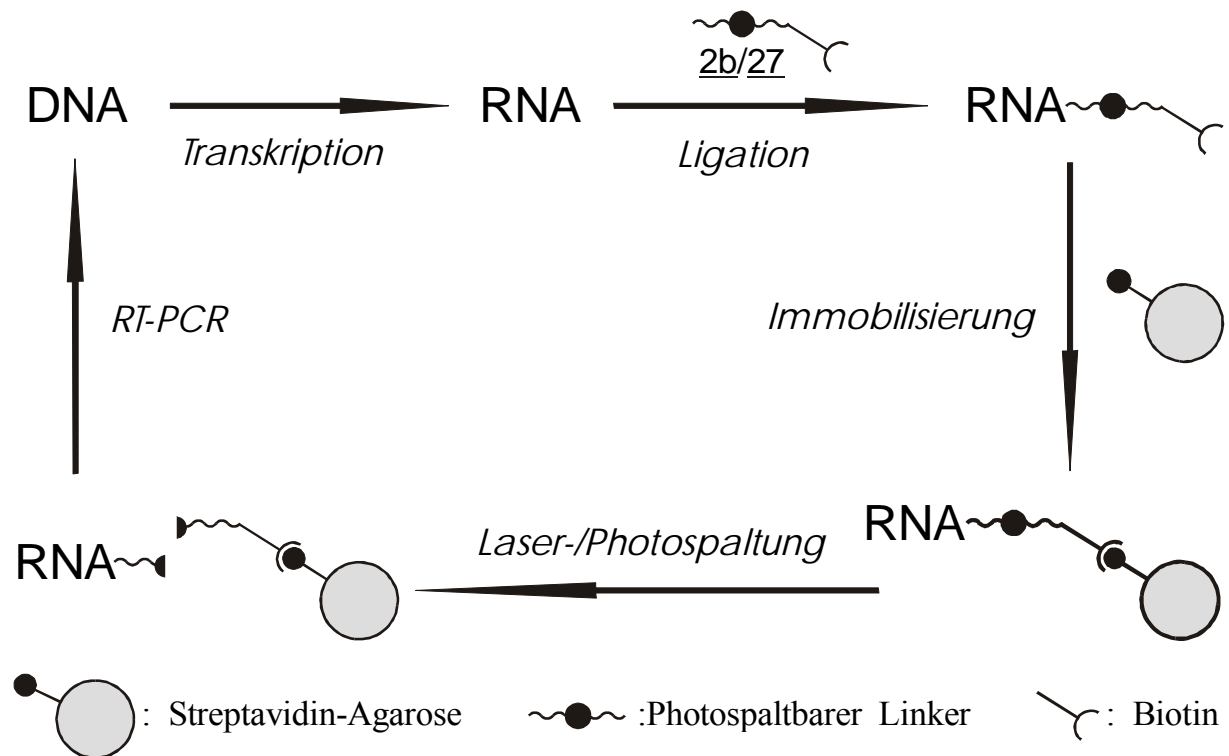


Abb. 18 Simulation eines Selektionszyklus mit photospaltbaren Linkern bzw. Selektion nach Photoredox-ribozymen durch Transkription, Ligation, Immobilisierung, photolytischer Freisetzung und RT-PCR.

Simulation des Selektionszyklus: DNA/RNA-Pool = 72nt randomisiert, Dinukleotidanalogen = 27, Laserspaltung; Photoredoxribozyme: DNA/RNA-Pool= 120nt randomisiert, Dinukleotidanalogen = 2b, Photospaltung (s. Kapitel 4.5).

Da die Reaktionsumsätze speziell in den ersten (unkatalysierten) Selektionsrunden sehr gering und kaum zu detektieren sind, wurde der Reaktionsschritt übergangen und durch ein künstliches Reaktionsprodukt ersetzt.

Dazu wurde zunächst die randomisierte dsDNA in Abb. 18 durch enzymatische Transkription mit Hilfe eines T7 Promotors in einzelsträngige RNA umgeschrieben [Famulok 1994]. Dieser 72 randomisierte Positionen enthaltende RNA Pool wurde nun an das biotinylierte Dinukleotid 27 ligiert und so künstlich eine Situation geschaffen, wie sie nach erfolgreicher Reaktion im Selektionsprozess vorkommt: die RNA ist über den photospaltbaren Linker mit der Ankergruppe Biotin verbunden (vergl. Abb. 5).

Zur effizienten Konjugation der 111 Nukleotide langen RNA mussten die Ligationsbedingungen optimiert werden. Durch einen fünffachen Überschuss an Dinukleotid, Ligation über Nacht und optionaler Zugabe eines 3'-komplementären Oligonukleotides konnte die Ausbeute auf 75% gesteigert werden. Durch die verringerte elektrophoretische Mobilität der Konjugate konnten diese durch PAGE aufgereinigt und von unmodifizierter RNA getrennt werden.

Die RNA-Konjugat-Bibliothek wurde nun mit Streptavidin-Agarose für 30 Minuten auf einem Spinfilter inkubiert, und nach Entfernen der nicht-bindenden RNA Moleküle durch

umfangreiches, denaturierendes Waschen konnten 80% der RNA an der Festphase immobilisiert werden (Abb. 19a). Kontrollexperimente zeigten, dass die unspezifische Adsorption von unmodifizierter RNA unter den gleichen Bedingungen vernachlässigt (<2%) oder durch stringenteres Waschen noch deutlich herabgesetzt werden kann.

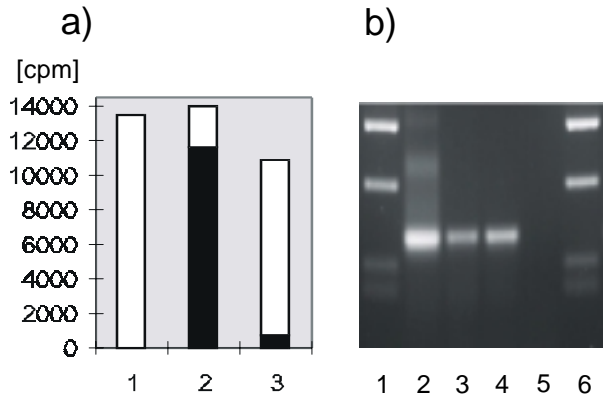


Abb. 19 a) Immobilisierung und photolytische Freisetzung des biotinylierten RNA-Pools; schwarz: immobilisierte RNA; weiß: gelöste RNA; 1: eingesetzte RNA; 2: nach Immobilisierung und Waschung; 3: photolytische Freisetzung der immobilisierten RNA.

b) Agarosegel der RT-PCR Produkte der photolytisch freigesetzten RNA; 1, 6: 100bp DNA-Leiter; 2: DNA-Startpool, der zur T7-Transkription eingesetzt wurde; 3: RT-PCR Produkt eines unmodifizierten RNA-Transkriptes; 4: RT-PCR Amplifizierung der photogespaltene RNA; 5: RT-PCR ohne Templat als negative Kontrolle.

Die mit RNA beladene Festphase wurde anschließend im gleichen Waschpuffer resuspendiert und direkt auf dem Spinfilter von oben mit 480 Laserpulsen bestrahlt, wodurch über 90% der RNA freigesetzt und durch einfaches Zentrifugieren wieder in Lösung gebracht werden konnten. Die restlichen 10% verblieben trotz weiterer Bestrahlung oder extensivem Waschen auf der Festphase (Abb. 19a).

Um zu gewährleisten, dass die so wiedergewonnenen RNA Moleküle nach wie vor intakt und zur Weitergabe in die nächste Selektionsrunde geeignet sind, wurden sie mit reverser Transkription und PCR amplifiziert (Abb. 19b, Bahn 4). Die Vervielfältigung war dieselbe wie in einem Kontrollexperiment, in dem die gleiche Menge unmodifizierter RNA amplifiziert wurde, d.h. die zuvor weder ligiert, immobilisiert noch bestrahlt worden war (Bahn 3). Wie auf dem Agarosegel in Abbildung 19b) zu sehen ist, haben beide PCR-Produkte die volle Länge wie der DNA Ausgangspool in Bahn 2. Durch die negative Kontrolle in Bahn 5 kann die Amplifizierung von Artefakten ausgeschlossen werden.

Der vervielfältigte DNA Pool steht nun zur erneuten Übersetzung in RNA zu Verfügung, sodass die Durchführung mehrerer Selektionsrunden möglich ist.

4.4 Präparation der kombinatorischen Nukleinsäurebibliotheken

Zur Durchführung der Selektionsexperimente musste zunächst der kombinatorische Startpool hergestellt werden.

Dazu wurde der in Abbildung 20 gezeigte ssDNA-Pool mit 120 randomisierten Nukleotiden und zwei flankierenden konstanten Primerbindungsstellen [Famulok 1994] durch chemische Festphasensynthese hergestellt. Für die Synthese der total randomisierten Positionen wurde dabei ein Gemisch aller vier DNA-Phosphoramidite in einem Verhältnis von dA:dC:dG:dT = 3:2,5:2,5:2 eingesetzt. Mit dieser nicht-äquimolaren Zusammensetzung wurde die unterschiedliche Reaktivität der einzelnen Phosphoramidite ausgeglichen und so ein statistisch gleicher Einbau der einzelnen Nukleotide nach dem Zufallsprinzip gewährleistet. Zusätzlich wurde ein zweiter, gedopter DNA-Pool synthetisiert, der zwei bekannte partielle randomisierte Bindungsmotive für die Nukleotide ATP [Sassanfar & Szostak 1993] und NMN [Lauhon & Szostak 1995] enthält. Durch ein Phosphoramidit-Gemisch mit einem 7:1:1:1 Überschuss des jeweiligen Vorzugsnukleotides wurde eine partielle Randomisierung von 30% in den entsprechenden 28nt- bzw. 42nt-langen Bindungsregionen erreicht (kleine Buchstaben in Abb. 20). Falls die entsprechenden Bindungsmotive die Katalyse unterstützen, wären entsprechende Sequenzen statistisch häufiger im kombinatorischen Pool repräsentiert. Andererseits enthalten die 70 gedopten Nukleotidpositionen immer noch durchschnittlich 22 Mutationen, die von der Vorzugssequenz abweichen, sodass andere kombinatorische Lösungen für das Katalyseproblem nicht wesentlich eingeschränkt sind.

Aus den Synthesen im Maßstab 0,2 µmol wurde nach Reinigung durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese eine Menge von 2,3 bzw. 3,3 nmol DNA erhalten.

Bei der chemischen Synthese von DNA-Molekülen dieser Länge (> 100 Nukleotiden) kommt es in nicht unerheblichem Maße zu Nebenreaktionen wie Kettenabbruch oder Depurinierungen. Um dem entgegenzuwirken, wurde das Standard-Syntheseprotokoll in bestimmten Punkten verändert. So wurde während der Synthese der randomisierten Positionen auf den Capping-Schritt verzichtet, der normalerweise die weitere Verlängerung von nicht umgesetzten Oligonukleotid-Strängen verhindert (s. Abb. 10). Dies kann zum Verlust eines Nukleotides führen, was im randomisierten Bereich allerdings toleriert werden kann.

Um Depurinierungen während der sauren Abspaltung der Trityl-Schutzgruppen zu minimieren, wurde die Zeit der Detritylierung um 1/3 verkürzt. Trotz dieser Vorkehrungen war nur ein bestimmter Anteil der synthetisierten DNA als Matrize für die nachfolgende PCR intakt. Um eine Aussage über die Komplexität des amplifizierbaren Pools machen zu können, wurde dieser Anteil zum einen durch PCR mit radioaktiv markiertem Desoxynukleotid und zum anderen durch Verlängerung eines 5'-terminal radioaktiv markierten Primers ermittelt [Bartel & Szostak 1993]. Von der synthetisierten DNA waren ca. 12 % durch die PCR amplifizierbar, was einer Pool-Komplexität von ca. $1,5 \cdot 10^{14}$ bzw. $2,5 \cdot 10^{14}$ Molekülen entspricht.

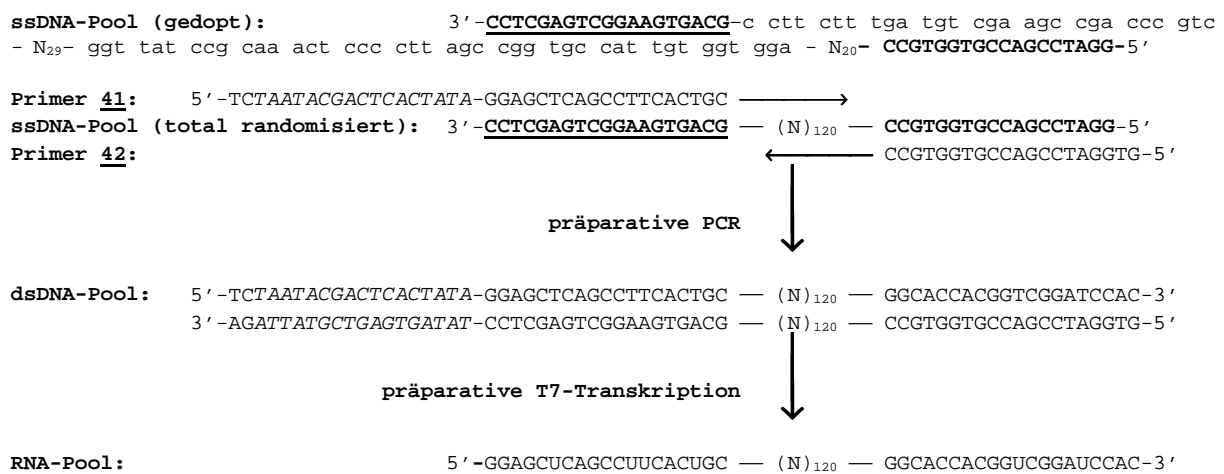


Abbildung 20: Konstruktion der kombinatorischen RNA-Bibliothek.

Der chemisch synthetisierte DNA-Pool mit den gedopten Motiven (kleine Buchstaben) für ATP und NMN bzw. der total randomisierte Pool mit 120 degenerierten Nukleotid-Positionen (N) wurde mit Hilfe der Primer 41 und 42 durch die PCR in dsDNA umgewandelt, um die T7-Promotorregion (kursive Nukleotide) verlängert und amplifiziert. Diese DNA-Matrize wurde in einer Transkriptionsreaktion mit der T7-RNA-Polymerase in einen RNA-Pool umgeschrieben.

Die gesamte chemisch synthetisierte einzelsträngige DNA wurde dann mittels präparativer PCR in doppelsträngige DNA überführt, wobei durch Primer 41 zusätzlich der für die T7-Transkription notwendige T7-Promotor eingeführt wurde. Die Primerkonzentrationen von 41 und 42 wurden dabei um den Faktor fünf erhöht, um der (unproduktiven) Bildung von Heteroduplexen bei den hohen DNA-Konzentrationen der Massen-PCR vorzubeugen [Czerny 1996]. Durch analytische Gelpermeations-Chromatographie wurde eine Vervielfältigung um den Faktor 100 bzw. 40 ermittelt.

Für die anschließende präparative T7-Transkription wurden je 5 Kopien der total randomisierten (1,25 nmol) bzw. der gedopten DNA-Stränge (2,1 nmol) als Matrizen eingesetzt, wobei letztlich 110 RNA-Kopien (90 nmol) jeder einzelnen Nukleinsäuresequenz erhalten wurden. Davon wurden 28 Kopien (22,4 nmol) präparativ an das biotinylierte Dinukleotid 2b ligiert und so die modifizierte RNA-Startbibliothek erzeugt.

4.5 Selektion nach Photoredoxribozymen

Redoxreaktionen gehören zu den essentiellen Biotransformationen des Metabolismus. Insbesondere im Energiehaushalt nehmen Elektronentransferreaktionen eine Schlüsselposition ein, wenn Licht in elektrochemische Energie umgesetzt wird. Ohne Redoxkatalysatoren ist auch die Entwicklung präbiotischer Organismen undenkbar [Bartel & Unrau 1999].

Aus diesen Gründen wurde das in Kapitel 4.3.3 entwickelte Selektionssystem zur Isolierung potentieller Photoredoxribozyme herangezogen. Die zu katalysierende Reaktion ist dabei die zuvor beschriebene, in Abbildung 17b) dargestellte Photospaltung der *o*-Nitrobenzyl-Phosphatbindung durch eine intramolekulare Redoxreaktion. Diese verläuft zwar wie in Abbildung 17d) gezeigt unter Laserbeschuss sehr schnell und quantitativ, nicht aber bei schwächerer Bestrahlung, wie sie unter präbiotischen Bedingungen vorgeherrscht hätte. *In vitro* Selektionen einer Spaltungsreaktion sind technisch leichter zu realisieren als z.B. Bindungsknüpfungen. Jedoch sind auch hier Oligonukleotid-Konjugate nötig, die den zu spaltenden Reaktanten samt Ankergruppe künstlich zur Verfügung stellen. So konnten erfolgreich verschiedene selbstspaltende Nukleinsäuren gewonnen werden, indem Biotin-DNA Konjugate an Streptavidin immobilisiert wurden, um dann die Oligonukleotide zu selektieren, die sich unter den geeigneten Bedingungen, z.B. Zugabe eines benötigten Kofaktors, selbst spalten und damit wieder in Lösung bringen.

Die Selektion nach Ribozymen der Photospaltung wurde nach einer Variation des in Abbildung 18 gezeigten Schemas durchgeführt. Ausgehend von dem in Kapitel 4.4 hergestellten RNA-Pool mit 120 randomisierten Positionen erwerben zunächst alle RNA Moleküle durch Ligation mit dem Dinukleotidanalogen **2b** ein photospaltbares *o*-Nitrobenzylphosphat und ein Biotin als Ankergruppe, das eine Immobilisierung der Konjugate ermöglicht. Die Bestrahlung der immobilisierten RNA erfolgt nun aber statt mit dem Laser mit einer schwachen Neon- bzw. Quecksilberdampf-Lampe, sodass nur ein Bruchteil (ca. 0,1%) der *o*-Nitrobenzyleinheiten gespalten werden. Konjugate mit katalytisch aktiver RNA würden dagegen weit effizienter gespalten und daher systematisch angereichert. Die Selektionsmethode hat den zusätzlichen Vorteil, dass die zeitaufwendige Gelreinigung der Selektionsprodukte überflüssig wird, da die Aufreinigung affinitätschromatographisch über die Immobilisierung und anschließende Waschung erfolgen kann. Da der zur Spaltung fehlende „Kofaktor“ Licht ist, müssen die Schritte von der Ligation bis zur Bestrahlung

allerdings in der Dunkelkammer durchgeführt werden, um eine vorzeitige Spaltung und damit den Verlust der aktivsten Spezies zu vermeiden. Um die Anreicherung von RNA spaltenden Ribozymen zu unterdrücken, wurde vor der Bestrahlung eine Gegenselektion durchgeführt, indem die immobilisierte RNA für eine Stunde mit Magnesium-haltigem Selektionspuffer inkubiert und anschließend von den selbstgespaltenen Spezies durch mehrfaches Waschen getrennt wurde.

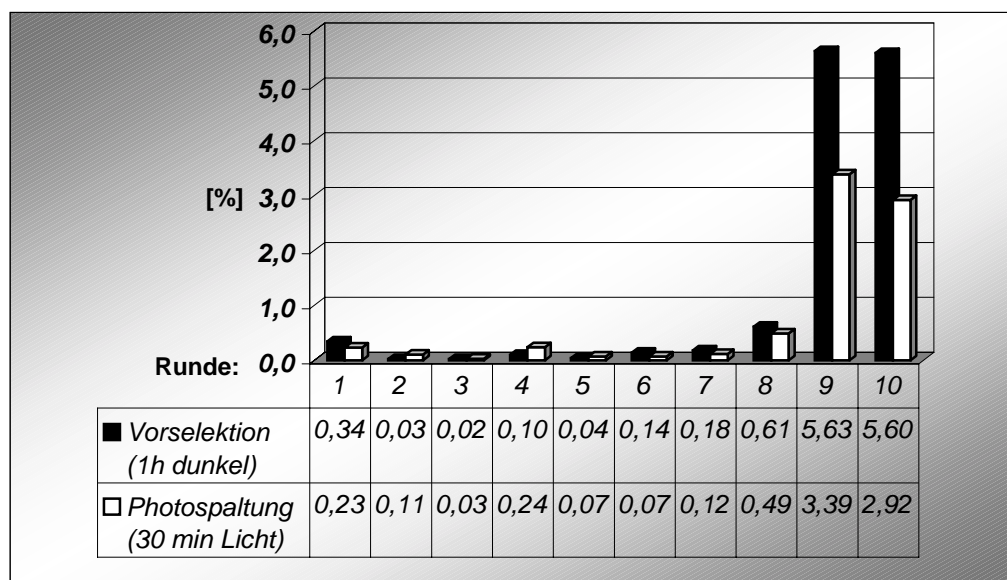
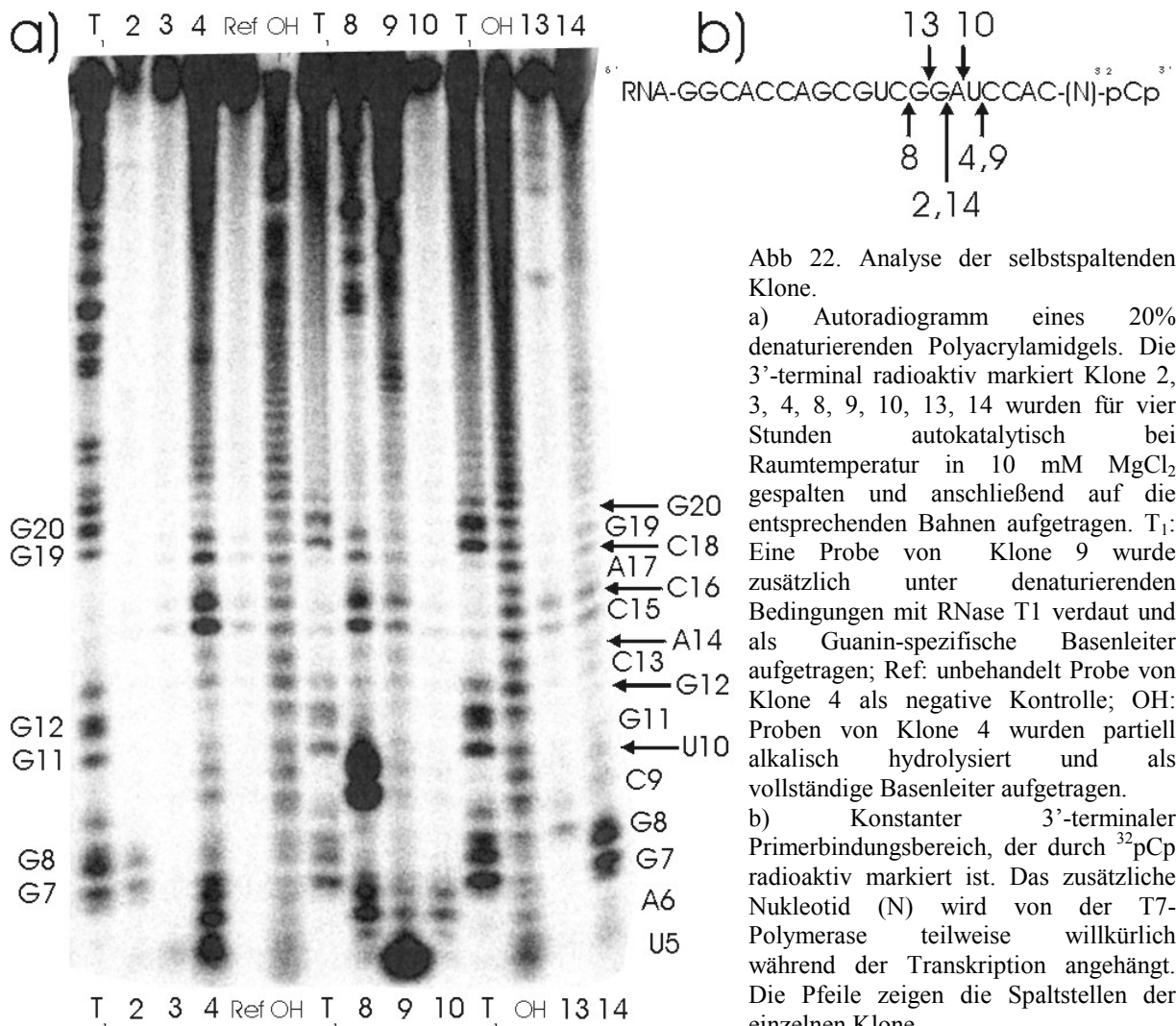


Abb. 21 Selektion nach Photoredoxribozymen. Die dargestellten Werte entsprechen der Fraktion abgespaltener Konjugate bezogen auf die immobilisierte RNA nach denaturierender Waschung in Prozenten [%].

Der Verlauf der Selektion ist in Abb.21 gezeigt, wo der Anteil der selbstgespaltenen RNA-Konjugate in jeder Runde aufgetragen ist. Ab Runde 9 erhöht sich die Fraktion der freigesetzten RNA nach Belichtung von ca. 0,12% auf 3%, was im Mittel einer 25fachen Reaktionsbeschleunigung entspricht. Ein entsprechender Anstieg von eluierter RNA während des Gegenselektionsschrittes als Kontrollexperiment zeigte jedoch, dass für die beobachtete Spaltung keine Bestrahlung nötig ist. Eine gelelektrophoretische Analyse der Spaltprodukte von RNA nach der 10. Runde zeigt, dass sich die RNA-Moleküle während der Freisetzung von der Festphase signifikant verkürzen, was nicht mehr mit dem Verlust des photoabspaltbaren Linkerfragmentes p-Heg-Heg-TegBio von 2b erklärt werden kann. Zusätzliche Experimente mit 3'-radioaktiv markierter, unmodifizierter RNA demonstrierten, dass zu der Spaltung weder die *o*-Nitrobenzyleinheit noch das Biotin nötig waren. Statt dessen wurden 3'-terminale RNA-Fragmente von ca. 4-8 Nukleotiden Länge beobachtet, die nur durch eine RNA-Spaltung im 3'-Primerbereich entstanden sein können. Es kann sich bei dem in Abbildung 21 beobachteten Anstieg also nicht um die gesuchte Photospaltungsaktivität handeln.

Um die katalytische Aktivität der selektierten RNA-Moleküle näher zu untersuchen und um zu klären, wie diese angereichert werden konnten, wurden die Sequenzen des Pools nach Runde 10 zunächst durch Klonierung vereinzelt und durch parallele PCR und T7-Transkription im Mikrotiterplattenformat amplifiziert. Nach radioaktiver 3'-Markierung durch Ligation mit ^{32}P -pCp wurden die einzelnen Spezies individuell auf Selbstspaltung getestet und ihre Spaltprodukte gelchromatographisch wie in Abbildung 22a) gezeigt analysiert.



Durch Vergleich mit entsprechenden RNA-Sequenzierleitern nach partieller, alkalischer Hydrolyse (Bahnen OH) bzw. nach einem für Guanin spezifischen RNase T_1 Verdau (Bahnen T_1) konnten die jeweiligen Spaltstellen identifiziert werden [Knapp 1989]. Die 3'-terminalen RNA-Fragmente treten dabei immer als Doppelbanden auf, da es wegen des partiellen Einbaus eines zusätzlichen Nukleotides am 3'-Ende während der T7-Transkription zu einer 3'-terminalen Endheterogenität kommt [Milligan *et al.* 1987]. Mit einer vor kurzem beschriebenen, Matrizen-abhängigen 3'-Markierung durch das Klenow-Fragment ließen sich

diese Doppelbanden vermeiden [Huang & Szostak 1996]. Wie in Abbildung 22b) zu sehen, spalten die sieben aktivsten Klone im Primerbindungsbereich zwischen den Cytidinen C₄ und C₉.

Bei der in Abbildung 21 gezeigten Selektion könnten gegebenenfalls vorhandene Photoredoxribozyme von der RNA-Selbstspaltungsaktivität überlagert gewesen sein, sodass diese nicht angereichert werden konnten. Die Selektion wurde daher unter stringenteren Bedingungen wiederholt. Durch eine Herabsetzung der Bestrahlungsdauer auf fünf Minuten wurde die Zeit, die zur intramolekularen Selbstspaltung zur Verfügung steht, deutlich verkürzt, während durch erhöhte Strahlungsintensität mit einer Quecksilberdampf-Lampe die photolytische Hintergrundreaktion konstant bei ca. 0,1% gehalten wurde. So konnte die Anreicherung von RNA spaltenden Ribozymen verhindert werden. Nach sechs Selektionsrunden wurde eine vierfache Beschleunigung der Photospaltung beobachtet, was durch Kontrollexperimente eindeutig auf Lichteinfluss zurückzuführen war. Jedoch konnte trotz zusätzlicher Mutagenese [Fromant *et al.* 1995] und verschärfter Selektionsbedingungen innerhalb von zehn Selektionsrunden die Katalyse nicht weiter gesteigert werden.

4.6 Selektion nach Desoxyribozymen

[Hausch & Jäschke 2000b]

4.6.1 Synthese modifizierter Primer-Derivate

Wegen der erhöhten Stabilität und dem geringeren synthetischen Aufwand von DNA gegenüber RNA ist es von Interesse, die Selektionsstrategie der photospaltbaren Linker auch auf Desoxyribozyme zu übertragen. Es mussten daher zunächst Methoden der DNA-Modifizierung für die Herstellung entsprechender DNA-Konjugat-Bibliotheken entwickelt werden, die anschließend in einem Selektionsexperiment einzusetzen waren.

Im allgemeinen wird DNA mittels kurzer synthetischer Primer vervielfältigt, die an eine komplementäre Primerbindungsstelle der einzelsträngigen Ziel-DNA hybridisieren und zur vollständigen Doppelhelix verlängert werden. Die dabei verwendeten DNA-Polymerasen sind bei der Erkennung der Primer tolerant und akzeptieren auch unnatürliche Modifikationen im 5'-Bereich (die Verlängerung startet am 3'-Ende). In Analogie zu den derivatisierten Dinukleotiden 1-3 in Abbildung 6 wurden daher die modifizierten Primer 45 und 47 synthetisiert, die zwei Polyethylenglykol-Einheiten zur freien Orientierung der Reaktanten sowie die *o*-Nitrobenzylgruppe als Photospaltstelle beinhalten. Wie in Abbildung 23 gezeigt,

enthält Primer 47 zudem einen 5'-terminalen Aminohexyl-Rest, der die Ankopplung verschiedener NHS-aktivierter Reaktanten nach den in Kapitel 4.2.2 entwickelten Methoden erlaubt. Im Primer-Derivat 45 wurde Anthracen als gewünschter Reaktant dagegen direkt während der Automaten-synthese eingeführt. Das dazu nötige Phosphoramidit 44 wurde durch Umsetzung von Anthracen-PEG 43 mit dem Phosphorylierungsmittel 8 erhalten [Seelig & Jäschke 1997]. Eine chromatographische Aufreinigung war nicht notwendig, sodass das Rohprodukt von 44 nach Extraktion mit Wasser und anschließender gründlicher Trocknung der organischen Phase direkt zur automatisierten Synthese von 45 eingesetzt wurde.

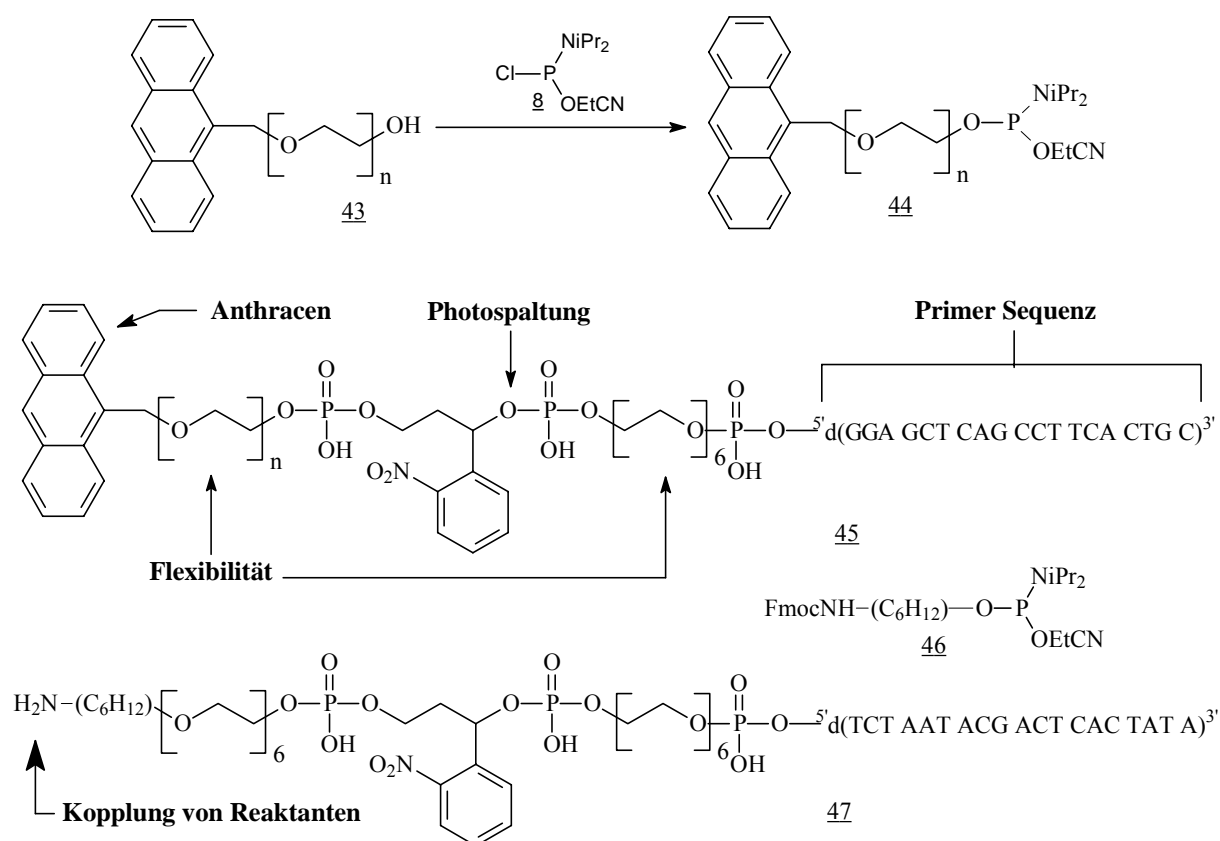
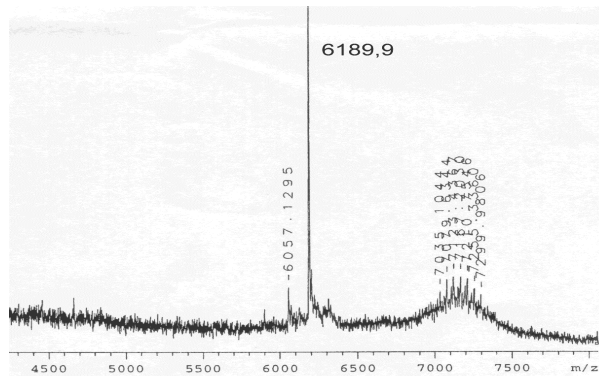


Abb. 23 Aufbau der photosplittbaren Primerderivate 45 und 47 sowie die Synthese des Anthracen-Phosphoramidites 44.

Die Primer-Derivate 45 und 47 wurden mit einem DNA-Standardprogramm im 15 bzw. 1,3 μ mol Maßstab unter Verwendung der Standard-DNA Phosphoramidite sowie der in Abbildung 9 und Abbildung 23 gezeigten Bausteine zusammengesetzt. Dabei wurde die primäre Aminogruppe des Primer-Derivates 47 durch abschließende Kopplung des kommerziellen Aminomodifiers 46 eingeführt. Nach Entschützung mit 33% Ammoniak wurden die Rohprodukte durch HPLC mit 5% bzw. 2% Gesamtausbeute gereinigt und anschließend durch MALDI-TOF charakterisiert (s. Abb. 24a). Für den aminomodifizierten Primer 47 wurden dabei sowohl der erwartete Molekülmassenpeak bei $m/z = 6859,1$ g/mol als

auch die entsprechenden Photofragmente bei $m/z = 6155,8$ und $706,0$ g/mol gefunden (berechnet: $[M+H]^+ = 6858,7; 6156,1; 703,1$).

a)



b)

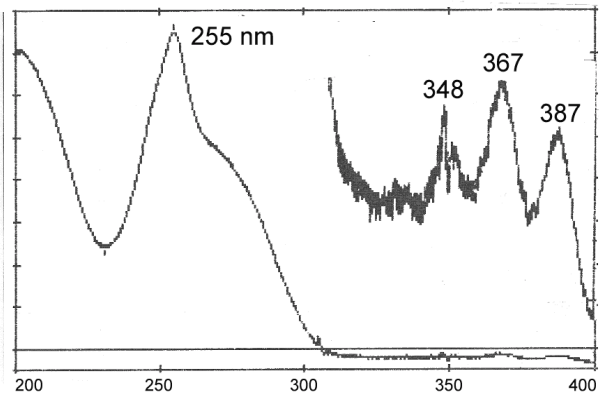


Abb. 24 Charakterisierung des Primerderivats 45: a) UV-MALDI-TOF Massenspektrum; b) UV-Spektrum mit Vergrößerung von 310-400 nm.

Im Fall des Primers 45 führt die variable Länge des PEG-Spacers zu einer typischen polydispersen Molmassenverteilung, deren Peaks sich jeweils um die 44 Masseneinheiten einer Ethylenglykolgruppe unterscheiden. Im MALDI-TOF-Spektrum in Abbildung 24a) sind die erwarteten Signale bei $m/z = 7035,1; 7079,6; 7123,4; 7167,2; 7210,7; 7255,3; 7300,0$ g/mol (berechnet: $[M+H]^+ = 7036,2 + n \times 44$ g/mol) sowie das monodisperse Signal des Nukleinsäure-enthaltenen Photofragmentes bei $m/z = 6189,9$ g/mol (berechnet: $[M+H]^+ = 6190,0$ g/mol) zu erkennen. Die Analyse des Primer-Konjugates 45 wird zudem durch die typische Absorption und die charakteristische Fluoreszenz des gekoppelten Anthracens erleichtert. Das entsprechende UV-Spektrum des Produktes in Abbildung 24b) kann als additives Spektrum von Anthracen (Peaks bei $\lambda = 255, 348, 367, 387$ nm) und des DNA Primers (breite Schulter von $\lambda = 260-300$ nm) interpretiert werden [Seelig & Jäschke 1999c].

4.6.2 Herstellung einzelsträngiger DNA-Konjugat Bibliotheken

Nach der erfolgreichen Synthese der Primer-Derivate 45 und 47 mussten diese nun in randomisierte DNA-Bibliotheken eingebaut werden. Ein inhärentes Problem bei der Herstellung von DNA durch Polymerasekettenreaktion ist dabei die Generierung komplementärer Doppelstränge. Für die *in vitro* Selektion werden jedoch Einzelstränge benötigt, da nur diese sich in die katalytisch aktive tertiäre Struktur falten können. Der in stöchiometrischen Mengen gebildete Gegenstrang muss daher vor jedem Reaktionsschritt abgetrennt werden. Da dieser fast die gleiche Länge wie der gewünschte „Sense“-Strang hat, ist dies nicht ohne weiteres durch PAGE-Chromatographie möglich. Es werden daher

modifizierte Gegenstrang-Primer verwendet, die eine Abtrennung des entsprechenden „Antisense“-Stranges erlauben.

In ersten Versuchen wurde die Polymerasekettenreaktion daher wie in Abbildung 25a) mit dem Anthracen-gekoppelten Primer 45 und einem biotinylierten Gegenprimer 48 durchgeführt. Die Ankergruppe Biotin erlaubt eine Immobilisierung der doppelsträngigen PCR-Produkte an Streptavidin-Agarose und anschließende Rückgewinnung der gewünschten Anthracen-Konjugate durch denaturierendes Waschen [Bock *et al.* 1992]. Da diese Aufreinigung jedoch nicht vollständig ist und die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung auch für die Immobilisierung der Reaktionsprodukte herangezogen wird, führen selbst geringe Spuren der PCR-Produkte von 48 zu Komplikationen im Selektionsschritt. Da diese Konjugate 49 ebenfalls dem Selektionskriterium entsprechen, ist die Strategie der biotinylierten Gegenprimer hier nicht mit dem restlichen Selektionsschema kompatibel (vergl. Abb. 26a).

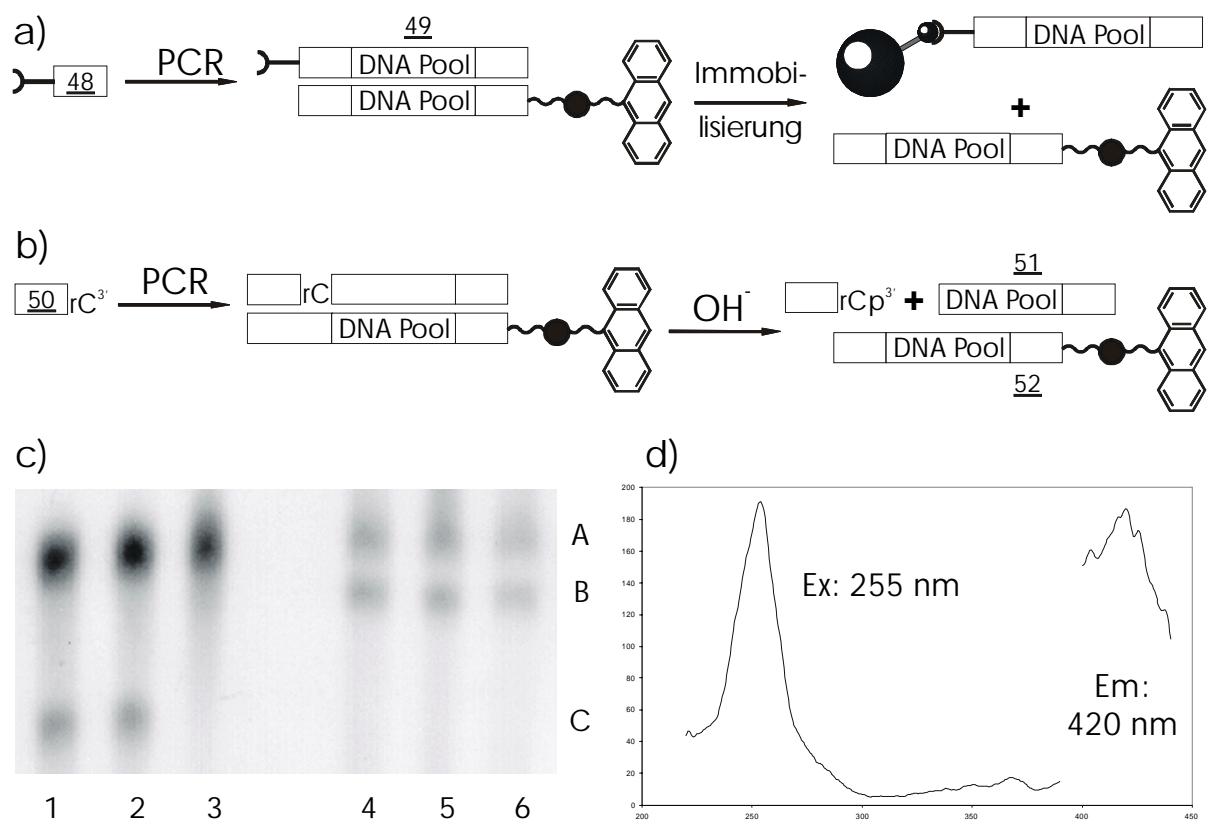


Abb. 25 Präparation und Analyse von ssDNA-Konjugaten. a) Strategie der biotinylierten Gegenprimer; b) Strategie der alkalisch abspaltbaren Riboprimers; c) Autoradiogramm eines denaturierenden, 5% PAA-Geles der PCR-Produkte mit den angegebenen Gegenprimern nach alkalischer Hydrolyse und Ethanol-Fällung; 1: 50, 95°C, 20 Minuten; 2: 50, 37°C, über Nacht; 3: 50, ohne 0,2M NaOH; 4: 42, 95°C, 20 Minuten; 2: 42, 37°C, über Nacht; 3: 42, ohne 0,2M NaOH; d) Fluoreszenzspektrum eines 157nt DNA-Anthracen Konjugates 52.

Es wurde daher nach Standardmethoden der modifizierte Primer 50 synthetisiert, der am 3'-Ende eine zusätzliche 2'-Hydroxylgruppe trägt. Nach Einbau in den Gegenstrang führt dies zu einer einzelnen Ribonukleotid-Bindung, die anschließend wie in Abbildung 25b) im

alkalischen Milieu selektiv gespalten werden kann [Silveira & Orgel 1995]. Abbildung 25c) zeigt eine entsprechende gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte unter Verwendung des Anthracen-Primers 45 und des Riboprimer 50 (Bahnen 1-3) oder des unmodifizierten, reinen DNA Gegenprimers 42 (Bahnen 4-6). Die Reaktionsansätze wurden dabei nach der PCR entweder für 20 Minuten bei 95°C (Bahnen 1 und 4) oder über Nacht bei 37°C in 0,2M NaOH hydrolysiert (Bahnen 2 und 5). In den Bahnen 3 und 6 sind unbehandelte PCR Proben als Kontrollen aufgetragen. Wie zu erkennen, ist der Ribo-modifizierte Gegenstrang schon nach 20 Minuten vollständig hydrolysiert (Bande C, entspricht 51), während sowohl das Anthracen-Konjugat 52 (Bande A) als auch der unmodifizierte DNA-Gegenstrang (Bande B) unverändert bleiben. In Abbildung 25c) wird zusätzlich deutlich, dass durch die 3'-Ribonkleotid-Modifikation die Verlängerungseffizienz des Gegenprimers 50 abnimmt, was zu asymmetrischer Amplifikation und Überproduktion des gewünschten Anthracen-konjugierten DNA-Stranges 52 führt. Dieser kann aus dem Gel eluiert und mit potentiellen Reaktanten umgesetzt werden.

Zur Charakterisierung der so präparierten DNA-Konjugate kann das Anthracen als spezifische Fluoreszenzsonde herangezogen werden. In einem typischen Fluoreszenzspektrum einer einzelsträngigen Anthracen-DNA Bibliothek sind in Abbildung 25d) neben dem Anregungsmaximum bei 255 nm zusätzliche Nebenabsorptionen zwischen 350 und 390 nm zu erkennen. Charakteristisch ist ebenfalls die Emission um 420 nm.

4.6.3 Selektion nach DNA Diels-Alderasen

Nachdem die Herstellung von photospaltbaren DNA-Reaktant Bibliotheken gezeigt worden war, sollten diese nun am speziellen Beispiel einer Diels-Alder Reaktion eingesetzt werden. Bei dieser für die organische Chemie sehr wichtigen synthetischen Reaktion kann das Anthracen als Dien mit Dienophilen wie z.B. Maleinimid in einer 4+2 Cycloreaktion reagieren. Für diese Reaktion sollten nun aus dem in Kapitel 4.4 beschriebenen DNA-Pool mit 120 randomisierten Positionen Katalysatoren isoliert werden (s. Abb. 20). Da aus vorangegangenen Selektionsexperimenten bereits entsprechende Ribozyme bekannt waren, deren katalytisches Zentrum auf wenige konservierte Ribonukleotide innerhalb einer von variablen Helixstämmen eingefassten Blase zurückgeführt werden konnte, wurde parallel eine Selektion mit dem in Abbildung 26b) vorgegebenen Strukturmotiv durchgeführt [Seelig 1999a]. Hierbei entsprechen die fetten Buchstaben dem Anthracen-Konjugat 45, die unterstrichenen Buchstaben der Primerbindungsstelle für den Riboprimmer 50 und die grau

300µl Maßstab durchgeführt und die Primer sowie die Polymerase-Konzentration um das fünffache erhöht.

Nach der Vervielfältigung wurde der Gegenstrang für 30 Minuten alkalisch hydrolysiert, mit Ethanol gefällt und wie in Abbildung 25c) gelelektrophoretisch abgetrennt. Die gereinigten einzelsträngigen Anthracen-DNA Konjugate wurden nun für eine Stunde mit dem freien Reaktionspartner Maleinimidobiotin 53 inkubiert. Die Konzentrationen mit ca. 0,5µM für das DNA-Konjugat und 25µM für das Maleinimid waren dabei so gewählt, dass ein Umsatz zwar noch klar bei 0,1-0,2 % nachweisbar war, aber auch eine effektive Anreicherung potentieller Desoxyribozyme ermöglichte. Nach der Reaktion wurde überschüssiges Maleinimid durch zweifache Ethanolpräzipitation entfernt und das Reaktionsprodukt an Streptavidin auf einem Spinfilter immobilisiert. Durch denaturierendes Waschen mit 200 Säulenvolumina wurde der Überschuss an nicht reagierten Konjugaten entfernt, wobei der beobachtete Anteil immobilisierter DNA dem unabhängig bestimmten Umsatz einer Diels-Alder-Reaktion mit Anthracen unter diesen Bedingungen entspricht [Seelig & Jäschke 1999b].

Die so selektierten DNA Moleküle wurden nun entweder als Streptavidin-Agarose Konjugate in die nächste Polymerasekettenreaktion eingesetzt und somit direkt von der festen Phase vervielfältigt, oder resuspendiert in Waschpuffer durch Laserbestrahlung freigesetzt und nach Ethanolfällung als gelöste Template in die PCR eingesetzt.

Der Verlauf der Selektion wurde durch den Anteil der immobilisierten, d.h. reagierten Anthracen-DNA Konjugate verfolgt und ist in Abbildung 26c) tabellarisch gezeigt. Weder für den kurzen noch für den langen Pool konnte ein Anstieg der immobilisierten Fraktion beobachtet werden, der auf eine Anreicherung der gesuchten Diels-Alder Katalysatoren hinweisen würde. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass das Konzept der photospaltbaren Linker auch auf DNA Selektionen übertragen werden kann. Die Reaktionsprodukte der DNA-Konjugate können durch den Erwerb einer Ankergruppe immobilisiert und durch Laserbestrahlung wie z.B. in Runde 6 des 120nt Pools mit 76% wieder in Lösung gebracht werden. Es ist also auch bei DNA Selektion eine Unterdrückung von Nebenreaktionen durch eine regioselektive Photospaltung möglich.