4 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Interferenzanalyse auf Grundlage der chemischen Festphasensynthese von Oligonukleotiden. Das neue Verfahren soll es ermöglichen, verschiedene essentielle funktionelle Gruppen eines RNA-Moleküls zu identifizieren. Die Basis des neuen Interferenzverfahrens bilden 3'-Phosphorothiolate. Bei 3'-Phosphorothiolaten ist das 3'-Brückensauerstoffatom gegen ein Schwefelatom substituiert. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, daß diese Modifikation keinen signifikanten Einfluß auf die Struktur und Funktion eines RNA-Moleküls hat, da das 3'-Sauerstoffatom nicht an der Ausbildung von Wechselwirkungen beteiligt ist, die für die Struktur oder Funktion notwendig sind. Darüberhinaus soll die Phosphor-Schwefel-Bindung selektiv und quantitativ in Gegenwart von Silbernitrat spaltbar sein^[40]. Diese Eigenschaften könnten die 3'-Phosphorothiolate zu einem idealen Marker (*tag*) für Interferenzanalysen machen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lassen sich in zwei Schwerpunkte einteilen: Zunächst wurden der Einbau einer 3'-Phosphorothiolat-Bindung in ein Oligonukleotid und die Spaltbarkeit der Phosphor-Schwefel-Bindung durch Silber untersucht. Hierfür wurde ein entsprechend thiomodifiziertes Ribo-Phosphoramidit nach Literaturvorschriften synthetisiert^[54, 55] und in ein Oligonukleotid eingebaut. Für Modifikationsinterferenzanalysen ist es notwendig, daß die zu untersuchenden RNA-Moleküle im statistischen Mittel nur eine Modifikation aufweisen. Daher galt es, Synthesebedingungen zu finden, mit denen partiell 3'-phosphorothiolat-modifizierte Oligomere erhalten werden, wie sie für die Interferenzanalyse benötigt werden.

Als Modellsystem zur Entwicklung des neuen Interferenzverfahrens wurde das Hammerhead-Ribozym gewählt, da es sich hierbei um ein gut charakterisiertes System handelt und die Wichtigkeit der funktionellen Gruppen für die Hammerhead-Spaltung beschrieben wurde^[9]. Die Wahl der auf einen Interferenzeffekt hin zu untersuchenden funktionellen Gruppe fiel auf die 2'-Hydroxylgruppe des Uridins. Im konservierten Bereich des Hammerhead-Ribozyms befinden sich drei Uridine, für die der Effekt der Deletion der 2'-Hydroxylgruppe bereits beschrieben wurde^[65-68]. Das Hammerhead-Ribozym wurde so gewählt, daß alle drei Uridine im Substratstrang positioniert sind. Für diese Untersuchungen wurde das benötigte 3'-thiolatmarkierte 2'-Desoxy-Phosphoramidit nach Literaturangaben synthetisiert^[40, 69] und in den Hammerhead-Substratstrang partiell eingebaut. Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Entwicklung des neuen Verfahrens. Es wurden Kontrollen durchgeführt, um den Einfluß, den die 3'-Phosphorothiolatbindung auf die Funktion eines Oligonukleotids hat, zu untersuchen. Im Anschluß wurde mit partiell 2'-desoxy-3'-phosphorothiolat-modifizierten Substratsträngen der Interferenzassay durchgeführt. Die für die Hammerhead-Aktivität essentiellen 2'-Hydroxylgruppen konnten identifiziert werden. Die Ergebnisse der Interferenzanalyse konnten durch singuläre Desoxymodifikationen bestätigt werden.

4.1 Synthese der thiomodifizierten Amidite

3'-*S*-Phosphorothiolat-modifizierte Oligonukleotide bei denen das 3'-Brückensauerstoffatom der Phosphordiesterbindung gegen ein Schwefelatom substituiert wurde, sind nützliche Analoga für die Untersuchung der Chemie von Nukleinsäuren. Sie wurden bereits erfolgreich für die Untersuchung der Rolle von Metallionen in der von RNA oder Ribonukleoproteinen katalysierten Phosphoresterübertragung eingesetzt ^[70-73].

Die Synthese von 3'-*S*-Phosphorothiolat-Internukleotidverbindungen wurde 1988 erstmals beschrieben^[37]. Die Einführung der Phosphorothiolatbindung erfolgte mit der Phosphoramiditmethode zuerst in Lösung in ein DNA-Dinukleotid und später mittels Festphasensynthese in ein DNA-Oligonukleotid^[72]. Neben der Phosphoramiditmethode wurden auch Synthesen über die Michaelis-Arbusov-Reaktion^[74] und die Phosphittriestermethode^[75, 76] durchgeführt. Der Synthese der DNA- bzw. 2'-Desoxy-amidite^[56, 71, 73] folgte einige Jahre später die Synthese der entsprechenden RNA-Amidite^[54].

Da die 3'-Phosphorothiolat-Bindung als Marker für eine zweite Modifikation dienen soll, wurden zwei Amidite synthetisiert. 2'-(*tert*.-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxy-3'-thiouridin-3'-*S*-(2-cyanoethyl-*N*,*N*-diisopropylphosphoramidit) (<u>11</u>) diente als Kontrollverbindung, um zu zeigen, daß die 3'-Phosphorothiolat-Bindung keinen Einfluß auf die katalytische Aktivität des Hammerhead-Ribozyms hat. Die Synthese des Amidits (<u>11</u>) erfolgte nach Literaturangaben (Abb.12)^[54, 55]. Das zweite Amidit, das synthetisiert wurde, trägt neben der 3'-Thiomodifikation die zusätzliche 2'-Desoxy-Modifikation, die mit der Interferenzanalyse untersucht werden sollte. Die Synthese des 5'-O-(4-Monomethoxytrityl)-3'-desoxy-3'-thiouridin-3'-S-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit)s (<u>19</u>) wurde in wenigen Stufen nach Literaturangaben durchgeführt (Abb.13)^[40, 69].



Abbildung 12: Syntheseschema von 2'-(tert.-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxy-3'-thiouridin-3'-S-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit) (<u>11</u>)^[54]. Tol = Toluoyl-, Tf = Triflat-, DMAP = Dimethylaminopyridin, Bz = Benzoyl-, DMF = Dimethylformamid, Py = Pyridin, TMS = Trimethylsilyl-, Ac = Acetyl-, DMT = Dimethoxytrityl-, TBDMS = *tert*.-Butyltrimethylsilyl-, DIPEA = Diisopropylethylamin, NMI = *N*-Methylimidazol.

Ausgehend von kommerziell erhältlicher 1',2'-O-Isopropyliden-a-D-xylofuranose (1), die mit 4-Methylbenzoylchlorid an der 5'-Hydroxylgruppe geschützt wurde, wurde die freie 3'-Hydroxylgruppe von 1',2'-O-Isopropyliden-5'-O-(4-methylbenzoyl)-a-D-xylofuranose (2) als Triflat in eine Abgangsgruppe, die eine S_N -2-Reaktion erlaubt, konvertiert. Anschließend wurde das Schwefelatom von Verbindung (3) durch Substitution des Triflats gegen ein Thiobenzoat eingeführt. Als Konkurrenzreaktion zur S_N-2-Reaktion trat hier die Eliminierung auf, die zur Bildung einer Doppelbindung führte. Nach Entfernen der 2',3'-Isopropylidenschutzgruppe $(\mathbf{3})$ sauren Bedingungen mit Ameisensäure wurde von unter 1',2'-O-Isopropyliden-3'-desoxy-3'-S-thiobenzoyl-5'-O-tolouyl-a-D-ribofuranose (4) erhalten. Im Anschluß wurde die Ribose sofort acyliert (5), die in Form zweier Anomere vorlag. Persilvliertes Uracil (zur Aktivierung von C1) wurde unter Vorbrüggen-Bedingungen mit der acylierten Ribose ($\underline{6}$) unter Erhalt von ($\underline{7}$) glykosyliert. Im nächsten Schritt wurde die 5'-Hydroxylschutzgruppe von 2'-O-Acetyl-3'-desoxy-3'-S-thiobenzoyl-5'-O-toluoyluridin (7)

unter basischen Bedingung mit Natriummethanolat entfernt und am Schwefelatom wurde mit Schutzgruppenwechsel vorgenommen. 2,2'-Pyridyldisulfid ein Der Schutz des Schwefelatoms in Form eines Disulfids verhinderte potentielle Probleme, die von der Nukleophilie und dem Redoxpotential des Schwefels herrühren könnten. 3'-Desoxy-3'-S-(pyridyl-2-disulfanyl)uridin (8) hatte den Vorteil gegenüber den anderen drei Nukleosiden, daß keine Schutzgruppen für die Aminofunktionalitäten an den Basen benötigt wurden. Im folgenden Syntheseschritt wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zum Schutz der freien 5'-Hydroxylgruppe verwendet ($\underline{9}$). Im Anschluß erfolgte die Veretherung der freien 2'-Hydroxylgruppe mit tert.-Butyldimethylsilylchlorid unter Standardbedingungen. Die Ausbeuten waren im Vergleich zu den Silylierungen der Standardamidite schlechter, was an der sterisch hindernden 3'-Schutzgruppe liegen kann. Ein großer Überschuß an Silylierungmittel und das Einengen der Reaktionsmischung unter wasserfreien Bedingungen erhöhte die Ausbeuten. Nach Reduktion der Disulfidbindung mit DTT wurde das 3'-thiomodifizierte Nukleosid 2'-(tert.-Butyldimethylsilyl)-3'-desoxy-3'-thio-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)uridin (10) erhalten. Hierbei war darauf zu achten, daß das Nukleosid unter sauerstoffreier Atmosphäre gelagert und umgesetzt wurde. Die Umsetzung zum Endprodukt 2'-(tert.-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxy-3'-thiouridin-3'-S-(2cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit) (<u>11</u>) erfolgte unter Standardbedingungen^[55].

Das zweite Amidit, das synthetisiert wurde, trägt neben der 3'-Thiomodifikation die zusätzliche 2'-Desoxy-Modifikation, die mit der Interferenzanalyse untersucht werden sollte. Die Synthese des 5'-O-(4-Monomethoxytrityl)-3'-desoxy-3'-thiouridin-3'-S-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit)s (19) wurde in wenigen Stufen nach Literaturangaben durchgeführt (Abb.13)^[40, 69]. Ausgehend von kommerziell erhältlichem 2'-Desoxyuridin wurde im ersten Syntheseschritt die freie 5'-Hydroxylgruppe mit 4-O-Monomethoxytritylchlorid geschützt (13). Durch zweifache Waldenumkehr am Kohlenstoffatom 3 mittels zweifacher Mesylierung der freien 3'-Hydroxylgruppe wurde unter Rückerhalt der Konfiguration ein thiobenzoatgeschütztes Schwefelatom substituiert (14-15-16-17). Die Benzoylgruppe am 5'-O-4-Monomethoxytriyl-2'3'-didesoxy-3'-thiobenzoyl-uridin (17)sauerstoffreien wurde und stark alkalischen Bedingungen entfernt. unter 5'-O-4-Monomethoxytriyl-2'3'-didesoxy-3'-thio-uridin (18) neigte in hohem Maße zur Dimerisierung, die nicht ohne Probleme wieder spaltbar war. Daher war es notwendig darauf zu achten unter Sauerstoffausschluß zu arbeiten und Verbindung (18) nicht länger als einen Tag zu lagern. Die Vorstufe 5'-O-4-Monomethoxytriyl-2'3'-didesoxy-3'-thiobenzoyluridin

(<u>17</u>) konnte dagegen ohne Probleme gelagert werden. Die Umsetzung zum 5'-O-(4-Monomethoxytrityl)-3'-desoxy-3'-thiouridin-3'-S-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl-phosphoramidit) (<u>19</u>) erfolgte wieder unter Standardbedingungen^[40, 69]. Hierbei ist anzumerken, daß die Amidierungsreaktion schneller verläuft als beim vergleichbaren unmodifizierten Nukleosid.



Abbildung 13: Syntheseschema von 5'-O-(4-Monomethoxytrityl)-3'-desoxy-3'-thiouridin-3'-S-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit) (<u>19</u>)^[40, 69]. MMT = Monomethoxytrityl-, DMAP = Dimethylaminopyridin, Ms = Methansulfonyl-, Bz = Benzoyl-, DIPEA = Diisopropylethylamin, NMI = *N*-Methylimidazol.

4.2 Optimierung des Synthesezyklus

Die Phosphoramiditmethode zur Synthese von Oligonukleotiden hat sich in den letzten Jahren als Standardmethode durchgesetzt^[53]. Ein Synthesezyklus besteht aus folgenden Schritten:

- 1. Detritylierung mit 3% Trichloressigsäure in Dichlormethan
- 2. Aktivierung und Kopplung des Amidites durch Tetrazol
- 3. Capping mit N-Methylimidazol und Acetanhydrid
- 4. Oxidation des Phosphittriesters durch Iod

In Abbildung 14 ist der Synthesezyklus für die 3'-thio-modifizierten Amidite dargestellt. Die detaillierten Syntheseschritte sind im Anhang aufgelistet.



Abbildung 14: Modifizierter Synthesezyklus für den Einbau von 3'-Phosphorothiolaten in Oligonukleotide. Der Zyklus begann mit der Abspaltung der 4,4'-Dimethoxytritylgruppe (DMT) des ersten, an der Festphase (*controlled pore glass*, CPG) immobilisierten Nukleotids unter sauren Bedingungen mittels Trichloressigsäure (TCA). Im zweiten Schritt wurde das zu koppelnde Amidit zusammen mit dem Aktivator Dicyanoimidazol (DCI) auf die Säule gegeben und im dritten Schritt erfolgte die Kopplung unter Abspaltung von Diisopropylamin. Die Kopplungszeit betrug 15 min. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, um eine höhere Kopplungseffizienz zu erreichen. Im folgenden Schritt wurden alle nicht umgesetzten 5'-Hydroxylgruppen mit Essigsäureanhydrid acetyliert, und somit für weitere Umsetzungen inaktiviert. Den letzte Schritt bildete die Oxidation des *b*-Cyanoethylphosphittriesters mit *tert.*-Butylhydroperoxid (TBHP) zum β -Cyanoethylphosphattriester. Ein neuer Zyklus startete wieder mit der Abspaltung der DMT-Schutzgruppe. B₁-B_n bezeichnet die verschiedenen Nukleobasen, R = TBDMS-, X = S oder O, Ac₂O = Essigsäureanhydrid.

Um 3'-thiomodifizierte Phosphoramidite im Standardsynthesezyklus einsetzen zu können, war es notwendig, ein anderes Oxidationsmittel zu verwenden. Die 3'-Thiolatbindung in einem Oligonukleotid kann durch Iod gespalten werden^[40]. Daher wurde das iodhaltige Oxidanz durch eine 3 M *tert*.-Butylhydroperoxidlösung in Acetonitril ersetzt. Die Oxidationzeit wurde auf 3 min erhöht^[58].

Bei ersten Kopplungsversuchen des 3'-Thiophosphoramidits am Syntheseautomaten hatte sich gezeigt, daß die beschriebenen Aktivatoren Tetrazol und Nitrophenyltetrazol^[77] zu keiner ausreichenden Kopplung führten. Daher wurden zuerst manuelle Kopplungstests mit verschiedenen Aktivatoren durchgeführt. Der erste Test bestand in der Synthese eines Dinukleotids: 0,1 M 2'-3'-Isopropylidenuridin in wasserfreiem Acetonitril wurde unter

inerten Bedingungen mit 1,5 Äquivalenten des 3'-Thiophosphoramidits und 3 Äquivalenten Aktivator versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde mit 2 Äquivalenten 3 M *tert*.-Butylhydroperoxid in Toluol für 5 min oxidiert. Die Mischung wurde mit jeweils 4 Äquivalenten Essigsäureethylester und gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Der Umsatz zum Dinukleotid wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Die Kopplungsausbeute wurde durch die Intensität der Fluoreszenzlöschung bestimmt (Tab.7). Dicyanoimidazol zeigte den höchsten Produktumsatz.

Tabelle 7: Optimierung der Kopplungsbedingungen des 3^c-thiomodifizierten Phosphoramidites in Lösung. Plus- und Minuszeichen stehen für die Intensität der Fluoreszenzlöschung des gebildeten Produkts im Vergleich zum eingesetzten Edukt.

Reagenz	Konzentration [M] ^a	Kopplung nach DC	Referenz
Nitrophenyltetrazol	gesättigt	-	[77]
Ethylthiotetrazol	0,25	+(+)	[78]
Dicyanoimidazol	0,25	+++	[59]
Benzimidazoliumtriflat	< 0,4	+	[79]

^a in Acetonitril

Daraufhin wurden Dicyanoimidazol und Ethylthiotetrazol am Syntheseautomaten getestet. Als Oxidationsmittel wurde *tert*.-Butylhydroperoxid verwendet. Es wurden unmodifizierte Test-Oligonukleotide der Längen 8, 12 und 32 Nukleotide mit jeweils beiden Reagenzien in jeweils zwei unabhängigen Experimenten synthetisiert. Die Kopplungszeiten wurden auf zweimal 5 min festgelegt (Tab.8).

Anzahl Nukleotide	Kopplungsausbeute Dicyanoimidazol Synthese 1 Synthese 2		Kopplungsausbeute Ethylthiotetrazol Synthese 1 Synthese 2	
8	96 %	91 %	98 %	96 %
12	97 %	98 %	98 %	97 %
32	98 %	98 %	98 %	98 %

Beide Reagenzien ergaben sehr gute Kopplungsausbeuten. Für die Synthesen am Automaten wurde Dicyanoimidazol verwendet, da es im manuellen Kopplungstest das bessere Ergebnis lieferte. Der neue Synthesezyklus wurde für modifizierte wie unmodifizierte Oligonukleotide verwendet. Anhand der Testsequenz 5'-GGUGU_(S)CUCGAGC-3' wurden die vollständige Thiolat-Modifikation, die partielle Thiolat-Modifikation und die Silberspaltung untersucht.

4.2.1 Synthese & Charakterisierung modifizierter Oligonukleotide

Für die Synthese des vollständig modifizierten Oligonukleotids 5'-GGUGU_(S)CUCGAGC-3' wurde das 3'-S-Thiophosphoramidit 0,15 M gelöst. Die Ausbeute einer Doppelkopplung des 3'-S-Thiophosphoramidites betrug 40% bei einer Kopplungszeit von 15 min. Eine Erhöhung der Kopplungszeit brachte keine Verbesserung. Die mittlere Kopplungsausbeute lag für ein 12-mer daher bei 90%. Nach der Synthese wurde das Oligonukleotid vollständig entschützt und das Rohprodukt mittels RP-HPLC analysiert (Abb.15).



Abbildung 15: RP-HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts des Oligonukleotids 5'-GGUGU_(s)CUCGAGC-3'. Die Elution fand mit Gradient 1 statt.

Im HPLC-Chromatogramm traten zwei Hauptpeaks im Verhältnis 3:2 auf. Das Oligomer, das mit der kürzeren Retentionszeit eluierte wurde, wurde mittels Nukleosidanalyse untersucht und HPLC-chromatographisch ausgewertet. Der erste Peak im HPLC-Chromatogramm entsprach dem erwarteten 7-mer Abbruchprodukt 5'-CUCGAGC-3'. Das Oligomer, mit der längeren Retentionszeit, wurde unter den gleichen Bedingungen untersucht. Der zweite Peak entsprach dem gewünschten 12-mer.

Eine HPLC-chromatographische Untersuchung einer Mischung aus modifiziertem und unmodifiziertem Oligomeren ergab unterschiedliche Retentionszeiten für die beiden Oligomere. Die Retentionszeit des unmodifizierten 12-mers beträgt 14,7 min, die des modifizierten 16,9 min (Abb.16).



Abbildung 16: RP-HPLC-Chromatogramme von einer Mischung aus unmodifiziertem und modifiziertem Oligonukleotid (A) und unmodifiziertem Oligonukleotid (B). Die Elution fand unter Standardbedingungen statt (Gradient 1).

Die Zusammensetzung des modifizierten Oligomeren konnte durch Nukleosidanaylse bestätigt werden. Die Nukleosidanalyse wurde durch Spaltung mit Nuklease P1 durchgeführt. Da Nuklease P1 nicht in der Lage ist Phosphor-Schwefel-Bindungen zu spalten^[39], wurde dem Vergleichsnukleosidmix der Nukleosidanalyse ein Dinukleotid mit der Sequenz 5'-UC-3' hinzugefügt. Die Nukleosidanalyse des zweiten Hauptpeaks zeigte im Chromatogramm erwartungsgemäß fünf Peaks mit den erwarteten Intensitäten (Abb.17).



Abbildung 17: RP-HPLC-Chromatogramm der Nukleosidanalyse des Oligonukleotids 5'-GGUGU_(S)CUCGAGC-3'. Für die Analyse wurde Gradient 2 verwendet. Die Nukleotide sind mit A, C, G und U gekennzeichnet. Der Pfeil markiert das ungespaltene Dinukleotid UpC, das die ungespaltene 3'-Thiolatbindung besitzt.

4.2.2 Untersuchung der Silberspaltung und Charakterisierung der Spaltprodukte

Zur Untersuchung der Effizienz der Silberspaltung von 3^c-Phosphorothiolaten wurden 3 nmol des thiomodifizierten Oligonukleotids mit Silbernitratlösung zu einer Endkonzentration von 20 mM für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde mit DTT-Lösung zu einer Endkonzentration von 50 mM gestoppt, 10 min zur Reaktion gebracht und der ausgefallene Niederschlag anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde mittels RP-HPLC analysiert und mit dem ungespaltenen Edukt verglichen. Im Chromatogramm traten anstelle des Eduktpeaks zwei neue Peaks auf (Abb.18 A und B). Die zu diesen Peak zugehörigen Verbindungen wurden isoliert und jeweils einer Nukleosidanalyse unterzogen (Abb.18 C und D). Es handelte sich hierbei um die gewünschten Spaltprodukte mit den Sequenzen 5'-CUCGAGC-3' und 5'-GGUGU-3'. Die unmodifizierten Phosphordiesterbindungen wurden durch das Silbernitrat nicht angegriffen. Es konnte damit gezeigt werden, daß die Silberspaltung einer 3'-Phosphorthiolat-Bindung quantitativ verläuft.



Abbildung 18: RP-HPLC-Chromatogramme zur Untersuchung der Silberspaltung von thiolatmodifizierten Oligonukleotiden. Dargestellt sind die Elutionsprofile des modifizierten Oligonukleotids 5'-GGUGU_(S)CUCGAGC-3' vor (**A**), R_i=16,9 min, und nach der Spaltung mit Silbernitrat (**B**), R_i=11,6 min und R_t=16,1 min. Die Oligomere zu Peak 1 und Peak 2 wurden isoliert und mit Nuklease P1 gespalten (**C** und **D**). Nukleosidpeaks sind mit A, C, G und U bezeichnet. Peak 1 kann dem 3'-Spaltprodukt 5'-GGUGU-3' zugeordnet werden (**C**) und Peak 2 dem 5'-Spaltprodukt 5'-CUCGAGC-3' (**D**). Für die Analysen A und B wurde Gradient 1 verwendet, für C und D Gradient 2.

4.2.3 Synthese partiell modifizierter Oligonukleotide und Quantifizierung des Thiolat-Einbaus

Für eine Interferenzanalyse ist es notwendig, ein Gemisch aus RNA-Molekülen zu erhalten in dem statistisch betrachtet nur eine Modifikation pro Molekül auftritt. Es galt das Mischungsverhältnis aus thiomodifiziertem zu Ribo-Phosphoramidit zu finden, bei dem nach chemischer Festphasensynthese im statistischen Mittel jedes der Oligonukleotide nur eine Modifikation trägt.

Es wurden drei verschiedene Mischungsverhältnisse untersucht. Da modifiziertes und unmodifiziertes Oligonukleotid unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen, konnten die Einbauraten direkt aus den HPLC-Chormatogrammen durch Integration der entsprechenden Peaks bestimmt werden (Abb.19). Die Elutionsprofile zeigen die Verhältnisse von unmodifiziertem Oligonukleotid zu modifiziertem. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die ermittelten Verhältnisse. Das Mischungsverhältnis von 5:1 entspricht dem gewünschten Einbau an modifiziertem Phosphoramidit.



Abbildung 19: HPLC-Chromatogramme des Oligonukleotids 5'-GGUGU_(S)CUCGAGC-3' mit unterschiedlichen Modifikationsgraden. Für die Elution wurde Gradient 1 verwendet. Dargestellt sind die Mischungsverhältnisse unmodifiziert zu modifiziert von A) 1:1, B) 5:1 und C) 10:1. Peak 1 entspricht jeweils dem unmodifizierten, Peak 2 dem modifizierten Oligonukleotid. Die Verhältnisse der Peaks zueinander wurden durch Peakintegration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Mischungsverhältnis Ribo- : Thio- phosphoramidit	Verhältnis Produktpeaks unmodifiziert:modifiziert
1:1	1:2
5 : 1	4 : 1
10 : 1	6 : 1

Tabelle 9: Verhältnisse des Modifikationsgrades bei drei verschiedenen Mischungsverhältnissen von unmodifiziertem zu modifiziertem Amidit.

Modifizierte und unmodifizierte Oligonukleotide wiesen zwar im HPLC-Chromatogramm unterschiedliche Retentionszeiten auf, ein Vergleich auf einem 12%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel zeigte aber nur eine Bande für die Mischung aus modifiziertem und unmodifiziertem Oligonukleotid. Auf gleicher Höhe liefen auch die Banden für die Kontrollen aus reinem modifiziertem und reinem unmodifiziertem Oligonukleotid. Der Einbau einer 3'-S-Phosphorothiolatbindung hat keinen Einfluß auf die Mobilität einer Nukleinsäure im Polyacrylamidgel.

4.3 Interferenzanalysen

Bei den hier durchgeführten Interferenzanalysen wurde die 3'-Phosphorothiolatsubstitution zur Markierung einer zweiten Modifikation, die auf Interferenz hin untersucht werden soll, verwendet. Ein Nukleotid trägt also zwei verschiedene Modifikationen (Abb.20). Die so markierten Nukleotide sollen dazu eingesetzt werden, essentielle funktionelle Gruppen des Hammerhead-Ribozyms zu identifizieren.

Bei früheren Untersuchungen am Hammerhead-Ribozym wurden schon zuvor Nukleotidanaloga verwendet, um essentielle funktionelle Gruppen zu identifizieren^[9]. Informationen über den Grundzustand, wie auch den aktiven Zustand sind aus mehreren Kristallstrukturen bekannt^[21-24, 27, 80]. Die Basen, wie auch das Phosphatrückgrat oder der Zucker besitzen essentielle funktionelle Gruppen, die an Wasserstoffbrückenbindungen, Metallkoordiantionen oder genereller Säure-Base-Chemie beteiligt sind. Ziel war die Identifikation bereits bekannter essentieller 2'-Hydroxylgruppen der Uridine im konservierten Bereich des Hammerhead-Ribozyms^[66, 68, 81, 82].



Abbildung 20: Darstellung des modifizierten Nukleotids wie es für die neue Interferenzmethode verwendet wurde. Die erste Modifikation (hier die Deletion der 2'-Hydroxylgruppe eines Uridins) ist die auf den Interferenzeffekt hin zu untersuchende. Die zweite Modifikation ist die 3'-Phosphorothiolatbindung, die als tagging der ersten Modifikation dient.

Im ersten Schritt des neuen Interferenzverfahrens wurden die partiell modifizierten Substratstränge einer Hammerheadspaltung unterzogen, wobei die Spaltungsreaktion nach 20% Umsatz gestoppt wurde, damit schwächere Interferenzeffekte nicht maskiert wurden. Gespaltene und ungespaltene Stränge wurden voneinander getrennt und isoliert. Im Anschluß folgte die Silberspaltungsanalyse der gespaltenen und ungespaltenen Stränge. Die Stränge wurden mit Silbernitratlösung inkubiert. Die Reaktion wurde mit DTT gestoppt, und der Niederschlag abzentrifugiert. Die Proben wurden auf einem 25%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. Interferenzpositionen konnten aus den Spaltungsmustern ermittelt werden. An den Positionen, an denen die fehlende 2'-Hydroxylgruppe einen negativen Effekt auf die Hammerhead-Spaltung aufweist, ist die Bandenintensität in der Produktspur reduziert, während die Bandenintensität in der Eduktspur erhöht ist. Der Ablauf der Interferenzstudie ist in Abbildung 21 schematisch dargestellt.



Abbildung 21: Schematische Darstellung des Ablaufs der Interferenzanalyse. Die horizontalen Linien symbolisieren die Oligonukleotide, die Dreiecke die Nukleotide mit der Doppelmodifikation und die Sterne eine terminale, radioaktive Markierung. Der Pfeil zeigt die Ribozym-Spaltstelle an. Zuerst wurde ein Pool von modifizierten Oligonukleotiden synthetisiert, wobei jedes Molekül im statistischen Mittel nur eine Modifikation trägt. Diese Oligonukleotide wurden einer Ribozymspaltung unterzogen, die bei einem Umsatz von 20% gestoppt wurde. Mittels PAGE wurden ungespaltene Substrate von gespaltenen Produkten getrennt. Substratstränge, die eine Modifikation tragen, die funktionell wichtig ist, werden nur sehr langsam gespalten. Daher fehlen diese Stränge in der Produktbande und reichern sich in der Substratbande an. Um diese interferierenden Positionen zu finden, wurden die Phosphorothiolatbindungen der Oligonukleotide mit Silbernitrat gespalten und anschließend durch hochauflösende PAGE analysiert. Aus der sich ergebenden Bandenleiter lassen sich die Interferenzpositionen (Pfeile) durch Vergleich von Substrat- und Produktfragmenten identifizieren.

4.3.1 Partiell modifizierte Oligonukleotide

Deletionsmodifikationen sind die am einfachsten zu untersuchenden und zu interpretierenden Modifikationen. Aus diesem Grunde wurde für die hier durchgeführten Interferenzanalysen Desoxyuridin als modifiziertes Nukleotid eingesetzt. Die Interferenzanalysen wurden an einem Hammerhead-Ribozym durchgeführt^[43], das so gewählt wurde, daß mit der Synthese eines Substratstranges gleichzeitig drei verschiedene Positionen untersucht werden konnten (Abb.22).



Abbildung 22: Sekundärstruktur des Hammerhead-Ribozyms, wie es für die neue Interferenzanalyse eingesetzt wurde. Konservierte Nukleotide sind eingekreist. Die Spaltstelle ist durch einen Pfeil markiert. R steht für Ribozymstrang, S für Substratstrang. Das Modell wurde analog zu Ruffner *et al.* gewählt^[43].

Die Synthese wurde mit einem 5:1-Gemisch aus unmodifiziertem und modifiziertem Amidit durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2.3). Die über Polyacrylamidgele aufgereinigten Substratstränge wurden sowohl am 5'-Ende zur Untersuchung der Position U16.1, wie auch am 3'-Ende für die Untersuchung der Positionen U4 und U7, radioaktiv markiert.

4.3.2 Hammerhead-Spaltung

Die Hammerhead-Spaltung erfolgte unter *single turnover*-Bedingungen. Unter diesen Bedingungen beschreibt die meßbare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante die Spaltung der Phosphordiesterbindung. Zuerst wurde das unmodifizierte Hammerhead-Ribozym unter *single turnover*-Bedingungen kinetisch charakterisiert (Abb.23).



Abbildung 23: Bestimmung der kinetischen Konstanten für das unmodifizierte Hammerhead-Ribozym. Die einzelnen Messungen wurden unter *single turnover*-Bedingungen in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 10 mM MgCl₂ bei 37°C durchgeführt. **A**: Graphische Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik; **B**: Eadie-Hoffstee-Darstellung von A. Die negative Steigung der Geraden ergibt den Wert für K_M und aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ergibt sich der Wert für k_{cat}. k_{obs} gibt den Wert für eine gemessene Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei einer bestimmten Ribozymkonzentration an. Für das Hammerhead-Ribozym ergaben sich folgende Werte: k_{cat} = (0,063 ± 0,002) min⁻¹ und K_M = (0,018 ± 0,003) µM.

Die Hammerhead-Spaltung der Interferenzanalyse wurde mit einer Ribozymkonzentration von 10 x K_M durchgeführt. Die Konzentration des Ribozyms lag bei 0,18 μ M, das Substrat wurde mit einer Konzentration von ca. 1 nM eingesetzt. Die Ribozymstränge wurden unmarkiert, die Substratstränge radioaktiv markiert eingesetzt. Zur Verhinderung, daß schwächere Interferenzeffekte maskiert werden, wurde die Spaltung nach einer Umsatzrate von 20% gestoppt. Die ungespaltenen Substrate und die gespaltenen Produkte wurden über denaturierende Polyacryamidgele getrennt. Die Banden wurden ausgeschnitten und die Oligonukleotide durch Elution und anschließende Ethanolfällung wiedergewonnen.

4.3.3 Silberspaltung

Die isolierten RNA-Moleküle der Substrat- und Produktbanden wurden mit Silbernitratlösung eine Stunde bei 25°C umgesetzt und die Spaltprodukte auf 25%-igen denaturierenden Polyacrylamidgelen analysiert. Aus den Bandenmustern der Silberspaltungsgele konnten die Nukleotidpositionen identifiziert werden, bei denen die Substitution der 2'-Hydroxylgruppe am Uridin gegen ein Proton mit der Hammerhead-Spaltung interferierte. An diesen Positionen war die Bandenintensität in der Bahn der gespaltenen Hammerheadprodukte stark vermindert, während die Intensität der Bande in der Bahn der ungespaltenen Produkte erhöht war (Abb.24 und 25). Als Kontrolle dienten modifizierte Stränge, bei denen auf die Zugabe von Silberionen verzichtet wurde (Abb.24-26, Bahn 4-6), sowie unmodifizierte Stränge mit Zugabe von Silberionen (Abb.24-26, Bahn 7). Die Banden wurden mittels Autoradiographie und Phosphorimaging detektiert. Die Auswertung der Banden erfolgte mit dem Programm ImageQuant. Die im folgenden abgebildeten Photographien (Abb.24-26) zeigen Reproduktionen der Autoradiogramme der Spaltungsgele.

Im Silberspaltungsgel der 3'-radioaktiv markierten Substratstränge wurden Interferenzeffekte sichtbar (Abb.24). Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mit dem Programm ImageQuant. Ein Vergleich der Bandenintensitäten zwischen Kontrollbahn (Abb.24, Bahn 1) und Produktbahn (Abb.24, Bahn 3) ergab eine um den Faktor 4 geringere Intensität für die Position U4 und eine um den Faktor 1,6 geringere Intensität für die Position U7. Ein Vergleich der Bandenintensitäten der Substratbahn (Abb.24, Bahn 1) mit der Produktbahn (Abb.24, Bahn 3) ergab für die Position U4 eine um den Faktor 8,8 geringere Intensität und für die Position U7 eine Verringerung um den Faktor 2,2. Es konnte eine eindeutige Interferenz für die 2'-Hydroxylgruppe an Position U4 und eine leichte Interferenz für die 2'-Hydroxylgruppe an Position U4 und eine Substratstränge konnte für die Position U16.1 kein Interferenzeffekt beobachtet werden (Abb.25).

4.3.4 Kontrollexperimente

Zur Überprüfung des Einflusses der 3'-Phosphorothiolatbindung auf die Aktivität des Hammerhead-Ribozyms wurde ein partiell modifizierter Substratstrang synthetisiert, der keine Desoxymodifikation trägt. Zur Synthese wurde das thiomodifizierte Amidit <u>11</u> ebenfalls in einer 1:5 Mischung mit unmodifiziertem Amidit verwendet.

Die partiell modifizierten Oligonukleotide wurden am 3'-Ende radioaktiv markiert (Kap. 3.6.2), wie beschrieben einer Hammerhead-Spaltung unterzogen, Produkte und ungespaltene Edukte wurden über PAGE getrennt und die Oligomere wiedergewonnen. In Anschluß folgte die Silberspaltung, und die Spaltprodukte wurden mit hochauflösender PAGE analysiert. Aus dem Bandenmuster ließ sich kein Interferenzeffekt durch das eingeführte 3'-Phosphorothiolat ermitteln (Abb.26). Die Experimente wurden zweifach ausgeführt.



Abbildung 24: Silberspaltungsgel der Phosphorothiolat-Interferenzanalyse am Hammerhead-Ribozym. Die chemisch synthetisierten Substratstränge sind am 3^c-Ende radioaktiv markiert. Bahn 1: Spaltungsmuster des modifizierten Substratstranges ohne Hammerhead-Spaltung nach Inkubation mit Silbernitrat; Bahn 2: Spaltungsmuster des ungespaltenen Substratstranges nach Hammerhead-Spaltung und Inkubation mit Silbernitrat; Bahn 3: Spaltungsmuster des gespaltenen Produkts nach Hammerhead-Spaltung und Inkubation mit Silbernitrat; Bahn 4-6: entsprechen den Bahnen 1-3 nur wurde auf die Zugabe von Silbernitrat verzichtet; Bahn 7: Kontrolle, unmodifizierter Substratstrang ohne Hammerhead-Spaltung nach Inkubation mit Silbernitrat.



Abbildung 25: Silberspaltungsgel der Phosphorothiolat-Interferenzanalyse am Hammerhead-Ribozym. Die chemisch synthetisierten Substratstränge sind am 5'-Ende radioaktiv markiert. Bahn 1: Spaltungsmuster des modifizierten Substratstranges ohne Hammerhead-Spaltung nach Inkubation mit Silbernitrat; Bahn 2: Spaltungsmuster des ungespaltenen Substratstranges nach Hammerhead-Spaltung und Inkubation mit Silbernitrat; Bahn 3: Spaltungsmuster des gespaltenen Produkts nach Hammerhead-Spaltung und Inkubation mit Silbernitrat, Bahnen 4-6: entsprechen den Bahnen 1-3 nur wurde auf die Zugabe von Silbernitrat wurde verzichtet; Bahn 7: Kontrolle, unmodifizierter Substratstrang ohne Hammerhead-Spaltung nach Inkubation mit Silbernitrat.



Abbildung 26: Silberspaltungsgel zur Überprüfung eines möglichen Interferenzeffektes des Phosphorothiolats auf die Aktivität des Hammerhead-Ribozyms. Die chemisch synthetisierten Substratstränge sind am 3'-Ende radioaktiv markiert. Bahn 1: Spaltungsmuster des modifizierten Substratstranges ohne Hammerhead-Spaltung nach Inkubation mit Silbernitrat; Bahn 2: Spaltungsmuster des ungespaltenen Substratstranges nach Hammerhead-Spaltung und Inkubation mit Silbernitrat; Bahn 3: Spaltungsmuster des gespaltenen Produkts nach Hammerhead-Spaltung und Inkubation mit Silbernitrat; Bahn 4-6: entsprechen den Bahnen 1-3 nur wurde auf die Zugabe von Silbernitrat verzichtet; Bahn 7: Kontrolle, unmodifizierter Substratstrang ohne Hammerhead-Spaltung nach Inkubation mit Silbernitrat.

4.4 Singuläre Desoxyuridin-Modifikationen

Die Ergebnisse der Interferenzanalyse wurden durch kinetische Bestimmung der Konstanten für die singulär desoxymodifizierten Substratstränge überprüft. Dazu wurden mittels Festphasensynthese drei verschiedene Oligonukleotide, mit singulären Desoxyuridinen an den Positionen U16.1, U7 und U4 synthetisiert. Die Synthesen wurden mit dem Standardsynthesezyklus durchgeführt. Die desoxymodifizierten Substratstränge wurden unter den gleichen Bedingungen wie das unmodifizierte Substrat der Hammerhead-Spaltung unterzogen. Es wurden kinetische Messungen bei acht verschiedenen Ribozymkonzentrationen und zu jeweils zwölf verschiedenen Zeitwerten durchgeführt. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Kinetiken für die verschiedenen Substratstränge angegeben. Abbildung 27 zeigt den Vergleich der Michaelis-Menten-Kineitken des unmodifizierten Hammerhead-Ribozyms mit dem Ribozym, das die Desoxymodifikation an U4 besitzt.

Für die Desoxymodifikation an der Position U4 konnte eine 20-fache Inhibierung der Hammerheadspaltung bestimmt werden. Bei den Positionen 7 und 16.1 konnte eine geringe bzw. keine Inhibierung festgestellt werden. Da der ermittelte Interferenzeffekt für Position U4 nicht mit den Daten aus der Literatur übereinstimmt, wurde zur Verifizierung des Ergebnisses der Substratstrang mit der Desoxymodifikation an Position U4 ein zweites Mal synthetisiert. Mit diesem Substratstrang konnten die gleichen Ergebnisse erhalten werden. Die Daten, die mit den singulär mit Desoxyuridinen modifizierten Hammerhead-Ribozymen erhalten wurden, konnten die Ergebnisse der Interferenzanalysen bestätigen.

Modifikation	k _{cat} [min⁻¹]	K _M [μM]	k _{cat} /K _M [[μM ⁻¹ min ⁻¹]	k _{cat} /K _M relative [μM⁻¹min⁻¹]
keine	0,063 ± 0,002	0,018 ± 0,004	3,5	1,00
dU 16.1	0,061 ± 0,006	0,012 ±0,003	5,1	1,46
dU 7	0,053 ± 0,001	0,014 ±0,001	3,8	1,01
dU 4	0,003 ± 0,0001	0,0046 ±0,0001	0,65	0,19

Tabelle 10: Kinetische Konstanten singulär mit Desoxyuridinen modifizierter Substratstränge. Die angegebenen Werte für k_{cat} und K_M sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung.



Abbildung 27: Graphische Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetiken für das unmodifizierte Hammerhead-Ribozym (weiße Punkte) und das Hammerhead-Ribozym mit einer Desoxymodifikation an Position U4 (schwarze Punkte). Die einzelnen Messungen wurden unter *single turnover* Bedingungen in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 10 mM MgCl₂ bei 37°C durchgeführt. Für das desoxymodifizierte Hammerhead-Ribozym ist eine eindeutige Inhibierung der Aktivität zu erkennen.

Die Ergebnisse des neuen Interferenzverfahrens zeigten eine gute Übereinstimmung mit den kinetischen Daten aus den Experimenten mit den singulär modifizierten Substratsträngen. Da die Silberspaltung quantitativ verläuft, wurde dadurch direkter Vergleich der Bandenintensitäten mit en Ergebnissen der kinetischen Messungen ermöglicht.