AG Chemische Funktionen in Biosystemen
der Universität Ulm
Leiter: Prof. Dr. H. Seliger



ulm university universität ulm

ENTWICKLUNG NEUER METHODEN ZUR PEG-DERIVATISIERUNG UND INTERNALISIERUNG THERAPEUTISCH WIRKSAMER OLIGONUKLEOTIDE

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm
vorgelegt von

Dipl.-Chem. Bernd Betzler
aus Aalen

2011

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. A. Groß
1. Gutachter:	Prof. Dr. H. Seliger
2. Gutachter:	Prof. Dr. P. Gierschik
3. Gutachter.	Prof. Dr. A. Brennicke
Tag der Promotion:	23. April 2012

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Chemische Funktionen in Biosystemen der Universität Ulm, im Department of Pharmaceutical Chemistry der Universität Kuopio (Finnland) sowie im Ulmer Labor der Firma Antisense Pharma GmbH (Regensburg) durchgeführt.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Seliger für die wissenschaftliche Betreuung und Beurteilung der Arbeit sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Chemische Funktionen in Biosystemen für die kollegiale Zusammenarbeit und die moralische Unterstützung.

Insbesondere danke ich Herrn Dipl.-Chem. Markus Lamla für die Durchführung der MALDI-TOF MS Messungen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Maxim Antopolsky (Department of Pharmaceutical Chemistry der Universität Kuopio) für die Betreuung und Unterstützung bei den Peptidsynthesen.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich beim Team der Firma Antisense Pharma GmbH für die hervorragende Zusammenarbeit sowie für die finanzielle und materielle Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein ganzes Leben zur Seite standen.

INHALTSVERZEICHNIS **4**

ABKÜRZUNGEN **8**

1. EINLEITUNG **11**

2. AUFGABENSTELLUNG **13**

3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN **15**

3.1. BIOPOLYMERE **15**
3.1.1. Struktur und Funktion von Nukleinsäuren 15
3.1.2. Struktur und Funktion von Proteinen und Peptiden 18

3.2. CHEMISCHE SYNTHESE VON OLIGONUKLEOTIDEN **21**
3.2.1. Festphasensynthese von Oligonukleotiden 21

3.3. CHEMISCHE SYNTHESE VON PEPTIDEN **32**
3.3.1. Die Boc-Synthesestrategie 33
3.3.2. Die Fmoc-Synthesestrategie 34
3.3.3. Synthese in Lösung 35
3.3.4. Festphasensynthese nach Merrifield 35

3.4. THERAPEUTISCH WIRKSAME OLIGONUKLEOTIDE **40**
3.4.1. Antisense-Oligonukleotide 40
3.4.2. siRNA 42
3.4.3. Triplexbildende Oligonukleotide 43
3.4.4. CpG-Oligonukleotide 45
3.4.5. Aptamere 45

3.5. OLIGONUKLEOTID-ANALOGA **46**

3.6. PEG-KONJUGATE PHARMAZEUTISCHER WIRKSTOFFE **49**

3.7. INTERNALISIERUNGSPEPTIDE **54**
3.7.1. Penetratin 54
3.7.2. HIV-Tat 55
3.7.3. Neuere Internalisierungspeptide 56
3.7.4. Endosomolytische Internalisierungspeptide 57

3.8. STREPTAVIDIN **58**
3.8.1. Tetrameres Streptavidin 58
3.8.2. Dimeres Streptavidin 60

3.9. GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) **62**

3.10. KLONIERUNG UND EXPRESSION REKOMBINANTER DNA **63**
3.10.1. Enzyme der Molekularbiologie 63
3.10.2. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 65
3.10.3. Klonierung von DNA Fragmenten 67
3.10.4. Sequenzierung 72
3.10.5. Bakterielle Expressionssysteme 75

4. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE **80**

4.1. EINSEITIGE UND SYMMETRISCHE DERIVATISIERUNG MIT POLYETHYLENGLYKOL **80**
4.1.1. Charakterisierung der verwendeten PEG-NHS Ester 81
4.1.2. Optimierung der Geräteprotokolle für die Oligonukleotidsynthese 84
4.1.3. 5´-terminale Derivatisierung mit mPEG2000 88
4.1.4. Derivatisierung mit Polyethylenglykolen anderer Längen 96

4.2. BEIDSEITIGE ASYMMETRISCHE DERIVATISIERUNG MIT POLYETHYLENGLYKOL **106**
4.2.1. Vergleich kommerzieller Amino-Träger 107
4.2.2. Beidseitige asymmetrische Derivatisierung in Lösung 111
4.2.3. Beidseitige asymmetrische Derivatisierung an einem Polymerträger 123

4.3. ERMITTLUNG DER NUKLEASESTABILITÄT PEG-DERIVATISIERTER OLIGONUKLEOTIDE **161**
4.3.1. Abbau durch Exonukleasen (HPLC-Analyse) 161

4.3.2. Abbau durch Endonukleasen (HPLC-Analyse) ... 165
4.3.3. Abbauuntersuchungen durch Kopplung von HPLC und MALDI-TOF MS ... 168
4.3.4. Abbauuntersuchungen mittels PAGE-Gelelektrophorese ... 180

4.4. KOPPLUNG PEG-DERIVATISIERTER OLIGONUKLEOTIDE MIT PENETRATIN ... 186
4.4.1. Synthese des Penetratins ... 187
4.4.2. Synthese des PEG-derivatisierten Oligonukleotids ... 190
4.4.3. Kopplung zum Oligonukleotid-Peptid-Konjugat ... 196

4.5. DESIGN EINES REKOMBINANTEN CARRIERS ZUR ZELL-INTERNALISIERUNG ... 205
4.5.1. Design des pQE30-EGFP Vektors ... 208
4.5.2. Design des pQE30-TSA43 Vektors ... 215
4.5.3. Design der pQE30-PenEGFP und pQE30-PenTSA43 Vektoren ... 221

4.6. EXPRESSION DER FUSIONSPROTEINE ... 247
4.6.1. Optimierung der Expressionsbedingungen ... 247
4.6.2. Aufreinigung der Expressionsprodukte ... 250
4.6.3. Charakterisierung der Expressionsprodukte ... 251

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE ... 255

5.1. PEG-DERIVATISIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN ... 255
5.1.1. Optimierung der Oligonukleotidsynthese ... 255
5.1.2. Einseitige und beidseitig symmmetrische PEG-Derivatisierung ... 255
5.1.3. Handelsübliche Aminoträger ... 257
5.1.4. Asymmetrische PEG-Derivatisierung in Lösung ... 257
5.1.5. Präsynthetische Derivatisierung des Trägers ... 258
5.1.6. Postsynthetische trägergebundene Derivatisierung mittels PEG-Amidit ... 259
5.1.7. Postsynthetische trägergebundene Derivatisierung mittels PEG-NHS ... 260
5.1.8. Verwendung von 5´-Phosphorigsäureesteramiden ... 261
5.1.9. Derivatisierung mit monodispersem PEG ... 262

5.2. STABILITÄTSTESTS GEGENÜBER NUKLEASEN ... 263
5.2.1. Vergleich der unterschiedlichen Detektionsmethoden ... 264
5.2.2. Einfluß des PEGylierungsmusters auf die Nukleasestabilität ... 266

5.3. CHEMISCHE SYNTHESE EINES OLIGONUKLEOTID-PENETRATIN KONJUGATS ... 267

5.4. REKOMBINANTER PENETRATIN-CARRIER ... 269
5.4.1. Design und Klonierung des rekombinanten Penetratin-Carriers ... 269
5.4.2. Expression des rekombinanten Penetratin-Carriers ... 271

5.5. AUSBLICK ... 272

6. MATERIAL UND METHODEN ... 273

6.1. VERWENDETE MATERIALIEN ... 273
6.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial ... 273
6.1.2. Chemikalien ... 274
6.1.3. Puffer ... 277
6.1.4. Größenmarker ... 278
6.1.5. Enzyme ... 280
6.1.6. Nährmedien und Nährplatten ... 280
6.1.7. Bakterienstämme ... 281
6.1.8. Vektoren ... 281

6.2. OLIGONUKLEOTIDSYNTHESE ... 281
6.2.1. Synthese der Oligonukleotide ... 281
6.2.2. Trägergebundene Detritylierung ... 283
6.2.3. Abspaltung vom Träger ... 283

6.3. PEPTIDSYNTHESEN ... 283
6.3.1. Synthese der Peptide ... 283
6.3.2. Abspaltung vom Träger ... 284

6.4. AUFREINIGUNGS- UND TRENNMETHODEN ... 284

6.4.1. reversed-phase HPLC ... 284
6.4.2. Ionenaustausch HPLC ... 286
6.4.3. Ionenaustausch FPLC ... 287
6.4.4. Größenausschlußfiltration ... 287
6.4.5. PolyPak™ Kartuschen ... 288
6.4.6. Polyacrylamid-Gel für Proteine ... 289
6.4.7. Färbung von Polyacrylamid-Gelen mittels Coomassie-Brillant-Blau ... 289
6.4.8. Polyacrylamid-Gel für Oligonukleotide ... 289
6.4.9. Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen ... 290
6.4.10. Digitalisierung von Polyacrylamid-Gelen ... 290
6.4.11. Bestimmung der Bandenintensitäten von Polyacrylamid-Gelen ... 290

6.5. QUANTIFIZIERUNG DURCH BESTIMMUNG DER UV-ABSORPTION ... 291

6.6. MALDI-TOF MS ... 291

6.7. MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN ... 291

6.7.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR) ... 291
6.7.2. Restriktionsverdau ... 292
6.7.3. Agarosegele ... 292
6.7.4. Gelextraktion und Säulenaufreinigung ... 293
6.7.5. Ligase-Reaktion ... 293
6.7.6. Kompetente Zellen ... 294
6.7.7. Transformation ... 294
6.7.8. Plasmidpreparation ... 294
6.7.9. Expression ... 296
6.7.10. Denaturierende His-tag Aufreinigung ... 296
6.7.11. Dot-Blot Hybridisierung mit Chemilumineszenz-Immunoassay ... 297

7. LITERATUR ... 298

8. ANHANG ... 308

8.1. OLIGONUKLEOTIDSEQUENZEN ... 308

8.2. RP-HPLC CHROMATOGRAMME DER NUKLEASE-ABBAUVERSUCHE ... 309

8.2.1. Abbau mit 3´-Exonuklease (Phosphodiesterase I) ... 309
8.2.2. Abbau mit 5´-Exonuklease (Phosphodiesterase II) ... 316
8.2.3. Abbau mit S1-Endonuklease ... 323

8.3. SEQUENZIERERGEBNISSE ... 335

8.3.1. pTSA43 ... 335
8.3.2. pQE30-EGFP ... 336
8.3.3. pQE30-TSA43 ... 337

8.4. VEKTORSEQUENZEN ... 338

8.4.1. pQE30 ... 338
8.4.2. pET-3a ... 339
8.4.3. pTSA43 ... 340
8.4.4. pQE30-TSA43 ... 341
8.4.5. pQE30-PenTSA43 ... 342
8.4.6. pEGFP-N1 ... 343
8.4.7. pQE30-EGFP ... 344
8.4.8. pQE30-PenEGFP ... 345

8.5. SEQUENZEN DER EXPRESSIONSPRODUKTE ... 346

9. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY ... 347

9.1. ZUSAMMENFASSUNG ... 347

9.2. SUMMARY ... 348

10. LEBENSLAUF ... 350

Verwendete Abkürzungen

✂	Restriktionsschnitt
↺	Ligation
Å	Angström
ACN	Acetonitril
Ahx	6-Aminohexansäure
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
amp^R	Gen zur Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AU	Absorbance Units
bp	Basenpaare
BamH1	eine Restriktionsendonuklease
Boc	t-Butyloxycarbonyl
cDNA	complementary DNA
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CPG	Controlled Pore Glass
CPP	Cell Penetrating Peptide (Internalisierungspeptid)
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCI	Dicyanoimidazol
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMS(O)MT	6-(4,4'-Dimethoxy-4"-methylsulfonyl-tritylamino)hexyl-
DMTr / DMT	Dimethoxytrityl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreit (Dithiothreitol)
E. coli	Escherichia coli
EcoRI	eine Restriktionsendonuklease
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ESI	Elektrospray Ionisation
FA	Formamid
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GFP	Green Fluorescent Protein
HeLa	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOBt	N-Hydroxybenztriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IE	Ion Exchange (Ionenaustausch)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kpn1	eine Restriktionsendonuklease
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time Of Flight
MCS	Multiple Cloning Site
MMTr / MMT	Monomethoxytrityl-
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mPEG	methoxy-PEG
mRNA	messenger RNA
miRNA	micro RNA
MS	Mass Spectrometry
Mtr	4-methoxy-2,3,6-trimethylphenylsulfon
MWCO	Molecular Weight Cut Off (Ausschlußgröße)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMP	N-Methylpyrrolidon
n.n.	nicht nachweisbar
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
ONT	Oligonukleotid-Thiophosphat
ORI	Origin of Replication (Replikationsursprung)

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDC	Plasmacytoid Dendritic Cell
PEG	Polyethylenglykol
PEGylierung	Substitution mit Polyethylenglykol
Pen	Penetratin
Py_2S_2	2,2´-Dipyridyldisulfid (2,2´-Dithiopyridin)
PyBOP	Benzotriazoloxytris[pyrrolidinamino]-phosphoniumhexafluorophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
SCD	Single-Chain Dimer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
Stv43	dimeres Streptavidin
Tat	trans-acting activator of transcription
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tet^R	Gen zur Tetracyclin-Resistenz
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
TFO	triple helix forming oligonucleotide
TLR	Toll Like Receptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
TSA43	dimeres Streptavidin codierendes Gen
UV	Ultraviolett
YAC	yeast artificial chromosomes
z	Ladung

Symbole der Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Symbole der Nukleobasen:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

1. Einleitung

Biopharmazeutische Therapeutika, wie z.B. Proteine, Peptide, Antikörper oder auch therapeutisch wirksame Oligonukleotide (s. Kap. 3.4), gewinnen einen immer höheren Stellenwert in der modernen Medizin. Die Hauptvorteile liegen in erster Linie in ihrer hohen Spezifität, verbunden mit meist geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zu den klassischen chemischen Pharmazeutika. Im Idealfall zeigen biopharmazeutische Therapeutika lediglich eine Wechselwirkung mit einem spezifischen Target. Der größte Nachteil dieser Wirkstoffe liegt allerdings bei einer sehr geringen Halbwertszeit im Organismus, bedingt durch einen schnellen metabolischen Abbau. Da die Substanzen in ihrer ursprünglichen Form eine starke strukturelle Ahnlichkeit zu anderen biologischen Komponenten aufweisen, werden sie auch leicht vom körpereigenen Immunsystem angegriffen.
Eine Möglichkeit zur Maskierung besteht in der Derivatisierung der biopharmazeutischen Wirkstoffe mit Polyethylenglykol (umgangssprachlich auch als PEGylierung bezeichnet), was in der Regel zu einem nicht-toxischen Produkt mit erhöhter Stabilität gegenüber körpereigenen Enzymen führt, welches aufgrund der hydrophilen PEG-Ketten sowohl im Blut als auch in Lösungsmitteln löslich ist. Ein um mehrere Größenordnungen gesteigertes hydrodynamisches Volumen verringert die Filtration durch die glomerulären Kapillaren der Niere und bewirkt eine deutliche Verzögerung der renalen Auscheidungsrate. Durch den erschwerten Angriff von Antikörpern weist der PEGylierte Wirkstoff oftmals auch eine, im Gegensatz zum unmodifizierten Molekül, wesentlich geringere Immunogenität auf.
Neben Proteinen und Peptiden stellen die Oligonukleotide eine wichtige Gruppe an biopharmakologischen Makromolekülen dar. In erster Linie ist dabei der Einsatz als Antisense-Oligonukleotide (s. Kap 3.4.1) zu nennen, aber auch therapeutische Ansätze in Form von triplexbildenden Antigen-Oligonukleotiden (s. Kap. 3.4.3) oder Aptameren (s. Kap 3.4.5) sind möglich. Die Halbwertszeiten ungeschützter Oligonukleotide liegen im Organismus jedoch im Bereich von nur wenigen Minuten. Obwohl diese Halbwertszeit durch intramolekulare Modifizierungen (s. Kap. 3.5) stark erhöht werden kann, sind selbst Oligonukleotid-Thiophosphate nicht vollkommen resistent gegenüber den im Plasma vorkommenden Endo- bzw. Exonukleasen.
Durch gezielte PEGylierung besteht bei Oligonukleotiden die Möglichkeit, den Angriff von Nukleasen sterisch zu behindern. Im Gegensatz zu Proteinen und Peptiden, bei denen die PEG-derivatisierung in der Regel inmitten des Moleküls an verschiedenen Aminosäure-Seitenketten durchgeführt wird, ist man bei der PEGylierung von Oligonukleotiden auf die beiden Termini des Moleküls angewiesen. Mittels verschiedener Linker ist allerdings die Generierung fast jeder erdenklichen reaktiven Gruppe am 3´- bzw. 5´-Ende des synthetisch hergestellten Oligonukleotids möglich (s. Kap. 3.6).
Als erstes PEG-derivatisiertes Oligonukleotid wurde im Jahre 2004 das 28 Basen lange, mit einem verzweigten 40kDa PEG derivatisierte Aptamer Pegaptanib® (ein Derivat des Aptamers Macugen® zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration) von der FDA anerkannt[(1)].
Neben der kurzen Halbwertszeit ist der effiziente klinische Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden darüber hinaus durch eine zu geringe zelluläre Aufnahme der potentiellen Wirkstoffe behindert. Aufgrund ihrer Größe und ihres hydrophilen Charakters sind diese Makromoleküle kaum in der Lage, die Lipid-Doppelschicht biologischer Membranen zu passieren, und bleiben daher oft wirkungslos. Nur relativ kleine Moleküle können, wenn andere Parameter wie Ladung und Polarität stimmen, die Lipid-Doppelschicht durch passive Diffusion entlang eines elektrochemischen Gradienten überwinden[(2)].
Dieses Problem kann zwar durch verschiedene Techniken wie Mikroinjektion, Elektroporation und dem Einsatz kationischer Lipide als Transfektionsreagenzien umgangen

werden, diese Methoden sind jedoch meist sehr aufwändig und im Allgemeinen nur in Zellkulturen durchführbar.
Eine elegantere Methode ist die Verwendung von Internalisierungspeptiden als Carrier. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Peptiden, welche in der Regel eine Länge von 9 bis 30 Aminosäuren aufweisen und in der Lage sind, biologische Membranen leicht zu passieren.
Populäre peptidische Carrier sind z.B. das Penetratin[3], ein aus 16 Aminosäuren bestehendes DNA-Bindungs-Fragment aus der Familie der Drosophila-Homeoproteine, einer Klasse von Transkriptionsfaktoren, welche in wichtige biologische Prozesse der Zellentwicklung eingebunden sind, oder eine aus dem HIV TAT-Protein[4] abgeleitete, 11 Aminosäuren lange Transduktions-Domäne (Tat).
Durch kovalente Kopplung kann die Fähigkeit zur Membranpassage auf andere Moleküle (z.B. größere Proteine, Oligonukleotide, siRNA...) übertragen werden, wodurch auch diese Moleküle in die Zelle eingeschleust werden können. Diese kovalent verknüpften Konjugate weisen, im Gegensatz zu den komplexen Gebilden, die sich bei der Verwendung liposomaler Transfektionsreagenzien ergeben, eine einheitliche Molekülstruktur auf. Durch diese definierte Stöchiometrie kann sich der lange Weg zur Marktreife, über eine Synthese im größeren Maßstab, der Zulassung zu klinischen Studien sowie der großtechnischen Herstellung, einfacher erweisen als bei der Verwendung strukturell wenig definierter, nicht-kovalenter Komplexe. Die Toxizität der Carrier-Konjugate ist ebenfalls als gering einzustufen[5], wodurch sich die Substanzen für therapeutische Zwecke im Tiermodell sowie auch für humane Anwendungen als geeignet erweisen können.
Der scheinbar einfachste Weg zur kovalenten Verknüpfung eines Internalisierungspeptids mit einem Oligonukleotid ist die schrittweise Festphasensynthese des gesamten Konjugats[6]. Diese Vorgehensweise erweist sich jedoch, auf Grund der sehr unterschiedlichen Schutzgruppenchemie von Oligonukleotid- und Peptidteil, in der Praxis als nur schwer durchführbar. Weniger präparative Probleme bereitet eine konvergente Strategie, bei der Peptid- und Oligonukleotidteil gesondert synthetisiert und anschließend über eine Fragmentverknüpfung zusammengefügt werden. Dies kann beispielsweise über eine Disulfid-Kopplung[7] erfolgen, welche von M. Gait im Sinne einer "native ligation" modifiziert wurde[8]. Das Hauptproblem besteht jedoch, sowohl bei der schrittweisen Festphasensynthese als auch bei der konvergenten Blockverknüpfung, in der Isolierung und Reinigung der Konjugate. Hier bereitet die sehr unterschiedliche chemische Natur von Peptid- und Oligonukleotidteil, insbesondere die Kombination der Peptid-Carrier als kationische Moleküle mit dem polyanionischen Oligonukleotid, große Schwierigkeiten da die gebildeten Konjugate oftmals stark zur Prezipitation neigen[9]. Die chemische Synthese gelingt daher zumeist nur in kleinen Mengen.
Die Herstellung biopharmazeutischer Therapeutika, in erster Linie von Peptiden und Proteinen, erfolgt heutzutage immer öfters auf biotechnologischem Wege. Die Produktion von Proteinen, bei denen es nicht auf ein Glykosylierungsmuster ankommt, findet dabei überwiegend durch Fermentation von Mikroorganismen (vor allem E. coli) in Bioreaktoren statt. Bakterien sind durch ihr haploides Genom leicht zugänglich für genetische Manipulationen, und die einfache Kultivierung sowie kurze Fermentationszeiten führen schnell zu einer beträchtlichen Menge der gewünschten Zielsubstanz. Diese, in der Regel überexprimierte, Substanz muß daraufhin von den übrigen Stoffwechselprodukten des Bakteriums abgetrennt werden. Je nach Beschaffenheit und Sequenz des Zielproteins wird dieses entweder in das umgebende Kulturmedium abgegeben oder intrazellulär akkumuliert.
Von allen derzeit zugelassenen Wirkstoffen sind nur 5% gentechnischen Ursprungs. Der Anteil an den jährlich neu eingeführten Medikamenten beträgt allerdings 15 – 25%, wodurch auch der Gesamtanteil in den nächsten Jahren stark ansteigen wird.

Gegenwärtig (Stand September 2010) sind in Deutschland mindestens 143 Arzneimittel mit 107 gentechnisch gewonnenen Wirkstoffen zugelassen, womit diese rekombinanten Pharmazeutika mit 4,7Mrd. Euro bereits 16% des Arzneimittelumsatzes ausmachen[(10)].

2. Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellungen der vorliegenden Arbeit lassen sich in 2 zentrale Hauptthemen unterteilen.
Im ersten Teil soll eine geeignete Methode zur terminalen Derivatisierung von Oligonukleotid-Thiophosphaten (ONT´s) mit Polyethylenglykolen unterschiedlicher Länge und Beschaffenheit entwickelt werden. Besonderes Augenmerk soll dabei auf die Etablierung einer Synthesestrategie gelegt werden, die es erlaubt, asymmetrische PEGylierungen von ONT´s mit zwei unterschiedlichen Polyethylenglykolen kurzer bis mittlerer Kettenlänge durchzuführen (Abb. 1).

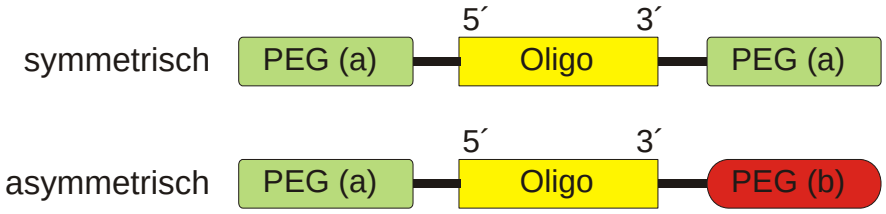


Abb. 1: beidseitig symmetrische und asymmetrische Derivatisierung eines Oligonukleotids mit Polyethylenglykol (PEG)

Um ein Oligonukleotid gezielt an beiden Termini mit unterschiedlichen Polyethylenglykolen zu derivatisieren, bedarf es eines Synthesekonzepts mit verschiedenen, orthogonalen reaktiven Gruppen oder einer Strategie zum temporären Schutz eines der beiden Enden. In dieser Arbeit soll dazu in erster Linie der zweite Ansatz, mit verschiedenen Möglichkeiten zum temporären Schutz eines Terminus, angegangen werden.
Bei der Entwicklung und Beurteilung der verschiedenen Synthesestrategien sollen dabei von vornherein die Ansprüche an eine spätere großtechnische Herstellung beachtet werden.
Mittels der etablierten Methode soll im weiteren Verlauf eine größere Menge an Oligonukleotid-Thiophosphat, im Maßstab von mehreren µmol, mit verschiedenen Poylyethylenglykolen derivatisiert werden.
Eine weitere wesentliche Aufagbe ist die Untersuchung der Stabilität der gewonnenen PEG-derivatisierten ONT´s gegenüber Endo- und Exonukleasen. Auch hierzu sollen verschiedene Detektionsmöglichkeiten untersucht und ihre Leistungsfähigkeit und Aussagekraft verglichen werden.
Abschließend für den ersten Teil der Arbeit soll die Kopplung eines PEG-derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphats mit dem Internalisierungspeptid Penetratin zu einem ONT-Peptid Konjugat erfolgen.

Im zweiten, molekularbiologischen Teil der Arbeit soll durch Expression in E. coli ein rekombinantes Fusionsprotein aus dimerem Streptavidin (Stv43) und Zell-internalisierendem Penetratin hergestellt werden. Dieses Konstrukt soll die Möglichkeit eröffnen, biotinylierte Oligonukleotide mit therapeutischer Wirkung sowie prinzipiell auch jedes beliebige andere biotinylierte Makromolekül über das dimere Streptavidin an den Carrier zu koppeln und durch die internalisierende Wirkung des Penetratins in eine Zelle einzuschleusen (Abb. 2). Ziel dieser Arbeit ist allerdings zunächst einmal das Design, die Klonierung und die Expression des universellen Carriers.

Als Grundlage für diese Vorgehensweise ist zuerst die Konstruktion eines Expressionsvektors notwendig, welcher die Penetratin-codierende Basensequenz zusammen mit dem Gen des dimeren Streptavidins (TSA43) enthält.

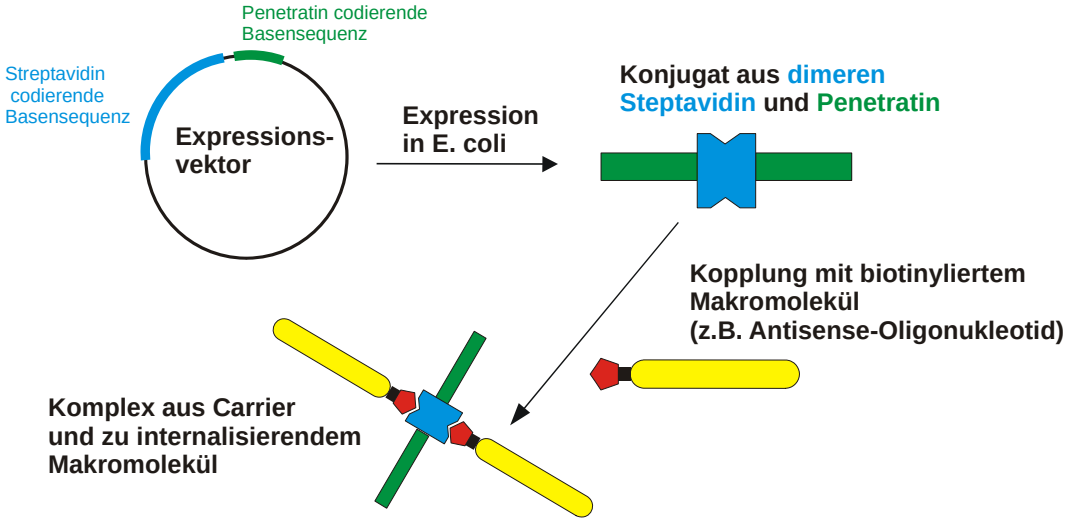


Abb. 2: Prinzip der rekomb. Herstellung und Anwendung eines Penetratin-Streptavidin-Konjugats

Die benötigte Nukleinsäure-Sequenz (Insert) für das dimere Streptavidin soll durch PCR aus einem entsprechenden Quellvektor (Template) amplifiziert werden. Eine Modifizierung des Inserts mit kompatiblen Restriktionsschnittstellen zum späteren Einbau in die MCS eines Zielvektors soll, ebenso wie der Einbau der synthetischen, 48 Nukleotide langen Penetratin-codierenden Sequenz, durch modifizierte Primer erfolgen (Abb. 3).

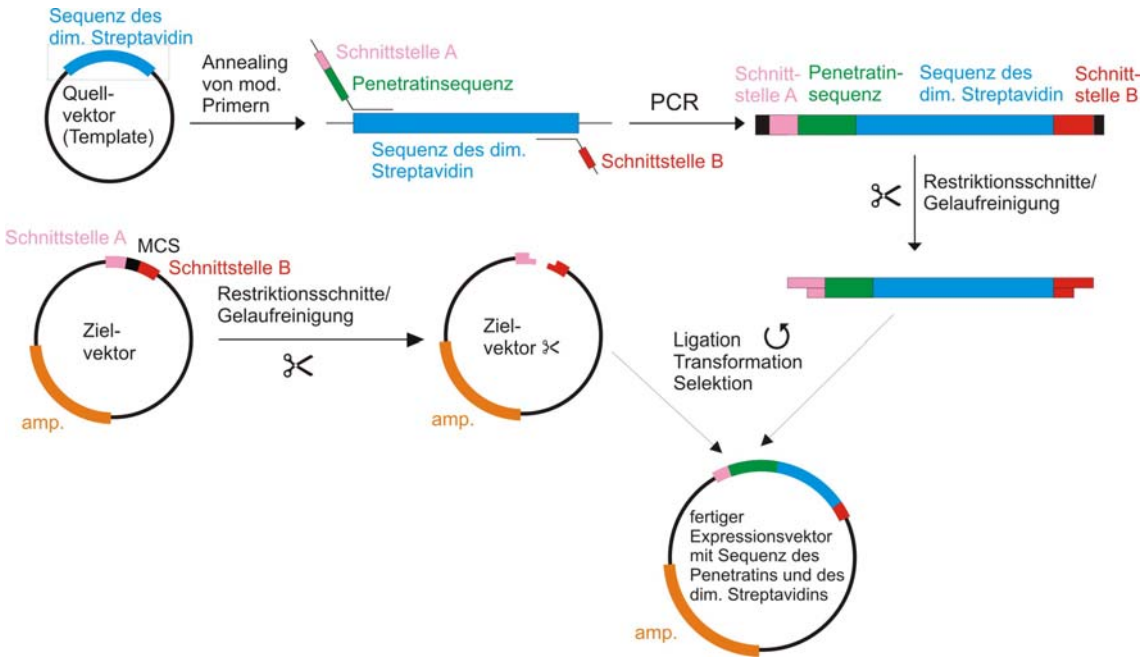


Abb. 3: PCR und Klonierung des Streptavidin-Inserts durch Primer mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen

3. Theoretische Grundlagen

3.1. Biopolymere

3.1.1. Struktur und Funktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind die Polymere von Nukleotiden. Die vier Nukleotide der DNA bestehen jeweils aus einer 5´ phosphorylierten Desoxyribose und einer heterozyklischen Nukleobase (Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) oder Cytosin (C)), die N-glykosidisch an der 1´ Position des Zuckermoleküls gebunden ist. Bei den auf Ribose basierenden Nukleotiden der RNA ist Thymin durch Uracil (U) ersetzt. Man unterscheidet Purin- und Pyrimidinbasen. Zu den Purinbasen (Abb. 4) gehören Guanin und Adenin, zu den Pyrimidinbasen (Abb. 5) Thymin bzw. Uracil und Cytosin.

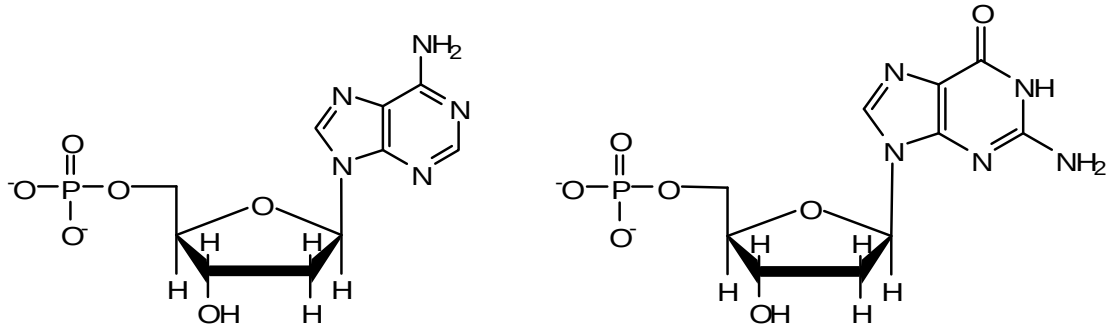


Abb. 4: Desoxyribonukleotide mit den Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G)

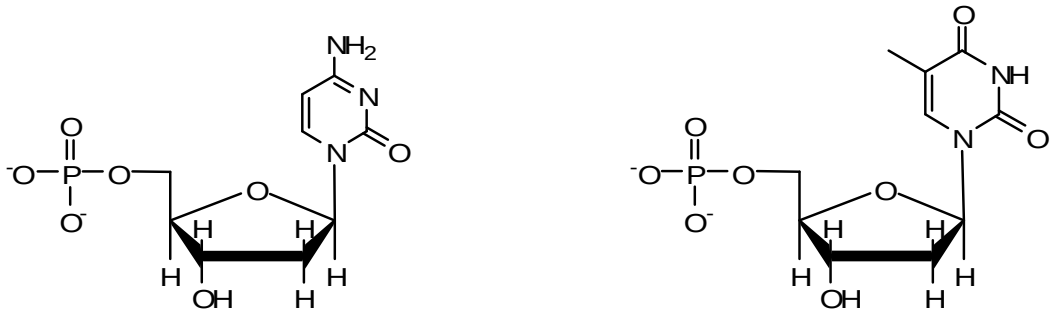


Abb. 5: Desoxyribonukleotide mit den Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T)

In der DNA bzw. RNA sind die einzelne Nukleotide jeweils zwischen der 3´ Position und der 5´ Position der Zuckermoleküle über Phosphodiesterbrücken verknüpft (Abb. 6).

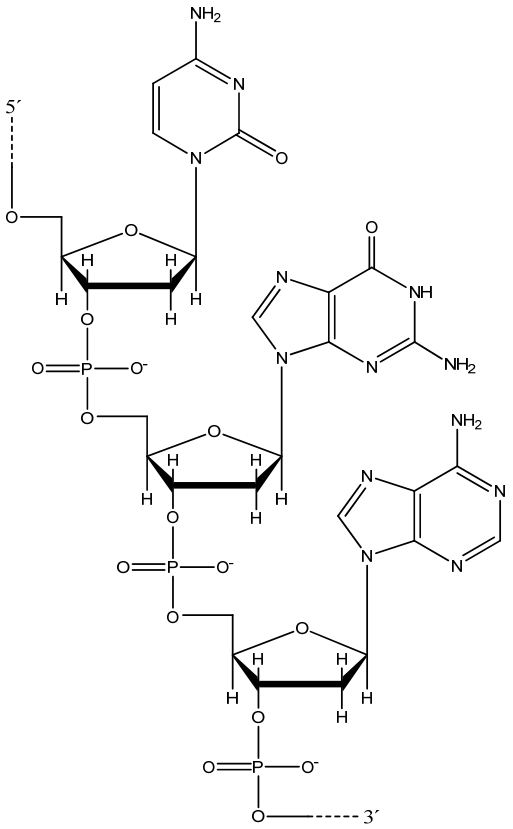


Abb. 6: Verknüpfung der Nukleotide durch Phosphodiesterbrücken

Im Jahre 1953 entdeckten Watson und Crick, dass die DNA aus zwei gegenläufigen Einzelsträngen aufgebaut ist, welche über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft sind[(11)]. Die Bildung von Basenpaaren findet dabei zwischen den komplementären Basen Adenin (A) und Thymin (T) sowie Guanin (G) und Cytosin (C) statt. Die Basenpaarung erfolgt demnach jeweils zwischen einer Purin- und einer Pyrimidinbase. Zwischen Adenin und Thymin bilden sich dabei zwei Wasserstoffbrücken aus. Cytosin und Guanin sind über drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden (Abb. 7).

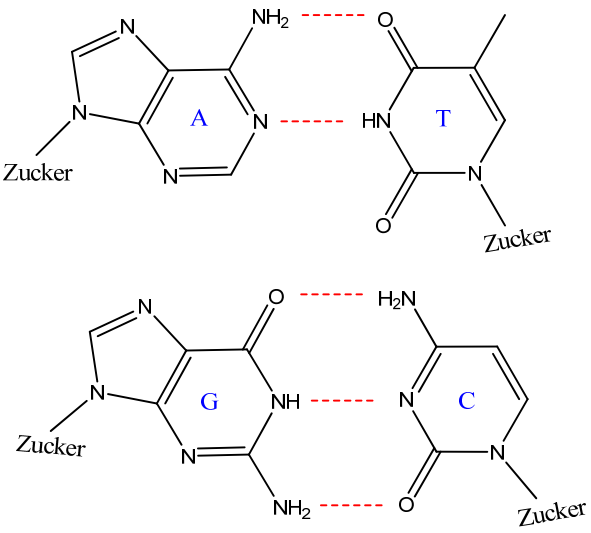


Abb. 7: Wasserstoffbrücken zwischen den Nucleobasen

Diese beiden Einzelstränge sind um eine gedachte Achse schraubenförmig gewunden und bilden eine Doppelhelixstruktur (Abb. 8). Im Organismus erfolgt die Biosynthese der DNA vom 5´ zum 3´ Ende.

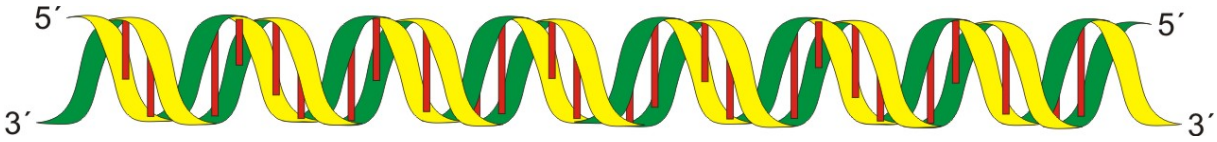


Abb. 8: schematische Darstellung der DNA-Doppelhelix

Normalerweise weist die DNA eine Rechtsdrehung auf, die so genannte B-Konformation. Hierbei sind die Basen in einem Abstand von 0,34nm annährend rechtwinklig zur Helixachse gestapelt. Jede Base ist gegenüber der vorhergehenden um einen Winkel von 35° gedreht. So enthält eine volle Windung der Helix um 360° etwa 10 Basenpaare bei einer Ganghöhe von 3,4nm. Zwischen den Rückgraten der beiden Einzelstränge gibt es zwei Furchen, die große Furche (major groove) und die etwas schmalere kleine Furche (minor groove) (Abb. 9). Unter bestimmten Bedingungen kann die DNA in die A-Konformation übergehen. Hierbei weist die rechtsgängige Doppelhelix eine Neigung auf, da die Basen nicht senkrecht zur Helix-Achse angeordnet sind. Wang et al. wiesen erstmals 1979 unter bestimmten Bedingungen auch eine Linksdrehung nach, die so genannte Z-DNA[12]. Ihre charakteristische Zickzack-Form tritt in der Regel in GC-reichen Teilsequenzen innerhalb der B-DNA auf. Im eukaryotischen Zellkern ist die DNA um basische Proteine (Histone) gewickelt.

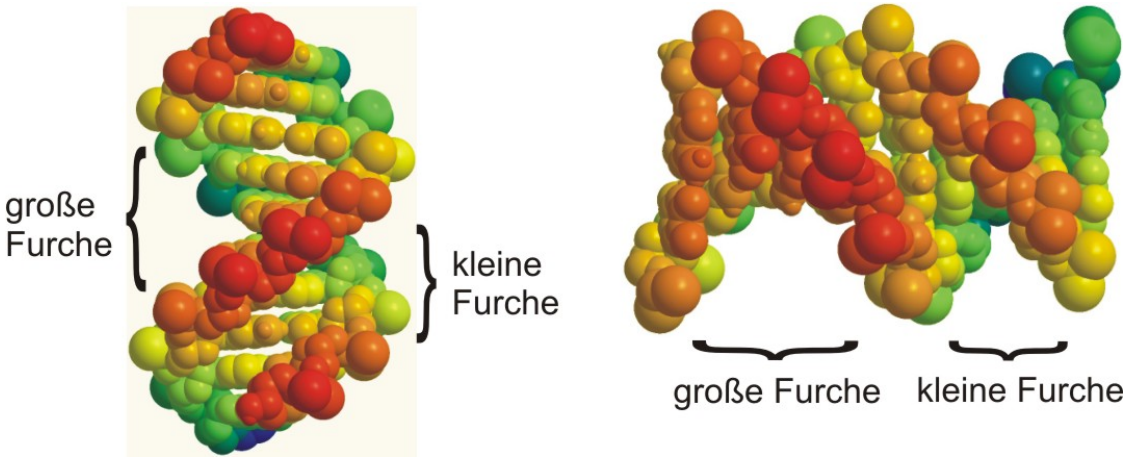


Abb. 9: große und kleine Furche in der B-DNA
(die rechte Darstellung ist gegenüber der Linken um 90° gedreht)

Unter physiologischen Bedingungen (~pH7) liegen die Nukleinsäuren aufgrund der dissoziierten Phophodiestergruppen als Polyanionen vor.

Bestimmte Abschnitte der DNA (Gene) enthalten die genetische Information zur Bildung von Proteinen. Die Basensequenz eines Genabschnitts der DNA wird zunächst durch Transkription mittels RNA-Polymerase in die komplementäre Basensequenz eines Ribonukleinsäure-Moleküls (mRNA) überschrieben. An den Ribosomen erfolgt schließlich die Synthese von Proteinen anhand der auf der mRNA vorliegenden Basensequenz. Jeweils 3 Basen kodieren eine Aminosäure und bilden somit ein Codon. Dieser Vorgang wird Translation genannt.

3.1.2. Struktur und Funktion von Proteinen und Peptiden

Die Bezeichnung Protein leitet sich vom griechischen „proteios“ für erstrangig ab und wurde von Berzelius (1838) geprägt. Tatsächlich sind diese Makromoleküle ein wichtiger Grundbaustein aller Zellen.
Bekannt sind Proteine unter anderem als Baustoffe für biologische Membranen, kontraktile Strukturen und die extrazelluläre Matrix. Aufgrund ihrer Strukturvielfalt und ihrer Flexibilität sind sie an vielen Prozessen beteiligt. Globuläre Proteine fungieren in Form von Enzymen als Biokatalysatoren, dienen als Hormone und Rezeptoren der Informationsübermittlung und sind z.B. als Ionenpumpen an Transportvorgängen in der Zelle beteiligt.
Proteine sind Polymere aus Aminosäuren. Bei der Polymerisation verbindet sich die terminale Carboxylgruppe einer Aminosäure (Abb. 10) unter Abspaltung von Wasser mit der α-Aminogruppe der nächsten Aminosäure. Die dabei entstehende mesomeriestabilisierte Säureamidbindung ist planar und wird als Peptidbindung bezeichnet.

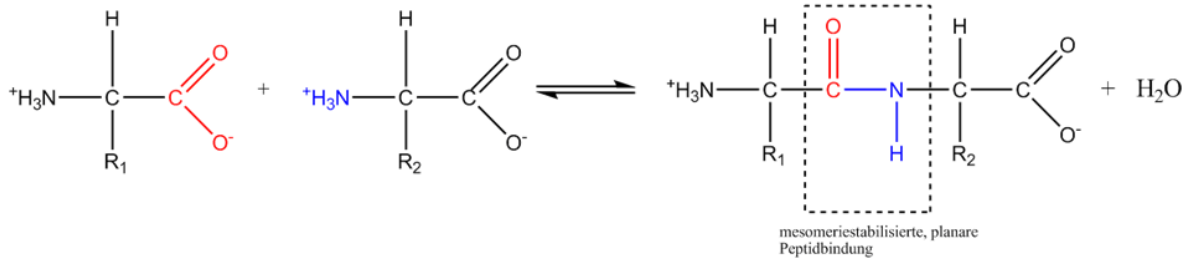


Abb. 10: Ausbildung einer Peptidbindung

Die Peptidbindung ist nicht frei drehbar, da eine Rotation um die partielle C-N-Doppelbindung nur unter hohem Energieaufwand möglich ist. Drehbar sind Peptide um die N-Cα- und Cα-C-Bindungen. Diese Rotationen werden durch die Diederwinkel φ (phi) und ψ (psi) beschrieben (Abb. 11).

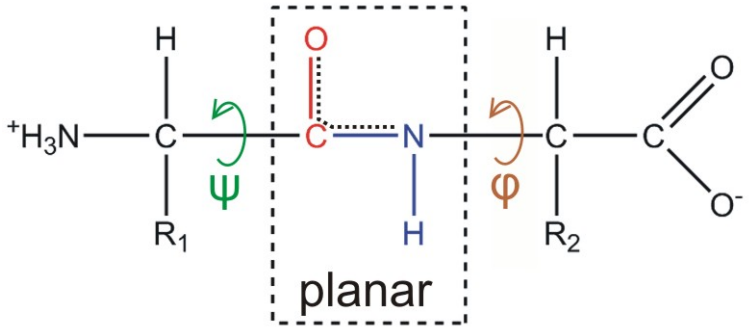


Abb. 11: Rotationen sind um die N-Cα-Bindung (φ) und die Cα-C-Bindunge (ψ) möglich

Für den Verlauf der Aminosäurekette sind aus sterischen Gründen nur bestimmte Kombinationen der Diederwinkel möglich. Polymere aus nur wenigen Aminosäuren bezeichnet man als Peptide, längere Ketten hingegen als Protein. Peptidketten bzw. Proteinketten haben immer eine N-terminale Aminogruppe und eine C-terminale Carboxylgruppe.
Alle Lebewesen, vom Prokaryoten bis zum Menschen, bauen durch Translation in der Regel 20 verschiedene α-L-Aminosäuren in Proteine ein. Bei einer Kettenlänge von 100 Aminosäuren ergeben sich dadurch 20^{100} bzw. $1{,}27 \times 10^{130}$ verschiedene Verknüpfungsmöglichkeiten.

Neben der Carboxylgruppe und der α-ständigen Aminogruppe besitzen Aminosäuren zum Teil weitere funktionelle Gruppen in den Seitenketten, wie z.B. die ε-Aminogruppe des Lysins, die Guanidinogruppe des Arginins, die Carboxylgruppe von Aspartat und Glutamat, die Sulfhydrylgruppe von Cystein sowie den endständigen Imidazolrest von Histidin. Sie sind für die Gesamtstruktur und die Funktion der Proteine ausschlaggebend.
Man unterscheidet die kugelförmigen, globulären Proteine und die fibrillären Proteine. Eine biologische Wirkung im Stoffwechsel zeigen meist die komplexer aufgebauten globulären Proteine, wie Enzyme, Plasmaproteine, Proteohormone, Hämoglobin und Myoglobin. Zu den fibrillären Proteinen gehören hingegen Strukturproteine, wie Kollagen und Fibrinogen.
Die Sequenz der Aminosäuren in einer Kette ergibt die Primärstruktur des Proteins. Als Sekundärstruktur bezeichnet man die durch Ausbildung von H-Brücken an bestimmten Segmenten der Peptidketten entstehende definierte Konformation (Abb. 12). Eine wichtige Rolle spielen hierbei häufig auftretende Kombinationen der Diederwinkel. Nehmen mehrere aufeinander folgende Abschnitte solche Konformationen ein, bilden sich definierte Sekundärstrukturen, die durch H-Brücken innerhalb der Peptidkette oder zwischen benachbarten Ketten stabilisiert werden.
Eine der häufigsten Sekundärstrukturen ist die rechtsgängige α-Helix (Abb. 12). Linksgängige α-Helices kommen in der Natur selten vor, obwohl sie energetisch möglich sind. Bei der rechtsgängigen α-Helix ist die Peptidkette schraubenförmig gewunden. Etwa 3,6 Aminosäuren entfallen auf jede Umdrehung der Schraube mit einer Ganghöhe von 0,54 nm. Die Ganghöhe beschreibt die kleinste Distanz zwischen zwei äquivalenten Punkten der Schraube. Zur Stabilisierung dienen Wasserstoff-Brücken zwischen den NH- und CO-Gruppen der Hauptkette, die in der Sequenz jeweils um 4 Positionen voneinander entfernt liegen.
Die Collagen-Helix ist eine weitere Helix-Form. Dabei handelt es sich um eine linksgängige Helix mit 3,3 Aminosäuren pro Windung und einer Ganghöhe von 0,96 nm. Es werden jedoch keine H-Brücken zur Stabilisierung der Struktur ausgebildet. Erst durch das Zusammenlagern von drei Helices wird die stabile rechtsgängige Collagen-Tripelhelix gebildet.
Bei der β-Faltblatt Struktur sind die Peptidebenen wie auf einem regelmäßig gefalteten Papierblatt angeordnet (Abb. 12). Hierbei werden H-Brücken nur zwischen benachbarten Ketten ausgebildet. Unterschieden wird zwischen dem antiparallelen Faltblatt mit antiparallel verlaufenden Strängen und dem parallelen Faltblatt mit parallel verlaufenden Strängen. Energetisch sind antiparallele Strukturen günstiger. In beiden Fällen liegen die α-C-Atome an den höchsten und tiefsten Punkten der Struktur, während die Seitenketten abwechselnd fast senkrecht nach oben oder unten ragen.
Sogenannte β-Schleifen führen zu einer Richtungsumkehr der Peptidkette. Dabei sind 4 Aminosäuren so angeordnet, dass sich der Verlauf der Kette um etwa 180° in die Gegenrichtung umkehrt. Die Schleifen werden häufig durch eine Wasserstoff-Brücke zwischen den Resten 1 und 4 stabilisiert. Mehrere, durch β-Schleifen verbundene, β-Stränge können eine stabile β-Barrel Tertiärstruktur bilden.
Als Tertiärstruktur wird die dreidimensional gefaltete biologisch aktive Konformation eines Proteins bezeichnet (Abb. 12). Die ebenfalls biologisch aktive Quartärstruktur entsteht durch Ausbildung von Komplexen aus einzelnen identischen oder nicht identischen Untereinheiten.

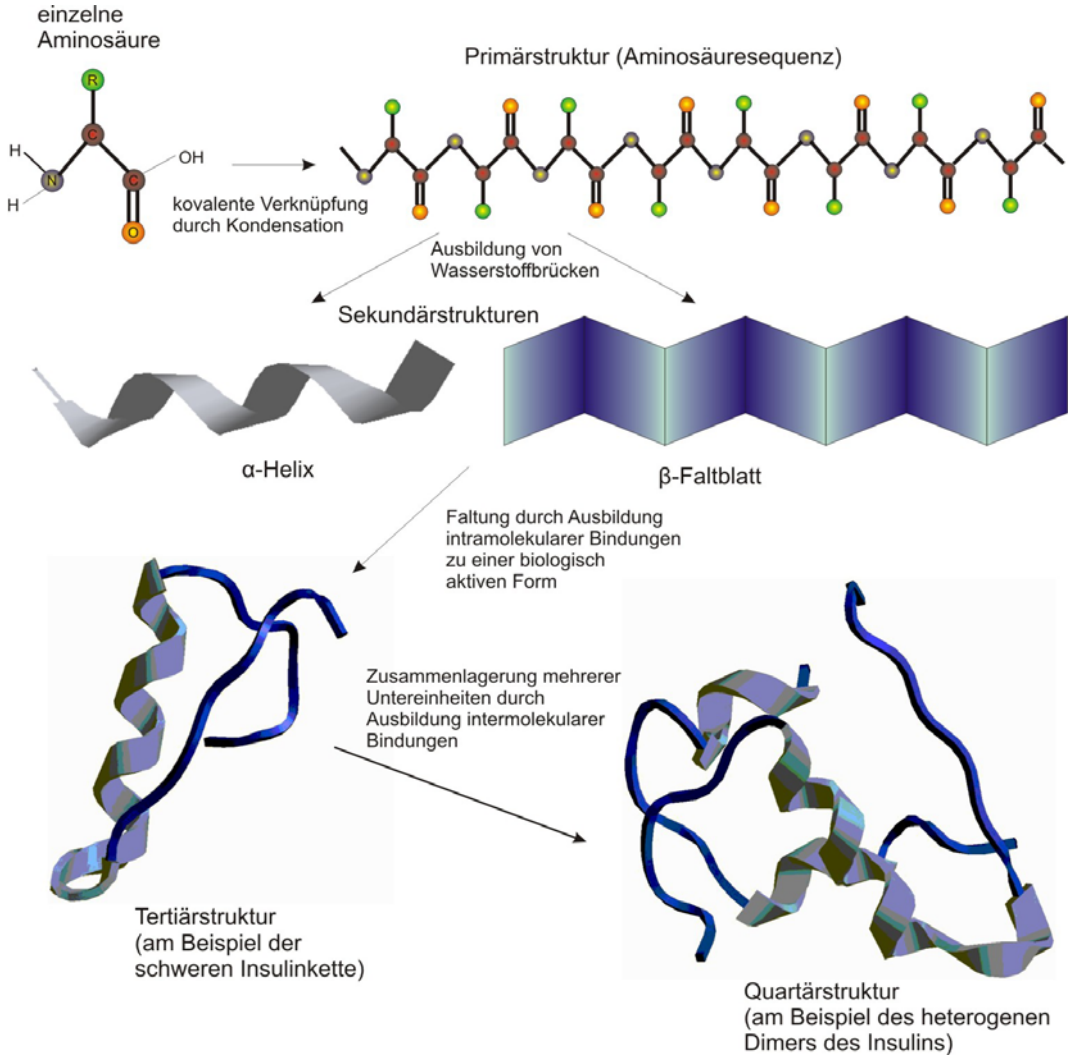


Abb. 12: Ausbildung der Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrutur eines Proteins

Die primäre Aminosäuresequenz bedingt bereits die spätere Konformation eines Proteins in der biologisch aktiven Form. Obwohl energetisch günstige, höhere Strukturen der Proteine bereits in vitro spontan entstehen, unterstützen im Organismus Hilfsproteine (Chaperone) die Faltung.
Zu den konformationsstabilisierenden Wechselwirkungen gehören Wasserstoffbrücken, Disulfidbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, die Komplexbildung mit Metallionen sowie hydrophobe Effekte. Als Folge hydrophober Wechselwirkungen falten sich lösliche Proteine so, dass die meisten unpolaren Aminosäuren-Seitenketten im Inneren des Moleküls liegen, wohingegen die polaren Aminosäuren-Ketten zum wässrigen Medium hin ausgerichtet sind.
Man unterscheidet zwischen einfachen Proteinen, die ausschließlich aus Aminosäuren bestehen, und den posttranslational modifizierten Proteinen, die weitere Bestandteile wie Nukleotide, Mono- und Polysaccharide, Porphyrine, Flavine, Lipide und Metalle enthalten. Diese können kovalent oder nicht kovalent an das Grundprotein gebunden sein.

3.2. Chemische Synthese von Oligonukleotiden

3.2.1. Festphasensynthese von Oligonukleotiden

Das zuerst von Letsinger und Mahadevan[13] beschriebene Prinzip der trägergebundenen Oligonukleotidsynthese (Abb. 13) bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Synthese in Lösung. So ist nicht nach jedem Syntheseschritt eine mühsame Aufreinigung und Isolierung der Zwischenstufen notwendig, sondern die im Überschuss eingesetzten, nicht umgesetzten Reagenzien sowie entstandene Nebenprodukte können einfach durch Filtration abgetrennt werden. Auf diese Weise wird auch die Handhabung kleinster Mengen über eine vielstufige Synthese hinweg möglich. Außerdem ist eine Automatisierung des Syntheseablaufes möglich, was eine erhebliche Zeit- und Kostenersparnis mit sich bringt.

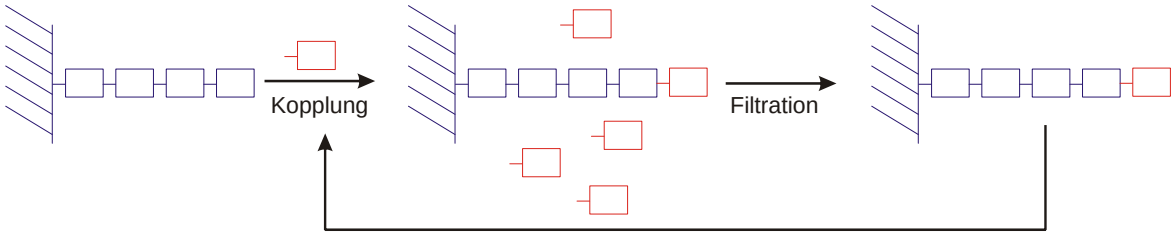


Abb. 13: Prinzip der trägergebundenen Oligonukleotidsynthese

3.2.1.1. Die Phosphorigsäureesteramid-Methode

Neben der ebenfalls etablierten H-Phosphonat-Methode[14] kommt in heutigen modernen Syntheseautomaten fast ausschließlich die von Beaucage und Caruthers[15] eingeführte Phosphorigsäureesteramid-Methode oder kurz Phosphoramidit-Methode zur trägergebundenen Oligonukleotidsynthese zum Einsatz. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der 1976 von Letsinger[16] beschriebenen Phosphittriester-Methode, die aufgrund der extremen Hydrolyseempfindlichleit der verwendeten Phosphorigsäuredichloride nur bedingt für die automatisierte Festphasensynthese geeignet war.
Die Synthesemaßstäbe reichen heutzutage von wenigen nmol bis hin zu mehreren µmol. Mit modernen Geräten sind durchaus Kettenlängen von mehr als 100 Nukleotiden möglich, wobei die Endausbeute aber aufgrund unvollständiger Kopplungen immer weiter abfällt. Die Dauer eines Synthesezyklus (Abb. 20) beträgt, abhängig vom verwendeten Maßstab, zwischen 3 und 8 Minuten.
Der wichtigste Schritt eines Synthesezyklus ist die Kopplung der 5´-Hydroxylgruppe der am Träger verankerten, wachsenden Kette mit der 3´-Phosphatgruppe des neuen Bausteins unter Ausbildung einer Phosphordiester-Bindung. Die Synthese verläuft also, bei Verwendung von Standard-Bausteinen, vom 3´zum 5´ Ende der Sequenz.
Als Bausteine verwendet man aktivierte Phosphorigsäureesteramide (Abb. 14) welche stark hydrolyseempfindlich sind und somit absolut wasserfreie Lösungsmittel und Reaktionsbedingungen erfördern.
Außerdem müssen die funktionellen Gruppen der Bausteine sowie auch der wachsenden Kette durch permanente bzw. selektiv entfernbare, temporäre Schutzgruppen blockiert werden, wodurch ein orthogonales Schutzgruppensystem notwendig wird.

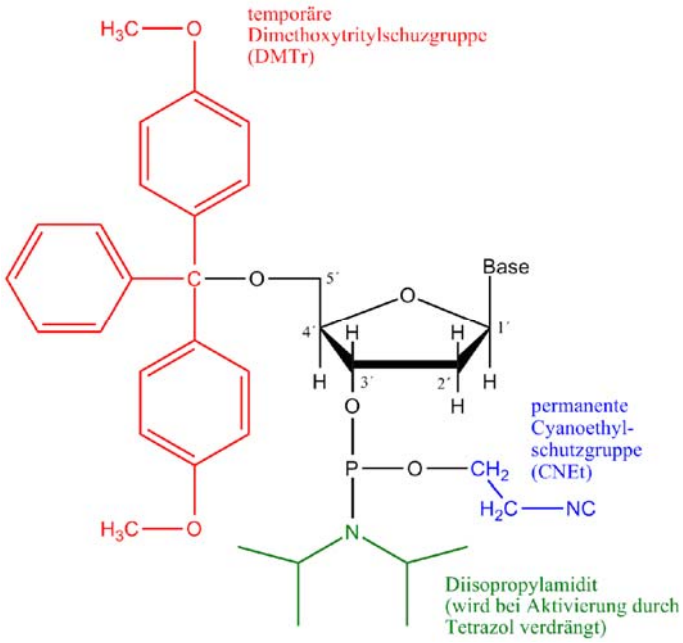


Abb. 14: ein in der Phosphorigsäureesteramid-Festphasensynthese verwendeter Baustein (Amidit)

Als temporäre Schutzgruppe für die 5´-Hydroxylfunktion wird im Allgemeinen eine 4,4´-Dimethoxytritylschutzgruppe (DMT-Gruppe) verwendet (Abb. 14). Diese äußerst säurelabile Gruppe wird nach einem erfolgten Synthesezyklus durch eine milde Säure wie z.B. 3%ige Trichloressigsäure in Dichlormethan abgespalten.
Da durch Verwendung einer Säure eine selektive Abspaltung der DMT-Gruppe möglich wird, ist diese temporäre Schutzgruppe orthogonal zu den ebenfalls verwendeten basenlabilen permanenten Schutzgruppen.

Der Schutz der Phosphatfunktion am 3´-Ende eines Monomer-Bausteins sowie der Phosphat-Brücke in der wachsenden Kette erfolgt durch eine β-Cyanoethylgruppe (Abb. 14) welche erst am Ende der gesamten Synthese durch konzentrierten Ammoniak abgespalten wird.

Ebenfalls permanent geschützt werden die exozyklischen Aminogruppen der Nukleobasen. Dabei wird Adenin durch Benzoylierung am N6 (Abb. 16), Cytosin durch Benzoylierung am N4 (Abb. 15) und Guanin durch eine Isobutyryl-Gruppe am N4 (Abb. 17) blockiert. Thymin enthält keine exozyklischen Aminogruppen und kann daher ungeschützt bleiben (Abb. 18).

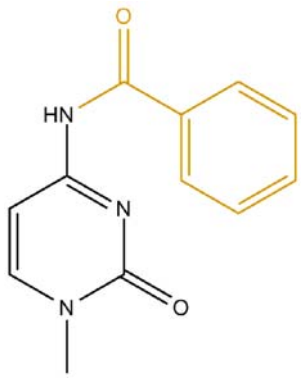


Abb. 15: Benzoylschutzgruppe des Cytosins

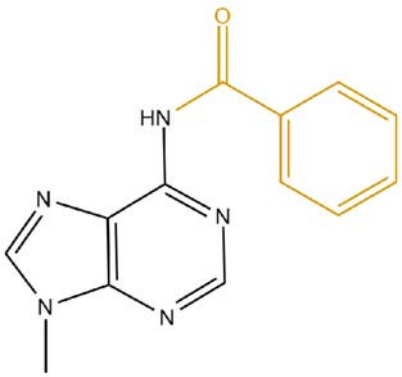


Abb. 16: Benzoylschutzgruppe des Adenins

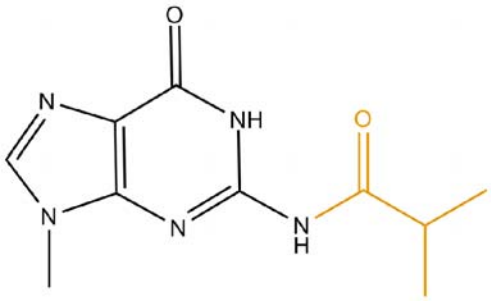


Abb. 17: Isobutyrylschutzgruppe des Guanins

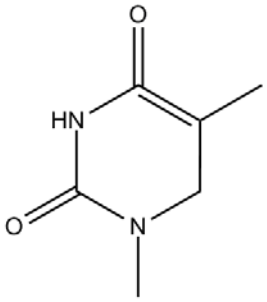


Abb. 18: ungeschütztes Thymin

3.2.1.2. Trägermaterialien

Als Trägermaterial für die Oligonukleotid-Festphasensynthese kommt neben den seltener verwendeten oberflächenfunktionalisierten Matrices wie Polystyrol, Silicagel und Cellulose in erster Linie Controlled Pore Glass (CPG) zum Einsatz.
Dieses chemisch inerte, nicht quellbare, poröse Material besteht aus Glaspartikeln mit Durchmessern von ca. 10µm und definierten Porengrößen von 500-1000Å, wodurch die Oberfläche und somit auch die Reaktionsfläche stark vergrößert werden.
Da die sterische Hinderung in unmittelbarer Oberflächennähe zu groß wäre, muß der Startpunkt der Synthese mittels eines Spacers weiter nach außen verlagert werden. Ab einer gewissen Länge des Spacers ist die sterische Hinderung fast wieder so gering wie in Lösung. Dieser Spacer, auch lcaa (long chain aminoalkyl) genannt, liefert auch die primäre Amingruppe, an der weitere Funktionalisierungen des Supports durchgeführt werden können.

Das fertige Oligonukleotid, welches am Ende der Synthese vom Träger abgespalten wird, soll an seinem 3´-Ende eine Hydroxylgruppe tragen. Da das erste Phosphorigsäureesteramid, welches im Synthesezyklus angekoppelt wird, allerdings am 3´-Ende eine geschützte Phosphatfunktion besitzt, muß die spätere 3´-Hydroxylgruppe bereits durch den Support bzw. durch das Spacer-Linkersystem bereitgestellt werden.
Dies geschieht dadurch, dass das erste Nukleotid, welches später den 3´-Terminus bilden soll, schon von vornherein in Form eines voll geschützten Nukleosids über seine 3´-Hydroxylgruppe mit einer Succinat-Brücke (Bernsteinsäure) verestert ist (Abb. 19). Diese ist über einen Aminolinker (lcaa) an das Trägermaterial gebunden. Die Ester-Bindung der Succinat-Brücke dient dabei später als Spaltstelle, um das Syntheseprodukt vom Support abzuspalten.

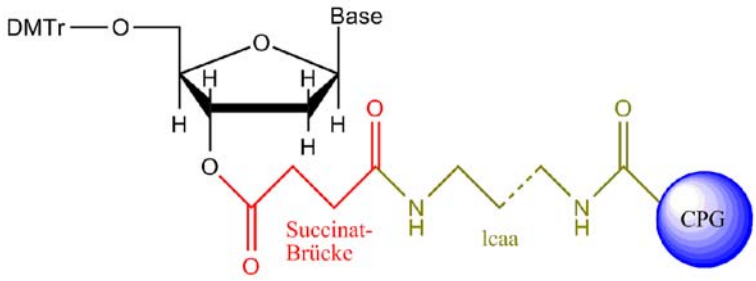


Abb. 19: Verankerung des ersten Nukleosids am Träger

Je nachdem, welche Base das 3´-Ende des Oligonukleotids bilden soll, werden demnach 4 verschiedene Träger verwendet.
Die Beladung, also die Anzahl der für den Synthesestart zur Verfügung stehenden Hydroxylgruppen, liegt bei 30-50µmol/g.

3.2.1.3. Der Synthesezyklus

Der typische, vollautomatisierte Synthesezyklus der Phosphorigsäureesteramid-Festphasensynthese besteht aus 4 Teilschritten (Abb. 20).

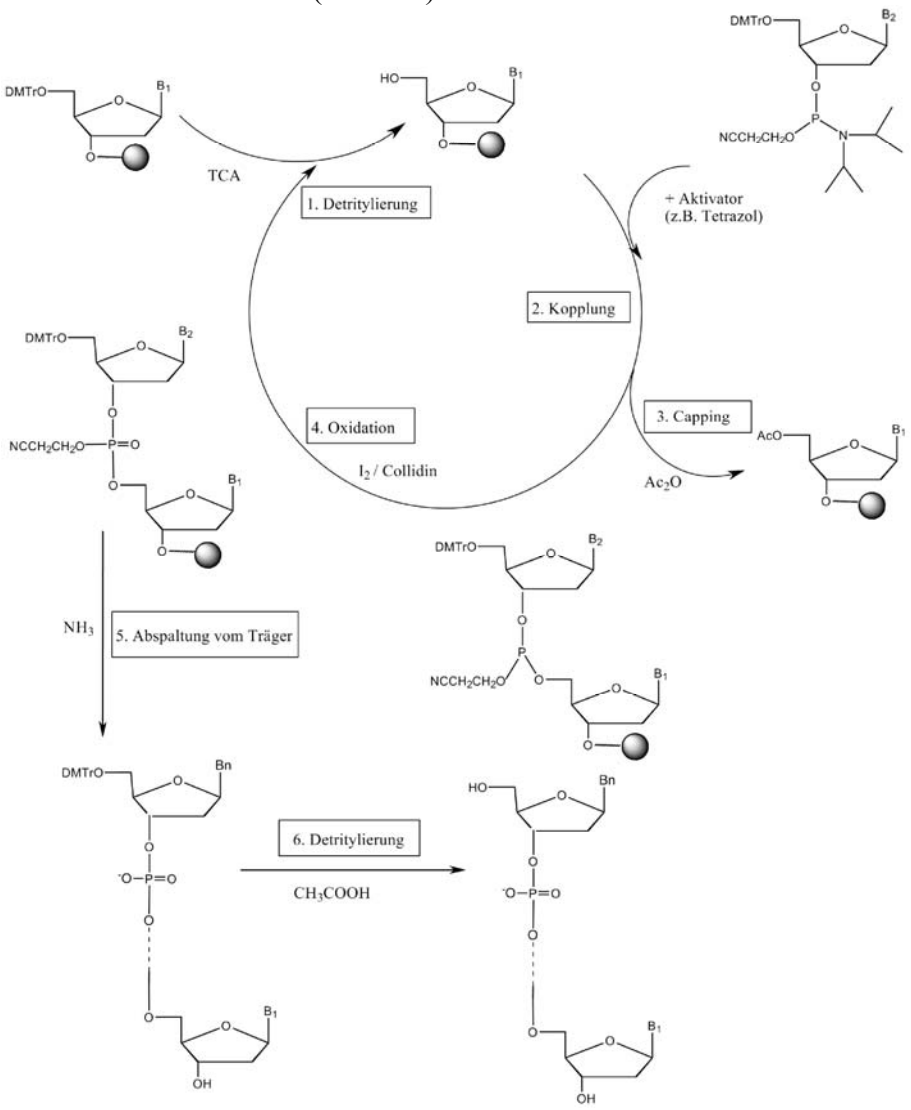


Abb. 20: Der Synthesezyklus der Phosphorigsäureesteramid-Festphasensynthese

Der Zyklus beginnt mit der säurekatalysierten Abspaltung der temporären 5´-DMT Schutzgruppe der wachsenden Kette (Abb. 21). Um Depurinierungen zu vermeiden, wird hierzu eine milde Säure wie 3%ige Trichloressigsäure (TCA) in Dichlormethan (DCM) eingesetzt.

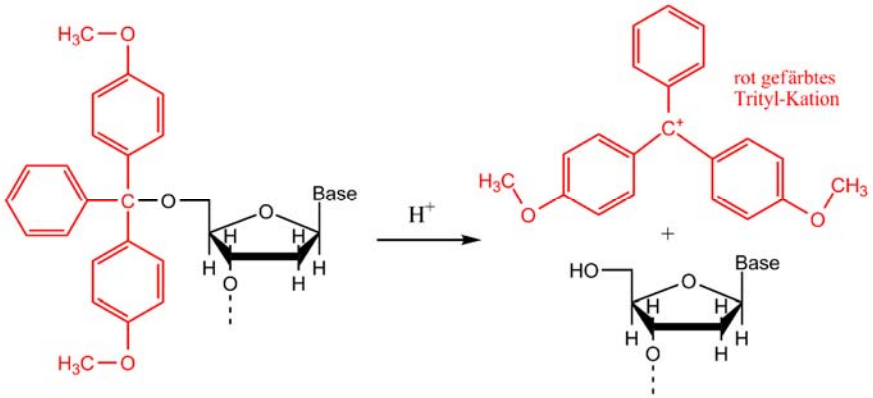


Abb. 21: Entschützung durch Abspaltung der Tritylgruppe

Das beim Entschützen freigesetzte 4,4´-Dimethoxytrityl-Kation weist eine intensive Orangefärbung auf. Die Absorption kann bei einer Wellenlänge von 436nm vermessen werden. Durch die so ermittelten Tritylwerte sind Rückschlüsse auf die Effizienz der erfolgten Kopplung möglich.
Die verwendeten Phosphorigsäureesteramide beinhalten Phosphor in der Oxidationsstufe +III. Dieser ist aufgrund von Elektronenmangel gegenüber Elektronendonoren, wie z.B. dem als Aktivator verwendeten Tetrazol oder Dicyanoimidazol (DCI), reaktiver als in der Oxidationsstufe +V, wie sie üblicherweise in der DNA vorkommt. Daher reagiert der Aktivator mit dem Diisopropylphosphorigsäureesteramid unter Verdrängung von Diisopropylamin offenbar zu einem intermediären Tetrazolid, welches sich spontan mit der 5´-Hydroxylgruppe der wachsenden Kette umsetzt (Abb. 22).

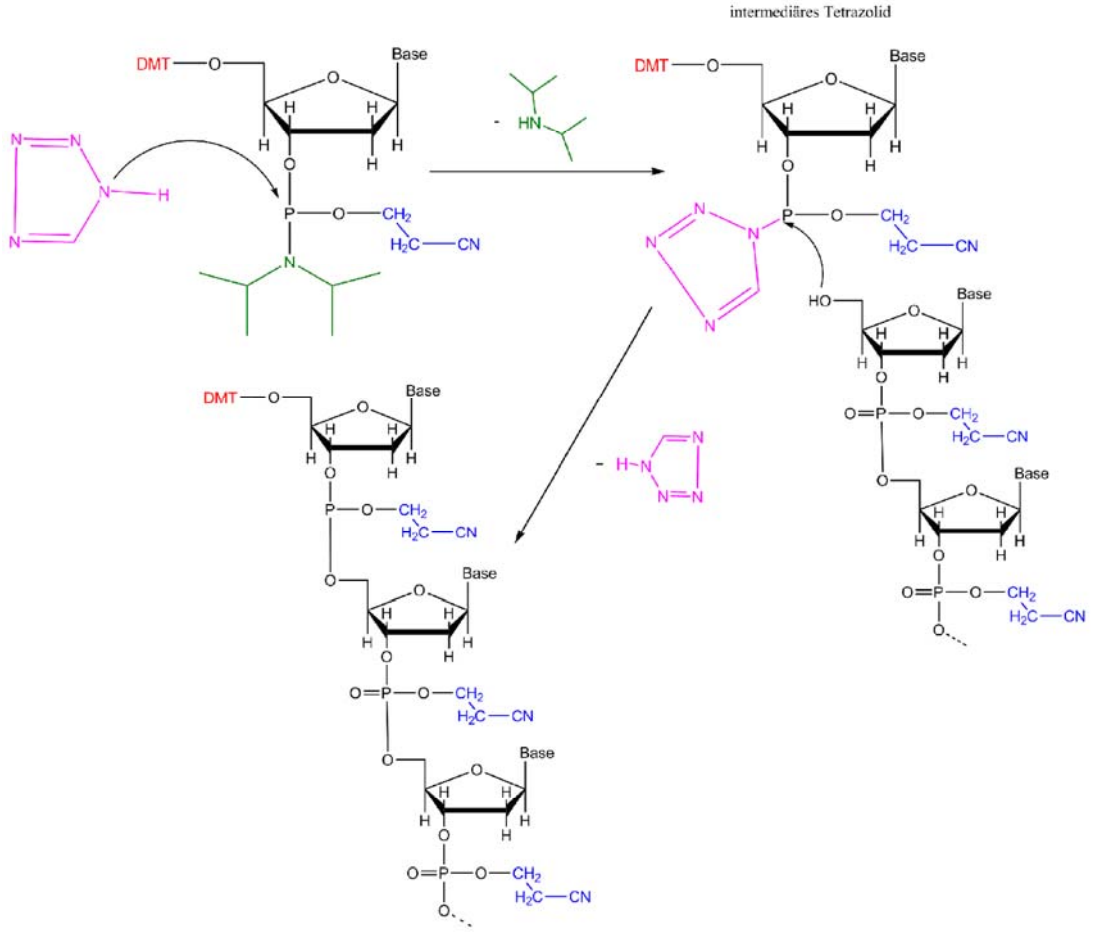


Abb. 22: Kopplung mittels Tetrazol

Da sowohl Monomere als auch Aktivator in großem Überschuss eingesetzt werden, erreicht man Kopplungsausbeuten von bis zu 99,5%. Dennoch würden die verbliebenen 0,5% an nicht verlängerten Sequenzen pro Kopplungsschritt bei einer Oligonukleotidlänge von 20 Basen zu einer beachtlichen Menge von $100x(1-0{,}995^{20}) = 10\%$ an undefinierten Fehlsequenzen führen. Um dies zu vermeiden, werden die Hydroxylgruppen der nicht verlängerten Ketten in einem „Capping“-Schritt mittels einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Collidin acetyliert, und somit eine Weiterreaktion größtenteils unterbunden (Abb. 23).

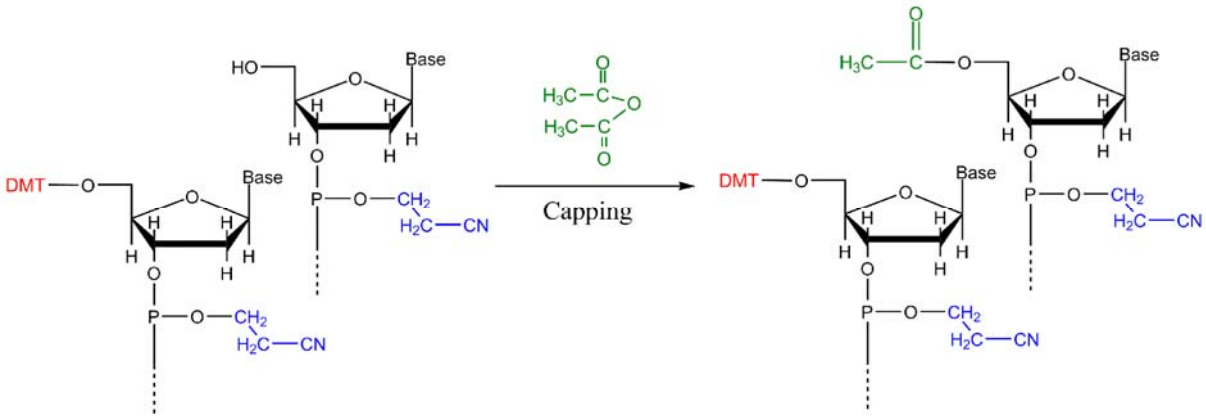


Abb. 23: Blockierung (Capping) der unreagierten Hydroxylgruppen durch Acetylierung

Der Syntheszyklus endet mit der Oxidation des neu eingeführte Phosphorigsäuretriesters (+III) zum stabileren Phosphorsäuretriester (+V) durch Einwirkung eines Gemisches von Jod und Collidin in wässriger Lösung (Abb. 24).

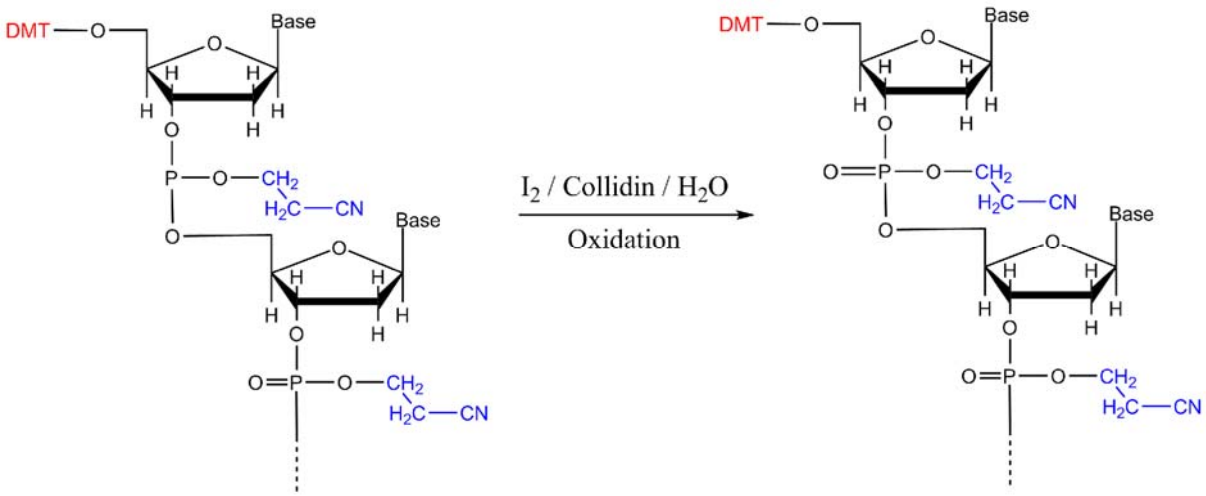


Abb. 24: Oxidation des Phosphors von +III auf +V

Da bei der Oxidation oftmals einige Acetylgruppen der „gecappten“ Sequenzen abgespalten werden, wird in modifizierten Syntheseprotokollen abschließend noch ein weiterer Capping-Schritt angefügt.
Der komplette Synthesezyklus wird so oft wiederholt, bis am Ende ein Oligonukleotid mit der gewünschten Sequenz vorliegt.
Nach Beendigung der Synthese wird durch Einwirkung von konzentriertem Ammoniak die Succinat-Brücke gespalten und das fertige Oliginukleotid vom Träger abgetrennt (Abb. 25).

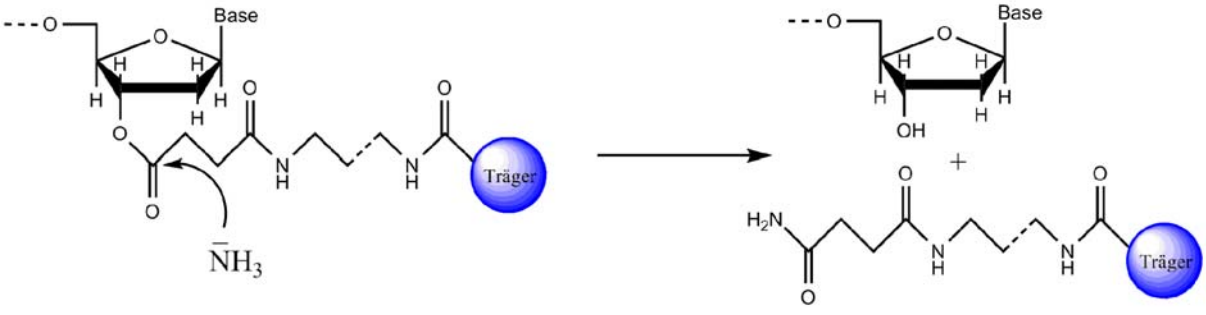


Abb. 25: Abspaltung des fertigen Oligonukleotids vom Träger

Dabei werden auch die permanenten, exozyklischen Aminoschutzgruppen der Nukleobasen (Abb. 26) sowie die Cyanoethyl-Schutzgruppe des Phosphotriesters (Abb. 27) abgespalten.

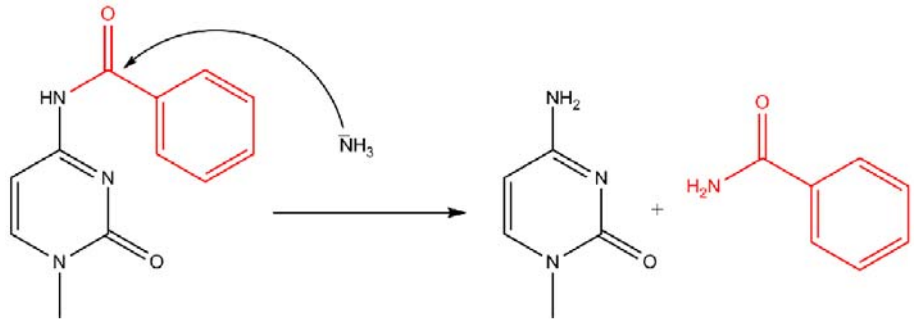


Abb. 26: Abspaltung der exozyklischen Aminoschutzgruppen

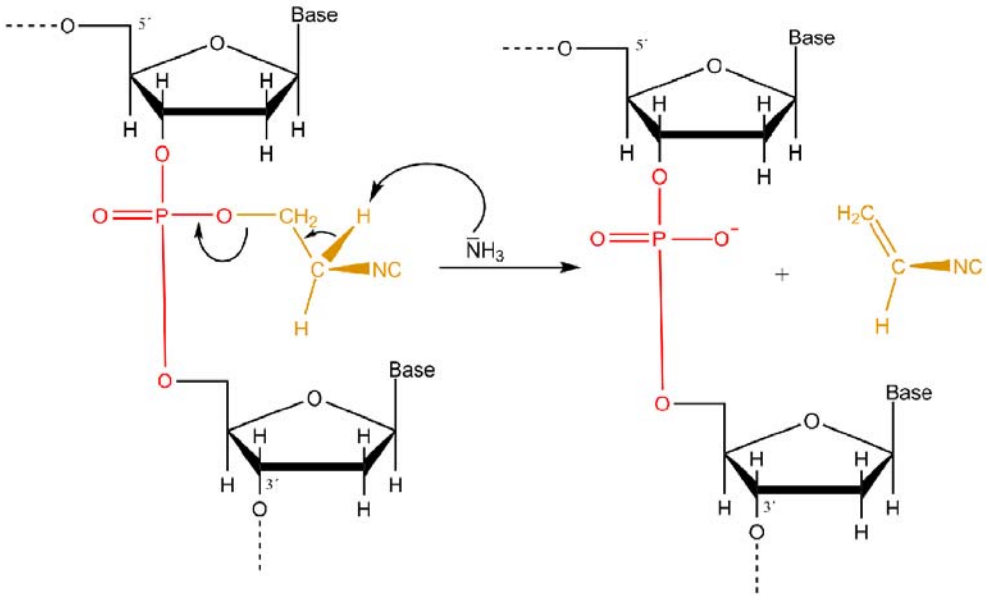


Abb. 27: Abspaltung der Cyanoethylschutzgruppe durch β-Eliminierung

Verbleibt die unter alkalischen Bedingungen stabile DMT-Schutzgruppe nach der Synthese am 5´-Ende, so kann sie aufgrund ihrer starken Hydrophobie zur Abtrennung der kompletten Sequenzen von den verkürzten, gecappten Sequenzen mittels RP-HPLC genutzt werden. Die Abspaltung erfolgt nach der Aufreinigung durch Einwirkung von 80%iger Essigsäure.

3.2.1.4. Modifizierte Oligonukleotide

Das Anwendungsspektrum und somit auch der Bedarf an modifizierten Oligonukleotiden ist in den letzten Jahren stetig angewachsen. So kann durch Modifizierung der nativen DNA-Struktur beispielsweise die Stabilität von Antisense-Oligonukleotiden gegenüber Nukleasen, oder ihre Fähigkeit zur Membranpassage erhöht werden. Auch kann durch Einführung von Fluoreszenzmarkern die Aufnahme sowie die Verteilung innerhalb einer Zelle bestimmt werden wofür früher radioaktive Markierungen nötig waren. Wichtig ist auch die durch entsprechende Modifikationen gegebene Möglichkeit zur postsynthetischen Kopplung der fertigen Oligonukleotide mit anderen Molekülen oder an Oberflächen.

Man kann prinzipiell zwischen Modifikationen der Zuckerbausteine, der Phosphatbrücke sowie terminalen Modifikationen unterscheiden.
Ein Beispiel für die Modifikation der Ribose ist die sogenannte „Locked Nucleic Acid“ oder LNA[17]. Bei den LNA-Nukleotiden existiert eine Methylenbrücke zwischen dem C4-Atom und der 2´-Hydroxylgruppe der Ribose, wodurch der Zuckerbaustein in seiner 3´-endo Konformation fixiert wird. Dies steigert die Fähigkeit zur Basenstapelung und führt somit zu einem höheren Schmelzpunkt (Abb. 28 und Abb. 29).

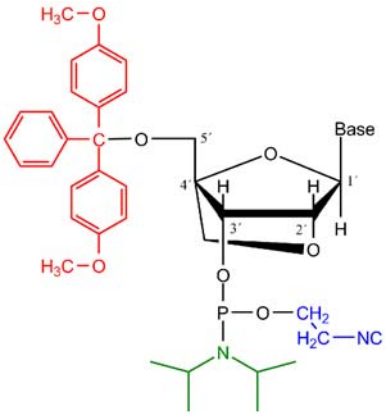


Abb. 28: LNA-Phosphorigsäureesteramid

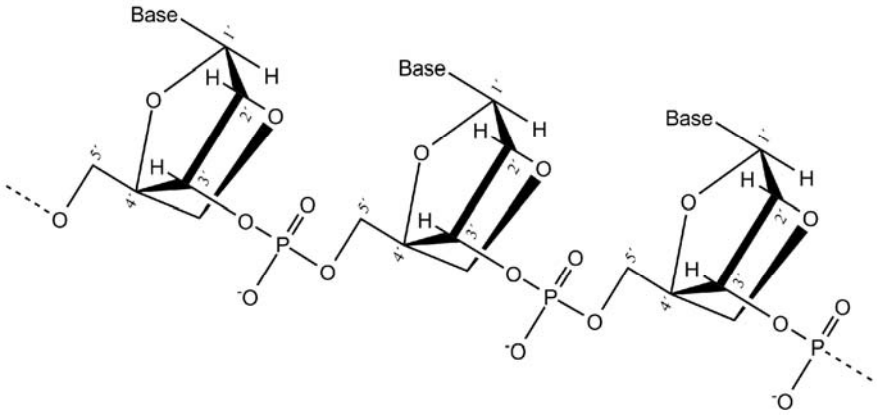


Abb. 29: Ausschnitt aus einem LNA-Oligonukleotid

Da die Kopplungschemie unverändert bleibt, können die LNA-Phosphorigsäureesteramide anstelle der Standard-Phosphorigsäureesteramide, sowie auch parallel zu diesen, im Syntheseautomat verwendet werden. Anwendung findet die LNA hauptsächlich in der DNA-Chiptechnologie sowie zur in-situ Detektion von miRNA[18].

Eine wichtige Modifikation der Phosphatbrücke ist der Austausch eines Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom. Diese sogenannten Oligonukleotidthiophosphate (Abb. 31) weisen eine wesentlich höhere Stabilität gegenüber Nukleasen auf als Oligonukleotide, welche in ihrer Form der nativen DNA entsprechen. Die Synthese erfolgt sehr einfach, indem beim Oxidationsschritt des Synthesezyklus, anstelle der Mischung aus Jod und Collidin, ein Sulfurierungsreagenz wie z.B. das Beaucage-Reagenz (Abb. 30) eingesetzt wird. Innerhalb eines Oligonukleotids können somit ohne weiteres Thiophosphatbrücken neben normalen Phosphatbrücken vorkommen.
Durch den Austausch nur eines Sauerstoffatoms mit Schwefel, wird das Phosphoratom der Phosphatbrücke allerdings zu einem Chiralitätszentrum mit 4 verschiedenen Substituenten. Da mehrere dieser Chiralitätszentren zu uneinheitlichen Molekülstrukturen führen, werden oft auch nur die endständigen Nukleotide als Thiophosphate eingeführt.

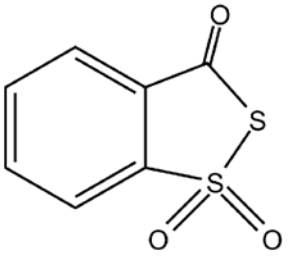


Abb. 30: Beaucage-Reagenz

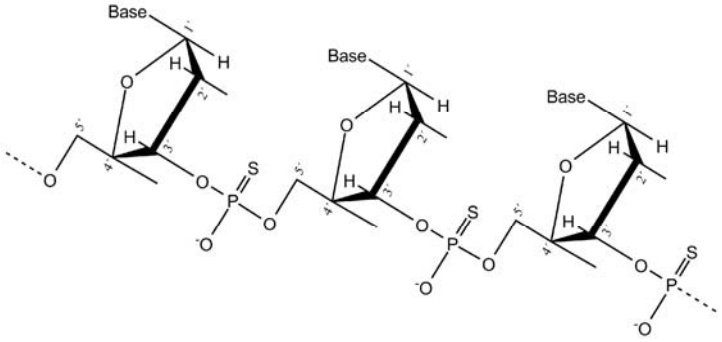


Abb. 31: Ausschnitt aus einem Oligonukleotid mit Thiophosphatbindungen

Die terminale Derivatisierung eines Oligonukleotids am 5´-Ende erfolgt durch den Einbau von modifizierten, meist nicht-nucleosidischen, Phosphorigsäreesteramiden im letzten Zyklus der Oligonukleotidsynthese. Modifikationen am 3´-Ende sind hingegen durch den Einsatz modifizierter Trägermaterialien möglich. Durch die Blockierung des 3´-Endes werden diese Oligonukleotide stabiler gegenüber den Abbau durch 3´-Exonukleasen.
Da bei 3´- sowie auch bei 5´-Modifikationen die gleiche Kopplungschemie wie bei Standard-Phosphorigsäreesteramiden bzw. Standard-Trägern angewendet wird, sind in der Regel keine Änderungen im Syntheseprotokoll notwendig.

Durch den Einsatz eines Aminolinkers (Abb. 32 und Abb. 33) erhält man ein Oligonukleotid, welches am 3´- bzw. 5´-Ende eine primäre Aminogruppe besitzt.

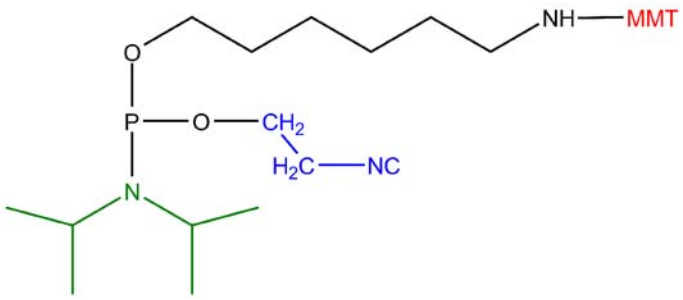


Abb. 32: Aminolinker-Phosphorigsäureesteramid für die 5´-Modifikation

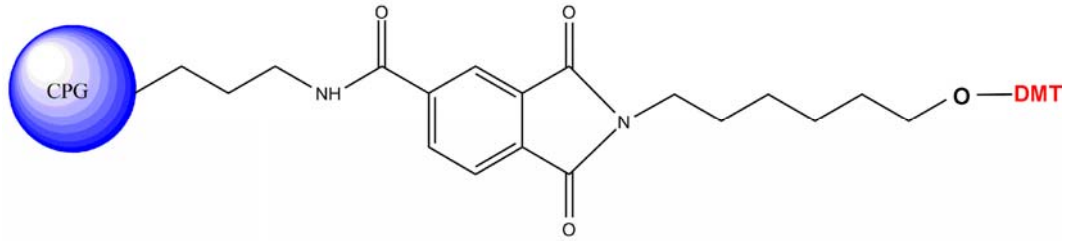


Abb. 33: Aminolinker-CPG für die 3´-Modifikation

An diese Aminogruppe können weitere Moleküle in Form von N-Hydroxysuccinimid-Estern (NHS-Ester) angekoppelt werden (Abb. 34). Auch ist eine Kopplung des Oligonukleotids an NHS-aktivierte Oberflächen möglich.

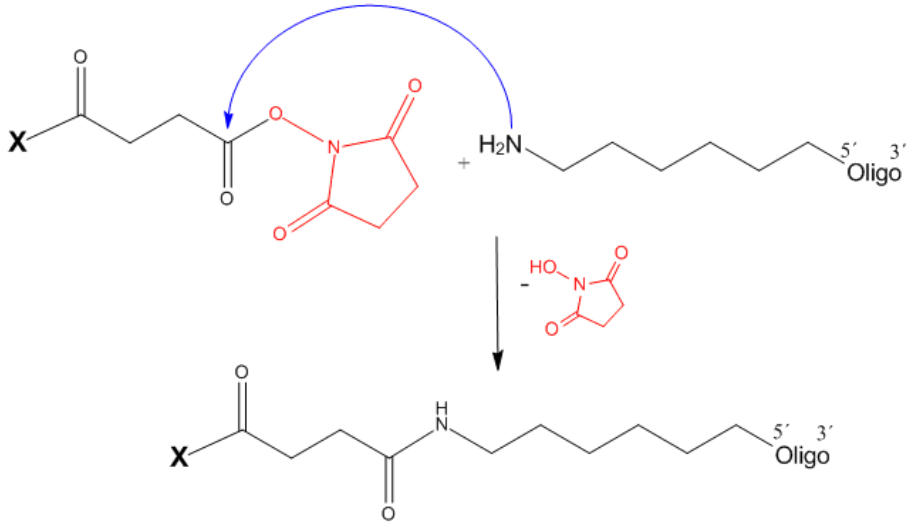


Abb. 34: Kopplung eines aminofunktionalisierten Oligonukleotids mit einem NHS-Ester

Die Verwendung eines Thiol-Linkers (Abb. 35 und Abb. 36) führt zu einem Oligonukleotid mit einer Disulfidbrücke am 3´- oder 5´-Ende.

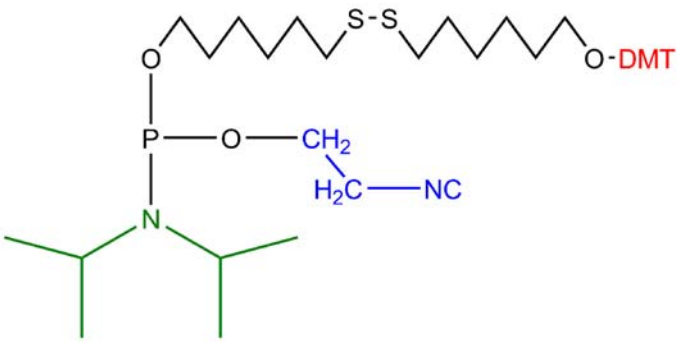


Abb. 35: Thiol-Linker Phosphorigsäureester-amid für die 5´-Modifikation

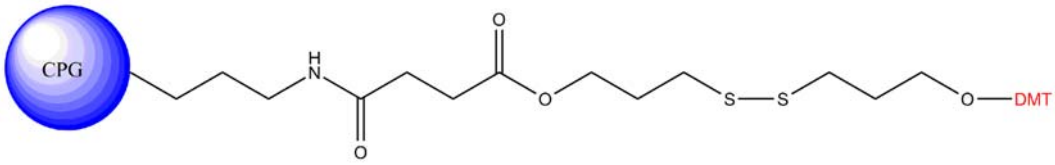


Abb. 36: Thiol-Linker-CPG für die 3´-Modifikation

Behandelt man das fertige Oligonukleotid mit Dithiothreitol, so wird die Disulfidbrücke gespalten und eine Thiolgruppe freigesetzt. Diese kann mit aktivierten Thiolgruppen weiterer Moleküle, wie z.B. Fluoreszenzmarkern oder Enzymen, umgesetzt werden, wodurch eine kovalente Kopplung auch größerer Moleküle an das Oligonukleotid möglich wird (Abb. 37).

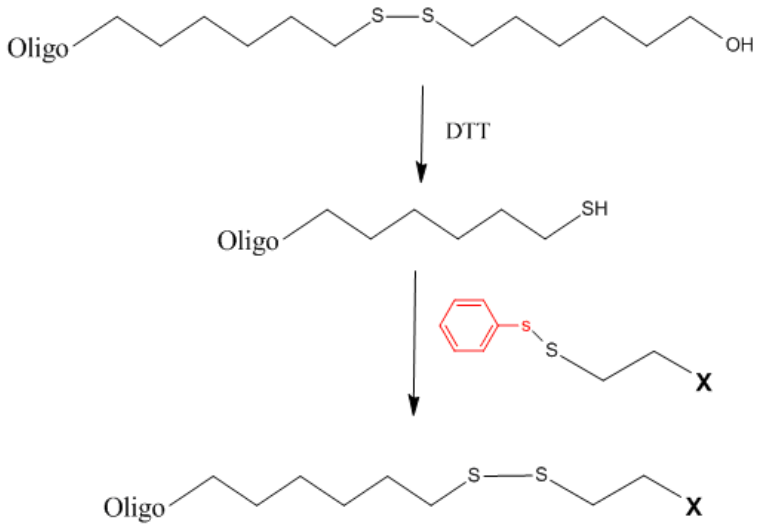


Abb. 37: Kopplung eines thiolfunktionalisierten Oligonukleotids mit einer anderen Thiolgruppe

Biotinylierte Oligonukleotide (Abb. 38 und Abb. 39) werden oft als diagnostische Sonden eingesetzt. Darüber hinaus ist auch eine nicht-kovalente Verknüpfung von biotinylierten Oligonukleotiden mit anderen Substanzen oder mit Oberflächen über Biotin-Streptavidin-Assoziation möglich.

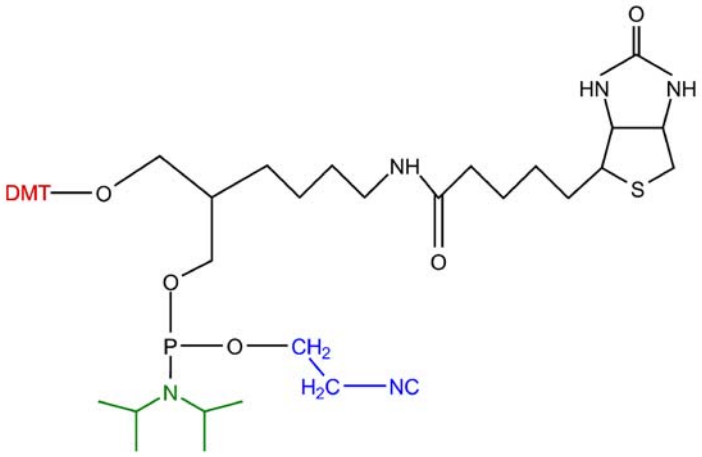


Abb. 38: Biotin Phosphorigsäureesteramid für die 5´-Modifikation

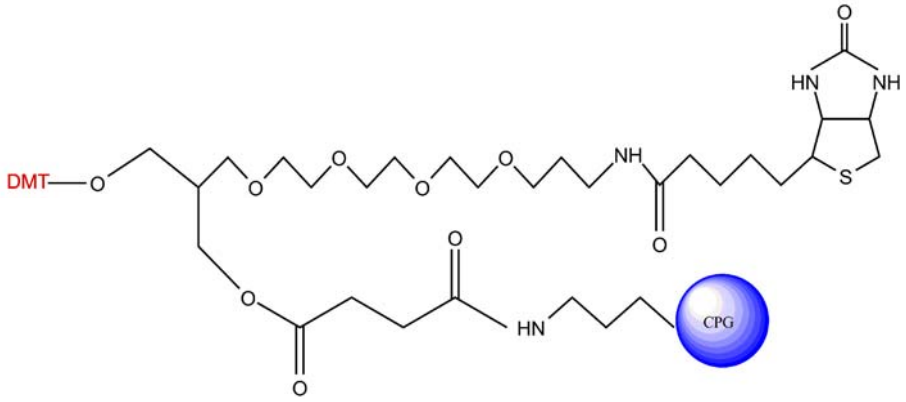


Abb. 39: Biotin-CPG für die 3´-Modifikation

Einen gewaltigen Fortschritt in der Visualisierung von intrazellulären Verteilungen sowie auch in der medizinischen Diagnostik erreichte man durch die Einführung von fluoresceinmarkierten Oligonukleotiden (Abb. 40 und Abb. 41). Für Untersuchungen dieser Art waren zuvor aufwendige radioaktive Markierungen notwendig, die nur in speziellen Laboratorien durchgeführt werden konnten.

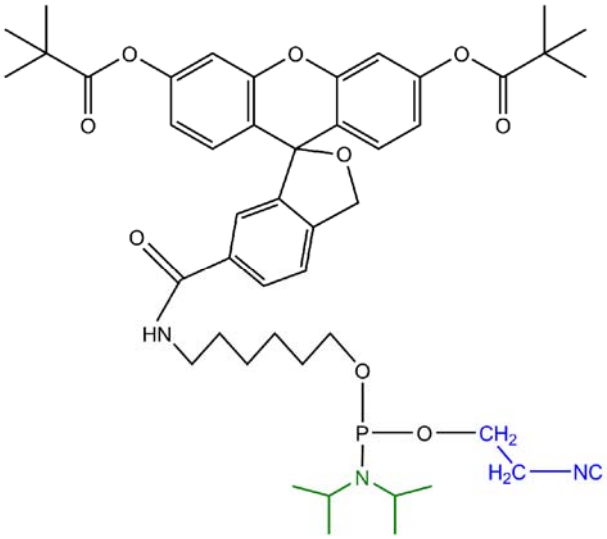


Abb. 40: Fluorescein Phosphorigsäureesteramid für die 5´-Modifikation

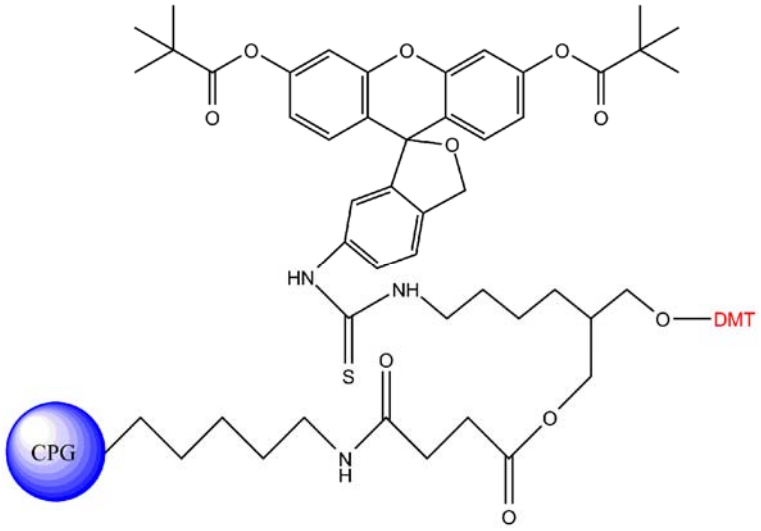


Abb. 41: Fluorescein-CPG für die 3´-Modifikation

Neben der Fluorescein-Modifikation sind heute auch Phosphorigsäureesteramide bzw. Trägermaterialien mit anderen Farbstoffen wie z.B. FAM, TAMRA oder Cy gebräuchlich. Da jeder dieser Farbstoffe ein anderes Absorptionsmaximum aufweist, sind auch parallele Untersuchungen mit unterschiedlich markierten Oligonukleotiden möglich.

3.3. Chemische Synthese von Peptiden

Chemisch synthetisierte Peptide erlangen eine immer höhere Bedeutung sowohl in der pharmakologischen Wirkstoffentwicklung, wie z.B. der Synthese von Hormonpräparaten, als auch bei der Strukturaufklärung bioaktiver Proteine wie Hormonen und Neurotransmittern. Synthetisierte Teilbereiche dienen zur Epitopcharakterisierung viraler Oberflächenproteine, zur Identifikation der Primärsequenz sowie zur Konformationsanalyse. Daraus abgeleitete synthetische Impfstoffe dienen sowohl zu direkten Immunisierung wie auch zur gezielten Gewinnung spezifischer Antikörper.
Das Grundprinzip der chemischen Peptidsynthese ist ein sukzessiver Aufbau einer Peptidkette aus einzelnen Aminosäure-Bausteinen. Die Synthese erfolgt dabei vom C-Terminus zum N-Terminus durch Kondensationsreaktionen unter Knüpfung einer Amidbindung.
Aufgrund möglicher Mehrfachkopplungen sowie Kopplungen an beiden Kettenenden kommt es dabei allerdings zwangsläufig zu uneinheitlichen Produktgemischen (Abb. 42).

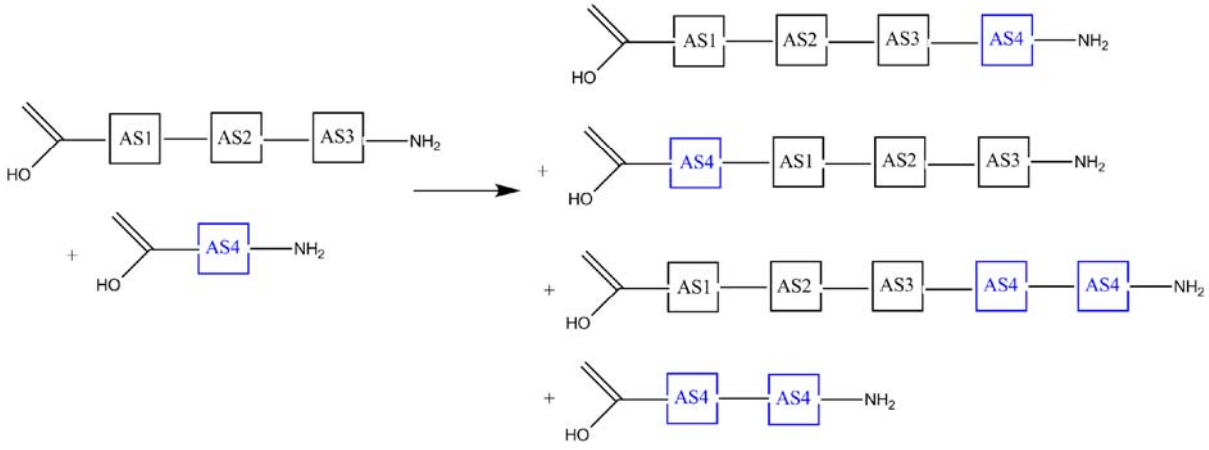


Abb. 42: unkontrollierte Reaktionsbedingungen führen zu uneinheitlichen Produktgemischen

Um die Synthese kontrolliert in eine Richtung zu lenken und damit einheitliche Produkte zu erhalten, ist demnach ein temporärer Schutz des N-Terminus der zu koppelnden Aminosäure notwendig. Für eine höhere Reaktionsausbeute wird zusätzlich deren Carboxylgruppe aktiviert, wodurch die Aktivierungsenergie herabgesetzt und eine Reaktion des nicht aktivierten C-Terminus der wachsenden Kette unterbunden wird (Abb. 43).

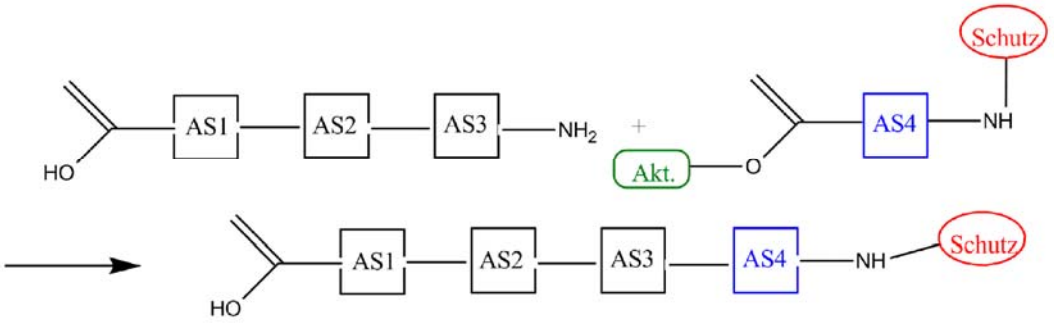


Abb. 43: Schutzgruppen führen zu einem einheitlichen Produkt

Vor jedem weiteren Kopplungsschritt wird die temporäre, N-terminale Schutzgruppe von der wachsenden Kette abgespalten.
Da die meisten Aminosäuren funktionelle Gruppen in ihren Seitenketten besitzen, ist auch hier ein Schutz notwendig, um Nebenreaktionen zu vermeiden. Diese permanenten Schutzgruppen müssen unter den Kopplungsbedingungen stabil bleiben und werden erst am Ende der Synthese von der fertigen Kette abgespalten. Die temporäre Schutzgruppe der Aminogruppe muß also orthogonal zu den Seitenkettenschutzgruppen sein.
Heutzutage sind zwei orthogonale Schutzgruppensysteme üblich, die sich grundsätzlich in ihrer Chemie und den verwendeten Seitenkettenschutzgruppen unterscheiden.

3.3.1. Die Boc-Synthesestrategie

Eine Möglichkeit zum Schutz der Aminogruppe besteht in der Verwendung von t-Butyloxycarbonyl, der sogenannten Boc-Schutzgruppe (Abb. 44).

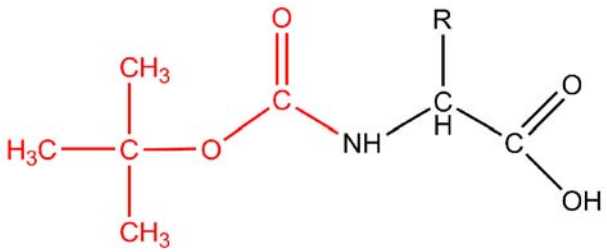


Abb. 44: mit einer Boc-Schutzgruppe geschützte Aminosäure

Diese Schutzgruppe ist säurelabil und kann von der wachsenden Kette durch eine E_1-Eliminierung mittels TFA abgespalten werden (Abb. 45).

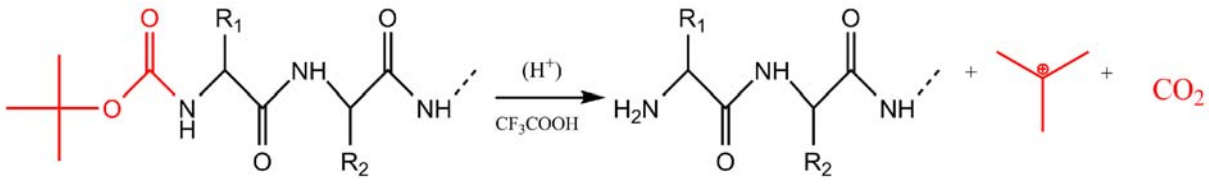


Abb. 45: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels TFA

Das entstandene Carbokation kann entweder wieder ein Proton abgeben oder mit dem TFA-Anion abreagieren (Abb. 46).

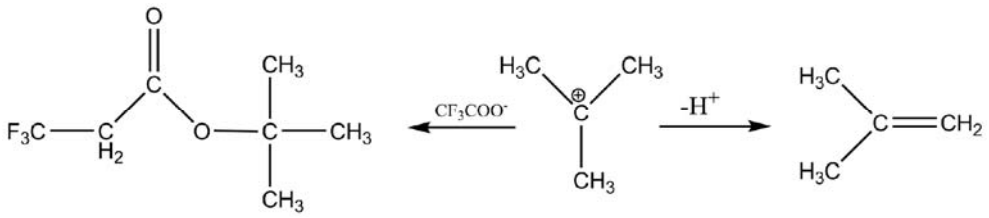


Abb. 46: mögliche Reaktionen des Carbokations

Die zur leicht säurelabilen Boc-Schutzgruppe orthogonalen Seitenkettenschutzgruppen sind so beschaffen, dass sie unter den sauren Abspaltbedingungen für Boc stabil bleiben. Sie sind allerdings bedingt säurelabil und werden am Ende der Synthese mit HF abgespalten. Aufgrund der nicht unproblematischen Handhabung durch die Verwendung von HF wird die Boc-Synthesestrategie allerdings nur noch selten angewendet.

3.3.2. Die Fmoc-Synthesestrategie

Das weitaus öfter verwendete Schutzgruppensystem basiert auf der Fluorenylmethoxy-carbonyl-Schutzgruppe oder kurz Fmoc-Schutzgruppe (Abb. 47).

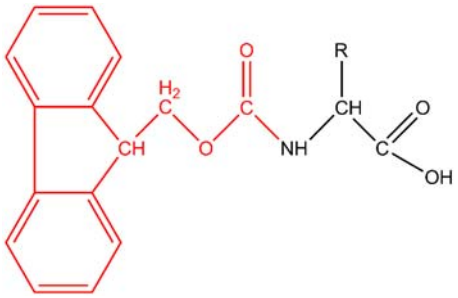


Abb. 47: mit der Fmoc-Schutzgruppe geschützte Aminosäure

Die Fmoc-Gruppe kann durch β-Eliminierung mit Piperidin in DMF unter milden alkalischen Bedingungen abgespalten werden, wobei die Abspaltung des β-Protons zu einem resonanzstabilisierten Carbanion-Derivat führt. Dieses zerfällt wiederum in CO_2 und Dibenzofulven, welches von Piperidin unter Bildung eines Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes abgefangen wird (Abb. 48).

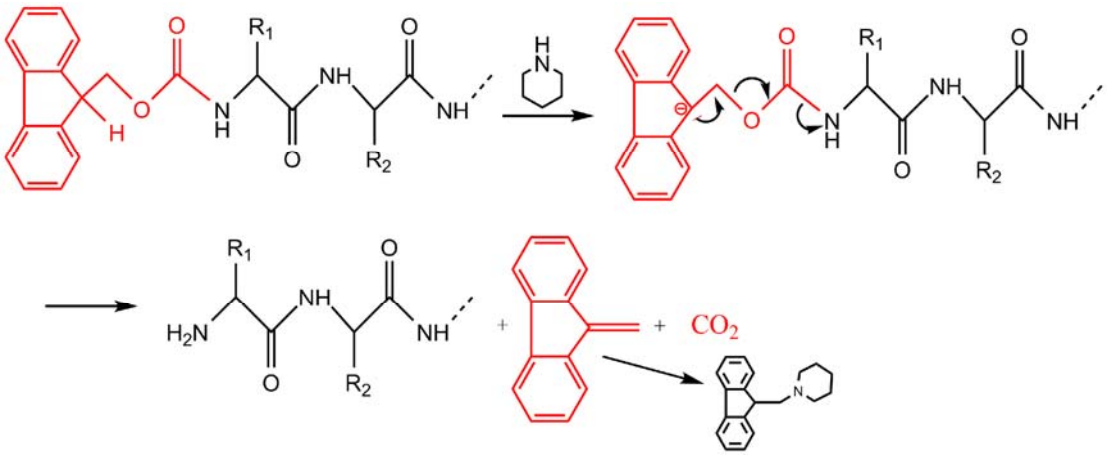


Abb. 48: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin

Da die gesamte Synthese im basischen Milieu abläuft, können die Seitenkettenschutzgruppen orthogonal dazu säurelabil gehalten werden. Gebräuchlich sind Schutzgruppen vom t-Butyl Typ wobei t-Butylester zum Schutz der Carboxylfunktionen dienen, während t-Butylether zum Schutz von Hydroxylgruppen Verwendung finden.
Auch die aus der Boc-Synthesestrategie bekannte Boc-Schutzgruppe kommt in der Fmoc-Synthese als Seitenkettenschutzgruppe für Aminofunktionen zum Einsatz (Abb. 49).

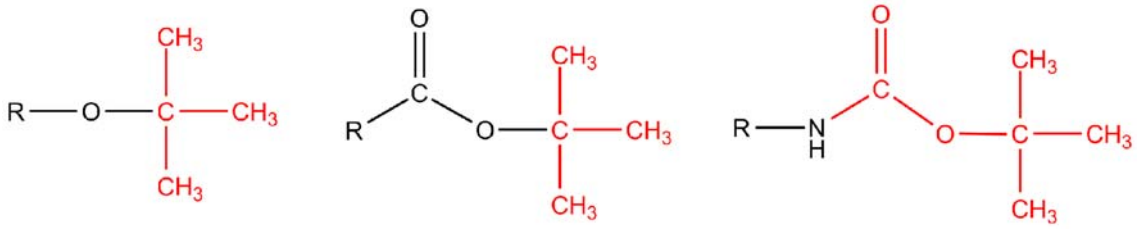


Abb. 49: t-Butylether, t-Butylester sowie Boc als Seitenkettenschutzgruppen in der Fmoc-Synthese

Darüber hinaus existieren noch einige spezielle Schutzgruppen, wie z.B. Mtr (4-methoxy-2,3,6-trimethylphenylsulfon), zum Schutz der Guanidiniumgruppe des Arginins.
Alle diese säurelabilen Schutzgruppen werden am Ende der Synthese durch TFA abgespalten (s. Abb. 55).

3.3.3. Synthese in Lösung

Klassische Methoden der Peptidsynthese beruhen auf Reaktionen in Lösung, wobei die nach jedem Kopplungsschritt notwendige Abtrennung der unreagierten, im Überschuss zugegebenen Kopplungsreagenzien über einen Ionenaustauscher erfolgt. Durch die damit verbundenen hohen Verluste liegt die maximale Ausbeute pro Kopplungsschritt bei ca. 90%.
Bei einem Peptid, wie dem in dieser Arbeit verwendeten Penetratin, mit einer Länge von 16 Aminosäuren bedeutet dies eine maximale theoretische Endausbeute von $0{,}9^{16} = 18\%$.
Industriell werden daher nur noch sehr kurze Peptide wie z.B. der Süßstoff Aspartam, ein Dipeptid aus Asparaginsäure und Phenylalaninmethylester, in Lösung hergestellt.

3.3.4. Festphasensynthese nach Merrifield

Eine bisher nie dagewesene Qualität erreichte die Peptidsynthese mit der Einführung des Festphasen-Systems durch Robert Bruce Merrifield im Jahre 1963[19], wofür ihm im Jahr 1984 der Nobelpreis für Chemie verliehen wurde. Seit Mitte der 1980er Jahre werden Peptidsynthesen fast ausschließlich mit dieser Art der vollautomatisierbaren „Solid Phase Peptide Synthesis“ (SPPS) durchgeführt, wodurch Synthesen von Peptiden bis zu 100 Aminosäuren bei guter Qualität und hoher Ausbeute möglich werden.
Mittels der SPPS gelang Merrified und seinen Mitarbeitern bereits 1966 die Totalsynthese des Insulins innerhalb von nur wenigen Tagen[20], wofür andere Forschergruppen[21], [22] mit klassischen Methoden nur 2 Jahre zuvor noch Monate benötigten.
Längere Peptide oder Proteine können durch Kopplung kürzerer, über SPPS hergestellter Fragmente in Lösung gewonnen werden.
Die wachsende Kette ist dabei mittels eines spaltbaren Linkers an einem unlöslichen, filtrierbaren Polymerträger verankert, welcher inert gegen die während der Synthese eingesetzten Lösungsmittel ist. Durch die Verankerung des C-Terminus der Peptidkette am Support sind Kopplungen am „falschen“ Ende der Kette von vornherein ausgeschlossen.
Die herausragende Verbesserung gegenüber der Synthese in Lösung ist jedoch die wesentlich einfachere und effizientere Aufreinigung der Zwischenprodukte nach den einzelnen

Kopplungsschritten. Überschüssige, in Lösung befindliche Kopplungsreagenzien werden einfach über eine Fritte abgesaugt. Der polymere Träger mit der verlängerten Peptidkette bleibt vollständig im Reaktionsgefäß zurück.
Nach Beendigung der Synthese erfolgt die Abspaltung vom Trägermaterial, wobei in der Regel gleichzeitig die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten werden.
Mit der SPPS sind Kopplungsausbeuten von >99% erreichbar, was z.B. bei der Synthese des 16 Aminosäuren langen Penetratins eine theoretische Ausbeute von $>0{,}99^{16}$, also mehr als 85% bedeutet.
Für die Festphasensynthese nach Merrifield kommen sowohl die Boc-Synthesestrategie (Boc-SPPS) als auch die Fmoc-Synthesestrategie (Fmoc-SPPS) mit ihrem jeweiligen Schutzgruppensystem in Frage, wobei der verwendete Linker den jeweiligen Synthese-bedingungen standhalten muß. Wegen der nicht ungefährlichen HF-Chemie bei der Boc-Synthese kommt heute fast ausschließlich die Fmoc-SPPS zum Einsatz.
Der in den folgenden Kapiteln erläuterte Synthesezyklus der Fmoc-SPPS ist in Abb. 50 dargestellt.

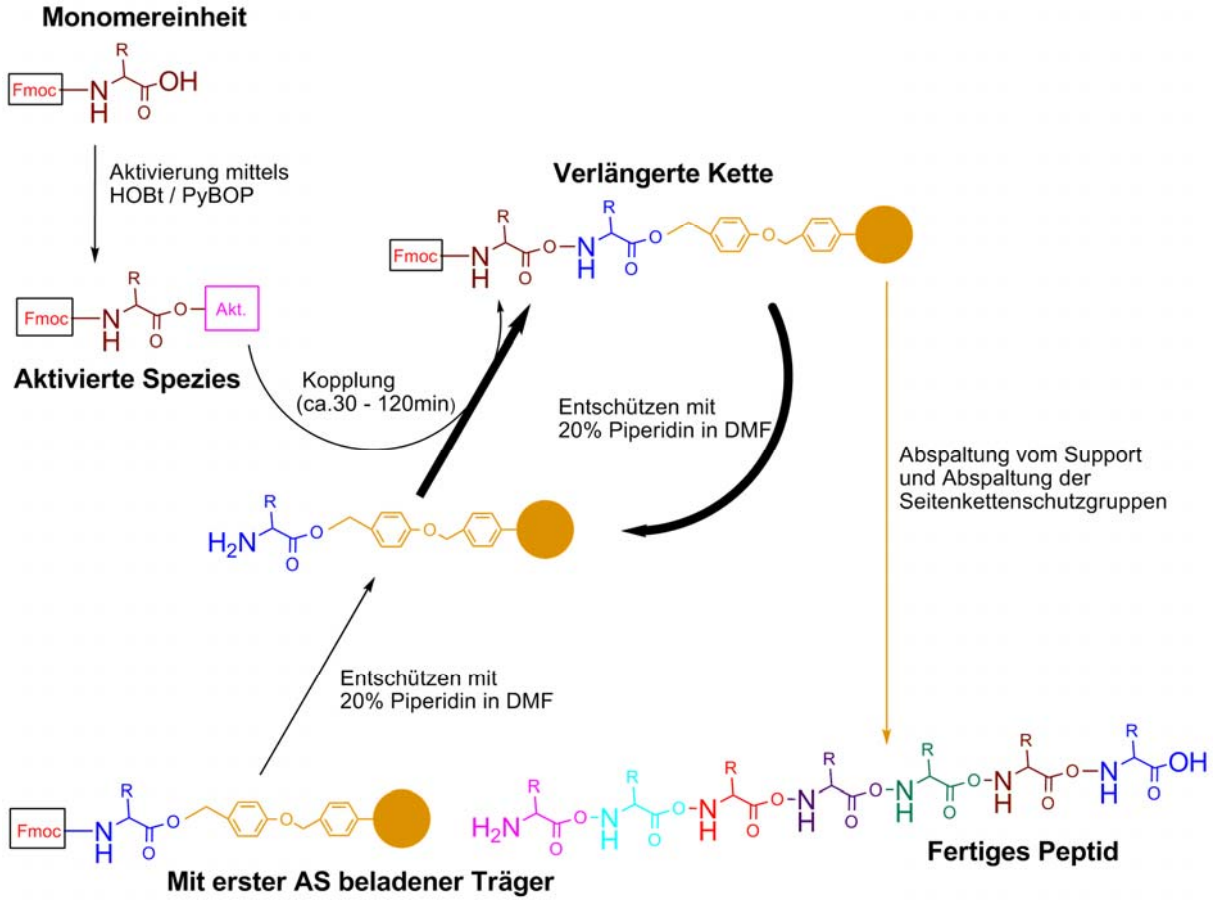


Abb. 50: Synthesezyklus der Fmoc-SPPS

3.3.4.1. Trägermaterial

Vor der eigentlichen Synthese muß die erste Aminosäure über einen spaltbaren Linker an den Support gebunden werden. Als Trägermaterial dient je nach Anwendung meist ein mit 1% Divinylbenzol schwach quervernetztes Polystyrol-Harz, welches durch Chlormethylierung funktionalisiert wurde. Dieses Harz ist in organischen Lösungsmitteln quellbar und bietet somit eine große, poröse Oberfläche, wodurch eine gute Erreichbarkeit der wachsenden Kette durch die Kopplungsreagenzien gewährleistet ist.
Als Linker wird in der Fmoc-SPPS oft ein p-Alkoxybenzylester oder Wang-Linker[23] verwendet, was in einem Träger mit Hydroxymethyl-funktionalisierter Oberfläche resultiert (Abb. 51).

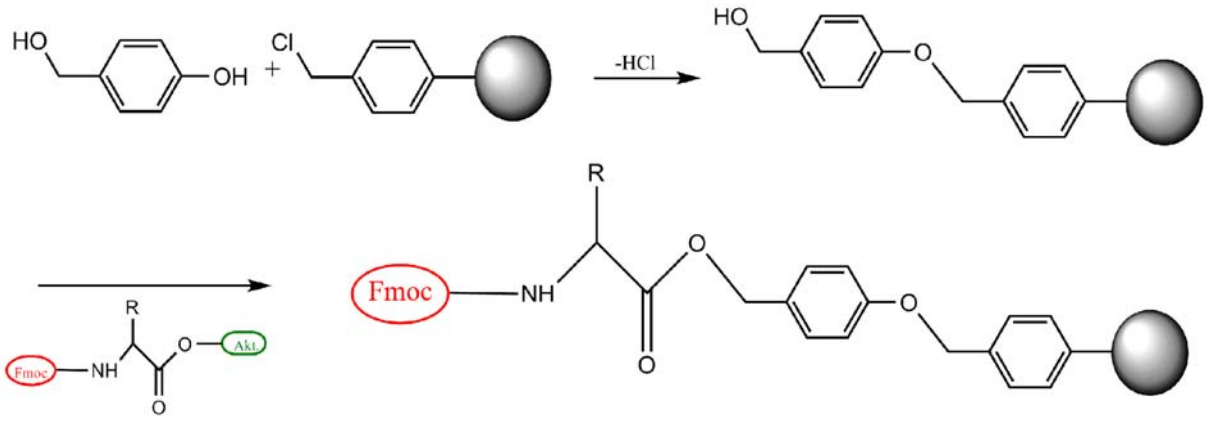


Abb. 51: Anbringen des Wang-Linkers und Kopplung der ersten Aminosäure an den Träger

Für längere Peptide mit mehr als 15 Aminosäuren ist es oft sinnvoll, einen zusätzlichen Spacerarm (z.B. PEG) einzusetzen, wodurch die sterische Hinderung herabgesetzt wird.
Je nach eingesetztem Linker erhält man nach der Abspaltung vom Harz eine Peptidkette mit einer freien Carbonsäure oder einem Säureamid am C-Terminus.
Wang-Linker mit bereits angekoppelten geschützten Aminosäuren sind kommerziell erhältlich und bilden den Grundbaustein für die meisten Standardsynthesen der Fmoc-SPPS. Darüber hinaus sind noch spezielle Linker verfügbar, die beispielsweise einen Marker enthalten oder sich photochemisch abspalten lassen.

3.3.4.2. Aktivierung und Kopplung

Die freie Carboxylgruppe einer Aminosäure ist aufgrund ihrer Resonanzstabilisierung mit 125kJ/mol relativ unreaktiv. Beim nukleophilen Angriff der Aminogruppe entsteht jedoch eine tetraedrische Zwischenstufe, in der keine Resonanzstabilisierung mehr vorhanden ist. Um die dadurch bedingte hohe Aktivierungsenergie zu senken ist es notwendig, die freie Säure vor der Kopplung in nicht oder nur wenig resonanzstabilisierte Derivate zu überführen. Darüber hinaus muß die tetraedrische Zwischenstufe durch elektronenziehende Substituenten stabilisiert werden.
Dies wird durch Acylierungsreagenzien wie z.B. Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, Abb. 52) ermöglicht.

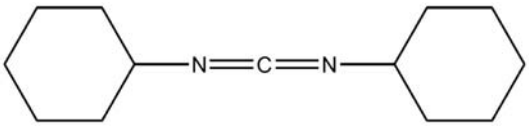


Abb. 52: DCC als klassisches Acylierungsreagenz

Da bei einer Aktivierung mit DCC jedoch große Mengen an Dicyclohexylharnstoff ausfallen, verwendet man in neuerer Zeit harnstofffreie Acylierungsreagenzien wie z.B. Benzotriazoloxytris-[pyrrolidinamino]-phosphoniumhexafluorophosphat oder kurz PyBOP (Abb. 53). Um Kopplungsausbeuten von >99% zu erreichen, arbeitet man mit einem 3-4fachen molaren Überschuss an PyBOP zusammen mit N-Hydroxybenztriazol (HOBt) als Katalysator.

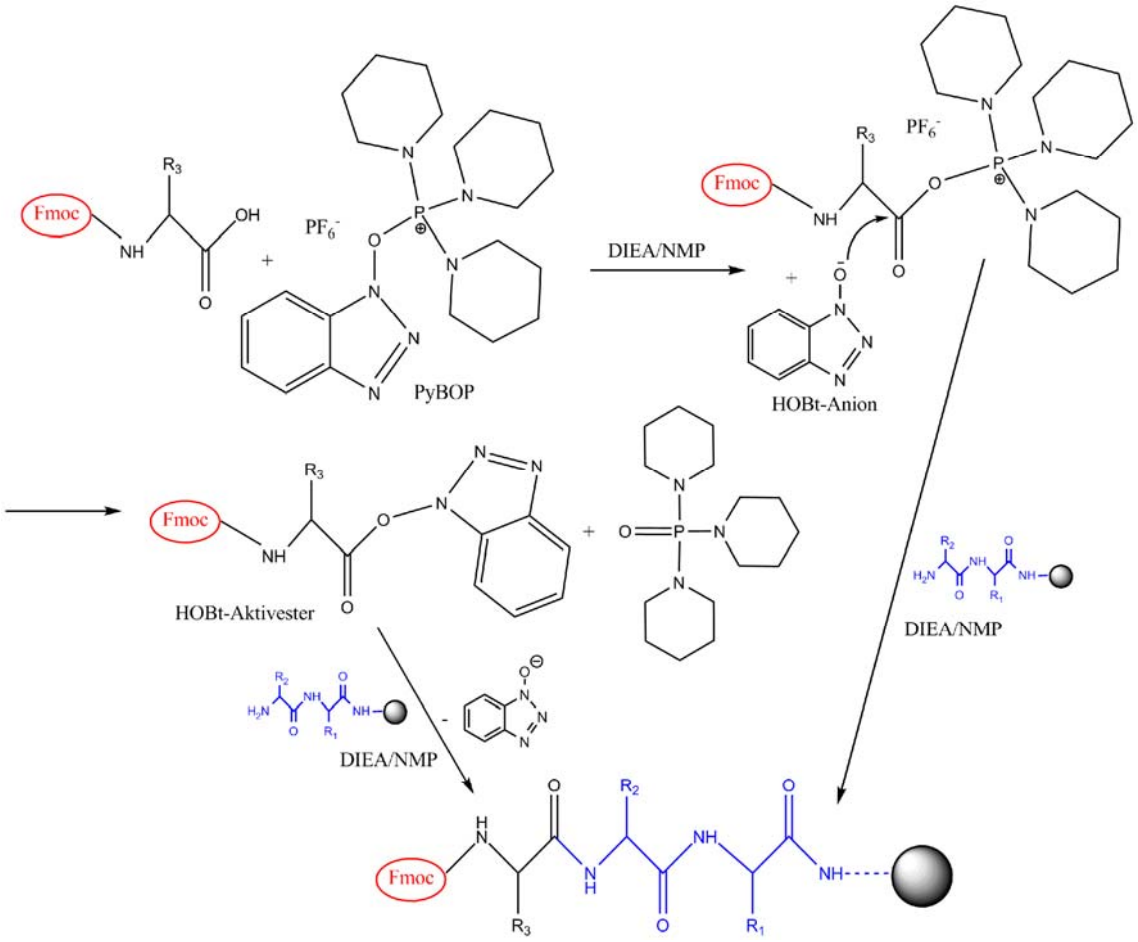


Abb. 53: Aktivierung und Kopplung mittels PyBOP / HOBt

Die Bildung des aktivierten Aminosäurederivats verläuft basenkatalysiert mit Diisopropylethylamin (DIPEA) in NMP, wobei zuerst ein O-acetyliertes Phosphoniumderivat unter Freisetzung eines HOBt-Anions entsteht. Dieses kopplungsfähige Zwischenprodukt kann nun entweder direkt mit der freien Aminogruppe der wachsenden Kette reagieren oder mit HOBt einen intermediären Aktivester bilden (Abb. 53). Da das HOBt-Anion eine gute Abgangsgruppe ist, wird auf diese Weise der nukleophile Angriff der Aminogruppe erleichtert. Durch die Gegenwart von HOBt wird auch die Tendenz zur Racemisierung verringert. Der Basenzusatz erhöht darüber hinaus die Nukleophilie der Aminokomponente.

Die typischen Kopplungszeiten liegen bei einigen Minuten bis hin zu mehreren Stunden, abhängig von der Kettenlänge und der Art der endständigen sowie der zu koppelnden Aminosäure. Insbesondere durch die Seitenkettenschutzgruppen sterisch stark gehinderte Aminosäuren, wie Arginin, Isoleucin, Prolin und Valin, erfordern deutlich längere Kopplungszeiten als z.B. Glycin.

3.3.4.3. Abspaltung vom Träger

Nach Fertigstellung der Synthese und der Entfernung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe erfolgt die Abspaltung der Peptidkette vom Trägermaterial mittels TFA. Ein Wang-Linker liefert eine Peptidkette mit freier Carboxylgruppe am C-Terminus, während der ebenfalls oft verwendete Rink-Linker[24] zu einem Säureamid führt (Abb. 54).

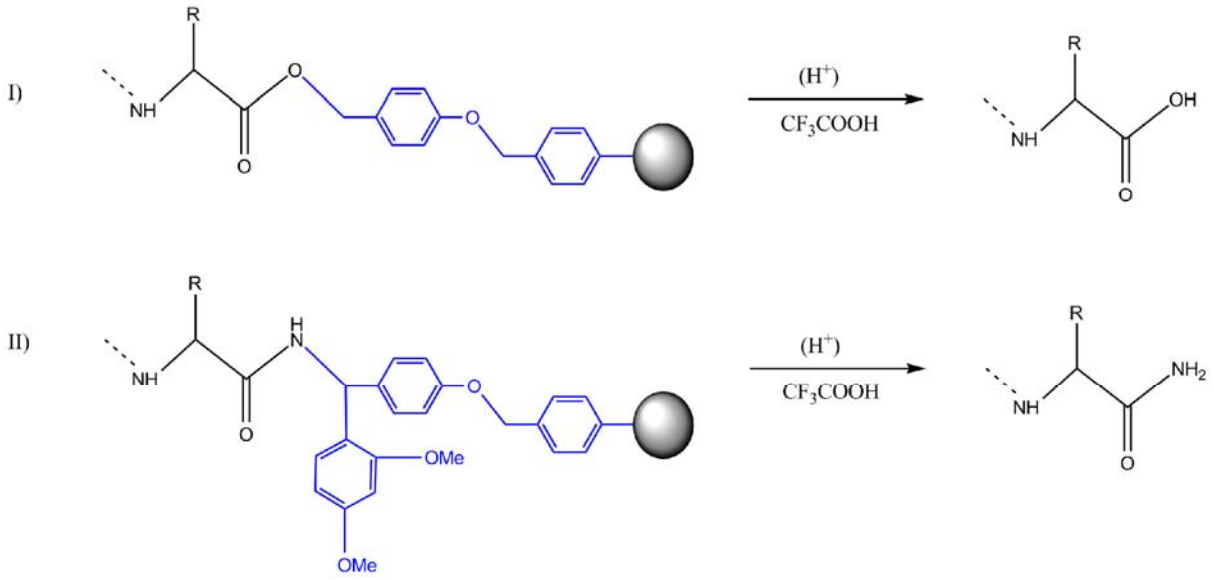


Abb. 54: Wang-Linker (I) und Rink-Linker (II) führen zu unterschiedlichen C-Termini

Durch die Behandlung mit TFA (Abb. 55) werden gleichzeitig auch die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen, wie Boc (Abb. 45) oder t-Butyl, abgespalten.

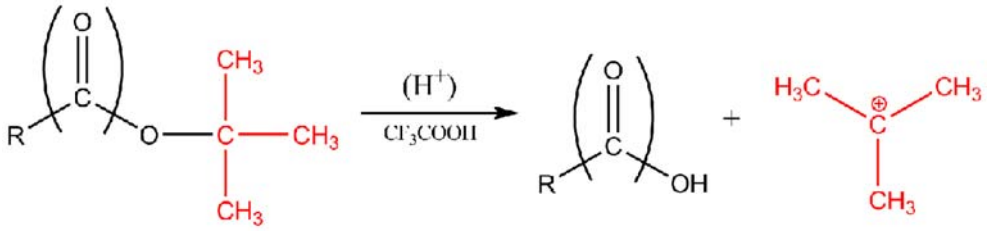


Abb. 55: Abspaltung von Seitenkettenschutzgruppen des t-Butyl Typs mittels TFA

Das bei der Abspaltung der meisten Seitenkettenschutzgruppen entstehende äußerst reaktive Carbokation kann dabei allerdings zu Alkylierungen in den Seitenketten von Methionin, Cystein sowie Tryptophan führen und muß daher durch Zugabe eines Kationenfängers (Scavenger) abgefangen werden. Als Scavenger kommen nukleophile Reagenzien wie Ethandiol (EDT), Dimethylsulfid (DMS), Thioanisol und Phenol sowie Gemische aus diesen Substanzen zum Einsatz.
Die weitere Aufreinigung des aus Zielsequenz, verkürzten Ketten, abgespaltenen Schutzgruppen sowie Scavenger-Reagenzien bestehenden, rohen Produktgemischs erfolgt über Gelfiltration und RP-HPLC.

3.4. Therapeutisch wirksame Oligonukleotide

Fast sämtliche biochemischen Vorgänge in einem Organismus, wie z.B. Stoffwechselregulation, Signalübertragung und Zellwachstum, basieren auf der Interaktion verschiedener Proteine. Fehlerhafte (mutierte) oder zellfremde, aus viraler DNA generierte Proteine sind daher oft die Ursache für verschiedene Erkrankungen.
Die Ursache fehlerhafter Proteine ist eine oder mehrere Mutationen in der DNA-Sequenz (Gen) welche für das entsprechende Protein codiert. Diese fehlerhafte Sequenz wird zunächst in einzelsträngige mRNA transkribiert und die fehlerhafte Information schließlich durch Translation an den Ribosomen in fehlerhafte Proteine umgesetzt. Sogenannte Onkogene sind z.B. eigentlich für die Regulation des Zellwachstums verantwortlich, durch Mutationen verändert, sorgen sie aber für eine ungehemmte Proliferation von Zellen und führen dadurch zur Ausbildung von Tumoren.
Konventionelle Medikamente zielen in der Regel auf die Hemmung der Funktion von defekten Proteinen ab, bekämpfen also nicht die eigentliche Ursache des Problems.
Ziel von therapeutischen Oligonukleotiden ist es nun, die Verbreitung dieser fehlerhaften Information noch vor der Translation, also bereits auf der DNA/mRNA Ebene, zu unterbinden und so die Synthese des mutierten Proteins zu inhibieren.

3.4.1. Antisense-Oligonukleotide

Bereits in den 1960er Jahren entstand die Idee, die Hybridisierungsfähigkeit der DNA auszunützen und gezielt mRNA durch den Einsatz komplementärer DNA-Sequenzen abzufangen[25]. Allerdings gelang Stephenson und Zamecnik erstmals im Jahre 1978 auf diesem Wege die effiziente Inhibierung der Translation einer viralen mRNA in Hühner-Embryo Fibroblasten[26], [27]. Aufgrund der Tatsache, dass zu diesem Zeitpunkt nur sehr wenige Gene sequenziert waren und von daher auch nur wenig Wissen über die Sequenzen der entsprechenden mRNA bestand, konnte das Antisense-Prinzip noch keinen Durchbruch verzeichnen. Auch stellte die Bereitstellung der nötigen Mengen an synthetischen Oligonukleotiden und deren Halbwertszeiten in der Zelle zu dieser Zeit noch ein Problem dar.
Erst durch die Weiterentwicklung und Automatisierung der Oligonukleotidsynthese (s. Kap. 3.2) sowie durch Einführung intramolekularer Modifizierungen zur Stabilitätserhöhung gegenüber Nukleasen (s. Kap. 3.5) konnte sich das Antisense-Prinzip als universell anzuwendende Methode durchsetzen. So ist es heutzutage nicht nur möglich, die Translation mutierter mRNA zu therapeutischen Zwecken zu unterbinden, es besteht auch die Möglichkeit, die Funktion einzelner Gene durch deren gezielte Herunterregulierung zu ermitteln.
Dabei können durch die Duplexbildung des Antisense-Oligonukleotids mit der Ziel-mRNA gleich mehrere Mechanismen in Gang gesetzt werden (Abb. 56). In erster Linie führt die Ausbildung eines doppelsträngigen Bereiches auf einer mRNA im Cytoplasma zu einer Behinderung des ribosomalen Komplexes. Liegt der hybridisierte Bereich in der Nähe des Startcodons, so bleibt das Ribosom gleich am Anfang der mRNA hängen, wodurch keine Translation mehr stattfindet (translational arrest). Die Synthese des jeweiligen Proteins wird also unterbunden, ohne dass die Menge an der entsprechenden mRNA verringert wird[28].
Ist das Antisense-Oligonukleotid auf die entsprechene Sequenz einer prä-mRNA im Zellkern gerichtet, so kann das 5´-Capping[29] oder die 3´-Polyadenylierung[30] der prozessierten mRNA unterbunden werden, wodurch der Transport der mRNA in das Cytoplasma ausbleibt. Werden dabei Bereiche hybridisiert, die für den Spleißvorgang benötigt werden, so kann die Bindung der Spleißfaktoren verhindert werden und die Prozessierung der mRNA bleibt vollständig aus[31].

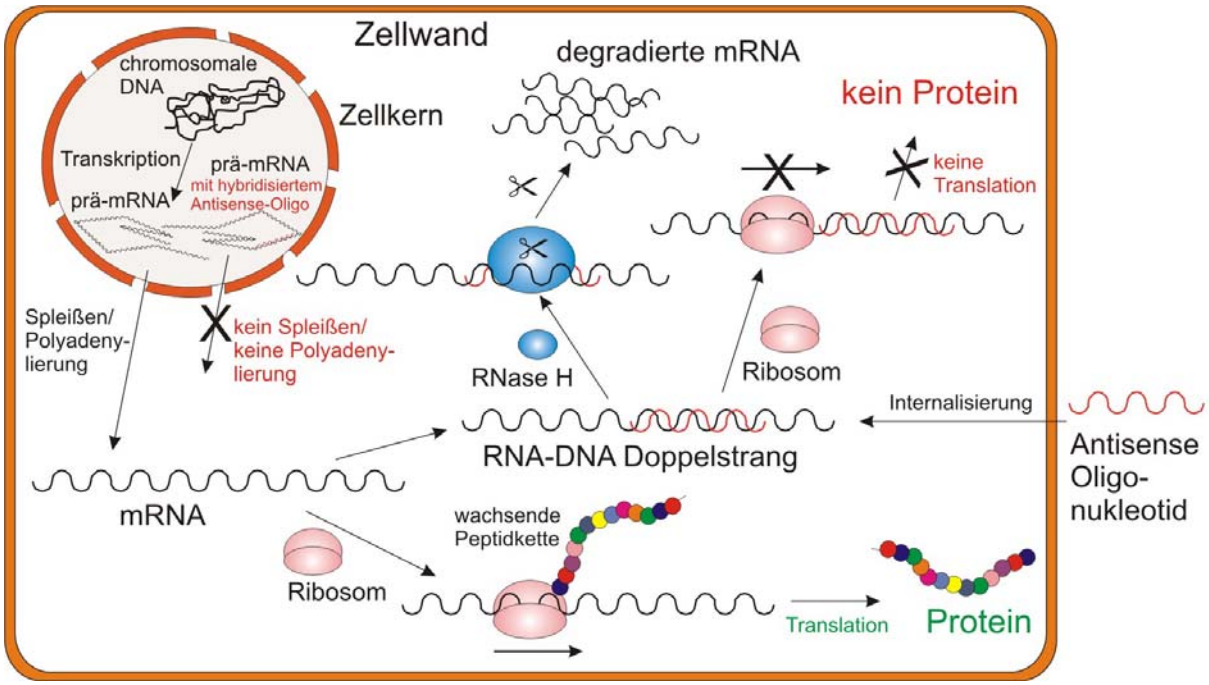


Abb. 56: schematische Darstellung des Antisense-Effekts

Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die Aktivierung von RNaseH, einem Enzym das in der Lage ist den RNA-Strang eines RNA-DNA Duplex abzubauen. RNaseH kommt sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern vor, wobei die Konzentration im Zellkern höher ist. DNA-ähnliche Oligonukleotide bewirken nach der Hybridisierung mit der mRNA, selbst wenn sie nur eine Länge von 4 Nukleotiden aufweisen, eine Aktivierung der RNaseH[(32)]. Oligonukleotide, die eher eine Ähnlichkeit mit RNA aufweisen, wie z.B. Oligonukleotide mit einer 2´-fluoro oder 2´-methoxy Modifikation, dienen hingegen nicht als Substrat für RNaseH[(33)]. Auch Modifikationen des Phosphatrückgrats des Antisense-Oligonukleotids haben einen starken Einfluß auf die Fähigkeit zur Aktivierung von RNaseH. So zeigen z.B. Methylphosphonate keinerlei RNaseH-Aktivierung, während Oligonukleotide mit Thiophosphat-Bindungen ein hervorragendes Substrat abgeben[(34)].

Um eine möglichst lange Wirkungsdauer zu erreichen, muß ein Antisense-Oligonukleotid eine hohe Stabilität, eine hohe Spezifität sowie eine hohe Hybridisierungstemperatur aufweisen. Prinzipiell kann jedes Gen, dessen mRNA-Sequenz bekannt ist, ein Ziel für Antisense-Oligonukleotide darstellen. Im Idealfall sollte die Wirkung auf ein einzelnes Protein beschränkt sein, während andere Proteine weiterhin uneingeschränkt synthetisiert werden. Um einen genügend hohen Schmelzpunkt für eine stabile und selektive Hybridisierung zu erreichen, sollte ein Antisense-Oligonukleotid einen möglichst hohen GC-Anteil sowie eine ideale Länge von etwa 18 Nukleotiden aufweisen. Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit diese Sequenz nochmals anzutreffen bei $1 : 4^{18}$ bzw. bei ca. 1 : 68Mrd liegt. Das (haploide) menschliche Genom besteht allerdings nur aus ca. 2,85Mrd Basenpaaren[(35)], wodurch zumindest eine hohe Sequenzspezifität von Antisense-Oligonukleotiden gewährleistet sein sollte.
Dennoch kann es auch zu weiteren unspezifischen Wechselwirkungen, z.B. mit anderen Proteinen kommen, die mit dem Antisense-Effekt nichts zu tun haben, aber trotzdem einen biologischen Effekt herbeiführen können. Oft werden diese Wechselwirkungen durch das Oligonukleotid-Rückgrat verursacht und können durch entsprechende „backbone“ Modifikationen umgangen werden.

Unmodifizierte Antisense-Oligonukleotide weisen zwar einwandfreie Hybridisierungseigenschaften auf, zeigen jedoch keinerlei Resistenz gegenüber den im Cytoplasma vorhanden Nukleasen, wodurch ihre Halbwertszeit für einen sinnvollen Einsatz zu kurz ist. Auch die Aufnahme der Oligonukleotide durch die Zellmembran stellt ein Problem dar, wodurch die intrazelluläre Konzentration oftmals zu gering ist, um eine Wirkung zu zeigen[(36)]. Für die Applikation eines optimalen Antisense-Präparates müssen daher Wege gefunden werden, die Stabilität (s. Kap. 3.5 und 3.6) sowie die Internalisierungsfähigkeit (s. Kap. 3.7) zu erhöhen.
Inzwischen sind bereits mehrere, auf dem Antisense-Prinzip basierende Medikamente in der klinischen Phase. Wissenschaftlern der Firma AVI BioPharma gelang es z.B. mittels ihrer beiden Produkte AVI-6002 und und AVI-6003, die Überlebensrate von mit dem Ebula- bzw. dem Marburg-Virus infizierten Rhesusaffen von 0% auf 75% zu steigern[(37)].
Als erstes deutsches Biotech Unternehmen brachte die Antisense-Pharma GmbH (Regensburg) ihr Leitprodukt Trabedersen[(38)] (AP 12009), ein auf die mRNA des human transforming growth factor TGF-β2 ausgerichtetes Antisense-Oligonukleotidthiophosphat, in die fortgeschrittene Klinische Phase II zur Behandlung von Patienten mit rekurrentem oder refraktärem anaplastischem Astrozytom, einer besonders aggressiven Form von Gehirntumor[(39)].
Ein 21 Nukleotide langes Antisense-Oligonukleotidthiophosphat der Firma ISIS[(40)] zur Behandlung von AIDS-Patienten mit einer retinalen Infektion durch das Cytomegalie Virus (CMV) wurde 1998 unter dem Handelsnamen Vitravene® bzw. Fomivirsen als Arzneistoff zugelassen.

3.4.2. siRNA

Im Jahre 1995 stellten Guo und Kemphues bei Versuchen zum Antisense Effekt im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* durch Zufall fest, dass nicht nur die Zugabe eines Antisense-RNA-Stranges, sondern auch der in einem Kontrollexperiment eingesetzte Sense-RNA-Strang eine Unterdrückung der Expression des par-1-Gens bewirkte[(41)].
Dieses Paradoxon war zuerst nicht zu erklären. Erst drei Jahre später stellte sich durch Versuche von Fire et al. heraus, dass die von Guo et al. verwendete Sense-RNA mit einigen Molekülen der entsprechenden Antisense-RNA verunreinigt war, was zur Bildung von nur wenigen Molekülen doppelsträngiger RNA in der Probe geführt hatte. Diese dsRNA zeigt eine 100-mal effektivere Unterdrückung der Genexpression in *Caenorhabditis elegans* als die entsprechende einzelsträngige Antisense-RNA[(42)]. Da bereits geringe Mengen für ein komplettes Ausschalten eines Gens ausreichen, muß es sich hierbei um einen katalytischen Prozess handeln. Die eingesetzte RNA wird also, im Gegensatz zum Antisense-Effekt, nicht verbraucht. Für die Entdeckung dieses Phänomens, welches als RNA-Interferenz bezeichnet wurde, erhielten Andrew Fire und Craig Mello im Jahre 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.
Die genaue Wirkungsweise der RNA-Interferenz wurde jedoch erst nach und nach aufgeklärt, wobei die Forschungsgruppen um Tuschel[(43)] und Zamore[(44)] die wesentlichsten Beiträge lieferten. Das Grundprinzip ist in Abb. 57 dargestellt. Doppelsträngige zelleigene RNA aus regulativen genetischen Elementen (z.B. miRNA), mobilen genetischen Elementen oder fremde RNA, z.B. aus einem RNA-Virus, wird durch ein Enzym (Dicer) zu kurzen, doppelsträngigen RNA-Stücken von 21-23 Nukleotiden Länge mit 3´-Überhang, der sogenannten siRNA (small interfering RNA) prozessiert. Diese siRNA wird nun, genau so wie eventuell von außen zugeführte synthetische siRNA, in den Multiproteinkomplex RISC (RNA-induced Silencing Complex) eingebaut. Zur Aktivierung des RISC wird der Sense-Strang endonukleolytisch gespalten und aus dem Komplex entfernt. Der im RISC verbleibende Antisense-Strang führt den Komplex zur entsprechenden komplementären mRNA, die durch die Endonuklease-Aktivität des RISC in zwei Hälften geschnitten wird.

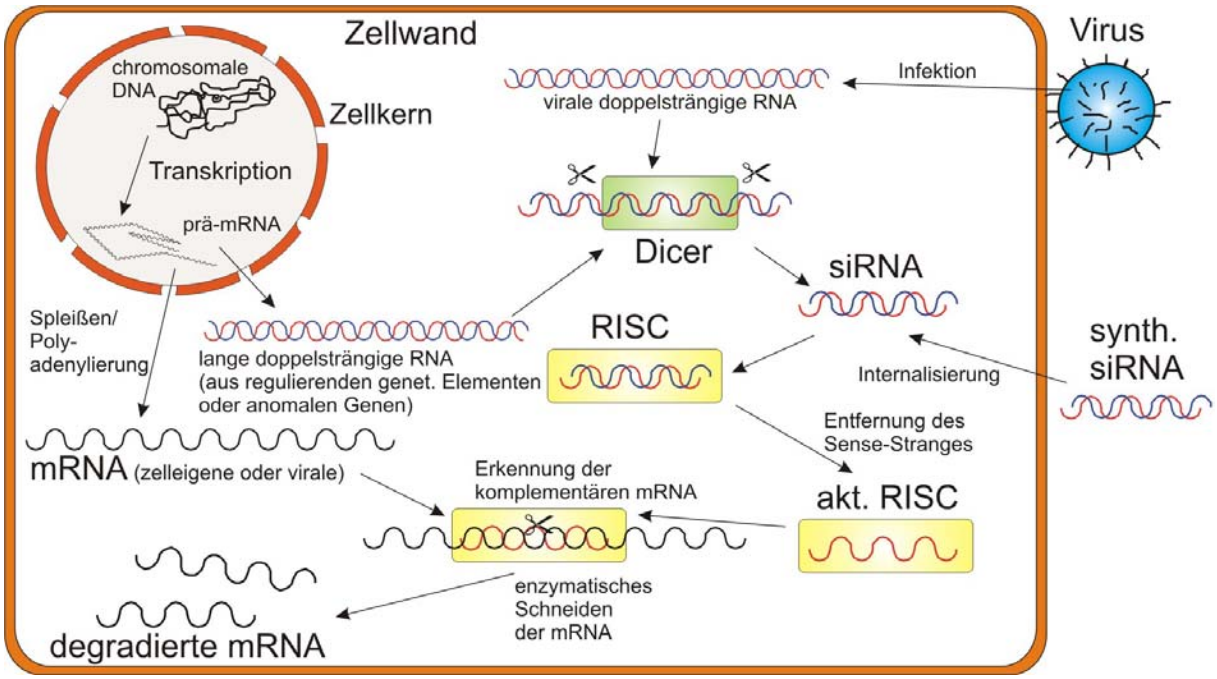


Abb. 57: schematische Darstellung der RNA-Interferenz

Nach dem Schneiden löst sich der RISC von der degradierten mRNA ab und wandert zur nächsten komplementären mRNA. Das RNA-Interferenz System erstellt somit aus Fragmenten doppelsträngiger RNA eine Art „schwarze Liste“ von mRNA´s, die erkannt und abgebaut werden können.
Der Vorgang der RNA-Interferenz konnte inzwischen auch in höheren Organismen nachgewiesen werden[(45)]. Es handelt sich demnach um einen evolutionären Prozess in allen Eukaryonten, der zur Genregulierung durch den Abbau von nicht mehr benötigter zelleigener mRNA, zur Zelldifferenzierung durch das Stummschalten von an Entwicklungsprozessen beteiligten Genen sowie zum Abbau von fremder mRNA, z.B. viraler RNA dient.
Durch den Nachweis von Elbashir und Tuschl, dass auch synthetische siRNA nach der Aufnahme in die Zelle zu einer effizienten Spaltung der entsprechenden mRNA führt[(43)] wurde eine Reihe neuer Anwendungsmöglichkeiten geschaffen. Durch den Einsatz synthetischer siRNA ist es unter anderem möglich, in kürzester Zeit die Funktionen einzelner Gene durch deren gezielte Stummschaltung zu ermitteln. Das größte Potential des siRNA-Phänomens liegt allerdings in der Bereitstellung einer einfachen und effizienten Methode zur sequenzspezifischen Hemmung von pathologisch aktiven Onkogenen in Tumoren und Leukämien[(46)] sowie zur Bekämpfung viraler Infektionen[(47)].

3.4.3. Triplexbildende Oligonukleotide

Bei den beiden zuvor beschriebenen Methoden, dem Antisense Prinzip und dem Einsatz von siRNA, bildet jeweils die mRNA das Target, wodurch die Translation des Proteins verhindert wird. Es besteht aber auch die Möglichkeit, mittels sogenannter TFO´s (triple helix forming oligonucleotides), direkt die Ablesung der doppelsträngigen DNA durch die RNA-Polymerase und somit bereits die Transkription zu hemmen[(48)].
Die Anlagerung eines TFO zur Triplexbildung erfolgt, unter Ausbildung von Hoogsteen bzw. reverse-Hoogsteen Bindungen, mit hoher Affinität und Spezifität in der großen Furche der DNA-Doppelhelix[(49)]. Als Zielsequenzen eignen sich dabei aber nur DNA-Abschnitte mit Homopurinbereichen, da lediglich Purinbasen in der Lage sind, zur Ausbildung eines stabilen Komplexes, zwei zusätzliche Hoogsteen bzw. reverse-Hoogsteen Bindungen zu anderen

Basen (Purin- und Pyrimidinbasen) auszubilden. Außerdem ist bei Homopurinbereichen die große Furche der DNA-Doppelhelix besser zugänglich[50].
Die Anlagerung eines poly-Pyrimidin-Oligonukleotids (C,T-Motiv) erfolgt parallel bezüglich des Purinstranges (Abb. 58). Dabei werden Hoogsteen-Bindungen der Form C-G-C^+ bzw T-A-T augebildet. Die Triplexbildung ist pH-abhängig, da das Cytidin protoniert sein muß, um zwei Wasserstoffbrückenbindungen nach Hoogsteen ausbilden zu können.

3´-TTCTCCTCTCCCTTCT-5´
5´-AAGAGGAGAGGGAAGA-3´
5´-TTCTCCTCTCCCTTCT-3´

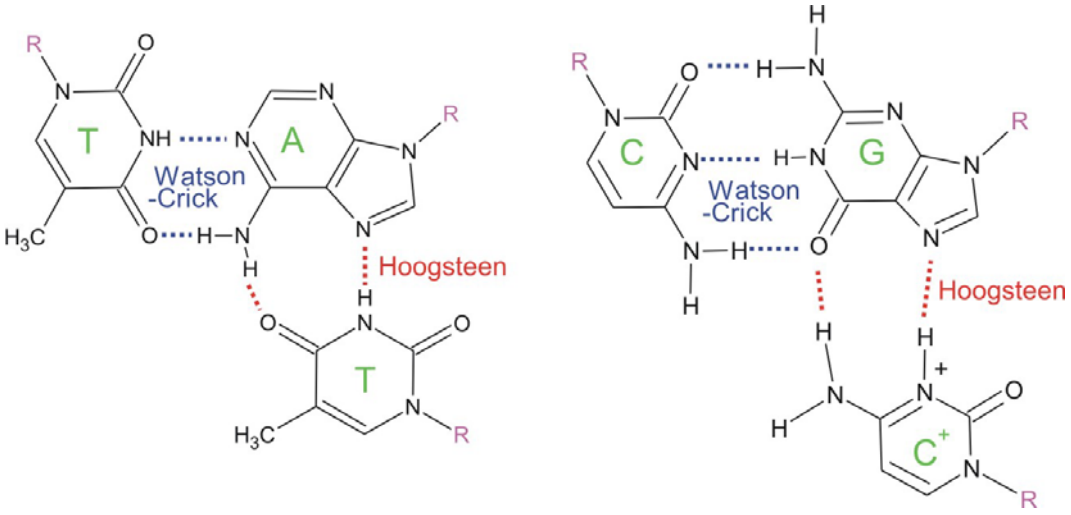


Abb. 58: Ausbildung von Hoogsteen-Bindungen zwischen Purinbasen und Pyrimidinbasen (A=T bzw. G=C^+)

Die Anlagerung eines poly-Purin-Oligonukleotids (G,A-Motiv) erfolgt antiparallel bezüglich des Purinstranges (Abb. 59). Dabei werden reverse-Hoogsteen-Bindungen der Form C-G-G bzw T-A-A augebildet, wobei diese Art der Triplexbildung pH-unabhängig ist.

3´-TTCTCCTCTCCCTTCT-5´
5´-AAGAGGAGAGGGAAGA-3´
3´-AAGAGGAGAGGGAAGA-5´

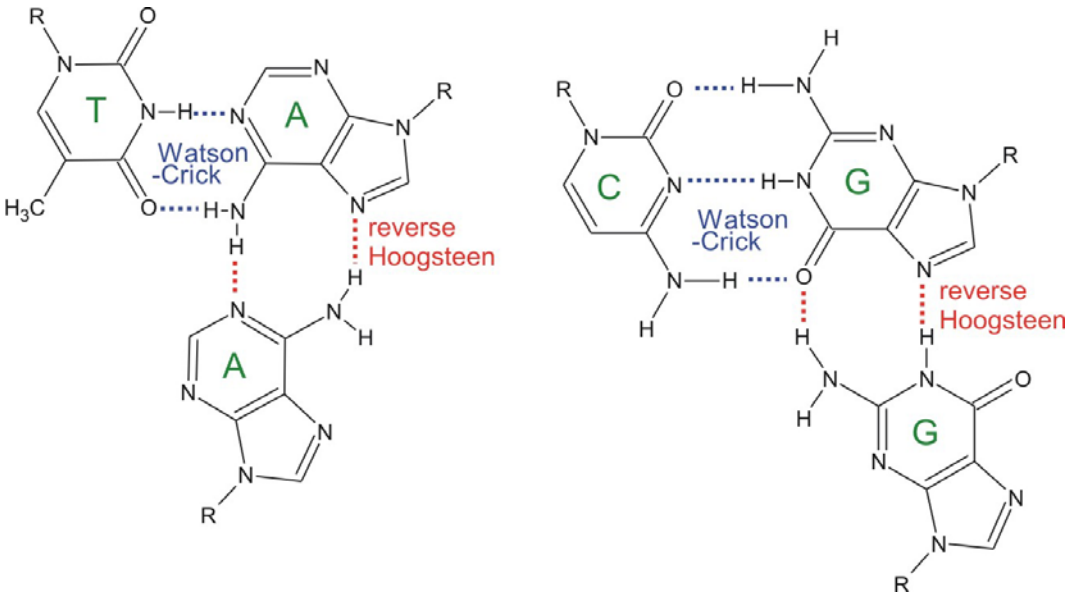


Abb. 59: Ausbildung von reverse Hoogsteen-Bindungen zwischen zwei Purinbasen (A=A bzw. G=G)

3.4.4. CpG-Oligonukleotide

Ein grundsätzlich anderer Ansatz zur therapeutischen Anwendung von Oligonukleotiden wird mit den CpG-Oligonukleotiden beschritten. Dabei handelt es sich um kurzkettige, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide, welche von speziellen Basenabfolgen flankierte, nicht-methylierte Cytidin-Guanosin Dinukleotide, sogenannte CpG-Motive enthalten. In der Natur sind diese nicht-methylierten CpG Dinukleotide, zusammen mit dem entsprechenden flankierenden Basenkontext, charakteristisch für die mikrobielle DNA von Bakterien und Viren. Bei Eukaryonten kommt diese Sequenzabfolge in Verbindung mit fehlender Methylierung eher selten vor, wodurch das Immunsystem in der Lage ist, das molekulare Muster der pathogenen DNA von der körpereigenen DNA zu unterscheiden[(51)]. Das Vorhandensein von DNA mit CpG-Motiven signalisiert dem Körper somit die Anwesenheit von mikrobiellen Erregern, was eine allgemeine Stimulation des Immunsystems bewirkt (unspezifische Immunantwort).
Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Strategien basiert der therapeutische Ansatz mit CpG-Oligonukleotiden nicht auf einer Hemmung der Translation oder Transkription. Vielmehr kommt es bei den synthetischen CpG-Oligonukleotiden zu einer Erkennung durch einen Proteinrezeptor (Protein-DNA Wechselwirkung). Der Mechanismus der immunstimulierenden Wirkung von CpG-Oligonukleotiden wurde erstmals 1995 von Krieg beschrieben[(52)].
Für die Erkennung der CpG Motive ist der Rezeptor TLR9 (Toll-like receptor 9) verantwortlich, welcher nur auf plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) und B-Zellen exprimiert wird. Wird DNA mit CpG Motiven erkannt, so bewirken die PDCs durch Ausschüttung von Zytokinen eine antigenspezifische Antwort der T-Zellen, während die aktivierten B-Zellen verstärkt Immunoglobuline sezernieren[(51)].
CpG-Oligonukleotide dienen daher auch als Vakzin-Adjuvans (Verstärker) bei Impfungen gegen Hepatitis C und Influenza. Dabei bewirken sie eine unspezifische Steigerung der Immunantwort, wodurch auch die spezifische Immunantwort auf das im Impfstoff enthaltene Antigen erhöht wird.
Aufgrund der rezeptorabhängigen Erkennung an der Zelloberfläche ist eine Aufnahme der Oligonukleotide in das Cytoplasma nicht notwendig, wodurch die klinische Anwendung erleichtert wird.

3.4.5. Aptamere

Eine weitere Klasse von therapeutisch wirksamen Oligonukleotiden stellen die Aptamere dar. Als Aptamere bezeichnet man synthetische Nukleinsäuren, die Peptide, Proteine oder andere Biomoleküle spezifisch binden können. Die Spezifität der Bindung beruht dabei aber nur bedingt auf der eigentlichen Nukleinsäuresequenz. Der eigentliche Grund ist die, durch die Sequenz bedingte, Sekundärstruktur des Oligonukleotids. Aptamere können dabei einfache, kovalente Bindungen mit Zielmolekülen an definierten Stellen eingehen, aber auch spezifische nichtkovalente Wechselwirkungen sind möglich. Die Dissoziationskonstante des Oligonukleotid-Target Komplexes liegt dabei im nanomolaren Bereich.
Als Aptamere wirkende Nukleinsäuren werden in der Regel über den SELEX-Prozess, durch Selektion und Amplifikation affiner Nukleinsäuren identifiziert. So gelang es der Firma Gilead Science (Foster City, Californien, USA), nach 32 Selektionszyklen im SELEX Verfahren einen Hemmstoff für Thrombin aus einer 1013 Elemente umfassenden ssDNA Bibliothek finden. Eine Verkürzung der gefundenen Sequenz auf 15 Nukleinsäuren ergab die Basenabfolge GGTTGGTGTGGTTGG, welche mit einer Affinität von 25nM an ein Thrombinmolekül bindet[(53)]. Gleich mehrere der Aptamer-Oligonukleotide nehmen dabei eine doppelte G-Quartett-Struktur mit verringerten Freiheitsgraden an (Abb. 60). Zwei

Oligonukleotide binden jeweils an der Fibrinogen- und an der Heparinbindungsstelle des Proteins, wobei ein Aptamer gleichzeitig zwei Thrombinmoleküle bindet[54]. Auch in vivo zeigen diese Aptamere einen hemmenden Effekt auf die Blutgerinnung[55].

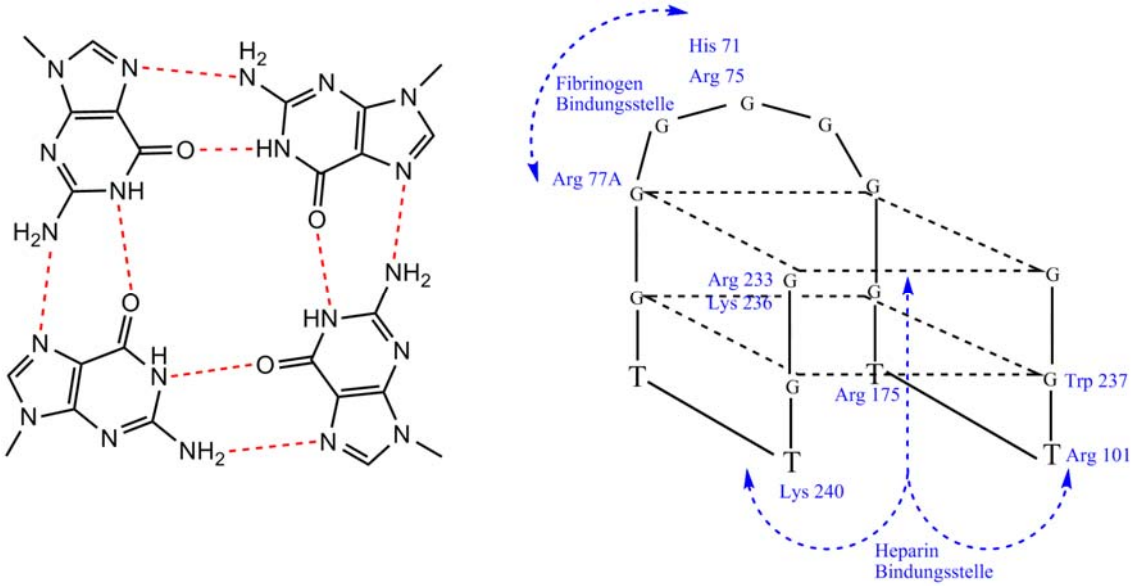


Abb. 60: G-Quartett-Struktur des Thrombinaptamers

Einen neueren Ansatz zur gezielten Entwicklung kurzkettiger Oligonukleotid-Aptamere stellt die in unserem Labor entwickelte SOCL/Protein-WW-Methode (Synthetic Oligonucleotide Combinatorial Library/Protein-Wechselwirkungs Methode) dar[56]. Hierbei werden Träger-gebundene Oligonukleotid-Bibliotheken verwendet, die nach Inkubation mit einem markierten Targetprotein und einem Screeningprozess zu einer Identifizierung des Aptamers führen.
Bei der therapeutischen Anwendung greifen die Aptamere also nicht auf der Ebene der Genexpression an, sondern können als Enzym-, Hormon- oder Toxinhemmer Verwendung finden. Im Falle einer fehlerhaften Verabreichung des Aptamers kann schnell und effizient ein Antidot auf Basis von Antisense Oligonukleotiden verabreicht werden, welches das Aptamer-Oligonukleotid spezifisch bindet und abfängt[57].

3.5. Oligonukleotid-Analoga

Um den therapeutischen Effekt eines Antisense-Oligonukleotids zu optimieren, muß neben einer stabilen Duplexbildung mit dem komplementären mRNA-Strang auch eine möglichst lange Verweildauer im Organismus erreicht werden. Oligonukleotide, welche die gleiche chemische Struktur wie natürliche DNA aufweisen, werden jedoch innerhalb kürzester Zeit durch zelluläre Nukleasen abgebaut.
In den letzten Jahren zielten daher viele Forschungen im Bereich der Oligonukleotidchemie darauf ab, synthetische Oligonukleotid-Analoga mit erhöhter Nukleaseresistenz sowie verbesserten Hybridisierungseigenschaften zu entwickeln, ohne dabei ihre therapeutische Wirksamkeit zu verlieren. Im Idealfall sollten diese Oligonukleotid-Analoga also resistent gegenüber nukleolytischem Abbau sein, stabile Duplexe mit der komplementären mRNA bilden und zur Aktivierung von RNaseH führen, welche den RNA-Teil des Duplex abbaut (s. Kap. 3.4.1).
Ein biologisches Oligonukleotid besteht aus Nukleosidphosphaten, die über Phosphodiester-Brücken verknüpft sind. Ein Nukleosid setzt sich dabei aus einem Zuckerbaustein (Ribose oder Desoxyribose) sowie einer N-glykosidisch verknüpften Nukleobase zusammen (s. Kap.

3.1.1). Als Oligonukleotid-Analoga bezeichent man Oligonukleotide, welche an einem oder an mehreren dieser Elemente (Phosphatbrücke, Zucker oder Nukleobase) chemisch verändert wurden (s. Abb. 61).

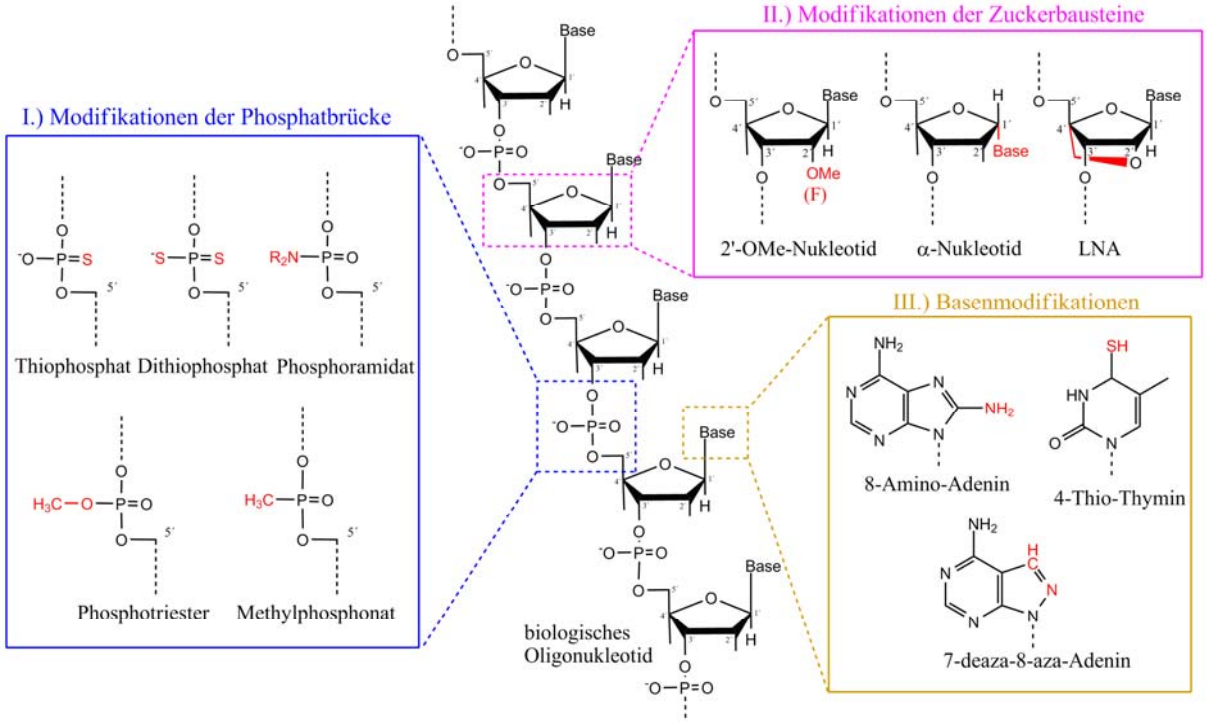


Abb. 61: Beispiele für intramolekulare Modifikationen an Oligonukleotiden

Da der endo- bzw. exonukleolytische Abbau durch die Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats erfolgt, kann durch dessen Modifizierung relativ einfach eine wesentlich erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen erreicht werden (I. in Abb. 61).
Die am häufigsten verwendete Modifikation besteht im Austausch eines Sauerstoffatoms der Phosphatbrücke durch ein Schwefelatom. Die Oligonukleotidsynthese wird in diesem Falle mit Standard-Phosphorigsäureesteramiden durchgeführt (s. Kap. 3.2.1.3), anstelle des Oxidationsschritts erfolgt jedoch die Ausbildung der Thiophosphatbrücke durch den Einsatz eines Sulfurierungsreagenz wie z.B. des Beaucage-Reagenz (s. Abb. 30).
Da Oligonukleotid-Thiophosphate (engl. Phosphorothioates) als erstes zum medizinischen Einsatz kamen, werden sie auch als Oligonukleotid-Analoga der „ersten Generation" bezeichnet. Sie zeigen eine um Größenordnungen gesteigerte Nukleaseresistenz und können, wie auch normale Oligonukleotide, mit mRNA hybridisieren. Duplexe aus mRNA und Oligonukleotid-Thiophosphaten stellen sogar sehr gute Substrate für RNaseH dar. Leider weisen Oligonukleotid-Thiophosphate gegenüber natürlichen Oligonukleotiden auch einige Nachteile auf. Das auf diese Weise modifizierte Phosphatrückgrat zeigt zum Beispiel eine hohe Affinität zu Proteinen, was zu unspezifischen Wechselwirkungen führen kann[(58)]. Aufgrund des asymetrisch substituierten Phosphoratoms entsteht darüber hinaus in jeder Phosphatbrücke ein Chiralitätszentrum, was bei einem Oligonukleotid mit n Monomereinheiten zu einem Gemisch aus 2^n Diastereomeren führt. Die Folge sind uneinheitliche Hybridisierungseigenschaften und eine Verbreiterung des Schmelzbereichs.
Bei den Oligonukleotid-Dithiophosphaten (engl. Phosphorodithioates) sind beide Sauerstoffatome der Phosphatbrücke durch Schwefelatome ersetzt. Dadurch ist kein Chiralitätszentrum mehr vorhanden und die Synthese führt zu einem einheitlichen Produkt. Allerdings weisen Dithiophosphat-Oligonukleotide deutlich schlechtere Hybridisierungs-eigenschaften auf und bewirken keine Aktivierung von RNaseH.

Eine weitere wichtige Möglichkeit zur Modifizierung der Phosphatbrücke ist durch die Verwendung von Methylphosphonsäureesteramiden (engl. Methylphosphonamidites) während der Oligonukleotidsynthese gegeben. Bei den dabei entstehenden Methylphosphonat-Oligonukleotiden ist ein Sauerstoffatom der Phosphatbrücke durch eine Methylgruppe ersetzt, was zur Ausbildung eines Chiralitätszentrums sowie zum Wegfall einer negativen Ladung führt. Methylphosphonat-Oligonukleotide weisen durch ihren nichtionischen Charakter eine wesentlich bessere Fähigkeit zur Membranpassage auf und sind nahezu vollständig resistent gegenüber nukleolytischem Abbau. Allerdings zeigen auch sie, aufgrund des Diastereomeren-Problems, uneinheitliche Hybridisierungseigenschaften und bewirken auch keine RNaseH-Aktivität.
Modifikationen an den Nukleobasen (II. in Abb. 61), wie der Austausch von Adenin durch chemosynthetische Derivate (z.B. 7-deaza-8-aza-Adenin), bewirken oftmals eine verstärkte Basenstapelung oder die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrücken zum komplementären Strang. Basenmodifikationen dienen somit in erster Linie zur Verbesserung der Hybridisierungseigenschaften.
Die ebenfalls nukleaseresistenten α-anomeren Oligonukleotide weisen gegenüber biologischen Nukleinsäuren eine umgekehrte Konfiguration an der 1´-Position des Zuckers auf. Bei der Hybridisierung mit einem komplementären mRNA-Strang kommt es dadurch zu einer parallelen Ausrichtung innerhalb des Duplex. Dieser weist zwar einen höheren Schmelzpunkt auf als β–konfigurierte Oligonukleotide, stellt aber kein Substrat für RNaseH dar[(59)].
Oligonukleotid-Analoga der „zweiten Generation“ basieren auf modifizierten Zuckerbausteinen (III. in Abb. 61). Dabei spielen Derivate mit einem Heteroatom an der 2´-Position die wichtigste Rolle. So führt der Einbau eines Fluoratoms an der 2´-Position zu einer Erhöhung des Schmelzpunktes von bis zu 2,5°C pro Modifikation. Die auch in biologischer tRNA, rRNA und snRNA vorkommende 2´-OMe-Modifikation führt, neben einer höheren Nukleaseresistenz, immerhin zu einer Steigerung der Duplexstabilität von bis zu 1°C pro Modifikation. Elektronegative Substituenten wie ein Fluor- oder ein O-Alkyl-Rest bewirken in diesem Falle eine Stabilisierung der C3´-Endo Konformation der Pentose, was der Konformation der Typ A Doppelhelix eines RNA-Duplex entspricht[(60)].
Durch den Einbau einer Methylenbrücke zwischen dem 2´-Sauerstoff und dem Kohlenstoff an der 4´-Position wird die Konformation der Pentafuranose vollständig in der C3´-Endo Konformation eingefroren. Diese LNA´s (locked nucleic acids) bewirken einen starken Anstieg des Schmelzpunktes um bis zu 6°C pro modifiziertem Nukleotid[(61)] bei gleichzeitig erhöhter Nukleaseresistenz. Leider bewirken RNA-LNA Duplexe jedoch keine Aktivierung von RNaseH.
Die „peptide nucleic acid“ (Abb. 62) stellt ein Oligonukleotid-Analogon der „dritten Generation“ dar. In einem PNA-Strang ist das komplette Phosphat-Zucker-Rückgrat durch ein isosteres Rückgrat aus Aminoethylglycin-Einheiten ersetzt. Die einzelnen Aminoethylglycin-Monomere sind dabei amidisch über ihre primäre Aminogruppe verknüpft, während die Nukleobasen, ebenfalls über eine Amidbindung, an die sekundäre Aminogruppe gebunden sind. PNA hybridisiert bereits bei sehr niedrigen Ionenstärken stabil mit einem Target-Strang und ist vollständig resistent sowohl gegenüber nukleolytischem als auch gegenüber proteolytischem Abbau. Allerdings bewirken auch PNA-RNA Duplexe keine Aktivierung von RNaseH.

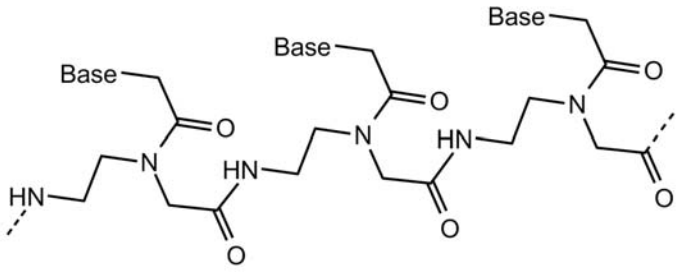


Abb. 62: PNA (Peptide Nucleic Acid)

Fast alle Modifizierungen des Phosphatrückgrats führen zu Oligonukleotid-Analoga welche ihre Fähigkeit zur Aktivierung der RNaseH eingebüßt haben. Lediglich Duplexe aus RNA und Oligonukleotid-Thiophosphaten können, neben den natürlichen Oligonukleotiden, als Substrat für RNaseH dienen. Da die RNaseH-Aktivierung jedoch den wichtigsten Teil des Antisense-Mechanismus darstellt (s. Kap. 3.4.1) bedeutet dies, dass eine erhöhte Nukleaseresistenz zwar eine längere pharmakologische Halbwertszeit bewirkt, in den meisten Fällen aber dennoch eine deutliche Verminderung des Antisense-Effektes nach sich zieht.
Diese gegenläufigen Effekte können durch die Verwendung chimärer Strukturen umgangen werden. So werden häufig chimäre Oligonukleotide eingesetzt, die in der Mitte aus einem unmodifizierten, RNaseH-aktivierenden Bereich bestehen und lediglich an den beiden Enden einige modifizierte, nukleaseresistente Nukleotide tragen. Diese Oligonukleotide zeigen eine hohe Stabilität gegenüber Exonukleasen, die Resistenz gegenüber Endonukleasen kann auf diesem Wege jedoch nicht erhöht werden.

3.6. PEG-Konjugate pharmazeutischer Wirkstoffe

Der Einsatz biopharmazeutischer Therapeutika wie z.B. Proteine, Peptide, Antikörper oder auch therapeutisch wirksamer Oligonukleotide (s. Kap. 3.4) hat in jüngerer Zeit einen immer höheren Stellenwert in der Medizin gewonnen. Hauptvorteile dieser biopharmazeutischen Wirkstoffe sind in erster Linie ihre hohe Spezifität (im Idealfall findet lediglich eine Wechselwirkung mit dem Target statt), verbunden mit meist geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zu chemischen Pharmazeutika. Die größten Nachteile sind allerdings neben einer oftmals schlechten Löslichkeit auch eine sehr geringe Halbwertszeit im Organismus, bedingt durch einen schnellen metabolischen Abbau. Da diese Wirkstoffe in ihrer ursprünglichen Form identisch mit anderen biologischen Komponenten sind, werden sie auch leicht vom körpereigenen Immunsystem angegriffen.
Polyethylenglykol (PEG) ist ein chemisch inertes, nicht-toxisches Polymer mit der allgemeinen Summenformel $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$, welches sowohl in Wasser als auch in unpolaren Lösungsmitteln löslich ist. Chemisch gesehen handelt es sich um einen Polyether des Ethandiols. Der wichtigste charakteristische Parameter eines Polyethylenglykols ist durch die Kettenlänge n gegeben. Je nach Kettenlänge liegen die Polyethylenglykole als flüssige, wachsähnliche oder feste Substanzen vor.

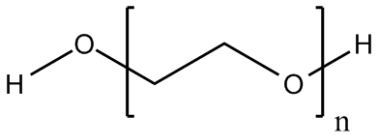


Abb. 63: Grundeinheit einer Polyethylenglykol-Kette

Kurzkettige Polyethylenglykole mit einer Molekülmasse bis 400Da (n < 10) sind bei Normalbedingungen flüssig, während Polyethylenglykole mittlerer Kettenlängen von 1000

bis 35.000Da (n = 20 bis n = 800) als Feststoffe vorliegen. Steigt die Molekülmasse der Substanzen über 35.000Da (n > 800), so ist der Einfluss der endständigen Hydroxylgruppen zu vernachlässigen. Diese Substanzen zeigen keine Glykoleigenschaften mehr und werden als Polyethylenoxid bezeichnet. Die beiden Enden einer PEG-Kette (α- und ω-Ende) können entweder mit den gleichen oder mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen funktionalisiert werden, wodurch homofunktionale, homobifunktionale bzw. heterobifunktionale Produkte entstehen. Durch den Austausch einzelner Monomereinheiten innerhalb der Kette durch multifunktionelle Komponenten (Lysin, Glycerin…) besteht darüber hinaus die Möglichkeit zur Erzeugung von verzweigten Strukturen.
Die Derivatisierung von Proteinen, Peptiden und anderen nicht-peptidischen Wirkstoffen mit Polyethylenglykol wird umgangssprachlich auch als PEGylierung bezeichnet. Das Ergebnis ist in den meisten Fällen ein nicht-toxisches Produkt, welches eine erhöhte Stabilität gegenüber körpereigenen Enzymen aufweist und sowohl im Blut als auch in anderen Lösungsmitteln löslich ist. Ein um mehrere Größenordnungen gesteigertes hydrodynamisches Volumen (Abb. 64) verringert die Filtration durch die glomerulären Kapillaren der Niere und bewirkt eine deutliche Verzögerung der renalen Auscheidungsrate.
Durch den erschwerten Angriff von Antikörpern (Abb. 64) weist der PEGylierte Wirkstoff oftmals eine im Gegensatz zum unmodifizierten Molekül wesentlich geringere Immunogenität auf. Auch die Löslichkeit wird durch die hydrophilen PEG-Ketten stark erhöht. Durch die drastische Erhöhung des Molekulargewichts und des hydrodynamischen Volumens bei der Derivatisierung mit hochmolekularem PEG besteht allerdings die Gefahr einer Anreicherung in der Leber.

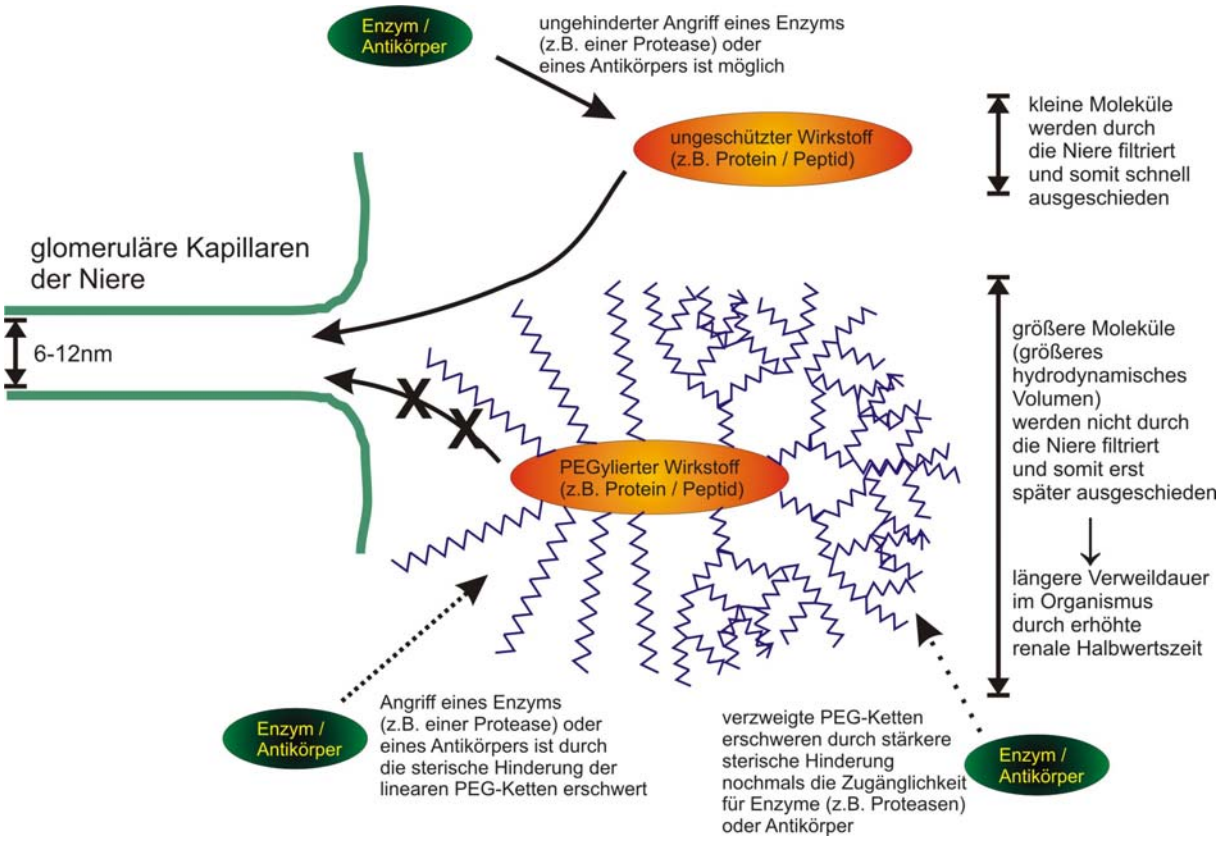


Abb. 64: Auswirkung der PEGylierung von pharmazeutischen Wirkstoffen

Polyethylenglykole sind mit den heutigen Synthese- und Trennmethoden nur bis zu einer Molekülmasse von ca. 1000Da (ca. 25 Monomereinheiten) in monodisperser Form herzustellen. Für die Derivatisierung von pharmakologischen Molekülen werden jedoch in der

Regel PEG´s mit einer wesentlich höheren Molekülmasse verwendet. Obwohl die heute verfügbaren langkettigen Polyethylenglykole bei weitem nicht mehr die Polydispersität wie in früheren Zeiten aufweisen, muß dennoch beachtet werden, dass durch die Derivatisierung mit polydispersem PEG diese Polydispersität auch auf die Wirkstoffe übergeht. Dies führt, insbesondere bei kleineren Molekülen, zu Derivaten mit unterschiedlich ausgeprägter Immunogenität und variierenden pharmakokinetischen Halbwertszeiten.
Die erhöhte Stabilität und die geringere Auscheidungsrate eines PEG-derivatisierten Wirkstoffs führen zu einer verlängerten Halbwertszeit im Organismus. Dadurch kann die Anzahl der notwendigen Verabreichungen, um die Konzentration des Wirkstoffes über einem bestimmten Grenzwert zu halten, deutlich veringert werden (Abb. 65).

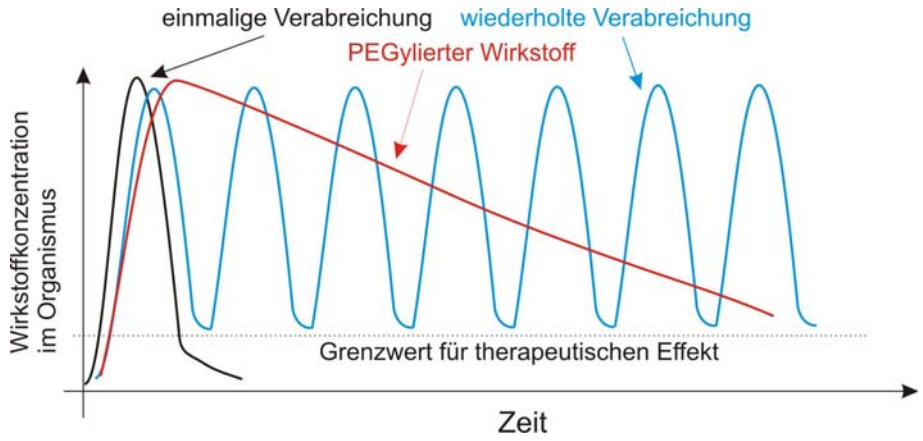


Abb. 65: zeitlicher Verlauf der Wirkstoffkonzentration im Organismus

Die ersten erfolgreichen PEGylierungen, um die Immunogenität nativer Proteine unter Beibehaltung der biologischen Aktivität zu verringern, wurden 1977 von Davies und Abuchowsky an Rinder-Albumin[(62)] und Rinderleber-Katalase[(63)] durchgeführt.
Mittlerweile ist bereits eine ganze Reihe an PEGylierten Protein-Wirkstoffen wie z.B. PEG-Asparaginase[(64)] (Oncaspar® zur Therapie von akuter lymphoblastischer Leukämie), PEG-Adenosindeaminase[(65)] (Adagen® zur Behandlung der Immunschwächekrankheit SCID) oder PEG-Interferon α2a[(66)] bzw. α2b[(67)] (Pegasys® bzw. PEG-Intron® gegen HepatitisC) von der FDA anerkannt und auf dem Markt.
Oftmals weisen PEG-derivatisierte Wirkstoffe eine stark verminderte biologische Aktivität im Vergleich zum unmodifizierten Ausgangsmolekül auf, was aber durch die höhere Stabilität und die längere Verweildauer im Organismus mehr als ausgeglichen wird. So zeigt das PEGylierte Interferon α2a (Pegasys®) aufgrund der günstigeren Pharmakokinetik eine stark verbesserte Wirkung im Organismus, obwohl es für sich betrachtet nur noch 7% der Aktivität des nativen Proteins aufweist[(66)].
Die PEGylierung von Peptiden und Proteinen erfolgt durch Reaktion von Polyethylen-glykolen mit reaktiven Endgruppen und den entsprechenden reaktiven Gruppen in den Seitenketten einzelner Aminosäuren.
Aminogruppen sind die mit Abstand häufigsten reaktiven Gruppen in einem Protein (Lysin, Ornithin, N-Terminus). Sie sind aufgrund ihres hydrophilen Charakters meist zum Lösungsmittel hin exponiert und somit leicht zugänglich.
Durch Alkylierung mit einem PEG-Aldehyd (Abb. 66) wird die ürsprüngliche primäre Aminogruppe in eine sekundäre Aminogruppe umgewandelt, wodurch die positive Partialladung an dieser Stelle des Proteins beibehalten wird.

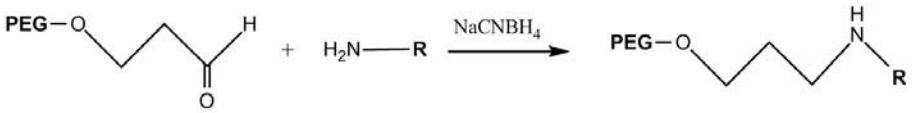


Abb. 66: Alkylierung durch Reaktion einer Aminogruppe mit einem PEG-Aldehyd

Eine einfachere und schnellere Reaktion zur PEG-derivatisierung an einer Aminogruppe ist durch die Umsetzung mit einem PEG-NHS Ester gegeben (Abb. 67). Die sich dabei ausbildende mesomeriestabilisierte Amidbindung führt jedoch zu einem Verlust der positiven Partialladung, was unter Umständen zu einer Veränderung der Proteinstruktur führen kann.

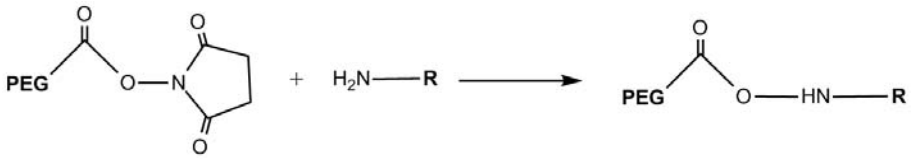


Abb. 67: Knüpfung einer Amidbindung durch Reaktion einer Aminogruppe mit PEG-NHS

Die hohe Anzahl an reaktiven Aminogruppen innerhalb eines Proteins führt allerdings meist zu einem Gemisch aus Isomeren, da nicht alle verfügbaren Aminogruppen zu 100% umgesetzt werden. Die Aufreingung dieser Isomerengemische ist relativ schwierig, für eine Freigabe durch die FDA (Food and Drug Administration) ist jedoch meist eine möglichst genaue Charakterisierung jedes einzelnen Isomers notwendig. Eine gute Möglichkeit der seitenkettenspezifischen Umsetzung von Aminogruppen besteht dabei in der Ausnutzung der unterschiedlichen pk_a-Werte von endständigen Aminogruppen und Aminogruppen des Lysins[68].

Aber auch die weitaus seltener vorkommenden Thiolgruppen des Cysteins bieten, sofern sie nicht zur Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken dienen, eine gute Möglichkeit für eine gezielte, zu weitaus weniger Isomeren führende PEGylierung. Aufgrund ihrer Hydrophobie sind die Cysteinreste jedoch meist tief innerhalb der Tertiärstruktur des Moleküls versteckt und damit bei weitem nicht so gut zugänglich wie Aminogruppen. Neben einer teilweisen Denaturierung zur Freilegung der Cysteinreste[69] gewinnt auch die rekombinante Herstellung von Proteinmutanten immer mehr an Bedeutung. Auf diese Weise kann ein Cysteinrest, durch Austausch einer für die Proteinfunktion unwichtigen Aminosäure, an nahezu jeder beliebigen Stelle im Molekül eingebaut werden.

Die einfachste und auch spezifischste Reaktion zur PEG-derivatisierung einer Thiolgruppe besteht in der Umsetzung mit einem durch Dipyridyldisulfid aktivierten PEG unter Ausbildung einer Disulfidbrücke (Abb. 68). Diese Reaktion ist reversibel, was dazu führt, dass die Bindung im Organismus reduktiv gespalten werden kann.

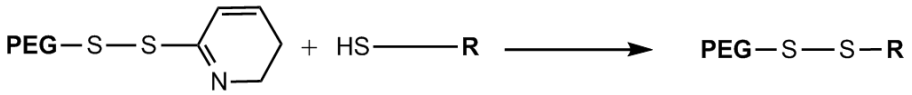


Abb. 68: Knüpfung einer Disulfidbrücke durch Reaktion einer Thiolgruppe mit PEG-Pyridyldisulfid

Alternative Möglichkeiten zur Umsetzung einer Thiolgruppe sind Reaktionen mit PEG-Maleimid (Abb. 69) oder PEG-Iodoacetat (Abb. 70). Dies führt in beiden Fällen zu einer stabilen Thioether-Bindung, allerdings sind auch Nebenreaktionen mit Aminogruppen möglich.



Abb. 69: Reaktion einer Thiolgruppe mit PEG-Maleimid



Abb. 70: Reaktion einer Thiolgruppe mit PEG-Iodoacetat

Die enzymatische Verknüpfung stellt ebenfalls eine elegante Möglichkeit zur gezielten PEGylierung dar[(70)]. Verschiedene Transglutaminasen sind z.B. in der Lage, ein Amino-PEG spezifisch an die Amidgruppe eines Glutaminrestes zu koppeln (Abb. 71).

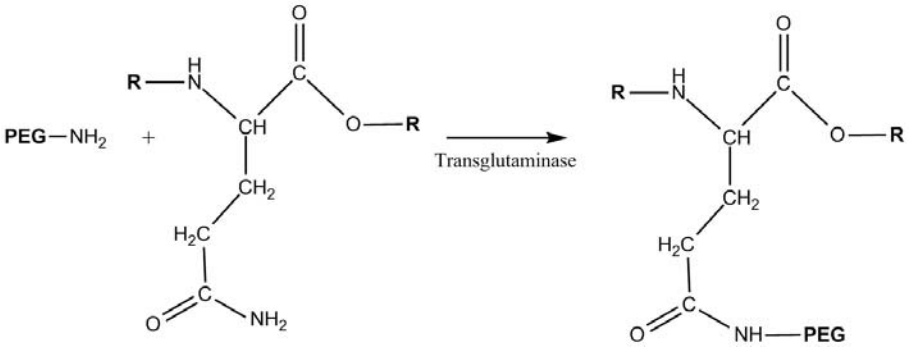


Abb. 71: Enzymatische Verknüpfung eines Amino-PEG mit einer Glutamin-Seitenkette durch Transglutaminase

Neben den Proteinen und Peptiden stellen die Oligonukleotide eine weitere wichtige Gruppe an biopharmakologischen Makromolekülen dar. In erster Linie ist dabei der Einsatz als Antisense-Oligonukleotide (s. Kap 3.4.1) zu nennen, aber auch therapeutische Ansätze in Form von triplexbildenden Antigen-Oligonukleotiden (s. Kap. 3.4.3) oder Aptameren (s. Kap 3.4.5) sind möglich.
Die Halbwertszeiten ungeschützter Oligonukleotide liegen im Organismus jedoch im Bereich von nur wenigen Minuten. Obwohl diese Halbwertszeit durch intramolekulare Modifizierungen (z.B. Verwendung von Thiophosphaten) stark erhöht werden kann, sind selbst Oligonukleotid-Thiophosphate nicht vollkommen resistent gegenüber den im Plasma vorkommenden Endo- bzw. Exonukleasen.
Durch PEGylierung besteht auch bei Oligonukleotiden die Möglichkeit, den Angriff von Nukleasen sterisch zu behindern. Gleichzeitig wird dabei, durch Maskierung der negativen Ladungen des Phosphat-Rückgrats, auch die Zellgängigkeit erleichtert.
Im Gegensatz zu Proteinen und Peptiden, bei denen die PEG-derivatisierung in der Regel inmitten des Moleküls an verschiedenen Aminosäure-Seitenketten durchgeführt wird, ist man bei der PEGylierung von Oligonukleotiden auf die beiden Termini des Moleküls angewiesen. Mittels verschiedener Linker ist jedoch die Generierung fast jeder erdenklichen reaktiven Gruppe am 3´- bzw. 5´-Ende des synthetisch hergestellten Oligonukleotids möglich (s. Kap. 3.2.1.4). Die wichtigste terminale Funktionalisierung ist dabei ein Aminolinker, wodurch Umsetzungen z.B. mit PEG-NHS möglich werden (Abb. 67). Die Funktionalisierung mittels eines Thiol-Linkers führt zu einer Thiolgruppe die, analog zum Cystein in den Proteinen und Peptiden, beispielsweise mit PEG-Pyridylsulfid (Abb. 68) oder PEG-Maleimid (Abb. 69) umgesetzt werden kann.

Da auf diese Weise nur eine bzw. zwei Stellen im Molekül gezielt PEGyliert werden, entstehen, im Gegensatz zu den auf Proteinen und Peptiden basierenden Wirkstoffen, bei entsprechender Syntheseführung und der Verwendung von monodispersem PEG auch keine Isomerengemische.
Als erstes PEG-derivatisiertes Oligonukleotid wurde im Jahre 2004 das 28 Basen lange, mit einem verzweigten 40kDa PEG derivatisierte Aptamer Pegaptanib® (ein Derivat des Aptamers Macugen® zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration) von der FDA anerkannt[(1)].

3.7. Internalisierungspeptide

Der effiziente klinische Einsatz pharmakologischer Makromoleküle (z.B. von Antisense-Oligonukleotiden) wird durch eine verminderte zelluläre Aufnahme dieser potentiellen Wirkstoffe behindert. Aufgrund ihrer Größe und ihres hydrophilen Charakters sind diese Moleküle oftmals nicht in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen und bleiben daher wirkungslos. Nur relativ kleine Moleküle können, wenn andere Parameter wie Ladung und Polarität stimmen, die Lipid-Doppelschicht durch passive Diffusion entlang eines elektrochemischen Gradienten überwinden[(2)].
Größere Moleküle werden in der Regel nur rezeptorvermittelt oder durch Endozytose internalisiert, was im ersten Fall für eine allgemeine Anwendung zu spezifisch ist. Bei der endozytotischen Aufnahme hingegen verbleiben die Moleküle oftmals in den Endosomen und werden nur sehr ineffizient ins Cytoplasma entlassen.
Dieses Problem kann zwar durch Techniken wie Mikroinjektion, Elektroporation und dem Einsatz von Transfektionsreagenzien (meist kationischer Lipide) umgangen werden[(71)], was in vielen Fällen mit einer vorübergehenden Destabilisierung der Zellmembran verbunden ist. Diese Methoden führen somit oftmals zu einem erhöhten Stress für die Zellen, was eine geringere Überlebensrate mit sich führt. Im Allgemeinen sind diese Arbeiten auch nur in Zellkulturen durchführbar.
Eine elegantere Methode ist die Verwendung von Internalisierungspeptiden (CPP = Cell penetrating peptides) als Carrier. Dabei handelt es sich um eine Klasse von Peptiden mit einer Länge von 9 bis 30 Aminosäuren, die in der Lage sind, biologische Membranen leicht zu passieren. Durch kovalente Kopplung über eine Disulfidbrücke, welche durch ein zusätzliches terminales Cystein ausgebildet wird, kann diese Eigenschaft auch auf andere Moleküle (z.B. größere Proteine, Oligonukleotide, siRNA...) übertragen werden. Dadurch werden auch diese Moleküle in die Zelle eingeschleust, wobei die Disulfidbrücke nach der Internalisierung durch intracytoplasmatische Reduktion gespalten werden kann. Diese Spaltung und die damit verbundene Freisetzung des gekoppelten Moleküls in das Cytoplasma wird jedoch kontrovers diskutiert[(72), (73)].
Die Konjugate weisen, im Gegensatz zu den komplexen Gebilden, die sich bei der Verwendung liposomaler Transfektionsreagenzien ergeben, eine definierte Molekülstruktur auf, wobei die Toxizität als gering einzustufen ist[(5)]. Dadurch könnten sich diese Carrier-Cargo Konstrukte für therapeutische Zwecke im Tiermodell sowie auch für humane Anwendungen als geeignet erweisen.

3.7.1. Penetratin

Das bekannteste Internalisierungspeptid ist das aus dem Antennapedia-Motiv abgeleitete Penetratin. Es stammt aus der Familie der Drosophila-Homeoproteine, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche in wichtige biologische Prozesse der Zellentwicklung eingebunden sind. Der DNA-Bindungsbereich dieser Homeoproteine ist hochkonserviert und wird als Homeodomäne bezeichnet. Die Homeodomäne des Antennapedia-Motivs besteht aus

60 Aminosäuren aufgeteilt in 3 α-Helices. Die dritte Helix ist durch einen β-Turn von der zweiten Helix separiert.
Die Homeodomäne von Antennapedia (AntpHD) wird in Zellkulturen internalisiert und wandert direkt in den Kern, wo sie Einfluß auf die Transkription nehmen kann. Verantwortlich für die Fähigkeit zur Internalisierung zeichnet die dritte Helix der AntpHD. Dieses 16 Aminosäuren lange Peptid (AS. 43-58) wird als Penetratin bezeichnet.

Penetratin: H_2N-***RQIKIWFQNRRMKWKK***-COOH

Frühe Studien zeigten, dass Penetratin in der Lage ist, die Zellmembran bei 4°C ebenso wie bei 37°C zu passieren und sich im Kern anzureichern, was den Mechanismus einer energie- und rezeptorunabhängigen Internalisierung nahelegte[74]. Diese Beobachtungen wurden durch verschiedene Versuche mit inversen Sequenzen und Sequenzen aus D-Aminosäuren untermauert[75]. Als essentiell für die Fähigkeit zur Translokation zeigten sich die letzten 7 C-terminalen Aminosäuren, wobei das Tryptophan eine besondere Rolle spielt[76]. Durch punktuelle Modifikationen, wie z.B. die Substitution einzelner Aminosäuren, konnte die intrazelluäre Verteilung (Kern oder Cytoplasma) beeinflußt werden, ohne die Fähigkeit des Peptids zur Translokalisation der Zellmembran im Wesentlichen zu beeinflussen. Die Translokalisation beruht dabei nicht zwingend auf einer α-helicalen amphiphatischen Konformation[77], welche zu einem positiv geladenen Kanal führen würde. Dazu ist ein 16 Aminosäuren großes Peptid nicht lang genug, außerdem ist die Passage von kovalent verknüpften Oligopeptiden oder Oligonukleotiden durch einen solchen positiv geladenen Kanal unwahrscheinlich.
Durch den hohen Gehalt an Arginin und Lysin ist das Peptid bei physiologischem pH Wert positiv geladen, worauf das ursprüngliche Modell der „inversen Micelle“ zur direkten Internalisierung beruht[76]. Dieser Prozess wäre energie- und rezeptorunabhängig[3] und würde somit auch bei niedrigeren Temperaturen mit gleicher Effizienz ablaufen. In diesem Modell geht das positiv geladene Penetratin eine Wechselwirkung mit den negativ geladenen Membran-Phospholipiden ein, was zur lokalen Anreicherung der Phospholipide und schließlich zur Ausbildung einer inversen Micelle (eines hydrophoben Käfigs) führt. Dieser hydrophobe Käfig wandert durch die Plasma-Membran und gibt das Penetratin, mitsamt einem eventuell kovalent verknüpftem Molekül, direkt in das Cytoplasma ab. Der Vorteil gegenüber einer endozytotischen Aufnahme bestünde, neben der geringeren Zelltoxizität, auch darin, dass das Peptid direkt in das Cytoplasma abgegeben wird und nicht in den Endosomen verbleibt.
In neueren Arbeiten wird das Modell der „inversen Micelle“ und der damit verbundenen direkten Freisetzung in das Cytoplasma allerdings wieder kontrovers diskutiert und doch ein endozytotischer Mechanismus postuliert, wobei das Carrier-Cargo Konstrukt zum größten Teil in den Endosomen verbleibt[78], [79]. Somit ist bei geringeren Konzentrationen kaum ein Antisense-Effekt durch ein verknüpftes Antisense-Oligonukleotid zu verzeichnen. Bei höheren Konzentrationen kommt es hingegen zu einer Destabilisierung der Membran, wodurch eine direkte Penetration ermöglicht wird[80].

3.7.2. HIV-Tat

Ein weiteres bekanntes Internalisierungspeptid ist das aus dem HIV-Tat Protein abgeleitete TAT. Das HIV-Tat-Protein (Tat = trans-acting activator of transcription) ist im Zellkern und im Cytoplasma HIV-infizierter Zellen zu finden und sorgt als Transkriptionsfaktor durch induzierte Elongation kurzer viraler RNA-Transkripte zu einer vielfachen Verstärkung der viralen Genexpression[81].
Die Tat-Proteine sämtlicher HIV-Typen bestehen aus 6 Hauptdomänen[4], wobei die vierte Domäne auch als basische Domäne bezeichnet wird, da sie sechs Arginine und zwei Lysine

enthält. Darüber hinaus besitzt sie eine nukleäre Lokalisationssequenz, wodurch eine Aufnahme in den Zellkern ermöglicht wird. In der vierten Domäne ist auch die stark basische TAT-Sequenz enthalten, die erst die Membranpassage des gesamten Moleküls ermöglicht.
Die Fähigkeit zur Internalisierung ist somit, analog zum Penetratin, nicht an die vollständige Proteinsequenz gebunden. Lediglich die 13 Aminosäuren lange TAT-Sequenz der basischen Domäne bewirkt die vollständige Einschleusung[82].

HIV-Tat: H_2N-***GRKKRRQRRRPPQ***-COOH

Wie beim Penetratin handelt es sich auch bei TAT um ein stark polares, polykationisches Molekül. Analog zum Penetratin verlieren auch reverse Sequenzen und Sequenzen aus D-Aminosäuren nicht die Fähigkeit zur Internalisierung[83], was auf einen Rezeptor-unabhängigen Mechanismus der Membranpassage hindeutet. Neuere Forschungen bestätigten tatsächlich, dass die Internalisierung unabhängig von Caveolar- bzw. Clathrin-vermittelter Endocytose stattfindet. Die zelluläre Aufnahme von TAT-Oligonukleotid-Konjugaten wird dabei sehr wahrscheinlich zunächst durch eine rezeptorunabhängige elektostatische Wechselwirkung des TAT mit negativ geladenen, cholesterinreichen und glycolipo-proteinhaltigen Mikrodomänen (lipid rafts) der Zellmembran initiiert, was zu einer spontanen Internalisierung des gesamten Carrier-Cargo Konjugats über lipid raft Macropinocytose und zu einem Verbleib in den Macropinosomen führt[84]. Die TAT-haltigen Endosomen weisen jedoch gewisse Leckagen auf, was dazu führt, dass die Konstrukte auch teilweise in das Cytoplasma abgegeben werden, wodurch gekoppelte Antisense-Oligonukleotide einen messbaren Antisense-Effekt zeigen[84]. Der Großteil der Carrier-Cargo Konjugate bleibt jedoch im Endosom gefangen[85].

3.7.3. Neuere Internalisierungspeptide

Neben den „klassischen“ Internalisierungspeptiden wie Penetratin und TAT existieren inzwischen eine Reihe an moderneren, teilweise synthetischen CPP´s, wobei in erster Linie Transportan, $(R\text{-}Ahx\text{-}R)_4$, R_6-Penetratin sowie M918 zu nennen sind. Antisense-Oligonukleotide, welche mit diesen Peptiden verknüpft sind, zeigen bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen einen biologischen Effekt. Auch weisen diese neueren Internalisierungspeptide bei höheren Konzentrationen meist eine geringere Cytotoxizität auf[80].

M918: H_2N-***MVTVLFRRLRIRRACGPPRVRV***-COOH

$(R\text{-}Ahx\text{-}R)_4$: H_2N-***R***-Ahx-***RR***-Ahx-***RR***-Ahx-***RR***-Ahx-***R***-COOH

R_6-Penetratin: H_2N-***RRRRRR-RQIKIWFQNRRMKWKK***-COOH

Transportan: H_2N-***GWTLNSAGYLLG-K-INLKALAALAKKIL***-COOH

Ein sehr vielversprechendes Internalisierungspeptid neuerer Zeit ist das aus dem Tumor-Repressor-Protein p14ARF abgeleitete M918[86]. Dieses CPP besteht aus den ersten 22 Aminosäuren von p14ARF, wobei die Sequenz zwischen der Position 3 und 8 invertiert ist. Obwohl der Aufnahmemechanismus ebenfalls endozytotisch über Macropinocytose verläuft, zeigen verknüpfte Antisense-Oligonukleotide einen ca. 15x stärkeren Effekt als vergleichbare Konstrukte mit Penetratin.
Viele Studien deuten darauf hin, dass die Guanidinium-Seitenketten des Arginins eine Schlüsselrolle bei der Membranpassage basischer CPP´s spielen. Dies bedeutet, dass kurze, künstliche Oligoargininsequenzen zu einer erhöhten Internalisierungsfähigkeit führen können[87]. Im synthetischen $(R\text{-}Ahx\text{-}R)_4$ sind daher mehrere Arginine durch einen 6-

Aminohexansäure-Linker verknüpft, während im R_6-Penetratin das ursprüngliche Penetratin mit sechs weiteren Argininen modifiziert wurde[80].
Das synthetische Internalisierungspeptid Transportan ist schließlich eine Kombination aus zwei Peptiden verschiedenen Ursprungs, welche über einen Lysinrest gekoppelt sind. Dadurch ergibt sich ein amphipathisches Molekül mit einer räumlich polarisierten Ladungsverteilung. Der N-Terminus besteht aus 12 Aminosäuren des Neuropeptids Galanin, während der C-Terminus des 27 Aminosäuren langen Peptids aus dem Toxin des Wespengifts Mastoparan gebildet wird[88].

3.7.4. Endosomolytische Internalisierungspeptide

Eine hohe zelluläre Aufnahmerate eines mit einem Internalisierungspeptid verknüpften Wirkstoffes führt nicht zwingenderweise zu einem biologischen Effekt (z.B. Antisense-Effekt), da die Konstrukte größtenteils in den Endosomen verbleiben[85]. Durch Zugabe von endosomolytischen Reagenzien wie z.B. Chloroquin (einem Inhibitor der H^+-ATPase) ist es zwar möglich, durch die Erhöhung des pH-Werts eine Lyse der Endosomen und somit eine Freisetzung des Carrier-Cargo Konjugats in das Cytoplasma zu bewirken[87], die Methode ist jedoch in der Regel auf Zellkulturversuche beschränkt.
Viele Virusarten entwickelten spezielle Mechanismen, um nach einer endosomalen Infektion aus den Endosomen in das Cytoplsma der Wirtszelle zu gelangen. Das Membran-Glykoprotein Hemagglutinin (HA) des Influenzavirus besteht aus zwei Untereinheiten, der HA1-Untereinheit, welche über eine Rezeptorbindung die endosomale Internalisierung bewirkt, sowie der HA2-Untereinheit, welche im niedrigen pH-Bereich der Endosomen (pH 4,5 – 6,5) durch Konformationsänderung eine Wechselwirkung mit der Membran eingeht und somit zu einer Lyse des Endosoms bzw. zur Fusion der Virusmembran mit der Endosomenmembran führt. Als verantwortlich für diese Fähigkeit zur pH-abhängigen Konformationsänderung erwiesen sich die letzten 23 N-terminalen Aminosäuren (hier kurz als HA2 bezeichnet), welche durch Protonierung eine amphiphatische, helikale Struktur ausbilden[89] deren hydrophober Bereich mit der Membran interagiert und die Zerstörung des Endosoms bewirkt.

HA2[90]: H_2N-***GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG***-COOH

Durch Kopplung des C-Terminus dieses endosomolytischen Peptids mit dem Internalisierungspeptid TAT zu HA2-TAT gelang es, ein chimäres Peptid herzustellen, welches die internalisierenden Eigenschaften des TAT mit den endosomolytischen Eigenschaften des HA2 kombiniert[84]. Dieses Konstrukt führt bei einer Konzentration von 20µM zu einer endozytotischen Internalisierung durch das TAT-Segment, gefolgt von einer gezielten Zerstörung der Endosomenmembran durch das HA2-Segment, ohne einen Einfluß auf die strukturelle Integrität der Plasmamembran zu nehmen. Das HA2-TAT sowie weitere in den Endosomen befindliche Makromoleküle werden dadurch in das Cytoplasma abgegeben. Erst höhere Konzentrationen von 50µM führen zu einer Zerstörung der Zellmambran[89]. Die meisten Studien mit HA2-TAT beschränken sich jedoch auf das ursprüngliche Peptid bzw. auf nicht-kovalente Formulierungen mit anderen Wirkstoffen. Das chimäre Fusionsprotein HA2-p53-R11 besteht hingegen aus einem kovalent verknüpften endosomolytischen Segment (HA2), einem Tumorrepressor als eigentlichen Wirkstoff (p53) sowie einem Internalisierungspeptid (R11 bzw. Polyarginin). Mit diesem Konstrukt gelang eine deutliche Steigerung des biologischen Effektes von p53 (Reduzierung der Proliferation von Krebszellen) im Vergleich zu einem entsprechenden Konstrukt (p53-R11) ohne endosomolytischen Part[91].

3.8. Streptavidin

3.8.1. Tetrameres Streptavidin

Streptavidin ist ein tetrameres Protein mit einer Molekülmasse von 53kDa welches von dem Bakterium *Streptomyces avidinii* produziert und üblicherweise, nach der Sezernierung, aus dessen Kulturfiltrat gewonnen wird. Es besteht aus vier identischen, 159 Aminosäuren langen, Untereinheiten mit einer Molmassse von je 13kDa. Jede dieser Untereinheiten ist in der Lage ein Biotin-Molekül mit einer sehr hohen Affinität (K_d ~10^{14} 1/M) zu binden (Abb. 72). Dabei handelt es sich um eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen in der Biologie. Das Molekül weist eine geringe Gesamtladung sowie einen isoelektrischen Punkt bei ca. pH 7 auf, wodurch Untersuchungen bei physiologischen Bedingungen möglich sind.

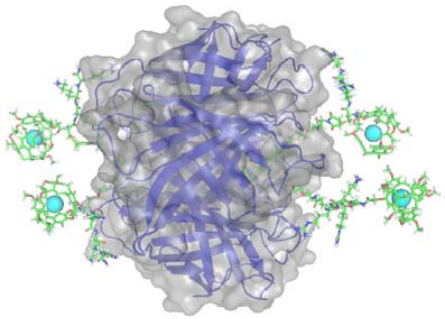


Abb. 72: Streptavidintetramer mit 4 Biotin-Bindungsstellen

Ein strukturell naher Verwandter des Streptavidins ist das aus Hühnereiweiss gewonnene Avidin. Trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeit sind die beiden Proteine evolutionär nicht miteinander verwandt, haben sich also unabhängig voneinander entwickelt. Genauer betrachtet weisen Streptavidin und Avidin nur 30% Sequenzidentität auf, während die Sekundär-, Tertiär-, und Quartärstruktur annähernd identisch sind. Im Gegensatz zu Avidin, welches aus einer Eukaryontenzelle stammt und daher posttranslational modifiziert wird, ist das Streptavidin kein Glykoprotein und enthält somit auch keine Seitenketten mit Kohlehydraten. Durch die fehlende Glykosylierung geht es seltener unspezifische Bindungen mit anderen Molekülen ein.
Das Streptavidintetramer ist ein sehr hitzestabiles Protein, welches auch einem weiten pH-Bereich standhält. So dissoziieren die Untereinheiten erst nach einer 20min Inkubation bei einer Temperatur von 100°C in einer 0,2% SDS-Lösung[92]. Eine häufige Anwendung für die Streptavidin-Biotin Wechselwirkung sind verschiedene Testsysteme in der Immunologie und der Molekulardiagnostik. Guesdon et al. nutzten bereits 1979 die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung für immuno-enzymatische Techniken[93]. Heutzutage wird an Antikörper-gebundenes Streptavidin standardmäßig für Immunoprezipitationen, wie z.B. Western-Blot, eingesetzt[94]. Eine weitere Anwendung ist die Aufreinigung biotionylierter Moleküle durch immobilisiertes Streptavidin an stationärer Phase (Affinitätschromatographie) oder die Kopplung von Proteinen mit biotinylierten Makromolekülen wie z.B Oligonukleotiden.
Die Sekundärstruktur einer Untereinheit wird durch 8 antiparallele β-Faltblatt-Stränge zwischen den Aminosäuren 21 und 130 gebildet, welche durch Faltung zu einer antiparallelen β-Barrel Tertiärstruktur führen. Eine Untereinheit des natürlichen Streptavidins zeigt demnach die in Abb. 73 schematisch dargestellte Struktur.



Abb. 73: natürliches Streptavidin mit einer Länge von 159 Aminosäuren

Die N- und C-terminalen Sequenzen führen zu einer Aggregation[95], wodurch das ursprüngliche Streptavidin nur sehr schwer löslich ist. Außerdem ist das natürliche Streptavidin, aufgrund der sterischen Hinderung durch die terminalen Regionen, nur schwer zugänglich für biotinylierte Makromoleküle. Da die terminalen Sequenzen allerdings sehr anfällig gegen Proteasen sind, werden diese bereits während der Fermentation oder der Aufarbeitung proteolytisch abgebaut[94]. Das Ergebnis ist das in Abb. 74 dargestellte „natural core streptavidin“, bei dem eine Untereinheit nur noch aus den Aminosäuren 13 bis 139 des natürlichen Streptavidins besteht. Es ist gut löslich und weist keine Tendenz zur Aggregation mehr auf.



Abb. 74: „natural core streptavidin“ mit mit einer Länge von 127 Aminosäuren

Da die terminalen Sequenzen, je nach Dauer der Proteolyse, unterschiedlich ausfallen können, ist das „natural core streptvidin“ oft sehr heterogen[95]. Aus diesem Grund wurde von Takeshi Sano im Jahre 1995 ein gentechnisch verändertes Streptavidin ohne die terminalen Sequenzen entwickelt[96]. Eine Untereinheit dieses in Abb. 75 dargestellten „minimal core streptavidin“ (Stv-13) besteht nur noch aus den Aminosäuren 16 bis 133 des natürlichen Streptavidins und wird rekombinant in E. coli exprimiert.



Abb. 75: „minimal natural core streptavidin“ (Stv-13) von T. Sano mit mit einer Länge von 119 Aminosäuren

Zwei Monomereinheiten des Streptavidins lagern sich über ein Monomer-Monomer Interface, bedingt durch van der Waals Kräfte zwischen den antiparallel angeordneten β-Barrels, sehr eng zu einem primären Dimer zusammen. Zwei dieser primären Dimere bilden dann über ein Dimer-Dimer Interface[97], bedingt durch die hydrophoben Außenbereiche der primären Dimere, das Tetramer (Abb. 76).

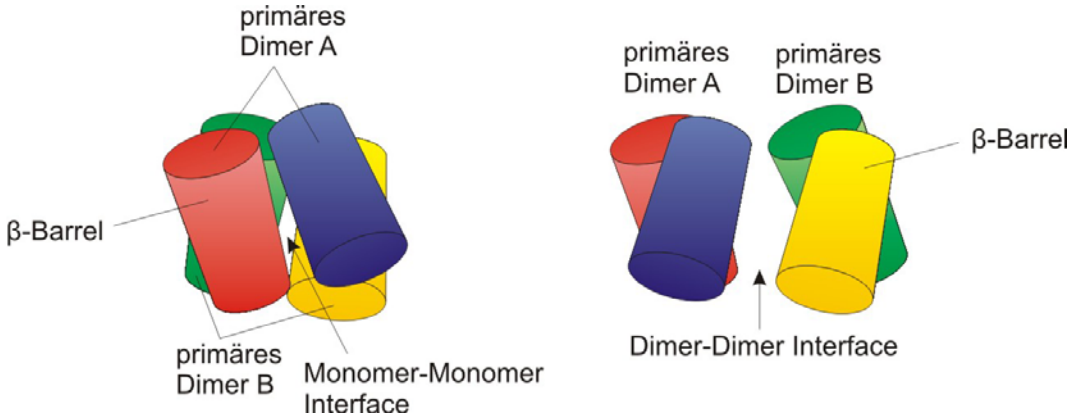


Abb. 76: Zusammenlagerung der Monomereinheiten zum primären Dimer und zum Tetramer (die rechte Darstellung ist gegenüber der Linken um 90° gedreht)

Die Biotin-Bindungsstelle jeder Untereinheit (Abb. 77) wird durch interne Abschnitte des β-Barrels (in erster Linie durch die Tryptophane Trp-79, Trp-92 und Trp-108) unter Einbeziehung des Trp-120 der gegenüberliegenden Nachbareinheit des anderen primären Dimers gebildet[98]. Ein Biotinmolekül wird demnach nicht nur durch eine Monomereinheit gebunden. Es hat durch das Trp-120, über das Dimer-Dimer Interface hinweg, auch Kontakt zu einer Nachabareinheit. Mutanten, bei denen das Trp-120 durch eine andere Aminosäure

ersetzt wurde[99] zeigen jedoch immer noch eine, wenn auch stark herabgesetzte, Bindungsfähigkeit für Biotin (K_d ~10^8 1/M).

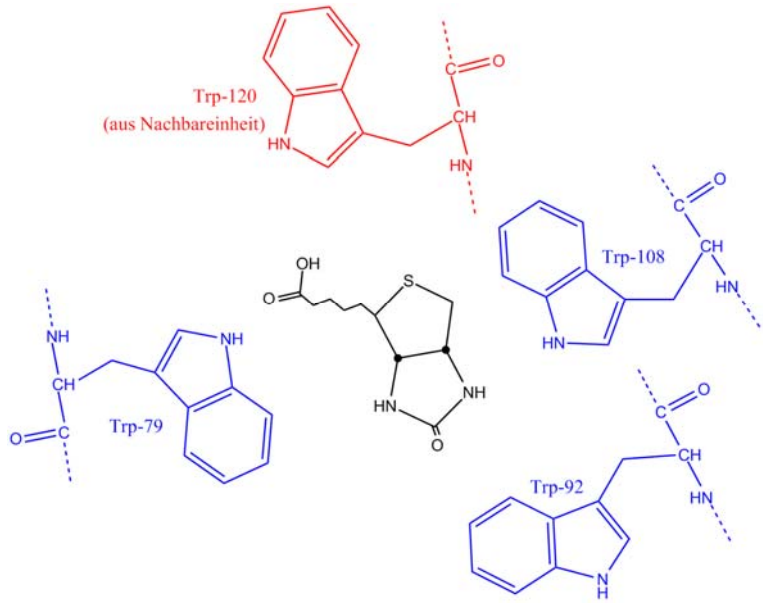


Abb. 77: Umgebung des Biotins an einer Bindungsstelle

Das Streptavidin-Tetramer kann daher auch als Dimer eines stabilen, funktionellen Dimers betrachtet werden. Gelingt es, die Bildung dieses doppelten Dimers zu unterbinden, so könnte man ein dimeres Streptavidin erhalten, welches nur noch zwei Biotin-Bindungsstellen besitzt. Dieses hätte jedoch, durch das fehlende Trp-120 der dem Dimer-Dimer Interface gegenüberliegenden Nachbareinheit, eine verminderte Biotin-Bindungsfähigkeit.

3.8.2. Dimeres Streptavidin

Aufgrund der 4 Biotin-Bindungsstellen kann es bei der Kopplung von Streptavidin mit biotinylierten Makromolekülen zu uneinheitlichen Produkten kommen (cross-linking). Auch die extrem hohe Bindungsstärke mit einer Dissoziationskonstanten von 10^{14} 1/M erweist sich oftmals als Nachteil, da die Biotin-Bindung kaum reversibel ist. Für einige Anwendungen, wie z.B. beim Protein-Imaging, der Affinitätschromatographie oder der Verwendung auf Biochips, wäre ein Protein mit weniger und schwächeren Biotin Bindungsstellen wünschenswert. Um dies zu ermöglichen, begannen Sano et al. im Jahre 1997 mit dem molecular modeling und der rekombinanten Herstellung eines dimeren Steptavidins[97].
Für die Funktionalität und die strukturelle Stabilität des Streptavidins ist, im Gegensatz zu vielen anderen Proteinen, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind, die gegenseitige Anordnung der Untereinheiten essentiell. Die einzelnen Monomereinheiten des Streptavidins zeigen keine hohe Affinität zum Biotin, erst durch die Ausbildung der tetrameren Quartärstruktur wird die extrem hohe Bindungsstärke erreicht.
Um ein funktionelles dimeres Streptavidin zu generieren, ist es daher notwendig die Untereinheiten zu trennen, ohne die Grundstruktur stark zu verändern. Dazu muß zunächst die Ausbildung des Tetramers, durch die Einführung von möglichst wenigen Mutationen, unterbunden werden. Durch die Aufspaltung des Tetramers in die beiden primären Dimere würden jedoch die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren, die zuvor das Dimer-Dimer Interface gebildet haben, direkt dem Einfluß des Lösungsmittels ausgesetzt. Damit das dimere Streptavidin trotzdem eine akzeptable Löslichkeit im wässrigen Medium aufweist, muß die Hydrophobizität dieses neu gebildeten Außenbereichs stark herabgesetzt werden. Als Basis

für das notwendige molecular modeling diente ein empirisches Modell zur Berechnung der freien Bindungsenergie[100].
Ausgehend vom minimal natural core streptavidin (Stv-13 in Abb. 75), wurde zunächst das His-127 durch Asp ersetzt, wodurch die elektrostatische Abstoßung groß genug wurde, um die Bildung des Tetramers zu unterbinden (Abb. 78).



Abb. 78: dimeres Streptavidin (Stv-33) von T. Sano mit einer Länge von 119 Aminosäuren

Das auf diese Weise erhaltene Stv-33 zeigte, wie erwartet, eine deutlich herabgesetzte Löslichkeit im wässrigen Medium durch die nun exponierten hydrophoben Bereiche des Dimer-Dimer Interfaces. Zur Herabsetzung der Hydrophobizität erfolgte daraufhin die Deletion eines acht Aminosäuren langen Abschnitts des hydrophoben Außenbereiches (Gly-113 bis Trp-120) welcher keine Rolle in der Biotin-Bindung spielt (Abb. 79).



Abb. 79: dimeres Streptavidin (Stv-43) von T. Sano mit einer Länge von 113 Aminosäuren

Das Ergebnis ist das auch in dieser Arbeit verwendete Stv-43. Dieses dimere Streptavidin zeigt zwar, aufgrund des fehlenden Trp-120 der Nachbareinheit, eine stark verminderte Affinität zum Biotin (K_d ~1,5x 10^7 1/M), aber eine gute Löslichkeit im wässrigen Millieu.

In einer neueren Arbeit[101] gelang es Aslan et al., durch zirkuläre Permutationen und Kombination zweier Streptavidin-Gene die beiden Untereinheiten eines primären Dimers kovalent zu verknüpfen (Abb. 80).

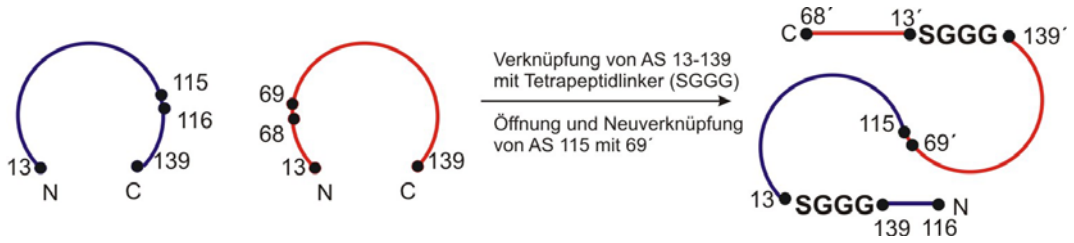


Abb. 80: Verknüpfung zweier Monomere zu einem SCD (single-chain dimer) mittels zirkulärer Permutationen

Das Ergebnis ist ein Streptavidin, dessen primäre Dimere durch nur noch eine, ununterbrochene Peptidkette gebildet werden. Eine zusätzliche Destabilisierung des Dimer-Dimer Interfaces durch Austausch des Trp-120 mit Lysin führt zu einem dimeren Streptavidin (single-chain dimer, SCD) welches nur noch aus einer Kette besteht. Dieses weist zwei Biotinbindungsstellen mit einem K_d-Wert von 10^6 1/M auf.
Ein großer Vorteil des SCD ist, dass die Peptidkette an einem Stück exprimiert wird, was zur sofortigen Ausbildung der funktionellen Struktur führt. Ist das SCD zusätzlich mit einem Fusionsprotein gekoppelt, so ist dieses nur einmal pro Dimer vorhanden.
Sau-Ching Wu et al. beschreiben sogar die Herstellung eines monomeren Streptavidins mit nur einer Biotin-Bindungsstelle und einer Dissoziationskonstante von 10^7 1/M, welches durch die Einführung von lediglich 4 Mutationen gewonnen werden konnte[102].

3.9. Green Fluorescent Protein (GFP)

Das im Jahre 1961 erstmals von Osamu Shimomure unter dem Namen Aequorin[(103)] beschriebene green fluorescent protein ist ein 26,9kDa schweres, aus 238 Aminosäuren bestehendes Protein welches aus der Quallenart *Aequorea victoria* isoliert wurde. Durch Anregung mit UV-Licht (Absorptionsmaxima bei 395nm und 475nm) findet, ohne das Vorhandensein weiterer Substrate oder Co-Faktoren, eine Emmision von grünem Licht (Emissionsmaximum 508nm) statt.
Das Gen des GFP wurde im Jahre 1992 von Prasher[(104)] kloniert und sequenziert. Seit dem ist es, z.B. als Marker für die Genexpression[(105)], zu einem unverzichtbaren Werkzeug der Molekularbiologie geworden. Das enorme Potential wird auch durch die Verleihung des Nobelpreises für Chemie im Jahre 2008 an Osamu Shimomure, Martin Chalfie und Roger Tsien für die „Entdeckung und Weiterentwicklung des grün fluoreszierenden Proteins“ deutlich.
Durch Fusion mit anderen Proteinen kann unter dem UV-Mikroskop deren intrazelluläre Verteilung festgestellt werden, ohne dass es einer Fixierung der Zelle bedarf. Die fluoreszierenden Zellen (Abb. 81) können in FACS-Geräten gezählt und getrennt werden, auch ein immunologischer Nachweis der GFP-markierten Proteine im Western Blot ist durch spezifische GFP-Antikörper möglich.

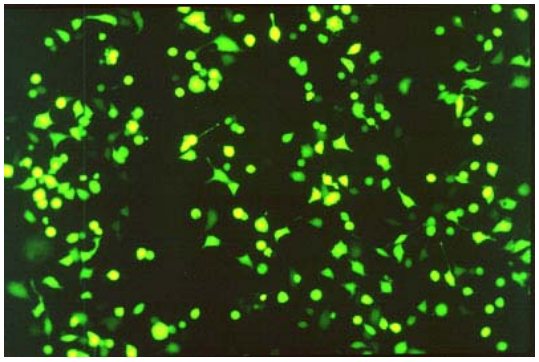


Abb. 81: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von EGFP-eprimierenden HeLa-Zellen

Da GFP in fast allen eukaryontischen Zellen als nicht cytotoxisch einzustufen ist, ergeben sich weitere Anwendungsmölichkeit für die Untersuchung biologischer Prozesse in vivo. Zu nennen wäre in diesem Zusammenhang die Herstellung von transgenen Tieren[(106)]. In den USA ist sogar ein gentechnisch veränderter, GFP-exprimierender, und somit grün fluoreszierender Fisch (Zebrabärbling) unter dem Namen GloFish im Zoohandel erhältlich.
Obwohl für eine korrekt funktionierende Fluoreszenz das gesamte Protein notwendig ist, konnten die als Fluorophor wirkenden Aminosäuren identifiziert werden. Das eigentliche Fluorophor wird demnach autokatalytisch aus dem Aminosäuretriplett Ser65–Tyr66–Gly67 gebildet.
Da das Gen des Wildtyp-GFP aus einer Qualle stammt, ist für die Übertragung auf andere Organismen eine Codon-Optimierung angebracht. So wurde von der Firma Clontech das EGFP (enhanced GFP) entwickelt, welches durch stille Mutationen auf die Codonverteilung des Menschen optimiert wurde. Darüber hinaus wurde durch den Austausch der Aminosäuren Phe-64 → Leu und Ser-65 → Thr das Absorptionsmaximum des EGFP in Richtung Rot auf 488nm verschoben, wodurch eine stärkere Fluoreszenz erreicht wird.
Neben dem EGFP sind inzwischen eine ganze Reihe weiterer GFP-Varianten verfügbar, die auf die unterschiedlichsten Bereiche hin optimiert wurden. Codon-optimierte Varianten sorgen zum Beispiel für eine schnelle Expression im jeweiligen Organismus.
Am wichtigsten sind jedoch leuchtstarke Mutanten mit veränderten Absorptions- und Emissionsspektren, wodurch Mehrfachmarkierungen mit unterschiedlichen Farben möglich

werden. So zeigt z.B. die Variante EBFP (enhanced blue fluorescent protein) eine blaue Farbe (Emissionsmaximum bei 440nm), EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) leuchtet eher gelb (Emissionsmaximum bei 527nm), während die Variante DsRed (ein dem GFP verwandtes Protein aus der Korallenart *Discosoma*) eine rote Farbe (Emissionsmaximum bei 583nm) aufweist. Ebenfalls möglich sind Mutanten mit einer von 24h auf 2h verkürzten Halbwertszeit, wodurch Echtzeit-Untersuchungen der Promotorregulation möglich werden oder Varianten die im Laufe der Zeit ihr Emissionsmaximum verschieben (Fluoreszenz-Timer). So zeigt eine Mutante des DsRed in den ersten Stunden nach der Translation eine grüne Farbe (Emissionsmaximum bei 500nm), die sich im Laufe der Zeit nach Rot (Emissionsmaximum bei 583nm) ändert[(107)].

3.10. Klonierung und Expression rekombinanter DNA

3.10.1. Enzyme der Molekularbiologie

3.10.1.1. Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme, auch Restriktionsendonukleasen genannt, sind die Grundpfeiler der Molekularbiologie. Diese, aus verschiedenen Bakterienstämmen isolierten, Enzyme sind in der Lage, eine meist 4 bis 8 Basen lange Abfolge innerhalb eines DNA-Doppelstranges präzise zu erkennen. Mit Hilfe dieser Enzyme kann der DNA-Strang nun an der Erkennungsstelle bzw. in der Nähe der Erkennungsstelle geschnitten werden, wodurch die Isolierung eines definierten DNA-Abschnitts und die Übertragung auf einen anderen Organismus (Klonierung) möglich wird. Im lebenden Bakterium dienen Restriktionsendonukleasen dazu, fremde DNA (z.B. virale DNA von Phagen) aufzuspüren und abzubauen. Damit kein Abbau der bakterieneigenen DNA stattfindet, wird diese an den entsprechenden Erkennungsstellen methyliert. Die Resriktionsenzyme sind nun in der Lage, anhand des Methylierungsmusters, die „eigene“ DNA von der Fremd-DNA zu unterscheiden[(108)].
Bezüglich ihrer Wirkungsweise und ihres Aufbaus erfolgt die Einteilung der verschiedenen Restriktionsenzyme in 3 Hauptgruppen. Restriktionsenzyme des Typ I haben zwar eine spezifische Erkennungssequenz, schneiden jedoch an einer zufälligen Stelle in deren Nähe. Diese Typ I Enzyme sind aus den 3 Untereinheiten S, M und R aufgebaut, wobei nur die S-Einheit für die Erkennung der DNA-Sequenz zuständig ist. Die R-Untereinheit schneidet die DNA, während die M-Untereinheit in der Lage ist, die DNA zu methylieren.
Auch die Restriktionsenzyme des Typ III sind zwar in der Lage eine spezifische Sequenz zu erkennen, der Schnitt findet allerding ca. 20 Nukleotide davon entfernt statt.
Durch die unspezifischen Schnittmuster der Typ I und Typ III Restriktionsendonukleasen scheiden diese für eine direkte Anwendung in der Klonierung aus.
Den Schlüssel zur molekularbiologischen Anwendung bilden die Restriktionsenzyme des Typ II. Nur sie besitzen die Fähigkeit, eine DNA-Sequenz nicht nur präzise zu erkennen, sondern die DNA auch an einer spezifischen Stelle zu schneiden. Der Schnitt findet dabei entweder direkt in der, meist palindromischen, Erkennungssequenz statt oder in einem definierten Abstand von dieser. Die Erkennungssequenz selbst ist in der Regel 4, 6 oder 8 Basen, in einigen Fällen auch 5 Basen lang, wodurch für die sogenannten 4-cutter statistisch alle 4^4 bzw. 256bp eine Schnittstelle vorliegt. Die Schnittstellen für die 8-cutter sind wesentlich seltener, statistisch findet sich nur alle 4^8 bzw. 65536bp eine Erkennungssequenz.
Die entstehenden Fragmente weisen in der Regel am 5´-Ende einen Phsophatrest und am 3´-Ende eine OH-Gruppe auf und können glatte Enden (blunt ends) oder überstehende Enden (sticky ends) haben, wobei der Überhang im letzteren Fall meist 2 oder 4 Basen beträgt. Für Klonierungen bevorzugt man meist Fragmente mit sticky ends und einem Überhang aus 4 Basen, da diese leichter ligiert werden.

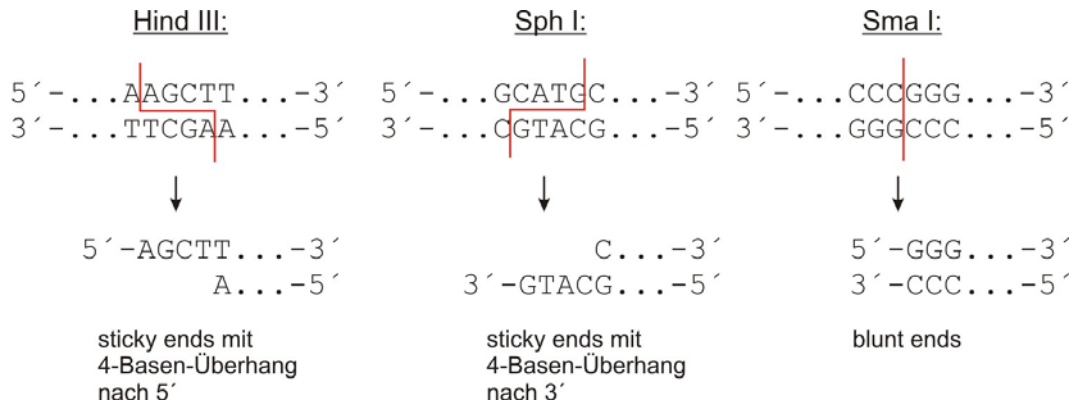


Abb. 82: verschiedene Schnittmuster einiger Restriktionsenzyme

Endonukleasen des Typ II bestehen aus dem eigentlichen Restriktionsenzym, welches an der Erkennungssequenz schneidet, und einer Methylase die hemimethylierte, bakterieneigene DNA durch vollständige Methylierung der Erkennungsstelle vor dem Abbau schützt.
Restriktionsendonukleasen, welche zwar die gleiche spezifische Erkennungssequenz haben, jedoch aus unterschiedlichen Organismen stammen, bezeichnet man als *Isoschizomere*. Diese Isoschizomere haben unterschiedliche Methylierungsempfindlichkeiten, wodurch sich in der Regel immer ein Enzym findet, das in der Lage ist, eine bestimmte Erkennungssequenz –trotz Methylierung– zu schneiden[(109)].

3.10.1.2. DNA-Polymerasen

DNA-Polymerasen dienen zum Aufbau neuer DNA, wobei in der Regel ein existierender DNA-Strang als Matrize dient. Dieser Strang wird vom 3- ´zum 5´-Ende abgelesen, die Synthese der neuen DNA erfolgt vom 5´- zum 3´-Ende.
Das am häufigsten verwendete Enzym zum Aufbau eines komplementären DNA-Strangs ist die, aus dem thermophilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isolierte, Taq-DNA Polymerase[(110), (111)]. Die normale Umgebungstemperatur des in heißen Quellen lebenden Thermus aquaticus Bakteriums beträgt ca. 70°C, wodurch auch seine DNA-Polymerase eine eine optimale Arbeitstemperatur von 72°C besitzt. Durch dieses hohe Aktivitätsmaximum wird ein Einsatz in der PCR möglich, bei der in jedem Zyklus Temperaturen von 95°C erreicht werden (s. Kap. 3.10.2).
Neben der templateabhängigen 5´-3´-Polymeraseaktivität, besitzt die Taq-Polymerase auch eine templateunabhängige Polymeraseaktivität was sich daran äußert, dass das Amplifikationsprodukt oftmals ein zusätzliches Adenosin am 3´-Ende trägt. Außerdem zeigt das Enzym eine geringe 5´-3´-Exonukleaseaktivität, jedoch keine 3´-5´-Exonukleaseaktivität. Mit einer durchschnittlichen Einbaurate von 2800 Nukleotiden pro Minute ist die Taq-DNA Polymerase schneller als alle anderen inzwischen etablierten DNA-Polymerasen.
Neben der Taq-Polymerase finden heute auch weitere thermostabile DNA-Polymerasen, wie die Pfu-DNA Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*, Tma-Polymerase aus *Thermotoga maritima* sowie die Tli-Polymerase aus *Thermococcus litoralis* Anwendung. Diese Polymerasen haben zwar eine deutlich geringere Einbaurate als die Taq-Polymerase (ca. 550 Nukleotide pro Minute bei Pfu), besitzen aber aufgrund einer 3´-5´-Exonukleaseaktivität eine Korrekturfunktion[(112)] (proofreading) wodurch die Fehlerrate gegenüber der Taq-Polymerase um den Faktor 10 gesenkt ist und Amplifikationsprodukte ohne 3´-Überhang generiert werden. Neben diesen Vorteilen weisen die alternativen DNA-Polymerasen auch eine wesentlich höhere Temperaturbeständigkeit auf als die klassische Taq-Polymerase, so beträgt die Halbwertszeit der Pfu-Polymerase 12h bei 95°C.

Die Tth-DNA Polymerase aus *Thermus thermophilus* und die Tfl-DNA Polymerase aus *Thermus flavus* weisen neben der normalen DNA-Polymeraseaktivität auch eine Reverse-Transktiptaseaktivität auf, wodurch diese für den Aufbau von cDNA aus mRNA innerhalb einer RT-PCR verwendet werden können.

3.10.1.3. DNA-Ligasen

Ligasen sind in der Lage, die 3´-OH Gruppe eines DNA Stranges mit der 5´-Phosphatgruppe eines anderen DNA Stranges unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zu einem einzelnen Strang zu Verknüpfen (Abb. 83). Innerhalb der Zelle spielen sie eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Strangbrüchen sowie der Verknüpfung von Okazaki-Fragmente bei der Replikation der DNA.
In der Molekularbiologie dienen Ligasen zur Neuverknüpfung und Neukombination und somit zur Klonierung von DNA Fragmenten die zvor mit Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden.
Die am meisten verwendete DNA-Ligase ist die T4-DNA Ligase welche aus dem Bakteriophagen T4 isoliert wurde. Dabei handelt es sich um ein einzelnes Protein mit einer Masse von 68kDa. Die T4-DNA Ligase benötigt nicht zwingenderweise einen doppelsträngigen Bereich in Form von überlappenden Enden, sondern ist unter optimierten Bedingungen auch in der Lage, DNA-Doppelstränge mit glatten Enden (blunt ends) zu verknüpfen. Als Co-faktoren müssen jedoch ATP und Mg^{2+} Ionen vorhanden sein.

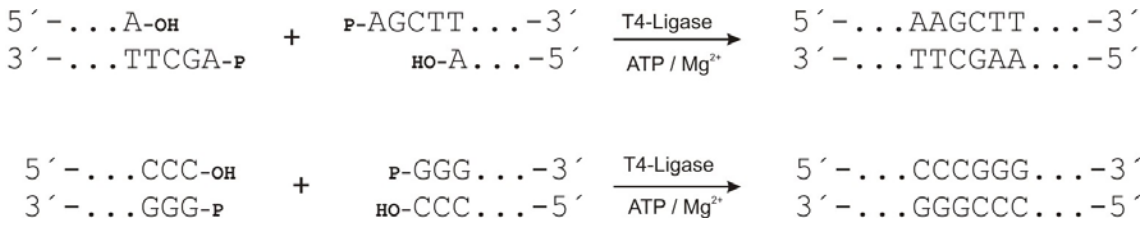


Abb. 83: Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA Ligase

3.10.2. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) ist eine der wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie. Sie wurde im Jahre 1983 von Kary Mullis eingeführt[(113)], wofür er 1993 den Nobelpreis für Chemie verliehen bekam.
Grundlegender Bestandteil einer PCR ist eine DNA-Polymerase, welche mittels zweier Primer zwei jeweils komplementäre Stränge zu einem DNA-Template synthetisiert. Dieser in vitro Vorgang ist mit der Replikation in vivo vergleichbar.
Die zunächst von Mullis verwendete DNA-Polymerase I von E. coli wird jedoch bei der zwingend notwendigen Trennung der Einzelstränge (Denaturierung) bei ca. 95°C zerstört. Durch die ständig manuelle Neuzugabe des Enzyms war die ursprüngliche Methode somit sehr ineffizient.
Eine Automatisierung wurde erst durch die Verwendung der thermostabilen Taq-Polymerase möglich (s. Kap. 3.10.1.2), welche auch bei 100°C kaum an Aktivität verliert. Neben der Taq-Polymerase sind heutzutage auch noch andere thermostabile DNA-Polymerasen wie z.B. die Pwo- oder die Pfu-Polymerase verfügbar. Diese Enzyme besitzen aufgrund einer Korrekturaktivität eine wesentlich geringere Fehlerrate (ein Fehler auf 10^6 Basen) als die Taq-Polymerase (ein Fehler auf 10^5 Basen) und führen somit zu erheblich weniger Mutationen in der amplifizierten DNA.

Mittels einer automatisierten Standard-PCR können DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 5kb amplifiziert werden. Bei optimierten Bedingungen sind auch Fragmentlängen von bis zu 35kb[114] möglich. Neben der DNA-Polymerase enthält ein PCR–Ansatz das zu vervielfältigende DNA-Template, zwei gegenläufige Primer (FP = *forward Primer*, RP = *reverse Primer*) die den zu amplifizierenden Bereich beidseitig begrenzen, sowie die 4 verschiedenen Nukleosidtriphosphate, aus denen die neue DNA aufgebaut wird.
Durchgeführt wird die Reaktion in einem Thermocycler, welcher ein definiertes Temperaturprogramm mehrmals hintereinander abfährt. Dieses Temperaturprogramm besteht aus mehreren Zyklen, welche sich ihrerseits in jeweils 3 Schritte unterteilen (Abb. 84).

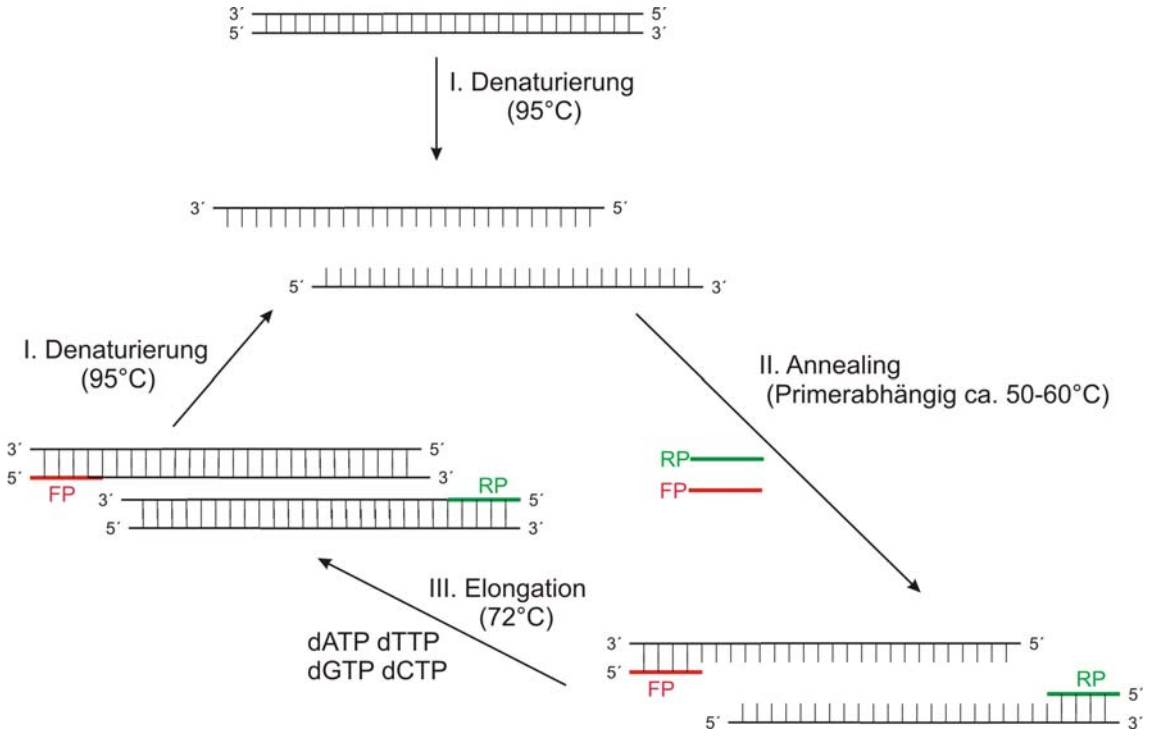


Abb. 84: Darstellung eines PCR-Zyklus

Im ersten Schritt, der *Denaturierung*, wird der Ansatz auf 95°C erhitzt. Dies führt zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen, wodurch die beiden DNA-Stränge des Templates getrennt werden. Für den zweiten Schritt, dem *Annealing*, wird die Temperatur für ca. 30 Sekunden auf 50-60°C abgesenkt wodurch eine Hybridisierung der Primer an die Template-DNA erfolgt. Die genaue Temperatur ist von der Primersequenz abhängig und liegt im Allgemeinen einige Grad unterhalb der jeweiligen Schmelztemperatur.
Im dritten Schritt, der *Elongation*, wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase (72°C bei Verwendung von Taq-Polymerase) heraufgefahren. Nun beginnt die eigentliche Amplifikation von 5´ nach 3´, die bei der Taq-Polymerase mit einer Geschwindigkeit von ca. 1kb pro Minute abläuft.
Bereits nach wenigen Zyklen sind überwiegend Stränge der gewünschten Länge vorhanden, deren Enden den jeweiligen Primersequenzen entsprechen. Diese dienen wiederum als Template und werden nun exponentiell vervielfältigt (Abb. 85). Das ursprüngliche DNA-Template dient auch weiterhin als Matrize und generiert nach wie vor auch längere Produkte, da kein definierter Endpunkt am zu amplifizierenden Strang festgelegt ist. Die Anzahl dieser Produkte steigt jedoch nur linear an.
Ein Standard PCR-Programm besteht aus etwa 35 Zyklen, wodurch die Anzahl der Produkte mit gewünschter Länge theoretisch auf 2^{35} bzw. 34 Mrd. pro Ausgangsmolekül ansteigt.

Dieser Wert wird in der Praxis allerdings nicht erreicht, da das bei der Verknüpfung der Nukleosidtriphosphate entstehende Pyrophosphat mit der Zeit als Inhibitor wirkt.

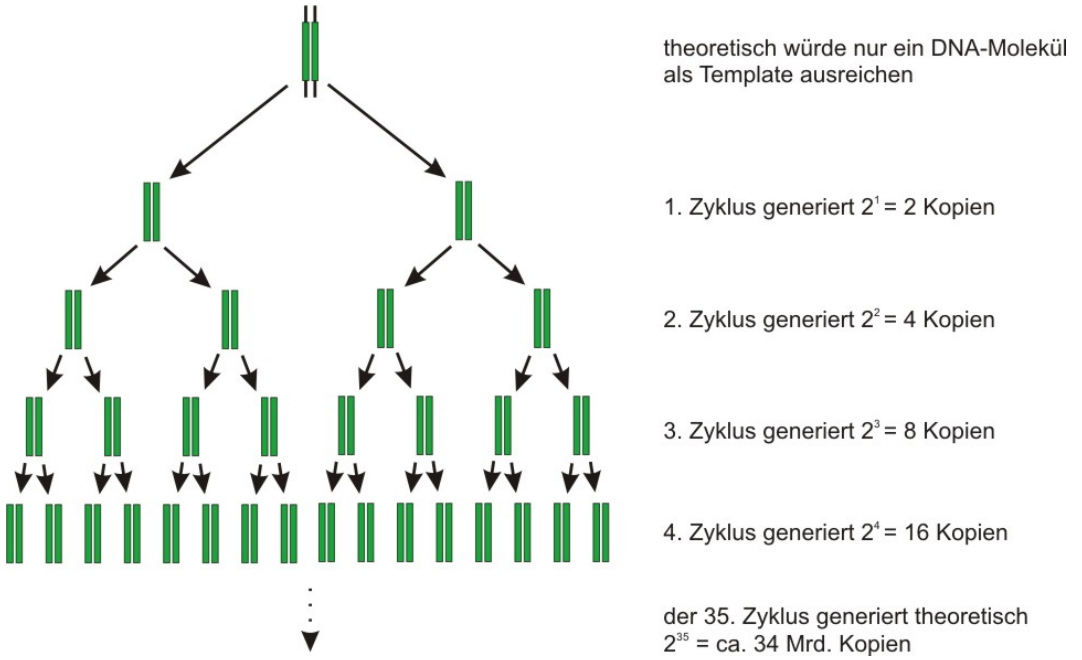


Abb. 85: Darstellung der exponentiellen Vervielfältigung in der PCR

Die Anwendungsbereiche der PCR gehen vom genetischen Fingerabdruck über Krankheitsdiagnostik (z.B. Amplifikation viraler DNA in infizierten Zellen) und Feststellung von Verwandschaftsverhältnissen bis zur Verfielfältigung archeologischer oder prähistorischer DNA. Das Haupteinsatzgebiet ist allerdings die Amplifikation von Genen oder anderen DNA-Fragmenten zur weiteren Klonierung. Mittels RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) ist durch Verwendung von reverser Transkriptase bzw. Tth-DNA Polymerase (s. Kap. 3.10.1.2) auch die Rückübersetzung von mRNA zu cDNA möglich, die ihrerseits wieder als Template für eine PCR dienen kann.

3.10.3. Klonierung von DNA Fragmenten

Ein häufiges Problem bei molekularbiologischen Arbeiten sind die zu geringen Substanzmengen. Zwar ist seit der Einführung der PCR (s. Kap. 3.10.2) eine in vitro Vermehrung der DNA möglich, das entstehende PCR-Produkt ist allerdings in seiner Länge begrenzt und ist nicht sehr stabil gegenüber Nukleasen.
Schon lange vor der Entdeckung der PCR war daher die Klonierung das molekularbiologische Standardwerkzeug zur Produktion von größeren Mengen an DNA. Unter Klonierung versteht man, im molekularbiologischen Sinne, den Einbau eines fremden DNA-Fragments (z.B. eines Gens) in einen sogenannten Vektor, ein DNA-Molekül welches sich innerhalb einer Zelle selbständig replizieren kann. Nach der Transformation in eine geeignete Wirtszelle, wie z.B. E. coli oder Hefe, beginnt diese mit der Replikation der Vektor-DNA, wodurch auch das eingebaute (einklonierte) DNA-Segment mit repliziert und dadurch massenhaft vermehrt wird. Auf diese Weise ist z.B. die Herstellung umfangreicher Bibliotheken genomischer DNA aus den unterschiedlichsten Organismen und Gewebtypen möglich. Wird das einklonierte Gen auf dem Vektor von den entsprechenden Kontrollsequenzen flankiert, so kann z.B. durch eine RNA-Polymerase Bindungsstelle (Promotor) auch die in vitro Transkription von mRNA ermöglicht werden[(115)] oder sogar die Expression des Gens zum Protein erfolgen (s. Kap.

3.10.5). Virale Promotoren ermöglichen die Produktion von cDNA aus der mRNA und somit den Aufbau von cDNA-Expressionsbanken zum Screening nach funktionellen Proteinen[116].
Je nach Größe des zu amplifizierenden DNA-Segments wurden inzwischen verschiedene Klonierungsvektoren, zusammen mit den jeweiligen Wirtszellen, etabliert. So können Fragmente bis 5kb Länge problemlos in ein Plasmid integriert werden, welches daraufhin in Bakterienzellen eingeschleust und vermehrt wird. Für größere Fragmente bis ca. 20kb sind λ-Phagen das Mittel der Wahl, während für noch größere DNA-Abschnitte sogenannte „künstliche Hefechromosomen" (YAC = yeast artificial chromosomes) Verwendung finden, in denen DNA-Sequenzen von über 1000kb amplifiziert werden können.
Die vom Aufbau her einfachsten Klonierungsvektoren sind die bakteriellen Plasmide. Dabei handelt es sich um zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle von 1 bis 200kb Länge, die neben dem eigentlichen Chromosom in Bakterien vorkommen. Boyer et al. beschrieben im Jahre 1973 erstmals den Einbau fremder DNA in ein replikationsfähiges Plasmid[117]. Plasmide besitzen einen eigenen Replikationsursprung (ori = origin of replication) und können sich daher unabhängig vom Bakterienchromosom vermehren. Diese „molekularen Parasiten" verleihem ihrem Wirt oftmals zusätzliche Eigenschaften, wie z.B. die Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika. So codiert das Ampicillin-Resistenzgen (amp^R) beispielsweise für das Enzym β-Lactamase, welches das Antibiotikum Ampicillin für die Zelle unschädlich macht, indem es die Amidbindung im β-Lactamring spaltet und inaktive Ampicillinsäure erzeugt (Abb. 86).

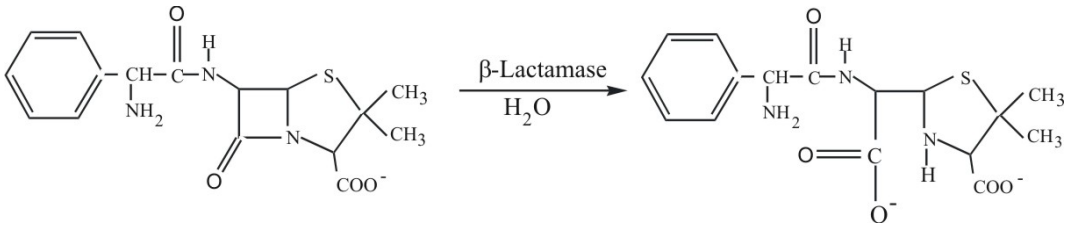


Abb. 86: Inaktivierung von Ampicillin durch β-Lactamase

Wird das Ampicillin nicht inaktiviert so bildet es, wie alle Penicilline, eine kovalente Bindung mit einem Serinrest im aktiven Zentrum der Transpeptidase (Abb. 87) aus, wodurch dieses Enzym gehemmt wird und nicht mehr zur Vernetzung von Peptidoglykansträngen zur Verfügung steht. Dadurch wird die Zellwandsynthese gramnegativer Bakterien wie E. coli unterbunden, und die Zellen sterben bei der Teilung ab.

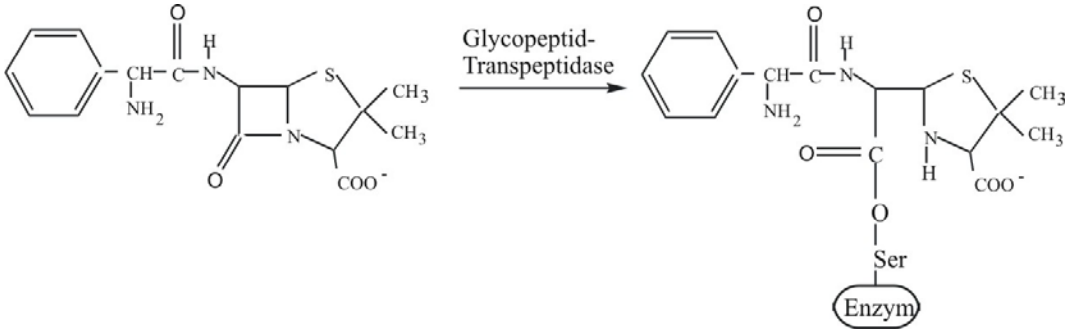


Abb. 87: Inaktivierung der Transpeptidase durch Ampicillin

Streicht man ein Gemisch aus antibiotikaresistenten und nicht-antibiotikaresistenten Bakterienzellen auf eine Nährplatte aus, die das entsprechende Antibiotikum enthält, so bilden nur die resistenten Zellen neue Kolonien (s. Kap. 6.7.7).
Je nach Replikationsursprung handelt es sich dabei um sogenannte „low-copy" Plasmide, die sich wie das Bakterienchromosom nur einmal pro Zellteilung replizieren und nur in wenigen Kopien pro Zelle vorkommen, oder um sogenannte „high-copy" Plasmide mit mehreren

hundert Kopien pro Zelle. Durch den Zusatz von Chloramphenicol kann die Proteinsynthese der Wirtszelle unterbunden werden, wodurch die Anzahl der Plasmide sogar auf mehrere tausend anwachsen kann[118].

Für Klonierungen verwendet man in der Regel speziell konstruierte Plasmide, die neben einem high-copy Replikationsursprung und einem oder mehreren Antibiotika-Resistenzgenen als Selektionsmarker auch noch einen sogenannten Polylinker oder eine multiple cloning site (MCS) enthalten. Die MCS stellt eine Abfolge mehrerer singulärer Restriktionsschnittstellen dar, wodurch die flexible Einklonierung eines fremden DNA-Abschnitts (Inserts) möglich wird. Liegt die MCS innerhalb eines Selektionsmarkers, so wird dieser bei der Einklonierung inaktiviert, wodurch eine einfachere Selektion der positiven Klone ermöglicht wird. Beim Urvater der Klonierungsvektoren pBR322 (Abb. 88), aus dem viele künstlich weiterentwickelte Plasmidvektoren abgeleitet sind, liegen mehrere Schnittstellen innerhalb des Tetracyclin-Resistenzgens (tet^R) oder des Ampicilin-Resistenzgens (amp^R).

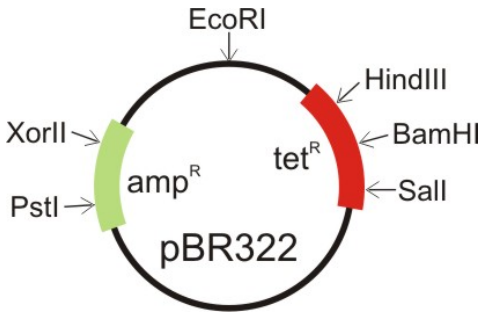


Abb. 88: Karte des pBR322-Plasmids

Wird ein neuer DNA-Abschnitt, z.B. zwischen der HindIII- und der BamHI-Schnittstelle eingebaut, so verliert die Wirtszelle ihre Resistenz gegenüber Tetracyclin. Durch Selektion auf antibiotikahaltigen Nährplatten wird so eine Unterscheidung zu den Zellen möglich, die ein Plasmid ohne Insert tragen.

Etwas einfacher in der Handhabung ist die sogenannte blau-weiß Selektion welche z.B durch den Plasmidvektor pUC18 möglich wird (Abb. 89). Dabei liegt der Polylinker des Plasmids inmitten des lacZ´-Gens, welches für das N-terminale α-Fragment der β-Galactosidase codiert.

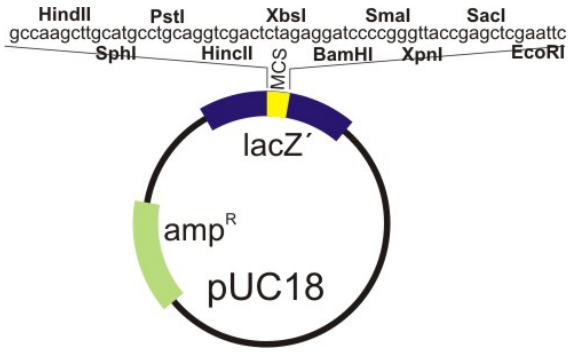


Abb. 89: Karte des pUC18-Plasmids mit Polylinker (MCS)

Exprimiert die verwendete Wirtszelle das entsprechende C-terminale ω-Fragment, so komplementieren sich die beiden Fragmente zur funktionellen β-Galactosidase[119] welche X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid) aus dem Nährmedium unter Freisetzung von blauem Indigo spaltet[120]. Nimmt das Plasmid ein Insert auf, so wird das lacZ´-Gen zerstört wodurch die Komplementierung zur funktionellen β-Galactosidase, und

damit auch die Ausbildung des Indigo, ausbleibt. Die Kolonien der Klone ohne Insert zeigen also auf der Nährplatte eine blaue Färbung, währen Klone mit Insert weiße Kolonien bilden.
Der allgemeine Vorgang der Klonierung ist schematisch in Abb. 90 dargestellt. Zuerst wird der Vektor in der Regel mit zwei Restriktionsenzymen an der MCS geschnitten und das freigesetzte kurze Stück des Polylinkers durch Gelelektrophorese vom linearisierten Vektor abgetrennt. Würde der Restriktionsschnitt mit nur einem Restriktionsenzym erfolgen, so würden die dabei entstehenden kompatiblen Enden bei der späteren Ligation wieder mit sich selbst rekombinieren.

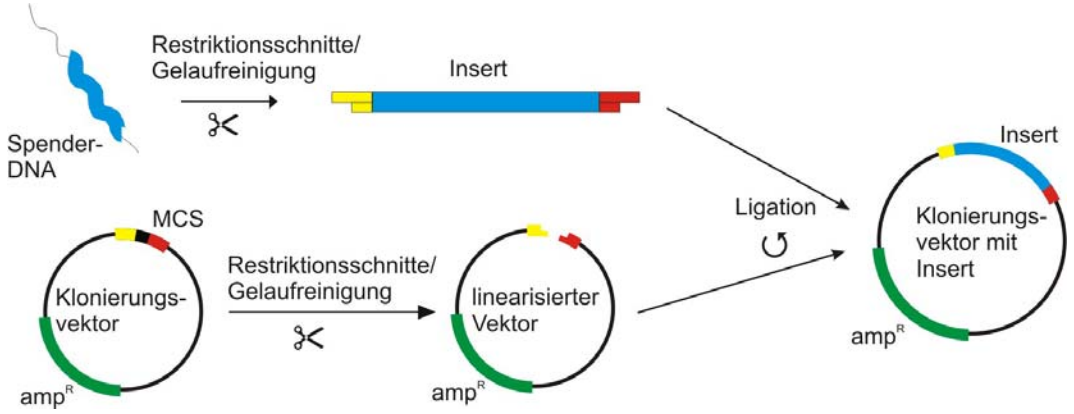


Abb. 90: Klonierung eines DNA-Fragments mittels kompatibler Restriktionsschnittstellen

Das zu klonierende DNA-Fragment wird mit denselben Restriktionsenzymen aus der DNA des Spenderorganismus herausgeschnitten und ebenfalls durch Gelelektrophorese abgetrennt.
Schließlich werden der linearisierte Vektor und das DNA-Fragment mittels einer Ligase (meist T4-Ligase) über die kompatiblen Enden miteinander verknüpft (s. auch Abb. 83), wodurch wieder ein zirkuläres Plasmid entsteht.
Stehen in dem zu klonierenden DNA-Fragment keine passenden Restriktionsschnittstellen zur Verfügung, so besteht die Möglichkeit, Vektor und Spender-DNA mit einem Restriktionsenzym zu schneiden, welches glatte Enden (blunt ends) generiert (s. auch Abb. 82). Schneidet man die Spender-DNA mit einem oder zwei beliebigen Restriktionsenzymen, so kann man durch Auffüllen der überstehenden Enden mit Nukleotiden durch DNA-Polymerase ebenfalls glatte Enden erhalten (Abb. 91). Auf diese Weise werden beliebige Ligationen möglich, allerdings ist die Ausbeute an positiven Klonen wesentlich geringer als bei überlappenden Enden[121]. Des Weiteren entstehen zwangsläufig zwei Varianten des zirkulären Plasmids mit jeweils verdreht eingebautem Insert, was dann zu einem Problem wird wenn der Klonierungsvektor auch gleichzeitig zur Expression eines Proteins dienen soll (s. auch Kap. 3.10.5).

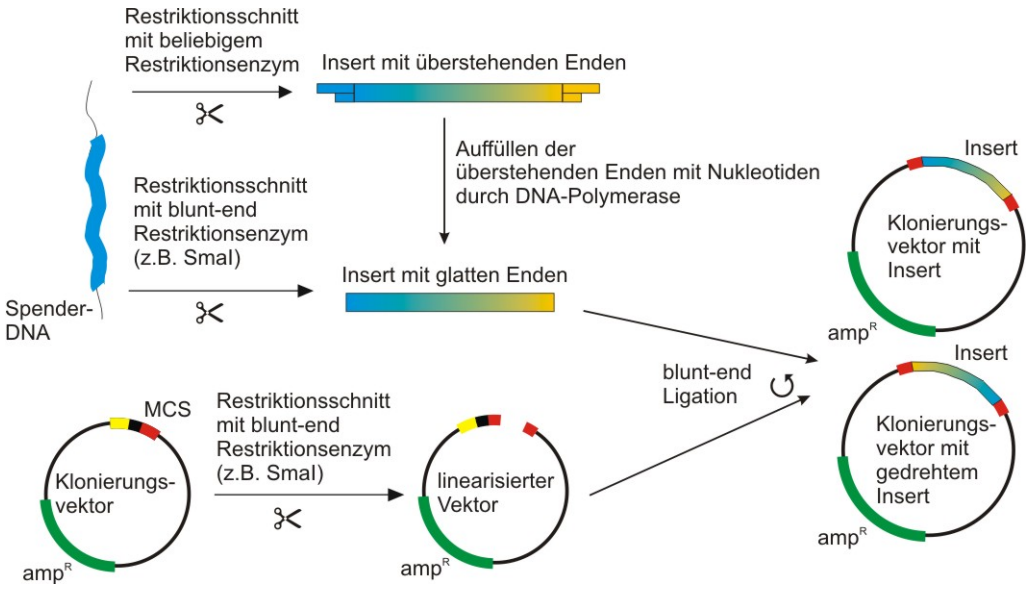


Abb. 91: Klonierung eines DNA-Fragments mittels blunt-end Ligation

Eine weitere Möglichkeit zur Generierung kompatibler Schnittstellen ist die Amplifizierung der Spender-DNA mittels PCR (Abb. 92). Dabei werden modifizierte Primer verwendet, welche bereits die benötigten Schnittstellen in sich tragen[122]. Die Länge des Inserts ist bei dieser Methode jedoch durch die Leistungsfähigkeit der PCR begrenzt.

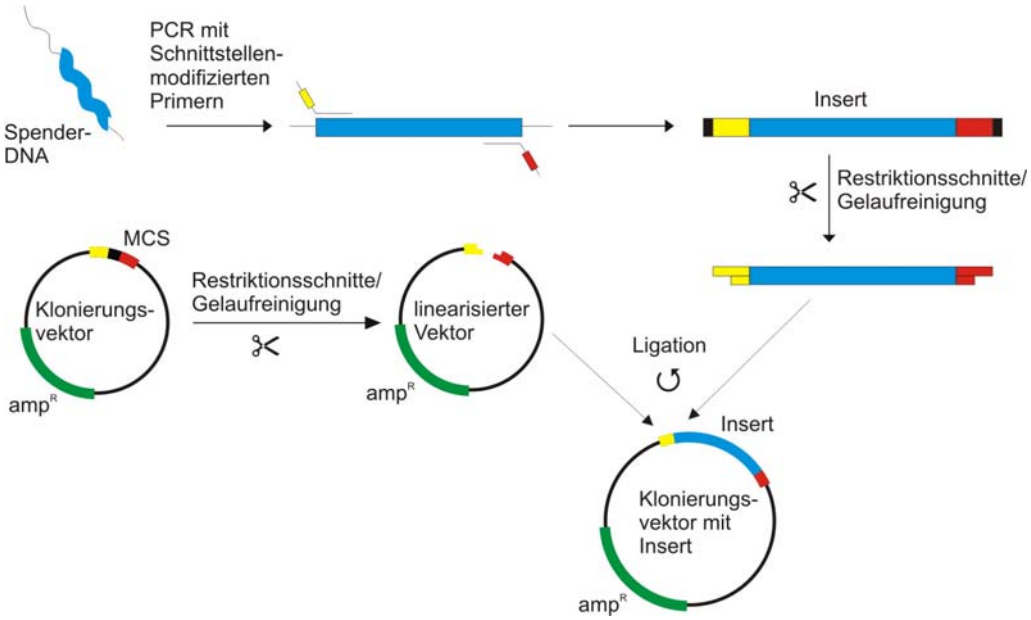


Abb. 92: Generierung kompatibler Schnittstellen durch PCR mit modifizierten Primern

Als nächstes erfolgt die Einschleusung des rekombinanten Plasmids in die Wirtszelle, die sogenannte Transformation. Die Fähigkeit einer Zelle, DNA aufzunehmen wird auch als Kompetenz bezeichnet. Einige Bakterienstämme, wie z.B. *Streptococcus pneumoniae* oder *Bacillus subtilis* besitzen eine natürliche Kompetenz[123], verfügen also über einen Mechanismus, DNA-Fragmente verwandter Spezies zu erkennen, aufzunehmen und sogar in ihr Genom zu integrieren[124] (horizontaler Gentransfer).
Bei den in der Regel verwendeten E. coli Stämmen handelt es sich jedoch um Bakterien ohne natürliche Kompetenz, welche zuerst transformationskompetent gemacht werden müssen. Sämtliche Methoden zur künstlichen Erhöhung der Transformationskompetenz beruhen auf einer Steigerung der Permeabilität der Zellwand[125]. Dies kann auf chemischem Wege, wie

z.B durch Behandlung mit zweiwertigen Ionen (Ca^{2+}), oder durch einen Elektroschock (Elektroporation) geschehen.
Die transformierten Zellen werden daraufhin auf antibiotikahaltige Nährplatten ausgestrichen, wo nur diejenigen Klone neue Kolonien bilden, die ein Plasmid mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz aufgenommen haben. Mit Hilfe von eventuell noch zusätzlich auf dem Plasmid vorhandenen Selektionsmarkern (z.B. blue-white) kann festgestellt werden, ob das aufgenommene Plasmid auch ein Insert trägt. Inserthaltige Klone können daraufhin gezielt vermehrt und ihre Plasmid-DNA isoliert werden.

3.10.4. Sequenzierung

In den späten 1970er Jahren wurden unabhängig voneinander zwei Methoden zur Sequenzierung von isolierten DNA-Fragmenten entwickelt. Beide Methoden basieren auf der Generierung eines kompletten Satzes an verkürzten Sequenzen (n, n-1, n-2,…) des ursprünglichen DNA-Fragments, deren Endgruppen bekannt sind. Die verkürzten Sequenzen werden daraufhin elektrophoretisch getrennt und detektiert.

3.10.4.1. Die Maxam-Gilbert Methode

Die von Maxam und Gilbert im Jahre 1977 etablierte Methode beruht auf der basenspezifischen, chemischen Spaltung der DNA[126]. In vier getrennten Reaktionsansätzen werden durch chemische Reaktionen die jeweiligen Basen vom Nukleotid abgetrennt und anschließend das Zucker-Phosphat-Rückgrat gespalten. Inkubiert man die DNA mit Hydrazin, so findet eine spezifische Spaltung bei einem T statt. Führt man die gleiche Reaktion bei einer hohen Salzkonzentration aus (1,5M NaCl) so wird hingegen bei einem C gespalten. Eine Behandlung mit Dimethylsulfat und Piperidin führt zur spezifischen Spaltung bei einem G, während das Dimethylsulfat im sauren pH-Bereich bei A und G spaltet.
Durch die Strangbrüche kommt es zu DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, welche nach radioaktiver Markierung des 5′-Endes (^{32}P) durch Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden können. Nachteile dieser heute kaum noch verwendeten Methode sind ein großer Zeitaufwand sowie die Verwendung einer Reihe gesundheitsschädlicher Reagenzien. Ein Vorteil ist hingegen die Möglichkeit zur Sequenzierung strukturmodifizierter, nicht natürlicher Oligonukleotide.
Die Sequenzierung eines DNA-Stücks mit der Sequenz ^{32}P-T-G-T-A-G-G-A-G-C- würde z.B. bei der Maxam-Gilbert Sequenzierung das folgende Ergebnis liefern:

Fragment-länge	DMS + Piperidin (G)	DMS + Säure (A+G)	Hydrazin (C+T)	Hydrazin + NaCl (C)
1			^{32}P-T	
2	^{32}P-T-G	^{32}P-T-G		
3			^{32}P-T-G-T	
4		^{32}P-T-G-T-A		
5	^{32}P-T-G-T-A-G	^{32}P-T-G-T-A-G		
6	^{32}P-T-G-T-A-G-G	^{32}P-T-G-T-A-G-G		
7		^{32}P-T-G-T-A-G-G-A		
8	^{32}P-T-G-T-A-G-G-A-G	^{32}P-T-G-T-A-G-G-A-G		
9				^{32}P-T-G-T-A-G-G-A-G-C

3.10.4.2. Die Sanger-Coulson Methode

Die heutzutage überwiegend verwendete Sanger-Coulson-Methode, oder auch Kettenabbruchmethode, wurde ebenfalls im Jahre 1977 bei der ersten vollständigen Sequenzierung eines Genoms (Bakteriophage φX174) bekannt[(127)]. Diese Methode basiert nicht auf dem chemischen Abbau der DNA, sondern auf dem enzymatischen Aufbau eines komplementären Stranges zu einer DNA-Matrize mittels PCR (polymerase chain reaction, Kap. 3.10.2). In nur einem Reaktionsansatz wird die unbekannte Sequenz mittels eines Primers, DNA-Polymerase, Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs; Abb. 93), sowie durch jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff versehene Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTPs; Abb. 94) amplifiziert[(128)].

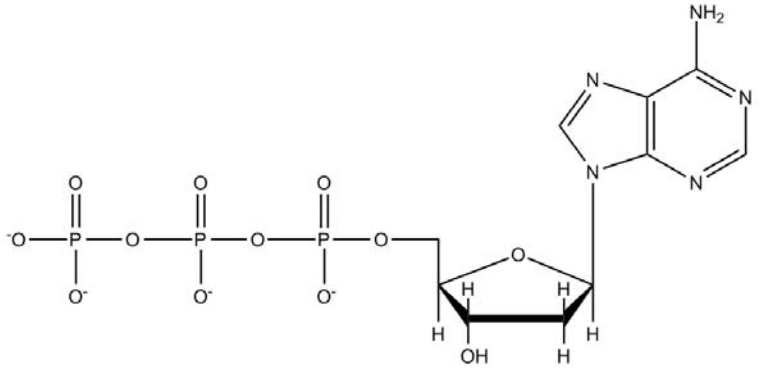


Abb. 93: Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP)

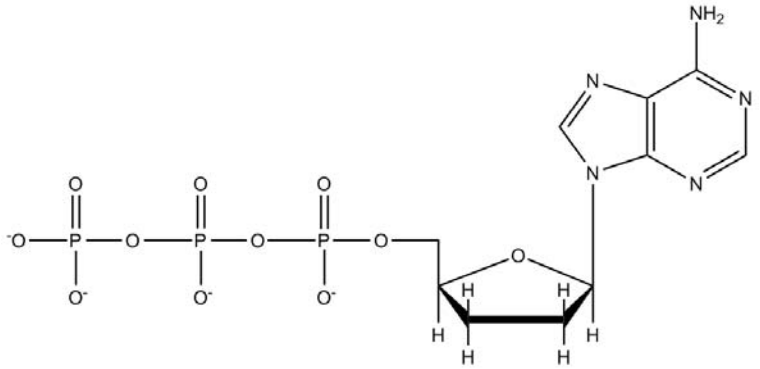


Abb. 94: Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddATP)

Die Didesoxynukleosid-Triphosphate (aufgrund ihrer farblichen Markierung oft auch als Dye-desoxynukleoside bezeichnet) werden ebenfalls, allerdings statistisch verteilt, in den neusynthetisierten Strang eingebaut. Nach ihrem Einbau ist jedoch, aufgrund der fehlenden 3´-Hydroxygruppe, keine Verlängerung des Stranges durch die DNA-Polymerase mehr möglich, und die Kette bricht ab. Auf diese Weise entsteht ein kompletter Satz an verkürzten DNA-Sequenzen, die am 3´-Ende jeweils ein spezifisch fluoreszenzmarkiertes ddNTP tragen. Das Prinzip der Sanger-Coulson Sequenzierung ist in Abb. 95 dargestellt.

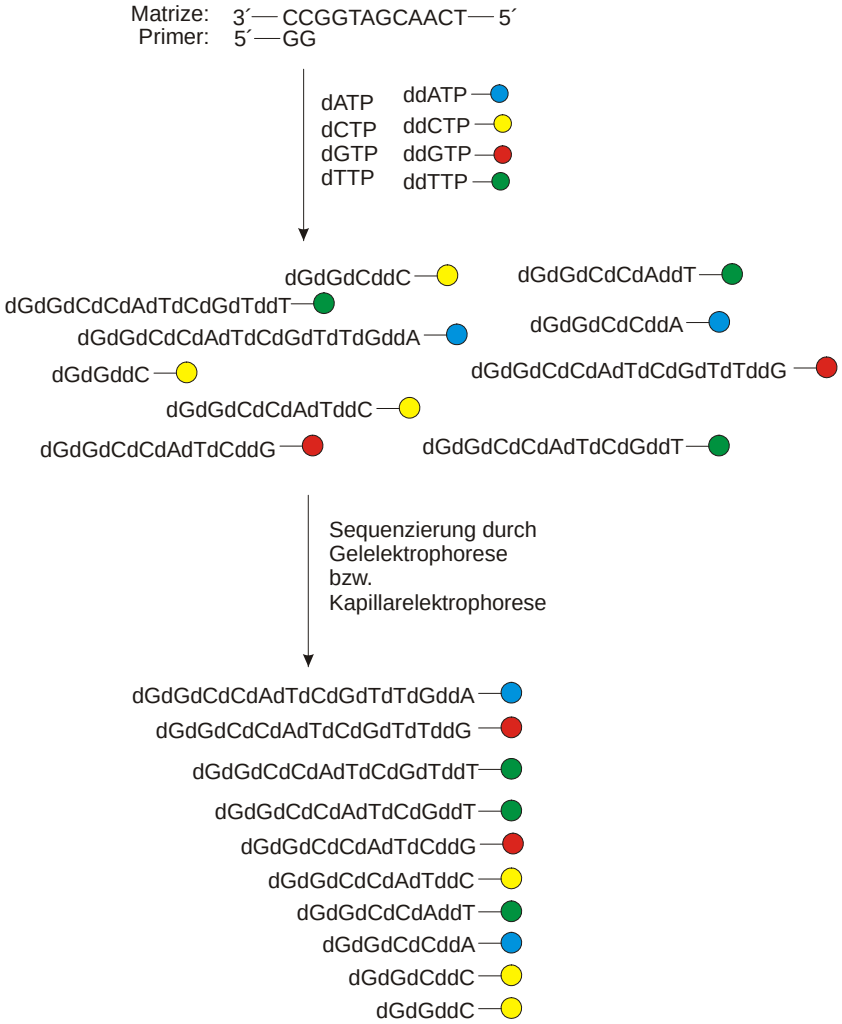


Abb. 95: Prinzip der Sanger-Coulson Sequenzierung

Die verkürzten Sequenzen tragen vier verschiedene, an die endständigen ddNTP´s gekoppelte, Farbstoffe. Während der Auftrennung mittels (Kapillar)-Gelelektrophorese erfolgt eine Laser-Anregung bei vier verschiedenen Wellenlängen und die Aufzeichnung der jeweiligen Absorption. Durch die Abfolge der Absorptionsmaxima im Chromatogramm kann die Sequenz der unbekannten DNA direkt abgelesen werden (Abb. 96).

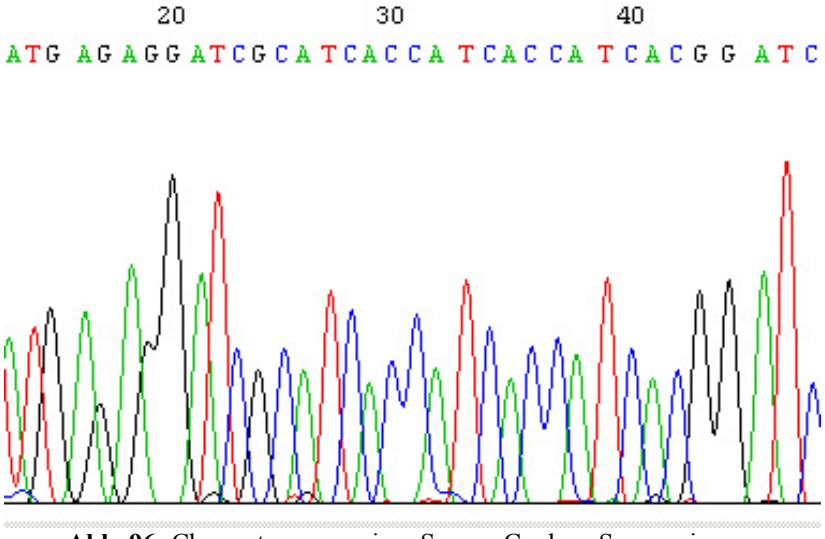


Abb. 96: Chromatogramm einer Sanger-Coulson Sequenzierung

3.10.5. Bakterielle Expressionssysteme

In den letzten Jahren ist die Zahl der auf gentechnischem Wege hergestellten Arzneimittel stark gestiegen[(129)]. Durch „genetic engineering“ sind auf Proteinen basierende, rekombinante Biopharmaka in großen Mengen und in großer Reinheit darstellbar. Je nach Art des Zielproteins muß die Biosynthese in Säugerzellen, Insektenzellen oder Hefen stattfinden, da nur Eukaryonten posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierungen) durchführen, welche für die biologische Aktivität vieler Proteine essentiell sind. Ebenso besteht die Möglichkeit, die rekombinanten Biopharmaka aus den Eiern oder der Milch von transgenen Tieren zu gewinnen.
Eukaryontische Expressionssysteme mit Säugerzellen sind jedoch sehr komplex aufgebaut und nur aufwendig zu kultivieren. Auch ist die Ausbeute an rekombinantem Protein meist nicht sehr hoch. Die einfacher zu kultivierenden Hefen bieten als Eukaryonten zwar ebenfalls die Möglichkeit der posttranslationalen Glykosylierung, jedoch unterscheidet sich das Glykosylierungsmuster meist zu sehr vom Glykosylierungsmuster menschlicher Proteine, so dass es bei der Anwendung zu Immunreaktionen kommen kann.
Die Produktion eines artfremden (z.B. eines humanen) Proteins in einem Wirt, der zu einer anderen Spezies gehört, wird als heterologe Expression bezeichnet. Am häufigsten werden bakterielle Expressionssysteme eingesetzt. Bakterienzellen enthalten, im Gegensatz zu Eukaryonten, nur ein Chromosom, sie sind also haploid und daher leicht zu manipulieren. Eine Veränderung des Genotyps (z.B. der Einbau eines neuen Gens) ruft sofort eine Veränderung des Phänotyps hervor und kann nicht durch einen rezessiven Erbgang unterdrückt werden. Des Weiteren sind Bakterien leicht zu kultivieren und führen, aufgrund ihrer hohen Teilungsrate, schon nach kurzer Zeit zu einer großen Menge an rekombinantem Protein. Da sich die Codon-Nutzung der prokaryontischen Bakterien allerdings oftmals stark von der des jeweiligen Spenderorganismus unterscheidet, ist unter Umständen eine Anpassung der DNA-Sequenz durch stille Mutationen notwendig, um hohe Expressionsraten zu erreichen (s. Kap. 4.5.3.1). Es besteht die Möglichkeit der Verwendung gramnegativer Bakterien mit doppelter Zellwand, wie z.B. E. coli, bei denen sich das Protein meist im Cytoplasma anreichert, oder grampositiver Bakterien wie z.B. *Bacillus subtilis*, welche nur eine Außenmembran besitzen und das Protein in der Regel in das umgebende Kulturmedium sezernieren. Oft ist die Proteinmenge bei der bakteriellen Expression so hoch, dass die Proteine falsch gefaltet werden und als unlösliche Einschlußkörperchen (inclusion bodies) im Cytoplasma vorliegen, die nach der Aufreinigung aufwendig in die biologisch aktive Form zurückgefaltet werden müssen[(130)].
Der mit Abstand am häufigsten eingesetzte bakterielle Wirt für die heterologe Expression ist das E. coli Bakterium, eines der am besten erforschten Organismen der Erde. Das ca. 2µm lange und 1µm breite gramnegative Bakterium bewohnt den Dickdarm des Menschen und anderer Säugetiere. Seine ca. 4600bp lange chromosomale DNA codiert mindestens 4000 verschiedene Proteine. Da die Generationsdauer von E. coli unter günstigen Bedingungen nur 20-30 Minuten beträgt und eine große Menge der Bakterien in einer kleinen Menge Medium Platz hat (bis zu 10^{10} Zellen pro ml), eignen sich E. coli-Bakterien vorzüglich als „Bioreaktoren“. Selbst wenn die Insertion eines neuen Gens in nur einem Promille aller Zellen funktioniert, genügen einige µl Zellsuspension für eine Selektion und spätere Vermehrung aus.
Die Einschleusung des neuen Gens erfolgt über einen Expressionsvektor mit einklonierter cDNA des Zielproteins. Ein Expressionsvektor ähnelt in seinem Aufbau einem Klonierungsplasmid (s. Kap. 3.10.3), jedoch ist das einklonierte Gen von Kontrollsequenzen wie einem bakteriellen Promotor/Operator System, einer ribosomalen Bindungsstelle (RBS) sowie einem Terminator flankiert (Abb. 101). Zusätzlich befindet sich am Anfang oder am Ende der cDNA in der Regel ein sogenanntes Affinitäts-tag. Das dadurch generierte

Fussionsprotein kann später durch Affinitätschromatografie von den übrigen zelleigenen Proteinen abgetrennt werden. Im Gegensatz zum Einbau in einen Klonierungsvektor ist bei Expressionsvektoren strengstens darauf zu achten, dass das einklonierte DNA-Fragment im richtigen Leseraster bezüglich des vor der MCS gelegenen Startcodons (ATG) zum liegen kommt.
Von zentraler Bedeutung ist ein gut funktionierendes Promotor-Operator System, um einerseits hohe Ausbeuten zu erlangen, andererseits, um die Expression eines möglicherweise toxischen Proteins in der Anzuchtphase effektiv zu unterdrücken. Fast alle Promotor-Operator Systeme der für die heterologe Expression in E. coli verwendeten Expressionsplasmide basieren auf dem lac-operon, einem Kontrollsystem für den Transport und den Abbau von Lactose in E. coli[131]. Das ursprüngliche lac-operon besteht aus einem E. coli eigenen Promotor, einem Operator und den drei Strukturgenen lacZ (für β-Galactosidase), lacY (für β-Galactosid-Permease) und lacA (für β-Galactosid-Transacetylase). Wichtig für die Regulation ist vor allem das lacZ-Gen, welches die β-Galactosidase codiert. Dieses Enzym katalysiert den Abbau von Lactose in Galactose und Glucose, ist aber auch für die Umwandlung von Lactose in Allolactose verantwortlich (Abb. 97).

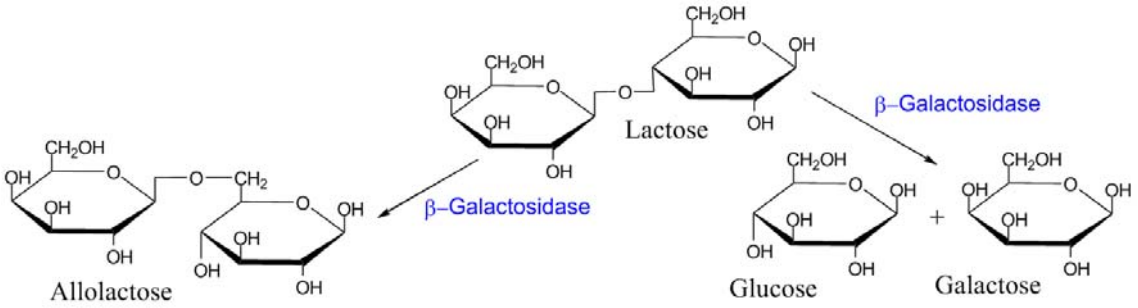


Abb. 97: β-Galactosidase bewirkt die Umwandlung von Lactose in Allolactose (Induktor des lac-Repressors) und den Abbau von Lactose zu Galactose und Glucose

Die β-Galaktosidase wird jedoch erst dann in größerem Maße gebildet, wenn Lactose im umgebenden Medium vorhanden ist. Diese Regulation geschieht durch den lac-Repressor, ein Protein, welches an den Operator bindet und dabei die Struktur der DNA so verändert, dass keine Anheftung von RNA-Polymerase mehr stattfinden kann (Abb. 98).
Auf diese Weise findet keine Transkription der Strukturgene und somit auch keine Bildung von β-Galaktosidase mehr statt. Der lac-Repressor wird von einem seperaten Regulatorgen (lacI) vor dem eigentliche lac-operon codiert.

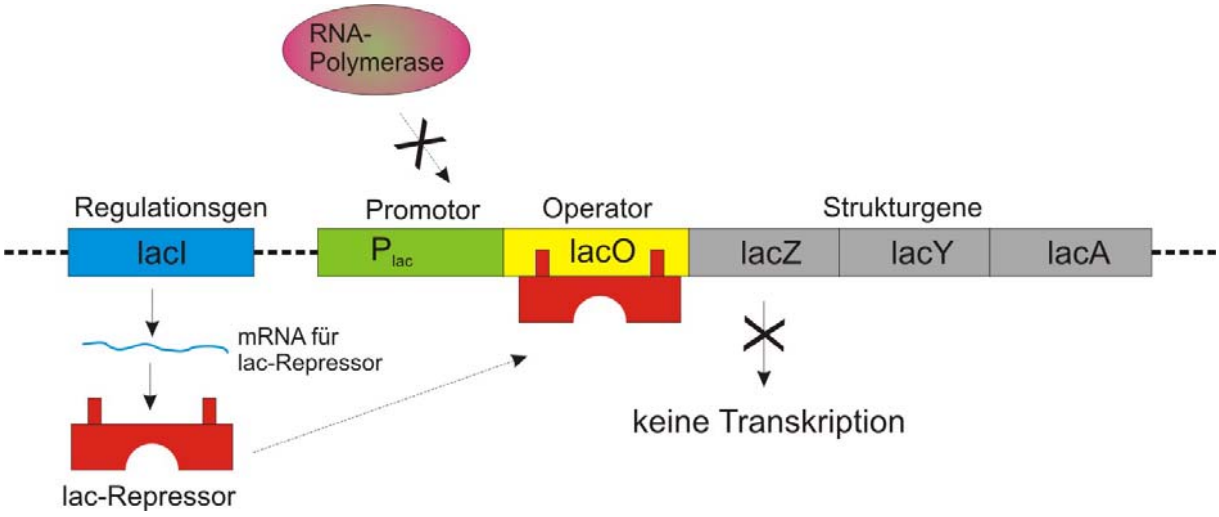


Abb. 98: Blockierung der Transkription der lac-Strukturgene durch den lac-Repressor

Eine geringe Grundmenge an β-Galaktosidase ist jedoch immer in der Zelle vorhanden. Befindet sich Lactose im umgebenden Medium, so wird diese von der β-Galactosid-Permease ins Zellinnere transportiert und durch die β-Galaktosidase in Allolactose umgewandelt (Abb. 97). Diese Allolactose dient nun als Induktor der Genexpression, indem sie sich an den lac-Repressor anlagert und durch Konformationsänderung eine Ablösung von der Operatorsequenz bewirkt. Die RNA-Polymerase kann jetzt an den Promotor binden und mit der Transkription der Strukturgene beginnen (Abb. 99). Auf diese Weise wird immer neue β-Galaktosidase gebildet welche die Lactose einerseits in Galactose und Glucose abbaut, andererseits immer wieder neuen Induktor in Form von Allollactose bereitstellt.

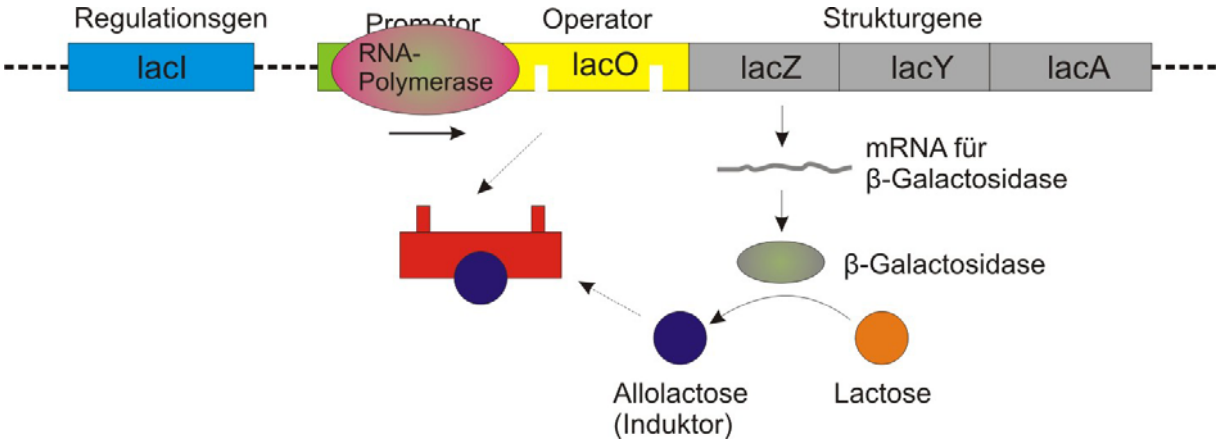


Abb. 99: Bindung des Induktors (Allolactose) an den lac-Repressor führt zur Ablösung vom Operator und zur Expression der lac-Strukturgene

Ist sämtliche Lactose aufgebraucht, so liegt auch kein Substrat mehr für die Bildung von Allolactose vor. Fehlt dieser Induktor, so bindet der lac-Repressor wieder an den Operator und eine weitere Bildung der nun nicht mehr benötigten β-Galaktosidase unterbleibt (Abb. 98). In den kommerziell erhältlichen Expressionssystemen findet sich meist eine optimierte Version des lac-Operators in Verbindung mit einem starken Promotor, welcher in der Regel aus einem Bakteriophagen (T5 oder T7) stammt. Bei vielen E. coli Stämmen ist die entsprechende Phagen-DNA bereits in das Bakterienchromosom integriert, wodurch diese in der Lage sind, die entsprechende RNA-Polymerase selbst zu produzieren. Als Induktor wird allerdings nicht Lactose oder Allolactose, sondern das strukturell ähnliche IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) verwendet (Abb. 100), welches ebenfalls stabil an den lac-Repressor binden kann.

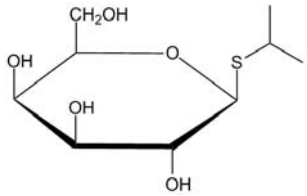


Abb. 100: IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)

Im Gegensatz zur Lactose wird IPTG nicht durch den zelleigenen Metabolismus abgebaut, wodurch seine Konzentration konstant bleibt und eine stabile Induktion gewährleistet ist.
Das in dieser Arbeit verwendete T5-Expessionssystem (Qiagen) basiert auf dem Expressionsvektor pQE30 (Abb. 101), welcher einen T5-Promotor aus dem Bakteriophagen T5 aufweist der unter der Kontrolle von zwei hintereinander geschalteten lac-Operatoren steht. Zwischen den beiden lac-Operatoren und dem Start-Codon (ATG) befindet sich eine synthetische ribosomale Bindungsstelle (RBS), die für eine hohe Translationsrate sorgen soll. Nach dem Start-Codon folgt eine Sequenz welche für 6 Histidine codiert. Durch diesen

sogenannten His-tag wird später eine affinitätschromatografische Aufreinigung durch Komplexbildung an einer Ni^{2+}-NTA Matrix möglich. Zwischen dem His-tag und dem Polylinker (MCS) sind je nach Variante des Vektors zusätzlich ein oder zwei Nukleotide platziert, um einen Einbau des Inserts in das richtige Leseraster bezüglich des Start-Codons zu ermöglichen. Für ein Ende der Translation an den Ribsosomen sorgen mehrere Stop-Codons, die in allen drei Leserastern hinter der MCS angebracht sind und dadurch nach der Klonierung hinter dem Insert liegen. Der Transkriptionsstop (Ablösung der RNA-Polymerase von der mRNA) wird durch zwei unabhängige Terminatoren, dem Terminator t_0 des λ-Phagen sowie dem Terminator T1 des rrnB Operons von E. coli bewerkstelligt. Darüber hinaus trägt das Plasmid neben einem ColE1-Replikationsursprung ein β-Lactamase Gen, das dem rekombinanten Wirt eine Ampicillinresistenz verleiht.

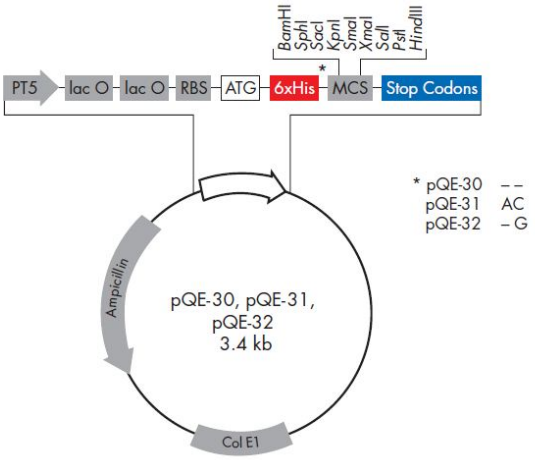


Abb. 101: der Expressionsvektor pQE30 (bzw. pQE31/32) von Qiagen

Der lac-Repressor wird trans-ständig von einem zusätzlichen Plasmid (pREP4) überexprimiert ($lacI^q$-Mutation) welches entweder bereits im verwendeten E. coli Stamm vorhanden ist oder ebenfalls transformiert werden muß. Die Induktion der Expression erfolgt durch die Zugabe von IPTG, was eine Ablösung des lac-Repressors vom Operator bewirkt (Abb. 102), wodurch die T5-RNA Polymerase mit dem T5-Promotor in Wechselwirkung treten und mit der Transkription beginnen kann.

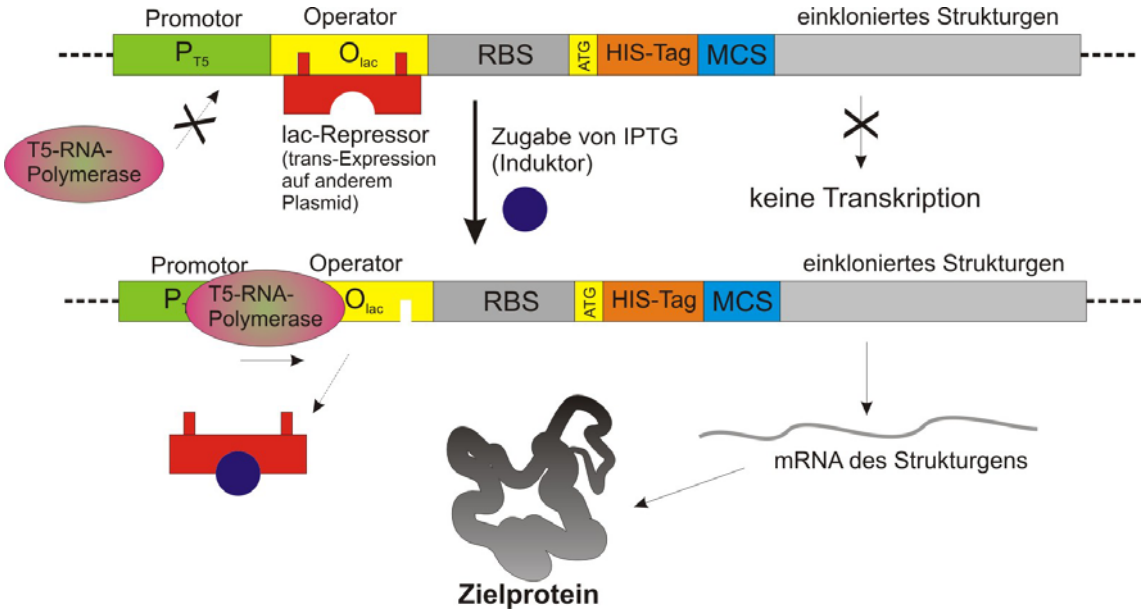


Abb. 102: schematische Darstellung der Induktion beim T5-Expressionssystem

Das fertige Zielprotein beinhaltet sämtliche Sequenzinformation vom Start-Codon bis zum Stop-Codon. Es trägt demnach auf seiner N-terminalen Seite die zusätzlichen 6 Histidine (His-tag) des Vektorkonstrukts und kann dadurch, nach der Lyse der Zellen, von den restlichen Proteinen über Ni-NTA Chromatografie (NTA = Nitrilotriacetic acid) abgetrennt werden (Abb. 103). Die NTA ist dabei kovalent an eine Sepharosematrix gebunden und bildet einen Komplex mit vier der sechs Koordinationsstellen eines Ni^{2+} Ions aus. Die reslichen beiden Koordinationsstellen interagieren mit den Histidin-Resten des Fusionsproteins. Proteine ohne His-tag gehen keine Bindung ein und können auf diese Weise abgetrennt werden. Die Freisetzung des komplexierten Zielproteins erfolgt durch Verdrängung mittels Imidazol oder durch Veränderung des pH-Wertes.

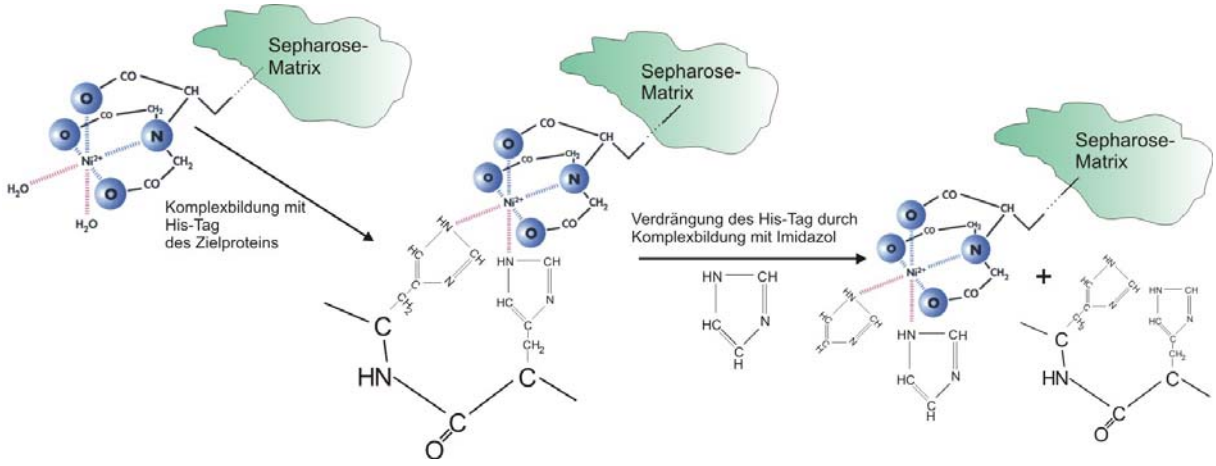


Abb. 103: Abtrennung des His-tag Fusionsproteins durch Komplexbildung mit den Ni^{2+}-Ionen der Sepharosematrix

4. Darstellung der Ergebnisse

4.1. Einseitige und symmetrische Derivatisierung mit Polyethylenglykol

Für die Oligonukleotid-Derivatisierungen im Rahmen dieser Arbeit sollen in erster Linie kurzkettige Polyethylenglykole (PEG400) sowie Polyethylenglykole mittlerer Kettenlänge (PEG1000 und PEG2000) zum Einsatz kommen.
Eine Monomereinheit des PEG (-CH_2-CH_2-O-) weist eine Molekülmasse von 44Da auf, weshalb auch alle modifizierten PEG-Derivate aus ganzzahligen Vielfachen dieser Molekülmasse plus der Masse der endständigen Gruppen bestehen.

Das spätere Hauptanwendungsgebiet für PEG-derivatisierte Oligonukleotide liegt im therapeutischen Bereich, wie z.B. in der Verwendung als Antisense-Medikamente (s. Kap. 3.4.1). Da Polyethylenglykol selbst bereits eine außergewöhnlich niedrige Toxizität aufweist, sollte auch die Verknüpfung mit dem Oligonukleotid durch eine für den Organismus unproblematischen Bindung zustande kommen.
Aus diesem Grunde, sowie auch wegen der relativ einfachen Handhabung der Reaktion, sollen die Polyethylenglykole durch eine Amidbindung mit dem Oligonukleotid verknüpft werden. Dies ist durch den Einsatz von Polyethylenglykol-N-Hydroxysuccinimidestern (PEG-NHS-Ester) sowie aminofunktionalisierten Oligonukleotiden möglich.
Ein NHS-Ester reagiert, unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid, spezifisch mit primären Aminen durch Ausbildung einer Amidbindung (Abb. 104). Um zu gewährleisten, dass sich das primäre Amin des funktionalisierten Oligonukleotids in unprotoniertem Zustand befindet, muß die Umsetzung im alkalischen Milieu (pH7-9) stattfinden. Dieses kann z.B. durch den Einsatz eines Natriumhydrogencarbonat-Puffers bereitgestellt werden.

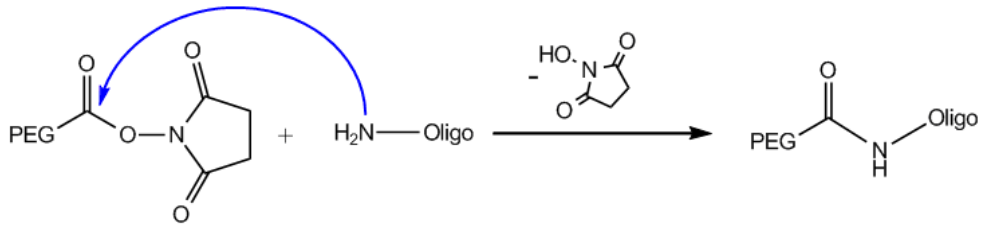


Abb. 104: Umsetzung eines NHS-Esters mit einer Aminogruppe unter Ausbildung einer Amidbindung

Da für eine quantitative Umsetzung des Oligonukleotids mit einem Überschuss an PEG-NHS gearbeitet werden muß, entstehen durch Hydrolyse große Mengen an N-Hydroxysuccinimid (NHS) sowie PEG-OH als Nebenprodukte. Diese müssen nach der Reaktion abgetrennt werden.
Für eine einseitige PEG-Derivatisierung kann die Aminofunktionalisierung des Oligonukleotids am 5´-Terminus durch ein Aminolinker-Phosphorigsäureesteramid bewerkstelligt werden, während zur Aminofunktionalisierung des 3´-Terminus die Oligonukleotidsynthese auf einem Amino-Träger erfolgen muß (Abb. 32 und Abb. 33 in Kapitel 3.2.1.4).
Für eine symmetrische Derivatisierung, bei der sich am Ende identische PEG-Ketten an beiden Seiten des Oligonukleotids befinden, muß sowohl ein Amino-Träger als auch ein Aminolinker-Phosphorigsäureesteramid eingesetzt werden (Abb. 105).

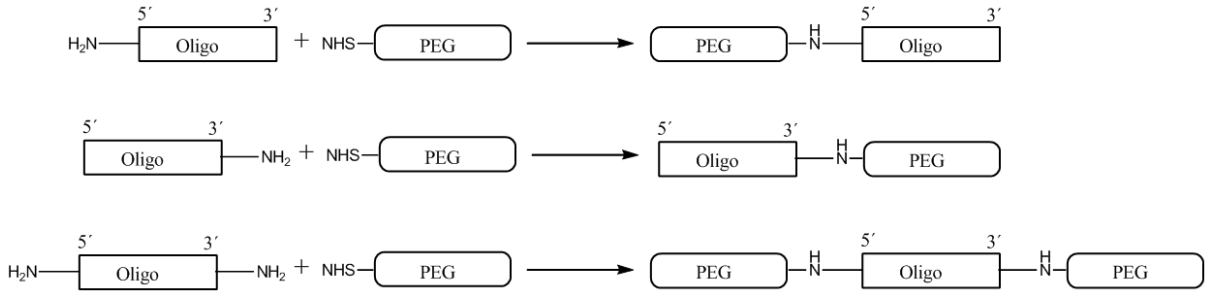


Abb. 105: Schematische Darstellung der einseitigen und beidseitigen symmetrischen Derivatisierung von Oligonukleotiden mit Polyethylenglykolen

4.1.1. Charakterisierung der verwendeten PEG-NHS Ester

Für die Umsetzungen der aminofunktionalisierten Oligonukleotide mittels PEG-NHS sollen Polyethylenglykol-N-hydroxysuccinimidester der Firma IRIS-Biotech zum Einsatz kommen (Abb. 106). PEG-NHS-Ester können eine endständige Hydroxylgruppe (PEG-Alkohol) oder eine Methoxygruppe (mPEG) tragen.
Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten mPEG-NHS Ester weisen eine gemeinsame Grundstruktur auf und unterscheiden sich lediglich in der Anzahl der Ethylenglykoleinheiten.

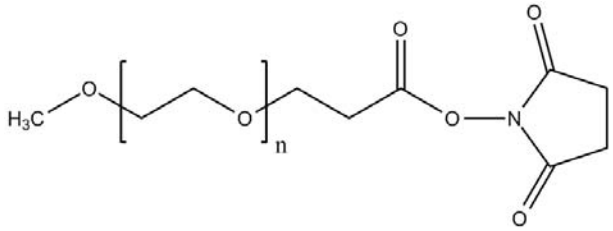


Abb. 106: Strukturformel der verwendeten mPEG-NHS (IRIS-Biotech)
(n= 7 bei mPEG400, n= 23 bei mPEG1000, n= ca. 41 bei mPEG2000)

$M_{mPEG400}$ = 509Da (mit NHS) bzw. 395Da (hydrolysiert)
$M_{mPEG1000}$ = 1214Da (mit NHS) bzw. 1100Da (hydrolysiert)
$M_{mPEG2000}$ = 2005Da ± n•44

Kleinere mPEG-Derivate können sowohl in monodisperser als auch in polydisperser Form bezogen werden, während Polyethylenglykole mit einer Molekülmasse von 2000Da und größer nur noch polydispers erhältlich sind.
Die unterschiedlichen Kettenlängen führen zu unterschiedlichen Aggregatszuständen. So ist mPEG400-NHS bei Raumtemperatur zähflüssig, während mPEG2000-NHS als Feststoff vorliegt. Das mPEG1000-NHS zeigt hingegen eine wachsähnliche Konsistenz.
Für die Handhabung bedeutet dies, dass mPEG2000-NHS direkt für einen Reaktionsansatz eingewogen werden kann, während es bei mPEG400-NHS und auch bei mPEG1000-NHS ratsam ist, eine Stammlösung in trockenem Dimethylformamid (DMF) oder Acetonitril (ACN) anzulegen.
Der Umgang mit den stark hygroskopischen und hydrolyseempfindlichen NHS-Estern sollte möglichst unter Schutzgasatmosphäre erfolgen. Bei Umsetzungen in wässrigen Puffersystemen ist zudem eine schnelle Hydrolyse zu beobachten, was eine portionsweise Zugabe in hohem Überschuss notwendig macht.
Dies bewirkt einen hohen Überschuss an hydrolysiertem PEG-OH welcher nach der Umsetzung vom Reaktionsansatz abgetrennt werden muß. Während mPEG400 eventuell noch über Ultrafiltration zu entfernen ist, muß die Abtrennung der größeren mPEG1000 bzw. mPEG2000 Moleküle chromatographisch erfolgen. Für eine quantitative Abtrennung ist es

jedoch notwendig, dass sich die Retentionszeit des hydrolysierten PEG´s und die des bei der Umsetzung entstehenden Zielprodukts genügend stark unterscheiden.
Zu diesem Zweck muß das Laufverhalten der einzelnen mPEG-Derivate in der RP-HPLC (Abb. 107) und der IE-HPLC (Abb. 108) ermittelt werden, wobei die Visualisierung des UV-inaktiven mPEG´s durch Kopplung mit einem Chromophor erfolgte.

RP-HPLC:

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Methode: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH7,5
- Puffer B: Acetonitril
- Auftragemenge: 1µmol

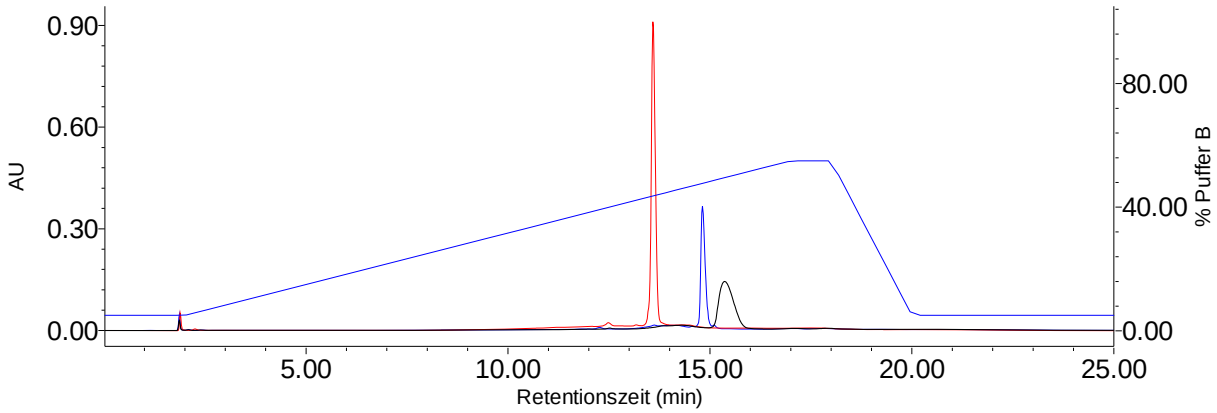


Abb. 107: RP-HPLC des visualisierten mPEG400 (rot), mPEG1000 (blau) und mPEG2000 (schwarz)

In der RP-HPLC (Abb. 107) ergeben sich dabei folgende Retentionszeiten:

mPEG400: ca. 13,5min
mPEG1000: ca. 14,7min
mPEG2000: ca. 15-16min

Die ermittelten Retentionszeiten liegen somit in einem ähnlichen Bereich wie die der späteren Zielprodukte (PEG-derivatisierte Oligonukleotidthiophosphate), wodurch eine Abtrennung des hydrolysierten PEG´s vom Reaktionsansatz mittels RP-HPLC nur bedingt möglich ist.

IE-HPLC:

- Säule: Toyopearl SuperQ-650S 250x4mm
- Methode: 0bis100Proz_1ml_50min (s. Kap. 6.4.2)
- Puffer A: 0,01M TEAA pH7,5
- Puffer B: 0,01M TEAA pH7,5 + 2M NaCl
- Auftragemenge: 1µmol

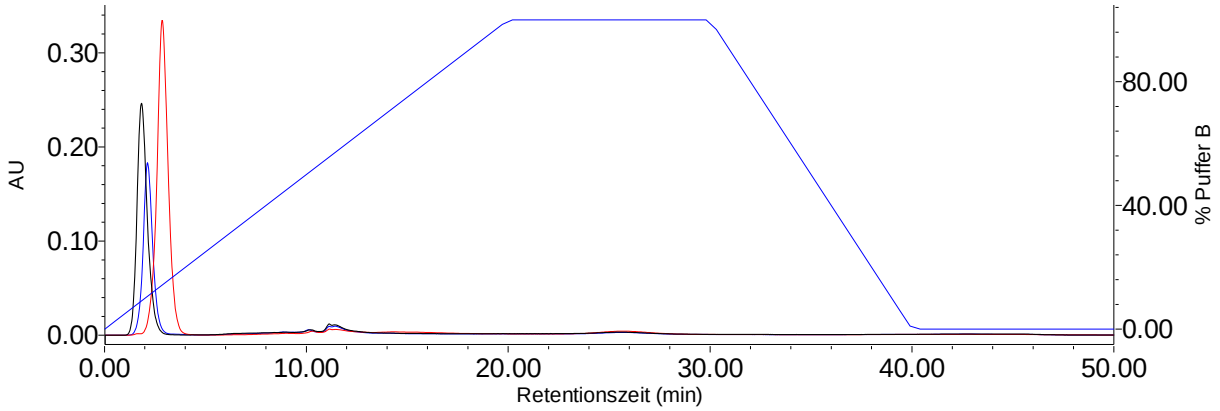


Abb. 108: IE-HPLC des visualisierten mPEG400 (rot), mPEG1000 (blau) und mPEG2000 (schwarz)

In Abb. 108 zeigt sich, dass sämtliche mPEG Derivate erwartungsgemäß keine Wechselwirkung mit dem IE-Säulenmaterial aufweisen und sofort mit dem Totvolumen der Säule eluieren.
Da die späteren Zielprodukte (PEG-derivatisierte Oligonukleotidthiophosphate) durchaus eine starke Wechselwirkung in der Ionenaustausch-Chromatographie zeigen und in der Regel Retentionszeiten von mehr als 10min aufweisen, ist somit eine vollständige Abtrennung des hydrolysierten PEG´s vom Reaktionsansatz mittels IE-HPLC bzw. IE-FPLC möglich.

Zur weiteren Charakterisierung und Identitätsbestimmung wurden mit jeweils 200nmol der verschiedenen mPEG-NHS Derivate eine MALDI-TOF MS (s. Kap. 6.6) durchgeführt (Abb. 109 bis Abb. 111). Bedingt durch die Probenpreparation liegen in diesem Fall sämtliche mPEG-NHS Derivate in hydrolysierter Form, also als mPEG-OH vor.

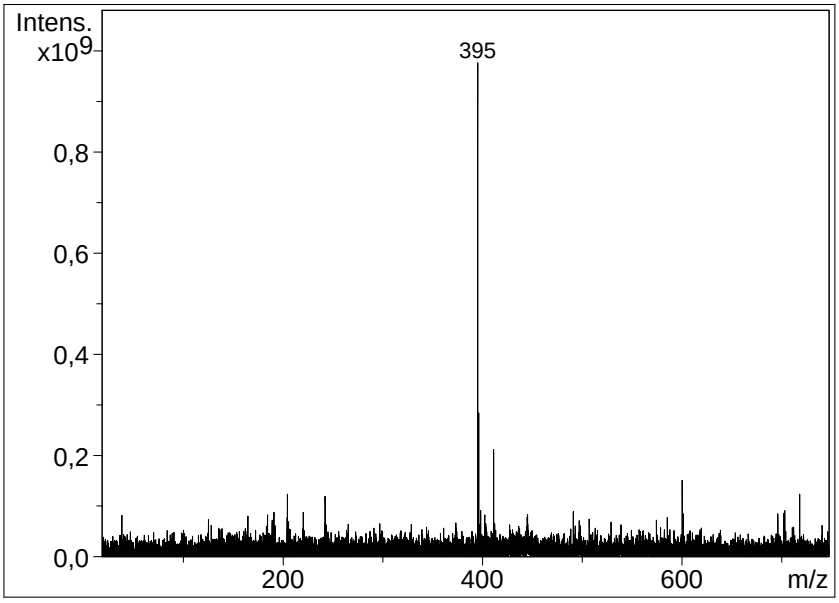


Abb. 109: MALDI-TOF MS des monodispersen mPEG400 ($M_{theor.}$ = 395Da M_{MALDI} = 395Da)

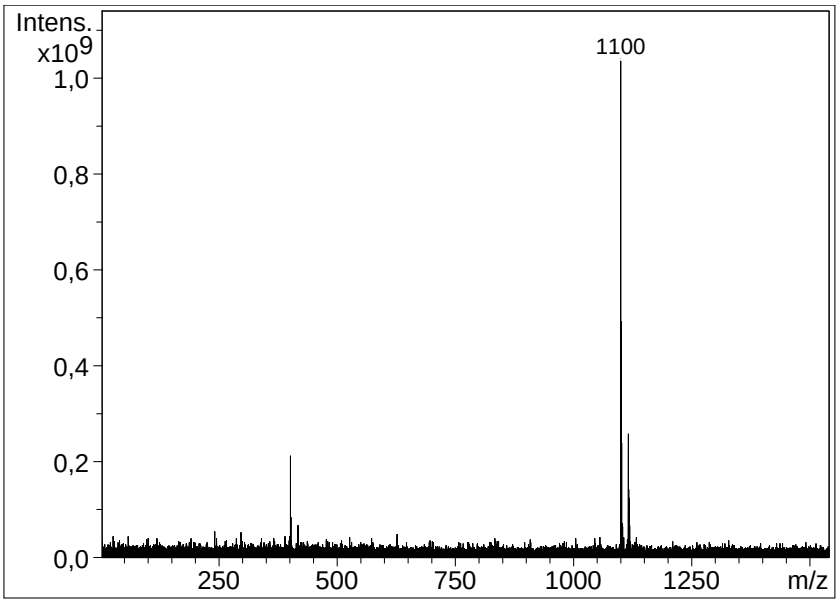


Abb. 110: MALDI-TOF MS des monodispersen mPEG1000 ($M_{theor.}$ = 1100Da M_{MALDI} = 1100Da)

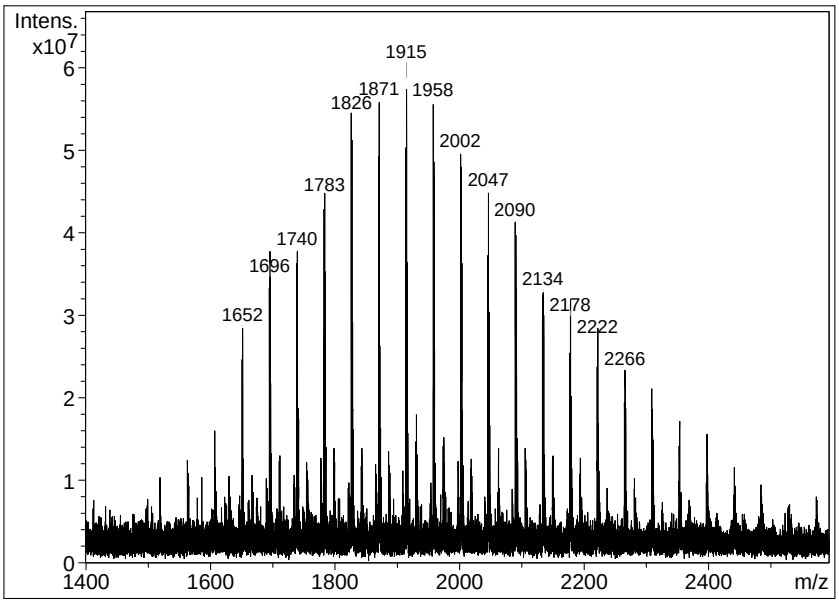


Abb. 111: MALDI-TOF MS des polydispersen mPEG2000
($M_{theor.}$ = 2005Da ± n•44Da M_{MALDI} = 1915Da ± n•44Da)

Die ermittelten Massen der monodispersen PEG-NHS Derivate stimmen somit vollständig mit den theoretischen Werten überein. Auch beim polydispersen mPEG2000-NHS entspricht die theoretische Masse einem der Peaks in der polydispersen Verteilung. Allerdings ist das Maximum der Verteilung in Richtung niedrigerer Molekülmassen verschoben.

4.1.2. Optimierung der Geräteprotokolle für die Oligonukleotidsynthese

Um eine für spätere Tier- und Zellkulturversuche ausreichende Menge an PEG-derivatisiertem Endprodukt zu erhalten ist, aufgrund von Verlusten während der vielen Zwischenaufreinigungen, eine möglicht hohe Ausgangsmenge an funktionalisiertem Oligonukleotid wünschenswert.
Die Standard-Kopplungsprotokolle des Oligonukleotidsynthesizers (Expedite 8909) führen allerdings zu einem hohen Anteil an verkürzten Sequenzen.

Um höhere Kopplungsausbeuten zu erreichen, wurden 2 Oligonukleotidsynthesen der Sequenz ONT1 (s. Kap. 8.1) mit je 1µmol Trägereinwaage durchgeführt. Für einen Ansatz wurde das Standard-Basenkopplungsprotokoll des Synthesizers verwendet, für den zweiten Ansatz hingegen ein modifiziertes Basenkopplungsprotokoll mit doppelten Kopplungszyklen und einem verlängerten Detritylierungsschritt.
Nach der Synthese wurden die Oligonukleotide mit je 700µl konz. Ammoniak 18h lang bei 55°C vom Träger abgespalten, der Ammoniak im Speedvac evaporiert, die Proben in je 1ml Wasser gelöst und mit jeweils 10nmol eine analyt. RP-HPLC durchgeführt (Abb. 112).

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

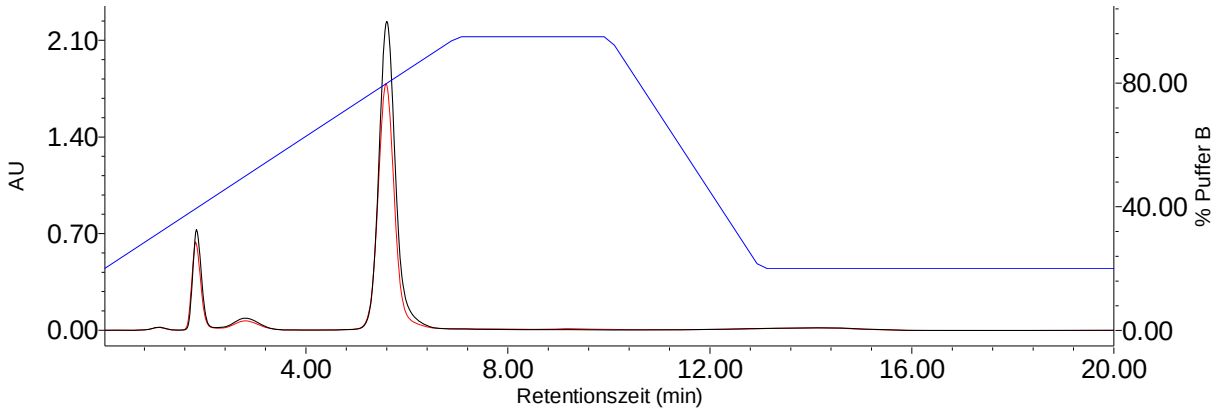


Abb. 112: RP-HPLC der beiden Syntheseansätze der Sequenz ONT1
(rot: Standard-Protokoll, schwarz: modifiziertes Protokoll mit doppelten Kopplungszyklen)

Die vollständigen Sequenzen weisen in Abb. 112, aufgrund der hydrophoben DMT-Gruppe, eine wesentlich höhere Retentionszeit (ca. 7min) auf als die verkürzten Sequenzen (< 2min). Dabei zeigt sich, dass beide Synthesen sehr gut, mit nur einem geringen Anteil an verkürzten Sequenzen, verliefen. Bereits jetzt wird durch die qualitative Betrachtung der Peakflächen deutlich, dass die Gesamtausbeute beim Ansatz mit modifiziertem Kopplungsprotokoll (schwarze Linie) höher ist.
Nach der preparativen Abtrennung der vollständigen Sequenzen ergaben sich durch photometrische Quantifizierung folgende Ausbeuten:

Standard-Protokoll: 240nmol (24% der Theorie)
modifiziertes Protokoll: 380nmol (38% der Theorie)

Die Ausbeute bezüglich der Trägereinwaage konnte demnach durch die vorgenommenen Modifizierungen des Kopplungsprotokolls um über 60% erhöht werden.
Mit dem modifizierten Protokoll wurden daraufhin zwei Synthesen der Sequenz ONT1 durchgeführt. Einmal mit einer Trägereinwaage von 1µmol und einmal mit einer Trägereinwaage von 2µmol Thymidin-CPG Support.
Nach Abspaltung vom Träger mittels 700µl konz. Ammoniak während 19h bei 55°C wurde wiederum eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 113).

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4.2)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

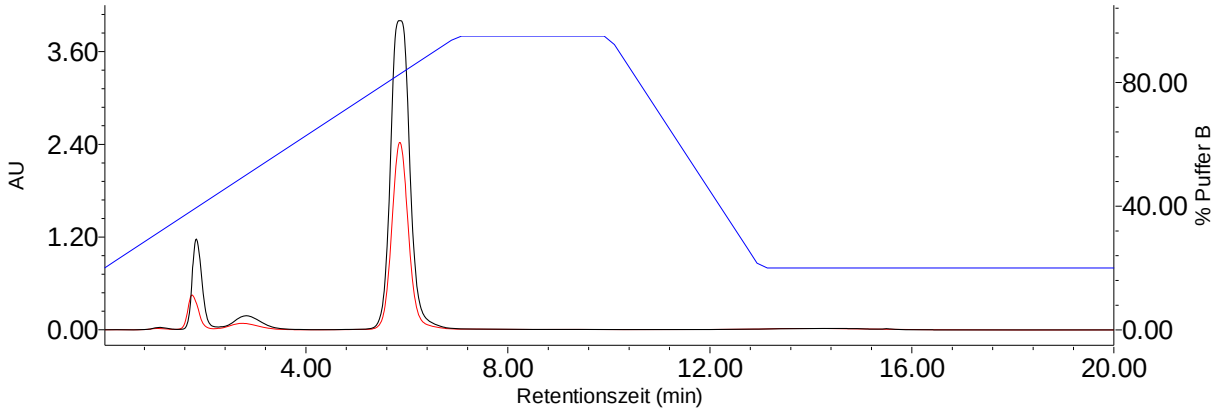


Abb. 113: RP-HPLC der beiden Synthesen (schwarz: 2µmol Maßstab, rot: 1µmol Maßstab)

Auch in Abb. 113 zeigen beide Synthesen nur eine geringe Menge an verkürzten Sequenzen mit Retentionszeiten < 2min. Aufgrund der Peakfläche wird bereits jetzt deutlich, dass die Gesamtausbeute bei einer Trägereinwaage von 2µmol (schwarze Linie) deutlich höher ist.
Nach der preparativen Aufreinigung ergaben sich folgende Ausbeuten:

1µmol-Maßstab: 300nmol (30% der Theorie)
2µmol-Maßstab: 540nmol (27% der Theorie)

Die prozentuale Ausbeute bezüglich der Trägereinwaage wird auf diese Weise zwar nicht erhöht, jedoch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist im verwendeten Synthesizer auch größere Ansätze ohne Qualitätsverlust zu fahren. Durch Anwendung eines 2µmol-Maßstabs verringert sich die Anzahl der nötigen Synthesen um etwa die Hälfte, was eine gewaltige Zeitersparnis bedeutet.
Ein weiterer Faktor, welcher die Ausbeute an PEG-derivatisierten Endprodukten beeinflußt, ist die Kopplungseffizienz des 5´-Aminomodifiers, welcher die 5´-Aminogruppe für weitere Umsetzungen mit PEG-NHS bereitstellt. Um auch hier eine möglichst hohe Kopplungsrate zu erzielen, wurden verschiedene modifizierte Kopplungsprotokolle getestet.
Zu diesem Zweck wurden zwei Synthesen der Sequenz ONT1 im 1µmol-Maßstab mit dem modifizierten Basenkopplungsprotokoll für Thiophosphate (s. Kap. 6.2) auf Thymidin-CPG Support durchgeführt. Im letzten Schritt erfolgte die Kopplung eines 5´-DMS(O)MT-Aminomodifiers C6 (Abb. 114) einmal nach einem Protokoll mit verlängertem Kopplungszyklus, und einmal nach einem Protokoll mit doppeltem Kopplungszyklus (Abb. 115).

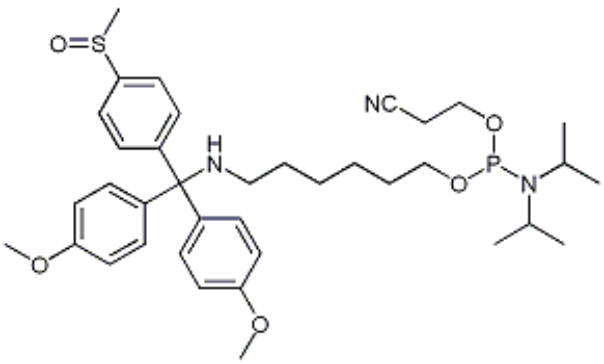


Abb. 114: 5´-DMS(O)MT-Aminomodifier C6 von Glen Research

```
/* ------------------------------------------------------------------------ */
/*     Function          Mode  Amount Time(sec)       Description          */
/*                       /Arg1  /Arg2                                       */
/* ------------------------------------------------------------------------ */
$Deblocking
 144 /*Index Fract. Coll.  */ NA        1     0  "Event out ON"
   0 /*Default           */ WAIT      0   1.5  "Wait"
 141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA        1     1  "START data collection"
  16 /*Dblk              */ PULSE    10     0  "Dblk to column"
  16 /*Dblk              */ PULSE    50    49  "Deblock"
  38 /*Diverted Wsh A     */ PULSE    40     0  "Flush system with Wsh A"
 141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA        0     1  "STOP data collection"
  38 /*Diverted Wsh A     */ PULSE    40     0  "Flush system with Wsh A"
 144 /*Index Fract. Coll.  */ NA        2     0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh              */ PULSE     5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act              */ PULSE     5     0  "Flush system with Act"
  22 /*5 + Act          */ PULSE     3     0  "Monomer + Act to column"
  22 /*5 + Act          */ PULSE     3   180  "Couple monomer"
   2 /*Act              */ PULSE     4   300  "Couple monomer"
   1 /*Wsh              */ PULSE     7   225  "Couple monomer"
   1 /*Wsh              */ PULSE     8     0  "Flush system with Wsh"
$Oxidizing
  12 /*Wsh A            */ PULSE    30     0  "Flush system with Wsh A"
  17 /*Aux              */ PULSE    15     0  "Aux to column"
  17 /*Aux              */ PULSE    20   120  "Aux"
  12 /*Wsh A            */ PULSE     6    60  "Slow pulse to thioate"
  12 /*Wsh A            */ PULSE    30     0  "Flush system with Wsh A"
```

```
/* ------------------------------------------------------------------------ */
/*     Function          Mode  Amount Time(sec)       Description          */
/*                       /Arg1  /Arg2                                       */
/* ------------------------------------------------------------------------ */
$Deblocking
 144 /*Index Fract. Coll.  */ NA        1     0  "Event out ON"
   0 /*Default           */ WAIT      0   1.5  "Wait"
 141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA        1     1  "START data collection"
  16 /*Dblk              */ PULSE    10     0  "Dblk to column"
  16 /*Dblk              */ PULSE    70    49  "Deblock"
  38 /*Diverted Wsh A     */ PULSE    40     0  "Flush system with Wsh A"
 141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA        0     1  "STOP data collection"
  38 /*Diverted Wsh A     */ PULSE    40     0  "Flush system with Wsh A"
 144 /*Index Fract. Coll.  */ NA        2     0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh              */ PULSE     5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act              */ PULSE     5     0  "Flush system with Act"
  22 /*5 + Act          */ PULSE     5     0  "Monomer + Act to column"
  22 /*5 + Act          */ PULSE     2    16  "Couple monomer"
   2 /*Act              */ PULSE     3    24  "Couple monomer"
   1 /*Wsh              */ PULSE     7    56  "Couple monomer"
   1 /*Wsh              */ PULSE     8     0  "Flush system with Wsh"
   1 /*Wsh              */ PULSE     5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act              */ PULSE     5     0  "Flush system with Act"
  22 /*5 + Act          */ PULSE     5     0  "Monomer + Act to column"
  22 /*5 + Act          */ PULSE     2    16  "Couple monomer"
   2 /*Act              */ PULSE     3    24  "Couple monomer"
   1 /*Wsh              */ PULSE     7    56  "Couple monomer"
   1 /*Wsh              */ PULSE     8     0  "Flush system with Wsh"
$Oxidizing
  12 /*Wsh A            */ PULSE    30     0  "Flush system with Wsh A"
  17 /*Aux              */ PULSE    15     0  "Aux to column"
  17 /*Aux              */ PULSE    20   120  "Aux"
  12 /*Wsh A            */ PULSE     6    60  "Slow pulse to thioate"
  12 /*Wsh A            */ PULSE    30     0  "Flush system with Wsh A"
```

Abb. 115: Vergleich der beiden modifizierten Kopplungsprotokolle für den 5´-Aminomodifier (Änderungen sind gelb unterlegt, links: verlängerter Kopplungszyklus, rechts: doppelter Kopplungszyklus)

Die beiden fertig synthetisierten Sequenzen wurden noch auf dem Synthesizer mit jeweils 30 Zyklen 3% TFA in DCM detrityliert. Bei Verwendung des Protokolls mit doppeltem Kopplungszyklus zeigte sich dabei über längere Zeit eine intensive Rotfärbung des abgespaltenen DMS(O)MT-Kations (s. Kap 6.2.2), welches zuvor die Schutzgruppe des Aminomodifiers bildete.
Im Falle des Protokolls mit verlängertem Kopplungszyklus blieb die Rotfärbung jedoch fast vollständig aus, was darauf hindeutet, dass hier nur eine unzureichende Kopplung des 5´-Aminomodifiers stattfand. Dies könnte auf einer mangelnden Durchmischung von Aktivator und gelöstem Monomer während der langen Kopplungszeit, bedingt durch Diffusionsprozesse in der Synthesekartusche beruhen.
Der Inhalt beider Synthese-Kartuschen wurde daraufhin getrocknet und jeweils mit einem 10fachen molaren Überschuss an mPEG2000-NHS (10µmol bzw. 20mg) in 150µl DMF / 7,5µl DIPEA für 1,5 Stunden bei 37°C und 200rpm im Brutschrank umgesetzt.

mPEG2000-NHS + H_2N-ONT1-**CPG** → mPEG2000-NH-ONT1-**CPG**

Die Abspaltung der derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphate erfolgte in jeweils 700µl konz. Ammoniak innerhalb von 11 Stunden bei 55°C.

mPEG2000-NH-ONT1-**CPG** → mPEG2000-NH-ONT1

Von jeweils 10nmol der abgespaltenen Produkte wurde eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 116).

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4.2)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

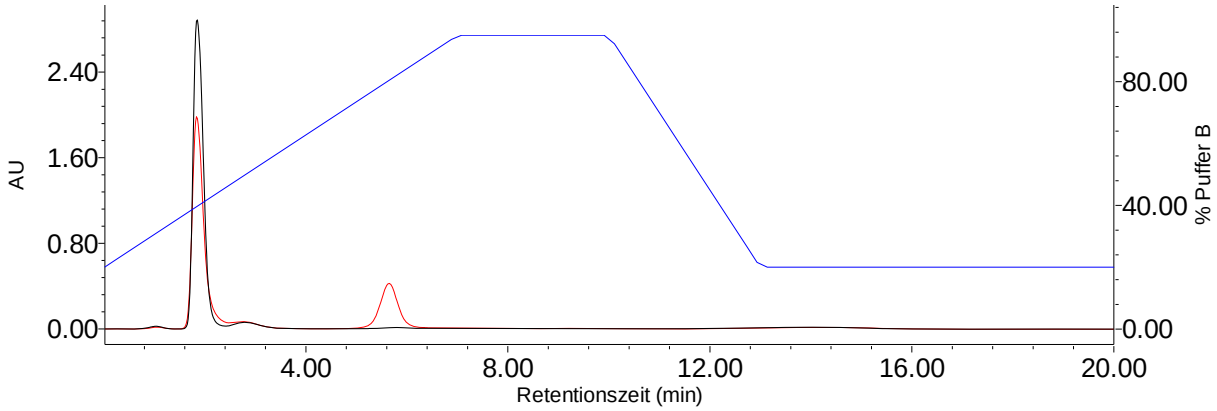


Abb. 116: RP-HPLC der beiden mPEG2000-derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphate (schwarz: verlängerter Kopplungszyklus für 5´-Aminomodifier, rot: doppelter Kopplungszyklus für 5´-Aminomodifier)

Wie sich schon im Vorfeld andeutete, erfolgte im Falle des verlängerten Kopplungszyklus keine Kopplung des 5´-Aminomodifiers und somit auch keine Reaktion mit mPEG2000-NHS (fehlender Peak bei 5-6min in Abb. 116). Die Kopplung mittels doppeltem Kopplungszyklus war hingegen erfolgreich und führt nach der Umsetzung mit mPEG2000-NHS zu einem polydispersen Peak bei 6-8min.
Die UV-Quantifizierung nach der preparativen Aufreinigung ergab bei Verwendung des doppelten Kopplungszyklus 100nmol Ausbeute an mPEG2000-derivatisiertem Produkt (10% bezüglich Trägereinwaage), bei Verwendung des verlängerten Kopplungsprotokolls war kein derivatisiertes Oligonukleotid-Thiophosphat vorhanden.
Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Oligonukleotid-Synthesen nach Möglichkeit mit einem modifizierten Geräteprotokoll vorgenommen, welches doppelte Kopplungszyklen sowohl für die Basenkopplungen wie auch für die Kopplung des 5´-Aminomodifiers enthält.

4.1.3. 5´-terminale Derivatisierung mit mPEG2000

Zur Etablierung und Optimierung einer Synthese- und Aufreinigungsstrategie für Oligonukleotid-Thiophosphate mit einer einseitigen 5´-terminalen Derivatisierung durch ein Polyethylenglykol mittlerer Kettenlänge wurde zunächst ein 18mer-Oligonukleotid-Thiophosphat mit einem C6-Aminolinker am 5´-Terminus auf einem Expedite 8909 DNA-Synthesizer hergestellt (Sequenz H_2N-ONT1). Die Synthesen erfolgten nach den in Kapitel 4.1.2 beschriebenen, modifizierten Basenkopplungsprotokollen mit doppelten Kopplungszyklen im 2µmol Maßstab.
Nach der Synthese wurde das aminofunktionalisierte Oligonukleotid-Thiophosphat, wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben vom Träger abgespalten und aufgereinigt. Für die darauf folgende Umsetzung mit mPEG2000-NHS gilt das Reaktionsschema in Abb. 117.

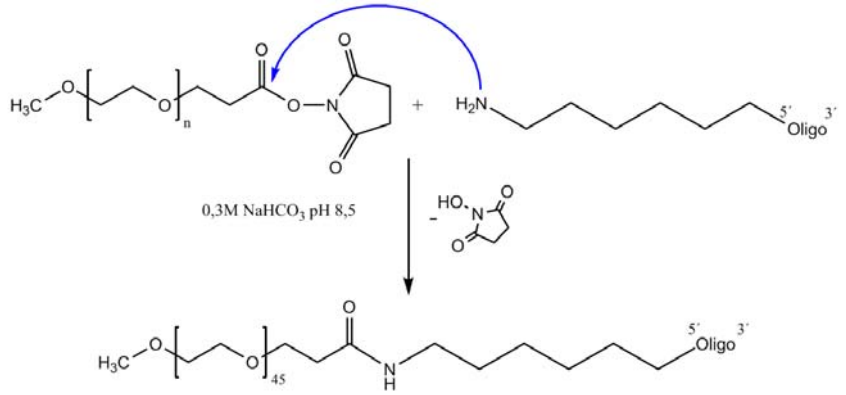


Abb. 117: 5´-terminale Derivatisierung eines aminofunktionalisierten Oligonukleotid-Thiophosphats mittels mPEG2000-NHS

Die Aufreinigung des Reaktionsansatzes soll über Ionenaustausch FPLC und Reversed-Phase HPLC erfolgen (Abb. 118).

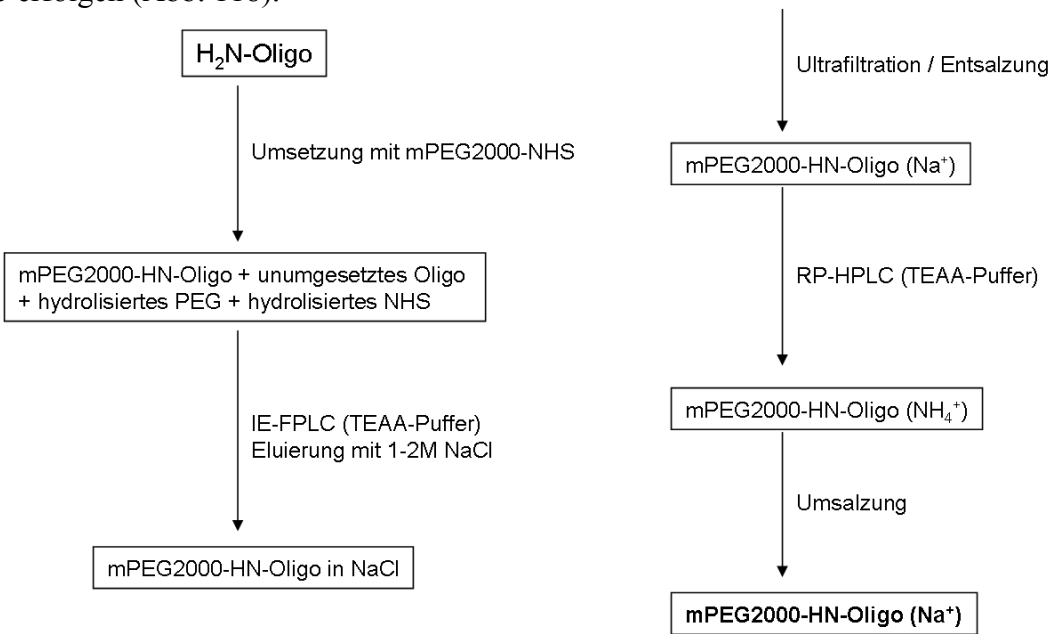


Abb. 118: Aufreinigungsprinzip für 5´-PEG-derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphate mit einem Polyethylenglykol mittlerer Kettenlänge

4.1.3.1. erster Ansatz zur 5´-terminalen Derivatisierung mit mPEG2000

Für einen ersten Ansatz wurden 2µmol des Oligonukleotid-Thiophosphats in 1,6ml 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5 gelöst und portionsweise, über einen Zeitraum von 2 Stunden, insgesamt 28µmol (14x Überschuss; 55mg) mPEG2000-NHS Ester zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde daraufhin 16h lang bei 37°C inkubiert. Nach 16h wurde ein 5nmol Aliquot entnommen und der restliche Ansatz im Speedvac getrocknet. Mit dem entnommenen Aliquot wurde eine IE-HPLC (Abb. 119) zur Beurteilung des Reaktionsverlaufes vorgenommen.
Als Vergleich dienten 5nmol des unumgesetzten Ausgangs-Oligonukleotids H_2N-ONT1.

- Säule: Toyopearl SuperQ-650S 250x4mm
- Methode: 0bis100Proz_1ml_50min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,01M TEAA pH7,5
- Puffer B: 0,01M TEAA pH7,5 + 4M NaCl
- Auftragemenge: 5nmol

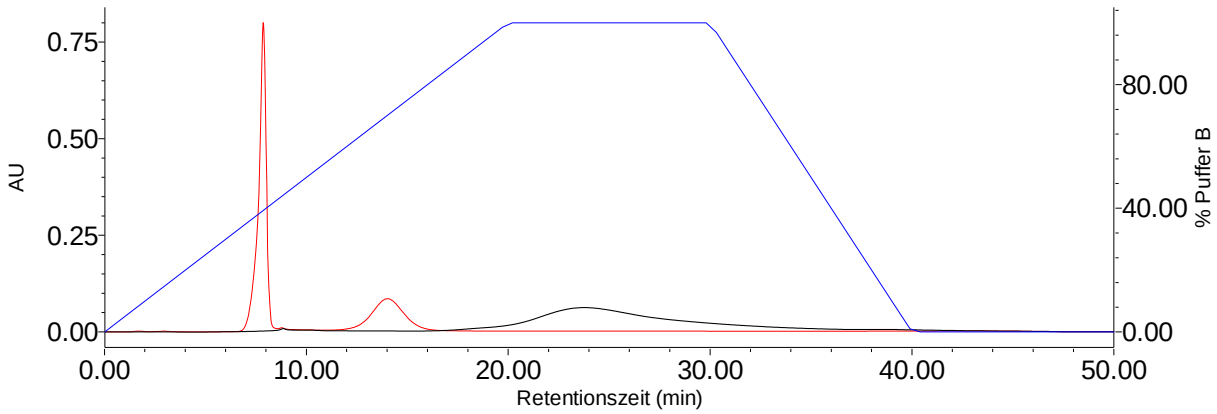


Abb. 119: IE-HPLC nach Ende der Reaktion (schwarz: Ausgangsoligonukleotid, rot: Reaktionsansatz)

Das Ausgangs-Oligonukleotid H_2N-ONT1 (in Abb. 119 schwarz) eluiert in Form eines sehr breiten Peaks zwischen 18min und 38min. Das Konjugat mPEG2000-ONT1 (rot) eluiert als etwas schmälerer Peak zwischen 12min und 16min. Es ist kein unumgesetztes Oligonukleotid-Thiophosphat mehr zu erkennen. Der scharfe Peak bei 8min wird durch das hydrolysierte NHS verursacht.
Der getrocknete Ansatz wurde in 1ml 0,01M TEAA pH7,5 gelöst und zur Abtrennung des überschüssigen hydrolysierten NHS und mPEG2000 einer IE-FPLC unterworfen (Abb. 120).
Zum langsamen Herantasten an die maximale Säulenkapazität wurden mehrere Läufe mit verschiedenen Auftragemengen (15nmol – 600nmol) durchgeführt.

- Säule: Toyopearl SuperQ-650M 150x16mm
- Puffer A: 0,01M TEAA pH7,5
- Puffer B: 0,01M TEAA pH7,5 + 2M NaCl
- Flow = 4ml/min (Kolbenpumpe P-500)
- Schreibergeschwindigkeit: 2mm/min
- Gradienten: 0%B, 20%B, 40%B, 60%B, 80%B, 100%B
- Auftragemenge / Schreiberempfindlichkeit: 15nmol / 1mV
  100nmol / 5mV
  300nmol / 25mV
  600nmol / 50mV

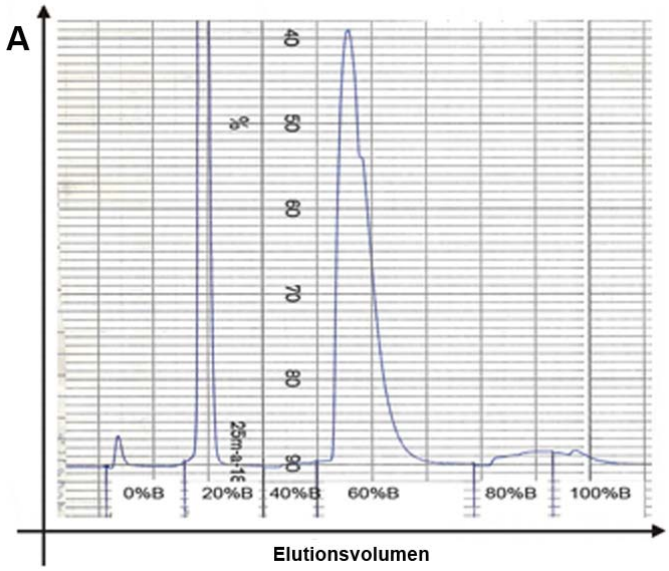


Abb. 120: IE-FPLC des Reaktionsansatzes bei einer Auftragemenge von 600nmol

Der Peak bei 20%B stammt von hydrolysiertem NHS. Das Konjugat aus Oligonukleotid-Thiophosphat und mPEG2000 (mP2000-ONT1) eluiert bei 60%B, während unumgesetztes Oligonukleotid-Thiophosphat erst bei 80% - 100%B die IE-Säule verlässt.
Die verwendete Säule kann demnach ohne Probleme mit 600nmol Produkt (bezogen auf die Ansatzgröße) beladen werden. Das Elutionsvolumen ist dabei nur wenig abhängig von der Auftragemenge.
Nach der IE-FPLC weist das Eluat einen hohen NaCl-Gehalt von 1,2M auf. Dieser muß, vor der weiteren Verarbeitung des Produkts, mittels Ultrafiltration (s. Kap. 6.4.4.1) verringert werden. Der Durchlauf durch die Ultrafiltrationsmembran wurde dabei im Photometer vermessen, um einen eventuellen Verlust des Produkts rechtzeitig erkennen zu können.

Verdünnung	Gehalt an NaCl	Produkt im Durchlauf
0	1,2M	nicht messbar
1	0,24M	nicht messbar
2	48mM	nicht messbar
3	9,6mM	nicht messbar
4	1,9mM	nicht messbar
5	0,4mM	nicht messbar

Der Rückstand wurde schließlich in 10ml Wasser aufgenommen und im Photometer vermessen (s. Kap. 6.5). Dabei ergab sich eine Stoffmenge von ca. **1,5µmol**, was einer Zwischenausbeute von ca. 75% entspricht. Anschließend erfolgte eine Trocknung im Speedvac.
Um die maximale Kapazität der verwendeten Phenomenex PolymerX RP1 100Å 10x250mm Säule für die nun folgende Aufreinigung über preparative RP-HPLC zu ermitteln, folgten mehrere Läufe mit steigenden Auftragemengen (Abb. 121).

- Säule: Phenomenex PolymerX RP1 100Å 10x250mm
- Methode: 20bis80Proz_6ml_25min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH7,5
- Puffer B: Acetonitril
- Auftragemenge: 20nmol (rot)
  250nmol (blau)
  500nmol (schwarz)

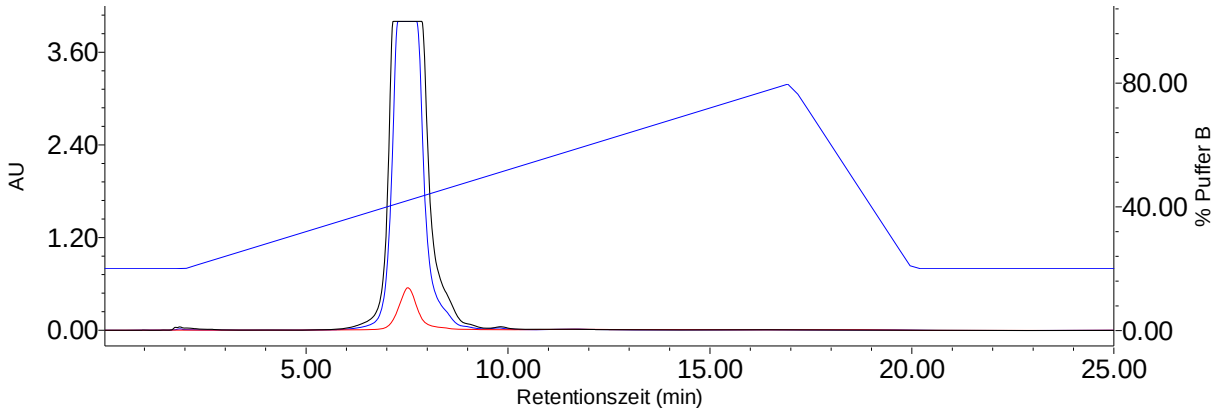


Abb. 121: preparative RP-HPLC zur Endaufreinigung

Die Phenomenex PolymerX RP1 100Å 10x250mm Säule kann demnach ohne Probleme mit einer Auftragemenge von 500nmol Produkt betrieben werden.
Das Konjugat aus Oligonukleotid-Thiophosphat und mPEG2000 (mPEG2000-ONT1) eluiert in Abb. 121 bei ca. 7-9min bei einem Gesamtvolumen von 60ml in 5 Läufen. Das Eluat wurde auf mehrere 15ml Zentrifugenröhrchen verteilt, im Speedvac getrocknet und am Ende wieder vereint.
Für eine Anwendung in Zellkulturversuchen müssen die, aus dem TEAA-Puffer der RP-HPLC Aufreinigung stammenden, NH_4^+ Gegenionen gegen Na^+ Ionen ausgetauscht werden (Umsalzung). Dazu wurde die getrocknete Probe mit 100µl 1M Natriumacetat-Lösung versetzt, in 1ml Wasser gelöst und über eine NAP-Säule entsalzt (Kapitel 6.4.4.3).
Eine UV-Vermessung nach der Trocknung im Speedvac ergab eine Stoffmenge von **1µmol**, was einer Gesamtausbeute von 50% bezüglich des aminofunktionalisierten Ausgangs-Oligonukleotid entspricht.

Über den kompletten Syntheseablauf ergeben sich somit folgende Ausbeuten:

Schritt	Stoffmenge	insg. Ausbeute	Ausbeute pro Schritt
Synthesestart	2µmol		
IE-FPLC	1,5µmol	75%	75%
Entsalzung	1,5µmol	75%	100%
RP- HPLC + Umsalzung	1µmol	50%	66%

Die größten Verluste treten demnach bei der abschließenden Reinigung über RP-HPLC mit anschließender Umsalzung auf. Für weitere Ansätze sollte daher dieser letzte Schritt vermieden werden.

4.1.3.2. optimierter Ansatz zur 5´-terminalen Derivatisierung mit mPEG2000

In einem optimierten Ansatz wurden zur Verkürzung der Synthesezeit und der Erhöhung der Ausbeute einige Veränderungen vorgenommen.
So wurde der Ansatz am Ende der Reaktion nicht vollständig getrocknet, auf die HPLC-Endreinigung verzichtet und ein neues Puffersystem für die Ionenaustausch FPLC eingeführt.
Aufgrund des bisher verwendeten TEAA-Puffers, welcher sich aus Triethylamin und Essigsäure zusammensetzt, liegt das Oligonukleotid-Thiophosphat mit NH_4^+ als Gegenion vor. Für eine spätere Anwendung in Zellkulturversuchen werden jedoch Oligonukleotid-Thiophosphate mit Na^+ als Gegenion benötigt. Dies macht einen Umsalzungsschritt am Ende der Aufreinigung notwendig welcher zu einer starken Verringerung der Ausbeute führt.
So kam in diesem optimierten Ansatz ein $NaHCO_3$ Puffer zum Einsatz, wodurch während der gesamten Synthese und Aufreinigung Na^+ als Gegenion vorlag.
Für die Umsetzung wurden 1µmol des Ausgangs-Oligonukleotid-Thiophosphats (H_2N-ONT1) in 1ml 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5 gelöst, auf 37°C temperiert und portionsweise über einen Zeitraum von 1 Stunde insgesamt 30µmol (30x Überschuss; 60mg) mPEG2000-NHS Ester zugegeben. Der Ansatz wurde daraufhin 16h lang bei 37°C inkubiert.
Um einen Überblick über den zeitlichen Verlauf des Umsatzes zu bekommen, wurde zu verschiedenen Zeiten ein 5nmol Aliquot entnommen und eine Reversed-Phase HPLC durchgeführt (Abb. 122).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Methode: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH7,5
- Puffer B: Acetonitril
- Auftragemenge: 5nmol

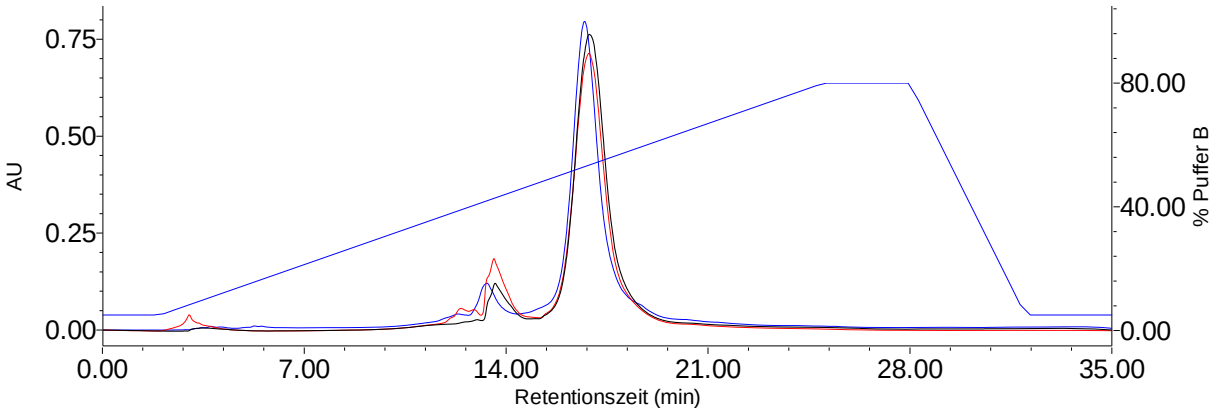


Abb. 122: RP-HPLC des zeitlichen Reaktionsverlaufes der Umsetzung (rot: direkt nach Ende der Zugabe von mPEG2000-NHS, blau: 2h nach Reaktionsstart, schwarz: 16h nach Reaktionsstart)

Das Ausgangs-Oligonukleotid-Thiophosphat (H_2N-ONT1) liefert in Abb. 122 einen Peak bei ca. 14min, während das umgesetzte Produkt (mPEG2000-ONT1) bei 17min eluiert. Dabei ist gut zu erkennen, dass bereits unmittelbar nach Ende der Zugabe des mPEG2000-NHS-Esters fast die gesamte Menge an Ausgangs-Oligonukleotid-Thiophosphat umgesetzt wurde.
Das zu Anfang unumgesetzte Oligonukleotid-Thiophosphat ist auch nach 16 Stunden immer noch in ähnlichem Umfang vorhanden, wobei die Flächen der Peaks von Produkt und Edukt in einem Verhältnis von 10:1 stehen.
Es ist daher anzunehmen, dass bereits nach spätestens 2 Stunden eine maximale Umsetzung stattgefunden hat und das immer noch vorhandene unumgesetzte Ausgangs-Oligonukleotid-Thiophosphat in einer nicht-reaktiven Form (z.B. ohne terminale Aminogruppe) vorliegt. Viel wichtiger als eine lange Reaktionsdauer ist die portionsweise Zugabe des schnell hydrolysierenden NHS-Esters.
Nach 16h wurde der Ansatz im Speedvac auf ca. 0,5ml eingeengt, in 2,5ml Wasser aufgenommen, und auf eine IE-FPLC Säule aufgetragen (Abb. 123). Im Gegensatz zum vorigen Ansatz wurde in diesem Fall anstelle des TEAA-Puffers ein $NaHCO_3$-Puffer verwendet, was bei einer NaCl-Konzentration von 2M im Puffer B allerdings nicht unbedingt notwendig ist.

- Säule: Toyopearl SuperQ-650M 150x16mm
- Puffer A: 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5
- Puffer B: 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5 + 2M NaCl
- Flow = 4ml/min (Kolbenpumpe P-500)
- Schreibergeschwindigkeit: 1mm/min
- Gradienten: 0%B, 20%B, 40%B, 60%B, 80%B, 100%B
- Auftragemenge: 1µmol
- Schreiberempfindlichkeit: 100mV

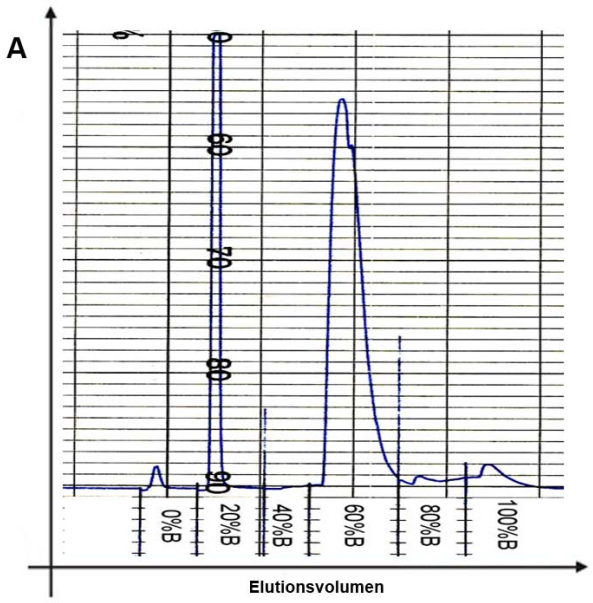


Abb. 123: IE-FPLC mit einer Auftragemenge von 1µmol

Auch bei Verwendung eines 0,01M $NaHCO_3$ Puffers eluiert das hydrolysierte NHS bei 20%B und das Produkt (mPEG2000-NH-ONT1) bei 60%B. Unumgesetztes Ausgangs-Oligonukleotid-Thiophosphat eluiert ebenfalls wie gewohnt bei 80% - 100%B.
Eine photometrische Vermessung des Eluats (35ml) ergab Stoffmenge von **0,66µmol**, was einer Zwischenausbeute von 66% entspricht.

Zur Verringerung der NaCl-Konzentration erfolgte eine Entsalzung mittels Ultrafiltration (s. Kap. 6.4.4.1) bei einem MWCO von 1kDa und einem Druck von 3,2bar Argon.
Das Volumen wurde jeweils auf 2,5ml eingeengt und auf mehrmals mit 10ml Wasser verdünnt. Der Durchlauf wurde zur Kontrolle im Photometer vermessen.

Verdünnung	Gehalt an NaCl	Produkt im Durchlauf
0	1,2M	nicht messbar
1	0,24M	nicht messbar
2	48mM	nicht messbar
3	9,6mM	nicht messbar
4	1,9mM	nicht messbar
5	0,4mM	nicht messbar
6	77µmol	nicht messbar

Nach der Ultrafiltration wurde der Rückstand in 5ml Wasser aufgenommen und photometrisch vermessen. Dabei ergab sich in diesem Schritt eine Stoffmenge von **0,65µmol** und somit eine Ausbeute von 98% bezüglich der Stoffmenge vor der Ultrafiltration.
Bezogen auf eine Ausgangsmenge von 1µmol Oligonukleotid-Thiophosphat, entspricht dies einer Gesamtausbeute von 65%.
Zur Endkontrolle der Reinheit wurden mit 5nmol des fertigen Produkts (mPEG2000-NH-ONT1) eine analytische IE-HPLC (Abb. 124) und eine RP- HPLC (Abb. 125) vorgenommen.

IE-HPLC:

- Säule: Toyopearl SuperQ-650S 250x4mm
- Methode: 0bis100Proz_1ml_50min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,01M TEAA pH7,5
- Puffer B: 0,01M TEAA pH7,5 + 4M NaCl
- Auftragemenge: 5nmol

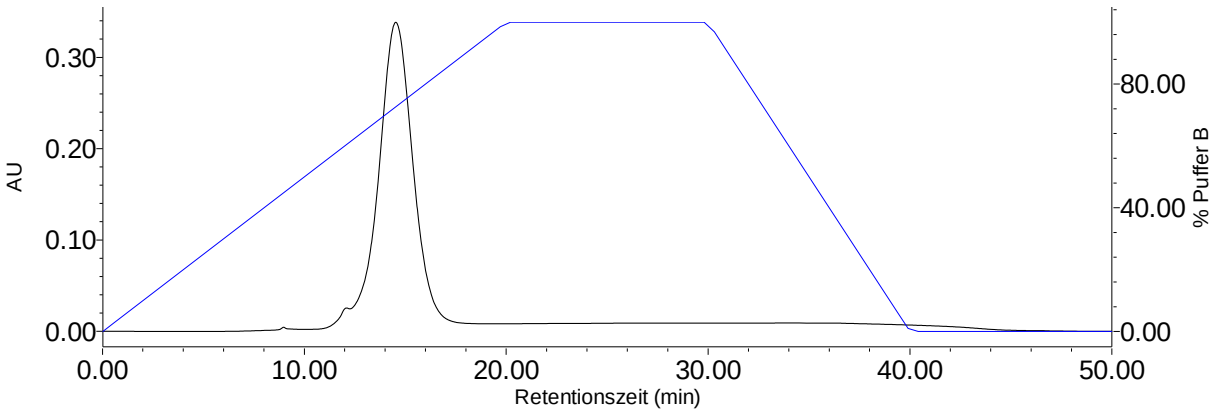


Abb. 124: IE-HPLC zur Reinheitskontrolle des Endprodukts

RP-HPLC:

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Methode: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH7,5
- Puffer B: Acetonitril
- Auftragemenge: 5nmol

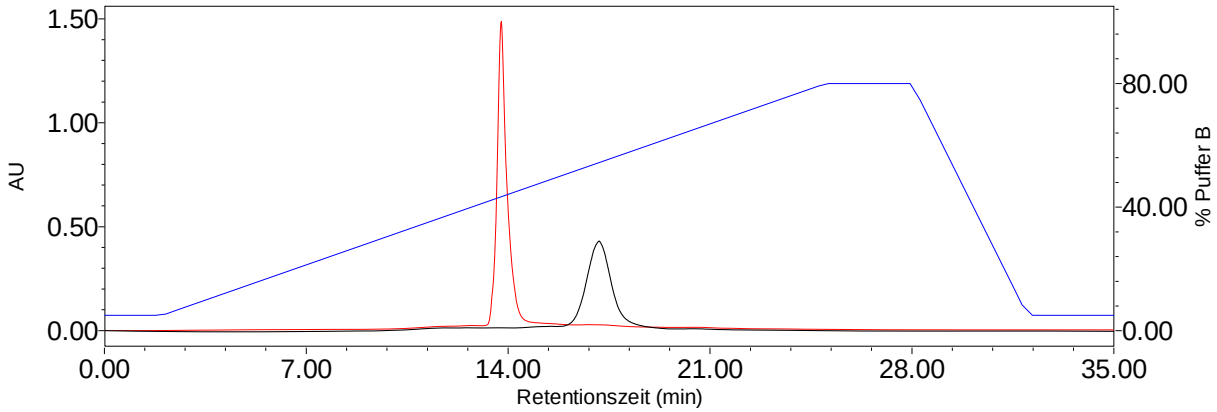


Abb. 125: RP-HPLC zur Reinheitskontrolle des Endprodukts
(rot: reines Ausgangsoligonukleotid; schwarz: Reaktionsansatz nach vollst. Umsetzung)

Sowohl bei der abschließenden analytischen IE-HPLC (Peak bei 14min in Abb. 124) als auch bei der RP-HPLC (Peak bei 17min in Abb. 125) ist nur noch ein Peak des fertigen Konjugats aus Oligonukleotid-Thiophosphat und mPEG2000 (mPEG2000-NH-ONT1) vorhanden. Es ist kein Peak des unumgesetzten Oligonukleotid-Thiophosphats mehr zu erkennen.
Die Ausbeute ist bei dieser modifizierten Variante der Aufreinigung mit 65% deutlich besser als beim ersten Ansatz (50%), bei dem am Ende eine Umsalzung vorgenommen wurde. Die modifizierte Variante der Aufreinigung hat sich demnach bewährt.

4.1.3.3. Charakterisierung durch MALDI-TOF MS

Betrachtet man die einzelnen Bausteine des Gesamtmoleküls, so ergibt sich eine theoretische Masse von ca. 7900Da mit einer polydispersen Verteilung von ± n•44Da.

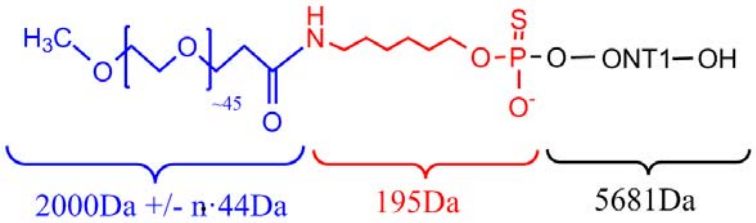


Abb. 126: Einzelne Bausteine des Gesamtmoleküls mit ihren jeweiligen Massen

Zur Bestätigung der Identität wurde das Endprodukt mittels MALDI-TOF MS vermessen (s. Kapitel 6.6), wobei sich unter Berücksichtigung der Polydispersität so gut wie kein Unterschied zur theoretischen Molekülmasse ergab (Abb. 127 und Abb. 128). Selbst die polydisperse Verteilung mit ± n•44Da (Ethylenglykoleinheiten) ist deutlich zu erkennen.

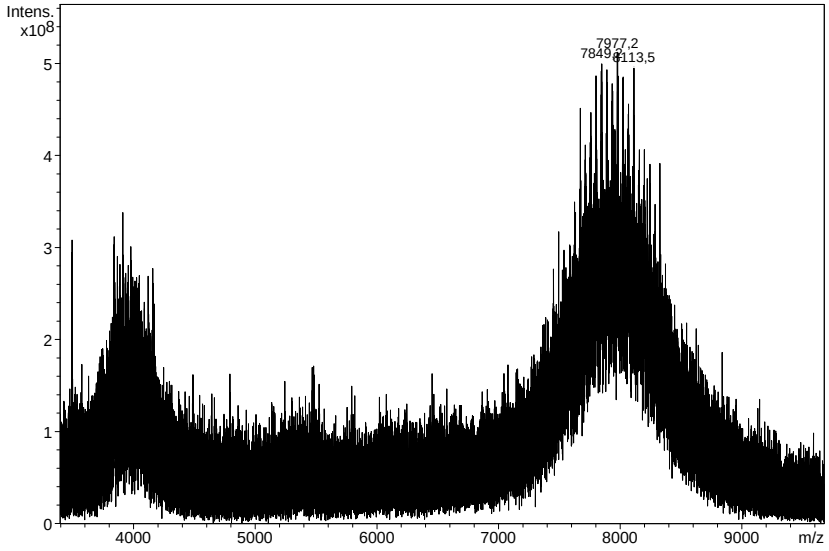


Abb. 127: MALDI-TOF MS von mPEG2000-NH-ONT1 mit polydispersen Peaks um 7900Da

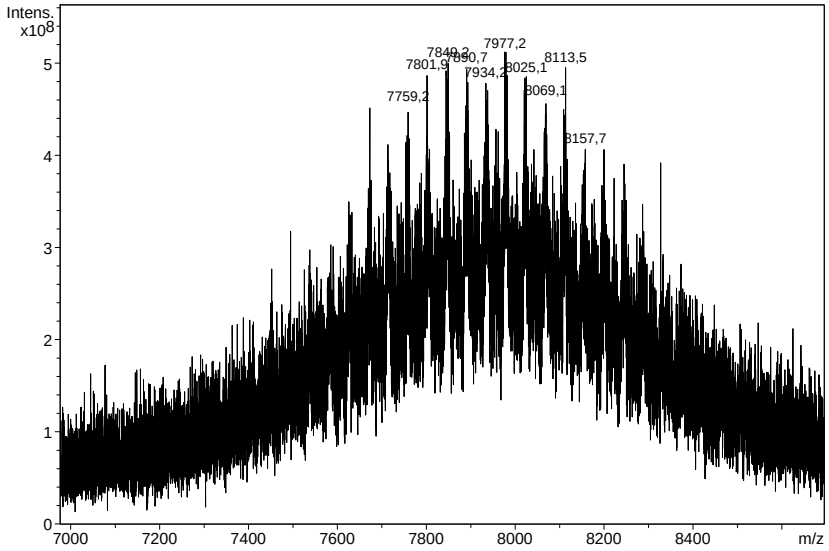


Abb. 128: Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 127 zeigt die polydisperse Verteilung mit ± n•44Da (Ethylenglykoleinheiten)

4.1.4. Derivatisierung mit Polyethylenglykolen anderer Längen

Basierend auf den in Kapitel 4.1.3 gesammelten Erfahrungen sollen nun weitere einseitige bzw. zweiseitig symmetrische Derivatisierungen von Oligonukleotid-Thiophosphaten der Sequenz ONT1 mit Polyethylenglykolen anderer Kettenlängen erfolgen.
Um eine möglichst große Bandbreite der verschiedenen Längen abzudecken, sind die folgenden Produkte vorgesehen:

	5´-Derivatisierung	**5´- und 3´-Derivatisierung**	**3´-Derivatisierung**
mPEG400	mPEG400-ONT1	mPEG400-ONT1-mPEG400	ONT1-mPEG400
mPEG1000	mPEG1000-ONT1	mPEG1000-ONT1-mPEG1000	ONT1-mPEG1000
mPEG2000	mPEG2000-ONT1	mPEG2000-ONT1-mPEG2000	ONT1-mPEG2000

Dazu wurden zunächst drei auf verschiedene Weise funktionalisierte Oligonukleotid-Thiophosphate der Sequenz ONT1 auf einem Expedite 8909 DNA/RNA-Synthesizer jeweils

im 2µmol-Maßstab nach einem modifizierten Kopplungsprotokoll mit doppelten Kopplungszyklen synthetisiert.

- H_2N-ONT1 für spätere 5´-Modifikatinen
- ONT1-NH_2 für spätere 3´-Modifikatinen
- H_2N-ONT1-NH_2 für spätere 5´- und 3´-Modifikationen

Die Synthese von H_2N-ONT1 erfolgte auf Thymidin-CPG Support, die Synthesen von ONT1-NH_2 und H_2N-ONT1-NH_2 auf Amino-ON CPG Support (Abb. 157). Im Falle von H_2N-ONT1 und H_2N-ONT1-NH_2 erfolgte im letzten Schritt die Kopplung des 5´-Aminomidifiers ebenfalls mit einem doppelten Kopplungszyklus. Die Abspaltung vom Träger und die Aufreinigung der Oligonukleotid-Thiophosphate erfolgten wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben.
Für die Umsetzungen mit den verschiedenen mPEG-NHS Estern wurden jeweils 500nmol der aminofunktionalisierten Oligonukleotid-Thiophosphate in 500µl 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5 gelöst.
Die Umsetzung mit den beiden einfach aminofunktionalisierten Oligonukleotid-Thiophosphaten erfolgte durch portionsweise Zugabe eines 15fachen molaren Überschusses (7,5µmol) des jeweiligen mPEG-NHS Esters bei 37°C.
Im Falle des zweifach aminofunktionalisierten Oligonukleotid-Thiophosphats wurde portionsweise ein 30facher Überschuss (15µmol) eingesetzt. Das mPEG2000-NHS wurde direkt als Feststoff eingewogen, während mPEG400-NHS und mPEG1000-NHS in Form einer 250mM Lösung in Acetonitril verwendet wurden.

$M_{mPEG2000\text{-}NHS}$ = ca. 2000Da → 7,5µmol = 15mg; 15µmol = 30mg

$c_{mPEG400\text{-}NHS/mPEG1000\text{-}NHS}$ = 250mM → 7,5µmol = 30µl; 15µmol = 60µl

Zur Reaktionskontrolle wurde nach 1h mit jeweils 1nmol der einzelnen Ansätze (1µl) eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 129 bis Abb. 131).

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Methode: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH7,5
- Puffer B: Acetonitril
- Auftragemenge: 1nmol

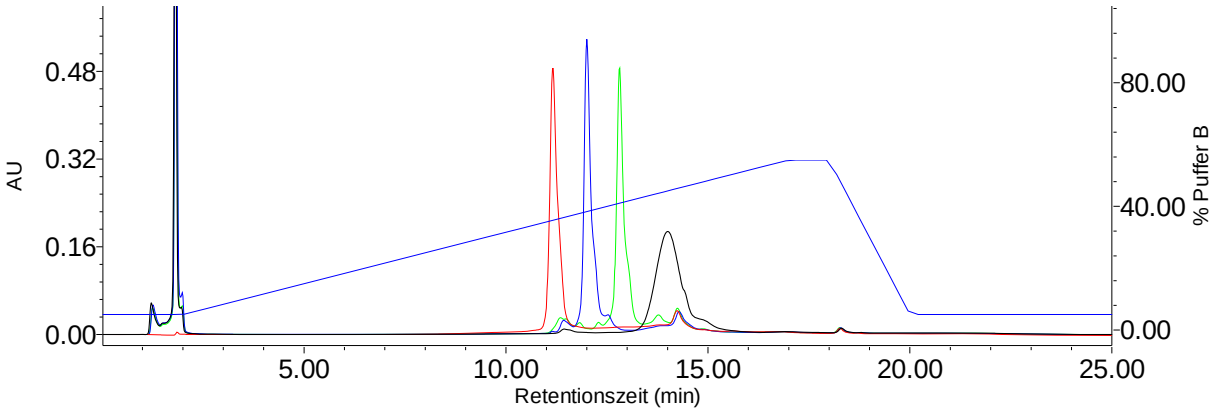


Abb. 129: RP-HPLC der Reaktionsansätze von H_2N-ONT1 (rot) mit mPEG400-NHS (blau), mPEG1000-NHS (grün) und mPEG2000-NHS (schwarz)

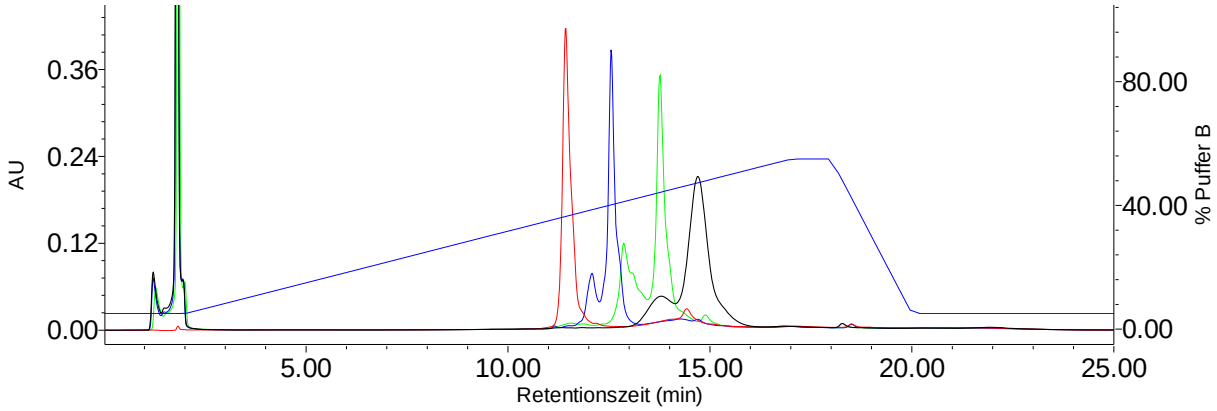


Abb. 130: RP-HPLC der Reaktionsansätze von H_2N-ONT1-NH_2 (rot)
mit mPEG400-NHS (blau), mPEG1000-NHS (grün) und mPEG2000-NHS (schwarz)

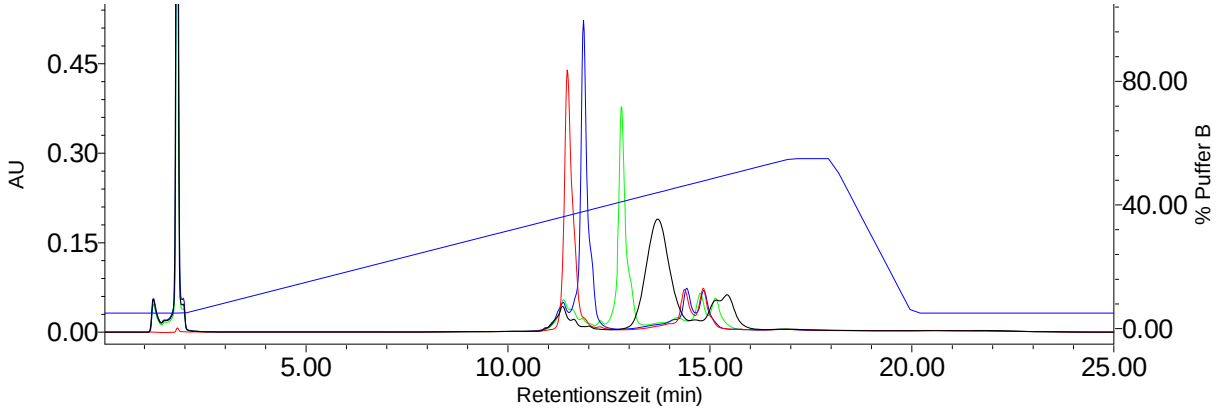


Abb. 131: RP-HPLC der Reaktionsansätze von ONT1-NH_2 (rot)
mit mPEG400-NHS (blau), mPEG1000-NHS (grün) und mPEG2000-NHS (schwarz)

In den Chromatogrammen aller Reaktionsansätze (Abb. 129 bis Abb. 131) sind deutlich einige zusätzliche Peaks bei 14-16min zu erkennen, welche noch von der Oligonukleotidsynthese stammen und auf einer unvollständigen Abtrennung der abgespaltenen MMT- bzw. DMT-Schutzgruppen nach der Essigsäureabspaltung (s. Kap. 6.2) beruhen. Diese stören den weiteren Reaktionsablauf jedoch nicht und werden im Laufe der späteren Aufreinigung durch IE-FPLC und Ultrafiltration abgetrennt.
Bei den Reaktionsansätzen der beidseitig aminofunktionalisierten Sequenzen (Abb. 130) zeigen die Peaks der Zielprodukte einen deutlichen Doppelpeakcharakter. Dies ist, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, auf fehlende bzw. inaktive trägergenerierte 3´-Aminogruppen zurückzuführen. Bezüglich des 5´-Endes ist jedoch eine quantitative Umsetzung zu beobachten
Die weitere Aufreinigung zur Abtrennung des überschüssigen hydrolysierten PEG´s, des hydrolysierten NHS sowie der unumgesetzten Sequenzen erfolgte im Falle der mPEG1000 und mPEG2000 derivatisierten Produkte mittels IE-FPLC (Abb. 132). Das hydrolysierte PEG sowie das hydrolysierte NHS eluieren bereits bei 20%B. Die PEG-derivatisierten Sequenzen wurden mit 50%B eluiert, wobei im Falle der beidseitigen Derivatisierung, aufgrund der fehlenden Trennschärfe von 5´-einseitig und beidseitig derivatisierten Produkten, nur der vordere Peakteil aufgefangen wurde (Substanzen mit kleineren PEG-Derivatisierungen eluieren später als Substanzen mit großen PEG-Derivatisierungen).
Das eventuell noch vorhandene Restoligo, sowie im Falle der beidseitigen Derivatisierung noch vorhandene 5´-einfach derivatisierte Sequenzen wurden schließlich mit 100%B eluiert.

- Säule: Toyopearl SuperQ-650M 30ml
- Puffer A: 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5
- Puffer B: 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5 + 2M NaCl
- Flow = 5ml/min (Kolbenpumpe P-500)
- Schreibergeschwindigkeit: 1mm/min
- Gradienten:
  0%B, 20%B, 50%B, 100%B
- Auftragemenge: 500nmol
- Schreiberempfindlichkeit: 50mV

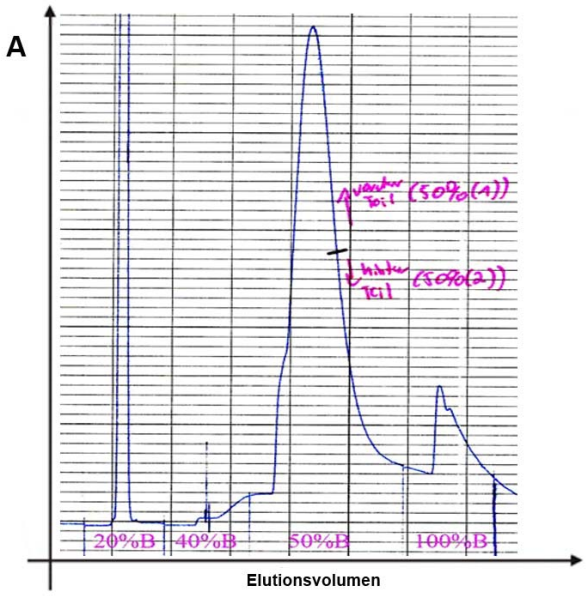


Abb. 132: IE-FPLC zur Abtrennung der hydrolysierten Edukte sowie der unumgesetzten Sequenzen (am Beispiel von mPEG1000-ONT1-mPEG1000)

Im Falle der mPEG400 derivatisierten Sequenzen ist der Affinitätsunterschied zwischen den zweifach-, einfach- und nicht-derivatisierten Sequenzen zum IE-Säulenmaterial zu gering, so dass auf diesem Wege keine Auftrennung möglich ist.
Daher muß die Abtrennung der nicht-derivatisierten bzw. nur 5´-einfach derivatisierten Sequenzen über eine preparative RP-HPLC erfolgen (Abb. 133), wobei das hydrolysierte PEG aufgrund der ähnlichen Retentionszeit jedoch nicht vollständig abgetrennt wird.

- Säule: Phenomenex PolymerX RP1 100Å 10x250mm
- Methode: 5bis80Proz_6ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH7,5
- Puffer B: Acetonitril
- Auftragemenge: 500nmol

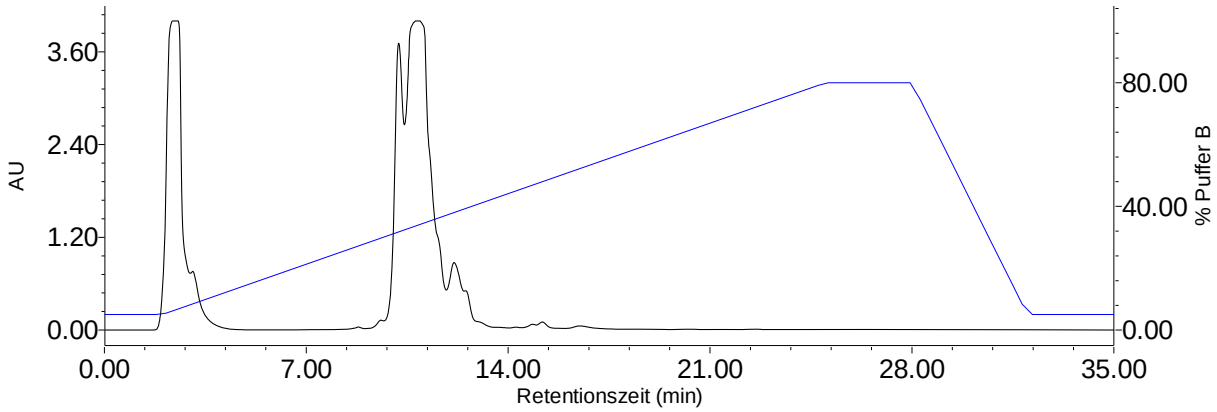


Abb. 133: prep RP-HPLC zur Abtrennung der nicht derivatisierten bzw. 5´-einfach derivatisierten Sequenzen (am Beispiel von mPEG400-ONT1-mPEG400, vorderer Peak bei 10min entspricht dem nur einfach am 5´-Ende derivatisierten Nebenprodukt)

Die Abtrennung des immer noch vorhandenen hydrolysierten mPEG400 Überschusses erfolgte über IE-FPLC (Abb. 134) wobei das nicht detektierbare hydrolysierte mPEG400 bereits bei 0% B eluiert. Da aufgrund der zuvor erfolgten RP-HPLC kein Restoligo mehr

vorhanden ist, wurde das Zielprodukt nach einem weiteren Waschschritt (40% B) mit 100% B eluiert.

- Säule: Toyopearl SuperQ-650M 30ml
- Puffer A: 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5
- Puffer B: 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5 + 2M NaCl
- Flow = 5ml/min (Kolbenpumpe P-500)
- Schreibergeschwindigkeit: 1mm/min
- Gradienten:
  0%B, 40%B, 100%B
- Auftragemenge: 500nmol
- Schreiberempfindlichkeit: 50mV

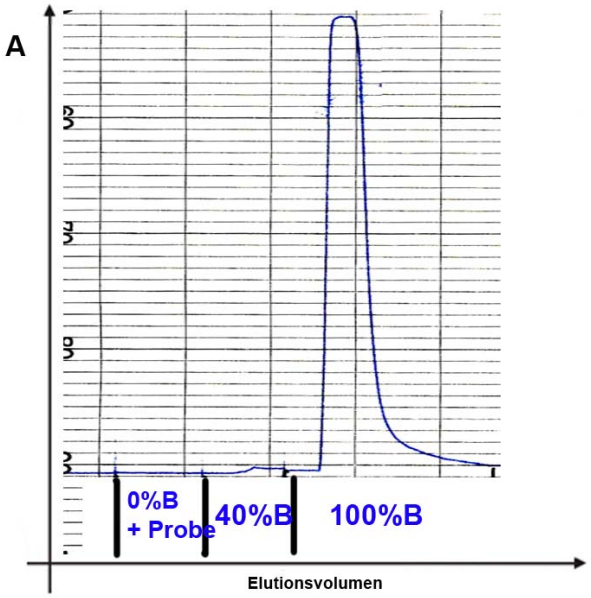


Abb. 134: IE-FPLC zur Abtrennung des hydrolysierten mPEG400 (am Beispiel von mPEG400-ONT1-mPEG400)

Da nach der IE-FPLC sämtliche Produkte in ca. 30ml einer hochkonzentrierten NaCl-Lösung vorlagen, wurden die Eluate durch Ultrafiltration eingeengt und entsalzt (s. Kap. 6.4.4.1).

Eine photometrische Quantifizierung ergab folgende Ausbeuten:

Endprodukt (mit mPEG derivatisiertes ONT1)	Stoffmenge an Ausgangsoligo (aminofunktionalisiertes ONT1)	Stoffmenge an Endprodukt (mit mPEG derivatisiertes ONT1)	Prozentuale Ausbeute bezüglich der Stoffmenge an Ausgangsoligo
mPEG400-ONT1	500nmol	305nmol	61%
mPEG1000-ONT1	500nmol	345nmol	69%
mPEG2000-ONT1	500nmol	330nmol	66%
mPEG400-ONT1-mPEG400	500nmol	215nmol	43%
mPEG1000-ONT1-mPEG1000	500nmol	235nmol	47%
mPEG2000-ONT1-mPEG2000	500nmol	225nmol	45%
ONT1-mPEG400	500nmol	240nmol	48%
ONT1-mPEG1000	500nmol	275nmol	55%
ONT1-mPEG2000	500nmol	255nmol	51%

Zur abschließenden Reinheitskontrolle wurde mit jeweils 1nmol der Endprodukte eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 135 bis Abb. 137).

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Methode: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH7,5
- Puffer B: Acetonitril
- Auftragemenge: 1nmol

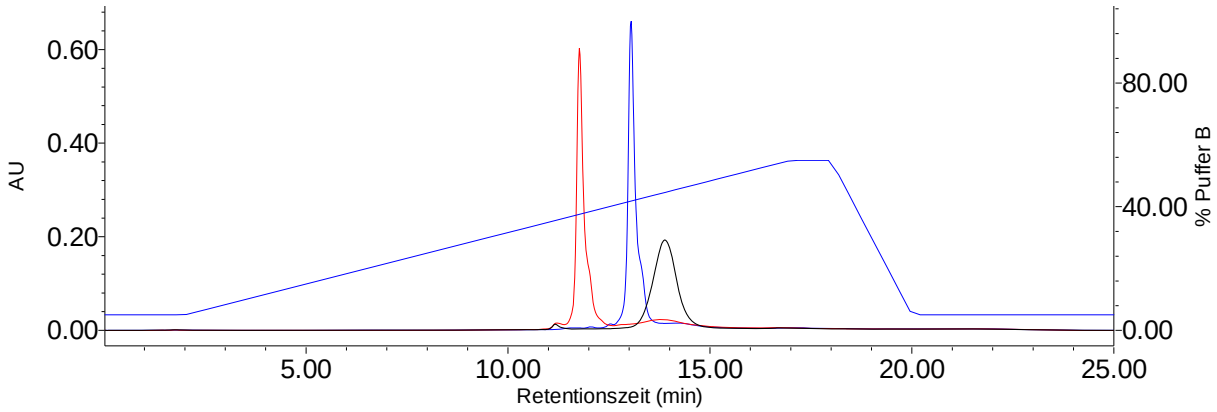


Abb. 135: RP-HPLC der 5´-derivatisierten Endprodukte
mPEG400-ONT1 (rot), mPEG1000-ONT1 (blau), mPEG2000-ONT1 (schwarz)

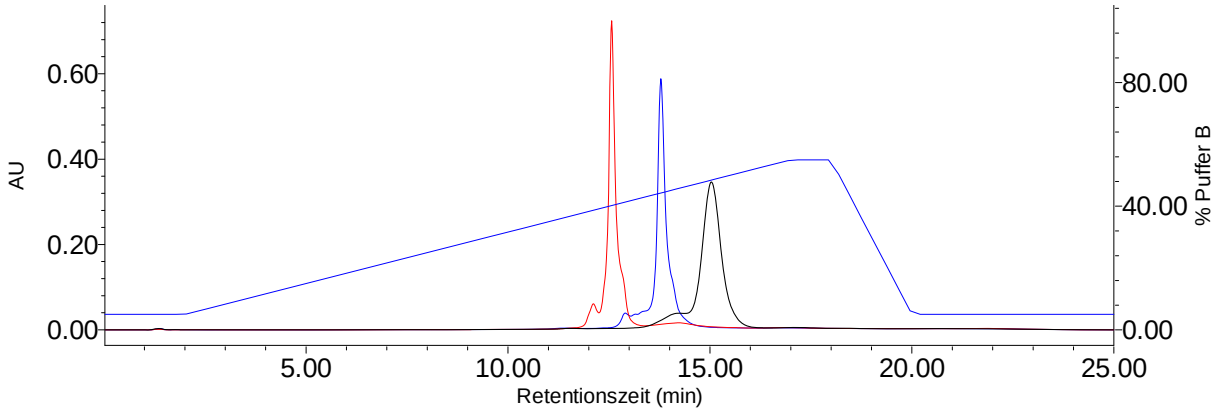


Abb. 136: RP-HPLC der beidseitig derivatisierten Endprodukte
mPEG400-ONT1-mPEG400 (rot), mPEG1000-ONT1-mPEG1000 (blau),
mPEG2000-ONT1-mPEG2000 (schwarz)

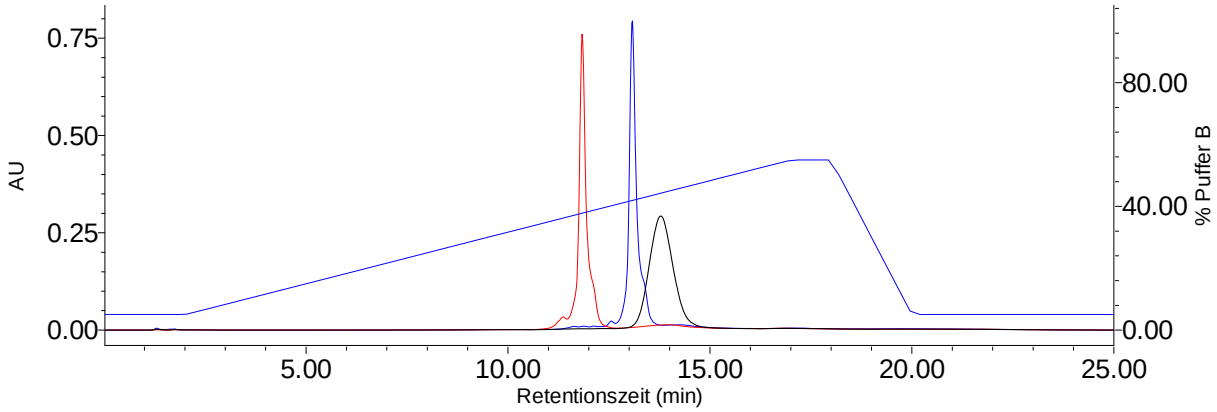


Abb. 137: RP-HPLC der 3´-derivatisierten Endprodukte
ONT1-mPEG400 (rot), ONT1-mPEG1000 (blau), ONT1-mPEG2000 (schwarz)

Zur Identitätsbestimmung wurden die aufgereinigten, derivatisierten Endprodukte mittels MALDI-TOF MS vermessen, wobei sich folgende theoretische und gemessene Molekulargewichte ergaben:

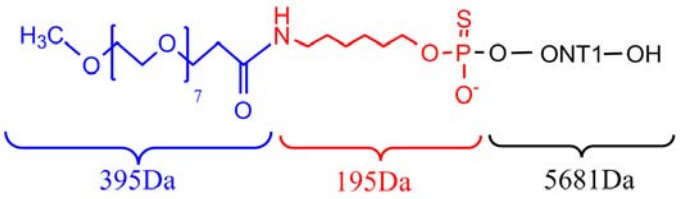


Abb. 138: die theoretische Molekülmasse von mPEG400-ONT1 beträgt 6271Da

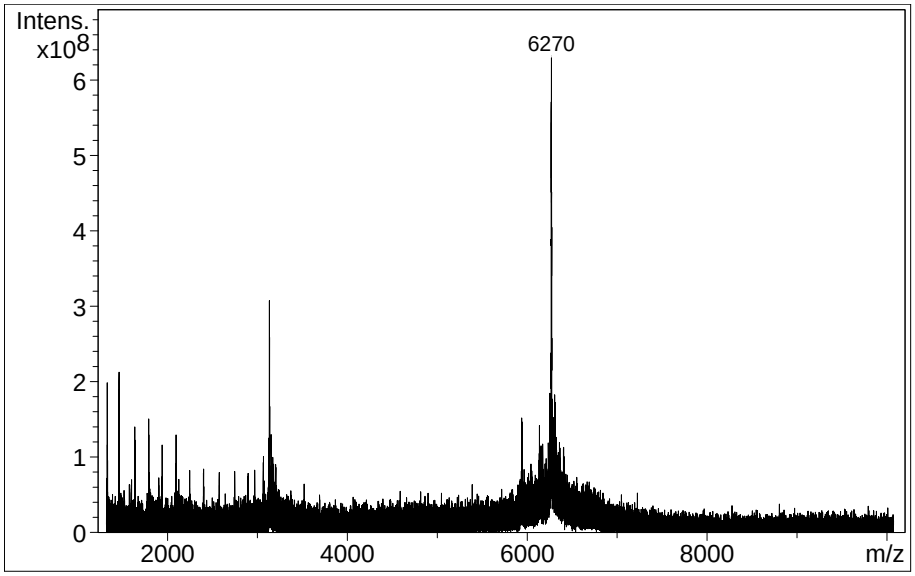


Abb. 139: MALDI-TOF MS von mPEG400-ONT1 mit einem Peak bei 6270Da (Δm = 1Da)

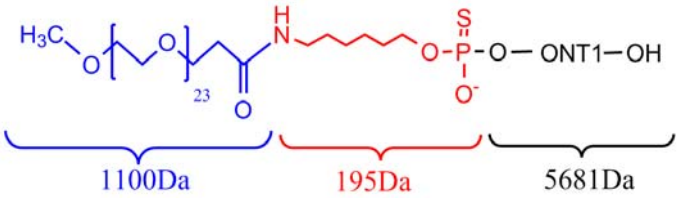


Abb. 140: die theoretische Molekülmasse von mPEG1000-ONT1 beträgt 6976Da

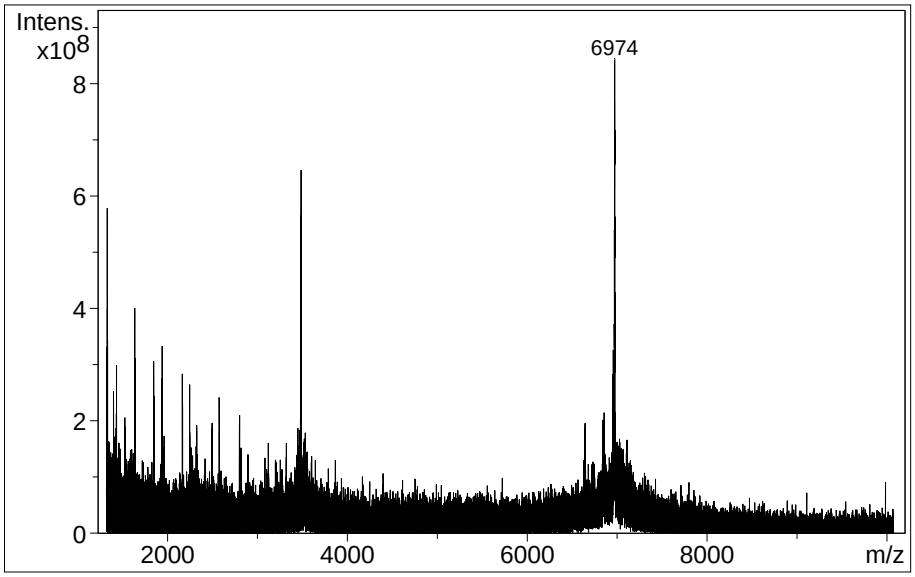


Abb. 141: MALDI-TOF MS von mPEG1000-ONT1 mit einem Peak bei 6974Da (Δm = 2Da)

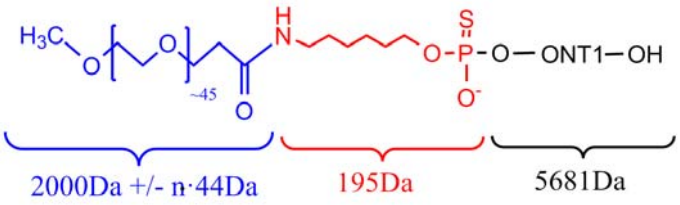


Abb. 142: die theoretische Molekülmasse von mPEG2000-ONT1 beträgt 7900Da ± n•44Da

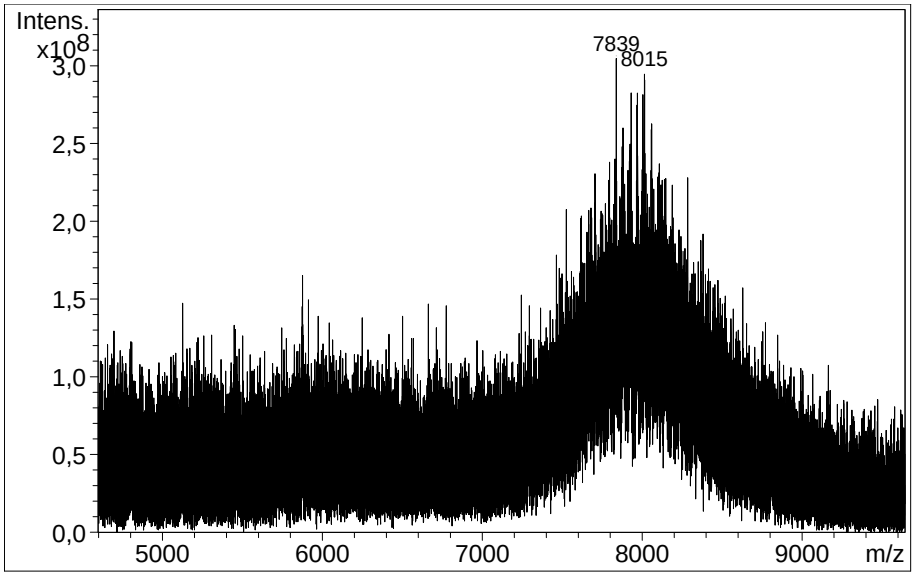


Abb. 143: MALDI-TOF MS von mPEG2000-ONT1 mit einem polydispersen Peak um 7900Da

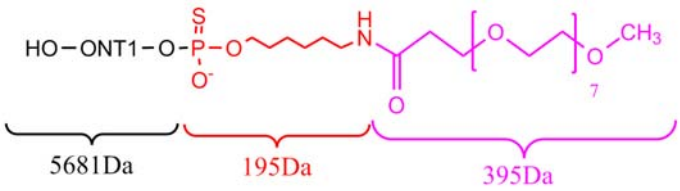


Abb. 144: die theoretische Molekülmasse von ONT1-mPEG400 beträgt 6271Da

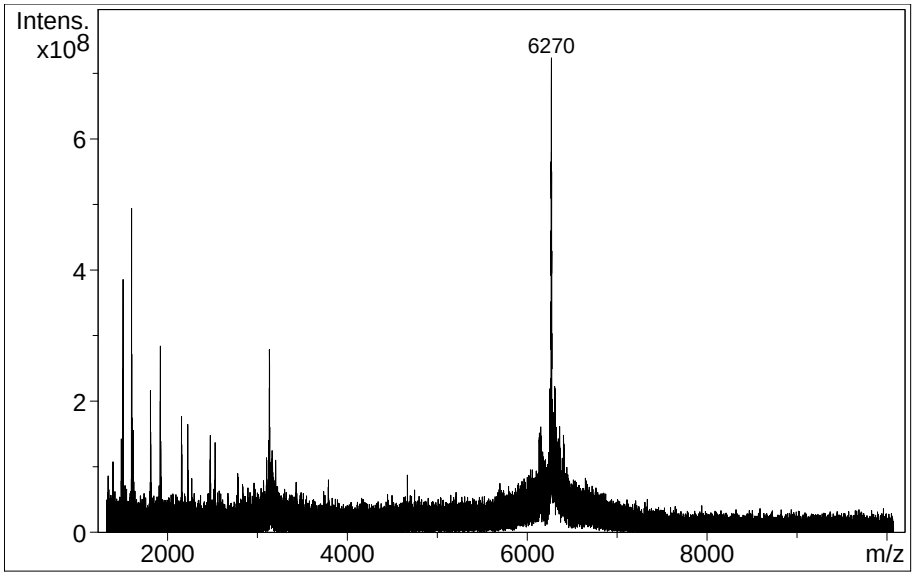


Abb. 145: MALDI-TOF MS von ONT1-mPEG400 mit einem Peak bei 6270Da (Δm = 1Da)

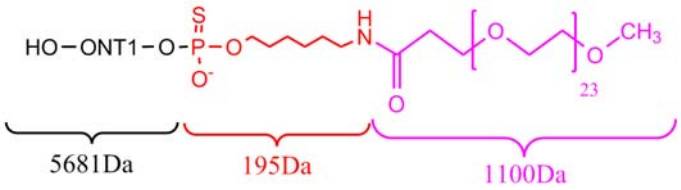


Abb. 146: die theoretische Molekülmasse von ONT1-mPEG1000 beträgt 6976Da

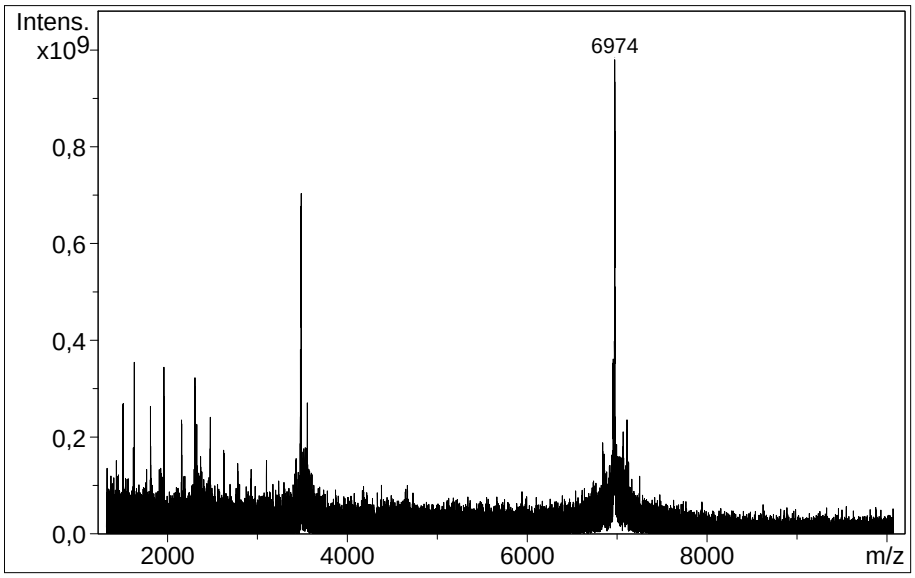


Abb. 147: MALDI-TOF MS von ONT1-mPEG1000 mit einem Peak bei 6974Da (Δm = 2Da)

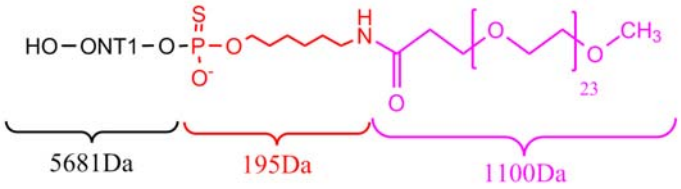


Abb. 148: die theoretische Molekülmasse von ONT1-mPEG2000 beträgt ca. 7900Da ± n•44Da

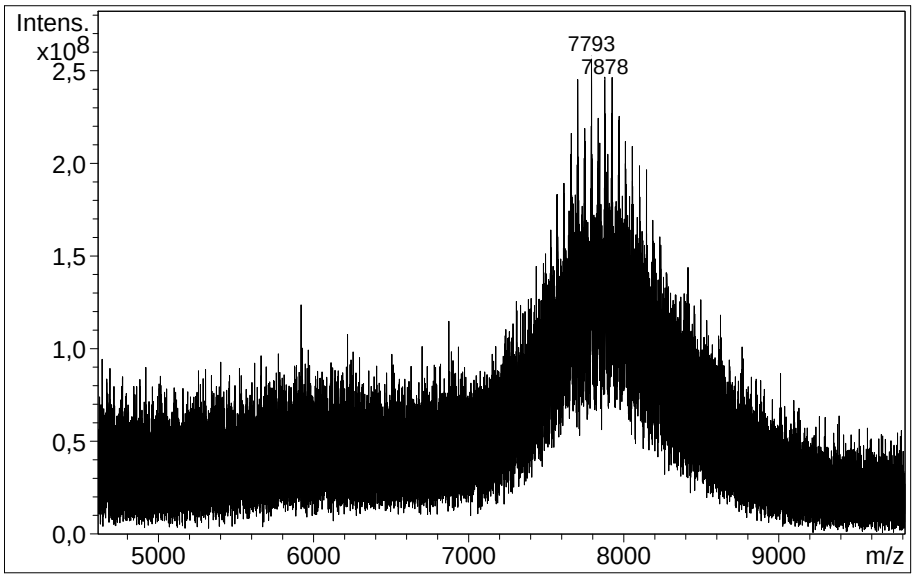


Abb. 149: MALDI-TOF MS von ONT1-mPEG2000 mit einem polydispersen Peak um 7900Da

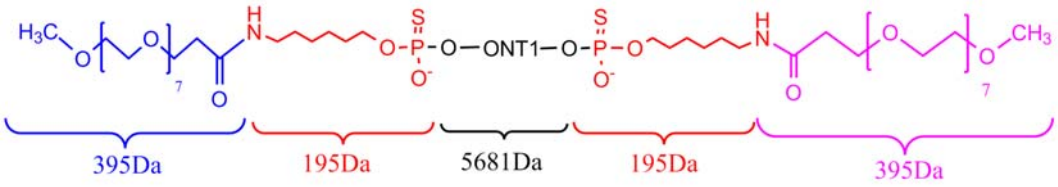


Abb. 150: die theoretische Molekülmasse von mPEG400-ONT1-mPEG400 beträgt 6861Da

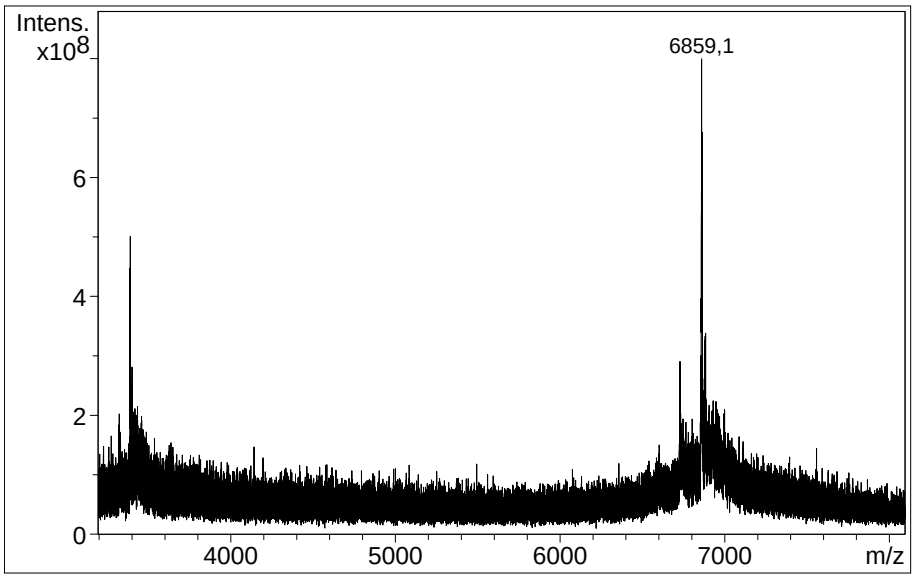


Abb. 151: MALDI-TOF MS von mPEG400-ONT1-mPEG400 mit einem Peak bei 6859Da (→ Δm = 2Da)



Abb. 152: die theoretische Molekülmasse von mPEG1000-ONT1-mPEG1000 beträgt 8271Da

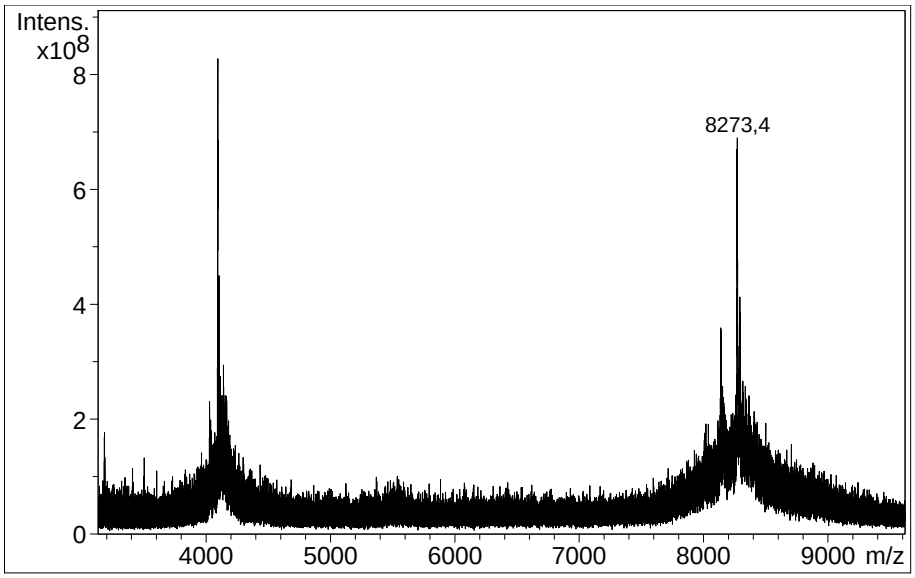


Abb. 153: MALDI-TOF MS von mPEG1000-ONT1-mPEG1000 mit einem Peak bei 8273Da (→ Δm = 2Da)



Abb. 154: die theoretische Molekülmasse von mPEG2000-ONT1-mPEG2000 beträgt ca. 10100Da ± n•44Da

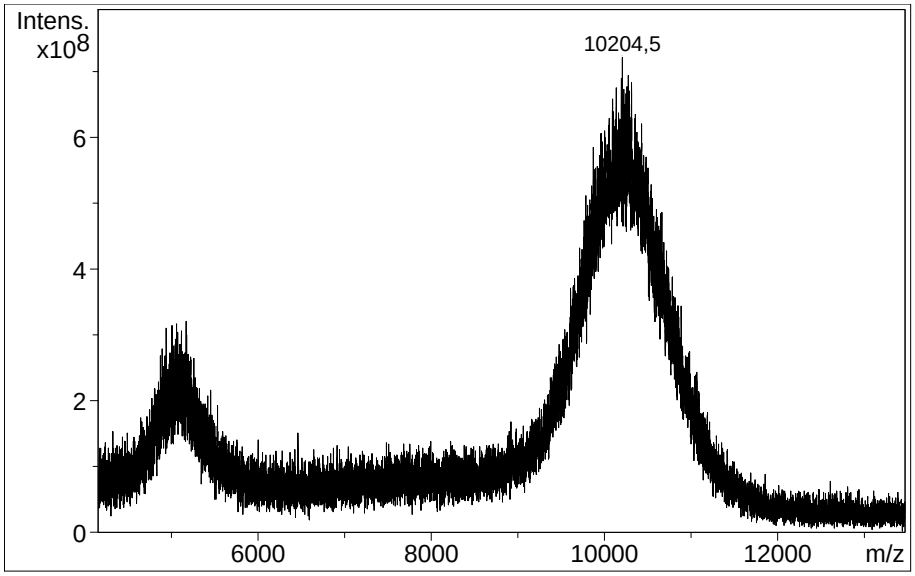


Abb. 155: MALDI-TOF MS von mPEG2000-ONT1-mPEG2000 mit einem polydispersen Peak um 10200Da

Sämtliche ermittelte Molekülmassen der Produkte der einseitigen und beidseitig symmetrischen Derivatisierung mit Polyethylenglykol zeigen somit eine hervorragende Übereinstimmung mit den theoretischen Werten.

4.2. Beidseitige asymmetrische Derivatisierung mit Polyethylenglykol

Im Gegensatz zu den in Kapitel 4.1 beschriebenen symmetrischen Derivatisierungen mit zwei identischen Polyethylenglykolen am 5´- und am 3´-Ende, trägt ein asymmetrisch derivatisiertes Oligonukleotid zwei verschiedene PEG-Derivatisierungen an seinen beiden Enden (Abb. 1).
Eine Möglichkeit zur Herstellung solch asymmetrisch derivatisierter Oligonukleotide ist die Verwendung eines Ausgangs-Oligonukleotids, welches mit verschiedenen reaktiven Gruppen (z.B. Maleimid-Linker und Amino-Linker) an seinen beiden Enden funktionalisiert ist. Die spätere PEG-Derivatisierung erfolgt dann nacheinander mit den jeweils entsprechend funktionalisierten PEG-Derivaten im jeweiligen Puffersystem (Abb. 156).

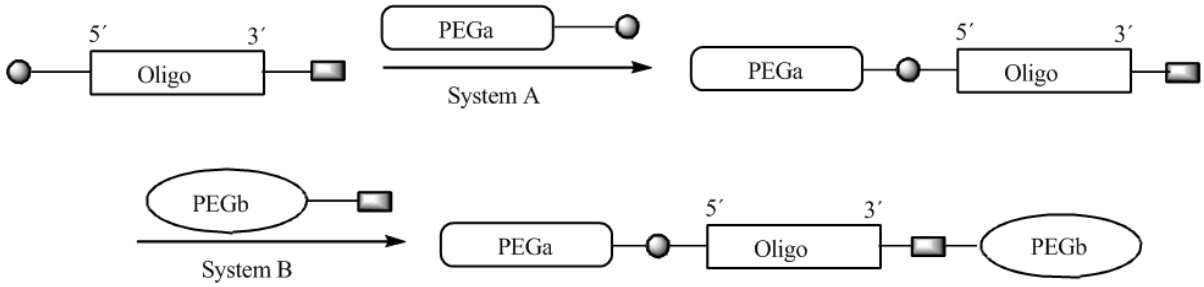


Abb. 156: Prinzip der asymmetrischen Derivatisierung mittels orthogonaler reaktiver Gruppen

Bei dieser Vorgehensweise ist jedoch die Orthogonalität der beiden verwendeten reaktiven Gruppen extrem wichtig. Sind die Einzelreaktionen mit den unterschiedlich funktionalisierten Polyethylenglykolen nicht absolut spezifisch, so kommt es zu Kreuzreaktionen unter Ausbildung undefinierter Produktgemische.
Eine andere Möglichkeit zur asymmetrischen Derivatisierung besteht darin, zwei identische reaktive Gruppen an beiden Enden des Oligonukleotids zu verwenden, von denen eine jedoch temporär geschützt ist. Dies kann durch eine Schutzgruppe (Kapitel 4.2.2) oder durch Verankerung auf einem Trägermaterial (Kapitel 4.2.3) erfolgen.
Im Rahmen dieser Arbeit soll eine universelle Methode etabliert werden, diese asymmetrischen PEG-Derivatisierungen unter Knüpfung einer für den Organismus unkritischen Bindung einzuführen. Wie schon in Kapitel 4.1 beschrieben, ist die beste Möglichkeit hierzu die Knüpfung einer Amidbindung unter Verwendung aminofunktionalisierter Oligonukleotide und PEG-NHS Ester.
Das primäre Ziel ist hierbei die asymmetrische Derivatisierung eines Oligonukleotid-Thiophosphats mit einem kurzkettigen Polyethylenglykol (mPEG400) und einem Polyethylenglykol mittlerer Kettenlänge (mPEG2000).

4.2.1. Vergleich kommerzieller Amino-Träger

Für eine beidseitige Derivatisierung eines Oligonukleotids mittels eines PEG-NHS Esters ist es notwendig, dass das Ausgangs-Oligonukleotid an beiden Enden möglichst vollständig aminofunktionalisiert ist. Während die 5´-Aminofunktionalisierung durch ein Aminolinker-Phosphorigsäureesteramid bereitgestellt wird, wird die 3´-Aminofunktion durch den bei der Synthese verwendeten Amino-Support generiert. Nach der Abspaltung vom Support und während der Abspaltung der Seitenkettenschutzgrupen mittels konz. Ammoniak liegt die 3´-Aminogruppe in ungeschützter Form vor und kann durch das bei der β–Eliminierung der Cyanoethylschutzgruppen entstehende Acrylnitril (Abb. 27) alkyliert werden[132), (133)]. Daher sollen verschiedene Amino-CPG Supports (Abb. 157 bis Abb. 159) untersucht werden, um das Trägermaterial zu ermitteln, welches die meisten funktionellen Aminogruppen am 3´-Ende bereitstellt.
Zu diesem Zweck wurden drei Synthesen der Sequenz ONT1 ohne 5´-Funktionalisierung mit einem modifiziertem Kopplungsprotokoll (s. Kap. 6.2.1) auf drei verschiedenen Amino-Trägermaterialien im 1µmol-Maßstab durchgeführt. Die DMT-Schutzgruppe verblieb zur weiteren Aufreinigung am 5´-Ende des Oligonukleotid-Thiophosphats (DMT-on).
Dabei kamen folgende Trägermaterialien zum Einsatz:

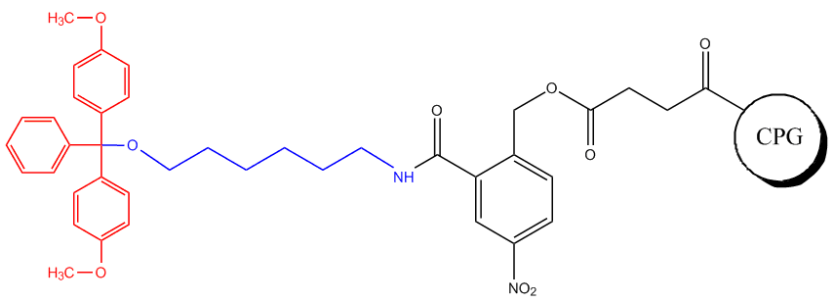


Abb. 157: Amino-On CPG von Proligo (a)

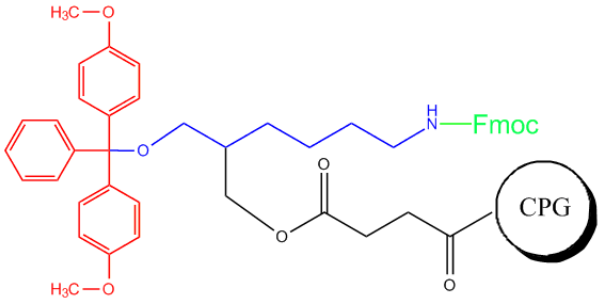


Abb. 158: 3´-Aminomodifier C7 CPG von Glen Research (b)

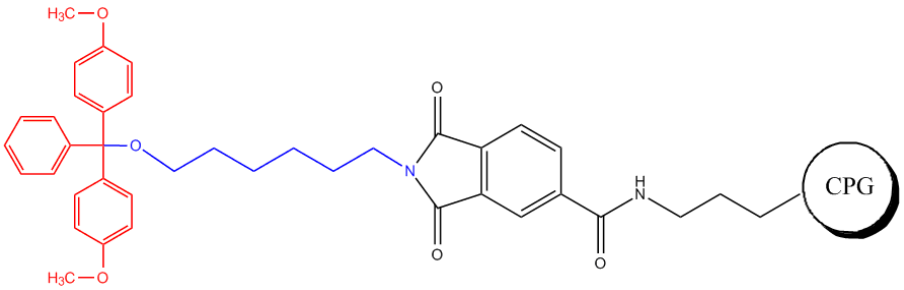


Abb. 159: 3´-PT Aminomodifier C6 CPG von Glen Research (c)

Nach der Synthese wurden die Oligonukleotid-Thiophosphate mit 700µl konz. Ammoniak bei 40°C (b) und (c) bzw. 55°C (a) 12 Stunden lang vom Träger abgespalten und über eine preparative RP-HPLC (Abb. 160) die vollständigen Sequenzen von den verkürzten Sequenzen abgetrennt.

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

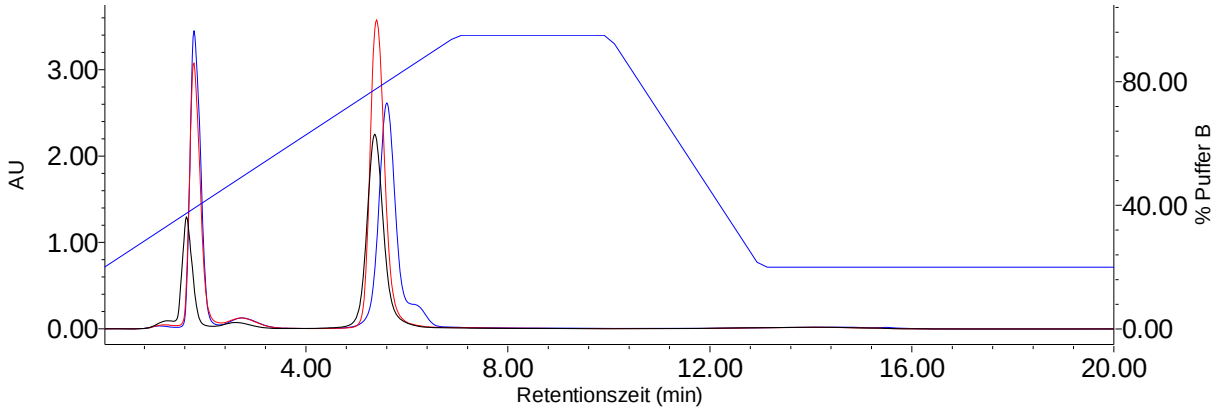


Abb. 160: RP-HPLC der vom Träger abgespaltenen Sequenzen (a: rot, b: blau, c: schwarz)

Das Peakflächenverhältnis der DMT-on Sequenzen (5-6min) zu den verkürzten Sequenzen (< 2min) beträgt in Abb. 160 bei allen drei Ansätzen ca. 3:1, was prinzipiell auf eine gute Synthesequalität bei allen getesteten Trägermaterialien schließen lässt.
Nach Trocknung und Detritylierung mit jeweils 200µl 80%iger Essigsäure wurden die Ansätze über eine NAP-Säule aufgereinigt (s. Kapitel 6.4.4.3) und quantifiziert (s. Kapitel 6.5).

Dabei ergaben sich folgende Ausbeuten:

a) 143nmol (aus 1µmol Amino-On CPG → 14% der Theorie)
b) 122nmol (aus 1µmol 3´-Aminomodifier C7 CPG → 12% der Theorie)
c) 129nmol (aus 1µmol 3´-PT Aminomodifier C6 CPG → 13% der Theorie)

Jeweils 5nmol der abgespaltenen, detritylierten Sequenzen wurden für eine analytische RP-HPLC auf einer Säule mit hoher Auflösung verwendet (Abb. 161 bis Abb. 163).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

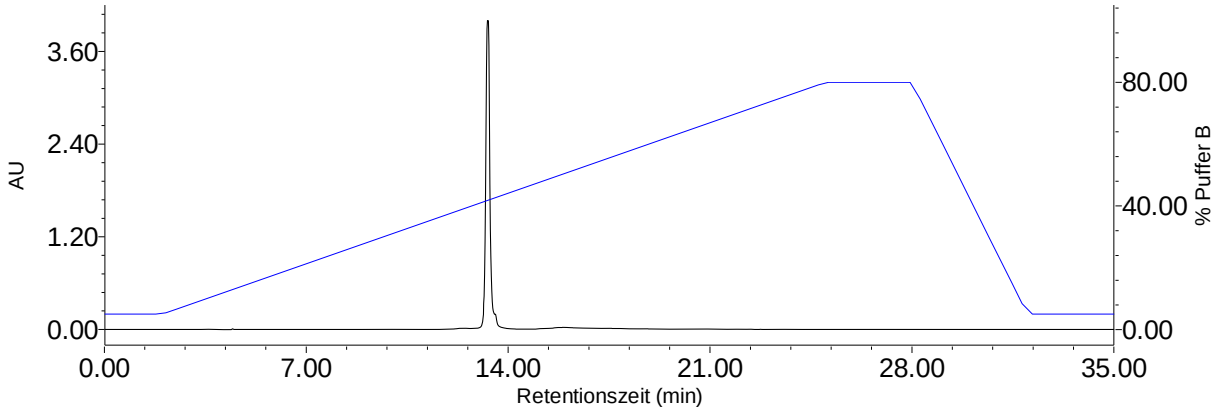


Abb. 161: RP-HPLC der abgespaltenen Sequenzen, synthetisiert auf Amino-On CPG

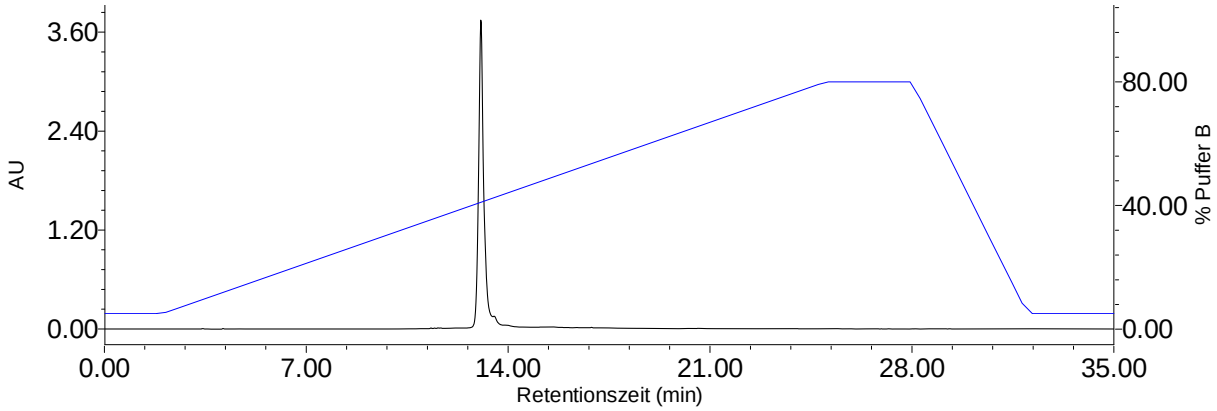


Abb. 162: RP-HPLC der abgespaltenen Sequenzen, synthetisiert auf 3´-Aminomodifier C7 CPG

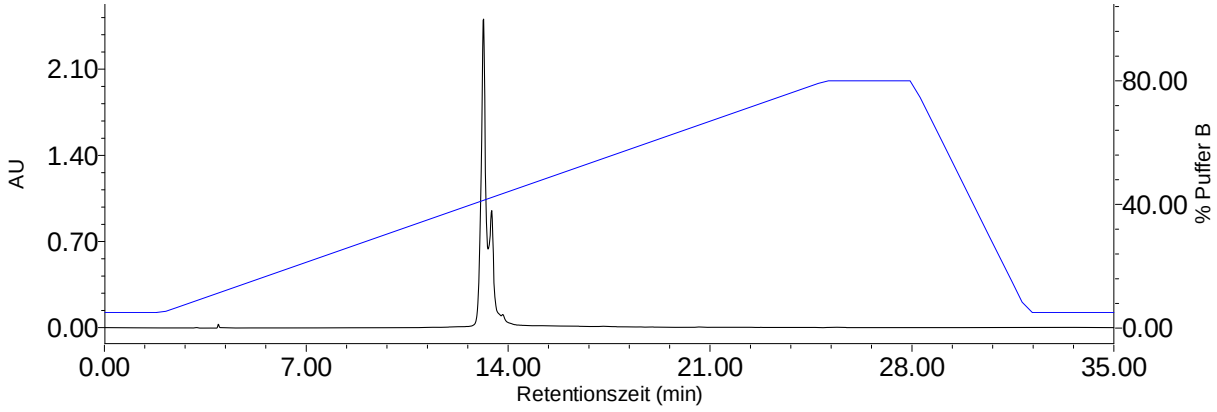


Abb. 163: RP-HPLC der abgespaltenen Sequenzen, synthetisiert auf 3´-PT Aminomodifier C6 CPG

Wie in Abb. 163 deutlich zu erkennen ist, liefert bereits das nicht derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphat (Synthese auf 3´-PT Aminomodifier C6 CPG) einen klaren Doppelpeak welcher auch bei einer Verlängerung der Abspaltdauer erhalten blieb. Die Ursache hierfür liegt also nicht in einer unvollständigen Abspaltung / Entschützung sondern scheint ein Fehler des Trägermaterials selbst zu sein.
Die Synthesen auf Amino-On CPG (Abb. 161) und 3´-Aminomodifier C7 CPG (Abb. 162) lieferten hingegen saubere einzelne Peaks.
Nach der Trocknung wurden jeweils 20nmol der 3 Ansätze mit einem 12,5fachen molaren Überschuss an mPEG400-NHS (250nmol = 1µl einer 250mM Lösung in DMF) für 2 Stunden bei 37°C umgesetzt.

$$ONT1\text{-}NH_2 + mPEG400\text{-}NHS \rightarrow ONT1\text{-}mPEG400$$

Die Reaktion fand dabei einmal im wäßrigen System (20µl 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5) und einmal im nicht-wäßrigen System (20µl DMF / 1µl DIPEA) statt.
Zum Beenden der Reaktion wurden die Ansätze mit 180µl Wasser versetzt und eine analytische RP-HPLC vorgenommen (Abb. 164 bis Abb. 167).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

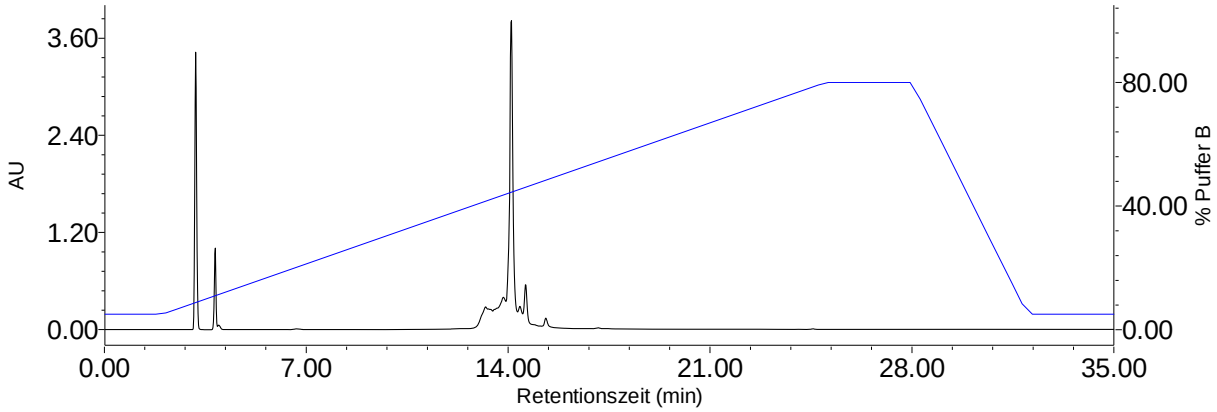


Abb. 164: RP-HPLC der Sequenz ONT1-mPEG400 aus Amino-On CPG in DMF/DIPEA

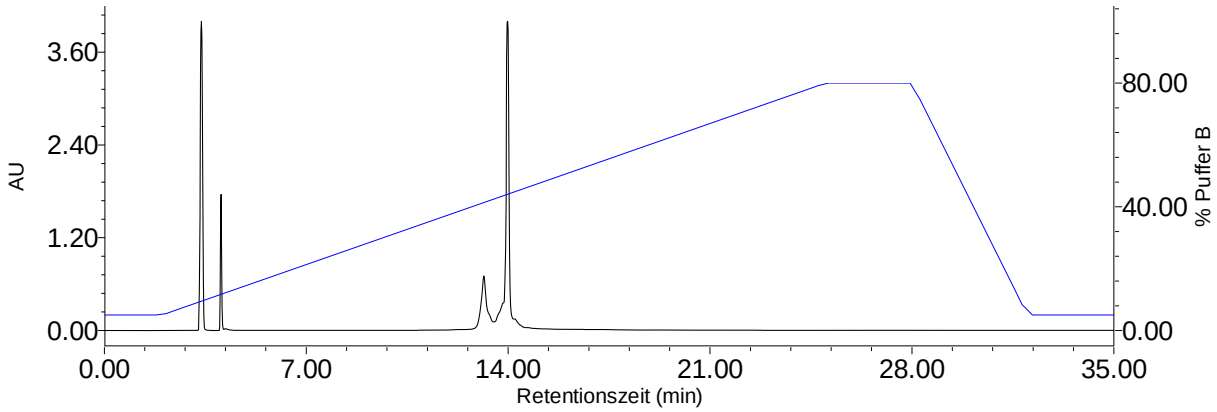


Abb. 165: RP-HPLC der Sequenz ONT1-mPEG400 aus Amino-On CPG in 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5

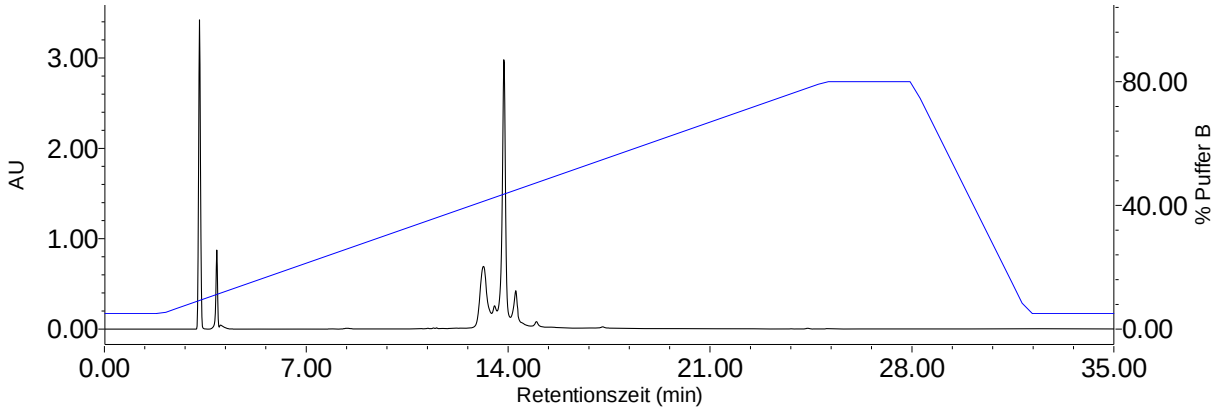


Abb. 166: RP-HPLC der Sequenz ONT1-mPEG400 aus 3´-Aminomodifier C7 in DMF/DIPEA

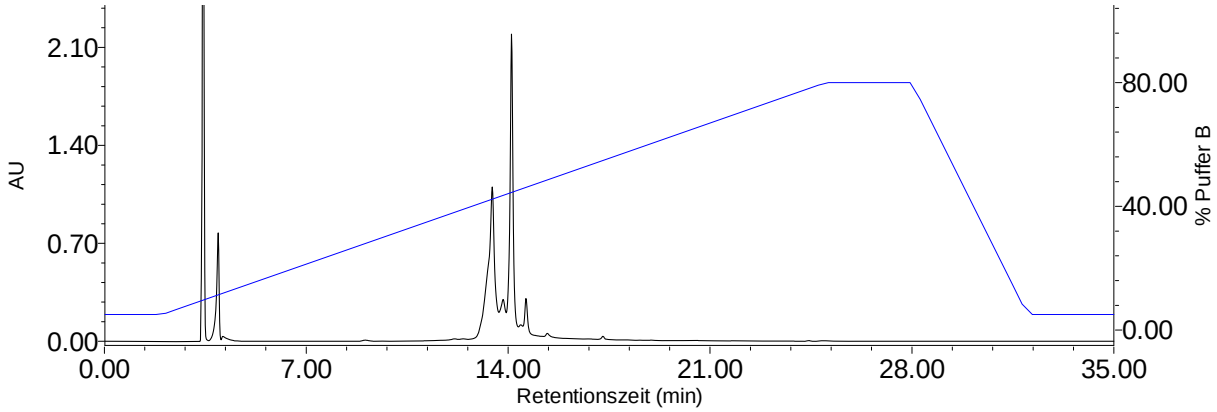


Abb. 167: RP-HPLC der Sequenz ONT1-mPEG400 aus 3´-PT Aminomodifier C6 CPG in DMF/DIPEA

Die mPEG400-derivatisierten Sequenzen weisen mit ca. 14min eine etwas höhere Retentionszeit auf als die unumgesetzten, nicht derivatisierten Sequenzen mit ca. 13,2min.
Es zeigte sich, dass das Ergebnis bei Ansatz c (mit 3´-PT Aminomodifier C6 CPG) am schlechtesten ist. Die Menge an unumgesetzten Sequenzen liegt bei ca. 50% (Abb. 167), was sich schon im Vorfeld durch den Doppelpeak des nicht derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphats andeutete (Abb. 163).
Bei Ansatz b (mit 3´-Aminomodifier C7 CPG) liegt die Menge an unumgesetzten Sequenzen bei ca. 30% (Abb. 166), bei Ansatz a (mit Amino-On CPG) hingegen nur bei ca. 25% (Abb. 164 und Abb. 165).
In allen Fällen lieferten die Umsetzungen im wäßrigen System bessere Ergebnisse mit weniger Nebenprodukten als die Umsetzungen im DMF/DIPEA System.
Das qualitativ und quantitativ beste Ergebnis liefert die Verwendung von Amino-On CPG (Proligo) zur Oligonukleotidsynthese und die spätere Umsetzung mit mPEG-NHS im wäßrigen System. Dies ist in sofern verwunderlich, da Amino-On CPG das mit Abstand preisgünstigste Produkt dieser Auswahl ist.

4.2.2. Beidseitige asymmetrische Derivatisierung in Lösung

Auf den ersten Blick besteht die einfachste Möglichkeit, ein Oligonukleotid beidseitig mit zwei unterschiedlichen Polyethylenglykol-Ketten zu modifizieren darin, eine 5´- und 3´-aminofunktionalisierte Sequenz auf Amino-CPG Support herzustellen und die 5´-MMT-Schutzgruppe des Aminomodifiers nach der Ammoniakabspaltung am Oligonukleotid zu belassen.

Nach der Umsetzung des ungeschützten, aminofunktionalisierten 3´-Endes in Lösung mit dem ersten mPEGa-NHS wird die Trityl-Schutzgruppe abgespalten und das nun freie 5´-Ende mit einem zweiten mPEGb-NHS derivatisiert (Abb. 168).

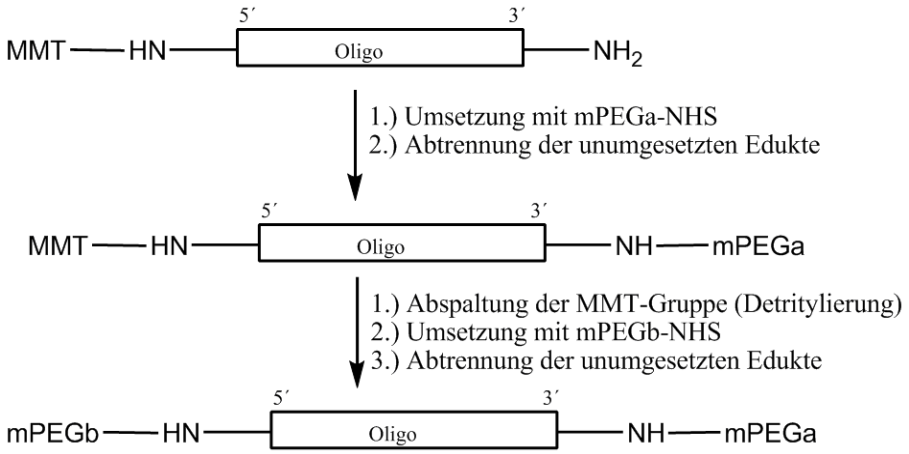


Abb. 168: Prinzip der beidseitigen Derivatisierung in Lösung

Für eine solche Anwendung muß die MMT-Schutzgruppe allerdings während der Derivatisierung des 3´-Endes stabil an der 5´-Aminogruppe verbleiben, um Nebenreaktionen zu vermeiden.
Für erste Untersuchungen zur Zuverlässigkeit der Methode wurde von der Firma Biomers.net ein beidseitig aminofunktionalisiertes, am 5´-Terminus MMT-geschütztes 18mer Oligonukleotid-Thiophosphat der Sequenz ONT2 (s. Kap. 8.1) bezogen.

5´-MMT-NH-C_6H_{12}-ONT2-C_6H_{12}-NH_2-3´ (MMT-NH-ONT2-NH_2)

Um die Stabilität der MMT-Gruppe zu testen, wurden 20nmol der Sequenz mit einem 25fachen Überschuss an mPEG5000-NHS (500nmol bzw. 2,5mg) in 100µl 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5 17 Stunden lang bei 37°C umgesetzt. Dies sollte in folgendem Produkt resultieren.

MMT-NH-ONT2-NH-mPEG5000 (a)

Zum Vergleich wurden 40nmol der Sequenz MMT-NH-ONT2-NH_2 mit 200µl 80%iger Essigsäure detrityliert, über eine NAP-Säule aufgereinigt (s. Kapitel 6.4.4.3) und getrocknet. Davon wurden ebenfalls 20nmol wie zuvor beschrieben mit PEG5000-NHS umgesetzt woraus sich ein beidseitig derivatisiertes Produkt ergeben sollte.

mPEG5000-NH-ONT2-NH-mPEG5000 (b)

Das einfach (MMT-NH-ONT2-NH-mPEG5000) und das doppelt (mPEG5000-NH-ONT2-NH-mPEG5000) derivatisierte Produkt sollten ein deutlich unterschiedliches Laufverhalten in der IE-HPLC aufweisen.

Nach dem Ende der Reaktion wurden beide Ansätze im Speedvac getrocknet, in jeweils 100µl Wasser gelöst und mit je 5nmol eine analytische IE-HPLC vorgenommen (Abb. 169). Zum Vergleich wurde auch ein Durchlauf mit einem einseitig 5´-mPEG5000-derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphat aus einer früheren Synthese durchgeführt.

- Säule: Toyopearl SuperQ-650S 250x4mm
- Methode: 0bis100Proz_1ml_50min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,01M TEAA pH7,5
- Puffer B: 0,01M TEAA pH7,5 + 4M NaCl
- Auftragemenge: 5nmol

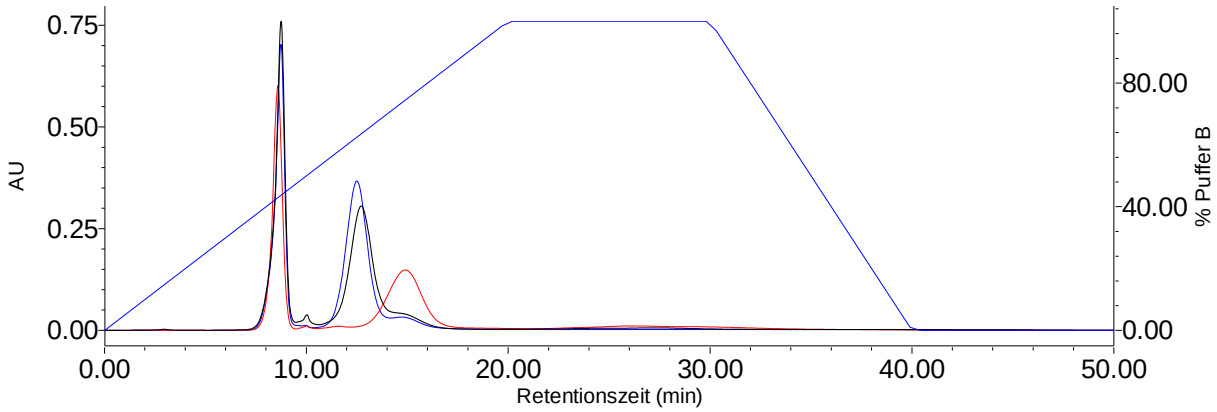


Abb. 169: IE-HPLC der beiden mPEG5000-derivatisierten Sequenzen (a) blau, (b) schwarz, rot: 5´-mPEG5000-derivatisierte Vergleichssequenz

Das einfach 5´-mPEG5000-derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphat aus der früheren Synthese eluiert in Abb. 169 bei 14-16min. Von daher sollte die ebenfalls einfach derivatisierte Sequenz (a) MMT-NH-ONT2-NH-mPEG5000 eine ähnliche Retentionszeit aufweisen.
Dies ist jedoch nicht der Fall, sowohl die Sequenz (a) MMT-NH-ONT2-NH-mPEG5000 als auch die Sequenz (b) mPEG5000-NH-ONT2-NH-mPEG5000 eluieren deckungsgleich bereits deutlich früher bei 12-14min, was drauf hindeutet das beide Substanzen identisch sind. Der Peak bei 8min wird durch hydrolysiertes NHS verursacht.
Da Oligonukleotid-Thiophosphate mit längeren Polyethylenglykol-Ketten in der IE-HPLC kürzere Laufzeiten aufweisen, ist die im Gegensatz zur einfach-derivatisierten Vergleichssequenz wesentlich geringere Retentionszeit ein deutlicher Hinweis darauf, dass beide Sequenzen zweifach mit mPEG5000 derivatisiert wurden.
Dies bedeutet wiederum, dass die 5´-Aminogruppe der Sequenz MMT-NH-ONT2-NH_2 beim Umsatz mit mPEG5000-NHS nicht geschützt war. Die MMT-Gruppe war somit bereits von Anfang an nicht mehr vorhanden oder ging während der Reaktion verloren.

Da die Ursache für die Abwesenheit der MMT-Gruppe auch in einer fehlerhaften Synthese liegen könnte, wurden für weitere Tests ein 5´-aminofunktionalisiertes und MMT-geschütztes 18mer Oligonukleotid-Thiophosphat der Sequenz ONT3 (s. Kap. 8.1) verwendet, welches von der Firma TriLink bezogen wurde.

5´-MMT-NH-C_6H_{12}-ONT3-OH-3´ (MMT-NH-ONT3)

Als Vergleichssubstanz diente das ebenfalls von TriLink synthetisierte ungeschützte Oligonukleotid-Thiophosphat der Sequenz ONT3.

5´- NH_2-C_6H_{12}-ONT3-OH-3´ (H_2N-ONT3)

Ist eine MMT-Schutzgruppe vorhanden, und bleibt diese unter den Reaktionsbedingungen stabil, so dürfte sich die Sequenz MMT-NH-ONT3 nicht mit einem NHS Ester umsetzten.

MMT-NH-ONT3 + mPEG2000-NHS → /

Dazu wurden 15nmol MMT-NH-ONT3 in 25µl 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5 gelöst, 450nmol mPEG2000-NHS (30facher molarer Überschuss) zugegeben und 16h lang bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz im Speedvac getrocknet und in 60µl Wasser gelöst. Ob eine Reaktion stattgefunden hat, wurde über eine IE-HPLC untersucht. Zum Vergleich wurde auch ein Lauf mit dem Ausgangsprodukt MMT-NH-ONT3 durchgeführt (Abb. 170).

- Säule: Toyopearl SuperQ-650S 250x4mm
- Methode: 0bis100Proz_1ml_50min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,01M TEAA pH7,5
- Puffer B: 0,01M TEAA pH7,5 + 4M NaCl
- Auftragemenge: 5nmol

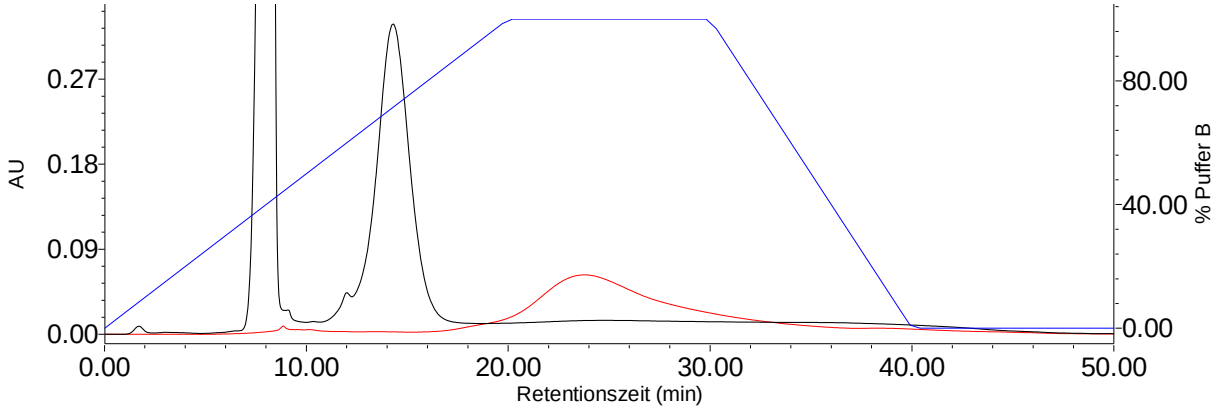


Abb. 170: IE-HPLC des Reaktionsansatzes von MMT-NH-ONT3 mit mPEG2000-NHS (schwarz) im Vergleich zum Ausgangsprodukt MMT-NH-ONT3 (rot)

Der Reaktionsansatz liefert in Abb. 170 einen Peak bei 12-16min (schwarz), was der Retentionszeit einer mPEG2000-derivatisierten Sequenz entspricht. Der erwartete breite Peak des unumgesetzten Ausgangs-Oligonukleotids bei 20-30 Minuten (rot) blieb aus.
Das bedeutet, dass eine Umsetzung mit dem NHS-Ester stattfand und somit auch die von TriLink hergestellte Sequenz keine schützende MMT-Gruppe enthielt.

Um festzustellen ob die MMT-Gruppe erst während der Reaktion verloren ging oder ob von Anfang an keine vorhanden war, wurde mit je 10nmol der Sequenz MMT-NH-ONT3 und H_2N-ONT3 eine analyt. RP-HPLC vorgenommen.
Oligonukleotid-Thiophosphate mit hydrophober MMT-Gruppe weisen hierbei eine wesentlich höhere Retentionszeit auf als Sequenzen ohne Trityl-Gruppe. Als Vergleich diente das Chromatogramm einer DMT-on Sequenz aus einer früheren Synthese (Abb. 171).

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

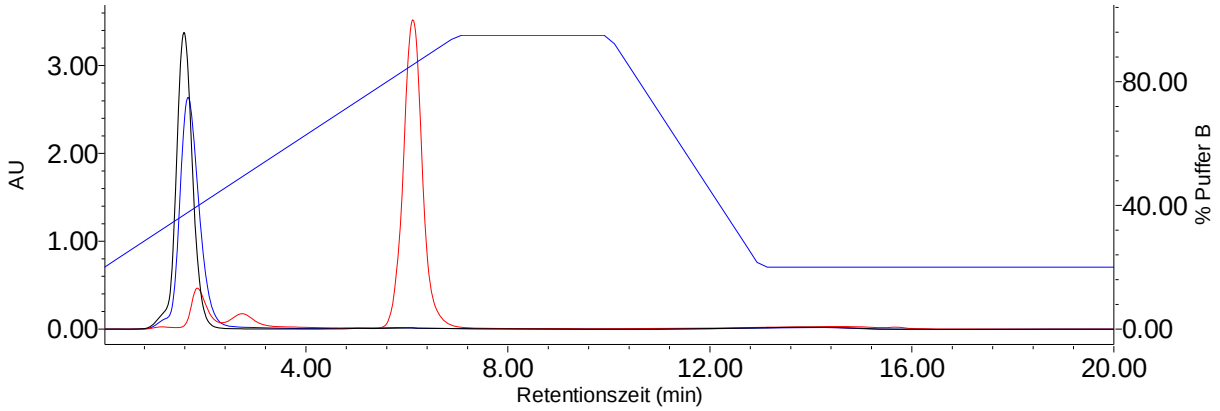


Abb. 171: RP-HPLC der Sequenz MMT-NH-ONT3 von TriLink (schwarz) im Vergleich zur MMT-off Sequenz H_2N-ONT3 (blau) und einer DMT-on Sequenz (rot)

Wie in Abb. 171 deutlich zu erkennen ist, eluieren sowohl die Sequenzen MMT-NH-ONT3 (schwarz) wie auch H_2N-ONT3 (blau) sehr früh bei ca. 2min. Die Vergleichssequenz mit DMT-Gruppe weist hingegen eine hohe Retentionszeit von 6min auf.
Dies zeigt eindeutig, dass die Sequenz MMT-NH-ONT3 bereits von Anfang an keine MMT-Gruppe trug.
Da es sehr unwahrscheinlich ist, dass zwei verschiedene Synthesen von zwei verschiedenen Herstellern fehlerhaft sind, ist davon auszugehen dass die MMT-Gruppe sehr instabil ist. Sie geht wohl bei längerer Lagerung des Oligonukleotid-Thiophosphats (z.B. während des Transports) verloren.

Um genauere Informationen über das Verhalten der Trityl-Gruppe unter verschiedenen Bedingungen zu sammeln, erfolgte eine eigene Synthese der Sequenz ONT2 im 1µmol-Maßstab nach modifizierten Kopplungsprotokollen mit doppelten Kopplungszyklen auf Adenosin-CPG (s. Kap. 6.2.1). Als Aminolinker-Phosphorigsäureesteramid wurde der 5´-Amino-Modifier C6 von Glen Research eingesetzt, was zu folgender Sequenz führen sollte:

5´-MMT-NH-C_6H_{12}-ONT2-3´ (MMT-NH-ONT2)

Die Abspaltung vom Trägermaterial erfolgte mit 700µl konz. Ammoniak während 17h bei 37°C. Nach der Abspaltung wurde die überstehende Lösung in ein neues Gefäß übergeführt und der Ammoniak im Speedvac abgezogen.
Da die MMT-Gruppe äußerst säurelabil ist, wurde der Rückstand zur Wahrung alkalischer Bedingungen in 200µl 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5 gelöst.
Die Abtrennung der aminofunktionalisierten MMT-on Sequenzen von den während der Synthese angereicherten verkürzten Sequenzen erfolgte über eine preparative RP-HPLC (Abb. 172).

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

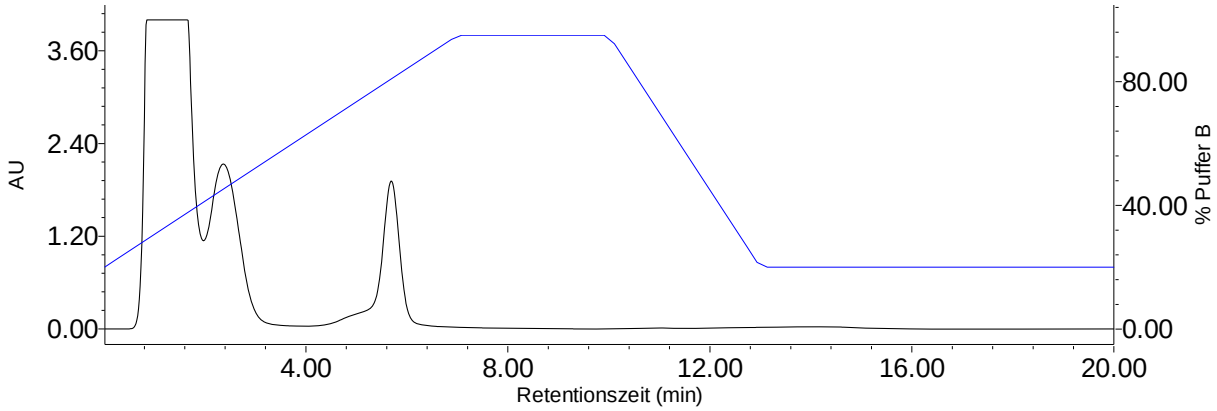


Abb. 172: prep. RP-HPLC zur Abtrennung der MMT-on Sequenzen

Wie in Abb. 172 deutlich zu erkennen, ist das Verhältnis von verkürzten MMT-off Sequenzen (2min) zu MMT-on Sequenzen (6min) massiv in Richtung MMT-off verschoben. Dies bedeutet, dass bereits hier ein Großteil der Sequenzen keine MMT-Gruppe trägt oder nicht mit dem Aminolinker-Phosphorigsäureesteramid funktionalisiert wurde.

Der Peak mit den MMT-on Sequenzen bei 6min wurde aufgefangen und das Eluat (ca. 1ml) in 50µl Aliquote aufgeteilt. Mehrere Aliquote wurden, wie im Folgenden beschrieben, unterschiedlichen Behandlungen und Lagerungen unterworfen, um die Stabilität der MMT-Gruppe bei verschiedenen Bedingungen zu testen. Die restlichen Aliquote wurden wie Aliquot Nr. 4 eingefroren.

Aliquot	**Behandlung**	**Zeitdauer der Lagerung**
1.)	sofortige erneute RP-HPLC	
2.)	trocknen im Speedvac, dann erneute RP-HPLC	
3.)	lagern bei 4°C im HPLC-Puffer	5 Tage
4.)	lagern bei -20°C im HPLC-Puffer	5 Tage
5.)	trocknen im Speedvac, lagern bei 4°C	5 Tage
6.)	trocknen im Speedvac, lagern bei -20°C	5 Tage

Eine Analyse erfolgte jeweils mittels analytischer RP-HPLC (Abb. 173 bis Abb. 178).

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

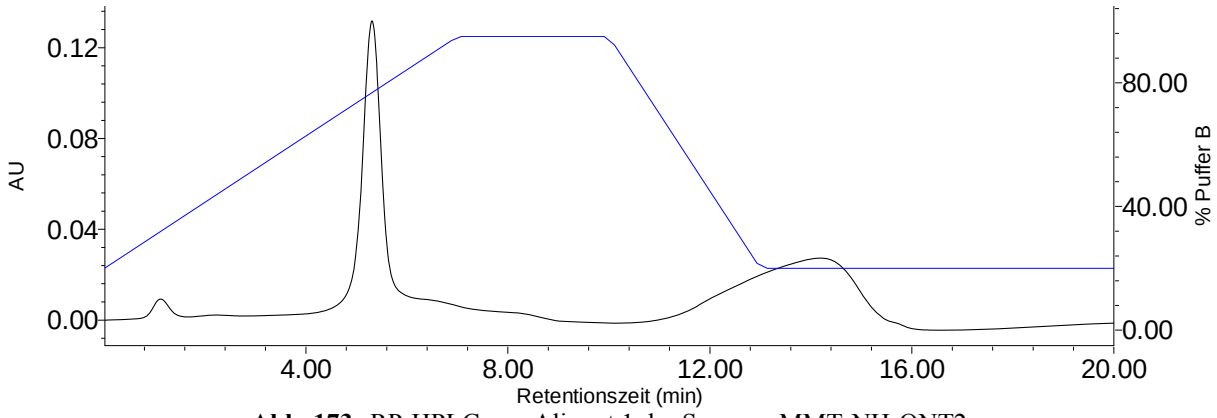


Abb. 173: RP-HPLC von Aliquot 1 der Sequenz MMT-NH-ONT2

Bei sofortiger Weiterverwendung (Abb. 173) liegt das Peakflächen-Verhältnis von MMT-off (< 2min) zu MMT-on Sequenzen (6min) bei ca. 1:10. Somit sind noch ca. 90% der Sequenzen im Besitz der MMT-Gruppe. Der breite Peak bei 12-16min tritt auch im Leerlauf der HPLC-Säule auf. Dabei handelt es sich um die Grundlinie, welche durch die geringe Auftragemenge sichtbar wird.

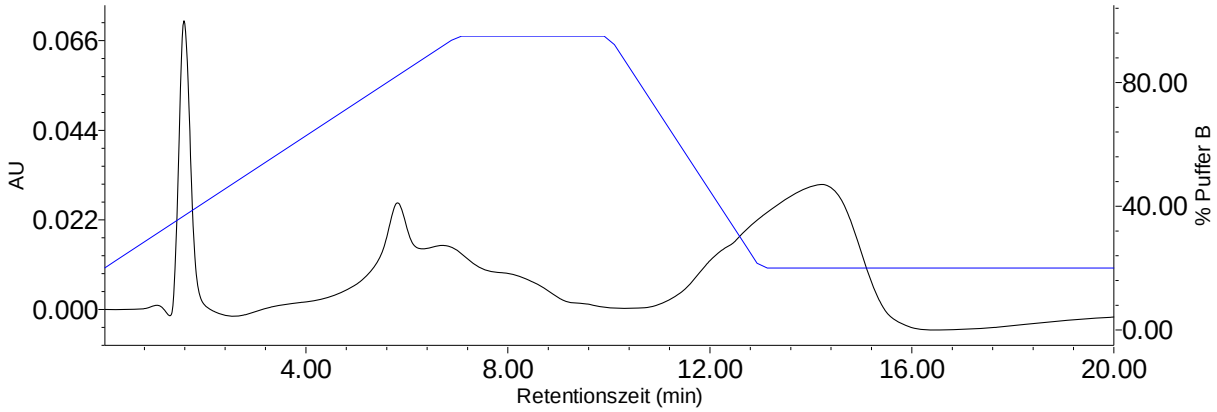


Abb. 174: RP-HPLC von Aliquot 2 der Sequenz MMT-NH-ONT2

Durch die Trocknung im Speedvac (Abb. 174) verschiebt sich das Peakflächen-Verhältnis auf ca.1:1. Das bedeutet, dass ca. 50% der Sequenzen die MMT-Gruppe verloren haben. Die Peaks bei 7-9min sind ebenfalls durch die geringe Auftragemenge bedingt und gehören zur Grundlinie der verwendeten Säule.

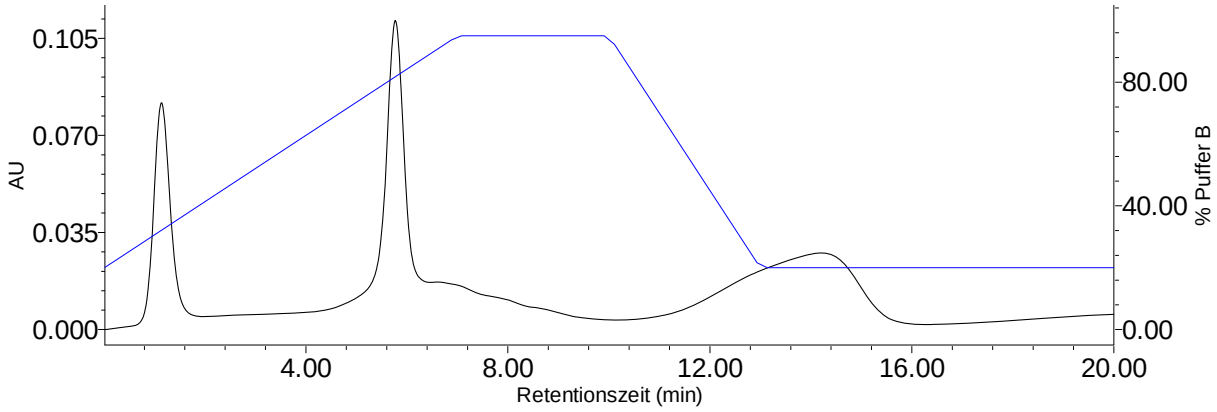


Abb. 175: RP-HPLC von Aliquot 3 der Sequenz MMT-NH-ONT2

Eine Lagerung im HPLC-Puffer bei 4°C (Abb. 175) führt ebenfalls zu einem Peakflächen-Verhältnis von 1:1. Auch hier haben ca. 50% der Sequenzen ihre MMT-Gruppe verloren.

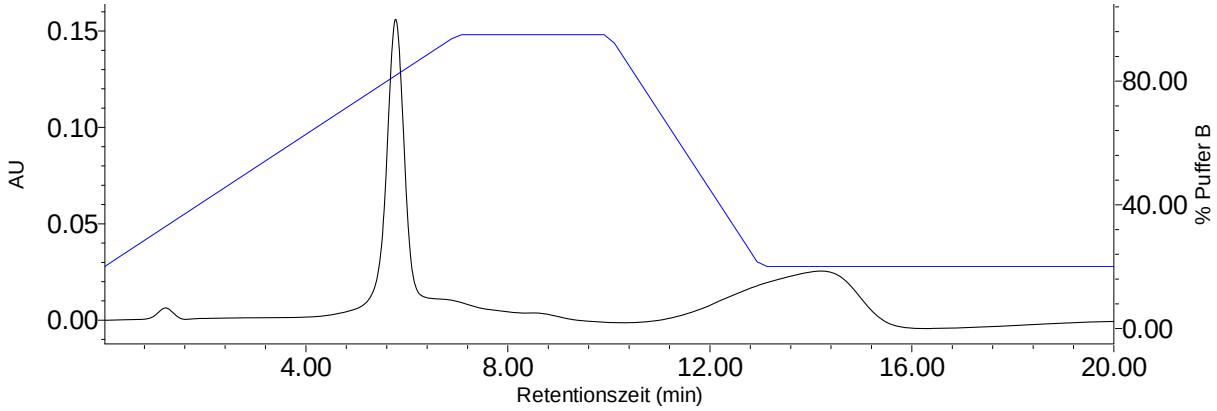


Abb. 176: RP-HPLC von Aliquot 4 der Sequenz MMT-NH-ONT2

Bei einer Lagerung im HPLC-Puffer bei -20°C (Abb. 176) ergibt sich ein Peakflächen-Verhältnis (6min : > 2min) von ca. 1:20. Unter diesen Bedingungen behielten ca. 95% der Sequenzen die Schutzgruppe.

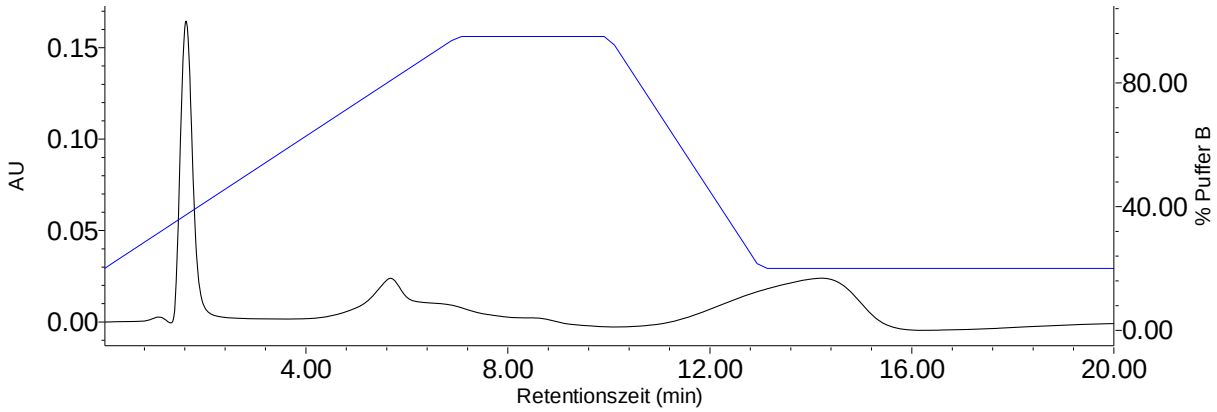


Abb. 177: RP-HPLC von Aliquot 5 der Sequenz MMT-NH-ONT2

Die Trocknung, kombiniert mit einer längeren Lagerung bei 4°C (Abb. 177) führte zu einem massiven Einbruch an MMT-on Sequenzen. Nur noch 20% der Sequenzen tragen die MMT-Gruppe, das Peakflächen-Verhältnis liegt bei 5:1.

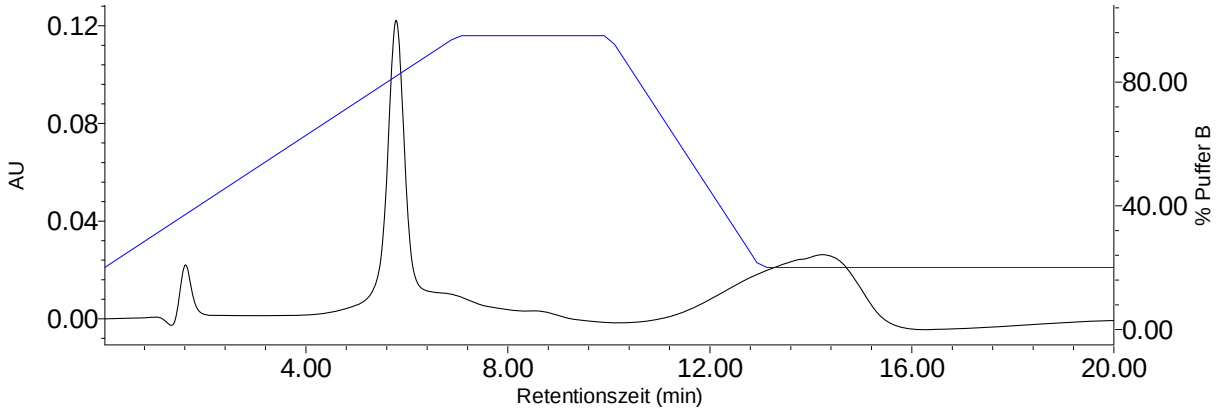


Abb. 178: RP-HPLC von Aliquot 6 der Sequenz MMT-NH-ONT2

Eine Trocknung im Speedvac führt aber nicht unbedingt zum Verlust der MMT-Gruppe. Aliquot 6 lieferte nach 5 Tagen bei -20°C noch ein Peakflächen-Verhältnis von 1:10 und bestand somit zu 90% aus MMT-on Sequenzen mit einer Retentionszeit von 6min (Abb. 178).

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse über den Verbleib bzw. den Verlust der MMT-Gruppe während des Trocknungsprozeses, wurden die Versuche noch einmal mit ähnlichen Bedingungen wiederholt.
Dazu wurden die restlichen 150µl der Lösung mit den vom Support abgespaltenen, in 0,01M TEAA pH8,5 gelösten Sequenzen über eine preparative RP-HPLC aufgereinigt (Abb. 179).

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

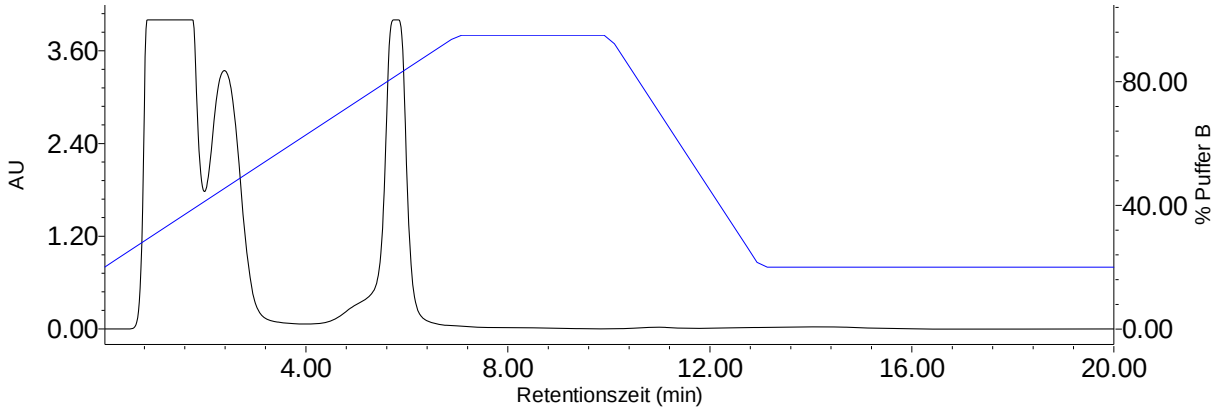


Abb. 179: prep. HPLC zur Abtrennung der MMT-on Sequenzen

Der Peak bei 6min in Abb. 179 wurde aufgefangen, das Eluat (1ml) im Speedvac eingeengt und nach 10min sowie nach 60min jeweils 50µl für eine analytische RP-HPLC (Abb. 180) entnommen.

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

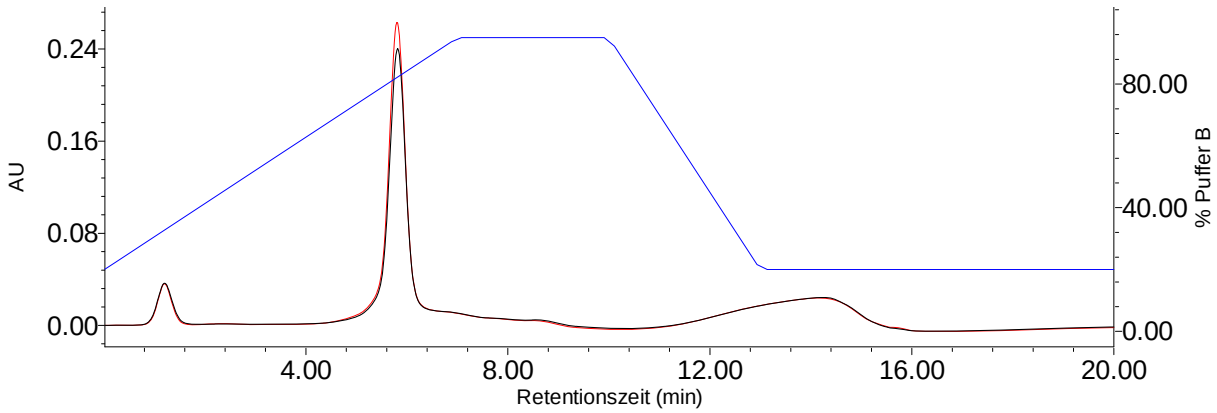


Abb. 180: RP-HPLC des Eluats nach 10min (rot) und 60min (schwarz) im Speedvac

Bereits nach einer Trocknungszeit von 10min im Speedvac zeigt sich in Abb. 180 schon wieder eine beachtliche Menge (ca. 20%) an MMT-off Sequenzen (< 2min). Deren Menge nimmt aber innerhalb der ersten 60min nicht zu.

Nach 60min wurde das eingeengte Eluat in mehrere 50µl-Aliquote unterteilt, die unterschiedlich behandelt wurden. Eine Untersuchung erfolgte jeweils über eine analyt. RP-HPLC (Abb. 181 bis Abb. 185).

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

Ein Aliquot wurde im Speedvac getrocknet und wieder in 50µl Wasser aufgenommen (Abb. 181).

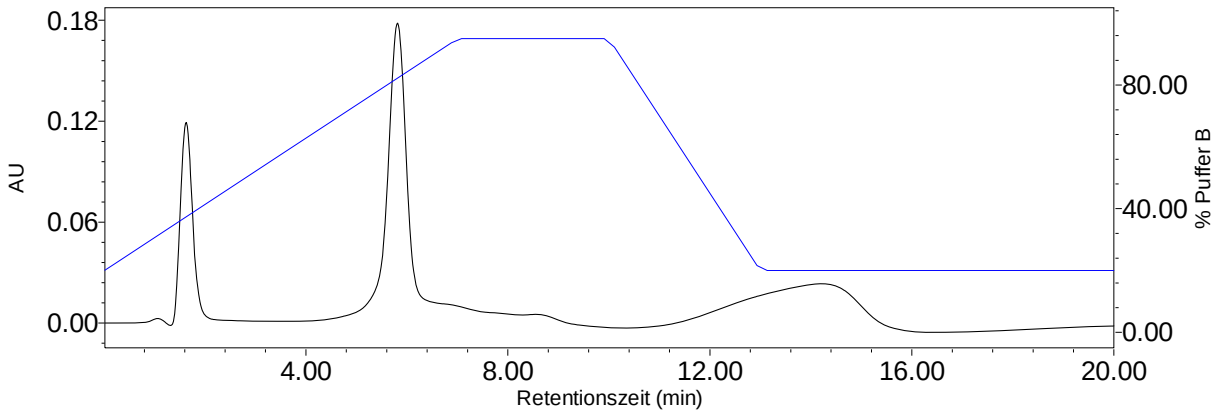


Abb. 181: RP-HPLC des getrockneten, in 50µl Wasser gelösten Aliquots

Der Trocknungsprozess führt in Abb. 181 zu einer deutlichen Zunahme an MMT-off Sequenzen (> 2min). Nur noch 60% der Oligonukleotid-Thiophosphate besitzen eine MMT-Gruppe (6min).
Ein weiteres Aliquot wurde ebenfalls im Speedvac getrocknet, dann aber zur Aufrechterhaltung eines alkalischen Milieus in 50µl 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5 gelöst (Abb. 182).

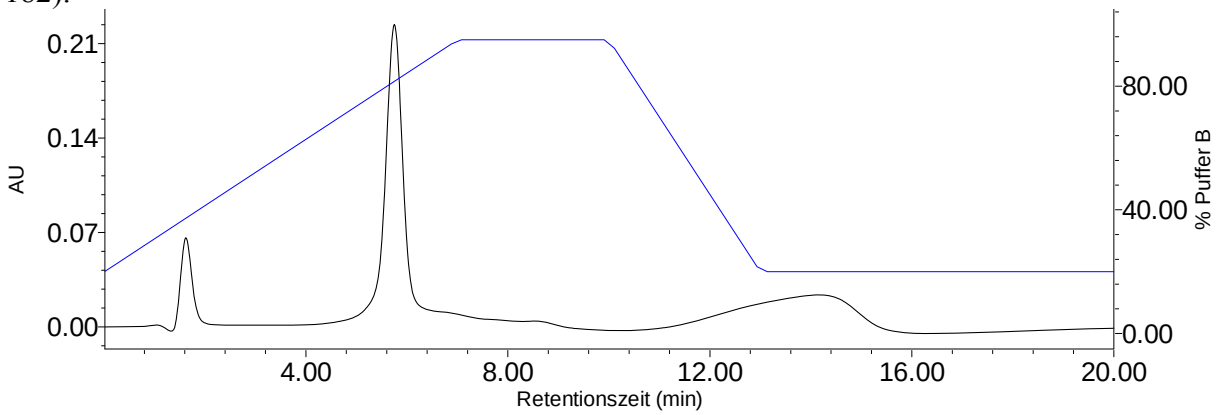


Abb. 182: RP-HPLC des getrockneten, in 50µl NaHCO3 pH8,5 gelösten Aliquots

Der höhere pH-Wert führte zu einem etwas niedrigeren Anteil an MMT-off Sequenzen in Abb. 182. Wie auch am Anfang des Trocknungsprozesses sind immerhin noch 80% der Oligonukleotid-Thiophosphate im Besitz der MMT-Gruppe (6min).
Das dritte Aliquot wurde wie das erste im Speedvac getrocknet und in 50µl Wasser gelöst. Dann folgte allerdings eine Lagerung für 8 Stunden bei 4°C (Abb. 183).

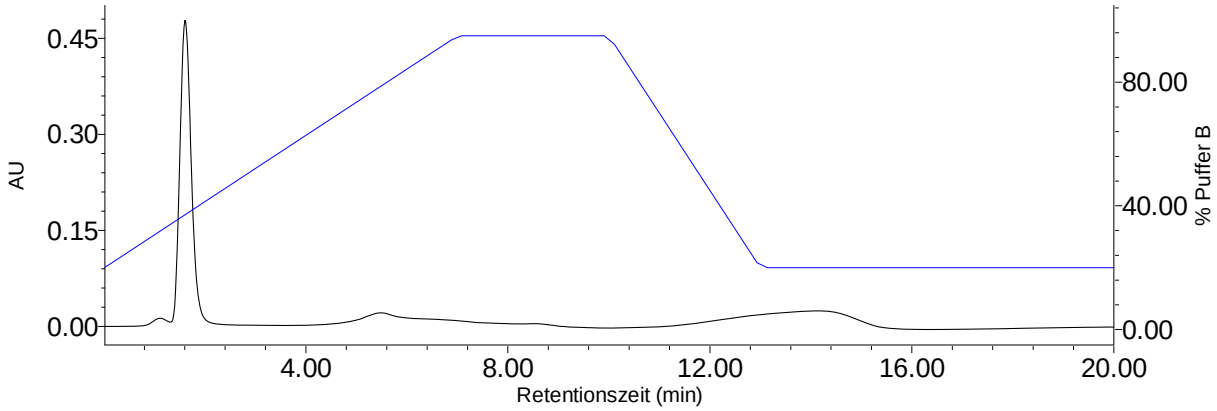


Abb. 183: RP-HPLC des getrockneten, in 50µl Wasser gelösten Aliquots nach 8h bei 4°C

Dies führte, wie am fehlenden 6min-Peak in Abb. 183 zu erkennen, zu einem kompletten Verlust der MMT-Gruppe.

Das vierte Aliquot wurde wie das zweite im Speedvac getrocknet und in 50µl 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5 gelöst. Die Lagerung erfolgte wie beim dritten Aliquot für 8 Stunden bei 4°C (Abb. 184).

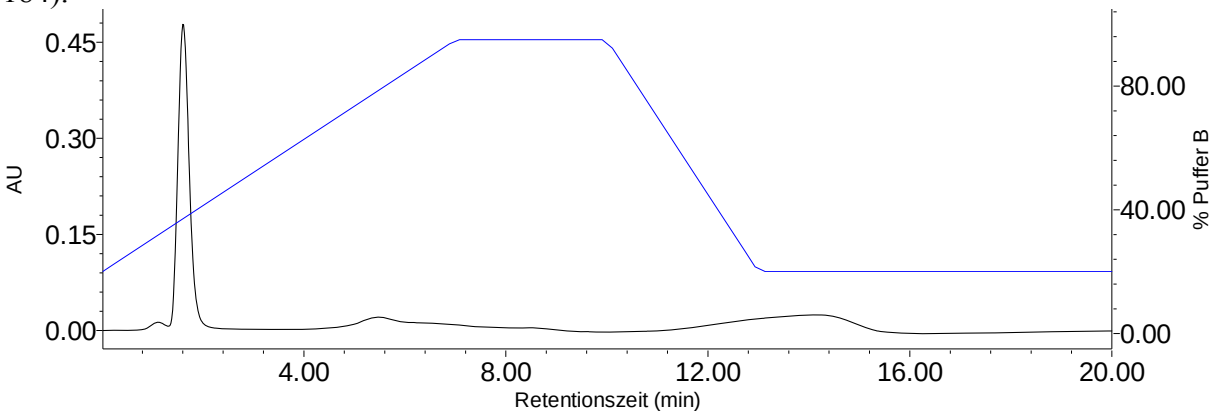


Abb. 184: RP-HPLC des getrockneten, in 50µl NaHCO3 pH8,5 gelösten Aliquots nach 8h bei 4°C

Auch dies führte zu einem fast vollständigen Verlust der MMT-Gruppe. Der Peak bei 6min ist nur noch andeutungsweise vorhanden.
Das fünfte Aliquot wurde lediglich im Speedvac getrocknet, und in lyophilisierter Form 8h lang bei 4°C gelagert (Abb. 185).

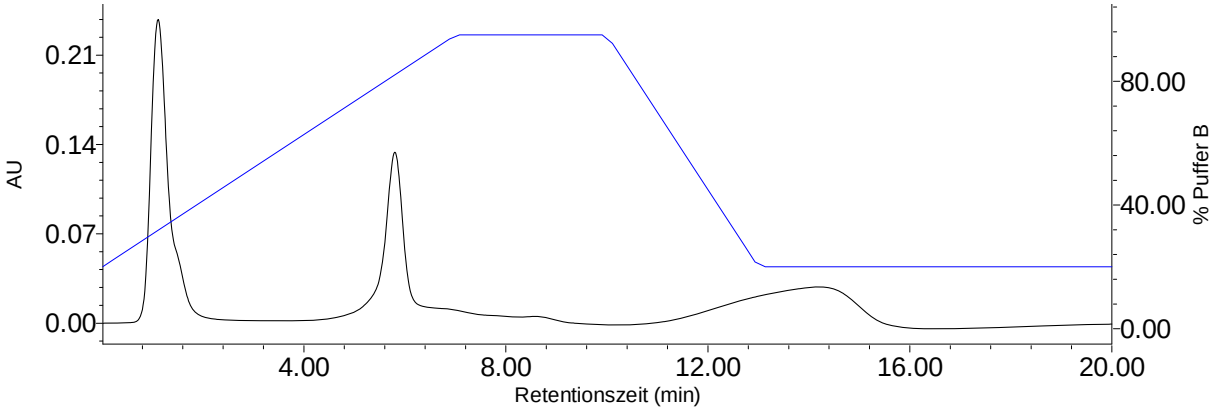


Abb. 185: RP-HPLC des getrockneten Aliquots nach 8h bei 4°C

Der Verlust an MMT-on Sequenzen ist in Abb. 185 zwar nicht so hoch wie beiden vorigen Aliquoten, jedoch sinkt auch hier der Anteil an MMT-on Sequenzen (Peak bei 6min) auf ca. 40%.
Das letzte Aliquot wurde nicht getrocknet, sondern im HPLC-Puffer (0,1M TEAA pH7,5 / ACN) belassen und 8 Stunden lang bei -20°C gelagert (Abb. 186).

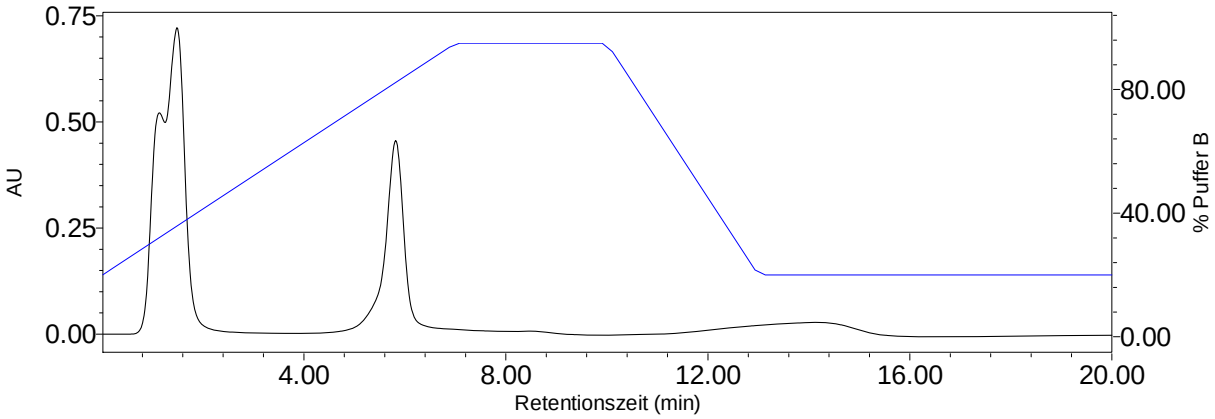


Abb. 186: RP-HPLC des in HPLC-Puffe gelösten Aliquots nach 8h bei -20°C

Selbst diese Behandlung resultierte in einem Anteil an MMT-on Sequenzen von nur 30% (Peak bei 6min in Abb. 186).

Um die Funktionalität der MMT-Schutzgruppe direkt unter den Reaktionsbedingungen zu testen, wurde eines der 50µl-Aliquote der Sequenz MMT-NH-ONT2 mit einem Überschuss an mPEG2000-NHS eine Stunde lang bei 37°C in 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5 inkubiert.
Nach Reaktionsende wurde eine analyt. RP-HPLC durchgeführt (Abb. 187). Als Vergleichssubstanzen dienten die unumgesetzte Sequenz MMT-NH-ONT2, eine MMT-off Sequenz (H_2N-ONT1) und eine mPEG2000-derivatisierte Sequenz aus einer früheren Synthese (mPEG2000-NH-ONT1).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

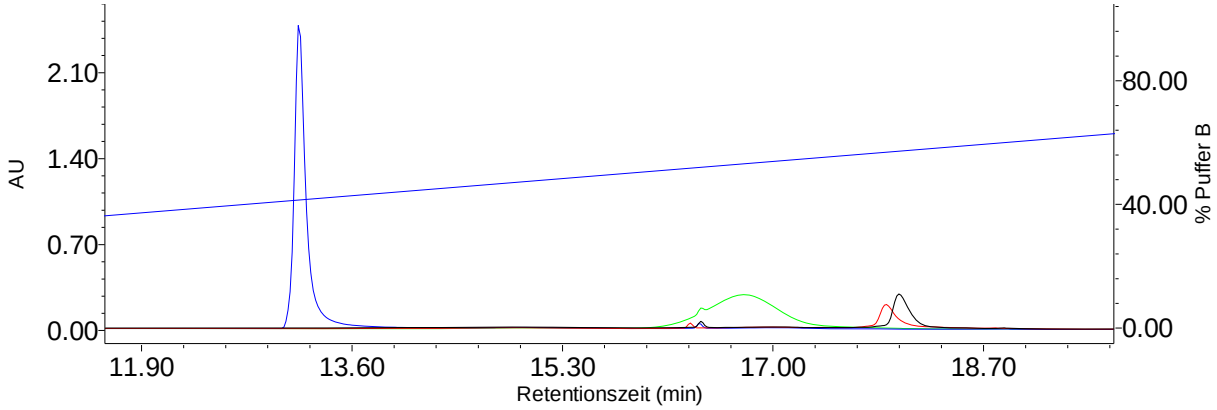


Abb. 187: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der analyt. RP-HPLC des Ansatzes von MMT-NH-ONT2 mit mPEG2000-NHS (schwarz)

Der Ansatz von MMT-NH-ONT2 mit mPEG2000-NHS (schwarz) liefert ebenso wie die unumgesetzte Sequenz MMT-NH-ONT2 (rot) einen Peak bei 18min in Abb. 187. Die MMT-off Sequenz H_2N-ONT1 (blau) erscheint bei 13min, ein mPEG2000-derivatisiertes Oligonukleotid-Thiophosphat (mPEG2000-NH-ONT1) hingegen bei 16-17min (grün).
Dies bedeutet, dass die MMT-Gruppe der Sequenz MMT-NH-ONT2 noch vorhanden war und eine Reaktion verhindert hat.
Bei entsprechender Lagerung (lyophilisiert bei -20°C) und schneller Weiterverwendung nach der Synthese, kann demnach die MMT-Gruppe unter den Reaktionsbedingungen stabil bleiben und das 5´-Ende erfolgreich vor einem Umsatz mit NHS-Ester schützen.
Der Verbleib der Gruppe ist allerdings stark vom Verlauf des Trocknungsprozesses nach der Ammoniakabspaltung abhängig. Trocknet das abgespaltene Oligonukleotid-Thiophosphat schnell durch, so verbleibt die MMT-Gruppe meist an der 5´-Aminofunktion. Steigt die Temperatur jedoch während der Trocknung an, so kann dies sehr schnell zu einem totalen Verlust der Schutzgruppe führen.
Selbst bei Synthesen im kleineren Maßstab ist dieses unkalkulierbare Verhalten nicht zu akzeptieren und kann bei Großmengen-Synthesen sehr schnell zum Problem werden. Hier wäre der Verlust eines kompletten Ansatzes wesentlich kostspieliger.
Von daher scheint dieser Syntheseweg für eine beidseitige asymmetrische PEG-Derivatisierung, trotz seiner großen Flexibilität, eher ungeeignet zu sein.

4.2.3. Beidseitige asymmetrische Derivatisierung an einem Polymerträger

Die Grundidee einer trägergebundenen asymmetrischen Derivatisierung besteht darin, ein Ende des Oligonukleotid-Thiophosphats noch auf dem CPG-Träger mit einem ersten PEGa zu derivatisieren. Die Umsetzung des anderen Endes mit einem zweiten PEGb erfolgt erst nach Abspaltung vom Trägermaterial in Lösung. Dafür wurden im Rahmen diese Arbeit zwei prinzipielle Strategien angegangen.
Bei der präsynthetischen Trägerderivatisierung (Kapitel 4.2.3.1) soll ein Trägermaterial bereitgestellt werden welches eine 3´-PEGa-Modifizierung bereits in sich trägt. Nach der Oligonukleotidsynthese und der Abspaltung vom Träger ist das Oligonukleotid-Thiophosphat am 3´-Ende bereits mit dem ersten PEGa derivatisiert. Die Umsetzung des 5´-Endes mit dem zweiten PEGb erfolgt danach in Lösung (Abb. 188).

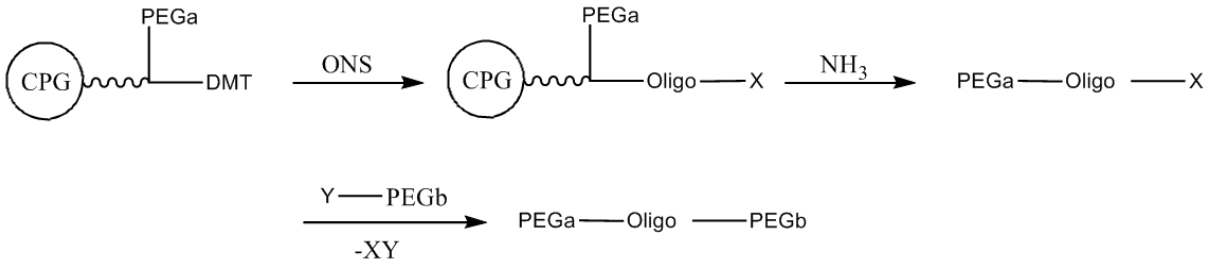


Abb. 188: Strategie der präsynthetischen TrägerDerivatisierung

Im Falle der postsynthetischen TrägerDerivatisierung (Kapitel 4.2.3.2 und 4.2.3.3) soll nach einer Oligonukleotidsynthese auf funktionalisiertem Träger (z.B. Amino-On CPG) das freie 5´-Ende mit dem ersten PEGa umgesetzt werden, während das Oligonukleotid mit dem 3´-Ende noch auf dem Träger verankert ist. Hier erfolgt die Derivatisierung des 3´-Endes mit dem zweiten PEGb nach der Abspaltung vom Träger in Lösung (Abb. 189).

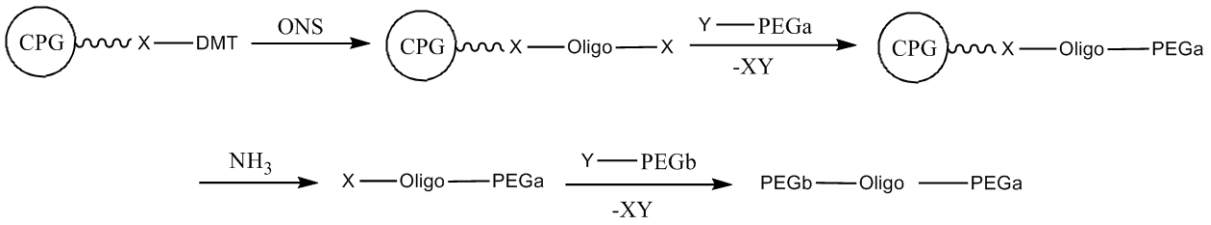


Abb. 189: Strategie der postsynthetischen TrägerDerivatisierung

Bei beiden Strategien soll die Verknüpfung zwischen dem Oligonukleotid und den Polyethylenglykolen durch eine für den Organismus unkritische Bindung erfolgen. Dies wäre einerseits, wie bei den früheren einseitigen sowie beidseitig symmetrischen Derivatisierungen, die Knüpfung einer Amidbindung durch Reaktion eines PEG-NHS Esters mit einer Aminogruppe. Aber auch andere „native“ Bindungsformen wie z.B. eine Phosphodiester-Bindung wären denkbar. Das primäre Ziel der beidseitigen, asymmetrischen, trägergebundenen Derivatisierung soll die gemischte Derivatisierung mit einem kurzkettigen (mPEG400) und einem Polyethylenglykol mittlerer Kettenlänge (mPEG2000) sein.

4.2.3.1. Präsynthetische 3´-Träger Derivatisierung

Eine Möglichkeit zur beidseitigen asymmetrischen Derivatisierung eines Oligonukleotids mittels unterschiedlicher PEG-NHS besteht in der Verwendung des 3´-Amino-Modifier C7 CPG von Glen Research. Dieser bifunktionelle Support weist neben der Trityl-Gruppe in 5´-

Richtung, welche als Startpunkt für die Oligonukleotidsynthese fungiert, auch eine Fmoc-geschützte Aminogruppe am 3´-Ende auf. Die beiden Gruppen sind durch einen C6-Linker miteinander verbunden, welcher selbst über eine Succinat-Brücke am CPG-Träger verankert ist (Abb. 190).

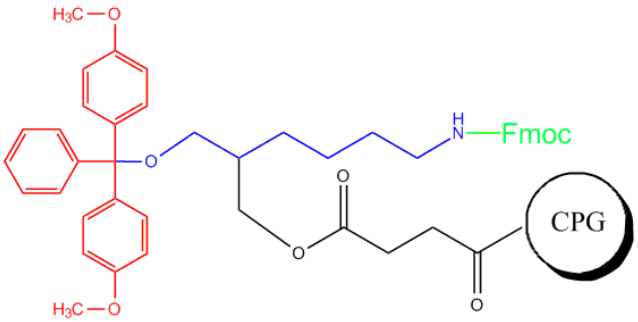


Abb. 190: 3'-Amino-Modifier C7 CPG von Glen Research

Das Trägermaterial kann noch vor der eigentlichen Oligonukleotidsynthese an der 3´-Aminofunktion derivatisiert werden (präsynthetisch). Die Umsetzung am 5´-Ende erfolgt nach der Abspaltung vom Träger und der HPLC-Abtrennung der 3´-unmodifizierten Sequenzen in Lösung. Das Prinzip der Synthesestrategie ist in Abb. 191 dargestellt.

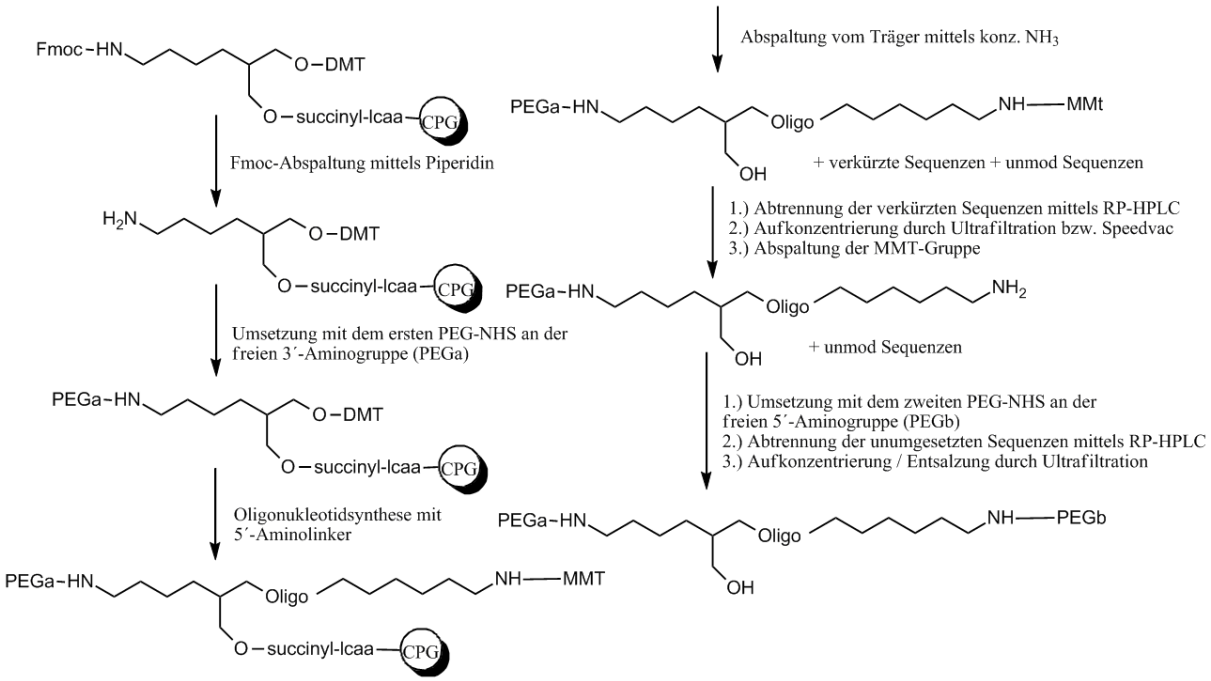


Abb. 191: präsynthetische Träger Derivatisierung auf Fmoc-geschütztem 3´-Amino-Modifier C7 CPG

Für erste Testsynthesen wurden 80mg des 3´-Amino-Modifier C7 CPG verwendet. Dies entspricht, bei einer angegebenen Beladung von 38µmol/g, einer Stoffmenge von 3µmol an funktionellen Gruppen.
Ein mit dem unbehandelten Träger durchgeführter Ninhydrin-Test verlief negativ, was darauf hindeutet dass keine freien Aminogruppen vorhanden sind.
Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe zum Freisetzen der Aminogruppe (Abb. 192) erfolgte mit 20% Piperidin in DMF, gefolgt von mehreren Waschgängen mit DMF und ACN.

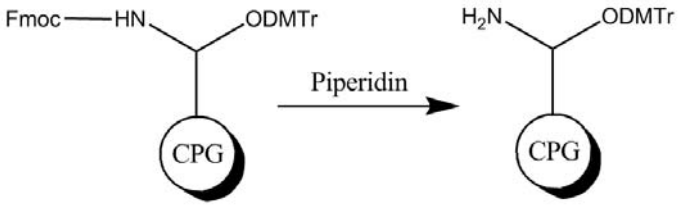


Abb. 192: schematische Darstellung der Fmoc-Entschützung

Nach der Fmoc-Entschützung wurde der Support im Argon-Strom getrocknet. Ein darauf folgender Ninhydrin-Test verlief positiv, was auf die Anwesenheit von freien Aminogruppen schließen läßt. Der getrocknete Support wurde in 3 Aliquote aufgeteilt:

(A): 19mg = 0,7µmol
(B): 24mg = 0,9µmol
(C): 24mg = 0,9µmol

Das Aliquot (A) soll dabei unbehandelt bleiben, während (B) mit mPEG400-NHS und (C) mit mPEG2000-NHS umgesetzt werden soll.
Die Umsetzung erfolgte jeweils mit einem 15fachen Überschuss an mPEG400-NHS (13,5µmol) bzw. einem 30fachen Überschuss an mPEG2000-NHS (27µmol) in 100µl trockenem DMF über 2 Stunden bei 37°C (Abb. 193). Als Hilfsbase wurde Diisopropylethylamin (DIPEA) eingesetzt. Um für eine gute Durchmischung zu sorgen, wurden die Reaktionsansätze mit 200rpm geschüttelt.

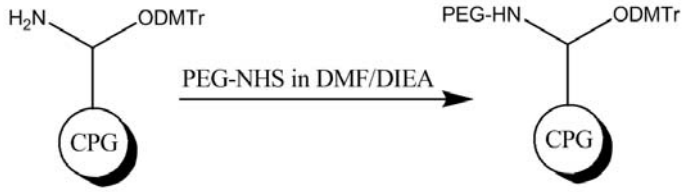


Abb. 193: schematische Darstellung der PEG-Derivatisierung der freien 3´-Aminogruppe des Trägers

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze jeweils mit 3x 1ml DMF, 3x 1ml ACN und 3x 1ml DCM gewaschen und an der Luft getrocknet.
Alle Ansätze wurden nun in jeweils 2 weitere Aliquote aufgeteilt (A1, A2, B1, B2, C1, C2), wobei A1, B1 und C1 unbehandelt blieben, während bei A2, B2 und C2 noch eventuell vorhandene freie Aminogruppen (welche die spätere Oligonukleotidsynthese stören könnten) mittels Acetanhydrid gecapped wurden (Abb. 194). Dazu wurde das Trägermaterial 5min lang mit 1ml Acetanhydrid in THF bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Reaktion wurde mit 3x 1ml ACN gewaschen und der Träger an der Luft getrocknet.

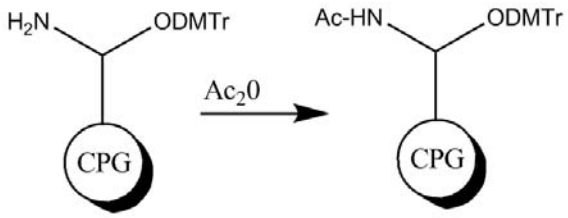


Abb. 194: schematische Darstellung des Capping der evt. noch vorhandenen freien Aminogruppen

Für die folgenden Oligonukleotidsynthesen wurden von jedem Träger jeweils 6mg (ca. 0,2µmol) abgewogen und in Synthesekartuschen überführt.

Als Testsequenz wurde 5´-TATATATATATATATA-3´ ($(TA)_8$) ausgewählt. Die Synthese erfolgte nach Standard-Basenkopplungsprotokollen des Synthesizers für Thiophosphate im 0,2µmol-Maßstab, wobei die Trityl-Gruppe zur späteren Aufreinigung am 5´-Ende verblieb (DMT-on). Die Abspaltung vom Support erfolgte mit jeweils 200µl konz. Ammoniak 20 Stunden lang bei 55°C (Abb. 195).

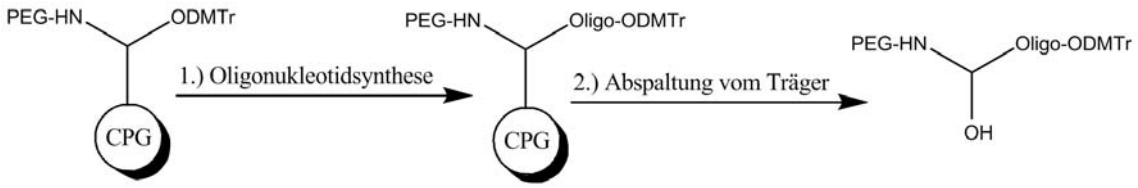


Abb. 195: schematische Darstellung der Oligonukleotidsynthese und der Trägerabspaltung

Nach der Abspaltung wurde der Ammoniak im Speedvac abgezogen und die Rückstände in jeweils 50µl 0,1M TEAA pH7,5 gelöst.
Die Abtrennung der verkürzten Sequenzen erfolgte mittels prep. RP-HPLC (Abb. 196).

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

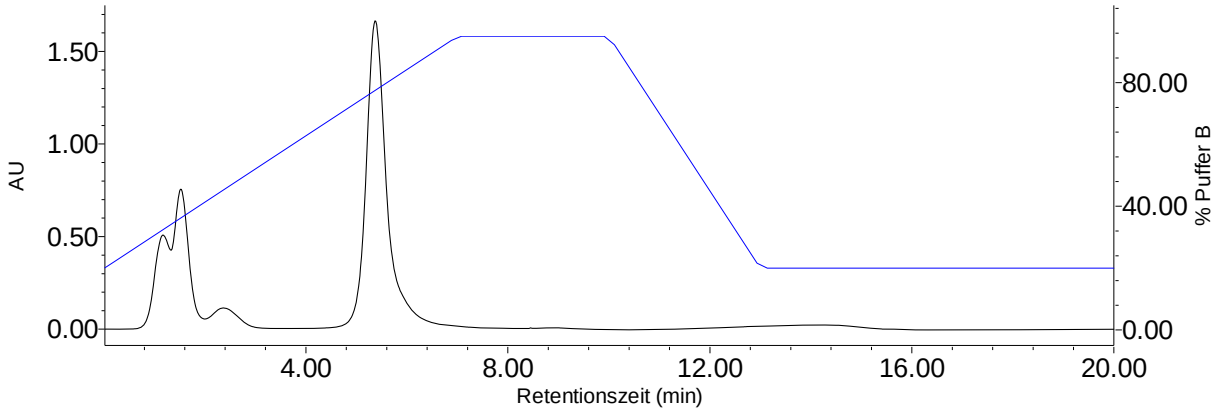


Abb. 196: RP-HPLC der abgespaltenen Testsequenzen (am Beispiel von B1)

Die verkürzten Sequenzen eluieren in Abb. 196 bereits bei < 2min, währen die Sequenzen mit hydrophober Trityl-Gruppe bei allen 6 Ansätzen eine Retentionszeit von 5-6min aufweisen. Die Produktpeaks wurden aufgefangen und die Eluate im Speedvac getrocknet.
Nach der Trocknung erfolgte die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe durch Einwirkung von jeweils 200µl 80%iger Essigsäure über einen Zeitraum von 30min bei Raumtemperatur (Abb. 197). Die Essigsäure sowie die abgespaltene DMT-Gruppe wurden schließlich über eine NAP- Säule abgetrennt (s. Kapitel 6.4.4.3).

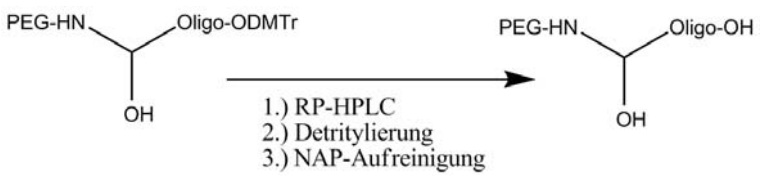


Abb. 197: schematische Darstellung der Aufreinigung der Testsequenzen

Eine photometrische Quantifizierung ergab für die einzelnen Ansätze:

A1: 34nmol (17% bezügl. Trägereinwaage)
A2: ging durch eine Fehlfunktion der HPLC verloren
B1: 34nmol (17% bezügl. Trägereinwaage)
B2: 25nmol (13% bezügl. Trägereinwaage)
C1: 44nmol (22% bezügl. Trägereinwaage)
C2: 34nmol (17% bezügl. Trägereinwaage)

Die relativ niedrigen Ausbeuten sind in erster Linie auf Verluste während der Oligonukleotidsynthese mit Standard-Protokollen zurückzuführen. Auch sind die herstellerseitigen Angaben über die Trägerbeladung oftmals zu hoch.

Durch die DMT-on Aufreinigung über RP-HPLC konnten die verkürzten von den vollständigen Sequenzen abgetrennt werden. Jedoch sind nicht alle vollständigen Sequenzen auch am 3´-Ende mit PEG derivatisiert worden, da die Umsetzung der trägergebundenen 3´-Aminogruppe am Anfang nicht vollständig war bzw. an einigen Positionen des Trägers überhaupt keine Aminogruppen vorhanden waren. Daher liegt nun ein Gemisch aus folgenden Sequenzen vor:

5´-HO-Oligo-NH-PEG
5´-HO-Oligo-NH_2
5´-HO-Oligo-OH

Die PEG-derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphate unterscheiden sich jedoch in ihrer Retentionszeit von den nicht derivatisierten Sequenzen, wodurch eine Analyse und Aufreinigung über eine RP-HPLC Säule mit hoher Trennleistung möglich ist.
Für eine analytische RP-HPLC wurden jeweils 5µl der einzelnen Ansätze aufgetragen (Abb. 198 bis Abb. 200).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

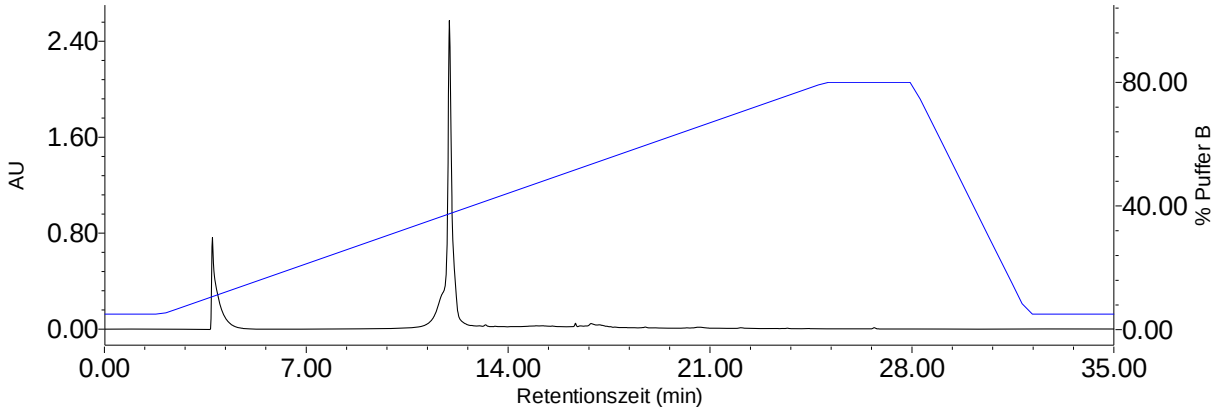


Abb. 198: RP-HPLC des Ansatzes A1 der Sequenz $(TA)_8$-NH_2

Ansatz A1 liefert in Abb. 198 einen einzelnen Peak der nicht derivatisierten Sequenz bei ca. 12min. Dies war nicht anders zu erwarten, da hier keine Derivatisierung des Trägers erfolgt ist. Das oft auftretende scheinbare Signal bei 4min wird durch Luftblasen bei der Injektion der Probe in die HPLC-Anlage verursacht (Injektionspeak).

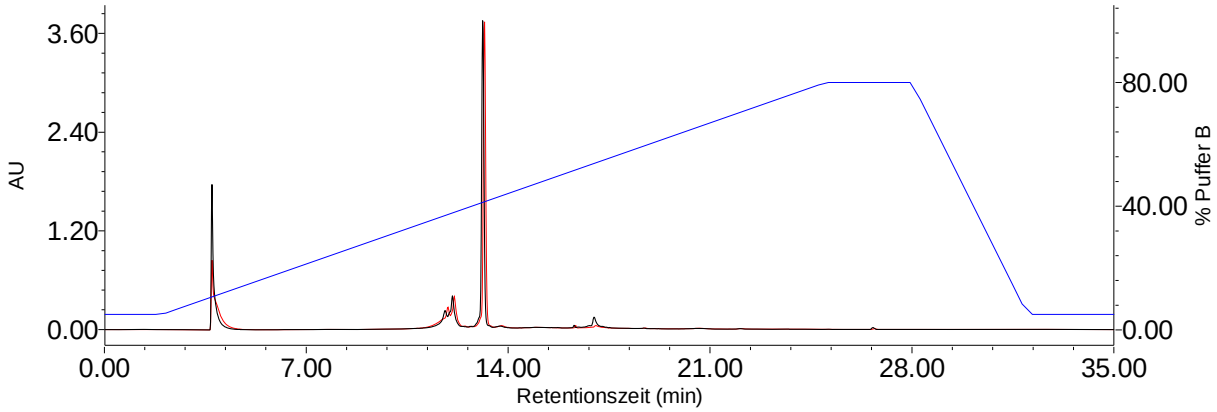


Abb. 199: RP-HPLC des Ansatzes B1(schwarz) und B2 (rot) der Sequenz $(TA)_8$-mPEG400

Die Ansätze B1 und B2 liefern in Abb. 199 einen Peak der mPEG-400 derivatisierten Sequenz bei ca. 13min (70% Peakfläche) und der nicht derivatisierten Sequenz bei ca. 12min (30% Peakfläche).

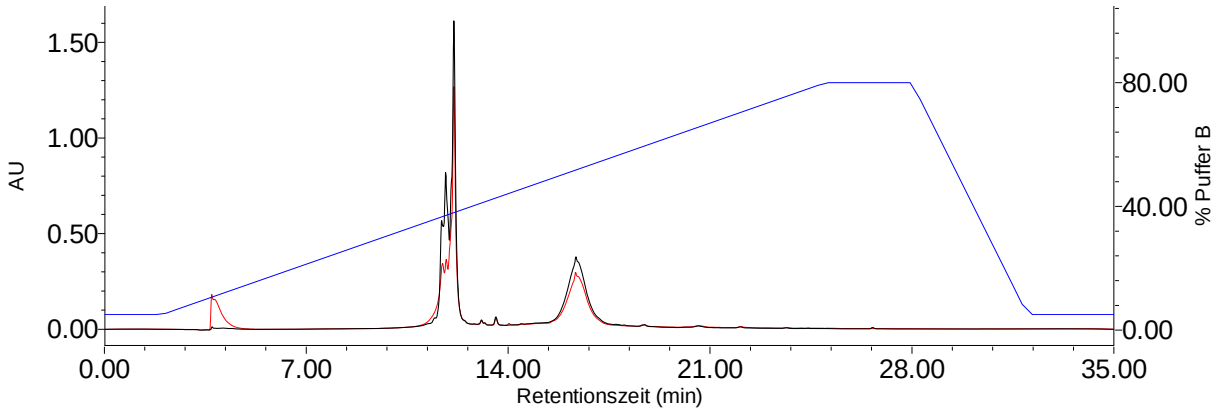


Abb. 200: RP-HPLC des Ansatzes C1 (schwarz) und C2 (rot) der Sequenz $(TA)_8$-mPEG2000

Die Ansätze C1 und C2 liefern in Abb. 200 einen Peak der mPEG-2000 derivatisierten Sequenz bei ca. 16-18min (40% Peakfläche) und der nicht derivatisierten Sequenz bei ca. 12min (60% Peakfläche).
Ein zusätzlicher Capping-Schritt vor der Oligonukleotidsynthese bringt somit keine Verbesserung der Synthesequalität mit sich, da die Chromatogramme der gecappten und der nicht gecappten Ansätze weitgehend identisch sind.
Der Anteil an derivatisierten Sequenzen liegt im Falle der mPEG400-Derivatisierung bei ca. 70%, während er bei den mPEG2000-derivatisierten Sequenzen nur ca. 40% beträgt. Dies ist insofern einleuchtend, da die Reaktion sehr nahe an der Trägeroberfläche stattfindet und die sterische Hinderung bei mPEG2000 wesentlich höher ist als bei mPEG400.
Für die Synthese eines beidseitig derivatisierten Produkts bietet es sich daher an, die trägergebundene 3´-Derivatisierung mit dem sterisch weniger gehinderten mPEG400 durchzuführen und später nach der Abspaltung und Aufreinigung das mPEG2000 in Lösung anzukoppeln.

Zu diesem Zweck wurden 100mg 3´-Amino-Modifier C7 CPG abgewogen (entspricht ca. 5µmol bei einer angegebenen Beladung von 50µmol/g), die Aminogruppen durch Fmoc-Entschützung mittels Piperidin freigesetzt und der Fmoc-entschützte Support im Argon-Strom getrocknet.
Die 3´-Derivatisierung erfolgte mit einem 15fachen Überschuss an mPEG400-NHS (60µmol) in 600µl DMF / 25µl DIPEA über einen Zeitraum von 2 Stunden bei 37°C und 200rpm im

Brutschrank. Nach der Reaktion wurde der Support mit 3x 5ml DMF, 3x 5ml ACN sowie 3x 5ml DCM gewaschen und erneut im Argonstrom getrocknet.

Mit 29mg (1,45µmol) des mPEG400-derivatisierten Supports wurde eine Oligonukleotidsynthese der Sequenz H_2N-ONT1 nach modifizierten Basenkopplungs-protokollen (doppelte Kopplungszyklen) durchgeführt (s. Kap. 6.2.1). Im letzten Kopplungsschritt wurde ebenfalls mit einem doppelten Kopplungszyklus ein 5´-AminoModifier C6 angebracht und die MMT-Gruppe für die weitere Aufreinigung am 5´-Ende belassen. Die Abspaltung vom Träger erfolgte in 700µl konz. Ammoniak 17h lang bei 40°C. Die ammoniakalische Lösung des abgespaltenen Oligonukleotid-Thiophosphats wurde mit Wasser auf 3ml verdünnt und zur Abtrennung der verkürzten Sequenzen über eine PolyPak-Kartusche aufgereinigt und detrityliert (s Kapitel 6.4.5).

Eine photometrische Quantifizierung (s. Kap. 6.5) des Eluats ergab eine Stoffmenge von 340nmol was einer Ausbeute von 23% bezüglich der Trägereinwaage entspricht. Die relativ geringe Ausbeute ist neben einer zu hohen Angabe für die Trägerbeladung im Wesentlichen auf unvollständige Kopplungen der Nukleotide sowie auch des 5´-Aminolinkers zurückzuführen.
Die eluierten Sequenzen der kompletten Länge sind allerdings nicht alle am 3´-Ende mit mPEG400 derivatisiert worden. Um eine Aussage über den Anteil an nicht derivatisierten Sequenzen zu bekommen, wurde mit 10nmol eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 201).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

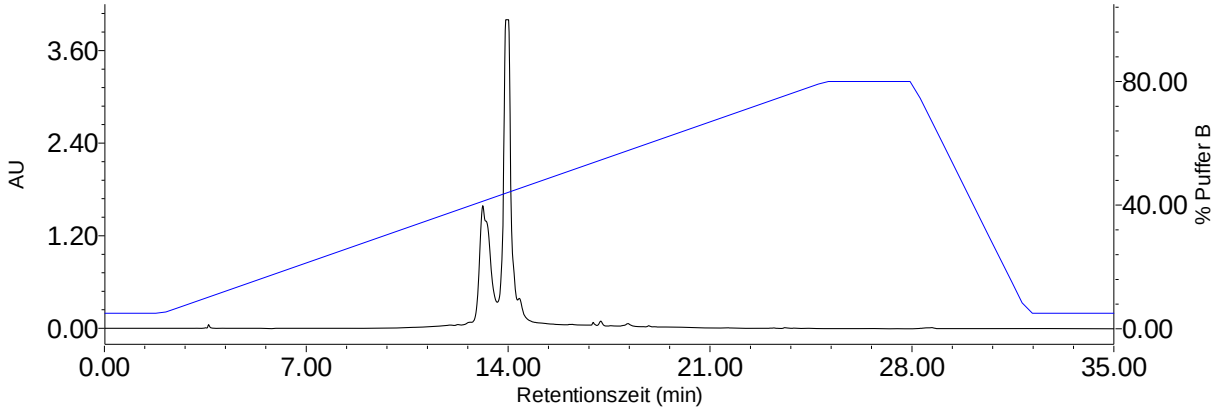


Abb. 201: RP-HPLC des PolyPak-Eluats mit einem Doppelpeak verursacht durch derivatisierte und nicht derivatisierte Sequenzen

Neben den mPEG400-derivatisierten Sequenzen der kompletten Länge bei 13,9min, welche 65% der Gesamtpeakfläche ausmachen, sind in Abb. 201 auch in großer Menge nicht derivatisierte Sequenzen bei 13,1min vorhanden. Diese Sequenzen besitzen keine mPEG400-Derivatisierung am 3´-Ende, wohl aber eine Aminofunktion am 5´-Ende. Sie müssen daher für den weiteren Verlauf der Synthese abgetrennt werden.

Das PolyPak-Eluat wurde daraufhin im Speedvac getrocknet, in jeweils 200µl Wasser gelöst und über preparative RP-HPLC aufgereinigt (Abb. 202).

- Säule: Phenomenex PolymerX RP1 100Å 10x250mm
- Gradient: 10bis30Proz_6ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

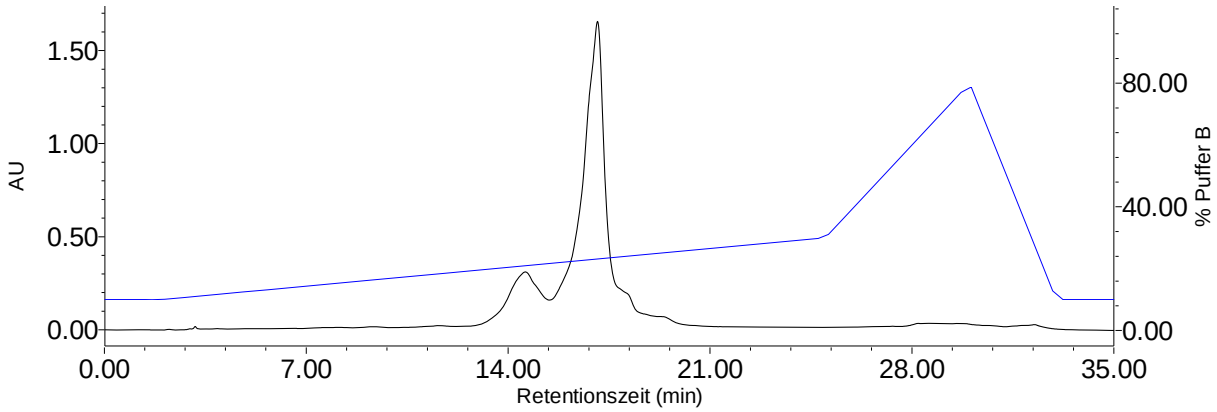


Abb. 202: prep. RP-HPLC zur Abtrennung der nicht derivatisierten Sequenzen von den mPEG400-derivatisierten Sequenzen

Der Peak bei 16-18min in Abb. 202 wurde aufgefangen und die Eluate der einzelnen Läufe vereinigt. Die Quantifizierung ergab eine Ausbeute von 175nmol, was ca. 50% der aufgetragenen 340nmol an Gesamtsequenzen und somit ca. 80% der vorhandenen derivatisierten Sequenzen entspricht.
Es lagen insgesamt 25ml Eluat vor, welches über Ultrafiltration mit einem MWCO von 1kDa bei einem Argondruck von 4bar aufkonzentriert und im Speedvac getrocknet wurde.
Nach der Ultrafiltration waren noch 154nmol an 3´-mPEG400 derivatisiertem Produkt vorhanden, von denen 3nmol für eine analytische RP-HPLC zur Reinheitskontrolle verwendet wurden (Abb. 203).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

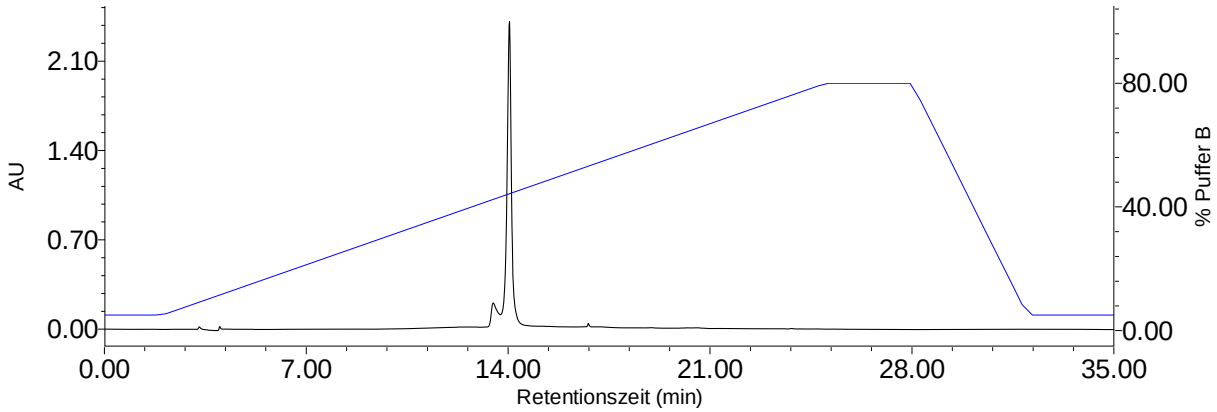


Abb. 203: analyt. RP-HPLC der abgetrennten, mPEG400-derivatisierten Sequenz

Das mPEG400-derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphat eluiert in Abb. 203 bei 14min, wobei noch eine leichte Verunreinigung mit nicht derivatisierten Sequenzen bei 13,4min zu

erkennen ist. Diese ist mit < 10% jedoch klein und kann durch späteres Auffangen des Produktpeaks während der preparativen RP-HPLC noch weiter verringert werden.

Zur Umsetzung des freien 5´-Endes mit mPEG2000-NHS wurden die getrockneten 150nmol des 3´-mPEG400-derivatisierten Produkts in 150µl 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5 gelöst und portionsweise mit einem 30fachen Überschuss an mPEG2000-NHS (4,6µmol bzw. 9,8mg) versetzt. Die Reaktionsdauer betrug 2 Stunden bei 37°C.
Nach 6 Stunden wurde ein Aliquot von 5nmol entnommen und eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 204).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

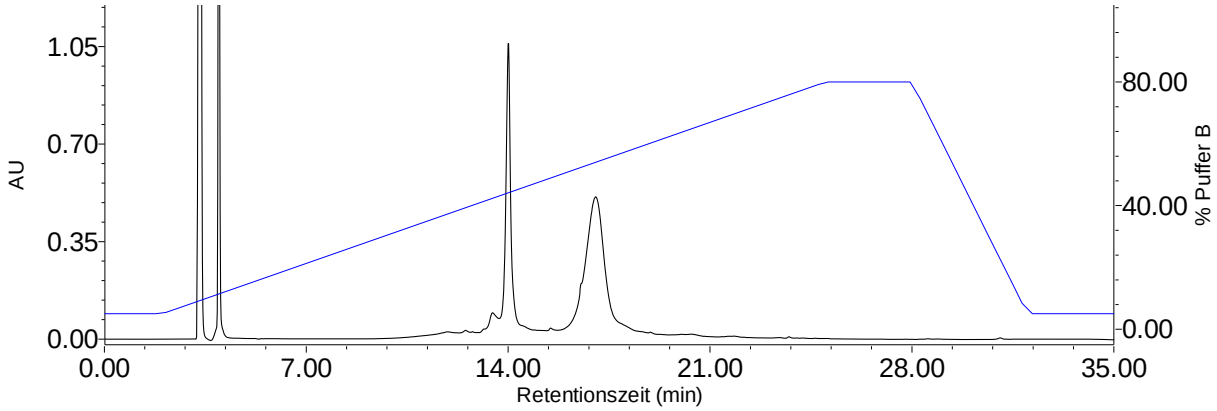


Abb. 204: analyt. RP-HPLC des Reaktionsansatzes zur mPEG2000-Derivatisierung

Das beidseitig derivatisierte Produkt eluiert in Abb. 204 bei 16-18min, während bei 14min noch eine große Menge an nur einseitig mPEG400-derivatisierten Sequenzen zu erkennen ist (40% der Gesamtpeakfläche). Eine weitere Zugabe von mPEG2000-NHS und eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 20 Stunden führten jedoch zu keinem höheren Umsatz.
Das bedeutet, dass 40% der zuvor aufgereinigten Sequenzen zwar eine mPEG400-Derivatisierung am 3´-Ende aufweisen, jedoch keine Aminofunktion am 5´-Ende besitzen. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die PolyPak-Aufreinigung zurückzuführen, bei der scheinbar auch Sequenzen ohne Trityl-Gruppe gebunden und zusammen mit den aminofunktionalisierten Produkten eluiert wurden.
Der Reaktionsansatz wurde im Speedvac getrocknet und der Rückstand in 200µl Wasser gelöst. Die Aufreinigung erfolgte über RP-HPLC mit einer analytischen Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm Säule mit dem gleichen Gradienten, der auch zur analytischen Untersuchung verwendet wurde (Abb. 205).
Aufgrund der für diese Säule relativ großen Auftragemenge von 150nmol wurde jedoch ein preparativer Detektor mit größerer Durchflußzelle angeschlossen.
Um eine verlustreiche Umsalzung nach der HPLC-Aufreinigung zu vermeiden, wurde der TEAA-Puffer durch einen $NaHCO_3$-Puffer ersetzt.

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M $NaHCO_3$ pH 8,5
- Puffer B: Acetonitril

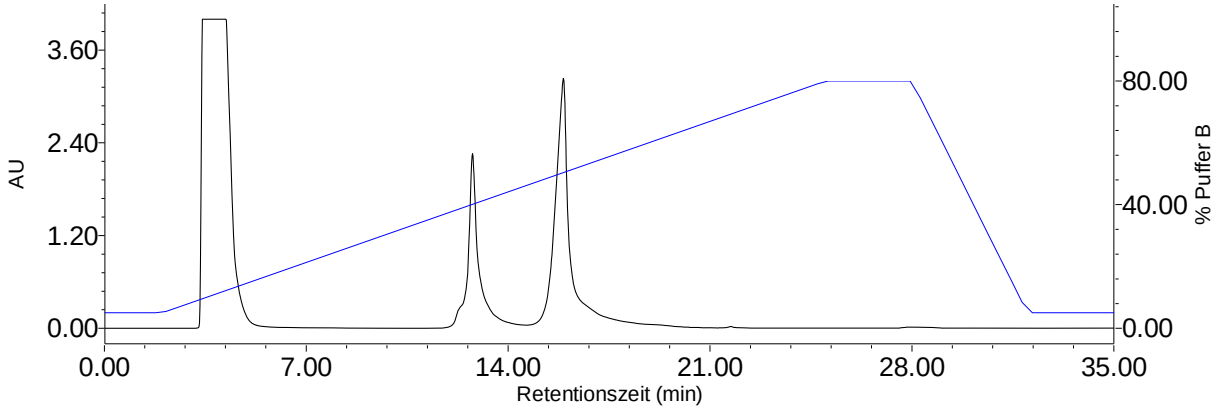


Abb. 205: RP-HPLC zur Abtrennung des beidseitig derivatisierten Endprodukts

Der Produktpeak bei 16-18min in Abb. 205 wurde aufgefangen. Eine Quantifizierung des Eluats ergab eine Stoffmenge von 50nmol, was 33% der ursprünglich eingesetzten 150nmol an einseitig derivatisiertem Produkt entspricht.
Das Eluat wurde über Ultrafiltration (MWCO = 1kDa, 4bar Ar) aufkonzentriert und durch fünfmaliges Waschen mit je 10ml Wasser entsalzt.

Nach der Ultrafiltration waren noch 32nmol an beidseitig derivatisiertem Produkt vorhanden. Dies entspricht nur noch 2% Ausbeute bezüglich der Trägereinwaage, was aber teilweise dadurch zu erklären ist, dass bei diesem Synthesedurchgang sehr viel Material für analytische Testläufe verbraucht wurde. Auch sind die Verluste bei der Arbeit mit geringen Substanzmengen zwangsläufig höher als bei der Arbeit mit größeren Mengen.
Für eine großtechnische, universelle Synthesemethode beidseitig asymmetrisch PEG-derivatisierter Oligonukleotid-Thiophosphate erweist sich diese Strategie jedoch, nicht zuletzt aufgrund der fehlenden Flexibilität bei der 3´-Derivatisierung, als eher ungeeignet.

4.2.3.2. Postsynthetische trägergebundene 5´-Derivatisierung mittels PEG-Amidit

Eine einfache Möglichkeit, den 5´-Terminus eines Oligonukleotids mit Polyethylenglykol zu derivatisieren, besteht in der direkten Verwendung eines Polyethylenglykol-Phosphorigsäureesteramids als letzten Synthesebaustein der Festphasensynthese (Abb. 206). Die Oligonukleotidsynthese findet dabei auf einem Aminoträger statt, um eine 3´-Aminogruppe für eine spätere 3´-Derivatisierung mittels PEG-NHS zu ermöglichen. Diese PEG-Phosphorigsäureesteramide sind allerdings nur in einer begrenzen Auswahl kommerziell verfügbar und auch relativ kostspielig.

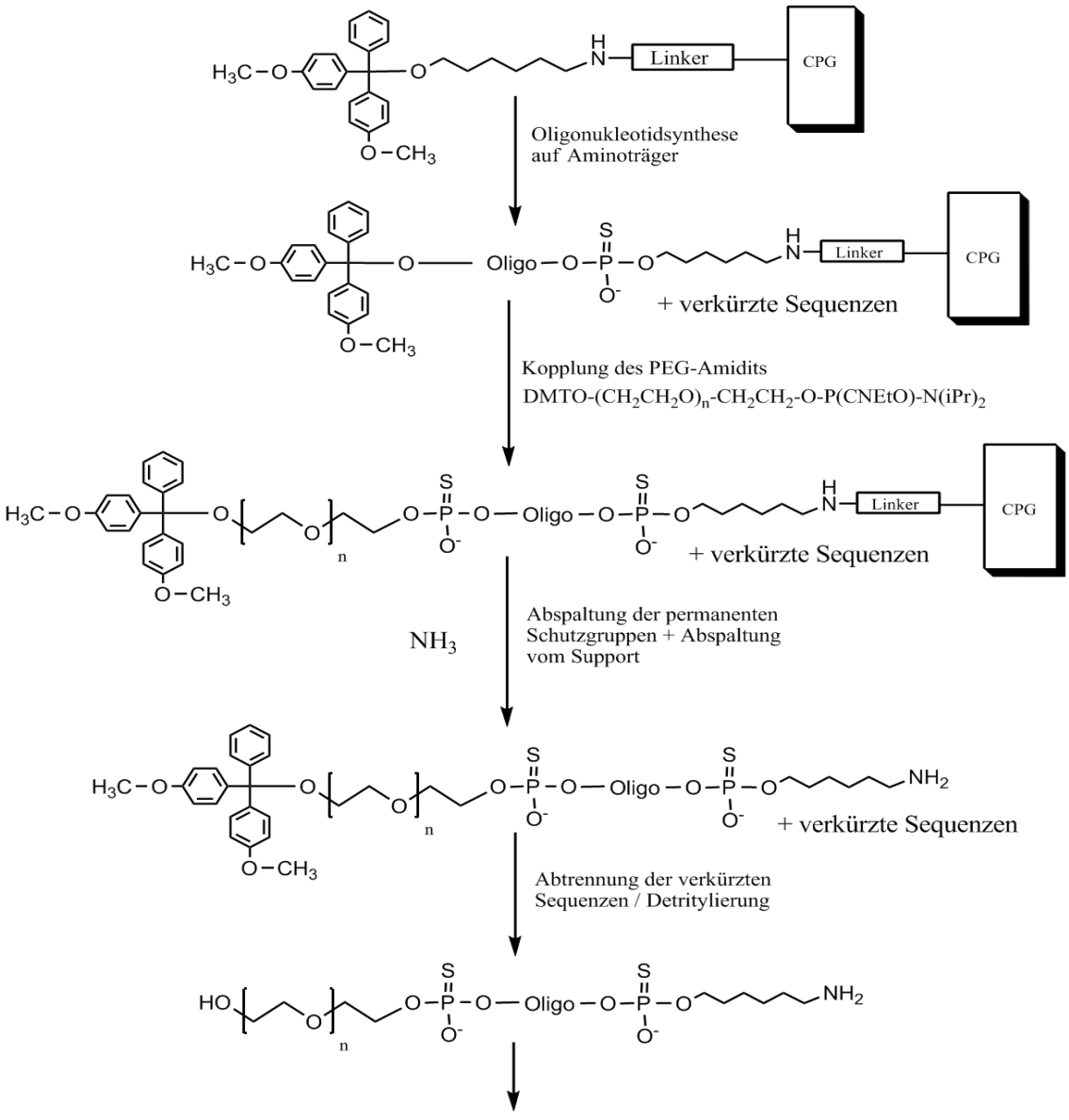


Abb. 206: Prinzip der Derivatisierung mittels eines PEG-Phosphorigsäureesteramids

Um die prinzipielle Anwendbarkeit dieser Methode zu testen, soll für eine PEG2000-Derivatisierung am 5´-Ende eines Oligonukleotid-Thiophosphats das *Polyethyleneglycol 2000 CED* Phosphorigsäureesteramid (Abb. 207) der Firma ChemGenes zum Einsatz kommen.

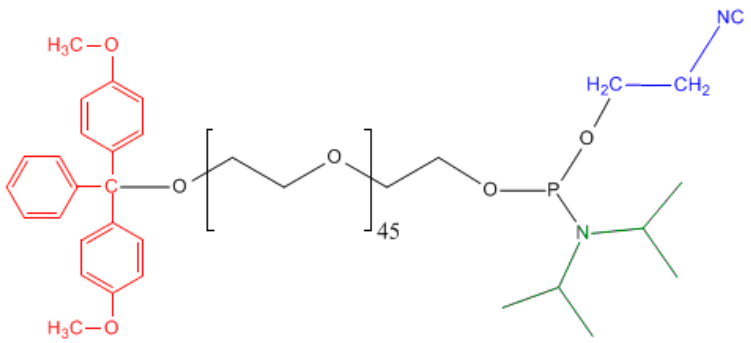


Abb. 207: Polyethylenglycol 2000 CED Phosphorigsäureesteramid der Firma ChemGenes

Aufgrund der sterischen Hinderung durch die lange Polyethylenglykolkette sollte laut Hersteller ein modifiziertes Kopplungsprotokoll mit verlängertem Kopplungszyklus verwendet werden. Dazu wurde ein Kopplungsprotokoll für den Expedite 8909 DNA-Synthesizer entwickelt, welches 2 verlängerte Kopplungszyklen von je 15min Dauer und einen 20fachen Überschuss an Phosphorigsäureesteramid beinhaltet (Abb. 208).

```
/* ------------------------------------------------------------------------------ */
/*      Function          Mode  Amount Time(sec)       Description          */
/*                        /Arg1   /Arg2                    */
/* ------------------------------------------------------------------------------ */
$Deblocking
 144 /*Index Fract. Coll.  */ NA        1     0  "Event out ON"
  0 /*Default           */ WAIT      0   1.5  "Wait"
 141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA        1     1  "START data collection"
  16 /*Dblk              */ PULSE     10     0  "Dblk to column"
  16 /*Dblk              */ PULSE     50    49  "Deblock"
  38 /*Diverted Wsh A     */ PULSE     40     0  "Flush system with Wsh A"
 141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA        0     1  "STOP data collection"
  38 /*Diverted Wsh A     */ PULSE     40     0  "Flush system with Wsh A"
 144 /*Index Fract. Coll.  */ NA        2     0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh              */ PULSE      5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act              */ PULSE      5     0  "Flush system with Act"
  22 /*5 + Act          */ PULSE      4     0  "Monomer + Act to column"
  22 /*5 + Act          */ PULSE      4   180  "Couple monomer"
   2 /*Act              */ PULSE      4   300  "Couple monomer"
   1 /*Wsh              */ PULSE      7   225  "Couple monomer"
   1 /*Wsh              */ PULSE     20     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act              */ PULSE      5     0  "Flush system with Act"
  22 /*5 + Act          */ PULSE      4     0  "Monomer + Act to column"
  22 /*5 + Act          */ PULSE      4   180  "Couple monomer"
   2 /*Act              */ PULSE      4   300  "Couple monomer"
   1 /*Wsh              */ PULSE      7   225  "Couple monomer"
   1 /*Wsh              */ PULSE      8     0  "Flush system with Wsh"
$Oxidizing
  12 /*Wsh A            */ PULSE     30     0  "Flush system with Wsh A"
  17 /*Aux              */ PULSE     15     0  "Aux to column"
  17 /*Aux              */ PULSE     20   120  "Aux"
  12 /*Wsh A            */ PULSE      6    60  "Slow pulse to thioate"
  12 /*Wsh A            */ PULSE     30     0  "Flush system with Wsh A"
```

Abb. 208: Geräteprotokoll des Expedite 8909 DNA-Synthesizers zur Kopplung des Polyethyleneglycol 2000 CED Phosphorigsäureesteramids (Änderungen sind gelb unterlegt)

Die 100µmol des, in Form einer öligen Substanz vorliegenden, Phosphorigsäureesteramids wurden in einer Mischung aus 335µl ACN und 335µl DCM gelöst, was einer Konzentration von 0,15M entspricht.
Zunächst erfolgten 2 Synthesen eines Oligonukleotid-Thiophosphats der Sequenz ONT1 im 1µmol-Maßstab auf Amino-ON CPG nach modifizierten Kopplungsprotokollen mit doppelten Kopplungszyklen. Erst nach Beendigung der Synthesen wurde in einem weiteren Schritt das *Polyethyleneglycol 2000 CED* Phosphorigsäureesteramid mit dem verlängerten Protokoll angekoppelt. Die Trägerabspaltung erfolgte in jeweils 700µl konz. Ammoniak während 16h bei 40°C.
Einer der beiden Syntheseansätze soll, wie bisher üblich, mittels RP-HPLC aufgereinigt werden. Für den anderen soll zur Zeitersparnis eine PolyPak-Kartusche zum Einsatz kommen.
Für die Aufreinigung über RP-HPLC wurde zunächst der Ammoniak im Speedvac abgezogen und die Probe zur Beibehaltung eines alkalischen Milieus in 200µl 0,1M TEAA pH7,5 gelöst. Der Lösung wurden 10nmol entnommen und eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 209).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

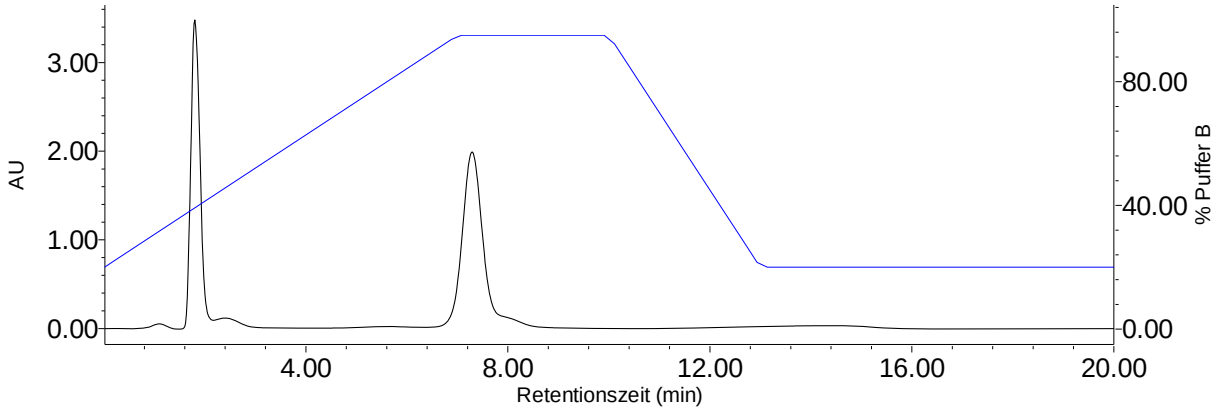


Abb. 209: RP-HPLC des mittels PEG2000 CED derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphats nach der Trägerabspaltung

Das Verhältnis von verkürzten Sequenzen (< 2min) zu den DMT-on Sequenzen mit PEG2000-Derivatisierung am 5´-Ende (ca. 6-8min) liegt in Abb. 15 bei etwa 50:50, was eine durchschnittliche Kopplungseffizienz bedeutet.
Die Retentionszeit der kompletten Sequenzen ist aufgrund der PEG2000-Derivatisierung und der Trityl-Gruppe von ca. 6min auf > 7min verschoben.
Nach der preparativen Abtrennung wurde das Eluat im Speedvac getrocknet und die noch vorhandene Trityl-Gruppe unter Einwirkung von 200µl 80%iger Essigsäure 30min lang bei Raumtemperatur abgespalten und über eine NAP-Säule aufgereinigt (s. Kapitel 6.4.4.3).
Die Quantifizierung ergab eine Ausbeute von 120nmol (12% bezüglich Trägereinwaage).

Die Aufreinigung über eine PolyPak-Kartusche erfolgte wie in Kapitel 6.4.5 beschrieben, wobei die detritylierten Sequenzen mit 50% ACN eluiert wurden.
Eine UV-Quantifizierung des PolyPak-Eluats ergab eine Ausbeute von 200nmol, was 20% bezüglich der Trägereinwaage entspricht.
Mit jeweils 5nmol der über HPLC aufgereinigten Substanz sowie des PolyPak-Eluats wurde eine analytische RP-HPLC vorgenommen (Abb. 210).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

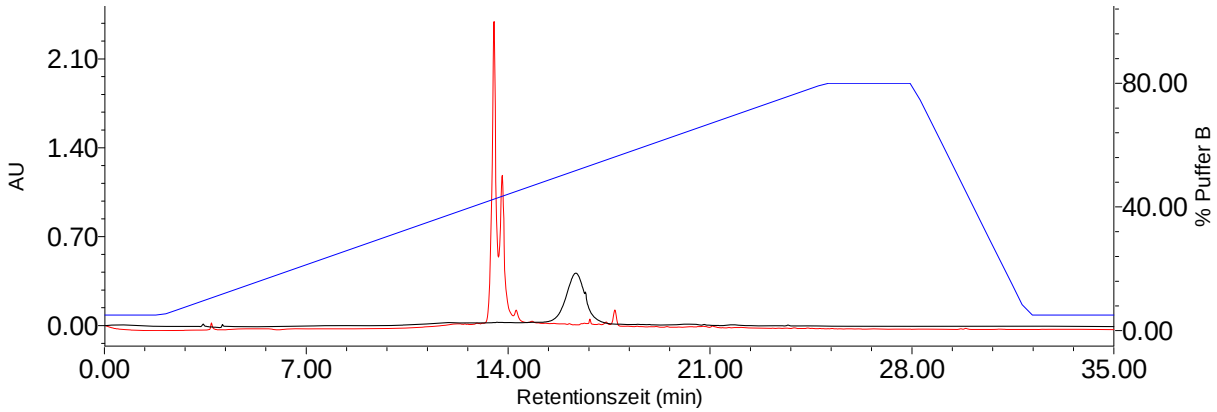


Abb. 210: RP-HPLC zur Reinheitskontrolle des mittels *Polyethyleneglycol 2000 CED* derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphats (schwarz: nach HPLC-Aufreinigung, rot: nach PolyPak-Aufreinigung)

Das über RP-HPLC aufgereinigte PEG2000-derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphat liefert in Abb. 210 einen einzelnen, polydispersen Peak bei ca. 16-18min (schwarz), während nach der PolyPak-Aufreinigung nur verkürzte, nicht derivatisierte Sequenzen bei ca. 14min zu finden sind (rot). Dies bedeutet, dass eine Aufreinigung über PolyPak-Kartuschen für PEG2000-derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphate nicht geeignet ist.
Mögliche Ursachen sind eine zu hohe Affinität der PEG2000-derivatisierten Sequenzen zum Säulenmaterial oder eine Abspaltung des Polyethylenglykols durch die zur Detritylierung verwendete 2%ige TFA. Tatsache ist jedoch, dass die Kopplung mit dem Polyethyleneglycol 2000 CED Phosphorigsäureesteramid, trotz anfänglicher Bedenken über eine mögliche sterische Hinderung, gut funktioniert und auch zu annehmbaren Kopplungsausbeuten führt.
Bei einer weiteren Derivatisierung des 3´-Endes mit mPEG400 würde sich allerdings, aufgrund der nicht vollständig vorhandenen 3´-Aminogruppen sowie der Polydispersität des PEG2000 am 5´-Ende, ein prinzipielles Trennproblem bei der weiteren Aufreinigung ergeben (s. Kapitel 4.2.3.3).

4.2.3.3. Postsynthetische trägergebundene 5´-Derivatisierung mittels PEG-NHS

Aufgrund der Beobachtung, dass mPEG2000-derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphate in der RP-HPLC ähnlich hohe Retentionszeiten aufweisen wie Oligonukleotid-Thiophosphate mit MMT-ähnlichen Schutzgruppen entstand die Idee, auf die labile MMT bzw. DMS(O)MT-Schutzgruppe (Abb. 114) komplett zu verzichten und die mPEG2000-Derivatisierung direkt als „Label“ zur Abtrennung von den verkürzten Sequenzen zu verwenden. Da Kopplungen mit einem mPEG2000-Phosphorigsäureesteramid gut funktionieren, sollte sich auch mPEG2000-NHS ähnlich gut mit einem trägergebundenen, 5´-aminofunktionalisierten Oligonukleotid umsetzen (Abb. 211).

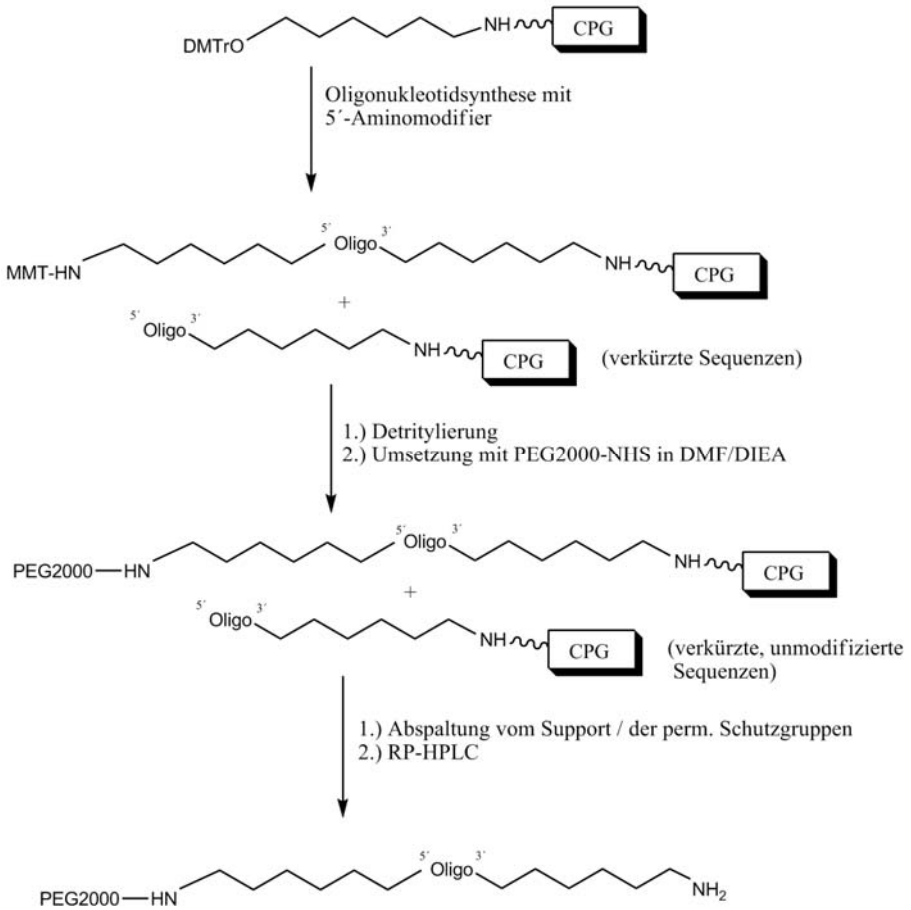


Abb. 211: Prinzip der postsynthetischen Derivatisierung eines Oligonukleotids mit mPEG2000-NHS

Dazu wurde eine Synthese der Sequenz ONT1 im 1µmol-Maßstab auf Amino-On CPG vorgenommen. Als Kopplungsprotokoll wurde das modifizierte Basenkopplungsprotokoll für Thiophosphate mit doppelten Kopplungszyklen verwendet (s. Kap. 6.2). Im letzten Zyklus wurde mittels eines verlängerten Kopplungsprotokolls (Abb. 115) ein 5´-MMT-Aminomodifier C5 (Glen Research) angebracht.
Nach Ende der Synthese wurde die Sequenz manuell mit 30 Zyklen 3% TFA in DCM noch am Synthesizer detrityliert (s. Kap. 6.2.2). Dabei war über mehrere Zyklen eine intensive Gelbfärbung, verursacht durch das MMT-Kation, zu beobachten.
Der Inhalt der Synthesekartusche wurde daraufhin getrocknet und jeweils 3mg (ca. 110nmol) des trägergebundenen Oligonukleotid-Thiophosphats mit einem 18x Überschuss (2µmol bzw 4mg) an mPEG2000-NHS 4h lang bei 37°C in verschiedenen Lösungsmitteln (Dimethylformamid und Acetonitril) umgesetzt.

A: mPEG2000-NHS + H_2N-ONT1-NH-**CPG** in 30µl DMF + 1,5µl DIPEA
B: mPEG2000-NHS + H_2N-ONT1-NH-**CPG** in 30µl ACN + 1,5µl DIPEA

→ mPEG2000-NH-ONT1-NH-**CPG**

Nach der Reaktion wurden die Trägermaterialien mit 4x 100µl ACN gewaschen und getrocknet. Die Abspaltung vom Support erfolgte innerhalb 17 Stunden mit jeweils 200µl konz. Ammoniak bei 40°C.
Nach der Abspaltung wurde der Ammoniak im Speedvac abgezogen, der Rückstand in jeweils 200µl Wasser gelöst und eine analytische RP-HPLC vorgenommen (Abb. 212).

- Säule: Amberchrom CG-300S
- Gradient: 20bis95Proz_1ml_20min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

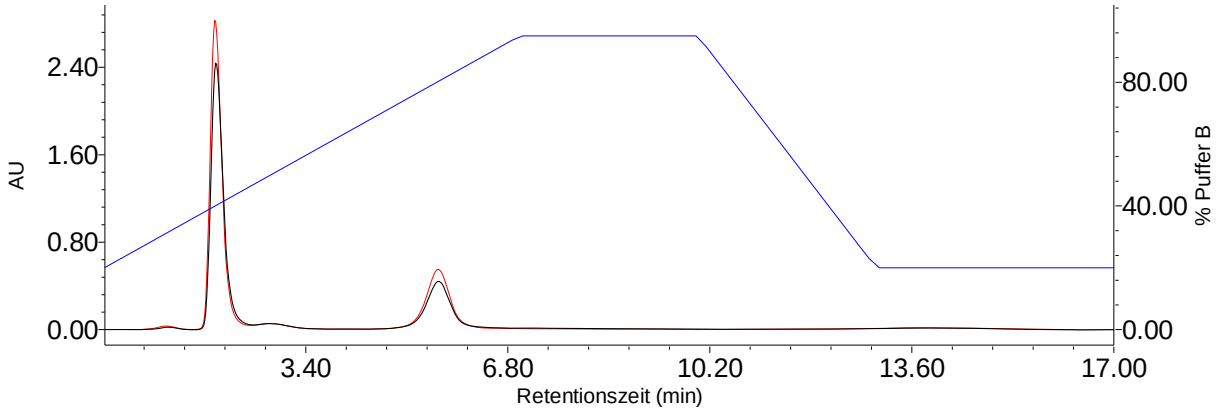


Abb. 212: RP-HPLC der noch auf dem Träger mit mPEG2000-NHS derivatisierten Sequenzen (schwarz: Umsetzung in ACN, rot: Umsetzung in DMF)

Die Umsetzungen des trägergebundenen Oligonukleotid-Thiophosphats mit mPEG2000-NHS verliefen in ACN und DMF etwa gleich gut und führten in Abb. 212 zu einem Peakverhältnis der nicht derivatisierten Sequenzen (ca. 2min) zu den mPEG2000-derivatisierten Sequenzen (5-6min) von ca. 3:1. Die relativ schlechte Ausbeute ist, neben einer sterischen Hinderung durch die lange PEG-Kette, auch auf die Verwendung des verlängerten Kopplungsprotokoll zur Kopplung des 5´-Aminomodifiers zurückzuführen (s. Kapitel 4.1.2).

Das restliche trägergebundene Oligonukleotid-Thiophosphat (ca. 1µmol) wurde daraufhin mit einem 10x Überschuss an mPEG2000-NHS (10µmol) in 150µl DMF (+ 7,5µl DIPEA) 4h lang bei 37°C umgesetzt, mit Ammoniak vom Träger abgespalten und über RP-HPLC aufgereinigt. Dies führte zu einer Ausbeute von ca. 100nmol an 5´-mPEG2000 derivatisiertem Produkt.
Im nächsten Schritt soll die noch freie 3´-Aminogruppe mit mPEG400-NHS umgesetzt werden, wobei zur Kontrolle eine kleine Menge auch am 3´-Ende mit mPEG2000 derivatisiert werden soll.

mPEG2000-NH-ONT1-NH_2 + mPEG400-NHS → mPEG2000-NH-ONT1-NH-mPEG400

Dazu wurde das getrocknete, einseitig 5´-derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphat in 3 Aliquote aufgeteilt und in 2 verschiedenen Lösungsmitteln umgesetzt.

a) 35nmol mPEG2000-NH-ONT1-NH_2 + 350nmol mPEG400-NHS
(1,4µl einer 250mM Lösung) in 50µl DMF / 2,5µl DIPEA → mP2000-ONT1-mP400

b) 35nmol mPEG2000-NH-ONT1-NH_2 + 350nmol mPEG400-NHS
(1,4µl einer 250mM Lösung) in 50µl ACN / 2,5µl DIPEA → mP2000-ONT1-mP400

c) 5nmol mPEG2000-NH-ONT1-NH_2 + 150nmol mPEG2000-NHS
(0,3µg) in 30µl DMF / 1,5µl DIPEA → mP2000-ONT1-mP2000

Die Reaktionsdauer betrug 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank. Nach Beendigung der Reaktion wurden von jedem Ansatz 2nmol entnommen und eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 213). Als Vergleich diente das einseitig mPEG2000-derivatisierte Zwischenprodukt.

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

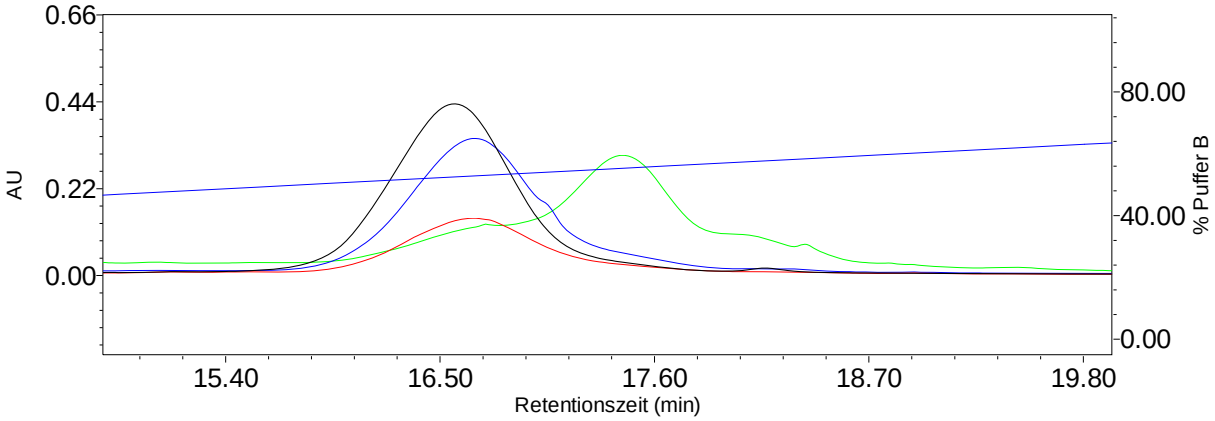


Abb. 213: Ausschnitt aus dem RP-HPLC Chromatogramm der beidseitig derivatisierten Sequenzen (a: blau, b: rot, c: grün, schwarz: einseitig mPEG2000-mod. Ausgangsprodukt)

Wie in Abb. 213 deutlich erkennbar, weisen die beiden gemischt derivatisierten Sequenzen aus den Umsetzungen a) und b) (blau und rot) annähernd die gleiche Retentionszeit auf (16-17min) wie das nur einseitig mPEG2000-derivatisierte Ausgangsprodukt (schwarz), was eine Abtrennung von am 3´-Ende unumgesetzten Edukten praktisch unmöglich macht. Das

beidseitig mPEG2000-derivatisierte Produkt aus Umsetzung c) hingegen eluiert bei einer wesentlich höheren Retentionszeit von 17-18min (grün).
Betrachtet man die beiden zur Derivatisierung verwendeten Polyethylenglykole genauer, so wird deutlich, dass eine Abtrennung auch theoretisch unmöglich ist. Das mPEG400 besteht aus 8 Monomereinheiten Ethylenglykol, das nur polydispers verfügbare mPEG2000 weist hingegen eine Polydispersität von mindestens D=1,07 auf was bei ca. 2000Da einer Massenunschärfe im Größenordnungsbereich von ebenfalls 8 Monomereinheiten entspricht. Aus diesem Grund überlappen sich die Molekülmassen von einseitig mPEG2000-derivatisiertem Zwischenprodukt und beidseitig derivatisiertem Endprodukt zwangsläufig, wodurch eine Trennung prinzipiell nicht möglich ist (Abb. 214).
Um diese Synthesemethode sinnvoll einsetzen zu können, muß also eine möglichst quantitative Umsetzung an der 3´-Aminofunktion stattfinden, um den Anteil an nicht-abtrennbaren einseitig derivatisierten Sequenzen im Endprodukt gering zu halten.
Wie allerdings in Kapitel 4.2.1 festgestellt, liegt bei Verwendung von Amino-On CPG die maximale Umsetzung am 3´-Ende bei ca. 75%. Dies bedeutet, dass zwangsläufig nach der Derivatisierung am 3´-Ende 25% Fehlsequenzen ohne PEG vorhanden sind. Aufgrund der Polydispersität des mPEG2000 ist es bei einer bereits erfolgten 5´-Derivatisierung mit mPEG2000 unmöglich, diese einseitig derivatisierten Fehlsequenzen vom beidseitig derivatisierten Zielprodukt abzutrennen. Um quantitativ ein Produkt zu erhalten, welches definierte beidseitige Derivatisierungen trägt, ist es demnach notwendig, die erste (trägergebundene) Umsetzung mit dem monodispersen mPEG400-NHS vorzunehmen. Erst nach der Aufreinigung dieses einseitig derivatisierten Produkts kann die Umsetzung des anderen Endes mit dem polydispersen mPEG2000-NHS in Lösung erfolgen. Auf diese Weise sind nach der unvollständigen 3´-Derivatisierung mit mPEG2000 lediglich einseitig mPEG400-derivatisiertes Oligonukleotid-Thiophosphat vom beidseitig derivatisierten Zielprodukt abzutrennen, was über RP-HPLC kein Problem darstellt (Abb. 214).

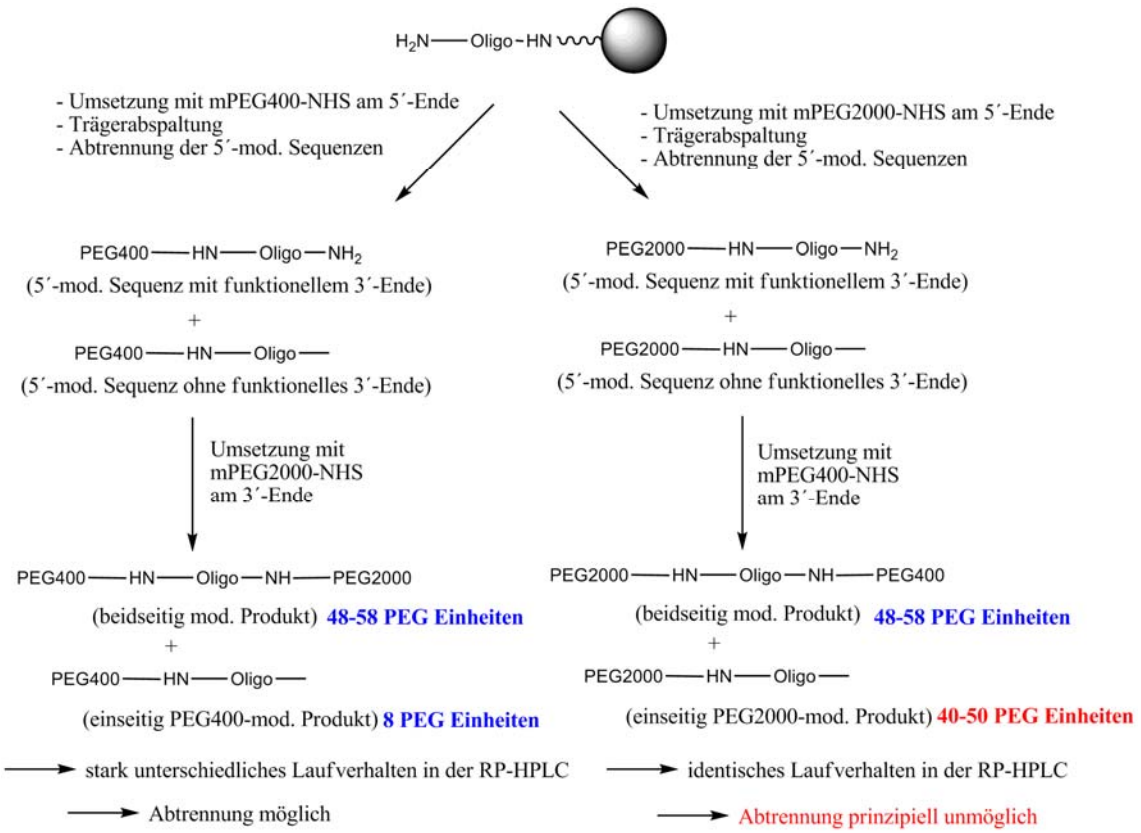


Abb. 214: das Polydispersitätsproblem bei der postsynthetischen TrägerDerivatisierung

4.2.3.4. Postsynthetische trägergebundene 5´-mPEG400 und 3´-mPEG2000 Derivatisierung

Da Polyethylenglykole mit einer Molekülmasse von 2000Da und größer nur in polydisperser Form verfügbar sind, muß die erste (trägergebundene) Umsetzung mit dem monodispersen mPEG400 erfolgen. Ansonsten würden sich, aufgrund der geringen Masse des mPEG400-Substituenten, die polydispersen Molekülmassen des beidseitig derivatisierten Endprodukts mit dem unumgesetzten, einseitig mPEG2000-derivatisierten Zwischenprodukt überschneiden (Abb. 214). Dies würde eine Abtrennung unmöglich machen. Damit ergibt sich, aufgrund der standardmäßigen 3´-5´-Syntheserichtung in der Oligonukleotidsynthese ein Endprodukt, welches eine mPEG400-Derivatisierung am 5´-Ende und eine mPEG2000-Derivatisierung am 3´-Ende trägt. Ein weiterer Vorteil, das noch trägergebundene Oligonukleotid-Thiophosphat zuerst mit mPEG400-NHS umzusetzen, liegt auch in der, im Gegensatz zum mPEG2000, wesentlich geringeren sterischen Hinderung des mPEG400. Dies führt bereits im ersten Schritt zu einer wesentlich höheren Ausbeute. Die im Kapitel 4.2.3.3 entwickelte und nun zur Anwendung kommende Synthesestrategie ist in Abb. 215 schematisch dargestellt.

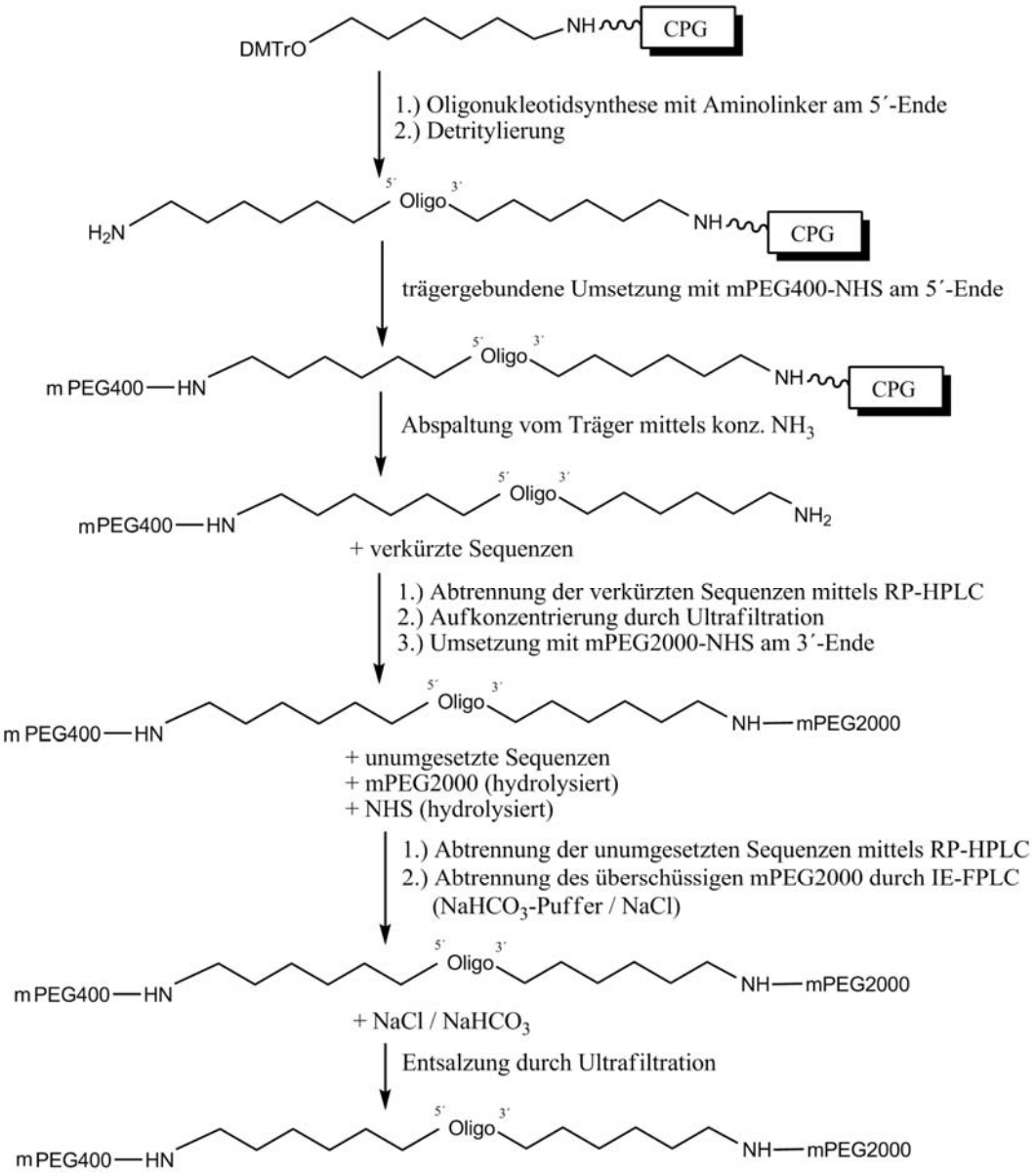


Abb. 215: schematische Darstellung der Synthesestrategie zur 5´-mPEG400 und 3´-mPEG2000 Derivatisierung eines Oligonukleotids

Oligonukleotidsynthese

Die Synthese der Sequenz ONT1 erfolgte auf einem Expedite 8909 DNA/RNA-Synthesizer als Oligonukleotid-Thiophosphat nach einem modifizierten Kopplungsprotokoll mit doppelten Kopplungszyklen auf Amino-ON CPG (Abb. 216). Im letzten Schritt wurde ebenfalls mit einem doppelten Kopplungszyklus der 5´-Aminomodifier angebracht. Nach Beendigung der Synthese wurden die Ansätze noch auf dem Synthesizer durch 30 Zyklen mit 3% Trichloressigsäure in Dichlormethan detrityliert (s. Kap. 6.2.2). Aufgrund der, durch die abgespaltene MMT-Schutzgruppe hervorgerufenen, Gelbfärbung kann bereits hier eine Aussage über die zu erwartende Ausbeute gemacht werden.

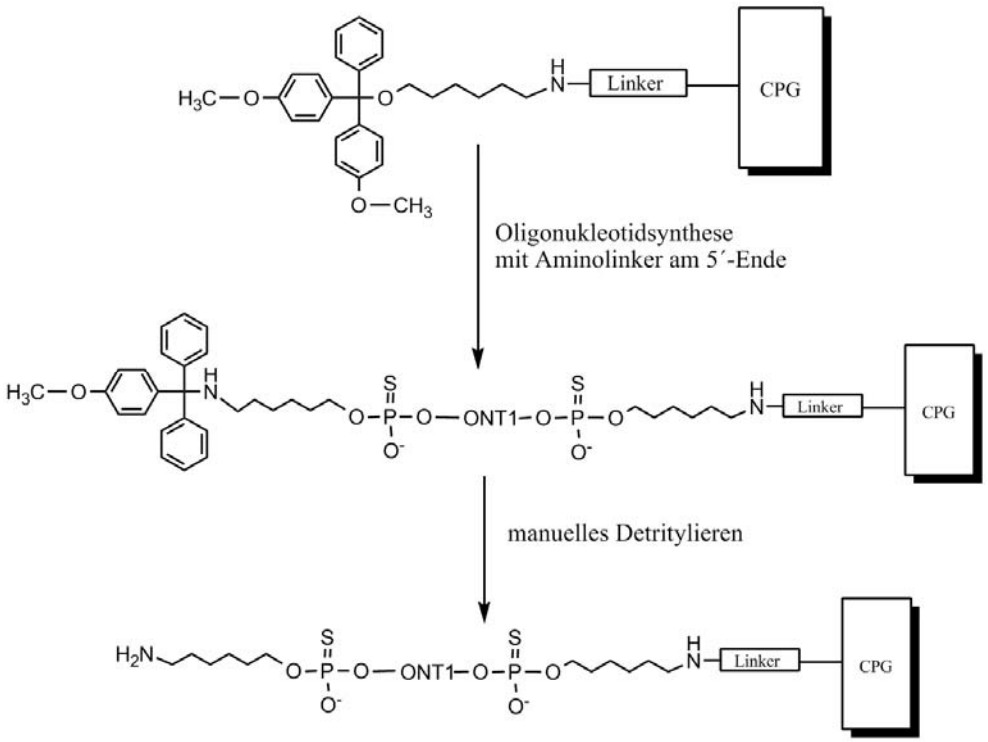


Abb. 216: Oligonukleotidsynthese mit 5´-Aminomodifier

Es erfolgten insgesamt 18 Synthesen mit einer Trägereinwaage von jeweils 2µmol. Zur weiteren Verwendung wurde das Trägermaterial aus den Synthesekartuschen entnommen und getrocknet.

Derivatisierung des 5´-Endes mit mPEG400-NHS

Die Umsetzung der freien 5´-Aminogruppe des trägergebundenen Oligonukleotid-Thiophosphats erfolgte unter alkalischen Bedingungen (Hilfsbase) mit einem 5fachen Überschuss an mPEG400-NHS (Abb. 217). Dazu wurde der getrocknete Support mit der entsprechenden Menge einer 250mM mPEG400-NHS Lösung in DMF versetzt und mit trockenem DMF auf das doppelte Volumen aufgefüllt.

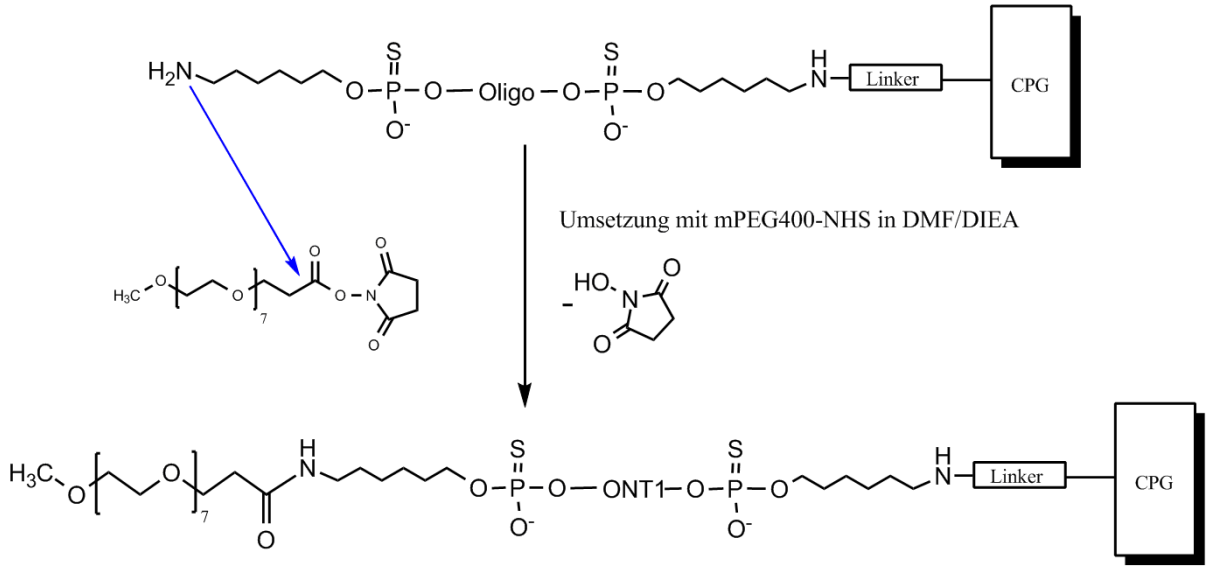


Abb. 217: Trägergebundene Umsetzung des 5´-Endes mit mPEG400-NHS

Die Reaktion erfolgte innerhalb 90min bei 37°C, wobei die Ansätze mit 100rpm bewegt wurden, um für eine gleichmäßige Durchmischung zu sorgen. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze zur Entfernung des überschüssigen hydrolysierten mPEG400 sowie des hydrolysierten NHS 5x mit einer Menge von ca. 100µl Acetonitril pro µmol Trägereinwaage gewaschen.
Die Abspaltung vom Support sowie die Abspaltung der noch vorhandenen permanenten Basenschutzgruppen der Oligonukleotidsynthese erfolgte mittels konzentrierten Ammoniaks während 10h bei 55°C (Abb. 218). Pro µmol Trägereinwaage wurden 200µl konz. Ammoniak verwendet.

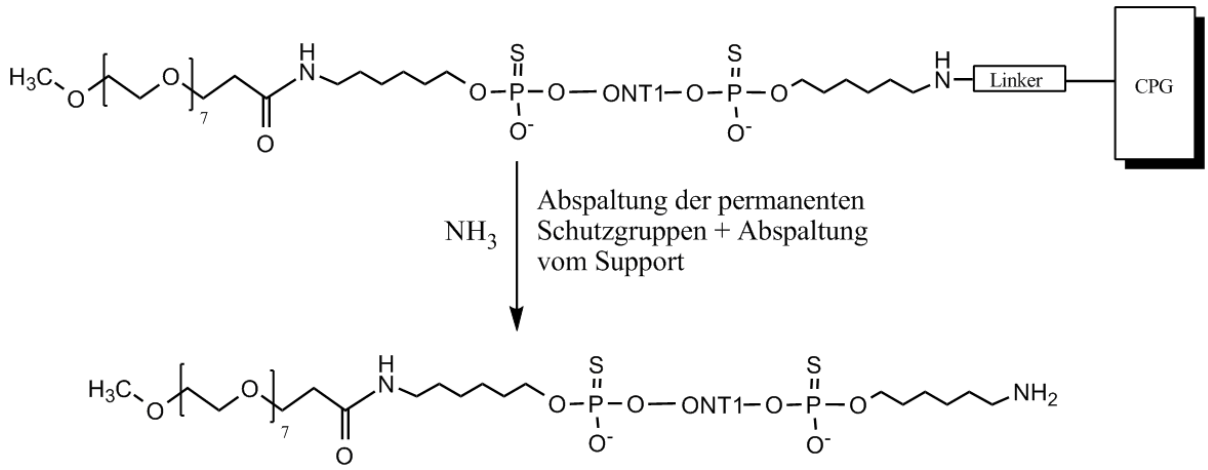


Abb. 218: Abspaltung des einfach 5´-mPEG400-derivatisierten Zwischenprodukts vom Trägermaterial

Nach ca. 10 Stunden wurde der Überstand mit dem abgespaltenen, einfach mPEG400-derivatisierten Zwischenprodukt in ein neues Eppendorfgefäß überführt, der verbliebene Support mehrmals mit Wasser gewaschen und die vereinigten Lösungen im Speedvac zur Entfernung des Ammoniaks eingeengt.
Zur Kontrolle des Reaktionsverlaufes und des Erfolges der mPEG400-Derivatisierung wurde von jedem Ansatz mit ca. 5nmol eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 219).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

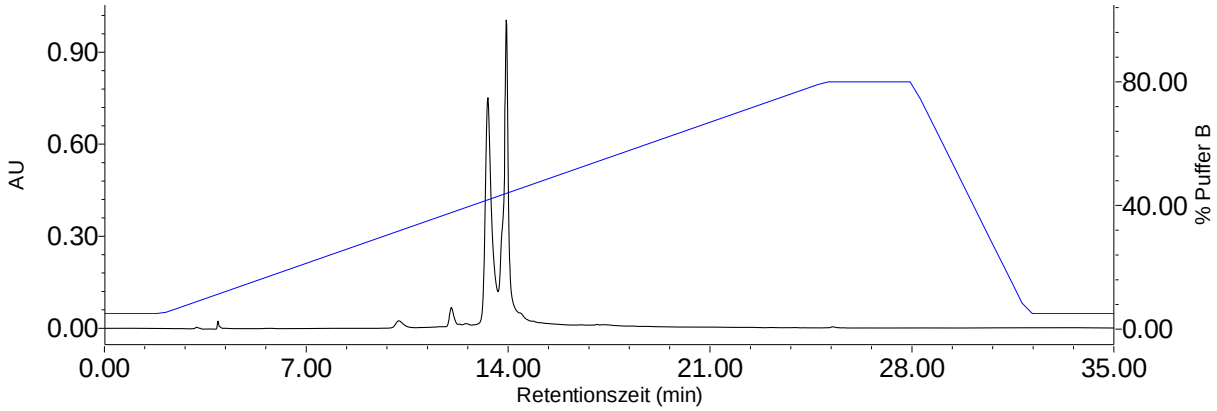


Abb. 219: Kontrolle des Reaktionsverlaufes der trägergebundenen mPEG400 Umsetzung mittels RP-HPLC (nicht derivatisierte Sequenzen bei 13,3min, 5´-mPEG400-derivatisierte Sequenz bei 13,9min)

Das mit mPEG400 derivatisierte Zwischenprodukt weist in Abb. 219 eine etwas höhere Retentionszeit auf (13,9min) als die nicht derivatisierten (zum größten Teil verkürzten) Sequenzen (ca. 13,5min). Es ergab sich in der Regel ein typisches Peakverhältnis von nicht derivatisierten Sequenzen zu derivatisierter Sequenz von ca. 50:50, welches je nach Ansatz um max. 10% schwankte.
Die Abtrennung erfolgte über eine preparative RP-HPLC unter Verwendung eines extrem flachen Gradienten (Abb. 220).

- Säule: Phenomenex PolymerX RP1 100Å 10x250mm mit prep. Detektor
- Gradient: 5bis30Proz_6ml_30min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

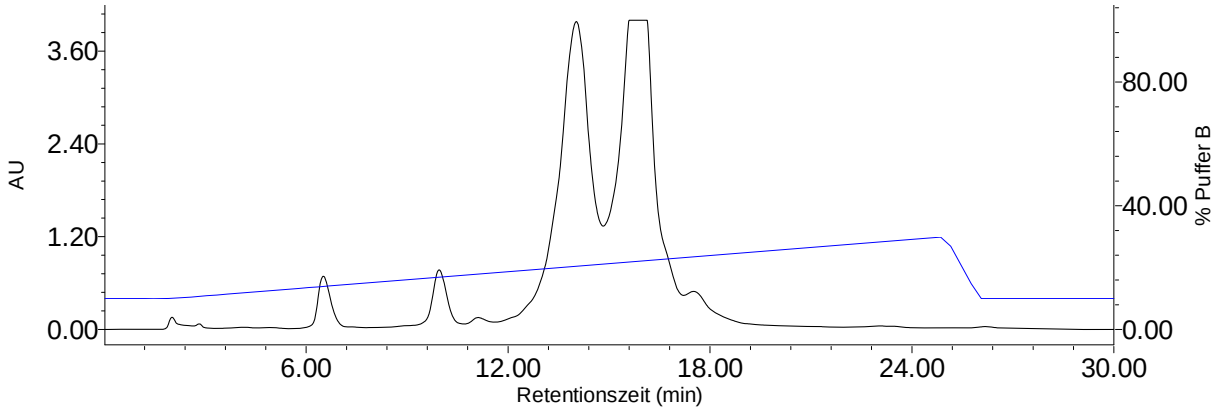


Abb. 220: preparative Abtrennung des einfach 5´-mPEG400-derivatisierten Zwischenprodukts mittels RP-HPLC

Pro Lauf wurden jeweils ca. 1 – 1,5µmol (bezogen auf die Trägereinwaage) des zuvor in Wasser gelösten Reaktionsansatzes aufgetragen. Trotz des sehr flachen Gradienten liegen beide Peaks in Abb. 220 sehr nahe beieinander und sind nicht vollständig zu trennen. Daher wurde mit dem Aufsammeln des Eluats erst sehr spät begonnen und der Beginn des 2. Peaks großzügig abgeschnitten.

Für die insgesamt 18 Synthesen im 2µmol-Maßstab (= 36µmol) waren somit 23 Läufe nötig. Als Gesamtausbeute an aufgereinigtem, einseitig derivatisiertem Zwischenprodukt ergab sich eine Stoffmenge von 7µmol, was einer Ausbeute von ca. 20% bezüglich der Trägereinwaage entspricht.
Eine analytische RP-HPLC der Eluate (Abb. 221) ergab eine Restmenge an nicht derivatisiertem Oligonukleotid-Thiophosphat in Form eines kleinen Vorpeaks von < 5% der Gesamtpeakfläche. Eine bessere Abtrennung ist aufgrund der sehr nahe beieinander liegenden Peaks in der prep. RP-HPLC nicht möglich.

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

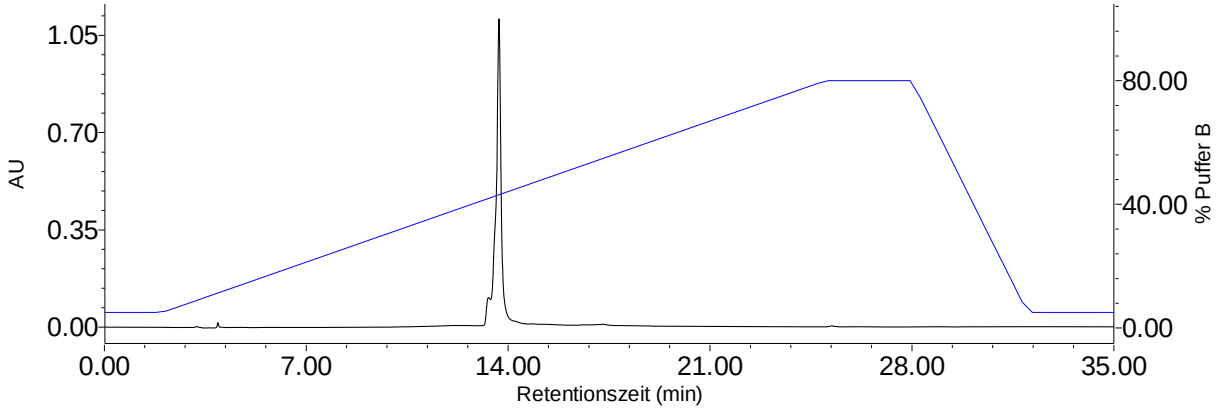


Abb. 221: RP-HPLC nach Aufreinigung des einfach 5´-mPEG400-derivatisierten Zwischenprodukts (Reinheit > 95%)

Für die weitere Verwendung wurden die vereinigten Eluate (ca. 300ml) durch Ultrafiltration (MWCO = 1kDa, 4bar Ar) eingeengt und im Speedvac getrocknet.

Derivatisierung des 3´-Endes mit mPEG2000-NHS

Die mPEG2000-Derivatisierung an der nun freien 3´-Aminogruppe erfolgte durch portionsweise Umsetzung mit einem 10fachen molaren Überschuss an PEG2000-NHS in 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5 (Abb. 222). Pro µmol Oligonukleotid-Thiophosphat wurden 500µl Reaktionspuffer verwendet. Die Reaktionsdauer betrug 1h bei 37°C.

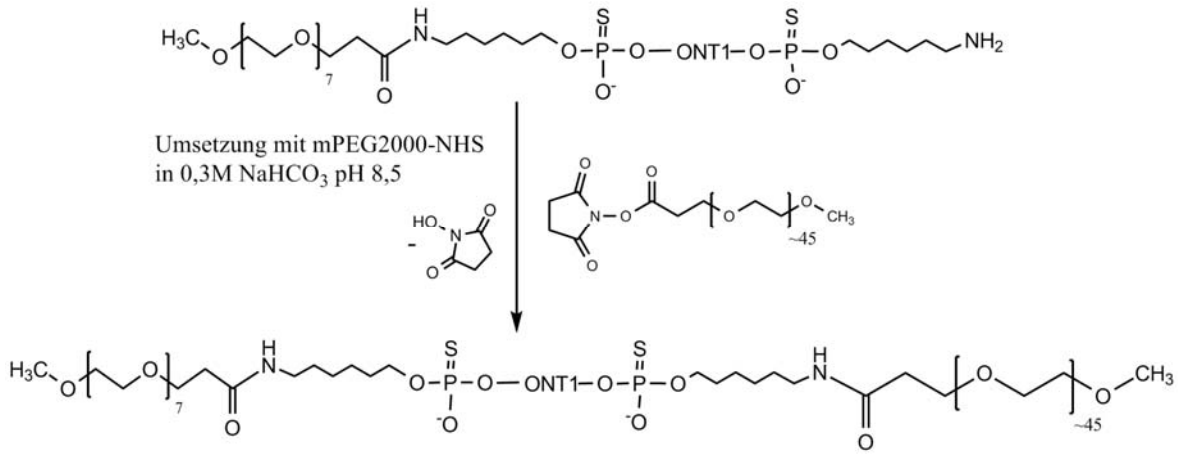


Abb. 222: Umsetzung des 3´-Endes mit mPEG2000-NHS in Lösung

Nach einer Stunde wurden 5nmol des Reaktionsansatzes entnommen und mittels analytischer RP-HPLC der Fortschritt der Reaktion ermittelt (Abb. 223).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5 / Puffer B: Acetonitril

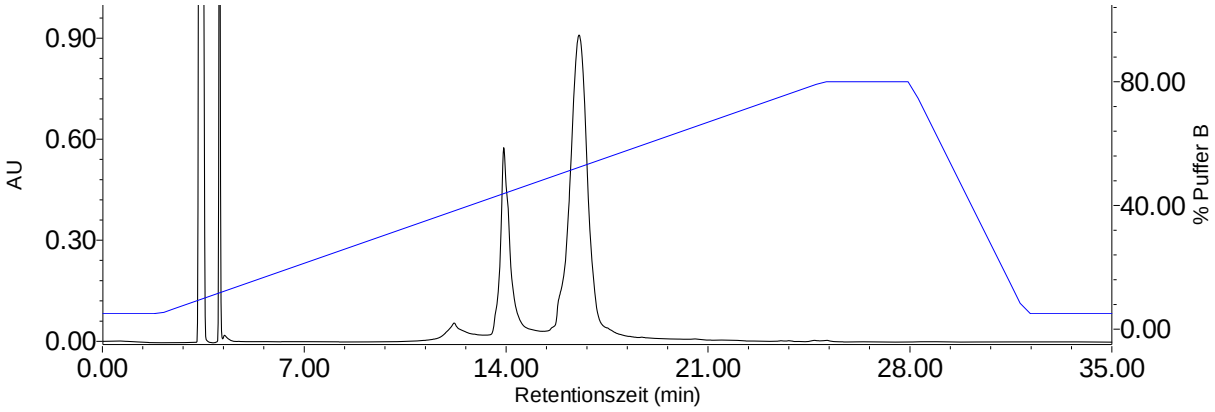


Abb. 223: Kontrolle des Reaktionsverlaufes der mPEG2000-Umsetzung in Lösung mittels RP-HPLC (einseitig mPEG400 derivatisierte Sequenz bei 14,4min, beidseitig derivatisierte Sequenz bei 16-18min, hydrolysiertes NHS bei 3-4min)

Das beidseitig derivatisierte Endprodukt weist in Abb. 223 eine wesentlich höhere Retentionszeit (16-18min) auf als das nur einfach mit mPEG400 derivatisierte unumgesetzte Zwischenprodukt (14,4min). Das typische Peakverhältnis von unumgesetztem Zwischenprodukt zu beidseitig derivatisiertem Endprodukt liegt bei 25 : 75 bis 20 : 80.
Da auch eine längere Reaktionsdauer sowie ein höherer molarer Überschuss an mPEG2000-NHS nicht zu einer höheren Ausbeute führte, kann davon ausgegangen werden, dass ca. 20 – 25% der durch den Amino-On CPG Support generierten 3´-Aminogruppen aufgrund des Trägermaterials nicht funktionell sind und somit für eine vollständige Umsetzung nicht zur Verfügung stehen (s. Kapitel 4.2.1).
Nach Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze im Speedvac eingeengt und das zweifach derivatisierte Endprodukt durch eine preparative RP-HPLC von den unumgesetzten Sequenzen abgetrennt (Abb. 224).

- Säule: Phenomenex Polymerx RP1 100Å 10x250mm mit prep. Detektor
- Gradient: 5bis50Proz_6ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5 / Puffer B: Acetonitril
- Auftragemenge ca. 1µmol

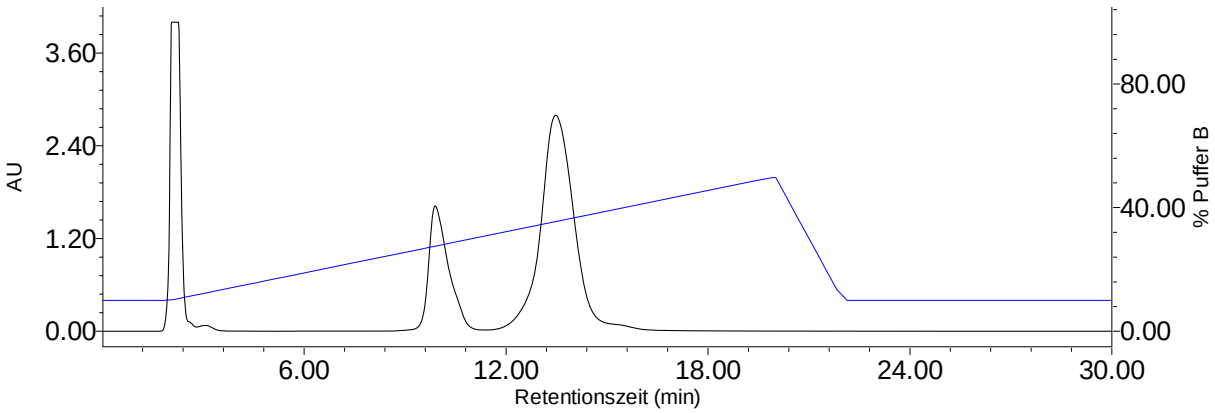


Abb. 224: preparative Abtrennung des zweifach derivatisierten Endprodukts mittels RP-HPLC (unumgesetzte Sequenzen bei ca. 10min, Endprodukt bei ca. 12-15min)

Die vereinigten Eluate wurden zur Verminderung des Acetonitril-Gehaltes im Verhältnis 1:1 mit FPLC-Puffer A verdünnt. Zur Abtrennung des noch vorhandenen überschüssigen, hydrolysierten mPEG2000 wurde eine IE-FPLC vorgenommen (Abb. 225).
Nach Auftragung der Proben (jeweils 1µmol) wurde zuerst mit ca. 50ml Puffer A und 50ml Puffer W (40% Puffer B) das hydrolysierte, im Detektor nicht feststellbare, mPEG2000 herausgewaschen. Schließlich wurde das Endprodukt (mPEG400-ONT1-mPEG2000) mit 100% Puffer B eluiert.

- Säule: Toyopearl SuperQ-650M 150x16mm
- Puffer A: 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5
- Puffer B: 0,01M $NaHCO_3$ pH8,5 + 2M NaCl
- Flow = 4ml/min (Kolbenpumpe P-500)
- Schreibergeschwindigkeit: 1mm/min
- Gradienten: 0%B, 40%B, 100%B
- Auftragemenge: 1µmol
- Schreiberempfindlichkeit: 100mV

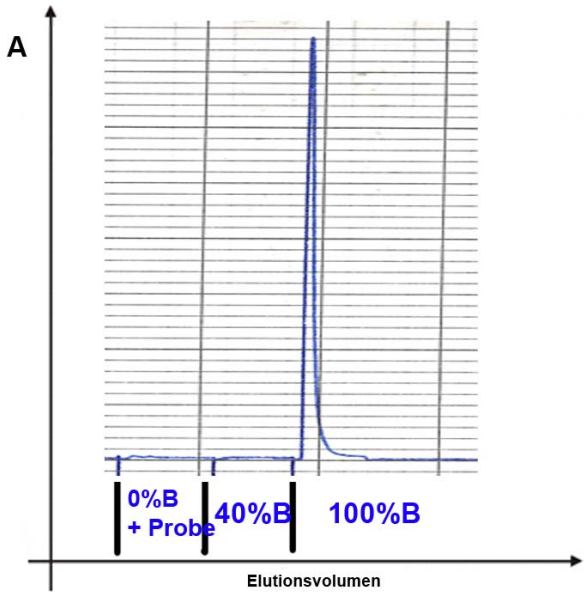


Abb. 225: IE-FPLC des Endprodukts (mPEG400-ONT1-mPEG2000) bei einer Auftragemenge von 1µmol

Zur Verringerung der NaCl-Konzentration erfolgte eine Entsalzung der vereinigten Eluate mittels einer Ultrafiltrationseinheit und einer Ultrafiltrationsmembran mit einem MWCO von 1kDa bei einem Argondruck von 4bar.
Das Volumen wurde dabei auf ca. 2ml eingeengt und 10x mit jeweils 10ml Wasser verdünnt. Die NaCl-Konzentration sinkt dadurch von 2M auf < 0,5µM.
Der Rückstand wurde aus der Ultrafiltrationseinheit entnommen und photometrisch vermessen. Dabei ergab sich insgesamt eine Stoffmenge an beidseitig derivatisiertem Endprodukt von 3,0µmol, was einer Ausbeute von ca. 10% bezüglich der nominellen Trägereinwaage entspricht.
Eine analytische RP-HPLC zur Kontrolle der Reinheit des Produkts lieferte einen einzelnen, polydispersen Peak.

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5 / Puffer B: Acetonitril

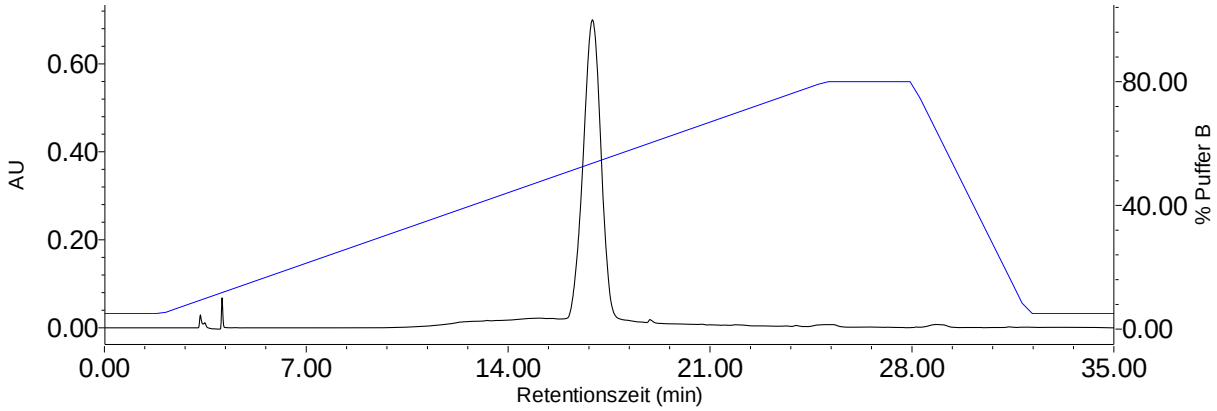


Abb. 226: Reinheitskontrolle des Endprodukts (mPEG400-ONT1-mPEG2000) mittels RP-HPLC liefert einen polydispersen Einzelpeak

<u>Charakterisierung mittels MALDI-TOF MS</u>

Als theoretische Massen ergeben sich für das einseitig derivatisierte Zwischenprodukt (mPEG400-ONT1-NH_2) **6466Da** und für das beidseitig derivatisierte Endprodukt (mPEG400-ONT1-mPEG2000) **ca. 8500Da** (± n•44Da, bedingt durch die Polydispersität des mPEG2000).

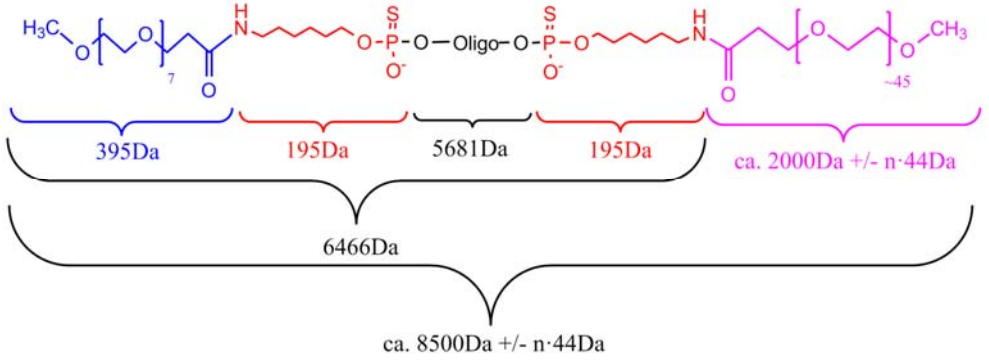


Abb. 227: Ermittlung der theoretischen Massen von Zwischenprodukt und Endprodukt

Diese theoretischen Massen konnten durch die MALDI-TOF MS Messung (s. Kapitel 6.6) bestätigt werden (Abb. 228 und Abb. 229).

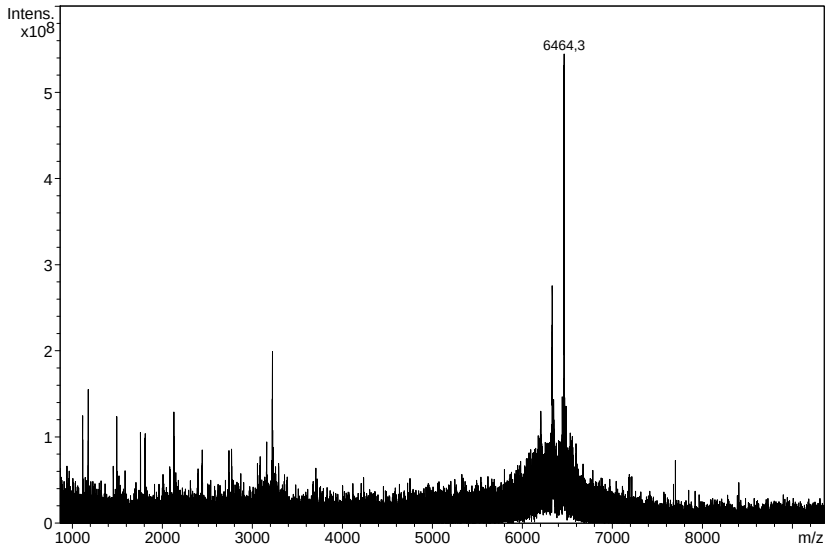


Abb. 228: MALDI-TOF MS des einseitig derivatisierten Zwischenprodukts (mPEG400-ONT1-NH_2) mit einem Peak bei 6464Da (M_{theor} = 6466Da)

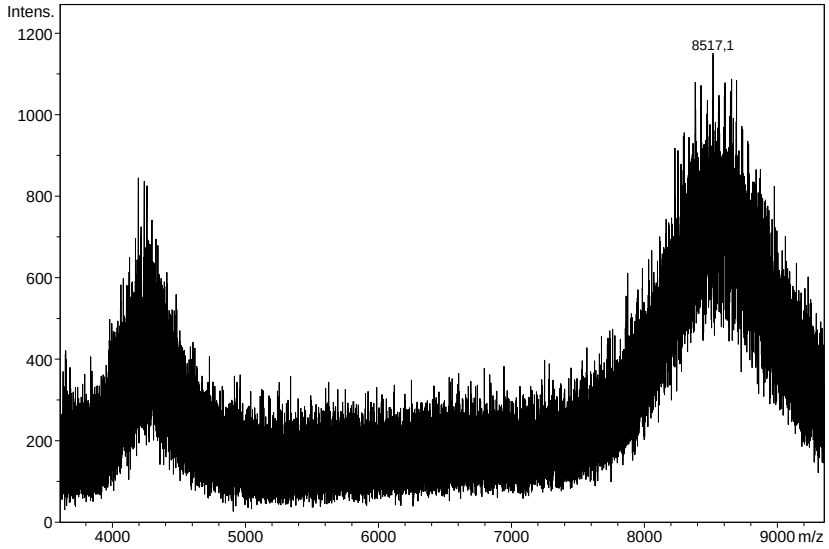


Abb. 229: MALDI-TOF MS des beidseitig derivatisierten Endprodukts (mPEG400-ONT1-mPEG2000) mit einem polydispersen Peak um 8500Da ± n•44Da (Polydispersität des mPEG2000)

Die ermittelten Massen stimmen demnach genau mit den theoretisch berechneten Massen überein, was die Qualität der Synthese und die Reinheit des Produkts bestätigt.

Zusammenfassung zur trägergebundenen 5´-mPEG400 und 3´-mPEG2000 Derivatisierung

Im Verlauf der Synthese ergaben sich folgende Ausbeuten bei den einzelnen Teilschritten:

Trägereinwaage:	36µmol	(100%)
5´-mPEG400-derivatisiertes Zwischenprodukt:	7µmol	(20%)
5´-mPEG400- und 3´-mPEG2000-derivatisiertes Endprodukt:	3µmol	(8%)

Trotz der auf den ersten Blick sehr geringen Endausbeute (bezüglich der Trägereinwaage) führt die verwendete Synthesestrategie zu einem sauberen Endprodukt und ist auch im größeren Maßstab durchführbar.
Die Hauptverluste liegen im Wesentlichen bei der eigentlichen Oligonukleotidsynthese, noch vor der 5´-Derivatisierung mit mPEG400. Die Synthesezyklen führen von Haus aus, aufgrund unvollständiger Kopplungen (trotz modifiziertem Protokoll mit doppelten Kopplungszyklen), zu einem Verhältnis der verkürzten Sequenzen zur Zielsequenz von ca. 50:50 bis 30:70. Auch liegt die effektive Beladung der Trägermaterialien oft bis zu 50% unter der Angabe des Herstellers. Legt man dies bei der Berechnung der Ausbeute zu Grunde, so führen 10µmol Trägereinwaage zu einer theoretischen Ausbeute von 2,5 - 3,5µmol an kompletten Sequenzen. Dies entspricht einer Ausbeute von 25 - 35% und liegt deutlich näher an dem bei dieser Synthesestrategie erreichten Wert von 20% für das einseitig derivatisierte Zwischenprodukt, bei dem allerdings die Umsetzung mit mPEG400 schon beinhaltet ist.
Eine weitere Verlustquelle ist die nur ca. 70%ige Umsetzung mit mPEG2000-NHS am 3´-Ende. Die Ursache hierfür liegt beim verwendeten Amino On CPG, welches zu einem hohen Prozentsatz keine, oder nicht-funktionelle Aminogruppen am 3´-Ende generiert (s. Kapitel 4.2.1).
Ebenfalls hohe Verluste sind bei der Abtrennung des einfach derivatisierten Zwischenprodukts von den verkürzten Sequenzen mittels RP-HPLC zu verzeichnen. Da die Retentionszeiten und somit auch die Peaks sehr nahe beieinander liegen, muß für eine quantitative Abtrennung ein großer Teil am Anfang des Produktpeaks verworfen werden.

Hier wäre auf jeden Fall noch Verbesserungspotential vorhanden, entweder durch Verwendung von RP-HPLC-Säulen mit höherer Trennleistung oder durch mehrmaliges erneutes Auftragen der bisher verworfenen Eluate.

4.2.3.5. Postsynthetische trägergebundene 5´-mPEG2000 und 3´-mPEG400 Derivatisierung

Um unter Beibehaltung der bisherigen Strategie für die postsynthetische, trägergebundene, beidseitige asymmetrische Derivatisierung zu einem Produkt zu kommen, welches eine mPEG2000-Derivatisierung am 5´-Ende und eine mPEG400-Derivatisierung am 3´-Ende aufweist (mPEG2000-ONT1-mPEG400), müßte die erste, trägergebundene Umsetzung am 5´-Ende mit mPEG2000-NHS erfolgen.
Dies würde jedoch aufgrund der Polydispersität des mPEG2000 dazu führen, dass nach der zweiten Umsetzung am 3´-Ende mit mPEG400 in Lösung keine Abtrennung von unumgesetztem Edukt mehr möglich ist. Die erste, trägergebundene Umsetzung muß also auf jeden Fall mit dem monodispersen mPEG400-NHS erfolgen.
Mit Standard-Phosphorigsäureestermiden ist eine Syntheserichtung von 3´ nach 5´ vorgegeben. In diesem Fall benötigt man jedoch zur trägergebundenen Umsetzung mit mPEG400 ein freies 3´-Ende, während die Oligonukleotidkette mit dem 5´-Ende am Träger verankert sein muß.
Dies wird durch die Verwendung spezieller 5´-Phosphorigsäureesteramide möglich, bei denen die Positionen der DMT-Schutzgruppe und der Phosphorigsäureesteramidgruppe im Gegensatz zu den Standardbausteinen vertauscht sind.

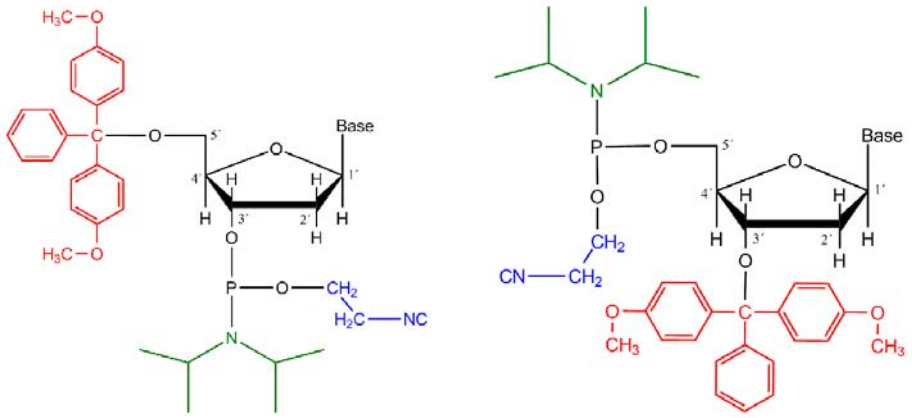


Abb. 230: 3´-Phosphorigsäureesteramid (links) und 5´-Phosphorigsäureesteramid (rechts)

Auf diese Weise kann die Syntheserichtung umgedreht werden und erfolgt nun von 5´ nach 3´. Die fertige Oligonukleotidkette ist nach der Synthese mit ihrem 5´-Ende am Träger verankert, während das 3´-Ende frei ist (Abb. 231).

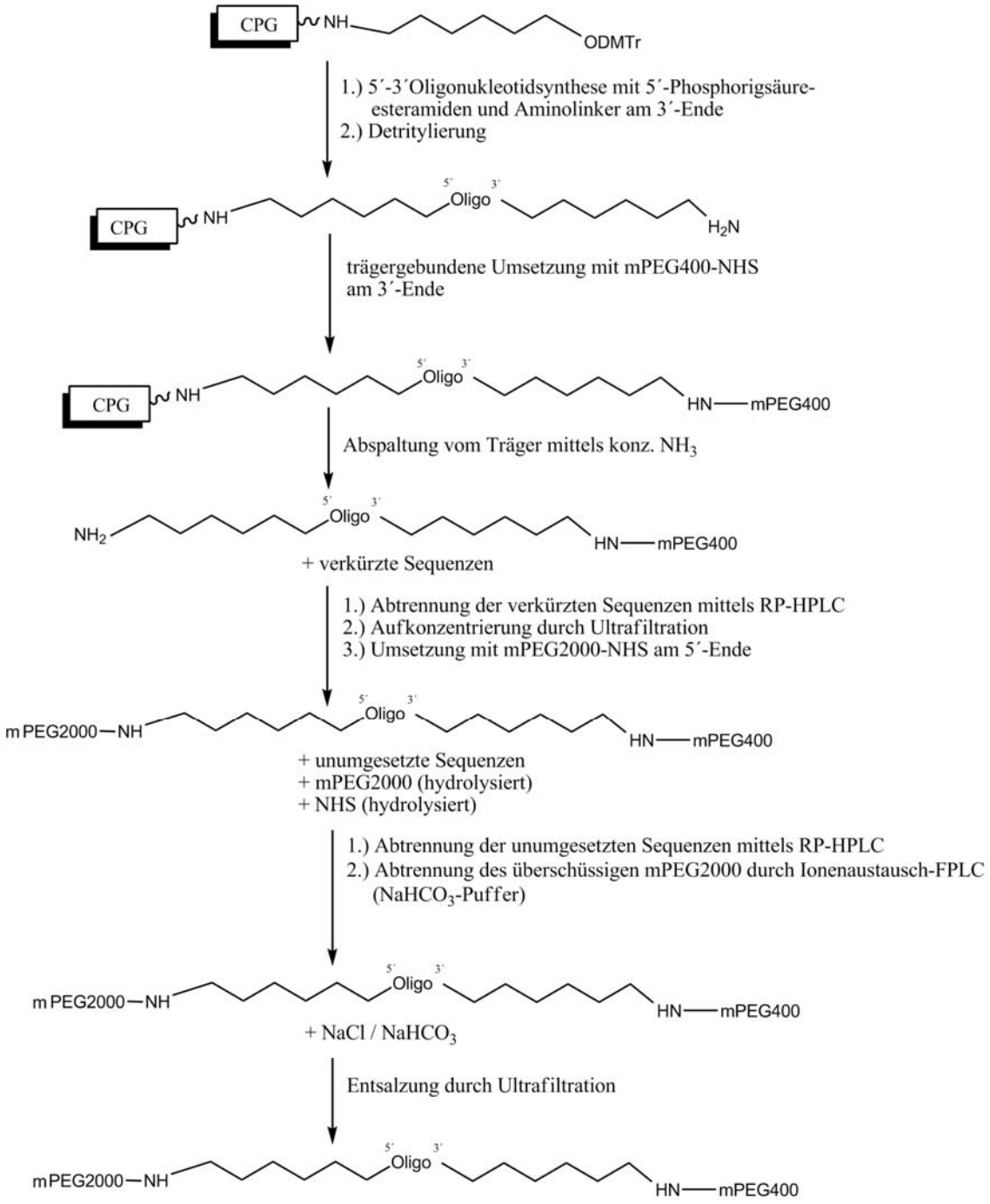


Abb. 231: Schematische Darstellung der Synthesestrategie zur Herstellung des beidseitig asymmetrisch derivatisierten mPEG2000-ONT1-mPEG400 unter Verwendung von 5´-Phosphorigsäureesteramiden

Oligonukleotidsynthese

Die Synthese des Oligonukleotids (ONT1) erfolgte mittels 5´-Phosphorigsäureesteramiden in 5´→3´ Richtung auf einem Expedite 8909 DNA/RNA-Synthesizer in Form von Thiophosphaten mit modifiziertem Kopplungsprotokoll (doppelte Kopplungszyklen) auf Amino-ON CPG (s. Kap. 6.2.1).
Auf diese Weise ist die fertige Oligonukleotidkette mit ihrem 5´-Ende am Trägermaterial verankert. Im letzten Schritt wurde ebenfalls mit einem doppelten Kopplungszyklus der C6-Aminomodifier an das freie 3´-Ende angebracht. Nach Beendigung der Synthese wurden die

Ansätze noch auf dem Synthesizer mit 3% Trichloressigsäure in Dichlormethan bis zum Verschwinden der gelben Farbe des MMT-Kations detrityliert (s. Kap. 6.2.2).
Es erfolgten insgesamt 7 Synthesen mit einer Trägereinwaage von jeweils 2µmol. Zur weiteren Verwendung wurde das Trägermaterial aus den Synthesekartuschen entnommen und getrocknet.

Trägergebundene 3´-Derivatisierung sowie 5´-Derivatisierung in Lösung

Die trägergebundene Derivatisierung des 3´-Endes mit mPEG400-NHS sowie die mPEG2000-Derivatisierung des 5´-Endes in Lösung erfolgten analog zu der in Kapitel 4.2.3.4 beschriebenen Vorgehensweise. Lediglich 3´- und 5´-Ende des Oligonukleotid-Thiophosphats sind jeweils vertauscht.
Eine RP-HPLC zur Kontrolle der trägergebundenen 3´-Umsetzung mit mPEG400-NHS lieferte wiederum einen Doppelpeak (Abb. 232), was eine unvollständige Umsetzung bedeutet (s. auch Abb. 219).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

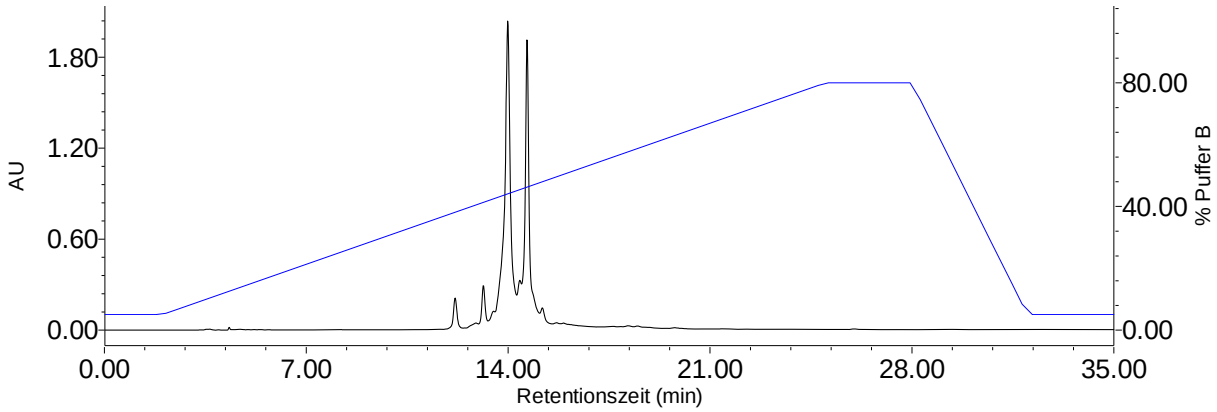


Abb. 232: Kontrolle des Reaktionsverlaufs der trägergebundenen 3´-mPEG400-Umsetzung (nicht derivatisierte Sequenzen bei 13,9min, 3´-mPEG400-derivatisierte Sequenz bei 14,6min)

Nach der preparativen Aufreinigung des 3´-mPEG400-derivatisiertem Zwischenprodukts ergab sich eine Stoffmenge von **2,4µmol**, was einer Ausbeute von ca. 17% bezüglich der Trägereinwaage entspricht.
Eine RP-HPLC des 3´-mPEG400 derivatisierten Zwischenprodukts (Abb. 233) ergab einen einzelnen Peak ohne erkennbare Restmenge an nicht derivatisiertem Oligonukleotid-Thiophosphat.

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

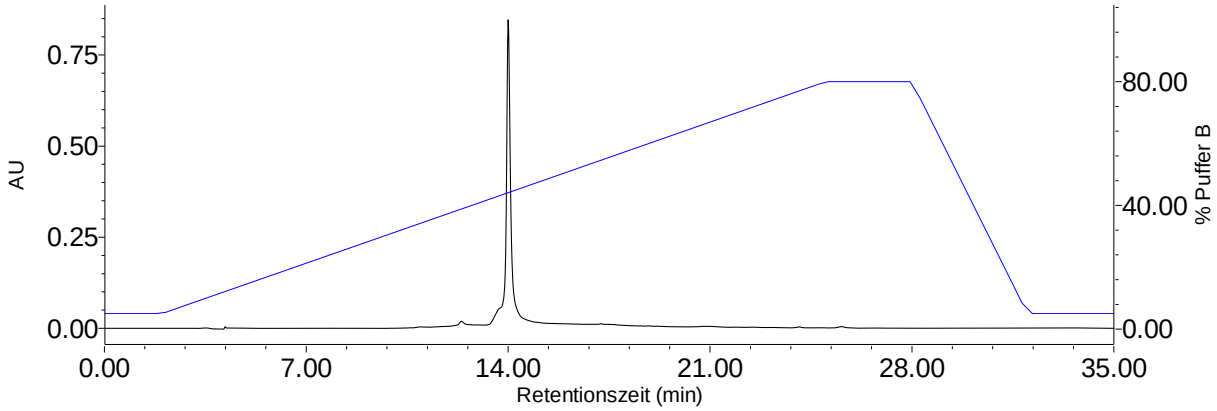


Abb. 233: RP-HPLC nach Aufreinigung des einfach 3´-mPEG400-derivatisierten Zwischenprodukts liefert einen einzelnen Peak

Auch eine analytische RP-HPLC (Abb. 234) nach Derivatisierung des 5´-Endes mit mPEG2000-NHS in Lösung analog zu Kap. 4.2.3.4 zeigt wie in Abb. 223 eine unvollständige Umsetzung mit einem polydispersen Peak des Zielprodukts (mPEG2000-ONT1-mPEG400).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

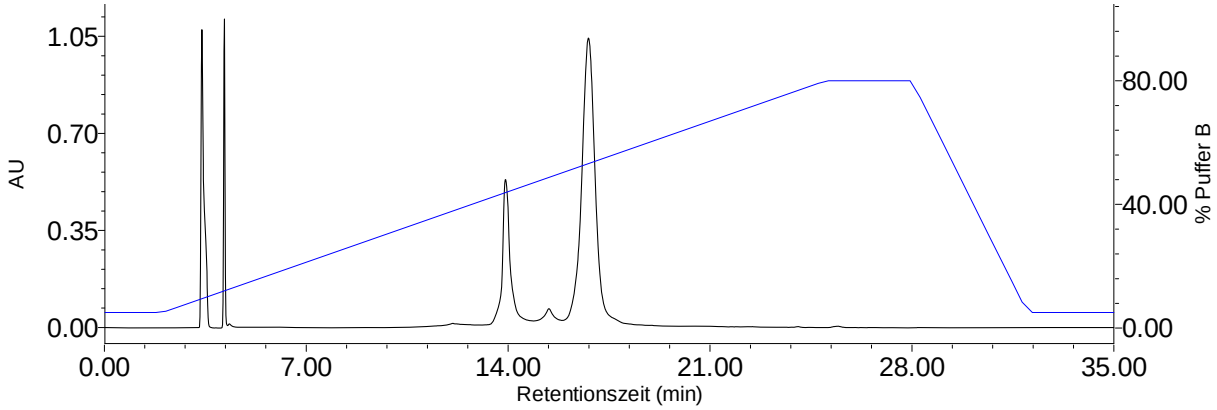


Abb. 234: RP-HPLC zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs der 5´-Umsetzung mit mPEG2000-NHS (einseitig derivatisierte Sequenz bei 13,9min, beidseitig derivatisierte Sequenz bei 16-18min, hydrolysiertes NHS bei 3-4min)

Nach preparativer Abtrennung, IE-Aufreinigung und Ultrafiltration analog zu Kapitel 4.2.3.4 ergab sich eine Stoffmenge an beidseitig derivatisiertem Endrodukt von 1,3µmol, was einer Ausbeute von ca. 9% bezüglich der nominellen Trägereinwaage entspricht.
Eine analytische RP-HPLC (5nmol) zur Bestätigung der Reinheit des Produkts lieferte einen einzelnen, polydispersen Peak (Abb. 235).

- Säule: Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm
- Gradient: 5bis80Proz_1ml_35min (s. Kap. 6.4)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

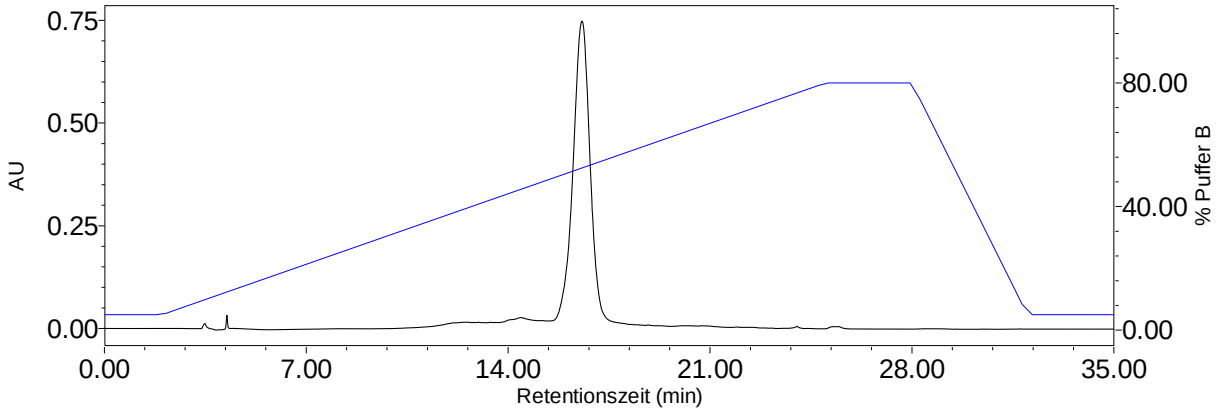


Abb. 235: RP-HPLC des Endprodukts (mPEG2000-ONT1-mPEG400) liefert einen sauberen, polydispersen Einzelpeak

Charakterisierung mittels MALDI-TOF MS

Als theoretische Massen ergeben sich für das einseitig derivatisierte Zwischenprodukt (ONT1-mPEG400) wiederum **6466Da** und für das beidseitig derivatisierte Endprodukt (mPEG2000-ONT1-mPEG400) **ca. 8500Da** (± n·44Da durch die Polydispersität des mPEG2000)

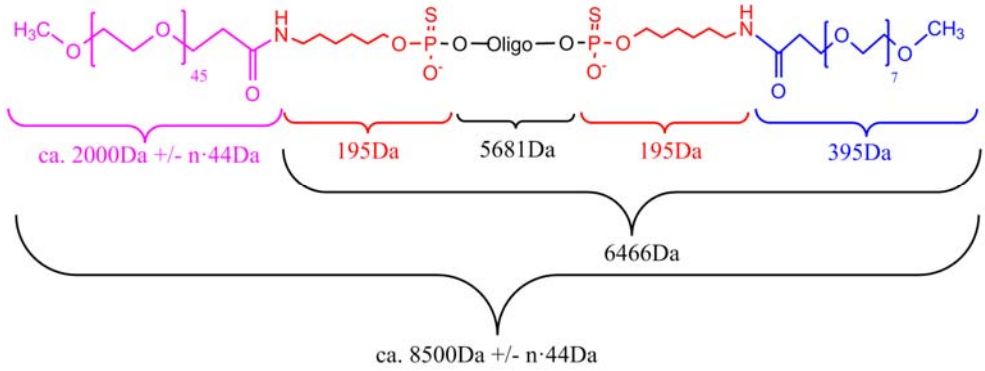


Abb. 236: Ermittlung der theoretischen Massen von Zwischenprodukt und Endprodukt

Diese theoretischen Massen konnten durch MALDI-TOF MS Messungen (s. Kapitel 6.6) bestätigt werden (Abb. 237 und Abb. 238).

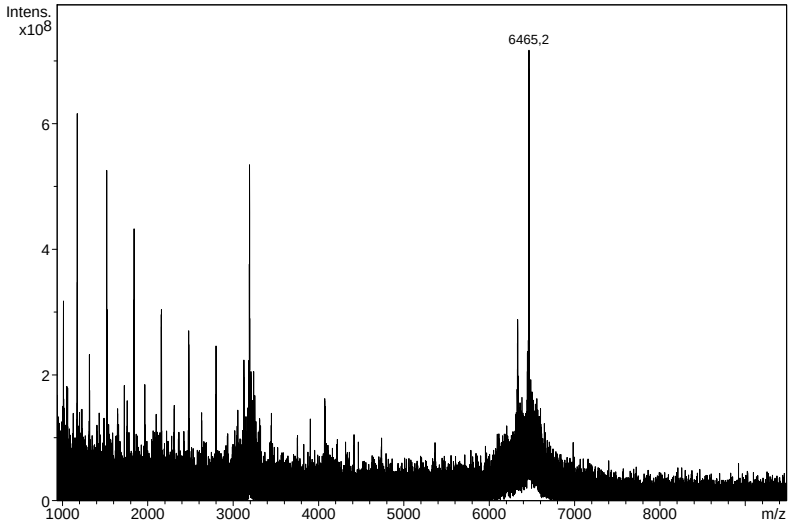


Abb. 237: MALDI-TOF MS des einseitig derivatisierten Zwischenprodukts (ONT1-mPEG400) mit einem Peak bei 6465Da (M_{theor} = 6466Da)

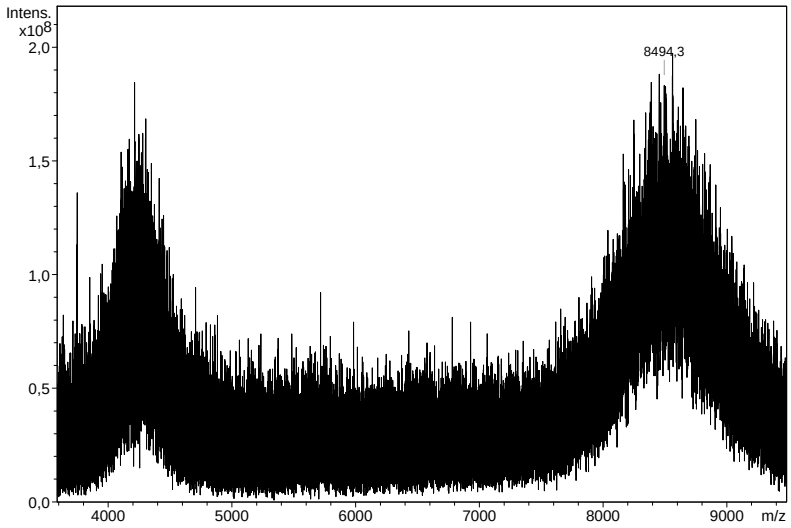


Abb. 238: MALDI-TOF MS des beidseitig derivatisierten Endprodukts (mPEG2000-ONT1-mPEG400) mit einem polydispersen Peak um 8500Da ± n•44Da (Polydispersität des mPEG2000)

Die ermittelten Massen stimmen demnach mit den theoretisch berechneten Massen überein was die Qualität der Synthese und die Reinheit des Produkts bestätigt.

Zusammenfassung zur trägergebundenen 5´-mPEG2000 und 3´-mPEG400 Derivatisierung

Im Verlauf der Synthese ergaben sich folgende Ausbeuten bei den einzelnen Teilschritten:

Trägereinwaage:	14µmol	(100%)
3´-mPEG400-derivatisiertes Zwischenprodukt:	2,4µmol	(17%)
3´-mPEG400- und 5´-PEG2000-derivatisiertes Endprodukt:	1,3µmol	(9%)

Dies entspricht im Wesentlichen den Werten bei der 3´-5´ Synthese (s. Kapitel 4.2.3.4) unter Verwendung von Standard-Phosphorigsäureesteramiden. Beide Syntheserichtungen führen demnach zu ähnlichen Ausbeuten, was bedeutet, dass die Reaktivität der beiden Arten von Phosphorigsäureesteramiden in etwa gleich hoch ist.
Aufgrund des wesentlich höheren Preises der schwieriger herzustellenden und im täglichen Gebrauch selten verwendeten 5´-Phosphorigsäureesteramide ist eine großtechnische 5´-3´ Synthese allerdings mit wesentlich höheren Kosten verbunden als eine Standardsynthese in 3´-5´-Richtung.

4.2.3.6. Postsynthetische trägergebundene Derivatisierung mit monodispersem PEG

Aufbauend auf der in den vorigen Kapiteln etablierten Strategie zur postsynthetischen, trägergebundenen beidseitig asymmetrischen Derivatisierung sollen neben den bisherigen polydispersen, mit mPEG2000 umgesetzten Derivaten auch zwei Derivate mit dem monodispersen mPEG1000 hergestellt werden. Ein Derivat soll dabei die mPEG1000-Modifikation am 5´-Ende, das andere Derivat hingegen am 3´-Ende tragen. Das jeweils andere Ende der Oligonukleotide soll mit mPEG400 derivatisiert werden.
Da es beim Einsatz zweier unterschiedlich langer, aber jeweils monodisperser Polyethylenglykole zu keiner Überschneidung von polydispersen Molekülmassen kommen kann, ist es gleichgültig ob die erste, trägergebundene Umsetzung mit dem kürzeren mPEG400-NHS oder mit dem längerkettigen mPEG1000-NHS erfolgt. Bei der abschließenden Aufreinigung über RP-HPLC nach der zweiten Umsetzung in Lösung ist in jedem Falle eine Abtrennung der am 3´-Ende unumgesetzten Produkte möglich.

Oligonukleotidsynthese

Die Synthese der Sequenz ONT1 und die Funktionalisierung mit einem 5´-Aminomodifier erfolgte auf einem Expedite 8909 DNA/RNA-Synthesizer als Oligonukleotid-Thiophosphat nach einem modifizierten Kopplungsprotokoll mit doppelten Kopplungszyklen auf Amino-ON CPG analog zu Kapitel 4.2.3.4.
Es wurden insgesamt 12 Synthesen mit einer Trägereinwaage von jeweils 2µmol durchgeführt. Zur weiteren Verwendung wurde das Trägermaterial aus den Synthesekartuschen entnommen und getrocknet.

trägergebundene Derivatisierung des 5´-Endes

Für die trägergebundene Derivatisierung des 5´-Endes wurde der Inhalt der Synthesekartuschen in zwei Portionen mit je 12µmol Trägereinwaage aufgeteilt. Die Umsetzung der freien 5´-Aminogruppe der trägergebundenen Sequenz erfolgte analog zu Kapitel 4.2.3.4 unter alkalischen Bedingungen (Hilfsbase) mit einem zehnfachen Überschuss an mPEG400-NHS bzw mPEG1000-NHS. Dazu wurde der getrocknete Support mit der entsprechenden Menge einer 250mM mPEG-NHS Lösung in ACN versetzt und mit trockenem ACN auf das doppelte Volumen aufgefüllt (Reaktionsschema s. Abb. 217).
Die Abspaltung vom Support sowie die Abspaltung der noch vorhandenen permanenten Basenschutzgruppen der Oligonukleotidsynthese erfolgte mittels konzentrierten Ammoniaks während 10h bei 55°C (Abb. 218). Pro µmol Trägereinwaage wurden 200µl konz. Ammoniak verwendet.
Nach ca. 16 Stunden wurde der Überstand mit dem abgespaltenen, einfach am 5´-Ende mit mPEG400 bzw mPEG1000 derivatisierten Zwischenprodukt in ein neues Eppendorfgefäß überführt, der verbliebene Support mehrmals mit Wasser gewaschen und die vereinigten Lösungen im Speedvac zur Entfernung des Ammoniaks eingeengt.
Zur Kontrolle des Reaktionsverlaufes und des Erfolges der 5´-Derivatisierung wurde von jedem Ansatz mit ca. 1nmol eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 239 und Abb. 240).

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

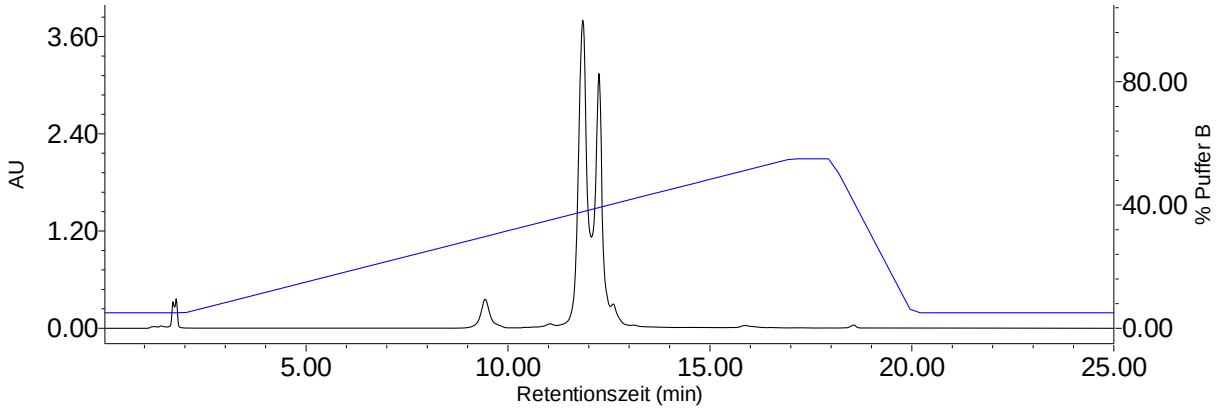


Abb. 239: Kontrolle des Reaktionsverlaufes der trägergebundenen mPEG400 Umsetzung mittels RP-HPLC

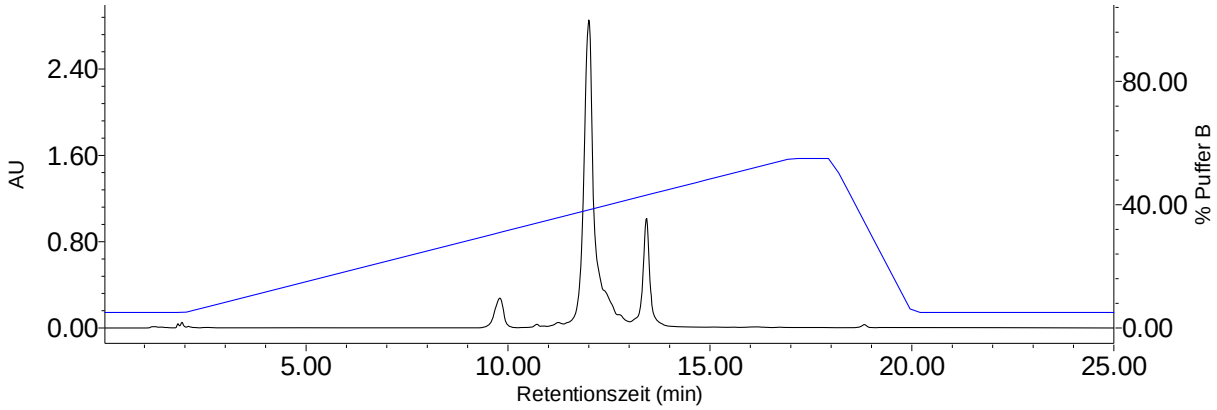


Abb. 240: Kontrolle des Reaktionsverlaufes der trägergebundenen mPEG1000 Umsetzung mittels RP-HPLC

Das mit mPEG400 derivatisierte Zwischenprodukt (mPEG400-ONT1-NH_2) weist in Abb. 239 eine etwas höhere Retentionszeit auf (12,5min) als die nicht derivatisierten Sequenzen bei ca. 11,5min. Dabei ergab sich in der Regel ein typisches Peakflächenverhältnis von nicht derivatisierten Sequenzen zu derivatisierter Sequenz von ca. 50:50.
Das mit mPEG1000 derivatisierte Zwischenprodukt (mPEG1000-ONT1-NH_2) weist in Abb. 240 mit ca. 13,5min eine wesentlich höhere Retentionszeit auf als die nicht derivatisierten bzw. verkürzten Sequenzen bei ca. 11,5min. Die Ausbeuten (Verhältnisse der Peakflächen) lagen allerdings, aufgrund der wesentlich höheren sterischen Hinderung, nur bei ca. 20-25%.
Die Abtrennung der am 5´-Ende derivatisierten Sequenzen erfolgte über eine preparative RP-HPLC unter Verwendung eines extrem flachen Gradienten (Abb. 241und Abb. 242).

- Säule: Phenomenex PolymerX RP1 100Å 10x250mm mit prep. Detektor
- Gradient: 5bis30Proz_6ml_30min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

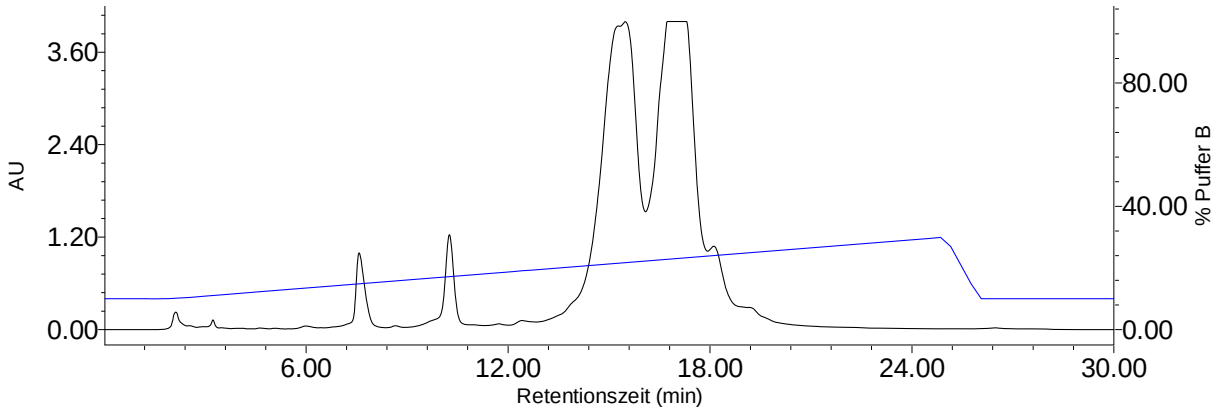


Abb. 241: preparative Abtrennung des 5´-mPEG400-derivatisierten Zwischenprodukts mittels RP-HPLC

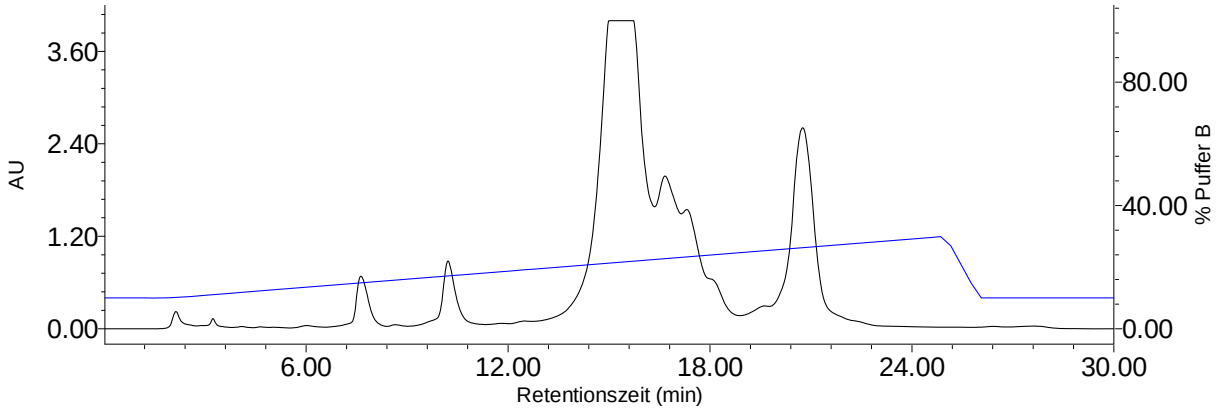


Abb. 242: preparative Abtrennung des 5´-mPEG1000-derivatisierten Zwischenprodukts mittels RP-HPLC

Pro Lauf wurden jeweils 2µmol (bezogen auf die Trägereinwaage) des zuvor in Wasser gelösten Reaktionsansatzes aufgetragen.

Die entsprechenden Eluate wurden vereint und durch photometrische Vermessung quantifiziert. Als Ausbeute an aufgereinigtem, einseitig derivatisiertem Zwischenprodukt ergab sich im Falle der Umsetzung mit mPEG400-NHS eine Stoffmenge von 3µmol, was einer Ausbeute von ca. 25% bezüglich der Trägereinwaage entspricht. Im Falle der Umsetzung mit mPEG1000-NHS betrug die Ausbeute 1,2µmol, was einer Ausbeute von ca. 10% bezüglich der Trägereinwaage entspricht.
Eine analytische RP-HPLC der Eluate (Abb. 243) ergab jeweils einen sauberen Einzelpeak ohne erkennbare Restmenge an 5´-unmodifiziertem Ausgangsprodukt.

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

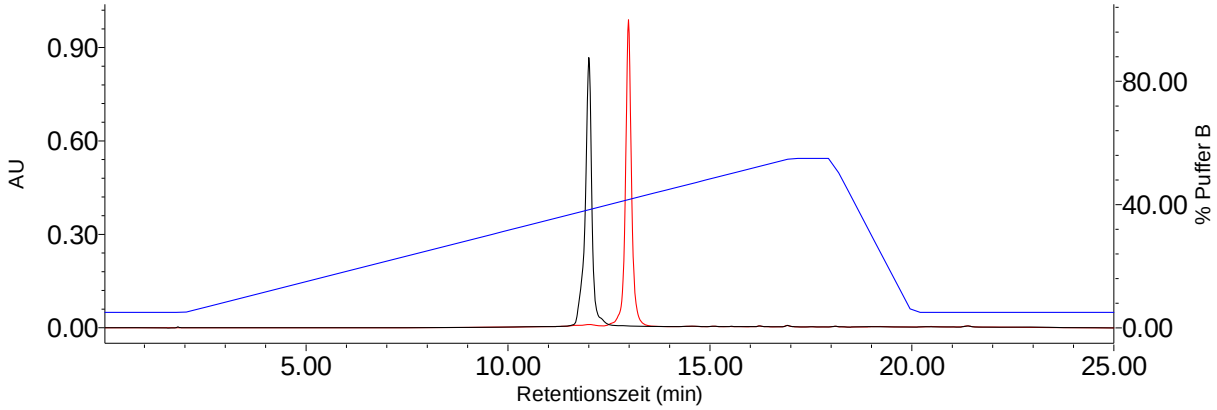


Abb. 243: RP-HPLC nach der Aufreinigung des am 5´-Ende-derivatisierten Zwischenprodukts (schwarz: mPEG400-ONT1-NH_2, rot: mPEG1000-ONT1-NH_2)

Für die weitere Verwendung wurden die jeweiligen Eluate durch Ultrafiltration (MWCO = 1kDa, 4bar Ar) eingeengt und im Speedvac getrocknet.

Derivatisierung des 3´-Endes in Lösung

Die Derivatisierung an der nun freien 3´-Aminogruppe erfolgte durch sechsmalige portionsweise Umsetzung mit einem jeweils 3fachen molaren Überschuss des jeweiligen NHS-Esters (250mM mPEG400-NHS bzw. mPEG1000-NHS in ACN) in 0,3M $NaHCO_3$ pH8,5 (Reaktionsschema s. Abb. 222). Die Oligonukleotidkonzentration betrug dabei 4nmol/µl bei einer Reaktionsdauer von 1h bei 37°C.
Nach einer Stunde wurden jeweils 1nmol der beiden Reaktionsansätze entnommen und mittels analytischer RP-HPLC der Fortschritt der Reaktion ermittelt (Abb. 244 und Abb. 245). Dabei zeigte sich, aufgrund fehlender vom Support generierter 3´-Aminogruppen, in beiden Fällen ein Anteil an unumgesetzten nur einfach am 5´-Ende modifizierten Produkts von 20-25% (Vorpeak des schwarzen Graphen).

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

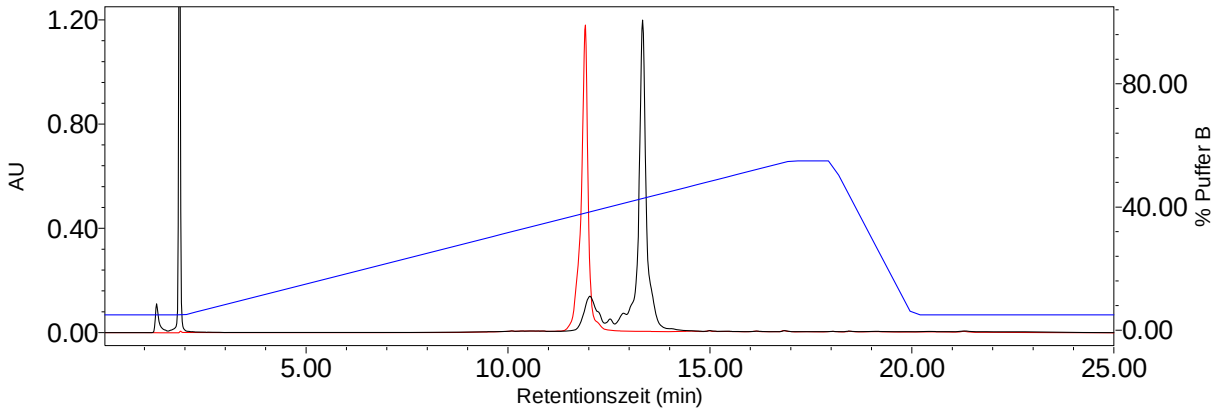


Abb. 244: Kontrolle der Umsetzung des 3´-Endes mit mPEG1000-NHS in Lösung
(rot: mPEG400-ONT1-NH_2, schwarz: mPEG400-ONT1-mPEG1000)

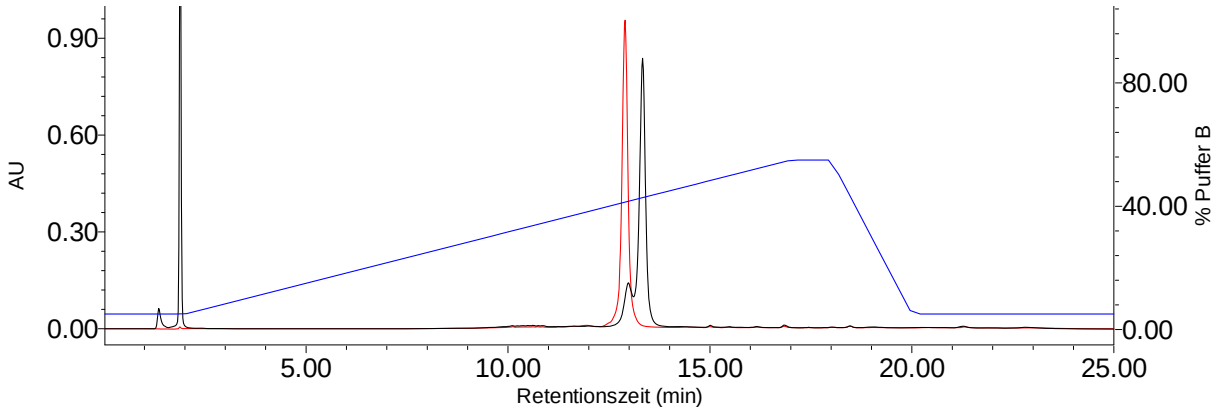


Abb. 245: Kontrolle der Umsetzung des 3´-Endes mit mPEG400-NHS in Lösung
(rot: mPEG1000-ONT1-NH_2, schwarz: mPEG1000-ONT1-mPEG400)

Die Abtrennung der nur einfach derivatisierten Sequenzen erfolgte durch eine preparative RP-HPLC bei einer Auftragemenge von ca. 500nmol (Abb. 246 und Abb. 247).

- Säule: Phenomenex Polymerx RP1 100Å 10x250mm mit prep. Detektor
- Gradient: 10bis30Proz_6ml_30min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril
- Auftragemenge ca. 1µmol

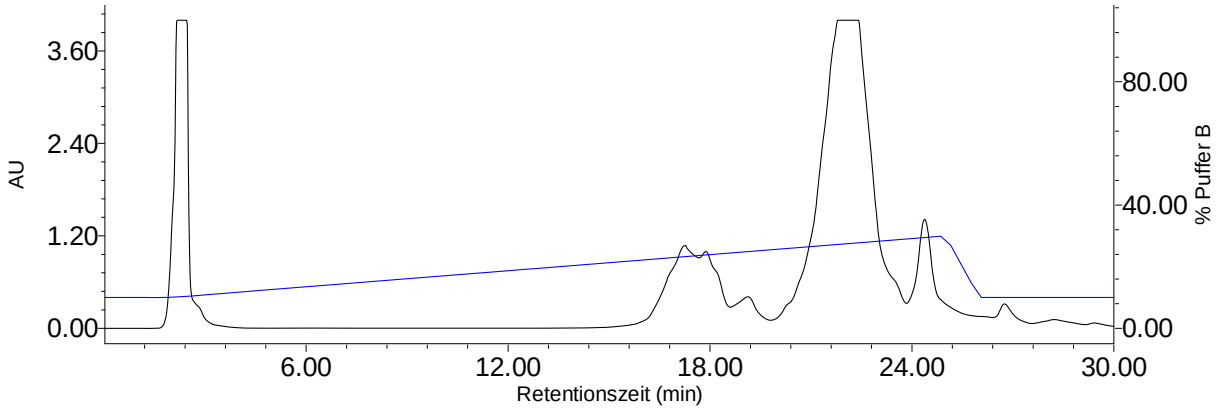


Abb. 246: preparative Abtrennung des Endprodukts (mPEG400-ONT1-mPEG1000) mittels RP-HPLC
(Produktpeak bei ca. 20 – 24min, einseitig 5´-400 modifizierte Sequenz bei ca. 16 – 19min)

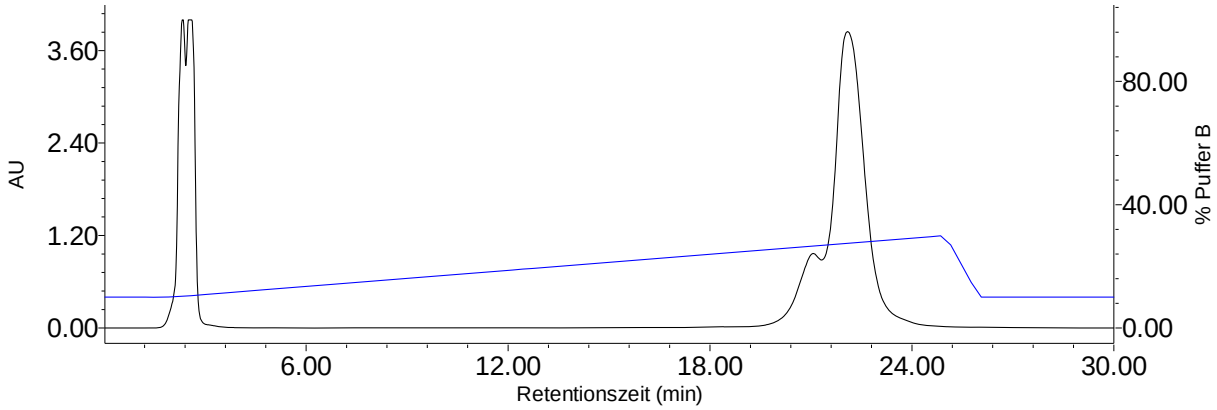


Abb. 247: preparative Abtrennung des Endprodukts (mPEG1000-ONT1-mPEG400) mittels RP-HPLC (Produktpeak bei ca. 22 – 24min, einseitig 5´-1000 modifizierte Sequenz bei ca. 21min)

Die vereinigten Eluate der preparativen RP-HPLC wurden zur Verminderung des Acetonitril-Gehaltes im Verhältnis 1:1 mit FPLC-Puffer A verdünnt und zur Abtrennung des noch vorhandenen überschüssigen, hydrolysierten mPEG eine IE-FPLC vorgenommen
Die Verringerung des NaCl-Gehaltes auf < 0,5mM erfolgte über eine Entsalzung mittels Ultrafiltration (MWCO = 1kDa, 4bar Ar).
Die photometrische Vermessung der beiden Endprodukte ergab dabei folgende Endausbeuten:

mPEG400-ONT1-mPEG1000: 1700nmol (13% bzgl. Trägereinwaage)
mPEG1000-ONT1-mPEG400: 900nmol (7,5% bzgl. Trägereinwaage)

Eine analytische RP-HPLC zur Endkontrolle lieferte bei beiden Derivaten einen isolierten Einzelpeak (Abb. 248).

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

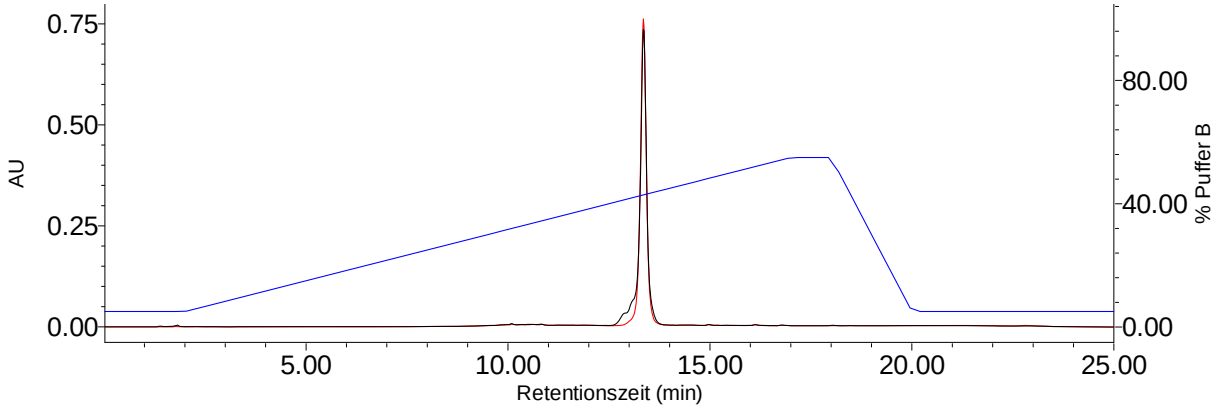


Abb. 248: Reinheitskontrolle der Endprodukte (schwarz: mPEG400-ONT1-mPEG1000 rot: mPEG1000-ONT1-mPEG400)

Charakterisierung mittels MALDI-TOF MS

Für beide Derivate ergibt sich eine theoretische Molekülmasse von **7566Da** (Abb. 249 und Abb. 250).

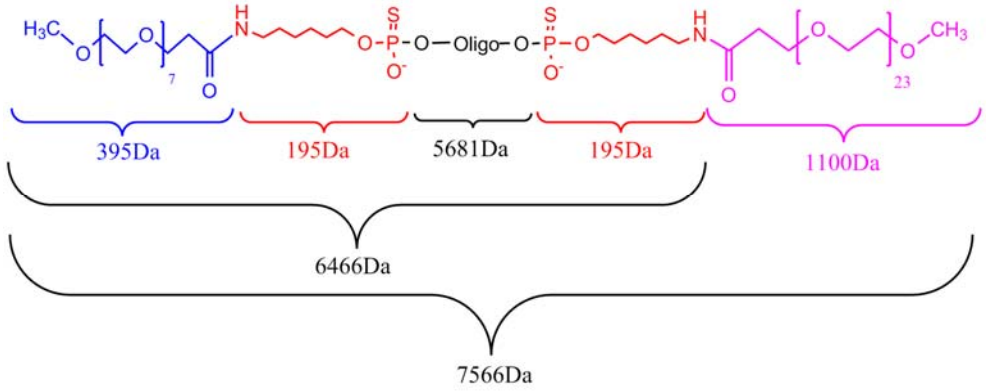


Abb. 249: theoretische Masse von mPEG400-ONT1-mPEG1000

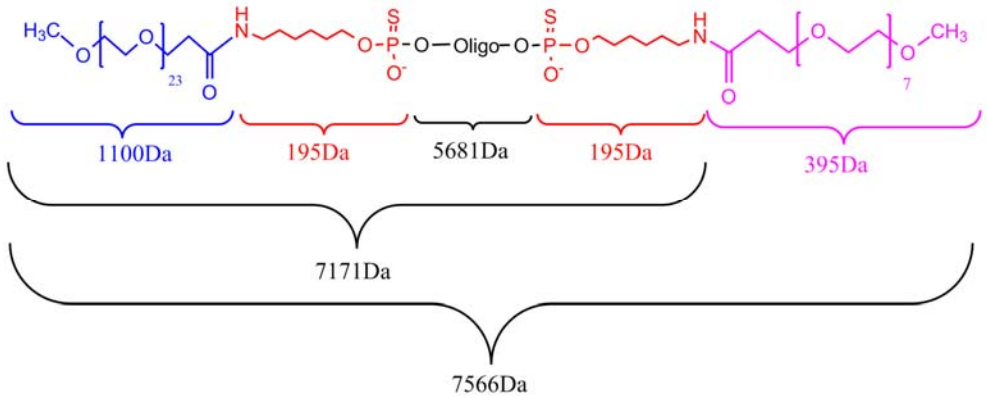


Abb. 250: theoretische Masse von mPEG1000-ONT1-mPEG400

Diese theoretischen Massen konnten durch MALDI-TOF MS Messungen (s. Kapitel 6.6) hinreichend genau bestätigt werden (Abb. 228 und Abb. 229).

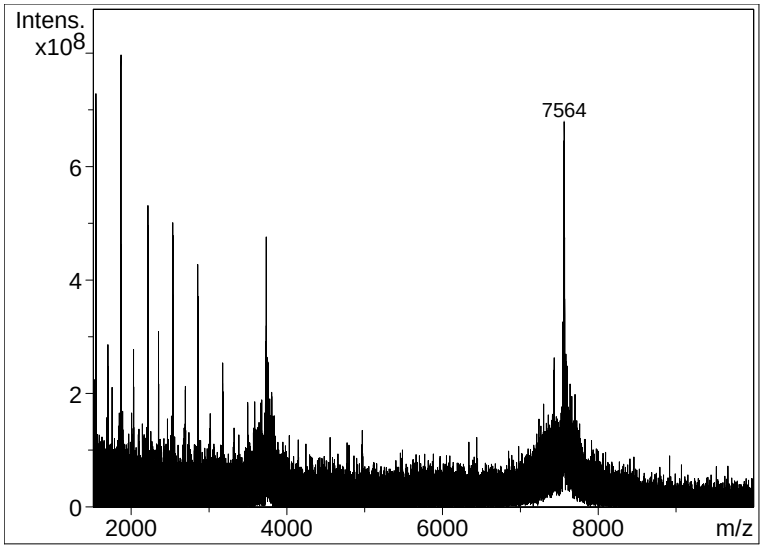


Abb. 251: MALDI-TOF MS von mPEG400-ONT1-mPEG1000
(M_{theor} = 7566Da, $M_{Messung}$ = 7564Da, Δm = 2Da)

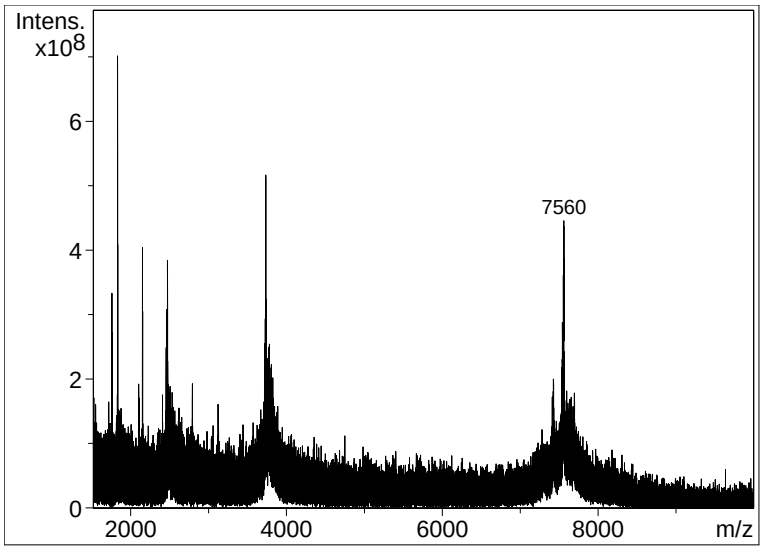


Abb. 252: MALDI-TOF MS von mPEG1000-ONT1-mPEG400
(M_{theor} = 7566Da, $M_{Messung}$ = 7560Da, Δm = 6Da)

4.3. Ermittlung der Nukleasestabilität PEG-derivatisierter Oligonukleotide

Bei einer späteren therapeutischen Anwendung, wie z.B. dem Einsatz als Antisense-Medikamente, sind die Oligonukleotide einer starken Nuklease-Aktivität im Blutserum ausgesetzt.
Sämtliche Nukleasen katalysieren die Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen von Nukleinsäuren, wobei einige spezifisch die auf Ribose basierende RNA (RNasen), andere spezifisch die auf Desoxyribose basierende DNA (DNasen) angreifen. Im Wesentlichen können die Nukleasen in zwei große Gruppen aufgeteilt werden, die Exo- und die Endonukleasen. Exonukleasen greifen einen DNA-Strang terminal an, während Endonukleasen intramolekular spalten, und somit auch zirkuläre DNA abbauen können.
Im humanen Serum spielen dabei die 3´-Exonukleasen die dominierende Rolle[(134)], aber auch die Einflüsse von 5´-Exonukleasen sowie Endonukleasen sollten nicht vernachlässigt werden.

Das Hauptziel der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Derivatisierungen mittels unterschiedlicher Polyethylenglykole ist die Erhöhung der Nukleasestabilität. Der Einfluß der unterschiedlichen Polyethylenglykol-Derivatisierungen auf die Stabilität gegenüber den verschiedenen Nukleasen soll nun durch in vitro Abbauversuche untersucht werden.

4.3.1. Abbau durch Exonukleasen (HPLC-Analyse)

In einer ersten Versuchsreihe soll die relative Stabilität der Polyethylenglykol-derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphate gegenüber 3´- und 5´-Exonukleasen ermittelt werden.
Dazu wurde eine Auswahl der in den Kapiteln 4.1.4, 4.2.3.4 und 4.2.3.5 beschriebenen Oligonukleotid-Thiophosphate der Sequenz ONT1 (Sequenz s. Kap. 8.1) mit folgenden Derivatisierungen verwendet:

Oligo1 (terminal nicht-derivatisiertes ONT1)
Oligo2 (5´-mPEG2000-ONT1)
Oligo3 (5´-mPEG400-ONT1-mPEG2000-3´)
Oligo4 (5´-mPEG2000-ONT1-mPEG400-3´)

Als 3´-Exonuklease kam die Phosphodiesterase I (snake venom), als 5´-Exonuklease die Phosphodiesterase II (bovine spleen) zum Einsatz, welche einzelsträngige DNA vom jeweiligen Terminus her abbauen.

Da sämtliche Oligonukleotide nicht als Phosphodiester (–P=O) sondern als Thiophosphate (–P=S) vorlagen, sollten eigentlich alle eine stark erhöhte Resistenz gegenüber den Exonukleasen aufweisen[(134)]. Durch einen teilweisen Austausch von –P=S zu –P=O kann es jedoch auch hier zu Instabilitäten kommen.
Die am 5´-Terminus derivatisierten Sequenzen (Oligo2, Oligo3 und Oligo4) sollten eine nochmals erhöhte Stabilität gegenüber der 5´-Exonuklease, die am 3´-Terminus derivatisierten Sequenzen (Oligo3 und Oligo4) eine nochmals erhöhte Stabilität gegenüber der 3´-Exonuklease zeigen.
Interessant ist vor allem die Frage, ob die unterschiedlich langen Polyethylenglykol-Ketten der beidseitig derivatisierten Sequenzen (Oligo3 und Oligo4) auch zu unterschiedlich ausgeprägten Resistenzen führen.
Die vier zu testenden Oligonukleotid-Thiophosphate wurden zunächst in 15nmol-Aliquote aufgeteilt und im Speedvac getrocknet.
Für den Abbau mit Phosphodiesterase I (3´-Exonuklease) wurde jeweils ein 15nmol-Aliquot in 94µl Reaktionspuffer (100mM Tris-HCl pH8,9 / 100mM NaCl / 14mM $MgCl_2$) gelöst und 6µl (0,3U) Phosphodiesterase I zugegeben (0,05U/µl in 110mM Tris-HCl pH8,9 / 110mM NaCl / 15mM $MgCl_2$ / 50%Glycerin).
Jeweils ein weiteres Aliquot wurde zum Abbau mit Phosphodiesterase II (5´-Exonuklease) in 5µl 2M TEAA pH6,5 gelöst und 95µl (0,95U) Phosphodiesterase II zugegeben (0,01U/µl in Wasser). Als Reaktionspuffer ergibt sich somit 0,1M TEAA pH 6,5.
Die Ansätze wurden daraufhin bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach definierten Zeitabständen (0min, 30min, 1h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h und 144h) wurden aus jedem Ansatz zwei 5µl Aliquote (0,75nmol) entnommen und zur Inaktivierung der jeweiligen Exonuklease in einem Heizblock 5min lang auf 95°C erhitzt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Proben in je 15µl HPLC-Puffer (0,04M KH_2PO_4 / 0,002% H_3PO_4) aufgenommen und bis zur weiteren HPLC-Untersuchung eingefroren.
Die HPLC-Analysen zur Detektion der Abbauprodukte (Chromatogramme s. Anhang 8.2.1 und 8.2.2) wurden mit einer LiChroCART 125-4 RP-18e Hauptsäule (Merck) durchgeführt, welche durch eine LiChroCART 4-4 RP-18e Vorsäule geschützt wurde. Als Puffer wurde Acetonitril und 0,04M KH_2PO_4 / 0,002% H_3PO_4 verwendet. Das Probeauftragevolumen betrug jeweils 20µl.
Der verwendete Gradient „0bis13,5/50Proz_1ml_30min “ (s. Kap. 6.4.1) steigt in den ersten 7min nur sehr flach an um dann weitere 7min auf einer niedrigen Acetonitril-Konzentration (13,5%) zu bleiben. Während dieser Zeit eluieren die niedermolekularen Abbauprodukte (Nukleoside, Nukleotide, Dinukleotide…). Nach 14min steigt der Acetonitrilgehalt innerhalb von 4min auf 50% an, um 5min auf diesem Wert zu bleiben. In dieser Zeit eluiert das restliche, nicht abgebaute Oligonukleotid-Thiophosphat. Nach der vollständigen Elution sinkt der Acetonitrilgehalt wieder auf 0%.
Die einzelnen Peakflächen der aufgenommenen Chromatogramme wurden integriert. Aus dem prozentualen Flächenanteil der Abbauprodukte (Rezentionszeit 2min – 12min) an der Gesamtpeakfläche können Aussagen über die Abbaurate gemacht werden. Die absoluten Werte der Peakhöhen bzw. Flächen sind hingegen nicht aussagekräftig, da sich die allgemeine Signalstärke als sehr stark abhängig vom Alter der verwendeten Vorsäule erweist. Weitere Fehlerquellen, die eine Toleranz der Peakflächen-Verhältnisse von ca. ± 2% bewirken, sind in erster Linie Störsignale, eine unregelmäßige gebogene Grundlinie sowie das starke Tailing (schmieren) des Oligonukleotidpeaks bei > 20min.

Ein Beispielchromatogramm für den 3´-Exonuklease-Abbau von Oligo1 nach 24h ist in Abb. 253 dargestellt. Der komplette Satz an Chromatogrammen befindet sich im Anhang (Kap. 8.2.1 und 8.2.2).

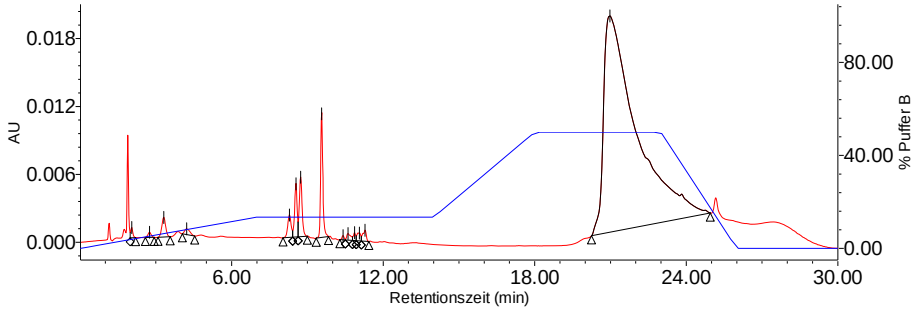


Abb. 253: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo1 24h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **11%**

Ergebnisse der Abbauversuche mit Exonukleasen:

Da sämtliche getesteten Oligonukleotide als Thiophosphate vorlagen, zeigen sie auch alle eine gewisse Resistenz gegenüber den eingesetzten Exonukleasen. Die als 5´-Exonuklease verwendete Phosphodiesterase II wies dabei allerdings, im Gegensatz zu der als 3´-Exonuklease verwendeten Phosphodiesterase I, eine allgemein stärkere Aktivität auf.
Das terminal unmodifizierte Oligo1 (ONT1, in den folgenden Diagrammen gelb dargestellt) wurde dabei am leichtesten abgebaut. Bereits nach einstündiger Inkubation mit der 3´-Exonuklease kam es zu einer Abbaurate von ca. 2% welche sich nach 144h auf ca. 16% steigerte. Die 5´-Exonuklease führte nach 6h zu einer Abbaurate von ca. 3% und steigerte sich nach 72h auf ca. 27%. Der etwas geringere Wert nach 144h (25%) liegt innerhalb der Fehlertoleranz. Als Fehlerquellen für eine Toleranz von ca. ± 2% kommen in erster Linie Störsignale, eine unregelmäßige gebogene Grundlinie sowie das lange „Tailing“ des Restoligonukleotid-Peaks bei > 20min in Frage, was eine Integration der Peakflächen erschwert.
Das ungeschützte 3´-Ende des Oligo2 (mPEG2000-ONT1, in den folgenden Diagrammen rot dargestellt) wurde durch die 3´-Exonuklease in ähnlicher Weise abgebaut wie das beidseitig ungeschützte Oligo1. Auch hier lag die Abbaurate nach 1h bei 2% und steigerte sich nach 144h auf ca. 18%. Der mit mPEG2000 geschützte 5´-Terminus zeigte sich jedoch wesentlich resistenter gegenüber der 5´-Exonuklease als das ungeschützte Oligo1. Nach 144h Inkubationszeit lag eine Abbaurate von weniger als 10% vor.
Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000, in den folgenden Diagrammen blau dargestellt) und Oligo4 (mPEG2000-ONT1-mPEG400, in den folgenden Diagrammen grün dargestellt) sind beidseitig derivatisiert. Sie wiesen sowohl gegenüber der 3´-Exonuklease als auch gegenüber der 5´-Exonuklease eine wesentlich höhere Resistenz auf als die ungeschützte Variante. Im Falle der 3´-Exonuklease zeigten sich signifikante Abbauerscheinungen von ca. 2% bzw. 3% erst nach 144h. Bei Behandlung mit der 5´-Exonuklease waren erste Abbauerscheinungen in Höhe von ca. 1% nach 6h bzw. 24h sichtbar. Nach 144h lag die Abbaurate mit 5% bzw. 8% immer noch wesentlich niedriger als beim ungeschützten Oligo1.
Ein direkter Vergleich der Stabilität der beiden zweiseitig derivatisierten Oligonukleotide liefert im Rahmen der Meßgenauigkeit allerdings keinen signifikanten Unterschied.
Die Resultate der Abbauversuche mit den Exonukleasen sind in den folgenden Tabellen (Tab. 1 und Tab. 2) sowie grafisch in Diagrammen (Abb. 254 und Abb. 255) zusammenfassend dargestellt.

	Oligo1 (ONT1)	**Oligo2** (mPEG2000-ONT1)	**Oligo3** (mPEG400-ONT1-mPEG2000)	**Oligo4** (mPEG2000-ONT1mPEG400)
0h	n.n.	< 1%	n.n.	n.n.
0,5h	1%	< 1%	< 1%	n.n.
1h	2%	2%	< 1%	n.n.
3h	4%	4%	< 1%	n.n.
6h	7%	7%	n.n.	n.n.
24h	11%	7%	n.n.	n.n.
48h	10%	12%	< 1%	< 1%
72h	12%	12%	< 1%	1%
144h	16%	18%	2%	3%

Tab. 1: Wertetabelle des 3´-Exonuklese-Abbaus von Oligo1 – Oligo4
(Anteil der niedermolekularen Abbauprodukte)

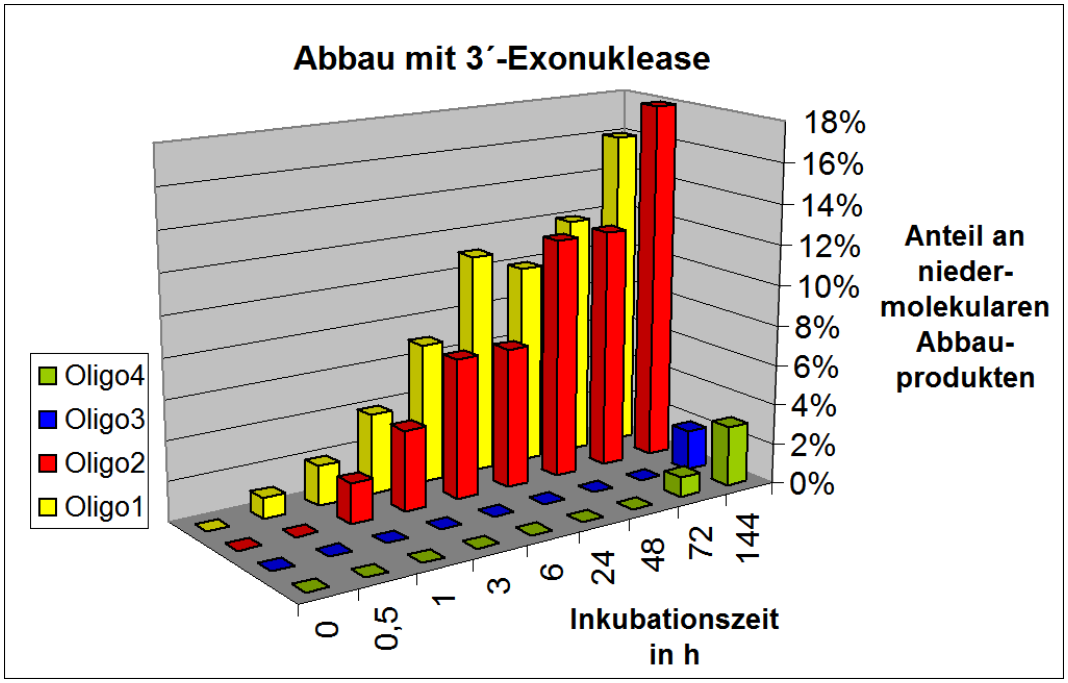


Abb. 254: Diagramm des 3´-Exonuklese-Abbaus von Oligo1 – Oligo4

	Oligo1 (ONT1)	**Oligo2** (mPEG2000-ONT1)	**Oligo3** (mPEG400-ONT1-mPEG2000)	**Oligo4** (mPEG2000-ONT1mPEG400)
0h	< 1%	< 1%	n.n.	n.n.
0,5h	< 1%	< 1%	n.n.	< 1%
1h	1%	< 1%	< 1%	< 1%
3h	1%	1%	n.n.	n.n.
6h	3%	1%	1%	n.n.
24h	8%	4%	2%	1%
48h	10%	4%	1%	1%
72h	27%	7%	4%	8%
144h	25%	9%	5%	8%

Tab. 2: Wertetabelle des 5´-Exonuklese-Abbaus von Oligo1 – Oligo4
(Anteil der niedermolekularen Abbauprodukte)

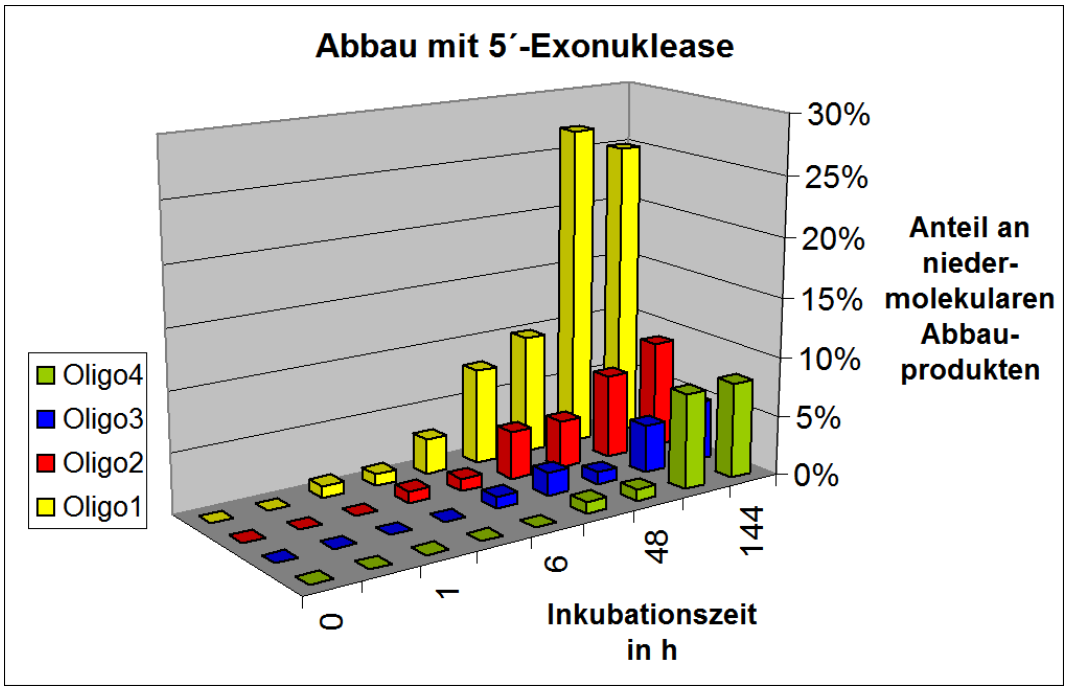


Abb. 255: Diagramm des 5´-Exonuklese-Abbaus von Oligo1 – Oligo4

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die terminalen Derivatisierungen ihren Zweck erfüllen. Am 5´-Ende mPEG-derivatisierte Oligonukleotide zeigen eine stark erhöhte Stabilität gegenüber der 5´-Exonuklease (Oligo2 in Abb. 255), während beidseitig derivatisierte Oligonukleotide (Oligo3 und Oligo4) eine wesentlich höhere Resistenz sowohl gegenüber gegenüber der 3´-Exonuklease (Abb. 254) als auch gegenüber der 5´-Exonuklease (Abb. 255) aufweisen als terminal unmodifizierte Oligonukleotide.

4.3.2. Abbau durch Endonukleasen (HPLC-Analyse)

Nach den Abbauversuchen mit Exonukleasen sollen nun die relativen Stabilitäten der mPEG-derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphate gegenüber einer Endonuklease ermittelt werden. Die verwendete S1-Endonuklease (Sigma) ist in der Lage, einzelsträngige Oligonukleotide abzubauen. Da eine Endonuklease nicht terminal angreift, sondern den DNA-Strang von innen her abbaut, ist es interessant, den Einfluß von endständigen Modifizierungen auf die Abbaurate des Oligonukleotids zu ermitteln.

Für die Abbauversuche wurden neben den in Kapitel 4.2.3.4 und 4.2.3.5 beschriebenen, beidseitig asymmetrisch derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphaten, auch eine erweiterte Auswahl der in Kapitel 4.1.4 beschriebenen Produkte mit folgenden Derivatisierungen verwendet

Oligo1 (terminal unmodifiziertes ONT1)
Oligo2 (mPEG2000-ONT1)
Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000)
Oligo4 (mPEG2000-ONT1-mPEG400)
Oligo5 (mPEG400-ONT1)
Oligo6 (ONT1-mPEG400)
Oligo7 (mPEG400-ONT1-mPEG400)

Da sämtliche Oligonukleotide nicht als Phosphodiester (–P=O) sondern als Thiophosphate (–P=S) vorlagen, sollten alle eine hohe Resistenz gegenüber Nukleasen, insbesondere der S1-Endonuklease, aufweisen[(134)]. Durch einen teilweisen Austausch von –P=S zu –P=O kann es jedoch auch hier zu Instabilitäten kommen.
Die 7 zu testenden Oligonukleotid-Thiophosphate wurden im Speedvac getrocknet und in einer Konzentration von 1nmol/µl in Wasser gelöst.
Für die Abbauversuche wurden 20nmol Oligonukleotid-Thiophosphat (20µl) mit 160µl Wasser versetzt und 20µl 10x S1-Reaktionspuffer (300mM Na-Acetat, 2800mM NaCl, 10mM $ZnSO_4$ bei pH 4,6) zugegeben. Ein einzelner Ansatz hatte somit ein Volumen von 200µl mit einer Oligonukleotidkonzentration von 0,1nmol/µl in 1x S1-Reaktionspuffer (30mM Na-Acetat, 280mM NaCl, 1mM $ZnSO_4$ bei pH 4,6).
Zum Start des Abbaus wurde zu jedem Ansatz 40U S1-Endonuklease gegeben, was einem Enzym-Substrat Verhältnis von 2U/nmol entspricht.
Die Ansätze wurden daraufhin bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach definierten Zeitabständen (0min, 10min, 30min, 1h, 3h, 6h, 24h und 48h) wurde aus jedem Ansatz drei 7,5µl Aliquote (0,75nmol) entnommen und zur Inaktivierung des Enzyms für 10min auf 95°C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Proben in je 190µl HPLC-Puffer (0,04M KH_2PO_4 / 0,002% H_3PO_4) aufgenommen und bis zur weiteren HPLC-Untersuchung eingefroren.
Für die HPLC-Analysen wurden der gleiche Gradient und das gleiche Puffersystem wie bei den Abbauversuchen mit den Exonukleasen verwendet (s. Kap. 4.3.1). Ein Beispielchromatogramm für den S1-Endonuklease-Abbau von Oligo1 nach 6h ist in Abb. 256 dargestellt. Der komplette Satz an Chromatogrammen befindet sich im Anhang (Kap. 8.2.3).

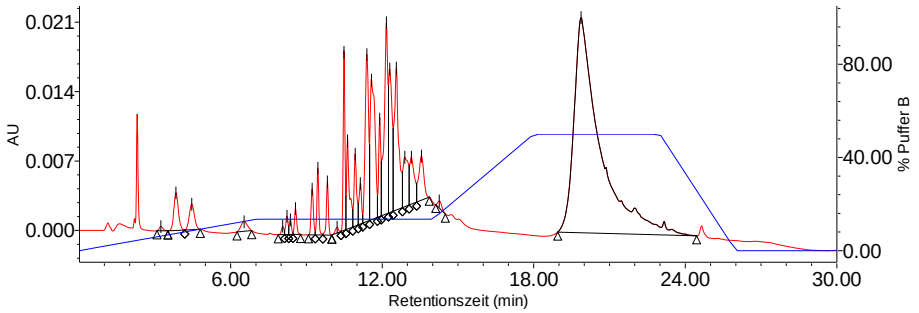


Abb. 256: S1-Endonuklease-Abbau Oligo1 6h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **50%**

Ergebnisse der Abbauversuche mit S1-Endonuklease:

Die Resultate der Abbauversuche mit S1-Endonuklease sind in folgender Tabelle (Tab. 3) sowie grafisch in einem Diagramm (Abb. 257) zusammenfassend dargestellt.

	Oligo1 (ONT1)	**Oligo2** (mPEG2000-ONT1)	**Oligo3** (mPEG400-ONT1-mPEG2000)	**Oligo4** (mPEG2000-ONT1mPEG400)	**Oligo5** (mPEG400-ONT1)	**Oligo6** (ONT1-mPEG400)	**Oligo7** (mPEG400-ONT1-mPEG400)
0h	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
0,17h	10%	5%	1%	1%	3%	10%	1%
0,5	18%	9%	6%	4%	7%	14%	3%
1h	26%	14%	9%	9%	12%	20%	4%
3h	40%	25%	16%	13%	18%	31%	7%
6h	50%	33%	21%	18%	23%	35%	10%
24h	66%	44%	41%	35%	48%	55%	30%
48h	68%	55%	43%	44%	54%	60%	37%

Tab. 3: Wertetabelle des S1-Endonuklese-Abbaus von Oligo1 – Oligo7
(Anteil der niedermolekularen Abbauprodukte)

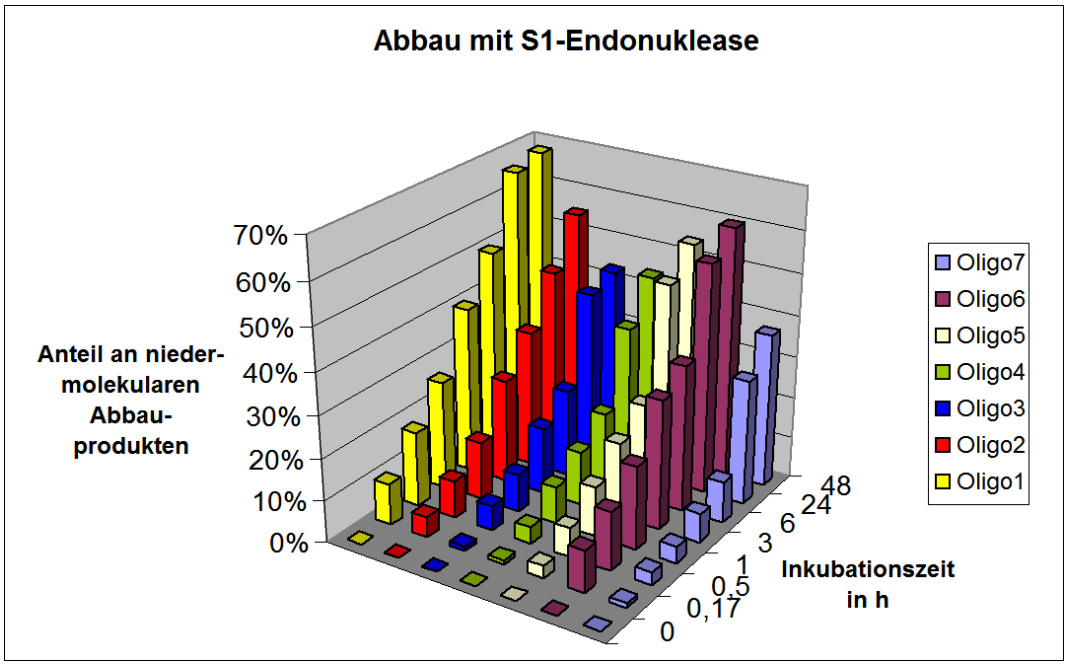


Abb. 257: Diagramm des S1-Endonuklese-Abbaus von Oligo1 – Oligo7

Die bereits nach kurzen Inkubationszeiten vorhandenen Peaks der niedermolekularen Abbauprodukte mit Retentionszeiten von 7-15min zeigen, dass die untersuchten Oligonukleotid-Thiophosphate durch die S1-Endonuklease allgemein stärker und schneller abgebaut werden als durch die im vorigen Abbauexperiment (Kap. 4.3.1) verwendeten Exonukleasen.
Als allgemeine Tendenz ergibt sich, dass die Ausbildung der niedermolekularen Abbauprodukte bei beidseitig derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphaten (Oligo3, Oligo4 und Oligo7) etwas später erfolgt und auch nicht so ausgeprägt ist wie bei entsprechenden einseitig derivatisierten Sequenzen. Gründe dafür könnten in einer, durch die beidseitige terminale mPEG-Derivatisierung, veränderten Molekülkonformation liegen, wodurch die Wechselwirkung der S1-Endonuklease mit dem Oligonukleotid erschwert wird. Dieser Effekt wurde in ähnlicher Form schon bei der Rezeptor-Ligand Wechselwirkung von Polyethylenglykol-modifizierten Proteinen wie dem Interferon beschrieben[(66)].
Das terminal nicht derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphat (Oligo1) wird in dieser Versuchsreihe am schnellsten abgebaut.
Scheinbar weist die beidseitig mit mPEG400 derivatisierte Sequenz (Oligo7) eine höhere Resistenz auf als die beiden gemischten Derivate (Oligo3 und Oligo4), die sich untereinander kaum unterscheiden.
Die beiden einseitig mit mPEG400 derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphate zeigen hingegen ein stark unterschiedliches Verhalten. Die 5´-derivatisierte Variante (Oligo5) weist eine sehr hohe Resistenz auf, die fast an die gemischt substituierten Derivate herankommt, während die 3´-derivatisierte Variante (Oligo6) eine extrem geringe Resistenz ähnlich der des terminal unmodifizierten Oligonukleotid-Thiophosphats zeigt.
Nach 24 Stunden ist bei allen Ansätzen ein erhöhter Abbau zu verzeichnen, wodurch die relativen Unterschiede in der Abbaurate geringer werden. Nach 48 Stunden ist nur noch eine geringe Änderung der Werte feststellbar, was darauf hindeuten könnte, dass das Enzym mit der Zeit inaktiv wird.

Betrachtet man die HPLC-Chromatogramme der S1-Abbauversuche jedoch genauer, so wird deutlich, dass sich das Signal des Restoligonukleotids mit einer Retentionszeit von 20min auch bei den beidseitig mPEG-derivatisierten Oligonukleotiden Oligo3, Oligo4 und Oligo7 (Abb. 487 bis Abb. 502 / Abb. 519 bis Abb. 526) schon nach kurzer Zeit in einen Doppelpeak aufspaltet (s. Beispielchromatogramm in Abb. 258).

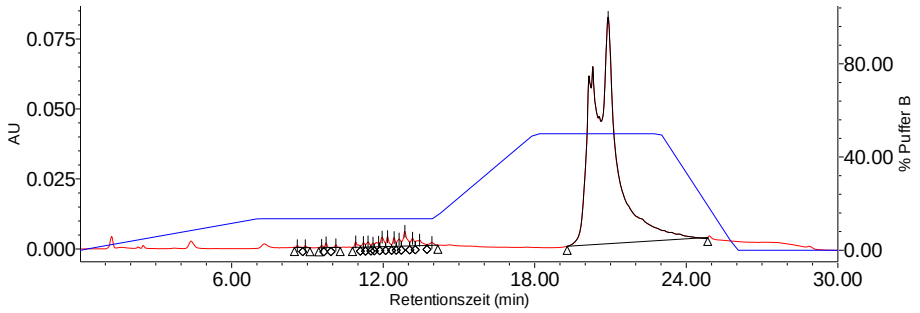


Abb. 258: S1-Endonuklease-Abbau Oligo3 30min (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **6%**

Beim beidseitig mPEG400-derivatisierten Oligo7 (Abb. 519 bis Abb. 526) wird dieser Effekt erst nach einer Inkubationszeit von ca. 1h deutlich, während bei den gemischt-derivatisierten Sequenzen Oligo3 und Oligo4 (Abb. 487 bis Abb. 502) bereits nach 10min ein Doppelpeak bzw. eine deutliche Verschmälerung des ürsprünglichen Peaks bei 20min zu beobachten ist.
Spätere Untersuchungen (s. Kap. 4.3.3) ergaben, durch Kopplung der chromatographischen HPLC-Analyse mit einem massenspektroskopischen Verfahren (MALDI-TOF MS), dass auch beidseitig derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphate durch die S1-Endonuklease intern gespalten werden. Dabei entstehen 2 größere Fragmente, jeweils mit einem endsprechenden mPEG-Rest am 3´- bzw. 5´-Ende (Abb. 278). Diese mPEG-haltigen Bruchstücke weisen Retentionszeiten von ca. 20min auf und bilden den zu beobachtenden Doppelpeak. Die beiden Fragmente werden bei längerer Inkubationszeit weiterhin intern gespalten, wodurch die Peaks der niedermolekularen Abbauprodukte mit einer Retentionszeit von 7-15min entstehen.
Auch die nur noch geringe Änderung der Peakflächen-Verhältnisse nach 48h, was zuerst mit einer abnehmenden Enzymaktivität erklärt wurde, ist wohl auf diese Spaltung zurückzuführen. Nach 48h ist das Phosphat-Rückgrat sämtlicher Oligonukleotid-Thiophosphate bereits komplett hydrolysiert, der Ansatz besteht zu diesem Zeitpunkt nur noch aus niedermolekularen Abbauprodukten und den beiden größeren mPEG-haltigen Fragmenten.

4.3.3. Abbauuntersuchungen durch Kopplung von HPLC und MALDI-TOF MS

Ein RP-HPLC-Chromatogramm allein reicht zur vollständigen Beurteilung eines Abbauexperiments nicht aus. Größere Restoligonukleotide eluieren trotz unterschiedlicher Länge, aufgrund der geringen Trennleistung, in der RP-HPLC bei der gleichen Retentionszeit. Somit ist durch RP-HPLC keine Trennung zwischen Sequenzen der Länge n, n-1, n-2... möglich, wodurch ein eventueller Abbau nicht detektiert würde. Eine anschließende Untersuchung mittels MALDI-TOF MS ermöglicht jedoch eine genauere Interpretation
Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Abbauexperimenten soll das Hauptaugenmerk diesmal nicht auf den niedermolekularen Abbauprodukten, sondern auf den längerkettigen Oligonukleotidresten liegen.
Für die Untersuchungen wurden ein beidseitig gemischt derivatisiertes und das terminal unmodifizierte Oligonukleotid-Thiophosphat herangezogen.

Oligo1 (terminal unmodifiziertes ONT1)
Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000)

Für die Abbauversuche kam ein Universalpuffer (70mM TRIS-HCl pH7,5 50mM NaCl, 20mM $MgCl_2$) zum Einsatz, in dem sowohl die S1-Endonuklease[(135)] als auch die beiden Exonukleasen (Phosphodiesterase I und Phosphodiesterase II) gute Aktivitäten aufweisen.

Die Oligonukleotid-Thiophosphate wurden im Speedvac getrocknet und in einer Konzentration von 1nmol/µl in Wasser gelöst. Zum Abbau wurden 10nmol Oligonukleotid-Thiophosphat (10µl) mit 10µl 10x Universalpuffer versetzt und entsprechend der verwendeten Enzymmenge mit Wasser auf 100µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden daraufhin bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
Folgende Enzym-Substrat Verhältnisse wurden verwendet:

S1-Endonuklease: 0,5U pro nmol Oligo
Phosphodiesterase I (3´-Exo): 0,2U pro nmol Oligo
Phosphodiesterase II (5´-Exo): 0,075U pro nmol Oligo

Zum Abbau mit S1-Endonuklease wurden die Oligonukleotid-Thiophosphate lediglich mit diesem Enzym inkubiert, der Abbau mit den Exonukleasen erfolgte hingegen mit einem Gemisch aus Phosphodiesterase I (3´-Exonuklease) und Phosphodiesterase II (5´-Exonuklease).

Ein einzelner Ansatz hat somit ein Volumen von 100µl bei einer Oligonukleotid-konzentration von 0,1nmol/µl in 1x Reaktionspuffer.
Nach 24h wurde aus jedem Ansatz ein 7,5µl Aliquot (0,75nmol) entnommen und zur Inaktivierung der Enzyme 10min lang auf 95°C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Proben in je 190µl HPLC-Puffer (0,1M TEAA pH 7,5) aufgenommen und bis zur weiteren HPLC-Untersuchung eingefroren.
Die HPLC-Analysen zur Detektion der Abbauprodukte erfolgten auf einer LiChroCART 125-4 RP-18e Hauptsäule (Merck) welche durch eine LiChroCART 4-4 RP-18e Vorsäule geschützt wurde. Als Puffer kam ein System aus Acetonitril und 0,1M TEAA pH7,5 zum Einsatz. Im Gegensatz zum bisher verwendeten Kaliumhydrogenphosphat-Puffer (s. Kap. 4.3.1) liefert der TEAA-Puffer keine störenden Alkali-Addukte bei einer nachfolgenden massenspektroskopischen Untersuchung. Die Signale der niedermolekularen Abbauprodukte (Retentionszeit 7-15min) sind bei Verwendung dieses Puffers nur noch schwach ausgeprägt. Im Gegenzug erhält man jedoch eine bessere Auflösung im hinteren Bereich des Chromatogramms (Retentionszeit > 20min) wodurch das bislang stark verschmierte Signal (Tailing) des Restoligonukleotids als scharfer Peak abgebildet wird.
Das Probeauftragevolumen betrug jeweils 200µl. Die relevanten Peaks wurden aufgefangen und bis zur weiteren Untersuchung durch MALDI-TOF MS eingefroren.

Zur Entfernung von noch eventuell anhaftenden Alkali-Ionen, welche in der MALDI-TOF MS zu störenden Addukt-Peaks führen würden, wurden die noch im TEAA-Puffer befindlichen HPLC-Eluate getrocknet, in 100µl Wasser gelöst und mit einigen Körnchen Kationenaustauscher versetzt. Diese Suspension wurde 30min bei Raumtemperatur inkubiert, gevortext und schließlich zur Trocknung im Speedvac in ein neues Gefäß überführt.
Die getrockneten Proben wurden mit 0,25µl Wasser, 2µl Matrixlösung (bestehend aus einer gesättigten Lösung von 3-Hydroxypicolinsäure in Wasser : Acetonitril 7:3) und 0,25µl Ammoniumcitratpuffer (bestehend aus einer gesättigten Ammoniumcitratlösung pH 5,0 in Wasser : Acetonitril 7:3) versetzt, gevortext und abzentrifugiert. Zwei Mikroliter dieser

Lösung wurden daraufhin auf eine MALDI-Platte aufgetragen und zur Kristallisation gebracht.
Die MALDI-Messungen erfolgten auf einem Bruker Reflex III Massenspektrometer nach der Methode RP_5-20kDa im Reflektor-Modus (s. Kap. 6.6).

Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) direkt nach Zugabe der Exonukleasen:

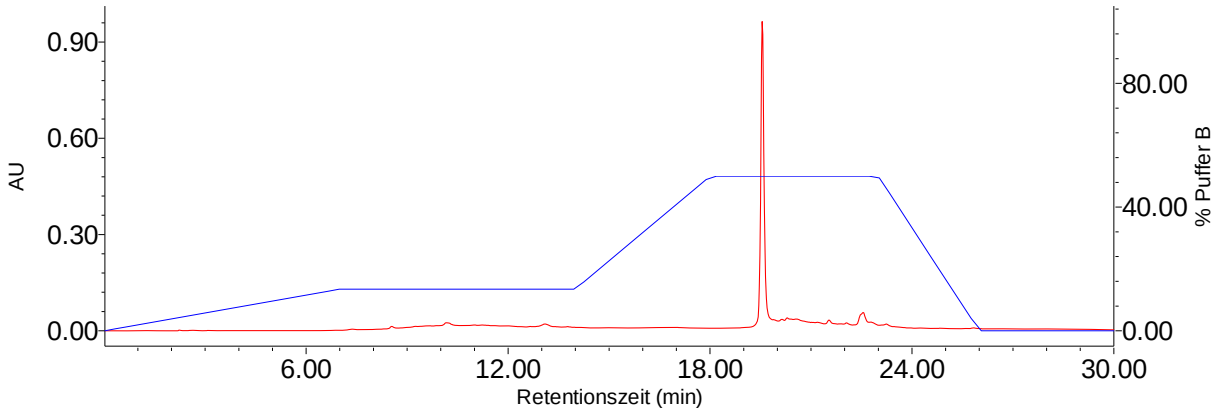


Abb. 259: RP-HPLC von Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) direkt nach Zugabe der Exonukleasen

Das HPLC-Chromatogramm zeigt direkt nach Zugabe der Exonukleasen einen einzelnen Peak bei 19,5min (Abb. 259).

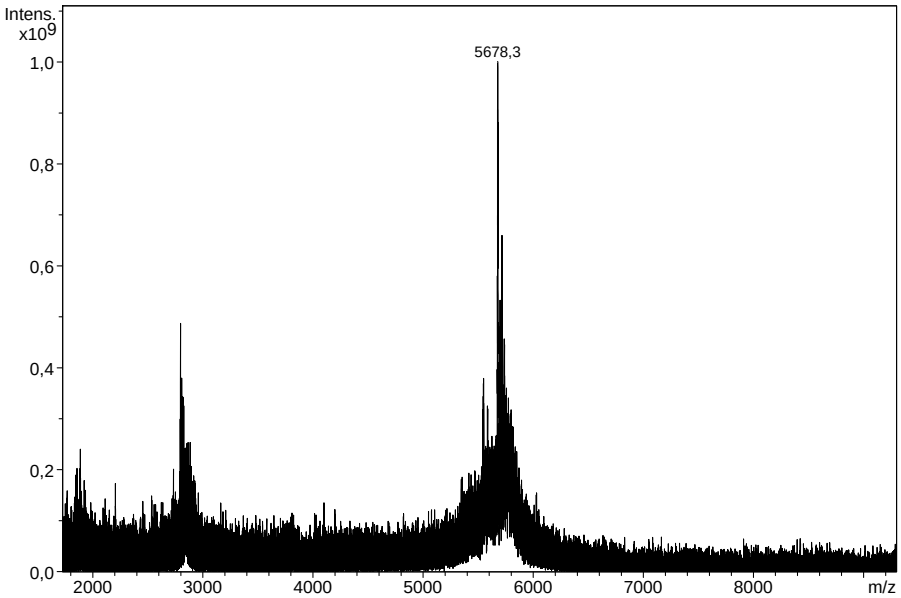


Abb. 260: MALDI-TOF-MS von Oligo1 (ungeschütztes ONT1 direkt nach Zugabe der Exonukleasen (HPLC-Peak bei 19,5min)

Das MALDI-TOF Massenspektrum (Abb. 260) des Peaks bei 19,5min liefert einen Massepeak bei 5678Da. Dies entspricht der Masse des eingesetzten Oligonukleotid-Thiophosphats (5681Da) und zeigt, dass direkt nach Enzymzugabe noch kein Abbau des terminal ungeschützten Oligonukleotid-Thiophosphats erfolgt ist.

Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) nach 24h Inkubation mit Exonukleasen:

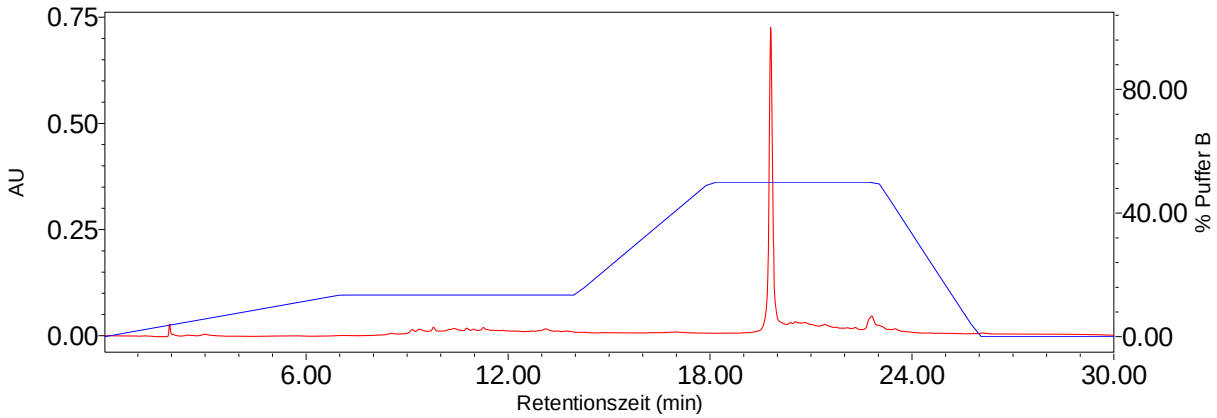


Abb. 261: RP-HPLC von Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) nach 24h Inkubation mit Exonukleasen

Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 261) zeigt nach 24h Inkubation mit Exonukleasen noch immer einen einzelnen Peak bei ca. 20min. Dies für sich allein betrachtet würde darauf hin deuten, dass kein oder nur ein sehr geringer Abbau stattgefunden hat.

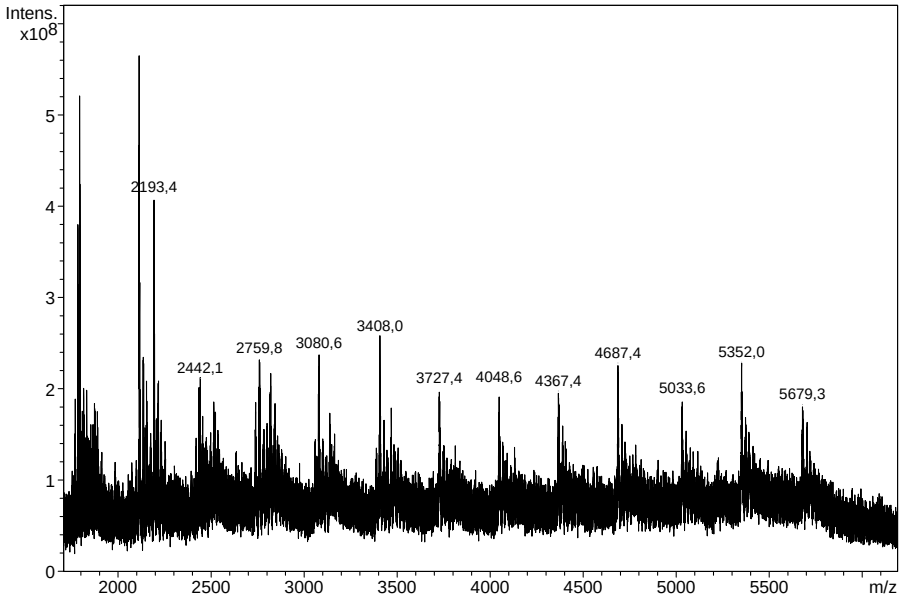


Abb. 262: MALDI-TOF MS von Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) nach 24h Inkubation mit Exonukleasen (HPLC-Peak bei 20min)

Das MALDI-TOF Massenspektrum (Abb. 262) dieses HPLC-Peaks hingegen zeigt eindeutig einen vollständigen Abbau des terminal ungeschützten Oligonukleotid-Thiophosphats. Der Massepeak des vollständigen Oligos bei 5679Da ist nur noch gering ausgeprägt, dafür ist eine komplette Leiter der Abbauprodukte mit n-1, n-2,... zu beobachten. Die Abstände der Peaks liegen jeweils im Bereich von ca. 320Da – 340Da was den Massen der einzelnen Nukleotide entspricht (A = 313Da, C = 289Da, G = 329Da, T = 304Da). Da jedoch durch Einsatz eines Gemisches aus 3´- und 5´-Exonuklease der Abbau von beiden Enden her stattfand, kann keine Aussage über die ursprüngliche Sequenz gemacht werden.

Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) direkt nach Zugabe der Exonukleasen:

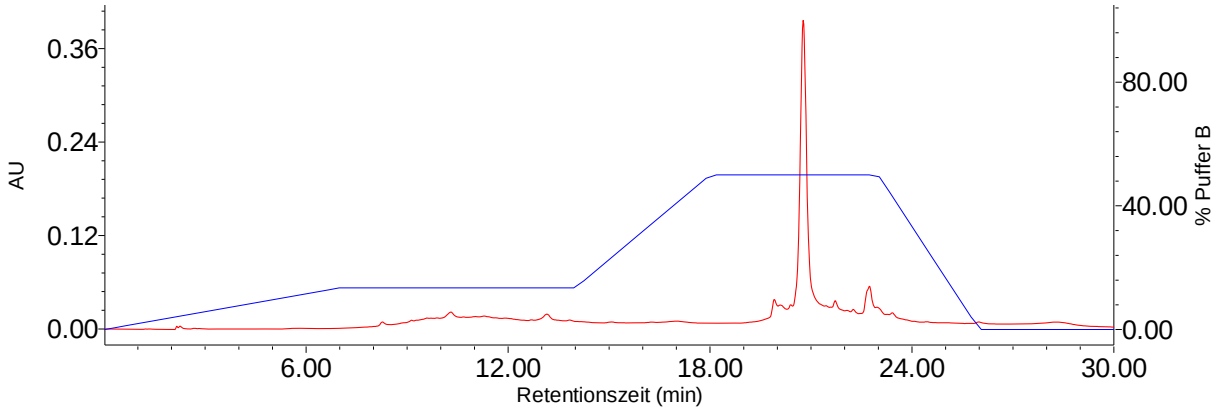


Abb. 263: RP-HPLC von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) direkt nach Zugabe der Exonukleasen

Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 263) zeigt direkt nach Zugabe der Exonukleasen einen einzelnen Peak bei ca. 21min.

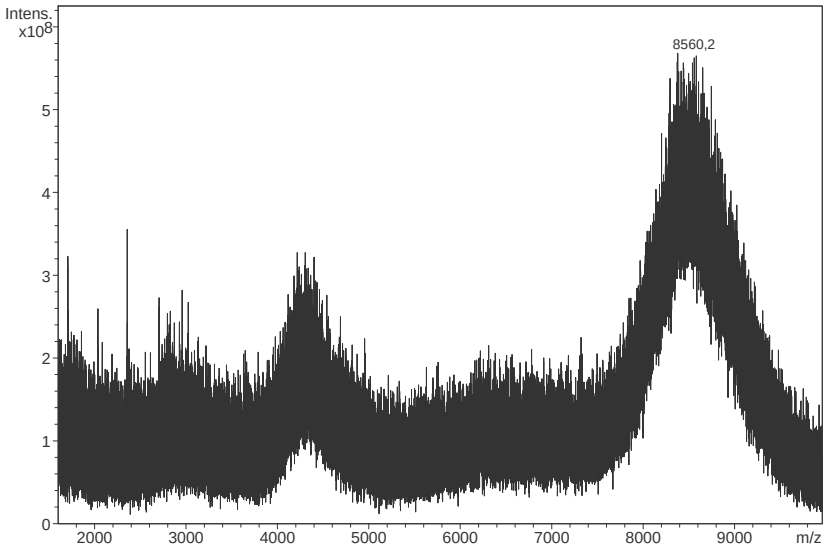


Abb. 264: MALDI-TOF MS von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) direkt nach Zugabe der Exonukleasen (HPLC-Peak bei 21min)

Das MALDI-TOF Massenspektrum (Abb. 264) des HPLC-Peaks bei 21min liefert einen polydispersen Massenpeak um 8500Da. Dies entspricht der Masse des eingesetzten, beidseitig derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphats (ca. 8500Da) und zeigt, dass direkt nach der Enzymzugabe noch kein Abbau der beidseitig geschützten Sequenz erfolgt ist.

Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) nach 24h Inkubation mit Exonukleasen:

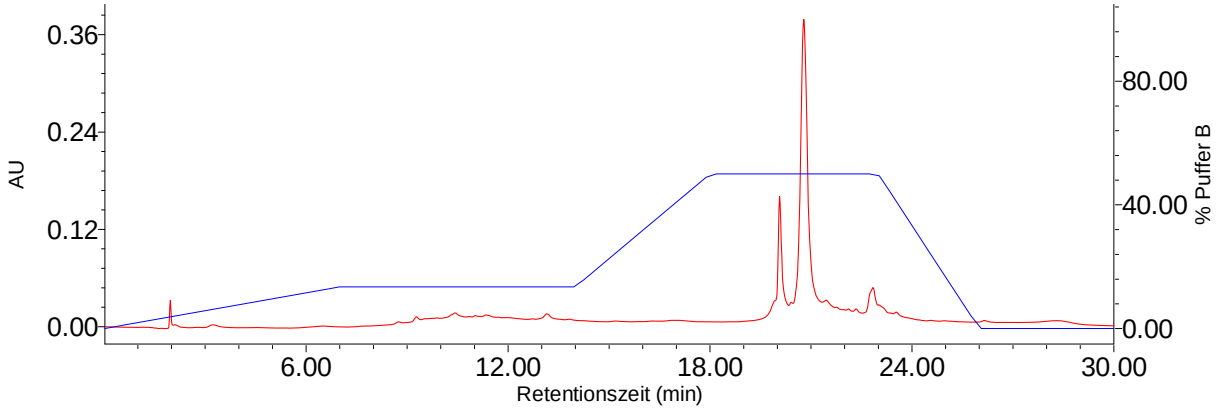


Abb. 265: RP-HPLC von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) nach 24h Inkubation mit Exonukleasen

Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 265) zeigt nach 24h Inkubation mit Exonukleasen neben dem ursprünglichen Peak bei ca. 21min einen zusätzlichen Peak bei ca. 20min.

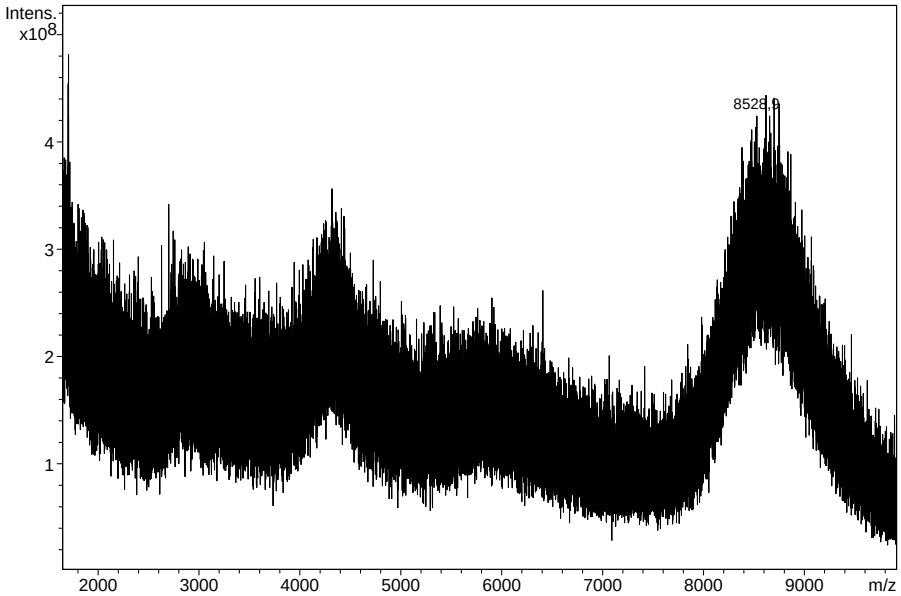


Abb. 266: MALDI-TOF MS von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) nach 24h Inkubation mit Exonukleasen (HPLC-Peak bei 21min)

Das MALDI-TOF Massenspektrum (Abb. 266) des HPLC-Peaks bei ca. 21min liefert nach wie vor einen polydispersen Peak um 8500Da was zeigt, dass selbst nach 24h so gut wie kein Abbau des beidseitig derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphats durch Exonukleasen erfolgt ist.

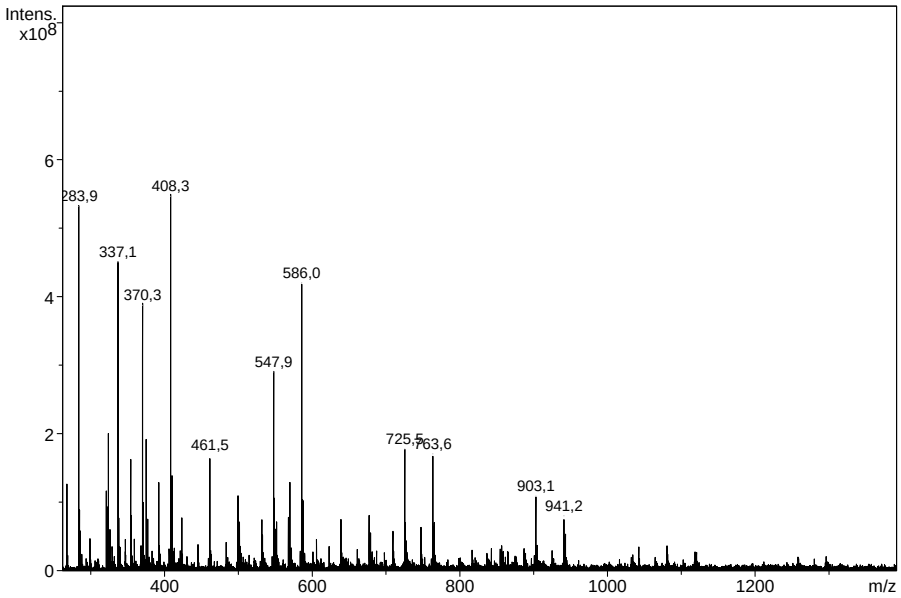


Abb. 267: MALDI-TOF MS von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) nach 24h Inkubation mit Exonukleasen (HPLC-Peak bei 20min)

Das MALDI-TOF Massenspektrum (Abb. 267) des HPLC-Peaks bei ca. 20min liefert mehrere monodisperse Peaks im Bereich von 300-1000Da. Dies ist sehr wahrscheinlich auf synthesebedingte Reste von einseitig derivatisierten Sequenzen zurückzuführen.

Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) direkt nach Zugabe der S1-Endonuklease:

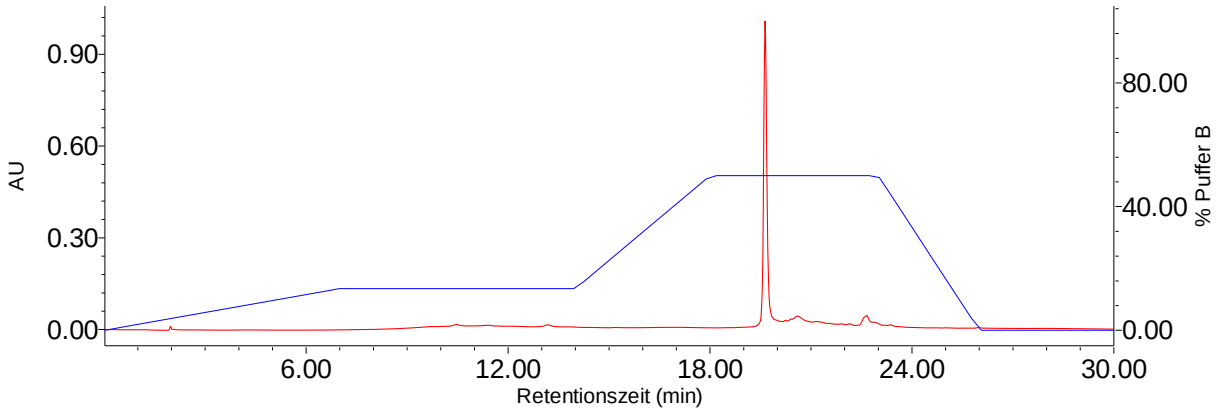


Abb. 268: RP-HPLC von Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) direkt nach Zugabe der S1-Endonuklease

Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 268) zeigt direkt nach Zugabe von S1-Endonuklease einen einzelnen Peak bei ca. 19,5min.

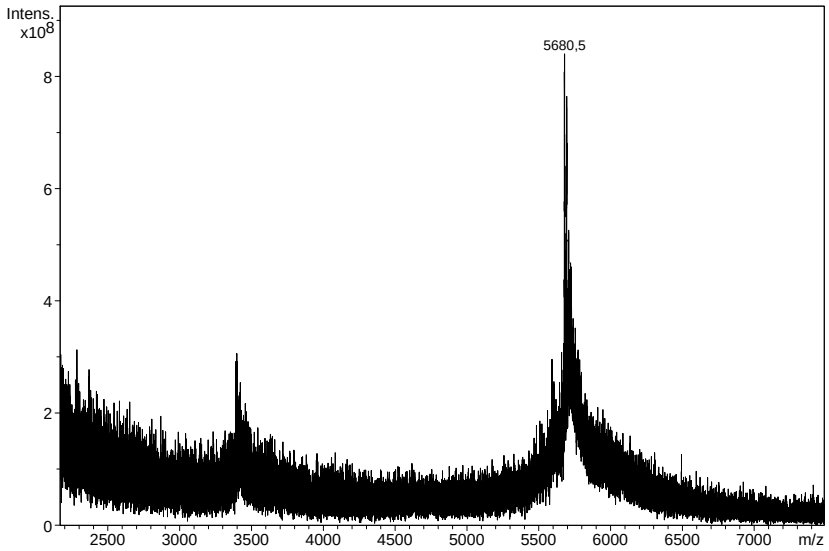


Abb. 269: MALDI-TOF MS von Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) direkt nach Zugabe der S1-Endonuklease (HPLC-Peak bei 19,5min)

Das MALDI-TOF Massenspektrum (Abb. 269) des HPLC-Peaks bei 19,5min liefert einen Massepeak bei 5680Da. Dies entspricht der Masse des eingesetzten Oligonukleotid-Thiophosphats (5681Da) und zeigt, dass direkt nach Enzymzugabe noch kein Abbau des terminal ungeschützten Oligonukleotid-Thiophosphats erfolgt ist.

Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) nach 24h Inkubation mit S1-Endonuklease:

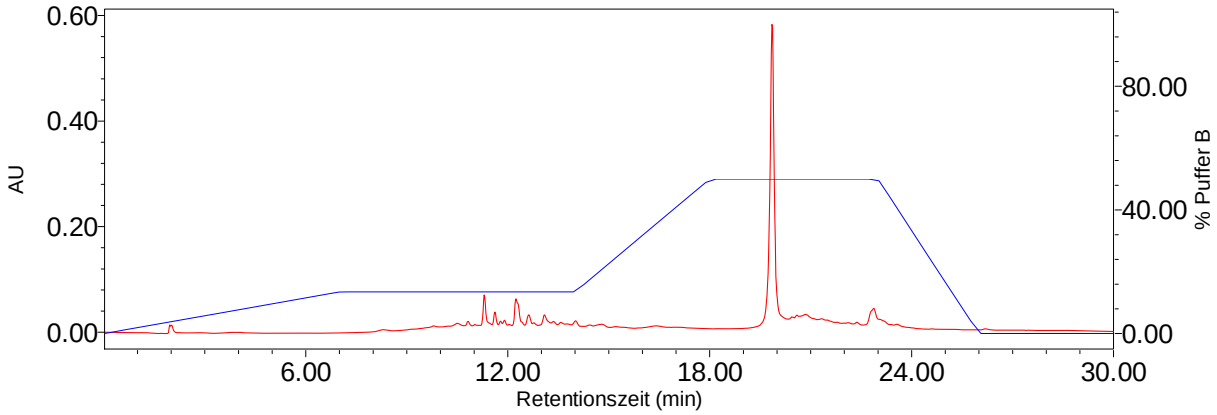


Abb. 270: RP-HPLC von Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) nach 24h Inkubation mit S1-Endonuklease

Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 270) zeigt nach 24h Inkubation mit S1-Endonuklease noch immer einen einzelnen Peak bei ca. 20min. Diese Tatsache deutet für sich allein betrachtet darauf hin, dass kein oder nur ein sehr geringer Abbau stattgefunden hat (analog zur 24h Inkubation mit den Exonukleasen in Abb. 261).

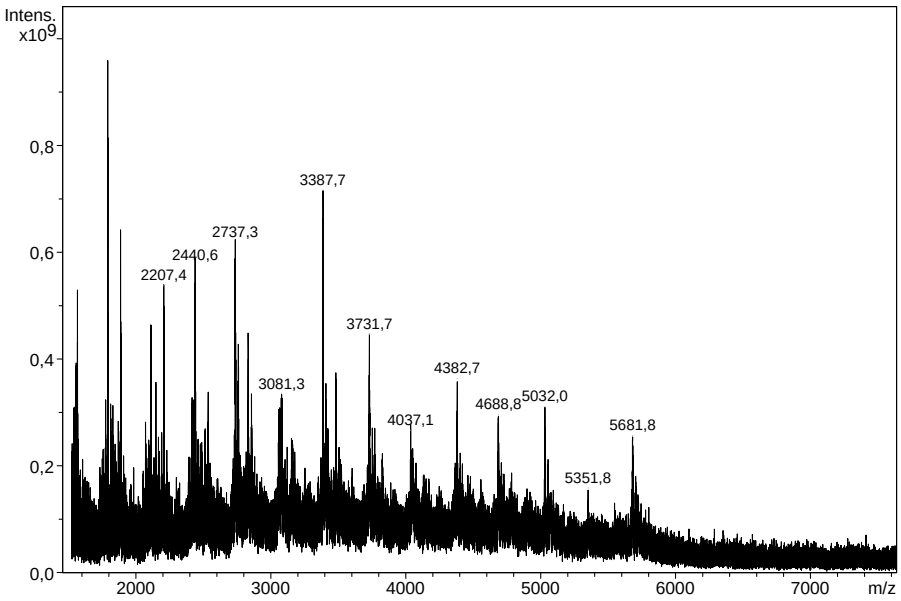


Abb. 271: MALDI-TOF MS von Oligo1 (unmodifiziertes ONT1) nach 24h Inkubation mit S1-Endonuklease (HPLC-Peak bei 20min)

Das MALDI-TOF Massenspektrum (Abb. 271) dieses HPLC-Peaks bei 20min (Abb. 270) zeigt hingegen einen vollständigen Abbau des terminal ungeschützten Oligonukleotid-Thiophosphats mit einem nur noch gering ausgeprägten Peak der kompletten Sequenz bei 5681Da. Auch hier ist eine komplette Leiter der Abbauprodukte mit n-1, n-2,... in Abständen von 320-340Da zu beobachten. Aufgrund des zufälligen Spaltmusters der S1-Endonuklease kann allerdings keine Aussage über die ursprüngliche Sequenz getroffen werden.

<u>Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) direkt nach Zugabe der S1-Endonuklease:</u>

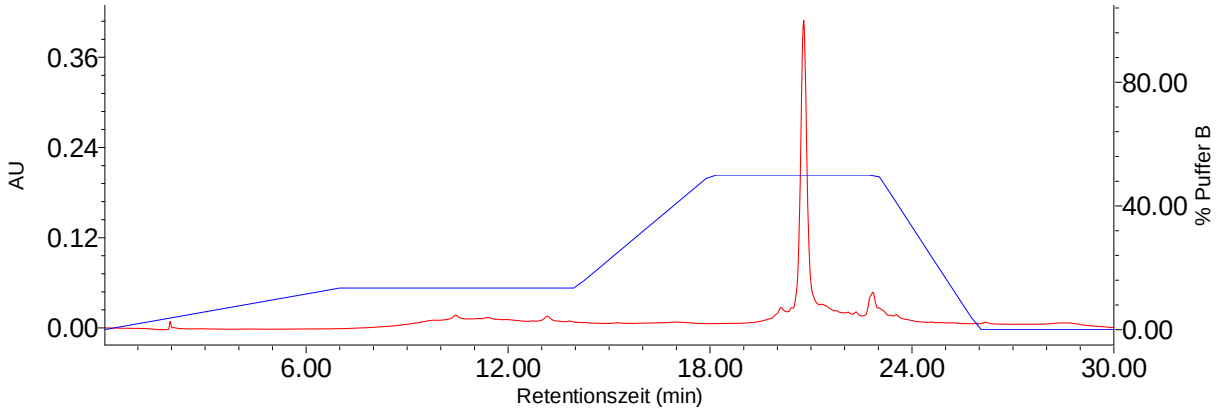


Abb. 272: RP-HPLC von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) direkt nach Zugabe der S1-Endonuklease

Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 272) zeigt direkt nach Zugabe von S1-Endonuklease einen einzelnen Peak bei ca. 21min.

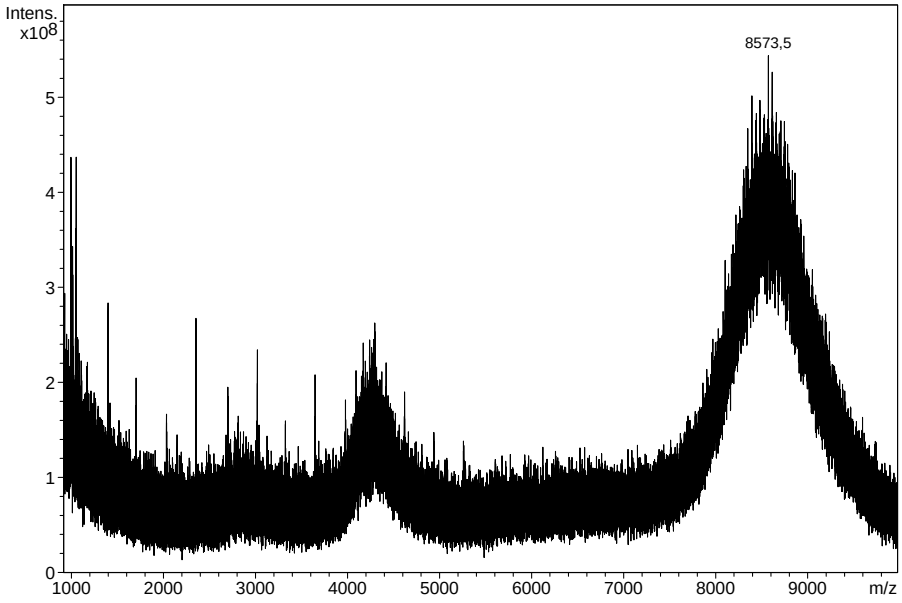


Abb. 273: MALDI-TOF MS von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) direkt nach Zugabe der S1-Endonuklease (HPLC-Peak bei 21min)

Das MALDI-TOF Massenspektrum (Abb. 273) des HPLC-Peaks bei 21min (Abb. 272) liefert einen polydispersen Massepeak um 8500Da, was der Masse des beidseitig derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphats (ca. 8500Da) entspricht. Dies zeigt, dass direkt nach Enzymzugabe noch kein Abbau der beidseitig geschützten Sequenz erfolgt ist.

Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) nach 24h Inkubation mit S1-Endonuklease

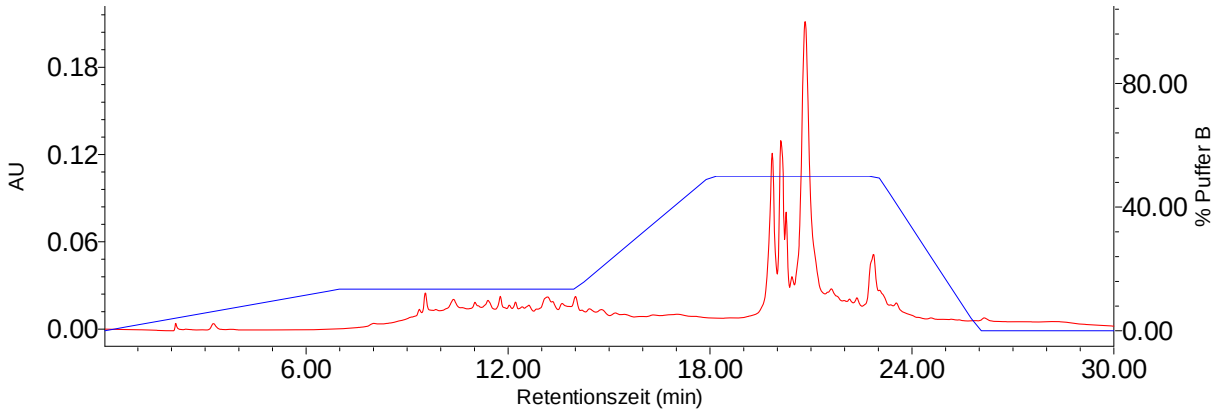


Abb. 274: RP-HPLC von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) nach 24h Inkubation mit S1-Endonuklease

Nach 24h Inkubation mit S1-Endonuklease zeigen sich im HPLC-Chromatogramm (Abb. 274) neben dem Peak bei 21min zwei zusätzliche Peaks bei ca. 20min.

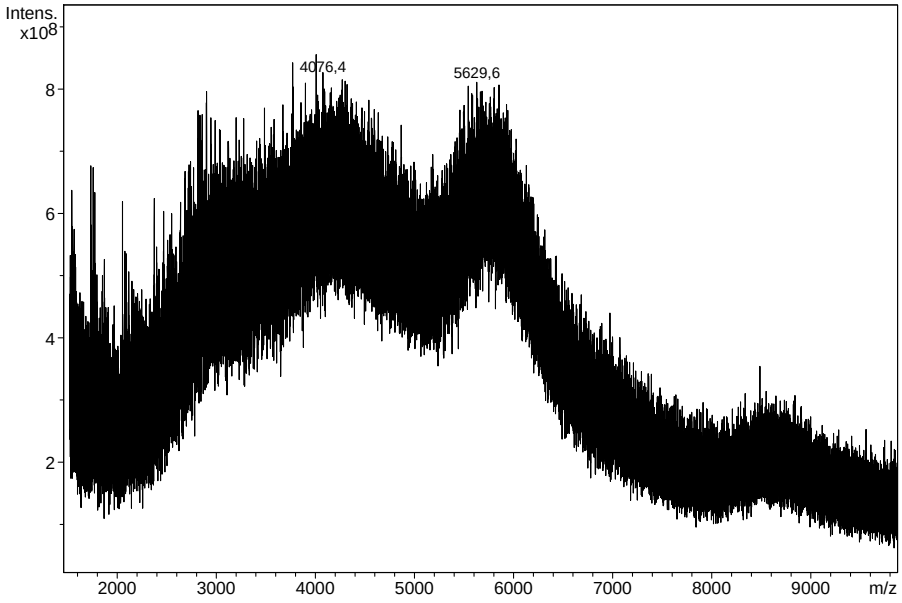


Abb. 275: MALDI-TOF MS von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) nach 24h Inkubation mit S1-Endonuklease (HPLC-Peak bei 21min)

Die MALDI-TOF MS Analyse (Abb. 275) des HPLC-Peaks bei 21min (Abb. 274) liefert allerdings nicht mehr die gewohnte polydisperse Verteilung um 8555Da sondern einen polydispersen Peak um 4000Da bzw. 5600Da. Dabei handelt es sich um Bruchstücke des Oligos mit anhängender mPEG2000-Derivatisierung. Das beidseitig geschützte Oligonukleotid-Thiophosphat wurde demnach durch die S1-Endonuklease innerhalb von 24h komplett gespalten.

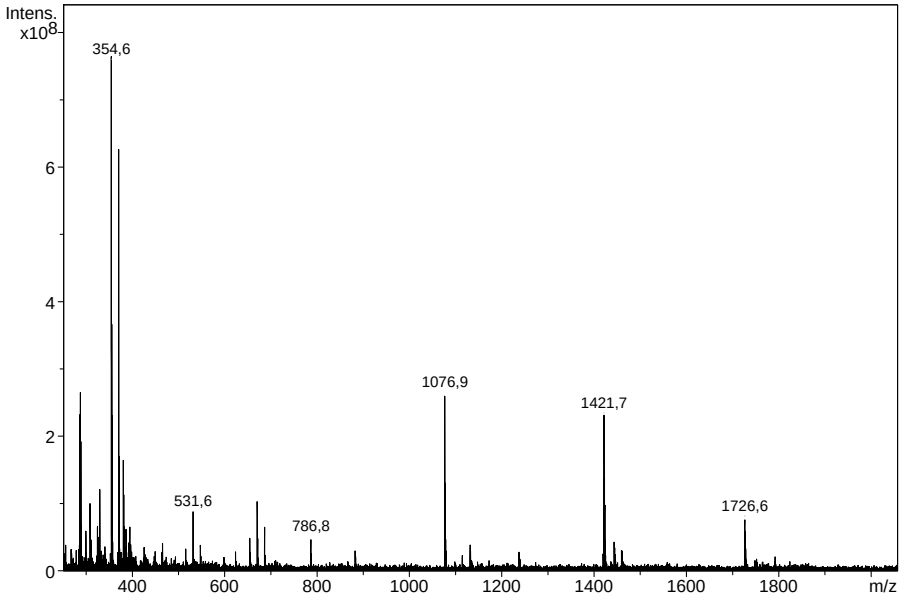


Abb. 276: MALDI-TOF MS von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) nach 24h Inkubation mit S1-Endonuklease
(1. HPLC-Peak bei 20min)

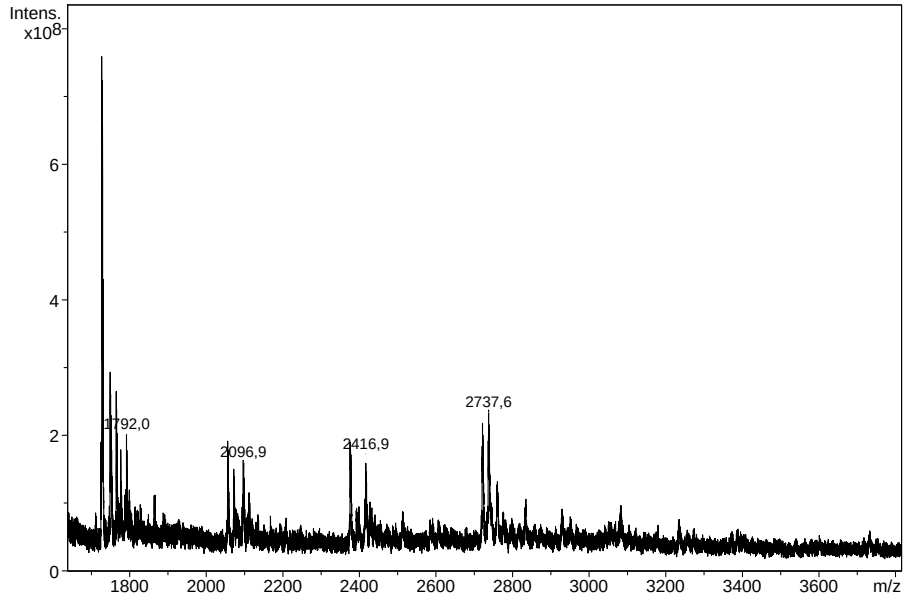


Abb. 277: MALDI-TOF MS von Oligo3 (mPEG400-ONT1-mPEG2000) nach 24h Inkubation mit S1-Endonuklease
(2. HPLC-Peak bei 20min)

Die MALDI-TOF Massenspektren (Abb. 276 und Abb. 277) der beiden HPLC-Peaks um 20min (Abb. 274) liefern mehrere monodisperse Peaks im Bereich von 350-2800Da. Die Massendifferenzen liegen dabei immer im Bereich von 300-350Da, was in etwa der Masse eines Nukleotids entspricht. Man kann daher davon ausgehen, dass es sich hierbei um Bruchstücke der Sequenz mit anhängender terminaler mPEG400-Derivatisierung handelt.

Ergebnisse der Abbauuntersuchungen mittels MALDI-TOF MS:

Tabellarisch dargestellt ergibt sich für die beiden untersuchten Produkte somit folgendes Abbauverhalten:

	Oligo1 (terminal ungeschützt)	Oligo3 (5´-mPEG400-ONT1-mPEG2000-3´)
Exonukleasen 0h	-	-
Endonuklease 0h	-	-
Exonukleasen 24h	+	-
Endonuklease 24h	+	+

Tab. 4: Abbauverhalten der Oligonukleotid-Thiophosphate ONT1 und mPEG400-ONT1-mPEG2000
(- kein Abbau oder sehr geringer Abbau + vollständiger Abbau)

Die Ergebnisse zeigen, dass ein terminal ungeschütztes Oligonukleotid-Thiophosphat sowohl von Endo- als auch von Exonukleasen innerhalb von 24 Stunden komplett abgebaut wird. Die terminal angreifenden Exonukleasen bewirken eine Leiter im Massenspektrum (Abb. 260) mit Massenunterschieden in der Größenordnung eines Nukleotids (280-350Da).
Beidseitig terminal geschützte Sequenzen, wie in diesem Fall das am 5´-Ende mit mPEG400 und am 3´-Ende mit mPEG2000 derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphat, sind hingegen resistent gegenüber terminal angreifenden Exonukleasen. Der im HPLC-Chromatogramm nach 24 Stunden auftretende Zusatzpeak (Abb. 263) ist auf synthesebedingte Reste von

einfach derivatisierten Sequenzen zurückzuführen. Die massenspektroskopische Untersuchung des Hauptpeaks (Abb. 264) zeigt eindeutig, dass kein Abbau erfolgt ist.

Endonukleasen hingegen bewirken auch bei beidseitig derivatisierten Sequenzen einen vollständigen Abbau nach 24 Stunden. Man erhält jedoch nicht das klassische Abbaumuster in Form einer kompletten Leiter wie bei den terminal unmodifizierten Sequenzen. Vielmehr spaltet die Endonuklease die Sequenz an mehreren Stellen intramolekular, was zu vielen, jeweils an einem Ende mit mPEG derivatisierten, Spaltstücken führt (Abb. 278).
Im vorliegenden Fall des mPEG400-ONT1-mPEG2000 sind dies Spaltstücke mit mPEG400-Rest am 5´-Ende, welche im HPLC-Chromatogramm (Abb. 274) zu einem Peak bei ca. 20min führen und sich im MALDI-TOF Spektrum (Abb. 276 und Abb. 277) durch eine Leiter mehrerer monodisperser Peaks im Bereich 350-2800Da und einer Massendifferenz von jeweils ca. einem Nukleotid (380-350Da) zeigen. Die anderen Spaltstücke, welche im HPLC-Chromatogramm (Abb. 274) die gleiche Retentionszeit (21min) wie die vollständige Sequenz aufweisen, tragen die mPEG2000-Derivatisierung am 3´-Ende. Im MALDI-TOF Spektrum (Abb. 275) führt dies zu einem polydispersen Peak um 4000Da bzw. 5600Da.

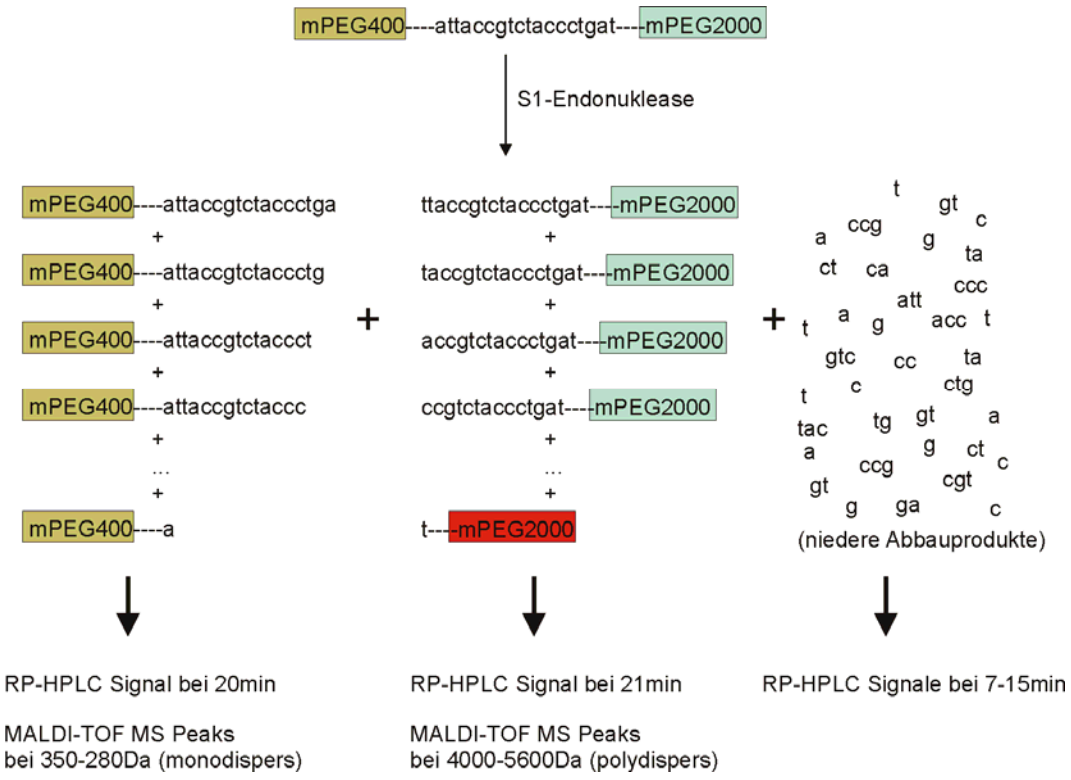


Abb. 278: Abbauverhalten von beidseitig derivatisierten Oligonukleotiden (mPEG400-ONT1-mPEG2000) bei Inkubation mit S1-Endonuklease

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass bei alleiniger Betrachtung des Hauptpeaks im Chromatogramm der RP-HPLC ein Abbau nicht ohne weiteres zu erkennen ist. Die Retentionszeiten von vollständigen und verkürzten Sequenzen liegen so nahe beieinander, dass eine Trennung über eine RP-HPLC-Säule nicht möglich ist. Erst eine anschließende massenspektroskopische Untersuchung erlaubt eine genauere Beurteilung. Alternativ wären neben einer PAGE-Gelelektrophorese (s. Kap. 4.3.4) auch chromatographische Systeme mit einer höheren Trennleistung wie z.B. IE-HPLC oder Kapillarelektrophorese (CE) denkbar.

4.3.4. Abbauuntersuchungen mittels PAGE-Gelelektrophorese

Da, wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, die Trennleistung der RP-HPLC zur Unterscheidung der vollständigen Sequenzen eines Oligonukleotids von teilweise abgebauten, verkürzten Sequenzen zu gering ist, wurde für weitere Abbauversuche die PAGE-Gelelektrophorese als alternative Trennmethode herangezogen. Ein 19%iges Polyacrylamid-gel mit einer Vernetzung von 19:1 (Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid) erlaubt dabei die Auftrennung von Sequenzen der Längen n und n-1.
Das Hauptaugenmerk soll auch bei diesen Ansätzen nicht bei der Detektion der niedermolekularen Abbauprodukte (Mono-Nukleotide, Di-Nukleotide...), sondern bei der Detektion der längerkettigen Oligonukleotidfragmente (n, n-1, n-2, …) liegen.

Für die Untersuchungen wurden zwei beidseitig gemischt derivatisierte sowie ein terminal unmodifiziertes Oligonukleotid-Thiophosphat der Sequenz ONT1 (s. Kap. 8.1) herangezogen.

Oligo1 (terminal unmodifiziertes ONT1)
Oligo8 (mPEG400-ONT1-mPEG1000)
Oligo9 (mPEG1000-ONT1-mPEG400)

Zum Abbau mit 5´-Exonuklease (Phosphodiesterase II) diente ein Puffer aus 0,1M TEAA pH6,5 bei einer Oligokonzentration von 0,1nmol/µl und einer Enzymkonzentration von 0,03U/µl. Dies entspricht einem Enzym/Substratverhältnis von 0,3U pro nmol Oligo.
Der Abbau mit 3´-Exonuklease (Phosphodiesterase I) erfolgte in einem Puffer aus 100mM Tris-HCl / 100mM NaCl / 14mM $MgCl_2$ / pH8,8 bei einer Oligokonzentration von 0,1nmol/µl und einer Enzymkonzentration 0,0002U/µl. Dies entspricht einem Enzym/Substratverhältnis von 0,002U pro nmol Oligo.
Für den Abbau mit S1-Endonuklease wurde der S1-Nuklease Reaktionspuffer von Promega (500mM NaAc / 2,8M NaCl / 45mM $ZnSO_4$ / pH4,5) verwendet. Die Oligokonzentration betrug 0,1nmol/µl bei einer Enzymkonzentration von 0,04U/µl. Dies entspricht einem Enzym/Substratverhältnis von 0,4U pro nmol Oligo. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 37°C im Brutschrank.
Nach 1h, 24h, 48h, 72h und 144h wurde jeweils ein Aliquot von 1µl (0,1nmol) des jeweiligen Ansatzes entnommen und mit 9µl Wasser versetzt. Diese Lösung mit einer Oligonukleotidkonzentration von 0,01nmol/µl wurde zur Inaktivierung der Nuklease 10min lang auf 95°C erhitzt, abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch ein 19%iges Polyacrylamid-Minigel mit den Dimensionen 10cm x 10cm (s. Kap. 6.4.8). Der Gewichtsmarker (M) bestand aus gleichen Anteilen (je 0,01nmol) an mPEG1000-ONT1-mPEG1000, mPEG400-ONT1-mPEG400, ONT1, ONT1 (n-1) und ONT1 (n-2) (in absteigender Reihenfolge).

Für sämtliche Gele kam folgendes Auftrageschema zur Anwendung:

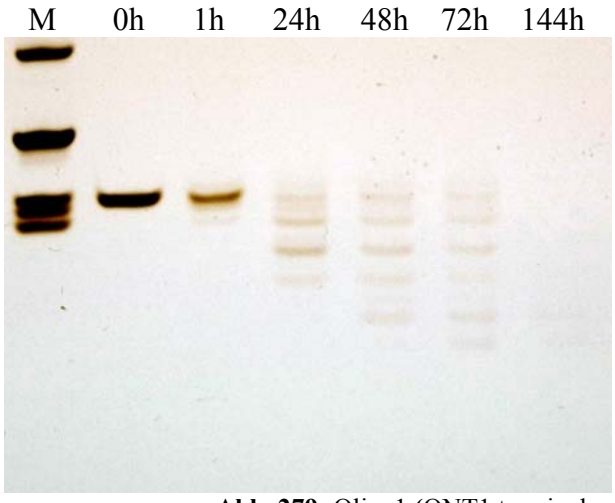
Bahn 1: Farbmarker (F)
Bahn 2: Gewichtsmarker (M)
Bahn 3: Probe vor Zugabe der Nuklease
Bahn 4: Probe nach 1h Inkubationszeit
Bahn 5: Probe nach 24h Inkubationszeit
Bahn 6: Probe nach 48h Inkubationszeit
Bahn 7: Probe nach 72h Inkubationszeit
Bahn 8: Probe nach 144h Inkubationszeit

Bahn 9: Formamid
Bahn 10: Formamid

Nach der Elektrophorese wurde der Taschenbereich des Gels mit einem scharfen Skalpell abgetrennt und das Gel vorsichtig entnommen.
Die Silberfärbung zur Visualisierung der DNA-Banden erfolgte mittels des Roti®-Black N Kit nach Angaben des Herstellers (s. Kap. 6.4.8).

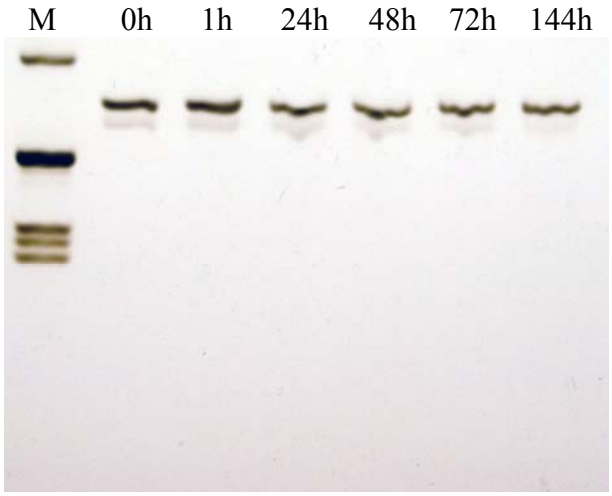
Zur Digitalisierung wurde das noch in der Stopp- bzw. Trockenlösung befindliche Gel auf einen Leuchttisch gestellt und mittels einer Digitalkamera (Canon EOS 350D) abfotografiert. Eine anschließende allgemeine Kontrastanpassung (Tonwertkorrektur) wurde durch das Programm Adobe-Photoshop PS2 bewerkstelligt.
Die Bestimmung der Bandenintensität des noch nicht abgebauten Restoligos (jeweils die am höchsten gelegene Bande) erfolgte mittels des Programms ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Version 1.42q) (s. Kap. 6.4.11).
Zur grafischen Auftragung wurde für jedes Gel die Intensität der Bande bei 0h auf 100% gesetzt und die dazu relativen Intensitäten der übrigen Banden aus den gemessenen, absoluten Intensitäten angeglichen.

Abbau mit 5´-Exonuklease (Phosphodiesterase II):



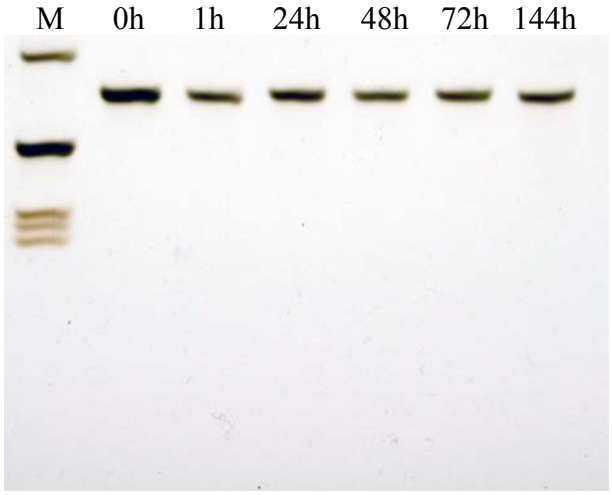
	abs. Intens.	rel. Intens.
0h	1098926	100%
1h	457635	42%
24h	124542	11%
48h	108292	10%
72h	98297	9%
144h	73117	7%

Abb. 279: Oligo1 **(**ONT1 terminal unmod.) inkubiert mit 5´-Exonuklease



	abs. Intens.	rel. Intens.
0h	814627	100%
1h	856461	100%
24h	702748	86%
48h	693740	85%
72h	654691	80%
144h	648788	80%

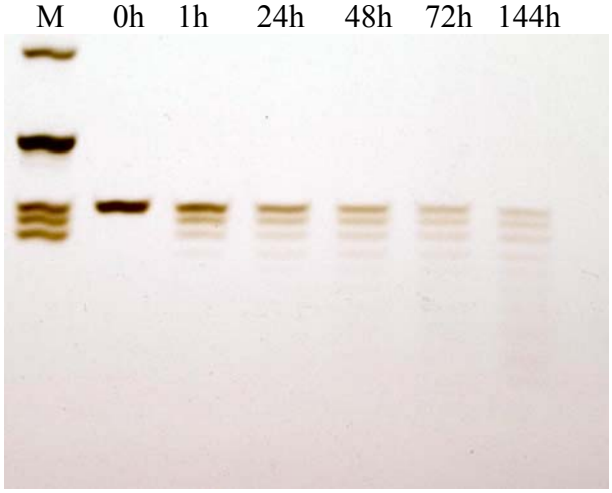
Abb. 280: Oligo8 (mPEG400-ONT1-mPEG1000) inkubiert mit 5´-Exonuklease



	abs. Intens.	rel. Intens.
0h	1299677	100%
1h	799488	62%
24h	933701	72%
48h	740801	57%
72h	818796	63%
144h	870316	67%

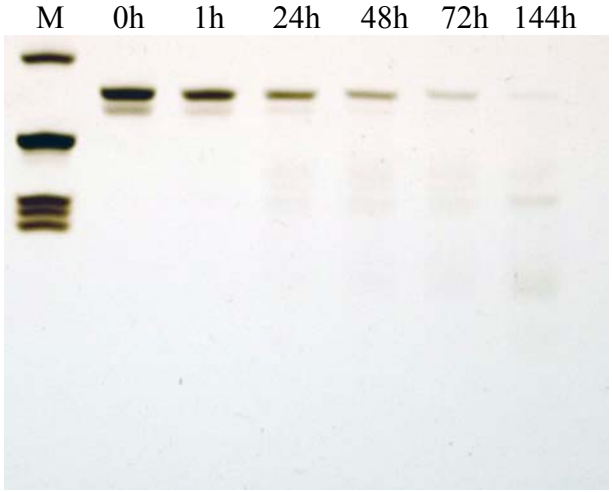
Abb. 281: Oligo9 (mPEG1000-ONT1-mPEG400) inkubiert mit 5´-Exonuklease

Abbau mit 3´-Exonuklease (Phosphodiesterase I):



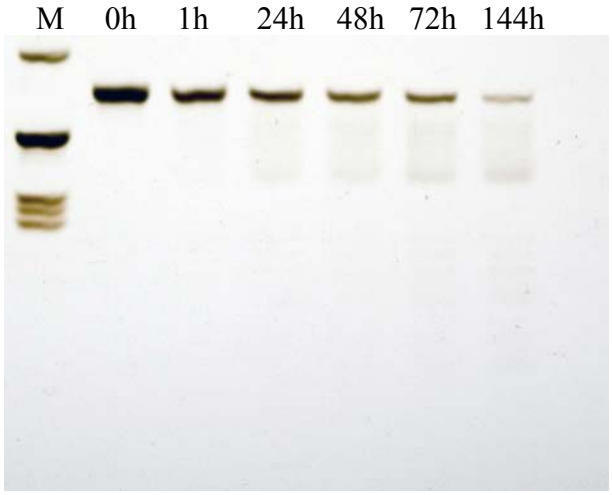
	abs. Intens.	rel. Intens.
0h	847258	100%
1h	462733	55%
24h	238281	28%
48h	156632	18%
72h	116498	14%
144h	95921	11%

Abb. 282: Oligo1 (ONT1 terminal unmod.) inkubiert mit 3´-Exonuklease



	abs. Intens.	rel. Intens.
0h	1049183	100%
1h	787803	75%
24h	472082	45%
48h	312006	30%
72h	199972	19%
144h	145940	14%

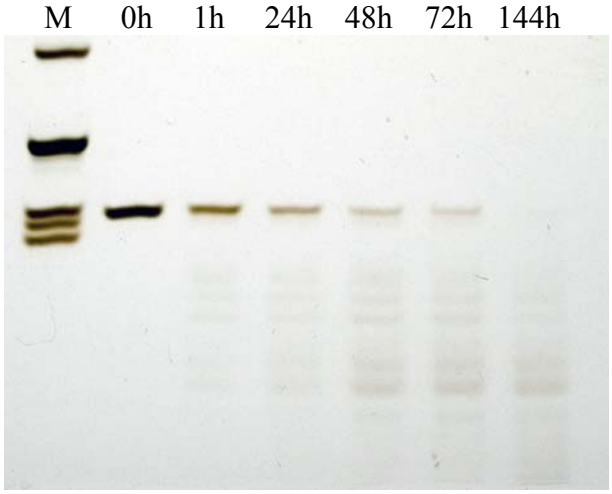
Abb. 283: Oligo8 (mPEG400-ONT1-mPEG1000) inkubiert mit 3´-Exonuklease



	abs. Intens.	rel. Intens.
0h	1223124	100%
1h	843771	69%
24h	672277	55%
48h	525089	43%
72h	453338	37%
144h	199065	16%

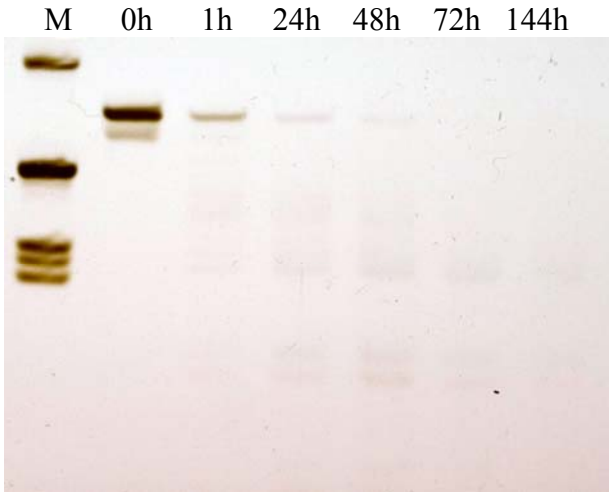
Abb. 284: Oligo9 (mPEG1000-ONT1-mPEG400) inkubiert mit 3´-Exonuklease

Abbau mit S1-Endonuklease:



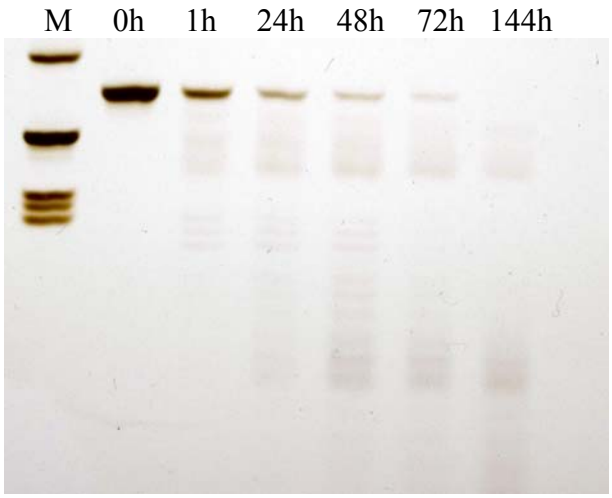
	abs. Intens.	rel. Intens.
0h	923932	100%
1h	458882	50%
24h	279622	30%
48h	162133	18%
72h	117199	13%
144h	68243	7%

Abb. 285: Oligo1 (ONT1 terminal unmod.) inkubiert mit S1-Endonuklease



	abs. Intens.	rel. Intens.
0h	1496186	100%
1h	315916	21%
24h	164800	11%
48h	149015	10%
72h	161969	11%
144h	153910	10%

Abb. 286: Oligo8 (mPEG400-ONT1-mPEG1000) inkubiert mit S1-Endonuklease



	abs. Intens.	rel. Intens.
0h	1266108	100%
1h	532982	42%
24h	239943	19%
48h	144787	11%
72h	84288	7%
144h	49647	4%

Abb. 287: Oligo9 (mPEG1000-ONT1-mPEG400) inkubiert mit S1-Endonuklease

Auswertung der Abbauuntersuchungen mittels PAGE:

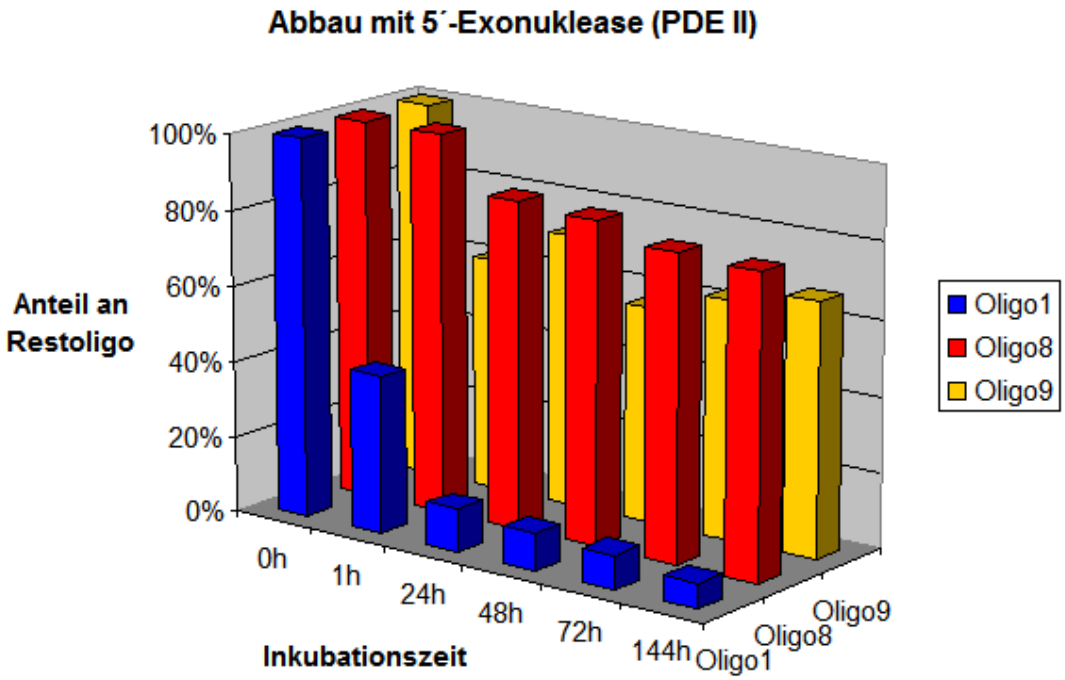


Abb. 288: Diagramm des 5´-Exonuklese-Abbaus von Oligo1, Oligo8 und Oligo9

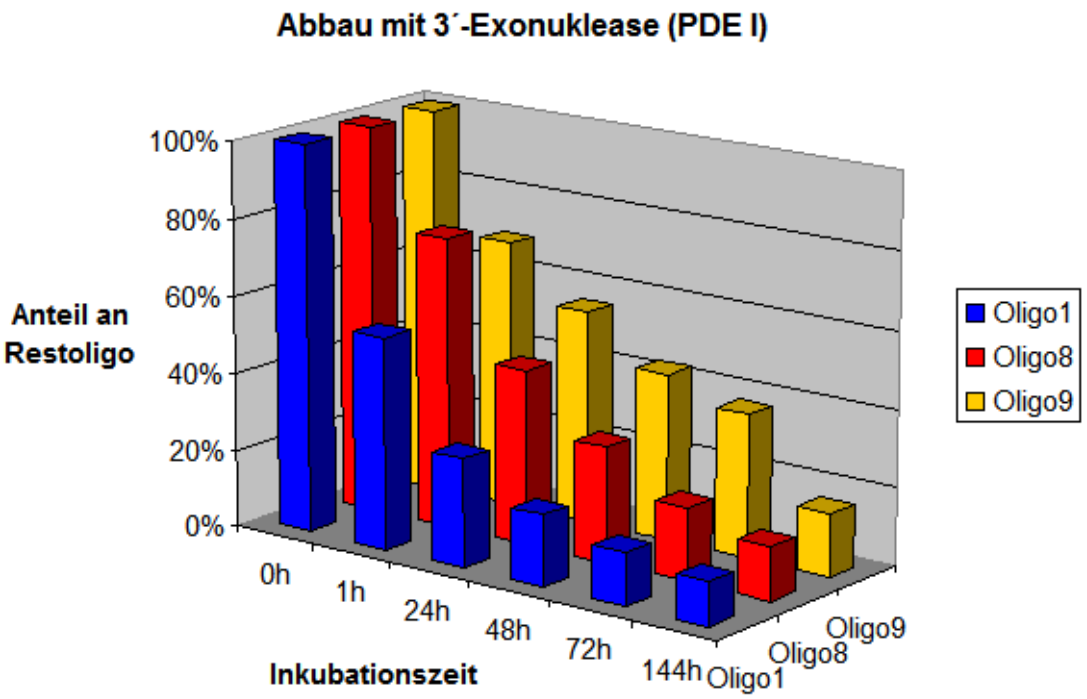


Abb. 289: Diagramm des 3´-Exonuklese-Abbaus von Oligo1, Oligo8 und Oligo9

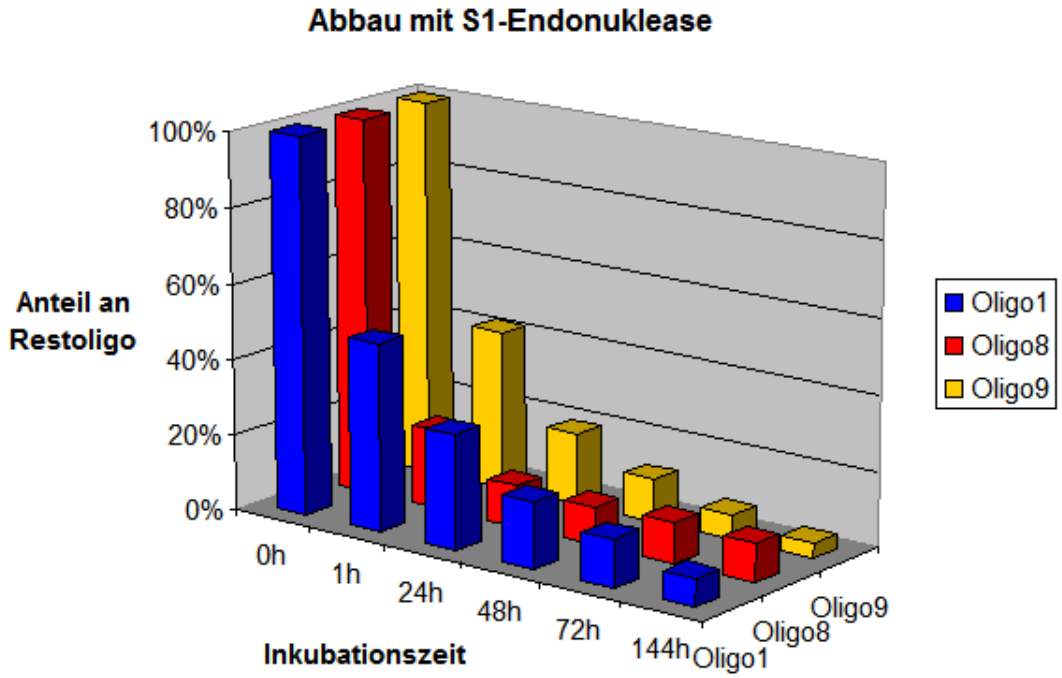


Abb. 290: Diagramm des S1-Endonuklese-Abbaus von Oligo1, Oligo8 und Oligo9

Die durch die PAGE-Analyse gewonnenen Erkentnisse bestätigen im Wesentlichen die Ergebnisse aus den vorigen Abbauuntersuchungen mittels RP-HPLC (s. Kap. 4.3.1) bzw. MALDI-TOF-Massenspektrometrie (s. Kap. 4.3.3).

Beide terminal PEG-derivatisierten Oligonukleotide (Oligo8 und Oligo9) zeigen eine sehr hohe Stabilität gegenüber der 5´-Exonuklease (Abb. 288). Selbst nach einer Inkubationszeit von 144h weist das am 5´-Ende mit mPEG1000 derivatisierte Oligo8 noch einen Anteil an unabgebautem Restoligo von 80% auf. Der Wert des am 5´-Ende mit mPEG400 modifizierten

Oligo9 liegt mit 63% etwas darunter. Das terminal unmodifizierte Oligo1 zeigt bereits nach 24h lediglich noch einen Restoligo-Anteil von 11%, welcher nach 144h sogar noch auf 7% fällt. Dabei ist deutlich die Ausbildung einer Leiterstruktur aus verkürzten Sequenzen (n, n-1, n-2,…) zu erkennen (Abb. 279), welche bei den terminal PEG-modifizierten Derivaten ausbleibt (Abb. 280 und Abb. 281).

Die Ergebnisse des Abbaus mit 3´-Exonuklease (Abb. 289) sind hingegen nicht so eindeutig. Hier nimmt die Intensität der Hauptbande sowohl beim terminal unmodifizierten Oligo1 als auch bei den beiden terminal modifizierten Derivaten stetig ab und liegt in allen Fällen nach 144h bei ca. 15%. Lediglich das am 3´-Ende mit mPEG400 derivatisierte Oligo9 zeigt auch noch nach 72h eine signifikant erhöhte Stabilität im Vergleich zum terminal unmodifizierten Oligo1 (37% Restoligo vs. 14% Restoligo).
Beim unmodifizierten Oligo1 ist deutlich die Ausbildung einer Leiter aus Sequenzen der Länge n, n-1, n-2,… zu beobachten (Abb. 282). Diese Leiter bleibt bei den terminal modifizierten Derivaten Oligo8 (Abb. 283) und Oligo9 (Abb. 284) trotz deutlich abnehmender Intensität der Hauptbande aus. Stattdessen bilden sich im Laufe der Zeit deutliche Banden, ohne erkennbare Leiterstruktur, im mittleren und unteren Bereich des Gels aus, welche starke Ähnlichkeit mit dem Bandenmuster aufweisen, welches bei der Inkubation mit S1-Endonuklease (Abb. 286 und Abb. 287) entsteht. Dies deutet stark auf den Effekt einer Endonukleaseaktivität der als 3´-Exonuklease verwendeten Phosphodiesterase I (snake venom) hin[(136)]. Durch den endonukleolytischen Abbau entstehen mehrere, wesentlich leichtere, nur noch an einem Ende PEGylierte Fragmente mit ähnlichen, sich teilweise überschneidenden Molekülmassen wodurch die Ausbildung einer diskreten Leiter ausbleibt.

Der Abbau mit S1-Endonuklease (Abb. 290) führt, wie erwartet, zu keinem großen Unterschied in den relativen Stabilitäten der untersuchten Oligonukleotide. Sowohl die terminal unmodifizierte, als auch die terminal modifizierten Sequenzen werden durch die S1-Endonuklease intramolekular gespalten, wodurch verschieden große, wesentlich leichtere Fragmente entstehen. Aufgrund der sich teilweise überschneidenden Molekülmassen dieser Fragmente ist hier keine Ausbildung einer diskreten Leiter aus Sequenzen der Länge n, n-1, n-2,… zu beobachten.

4.4. Kopplung PEG-derivatisierter Oligonukleotide mit Penetratin

Wie in den vorigen Kapiteln gezeigt werden konnte, weisen PEG-derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphate eine wesentlich höhere Halbwertszeit im Organismus auf als Oligonukleotide mit unmodifizierten Termini. Die Fähigkeit zur Membranpassage, also zur Internalisierung in eine Zelle, wird durch diese Modifikationen jedoch nicht erhöht. Im nächsten Schritt sollen nun die Vorteile einer erhöhten Nukleasestabilität mit der Möglichkeit zur leichten Zellmembranpassage kombiniert werden.
Zu diesem Zweck soll ein Oligonukleotid-Thiophosphat der Sequenz ONT1 an einem Ende mit einem kurzen Polyethylenglykol (mPEG400) und auf der anderen Seite mit einem Internalisierungspeptid, in diesem Falle dem 16 Aminosäuren langen Penetratin, gekoppelt werden. Da im humanen Serum 3´-Exonukleasen die dominierende Rolle spielen[(134)], soll die PEG-Derivatisierung am 3´-Terminus stattfinden. Das Penetratin hingegen soll reversibel, über eine Disulfidbrücke, am 5´-Terminus gebunden sein, so dass es nach der Internalisierung durch intracytoplasmatische Reduktion abgespalten werden kann. Als Grundlage für dieses Modifizierungsmuster dient ein Oligonukleotid mit einer Aminomodifikation am 3´-Terminus und einer Thiolmodifikation am 5´-Terminus.
Die PEG-Derivatisierung soll dabei, analog zu Kap. 4.1 und Kap. 4.2, durch eine Reaktion der Aminogruppe mit einem PEG-NHS erfolgen. Um Nebenreaktionen mit der Thiolfunktion am

5´-Ende auszuschließen, muß diese vor der Umsetzung des 3´-Endes geschützt werden. Thiolgruppen können durch Reaktion mit 2,2'-Dithiopyridin (Py_2S_2) sehr spezifisch in gemischte, aktivierte Disulfide überführt werden. Diese aktivierte Thiolfunktion ermöglicht einen spätereren Umsatz mit einer freien Thiolfunktion des Penetratins.
Die Thiolfunktion des Penetratins soll dabei durch einen Cysteinrest am C-Terminus eingeführt werden. Das Prinzip dieser heterobifunktionellen beidseitigen Modifizierung ist in Abb. 291 dargestellt.

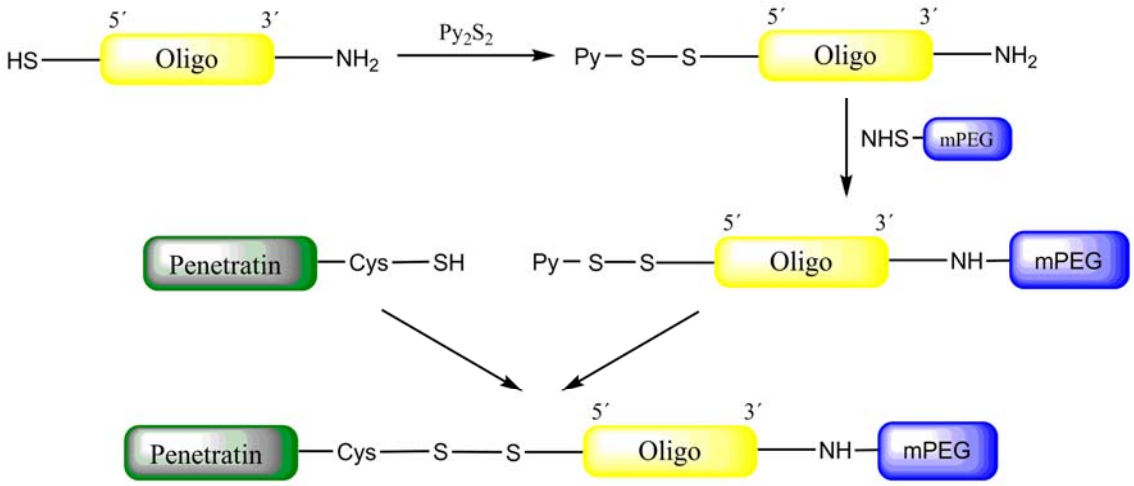


Abb. 291: Prinzip der heterobifunktionellen Modifizierung eines Oligonukleotids mit Polyethylenglykol und einem Internalisierungspeptid (Penetratin)

4.4.1. Synthese des Penetratins

Die Synthese des 16 Aminosäuren langen Penetratins erfolgte auf einem Kem-En-Tec MKIII Peptidsynthesizer (s. Kap 6.3.1). Durch die, für die spätere Kopplung mit einem Oligonukleotid nötige, zusätzliche Cysteinfunktion am C-Terminus ergibt sich somit folgende Peptidsequenz:

H_2N-***RQIKIWFQNRRMKWKKC***-COOH

Da die Syntheserichtung vom C-Terminus zum N-Terminus verläuft, wurde als Trägermaterial Fmoc-Cys(Trt)-Wang Resin (Abb. 292) eingesetzt.

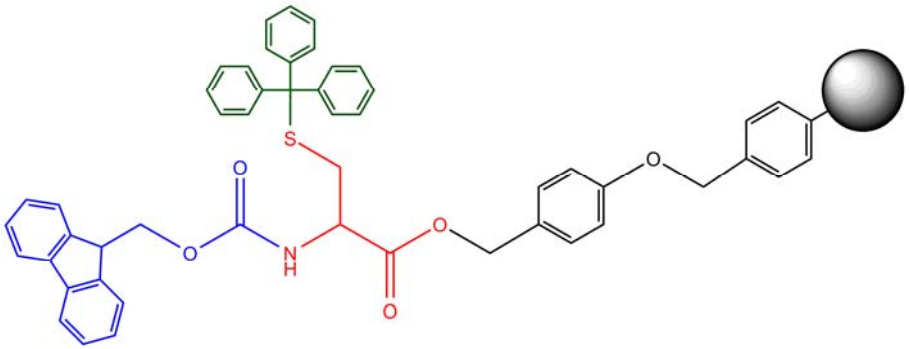


Abb. 292: Fmoc-Cys(Trt)-Wang Resin

Zunächst wurden 0,5g des Trägermaterials in das Reaktorgefäß eingewogen und mit 6ml DMF zum Quellen gebracht. Bei einer Beladung des Trägermaterials von 0,66mmol/g ergibt sich somit eine Synthesekapazität von 0,33mmol.

Die benötigten Aminosäuren wurden im vierfachen molaren Überschuss, zusammen mit einem ebenfalls vierfachen molaren Überschuss an HOBt eingesetzt. Somit ergibt sich für die direkten Einwaagen in die einzelnen Reaktionsgefäße:

Aminosäure	**Molmasse AS-Building Block**	**Einwaage AS-Building Block**	**Einwaage HOBt (153g/mol)**
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5g/mol	620mg	200mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5g/mol	620mg	200mg
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526,6g/mol	700mg	200mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5g/mol	620mg	200mg
Fmoc-Met-OH	371,5g/mol	490mg	200mg
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8g/mol	950mg	200mg
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8g/mol	950mg	200mg
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,7g/mol	790mg	200mg
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,7g/mol	810mg	200mg
Fmoc-Phe-OH	387,4g/mol	510mg	200mg
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526,6g/mol	700mg	200mg
Fmoc-Ile-OH	353,4g/mol	470mg	200mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5g/mol	620mg	200mg
Fmoc-Ile-OH	353,4g/mol	470mg	200mg
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,7g/mol	810mg	200mg
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8g/mol	950mg	200mg

Nach der Synthese wurde das Rohprodukt vom Trägermaterial abgespalten (s. Kap. 6.3.2) und über mehrere preparative RP-HPLC Läufe aufgereingt.

- Säule: Symetry C18 5µm 19x100mm
- Gradient: 30bis50Proz_8ml_60min (s. Kap. 6.4)
- Wellenlänge: $\lambda = 235nm$
- Puffer A: 0,2% TFA in H_2O
- Puffer B: 0,2% TFA in ACN/ H_2O (4:1)

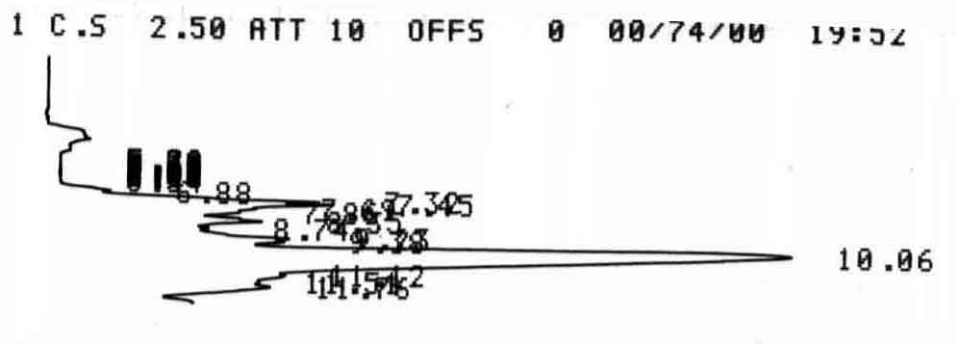


Abb. 293: preparative RP-HPLC zur Aufreinigung des abgespaltenen und entschützten Penetratins

Der Hauptpeak mit einer Retenzionszeit von ca. 10min wurde aufgefangen, die einzelnen Eluate vereinigt und im Rotationsverdampfer eingeengt.
Nach einer abschließenden Trocknung im Speedvac wurde das fertige Peptid gewogen, was zu einer Ausbeute von 55mg führte. Bei einer Molekülmasse des Cystein-modifizierten Penetratins von 2350Da entspricht dies einer Stoffmenge von 23,4µmol. Die prozentuale Ausbeute nach der Aufreinigung beträgt somit ca. 7% bezüglich der Trägereinwaage bzw. der

ersten, auf dem Träger verankerten Aminosäure. Das lyophylisierte Produkt wurde daraufhin bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur abschließenden Reinheitskontrolle wurde eine analytische RP-HPLC mit 10nmol durchgeführt, was zu einem einzelnen Peak mit einer Retentionszeit von 14min führte (Abb. 294).

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Wellenlänge: $\lambda = 220nm$
- Puffer A: 0,1% TFA in H_2O
- Puffer B: Acetonitril + 0,1% TFA

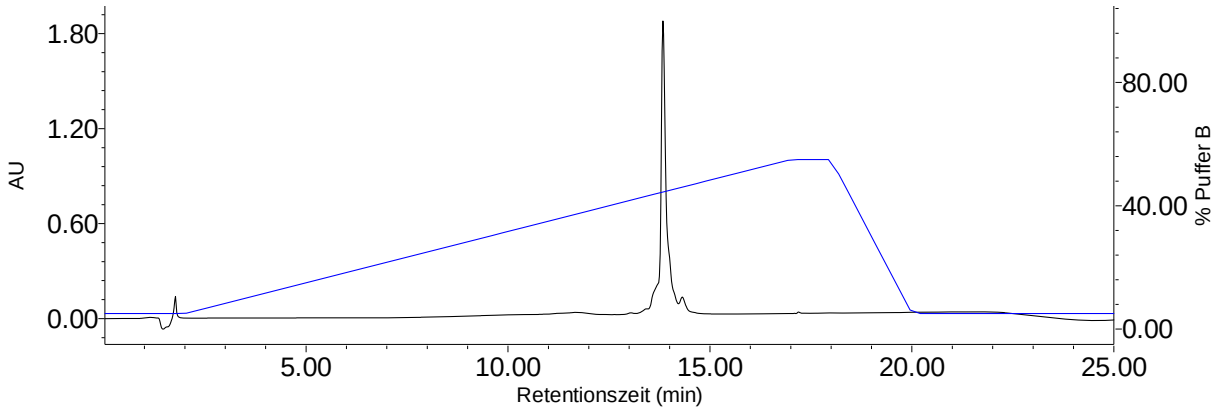


Abb. 294: RP-HPLC zur Reinheitskontrolle des aufgereinigten Penetratins

Neben der Endanalyse durch RP-HPLC wurde zur weiteren Kontrolle der Reinheit auch eine SDS-PAGE (s. Kap 6.4.6) mit Silberfärbung (s. Kap. 6.4.9) durchgeführt. Das Produkt erscheint bei einer Auftragemenge von 0,5nmol in Form einer leichten Doppelbande (Abb. 295) da Penetratin, aufgrund der freien Thiolgruppe des terminalen Cysteins, zur Dimerisierung neigt.



Abb. 295: SDS-PAGE zur Reinheitskontrolle des aufgereinigten Penetratins

Die entgültige Identitätsbestimmung des aufgereinigten Penetratins durch MALDI-TOF-MS (s. Kap. 6.6), führte zu einer Abweichung von lediglich 2Da zur theoretischen Molekülmasse (Abb. 296).

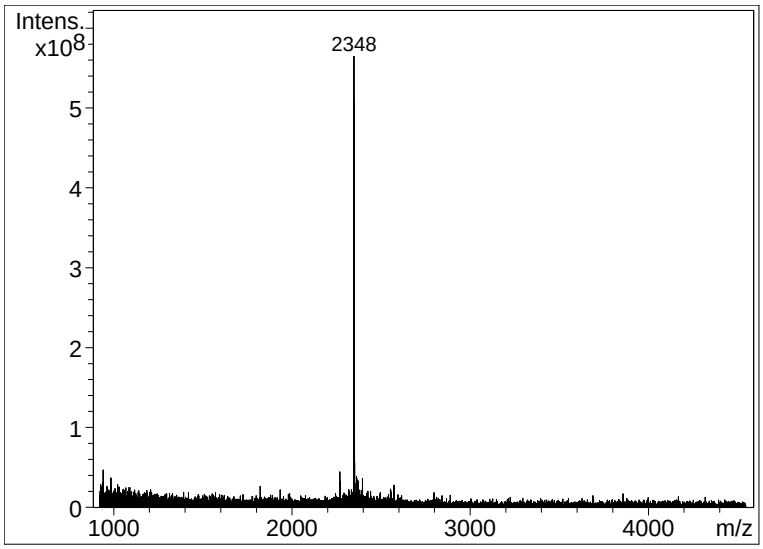


Abb. 296: MALDI-TOF MS des aufgereinigten Penetratins (M_{theor} = 2350Da; M_{MALDI} = 2348Da)

4.4.2. Synthese des PEG-derivatisierten Oligonukleotids

Die Synthese des Oligonukleotids ONT1 erfolgte mit einer Trägereinwaage von 2µmol auf einem Expedite 8909 DNA/RNA-Synthesizer als Oligonukleotid-Thiophosphat nach einem modifizierten Kopplungsprotokoll mit doppelten Kopplungszyklen (s. Kap. 6.2). Zur Generierung der 3´-Aminofunktion wurde als Trägermaterial Amino-ON CPG eingesetzt. Im letzten Zyklus erfolgte die Kopplung eines 5´-Thiolmodifiers C6 mittels eines einfachen Kopplungszyklus.
Die Thiolgruppe des Thiolmodifiers (Abb. 297) ist mit einer hydrophoben Tritylgruppe geschützt, wodurch eine leichte Abtrennung von den verkürzten Sequenzen mittels RP-HPLC möglich ist.

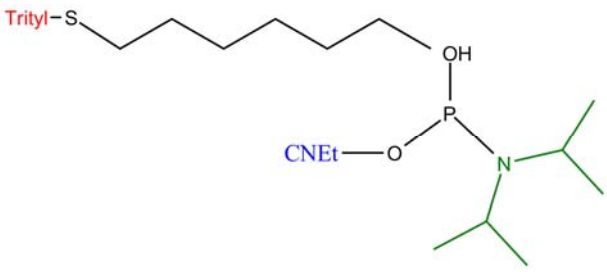


Abb. 297: C6-Thiolmodifier von Glen Research

Die Abspaltung vom Träger und die Abspaltung der permanenten Basenschutzgruppen erfolgte durch Einwirkung von konzentriertem Ammoniak bei 55°C über Nacht.
Nach der Abspaltung wurde der Ammoniak im Speedvac evaporiert, der Ansatz in 200µl 0,1M TEAA pH7,5 gelöst und mit 2µl eine analyt. RP-HPLC durchgeführt (Abb. 298).

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

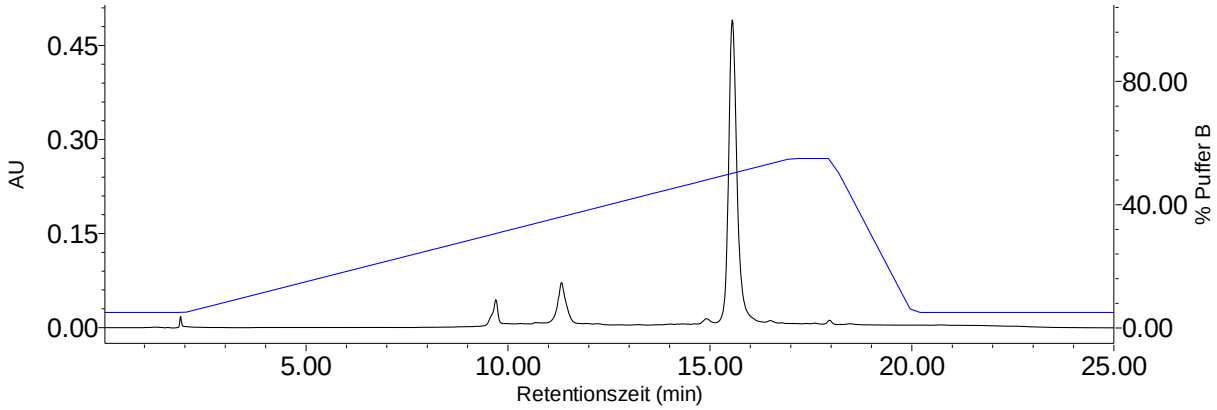


Abb. 298: RP-HPLC des vom Träger abgespaltenen Trityl-S-ONT1-NH_2

Die vollständigen Sequenzen tragen eine hydrophobe Tritylgruppe und weisen daher in Abb. 298 eine wesentlich höhere Retentionszeit auf (15,5min) als die verkürzten Sequenzen (11,5min).
Nach der preparativen Abtrennung der vollständigen Sequenz über eine preparative RP-HPLC muß zunächst die Tritylgruppe, welche dem Schutz der Thiolfunktion diente, entfernt werden. Im Gegensatz zu einer Trityl-Sauerstoffbindung zum Schützen einer Hydroxyfunktion ist die Trityl-Schwefelbindung jedoch nicht säurelabil. Die Schutzgruppe muß daher oxidativ unter Einwirkung von Silbernitrat entfernt werden.
Dazu wurde das getrocknete Oligonukleotid in 100µl 0,1M TEAA pH 6,5 gelöst, und nach Zugabe von 15µl 1M $AgNO_3$-Lösung 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige Silbernitrat wurde daraufhin durch Zugabe von 20µl 1M DTT-Lösung komplexiert und der ausgefallene Silber-DTT Komplex abzentrifugiert. Nach der Abtrennung des überschüssigen DTT mittels einer NAP-Säule (s. Kap. 6.4.4.3) wurde das Oligonukleotid durch Bestimmung der UV-Absorption (s. Kap. 6.5) quantifiziert. Dies führte zu einer Ausbeute von 100nmol, was 5% bezüglich der Trägereinwaage entspricht.
Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine analytische RP-HPLC mit 1nmol (Abb. 299) durchgeführt, was zu einem relativ sauberen Einzelpeak führte. Auch die Massenbestimmung mittels MALDI-TOF MS (Abb. 308) bestätigt die Identität des Ausgangsprodukts für die weiteren Umsetzungen.
Zur Vermeidung einer Dimerisierung durch die nun freie Thiolgruppe wurde das Oligonukleotid im Speedvac getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

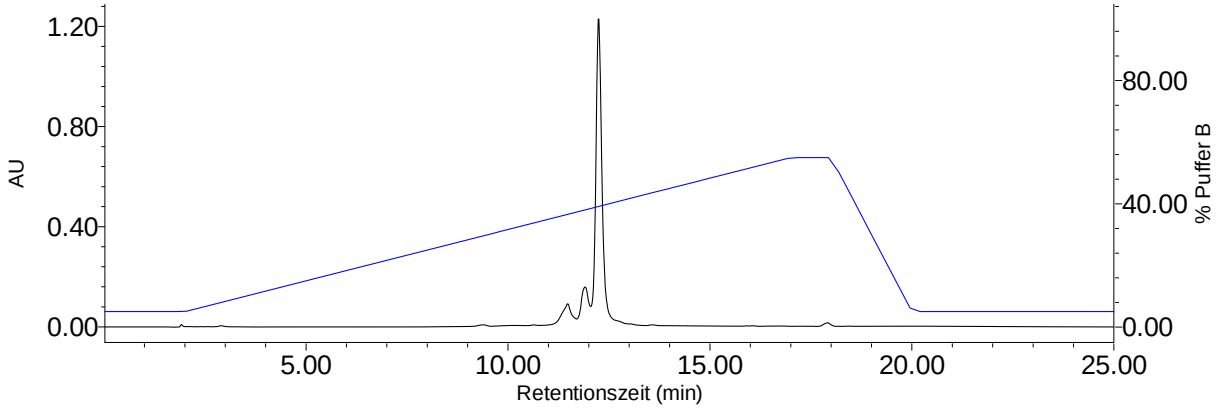


Abb. 299: HS-ONT1-NH_2 nach der Aufreinigung und der oxidativen Entfernung der Tritylgruppe

Im nächsten Schritt muß die Thiolfunktion des Oligonukleotids zur späteren Kopplung an den Cysteinrest des Penetratins durch Umsetzung mit 2,2´ Dithiopyridin (Py_2S_2) aktiviert werden (Abb. 300).

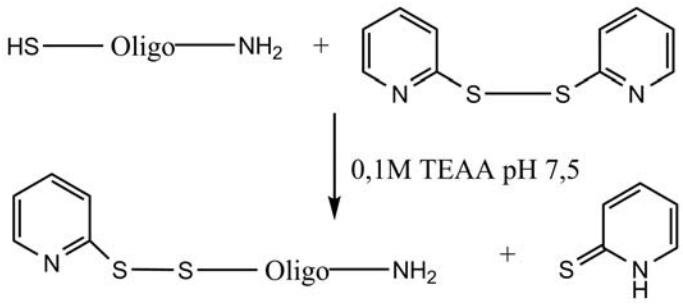


Abb. 300: Aktivierung von HS-ONT1-NH_2 mit Py_2S_2

Dazu wurden 80nmol HS-ONT1-NH_2 in 800µl 0,1M TEAA pH7,5 gelöst und mit einem 1000fachen molaren Überschuss an 2,2´ Dithiopyridin versetzt (80µl einer 1M Lösung von Py_2S_2 in MeOH). Nach 16h Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit 0,5nmol eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 301).
Das entsandene PyS-S-ONT1-NH_2 weist dabei eine wesentlich höhere Retentionszeit als das HS-ONT1-NH_2 auf. Ein einzelner Produktpeak bei ca. 13min lässt auf eine nahezu quantitative Umsetzung schließen. Die kräftigen Peaks bei ca. 3min und ca. 18,5min werden durch überschüssiges Py_2S_2 und entstandenes Pyridinthion verursacht.

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

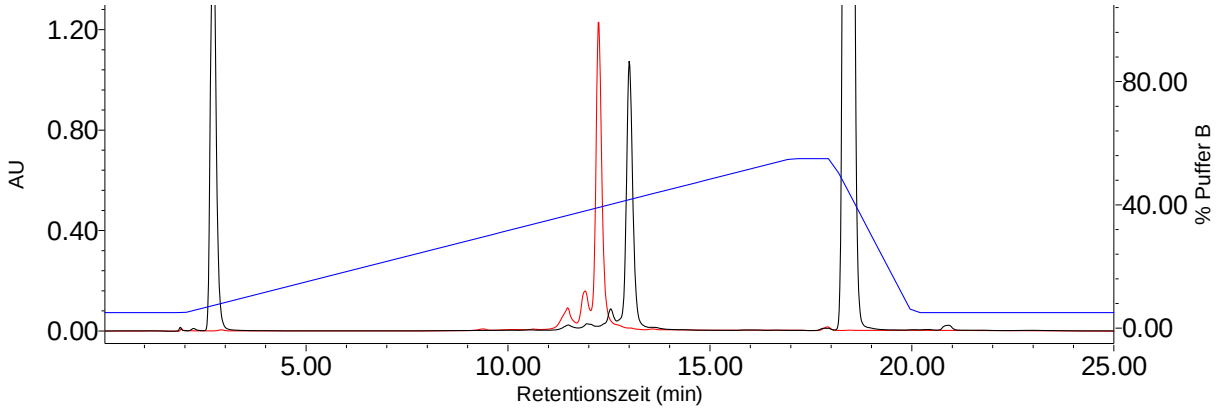


Abb. 301: RP-HPLC zur Umsetzung von HS-ONT1-NH_2 (rot) mit Py_2S_2 zu PyS-S-ONT1-NH_2 (schwarz)

Die Abtrennung des Pyridinthions und des Py_2S_2 erfolgte über eine preparative RP-HPLC. Dabei ergab sich nach photometrischer Quantifizierung eine Stoffmenge von 50nmol, was einer Ausbeute von ca. 63% entspricht. Mit 0,5nmol des aufgereinigten Zwischenprodukts wurde eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 302) was zu einem einzelnen Peak bei ca. 13min führte. Der kleine Vorpeak bei ca. 12,5min ist durch die geringe Auftragemenge bedingt und auch in einem Leerlauf der HPLC-Säule erkennbar.

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

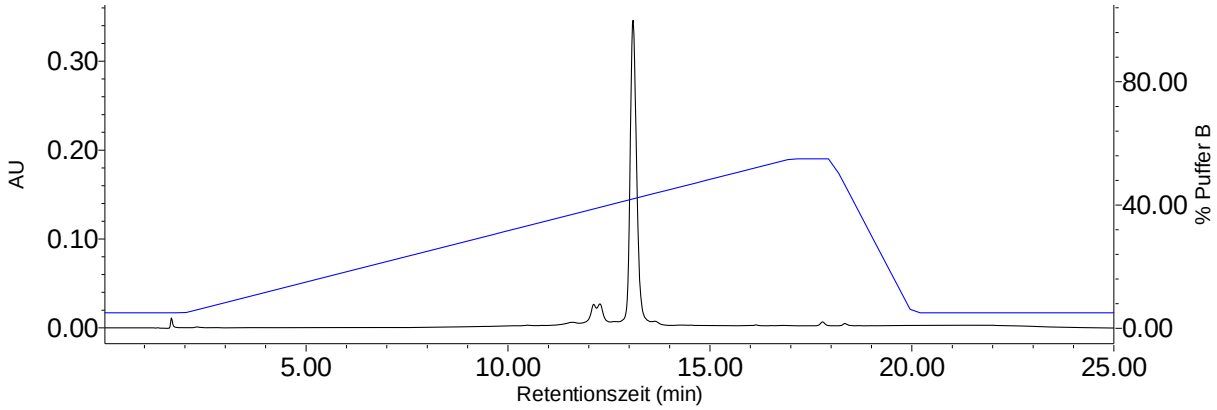


Abb. 302: Py-S-ONT1-NH_2 nach preparativer Aufreinigung

Nach der Trocknung des Zwischenprodukts (PyS-S-ONT1-NH_2) im Speedvac erfolgte schließlich die Umsetzung des 3´-Terminus mit mPEG400-NHS (Abb. 303).

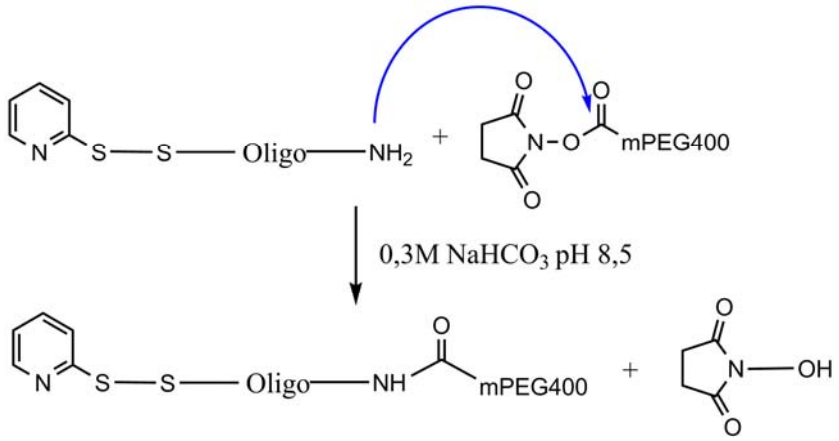


Abb. 303: Umsetzung des 3´-Endes von PyS-S-ONT1-NH_2 mit mPEG400-NHS

Dazu wurden 50nmol PyS-S-ONT1-NH_2 in 350µl 0,3M $NaHCO_3$ gelöst und 5x mit einem jeweils 10x Überschuss an mPEG400-NHS versetzt (5x 500nmol bzw. jeweils 1µl einer 500mM Lösung von mPEG400-NHS in ACN). Nach jeder Zugabe wurde der Ansatz 5min lang bei 37°C inkubiert. Nach der fünften Zugabe wurde mit 1nmol eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 304). Das entstandene PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 weist mit ca. 13,5min eine etwas höhere Retentionszeit auf als das Edukt mit ca. 13min. Ein deutlicher Restpeak bei ca. 13min, welcher ca. 15% der Gesamtpeakfläche ausmacht, lässt auf eine unvollständige Umsetzung aufgrund fehlender oder inaktiver 3´-Aminogruppen schließen.

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

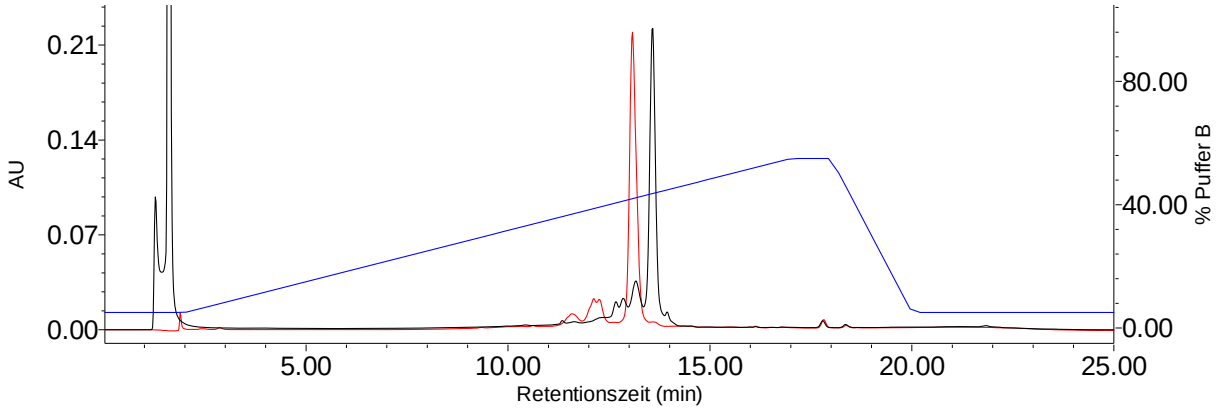


Abb. 304: RP-HPLC zur Umsetzung von PyS-S-ONT1-NH_2 (rot) mit mPEG400-NHS zu PyS-S-ONT1-mPEG400 (schwarz)

Die Aufreinigung des Endprodukts erfolgte wiederum über eine preparative RP-HPLC, was zu einer Stoffmenge von 21nmol und somit zu einer Ausbeute von 42% in diesem Schritt führte. Bezogen auf die ürsprünglich eingesetzten 80nmol an HS-ONT1-NH_2 ergibt sich somit eine Gesamtausbeute von ca. 26%.
Mit 0,5nmol des aufgereinigten Endprodukts wurde eine analytische RP-HPLC durchgeführt (Abb. 305) was zu einem Einzelpeak bei ca. 13,5min führte. Der kleine Vorpeak bei ca. 12,5min ist durch die geringe Auftragemenge bedingt und auch in einem Leerlauf der HPLC-Säule erkennbar.

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

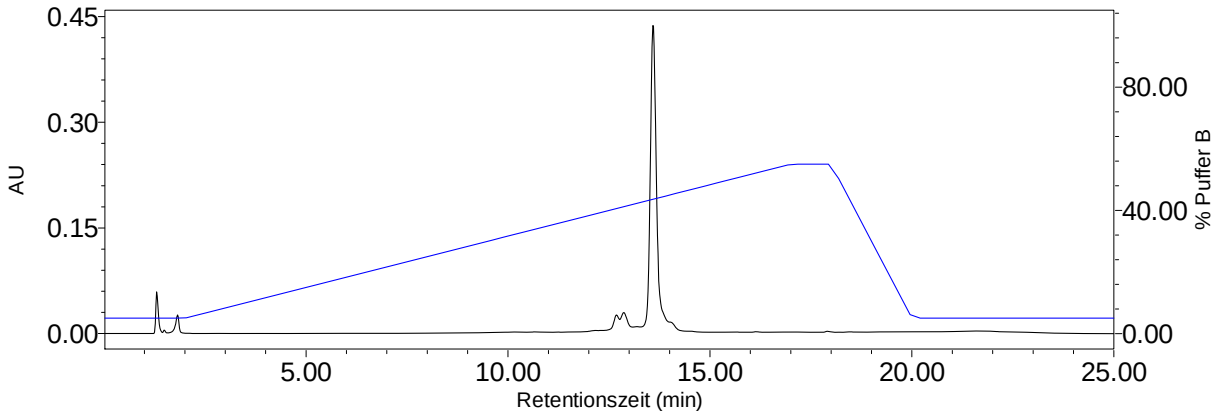


Abb. 305: RP-HPLC des aufgereinigten PyS-S-ONT1-mPEG400

Die restlichen ca. 20nmol PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 wurden im Speedvac getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Neben der HPLC-Endanalyse wurde zur weiteren Kontrolle der Reinheit auch eine PAGE (Abb. 306) durchgeführt (s. Kap 6.4.8). Dies führte sowohl beim Zwischenprodukt (HS-ONT1-NH_2 auf Bahn 1) als auch beim Endprodukt (PyS-S-ONT1-NH-mPEG400) zu jeweils einer einzelnen Bande.



Abb. 306: PAGE von HS-ONT1-NH_2 (1) und PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 (2)

Die entgültige Identitätsbestimmung erfolgte schließlich durch eine MALDI-TOF-MS des Ausgangsoligonukleotids (Abb. 308) und des Endprodukts (Abb. 309), was in beiden Fällen nur zu einer geringen Abweichung von der theoretischen Molekülmasse (Abb. 307) führte. Im Falle des Endprodukts PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 ging die Pyridylgruppe durch den Laserbeschuß verloren, wodurch die Molekülmasse um 110Da verringert ist.

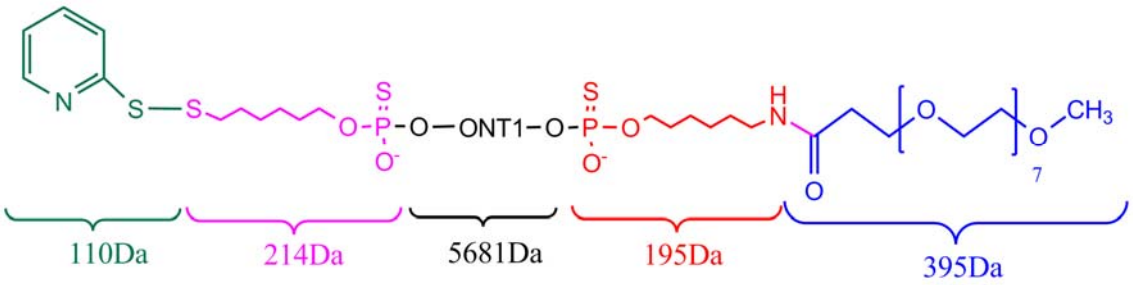


Abb. 307: Molekülsegmente von PyS-S-ONT1-NH-mPEG400

$M_{(HS\text{-}ONT1\text{-}NH2)}$ = 214Da + 5681Da + 195Da = 6090Da
$M_{(HS\text{-}ONT1\text{-}NH\text{-}mPEG400)}$ = 214Da + 5681Da + 195Da + 395Da = 6485Da
$M_{(PyS\text{-}S\text{-}ONT1\text{-}mPEG400)}$ = 110Da + 214Da + 5681Da + 195Da + 395Da = 6595Da

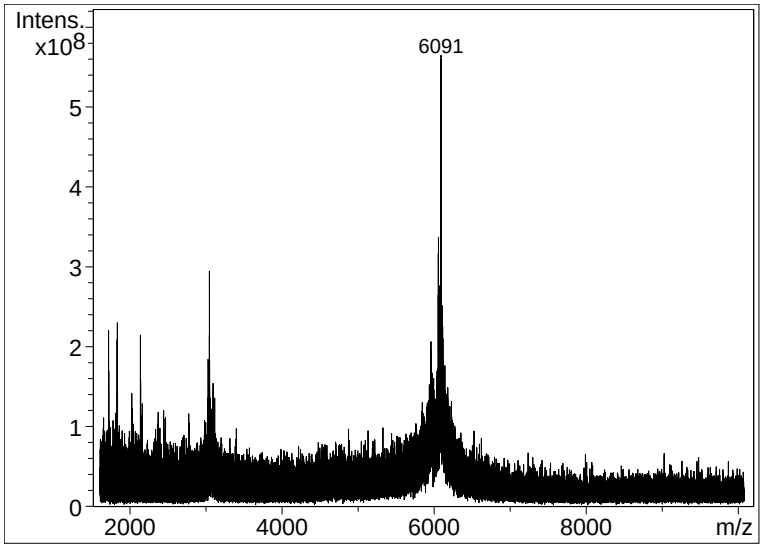


Abb. 308: MALDI-TOF MS von HS-ONT1-NH_2 (M_{theor} = 6090Da; M_{MALDI} = 6091Da)

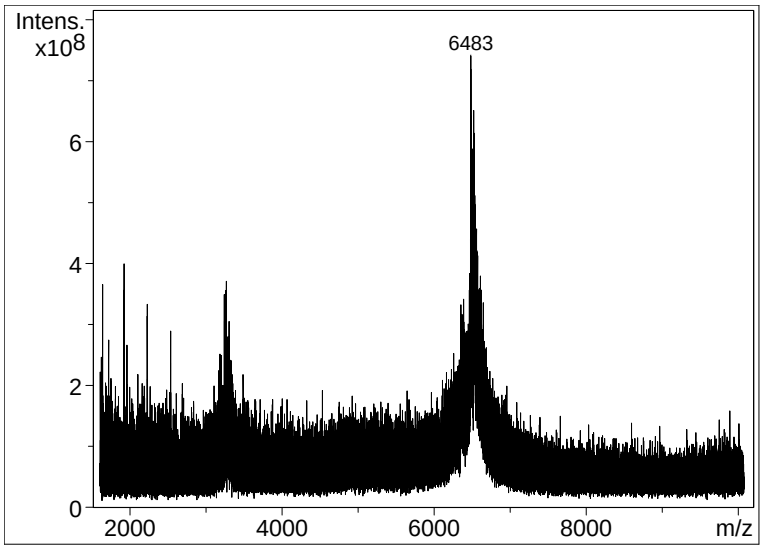


Abb. 309: MALDI-TOF MS von PyS-S-ONT1-NH-mPEG400
(M_{theor} = 6595Da (mit SPy); M_{theor} = 6485Da (ohne SPy); M_{MALDI} = 6483Da)

4.4.3. Kopplung zum Oligonukleotid-Peptid-Konjugat

Die Kopplung zum Oligonukleotid-Peptid Konjugat soll durch Reaktion der Pyridyl-aktivierten 5´-Thiolfunktion des Oligonukleotid-Thiophosphats mit der Thiolfunktion des Cysteinrests des Penetratins erfolgen[72]. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke unter Abspaltung von Pyridinthion (Abb. 310).

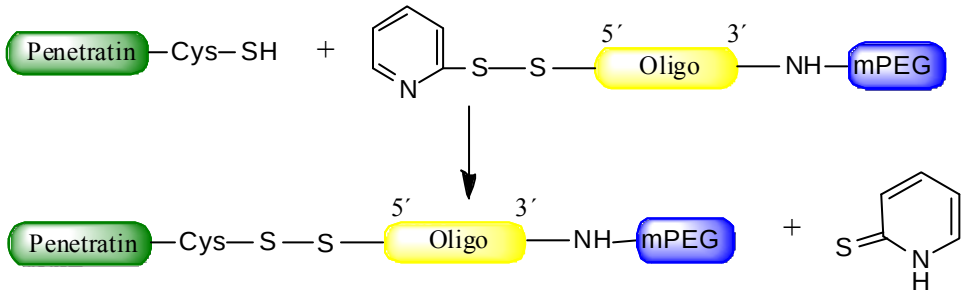


Abb. 310: Ausbildung einer Disulfidbrücke unter Abspaltung von Pyridinthion

Für einen ersten Testumsatz wurde zunächst eine 0,05mM Lösung von PyS-S-ONT1-mPEG400 in 0,1M TEAA pH7,5 hergestellt. Je 10µl dieser Lösung (0,5nmol) wurden daraufhin mit einem steigenden molaren Überschuss an zuvor lyophilisiertem Cys-Penetratin versetzt und 30min lang bei 37°C inkubiert. Von jedem Reaktionsansatz wurden 0,02nmol (0,4µl) entnommen und eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt (s. Kap. 6.4.8). Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Silberfärbung (s. Kap. 6.4.9). Das Ergebnis dieses ersten Testumsatzes ist in Abb. 311 dargestellt.

M: Marker
Bahn1: reines PyS-S-ONT1-NH-mPEG400
Bahn2: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 0,5x Penetratin-Überschuss
Bahn3: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 1x Penetratin-Überschuss
Bahn4: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 2x Penetratin-Überschuss
Bahn5: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 4x Penetratin-Überschuss
Bahn6: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 8x Penetratin-Überschuss
Bahn7: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 16x Penetratin-Überschuss
Bahn8: reines Penetratin (10nmol)

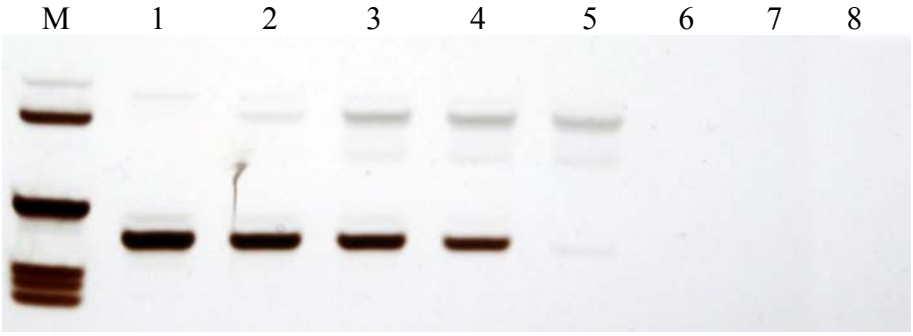


Abb. 311: PAGE zur Umsetzung von PyS-ONT1-NH-mPEG400 (0,05nmol/µl) in 0,1M TEAA pH7,5 mit steigendem Überschuss an Penetratin

In Abb. 311 wird deutlich, dass die Bande des Ausgangs-Oligonukleotids (untere Bande) bei steigendem Penetratin-Überschuss erwartungsgemäß schwächer wird, um bei einem 4fachen Überschuss an Penetratin vollständig zu verschwinden (Bahn 5). Zugleich bildet sich eine immer stärker werdende Bande im oberen Bereich des Gels aus, welche durch das gebildete Konjugat Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400 hervorgerufen wird und ihre höchste Intensität bei einem 4fachen Überschuss an Penetratin aufweist (Bahn 5). Reines Penetratin (Bahn 8) läuft unter den gegebenen Bedingungen nicht im Gel und führt auch nicht zur Ausbildung einer Bande.
Interesanterweise verschwinden ab einem 8fachen Überschuss an Penetratin (Bahn 6 und 7) sowohl die Bande des Ausgangsoligonukleotids als auch die Bande des gebildeten Konjugats vollständig. Betrachtet man die Reaktionsgefäße der einzelnen Ansätze genauer, so beobachtet man, dass es ab einem 8fachen Penetratin-Überschuss zur Ausbildung eines weißen Niederschlages kommt. Dieser ist im verwendeten Reaktionspuffer (0,1M TEAA pH7,5) unlöslich.
Die Ausbildung dieses Prezipitats ist sehr wahrscheinlich auf eine unspezifische Wechselwirkung des bei pH7,5 stark positiv geladenen (polykationischen) Penetratins (Abb. 312) mit dem polyanionischen Phosphatrückgrat des Oligonukleotid-Thiophosphats bzw. des schon gebildeten Konjugats zurückzuführen[9], [7].

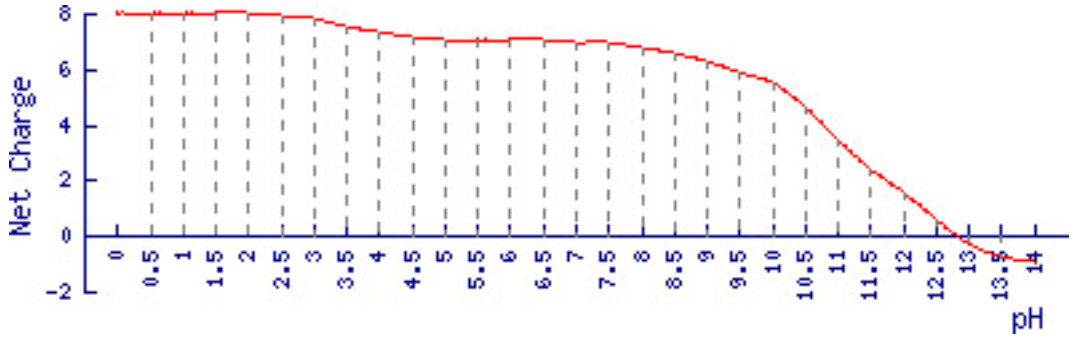


Abb. 312: Titrationskurve des stark basischen Penetratins mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 12,83 und einer Ladung von +7 bei pH7,5

Falls die Bildung dieses, im wässrigen System unlöslichen, Prezipitats tatsächlich auf unspezifische Wechselwirkungen zwischen Peptid und Oligonukleotid zurückzuführen ist, so sollte es sich auch bei der Verwendung eines nicht aktivierten Oligonukleotids oder gar eines Oligonukleotids ohne Thiolfunktion ausbilden.
Um dies sicherzustellen, wurde eine 0,05mM Lösung des nicht-thiolfunktionalisierten Oligonukleotids mPEG400-NH-ONT1-NH-mPEG1000 (Synthese s. Kap. 4.2.3.6) in 0,1M TEAA pH7,5 hergestellt und analog zum letzten Ansatz mit steigendem Penetratin-

Überschuss inkubiert. Das Ergebnis der anschließenden PAGE (s. Kap. 6.4.8) ist in Abb. 313 dargestellt.

M: Marker
Bahn1: reines mPEG400-NH-ONT1-NH-mPEG1000
Bahn2: mPEG400-NH-ONT1-NH-mPEG1000 + 0,5x Penetratin-Überschuss
Bahn3: mPEG400-NH-ONT1-NH-mPEG1000 + 1x Penetratin-Überschuss
Bahn4: mPEG400-NH-ONT1-NH-mPEG1000 + 2x Penetratin-Überschuss
Bahn5: mPEG400-NH-ONT1-NH-mPEG1000 + 4x Penetratin-Überschuss
Bahn6: mPEG400-NH-ONT1-NH-mPEG1000 + 8x Penetratin-Überschuss
Bahn7: mPEG400-NH-ONT1-NH-mPEG1000 + 16x Penetratin-Überschuss
Bahn8: reines Penetratin (10nmol)

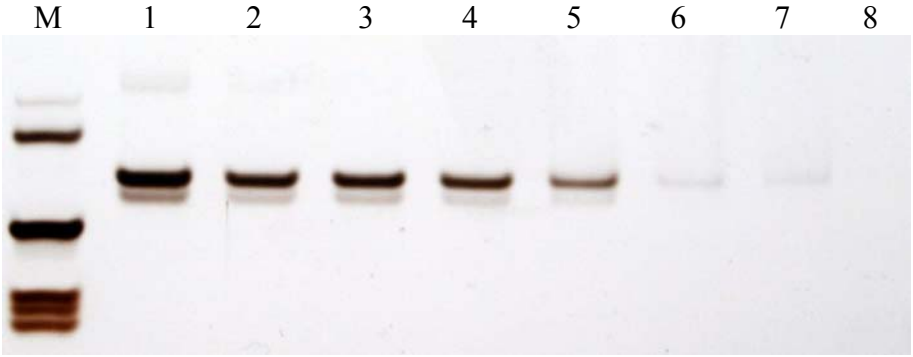


Abb. 313: PAGE zur Inkubation von mPEG400-NH-ONT1-NH-mPEG1000 (0,05nmol/µl) in 0,1M TEAA pH7,5 mit steigendem Überschuss an Penetratin

In Abb. 313 wird die Intensität der Bande des Ausgangsoligonukleotids, analog zum Ansatz in Abb. 311, mit steigendem Überschuss an Penetratin schwächer. Ab einem 8fachen Penetratin-Überschuss (Bahn 6) ist die Bande fast nicht mehr zu erkennen. Die Ausbildung einer neuen Bande im oberen Bereich des Gels wie in Abb. 311 bleibt jedoch erwartungsgemäß aus. Es findet demnach keine Reaktion zum Konjugat statt, ein weißlicher Niederschlag in den Reaktionsgefäßen der Ansätze mit 8x und 16x Penetratin-Überschuss deutet aber auch hier auf die Bildung eines unlöslichen Prezipitats hin.
Die Bildung des im wässrigen Millieu unlöslichen Prezipitats könnte durch die Verwendung eines anderen Lösungsmittels wie z.B Formamid unterbunden werden.
Um dies zu testen, wurde erneut eine 0,05mM Lösung an PyS-S-ONT1-NH-mPEG400, diesmal allerdings in reinem Formamid, hergestellt. Je 20µl dieser Lösung (1nmol) wurden erneut mit einem steigenden molaren Überschuss an zuvor lyophilisiertem Cys-Penetratin versetzt und 30min lang bei 37°C inkubiert. Von jedem Reaktionsansatz wurden wiederum 0,02nmol (0,4µl) entnommen und eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (s. Kap. 6.4.8). Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Silberfärbung (s. Kap. 6.4.9). Das Ergebnis des Umsatzes in Formamid ist in Abb. 314 dargestellt.

M: Marker
Bahn1: reines PyS-S-ONT1-NH-mPEG400
Bahn2: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 0,5x Penetratin-Überschuss
Bahn3: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 1x Penetratin-Überschuss
Bahn4: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 2x Penetratin-Überschuss
Bahn5: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 4x Penetratin-Überschuss
Bahn6: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 8x Penetratin-Überschuss
Bahn7: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 16x Penetratin-Überschuss
Bahn8: reines Penetratin (10nmol)

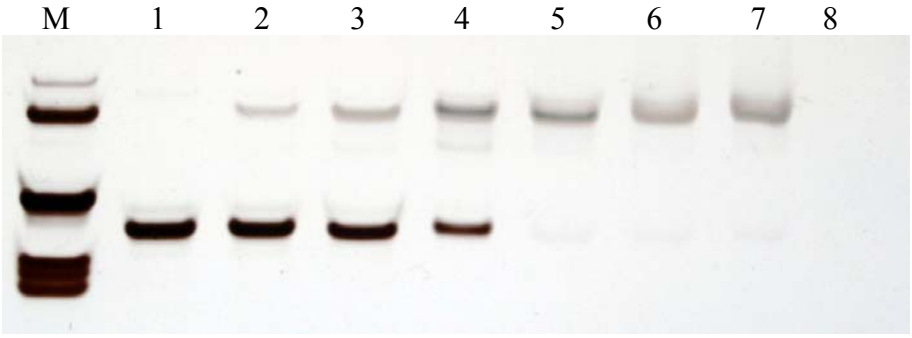


Abb. 314: PAGE zur Umsetzung von PyS-ONT1-NH-mPEG400 (0,05nmol/µl) in Formamid zu Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400 mit steigendem Überschuss an Penetratin

Vergleicht man den Umsatz in Formamid (Abb. 314) mit dem Umsatz in 0,1M TEAA pH7,5 (Abb. 311) so erkennt man auch hier eine ständige Abnahme der Intensität der Oligonukleotidbande bei gleichzeitig stärker werdender Konjugatsbande. Auch bei dieser Umsetzung verschwindet die Oligonukleotidbande ab einem 4fachen Penetratin-Überschuss (Bahn 5 in Abb. 314) vollständig.
Während bei der Umsetzung in 0,1M TEAA pH7,5 die neu gebildete Konjugatsbande bereits ab einem 8fachen Überschuss an Penetratin (Bahn 6 in Abb. 311) durch Preziptatsbildung ausbleibt, ist sie im Falle der Umsetzung in Formamid noch bis zu einem 16fachen Penetratin-Überschuss (Bahn 7 in Abb. 314) vorhanden. Betrachtet man die Reaktionsgefäße der einzelnen Umsätze so wird deutlich, dass durch die Verwendung von Formamid der Ausfall des Prezipitats verhindert wird.
Die Disulfidbrücke, welche den Oligonukleotidteil und den Peptidteil des Konjugats miteinander verbindet, kann durch die Einwirkung von Reduktionsmitteln gespalten werden (Abb. 315).

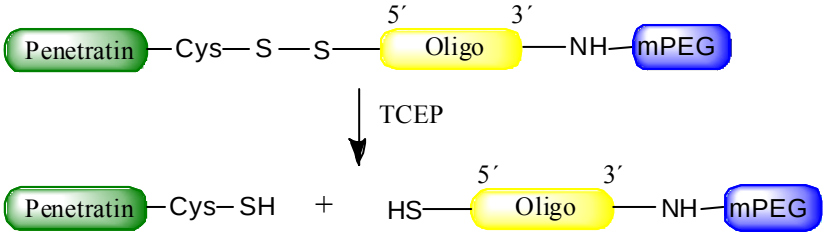


Abb. 315: Reduktion des Konjugats führt zur Rückbildung des Oligonukleotids

Um sicherzustellen, dass es sich bei der neu gebildeten Bande im oberen Bereich des Gels tatsächlich um das Konjugat Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400 handelt, wurden von den Ansätzen mit 4fachem und 16fachem Penetratin-Überschuss in Formamid jeweils 0,02nmol (0,4µl) entnommen und mit 2µl einer 0,2M TCEP-Lösung (Tris(2-carboxyethyl)phosphine) 30min lang bei 37°C inkubiert. Das TCEP müsste dabei zu einer Reduktion der Disulfidbrücke führen, was eine Rückbildung der Oligonukleotidbande im Gel zur Folge haben müsste.
Das Ergebnis der mit den beiden Reduktionsansätzen durchgeführten PAGE (s. Kap. 6.4.8) ist in Abb. 316 dargestellt.

M: Marker
Bahn1: reines PyS-S-ONT1-NH-mPEG400
Bahn2: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 4x Penetratin-Überschuss
Bahn3: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 4x Penetratin-Überschuss (reduziert mit TCEP)
Bahn4: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 16x Penetratin-Überschuss (reduziert mit TCEP)

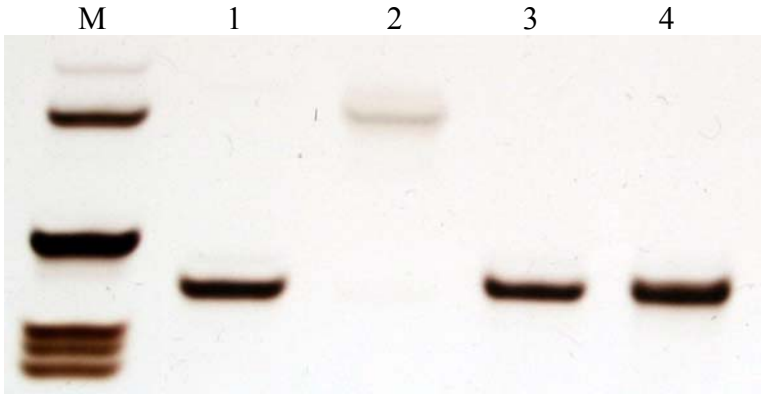


Abb. 316: PAGE der wieder reduzierten Kopplungsansätze

Die wieder reduzierten Kopplungsansätze führen in Abb. 316 tatsächlich zu einer Rückbildung der Oligonukleotidbande (Bahn 3 und 4). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die obere Bande der Kopplungsansätze (Bahn 2) tatsächlich durch das über eine Disulfidbrücke verbundene Konjugat Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400 hervorgerufen wird.

Zur Aufreinigung des Konjugats muß das überschüssige, nicht abreagierte Penetratin sowie eventuell unumgesetztes Ausgangs-Oligonukleotid vom Reaktionsansatz abgetrennt werden. Dies geschieht am besten über chromatografische Methoden wie RP-HPLC oder IE-HPLC.
Da bei der RP-HPLC wässrige Puffersysteme zur Anwendung kommen, besteht hier in besonderem Maße die Gefahr der Prezipitatsbildung. Um dies zu testen, wurden mit jeweils 0,25nmol einiger Kopplungsansätze von PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 in Formamid sowie mit 20nmol reinem Penetratin eine RP-HPLC durchgeführt (Abb. 317 und Abb. 318).

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril
- $\lambda = 254$nm
- schwarz: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 (entspr. Bahn 1 in Abb. 314)
- blau: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 2x Penetratin-Überschuss (≙ Bahn 4 in Abb. 314)
- rot: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 8x Penetratin-Überschuss (≙ Bahn 6 in Abb. 314)

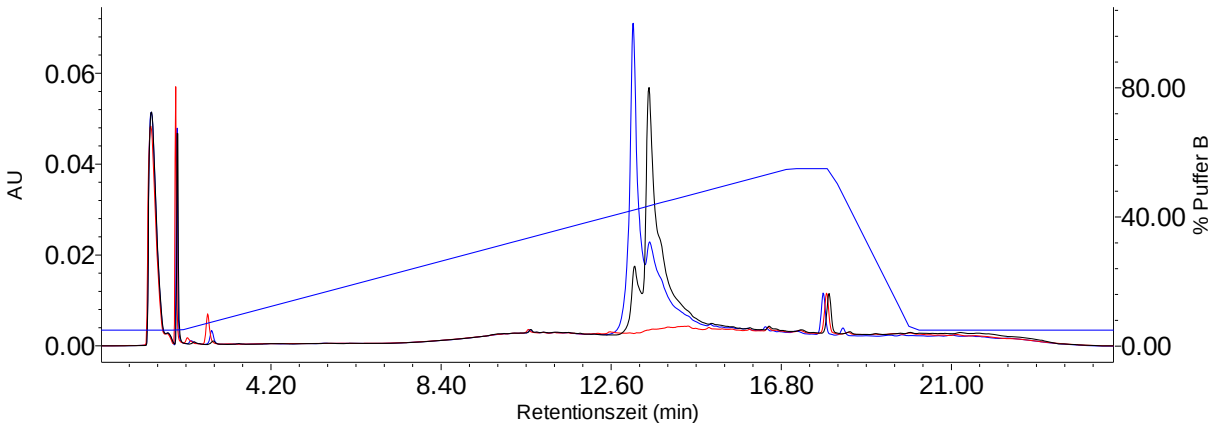


Abb. 317: RP-HPLC der Kopplungsansätze von PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 in Formamid

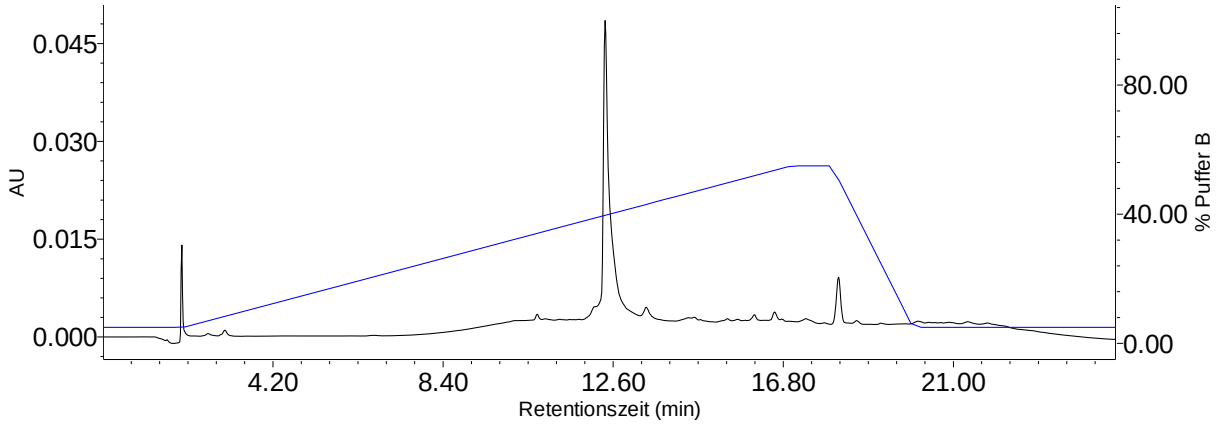


Abb. 318: RP-HPLC mit 20nmol reinem Penetratin

Wie in Abb. 317 zu erkennen ist, weisen das Pyridyl-aktivierte, mPEG400-derivatisierte Ausgangsoligonukleotid (schwarz) und das Konjugat Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400 aus dem Ansatz mit 2x Penetratin-Überschuss (blau) eine ähnliche Retentionszeit von ca. 13,5min auf, was eine preparative Abtrennung über RP-HPLC sehr schwierig macht. Analog zum Gel (Bahn 4 in Abb. 314) ist beim Ansatz mit 2x Penetratin-Überschuss (blau) sowohl der Peak des gebildeten Konjugats Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400 als auch ein Restpeak von unumgesetztem Ausgangsoligonukleotid erkennbar.
Interessanterweise führt der Ansatz mit 8fachem Penetratin-Überschuss (rot) zu einem vollständigen Signalverlust in der RP-HPLC, obwohl im entsprechenden Gel (Bahn 6 in Abb. 314) noch deutlich eine Konjugatsbande zu erkennen ist. Dieses Phänomen muß auf eine nachträgliche Bildung des Prezipitats im HPLC-Puffer zurückzuführen sein.
Das überschüssige Penetratin (Abb. 318) eluiert nur ein wenig früher als die Konjugate bei ca. 12,5min und ist damit ebenfalls nur schwer vom Reaktionsansatz abzutrennen.

Die Summe dieser Beobachtungen macht deutlich, dass die RP-HPLC weder zur Analyse noch zur Aufreinigung von Konjugaten aus Oligonukleotid-Thiophosphaten und polykationischen Peptiden wie Penetratin geeignet ist.
Als alternative Möglichkeit bietet sich die Aufreinigung über einen Ionenaustauscher an, wobei die Laufpuffer allerdings einen hohen Formamid-Anteil aufweisen müssen um eine Prezipitation bei höheren Penetratin-Überschüssen zu verhindern.
Wie dem isoelektrischen Plot in Abb. 312 zu entnehmen ist, weist das stark basische Penetratin bei pH 7,5 eine positive Ladung von ca. +7 auf, was bedeutet, dass es bei diesem pH-Wert nicht von einem Anionenaustauscher gebunden wird. Das Ausgangsoligonukleotid und das gebildete Konjugat hingegen besitzen negativ geladene Phosphatgruppen, wodurch sie eine Wechselwirkung mit dem Anionenaustauscher zeigen sollten.
Um diese Möglichkeit der Aufreinigung zu testen, wurden mit jeweils 0,5nmol der Kopplungsansätze eine entsprechende IE-HPLC durchgeführt (Abb. 319), wobei die Eluate zur weiteren Analyse aufgefangen wurden.

- Säule: Resource™ Q
- Gradient: Resource Q (FA) (s. Kap. 6.4.2)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5 mit 50% Formamid
- Puffer B: 0,1M TEAA pH 7,5 mit 50% Formamid + 2M LiCl
- $\lambda = 254$nm
- schwarz: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 (≙ Bahn 1 in Abb. 314)
- blau: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 2x Penetratin-Überschuss (≙ Bahn 4 in Abb. 314)
- rot: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 8x Penetratin-Überschuss (≙ Bahn 6 in Abb. 314)

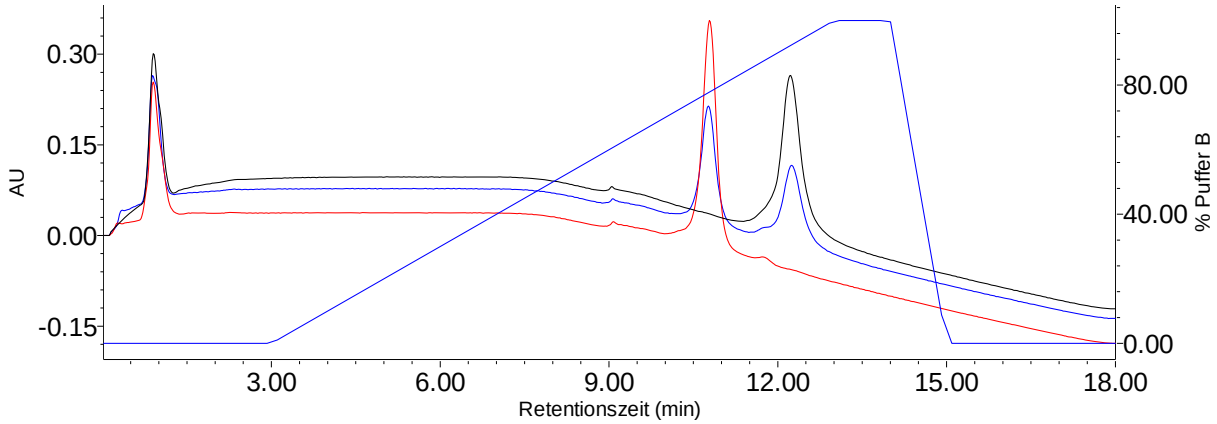


Abb. 319: IE-HPLC der Kopplungsansätze von PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 in Formamid

Unter den gleichen Bedingungen erfolgte auch eine Auftragung von 20nmol reinem Penetratin (schwarz in Abb. 320). Da bei einem Peptid die UV-Absorption im Wesentlichen durch die Amidbindungen erfolgt, wurde die Wellenlänge zur besseren Detektion auf 220nm eingestellt.

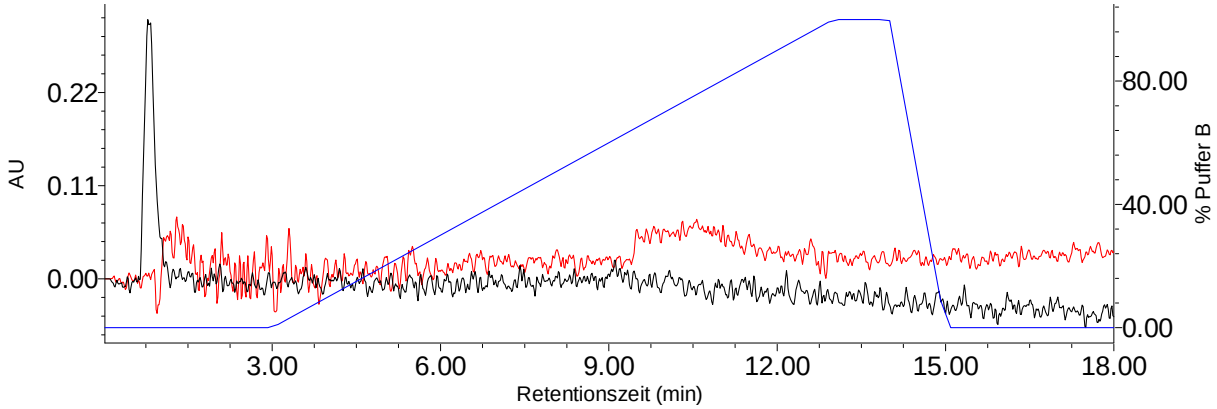


Abb. 320: IE-HPLC mit 20nmol reinem Penetratin bei 220nm (schwarz) im Vergleich zum Säulenleerlauf (rot)

Wie in Abb. 319 zu sehen ist, weist das gebildete Konjugat Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400 mit ca. 10,7min (rot/blau) eine deutlich kürzere Retentionszeit auf als das Ausgangsoligonukleotid PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 mit ca. 12,5min (schwarz).
Auch der Reaktionsverlauf bei verschiedenem Penetratin-Überschuss ist sehr gut zu erkennen und entspricht im Wesentlichen den Beobachtungen der PAGE-Analyse (Abb. 314). Bei einem zweifachen Überschuss an Penetratin, ist noch ca. 50% unumgesetztes Ausgangsoligonukleotid vorhanden (blau in Abb. 319) während bei einem 8x Überschuss eine vollständige Umsetzung erfolgt (rot in Abb. 319). Ein Ausfall des Prezipitats bei höherem Penetratin-Überschuss findet im Gegensatz zur Analyse über RP-HPLC (Abb. 317) nicht statt. Reines Penetratin zeigt keine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial und eluiert sofort (Abb. 320).
Somit ist mittels IE-HPLC eine preparative Abtrennung des gebildeten Konjugats sowohl von überschüssigem Penetratin als auch von eventuell unumgesetztem Ausgangsoligonukleotid möglich. Bei größeren Ansätzen besteht zudem die Möglichkeit der Aufreinigung über IE-FPLC ohne dabei einen Gradienten zu fahren. Da bei einem entsprechenden Überschuss an Penetratin von einer vollständigen Reaktion des Oligonukleotids ausgegangen werden kann, muß nur noch das überschüssige Penetratin abgetrennt werden, welches die IE-FPLC-Säule ungebunden passieren würde. Das in der Säule gebundene Konjugat hingegen kann danach direkt durch einen Puffer mit hoher Salzkonzentration eluiert werden. Auf diese Weise wäre die schnelle Aufreinigung auch größerer Mengen möglich.
Das durch IE-HPLC aufgereinigte Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400 liegt nun jedoch in einem formamidhaltigen Puffer mit einer hohen Salzkonzentration vor. Für weitere Analysen

muß daher zunächst eine Entsalzung stattfinden. Bei größeren Mengen wäre hierfür eine Ultrafiltration oder Gelfiltration das Mittel der Wahl. Geringe Substanzmengen können jedoch, zumindest für massenspektroskopische Untersuchungen, auch über RP-HPLC entsalzt werden. Im nächsten Schritt wurden daher die IE-Eluate des Konjugats vereinigt, im Speedvac eingeengt und auf eine RP-HPLC Säule aufgetragen (Abb. 321).

- Säule: LiChroCART 125-4 RP-18e
- Gradient: 5bis55Proz_1ml_25min (s. Kap. 6.4.1)
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,5
- Puffer B: Acetonitril

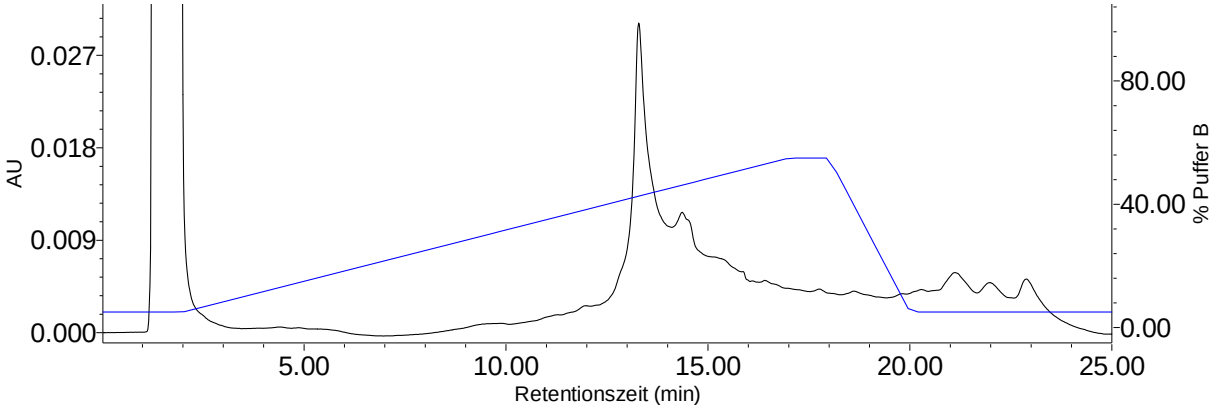


Abb. 321: RP-HPLC des über IE aufgereinigten Konjugats Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400

Das über IE-FPLC aufgereinigte Penetratin-Oligonukleotid-Konjugat weist in der anschließenden Untersuchung über RP-HPLC (Abb. 321) eine Retentionszeit von ca. 13,5min auf, was dem Peak des gebildeten Produkts bei der RP-HPLC Analyse der Reaktionsansätze (Abb. 317) entspricht. Der intensive Peak bei 1-2min wird durch das bei der Auftragung noch vorhandene Formamid des IE-Laufpuffers verursacht.
Eine UV-Quantifizierung des Eluats der RP-HPLC ergab eine Stoffmenge von 0,7nmol, was für eine Analyse mittels PAGE und MALDI-TOF MS ausreichend ist.
Zur weiteren Charakterisierung des aufgereinigten Oligonukleotid-Penetratin-Konjugats wurden 0,02nmol des RP-HPLC Eluats auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (s. Kap. 6.4.8) und die Laufzeit der Konjugatsbande mit dem Ausgangsoligonukleotid und der neu gebildeten Bande eines unaufgereinigten Kopplungsansatzes verglichen (Abb. 322). Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Silberfärbung (s. Kap. 6.4.9).

M: Marker
Bahn1: reines PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 (Ausgangsoligonukleotid)
Bahn2: PyS-S-ONT1-NH-mPEG400 + 4x Penetratin-Überschuss (Reaktionsansatz)
Bahn3: aufgereinigtes Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400 (Eluat aus Abb. 321)

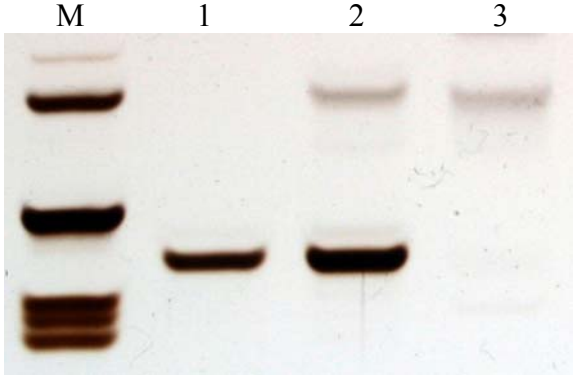


Abb. 322: PAGE des über IE-HPLC aufgereinigten und über RP-HPLC entsalzten Konjugats

Das über IE-FPLC aufgereinigte und über RP-HPLC entsalzte Penetratin-Oligonukleotid-Konjugat Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400 liefert dabei, wie erwartet, eine einzelne Bande (Bahn 3 in Abb. 322) welche der Konjugatsbande des unaufgereinigten Reaktionsansatzes (Bahn 2 in Abb. 322) entspricht.

Die abschließende Identitätsbestimmung des Produkts erfolgte durch Ermittlung der Molekülmasse über MALDI-TOF MS (s. Kap. 6.6).

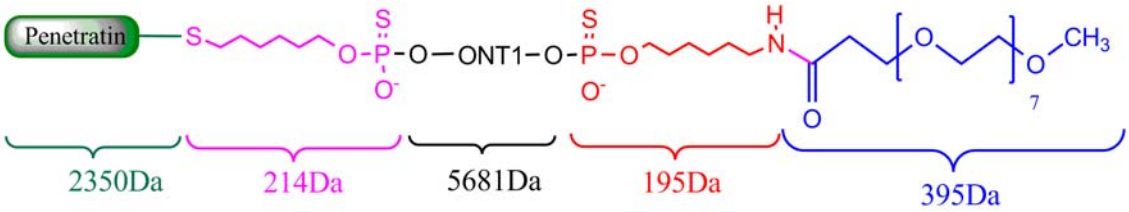


Abb. 323: Ermittlung der theoretischen Molekülmasse des Konjugats (m_{theor} = 8835Da)

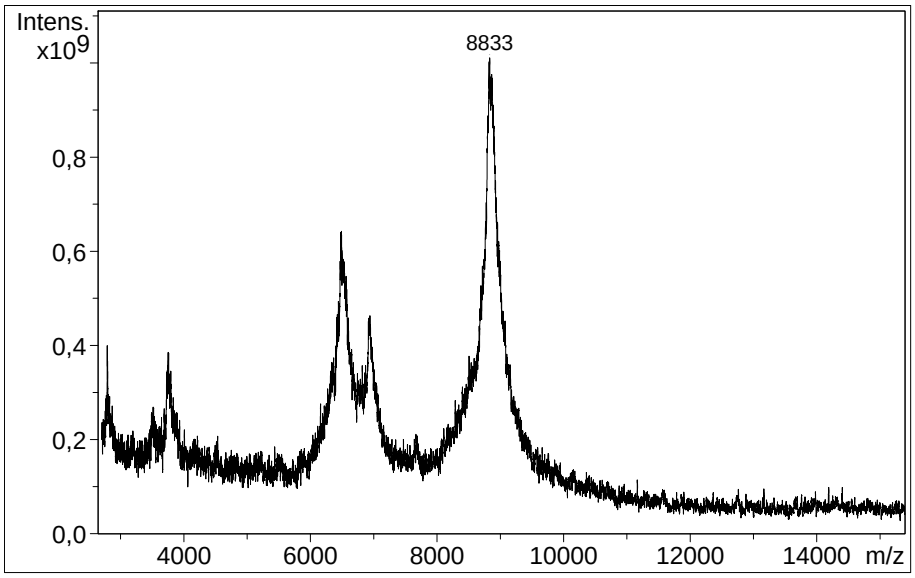


Abb. 324: MALDI-TOF MS des aufgereinigten Konjugats (m_{theor} = 8835Da; $M_{Messung}$ = 8833Da)

Für die angewandte Meßmethode liegt die erwartete Molekülmasse bereits sehr hoch. Das MALDI-TOF Spektrum (Abb. 324) liefert daher einen relativ breiten Peak im Bereich von ca. 8800Da bis ca. 8900Da. Das Zentrum des Massepeaks bei 8833Da stimmt jedoch mit der erwarteten Molekülmasse von 8835Da überein, wodurch die Identität des Oligonukleotid-Penetratin Konjugats (Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400) hinreichend bestätigt wird.
Da durch den Laserbeschuß bei der MALDI-TOF Messung die Disulfidbrücke zwischen Oligonukleotid- und Peptidteil teilweise gespalten wird, ist ein zusätzlicher Peak des freien, mPEG400-derivatisierten Oligonukleotids bei ca. 6500Da zu erkennen.

4.5. Design eines rekombinanten Carriers zur Zell-Internalisierung

In diesem Teil der Arbeit soll durch Expression in E. coli ein rekombinantes Fusionsprotein aus dimerem Streptavidin (Stv43 s. Kap. 3.8) und Zell-internalisierendem Penetratin (s. Kap. 3.7.1) hergestellt werden. Biotinylierte Oligonukleotide mit therapeutischer Wirkung könnten auf diese Weise über das dimere Streptavidin an den Carrier gekoppelt werden, wodurch die Möglichkeit geschaffen wird, den gesamten Komplex durch die internalisierende Wirkung des Penetratins in eine Zelle einzuschleusen (Abb. 325). Als Grundlage für diese Vorgehensweise ist zuerst die Konstruktion eines Expressionsvektors notwendig, welcher die Penetratin-codierende Basensequenz zusammen mit dem Gen des dimeren Streptavidins (TSA43) enthält.

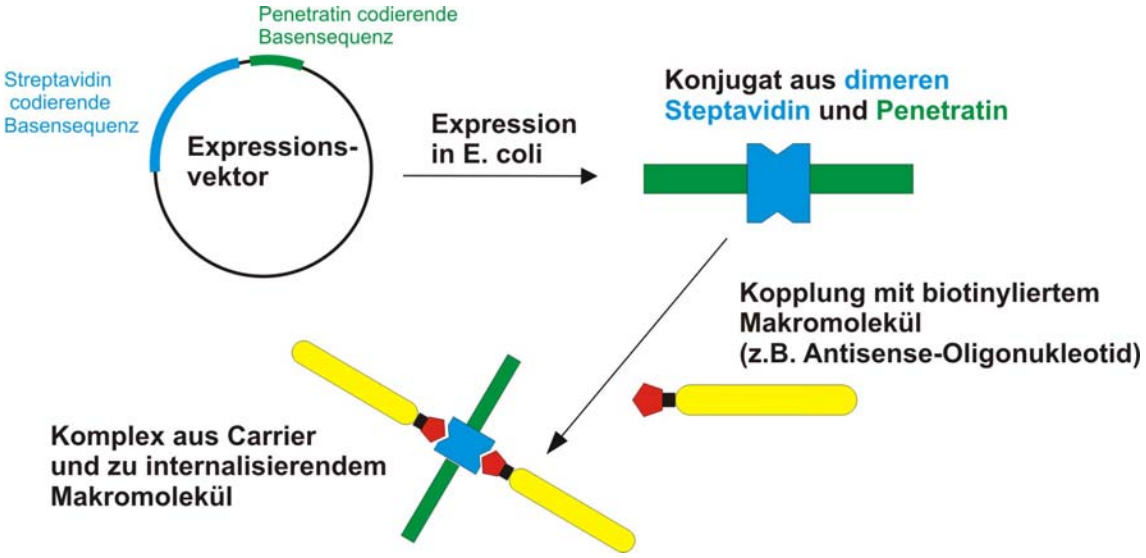


Abb. 325: Prinzip der rekomb. Herstellung und Anwendung eines Penetratin-Streptavidin-Konjugats

Um Vergleichsdaten bei den Klonierungen und der späteren Expression zu erhalten, sollen parallel dazu ähnliche Vektoren konstruiert werden, mit denen die Expression eines UV-absorbierenden Penetratin-GFP Konjugats (s. Kap. 3.9) sowie die alleinige Expression von GFP bzw. dimerem Streptavidin im gleichen Expressionssystem möglich ist.

Die benötigten codierenden Nukleinsäure-Sequenzen (Inserts) sollen durch PCR aus entsprechenden Quellvektoren (Templates) amplifiziert werden. Eine Modifizierung der Inserts mit kompatiblen Restriktionsschnittstellen (Abb. 326) zum späteren Einbau in den Zielvektor soll, ebenso wie der Einbau der 48 Nukleotide langen Penetratin-codierenden Sequenz, durch modifizierte Primer erfolgen[(122)].

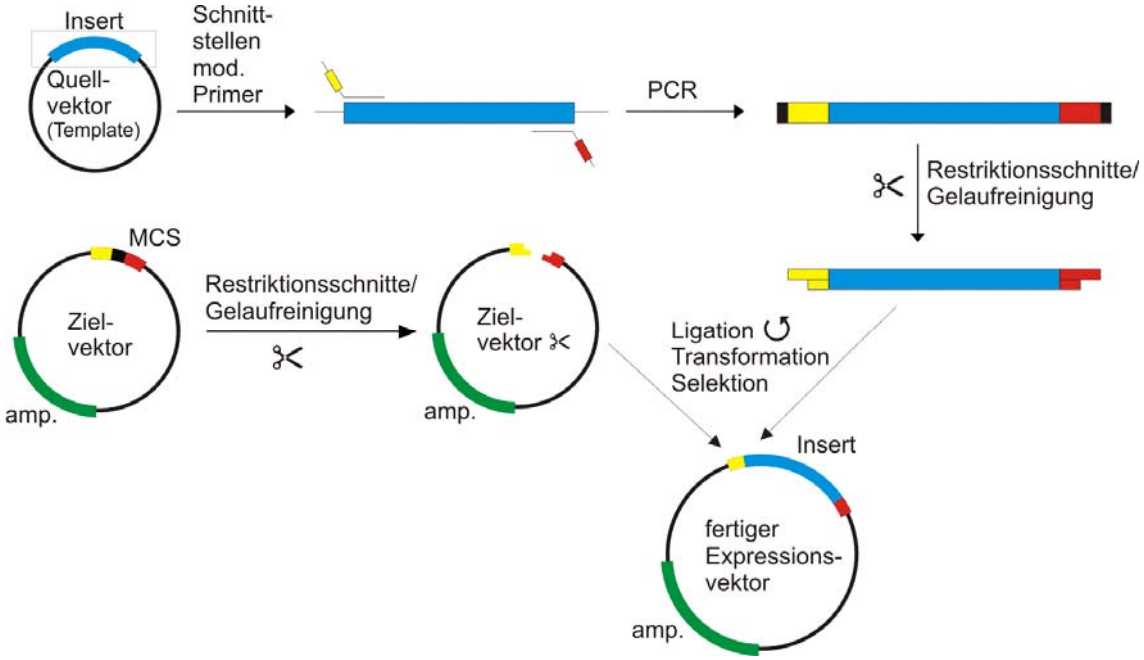


Abb. 326: PCR und Klonierung der Inserts durch Primer mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen

Als Quellvektor für die Sequenz des dimeren Streptavidins (Stv43) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Takeshi Sano (Boston University) das Plasmid pTSA43 zur Verfügung gestellt welches auf dem pET3a-Plasmid (Abb. 336) basiert und das, durch gezielte Mutationen (s. Kap. 3.8) gewonnene, TSA43-Gen für dimeres Streptavidin enthält.

Als Template für das geplante GFP-Insert stand das Plasmid pEGFP-N1 von Clontech zur Verfügung welches eine für EGFP (enhanced GFP) codierende Basensequenz in sich trägt (Vektorsequenz s. Seite 343). Das EGFP ist eine Variante des Wildtyp-GFP, die durch stille Mutationen auf die Codonverteilung im Menschen optimiert wurde, aber auch ohne Probleme in E. coli exprimiert werden kann. Das Absorptionsmaximum (488nm) ist durch Austausch einiger Aminosäuren (Phe-64 → Leu, Ser65 → Thr) in Richtung rot verschoben, wodurch eine intensivere Fluoreszenz erreicht wird.

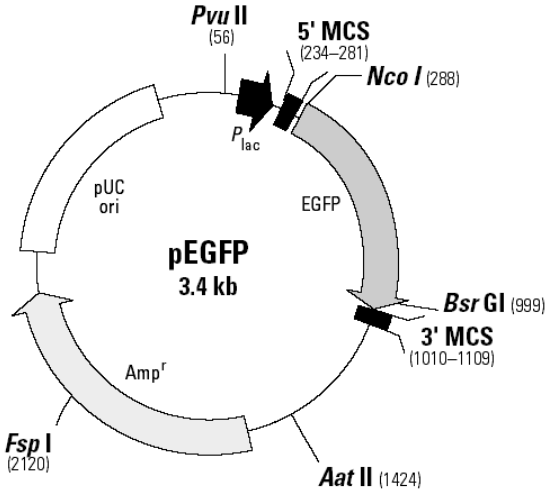


Abb. 327: Das pEGFP-N1 Plasmid von Clontech

Als Ziel- und späterer Expressionsvektor soll das pQE30-Plasmid (Abb. 328, Sequenz s. Seite 338) des T5-Expressionssystems der Firma Qiagen (s. Kap. 3.10.5) zum Einsatz kommen.

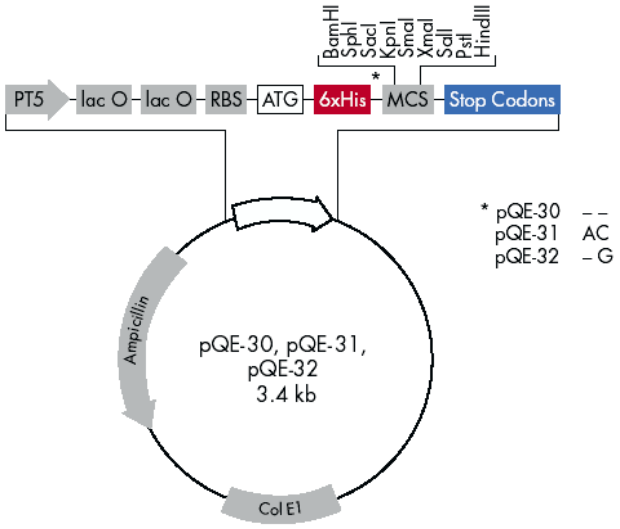


Abb. 328: Die pQE30/31/32Plasmid-Serie von Qiagen

Zur Selektion der mit diesem Vektor transformierten Klone besitzt das pQE30-Plasmid einen Ampicillin-Resistenzmarker. Für die Transkription steht ein T5-Promotor inklusive lac-Operon zur Verfügung, welcher von der E. coli eigenen RNA-Polymerase erkannt wird. Hinter dem Startcodon (ATG) folgt eine His-tag Sequenz zur späteren Aufreinigung des Expressionsprodukts über Ni-NTA (s. Kap. 6.7.10) sowie eine Multiple Cloning Site (MCS) mit den in Abb. 329 dargestellten Restriktionsschnittstellen.

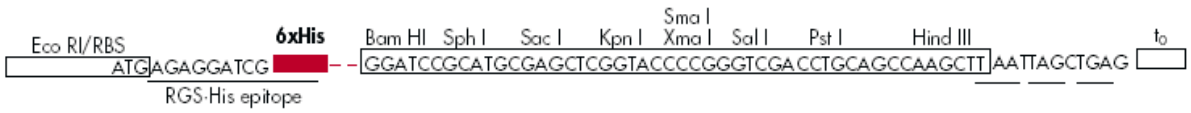


Abb. 329: Multiple Cloning Site (MCS) des pQE30-Plasmids

Für den Einbau eines Inserts müssen 2 Restriktionsschnittstellen verwendet werden, welche im zu klonierenden PCR-Produkt nicht vorkommen. Dies sind in unserem Fall z.B. BamH1 und Kpn1. Wird die gleiche Restriktionsschnittstelle für beide Enden des Inserts verwendet, so muß der Zielvektor zwar mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten werden, die Chance eines gedrehten Einbaus des Inserts liegt allerdings bei 50%, was ein späteres Screening erschwert. Außerdem muß beim Design der modifizierten Primer auf das richtige Leseraster bezüglich des vor der MCS liegenden Startcodons ATG geachtet werden.

4.5.1. Design des pQE30-EGFP Vektors

4.5.1.1. Design der EGFP-Primer

Die hybridisierende Sequenz des forward (+)-Primers zur Amplifizierung des EGFP-Inserts soll mit dem Startcodon (ATG) des in pEGFP-N1 (Sequenz s. Seite 343) einklonierten EGFP-Gens beginnen und in 3´-Richtung eine Länge von mindestens 18 Nukleotiden sowie einen G/C-Gehalt von 40-60% aufweisen. Der Abschluß des 3´-Endes sollte dabei von ein bis zwei G oder C gebildet werden, um eine bessere Bindung und Elongation zu gewährleisten. Direkt vor der am Template hybridisierenden Sequenz soll in 5´-Richtung eine neu eingeführte BamH1-Schnittstelle (GGATCC) im Leseraster des späteren Zielvektors pQE30 liegen. Da die BamH1-Schnittstelle durch das entsprechende Restriktionsenzym symmetrisch geschnitten wird und eine Länge von 6 Nukleotiden (entspricht 2 Codon-Tripletts) aufweist, sollte das Insert bei einer Klonierung in die multiple cloning site (MCS) des pQE30-Vektors automatisch im richtigen Leseraster liegen (Abb. 329).
Restriktionsenzyme benötigen zur einwandfreien Funktion eine gewisse Anzahl an Nukleotiden links und rechts der eigentlichen Schnittstelle[137], weshalb vor der BamH1-Schnittstelle noch ca. 5 Füllnukleotide eingebaut werden müssen.
Der gegenläufige reverse (-)-Primer soll mit seiner ebenfalls mindestens 18 Nukleotide langen hybridisierenden Sequenz dem Ende des nicht-codierenden Stranges des in pEGFP-N1 einklonierten EGFP-Gens bis hin zum Stopcodon (TAA) entsprechen. Auch er sollte einen G/C-Gahalt von 40-60% sowie ein bis zwei G oder C am 3´-Ende aufweisen. Vor der hybridisierenden Sequenz sollen in 5´-Richtung die neu eingeführte Kpn1-Schnittstelle (GGTACC) sowie fünf Füllnukleotide liegen.
Die mit diesen Vorgaben entwickelten Primer sowie das geplante PCR-Produkt sind in Abb. 330 dargestellt.

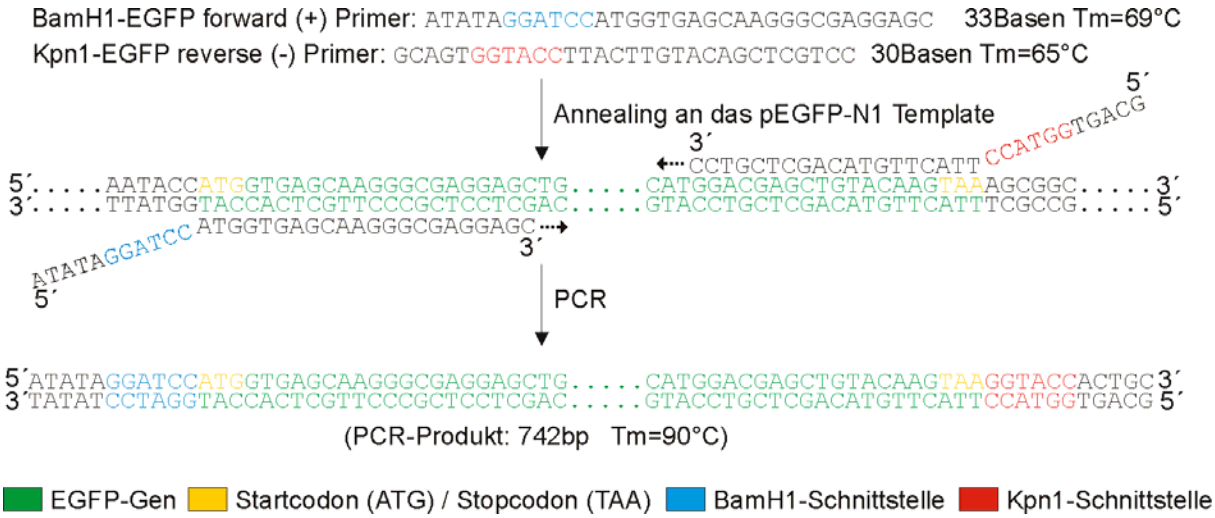


Abb. 330: Design der Schnittstellen-modifizierten Primer für die PCR des EGFP-Inserts

Die Synthese der beiden schnittstellenmodifizierten EGFP-Primer erfolgte auf einem Expedite 8909 DNA-Synthesizer nach Standard-Protokollen im 0,2µmol-Maßstab auf Cytidin-Träger (s. Kapitel 6.2.1). Nach der Aufreinigung über RP-HPLC und Entsalzung über eine NAP-Säule ergaben sich folgende Konzentrationen:

BamH1-EGFP (+): 24pmol/µl
Kpn1-EGFP (-): 19pmol/µl

4.5.1.2. PCR des EGFP-Inserts

Die Amplifikation des EGFP-Inserts mit pEGFP-N1 als Template erfolgte durch eine den Schmelztemperaturen der Primer angepasste PCR (s. Kap. 6.7.1). Die Schmelztemperaturen der Primer liegen beim ersten Annealing, aufgrund der noch nicht hybridisierenden Schnittstellen-Sequenzen, niedriger (BamH1-EGFP (+): 63°C, Kpn1-EGFP (-): 51°C) als bei den späteren PCR-Zyklen mit hybridisierenden Schnittstellen-Sequenzen, in denen hauptsächlich schon entstandenes PCR-Produkt als Template dient (BamH1-EGFP (+): 69°C, Kpn1-EGFP (-): 65°C). Die Schmelztemperatur des PCR-Produkts liegt bei 90°C.
Für die Annealing-Temperatur im ersten PCR-Zyklus ist es sinnvoll, sich an dem Primer mit der niedrigeren Schmelztemperatur zu orientieren, was im Falle der EGFP-Primer 51°C sind.
Für die Annealing-Temperatur der späteren PCR-Zyklen sollte neben den höheren Schmelztemperaturen der Primer, auch die Schmelztemperatur des PCR-Prouktes berücksichtigt werden. Da die Rolle des PCR-Produkts als Template jedoch erst nach einigen Zyklen bedeutsam wird, wurde die Annealing-Temperatur empirisch auf 55°C gesetzt.
Als Richtwert für die Elongationszeit gilt ca. 1min pro kb Länge des geplanten PCR-Produkts. Daher wurde für das 742bp lange PCR-Produkt eine Elongtionzeit von 1min gewählt, wobei das Temperaturoptimum für die Taq-Polymerase 72°C beträgt.
Um die ideale Template-Menge zur ermitteln, wurden mehrere PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Template-Mengen (1ng und 10ng des pEGFP-Plasmids) gefahren.

Konzentrationen:

- Taq-Polymerase: 5U/µl
- dNTP-Mix: 10mM
- Template (pEGFP): 10ng/µl
- BamH1-EGFP (+): 24pmol/µl
- Kpn1-EGFP (-): 19pmol/µl

PCR-Ansatz:

- 2,5µl 10xPCR-Puffer (50mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$)
- 0,5µl dNTP-Mix (200µM)
- 0,4µl BamH1-EGFP (+) (10pmol)
- 0,5µl Kpn1-EGFP (-) (10pmol)
- 1ng (0,1µl) bzw. 10ng (1µl) Template (pEGFP)

→ mit Wasser auf 25µl auffüllen

Temperaturprogramm:

1x:
- 5min bei 94°C
  → 1,5U Taq-Polymerase nach 2min
- 0,5min bei 50°C
- 1min bei 72°C

35x:
- 0,5min bei 94°C
- 0,5min bei 55°C
- 1min bei 72°C

→ 10min bei 72°C → 4°C

Tab. 5: PCR-Ansätze und Temperaturprogramm zur Amplifikation des EGFP-Inserts

Nach Beendigung der PCR wurde von jedem Ansatz 2µl entnommen und auf ein 1%iges, ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (s. Kap. 6.7.3) aufgetragen (Abb. 331).

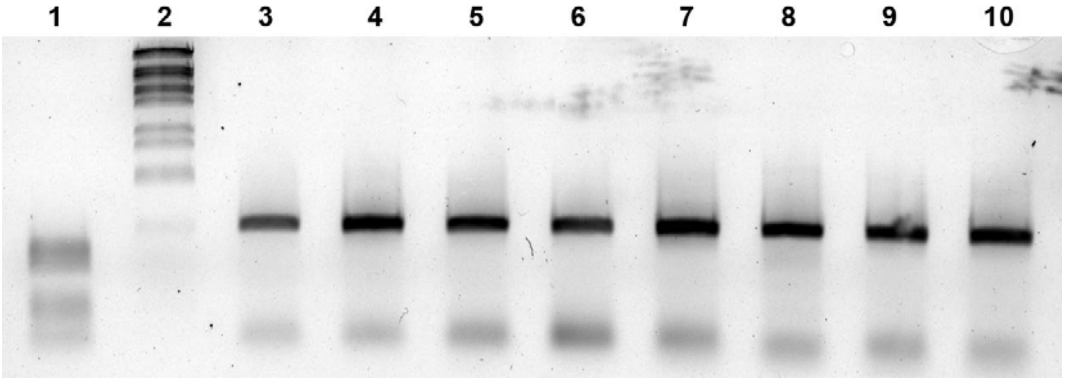


Abb. 331: Agarosegel der PCR zur Amplifizierung des EGFP-Inserts (2µl PCR-Ansatz)
(1: Marker V, 2: λ-Digest, 3-6: 1ng Template, 7-10: 10ng Template)

Die Auswertung der, durch Interkalation mit Ethidiumbromid, UV-absorbierenden DNA-Banden mittels eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) zeigt, dass sowohl die PCR-Ansätze mit 1ng Template als auch mit 10ng Template in Abb. 331 eine scharfe Bande des PCR-Produkts bei ca. 750bp liefern (die unterste Bande des λ-Digest auf Bahn 2 liegt bei 564bp, siehe Kap. 6.1.4). Daraus wird deutlich, dass im Falle eines reinen Plasmid-Templates wie pEGFP-N1 eine Menge von 1ng für eine erfolgreiche PCR ausreichend ist.

4.5.1.3. Klonierung des EGFP-Inserts

Die sich an die PCR anschließende Vorgehensweise zur Klonierung des amplifizierten EGFP-Inserts ist übersichtlich in Abb. 332 dargestellt.
Zur Abtrennung des EGFP-Inserts von den restlichen Bestandteilen des PCR-Ansatzes (Puffer, Nukleotide, Taq-Polymerase, Template, Primer) wurden zunächst die einzelnen PCR-Ansätze zusammengegeben und gemeinsam über eine Spin-Column aufgereinigt (s. Kap. 6.7.4). Das BamH1/Kpn1 Schnittstellen-modifizierte EGFP-Insert wurde daraufhin mit 50µl Wasser aus der Säule eluiert, mit BamH1 und Kpn1 verdaut (✂) (s. Kap. 6.7.2) und die kleineren End-Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt.
Die Banden des verdauten EGFP-Inserts wurden darufhin aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels Gelextraktion extrahiert (s. Kap. 6.7.4). Nach der Elution mit 50µl Wasser ergab sich durch UV-Quantifizierung (s. Kap. 6.5) eine Konzentration an BamH1/Kpn1-geschnittenem EGFP-Insert von 0,019µg/µl (0,95µg).

Parallel dazu wurden 7,5µg des pQE30-Zielvektors mit BamH1 und Kpn1 verdaut und über Gelextraktion aus einem Agarosegel aufgereinigt. Nach der Elution mit 50µl Wasser ergab die UV-Quantifizierung eine Konzentration an BamH1/Kpn1-geschnittenem pQE30-Vektor von 0,046µg/µl (2,3µg).

Weitere 7,5µg des pQE30-Vektors wurden ebenfalls mit BamH1 und Kpn1 verdaut, danach jedoch zusätzlich 1h lang bei 37°C mit CIP (calf intestine alkaline phosphatase) behandelt. Dieses Enzym dephosphoryliert die 5´-Enden der DNA-Fragmente, wodurch eine unerwünschte Selbstligation des Vektors unterbunden werden kann. Nach der CIP-Behandlung wurde ebenfalls eine Agarose-Gelelektrophorese mit Gelextraktion durchgeführt. Die Konzentration des mit 50µl Wasser eluierten, BamH1/Kpn1-geschnittenen, CIP-behandelten pQE30-Vektors betrug 0,036µg/µl (1,8µg).

Für die nun folgende Ligation (↺) mittels T4 DNA-Ligase (s. Kap. 6.7.3) wurde das geschnittene EGFP-Insert in einem 5fachen molaren Überschuss gegenüber dem verdauten pQE30 Vektor eingesetzt, wobei zur Berechnung folgende Formel diente (m = Masse in ng; l = Länge in Nukleotiden):

$$m_{Insert} = \frac{5 \cdot m_{Vektor} \cdot l_{Insert}}{l_{Vektor}}$$

Bei 40ng Vektor (0,9µl des geschnittenen pQE30 Vektors bzw. 1,1µl des geschnittenen und dephosphorylierten pQE30 Vektors) sind dies 44ng bzw. 2,3µl des verdauten PCR-Produkts.

Konzentrationen:

- T4 DNA-Ligase: 1U/µl
- EGFP ✂BamH1/Kpn1: 19ng/µl
- pQE30 ✂BamH1/Kpn1: 46ng/µl
- pQE30 ✂BamH1/Kpn1/CIP: 36ng/µl

Ligations-Ansatz:

- 5µl 10x Ligations-Puffer
- 0,9µl pQE30 ✂BamH1/Kpn1
  bzw.
  1,1µl pQE30 ✂BamH1/Kpn1/CIP
- 2,3µl EGFP ✂BamH1/Kpn1
- 1µl (1U) T4-Ligase

→ mit Wasser auf 50µl auffüllen
→ 16h bei 16°C

Tab. 6: Ligationsansätze (↺) für pQE30-EGFP

Jeweils 10µl der Ligationsansätze wurden für eine Transformation (s.Kap. 6.7.7) in RbCl-kompetente E. coli (s. Kap. 6.7.1) des Stammes DH5α verwendet und die Transformationsansätze (100µl) zur Selektion auf LB^{amp}-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C ergab sich folgendes Wachstumsmuster:

Blindprobe (DH5α ohne DNA-Zugabe) → kein Wachstum
DH5α transf. mit pQE30 ✂BamH1/Kpn1 ↺ EGFP ✂BamH1/Kpn1 → ca. 50 Kolonien
DH5α transf. mit pQE30 ✂BamH1/Kpn1/CIP ↺ EGFP ✂BamH1/Kpn1 → ca. 20 Kolonien

Die gewachsenen Bakterienkolonien tragen alle eine Ampicillin-Resistenz, was auf eine Aufnahme des pQE30-Vektors schließen läßt. Allerdings ist es nicht sicher, dass auch alle Klone einen rekombinanten Vektor mit korrektem EGFP-Insert tragen, da neben einem fehlerhaften Einbau auch eine Selbstligation des Vektors möglich ist.

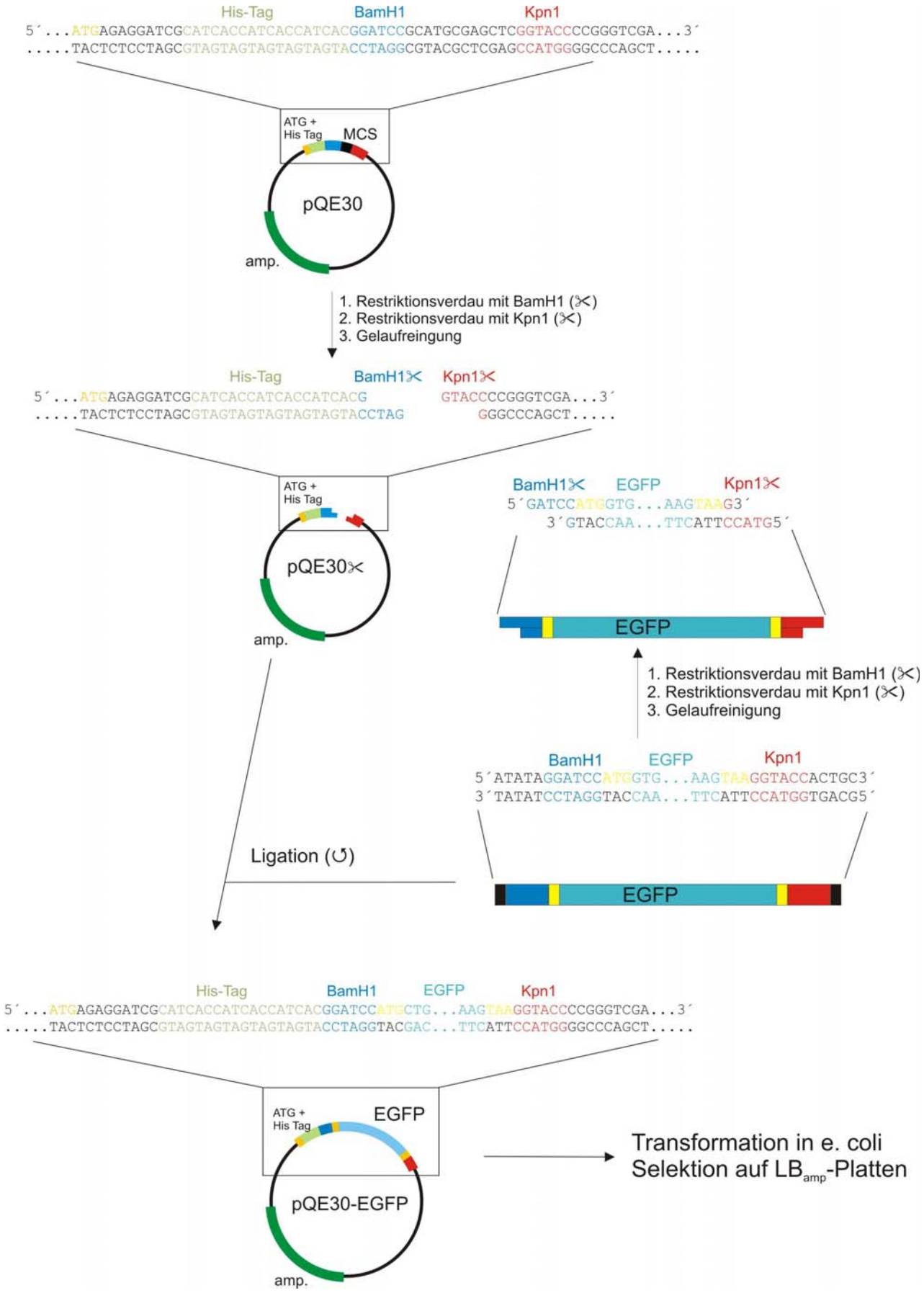


Abb. 332: Vorgehensweise zur Klonierung des Schnittstellen-modifizierten EGFP-PCR-Produkts in pQE30 durch Restriktionsverdau mit BamH1 und Kpn1

4.5.1.4. Screening und Sequenzierung der Transformanten mit EGFP-Insert

Zum weiteren Screening wurden einige der gewachsenen Kolonien gepickt, 8h in 5ml LB^{amp}-Medium bei 37°C inkubiert und jeweils 1µl auf eine gerasterte $LB^{amp/IPTG}$-Platte übertragen. Durch das IPTG wird die Expression induziert (s. Kap. 3.10.5), wodurch Klone mit korrektem Insert aufgrund des exprimierten EGFP´s unter UV-Bestrahlung fluoreszieren sollten. Nach 24h Inkubation bei 37°C zeigten bereits viele Kolonien, auch ohne UV-Bestrahlung, eine deutliche Grünfärbung. Die Auswertung mit einem UV-Scanner (Fuji FLA-2000, 473nm, O580-Filter) zeigt dann in Abb. 333 deutlich, dass die meisten der Klone tatsächlich fluoreszierendes EGFP produzieren.

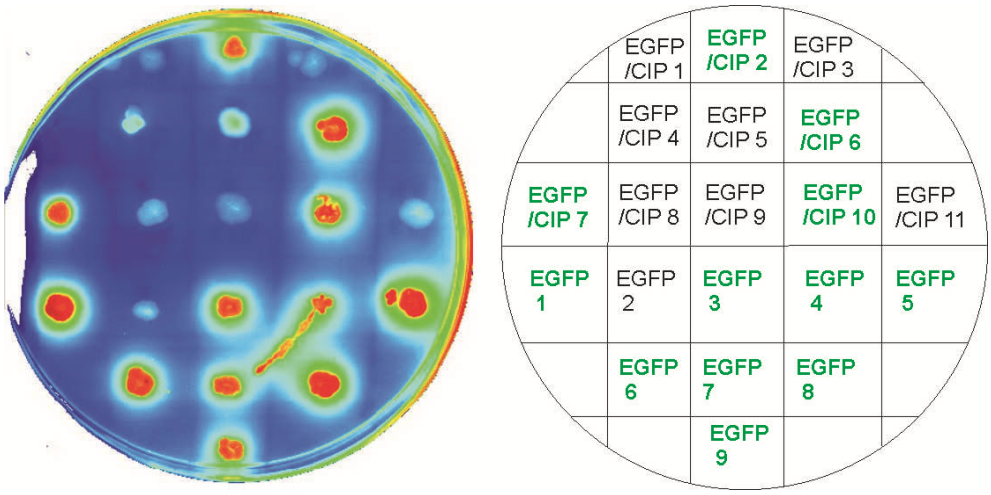


Abb. 333: UV-Falschfarbenaufnahme (UV-Scanner Fuji FLA-2000, 473nm, O580-Filter) der gerasterten LBamp/IPTG-Platte zum Screening auf EGFP-exprimerende Klone

Die Auswertung ergibt, dass die Klonierung größtenteils erfolgreich war. Circa 90% der Klone aus dem Ligationsansatz mit nicht dephosphoryliertem Vektor (EGFP1-EGFP9) sowie ca. 40% der Klone aus dem Ligationsansatz mit dephosphoryliertem Vektor (EGFP/CIP1-EGFP/CIP11) zeigten eine starke UV-Fluoreszenz, was auf ein korrekt exprimiertes EGFP schließen läßt. Desweiteren wird deutlich, dass die Dephosphorylierung mittels CIP-Enzym nicht zu einer höheren Erfolgsrate bei der Ligation führt, sondern sich eher nachteilig auswirkt.
Zum direkten Nachweis eines vorhandenen EGFP-Inserts wurden von einigen positiven (EGFP-exprimierenden) Klonen Plasmid-Micropreparationen (s. Kap. 6.7.8) durchgeführt. Dabei ergaben die einzelnen Klone folgende Ausbeuten an pQE30-EGFP Plasmiden:

pQE30-EGFP/CIP2: 4µg
pQE30-EGFP3: 4,6µg
pQE30-EGFP7: 2,5µg
pQE30-EGFP9: 5µg

Jeweils 0,5µg der einzelnen Plasmide wurden mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2), auf ein 1%iges ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (s. Kap. 6.7.3) aufgetragen und mittels eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) ausgewertet (Abb. 334). Plasmide mit EGFP-Insert müßten dabei eine Bande in der Höhe des EGFP PCR-Produkts bei ca. 750bp aufweisen.

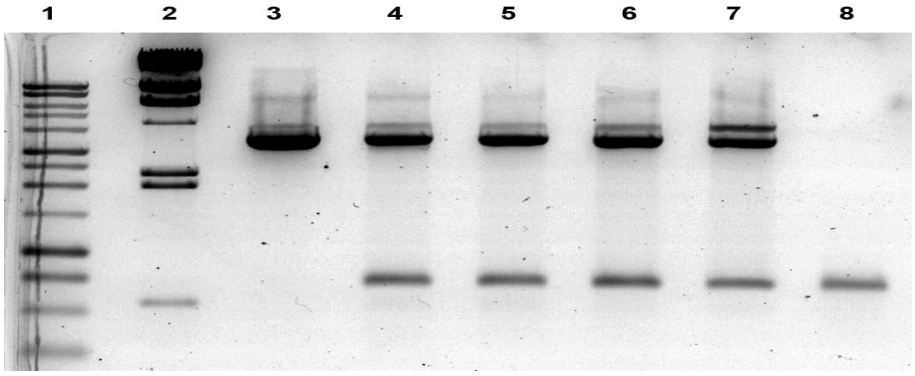


Abb. 334: Agarosegel der preparierten Plasmide zum Test auf vorhandenes EGFP-Insert
(1: 1kb-Leiter, 2: λ-Digest, 3: pQE30✂, 4: pQE30-EGFP/CIP2✂, 5: pQE30-EGFP3✂,
6: pQE30-EGFP7✂, 7: pQE30-EGFP9✂, 8: EGFP PCR-Produkt)

Die Auswertung des Gels (Abb. 334) zeigt deutlich, dass alle untersuchten Klone ein ca. 750bp langes Insert in sich tragen (die unterste Bande des λ-Digest auf Bahn 2 liegt bei 564bp, siehe Kap. 6.1.4). Diese Tatsache, zusammen mit der Beobachtung der grünen Fluoreszenz läßt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf ein korrekt kloniertes EGFP-Insert schließen.

Um entgültige Klarheit über die erfolgreiche Klonierung sowie eventuelle Mutationen zu bekommen, sollte mindestens einer der Klone sequenziert werden.
Dazu wurde von Klon pQE30-EGFP7 eine Plasmid-Midipreparation (s. Kap. 6.7.8) vorgenommen und 3µg zur Auftragssequenzierung an die Firma GATC-Biotech (Konstanz) gegeben. Als Primer kam ein Standardprimer für pQE-Vektoren (pQE-FP s. Kap. 8.1) zum Einsatz welcher am Ende der T5-Promotorsequenz des pQE30-Vektors ansetzt und somit 26 Nukleotide vor dem Startcodon liegt.
Das Chromatogramm der Sequenzierung ist auf Seite 335 zu sehen und führt zu der in Abb. 335 dargestellten Teilsequenz des EGFP-Inserts.

```
AGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA
CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGA
GGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC
CTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCA
AGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGC
CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC
ATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCA
TCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC
CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCC
AACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATG
```

Abb. 335: Teilsequenz von pQE30-EGFP im Bereich des Startcodons
(gelb: Start-Codon, grün: His-tag, dunkelblau: BamH1-Schnittstelle, hellblau: EGFP-Insert)

Die Sequenzierung zeigt eindeutig, dass das Startcodon des EGFP genau 12 Basentripletts hinter dem Startcodon des pQE30-Vektors liegt. Auch die restliche Sequenz entspricht der bekannten Sequenz des Inserts im pEGFP-N1 Plasmid (s. Kap. 8.4.6). Das einklonierte EGFP-Gen liegt somit im Leseraster des pQE30-Vektors und kann korrekt exprimiert werden.
Die Komplettsequenz des pQE30-EGFP-Vektors ergibt sich aus dem Sequenzierergebniss für das EGFP-Insert und der bereits bekannten Sequenz des pQE30-Vektors. Sie ist in Kapitel 8.4.7 dargestellt.

Für die Expression von EGFP steht somit der fehlerfreie Klon pQE30-EGFP7 (zukünftig als EGFP bezeichnet) zur Verfügung.

4.5.2. Design des pQE30-TSA43 Vektors

4.5.2.1. Sequenzierung von TSA43

Im Gegensatz zum vollständig dokumentierten pEGFP-Plasmid der Firma Clontech, welches als Template für die PCR des EGFP-Inserts diente, war die Sequenz des pTSA43-Plasmids nicht bekannt. Für das Design der Schnittstellen-modifizierten TSA43-Primer zur Amplifizierung des TSA43-Inserts ist daher eine Sequenzierung des TSA43-Insert notwendig. Als Basis für das pTSA43-Plasmid dient der T7-Expressionsvektor pET3a von New England Biolabs (Abb. 336) dessen Sequenz dokumentiert ist (s. Kap. 8.4.2).

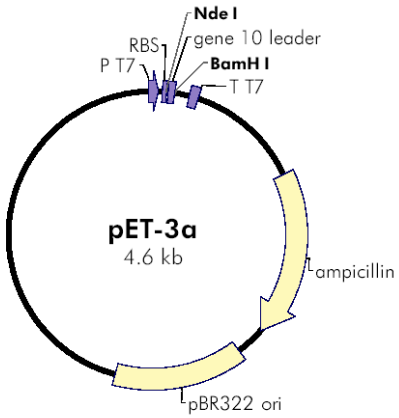


Abb. 336: Das Plasmid pET-3a der Firma New England Biolabs

In diesem Plasmid dienen eine BamH1-Schnittstelle (GGATCC) am 3´-Ende sowie eine Nde1-Schnittstelle (CATATG) am 5´-Ende zur Aufnahme eines Inserts. Das Startcodon (ATG) ist dabei bereits in der Nde1-Schnittstelle am 5´-Ende enthalten, wodurch die Gefahr einer Leserasterverschiebung minimiert wird. Der in seiner Sequenz bekannte T7-Promotor liegt 57bp vor der Nde1-Schnittstelle, wodurch der Einsatz eines T7-Standardprimers (Sequenz s. Kap. 8.1) zur Sequenzierung des Inserts möglich wird.
Das Chromatogramm der Sequenzierung, welche von der Firma GATC-Biotech (Konstanz) durchgeführt wurde, ist auf Seite 335 zu sehen und führt zu der in Abb. 337 dargestellten Gesamtsequenz der TSA43-Inserts.

```
gantnnnnntaTTTGTTTACTttaGaAGGAGATATACATATGGGCATCACCGGCACCTgGTACAACCAGCTCGGC
TCGACCTTCATCGTGACCGCGGGCGCCGACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAG
AGCCGCTACGTCCTGACCGGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACG
GTGGCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCGGCGCCGAG
GCGAGGATCAACACCCAGTGGCCGCTGACTTCGAAGTCCACGCTGGTCGGCGACGACACCTTCACCAAGGTGTAG
CCGTCCGCCGCCTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGCCCATATGGCTAGCATGAC
TGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCG
CTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTA
TATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAGTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGC
AGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCGGTCGGACAGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATC
```

Abb. 337: Sequenz des TSA43-Inserts im Plasmid pTSA43 (gelb: Start/Stop-Codon, dunkelblau: Nde1/BamH1-Schnittstelle, hellblau: TSA43-Gen)

Die beim Design der Schnittstellen-modifizierten EGFP-Primer (s. Kap. 4.5.1.1) verwendeten Schnittstellen BamH1 (GGATCC) und Kpn1 (GGTACC) kommen innerhalb des TSA43-Inserts nicht vor. Daher können die gleichen Schnittstellen auch für das Design der modifizierten TSA43-Primer herangezogen werden.

Das Sequenzierergebniss für das TSA43-Insert ergibt zusammen mit der bereits bekannten Sequenz des pET3a-Vektors die Komplettsequenz des pTSA43-Plasmids. Sie ist in Kapitel 8.4.3 dargestellt.

4.5.2.2. Design der TSA43-Primer

Das Design der Schnittstellen-modifizierten Primer für das TSA43-Insert erfolgte analog zu den beim Design des EGFP-Inserts (Kapitel 4.5.1.1) beschriebenen Vorgaben und ist in Abb. 330 dargestellt.

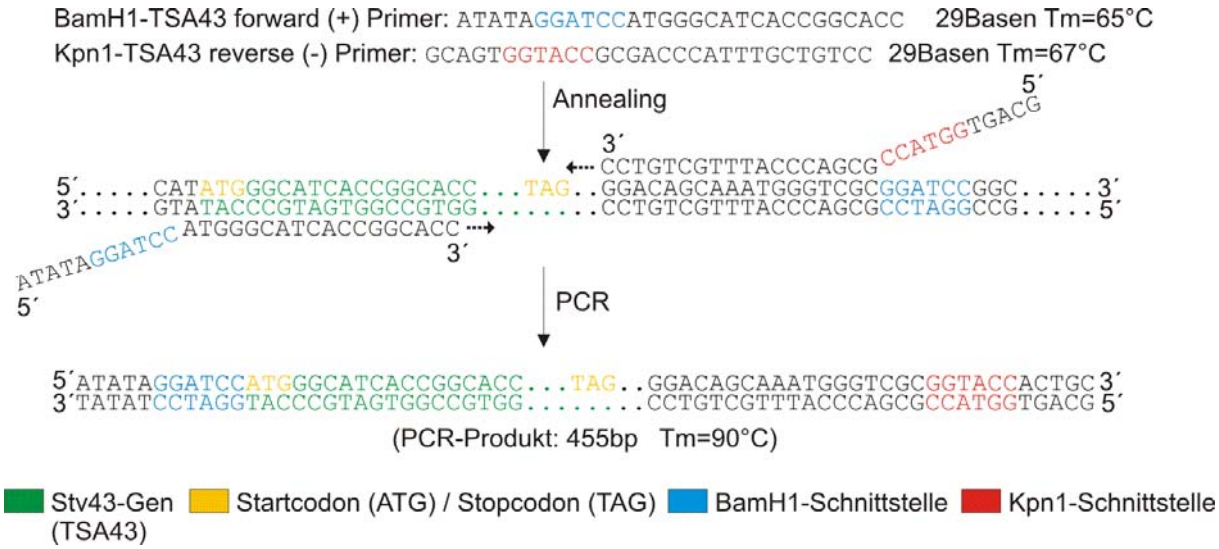


Abb. 338 Design der Schnittstellen-modifizierten Primer für die PCR des TSA43-Inserts

Die Synthese der Primer fand auf einem Expedite 8909 DNA-Synthesizer nach Standard-Protokollen im 0,2µmol-Maßstab auf Cytidin-Träger statt (s. Kapitel 6.2.1). Nach der Aufreinigung über RP-HPLC und Entsalzung über eine NAP-Säule ergaben sich folgende Konzentrationen:

BamH1-TSA43 (+): 24pmol/µl
Kpn1-TSA43 (-): 30pmol/µl

4.5.2.3. PCR des TSA43-Inserts

Die Schmelztemperatur des BamH1-TSA43 (+) Primers liegt beim ersten Annealing, aufgrund der noch nicht hybridisierenden Schnittstellen-Sequenzen, bei 56°C. In den späteren PCR-Zyklen mit hybridisierenden Schnittstellen-Sequenzen steigt die Schmelztemperatur auf 65°C an.
Der Kpn1-TSA43 (-) Primer weist beim ersten Annealing eine Schmelztemperatur von 54°C auf, bei den späteren Zyklen hingegen 67°C.
Die Schmelztemperatur des Schnittstellen-modifizierten TSA43-PCR-Produkts beträgt 90°C.
Da diese Werte ziemlich genau mit den Daten der EGFP-Primer sowie des EGFP-PCR-Produkts übereinstimmen, wurde für die PCR das gleiche Temperaturprogramm wie in Kapitel 4.5.1.2 verwendet.

Auch die Elongationszeit betrug, analog zur PCR des EGFP-Insert, eine Minute, obwohl aufgrund des nur 455 Nukleotide langen TSA43-PCR-Produkts eine Verkürzung der Zeit möglich gewesen wäre.
Zur Ermittlung der idealen Primerkonzentration für spätere PCR-Läufe, wurden mehrere PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen von Primer zu Template (pTSA43) gefahren.

Konzentrationen:

- Taq-Polymerase: 5U/µl
- dNTP-Mix: 10mM
- Template (pTSA43): 10ng/µl
- BamH1-TSA43 (+): 24pmol/µl
- Kpn1-TSA43 (-): 30pmol/µl

PCR-Ansatz:

- 2,5µl 10xPCR-Puffer (50mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$)
- 0,5µl dNTP-Mix (200µM)
- 0,4µl (10pmol) bzw. 2µl (50pmol)BamH1-TSA43 (+)
- 0,35µl (10pmol) bzw. 1,7µl (50pmol) Kpn1-TSA43 (-)
- 1ng (0,1µl) bzw. 5ng (0,5µl) bzw. 20ng (2µl) Template (pTSA43)

→ mit Wasser auf 25µl auffüllen

Temperaturprogramm:

1x:

- 5min bei 94°C
  → 1U Taq-Polymerase nach 2min
- 0,5min bei 50°C
- 1min bei 72°C

35x:

- 0,5min bei 94°C
- 0,5min bei 55°C
- 1min bei 72°C

→ 10min bei 72°C → 4°C

Tab. 7: PCR-Ansatz und Temperaturprogramm zur Amplifikation des TSA43-Inserts

Nach Abschluß der PCR wurden jeweils 2µl der einzelnen Ansätze entnommen und eine Gelelektrophorese mit einem 1%igen, ethidiumbromidhaltigem Agarosegel (s. Kap. 6.7.3) duchgeführt. Zur Auswertung wurde das Gel mit einem UV-Scanner (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) eingescannt (Abb. 339).

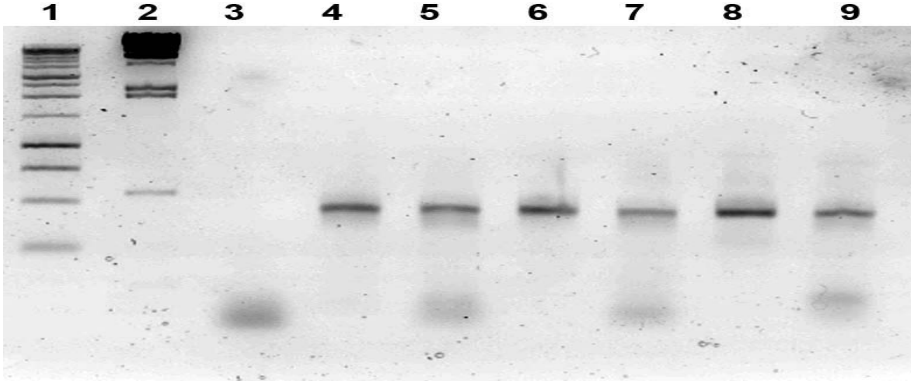


Abb. 339: Agarosegel der PCR zur Amplifizierung des TSA43-Inserts (2µl PCR-Ansatz)
(1: 1kb-Leiter, 2: λ-Digest, 3: 50pmol Primer (ohne Template), 4: 10pmol Primer / 1ng Template, 5: 50pmol Primer / 1ng Template, 6: 10pmol Primer / 5ng Template, 7: 50pmol Primer / 5ng Template, 8: 10pmol Primer / 20ng Template, 9: 50pmol Primer / 20ng Template)

Sämtliche PCR-Ansätze waren erfolgreich und zeigen in Abb. 339 eine scharfe Bande des TSA43-PCR-Produkts bei ca. 450bp (die unterste Bande des λ-Digest auf Bahn 2 liegt bei 564bp, siehe Kap. 6.1.4). Dies bedeutet, dass bereits 1ng Template bei einer Primermenge von 10pmol für die PCR eines Plasmid-Templates ausreichend sind.

4.5.2.4. Klonierung des TSA43-Inserts

Die Vorgehensweise zur Klonierung des TSA43-Inserts entspricht im Wesentlichen der in Abb. 332 dargestellten Vorgehensweise zur Klonierung des EGFP-Inserts und ist ausschnittsweise in Abb. 340 dargestellt. Zur Aufreinigung wurden die einzelnen PCR-Ansätze zusammengegeben und das PCR-Produkt über eine Spin-Column (s. Kap. 6.7.4) von den restlichen Pufferbestandteilen abgetrennt. Das BamH1/Kpn1 Schnittstellen-modifizierte TSA43-Insert wurde daraufhin mit BamH1 und Kpn1 verdaut (✂) (s. Kap. 6.7.2), die End-Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt und das geschnittene TSA43-Insert mittels Gelextraktion extrahiert (s. Kap. 6.7.4). Dabei ergab sich eine Konzentration an BamH1/Kpn1-geschnittenem TSA43-Insert von 0,003µg/µl (0,15µg). Diese Ausbeute ist zwar sehr gering, sollte allerdings für eine Ligation mehr als ausreichen.

Der BamH1/Kpn1-geschnittene Zielvektor pQE30 lag noch in einer Konzentration von 0,046µg/µl aus dem letzten Verdau zur Klonierung des EGFP-Inserts vor. Auf eine Dephosphorylierung mittels CIP-Enzym wurde in diesem Fall verzichtet.

Die Ligation (↺) mittels T4 DNA-Ligase (s. Kap. 6.7.3) fand mit einem 5fachen molaren Überschuss des TSA43-Inserts gegenüber dem geschnittenen pQE30 Vektor statt.

Bei 40ng (0,9µl) des geschnittenen pQE30 Vektors sind dies 26,5ng bzw. 8,8µl des verdauten PCR-Produkts.

Konzentrationen:	Ligations-Ansatz:
• T4 DNA-Ligase: 1U/µl • TSA43 ✂BamH1/Kpn1: 3ng/µl • pQE30 ✂BamH1/Kpn1: 46ng/µl	• 5µl 10x Ligations-Puffer • 0,9µl pQE30 ✂BamH1/Kpn1 • 8,8µl TSA43 ✂BamH1/Kpn1 • 1µl (1U) T4-Ligase → mit Wasser auf 50µl auffüllen → 16h bei 16°C

Tab. 8: Ligationsansätze (↺) für pQE30-TSA43

Jeweils 10µl der Ligationsansätze wurden in kompetente E. coli des Stammes DH5α transformiert (s. Kap. 6.7.1) und die Transformationsansätze (100µl) zur Selektion auf LB^{amp}-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C ergab sich folgendes Wachstumsmuster:

Blindprobe (DH5α ohne DNA-Zugabe) → kein Wachstum
DH5α transf. mit pQE30 ✂ BamH1/Kpn1 ↺ TSA43 ✂ BamH1/Kpn1 → ca. 15 Kolonien

Alle gewachsenen Bakterienkolonien tragen eine Ampicillin-Resistenz durch den pQE30-Vektor. Ob der Vektor allerdings auch ein TSA43-Insert enthält kann erst durch eine

Plasmidpreparation mit anschließendem BamH1/Kpn1-Restriktionsverdau ermittelt werden. Ein Screening mittels UV-Absorption ist nicht möglich, da das exprimierte dimere Streptavidin (Stv43) im Gegensatz zu EGFP nicht fluoreszent ist.

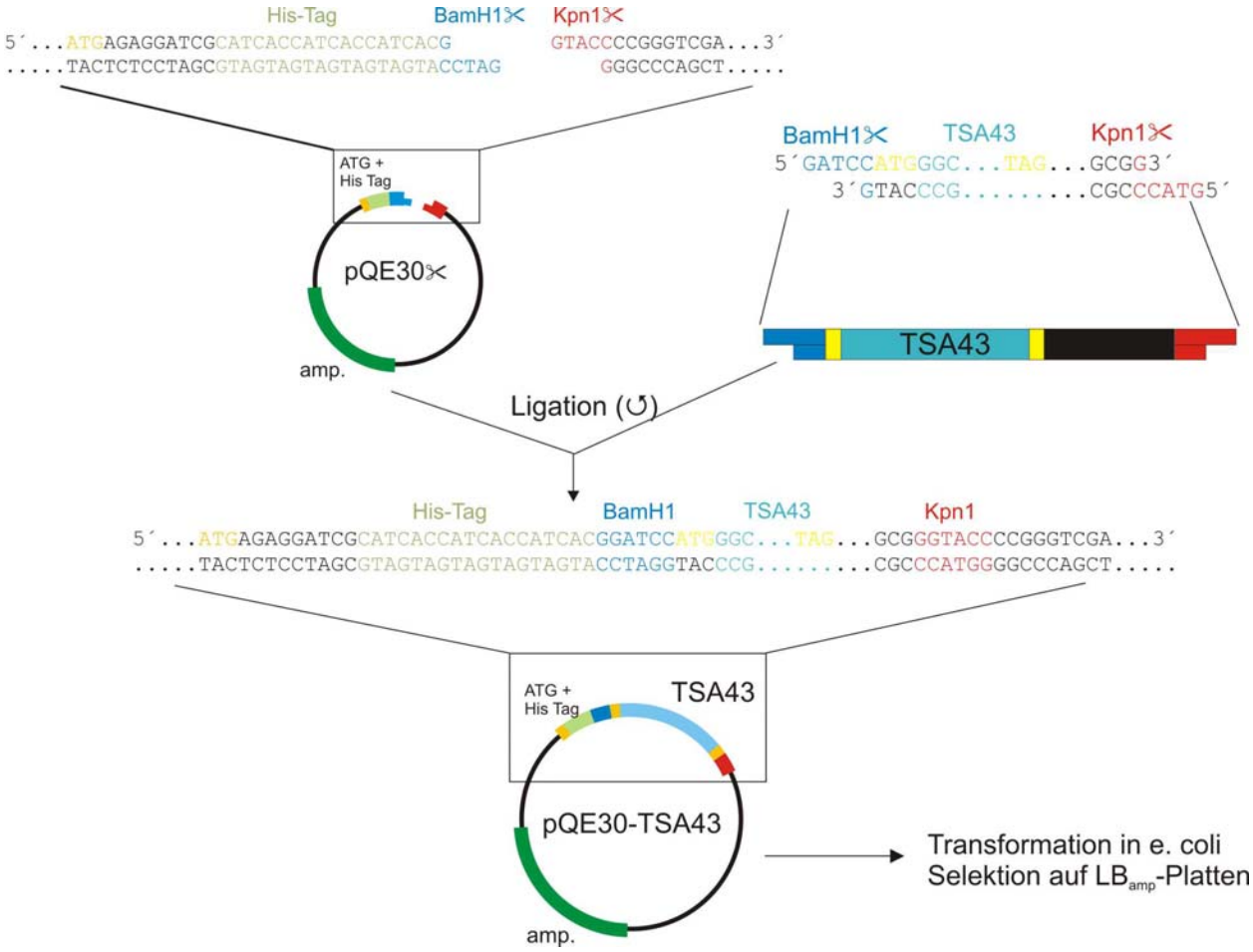


Abb. 340: Klonierung des mit BamH1 und Kpn1 verdauten TSA43-PCR-Produkts in pQE30

4.5.2.5. Screening und Sequenzierung der Transformanten

Für den Test auf vorhandene TSA43-Inserts wurde von zwei Klonen eine Plasmid-Minipreparation (s. Kap. 6.7.8) durchgeführt, die zu folgenden Ausbeuten an Plasmid-DNA führte:

pQE30-TSA43K1: 25µg
pQE30-TSA43K2: 15µg

Jeweils 0,5µg der beiden Plasmide wurden mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2), auf ein 1%iges ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (s. Kap. 6.7.3) aufgetragen und mittels eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) ausgewertet (Abb. 341). Plasmide mit TSA43-Insert müßten dabei eine Bande bei ca. 450bp aufweisen.

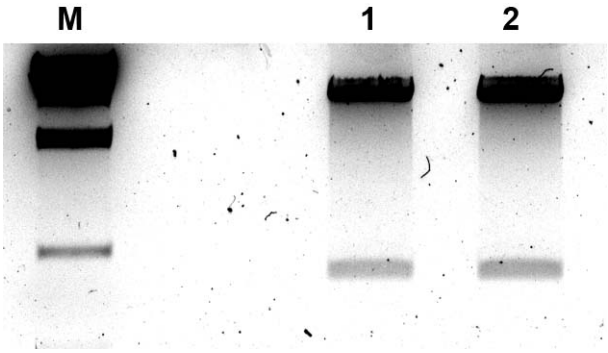


Abb. 341: Agarosegel der preparierten Plasmide zum Test auf vorhandenes TSA43-Insert (M: λ-Digest, 1: pQE30-TSA43K1✂, 2: pQE30-TSA43K2✂)

Dabei zeigt sich in Abb. 341, dass beide Klone tatsächlich ein ca. 450bp langes Insert in sich tragen. Auskunft darüber, ob das Insert allerdings auch im richtigen Leseraster sitzt, kann jedoch nur eine Sequenzierung geben. Deshalb wurden 3µg Plasmid-DNA des Klons pQE30-TSA43K1 zur Auftragssequenzierung an die Firma GATC-Biotech (Konstanz) gegeben. Als Primer kam der pQE-FP-Standardprimer zum Einsatz.
Das Chromatogramm der Sequenzierung ist auf Seite 337 zu sehen und führt zu der in Abb. 342 dargestellten Komplettsequenz des TSA43-Inserts.

TAGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATGGGCATCACCGGCACCTGGTACAA
CCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGCGCCGACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGG
CAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACCGGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCT
CGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCGG
CGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCCGCTGACTTCGAAGTCCACGCTGGTCGGCGACGACACCTTCAC
CAAGGTGTAGCCGTCCGCCGCCTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGCCCATATGG
CTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCT
TGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCG
GGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAA
AAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTCAGTCAGTTG

Abb. 342: Komplettsequenz von pQE30-TSA43 (gelb: Start/Stop-Codon, grün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellblau: TSA43-Insert)

Wie man am Sequenzierergebnis in Abb. 342 sehen kann, liegt das Startcodon des TSA43 genau 12 Basentripletts hinter dem Startcodon des pQE30-Vektors. Die restliche Sequenz stimmt ebenfalls mit der Sequenz des Inserts im pTSA43 Plasmid (s. Kap.4.5.2.1) überein. Das einklonierte TSA43-Gen liegt somit im Leseraster des pQE30-Vektors und kann korrekt exprimiert werden.
Das Sequenzierergebnis des TSA43-Inserts liefert, zusammen mit der bereits bekannten Sequenz des pQE30-Plasmids, die Komplettsequenz des pQE30-TSA43-Vektors. Sie ist in Kapitel 8.4.4 dargestellt.

Für die Expression von dimerem Streptavidin (Stv43) steht somit der fehlerfreie Klon pQE30-TSA43K1 (zukünftig als TSA43 bezeichnet) zur Verfügung.

4.5.3. Design der pQE30-PenEGFP und pQE30-PenTSA43 Vektoren

4.5.3.1. Codon-Optimierung der Penetratin-Sequenz

Durch Basentripletts (Codons) ist die Codierung von $4^3 = 64$ Aminosäuren möglich. Da es jedoch nur 20 natürliche Aminosäuren gibt, werden viele Aminosäuren durch verschiedene Basentripletts codiert. Der universelle genetische Code ist somit überbestimmt oder degeneriert.
Dies führt dazu, dass verschiedene Spezies aufgrund unterschiedlicher interner tRNA-Zusammensetzungen bestimmte Codons bevorzugen, während die tRNA für andere Codons nicht oder in nur sehr geringer Konzentration vorkommt.
So kann zum Beispiel die Aminosäure Prolin durch die Codons CCU, CCC, CCA und CCG codiert werden. Im Genom von E. coli K12 kommt auf 1000 Basen das Prolin-Codon CCG durchschnittlich 27x vor, wärend das Prolin-Codon CCC nur ca 6x vorkommt. Im Humangenom dagegen kommt das bei E. coli häufig verwendete Prolin-Codon CCG nur 7x vor während das in E.coli selten verwendete Prolin-Codon CCC dagegen 20x vorkommt.
Diese unterschiedliche Codon-Nutzung („Codon Usage“) spielt auch eine gewisse Rolle in der Regulation der Proteinbiosynthese, da selten verwendete Codons die Translation bremsen, während häufig genutzte Codons zu einer Beschleunigung der Translation führen.

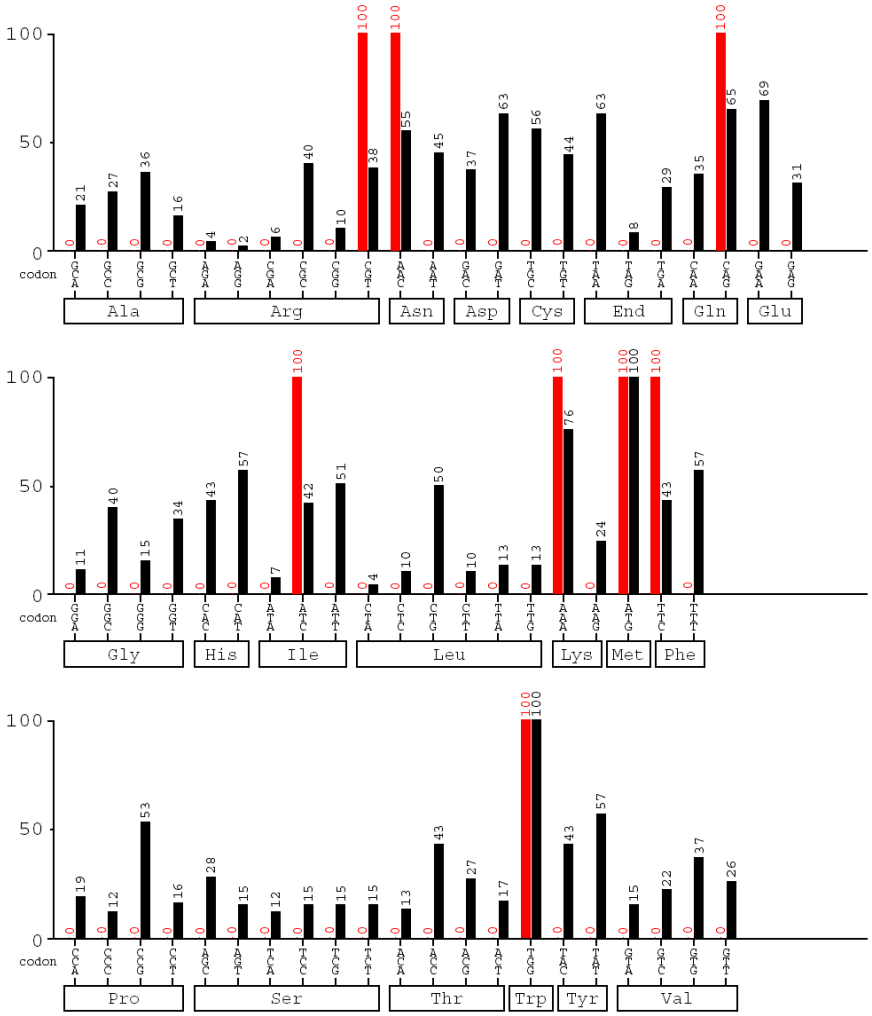


Abb. 343: Codon-Tabelle von E.coli K12 (Häufigkeit der Codon-Nutzung)
rot: im Penetratin vorkommende Aminosäuren

Bei der rekombinanten Herstellung ist es daher sinnvoll, ein kloniertes Gen durch stille Mutationen soweit wie möglich dem Codongebrauch der Wirtszelle anzupassen, was bei größeren Genen den Einsatz spezieller Software wie z.B. dem „Graphical Codon Usage Analyser (GCUA)“ der Firma Geneart notwendig macht.
Auch die codierende Basensequenz des zu klonierenden, 16 Aminosäuren langen Penetratins wurde mit diesem Programm auf eine hohe Expressionsrate in E.coli optimiert (s. Abb. 343 und Abb. 344).
Am deutlichsten kommen hier die Unterschiede der Codon-Nutzung bei Arginin (R) und Isoleucin (I) zutage (Abb. 344). Würden diese Codons beim Design der codierenden Basensequenz für das Penetratin nicht auf den Codon-Gebrauch von E. coli optimiert, so hätte dies eine deutliche Verminderung des Expressionslevels zur Folge.

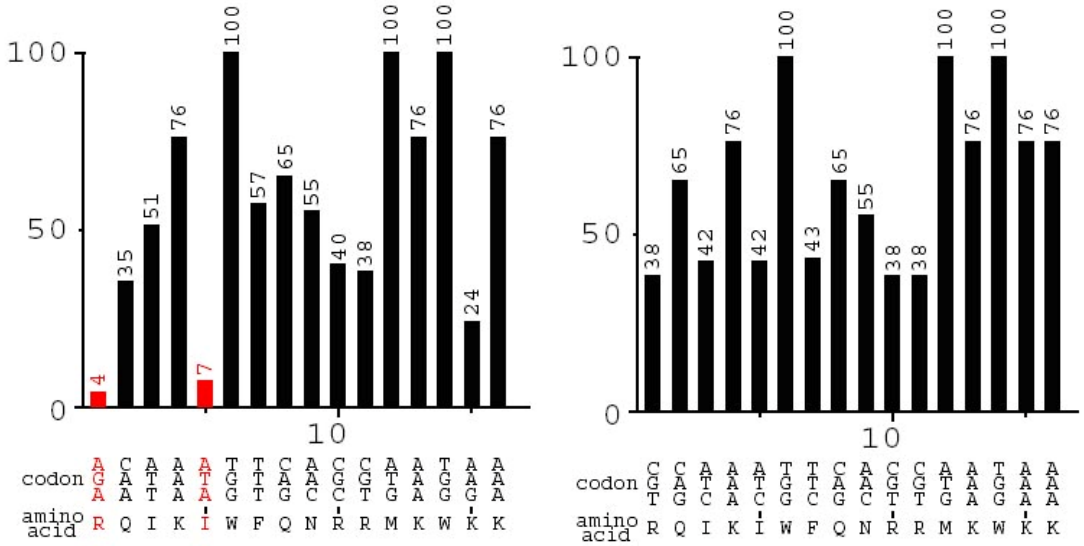


Abb. 344: ursprüngliche Penetratin-Sequenz (links) und auf den Codongebrauch von E. coli K12 optimierte Penetratin-Sequenz (rechts)

Somit ergibt sich folgende Codon-optimierte Basensequenz für die Expression von Penetratin in E. coli:

5´-CGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAACCGTCGTATGAAATGGAAAAAA-3´

4.5.3.2. Design der Penetratin-modifizierten Primer

Für das Design der Primer, welche neben einer BamH1-Schnittstellensequenz (GGATCC) auch die Basensequenz des Penetratins enthalten sollen (Abb. 345 und Abb. 346), wurde die Codon-optimierte 48 Nukleotide lange Penetratin-Sequenz in einer neuen Oligonukleotid-Synthese zwischen die BamH1-Schnittstelle und dem hybridisierenden Bereich der ansonsten unveränderten BamH1-EGFP (+) bzw. BamH1-TSA43 (+) Primer eingebaut. Durch den Einbau der Penetratin-Sequenz ergibt sich keine Leserasterverschiebung, da die 48 Nukleotide für insgesamt 16 Aminosäuren codieren.

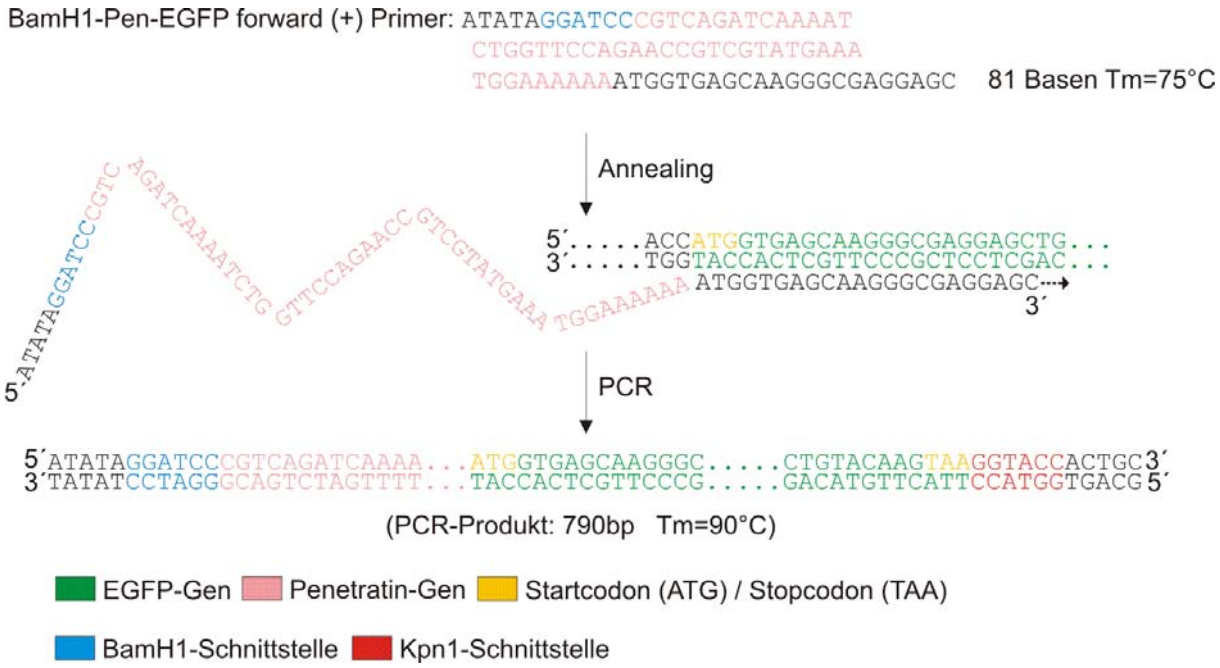


Abb. 345: Primerdesign zur Gewinnung des Penetratin-modifizierten EGFP-Inserts durch PCR

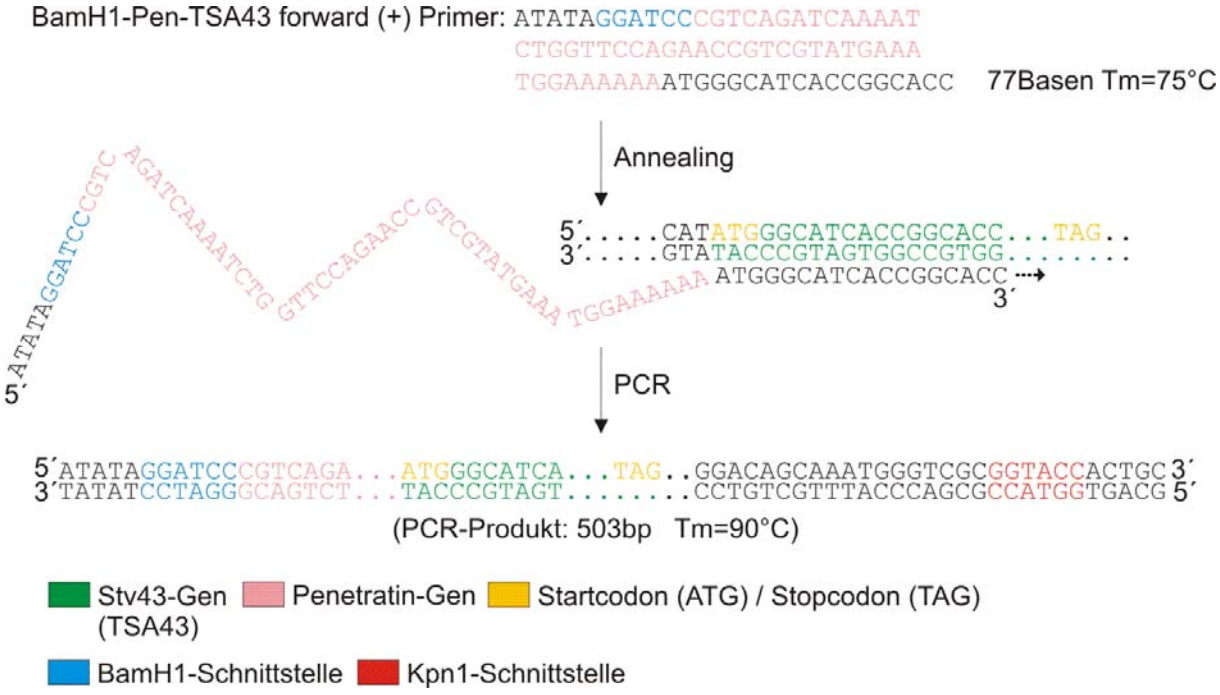


Abb. 346: Primerdesign zur Gewinnung des Penetratin-modifizierten TSA43-Inserts durch PCR

Die Synthese der beiden 77 bzw 81 Nukleotide langen Primer erfolgte nach Standard-Protokollen auf Cytidin-Träger in einem Expedite 8909 DNA-Synthesizer (s. Kapitel 6.2.1). Nach Aufreinigung über RP-HPLC und Entsalzung über eine NAP-Säule ergaben sich folgende Primerkonzentrationen:

BamH1-PenEGFP (+): 10pmol/µl
BamH1-PenTSA43 (+): 10pmol/µl

4.5.3.3. PCR der Penetratin-modifizierten Inserts

Der Unterschied der Schmelztemperaturen zwischen dem ersten Annealing und dem Annealing in den späteren PCR-Zyklen ist im Falle der Penetratin-modifizierten Primer aufgrund des viel größeren, am Anfang nicht-hybridisierenden Bereiches um einiges stärker ausgeprägt als bei den früheren PCR-Ansätzen in Kap. 4.5.1.2 und 4.5.2.3.
So liegt die Schmelztemperatur des BamH1-PenEGFP (+) Primers im ersten Zyklus bei 63°C, um bei den späteren Zyklen auf 75°C anzusteigen. Auch die Schmelztemperatur des BamH1-PenTSA43 (+) Primers steigt von 56°C im ersten Zyklus auf 75°C in den späteren Zyklen. Die Schmelztemperatur der Penetratin-modifizierten PCR-Produkte liegt in beiden Fällen bei 90°C. Als reverse (-) Primer kamen die in den Kapiteln 4.5.1 und 4.5.2 verwendeten Primer Kpn1-EGFP (-) bzw. Kpn1-TSA43 (-) zum Einsatz, während die Plasmide pQE30-EGFP bzw. pQE30-TSA43 das Template bildeten.
Mit beiden Templates wurden jeweils zwei PCR-Ansätze gefahren, wobei das bewährte Temperaturprogramm der früheren Läufe aus Kapitel 4.5.2 verwendet wurde. Auch die Template- und Primermengen basieren auf den Ergebnissen früherer Läufe (Tab. 9).

Konzentrationen:

- Taq-Polymerase: 5U/µl
- dNTP-Mix: 10mM
- Template (pQE30-EGFP): 1ng/µl
- Template (pQE30-TSA43): 1ng/µl
- BamH1-PenEGFP (+): 10pmol/µl
- Kpn1-EGFP (-): 19pmol/µl
- BamH1-PenTSA43 (+): 10pmol/µl
- Kpn1-TSA43 (-): 30pmol/µl

PCR-Ansatz:

- 2,5µl 10xPCR-Puffer (50mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$)
- 0,5µl dNTP-Mix (200µM)
- 1µl (10pmol) BamH1-PenEGFP (+) bzw. BamH1-PenTSA43 (+)
- 0,5µl (10pmol) Kpn1-EGFP (-) bzw. 0,3µl (10pmol) Kpn1-TSA43 (-)
- 2ng (2µl) Template (pQE30-EGFP bzw. pQE30-TSA43)

→ mit Wasser auf 25µl auffüllen

Temperaturprogramm:

1x:
- 5min bei 94°C
  → 1U Taq-Polymerase nach 2min
- 0,5min bei 50°C
- 1min bei 72°C

35x:
- 0,5min bei 94°C
- 0,5min bei 55°C
- 1min bei 72°C

→ 10min bei 72°C → 4°C

Tab. 9: PCR-Ansatz und Temperaturprogramm zur Amplifizierung der Penetratin-modifizierten Inserts

Nach der PCR wurde aus jedem Ansatz jeweils 2µl entnommen und mit einem 1%igen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegel eine Gelelektrophorese (s. Kap. 6.7.3) duchgeführt.
Zur Auswertung wurde das Gel mit einem UV-Scanner (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) eingescannt (Abb. 347). Wie in Abb. 347 zu erkennen ist, waren beide Ansätze zur Amplifizierung des PenTSA43-PCR-Produkts (Bahn 4 und 5) erfolgreich und führen zu einer scharfen Bande bei ca. 500bp (die unterste Bande des λ-Digest auf Bahn 1 liegt bei 564bp, siehe Kap. 6.1.4). Von den beiden Ansätzen zur Amplifizierung des PenEGFP-PCR-Produkts

lieferte nur einer eine scharfe Bande bei ca. 800bp (Bahn 2), was aber für eine Klonierung mehr als ausreichend sein sollte. Der Ansatz auf Bahn 3 lieferte kein PCR-Produkt.

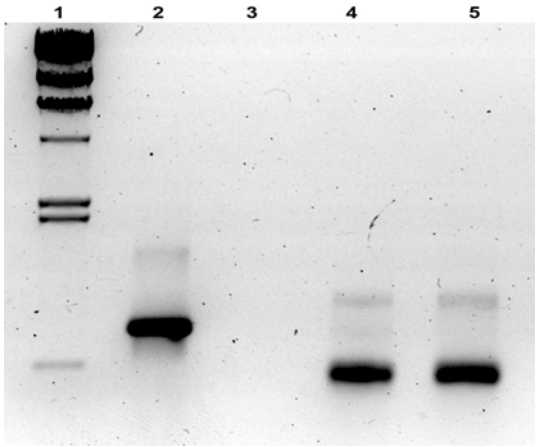


Abb. 347: Agarosegel der PCR zur Amplifizierung der Penetratin-modifizierten Inserts (2µl PCR-Ansatz) (1: λ-Digest, 2-3: PenEGFP, 4-5: PenTSA43)

4.5.3.4. Klonierung der Penetratin-modifizierten Inserts

Die Klonierung der Penetratin-modifizierten Inserts erfolgte im Wesentlichen nach der Vorgehensweise in Abb. 332 und ist in Abb. 348 im Detail dargestellt.

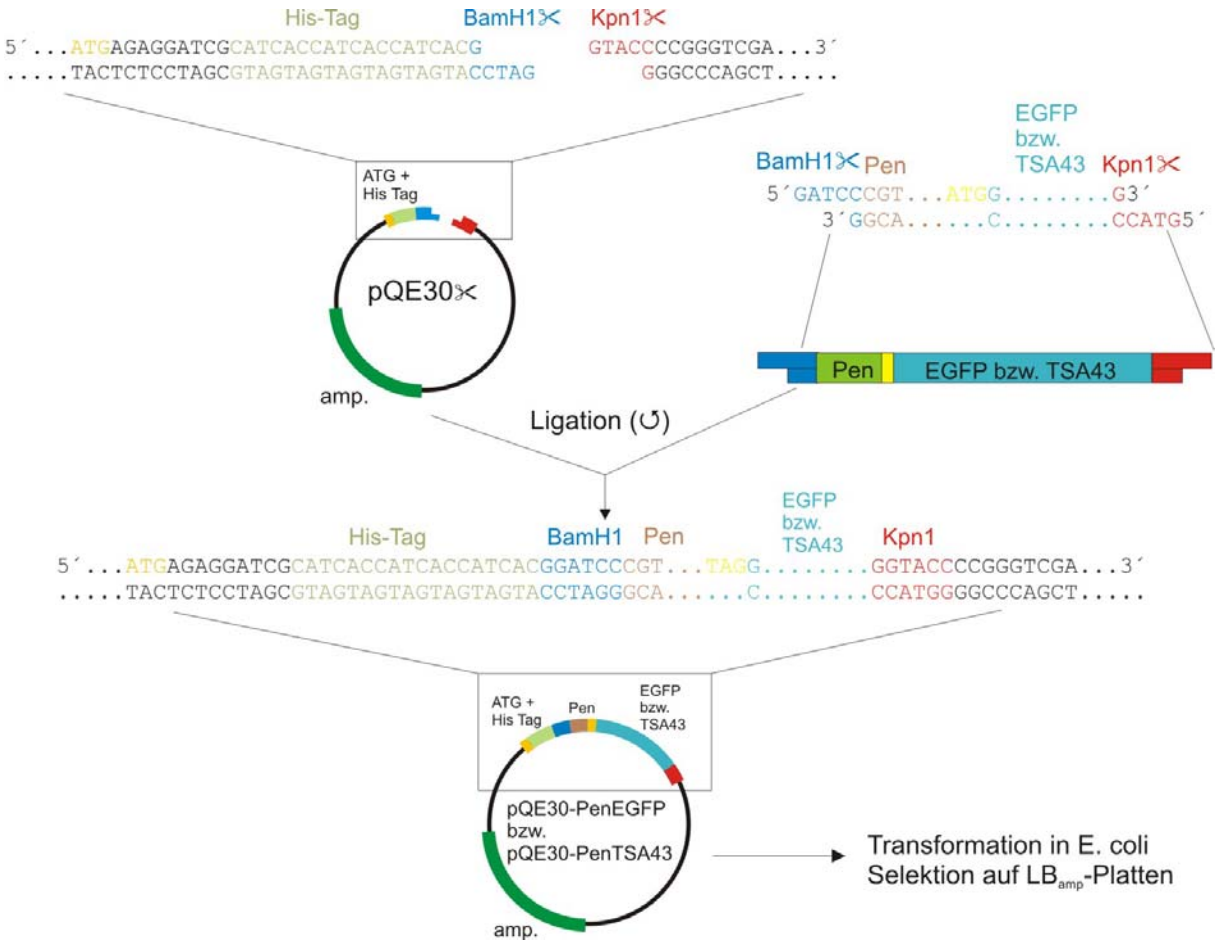


Abb. 348: Klonierung der mit BamH1 und Kpn1 verdauten Penetratin-modifizierten-Produkte in pQE30

Zur Aufreinigung wurden die beiden PCR-Ansätze des PenTSA43-Inserts vereint und, ebenso wie der PCR-Ansatz des PenEGFP-Inserts, zur Abtrennung der restlichen Pufferbestandteile über eine Spin-Column aufgereinigt. Die Inserts wurden daraufhin mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2), die End-Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt und die geschnittenen Inserts mittels Gelextraktion extrahiert (s. Kap. 6.7.4). Dabei ergab sich eine Konzentration an BamH1/Kpn1-geschnittenen, Penetratin-modifizierten Inserts von 0,013µg/µl im Falle von PenEGFP sowie 0,008µg/µl im Falle von PenTSA43. Der BamH1/Kpn1-geschnittene Zielvektor pQE30-lag noch in einer Konzentration von 0,046µg/µl vor.
Die Ligation (↻) mittels T4 DNA-Ligase (s. Kap. 6.7.3) fand mit einem 5fachen molaren Überschuss der Penetratin-modifizierten Inserts gegenüber dem geschnittenen pQE30 Vektor statt. Bei 40ng (0,9µl) des geschnittenen pQE30 Vektors sind dies 41ng (3,2µl) des verdauten PenEGFP-PCR-Produkts bzw. 30ng (3,8µl) des verdauten PenTSA43-PCR-Produkts (Tab. 10)

Konzentrationen:

- T4 DNA-Ligase: 1U/µl
- PenEGFP ✂BamH1/Kpn1: 13ng/µl
- PenTSA43 ✂BamH1/Kpn1: 8ng/µl
- pQE30 ✂BamH1/Kpn1: 46ng/µl

Ligations-Ansatz:

- 5µl 10x Ligations-Puffer
- 0,9µl pQE30 ✂BamH1/Kpn1
- 3,2µl PenEGFP ✂BamH1/Kpn1
  bzw.
- 3,8µl PenTSA43 ✂BamH1/Kpn1
- 1µl (1U) T4-Ligase

→ mit Wasser auf 50µl auffüllen
→ 16h bei 16°C

Tab. 10: Ligationsansätze (↻) für pQE30-PenEGFP bzw. pQE30-PenTSA43

Jeweils 10µl der Ligationsansätze wurden in kompetente E. coli des Stammes DH5α transformiert (s. Kap. 6.7.1) und die Transformationsansätze (100µl) zur Selektion auf LB^{amp}-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C ergab sich fogendes Wachstumsmuster:

Blindprobe (DH5α ohne DNA-Zugabe) → kein Wachstum
DH5α transf. mit pQE30 ✂BamH1/Kpn1 ↻ PenEGFP ✂BamH1/Kpn1 → 12 Kolonien
DH5α transf. mit pQE30 ✂BamH1/Kpn1 ↻ PenTSA43 ✂BamH1/Kpn1 → 7 Kolonien

Alle gewachsenen Bakterienkolonien tragen eine Ampicillin-Resistenz durch den pQE30-Vektor. Das Vorhandensein eines Inserts kann allerdings erst durch eine Plasmidpreparation mit anschließendem BamH1/Kpn1-Restriktionsverdau ermittelt werden. Ein Screening mittels UV-Absorption sollte im Falle von PenEGFP ebenfalls möglich sein.

4.5.3.5. Screening und Sequenzierung der Transformanten

Für den Test auf vorhandene PenEGFP bzw. PenTSA43-Inserts wurden jeweils 3 Klone der beiden Transformationsansätze gepickt und Plasmid-Micropreparationen (s. Kap. 6.7.8) durchgeführt. Dies führte zu folgenden Ausbeuten an Plasmid-DNA:

pQE30-PenEGFP(a): 5,5µg
pQE30-PenEGFP(b): 4,2µg
pQE30-PenEGFP(c): 6,7µg

pQE30-PenTSA43(a): 2,4µg
pQE30-PenTSA43(b): 2µg
pQE30-PenTSA43(c): 2,4µg

Jeweils 0,5µg der preparierten Plasmide wurden mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2), auf ein 1%iges ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (s. Kap. 6.7.3) aufgetragen und das Gel mittels eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) ausgewertet (Abb. 349). Plasmide mit PenEGFP-Insert müßten dabei eine Bande bei ca. 800bp, Plasmide mit PenTSA43-Insert eine Bande bei ca 500bp aufweisen.

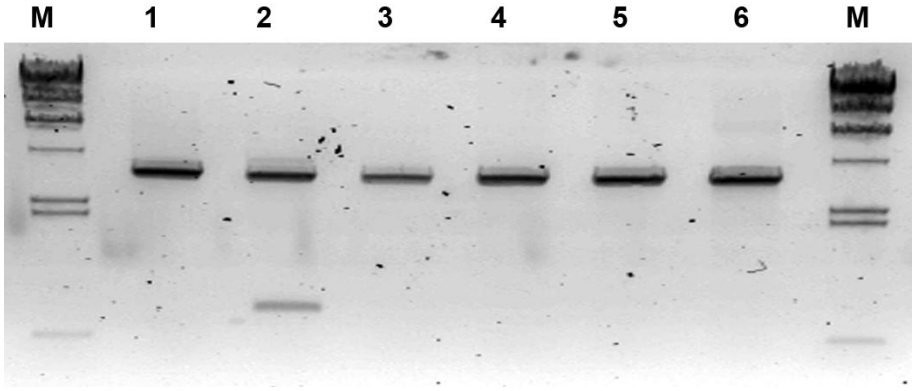


Abb. 349: Agarosegel (I) zum Test der Klone auf vorhandene PenEGFP bzw. PenTSA43-Inserts (M: λ-Digest, 1-3: pQE30-PenEGFP(a-c)✂, 4-6: pQE30-PenTSA43(a-c)✂)

Als einziger Klon weist pQE30-PenEGFP(b) auf Bahn 2 in Abb. 349 ein Insert auf. Bei sämtlichen anderen Klonen müssen die geschnittenen pQE30-Vektoren selbst ligiert sein und blieben leer. Da abzusehen ist, dass die Anzahl rekombinanter Klone mit vorhandenem Insert eher gering ausfällt, wurde eine größere Anzahl weiterer Klone gepickt und Micropreparationen durchgeführt.

pQE30-PenEGFP(d): 4µg
pQE30-PenEGFP(e): 2,7µg
pQE30-PenEGFP(f): 2,3µg
pQE30-PenEGFP(g): 3,2µg
pQE30-PenEGFP(h): 1,3µg
pQE30-PenEGFP(i): 1,3µg
pQE30-PenEGFP(k): 1,9µg
pQE30-PenEGFP(l): 2,2µg

pQE30-PenTSA43(d): 5,9µg
pQE30-PenTSA43(e): 2,3µg
pQE30-PenTSA43(f): 2,7µg
pQE30-PenTSA43(g): 2,3µg
pQE30-PenTSA43(h): 1µg
pQE30-PenTSA43(i): 2,7µg
pQE30-PenTSA43(k): 1,6µg
pQE30-PenTSA43(l): 1,7µg
pQE30-PenTSA43(m): 3,3µg
pQE30-PenTSA43(n): 4,5µg
pQE30-PenTSA43(o): 3,6µg
pQE30-PenTSA43(p): 3,5µg
pQE30-PenTSA43(q): 5,3µg
pQE30-PenTSA43(r): 4,3µg
pQE30-PenTSA43(s): 4,5µg
pQE30-PenTSA43(t): 7,2µg

Auch von diesen Plasmiden wurden wiederum jeweils 0,5µg mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2), eine Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 6.7.3) durchgeführt und die Gele mittels eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) ausgewertet (Abb. 350 bis Abb. 352).

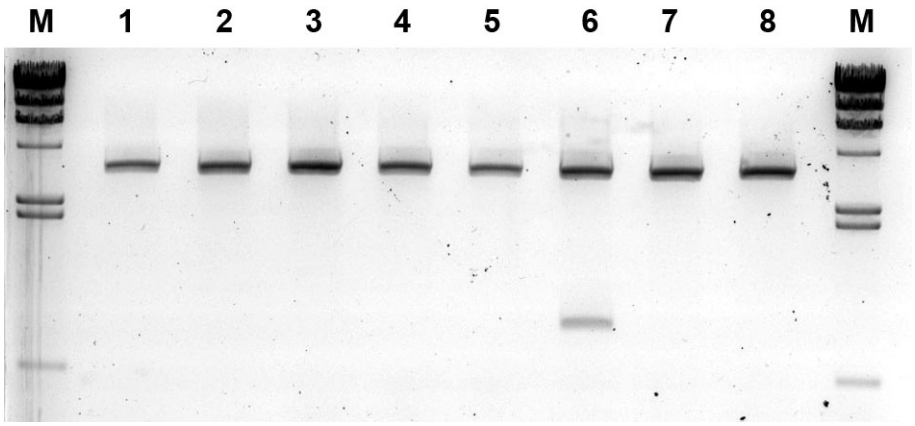


Abb. 350: Agarosegel (II) zum Test der Klone auf vorhandene EGFP bzw. TSA43-Inserts
(M: λ-Digest, 1-4: pQE30-PenTSA43(d-g)✂, 5-8: pQE30-PenEGFP(d-g)✂)

Im 2. Agarosegel (Abb. 350) weist lediglich Klon pQE30-PenEGFP(e) auf Bahn 6 ein PenEGFP-Insert auf.

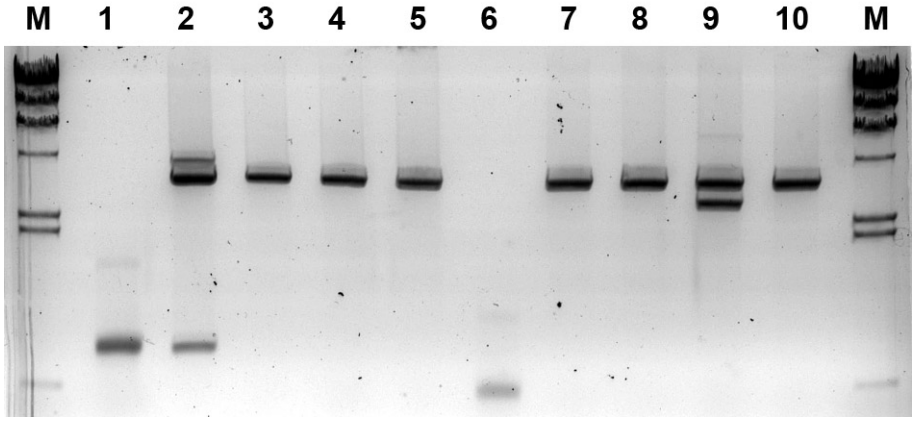


Abb. 351: Agarosegel (III) zum Test der Klone auf vorhandene EGFP bzw. TSA43-Inserts
(M: λ-Digest, 1: PenEGFP-PCR-Produkt, 2-5: pQE30-PenEGFP(h-l)✂,
6: Pen-TSA43-PCR-Produkt, 7-10: pQE30-PenTSA43(h-l)✂)

Das 3. Agarosegel (Abb. 351) zeigt mit pQE30-PenEGFP(h) auf Bahn 2 ebenfalls nur einen positiven Klon.

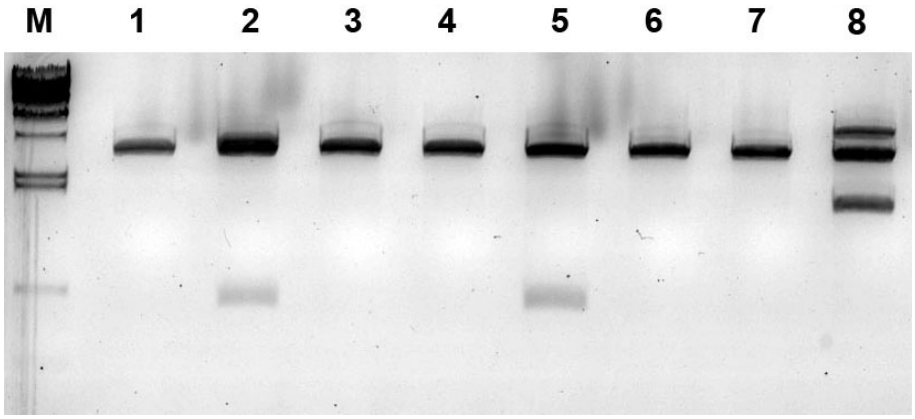


Abb. 352: Agarosegel (IV) zum Test der Klone auf vorhandene TSA43-Inserts
(M: λ-Digest, 1-7: pQE30-PenTSA43(m-t)✂)

Im 4. Agarosegel (Abb. 352) sind immerhin 2 Klone mit TSA43-Insert vorhanden: pQE30-PenTSA43(n) auf Bahn 2 sowie pQE30-PenTSA43(q) auf Bahn 5.

Da die vorhandenen Plasmid-Mengen für eine Sequenzierung nicht ausreichen, wurden die inserthaltigen Vektoren zur Vermehrung erneut in RbCl-kompetente E. coli des Stammes DH5α transformiert (s. Kap. 6.7.1) und zur Selektion auf LB^{amp}-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde mit jeweils einer Kolonie eine Plasmid-Minipreparation (s. Kap. 6.7.8) durchgeführt, was zu folgenden Ausbeuten führte:

pQE30-PenEGFP(b): 54µg
pQE30-PenEGFP(e): 34µg
pQE30-PenEGFP(h): ging verloren
pQE30-PenTSA43(n): 40µg
pQE30-PenTSA43(q): 48µg

Für einen direkten Vergleich vor der Sequenzierung wurden jeweils 0,5µg dieser Plasmide mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2) und direkt nebeneinander auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel (s. Kap. 6.7.3) aufgetragen (Abb. 353). Die Auswertung erfolgte mittels eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter).

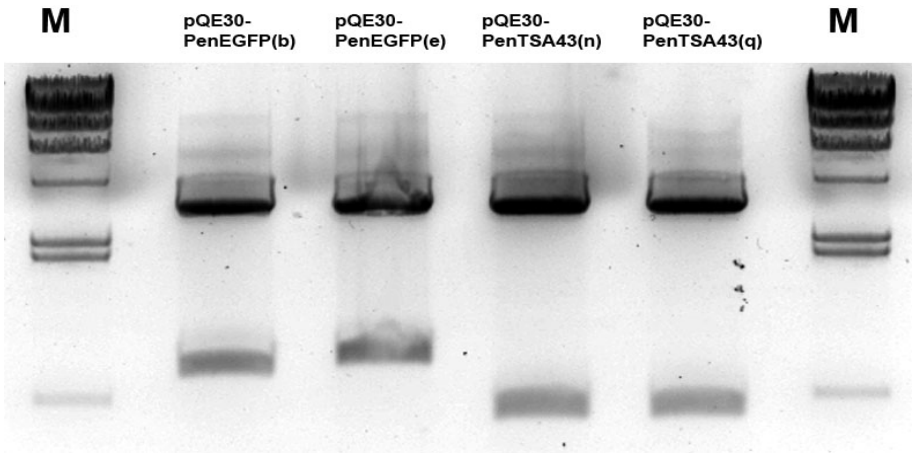


Abb. 353: Agarosegel zum direkten Vergleich der inserthaltigen Klone nach Verdau mit BamH1 und Kpn1 (M: λ-Digest)

Hier ist bereits zu erkennen, dass die beiden PenEGFP-Inserts auf Bahn 2 und 3 in Abb. 353 unterschiedliche Laufweiten und somit unterschiedliche Größen aufweisen. Dies bedeutet, dass mindestens eines von ihnen fehlerhaft sein muß.
Zur genaueren Untersuchung wurden jeweils 3µg der inserthaltigen Plasmide an die Firma GATC Biotech (Konstanz) gegeben um mit einem pQE-FP Standardprimer eine Sequenzierung durchzuführen (Abb. 354 bis Abb. 357). Als Vergleichssequenz für eine erfolgreiche Klonierung dienten die Sequenzen der selbst synthetisierten Penetratin-modifizierten Primer BamH1-PenEGFP(+) bzw. BamH1-PenTSA43(+) (s. Kap. 8.1) sowie die Sequenzen der bereits erfolgreich klonierten EGFP und TSA43-Inserts (s. Kap. 8.2).

TNAAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCGTCAGATCAAA_TCTGGTTCCAGAA
CCGTCGTATGAAATGGAAAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCCGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGA
GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT
GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGG
CGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA
CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGA
CACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGGCTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA
GTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGAT
CCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCC
CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCA

Abb. 354: Sequenzierergebnis von pQE30-PenEGFP(b)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 1x Deletion (A), 2x Austausch (T →C, A→G)

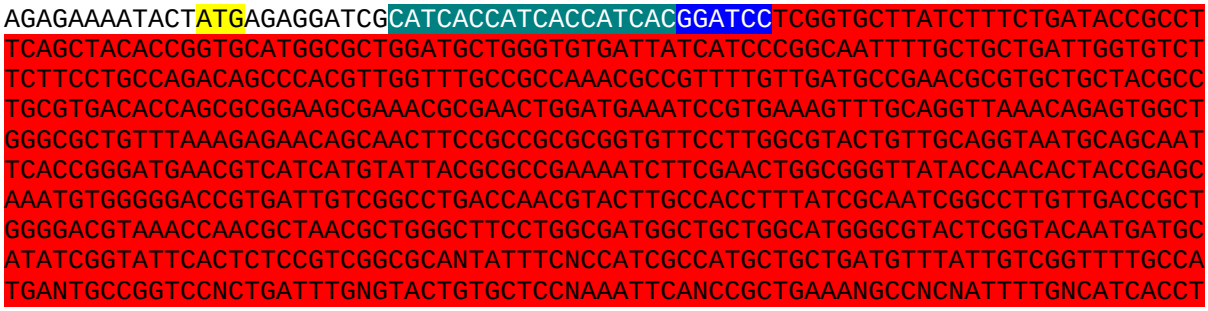


Abb. 355: Sequenzierergebnis von pQE30-PenEGFP(e)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ vollst. unbekannte Sequenz)

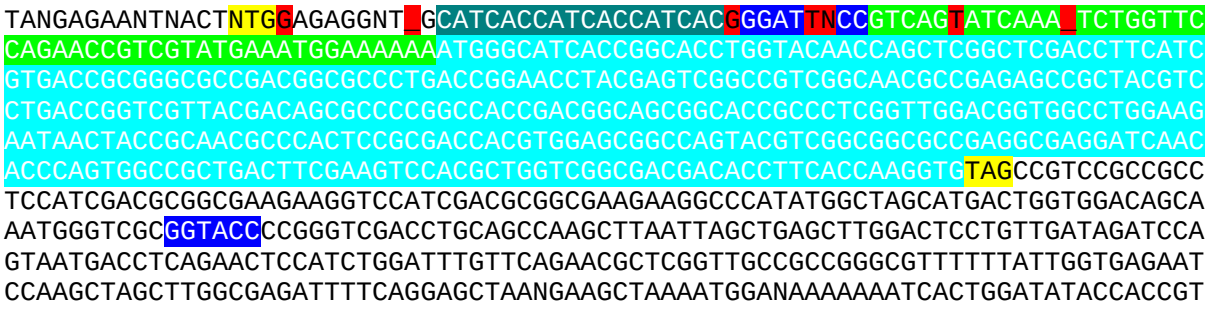


Abb. 356: Sequenzierergebnis von pQE30-PenTSA43(n)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: TSA43-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 2x Deletion (C, A), 5x zus. Base (G, G, T, N, T))



Abb. 357: Sequenzierergebnis von pQE30-PenTSA43(q)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: TSA43-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 1x Deletion (T))

Sämtliche Sequenzierungen zeigen Deletionen bzw. zusätzliche Nukleotide bereits in einem sehr frühen Bereich des Inserts, was in allen Fällen zu einer Leserasterverschiebung und somit zu einem völlig unsinnigen Expressionsprodukt führt. Im Falle von pQE30-PenEGFP(e) (Abb. 355), das bereits im Agarosegel zur Insertkontrolle (Abb. 353) eine falsche Länge aufwies, wurde sogar eine völlig unbekannte Sequenz kloniert.

4.5.3.6. Ermittlung der Fehlerquelle für die Mutationen

Da sich sämtliche leserasterverschiebenden Mutationen im Bereich der Primersequenz befinden besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Fehlerquelle in den Penetratin-modifizierten Primern selbst liegt. Eine falsche Primersequenz bei der Synthese ist allerdings eher unwahrscheinlich, da es sich um keine einheitlichen Fehler handelt.
Andererseits könnte das Problem auch darin liegen, dass die Primer nach der Oligonukleotidsynthese nur über RP-HPLC aufgereinigt wurden.

Die Trennleistung einer RP-Säule reicht nicht aus, um Sequenzen abzutrennen, in denen, z.B. aufgrund unvollständigen Cappings während der Synthese, intern ein oder mehrere Nukleotide fehlen. Gerade solche Fehlsequenzen können aber zu den beobachteten Mutationen führen.
Aus diesem Grund wurden die beiden BamH1-PenEGFP(+) und BamH1-PenTSA43(+) Primer über ein Polyacrylamid-Gel aufgereinigt (s. Kap. 6.4.6) welches auch verkürzte Sequenzen der Länge n-1 von Sequenzen mit vollständiger Länge abtrennen kann.
Nach der Extraktion ergaben sich durch UV-Vermessung (s. Kap. 6.5) folgende Primer-konzentrationen:

BamH1-PenEGFP(+): 0,7pmol/µl
BamH1-PenTSA43(+): 0,7pmol/µl

Mit den gelaufgereinigten Primern wurde wiederum wie in Kapitel 4.5.3.3 beschrieben eine PCR zur Gewinnung der Inserts durchgeführt (Tab. 11).

Konzentrationen:

- Taq-Polymerase: 5U/µl
- dNTP-Mix: 10mM
- Template (pQE30-EGFP): 1ng/µl
- Template (pQE30-TSA43): 1ng/µl
- BamH1-PenEGFP (+): 0,7pmol/µl
- Kpn1-EGFP (-): 19pmol/µl
- BamH1-PenTSA43 (+): 0,7pmol/µl
- Kpn1-TSA43 (-): 30pmol/µl

PCR-Ansatz:

- 2,5µl 10xPCR-Puffer (50mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$)
- 0,5µl dNTP-Mix (200µM)
- 14µl (10pmol) BamH1-PenEGFP (+) bzw. BamH1-PenTSA43 (+)
- 0,5µl (10pmol) Kpn1-EGFP (-) bzw. 0,3µl (10pmol) Kpn1-TSA43 (-)
- 3ng (3µl) Template (pQE30-EGFP bzw. pQE30-TSA43)

→ mit Wasser auf 25µl auffüllen

Temperaturprogramm:

1x:
- 5min bei 94°C
  → 1U Taq-Polymerase nach 2min
- 0,5min bei 50°C
- 1min bei 72°C

35x:
- 0,5min bei 94°C
- 0,5min bei 55°C
- 1min bei 72°C

→ 10min bei 72°C → 4°C

Tab. 11: PCR-Ansatz und Temperaturprogramm zur Amplifikation der Penetratin-modifizierten Inserts

Nach der PCR wurden jeweils 2µl der Ansätze entnommen und mit einem einprozentigen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegel eine Gelelektrophorese (s. Kap. 6.7.3) duchgeführt.
Zur Auswertung wurde das Gel mit einem UV-Scanner (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) eingescannt (Abb. 358), wobei sich, wie erwartet, im Falle von PenEGFP eine Bande des PCR-Produkts bei ca. 800bp und im Falle von PenTSA43 bei ca. 500bp ergab.

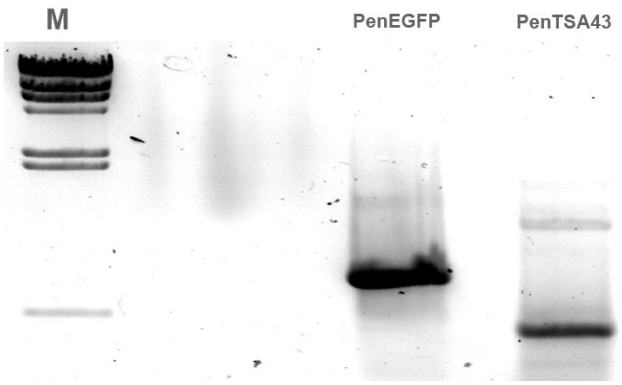


Abb. 358: Agarosegel der PCR-Produkte mit gelaufgereinigten Penetratin-Primern (M: λ-Digest)

Die beiden PCR-Ansätze wurden zur Abtrennung der restlichen Pufferbestandteile über eine Spin-Column (s. Kap. 6.7.4) aufgereinigt, mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2), die End-Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt und die geschnittenen Inserts mittels Gelextraktion extrahiert (s. Kap. 6.7.4). Dabei ergaben sich Konzentrationen an BamH1/Kpn1-geschnittenen, Penetratin-modifizierten Inserts von 0,012µg/µl im Falle von PenEGFP sowie 0,0045µg/µl im Falle von PenTSA43.

Die Ligation (↻) mittels T4 DNA-Ligase (s. Kap. 6.7.3) fand mit einem 5fachen molaren Überschuss der Penetratin-modifizierten Inserts gegenüber dem geschnittenen pQE30 Vektor statt (Tab. 12).

Konzentrationen:

- T4 DNA-Ligase: 1U/µl
- PenEGFP ✂BamH1/Kpn1: 12ng/µl
- PenTSA43 ✂BamH1/Kpn1: 4,5ng/µl
- pQE30 ✂BamH1/Kpn1: 46ng/µl

Ligations-Ansatz:

- 5µl 10x Ligations-Puffer
- 0,9µl pQE30 ✂BamH1/Kpn1
- 3,4µl PenEGFP ✂BamH1/Kpn1 bzw. 6,7µl PenTSA43 ✂BamH1/Kpn1
- 1µl (1U) T4-Ligase

→ mit Wasser auf 50µl auffüllen
→ 16h bei 16°C

Tab. 12: Ligationsansätze (↻) für pQE30-PenEGFP bzw. pQE30-PenTSA43

Jeweils 10µl der Ligationsansätze wurden in RbCl-kompetente E. coli des Stammes DH5α transformiert (s. Kap. 6.7.1) und die Transformationsansätze (100µl) zur Selektion auf LB^{amp}-Platten ausgestrichen.
Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden mehrere Klone gepickt und Micropreparationen (s. Kap. 6.7.8) durchgeführt, was zu folgenden Ausbeuten an Plasmid-DNA führte:

pQE30-PenEGFP(G1): 0,9µg
pQE30-PenEGFP(G2): 1,3µg
pQE30-PenEGFP(G3): 2µg
pQE30-PenEGFP(G4): 1,2µg
pQE30-PenEGFP(G5): 1,4µg
pQE30-PenEGFP(G6): 6,6µg
pQE30-PenEGFP(G7): 3µg
pQE30-PenEGFP(G8): 2,6µg
pQE30-PenEGFP(G9): 1,3µg
pQE30-PenEGFP(G10): 1,6µg

pQE30-PenTSA43(T1): 1,9µg
pQE30-PenTSA43(T2): 1,2µg
pQE30-PenTSA43(T3): 0,9µg
pQE30-PenTSA43(T4): 1,6µg
pQE30-PenTSA43(T5): 1µg
pQE30-PenTSA43(T6): 4,6µg
pQE30-PenTSA43(T7): 1,9µg
pQE30-PenTSA43(T8): 3,2µg
pQE30-PenTSA43(T9): 4,3µg
pQE30-PenTSA43(T10): 2,6µg

Jeweils 0,5µg der preparierten Plasmide wurden mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2), auf zwei 1%ige ethidiumbromidhaltige Agarosegele (s. Kap. 6.7.3) aufgetragen und die Gele mittels eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) ausgewertet (Abb. 359 und Abb. 360).

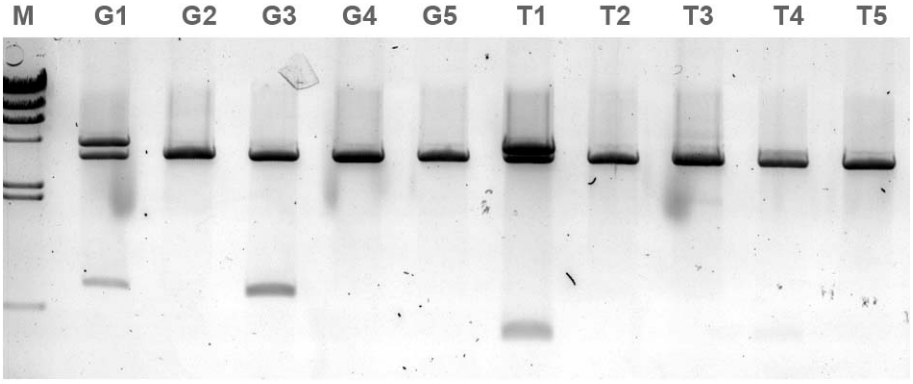


Abb. 359: Agarosegel zum Test der Klone G1-G5 und T1-T5 auf vorhandene EGFP bzw. TSA43-Inserts (M: λ-Digest)

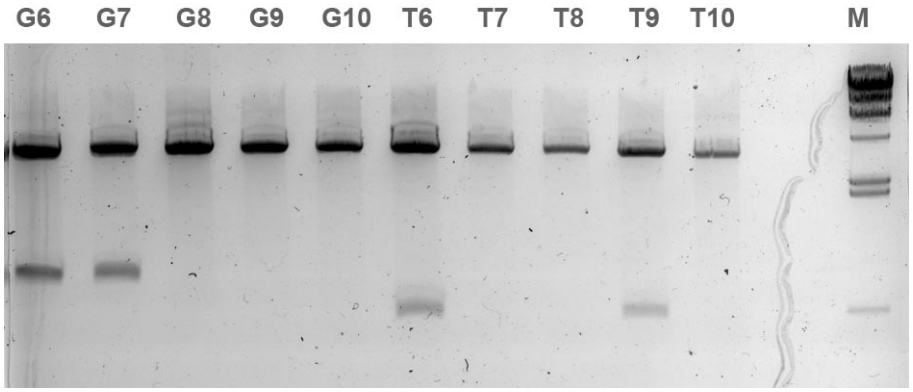


Abb. 360: Agarosegel zum Test der Klone G6-G10 und T6-T10 auf vorhandene EGFP bzw. TSA43-Inserts (M: λ-Digest)

Als Träger eines potentiellen PenEGFP-Inserts kommen somit die 4 Klone pQE30-PenEGFP(G1), pQE30-PenEGFP(G3), pQE30-PenEGFP(G6) und pQE30-PenEGFP(G7) mit einer Bande bei ca. 800bp in Frage.
Lediglich die 3 Klone pQE30-PenTSA43(T1), pQE30-PenTSA43(T6) und pQE30-PenTSA43(T9) tragen potentiell ein PenTSA43-Insert mit einer Bande bei ca. 500bp in sich.

Um die nötigen Plasmidmengen für eine Sequenzierung zu gewinnen, wurden die inserthaltigen Plasmide zur Vermehrung erneut in RbCl-kompetente E. coli des Stammes DH5α transformiert (s. Kap. 6.7.1) und zur Selektion auf LB^{amp}-Platten ausgestrichen.
Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde mit jeweils einer Kolonie eine Plasmid-Minipreparation (s. Kap. 6.7.8) durchgeführt, was zu folgenden Ausbeuten führte:

pQE30-PenEGFP(G1): 9,5µg
pQE30-PenEGFP(G3): 8,9µg
pQE30-PenEGFP(G6): 21,7µg
pQE30-PenEGFP(G7): 10,1µg

pQE30-PenTSA43(T1): 3,3µg
pQE30-PenTSA43(T6): 8,3µg
pQE30-PenTSA43(T9): 5,1µg

Zum direkten Vergleich vor der Sequenzierung wurden jeweils 0,5µg dieser Plasmide mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2) und direkt nebeneinander auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (s. Kap. 6.7.3) aufgetragen (Abb. 361). Die Auswertung erfolgte mittels eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter).

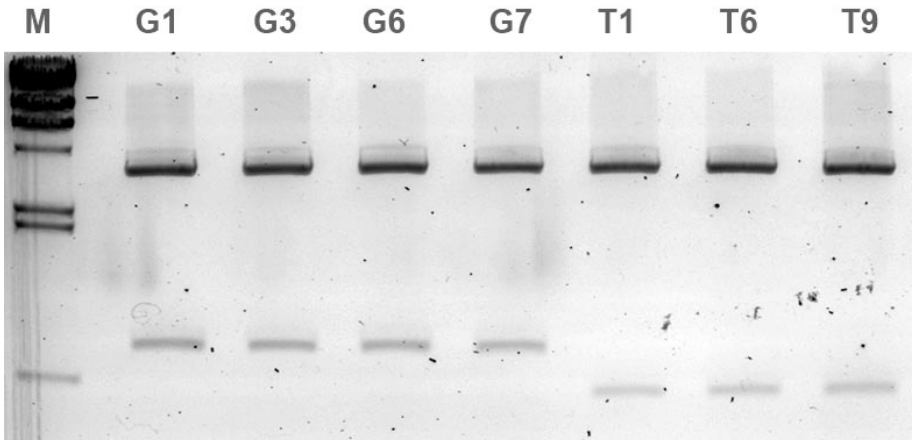


Abb. 361: Agarosegel zum direkten Vergleich der inserthaltigen Klone G1, G3, G6, G7, T1, T6 und T9 nach Verdau mit BamH1 und Kpn1 (M: λ-Digest)

Die Auswertung des Gels aus Abb. 361 ergibt, dass sämtliche PenEGFP-Inserts (G1, G3, G6, G7) sowie sämtliche PenTSA43-Inserts (T1, T6, T9) jeweils auf der gleichen Höhe bei ca. 800bp bzw. 500bp liegen.
Jeweils 3µg der inserthaltigen Plasmide wurden zur Auftragssequenzierung mittels eines pQE-FP-Standardprimers an die Firma GATC Biotech (Konstanz) gegeben (Abb. 362 bis Abb. 367). Als Vergleichssequenz für eine erfolgreiche Klonierung dienten die Sequenzen der selbst synthetisierten Penetratin-modifizierten Primer BamH1-PenEGFP(+) bzw. BamH1-PenTSA43(+) (s. Kap. 8.1) sowie die Sequenzen der bereits erfolgreich klonierten EGFP und TSA43-Inserts (s. Kap. 8.2).

```
TAGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCGTCAGAT_AAAATCTGGTTCCAGAA
CCGTCGTATGAAATGGAAAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCCGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGA
GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT
GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGG
CGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA
CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGA
CACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA
GTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGAT
CCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCC
CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCA
```

Abb. 362: Sequenzierergebnis von pQE30-PenEGFP(G1)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 1x Deletion (C), 1x Austausch (T→C))

```
TAGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAA
CCGT_GTATGAAATGGAAAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCCGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGA
GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT
GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGG
CGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA
CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGA
CACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA
GTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGAT
CCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCC
CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCA
```

Abb. 363: Sequenzierergebnis von pQE30-PenEGFP(G3)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 1x Deletion (C), 1x zus. Base (C))

TAGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAA
CCGTCGTATGAAATAGAAAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCCGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGA
GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT
GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGG
CGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA
CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGA
CACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA
GTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGAT
CCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCC
CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCA

Abb. 364: Sequenzierergebnis von pQE30-PenEGFP(G6)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 2x Austausch (G→A, T→C))

AGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCG_CAGATCAAAATCTGGTTCCAGAAC
CGTCGTATGAAATGGAAAAAAATGGGCATCACCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACC
GCGGGCGCCGACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACC
GGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAAC
TACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAG
TGGCCGCTGACTTCGAAGTCCACGCTGGTCGGCGACGACACCTTCACCAAGGTGTAGCCGTCCGCCGCCTCCATC
GACGCGGCGAAGAAGGTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGCCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGG
TCGCGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATG
ACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGC
TAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATAT

Abb. 365: Sequenzierergebnis von pQE30-PenETSA43(T1)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 1x Deletion (T))

AGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAAC
CGTCGT_TGAAATGGAAAAAAATGGGCATCCCCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACC
GCGGGCGCCGACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACC
GGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAAC
TACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAG
TGGCCGCTGACTTCGAAGTCCACGCTGGTCGGCGACGACACCTTCACCAAGGTGTAGCCGTCCGCCGCCTCCATC
GACGCGGCGAAGAAGGTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGCCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGG
TCGCGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATG
ACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGC
TAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATAT

Abb. 366: Sequenzierergebnis von pQE30-PenETSA43(T6)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 1x Deletion (A), 1x Austausch (A→C))

AGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCG_CAGATCAAAATCTGGTTCCAGAAC
CGTCGTATGAAATGGAAAAAAATGGGCATCACCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACC
GCGGGCGCCGACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACC
GGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAAC
TACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAG
TGGCCGCTGACTTCGAAGTCCACGCTGGTCGGCGACGACACCTTCACCAAGGTGTAGCCGTCCGCCGCCTCCATC
GACGCGGCGAAGAAGGTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGCCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGG
TCGCGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATG
ACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGC
TAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATAT

Abb. 367: Sequenzierergebnis von pQE30-PenETSA43(T9)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 1x Deletion (T))

Beschränkt man sich bei der Betrachtung der Abb. 362 bis Abb. 367 auf den Primerbereich, so ist eine direkte Gegenüberstellung der Mutationen möglich (Abb. 368).

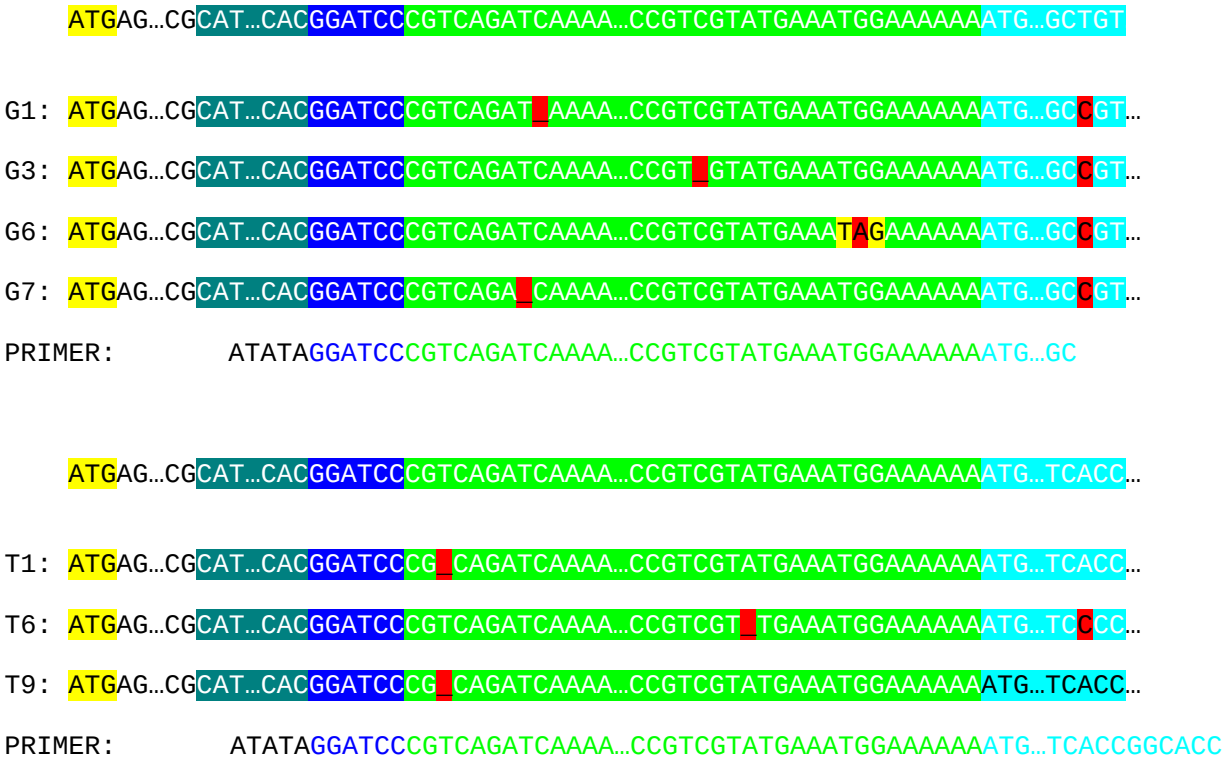


Abb. 368: Vergleich der Mutationen in den PenEGFP und PenTSA43-Inserts
(gelb: Start/Stop-Codons, rot: Mutationen)

Somit zeigen auch bei Verwendung von Gel-aufgereinigten Primern fast sämtliche Klone in Abb. 368 sehr frühe Deletionen im Primerbereich der PCR, was zu Leserasterverschiebungen und somit zu unsinnigen Expressionsprodukten führt. Als einziger Klon weist pQE30-PenEGFP(G6) keine leserasterverschiebende Deletion auf. Bei diesem Klon führt allerdings ein Basenaustausch zu einem sehr frühen Stop-Codon (TAG).

Interessant ist auch der Austausch von T gegen C an der ersten Base nach dem Ende der Primersequenz bei sämtlichen pQE30-PenEGFP Klonen (G1, G3, G6 und G7). Die Wahrscheinlichkeit, dass das Template genau an der Stelle eine Mutation aufweist wo der Primer endet, ist sehr gering. Ein am 3´-Ende fehlerhafter Primer mit einem zusätzlichen C kommt allerdings auch kaum in Frage, da dieser aufgrund der fehlenden Hybridisierung an der 3´-Seite nicht elongiert würde.
Diese Punktmutation würde, für sich alleine betrachtet, zu keiner Leserasterverschiebung führen, sondern lediglich den Austausch einer Aminosäure (Leu → Pro) bewirken. Sie kommt jedoch immer nur zusammen mit einer schwerer wiegenden Mutation vor.

Vieles deutet bereits jetzt darauf hin, dass die auf den ersten Blick willkürlichen Mutationen letztendlich doch in eine Richtung gehen. Entweder tritt durch Deletion bzw. durch Einbau einer zusätzlichen Base eine Leserasterverschiebung ein, was ein nonsense-Produkt zur Folge hat, oder es wird durch Basenaustausch ein Stop-Codon generiert, was zu einem frühen Abbruch der Translation führt. Eine einfache Punktmutation, die lediglich zum Austausch einer Aminosäure führen würde, kommt nie vor.

Um die Primer als Ursache der Mutationen definitiv ausschließen zu können, wurde eine modifizierte Version des PenEGFP(+)-Primers (BamH1-PenEGFPa(+)) synthetisiert. Dieser ist am 3´-Ende um zwei Nukleotide verlängert um den oft auftetenden Austausch von C gegen T zu unterbinden (Abb. 369). Vom PenTSA43(+)-Primer wurde hingegen eine verkürzte Variante hergestellt. Die Version BamH1-PenTSA43a(+) bedient sich des, bis auf eine frühe Deletion, fehlerfreien pQE30-PenTSA43(T1)-Plasmids als Template. Die Deletion im Template wird dabei vom Primer überbrückt (Abb. 369).



Abb. 369: Design der neuen Primer BamH1-PenEGFPa(+) und BamH1-PenTSA43a(+)

Die Primersynthese erfolgte nach Standard-Protokollen auf Guanidin-Träger mit einem Expedite 8909 DNA-Synthesizer (s. Kapitel 6.2.1). Nach Abtrennung der verkürzten Sequenzen mittels RP-HPLC wurden die Primer zusätzlich über ein Polyacrylamid-Gel aufgereinigt (s. Kap. 6.4.6). Eine UV-Quantifizierung (s. Kap. 6.5) nach der Gelextraktion ergab folgende Primerkonzentrationen:

BamH1-PenEGFPa(+): 0,7pmol/µl
BamH1-PenTSA43a(+): 6pmol/µl

Mit den neuen Primerversionen wurde erneut, wie in Kapitel 4.5.3.3 beschrieben, eine PCR zur Gewinnung der Inserts durchgeführt (Tab. 13).

Konzentrationen:

- Taq-Polymerase: 5U/µl
- dNTP-Mix: 10mM
- Template (pQE30-EGFP): 1ng/µl
- Template (pQE30-PenTSA43(T1)): 1ng/µl
- BamH1-PenEGFPa (+): 0,7pmol/µl
- Kpn1-EGFP (-): 19pmol/µl
- BamH1-PenTSA43a (+): 6pmol/µl
- Kpn1-TSA43 (-): 30pmol/µl

PCR-Ansatz:

- 2,5µl 10xPCR-Puffer (50mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$)
- 0,5µl dNTP-Mix (200µM)
- 14µl (10pmol) BamH1-PenEGFPa (+) bzw. 1,7µl /10pmol) BamH1-PenTSA43a (+)
- 0,5µl (10pmol) Kpn1-EGFP (-) bzw. 0,3µl (10pmol) Kpn1-TSA43 (-)
- 1ng (1µl) Template (pQE30-EGFP bzw. pQE30-TSA43)

→ mit Wasser auf 25µl auffüllen

Temperaturprogramm:

1x:
- 5min bei 94°C
  → 1U Taq-Polymerase nach 2min
- 0,5min bei 50°C
- 1min bei 72°C

35x:
- 0,5min bei 94°C
- 0,5min bei 55°C
- 1min bei 72°C

→ 10min bei 72°C → 4°C

Tab. 13: PCR-Ansatz und Temperaturprogramm zur Amplifikation der Penetratin-modifizierten Inserts

Nach der PCR wurden jeweils 2µl der Ansätze auf ein einprozentiges, ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen (s. Kap. 6.7.3) und mit Hilfe eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) untersucht (Abb. 370). Dabei ergaben sich wieder die bekannten Banden des PenEGFP PCR-Produkts bei ca. 800bp sowie des PenTSA43 PCR-Produkts bei ca. 500bp.

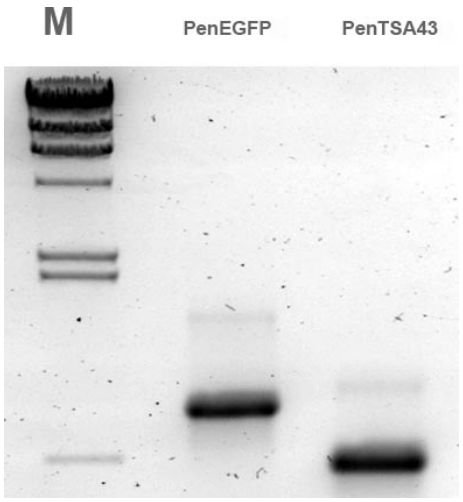


Abb. 370: Agarosegel der PCR-Produkte mit den neuen Varianten der Penetratin-Primer (M: λ-Digest)

Die beiden PCR-Ansätze wurden über eine Spin-Column (s. Kap. 6.7.4) aufgereinigt, mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2), die End-Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt und die geschnittenen Inserts mittels Gelextraktion extrahiert (s. Kap. 6.7.4). Dabei ergab sich eine Konzentration an BamH1/Kpn1-geschnittenen, Penetratin-modifizierten Inserts von 0,03µg/µl im Falle von PenEGFP sowie 0,022µg/µl im Falle von PenTSA43.

Die Ligation (↺) mittels T4 DNA-Ligase (s. Kap. 6.7.3) fand mit einem 5fachen molaren Überschuss der Penetratin-modifizierten Inserts gegenüber dem geschnittenen pQE30 Vektor statt (Tab. 14).

Konzentrationen:

- T4 DNA-Ligase: 1U/µl
- PenEGFP ✂BamH1/Kpn1: 30ng/µl
- PenTSA43 ✂BamH1/Kpn1: 22ng/µl
- pQE30 ✂BamH1/Kpn1: 46ng/µl

Ligations-Ansatz:

- 5µl 10x Ligations-Puffer
- 0,9µl pQE30 ✂BamH1/Kpn1
- 1,4µl PenEGFPa ✂BamH1/Kpn1 bzw. 1,4µl PenTSA43 ✂BamH1/Kpn1
- 1µl (1U) T4-Ligase

→ mit Wasser auf 50µl auffüllen
→ 16h bei 16°C

Tab. 14: Ligationsansätze (↺) für pQE30-PenEGFP bzw. pQE30-PenTSA43

Jeweils 10µl der Ligationsansätze wurden in kompetente E. coli des Stammes DH5α transformiert (s. Kap. 6.7.1) und die Transformationsansätze (100µl) zur Selektion auf LB^{amp}-Platten ausgestrichen.
Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden mehrere Klone gepickt und Micropreparationen (s. Kap. 6.7.8) durchgeführt, was zu folgenden Ausbeuten an Plasmid-DNA führte:

pQE30-PenEGFP(PE1): 4,5µg
pQE30-PenEGFP(PE2): 3,6µg
pQE30-PenEGFP(PE3): 2,7µg
pQE30-PenEGFP(PE4): 1,5µg
pQE30-PenEGFP(PE5): 1,3µg

pQE30-PenTSA43(PT1): 1,3µg
pQE30-PenTSA43(PT2): 1,4µg
pQE30-PenTSA43(PT3): 2,5µg
pQE30-PenTSA43(PT4): 1,3µg
pQE30-PenTSA43(PT5): 7µg
pQE30-PenTSA43(PT6): 1,6µg
pQE30-PenTSA43(PT7): 0,9µg
pQE30-PenTSA43(PT8): 1,6µg
pQE30-PenTSA43(PT9): 2,8µg
pQE30-PenTSA43(PT10): 0,9µg
pQE30-PenTSA43(PT11): 2µg
pQE30-PenTSA43(PT12): 1µg
pQE30-PenTSA43(PT13): 4,5µg
pQE30-PenTSA43(PT13): 1,5µg

Jeweils 0,5µg dieser Plasmide wurden mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2), eine Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 6.7.3) vorgenommen und die Gele mittels eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) ausgewertet (Abb. 371 und Abb. 372).

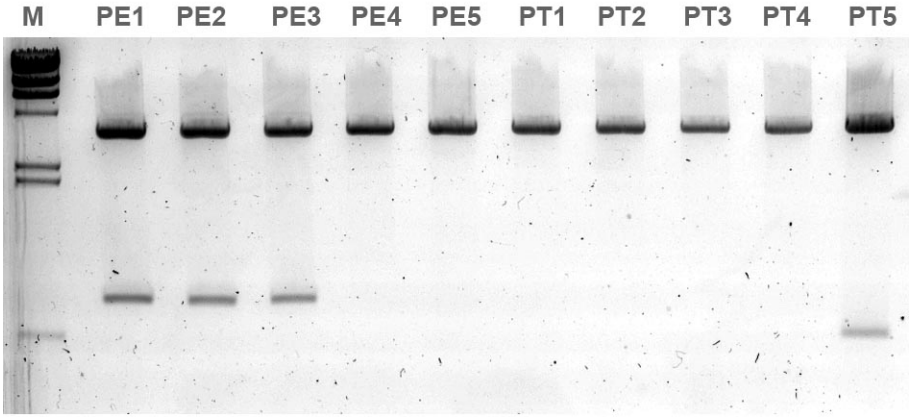


Abb. 371: Agarosegel zum Test der Klone PE1-PE5 und PT1-PT5 auf vorhandene EGFP bzw. TSA43-Inserts (M: λ-Digest)

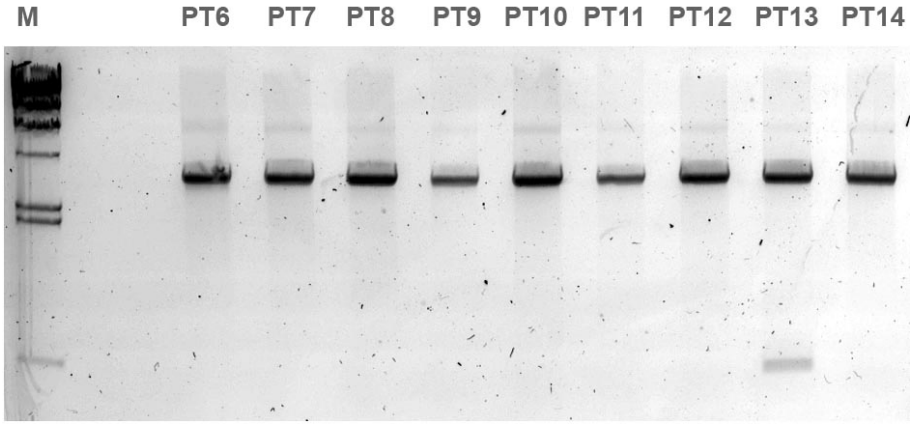


Abb. 372: Agarosegel zum Test der Klone PT6-PT14 auf vorhandene EGFP bzw. TSA43-Inserts (M: λ-Digest)

Die Auswertung der beiden Gele in Abb. 371 und Abb. 372 liefert als positive Klone mit potentiellem PenEGFP-Insert (Bande bei ca. 800bp) die Klone pQE30-PenEGFP(PE1), pQE30-PenEGFP(PE2) und pQE30-PenEGFP(PE3).
Als potentielle Träger des PenTSA43-Insert (Bande bei ca. 500bp) kommen die beiden Klone pQE30-PenTSA43(PT5) und pQE30-PenTSA43(PT13) in Frage.

Jeweils 1µg der inserthaltigen Plasmide wurden zur Auftragssequenzierung mittels eines pQE-FP-Standardprimers an die Firma GATC Biotech (Konstanz) gegeben. Als Vergleichssequenz für eine erfolgreiche Klonierung dienten wiederum die Sequenzen der selbst synthtisierten Penetratin-modifizierten Primer BamH1-PenEGFP(+) bzw. BamH1-PenTSA43(+) sowie die Sequenzen der bereits erfolgreich klonierten EGFP und TSA43-Inserts (Sequenzen s. Kap 8.1 und 8.2).
Auch hier genügt eine Betrachtung des Anfangsbereiches der Inserts in Abb. 373. Alle Klone tragen Mutationen in Form von Deletionen, die bei der Translation, aufgrund von Leserasterverschiebungen, zu nonsense-Produkten führen.

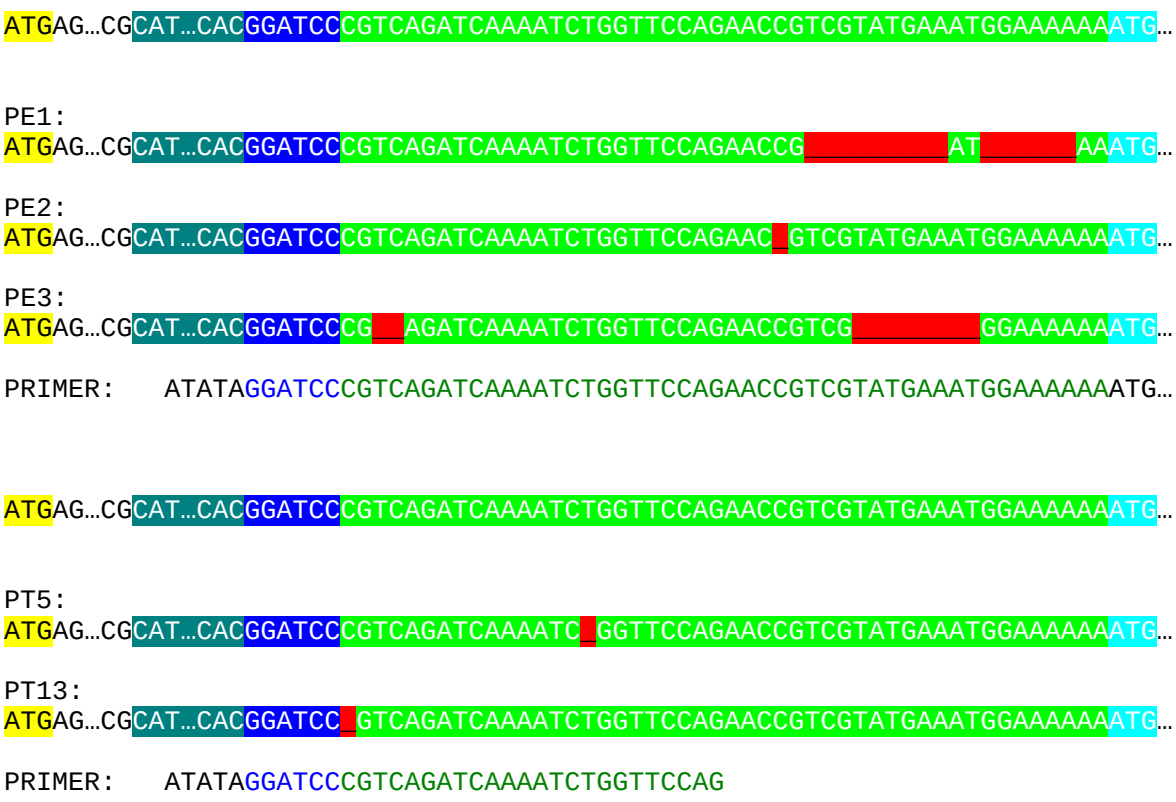


Abb. 373: Vergleich der Mutationen in den PenEGFP und PenTSA43-Inserts
(gelb: Start/Stop-Codons, rot: Mutationen)

Um eine fehlerhafte Sequenzierung ausschließen zu können, wurde diesmal auch eine Analyse der Gegenstränge vorgenommen. Dies geschah mittels eines pQE-RP-Standardprimers (s. Kap. 8.1), welcher 56bp hinter der Kpn1-Schnittstelle des pQE30-Vektors ansetzt. Die Sequenzierungen wurden ebenfalls von der Firma GATC Biotech ausgeführt und führten zu exakt den gleichen Ergebnissen, mit identischen Mutationen, wie die Sequenzierungen des sense-Stranges in Abb. 373.

Die bisher beobachteten Mutationsmuster deuten darauf hin, dass eine Selektion von Mutanten stattfindet die aufgrund eines frühen Stop-Codons die Translation vorzeitig beenden, oder aufgrund einer Leserasterverschiebung ein Produkt produzieren, welches kein vollständiges Penetratin enthält. Es kommt kein einziger Klon vor, bei dem z.B. eine Punktmutation lediglich zu einem Aminosäureaustausch bei ansonsten unverändertem Expressionsprodukt führt. Immer sind es schwerwiegende Mutationen, die zu einem Abbruch oder einem nonsense-Produkt führen. Klone mit korrektem Insert scheinen, möglicherweise aufgrund einer Toxizität des Penetratins[(5)], nicht lebensfähig zu sein oder zumindest wesentlich langsamer zu wachsen.
Sollte dies tatsächlich der Fall sein, so müßten aber zumindest die PCR-Produkte vor der Klonierung eine korrekte Sequez aufweisen.

Um dies zu verifizieren, wurden erneut zwei PCR-Ansätze (s. Kap. 6.7.1) gefahren. Im ersten Ansatz (PCR1) wurde der ursprüngliche BamH1-PenTSA43(+)-Primer mit dem fehlerfreien pTSA43 Plasmid als Template verwendet.
Im zweiten Ansatz (PCR2) kam der neue BamH1-PenTSA43a(+)-Primer zusammen mit dem mutierten pQE30-PenTSA43-Plasmid von Klon T1 zum Einsatz, welches eine Deletion (fehlendes T) kurz nach der BamH1-Schnittstelle aufweist (s. Abb. 368).

Als Gegenprimer kam in beiden Fällen der TSA43(-) Primer zum Einsatz (Ansätze analog zu Tab. 11 bzw. Tab. 13).

Nach der Säulenaufreingung ergab sich für den ersten PCR1-Ansatz (fehlerfreies pTSA43-Template) eine Ausbeute von 2,3µg. Der zweite PCR2-Ansatz (mutiertes pQE30-PenTSA43(T1)-Template) lieferte 4,5µg.
Jeweils 1,5µg der PCR-Produkte wurden als Sequenzier-Template an die Firma GATC Biotech gegeben. Als Primer dienten die jeweils verwendeten Primer zur Amplifizierung der PCR-Produkte, die in einer Konzentration von 30pmol/µl mitgeliefert wurden.
Da in erster Linie das mutationsreiche 5´-Ende der Sequenz interessant ist, wurde neben der Sequenzierung des Sense-Stranges auch eine Sequenzierung des antisense-Strangs mit dem Gegenprimer TSA43(-) durchgeführt. Sowohl die Sequenzierung des jeweiligen sense-Stranges als auch des jeweiligen antisense-Stranges führten zu den gleichen Ergebnissen welche in Abb. 374 dargestellt sind.

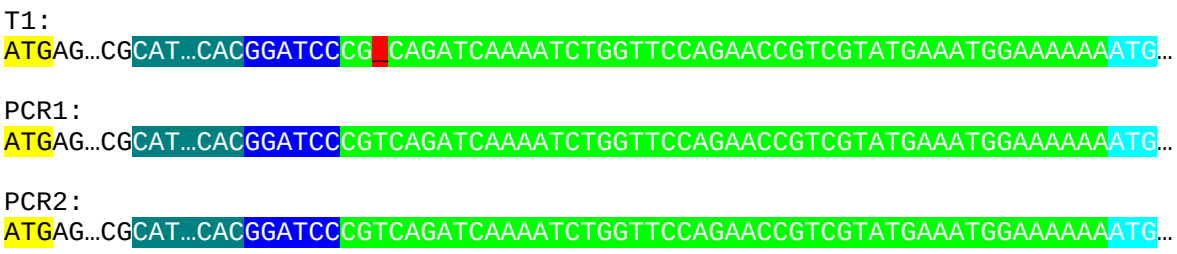


Abb. 374: Ergebnisse der Sequenzierung der PCR-Produkte (gelb: Start/Stop-Codons, rot: Mutationen)

Beide Sequenzierungen zeigen in Abb. 374 völlig fehlerfreie PCR-Produkte. Sogar das Produkt aus dem PCR2-Ansatz, mit dem mutierten pQE30-PenTSA43(T1) als Template, weist keine Deletion mehr auf.
Dies bedeutet, dass sämtliche verwendeten Primer sowie auch die damit amplifizierten PCR-Produkte, welche als Inserts für die Klonierungen dienten, völlig fehlerfrei sind. Die Ursache für die beobachteten schwerwiegenden Mutationen muß demnach tatsächlich darin liegen, dass Klone mit korrektem Insert, aufgrund eines toxischen Expressionsprodukts, nicht lebensfähig sind.

Für eine weitergehende Fehleranalyse muß beachtet werden, dass die als Zielvektoren verwendeten pQE-Plasmide eigentlich gar keine Klonierungsvektoren sind. Vielmehr handelt es sich um Expressionsvektoren, die vor ihrer MCS einen T5-Promotor tragen, welcher unter der Kontrolle eines lac-operons steht und von der E. coli eigenen RNA-Polymerase erkannt wird. Dadurch kommt es in E. coli ohne $lacI^q$-Mutation (einer Mutation im Promotorbereich des lacI-Gens welches für den lac-Repressor codiert), aufgrund zu geringer Konzentration des lac-Repressors, auch ohne externe Induktion zu einer leichten Expression des im Vektor codierten Proteins (s. Kap. 3.10.5). Dies kann bei toxischen Proteinen zu einem verlangsamten Wachstum oder sogar zu einer Selektion von Mutanten führen, die schneller wachsen als Bakterien welche das korrekte Plasmid in sich tragen.
Die bisher verwendeten E. coli des Stammes DH5α besitzen den Genotyp

F^- (Φ80d lacZΔM15) Δ (lacZYA-argF) U169 supE44 hsdR17($r_\kappa^- m_\kappa^+$) recA1 gyrA96 endA1 thi-1 relA1 deoR λ^-

Sie tragen demnach keine chromosomale Kopie des $lacI^q$-Gens und sind somit zur reinen Klonierung von Expressions-Vektoren, die für potentiell toxische Proteine codieren, eher ungeeignet.

Um eine nicht-induzierte Expression so weit wie möglich zu unterdrücken, sollten weitere Klonierungen in E. coli des Stammes JM109 durchgeführt werden. Diese Bakterien haben den Genotyp

F' traD36 proA+ proB+ lacI^q (lacZ) M15 L (lac- proAB) hsdR17 recA1 endA1 relA1

und sind demnach Träger einer chromosomalen lacI^q-Mutation. Dies führt zur Überexpression des lac-Repressors, der die Transkription und somit auch die Expression, zumindest in der Anfangsphase des Zellwachstums nach der Transformation, weitgehend unterdrückt.
Zu diesem Zweck wurden jeweils 10µl der alten Ligationsansätze aus Tab. 14 in, durch Roti-Transform kompetent gemachte, E. coli des Stammes JM109 transformiert (s. Kap. 6.7.1) und die Transformationsansätze (100µl) zur Selektion auf LB^{amp}-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C ergab sich folgendes Wachstumsmuster:

Blindprobe (JM109 ohne DNA-Zugabe) → kein Wachstum
JM109 transf. mit pQE30 ✂BamH1/Kpn1 ↺ PenEGFP ✂BamH1/Kpn1 → einige Kolonien
JM109 transf. mit pQE30 ✂BamH1/Kpn1 ↺ PenTSA43 ✂BamH1/Kpn1 → viele Kolonien
JM109 transf. mit pQE30 ✂BamH1/Kpn1 ↺ → kein Wachstum

Im Falle des mit pQE30 ✂BamH1/Kpn1 ↺ PenEGFP ✂BamH1/Kpn1 transformierten Ansatzes zeigte sich bereits zu diesem Zeitpunkt unter UV-Betrachtung eine grüne Fluoreszenz sämtlicher Kolonien, was auf ein funktionelles PenEGFP Insert im richtigen Leseraster hindeutet.

Zur Amplifizierung und weiteren Untersuchung der Plasmid-DNA, wurden mehrere Klone (Bezeichnung **PEJ** für **P**en**E**GFP aus **J**M109 bzw. **PTJ** für **P**en**T**SA43 aus **J**M109) gepickt und Micropreparationen (s. Kap. 6.7.8) durchgeführt. Dies führte zu zu folgenden Ausbeuten an Plasmid-DNA:

pQE30-PenEGFP(PEJ1): 1,9µg
pQE30-PenEGFP(PEJ2): 2,2µg
pQE30-PenEGFP(PEJ3): 1,1µg

pQE30-PenTSA43(PTJ1): 1,2µg
pQE30-PenTSA43(PTJ2): 1,5µg
pQE30-PenTSA43(PTJ3): 1,1µg
pQE30-PenTSA43(PTJ4): 0,3µg
pQE30-PenTSA43(PTJ5): 1,7µg
pQE30-PenTSA43(PTJ6): 1,5µg
pQE30-PenTSA43(PTJ7): 1,19µg

Jeweils 0,5µg dieser Plasmide (im Falle von PTJ4 0,3µg) wurden zum Test auf ein vorhandenes Insert mit BamH1 und Kpn1 verdaut (s. Kap. 6.7.2), eine Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 6.7.3) durchgeführt und das Gel mittels eines UV-Scanners (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) ausgewertet (Abb. 375).

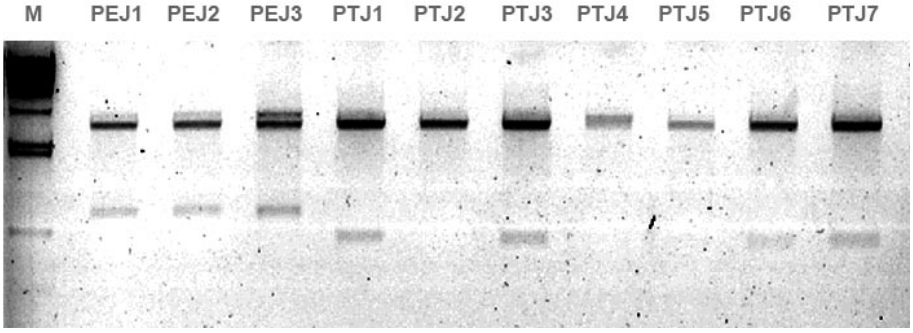


Abb. 375: Agarosegel zum Test der Klone PEJ1-PEJ3 und PTJ1-PTJ7 auf vorhandene EGFP bzw. TSA43-Inserts (M: λ-Digest)

Die Klone PEJ1, PEJ2 und PEJ3 zeigen in Abb. 375 eine Bande bei ca. 800bp, was der Länge des PenEGFP-Inserts entspricht. Die Klone PTJ1, PTJ3, PTJ6 und PTJ7 weisen eine, der Länge des PenTSA43-Inserts entsprechende, Bande bei ca. 500bp auf. Die nicht vorhandenen Banden bei den Klonen PTJ2, PTJ4 und PTJ5 deuten hingegen auf leere Vektoren hin.
Als inserthaltige Klone ergeben sich somit:

potentielles PenEGFP-Insert:	potentielles PenTSA43-Insert:
pQE30-PenEGFP(PEJ1)	pQE30-PenTSA43(PTJ1)
pQE30-PenEGFP(PEJ2)	pQE30-PenTSA43(PTJ3)
pQE30-PenEGFP(PEJ3)	pQE30-PenTSA43(PTJ6)
	pQE30-PenTSA43(PTJ7)

Die Sequenzierung der inserthaltigen Plasmide wurde von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt, wobei ein Standard pQE-FP Primer zum Einsatz kam. Als Vergleichssequenzen für eine erfolgreiche Klonierung dienten die selbst synthtisierten Penetratin-modifizierten Primer BamH1-PenEGFP(+) bzw. BamH1-PenTSA43(+) sowie die Sequenzen der bereits erfolgreich klonierten EGFP und TSA43-Inserts (Sequenzen s. Kap 8.1 und 8.2). Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in Abb. 376 bis Abb. 382 dargestellt.

```
TAGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCC_GTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAA
ACCGTCGTATGAAATGGAAAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCG
AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGC
TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACG
GCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCT
ACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG
ACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG
AGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGA
TCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCC
CCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC
```

Abb. 376: Sequenzierergebnis von pQE30-PenEGFP(PEJ1)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 1x Deletion (C), 1x zus. Base (A))

```
TAGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAA
CCGTCGTATGAAATGGAAAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGA
GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT
GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGG
CGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA
CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGA
CACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA
GTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGAT
CCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCC
CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCA
```

Abb. 377: Sequenzierergebnis von pQE30-PenEGFP(PEJ2)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ fehlerfrei)

TAGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCC_GTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAA
CCGGTCGTATGAAATGGAAAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCG
AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGC
TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACG
GCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCT
ACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG
ACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG
AGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGA
TCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCC
CCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC

Abb. 378: Sequnzierergebnis von pQE30-PenEGFP(PEJ3)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 1x Deletion (C)), 1x zus. Base (G))

AGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAAC
CGTCGTATGAAATGGAAAAAAATGGGCATCACCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACC
GCGGGCGCCGACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACC
GGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAAC
TACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAG
TGGCCGCTGACTTCGAAGTCCACGCTGGTCGGCGACGACACCTTCACCAAGGTGTAGCCGTCCGCCGCCTCCATC
GACGCGGCGAAGAAGGTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGCCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGG
TCGCGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATG
ACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGC
TAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATAT

Abb. 379: Sequnzierergebnis von pQE30-PenETSA43(PTJ1)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ fehlerfrei)

AGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAAC
CGTCGTATGAAATGGAAAAAAATGGGCATCACCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACC
GCGGGCGCCGACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACC
GGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAAC
TACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAG
TGGCCGCTGACTTCGAAGTCCACGCTGGTCGGCGACGACACCTTCACCAAGGTGTAGCCGTCCGCCGCCTCCATC
GACGCGGCGAAGAAGGTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGCCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGG
TCGCGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATG
ACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGC
TAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATAT

Abb. 380: Sequnzierergebnis von pQE30-PenETSA43(PTJ3)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ fehlerfrei)

AGAGAAATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAAC
CGTCGTATGAAATGGAAAAAAATGGGCATCACCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACC
GCGGGCGCCGACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACACCGAGAGCCGCTACGTCCTGACC
GGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAAC
TACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAG
TGGCCGCTGACTTCGAAGTCCACGCTGGTCGGCGACGACACCTTCACCAAGGTGTAGCCGTCCGCCGCCTCCATC
GACGCGGCGAAGAAGGTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGCCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGG
TCGCGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATG
ACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGC
TAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATAT

Abb. 381: Sequnzierergebnis von pQE30-PenETSA43(PTJ6)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ 1x Austausch (G➔A))



Abb. 382: Sequenzierergebnis von pQE30-PenETSA43(PTJ7)
(gelb: Start/Stop-Codon, dunkelgrün: His-tag, dunkelblau: BamH1/Kpn1-Schnittstelle, hellgrün: Penetratin-Sequenz, hellblau: EGFP-Sequenz, rot: Mutationen ➔ fehlerfrei)

Betrachtet man lediglich den Anfangsbereich am 5´-Ende der Inserts, so wird eine direkte Gegenüberstellung der vorhandenen Mutationen in Abb. 383 möglich.

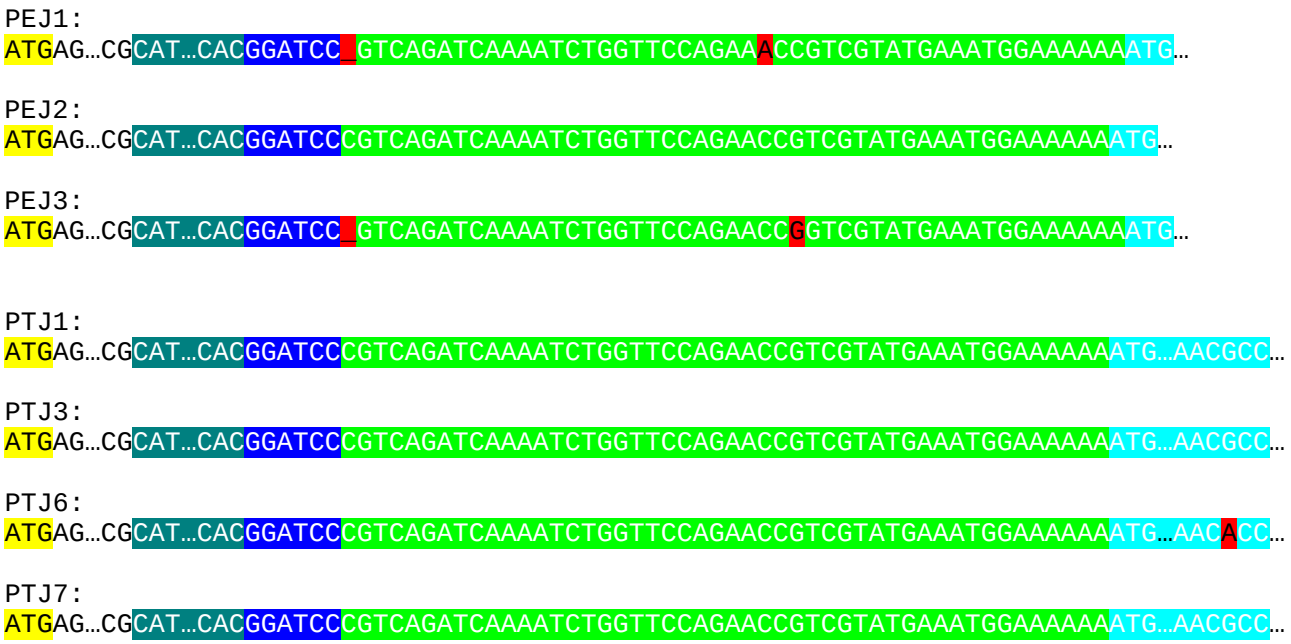


Abb. 383: Vergleich der Mutationen in den PenEGFP und PenTSA43-Inserts
(gelb: Start/Stop-Codons, rot: Mutationen)

Somit ist der Klon pQE30-PenEGFP(PEJ2) vollständig frei von Mutationen, was auch eine Sequenzierung des Gegenstranges mit einem pQE-RP Primer bestätigte.
Die Klone pQE30-PenEGFP(PEJ1) und pQE30-PenEGFP(PEJ3) weisen jeweils eine Deletion im Anfangsbereich, verbunden mit einer zusätzlichen Base im mittleren Bereich der Penetratinsequenz auf, was zu einer temporären Leserasterverschiebung führt. In beiden Fällen resultiert daraus ein Fusionsprotein mit funktionsunfähigem Penetratin-Teil bei ansonstem vollfunktionellem EGFP. Dies erklärt auch, warum die entsprechenden Kolonien, trotz vorhandener Mutationen, bei UV-Betrachtung eine Fluoreszenz aufweisen.

Im Falle der Klone mit PenTSA43-Insert erweisen sich pQE30-PenEGFP(PTJ1), pQE30-PenEGFP(PTJ3) sowie auch pQE30-PenEGFP(PTJ7) als vollkommen fehlerfrei. Der Klon pQE30-PenEGFP(PTJ6) zeigt einen späten Basenaustausch in der Mitte der Streptavidinsequenz (G zu A) was im Expressionsprodukt zum Austausch einer Aminosäure (Cys → Thr) führt.
Kein einziger der Klone des E. coli Stammes JM109 weist jedoch ähnlich schwerwiegende Mutationen auf, wie sie bei der Verwendung von E. coli des Stammes DH5α zu beobachten waren.
Für die Expressionsversuche stehen somit folgende fehlerfreie Klone zur Expression eines Penetratin-Fusionsproteins zur Verfügung:

Expression von PenEGFP: pQE30-PenEGFP(PEJ2) bzw. PEJ2

Expression von PenStv43: pQE30-PenTSA43(PTJ1) bzw. PTJ1
pQE30-PenTSA43(PTJ3) bzw. PTJ3
pQE30-PenTSA43(PTJ7) bzw. PTJ7

4.6. Expression der Fusionsproteine

Für die Expression der Zielprodukte kam der E. coli Stamm M15[pREP4] zum Einsatz (s. Kap. 3.10.5). Diese Bakterien tragen das Plasmid pREP4 in sich, welches ihnen eine zusätzliche Kanamycinresistenz verleiht. Durch die trans-ständige Expression eines lac-Repressors ist eine genaue Kontrolle über die Induktion der Expression gewährleistet. Eine vorzeitige Expression ohne externe Induktion durch IPTG, wie sie beim Stamm DH5α zu beobachten war, ist somit ausgeschlossen.

4.6.1. Optimierung der Expressionsbedingungen

Die idealen Expressionsbedingungen sind für jedes Protein unterschiedlich und müssen individuell ermittelt werden. Um die optimale Inkubationszeit und Inkubationstemperatur zur Expression von EGFP, PenEGFP, Stv43 und PenStv43 zu bestimmen, wurden die entsprechenden Vektoren (pQE30-EGFP für EGFP, pQE30-PenEGFP für PenEGFP, pQE30-TSA43 für Stv43, pQE30-PenTSA43 für PenStv43) zunächst in RbCl-kompetente M15[pREP4] transformiert (s. Kap. 6.7.7) und zur Selektion der positiven Klone auf $LB_{amp/kan}$ Platten ausgestrichen. Von den 4 verschiedenen Transformanten wurde jeweils ein positiver Klon gepickt und über Nacht bei bei 37°C und 200rpm in $LB_{amp/kan}$ Medium kultiviert.
Am nächten Tag wurden jeweils 1ml der Übernachtkulturen in jeweils 25ml $LB_{amp/kan}$ Medium gegeben und bei 37°C bzw. 29°C und 200rpm weiter kultiviert, bis ein OD_{600} Wert von ca. 0,5 erreicht war. Dann erfolgte die Induktion der Expression durch die Zugabe von jeweils 25µl 1M IPTG-Lösung, was zu einer IPTG-Konzentration von 1mM führte.
Die Expressionsansätze wurden darauf weiterhin unter Schütteln bei 37°C bzw. 29°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitabständen erfolgte die Entnahme von jeweils 1ml Zellsuspension, um durch eine photometrische Bestimmung bei 600nm (OD_{600}) den Fortschritt des Wachstums zu ermitteln (Tab. 15). Bereits hier wurde deutlich, dass die Stv43- und PenStv43-exprimierenden Klone langsamer wachsen als die EGFP- und PenEGFP-exprimierenden Klone. Die EGFP- und PenEGFP- exprimierenden Ansätze wiesen dabei bereits nach 2h eine deutliche Grünfärbung auf. Bei sämtlichen Klonen verlief das Wachstum bei 29°C schneller als bei 37°C.

	37°C:				29°C:			
	EGFP	**PenEGFP**	**Stv43**	**PenStv43**	**EGFP**	**PenEGFP**	**Stv43**	**PenStv43**
0h	0,45	0,45	0,45	0,45	0,49	0,49	0,57	0,52
2h	1,28	1,26	0,75	0,46	1,3	1,3	0,9	0,86
4h	1,6	1,6	0,77	0,47	1,6	1,7	1,0	0,89
6h	1,7	1,6	0,76	0,48	1,8	1,9	1,12	0,95
22h	1,76	1,76	1.3	1,4	2	2	1,76	1,43

Tab. 15: OD_{600}-Werte der Expressionsansätze (Wachstumsverlauf) bei verschiedenen Inkubationstemperaturen nach Induktion der Expression bei 0h

Nach der Bestimmung der Absorption wurden die entnommenen Aliquote abzentrifugiert, das jeweilige Pellet in 150µl reduzierendem, zweifach konz. Auftragepuffer (RotiLoad I) resuspendiert und 30min lang im Ultraschallbad lysiert. Die weitere Untersuchung des Zelllysates (Abb. 384 bis Abb. 387) erfolgte über eine 18%ige SDS-PAGE (s. Kap. 6.4.6) mit anschließender Coomassie-Färbung (6.4.7). Die Auftragemenge auf das Gel betrug bei Probe und Marker jeweils 5µl bei folgendem Auftragemuster:

1.) Marker (RotiMark Prestained s. Kap. 6.1.4)
2.) nicht induzierte Kontrolle
3.) 4h-Probe bei 29°C
4.) 6h-Probe bei 29°C
5.) 20h-Probe bei 29°C
6.) 4h-Probe bei 37°C
7.) 6h-Probe bei 37°C
8.) 20h-Probe bei 37°C

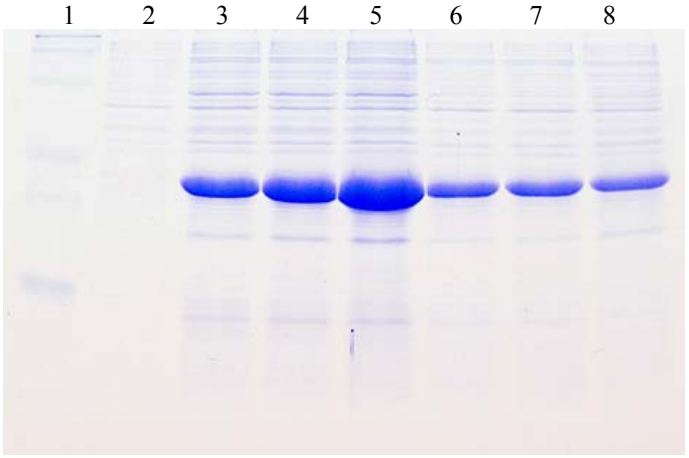


Abb. 384: Expressionsverlauf von EGFP bei 29°C (Bahn 3 - 5) und 37°C (Bahn 6 - 8)

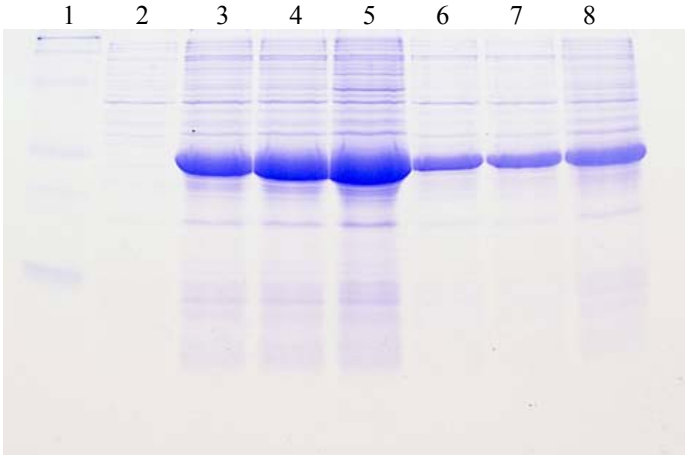


Abb. 385: Expressionsverlauf von PenEGFP bei 29°C (Bahn 3 - 5) und 37°C (Bahn 6 - 8)

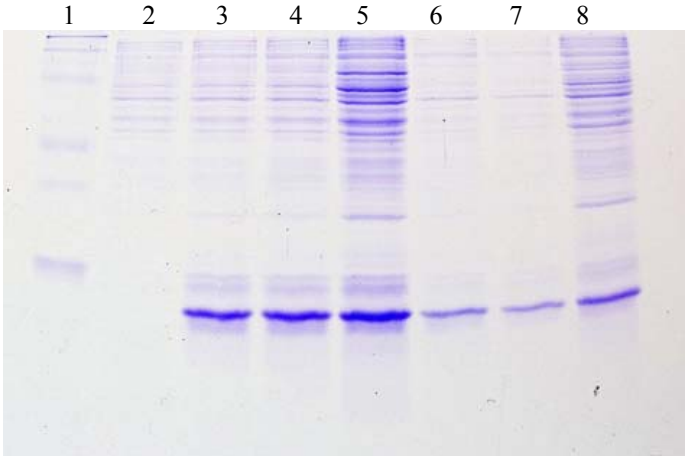


Abb. 386: Expressionsverlauf von Stv43 bei 29°C (Bahn3-5) und 37°C (Bahn6-8)

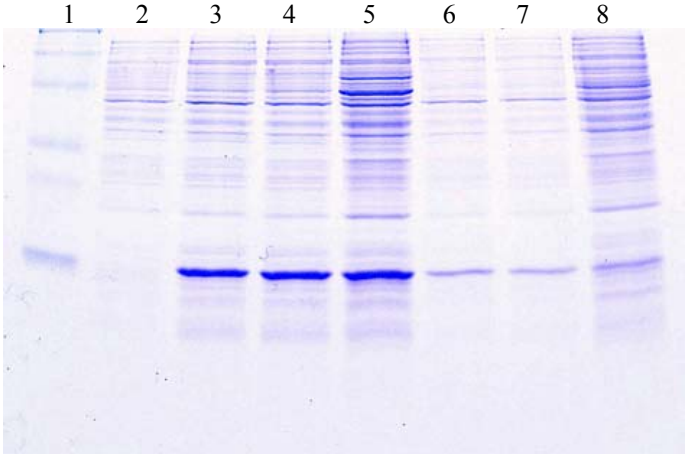


Abb. 387: Expressionsverlauf von PenStv43 bei 29°C (Bahn3-5) und 37°C (Bahn6-8)

Die stärksten Banden in den Gelen werden durch die jeweiligen Expressionsprodukte hervorgerufen. Betrachtet man die relativen Bandenintensitäten, so wird deutlich, dass EGFP und PenEGFP (Abb. 384 und Abb. 385) stärker exprimiert werden als Stv43 und PenStv43 (Abb. 386 und Abb. 387). Bei sämtlichen Ansätzen führt eine Kultivierung bei niedrigeren Temperaturen (29°C, linke Hälfte der Gele) zu einer wesentlich höheren Expressionsrate als eine Kultivierung bei höheren Temperaturen (37°C, rechte Hälfte der Gele). Das Maximum wird im Falle von EGFP und PenEGFP nach einer Inkubationszeit von 20h erreicht. Im Falle

von Stv43 und PenStv43 nimmt jedoch die Bandenintensität bereits nach einer Inkubationszeit von 2-4h kaum mehr zu. Als ideale Parameter für die Expression aller Zielprodukte ergibt sich somit eine mindestens 4stündige Kultivierung bei 29°C und 200rpm.

4.6.2. Aufreinigung der Expressionsprodukte

Um genügend Zellmaterial für eine Aufreinigung der Expressionsprodukte über Ni-NTA Chromatographie (s. Kap. 6.7.10) zu erhalten, wurden parallel vier 100ml Expressionsansätze mit EGFP, PenEGFP, Stv43 und PenStv43 gefahren (s. Kap. 6.7.9). Nach der Induktion und einer Expressionszeit von 4h ergab die photometrische Bestimmung folgende OD_{600}-Werte:

EGFP: 1,5OD in 1ml → 150OD in 100ml
PenEGFP: 1,7OD in 1ml → 170OD in 100ml
Stv43: 0,76OD in 1ml → 76OD in 100ml
PenStv43: 0,65 in 1ml → 65OD in 100ml

Vor der Pelletierung und dem Einfrieren der 100ml-Ansätze wurden für eine erste Aufreinigung jeweils 3OD der Stv43- und PenStv43-exprimierenden Ansätze sowie jeweils 2OD der EGFP- bzw. PenEGFP exprimierenden Ansätze entnommen und bei 13000g 5min lang zentrifugiert. Die Zellpellets des EGFP- und des PenEGFP-exprimierenden Ansatzes wiesen dabei nicht nur eine deutliche Grünfärbung auf, sondern zeigten auch eine starke Fluoreszenz bei der Betrachtung unter UV-Licht.
Nach der Lyse in 400µl Puffer B (100mM NaH_2PO_4 / 10mM Tris / 8M UREA / pH8,0) erfolgte eine denaturierende Aufreinigung über Ni-NTA im kleinen Maßstab, wie in Kap. 6.7.10 beschrieben. Dabei wiesen die Ni-NTA Beads, im Falle von EGFP und PenEGFP, direkt nach dem Abzentrifugieren bereits eine deutliche Grünfärbung auf, welche durch das gebundene Expressionsprodukt hervorgerufen wurde. Die Analyse des ursprünglichen Zelllysats, des Waschschrittes (Wash), des Durchlaufes (Flow) sowie des eigentlichen Eluats mit dem potentiellen Zielprodukt erfolgten durch 18%ige PAGE Gele (s. Kap. 6.4.6) mit Coomassie-Anfärbung (s. Kap. 6.4.7).
Im Falle von EGFP und PenEGFP (Abb. 388) kam folgendes Auftragemuster bei einer Auftragemenge von je 5µl zur Anwendung:

1.) Marker (RotiMark Prestained s. Kap. 6.1.4)
2.) Zelllysat EGFP
3.) Durchlauf (Flow) EGFP
4.) Waschschritt (Wash) EGFP
5.) Eluat EGFP
6.) Zelllysat PenEGFP
7.) Durchlauf (Flow) PenEGFP
8.) Waschschritt (Wash) PenEGFP
9.) Eluat PenEGFP

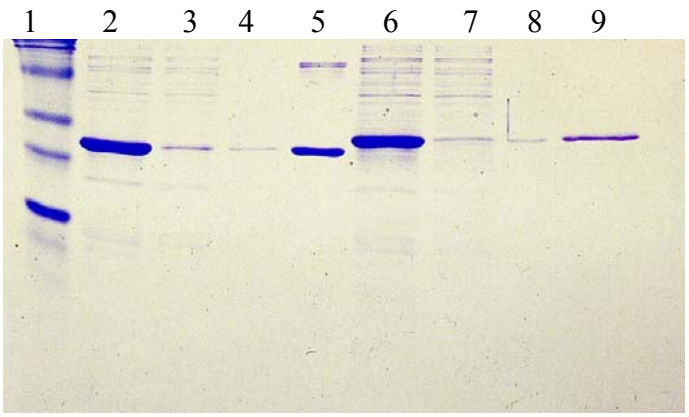


Abb. 388: Verlauf der His-tag Aufreinigung über Ni-NTA von EGFP (Bahn2-5) und PenEGFP (Bahn6-9)

Im Falle von Stv43 und PenStv43 (Abb. 389) kam folgendes Auftragemuster bei einer Auftragemenge von je 15µl zur Anwendung:

1.) Marker (RotiMark Prestained s. Kap. 6.1.4)
2.) Zelllysat Stv43
3.) Durchlauf (Flow) Stv43
4.) Waschschritt (Wash) Stv43
5.) Eluat Stv43
6.) Zelllysat Pen Stv43
7.) Durchlauf (Flow) Pen Stv43
8.) Waschschritt (Wash) Pen Stv43
9.) Eluat Pen Stv43

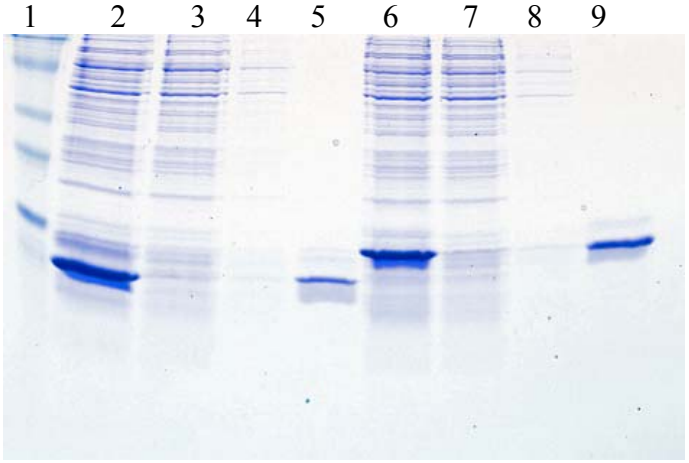


Abb. 389: Verlauf der His-tag Aufreinigung über Ni-NTA von Stv43 (Bahn2-5) und PenStv43 (Bahn6-9)

Bei allen vier Aufreinigungsansätzen ist gut zu erkennen, dass eine fast quantitative Abtrennung des His-tag haltigen Zielproteins (Bahn 5 und 9) von den restlichen Zellbestandteilen erfolgt ist. Im Durchlauf (Bahn 3) und in der Waschfraktion (Bahn 4) ist keine Bande des jeweiligen Zielprodukts zu erkennen.
Von den restlichen 100ml-Ansätzen der vier Proteine wurden daraufhin jeweils 50OD Zellmaterial in 10ml Puffer B lysiert und einer denaturierenden Aufreinigung über Ni-NTA im größeren Maßstab unterzogen (s. Kap. 6.7.10).

4.6.3. Charakterisierung der Expressionsprodukte

Ausgehend von den sich bezüglich der Start- und Stopcodons der codierenden DNA-Sequenzen ergebenden Aminosäuresequenzen, weisen die vier Expressionsprodukte folgende theoretische Molekülmassen auf.

EGFP: 28340 Da
PenEGFP: 30568 Da
Stv43: 13119 Da
PenStv43: 15348 Da

Im Falle des dimeren Streptavidins (Stv43 und PenStv43) bezieht sich diese Angabe lediglich auf eine monomere Kette, da die Zusammenlagerung zum Dimer erst posttranslational erfolgt.

Um einen groben Anhaltspunkt für die Molekülmassen und somit auch über die Identität der Expressionsprodukte zu bekommen, wurde mit jeweils 15µl der einzelnen aufgereinigten Expressionsprodukte eine SDS-PAGE mit nicht-reduzierendem Auftragepuffer durchgeführt (Abb. 390). Die Zuordnung der Molekülmassen erfolgte bezogen auf die Banden des Gewichtsmarkers RotiMark Prestained (s. Kap. 6.1.4), welcher einen Massenbereich von 17kDa bis 245kDa abdeckt.

1.) Marker (RotiMark Prestained s. Kap. 6.1.4)
2.) EGFP
3.) PenEGFP
4.) Stv43
5.) PenStv43
6.) Marker

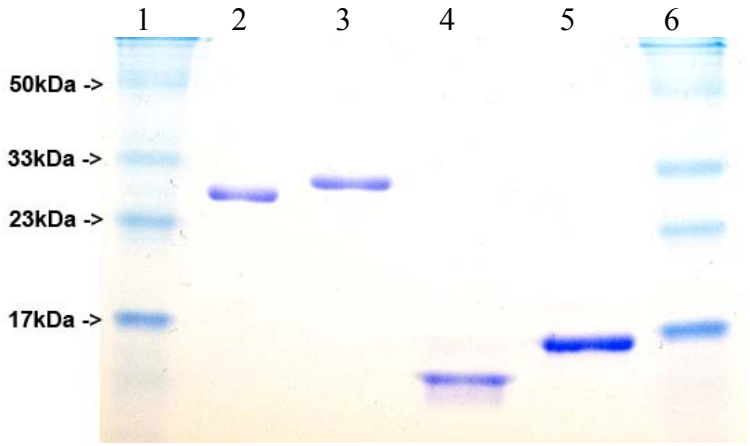


Abb. 390: SDS-PAGE zur Ermittlung der Molekülmassen der Expressionsprodukte

In Abb. 390 liegt die Bande des EGFP (Bahn 2) genau zwischen der 23kDa Bande und der 33kDa Bande des Markers, was in etwa der theoretischen Molekülmasse von 28340Da entspricht. Die Bande des PenEGFP (Bahn 3) liegt zwischen der Bande des EGFP mit 28kDa und der 33kDa Bande des Markers, also ebenfalls in der Nähe der theoretischen Molekülmasse von 30568Da.
Die beiden Expressionsprodukte mit dimerem Streptavidin (Stv43 und PenStv43) wurden, sowohl durch die Aufreinigung als auch durch das SDS-Gel, denaturiert und laufen in Form monomerer Ketten. Dabei liegt die Bande des Stv43 (Bahn 4) weit unterhalb der 17kDa Markerbande, was auf die theoretischen Molekülmasse von 13119Da hindeutet. Die Bande des PenStv43 liegt nur knapp unterhalb der 17kDa Bande des Markers und somit ebenfalls in der Nähe der theoretischen Molekülmasse von 15348 Da. Eine genauere Massenbestimmung ist aufgrund der schlechten Auflösung eines Proteingels nicht möglich, hierzu wäre ein massenspektroskopisches Verfahren für hohe Massenbereiche, wie z.B. ESI-MS, notwendig.

Die grobe Molekülmasse allein gibt jedoch nur wenig Auskunft über die tatsächliche Identität eines Proteins. So könnte z.B durch eine Leserasterverschiebung auch ein Produkt mit ähnlicher Länge, ähnlicher Molekülmasse, jedoch komplett anderer Sequenz exprimiert worden sein. Im Falle des EGFP bzw. PenEGFP ist die grüne Farbe und die UV-Aktivität zwar ein eindeutiger Beweis für die Funktionalität, die Identität von Stv43 und PenStv43 muß jedoch auf eine andere Weise bestätigt werden.
Eine einfache und elegante Möglichkeit bietet die Wechselwirkung mit einem spezifischen Antikörper in einem Dot-Blot und die Visualisierung mittels Chemilumineszenz (s. Kap. 6.7.11). Dazu wurden jeweils 2µl der aufgereinigten Expressionsprodukte auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Als Kontrollsubstanz diente 1µl einer Lösung (5µg/µl) mit kommerziell erhältlichem tetramerem Streptavidin.



Abb. 391: Auftrageschema der Dot-Blots

Nach der Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran erfolgte die Inkubation mit einem Horseradish peroxidase (HRP) -konjugierten Streptavidin-Antikörper (Rabbit polyclonal to Streptavidin (HRP), GeneTex) bzw. mit einem HRP-konjugierten GFP-Antikörper (Goat polyclonal to GFP (HRP), GeneTex) bei einer Verdünnung von 1:10000 bzw. 1:5000. Das Ergebnis nach der Visualisierung durch Chemilumineszenz ist in Abb. 392 und Abb. 393 dargestellt.



Abb. 392: Dot-Blot nach Inkubation mit Anti-Streptavidin (HRP)

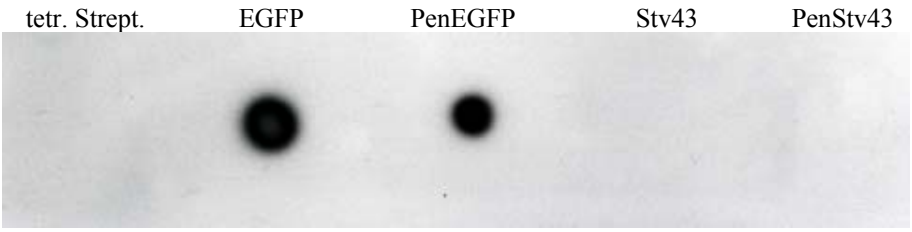


Abb. 393: Dot-Blot nach Inkubation mit Anti-GFP (HRP)

Die beiden rekombinanten streptavidinhaltigen Proteine (Stv43 und PenStv43) sowie das kommerzielle tetramere Streptavidin liefern nach der Inkubation mit Anti-Streptavidin ein deutliches Signal, während die beiden rekombinanten EGFP-haltigen Proteine (EGFP und PenEGFP) keine Wechselwirkung mit dem Streptavidin-Antikörper zeigen (Abb. 392). Analog dazu weisen Stv43, PenStv43 und das tetramere Streptavidin keine Wechselwirkung mit dem GFP-Antikörper auf, während EGFP und PenEGFP ein deutliches Signal liefern (Abb. 393). Durch den spezifischen Antikörper-Nachweis konnte somit die Identität der rekombinanten Expressionsprodukte bestätigt werden.

Der reine Identitätsnachweis durch spezifische Antikörper sagt jedoch noch nichts über die Funktionalität eines Proteins aus. Im Falle des EGFP bzw. PenEGFP ist die Funktionalität durch die beobachtete grüne Färbung sowie durch die UV-Aktivität erwiesen. Die Funktionalität der beiden rekombinanten streptavidinhaltigen Proteine (Stv43 und PenStv43) kann hingegen nur ermittelt werden indem man sie auf ihre Fähigkeit zur Bindung von Biotin testet.
Auch dies kann durch einen Chemilumineszenz-Nachweis (s. Kap. 6.7.11) erfolgen, wobei allerdings kein Antikörper im eigentlichen Sinne sondern biotinylierte Horseradish peroxidase (Biotin-HRP) zum Einsatz kommt. Da die auf der Nitrocellulosemembran gebundenen streptavidinhaltigen Proteine jedoch zuvor denaturierend aufgereinigt wurden, ist nur mit einer sehr geringen Affinität gegenüber Biotin-HRP zu rechnen.
Für diesen Funktionsnachweis wurden jeweils 2µl der aufgereinigten Expressionsprodukte erneut auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Als Kontrollsubstanz diente auch in diesem Falle 1µl einer Lösung (5µg/µl) mit kommerziell erhältlichem tetrameren Streptavidin. Das Auftrageschema entsprach dem Muster in Abb. 391.
Nach der Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran erfolgte die einstündige Inkubation mit Biotin-HRP (ThermoFisher Scientific) bei einer Verdünnung von 1:500. Das Ergebnis nach der Visualisierung durch Chemilumineszenz ist in Abb. 394 dargestellt.

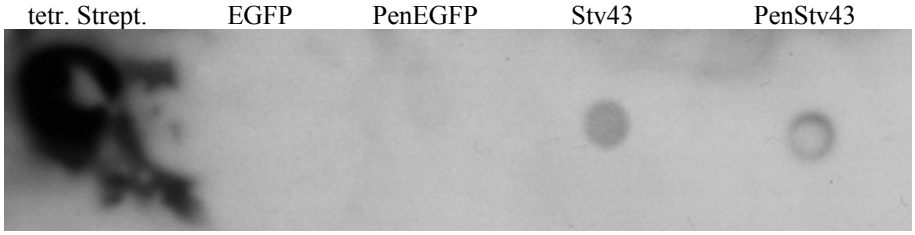


Abb. 394: Dot-Blot nach Inkubation mit Biotin-HRP

Das als Positivkontrolle dienende kommerzielle Streptavidin zeigt in Abb. 394 eine so starke Lumineszenz, dass es bereits nach einer kurzen Belichtungszeit zu einer übermäßigen Schwärzung des Röntgenfilmes kommt. Dies lässt darauf schließen, dass die nicht denaturierte Form des tetrameren Streptavidins große Mengen an Biotin-HRP bindet. Die beiden rekombinanten Proteine mit dimerem Streptavidin (Stv43 und PenStv43) liefern hingegen nur schwache, aber dennoch deutlich sichtbare Signale.
Somit sind die beiden streptavidinhaltigen Expressionsprodukte durchaus funktionell und in der Lage, Biotin zu binden. Die im Gegensatz zum kommerziellen Streptavidin viel geringere Affinität gegenüber Biotin ist darauf zurückzuführen, dass sie nach der Aufreinigung größtenteils in denaturierter Form vorliegen. Die in diesem Falle als Negativkontrolle dienenden EGFP-haltigen Expressionsprodukte (EGFP und PenEGFP) binden hingegen kein Biotin und führen somit auch zu keinerlei Signal.

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1. PEG-Derivatisierung von Oligonukleotiden

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer effizienten Synthesemethode zur schnellen, flexiblen und kostengünsigen Herstellung von einseitig, beidseitig-symmetrisch sowie von beidseitig-asymmetrisch PEG-derivatisierten Oligonukleotiden unter besonderer Berücksichtigung der Anforderungen einer späteren großtechnischen Synthese.
Um eine möglichst hohe biologische Verträglichkeit zu erreichen, wurde die Verbindung zwischen Oligonukleotid und Polyethylenglykol durch die Knüpfung von Amidbindungen unter Verwendung von NHS-Estern realisiert.
Für eine spätere großtechnische Verwirklichung mußten die Reaktionsparameter auf einen möglicht hohen Umsatz hin optimiert, sowie die Anzahl der Aufreinigungsschritte auf ein Minimum reduziert werden. Die wichtigste Vorraussetzung für eine effiziente PEG-Derivatisierung war dabei die möglichst vollständige Aminofunktionalisierung sowohl am 5´-Terminus als auch am 3´-Terminus des Ausgangsoligonukleotids. Bei einer asymmetrischen Derivatisierung mußte darüber hinaus eine der beiden terminalen Aminogruppen temporär geschützt werden, wozu verschiedene Lösungsansätze angegegangen wurden.

5.1.1. Optimierung der Oligonukleotidsynthese

Um bereits im Vorfeld, während der Oligonukleotidsynthese, eine möglichst hohe Ausbeute an Ausgangsoligonukleotid zu erreichen, war eine Optimierung der Standard-Syntheseprotokolle des verwendeten Oligonukleotidsynthesizers (Expedite 8909) notwendig.
Durch die Verwendung doppelter Kopplungszyklen (s. Kap. 6.2.1) gelang es, den Anteil der verkürzten Sequenzen, welche sich während der Synthese zwangsläufig durch unvollständige Kopplung anreichern, stark herabzusetzen. So konnte die Ausbeute bei einem 1µmol-Ansatz eines 18mer Oligonukleotidthiophosphats (Sequenz ONT1) um fast zwei Drittel von durchschnittlich 240nmol (24%) auf 380nmol (38%) gesteigert werden.
Die Verdopplung der Standard-Einwaage an Trägermaterial von 1µmol auf 2µmol führte zwar nicht zu einer Erhöhung der Gesamtausbeute, bezogen auf die Trägereinwaage, jedoch wurde es auf diese Weise möglich, mit nur einer Synthese eine Stoffmenge von durchschnittlich 580nmol anstelle von 380nmol ohne Qualitätsverlust zu produzieren.
Ein weiterer wichtiger Faktor für eine hohe Endausbeute an PEG-derivatisierten Oligonukleotiden ist, sowohl bei der einseitigen als auch bei der beidseitigen Derivatisierung, eine hohe Kopplungeffizienz des 5´-Aminomodifiers, um am Ausgangsoligonukleotid eine möglichst hohe Menge an 5´-Aminogruppen zu generieren. Auch hier erwies sich die Verwendung eines doppelt hintereinander durchgeführten Kopplungszyklus als vorteilhaft, während durch einen verlängerten Kopplungszyklus kein positiver Effekt erzielt werden konnte (Abb. 115).

5.1.2. Einseitige und beidseitig symmmetrische PEG-Derivatisierung

Die einfachste Möglichkeit zur PEG-Derivatisierung aminofunktionalisierter Oligonukleotide bestand in der direkten Umsetzung eines am 5´- oder am 3´-Terminus einfach aminomodifizierten Oligonukleotids oder in der gleichzeitigen Umsetzung beider Enden eines beidseitig aminomodifizierten Oligonukleotids mit demselben NHS-aktivierten Polyethylenglykol (Abb. 117).
Da die stark hygroskopischen und hydrolyseempfindlichen NHS-Ester in wässrigen Puffersystemen sehr schnell hydrolysieren, erwies sich die portionsweise Zugabe des PEG-NHS als Feststoff, oder gelöst in wasserfreiem ACN bzw. DMF, als notwendig. Als optimaler

Kompromiss zwischen hohem Überschuss und schneller Hydrolyse erwies sich die fünf- bis zehnmalige Zugabe eines jeweils zweifachen Überschusses an PEG-NHS bei einer jeweiligen Reaktionszeit von 5min bei 37°C. Dies bewirkte zwangsläufig einen hohen Gesamtüberschuss an hydrolysiertem PEG-OH, welcher nach der Umsetzung chromatographisch von Reaktionsansatz abgetrennt werden mußte.
Eine Abtrennung über RP-HPLC erwies sich als nicht praktikabel, da hydrolysierte Polyethylenglykole eine ähnliche Retentionszeit aufwiesen wie die Oligonukleotid-PEG Konjugate und darüber hinaus nicht über UV-Absorption detektierbar waren (Abb. 107).
Da Polyethylenglykole, im Gegensatz zu den Oligonukleotid-PEG Konjugaten, jedoch keine Wechselwirkung in der IE-Chromatografie aufwiesen und sofort mit dem Totvolumen der Säule eluierten (Abb. 108), erwies sich eine Aufreinigung des Reaktionsansatzes über IE-FPLC mit anschließender Entsalzung über Ultrafiltration als ideale Aufreinigungsstrategie.
Eine zunächst durchgeführte Endaufreinigung über RP-HPLC zog eine verlustreiche finale Umsalzung nach sich, um die aus dem TEAA-Puffer der RP-HPLC stammenden Ammoniumionen durch Natriumionen auszutauschen. Der Verzicht auf diese abschließende RP-HPLC führte zu einer Steigerung der Gesamtausbeute um ca. 15% ohne erkennbaren Qualitätsverlust.
Insgesamt ergaben sich, je nach Muster der PEGylierung, Ausbeuten bezüglich des eingesetzten Ausgangsoligonukleotids von ca. 50% bis 70% (s. Tab. 16)

Endprodukt (mit mPEG derivatisiertes ONT1)	Prozentuale Ausbeute bezüglich der eingesetzten Stoffmenge an ONT1
mPEG400-ONT1	61%
mPEG1000-ONT1	69%
mPEG2000-ONT1	66%
mPEG400-ONT1-mPEG400	43%
mPEG1000-ONT1-mPEG1000	47%
mPEG2000-ONT1-mPEG2000	45%
ONT1-mPEG400	48%
ONT1-mPEG1000	55%
ONT1-mPEG2000	51%

Tab. 16: Ausbeuten an mPEG-derivatisierten Oligonukleotidthiophosphaten (ONT1) bei verschiedenen PEGylierungsmustern

Bei der Umsetzung von einseitig am 3´-Terminus oder von beidseitig aminofunktionalisierten Oligonukleotiden zeigte sich eine nur unvollständige Umsetzung des 3´-Endes, was in vielen Fällen entweder eine zusätzliche Aufreinigung über RP-HPLC vor der eigentlichen IE-FPLC oder ein fraktionelles Auffangen des Eluats der IE-FPLC nötig machte. Als Grund für diese unvollständige Umsetzung stellten sich inaktive bzw. fehlende trägergenerierte 3´-Aminogruppen heraus, was eine genauere Untersuchung der verwendeten Aminoträger nach sich zog.
Eine abschließende Analyse der aufgereinigten Endprodukte mittels MALDI-TOF MS führte in allen Fällen zu einer hervorragenden Übereinstimmung mit den theoretischen Werten und somit zu einem eindeutigen Identitätsnachweis. Bei der Verwendung von polydispersem

Polyethylenglykol war sogar die Verteilung von ± n•44Da, bedingt durch die einzelnen Ethylengykoleinheiten, zu erkennen.

5.1.3. Handelsübliche Aminoträger

Bei der beidseitigen Derivatisierung eines Oligonukleotids mittels PEG-NHS Ester war es besonders wichtig, dass das Ausgangs-Oligonukleotid an beiden Enden möglichst vollständig aminofunktionalisiert war. Während die 5´-Aminofunktionalisierung durch ein Aminolinker-Phosphorigsäureesteramid bereitgestellt wird, wird die 3´-Aminofunktion durch den bei der Synthese verwendeten Amino-Polymerträger generiert. Nach der Abspaltung vom Support und während der Abspaltung der Seitenkettenschutzgrupen mittels konz. Ammoniak liegt die 3´-Aminogruppe in ungeschützter Form vor und kann durch das bei der β–Eliminierung der Cyanoethylschutzgruppen entstehende Acrylnitril alkyliert werden[(132), (133)]. Daher wurden drei verschiedene Aminoträger untersucht, um das Trägermaterial zu ermitteln, welches die meisten funktionellen Aminogruppen am 3´-Ende bereitstellt. Zum Einsatz kamen hierbei „Amino-On CPG“ von Proligo (Abb. 157) sowie „3´-Aminomodifier C7 CPG“ (Abb. 158) und „3´-PT Aminomodifier C6 CPG“ (Abb. 159) von Glen Research.
Bei der Untersuchung über RP-HPLC, direkt nach der Synthese einer Testsequenz und deren Abspaltung vom Trägermaterial, zeigte sich bei der Verwendung des 3´-PT Aminomodifiers C6 CPG (Glen Research) ein deutlicher Doppelpeak, welcher auch bei einer Verlängerung der Abspaltdauer erhalten blieb (Abb. 163). Die Synthesen auf Amino-On CPG (Proligo) und 3´-Aminomodifier C7 CPG (Glen Research) lieferten hingegen Einzelpeaks (Abb. 161 und Abb. 162).
Eine Quantifizierung der Peakflächen des RP-HPLC Chromatogramms nach einer 3´-Derivatisierung mit mPEG400-NHS zeigte im Falle des 3´-PT Aminomodifier C6 CPG lediglich einen Umsatz von 50% und bestätigte die schlechte Qualität dieses Trägermaterials (Abb. 167).
Die Verwendung des 3´-Aminomodifier C7 CPG (Glen Research) lieferte einen Umsatz von 70%, während die auf Amino-On CPG (Proligo) synthetisierten Sequenzen immerhin zu 75% am 3´-Ende derivatisiert wurden (Abb. 165 und Abb. 166).
Das qualitativ und quantitativ beste Ergebnis lieferte somit die Verwendung von Amino-On CPG (Proligo) zur Oligonukleotidsynthese, obwohl dieses das mit Abstand preisgünstigste Produkt dieser Auswahl war.

5.1.4. Asymmetrische PEG-Derivatisierung in Lösung

Ein weitaus wichtigeres Ziel dieser Arbeit war, neben der einseitigen und beidseitig symmetrischen PEG-Derivatisierung von Oligonukleotiden, die Etablierung einer Methode zur beidseitigen asymmetrischen Derivatisierung mit zwei unterschiedlichen Polyethylenglykolen.
Die scheinbar einfachste Möglichkeit hierzu bestand darin, eine 5´- und 3´-aminofunktionalisierte Sequenz herzustellen und die 5´-MMT-Schutzgruppe des Aminomodifiers nach der Ammoniakabspaltung am Oligonukleotid zu belassen. Nach der Umsetzung des ungeschützten, aminofunktionalisierten 3´-Endes in Lösung mit dem ersten mPEGa-NHS wurde die Trityl-Schutzgruppe abgespalten und das nun freie 5´-Ende mit einem zweiten mPEGb-NHS derivatisiert (Abb. 168).
Grundvoraussetzung für diese Vorgehensweise ist jedoch, dass die MMT-Schutzgruppe während der Derivatisierung des 3´-Endes stabil an der 5´-Aminogruppe verbleibt, um eine symmetrische Derivatisierung als Nebenreaktion auszuschließen.
RP-HPLC Untersuchungen von selbst synthetisierten sowie von mehreren kommerziell erworbenen, 5´-aminomodifizierten und MMT-geschützten Oligonukleotiden zeigten jedoch,

dass bereits vor einer weiteren Umsetzung mit PEG-NHS das Verhältnis von MMT-off Sequenzen zu MMT-on Sequenzen oftmals massiv in Richtung MMT-off verschoben ist. Dies bedeutet, dass bereits direkt nach der Abspaltung vom Support, bzw. nach der Trocknung der Oligonukleotide ein Großteil der Sequenzen keine MMT-Gruppe trägt oder nicht mit dem Aminolinker-Phosphorigsäureesteramid funktionalisiert wurde. Nach einer Isolierung der vorhandenen MMT-on Sequenzen über RP-HPLC und einer erneuten Auftragung des Eluats stellte sich heraus, dass selbst bei sofortiger Weiterverwendung erneut ca. 10% der Sequenzen ihre MMT-Gruppe eingebüßt haben.
Eine Lagerung der gelösten, isolierten MMT-on Sequenzen bei 4°C führte zu einem ca. 50%igen Verlust der MMT-Gruppe, während nach einer Lagerung der gelösten Sequenzen bei -20°C fast 95% der Sequenzen die Schutzgruppe behielten. Eine Trocknung im Speedvac führte, je nach Verlauf der Trocknung, zu einem MMT-Verlust von 10% bis 50%, während die Kombination aus längerer Lagerung im gelösten Zustand und anschließender Trocknung oftmals einen 80%igen Verlust der MMT-Gruppe nach sich zog. Durch die Zugabe von 0,01M $NaHCO_3$, zur Aufrechterhaltung eines alkalischen Milieus, konnte die MMT-Abspaltung während der Trocknung oftmals eingedämmt werden, ein erneutes Lösen und Lagern führte jedoch trotzdem zu einem oft vollständigen Verlust der MMT-Gruppe.
Die Ergebnisse zeigten, dass bei einer entsprechender Lagerung (lyophilisiert bei -20°C) und bei einer schnellen Weiterverwendung die MMT-Gruppe auch unter Reaktionsbedingungen stabil bleiben und das 5´-Ende erfolgreich vor einem Umsatz mit NHS-Ester schützen konnte.
Der Verbleib der Gruppe war allerdings stark vom Verlauf des Trocknungsprozesses nach der Ammoniakabspaltung abhängig. Trocknete das abgespaltene Oligonukleotid schnell durch, so verblieb die MMT-Gruppe meist an der 5´-Aminofunktion. Stieg die Temperatur jedoch während der Trocknung an, so konnte dies sehr schnell zu einem totalen Verlust der Schutzgruppe führen.
Selbst bei Synthesen im kleineren Maßstab ist dieses unkalkulierbare Verhalten nicht zu akzeptieren. Bei Großmengen-Synthesen kann es sehr schnell zum Problem werden. Hier wäre der Verlust eines kompletten Ansatzes wesentlich kostspieliger. Von daher erweist sich dieser Syntheseweg für eine beidseitige asymmetrische PEG-Derivatisierung, trotz seiner großen Flexibilität, als ungeeignet.

5.1.5. Präsynthetische Derivatisierung des Trägers

Eine weitere Möglichkeit zur beidseitigen asymmetrischen Derivatisierung eines Oligonukleotids mit unterschiedlichen NHS-aktivierten Polyethylenglykolen besteht in der Verwendung des 3´-Amino-Modifier C7 CPG von Glen Research (s. Abb. 190). Dieser bifunktionelle Support weist neben der Trityl-Gruppe in 5´-Richtung, welche als Startpunkt für die Oligonukleotidsynthese fungiert, auch eine Fmoc-geschützte Aminogruppe am 3´-Ende auf. Die beiden Gruppen sind durch einen C6-Linker miteinander verbunden, welcher selbst über eine Succinat-Brücke am CPG-Träger verankert ist.
Diese zusätzliche Aminofunktion bot die Möglichkeit, das Trägermaterial noch vor der eigentlichen Oligonukleotidsynthese (präsynthetisch) mit einem PEG-NHS zu funktionalisieren. Nach der Synthese befand sich diese Polyethylenglykolkette am 3´-Terminus des Oligonukleotids. Die Umsetzung am 5´-Ende erfolgte nach der Abspaltung vom Träger und der HPLC-Abtrennung der 3´-unmodifizierten Sequenzen in Lösung (s. Abb. 395).

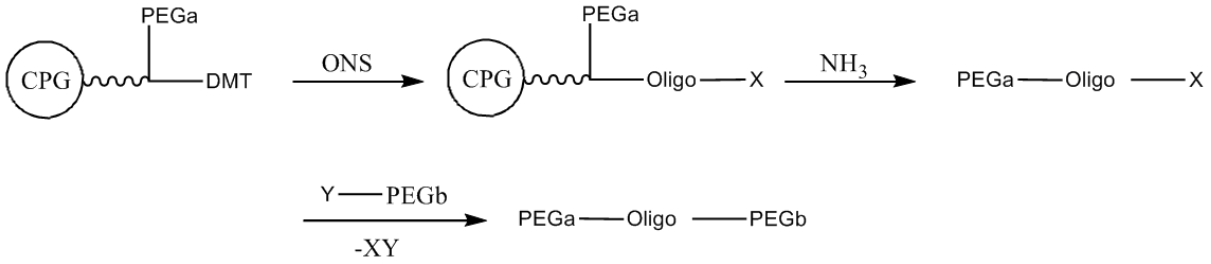


Abb. 395: Prinzip der Oligonukleotidsynthese auf einem präsynthetischen PEG-derivatisierten Träger

Die präsynthetischen Umsetzungen des Trägermaterials mit mPEG400-NHS bzw. mPEG2000-NHS erfolgten, nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, in trockenem DMF mit Diisopropylethylamin (DIPEA) als Hilfsbase. Bei einigen Ansätzen wurden darüber hinaus noch evt. vorhandene, unumgesetzte Aminogruppen zur Vermeidung von Nebenreaktionen mit Acetanhydrid maskiert.
Nach der Abspaltung des fertig synthetisierten Oligonukleotids vom Träger zeigten Untersuchungen mittels RP-HPLC, dass sowohl bei der präsynthetischen Umsetzung des Trägers mit mPEG400-NHS als auch mit mPEG2000-NHS nur eine partielle Derivatisierung stattgefunden hatte. Auch ein zusätzlicher Capping-Schritt vor der Oligonukleotidsynthese brachte keine Verbesserung der Synthesequalität. Der Anteil an 3´-derivatisierten Sequenzen liegt im Falle des mPEG400 bei ca. 70%, während er bei mPEG2000 nur ca. 40% beträgt. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Reaktion sehr nahe an der Trägeroberfläche stattfindet und die sterische Hinderung beim voluminöseren mPEG2000 wesentlich höher ist als bei mPEG400.
Für die Synthese eines beidseitig derivatisierten Produkts bietet es sich daher an, die trägergebundene 3´-Derivatisierung mit einem weniger sterisch gehinderten Polyethylenglykol wie z.B. mPEG400 durchzuführen. Die 5´-Derivatisierung in Lösung kann hingegen nach der Abspaltung vom Träger und der Abtrennung der 3´-unmodifizierten Sequenzen auch mit einem sterisch anspruchvolleren Polyethylenglykol wie z.B. mPEG2000 durchgeführt werden.
Für eine in großem Maßstab durchgeführte universelle Synthesemethode beidseitig asymmetrisch PEG-derivatisierter Oligonukleotide erweist sich diese Strategie jedoch, aufgrund der aufwändigen Vorbehandlung des Trägermaterials sowie der fehlenden Flexibilität bei der 3´-Derivatisierung, als eher ungeeignet.

5.1.6. Postsynthetische trägergebundene Derivatisierung mittels PEG-Amidit

Eine relativ einfache Möglichkeit zur beidseitigen asymmetrischen Derivatisierung besteht in der Verwendung eines Aminoträgers, für die spätere 3´-Derivatisierung mit einem PEG-NHS in Lösung, zusammen mit der direkten Derivatisierung des 5´-Terminus während der Oligonukleotidsynthese durch die Verwendung eines Polyethylenglykol-Phosphorigsäureesteramids als letzten Synthesebaustein der Oligonukleotid-Festphasensynthese (s. Abb. 206). Diese PEG-Phosphorigsäureesteramide sind allerdings nur in einer begrenzten Auswahl kommerziell verfügbar und auch relativ kostspielig. Von den auf dem Markt erhältlichen PEG-Phosphorigsäureesteramiden (polydisperses PEG2000 und PEG4000) kam im Rahmen dieser Arbeit lediglich das *Polyethyleneglycol 2000 CED* Phosphorigsäureesteramid (Abb. 207) der Firma ChemGenes zum Einsatz.
Nach der Synthese der Oligonukleotidsequenz erfolgte im letzten Syntheseschritt die Ankopplung des PEG2000-Phoshorigsäureesteramids. Dazu wurde ein modifiziertes Kopplungsprotokoll für den Expedite 8909 DNA-Synthesizer entwickelt, welches 2 verlängerte Kopplungszyklen von je 15min Dauer und einen 20fachen Überschuss an Phosphorigsäureesteramid beinhaltet (s. Abb. 208).

Eine Untersuchung über RP-HPLC, nach der Abspaltung vom Trägermaterial, ergab ein Verhältnis von verkürzten Sequenzen zu DMT-on Sequenzen mit PEG2000-Derivatisierung am 5´-Ende von etwa 50:50, was bei einer Gesamtausbeute von 20% bezüglich der Trägereinwaage eine durchschnittliche Kopplungseffizienz bedeutet.
Die Verwendung des Polyethyleneglycol 2000 CED Phosphorigsäureesteramids zur trägergebundenen 5´-Derivatisierung führte somit trotz einer möglichen sterische Hinderung zu annehmbaren Kopplungsausbeuten.
Aufgrund der hohen Kosten des Synthesebausteins ist jedoch auch diese Methode zur flexiblen großtechnischen Herstellung eines breiten Spektrums beidseitig asymmetrisch PEG-derivatisierter Oligonukleotide ungeeignet.

5.1.7. Postsynthetische trägergebundene Derivatisierung mittels PEG-NHS

Im Gegensatz zur präsynthetischen Trägermodifizierung mit anschließender Oligonukleotidsynthese beruht die Idee einer postsynthetischen trägergebundenen asymmetrischen Modifizierung auf einer Umsetzung der 5´-Aminofunktion eines noch mit dem Trägermaterial verbundenen Oligonukleotids mit einem ersten PEG-NHS (z.B. mPEG2000-NHS). Nach der Abspaltung vom Träger und der Abtrennung unumgesetzter Sequenzen fand die Umsetzung des nun freien 3´-Endes mit einem anderen PEG-NHS (z.B. mPEG400-NHS) in Lösung statt (s. Abb. 396).

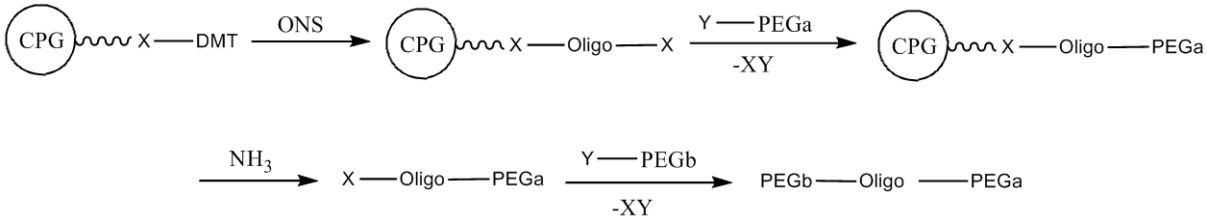


Abb. 396: Strategie der postsynthetischen TrägerDerivatisierung

Da eine größere Polyethylenglykolkette die Retentionszeit eines Oligonukleotids in der RP-HPLC stark erhöht, bestand die Möglichkeit, die 5´-Derivatisierung direkt als „Label“ zur Abtrennung von verkürzten bzw. nicht-derivatisierten Sequenzen zu nutzen.
Leider zeigte sich auch hier, dass die trägergebundene Umsetzung mit einem großen Polyethylenglykol, wie z.B. mPEG2000, aufgrund der sterischen Hinderung bereits im ersten Schritt zu nur sehr geringen Ausbeuten von maximal 10 – 30% führte.
Darüber hinaus wiesen Endprodukte, welche am 5´-Ende mit einem polydispersen mP2000 und am 3´-Ende mit einem monodispersen mPEG400 derivatisiert wurden, in der RP-HPLC annähernd die gleiche Retentionszeit auf wie nur einseitig am 5´-Ende mPEG2000-derivatisierte Zwischenprodukte. Da die Verwendung eines Aminoträgers zur Generierung der 3´-Aminofunktion allerdings niemals zu einer quantitativen Bereitstellung funktioneller Aminogruppen führt, waren im Reaktionsgemisch zwangsläufig immer am 3´-Ende unumgesetzte Sequenzen vorhanden, deren Abtrennung praktisch nicht möglich ist.
Betrachtete man die Eigenschaften der Polyethylenglykole genauer, so wurde deutlich dass im Falle der 5´-Derivatisierung mit mPEG2000 und der 3´-Derivatisierung mit mPEG400 die Abtrennung der Nebenprodukte auch theoretisch unmöglich ist. Das mPEG400 besteht aus 8 Monomereinheiten Ethylenglykol, das nur polydispers verfügbare mPEG2000 weist hingegen eine Polydispersität von mindestens D=1,07 auf was bei ca. 2000Da einer Massenunschärfe im Größenordnungsbereich von ebenfalls 8 Monomereinheiten entspricht. Aus diesem Grund überlappen sich die Molekülmassen von einseitig mPEG2000-derivatisiertem Zwischenprodukt und beidseitig derivatisiertem Endprodukt zwangsläufig, was eine Trennung prinzipiell ausschließt (Abb. 214).

Um quantitativ ein Produkt zu erhalten, welches definierte beidseitige Derivatisierungen trägt, war es demnach notwendig, die erste (trägergebundene) Umsetzung mit dem monodispersen mPEG400-NHS vorzunehmen (Abb. 215). Erst nach der Aufreinigung dieses einseitig derivatisierten Produkts konnte die Umsetzung des anderen Endes mit dem polydispersen mPEG2000-NHS in Lösung erfolgen. Auf diese Weise war nach der unvollständigen 3´-Derivatisierung mit mPEG2000 lediglich einseitig mPEG400-derivatisiertes Oligonukleotid-Thiophosphat vom beidseitig derivatisierten Zielprodukt abzutrennen, was über RP-HPLC kein Problem darstellte.
Ein weiterer Vorteil, das noch trägergebundene Oligonukleotid zuerst mit mPEG400-NHS umzusetzen, lag auch in der, im Gegensatz zum mPEG2000, wesentlich geringeren sterischen Hinderung des mPEG400. Dies führte bereits im ersten Schritt zu einer wesentlich höheren Ausbeute. Allerdings war, aufgrund des Polydispersitätsproblems (Abb. 214) und der standardmäßigen Syntheserichtung von 3´ nach 5´, das PEGylierungsmuster in Form des polydispersen mP2000 am 3´-Terminus und des monodispersen mP400 am 5´-Terminus zunächst vorgegeben.
Bezüglich der Trägereinwaage betrug die durchschnittliche Ausbeute bei dieser Synthesestrategie ca. 20% an 5´-mPEG400-derivatisiertem Zwischenprodukt und ca. 8% an beidseitig derivatisiertem Endprodukt (mPEG400-Oligo-mPEG2000).
Die über MALDI-TOF MS ermittelten Molekülmassen stimmten genau mit den theoretisch berechneten Massen überein, was die Qualität der Synthese und die Reinheit des Endprodukts bestätigte.
Trotz der auf den ersten Blick eher geringen Endausbeute und der zunächst fehlenden Flexibilität des PEGylierungsmusters, führte die Strategie der postsynthetischen Trägermodifizierung zu einem sauberen Endprodukt und ist auch im größeren Maßstab kostengünstig durchführbar. Die Hauptverluste lagen im Wesentlichen bei der eigentlichen Oligonukleotidsynthese, noch vor der 5´-Derivatisierung mit mPEG400. Die Synthesezyklen führen von Haus aus, aufgrund unvollständiger Kopplungen (trotz modifiziertem Protokoll mit doppelten Kopplungszyklen), zu einem Verhältnis der verkürzten Sequenzen zur Zielsequenz von ca. 50:50 bis 30:70. Auch liegt die effektive Beladung der Trägermaterialien oft bis zu 50% unter der Angabe des Herstellers. Legt man dies bei der Berechnung der Ausbeute zu Grunde, so führen 10µmol Trägereinwaage zu einer theoretischen Ausbeute von 2,5 - 3,5µmol an kompletten Sequenzen. Dies entspricht einer Ausbeute von 25 - 35% und liegt deutlich näher an dem bei dieser Synthesestrategie erreichten Wert von 20% für das einseitig derivatisierte Zwischenprodukt. Eine weitere Verlustquelle war die nur ca. 70%ige Umsetzung mit mPEG2000-NHS am 3´-Ende. Die Ursache hierfür liegt beim verwendeten Amino On CPG, welches zu einem hohen Prozentsatz keine, oder nicht-funktionelle Aminogruppen am 3´-Ende generiert (s. Kapitel 4.2.1).
Ebenfalls hohe Verluste waren bei der Abtrennung des einfach derivatisierten Zwischenprodukts von den verkürzten Sequenzen mittels RP-HPLC zu verzeichnen. Da die Retentionszeiten und somit auch die Peaks sehr nahe beieinander liegen, mußte für eine quantitative Abtrennung ein großer Teil am Anfang des Produktpeaks verworfen werden.
Hier wäre auf jeden Fall noch Verbesserungspotential vorhanden, entweder durch Verwendung von RP-HPLC-Säulen mit höherer Trennleistung oder durch mehrmaliges erneutes Auftragen der bisher verworfenen Eluate.

5.1.8. Verwendung von 5´-Phosphorigsäureesteramiden

Um unter Beibehaltung der für die postsynthetische, trägergebundene, beidseitig asymmetrische Derivatisierung etablierten Synthesestrategie zu einem Produkt zu gelangen, welches am 5´-Ende mit einem polydispersen mPEG2000 und am 3´-Ende mit einem

monodispersen mPEG400 derivatisiert ist, müßte die erste Umsetzung des trägergebundenen Oligonukleotids am 5´-Ende mit dem polydispersen mPEG2000-NHS erfolgen.
Aufgrund des Polydispersitätsproblems (Abb. 214) ist in diesem Falle jedoch, nach der mPEG400 Derivatisierung am 3´-Ende in Lösung, keine Abtrennung von den am 3´-Ende nicht PEGylierten Sequenzen möglich. Die erste Umsetzung des trägergebundenen Oligonukleotids muß also auf jeden Fall mit dem monodispersen mPEG400-NHS erfolgen. Man benötigt demnach ein freies 3´-Ende, während die Oligonukleotidkette mit ihrem 5´-Ende am Träger verankert sein muß (Abb. 231). Dies bedingte eine Umkehrung der Syntheserichtung von 3´→5´auf 5´→3´ und wurde nur durch die Verwendung spezieller Nukleosid-5´-Phosphorigsäureesteramide ermöglicht, bei denen die Positionen der DMT-Schutzgruppe und der Phosphorigsäureesteramidgruppe im Gegensatz zu den Standardbausteinen vertauscht sind (Abb. 230).
Die durchgeführten Synthesen zeigten dabei, dass sowohl die Verwendung von 5´-Phosphorigsäureesteramiden als auch die Verwendung von Standardbausteinen eine Ausbeute von ca. 10% bzgl. Trägereinwaage an beidseitig derivatisiertem Endprodukt ergeben. Beide Syntheserichtungen führen demnach zu ähnlichen Ausbeuten, was bedeutet, dass die Reaktivität beider Arten von Phosphorigsäureesteramiden in etwa gleich hoch ist. Auch bei der durch MALDI-TOF MS ermittelten Synthesequalität war kein Unterschied feststellbar.
Durch die zusätzliche Möglichkeit zur Steuerung der Syntheserichtung konnte die anwendungsbezogene Flexibilität der postsynthetischen, trägergebundenen, beidseitig asymmetrischen Derivatisierungstrategie enorm gesteigert werden. Durch die alternative Verwendung von 5´-Phosphorigsäureesteramiden oder 3´-Phosphorigsäureesteramiden ist somit die Möglichkeit zur Generierung nahezu jedes beliebigen PEGylierungsmusters, auch mit polydispersen Polyethylenglykolen, gegeben.
Aufgrund des wesentlich höheren Preises der schwieriger herzustellenden und im Laboralltag selten verwendeten 5´-Phosphorigsäureesteramide ist eine großtechnische 5´→3´ Synthese allerdings mit wesentlich höheren Kosten verbunden als eine Standardsynthese in 3´→5´ Richtung.

5.1.9. Derivatisierung mit monodispersem PEG

Die Synthesestrategie der postsynthetischen, trägergebundenen, beidseitig asymmetrischen Derivatisierung ist natürlich nicht auf die Verwendung von polydispersen Polyethylenglykolen beschränkt. Vielmehr kann durch die Verwendung von monodispersen Polyethylenglykolen das Polydispersitätsproblem umgangen werden, wodurch die Flexibilität dieser Methode erst richtig zur Anwendung kommt.
Da es beim Einsatz zweier unterschiedlich langer, aber jeweils monodisperser Polyethylenglykole nicht zu einer Überschneidung von polydispersen Molekülmassen kommen kann, war es gleichgültig, ob die erste, trägergebundene Umsetzung mit dem kürzeren PEG oder mit dem längerkettigen PEG erfolgt. Bei der abschließenden Aufreinigung über RP-HPLC nach der zweiten Umsetzung in Lösung war in jedem Falle eine Abtrennung der am 3´-Ende unumgesetzten Produkte möglich. Einzige Bedingung hierfür war, dass der Unterschied der Retentionszeiten in der RP-HPLC groß genug ist, was jedoch sogar bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten kürzesten PEG-Kette, dem mPEG400, der Fall war.
Eine mit mPEG400 durchgeführte Derivatisierung führte zu einer Zunahme der Retentionszeit von ca. einer Minute im Vergleich zum unmodifizierten oder einseitig mPEG1000 derivatisierten Produkt, während eine mit mPEG1000 durchgeführte Derivatisierung sogar zu einer Retentionszeiterhöhung von 2 Minuten relativ zum unmodifizierten oder einseitig mPEG4000 derivatisierten Produkt führte.
Bei der trägergebundenen Derivatisierung des 5´-Endes mit dem sterisch weniger anspruchsvollen mPEG400-NHS ergab sich nach der Ammoniakabspaltung im

Chromatogramm der analytischen RP-HPLC ein Peakflächenverhältnis von nicht derivatisierten Sequenzen zu derivatisierter Sequenz von ca. 50:50 was einer Rohausbeute von 50% entspricht. Bei der trägergebundenen Derivatisierung des 5´-Endes mit mPEG1000-NHS hingegen lag der Flächenanteil des Produktpeaks, aufgrund der wesentlich höheren sterischen Hinderung, nur bei ca. 20-25%.
Nach der Aufreinigung der einseitig am 5´-Ende derivatisierten Zwischenprodukte wurde der Einfluß der sterischen Hinderung besonders deutlich. Betrug die Zwischenausbeute bei der Verwendung des kurzkettigen mPEG400 noch 25% bezüglich der Trägereinwaage, so sank sie bei der Verwendung des sterisch anspruchvolleren mPEG1000 auf lediglich 10%.
Dieser Reaktivitätsunterschied spiegelte sich natürlich auch in der Gesamtausbeute der beidseitig asymmetrisch derivatisierten Endprodukte wieder. Im Falle des mPEG400-ONT1-mPEG1000, bei dem die trägergebundene 5´-Umsetzung mit mPEG400-NHS erfolgte, lag die Endausbeute bei 13% bezüglich der Trägereinwaage. Im Falle des trägergebunden mit mPEG1000-NHS derivatisierten mPEG1000-ONT1-mPEG400 sank die Endausbeute hingegen auf 7,5% bezüglich der Trägereinwaage.
Messungen durch MALDI-TOF MS zeigten in beiden Fällen eine gute Synthesequalität mit einer Bestätigung der Produktidentität (s. Abb. 251 und Abb. 252).
Durch eine Umkehrung der Syntheserichtung könnte die erste trägergebundene Umsetzung auch im Falle des mPEG1000-ONT1-mPEG400 mit dem sterisch günstigeren mPEG400-NHS erfolgen, wodurch die Endausbeute fast verdoppelt werden könnte. Betrachtet man jedoch die hohen Kosten der dazu benötigten 5´-Phosphorigsäureesteramide im Vergleich zu den relativ günstigen Kosten für Trägermaterial und für standardmäßige 3´-Phosphorigsäureesteramide, so wird klar, dass dieser Weg nicht rentabel ist. Eine Steigerung der Ansatzgröße unter Verwendung von Standardmaterialien ist in diesem Falle die günsigere Alternative.

5.2. Stabilitätstests gegenüber Nukleasen

Im Falle einer therapeutischen Anwendung sind Antisense-Oligonukleotide einer starken Nuklease-Aktivität im Blutserum ausgesetzt. Diese Nukleasen lassen sich im Wesentlichen in zwei große Gruppen aufteilen, die Exo- und die Endonukleasen. Exonukleasen greifen einen DNA-Strang terminal an, während Endonukleasen intramolekular spalten und somit auch zirkuläre DNA abbauen können. Sämtliche Nukleasen katalysieren die Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen von Nukleinsäuren, wobei die RNAsen spezifisch die auf Ribose basierende RNA, die DNAsen hingegen spezifisch die auf Desoxyribose basierende DNA angreifen.
Im humanen Serum spielen im Falle der DNAsen die 3´-Exonukleasen eine dominierende Rolle[(134)], aber auch die Einflüsse von 5´-Exonukleasen sowie Endonukleasen können nicht vernachlässigt werden.
Durch terminale Derivatisierungen kann der Angriffspunkt für Exonukleasen blockiert werden. Voluminöse terminale Derivatisierungen, wie die in dieser Arbeit verwendeten langkettigen Polyethylenglykole, können darüber hinaus das Oligonukleotid quasi einhüllen und sind somit theoretisch auch in der Lage, eine gewisse Abschirmung gegen den Angriff von Endonukleasen zu bewirken.
So lag ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit darin, durch in vitro-Abbauversuche Oligonukleotide mit unterschiedlichen PEG-Derivatisierungen auf ihre Stabilität gegenüber Exo- und Endonukleasen zu untersuchen. Als Modellenzym für eine 3´-Exonuklease diente die aus Schlangengift stammende Phosphodiesterase I, während als 5´-Exonuklease die aus Rindermilz gewonnene Phosphodiesterase II eingesetzt wurde. Stellvertretend für die Endonukleasen wurde S1-Endonuklease verwendet. Dabei kamen verschiedene Methoden zur Detektion der niedermolekularen Abbauprodukte bzw. des nicht abgebauten

Restoligonukleotids zur Anwendung, die eine unterschiedliche Leistungsfähigkeit und Aussagekraft boten.

5.2.1. Vergleich der unterschiedlichen Detektionsmethoden

5.2.1.1. Abbauuntersuchung mittels RP-HPLC

Erste Untersuchungen der enzymatischen Abbauprodukte erfolgten durch einfache RP-HPLC. Dabei kam ein Gradient zum Einsatz, welcher in den ersten Minuten nur sehr flach ansteigt, wodurch die sehr früh eluierenden kürzeren Abbauprodukte (Nukleoside, Nukleotide, Dinukleotide…) gut detektiert werden konnten. Gegen Ende führt ein stark ansteigender Acetonitrilgehalt zur Elution der größeren Fragmente bzw. des nicht abgebauten Restoligonukleotids.
Der prozentuale Flächenanteil der kürzeren Abbauprodukte an der Gesamtpeakfläche des Chromatogramms sollte eine erste Auskunft über die Abbaurate geben. Die absoluten Werte der Peakhöhen bzw. Flächen waren hingegen nicht aussagekräftig, da sich die allgemeine Signalstärke als sehr stark abhängig vom Alter der verwendeten Vorsäule erwies. Weitere Fehlerquellen, die eine Toleranz der Peakflächen-Verhältnisse um ca. ± 2% bewirkten, waren in erster Linie Störsignale, eine unregelmäßige gebogene Grundlinie sowie das starke Tailing (Schmieren) des Oligonukleotidpeaks bei > 20min (s. Abb. 399 bis Abb. 526).
Im Falle der beiden Exonukleasen zeigte selbst dieses einfache Detektionssystem, dass die terminalen Derivatisierungen ihren Zweck erfüllen. So konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass am 5´-Ende mPEG-derivatisierte Oligonukleotide, im Vergleich zum terminal unmodifizierten Oligonukleotid, eine stark erhöhte Stabilität gegenüber der 5´-Exonuklease aufwiesen, während beidseitig derivatisierte Oligonukleotide eine höhere Stabilität sowohl gegenüber dem Abbau durch 3´-Exonuklease (Abb. 254) als auch gegenüber dem Abbau durch 5´-Exonuklease (Abb. 255.) zeigten.
Im Falle der S1-Endonuklease schien es zunächst so, dass die Ausbildung der niedermolekularen Abbauprodukte bei beidseitig derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphaten etwas später erfolgt und auch nicht so ausgeprägt ist wie bei entsprechenden einseitig derivatisierten Sequenzen. Betrachtete man die HPLC-Chromatogramme der S1-Abbauversuche jedoch genauer, so wurde deutlich, dass sich das Signal des vermeintlichen Restoligonukleotids, im Falle einer beidseitigen PEG-Derivatisierung, schon nach kurzer Zeit in einen Doppelpeak aufspaltete. Dies war, wie spätere Untersuchungen durch Kopplung der chromatographischen HPLC-Analyse mit einem massenspektroskopischen Verfahren (MALDI-TOF MS) ergaben, darauf zurückzuführen, dass auch beidseitig derivatisierte Oligonukleotid-Thiophosphate durch die S1-Endonuklease intern gespalten wurden. Dabei entstanden zwei größere Fragmente mit jeweils einem entsprechenden mPEG-Rest am 3´- bzw. 5´-Ende (Abb. 278). Die Retentionszeiten dieser mPEG-haltigen Bruchstücke lagen im Bereich des nicht abgebauten Restoligonukleotids und führten zur Ausbildung des beobachteten Doppelpeaks. Eine längere Inkubationszeit führte zu einer weiteren internen Spaltung dieser Bruchstücke, wodurch im späteren Verlauf des Abbauexperiments zusätzliche Peaks niedermolekularer Abbauprodukte mit kürzeren Retentionszeiten entstanden. Eine nur noch geringe Änderung der Peakflächen-Verhältnisse nach 48h, was zuerst mit einer abnehmenden Enzymaktivität erklärt wurde, war auf diese weitere Spaltung zurückzuführen.
Eine alleinige Untersuchung über RP-HPLC reicht demnach zur vollständigen Beurteilung eines Abbauexperiments nicht aus. So eluieren, aufgrund der geringen Trennleistung der RP-HPLC, größere Bruchstücke eines nicht-PEG derivatisierten Vergleichsoligonukleotids sowie das nicht abgebaute Restoligonukleotid, trotz unterschiedlicher Länge, bei der gleichen Retentionszeit. Da mittels RP-HPLC keine Trennung zwischen Sequenzen der Länge n, n-1, n-2... möglich ist, würde demnach ein eventueller Abbau nicht detektiert werden.

5.2.1.2. Abbauuntersuchungen mittels Kopplung von RP-HPLC und MALDI-TOF MS

Da es aufgrund der schlechten Auflösung der RP-HPLC nicht möglich ist zu beurteilen, ob es sich bei einem Peak mit hoher Retentionszeit um ein vollständiges oder um ein teilweise abgebautes Oligonukleotid handelt, mußte eine Vorgehensweise gefunden werden, diese Peaks genauer zu charakterisieren. Eine gute Möglichkeit zur genaueren Interpretation ist z.B. durch eine zusätzliche massenspektroskopische Untersuchung gegeben, was die Kopplung zweier unterschiedlicher Anaylsemethoden beinhaltet.
Für eine solche Untersuchung wurden die Proben, nach der Inkubation mit dem entsprechenden Enzym, zunächst wie gewohnt auf eine RP-HPLC Säule aufgetragen. Darüber hinaus wurden nun die relevanten Peaks, bei denen es sich um das vermeintliche Restoligonukleotid handeln könnte, aufgefangen, das Eluat getrocknet und danach mittels MALDI-TOF MS untersucht.
Dass durch die Kopplung dieser beiden Analysemethoden eine wesentlich genauere Aussage über den Verlauf eines enzymatischen Abbaus möglich ist, wurde bereits bei der Untersuchung des Abbaus eines terminal unmodifizierten Oligonukleotids deutlich. Betrachtete man lediglich das RP-HPLC Diagramm, so konnte der Eindruck entstehen, dass selbst nach einer 24stündigen Inkubation kein Abbau stattgefunden hat. Sowohl im RP-HPLC Diagramm nach 0h Inkubation als auch nach 24h Inkubation war lediglich ein einzelner Peak mit einer Retentionszeit des nicht abgebauten Ausgangsoligonukleotids zu erkennen (Abb. 259, Abb. 261, Abb. 268, Abb. 270)
Die massenspektroskopische Untersuchung des Eluats dieser Peaks zeigte jedoch eindeutig, dass nach einer 24stündigen Inkubation, wie eigentlich zu erwarten, ein Abbau in kürzere Oligonukleotidketten erfolgt war (Abb. 262, Abb. 271). Der in der RP-HPLC einheitlich aussehende Peak wurde durch ein Gemisch aus Sequenzen mit den Kettenlängen n, n-1, n-2,… hervorgerufen. Die Abstände der Peaks lagen dabei jeweils im Bereich von ca. 320Da – 340Da, was den Massen der einzelnen Nukleotide (A = 313Da, C = 289Da, G = 329Da, T = 304Da) entspricht.
Die sich bei der Inkubation eines beidseitig PEG-derivatisierten Oligonukleotids mit einer Endonuklease ausbildenden Doppelpeaks, welche eine ähnliche Retentionszeit wie das unabgebaute Ausgangsoligonukleotid aufweisen (Abb. 274), konnten durch die zusätzliche massenspektroskopische Untersuchung ebenfalls eindeutig zugeordnet werden (Abb. 275). So stellte sich heraus, dass das diese Signale durch Bruchstücke mit noch anhängender PEG-Derivatisierung verursacht werden, die durch intramolekulare Spaltungen des Ausgangsoligonukleotids entstanden sind.
Die durch die Kopplung der beiden Analysemethoden gewonnenen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass bei einer alleinigen Betrachtung des Hauptpeaks im Chromatogramm der RP-HPLC ein Abbau nicht ohne weiteres zu erkennen ist. Die Retentionszeiten von vollständigen und verkürzten Sequenzen liegen so nahe beieinander, dass eine Trennung über eine RP-HPLC-Säule nicht möglich ist. Erst eine anschließende massenspektroskopische Untersuchung erlaubt eine genauere Beurteilung. Alternativ wären neben einer PAGE-Gelelektrophorese auch chromatographische Systeme mit einer höheren Trennleistung wie z.B. IE-HPLC oder Kapillarelektrophorese (CE) denkbar.

5.2.1.3. Abbauuntersuchungen mittels PAGE-Gelelektrophorese

Die Kopplung der beiden Analysemethoden RP-HPLC und MALDI-TOF MS ermöglicht zwar eine genaue Aussage über den Verlauf eines enzymatischen Abbaus, ist aber sehr arbeitsaufwendig und zeitintensiv. Jede Probe muß einzeln über RP-HPLC untersucht, die Peaks isoliert und massenspektroskopisch charakterisiert werden. Für eine schnelle, parallele Untersuchung mehrerer Ansätze wurde daher die PAGE-Gelelektrophorese als alternative Trennmethode herangezogen. Ein 19%iges Polyacrylamidgel mit einer Vernetzung von 19:1

(Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid) sollte dabei die Auftrennung von Sequenzen der Längen n und n-1 ermöglichen. Das Hauptaugenmerk lag bei diesen Ansätzen nicht bei der Detektion der niedermolekularen Abbauprodukte, sondern bei der Detektion der längerkettigen Oligonukleotidfragmente (n, n-1, n-2, …).
Die Trennleistung der PAGE-Gelelektrophorese wurde beim enzymatischen Abbau eines terminal unmodifizierten Oligonukleotids mit Phosphodieseterase II (5´-Exonuklease) besonders deutlich. Hier ist eindeutig die Ausbildung einer Leiter aus Sequenzen der Länge n, n-1, n-2,… zu beobachten (Abb. 279) welche bei terminal modifizierten Oligonukleotiden ausbleibt (Abb. 280 und Abb. 281).
Im Falle der Inkubation eines beidseitig PEG-derivatisierten Oligonukleotids mit S1-Endonuklease bildeten sich, wie erwartet, Banden der PEG-haltigen Spaltstücke im mittleren Bereich des Gels aus. Aufgrund der sich überschneidenden Molekülmassen der Spaltstücke weisen diese Banden keine diskrete Leiterstruktur auf, sondern erscheinen eher verschmiert (Abb. 286 und Abb. 287).
Ganz neue Erkentnisse lieferte diese hochauflösende Detektionsmethode jedoch beim enzymatischen Abbau mit Phosphodiesterase I (3´-Exonuklease). Hier bildete sich zunächst, wie von der Theorie vorhergesagt, beim terminal unmodifizierten Oligonukleotid eine diskrete Leiter mit Sequenzen der Länge n, n-1, n-2… aus (Abb. 282), die, ebenfalls wie erwartet, im Falle der terminal PEG-derivatisierten Oligonukleotide ausblieb. Im Laufe der Zeit bildeten sich jedoch deutliche Banden, ohne erkennbare Leiterstruktur, im mittleren und unteren Bereich des Gels aus (Abb. 283 und Abb. 284), welche starke Ähnlichkeit mit dem Bandenmuster aufwiesen, welches bei der Inkubation mit S1-Endonuklease (Abb. 286 und Abb. 287) entsteht. Dies ist nur durch eine zusätzliche Endonukleaseaktivität der Phosphodiesterase I zu erklären[(136)]. Durch den zusätzlichen endonukleolytischen Abbau entstanden mehrere, wesentlich leichtere, nur noch an einem Ende PEGylierte Fragmente mit ähnlichen, sich teilweise überschneidenden Molekülmassen, wodurch die Ausbildung einer diskreten Leiter ausblieb.
Von allen angewendeten Methoden zur Detektion des enzymatischen Abbaus stellt sich die PAGE-Gelelektrophorese als das Mittel der Wahl heraus. Nur mit dieser Methode ist es möglich, gleichzeitig und parallel extrem hochauflösende Untersuchungen von bis zu 10 Abbauansätzen pro Gel (Minigelformat) durchzuführen. Durch die parallele Anordnung der Bahnen wird darüber hinaus sofort ein direkter Vergleich zwischen den einzelnen Proben möglich. Auf diese Weise können auch nicht erwartete Ergebnisse, wie z.B. die Endonukleaseaktivität der Phosphodiesterase I, einfach erkannt und interpretiert werden

5.2.2. Einfluß des PEGylierungsmusters auf die Nukleasestabilität

Die deutlichsten Ergebnisse bezüglich des Abbauverhaltens ergaben sich, wie oben beschrieben, durch die Untersuchungen mittels PAGE-Gelelektrophorese. Sie bestätigen im Wesentlichen die Ergebnisse aus den Abbauuntersuchungen mittels RP-HPLC bzw. Kopplung aus RP-HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie.
So zeigten alle terminal PEG-derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphate eine sehr hohe Stabilität gegenüber dem Abbau durch 5´-Exonuklease (Abb. 288). Selbst nach einer Inkubationszeit von 144h wies ein am 5´-Ende mit mPEG1000 derivatisiertes Oligonukleotid-Thiophosphat noch einen Anteil an unabgebautem Restoligo von 80% auf. Der Wert eines am 5´-Ende mit mPEG400 modifizierten Oligonukleotid-Thiophosphats lag mit 63% etwas darunter. Dies lässt darauf schließen, dass längerkettige Polyethylenglykole, neben der eigentlichen Blockierung des 5´-Endes, zusätzlich noch einen sterisch bedingten räumlich abschirmenden Effekt zeigen. Ein terminal unmodifiziertes Oligonukleotid-Thiophosphat zeigte bereits nach 24h, trotz der Thiophosphat-Bindungen, lediglich noch einen Restoligonukleotidanteil von 11%, welcher nach 144h sogar noch auf 7% fiel. Dabei war,

sowohl im PAGE-Gel (Abb. 279) als auch bei der massenspektroskopischen Untersuchung (Abb. 262), deutlich die Ausbildung einer Leiterstruktur aus verkürzten Sequenzen (n, n-1, n-2,…) zu erkennen, welche bei terminal PEG-modifizierten Derivaten ausblieb (Abb. 280 und Abb. 281).
Die Ergebnisse des Abbaus mit 3´-Exonuklease (Abb. 289) waren hingegen nicht so eindeutig. Hier nahm die Intensität der Hauptbande sowohl bei einem terminal unmodifizierten Oligonukleotid-Thiophosphat als auch bei terminal modifizierten Derivaten stetig ab und lag in allen Fällen nach 144h bei nur noch ca. 15%. Lediglich ein am 3´-Ende mit mPEG400 derivatisiertes Oligonukleotid-Thiophosphat zeigte auch noch nach 72h eine signifikant erhöhte Stabilität im Vergleich zum terminal unmodifizierten Oligonukleotid-Thiophosphat (37% Restoligo vs. 14% Restoligo).
Bei einem unmodifizierten Oligonukleotid-Thiophosphat war auch bei Inkubation mit 3´-Exonuklease deutlich die Ausbildung einer Leiter aus Sequenzen der Länge n, n-1, n-2,… zu beobachten (Abb. 282). Diese Leiter blieb bei terminal modifizierten Derivaten (Abb. 283 und Abb. 284) trotz deutlich abnehmender Intensität der Hauptbande aus. Stattdessen bildeten sich im Laufe der Zeit deutliche Banden, ohne erkennbare Leiterstruktur, im mittleren und unteren Bereich des Gels aus, welche starke Ähnlichkeit mit dem Bandenmuster aufwiesen, welches bei der Inkubation mit S1-Endonuklease (Abb. 286 und Abb. 287) entstand. Dies deutet stark auf den Effekt einer Endonukleaseaktivität der als 3´-Exonuklease verwendeten Phosphodiesterase I (snake venom) hin[(136)].
Die Abbauversuche mit S1-Endonuklease (Abb. 290) führten nicht zu einem Unterschied in den relativen Stabilitäten der untersuchten Oligonukleotide. Sowohl die terminal unmodifizierten als auch die terminal PEG-derivatisierten Sequenzen wurden durch die S1-Endonuklease innerhalb von 24h vollständig intramolekular gespalten, wodurch verschieden große, wesentlich leichtere Fragmente entstanden.
Die terminale PEG-Derivatisierung von Oligonukleotiden bietet somit auf jeden Fall einen guten Schutz gegen den Angriff von Exonukleasen. Dabei scheinen längerkettige Polyethylenglykole, aufgrund der zusätzlichen sterischen Hinderung, etwas besser geeignet zu sein. Gegenüber intramolekular angreifenden Endonukleasen bieten die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten kurzkettigen und mittelkettigen Polyethylenglykole keinen erkennbaren Schutz. Ein sterisch abschirmender Effekt wäre allerdings bei Polyethylenglykolen mit einer wesentlich höheren Kettenlänge denkbar.

5.3. Chemische Synthese eines Oligonukleotid-Penetratin Konjugats

Um die Vorteile einer, durch terminale PEG-Derivatisierung gegebenen, erhöhten Nukleasestabilität mit der Fähigkeit zur leichten Zellmembranpassage zu kombinieren, bestand eine weitere Aufgabe dieser Arbeit darin, eine geeignete Synthese- und Aufreinigungsmethode zur reversiblen Kopplung eines PEG-derivatisierten Oligonukleotids mit einem Internalisierungspeptid zu entwickeln.
Um eine reversible Bindung zu erreichen, die nach der Internalisierung durch intracytoplasmatische Reduktion gespalten werden kann, bot sich die Kopplung über eine Disulfidbrücke an. Ein mittels 2,2'-Dithiopyridin aktiviertes, thiolmodifiziertes Oligonukleotid sollte dabei als aktivierte Spezies dienen, um eine Umsetzung mit der freien Cystein-Thiolgruppe des Penetratins zu ermöglichen (Abb. 291). Dabei stellte sich heraus, dass das argininhaltige, stark kationische Penetratin und das polyanionische Oligonukleotid zur Ausbildung eines unlöslichen Prezipitats neigen, was zu massiven Problemen sowohl bei der Synthese des Konjugats als auch bei dessen Aufreingung führte.
Bei Umsetzungen im wässrigen Puffersystem und Untersuchungen des Reaktionsansatzes mittels RP-HPLC und PAGE-Gelelektrophorese zeigte sich zunächst, dass das Signal des Ausgangsoligonukleotids bei steigenden Penetratin-Überschüssen erwartungsgemäß

schwächer wurde, um bei einem 4fachen Überschuss an Penetratin vollständig zu verschwinden. Im Gegenzug nahm die Signalstärke des gebildeten Konjugats Pen-Cys-S-S-Oligo-NH-mP400 stetig zu, um bei einem 4fachen Überschuss an Penetratin sein Maximum zu erreichen (s. Abb. 311). Mittels TCEP wieder reduzierte Kopplungsansätze führten, wie erwartet, zu einer Rückbildung des Oligonukleotidsignals, was ein deutlicher Hinweis darauf war, dass das vorherige Signal tatsächlich durch das über eine Disulfidbrücke verbundene Konjugat hervorgerufen wurde (s. Abb. 316).
Ab einem 8fachen Überschuss an Penetratin war jedoch, sowohl in der RP-HPLC als auch in der PAGE-Gelelektrophorese ein vollständiger Signalverlust, sowohl des gebildeten Konjugates als auch des Ausgangsoligonukleotids, zu verzeichen (s. Abb. 311). Bei der genaueren Betrachtung des Reaktionsverlaufs wurde darüber hinaus der Ausfall eines weißen Niederschlages deutlich, welcher im verwendeten Reaktionspuffer (0,1M TEAA pH7,5) unlöslich war. Vergleichsversuche mit einem nicht-thiolmodifizierten Oligonukleotid, welches keine Disulfidbindung mit dem Cysteinrest des Penetratins eingehen konnte, zeigten ebenfalls die Ausbildung des weißen Niederschlages in Verbindung mit einem vollständigen Signalverlust des Oligonukleotids, sowohl in der RP-HPLC als auch im PAGE-Gel (s. Abb. 313). Die Entstehung dieses Prezipitats war somit auf eine unspezifische Wechselwirkung des bei pH7,5 stark positiv geladenen (polykationischen) Penetratins (Abb. 312) mit dem polyanionischen Phosphatrückgrat des Oligonukleotid-Thiophosphats bzw. des schon gebildeten Konjugats zurückzuführen[(9), (7)].
Durch Umsetzungen in einem nicht-wässrigen System, unter Verwendung von Formamid als Lösungsmittel, konnte die Ausbildung des Niederschlags zwar unterbunden werden, bei der späteren Analyse mittels RP-HPLC (s. Abb. 317) bzw. PAGE-Gelelektrophorese (s. Abb. 314), welche beide mit wässrigen Laufpuffern arbeiten, kam es jedoch zu einer nachträglichen Prezipitatbildung mit entsprechendem vollständigem Signalverlust. Durch Wahl eines geringen Überschusses an Penetratin bzw. durch die Reaktionsführung in einem nicht-wässrigen Lösungsmittel war es nun zwar möglich, das Ausgangsoligonukleotid nahezu quantitativ mit Penetratin zu Koppeln, bei der Aufreinigung des Konjugats über das wässrige Puffersystem der RP-HPLC bestand jedoch in hohe Maße die Gefahr der Prezipitatbildung. Darüber hinaus war der Unterschied der Retentionszeiten zwischen überschüssigem Penetratin, evt. unumgesetztem Ausgangsoligonukleotid und gebildetem Konjugat zu gering, um eine quantitative Abtrennung über RP-HPLC zu ermöglichen. Die Summe dieser Beobachtungen machte somit deutlich, dass die RP-HPLC zur Analyse und Aufreinigung von Konjugaten aus Oligonukleotiden und stark polykationischen Peptiden wie Penetratin ungeeignet ist.
Aufgrund des hohen isoelektrischen Punktes des stark basischen Penetratins (Abb. 312), verbunden mit einer positiven Ladung von ca. +7 bei pH 7,5, bot sich als alternative Analyse- und Aufreinigungsmethode die Verwendung eines Anionenaustauschers an. Da eine Ionenaustauschersäule, im Gegensatz zu einer Silikasäule, in der RP-HPLC auch mit nicht-wässrigen Lösungsmitteln betrieben werden kann, konnte durch die Verwendung eines Laufpuffers mit einem hohen Formamidanteil die Prezipitatsbildung vollständig unterbunden werden. Wie erwartet, zeigte das überschüssige, positiv geladene Penetratin des Reaktionsansatzes bei einem neutralen pH-Wert keine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial (s. Abb. 320), während das Ausgangsoligonukleotid und das gebildete Konjugat in der Säule gebunden wurden (s. Abb. 319).
Aufgrund des hohen Retentionszeitunterschiedes zwischen Konjugat und Oligonukleotid wurde durch die Analyse über IE-FPLC sogar eine genaue Beurteilung des Reaktionsverlaufs bei verschiedenen Penetratin-Überschüssen möglich. Führte ein zweifacher Überschuss an Penetratin noch zu ca. 50% unumgesetztem Ausgangsoligonukleotid, so war ab einem achtfachen Überschuss eine vollständige Umsetzung zu verzeichnen. Dies bestätigte im Wesentlichen die Ergebnisse, welche durch die PAGE-Analyse gewonnen wurden. Ein

Ausfall des Prezipitats bei höheren Penetratin-Überschüssen fand, im Gegensatz zur Analyse über RP-HPLC oder PAGE, jedoch nicht statt.
Eine MALDI-TOF Analyse des aufgreinigten und entsalzten Oligonukleotid-Penetratin Konjugats lieferte einen relativ breiten Peak im Bereich von ca. 8800Da bis ca. 8900Da (s. Abb. 324), da dieser hohe Massenbereich die angewandte Meßmethode an ihre Grenzen führte. Das Zentrum des Massepeaks bei 8833Da entspricht jedoch der erwarteten Molekülmasse, wodurch die Identität des Oligonukleotid-Penetratin Konjugats (Pen-Cys-S-S-ONT1-NH-mPEG400) hinreichend bestätigt wurde.
Die IE-HPLC erweist sich somit als eine gute Methode zur Analyse der Reaktionsverlaufs sowie zur preparativen Abtrennung des gebildeten Konjugats sowohl von überschüssigem Penetratin als auch von eventuell unumgesetztem Ausgangsoligonukleotid. Bei größeren Ansätzen besteht zudem die Möglichkeit der Aufreinigung über IE-FPLC, ohne dabei einen Gradienten zu fahren. Da bei einem entsprechenden Überschuss an Penetratin von einer vollständigen Reaktion des Oligonukleotids ausgegangen werden kann, muß nur noch das überschüssige Penetratin abgetrennt werden, welches die IE-FPLC-Säule ungebunden passiert. Das in der Säule gebundene Konjugat hingegen kann direkt danach durch einen Puffer mit hoher Salzkonzentration eluiert werden. Auf diese Weise wäre die schnelle Aufreinigung auch größerer Mengen möglich.

5.4. Rekombinanter Penetratin-Carrier

Im abschließenden, molekularbiologischen Teil der Arbeit wurde durch Expression in E. coli ein rekombinantes Fusionsprotein aus dimerem Streptavidin (Stv43 s. Kap. 3.8) und Zell-internalisierendem Penetratin (s. Kap. 3.7.1) hergestellt. Mit diesem Carrier könnten in späteren Studien biotinylierte Oligonukleotide mit therapeutischer Wirkung bzw. andere biotinylierte Makromoleküle über das dimere Streptavidin gekoppelt und der gesamte Komplex durch die internalisierende Wirkung des Penetratins, in eine Zelle eingeschleust werden.

5.4.1. Design und Klonierung des rekombinanten Penetratin-Carriers

Am Anfang dieses Vorhabens stand zunächst die Konstruktion eines Expressionsvektors, welcher neben dem Gen des dimeren Streptavidins (TSA43) auch eine Penetratin-codierende Basensequenz enthält. Um Vergleichsdaten bei den Klonierungen und der späteren Expression zu erhalten, wurden parallel dazu einige ähnliche Vektoren konstruiert, welche die Expression eines UV-absorbierenden Penetratin-EGFP Konjugats sowie die alleinige Expression von EGFP bzw. dimerem Streptavidin im gleichen Expressionssystem ermöglichten.
Die benötigten codierenden Nukleinsäure-Sequenzen (Inserts) wurden durch PCR aus entsprechenden Quellvektoren (Templates) amplifiziert. Zur Generierung der nötigen Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in den Zielvektor kamen Primer zur Anwendung die, neben der eigentlichen hybridisierenden Sequenz, zusätzlich eine entsprechende Schnittstellensequenz enthielten[122] (Abb. 326). Der Einbau der synthetischen, 48 Nukleotide langen Penetratin-codierenden Sequenz erfolgte ebenfalls durch modifizierte PCR-Primer, wobei zunächst eine Codon-Optimierung durchgeführt wurde, um die Sequenz an die Codon-Benutzung von E. coli anzupassen.
Der Quellvektor für die Sequenz des dimeren Streptavidins (Stv43) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Takeshi Sano (Boston University) in Form des pTSA43 Plasmids zur Verfügung gestellt, welches das durch gezielte Mutationen (s. Kap. 3.8) gewonnene TSA43-Gen für dimeres Streptavidin enthält. Als Template für das EGFP-Insert stand das Plasmid pEGFP-N1 von Clontech zur Verfügung, welches eine für EGFP codierende Basensequenz in

sich trägt. Das pQE30-Plasmid (Abb. 328) des T5-Expressionssystems der Firma Qiagen (s. Kap. 3.10.5), welches neben einem Ampicillin-Resistenzmarker, zur Selektion der transformierten Klone, auch eine multiple cloning site (MCS) und eine His-tag Sequenz enthält, diente als Ziel- und späterer Expressionsvektor.
Die PCR sowie die Klonierung des PCR-Produkts bereiteten im Falle des reinen EGFP und des reinen TSA43, also ohne zusätzliche Penetratin-Sequenz, keine größeren Probleme. Bereits die Übertragung einiger Klone mit potentiellem EGFP-Insert auf eine $LB^{amp/IPTG}$-Platte führte zu einer Ausbeute an grünen, UV-fluoreszierenden, EGFP exprimierenden Kolonien von nahezu 100%. Eine genauere Untersuchung durch die Sequenzierung mehrerer Klone ergab sowohl beim pQE30-EGFP als auch beim pQE30-TSA43 eine korrekte Sequenz, welche im Leseraster des Expressionsvektors lag und somit korrekt exprimiert werden konnte. Die Verwendung eines CIP-Enzyms, zur Dephosphorylierung des verdauten Vektors, stellte sich als unnötig heraus und führte eher zu einer geringeren Ausbeute an funktionellen Klonen.

Die Klonierungen der Penetratin-haltigen Inserts PenEGFP und PenTSA43 stellten sich hingegen wesentlich schwieriger dar. So ergab eine erste Untersuchung durch einen erneuten Restriktionsschnitt der klonierten Vektoren, dass nur sehr wenige Klone überhaupt ein Insert aufwiesen. Die wenigen vorhandenen Inserts wiesen darüber hinaus teilweise unterschiedliche Laufweiten im Agarosegel auf, was schon zu diesem Zeitpunkt auf eine fehlerhafte Klonierung schließen ließ. Eine Sequenzierung ergab bei allen inserthaltigen Klonen Deletionen bzw. zusätzliche Nukleotide bereits in einem sehr frühen Bereich des Inserts, was in allen Fällen zu einer Leserasterverschiebung und somit zu einem völlig unsinnigen Expressionsprodukt führte. In einem Klon führte ein Basenaustausch sogar zu einem sehr frühen Stop-Codon (TAG). Da sich sämtliche leserasterverschiebenden Mutationen im Bereich der Primersequenz befanden, lag zunächst die Vermutung nahe, dass die Fehlerquelle in den Penetratin-modifizierten PCR-Primern selbst zu suchen sei. Eine zusätzliche Aufreinigung der verwendeten Primer über ein Polyacrylamidgel brachte jedoch, ebenso wie die Verwendung neusynthetisierter Primer mit unterschiedlich langen Hybridisierungsbereichen keine Verbesserung, wodurch fehlerhafte PCR-Primer als Ursache nicht in Frage kamen. Eine Sequenzierung der PCR-Produkte vor der Klonierung führte darüber hinaus in allen Fällen zu einer korrekten Sequenz, wodurch eine fehlerbehaftete PCR ebenfalls als Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnte.
Bei einer genaueren Bertrachtung der Mutationsmuster deutete alles darauf hin, dass eine Selektion von Mutanten stattfand, die aufgrund eines frühen Stop-Codons die Translation vorzeitig beendeten, oder aufgrund einer Leserasterverschiebung ein Produkt produzierten, welches kein vollständiges Penetratin enthielt. Es kam kein einziger Klon vor, bei dem z.B. eine Punktmutation lediglich zu einem Aminosäureaustausch bei ansonsten unverändertem Expressionsprodukt führte. In allen Fällen waren schwerwiegende Mutationen zu verzeichnen, die einen Abbruch der Translation oder die Expression eines nonsense-Produkts nach sich zogen. Klone mit korrektem Insert schienen, möglicherweise aufgrund einer Toxizität des Penetratins[5], nicht lebensfähig zu sein oder zumindest wesentlich langsamer zu wachsen.
Zur Aufklärung dieses Phänomäns führte erst eine genauere Betrachtung der bisher verwendeten E. coli Bakterien des Stammes DH5α, welcher den Genotyp *„F⁻ (Φ80d lacZΔM15) Δ (lacZYA-argF) U169 supE44 hsdR17($r_\kappa^- m_\kappa^+$) recA1 gyrA96 endA1 thi-1 relA1 deoR λ⁻“* aufweist. Dieser Stamm trägt demnach keine keine chromosomale Kopie des $lacI^q$-Gens. Dadurch konnte es, aufgrund zu geringer Konzentration des lac-Repressors und dem Vorhandensein eines T5-Promotors im pQE30 Plasmid, auch ohne externe Induktion zu einer schwachen Expression des im Vektor codierten Proteins kommen (s. Kap. 3.10.5). Da das einklonierte Penetratin eine gewisse antimikrobielle Aktivität aufweist[5], führte dies zu

einer Selektion von Mutanten ohne funktionellem Penetratin, die schneller wuchsen als Bakterien, welche das korrekte Plasmid in sich trugen.
Um eine nicht-induzierte Expression so weit wie möglich zu unterdrücken, musste also ein Stamm gefunden werden welcher Träger einer chromosomalen $lacI^q$-Mutation ist. Die dadurch bedingte Überexpression des lac-Repressors müßte die Transkription und somit auch die Expression, zumindest in der Anfangsphase des Zellwachstums direkt nach der Transformation, weitgehend unterdrücken. Für die weiteren Klonierungen kam daher der E. coli Stamm JM109 mit dem Genotyp *„F' traD36 proA+ proB+ $lacI^q$ (lacZ) M15 L (lac-proAB) hsdR17 recA1 endA1 relA1"* zum Einsatz.
Auf diese Weise gelang es schließlich, sowohl bei der Klonierung von PenEGFP als auch bei der der Klonierung von PenTSA43, mehrere Klone zu gewinnen, welche vollständig frei von Mutationen waren. Neben einer deutlichen UV-Aktivität der PenEGFP exprimierenden Klone konnte die korrekte Basensequenz und das korrekte Leseraster sowohl durch Sequenzierung des codierenden Stranges als auch durch Sequenzierung des Gegenstranges bestätigt werden.

5.4.2. Expression des rekombinanten Penetratin-Carriers

Als ideale Bedingungen für eine Expression sowohl des rekombinanten EGFP, des rekombinanten Stv43 als auch der entsprechenden Penetratin-Fusionsproteine (PenEGFP und PenStv43) im E. coli Stamm M15[pREP4] erwies sich eine mindestens 4stündige Kultivierung bei 29°C nach der Induktion der Expression. Dabei wiesen sowohl die abzentrifugierten Zellpellets als auch die zur His-tag Aufreinigung verwendeten Ni-NTA Beads im Falle von EGFP und PenEGFP eine deutliche Grünfärbung und UV-Aktivität auf, welche auf ein funktionelles EGFP zurückzuführen waren.
Durch eine denaturierende Lyse und Aufreinigung konnte eine fast quantitative Abtrennung der His-tag haltigen Zielproteine von den restlichen Zellbestandteilen verzeichnet werden. Die Untersuchung über ein Proteingel (SDS-PAGE) bestätigte im Rahmen der Messgenauigkeit die theoretischen Molekülmassen sämtlicher Expressionsprodukte. Ein Chemilumineszenz-Immunoassay mit spezifischen polyklonalen Antikörpern (Anti-Streptavidin und Anti-GFP) bestätigte darüber hinaus auch deren Identität.
Durch Inkubation mit Biotin-HRP und anschließende Chemilumineszenz-Detektion gelang schließlich auch ein Nachweis der Biotin-Bindungsfähigkeit und somit der Funktionalität der streptavidinhaltigen Expressionsprodukte Stv43 und PenStv43. Die Affinität gegenüber Biotin ist jedoch nicht stark ausgeprägt, da die Proteine, aufgrund der denaturierenden Aufreinigung, zum weitaus größten Teil nicht in ihrer nativen Form vorlagen. Für weiterführende Untersuchungen der Bindungskonstante, der Funktionalität des fusionierten Penetratins sowie für eine spätere biologische Anwendung müsste die Aufreinigung in nativer Form erfolgen.

5.5. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode der trägergebundenen asymmetrischen Derivatisierung von Oligonukleotiden ist nicht nur auf die Verwendung von Polyethylenglykolen beschränkt. Die Methode kann problemlos auch auf andere NHS-funktionalisierte Moleküle, wie z.B. Biotin-N-hydroxysuccinimidester, Fluorescein-N-hydroxysuccinimidester oder ähnliches, erweitert werden. Auf diese Weise wird eine kostengünstige Synthese von Oligonukleotiden mit verschiedenen Markern an beiden Enden auf aminofunktionalisierten Standard-Trägermaterialien ermöglicht. Die Verwendung spezieller Phosphorigsäureesteramide oder spezieller Trägermaterialien wäre nicht mehr notwendig.
Neben den Antisense-Oligonukleotiden ist auch eine Erweiterung der Methode auf andere therapeutisch wirksame Oligonukleotide, wie z.B. Antigen-Oligonukleotide (triplex forming oligonucleotides, TFO´s), Aptamere oder siRNA, denkbar. Anstelle von Oligonukleotid-Thiophosphaten, wie sie in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurden, könnten auch andere Oligonukleotid-Analoga, wie z.B. PNA oder Morpholino-Oligonukleotide, eingesetzt werden.
Die vorliegende Arbeit beschränkt sich im Wesentlichen auf die Etablierung und Optimierung der Synthesemethoden für PEG-derivatisierte Oligonukleotide und auf Stabilitätstests in vitro. Weiterführende Versuche zur Stabilität und zum Antisense-Effekt in Zellkultur wurden bereits mit vielversprechenden Ergebnissen von der Antisense-Pharma GmbH Regensburg durchgeführt[(138)]. Für Versuche im Tiermodell ist, um eine Visualisierung der Verteilung im Organismus zu ermöglichen, eine Markierung der Oligonukleotid-PEG Konjugate notwendig. Dies kann einerseits durch eine Fluoreszenzmarkierung, z.B. durch die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Polyethylenglykols, erfolgen, was jedoch eine Veränderung der Molekülstruktur mit sich bringen würde. Eine höhere Aussagekraft bietet die radioaktive Markierung durch Austausch eines oder mehrerer Wasserstoffatome der Nukleobasen durch Tritium[(139)] wodurch die ursprüngliche Molekülstruktur erhalten bleibt.
Der Einfluß des chemisch konjugierten Penetratins auf die Internalisierung und die damit erhoffte Steigerung des Antisense-Effektes muß ebenfalls noch in Zellkulturversuchen bestätigt werden. Anstelle von Kopplungen mit stark basischen Internalisierungspeptiden wie Penetratin oder HIV-Tat, welche in der Regel zu einem Verbleib des Konjugats in den Endosomen führen[(85)], ist auf ähnliche Weise auch eine Kopplung mit endosomolytischen Peptiden[(84)] oder neu entwickelten Internalisierungspeptiden wie $(R\text{-}Ahx\text{-}R)_4$, R6-Penetratin[(80)] oder M918[(86)] möglich, welche eine geringere Toxizität sowie verbesserte Internalisierungseigenschaften aufweisen. Auch wären Kopplungen mit spezifischen tumor targeting peptides (TTP´s) oder cell targeting peptides (CTP´s) denkbar.
Im Falle des rekombinanten Penetratin-Streptavidin Fusionsproteins als Carrier für biotinylierte Oligonukleotide standen im Rahmen dieser Arbeit die Klonierung und die Expression im Vordergrund. Zur Untersuchung des Internalisierungsverhaltens sind ebenfalls weiterführende Versuche in Zellkultur notwendig, wofür zunächst eine Strategie zur nativen Lyse und Aufreinigung entwickelt werden muß. Alternativ könnte auch eine Renaturierung des denaturierend aufgereinigten Expressionsprodukts erfolgen, um es erfolgreich in Zellkultur, oder im Tiermodell einzusetzen. Eine erneute Klonierung unter Verwendung eines Gens, welches die Expression des dimeren Streptavidins in Form einer einzelnen Proteinkette ermöglicht[(101)], könnte dabei den Vorgang der Renaturierung wesentlich vereinfachen.
Im Falle einer erfolgreichen Internalisierung von biotinylierten Oligonukleotiden könnte die Verwendungsmöglichkeit des rekombinanten Carriers auch auf biotinylierte Peptide oder auf andere biotinylierte Makromoleküle ausgedehnt werden.

6. Material und Methoden

6.1. Verwendete Materialien

6.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Oligonukleotidsynthese:

• Expedite 8909 DNA Synthesizer	PerSeptive Biosystems

FPLC-Zubehör:

• Toyopearl SuperQ-650M	TOSOH Bioscience GmbH
• FPLC-Säule (leer)	Pharmacia
• Pump P-1 (Peristaltikpumpe)	Pharmacia
• Pump P-500 (Kolbenpumpe)	Pharmacia
• UV-Single Path Monitor UV-1	Pharmacia
• LKB REC102 (Messschreiber)	Pharmacia

HPLC-Zubehör:

• Waters 600 Controller	Waters
• Waters 600 Pump	Waters
• Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters
• Waters In Line Degasser A7	Waters
• Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm	Phenomenex
• Phenomenex PolymerX RP1 100Å 10x250mm	Phenomenex
• Hauptsäule LiChroCART 125-4 RP-18e	Merck
• Vorsäule LiChroCART 4-4 RP-18e	Merck
• Symetry C18 5µm 19x100mm	Waters

MALDI-TOF MS:

• Bruker Reflex III	Bruker
• MALDI-Platte	Bruker

Peptidsynthese:

• Kem-En-Tec MKIII peptide Synthesizer	Kem-En-Tec

sonstige Geräte:

• Rotationsverdampfer	Heidolph
• Biofuge 15R	Heraeus
• Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann
• Analysenwaage Mettle H10 T	Mettler
• Drehschieberpumpe	Vacuubrand
• Wippschüttler	Bühler
• Heizschrank T5042-K	Heraeus
• Heizblock 5320H3558	Eppendorf
• Spannungsquelle (2197 Power Supply)	LKB
• Vortex Genie 2	Scientific Industries
• DU7500 Spectrophotometer	Beckman
• Ultrospec 3000 Photometer	Pharmacia
• Brutschrank BK6160	Heraeus

• Speedvac Univapo 150H	Uniequip
• Biofuge pico	Heraeus
• Schüttler Certomat MO	B. Braun Biotech
• Stirred Ultrafiltration Cell 8050	Millipore
• Leitfähigkeitsmessgerät DiST 6	Carl Roth GmbH
• Thermocycler PCRSprint	Hybaid
• UV-Scanner FLA-2000	Fuji Film
• Mikropipetten	Gilson / Eppendorf
• UV-Lampe	UV Technik Speziallampen
• Canon EOS350D	Canon
• Objektiv 18-55mm	Sigma
• Leuchttisch	Biotec-Fischer
• Agagel G 45/1 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Biometra
• Minigel-Twin Polyacrylamide Gel Electrophoresis Apparatus	Biometra
• Semi-Phor Blotting Apparat	Hoefer Scientific

Verbrauchsmaterial:

• Mikroreaktionsgefäße	Carl Roth GmbH
• Einwegpipetten	VWR
• Petrischalen	VWR
• Pipettenspitzen	VWR
• NAP™ 10 Colums	GE Healthcare
• Poly-Pak™ II Cartridges	Glen Research
• Ultrafiltration Membranes PLAC04310 MWCO1000	Millipore
• Zentrifugenröhrchen	Carl Roth GmbH
• Einweg-Spritzen	Carl Roth GmbH
• Einweg-Kanülen	Carl Roth GmbH
• Roti®-Spin MINI	Carl Roth GmbH
• Hybond™ ECL™ Nitrocellulosemembranen	GE Healthcare

Molekularbiologische Kits:

• QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
• QIAexpressionist	Qiagen
• QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen
• GFX Micro Plasmid Prep Kit	GE Healthcare

6.1.2. Chemikalien

• Agar-Agar	Carl Roth GmbH
• Agarose	Carl Roth GmbH
• 5´-Amino-Modifier 5	Glen Research
• 5´-DMS(O)MT-Amino-Modifier C6	Glen Research
• 5'-Thiol-Modifier C6	Glen Research
• Acetonitril	Merck
• Acetonitril (LOT: 1282/5CR)	Carl Roth GmbH
• Acrylamid / Bisacrylamid 37,5 : 1 (40%)	Carl Roth GmbH
• Acrylamid / Bisacrylamid 19 : 1 (40%)	Carl Roth GmbH

• Adenosin-CPG-Support 1000 Å	Carl Roth GmbH
• Amino-ON CPG 500Å	Proligo (Sigma-Aldrich)
• Ammoniaklösung (32%)	Carl Roth GmbH
• Ammoniumcitrat	Sigma-Aldrich
• Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
• Ampicilin	Fluka
• Avidin	Sigma-Aldrich
• Beaucage-Reagenz (3H-1,2-Benzodithiole-3-one-1,1-dioxide)	ISIS
• Biotin-HRP	Thermo Fisher Scientific
• Calciumchlorid	Sigma-Aldrich
• CAP A	Proligo (Sigma-Aldrich)
• CAP B	Proligo (Sigma-Aldrich)
• β-Cyanoethylphosphorigsäureesteramide (DMT-dT, DMT-dG, DMT-dC, DMT-dA)	Proligo (Sigma-Aldrich)
• 5´- β-Cyanoethylphosphorigsäureesteramide (5´CE-dT, 5´CE-dG, 5´CE-dC, 5´CE-dA)	GlenResearch
• DCI Activator	Proligo (Sigma-Aldrich)
• Diethylether	VWR
• Dichlormethan (DCM)	Carl Roth GmbH
• Dimethylformamid	IRIS Biotech GmbH
• Dimethylsulfid	Sigma-Aldrich
• dNTP Mix	Promega
• Dipyridyldisulfid	Sigma-Aldrich
• 1,4-Dithiothreit (DTT)	Sigma-Aldrich
• EDTA	Carl Roth GmbH
• Essigsäure	VWR
• Ethanol	Merck
• Ethandithiol	Sigma-Aldrich
• Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
• Formamid	Merck
• Fmoc-Aminosäuren	Novabiochem
• Fmoc-Cys(Trt)-Wang resin	Novabiochem
• Fmoc-Lys(Boc)-OH	Novabiochem
• Fmoc-Trp(Boc)-OH	Novabiochem
• Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Novabiochem
• Fmoc-Asn(Trt)-OH	Novabiochem
• Fmoc-Gln(Trt)-OH	Novabiochem
• Fmoc-Met-OH	Novabiochem
• Fmoc-Phe-OH	Novabiochem
• Fmoc-Ile-OH	Novabiochem
• GFP antibody (HRP) (GTX26663)	GeneTex
• Glycerin	Fluka
• Glycin	Carl Roth GmbH
• Harnstoff (UREA)	Carl Roth GmbH
• Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
• HOBt	Novabiochem
• 3-Hydroxypicolinsäure	Fluka

• IPTG	Carl Roth GmbH
• Kaliumacetat	Merck
• Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH
• Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
• di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
• Kanamycin	Fluka
• Magnesiumchlorid	Fluka
• Manganchlorid	Sigma-Aldrich
• MeO-dPEG(24)-NHS (Lot: 80401-3)	IRIS Biotech GmbH
• MeO-PEG-COO-Su 2000Da	IRIS Biotech GmbH
• Methanol	Merck
• Methyl-PEO8-NHS Ester	PIERCE
• MMT-Hexylamin Linker Amidite	Proligo (Sigma-Aldrich)
• Molsieb 3Å	Carl Roth GmbH
• MOPS	Sigma-Aldrich
• Natriumacetat	VWR
• Natriumchlorid	Fluka
• Natriumchlorid	VWR
• Natriumhydrogencarbonat (>99,5%)	Fluka BioChemika
• Natriumhydroxid	VWR
• N-Ethyldiisopropylamin (DIPEA)	Merck
• Ni-NTA Sepharose	Qiagen
• N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)	Sigma-Aldrich
• Oxidizer	Proligo (Sigma-Aldrich)
• Phenol	Sigma-Aldrich
• ortho-Phosphorsäure 85%	Fluka
• Piperidin	Sigma-Aldrich
• Polyethyleneglycol 2000 CED phosphoramidite	ChemGenes
• PyBOP	Novabiochem
• Roti®-Black N (Silberfärbung für DNA)	Carl Roth GmbH
• Roti®-Block	Carl Roth GmbH
• Roti®-Blot A	Carl Roth GmbH
• Roti®-Blot K	Carl Roth GmbH
• Roti®-Load DNA-orange 1	Carl Roth GmbH
• Roti®-Load DNA	Carl Roth GmbH
• Roti®-Load 1 (reduzierend)	Carl Roth GmbH
• Roti®-Load 2 (nicht reduzierend)	Carl Roth GmbH
• Roti®-Lumin	Carl Roth GmbH
• Roti®-Restore	Carl Roth GmbH
• Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich
• Salzsäure konz.	VWR
• SDS	Carl Roth GmbH
• Streptavidin	Sigma-Aldrich
• Streptavidin antibody (HRP) (GTX27239)	GeneTex
• TBE-Puffer	Carl Roth GmbH
• TCEP	Carl Roth GmbH
• TEMED	Carl Roth GmbH
• Thioanisol	Sigma-Aldrich

- Thiol-Modifier C6 S-S — Glen Research
- Thymidin-CPG-Support 1000 Å — Carl Roth GmbH
- Trichloressigsäure — Fluka
- Triethylamin (>99%) — Merck
- Trifluoressigsäure (TFA) — Sigma-Aldrich
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) — Fluka
- Trypton/Pepton — Carl Roth GmbH
- UREA — Carl Roth GmbH

6.1.3. Puffer

Puffersysteme für die HPLC:

- A: 0,1M TEAA (pH7,5) B: Acetonitril
- A: 0,04M KH_2PO_4 (0,002% H_3PO_4) B: Acetonitril
- A: 0,01M TEAA pH8,5 B: 0,01M TEAA (pH8,5) + 4M NaCl

Puffersysteme für die FPLC:

- A: 0,01M TEAA (pH8,5) B: 0,01M TEAA (pH8,5) + 2M NaCl
- A: 0,01M $NaHCO_3$ (pH8,5) B: 0,01M $NaHCO_3$ (pH8,5) + 2M NaCl

NHS-Reaktionspuffer:

- 0,3M $NaHCO_3$ (pH8,5)

Abbaupuffer für Phosphodiesterase I:

- 100mM Tris-HCl (pH8,9) / 100mM NaCl / 14mM $MgCl_2$

Abbaupuffer für Phosphodiesterase II:

- 0,1M TEAA (pH6,5)

Abbaupuffer für S1-Endonuklease:

- 30mM Na-Acetat (pH 4,6) / 280mM NaCl / 1mM $ZnSO_4$

Abbaupuffer Universal:

- 70mM Tris-HCl (pH7,5) / 50mM NaCl / 20mM $MgCl_2$

Puffer zur Herstellung kompetenter Zellen:

- RF-1: 100mM RbCl / 30mM KAc / 10mM $CaCl_2$ / 50mM $MnCl_2$ / 15% Glycerin (pH5,8)
- RF-2: 10mM MOPS / 10mM RbCl / 75mM $CaCl_2$ / 15% Glycerin (pH6,8)

10x PCR-Puffer für Taq-Polymerase (GE Healthcare):

- 100mM Tris-HCl (pH9,0) / 15mM $MgCl_2$ / 500mM KCl.

10x One-Phor-All Buffer PLUS (OPA+) (GE Healthcare):

- 100mM Tris-Acetat (pH7,5) / 100mM Mg-Acetat / 500mM K-Acetat

10x T4 DNA Ligase Buffer (Promega):

- 300mM Tris-HCl (pH7,8) / 100mM $MgCl_2$ / 100mM DTT / 10mM ATP

10X CIP Buffer (NEB):

- 500mM Tris-HCl (pH7,9) / 1M NaCl / 100mM $MgCl_2$ / 10mM DTT

TE-Puffer:

- 10mM Tris-HCl (pH7,4) / 1mM EDTA

10x SDS-Laufpuffer:

- 250m M Tris / 2M Glycin / 1% SDS

50x TEA-Puffer:

- 2M Tris-Acetat (pH8) / 50mM EDTA

Puffer für denaturierende Aufreinigung über Ni-NTA:

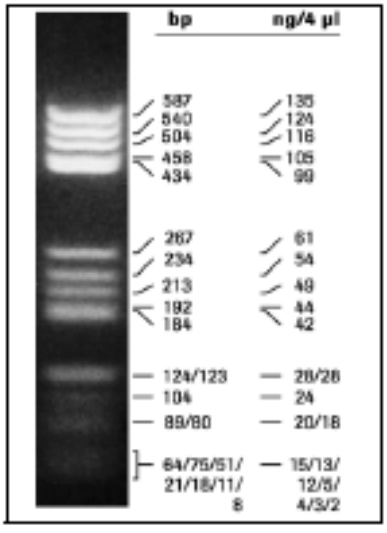
- B: 100mM NaH_2PO_4 / 8M UREA / 10mM Tris-HCl (pH8,0)
- C: 100mM NaH_2PO_4 / 8M UREA / 10mM Tris-HCl (pH6,3)
- D: 100mM NaH_2PO_4 / 8M UREA / 10mM Tris-HCl (pH5,9)
- E: 100mM NaH_2PO_4 / 8M UREA / 10mM Tris-HCl (pH4,5)

PBST-Puffer:

- 137mM NaCl / 2,7mM KCl / 10mM Na_2HPO_4 / 2mM KH_2PO_4 / 0,05% Tween 20 (pH7,4)

6.1.4. Größenmarker

"Marker V" → DNA Molecular Weight Marker V (Roche Applied Science):



Herkunft: pBR322 DNA verdaut mit HaeIII

Anwendung: Agarosegele für DNA

Größenbereich: 8 - 587 bp

Anzahl Fragmente: 21

Fragmentgrößen: 8, 11, 18, 21, 51, 57, 64, 80, 89, 104, 123, 124, 184, 192, 213, 234, 267, 434, 458, 504, 540, 587 bp

"λ-Digest" → λ- Hind III DNA-Marker (Roth):



Herkunft: unmethylierte Lambda-DNA verdaut mit Hind III

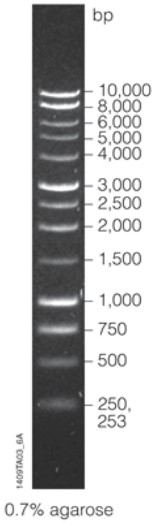
Anwendung: Agarosegele für DNA

Größenbereich: 125 - 23130 bp

Anzahl Fragmente: 8

Fragmentgrößen: 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130 bp

1kb DNA Leiter (Promega):



Anwendung: Agarosegele für DNA

Größenbereich: 250 - 10000 bp

Anzahl Fragmente: 13

Fragmentgrößen: 250, 500, 750, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp

„RotiMark Prestained" (Roth):



Anwendung: PAGE-Gele für Proteine

Größenbereich: 17 - 245 kDa

Anzahl Fragmente: 7

Fragmentgrößen: 17, 23, 33, 50, 95, 123, 245 kDa

6.1.5. Enzyme

- Phosphodiesterase I (USB)
  (aus *Crotalus Ademanteus Venom*)
  Prod. 20240Y, LOT 118225
- Phosphodiesterase II (Sigma)
  (Type I-SA aus *Bovine Spleen*)
  Prod. P9041-10UN, LOT: 086K7705
- S1-Endonuklease (Sigma)
  (aus *Aspergillus Oryzae*)
  Prod. N5661-50KU, LOT: 037K1513
- S1-Endonuklease (Promega)
  (aus *Aspergillus Oryzae*)
  Prod. E576B, LOT: 16833509
- *Taq* DNA Polymerase (GE Healthcare)
  (aus *Thermus Aquaticus*)
- T4 DNA Ligase (Promega)
  (aus rekombinanten *E. Coli*)
- Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
  (NEB)
  (aus *Calf intestinal mucosa*)
- BamH1 (GE Healthcare)
  (aus *Bacillus amyloliquefaciens*)
- Kpn1 (GE Healthcare)
  (aus rekombinanten *E. Coli*)

6.1.6. Nährmedien und Nährplatten

LB-Medium:

- 1% Trypton / 0,5% Hefe-Extrakt / 0,5% NaCl (pH7,5)
- Zur Herstellung von LB-Medium wurden 10g Trypton, 5g Hefeextrakt und 5g NaCl mit Wasser auf 1l aufgefüllt, der pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt und bei 120°C / 4bar 30min lang autoklaviert.

SOC-Medium:

- 2% Trypton / 0,5% Hefe-Extrakt / 20mM Glucose / 0,05% NaCl / 2,5mM KCl / 10mM $MgCl_2$ (pH7,0)
- Zur Herstellung von SOC-Medium wurden 20g Trypton, 5g Hefeextrakt, 0,5g NaCl, 10ml 0,25M KCl, 5ml 2M $MgCl_2$ und 20ml 1M Glucose mit Wasser auf 1l aufgefüllt, der pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt und bei 120°C / 4bar 30min lang autoklaviert.

SOB-Medium:

- 2% Trypton / 0,5% Hefe-Extrakt / 0,05% NaCl / 2,5mM KCl / 10mM $MgCl_2$ (pH7,0)
- Zur Herstellung von SOC-Medium wurden 20g Trypton, 5g Hefeextrakt, 0,5g NaCl, 10ml 0,25M KCl und 5ml 2M $MgCl_2$ mit Wasser auf 1l aufgefüllt, der pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt und bei 120°C / 4bar 30min lang autoklaviert.

LB, LB^{amp}, LB^{kan} und $LB^{kan/amp}$-Platten:

- 1% Trypton / 0,5% Hefe-Extrakt / 0,5% NaCl / 1,5% Agar / Antibiotika (pH7,5)
- Zur Herstellung von (antibiotikahaltigen) LB-Platten wurden 10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl und 15g Agar mit Wasser auf 1l aufgefüllt, der pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt und bei 120°C / 4bar 30min lang autoklaviert. Nach Abkühlung auf unter 50°C erfolgte die Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Ampicillin: 50µg/ml, Kanamycin: 30µg/ml). Jeweils 15-20ml der noch flüssigen Agar-Lösung wurden daraufhin zur Aushärtung in sterile Petrischalen gegossen.

6.1.7. Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit kamen folgende Bakterienstämme (E. Coli K-12) zum Einsatz:

E. Coli K-12 Stamm	Charakteristika (Genotyp bzw. Phänotyp)
JM109	*F' traD36 proA+ proB+ lacIq (lacZ) M15 L (lac- proAB) hsdR17 recA1 endA1 relA1*
DH5α	*F $^-$ (Φ80d lacZΔM15) Δ (lacZYA-argF) U169 supE44 hsdR17(r $_\kappa$ −m $_\kappa$ +) recA1 gyrA96 endA1 thi-1 relA1 deoR λ $^-$*
M15[pREP4] (Qiagen)	Nal^s, Str^s, Rif^s, Thi$^-$, lac$^-$, Ara$^+$, Gal$^+$, Mtl$^-$, F$^-$, RecA$^-$, Uvr$^+$, Lon$^+$ sowie Kan^R (aus pREP4)

6.1.8. Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Plasmide als Ausgangsvektoren verwendet:

Vektor (Plasmid)	Charakteristika (Ursprung, Resistenzen…)
pEGFP-N1 (Clontech) (s. 8.4.6)	pUC-ori, SV40-ori, mammalian, CMV-Promotor, MCS (N-term.), EGFP-Gen, kan^R, neo^R, 4733bp
pTSA43 (T. Sano) (s. 8.4.3)	pBR322-ori, bakteriell, T7-Promotor, TSA43-Gen, amp^R, 5037bp
pQE30 (Qiagen) (s. 8.4.1)	pBR322-ori, bakteriell, T5-Promotor, 6xHis-tag (N-term.), MCS, amp^R, low copy, 3461bp

6.2. Oligonukleotidsynthese

6.2.1. Synthese der Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotidsynthesen im Rahmen dieser Arbeit wurden auf einem Expedite 8909 DNA Synthesizer (PerSeptive Biosystems) durchgeführt. Im Falle der Synthese von Oligonukleotid-Thiophosphaten wurde, zur Erhöhung der Ausbeute, das Standard-Kopplungsprotokoll durch ein Protokoll mit doppeltem Kopplungszyklus ersetzt. Pro Kartusche wurden jeweils ca. 1µmol Träger eingewogen.

doppeltes Thiophosphat-Basenkopplungsprotokoll (am Beispiel von A):

```
/* ------------------------------------------------------------------------------
*/
/*       Function             Mode  Amount Time(sec)         Description
*/
/*                                  /Arg1   /Arg2
*/
/* ------------------------------------------------------------------------------
*/
$Deblocking
 144 /*Index Fract. Coll.  */ NA         1     0  "Event out ON"
   0 /*Default             */ WAIT       0   1.5  "Wait"
 141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA         1     1  "START data collection"
  16 /*Dblk                */ PULSE     10     0  "Dblk to column"
  16 /*Dblk                */ PULSE     70    49  "Deblock"
  38 /*Diverted Wsh A      */ PULSE     40     0  "Flush system with Wsh A"
```

```
 141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA         0     1  "STOP data collection"
  38 /*Diverted Wsh A      */ PULSE     40     0  "Flush system with Wsh A"
 144 /*Index Fract. Coll.  */ NA         2     0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh                 */ PULSE      5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                 */ PULSE      5     0  "Flush system with Act"
  18 /*A + Act             */ PULSE      5     0  "Monomer + Act to column"
  18 /*A + Act             */ PULSE      2    16  "Couple monomer"
   2 /*Act                 */ PULSE      3    24  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE      7    56  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE      8     0  "Flush system with Wsh"
   1 /*Wsh                 */ PULSE      5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                 */ PULSE      5     0  "Flush system with Act"
  18 /*A + Act             */ PULSE      5     0  "Monomer + Act to column"
  18 /*A + Act             */ PULSE      2    16  "Couple monomer"
   2 /*Act                 */ PULSE      3    24  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE      7    56  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE      8     0  "Flush system with Wsh"
$Capping
  12 /*Wsh A               */ PULSE     20     0  "Flush system with Wsh A"
  13 /*Caps                */ PULSE      8     0  "Caps to column"
  13 /*Caps                */ PULSE      4    15  "Caps"
  12 /*Wsh A               */ PULSE      6    15  "Cap"
  12 /*Wsh A               */ PULSE     14     0  "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
  17 /*Aux                 */ PULSE     15     0  "Aux to column"
  17 /*Aux                 */ PULSE     12    60  "Aux"
  12 /*Wsh A               */ PULSE      6    60  "Slow pulse to thioate"
  12 /*Wsh A               */ PULSE     20     0  "Flush system with Wsh A"
$Capping
  13 /*Caps                */ PULSE      7     0  "Caps to column"
  12 /*Wsh A               */ PULSE      6    15  "Wsh A"
  12 /*Wsh A               */ PULSE     30     0  "End of cycle wash"
```

doppeltes Thiophosphat-Basenkopplungsprotokoll für einen 5´-Modifier:

```
/* ------------------------------------------------------------------------------
*/
/*       Function             Mode  Amount Time(sec)         Description
*/
/*                                  /Arg1   /Arg2
*/
/* ------------------------------------------------------------------------------
*/
$Deblocking
 144 /*Index Fract. Coll.  */ NA         1     0  "Event out ON"
   0 /*Default             */ WAIT       0   1.5  "Wait"
 141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA         1     1  "START data collection"
  16 /*Dblk                */ PULSE     10     0  "Dblk to column"
  16 /*Dblk                */ PULSE     70    49  "Deblock"
  38 /*Diverted Wsh A      */ PULSE     40     0  "Flush system with Wsh A"
 141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA         0     1  "STOP data collection"
  38 /*Diverted Wsh A      */ PULSE     40     0  "Flush system with Wsh A"
 144 /*Index Fract. Coll.  */ NA         2     0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh                 */ PULSE      5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                 */ PULSE      5     0  "Flush system with Act"
  22 /*5 + Act             */ PULSE      5     0  "Monomer + Act to column"
  22 /*5 + Act             */ PULSE      2    16  "Couple monomer"
   2 /*Act                 */ PULSE      3    24  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE      7    56  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE      8     0  "Flush system with Wsh"
   1 /*Wsh                 */ PULSE      5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                 */ PULSE      5     0  "Flush system with Act"
  22 /*5 + Act             */ PULSE      5     0  "Monomer + Act to column"
  22 /*5 + Act             */ PULSE      2    16  "Couple monomer"
   2 /*Act                 */ PULSE      3    24  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE      7    56  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE      8     0  "Flush system with Wsh"
$Oxidizing
  12 /*Wsh A               */ PULSE     30     0  "Flush system with Wsh A"
  17 /*Aux                 */ PULSE     15     0  "Aux to column"
  17 /*Aux                 */ PULSE     20   120  "Aux"
  12 /*Wsh A               */ PULSE      6    60  "Slow pulse to thioate"
  12 /*Wsh A               */ PULSE     30     0  "Flush system with Wsh A"
```

Reagenzien für die Oligonukleotidsynthese:

- Detritylierung: 3% ige Trichloressigsäure in Dichlormethan
- Aktivierung: DCI activator von Proligo (Dicyanoimidazol / Acetonitril 3/100 (w/v))
- Oxidation: Oxidizer von Proligo (Tetrahyrofuran/Wasser/Pyridin/Iod 77/2/21/25,4 (v/v/v/w))
- Sulfurierung: 10mg/ml Beaucage-Reagenz (3H-1,2-Benzodithiole-3-one-1,1-dioxide) in Acetonitril
- Capping: CAP A von Proligo (10% Acetanhydrid in THF) / CAP B von Proligo (Tetrahydrofuran / N-Methylimidazol 84/16 (v/v))
- Phosphorigsäureesteramide: 67mM in Acetonitril

6.2.2. Trägergebundene Detritylierung

Für eine trägergebundene Umsetzung des 3´-Endes mit einem NHS-Ester, muß die temporäre Schutzgruppe des 5´-Aminomodifiers am noch trägergebundenen Oligonukleotid abgespalten werden. Dazu wurde die Träger-Kartusche nach Ende der Synthese am Synthesizer belassen und manuell mit 30 Zyklen 3% TFA in DCM („Deblock“) detrityliert. Im Falle einer MMT-Schutzgruppe ist dabei über mehrere Zyklen hinweg eine intensive Gelbfärbung, verursacht durch das MMT-Kation, zu beobachten. Im Falle einer DMS(O)MT Schutzgruppe zeigt das DMS(O)MT-Kation eine intensive Rotfärbung. Die Intensität der Färbung gibt bereits einen ersten Hinweis auf die Qualität der Synthese.

6.2.3. Abspaltung vom Träger

Nach Ende der Synthese wurde der Inhalt der Kartuschen getrocknet und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt. Die Abspaltung des Oligonukleotids vom Träger und die Abspaltung der permanenten Schutzgruppen erfolgten durch die Zugabe von konz. Ammoniaklösung (200µl pro µmol Trägereinwaage) und einer 10-16 stündigen Reaktion bei 55°C.
Nach der Abspaltung wurde der Ammoniak im Speedvac abgezogen und die Probe in Wasser gelöst. Die Abbtrennung der verkürzten Sequenzen und der abgespaltenen Schutzgruppen erfolgte über RP-HPLC (s. Kap. 6.4.1).

6.3. Peptidsynthesen

6.3.1. Synthese der Peptide

Die Peptidsynthesen wurde auf einem Kem-En-Tec MKIII Peptidsynthesizer (Abb. 397 und Abb. 398) nach Standardprotokollen für die Fmoc-SPPS durchgeführt.



Abb. 397: Kem-En-Tec MKIII Peptidsynthesizer



Abb. 398: Programmoberfläche des Kem-En-Tec MKIII

Zunächst wurde das Trägermaterial (Wang Resin) in die Reaktionskammer des Gerätes eingewogen und mit ca. 6ml DMF zum Quellen gebracht. Für einen Standard-Ansatz wurden ca. 0,3mmol des Trägermaterials eingesetzt.
Für die einzelnen Kopplungen wurden die jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäuren, zusammen mit einer entsprechenden Menge des Katalysators HOBt, in die einzelnen Vorratsgefäße eingefüllt. Die eingewogenen Mengen ergaben sich aus der Größe des Ansatzes, wobei die Aminosäuren und das HOBt in einem vierfachen molaren Überschuss bezüglich der Beladung des Trägermaterials eingesetzt wurden.
Als allgemeines Lösungsmittel „Solvent A“ diente eine Mischung aus DMF und NMP im Verhältnis 1:1. Das Entschützen erfolgte mit „Solvent B“ in Form von 20% Piperidin in DMF. Als Aktivator diente PyBOP in DMF als „Solvent C“ welcher ebenfalls in vierfachem molaren Überschuss eingesetzt wurde.

6.3.2. Abspaltung vom Träger

Die Abspaltung des fertigen Peptids vom Trägermaterial und die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte durch eine Mischung aus:

- 10ml Trifluoressigsäure (TFA)
- 0,5ml Phenol
- 0,5ml Ethandithiol (EDT)
- 0,5ml Thioanisol
- 0,5ml Wasser

Das eigentliche Abspalten und Entschützen geschieht durch die Einwirkung der TFA auf den säurelabilen Linker und die säurelabilen Schutzgruppen. Die restlichen Bestandteile dienen als „Scavenger“ zum Abfangen von reaktiven Spaltprodukten.
Für die Abspaltung wurde das Trägermaterial nach der Synthese in eine Glasfritte überführt, mit 30ml Methanol gewaschen, getrocknet und in einen 50ml Rundkolben gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 10ml der Entschützungsmischung und eine Inkubation von 3h bei Raumtemperatur. Die Lösung mit dem nun freien Peptid wurde daraufhin durch eine Filternutsche mit Glasfritte (P3) gesaugt, der Rückstand mit 15ml TFA nachgewaschen und das Filtrat im Rotationsverdampfer eingeengt. Nach der Zugabe von 150ml kaltem Diethylether und einer 30minütigen Lagerung bei 4°C konnte das prezipitierte Peptid durch Filtration mit einer Glasfritte (P4) abgetrennt werden. Das in der Fritte befindliche Peptid wurde daraufhin noch mehrmals mit kaltem Diethylether gewaschen und schließlich getrocknet. Für die weitere Aufreinigung über RP-HPLC (s. Kap. 6.4.1) wurde das Peptid in 5% Essigsäure gelöst.

6.4. Aufreinigungs- und Trennmethoden

6.4.1. reversed-phase HPLC

Die reversed-phase HPLC (RP-HPLC) zur Analyse und preparativen Aufreinigung von Oligonukleotiden, Peptiden und Konjugaten erfolgte auf einem Waters-HPLC System mittels gradientengesteuerter Programme. Die analytischen Läufe wurden mit einer Flußrate (flow rate) von 1ml/min und einer analytischen Durchflussküvette (flow cell) durchgeführt. Für die preparative Aufreinigung kam eine preparative Durchflussküvette bei einer Flußrate von 6ml/min zum Einsatz. Der Verlauf des Gradienten ist in den jeweiligen Chromatogrammen blau dargestellt.

HPLC-System:

- Waters 600 Controller
- Waters 600 Pump
- Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
- Waters® Analytical TaperSlit™ FlowCell
- Waters® Semi-Prep TaperSlit™ Flow Cell
- Waters In Line Degasser A7

analytische RP-HPLC Säulen:

- Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 4,6x250mm (Phenomenex)
- Hauptsäule LiChroCART 125-4 RP-18e (Merck)
- Vorsäule LiChroCART 4-4 RP-18e (Merck)

preparative RP-HPLC Säule:

- Phenomenex PolymerX RP1 100Å 10x250mm (Phenomenex)
- Symetry C18 5µm 19x100mm (Waters)

RP-HPLC Puffersysteme:

- A: 0,1M TEAA (pH7,5) B: Acetonitril
- A: 0,04M KH_2PO_4 (0,002% H_3PO_4) B: Acetonitril
- A: 0,2% TFA in Wasser B: 0,2% TFA in Acetonitril

RP-HPLC Gradienten:

5bis55Proz_1ml_25min:

0min – 2min	5%B
2min – 17min	5%B – 55%B
17min – 18min	55%B
18min – 20min	55%B – 5%B
20min – 25min	5%B
Flow = 1ml/min	

5bis55Proz_6ml_25min:

0min – 2min	5%B
2min – 17min	5%B – 55%B
17min – 18min	55%B
18min – 20min	55%B – 5%B
20min – 25min	5%B
Flow = 6ml/min	

5bis80Proz_1ml_35min:

0min – 2min	5%B
2min – 25min	5%B – 80%B
25min – 28min	80%B
28min – 32min	80%B – 5%B
32min – 35min	5%B
Flow = 1ml/min	

10bis50Proz_6ml_25min:

0min – 2min	10%B
2min – 20min	10%B – 50%B
20min – 22min	50%B – 10%B
22min – 25min	10%B
Flow = 6ml/min	

20bis95Proz_1ml_20min:

0min – 7min	20%B – 95%B
7min – 10min	95%
10min – 13min	95%B – 20%B
13min – 20min	20%B
Flow = 1ml/min	

10bis30Proz_6ml_35min:

0min – 2min	10%B
2min – 25min	10%B – 30%B
25min – 30min	30%B – 80%B
30min – 32min	80%B – 10%B
32min – 35min	10%B
Flow = 6ml/min	

10bis30Proz_6ml_30min:

0min – 2min	10%B
2min – 25min	10%B – 30%B
25min – 26min	30%B – 10%B
26min – 30min	10%B
Flow = 6ml/min	

20bis80Proz_6ml_25min:

0min – 2min	20%B
2min – 17min	20%B – 80%B
17min – 20min	80%B – 20%B
20min – 25min	20%B
Flow = 6ml/min	

0bis13,5/50Proz_1ml_30min:

0min – 7min	0%B – 13,5%B
7min – 14min	13,5%B
14min – 18min	13,5%B–50%B
18min – 23min	50%B
23min – 26min	50%B – 0%B
26min – 30min	0%B
Flow = 1ml/min	

30bis50Proz_8ml_60min:

0min – 5min	30%B
5min – 45min	30%B – 50%B
45min – 50min	50%B – 100%B
50min – 51min	100%B – 30%B
51min – 60min	30%B
Flow = 8ml/min	

6.4.2. Ionenaustausch HPLC

Die Ionenaustausch HPLC (IE-HPLC) zur Analyse von Oligonukleotiden und Konjugaten erfolgte auf einem Waters-HPLC System mittels eines gradientengesteuerten Programms. Die Flußrate (flow rate) betrug 1ml/min bei Verwendung einer analytischen Durchflussküvette (flow cell). Als Säulenmaterial kamen die Anionenaustauscher Toyopearl SuperQ-650S (TOSOH Bioscience GmbH) sowie Resource™ Q (GE Healthcare) zum Einsatz. Der Verlauf des Gradienten ist in den jeweiligen Chromatogrammen blau dargestellt.

HPLC-System:

- Waters 600 Controller
- Waters 600 Pump
- Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
- Waters® Analytical TaperSlit™ FlowCell
- Waters In Line Degasser A7

analytische IE-HPLC Säulen:

- Toyopearl SuperQ-650S 250x4mm (TOSOH Bioscience GmbH)
- Resource™ Q 1ml (GE Healthcare)

IE-HPLC Puffersysteme:

- A: 0,01M TEAA pH8,5 B: 0,01M TEAA (pH8,5) + 4M NaCl
- A: 0,1M TEAA pH7,5 mit 50% FA B: 0,1M TEAA pH7,5 mit 50% FA + 2M LiCl

IE-HPLC Gradienten:

0bis100Proz_1ml_50min:

0min – 20min	0%B – 100%B
20min – 30min	100%B
30min – 40min	100%B – 0%B
40min – 50min	0%B
Flow = 1ml/min	

Resource Q (FA):

0min – 3min	0%B
3min – 13min	0%B – 100%B
13min – 14min	100%B
14min – 15min	100%B – 0%B
15min – 18min	0%B
Flow = 1ml/min	

6.4.3. Ionenaustausch FPLC

Die Ionenaustausch FPLC (IE-FPLC) zur preparativen Aufreinigung von Oligonukleotiden und Konjugaten wurde auf einem Pharmacia FPLC System durchgeführt. Der Wechsel zwischen den Gradienten mit verschiedenem Salzgehalt erfolgte manuell durch Umstecken des Pumpenansaugschlauches in ein anderes Pufferreservoir. Die Flußrate (flow rate) betrug, je nach Größe der verwendeten Säule, zwischen 1ml/min und 5ml/min. Die verwendeten Säulen wurden selbst befüllt. Als Säulenmaterial kam der starke Ionenaustauscher Toyopearl SuperQ-650M (TOSOH Bioscience GmbH) zum Einsatz.

FPLC-Geräte:

- FPLC-Säulen (leer)
- Pump P-1 (Peristaltikpumpe)
- Pump P-500 (Kolbenpumpe)
- UV-Single Path Monitor UV-1
- LKB REC102 (Messschreiber)

Säulenmaterial:

- Toyopearl SuperQ-650M (TOSOH Bioscience GmbH)

Puffersysteme für die FPLC:

- A: 0,01M TEAA (pH8,5) B: 0,01M TEAA (pH8,5) + 2M NaCl
- A: 0,01M $NaHCO_3$ (pH8,5) B: 0,01M $NaHCO_3$ (pH8,5) + 2M NaCl

Gradienten:

- 0% B bis 100% B

6.4.4. Größenausschlußfiltration

Die Größenausschlußfiltration wird zur Volumenverminderung (Aufkonzentrierung), zur Entsalzung und zum Pufferwechsel angewandt. Dazu wird die aufzukonzentrierende Lösung mittels Druck (Ultrafiltration) oder mittels Zentrifugalkraft (Ultrazentrifugation) durch eine Membran gedrückt. Die Membran weist Poren mit einer bestimmten Ausschlußgröße (MWCO = molecular weight cut off) auf, wodurch kleinere Moleküle, Salze und sonstige Pufferbestandteile die Membran passieren können, während größere Moleküle zurückgehalten werden.
Bei Anwendungen mit DNA liegt die optimale Ausschlußgröße bei ca. der Hälfte, bei Proteinen und Peptiden bei ca. einem Drittel der Molekülmasse. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide haben eine minimale Molekülmasse von ca. 6000Da, wodurch die einzusetzende Membran mindestens eine Ausschlußgröße von 3kDa aufweisen sollte. Das ebenfalls in dieser Arbeit verwendete Penetratin hat eine minimale Molekülmasse von 2700Da, was eine Ausschlußgröße von ca. 1kDa notwendig macht.

6.4.4.1. Ultrafiltration

Zur Ultrafiltration wurde eine Stirred Ultrafiltration Cell 8050 von Millipore mit einem Fassungsvolumen von 50ml eingesetzt. Durch das ständige Rühren soll verhindert werden, dass gelöste Stoffe während der Aufkonzentrierung ausfallen und sich auf der Membranoberfläche ansammeln. Die verwendeten Membranen (Ultrafiltration Membranes

PLAC04310 MWCO1000) basieren auf regenerierter Cellulose und haben eine Ausschlußgröße von 1kDa.
Die zu entsalzende Lösung wurde in die Zelle gefüllt und ein Druck von 4Bar Argon bzw. Stickstoff angelegt, wodurch die Lösung durch die Membran gedrückt wurde. Der auf ca. 1ml eingeengte Rückstand wurde daraufhin mehrmals mit je 10ml Wasser verdünnt und erneut durch die Membran gedrückt. Auf diese Weise sinkt der Salzgehalt nach z.B. siebenmaliger Verdünnung auf $(1/10)^7$ bzw. 1/10000000 der Ausgangskonzentration. Die qualitative Überwachung des Salzgehaltes erfolgte durch Messung der Leitfähigkeit.

6.4.4.2. Ultrazentrifugation

Für die Ultrazentrifugation kamen Roti®-Spin MINI Ultrazentrifugationseinheiten (Carl Roth GmbH) mit einer Ausschlußgröße von 3kDa und 10kDa zum Einsatz. Die Membran der Einheiten basiert auf einem Polyethylensubstrat und weist somit nur eine geringe Tendenz zur Proteinbindung auf. Das maximale Probenvolumen liegt bei 500 µl, das Konzentrat-Endvolumen bei 15 - 20 µl.
Zur Aufkonzentrierung wurde die Lösung in das Probenreservoir pipettiert und die komplette Ultrazentrifugationseinheit in eine Tischzentrifuge mit einem Rotor für 1,5ml Reaktionsgefäße gestellt. Die eingestellte Zentrifugalkraft betrug bei der Aufkonzentrierung von Oligonukleotiden 5000g, im Falle von Proteinen und Peptiden 14000g.

6.4.4.3. NAP-Säulen

Die ebenfalls zur Entsalzung von Oligonukleotiden (bzw. anderen Makromolekülen) und zum Pufferwechsel eingesetzten NAP™ 10 Säulen basieren auf dem Prinzip der Gelfiltration, also ebenfalls einem Größenausschlußprinzip. Als Säulenmaterial wird Sephadex G-25, ein quervernetztes Dextran, verwendet. Auch das Sephadex weist Poren mit einer bestimmten Ausschlußgröße (G-10 bis G-50) auf. Moleküle, welche größer als die Poren sind, laufen ungehindert durch die Säule und eluieren als erstes. Kleinere Moleküle und Salze diffundieren in die Poren der Sephadex-Matrix und legen somit einen längeren Weg zurück, sie eluieren erst später.
Zur Entsalzung eines Oligonukleotids wurde dieses in 1ml Wasser gelöst und auf die NAP™ 10 Säule aufgetragen. Nachdem die Flüssigkeit die Säule vollständig passiert hatte, wurde das noch in der Säule befindliche Oligonukleotid mit 1,5ml Wasser eluiert. Der Durchfluß erfolgt dabei durch reine Einwirkung der Schwerkraft.

6.4.5. PolyPak™ Kartuschen

PolyPak™ Kartuschen (Glen Research) dienen zur Abtrennung von Oligonukleotiden mit endständiger DMT-Gruppe von den während der Oligonukleotidsynthese anfallenden verkürzten Sequenzen ohne endständige DMT-Gruppe. Aufgrund des pH-stabilen Polymerharzes ist es möglich, die Ammoniaklösung direkt auf die PolyPak™ Kartusche aufzutragen, nachdem das Oligonukleotid vom Support abgespalten wurde.
Dazu wird die Kartusche zuerst mit 2ml Acetonitril und 2ml 2M TEAA pH7 equilibriert. Nach dem Auftragen der Ammoniaklösung mit den abgespaltenen Oligonukleotiden binden die vollständigen Sequenzen mit ihrer stark hydrophoben DMT-Gruppe an das reversed-phase Polymerharz. Die nicht bindenden, verkürzten Sequenzen werden daraufhin mit 2ml Wasser herausgewaschen. Durch die Zugabe von 2ml 2%iger TFA wird von dem noch in der Kartusche befindliche Oligonukleotid die DMT-Gruppe abgespalten, und das aufgereinigte Oligonukleotid kann mit einigen ml 20% Acetonitril aus der Kartusche eluiert werden. Die abgespaltene DMT-Gruppe verbleibt dabei in der Säule.

6.4.6. Polyacrylamid-Gel für Proteine

Die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) zur Untersuchung von Proteinen wurden in einer Minigel-Twin Elektrophoresekammer von Biometra (Geldimensionen: 10 cm x 10 cm x 0,1cm) nach der Methode von Laemmli[(140)] durchgeführt. Ein PAGE-Gel zur Proteinauftrennung besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Das weniger konzentrierte Sammelgel dient der Anreicherung der aufgetragenen Proben zur Bildung einer einheitlichen Lauffront vor dem eigentlichen Trenngel. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und zur Vermeidung eines Meniskus mit 0,1% SDS überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation (30-45 min) wurde die SDS-Lösung entfernt, das Sammelgel gegossen und der Probentaschen-Kamm eingesetzt.

5%iges Sammelgel (2 Stück):

- 0,75ml 40% Acrylamid/ Bis-Acrylamid 37,5:1
- 0,75ml 1M Tris-HCl pH6,8
- 4,4ml Wasser
- 60µl 10% SDS
- 60µl APS
- 6µl TEMED

18%iges Trenngel (2 Stück):

- 6,75ml 40% Acrylamid/ Bis-Acrylamid 37,5:1
- 3,75ml 1M Tris-HCl pH6,8
- 4,2ml Wasser
- 150µl 10% SDS
- 150µl APS
- 6µl TEMED

Der Abstand zwischen dem Boden der Probentaschen und dem Trenngel sollte ca. 1cm betragen. Der Kamm wurde nach ca. 30min entfernt und die Platten in die Minigelapparatur eingebaut. Die Taschen wurden anschließend mit SDS-Laufpuffer (250m M Tris / 2M Glycin / 1% SDS) gespült und mit den in SDS-Probenauftragspuffer (RotiLoad) aufgenommenen Proben beladen (pro Tasche höchstens 20µl). Auf mindestens eine Bahn wurde zur Bestimmung des Molekulargewichts ein Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 25mA pro Gel innerhalb von ca. 70min.

6.4.7. Färbung von Polyacrylamid-Gelen mittels Coomassie-Brillant-Blau

Nach der Elektrophorese wurden die Platten aus der Elektrophoresekammer ausgebaut und das Sammelgel abgeschnitten. Das Trenngel wurde daraufhin 45min lang in eine Fixierlösung (Methanol/Wasser/Essigsäure 5:5:1) gegeben und 30min lang mit Coomassie G250 gefärbt (0,1% Coomassie G250 in Fixierlösung). Um den unspezifisch angefärbten Hintergrund wieder zu entfärben, erfolgten abschließend mehrere Waschvorgänge in einer Entfärbelösung (Ethanol/Wasser/Essigsäure 1:8:1).

6.4.8. Polyacrylamid-Gel für Oligonukleotide

Die elektrophoretische Auftrennung von Oligonukleotiden erfolgte durch ein 19%iges Polyacrylamid-Minigel mit den Dimensionen 10cm x 10cm x 0,1cm. In der Regel wurden zwei Gelläufe parallel in einer Minigel-Twin Elektrophoresekammer von Biometra durchgeführt.
Für ein Gel wurden 6,3g UREA, 7,5ml Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 (40%), 1,5ml TBE-Puffer (10x) und 1,5ml Wasser zusammengegeben und bis zum vollständigen Lösen des Harnstoffs bei 37°C erwärmt.
Der Start der Polymerisation erfolgte schließlich durch die Zugabe von 90µl APS (10%) sowie 7µl TEMED. Unmittelbar nach der Zugabe der Radikalstarter wurde die Lösung zwischen die beiden Glasplatten der Gelelektrophoreseapparatur pipettiert und ein 10-Taschen Kamm eingesetzt. Die Polymerisationsdauer betrug 60min.

Nach Ende der Polymerisationszeit wurde der Kamm entfernt, die Platte in die Elektrophoresekammer eingebaut, mit TBE-Puffer (1x) aufgefüllt und die Taschen gründlich mit TBE-Puffer gespült. Vor der Auftragung der Proben wurde das Gel durch einen zehnminütigen Vorlauf bei 5mA equilibriert.
Für die Auftragung wurden 0,01nmol der jeweiligen Probe mit 5µl Formamid versetzt und 5min lang auf 56°C erhitzt.
Zur Kontrolle des Fortschritts des Gellaufs diente ein Gemisch aus jeweils 5µl der farbigen Probeauftragepuffer Roti®-Load DNA-orange 1 (Orange G) und Roti®-Load DNA (Bromphenolblau und Xylencyanolblau). Der Gewichtsmarker (M) bestand aus gleichen Anteilen (je 0,01nmol) an mPEG1000-ONT1-mPEG1000, mPEG400-ONT1-mPEG400, ONT1, ONT1 (n-1) und ONT1 (n-2) (in absteigender Reihenfolge).
Sowohl der Gewichtsmarker (M) als auch der Farbmarker (F) wurden ebenfalls mit 5µl Formamid versetzt und 5min lang bei 56°C erhitzt. Die Laufzeit des Gels betrug ca. 2,5h bei 5mA. Der Gellauf wurde beendet, sobald der gelbe Farbstoff Orange G die Unterkante des Gels erreicht hatte.

6.4.9. Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Nach der Elektrophorese wurde der Taschenbereich des Gels mit einem scharfen Skalpell abgetrennt und das Gel vorsichtig entnommen.
Die Silberfärbung zur Visualisierung der DNA-Banden erfolgte mittels des Roti®-Black N Kit nach Angaben des Herstellers.
Zuerst wurde das Gel durch eine 15minütige Inkubation in einem Gemisch aus 20ml Methanol, 5ml Essigsäure und 75ml Wasser fixiert. Nach einem kurzen Waschschritt folgte eine 30minütige Imprägnierung in einer wässrigen Lösung aus Silbernitrat und Formaldehyd, wiederum gefolgt von einem kurzen Waschschritt.
Die Entwicklung erfolgte 5min lang in einer Lösung aus Natriumcarbonat und Natriumthiosulfat.
Nach der Entwicklung wurde das Gel mit den nun sichtbaren Banden 10min lang in eine Stopplösung mit EDTA gegeben. Nach zwei weiteren jeweils fünfminütigen Waschschritten erfolgte schließlich die Überführung in eine Trockenlösung (15ml Ethanol, 10ml Glycerin, 75ml Wasser) und eine anschließende mehrtägige Trocknung zwischen zwei Frischhaltefolien.

6.4.10. Digitalisierung von Polyacrylamid-Gelen

Zur Digitalisierung wurde das noch in der Stopplösung, Trockenlösung oder Entfärbelösung befindliche Gel auf einen Leuchttisch gestellt und mittels einer Digitalkamera (Canon EOS 350D) abfotografiert. Eine anschließende allgemeine Kontrastanpassung erfolgte mittels des Programms Photoshop PS2.

6.4.11. Bestimmung der Bandenintensitäten von Polyacrylamid-Gelen

Die Bestimmung der Bandenintensitäten in Polyacrylamidgelen erfolgte mittels des Programms ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Version 1.42q).
Dazu wurde zunächst mittels der Funktion *Process / Subtract Background* das Hintergrundrauschen entfernt und das Bild durch die Funktion *Edit / Invert* invertiert.
Die densitometrische Bestimmung erfolgte durch Markierung der jeweiligen Bande mittels einer Rechteck-Auswahl und einer Integration durch den Menüpunkt *Analyze / Measure (Integrated Density)*.

6.5. Quantifizierung durch Bestimmung der UV-Absorption

Die Quantifizierung von DNA (Plasmide und Oligonukleotide) in wäßrigen Lösungen erfolgte durch Bestimmung der UV Absorption bei 260nm auf Basis des Lambert-Beerschen Gesetzes in einem DU7500 Spectrophotometer (Beckmann) oder einem Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia). Die Absorption ist in einem Bereich von A=0,05 bis A=1,5 hinreichend genau linear von der Konzentration der DNA abhängig. Eine Absorption von A=1 bei einer Wellenlänge von 260nm und einer Küvettenlänge von 1cm entspricht bei doppelsträngiger Plasmid-DNA einem OD-Wert von OD_{260}=1, was einer Konzentration von ungefähr 50 µg/ml entspricht. Im Falle der Oligonukleotide erfolgte die Umrechnung des OD-Wertes auf die Stoffmenge anhand des jeweiligen Extinktionskoeffizienten ε (n=OD/ε).

6.6. MALDI-TOF MS

Zur Entfernung von Natriumionen, welche zu störenden Addukt-Peaks im MALDI-Spektrum führen, wurden jeweils ca. 300pmol der zu untersuchenden Substanz in 100µl Wasser gelöst und mit einigen Körnchen Kationenaustauscher versetzt. Die Suspension wurde 30min bei Raumtemperatur inkubiert, hin und wieder gevortext und schließlich im Speedvac getrocknet.

Für reine Oligonukleotid-Thiophosphate und PEG-derivatisierte Oligonukleotide kam eine Matrixlösung aus 3-Hydroxypicolinsäure (gesättigte Lösung in Wasser / Acetonitril 7:3) und Ammoniumcitratpuffer (gesättigte Lösung in Wasser / Acetonitril 7:3) zum Einsatz.
Für Oligonukleotid-Penetratin Konjugate wurde eine Matrixlösung aus 2,6-Dihydroxyacetophenon (20mg in 0,5ml Methanol) und Ammoniumcitratpuffer (40mg in 0,5ml Wasser) verwendet.

Von der jeweiligen Lösung wurden 2µl auf eine MALDI-Platte aufgetragen und zur Kristallisation gebracht.
Die MALDI-TOF Messungen erfolgten auf einem Reflex III Reflektor-Flugzeitmassen-spektrometer (Bruker) im Reflektor-Modus (PEG-derivatisierte Oligonukleotide) bzw. im Positiv-Modus (Oligonukleotid-Penetratin Konjugate).

6.7. molekularbiologische Arbeitsmethoden

6.7.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden auf einem Thermocycler PCRSprint (Hybaid) mit einem, je nach Bedarf, leicht abgewandelten Standard-Temperaturprogramm (s. Tab. 17) durchgeführt. Zuerst wurden die einzelnen Bestandteile des PCR-Ansatzes, ohne die Taq-Polymerase, in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und dieses in den Thermocycler überführt. Als nächstes erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 94°C, was zu einer Denaturierung der Template-DNA führte. Da die Taq-Polyerase zwar einigermaßen thermostabil ist, bei einer so langen Erhitzung auf 94°C aber dennoch teilweise inaktiviert werden könnte, wurde die Taq-Polyerase erst nach diesen ersten 5 Minuten zugegeben.
Nach der Zugabe der Taq-Polymerase startete das Temperaturprogramm (s. Tab. 17), welches aus 35 Zyklen bestand. Nach dem letzten Zyklus erfolgte ein zehnminütiger finaler Elongationsschritt bei 72°C. Am Ende der PCR wurde der Ansatz auf 4°C heruntergekühlt, um eventuelle unspezifische Nebenreaktionen zu vermeiden.

PCR-Ansatz:

- 2,5µl 10xPCR-Puffer (50mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$)
- 0,5µl dNTP-Mix (200µM)
- 10pmol forw.-Primer
- 10pmol rev.-Primer
- 1ng Template

→ mit Wasser auf 25µl auffüllen

Temperaturprogramm:

1x:
- 5min bei 94°C
  → 1,5U Taq-Polymerase nach 2min
- 0,5min bei 50°C
- 1min bei 72°C

35x:
- 0,5min bei 94°C
- 0,5min bei 55°C
- 1min bei 72°C

→ 10min bei 72°C → 4°C

Tab. 17: Standard-Reaktionsansatz und Standard-Temperaturprogramm einer PCR

6.7.2. Restriktionsverdau

Sämtliche Restriktionsschnitte im Rahmen dieser Arbeit wurden mit den Enzymen BamH1 und Kpn1 (GE Healthcare) durchgeführt. Als Reaktionspuffer kam der Universalpuffer OPA^+ (One-Phor-All Buffer PLUS von GE Healthcare) zum Einsatz.
Der zehnfach konzentrierte Stammpuffer setzt sich aus 100mM Tris-Acetat (pH7,5), 100mM Mg-Acetat und 500mM K-Acetat zusammen. Laut Herstellerangaben sollte der Verdau mit BamH1 bei einer zweifachen Pufferkonzentration und einer Temperatur von 30°C durchgeführt werden, während für den Verdau mit Kpn1 eine einfache Pufferkonzentration bei 37°C empfohlen wird. Aufgrund dieser unterschiedlichen Pufferbedingungen war ein Doppelverdau, also der gleichzeitige Einsatz beider Restriktionsenzyme, nicht ohne weiteres möglich.
Aus diesem Grund wurde zunächst ein doppelt konzentrierter Puffer (5µl 10x OPA^+ in 25µl) vorgelegt. Der Restriktionsschnitt mit 15U BamH1 erfolgte 1h lang bei 30°C, gefolgt von einer 20min Inaktivierung bei 80°C. Der Ansatz wurde daraufhin mit dem gleichen Volumen Wasser (25µl) aufgefüllt, um einen einfach konzentrierten Puffer für den Verdau mit Kpn1 zu erhalten. Der Restriktionsschnitt mit 15U Kpn1 erfolgte 1h lang bei 37°C, wiederum gefolgt von einer 20min Inaktivierung bei 80°C.
Die Abtrennung des durch den Verdau generierten Zielprodukts erfolgte durch Agarose-Gelaufreinigung (s. Kap. 6.7.3) und anschließende Gelextraktion (s. Kap. 6.7.4).

6.7.3. Agarosegele

Die im Rahmen dieser Arbeit für die Analyse und Aufreinigung verdauter oder unverdauter Plasmid-DNA verwendeten Agarose Gele wiesen eine Konzentration von 1% bzw 1,2% auf, wodurch ein Trennbereich von 0,4kb bis 7kb abgedeckt wurde. Für die Analyse und Aufreinigung der kürzeren PCR-Produkte wurden in der Regel Gele mit einer Konzentration von 1,4% eingesetzt, was einen Trennbereich von 0,2kb bis zu 3kb ermöglicht.
Als Laufpuffer und Gelpuffer wurde TAE-Puffer (40mM Tris-Acetat (pH8) / 1mM EDTA) verwendet, die Visualisierung erfolgte durch Ethidiumbromid, welches mit der doppelsträngigen DNA interkaliert.
Zunächst wurden 8ml 50xTAE-Puffer (2M Tris-Acetat (pH8) / 50mM EDTA) mit Wasser auf 400ml aufgefüllt, um einen 1x TAE-Puffer (40mM Tris-Acetat (pH8) / 1mM EDTA) als Laufpuffer und Gelpuffer zu erhalten.

Für ein 1% Gel wurden 0,5g Agarose in einen 250ml Erlenmeyerkolben abgewogen und in 50ml 1x TAE-Puffer suspendiert. Für ein 1,2% Gel wurden dementsprechend 0,6g Agarose, für ein 1,4% Gel 0,7g Agarose eingewogen. Zum Lösen der Agarose wurde die Suspension 1min lang bei 600W in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlung auf 50°C wurden zur Visualisierung der DNA 2,5µl Ethidiumbromid (10mg/ml) zugegeben, was zu einer Ethidiumbromid-Konzentration von 0,5µg/ml führte. Danach wurde die Lösung in den mit Klebeband abgedichteten Gelschlitten gegossen, ein Kamm für die späteren Geltaschen eingesetzt und 30min lang ausgehärtet.
Nach der Aushärtung wurde das Abdichtband entfernt, der Gelschlitten in die Elektrophorese-Apparatur (Agagel G 45/1 Horizontal Gel von Biometra) eingesetzt und die Kammer mit 250ml 1x TAE-Puffer gefüllt.
Die aufzutragenden Proben wurden mit 4µl 5x Probeauftragepuffer (Roti®-Load DNA) versetzt, mit Wasser auf 20µl aufgefüllt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftragemenge der Proben betrug bei analytischen Untersuchungen 0,5µg DNA, für preparative Abtrennungen wurden maximal 5µg aufgetragen. Mindestens eine Bahn wurde mit einem entsprechenden Größenmarker (1µg mit 16µl Wasser und 4µl 5x Auftragepuffer) beladen.
Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100V und einer Laufzeit von ca. 2-3h.
Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem UV-Scanner (Fuji FLA-2000, 532nm, O580-Filter) eingescannt.

6.7.4. Gelextraktion und Säulenaufreinigung

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde ein QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Das System basiert auf der Eigenschaft der DNA, in Gegenwart von hochkonzentrierten chaotropen Salzen (z.B. Bariumsalze, Guanidinhydrochlorid, Guanidiniumthiocyanat, Perchlorate), welche die Ausbildung von geordneten Wasserstoffbrückenbindungen stören, reversibel an Glasoberflächen (z.B. an eine Silika-Membran) zu binden. Nach einem Waschschritt wird die DNA schließlich mittels eines Puffers mit niedriger Salzkonzentration (oder Wasser) wieder eluiert.
Zunächst wurde das Gel unter eine UV-Lampe gelegt, um die nun sichtbare DNA-Bande mit einem Skalpell auszuschneiden. Das Agarosestück mit der zu extrahierenden DNA wurde daraufhin gewogen und pro 100mg Agarose 300µl des Puffers QG zugegeben. Nun erfolgte das Auflösen der Agarose über einen Zeitraum von 10min bei 50°C unter mehrmaligem Vortexen. Die Lösung wurde daraufhin in eine Spin Column mit Silika-Membran überführt, 1min lang bei 15000g zentrifugiert, der Durchfluß erneut aufgetragen und nochmals 1min lang bei 15000g zentrifugiert. Danach erfolgten die Zugabe von 0,75ml des Puffers PB und eine weitere Zentrifugation bei 15000g. Für den folgenden Waschschritt wurden 0,75ml Puffer PE zugegeben, 5min inkubiert und 1min lang bei 15000g zentrifugiert. Die noch in der Säule befindliche, aufgereinigte DNA konnte nun mit 60µl Wasser, nach einer Einwirkzeit von 10min, durch Zentrifugation mit 15000g eluiert werden.
Die Anwendung der Silika-Membran Säulenaufreinigung ist aber nicht nur auf eine Extraktion von DNA aus Agarosegelen beschränkt. Es besteht auch die Möglichkeit der Abtrennung von Primern, Nukleotiden, Enzymen, Mineralöl, Salzen, Ethidiumbromid und anderen in der Probe vorhanden Stoffen ohne vorherigen Gellauf.

6.7.5. Ligase-Reaktion

Für einen Ligationsansatz wurden in der Regel 40ng des Vektors und ein fünffacher molarer Überschuss des zu ligierenden Fragementes eingesetzt.

Dazu wurden 40ng des geschnittenen, gelaufgereinigten Plasmids mit 5µl 10x T4-Ligasepuffer (300mM Tris-HCl pH7,8 / 100mM $MgCl_2$ / 100mM DTT / 10mM ATP) und einem fünffachen molaren Überschuss des geschnittenen, gelaufgereinigten Inserts in ein 0,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach dem Auffüllen auf 49µl erfolgte die Zugabe von ca. 3U bzw. 1µl T4-DNA Ligase (Promega) und eine Inkubation bei 16°C über Nacht.
Die Ligationsansätze wurden daraufhin direkt für die Transformation in kompetente E. coli verwendet (s. Kap. 6.7.7).

6.7.6. Kompetente Zellen

E. coli-Zellen müssen für eine Transformation zunächst ‚kompetent' gemacht werden. Dazu wurden 5ml SOB-Medium mit einer E. coli Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 50ml SOB-Medium mit 1ml dieser Übernacht-Kultur versetzt und bis zu einer Absorption A_{600} = 0,5-0,7 weiter kultiviert, wobei sich die Zellen hier in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Sie wurden anschließend durch Zentrifugieren bei 4°C und 4000g sedimentiert, in 8ml kaltem RF-1 (100mM RbCl / 30mM KAc / 10mM CaCl2 / 50mM MnCl2 / 15% Glycerin / pH5,8) resuspendiert und 15min lang auf Eis gestellt. Nach erneuter Sedimentation bei 4°C und 4000g wurde das Pellet in 1,5ml kaltem RF-2 (10mM MOPS / 10mM RbCl / 75mM CaCl2 / 15% Glycerin / pH6,8) resuspendiert. Diese Suspension von E. coli wurde in 400µl Portionen aliquotiert und meist sofort für Transformationen (s. Kap. 6.7.7) verwendet. Durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und einer Lagerung bei –70°C sind die kompetenten Zellen aber auch bis zu 6 Monate haltbar.

6.7.7. Transformation

Zur Transformation wurden 100µl der kompetenten E. coli mit 1-10ng Plasmid-DNA oder mit der Hälfte (25µl) eines Ligationsansatzes (s. Kap. 6.7.5) versetzt und 15min lang auf Eis gestellt. Danach wurde der Transformationsansatz 35sek lang auf 42°C erhitzt und erneut 2min lang auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 500µl SOC-Medium folgte eine Inkubationszeit von 45min bei 37°C. Schließlich wurden die Ansätze zur Selektion auf antibiotikahaltige Nährplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.7.8. Plasmidpreparation

Für die Plasmidpreparationen zum schnellen Screening wurde das GFX Micro Plasmid Prep Kit von GE Healthcare verwendet. Mit Hilfe dieses Kits sind Ausbeuten von einigen µg Plasmid-DNA aus einer 3ml Kultur in weniger als 30min möglich, was für ein Agarosegel bzw. eine Sequenzierung ausreichend ist. Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, kam das Plasmid Mini Kit von Qiagen zum Einsatz, mit dem Ausbeuten bis zu 20µg Plasmid-DNA aus einer 50ml Kultur in ca. 2h möglich sind.
Beide Kits machen sich die unterschiedliche Größe von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA zu Nutze und basieren, analog zu den Spin Colums für die Gelextraktion (s. Kap. 6.7.4), auf einer reversieblen Bindung der DNA an einer Silika-Membran bei hoher Konzentration an chatropen Salzen. Die Preparation läuft bei beiden Kits im Wesentlichen in 7 Schritten ab:

- Anzucht der Kultur mit dem zu isolierenden Plasmid
- Suspendieren der Bakterien in einer RNase-haltigen Lösung, wodurch ein Abbau der RNA erfolgt, die ansonsten zusammen mit den Plasmiden isoliert würde
- Alkalische Lyse der Zellen mit einem SDS-haltigen Puffer, wobei Proteine und chromosomale DNA denaturieren und mit den restlichen Zelltrümmern abzentrifugiert werden
- Neutralisation mit einem Puffer mit hoher Konzentration an chaotropen Salzen
- Binden der Plasmid-DNA an eine Silika-Matrix
- Waschschritt zum Entfernen noch vorhandener Proteinreste und sonstiger Verunreinigungen
- Eluieren der Plasmid-DNA mit einem Puffer niederer Salzkonzentration (oder mit Wasser)

Im Falle der Preparationen mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit wurde eine 50ml-Kultur (OD_{600} = ca. 1,5) auf zwei 50ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 15min lang bei 4°C und 5300rpm pelettiert. Die zusammengehörenden Zellpellets wurden daraufhin in 5ml kaltem Puffer P3 (Pufferlösung mit EDTA und RNase) resuspendiert und gut gevortext.
Nach Zugabe von 5ml kaltem Puffer P2 (Lösung mit NaOH und SDS) wurde das Zentrifugenröhrchen 5mal vorsichtig gedreht und genau 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 5ml kaltem Puffer P3 (Pufferlösung mit chaotropen Salzen), wobei das Zentrifugenröhrchen wiederum 5mal gedreht wurde.
Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer 10min lang bei 10000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 10ml Isopropanol ausgefällt.
Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 10000rpm wurde der Überstand abgenommen, das DNA-Pellet in 100µl TE-Puffer gelöst und mit 900µl Puffer QBT auf 1ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde auf eine mit 1ml Puffer QBT equilibrierte Qiagen-Tip 20 Säule aufgetragen und die jetzt an die Silika-Membran gebundene DNA 4mal mit 1ml Puffer QC gewaschen.
Die Eluierung der Plasmid-DNA erfolgte mit 0,8ml Puffer QF, gefolgt von einer Prezipitation durch die Zugabe von 560µl Isopropanol und einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 15000rpm.
Das DNA-Pellet wurde schließlich mit 1ml 70% Ethanol gewaschen, erneut mit 15000rpm abzentrifugiert und 10min lang bei 37°C im Heizblock getrocknet. Die Ausbeuten an Plasmid-DNA lagen bei diesem Verfahren meist bei 15-20µg.

Für die Schnell-Preparationen mit Hilfe des GFX Micro Plasmid Prep Kit von GE Healthcare wurde eine 3ml-Kultur (OD_{600} = ca. 1,5), auf zwei Portionen verteilt, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und 30sek lang bei 15000g abzentrifugiert.
Das Zellpellet wurde darufhin durch kräftiges Vortexen in 300µl Lösung I (Pufferlösung mit EDTA und RNase) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 300µl Lösung II (Lösung mit NaOH und SDS), wobei das Reaktionsgefäß vorsichtig ca. 10mal gedreht wurde.
Nach einer Inkubationszeit von 5min wurde durch Zugabe von 600µl Lösung III (Acetatpuffer mit chaotropen Salzen) und mehrmaligem vorsichtigem Drehen das Lysat schließlich neutralisiert. Die dabei ausgefallenen Zelltrümmer sowie die chromosomale DNA wurden durch einen 5-minütigen Zentrifugationsschritt mit 15000g abgetrennt und der plasmidhaltige Überstand, auf zwei Portionen verteilt, in eine GFX-Säule überführt. Nach einer jeweils einminütigen Inkubation wurde die Lösung bei 15000g abgetrennt, wobei die Plasmid-DNA in der Silika-Matrix gebunden blieb.
Nun folgte der Waschschritt mit 400µl Waschpuffer und einer einminütigen Zentrifugation bei 15000g. Die noch in der Säule gebundene Plasmid-DNA wurde schließlich durch Zugabe

von 100µl Wasser gelöst und durch einen letzten Zentrifugationsschritt mit 15000g eluiert. Die Ausbeuten an Plasmid-DNA lagen bei diesem Verfahren meist zwischen 2 und 5µg.

6.7.9. Expression

Die Expression der Zielproteine erfolgte mit E. coli des Stammes M15[pREP4], welche eine Kanamycin-Resistenz durch das pREP4-Plasmid aufweisen. Nach der Transformation mit einem pQE-Plasmid weisen die Bakterien zusätzlich eine Ampicillin-Resistenz auf. Aus diesem Grund muß das Kulturmedium für die Expression diese beiden Antibiotika enthalten.
Für einen Standard-Expressionsansatz wurde zunächst eine Übernachtkultur der mit dem entsprechenden Plasmid transformierten M15[pREP4] Zellen in 5ml $LB^{kan/amp}$–Medium angesetzt.
Am nächsten Tag wurden 100ml $LB^{kan/amp}$–Medium auf 37°C bzw. 29°C erwärmt und 1ml der Übernachtkultur zugegeben. Während der nun folgenden Inkubation bei 37°C bzw. 29°C wurde der Ansatz mit 100rpm geschüttelt und alle 30min 1ml zur Messung der Zelldichte entnommen.
Sobald ein OD_{600} Wert von ca. 0,5 erreicht war (nach ca. 4-6h), erfolgte die Induktion der Expression durch die Zugabe von 100µl 1M IPTG-Lösung, was zu einer IPTG-Konzentration von 1mM führte. Die Expressionsansätze wurden nach der Induktion mindestens weitere 4h bei 29°C und 200rpm inkubiert, die Zelldichte gemessen und dementsprechend in Aliquote zu je ca. 50 OD aufgeteilt. Schließlich wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 4000g geerntet und bei -20°C eingefroren.

6.7.10. Denaturierende His-tag Aufreinigung

Für die denaturierende Aufreinigung der His-tag markierten Zielproteine wurden folgende harnstoffhaltige Puffer verwendet:

- B: 100mM NaH_2PO_4 / 8M Harnstoff / 10mM Tris-HCl (pH8,0)
- C: 100mM NaH_2PO_4 / 8M Harnstoff / 10mM Tris-HCl (pH6,3)
- D: 100mM NaH_2PO_4 / 8M Harnstoff / 10mM Tris-HCl (pH5,9)
- E: 100mM NaH_2PO_4 / 8M Harnstoff / 10mM Tris-HCl (pH4,5)

Um analytische Mengen der exprimierten Zielproteine zu isolieren, wurden ca. 3 OD der geernteten Zellen unter sanftem Vortexen in 400µl Puffer B lysiert und die Zelltrümmer 10min lang bei 15000g abzentrifugiert. Das überstehende, proteinhaltige Lysat wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100µl einer 50% Suspension von Ni-NTA Sepharose vesetzt. Während einer 30-minütigen Inkubation unter leichtem Schütteln fand eine Bindung des His-tag haltigen Zielproteins an die Ni-NTA Matrix statt.
Nach der Inkubation wurde die Ni-NTA Sepharose mit dem gebundenen His-tag Protein 30sek lang bei 15000g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sepharose-Pellet wurde daraufhin zweimal mit je 250µl Puffer C gewaschen und erneut abzentrifugiert.
Durch die Zugabe von 3x 50µl Puffer E wurde das Zielprotein schließlich aus der Ni-NTA Matrix eluiert. Die auf diese Weise gewonnenen Proteinmengen sind für analytische Untersuchungen wie SDS-PAGE ausreichend.
Für eine denaturierende Aufreinigung im größeren Stil wurden ca. 50 OD der geernteten Zellen in ca. 10ml Puffer B resuspendiert und durch eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und gelegentliches Vortexen lysiert. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch einen 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 10000g und Raumtemperatur.
Der proteinhaltige Überstand wurde daraufhin mit 2,5ml einer 50% Suspension von Ni-NTA Sepharose versetzt und 30min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die

Mischung aus Lysat und Ni-NTA Sepharose mit gebundenem His-tag Protein wurde daraufhin in eine leere Säule geladen und die überstehende Flüssigkeit durch Schwerkrafteinwirkung entfernt. Nach 4-maligem Waschen mit je 2ml Puffer C erfolgte schließlich die Elution mit 2ml Puffer E.

6.7.11. Dot-Blot Hybridisierung mit Chemilumineszenz-Immunoassay

Zur Dot-Blot-Hybridisierung wurde eine Nitrocellulosemembran in Streifen geschnitten, mit einem weichen Bleistift in einzelne Felder unterteilt und kurz in Wasser und TBST-Puffer angefeuchtet. Auf den noch feuchten Membranstreifen folgte die punktförmige (Dot) Auftragung von jeweils 1-3µl der zu untersuchenden Probe. Zur Belegung unspezifischer Bindungsstellen und der damit verbundenen Verringerung des Hintergrundrauschens wurde die Membran mit den aufgetragenen Proteinen daraufhin über Nacht in 20ml Roti-Block Puffer blockiert.
Die einstündige Inkubation mit dem jeweiligen HRP (horseradish peroxidase) -konjugierten Antikörper erfolgte direkt im Blockierungspuffer, gefolgt von zehn jeweils fünfminütigen Waschschritten in je 20ml PBST-Puffer.
Zur Visualisierung wurden gleiche Volumina (je 3ml) des Chemilumineszenz-Substrats Roti-Lumin 1 und Roti-Lumin 2 gemischt und mit einer Pipette auf die Membran gegeben. Die Meerrettich-Peroxidase (HRP) setzt dabei in Anwesenheit von H_2O_2 Luminol um, wobei ein Anion im angeregten Zustand entsteht, welches beim Zurückfallen in den Grundzustand Licht emittiert. Nach einer einminütigen Inkubation in der Roti-Lumin Arbeitslösung wurde diese abgetropft und die Membran in durchsichtige Cellophanfolie eingewickelt. Schließlich erfolgte die Belichtung auf einen Röntgenfilm.

7. Literatur

1. **Ng E.W., Shima D.T., Calias P., Cunningham E.T.Jr, Guyer D.R., Adamis A.P.** Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* **5**, 123-132 (**2006**).

2. **Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J.** Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3-26 (**2001**).

3. **Derossi D., Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G., Prochiantz A.** Cell internalisation of the third helix of antennapedia homeodomain is receptor independent. *J. Biol. Chem.* **271**, 18188-18193 (**1996**).

4. **Gregoire J.C., Loret P.E.** Conformational heterogeneity in two regions of TAT results in structural variations of this protein as a function of HIV-1 isolates. *J. Biol. Chem.* **271**, 22641-22646 (**1996**).

5. **Zhu W.L., Shin S.Y.** Antimicrobial and Cytolytic Activities and Plausible Mode of Bactericidal Action of the Cell Penetrating Peptide Penetratin and Its Lys-linked Two-Stranded Peptide. *Chemical Biology & Drug Design* **73**, 209-215 (**2009**).

6. **Antopolsky M., Azhayev A.** Stepwise Solid-Phase Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates on New Solid Supports. *Helvetica Chimica Acta* **82**, 2130-2140 (**1999**).

7. **Turner J.J., Williams D., Owen D., Gait M.J.** Disulfide Conjugation of Peptides to Oligonucleotides and Their Analogs. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* **Unit 4.28.2**, (**2006**).

8. **Stetsenko D.A., Gait M.J.** Efficient Conjugation of Peptides to Oligonucleotides by "Native Ligation". *J. Org. Chem.* **65**, 4900-4908 (**2000**).

9. **Wei Z., Tung C-H., Zhu T., Stein S.** Synthesis of Oligoarginine-Oligonucleotide Conjugates and Oligoarginine-Bridged Oligonucleotide Pairs. *Bioconjugate Chem.* **5**, 468-474 (**1994**).

10. **vfa**.Die forschenden Pharmaunternehmen. www.vfa.de/gentech . 2010.

11. **Watson J.D., Crick F.H.C.** A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738 (**1953**).

12. **Wang A.H.J., Quigley G.J., Kolpak F.J., Crawford J.L., van Boom J.H., van der Marel G., Rich A.** Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* **282**, 680-686 (**1979**).

13. **Letsinger R.L., Mahadevan V.** Stepwise synthesis of oligodeoxyribonucleotides on an Insoluble polymer support. *J. Am. Chem. Soc* **88**, 5319-5324 (**1966**).

14. **Froehler B.C., Matteucci M.D.** Nucleoside H-phosphonates : Valuable intermediates in the synthesis of oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **27**, 469-472 (**1986**).

15. **Beaucage S.L., Caruthers M.H.** Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1859-1862 (**1981**).

16. **Letsinger R.L., Lunsford W.** Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates. *J. Am. Chem. Soc* **98**, 3655-3661 (**1976**).

17. **Jepsen J.S., Sorensen M.D., Wengel J.** Locked nucleic acid: a potent nucleic acid analog in therapeutics and biotechnology. *Oligonucleotides* **14**, 130-146 (**2004**).

18. **Havelda Z.** In situ detection of miRNAs using LNA probes. *Methods Mol Biol* **592**, 127-136 (**2010**).

19. **Merrifield R.B.** Solid Phase Peptide Synthesis. Synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc* **85**, 2149-2154 (**1963**).

20. **Merrifield R.B., Marglin A.** The synthesis of bovine insulin by the solid phase method. *J. Am. Chem. Soc* **88**, 5051-5052 (**1966**).

21. **Katasoyannis P.G., Fakuda K., Tometsko A., Suzuki K., Tilak M.** Insulin Peptides. X. The synthesis of the B-Chain of Insulin and its combination with natural or synthetic A-chain to generate Insulin activity. *J. Am. Chem. Soc* **86**, 930-932 (**1964**).

22. **Meienhofer J., Schnabel E., Bremer H., Brinkhoff O., Zabel R., Sroka W., Klostermeyer H., Brandenburg D., Okuda T., Zahn H.** Synthese der Insulinketten und ihre Kombination zu insulactiven Präparaten. *Z. Naturforsch.* **18**, 1120-1121 (**1963**).

23. **Wang S.S.** p-Alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J. Am. Chem. Soc* **95**, 1328-1333 (**1973**).

24. **Rink H.** Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.* **28**, 3787-3790 (**1987**).

25. **Gillespie D., Spiegelman S.** A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.* **12**, 829-842 (**1965**).

26. **Stephenson M.L., Zamecnik P.C.** Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 280-284 (**1978**).

27. **Stephenson M.L., Zamecnik P.C.** Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 285-288 (**1978**).

28. **Boiziau C., Kurfurst R., Cazenave C., Roig V., Thuong N.T., Toulmé J.J.** Inhibition of translation initiation by antisense oligonucleotides via an RNase-H independent mechanism. *Nucleic Acids Research* **19**, 1113-1119 (**1991**).

29. **Baker B.F., Miraglia L., Hagedorn C.H.** Modulation of eucaryotic initiation factor-4E binding to 5'-capped oligoribonucleotides by modified anti-sense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* **267**, 11495-11499 (**1992**).

30. **Kim S.K., Wold B.J.** Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of anti-sense RNA. *Cell* **42**, 129-138 (**1985**).

31. **Dominski Z., Kole R.** Identification and characterization by antisense oligonucleotides of exon and intron sequences required for splicing. *Mol Cell Biol* **14**, 7445-7454 (**1994**).

32. **Donis-Keller H.** Site specific enzymatic cleavage of RNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 179-192 (**1979**).

33. **Kawasaki A.M., Casper M.D., Freier S.M., Lesnik E.A., Zounes M.C., Cummins L.L., Gonzalez C., Dan Cook P.** Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro-phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. *J. Med. Chem.* **36**, 831-841 (**1993**).

34. **Cazenave C., Stein C.A., Loreau N., Thuong N.T., Neckers L.M., Subasinghe C., Hélène C., Cohen J.S., Toulmé J.J.** Comparative inhibition of rabbit globin mRNA translation by modified antisense oligodeoxynucleotides. *Nucl. Acids Res.* **17**, 4255-4273 (**1989**).

35. **International Human Genome Sequencing Consortium** Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931-945 (**2004**).

36. **Beltinger C., Saragovi H.U., LeSauteur L., Shah N., DeDionisio L., Christensen L., Raible A., Jarett L., Gewirtz A.M.** Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest* **95**, 1814-1823 (**1995**).

37. **Warfield K.L., Swenson D.L., Olinger G.G., Nichols D.K., Pratt W.D., Blouch R., Stein D.A., Aman M.J., Iversen P.L., Bavari S.** Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *PLoS Pathog* **2**, e1. doi:10.1371/journal.ppat.0020001 (**2006**).

38. **Schlingensiepen K-H., Schlingensiepen R., Steinbrecher A., Hau P., Bogdahn U., Fischer-Blass B., Jachimczak P.** Targeted tumor therapy with the TGF-β2 antisense compound AP 12009. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 129-139 (**2006**).

39. **Vallières L.** Trabedersen, a TGFβ2-specific antisense oligonucleotide for the treatment of malignant gliomas and other tumors overexpressing TGFβ2. *IDrugs* **12**, 445-453 (**2009**).

40. **Detrick B., Nagineni C.N., Grillone L.R., Anderson K.P., Henry S.P., Hooks J.J.** Inhibition of human cytomegalovirus replication in a human retinal epithelial cell model by antisense oligonucleotides. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **42**, 163-169 (**2001**).

41. **Guo S., Kemphues K.J.** par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-620 (**1995**).

42. **Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* **391**, 806-811 (**1998**).

43. **Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498 (**2001**).

44. **Zamore P.D.** Ancient pathways programmed by small RNAs. *Nature* **296**, 1265-1269 (**2002**).

45. **Wianny F., Zernicka-Goetz M.** Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol.* **2**, 70-75 (**2000**).

46. **Borkhardt A.** Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment? *Cancer Cell* **2**, 167-168 (**2002**).

47. **Gitlin L., Karelsky S., Andino R.** Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* **418**, 430-434 (**2002**).

48. **Minton K.W.** The triple helix: a potential mechanism for gene regulation. *J Exp Pathol.* **2**, 135-148 (**1985**).

49. **Knauert M.P., Glazer P.M.** Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting. *Human Molecular Genetics* **10**, 2243-2251 (**2001**).

50. **Ferber M.J., Maher L.J.** Quantitating oligonucleotide affinities for duplex DNA: footprinting vs electrophoretic mobility shift assays. *Anal Biochem.* **244**, 312-320 (**1997**).

51. **Krieg A.M.** CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* **20**, 790 (**2002**).

52. **Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M.** CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-549 (**1995**).

53. **Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J.** Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**, 564-566 (**1992**).

54. **Kelly J.A., Feigon J., Yeates T.O.** Reconciliation of the X-ray and NMR structures of the thrombin-binding aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *J. Mol. Biol.* **256**, 417-422 (**1996**).

55. **Griffin L.C., Tidmarsh G.F., Bock L.C., Toole J.J., Leung L.L.** In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits. *Blood* **81**, 3271-3276 (**1993**).

56. **Bekheet J.** Neue Methoden zur Identifizierung von Oligonukleotid-Aptameren für Proteine. *Dissertation Universität Ulm* (**2008**).

57. **Rusconi C.P., Scardino E., Layzer J., Pitoc G.A., Ortel T.L., Monroe D., Sullenger B.A.** RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature* **419**, 90-94 (**2002**).

58. **Brown D.A., Kang S.H., Gryaznov S.M., DeDionisio L., Heidenreich O., Sullivan S., Xu X., Nerenberg M.I.** Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J Biol Chem* **269**, 26801-26805 (**1994**).

59. **Bertranda J-R., Imbach J-L., Paolettia C., Malvya C.** Comparative activity of α- and β-anomeric oligonucleotides on rabbit β globin synthesis: Inhibitory effect of cap targeted α-oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Comm* **164**, 311-318 (**1989**).

60. **Freier S.M., Altmann K-H.** The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure–stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4429-4443 (**1997**).

61. **Rajwanshi V.K., Håkansson A.E., Kumar R., Wengel J.** High affinity nucleic acid recognition using 'LNA' (locked nucleic acid, (β-D-ribo configured LNA), 'xylo-LNA' (β-D-xylo configured LNA) or 'α-L-ribo configured LNA). *Chem. Comm.* **1999**, 2074 (**1999**).

62. **Abuchowski A., van Es T., Palczuk N.C., Davis F.F.** Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.* **252**, 3578-3581 (**1977**).

63. **Abuchowski A., McCoy J.R., van Es T., Palczuk N.C., Davis F.F.** Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J. Biol. Chem.* **252**, 3582-3586 (**1977**).

64. **Vieira Pinheiro J.P., Lanvers C., Würthwein G., Beier R., Casimiro da Palma J., von Stackelberg A., Boos J.** Drug Monitoring of PEG-Asparaginase Treatment in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* **43**, 1911-1920 (**2002**).

65. **Levy Y., Hershfield M.S., Fernandez-Mejia C., Polmar S.H., Scudiery D., Berger M., Sorensen R.U.** Adenosine deaminase deficiency with late onset of recurrent infections: Response to treatment with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. *The Journal of Pediatrics* **113**, 312-317 (**1988**).

66. **Bailon P., Palleroni A., Schaffer C.A., Spence C.L., Fung W.J., Porter J.E., Ehrlich G.K., Pan W., Xu Z.X., Modi M.W., Farid A., Berthold W.** Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: A 40kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon r-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjugate Chem.* **12**, 195-202 (**2001**).

67. **Wang Y.S., Youngster S., Grace M., Bausch J., Bordens R., Wyss D.F.** Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon α-2b and its therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 547-570 (**2002**).

68. **Kinstler O.B., Brems D.N., Lauren S.L., Paige A.G., Hamburger J.B., Treuheit M.J.** Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF. *Pharm Res.* **13**, 996-1002 (**1996**).

69. **Veronese F.M., Mero A., Cabio F., Sergi M., Marongiu C., Pasut G.** Site-Specific Pegylation of G-CSF by Reversible Denaturation. *Bioconjugate Chem.* **18**, 1824-1830 (**2007**).

70. **Fontana A., Spolaore B., Mero A., Veronese F.M.** Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 13-28 (**2008**).

71. **Stephens D.J., Pepperkok R.** The many ways to cross the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4295-4298 (**2001**).

72. **Antopolsky M., Azhayeva E., Tengvall U., Auriola S., Jääskeläinen I., Rönkkö S., Honkakoski P., Urrti A., Lönnberg H., Azhayev A.** Peptide-Oligonucleotide Phosphorothioate Conjugates with Membrane Translocation and Nuclear Localization Properties. *Bioconjugate Chem.* **10**, 598-606 (**1999**).

73. **Turner J.J., Arzumanov A.A., Gait M.J.** Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides. *Nucl. Acids Res.* **33**, 27-42 (**2005**).

74. **Derossi D, Joliot A.H., Chassaing G., Prochiantz A.** The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10444-10450 (**1994**).

75. **Fischer P.M., Zhelev N.Z., Wang S., Melville J.E., Fåhraeus R., Lane D.P.** Structure-activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector Penetratin. *J. Peptide Res.* **55**, 163-172 (**1999**).

76. **Prochiantz A.** Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 400-406 (**2000**).

77. **Guillaume D., Helene D., Temsamani J., Brasseur R.** Translocation of the pAntp peptide and its amphipathic analogue AP-2AL. *Biochemistry **40***, 1824-1834 (**2001**).

78. **Richard J.P., Melikov K., Brooks H., Prevot P., Lebleu B., Chernomordik L.V.** Cellular Uptake of Unconjugated TAT Peptide Involves Clathrin-dependent Endocytosis and Heparan Sulfate Receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 15300-15306 (**2005**).

79. **Jones S.W., Christison R., Bundell K., Voyce C.J., Brockbank S.M., Newham P., Lindsay M.A.** Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol.* **145**, 1093-1102 (**2005**).

80. **Abes R., Arzumanov A.A., Moulton H.M., Abes S., Ivanova G.D., Iversen P.L., Gait M.J., Lebleu B.** Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides: an overview. *Biochem Soc Trans.* **35**, 775-779 (**2007**).

81. **Cullen B.R., Greene W.C.** Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* **58**, 423-426 (**1989**).

82. **Vives E., Brodin P., Lebleu B.** A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocate through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 16010-16017 (**2003**).

83. **Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y.** Arginine-rich peptides. *J. Biol. Chem.* **276**, 5836-5840 (**2001**).

84. **Waida J.S., Stan R.V., Dowdy S.F.** Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nature Med* **10**, 310-315 (**2004**).

85. **Lee Y.J., Datta S., Pellois J-P.** Real-time fluorescence detection of protein transduction into live cells. *J. Am. Chem. Soc* **130**, 2398-2399 (**2008**).

86. **El-Andaloussi S., Johansson H.J., Holm T., Langel Ü.** A Novel Cell-penetrating Peptide, M918, for Efficient Delivery of Proteins and Peptide Nucleic Acids. *Molecular Therapy* **15**, 1820-1826 (**2007**).

87. **Abes S., Moulton H.M., Turner J., Clair P., Richard J.P., ., Iversen P.L., Gait M.J., Lebleu B.** Peptide-based delivery of nucleic acids: design, mechanism of uptake and applications to splice-correcting oligonucleotides. *Biochem. Soc. Trans* **35**, 53-55 (**2007**).

88. **Pooga M., Hällbrink M., Zorko M., Langel U.** Cell penetration by transportan. *FASEB Journal* **12**, 67-77 (**1998**).

89. **Neundorf I., Rennert R., Hoyer J., Schramm F., Löbner K., Kitanoviv I., Wölfl S.** Fusion of a Short HA2-Derived Peptide Sequence to Cell-Penetrating Peptides Improves Cytosolic Uptake, but Enhances Cytotoxic Activit. *pharmaceuticals* **2**, 49-65 (**2009**).

90. **Lee Y.J., Johnson G., Pellois J-P.** Modeling of the Endosomolytic Activity of HA2-TAT Peptides with Red Blood Cells and Ghosts. *Biochemistry* **49**, 7866 (**2010**).

91. **Michiue H., Tomizawa K., Wei F.Y., Matsushita M., Lu Y.F., Ichikawa T., Tamiy T., Date I., Matsui H.** The NH_2 terminus of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides enhances the antitumor potency of polyarginine-mediated p53 protein transduction. *J. Biol. Chem.* **280**, 8285-8289 (**2005**).

92. **Bayer E.A., Ben Hur H., Gitlin G., Wilchek M.** An improved method for the single-step purification of streptavidin. *J. Biochem. Biophys.* **13**, 103-112 (**1986**).

93. **Guedson J.L., Ternynck T., Avrameas S.J.** The use of avidin- biotin interaction in immunoenzyme techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 1131-1139 (**1979**).

94. **Bayer E.A., Ben Hur H., Hiller Y., Wilchek M.** Postsecretory modifications of streptavidin. *Biochem. J.* **259**, 369-376 (**1989**).

95. **Pähler A., Hendrickson W.A., Kolks M.A., Argaraña C.E., Cantor C.R.** Characterization and crystallization of core streptavidin. *J. Biol. Chem.* **262**, 13933-13937 (**1987**).

96. **Sano T., Chen X., Smith C.L., Cantor C.R.** Recombinant core streptavidins. A minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules. *J. Biol. Chem.* **270**, 28204-28209 (**1995**).

97. **Sano T., Vajda S., Smith C.L., Cantor C.R.** Engeneering subunit association of multisubunit proteins: A dimeric streptavidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 6153-6158 (**1997**).

98. **Hendrickson W.A., Pähler A., Smith J.L., Satow Y., Merritt E.A., Phizackerley R.P.** Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchroton radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2190-2194 (**1989**).

99. **Sano T., Cantor C.R.** Intersubunit contacts made by tryptophan 120 with biotin are essential for both strong biotin binding and biotin-induced tighter subunit association of streptavidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3180-3184 (**1995**).

100. **Weng Z., Vajda S., DeLisi C.** Prediction of protein complexes using empirical free energy functions. *Prot Sci* **5**, 614-626 (**1996**).

101. **Aslan F.M., Yu Y., Mohr S.C., Cantor C.R.** Engineered single-chain dimeric streptavidins with an unexpected strong preference for biotin-4-fluorescein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8507-8512 (**2005**).

102. **Wu S.C., Wong S.L.** Engineering soluble monomeric streptavidin with reversible biotin binding capability. *J. Biol. Chem.* **280**, 23225-23231 (**2005**).

103. **Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y.** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**, 223-239 (**1962**).

104. **Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J.** Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233 (**1992**).

105. **Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C.** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805 (**1994**).

106. **Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T., Nishimune Y.** Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* **407**, 313-319 (**1997**).

107. **Terskikh A., Fradkov A., Ermakova G., Zaraisky A., Tan P., Kajava A.V., Zhao X., Lukyanov S., Matz M., Kim S., Weissman I., Siebert P.** "Fluorescent timer": protein that changes color with time. *Science* **290**, 1585-1588 (**2000**).

108. **Arber W., Dussoix D.** Host specificity of DNA produced by Escherichia coli: I. Host controlled modification of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* **5**, 18-36 (**1962**).

109. **McClelland M., Nelson M., Raschke E.** Effect of site-specific modifications on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucl. Acids Res.* **22**, 3640-3659 (**1994**).

110. **Lawyer F., Stoffer S., Saiki R.K., Chang S.Y., Landre P.A., Abramson R.D., Gelfand D.H.** High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length Thermus aquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods and Applications* **2**, 275-287 (**1993**).

111. **Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K., Erlich H.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (**1988**).

112. **Greagg M.A., Fogg M.J., Panayotou G., Evans S.J., Connolly B.A., Pearl L.H.** A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9045-9050 (**1999**).

113. **Mullis K., Faloona F.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350 (**1987**).

114. **Barnes W.M.** PCR amplification up to 35-kb DNA with high fidelity yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2216-2220 (**1994**).

115. **Melton D.A., Krieg P.A., Rebagliati M.R., Maniatis T., Zinn K., Green M.R.** Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* **12**, 7035-7056 (**1984**).

116. **Sagesser R., Martinez E., Tsagris M., Tabler M.** Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of a cDNA expression library. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3816-3822 (**1997**).

117. **Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W., Helling R.B.** Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *PNAS* **70**, 3240-3244 (**1973**).

118. **Clewell D.B.** Nature of Col E1 plasmid replication in Escherichia coli in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.* **110**, 667-676 (**1972**).

119. **Ullmann A., Jacob F., Monod J.** Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β-galactosidase structural gene of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **24**, 339-343 (**1967**).

120. **Horwitz J.P., Chua J., Curby R.J., Tomson A.J., Darooge M.A., Fisher B.E., Mauricio J., Klundt I.** Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl-β-D-glycopyranosides. *J. Med. Chem.* **7**, 574-575 (**1964**).

121. **Liu Z.G., Schwartz L.M.** An efficient method for blunt-end ligation of PCR products. *BioTechniques* **12**, 28-30 (**1992**).

122. **Scharf S.J., Horn G.T., Erlich H.A.** Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**, 1076-1078 (**1986**).

123. **Anagnostopoulos C., Spizizen J.** Requirements for transformation in Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **81**, 741-746 (**1961**).

124. **Dubnau D.** DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 217-244 (**1999**).

125. **Hanahan D.** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580 (**1983**).

126. **Maxam A., Gilbert W.** A new method of sequencing DNA. *PNAS* **74**, 560-564 (**1977**).

127. **Sanger F., Air GM, Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchison C.A., Slocombe P.M., Smith M.** Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**, 687-695 (**1977**).

128. **Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**, 5463-5467 (**1977**).

129. **Enghofer E.** Biotechnologisch hergestellte Arzneimittel. *Onkologe* **4**, 191-197 (**1998**).

130. **Raghava S., Baruna B, Singh P.K., Das M., Madan L., Bhattacharyya S., Bajaj K., Gopal B., Varadarajan R., Gupta M.N.** Refolding and simultaneous purification by three-phase partitioning of recombinant proteins from inclusion bodies. *Protein Science* **17**, 1987-1997 (**2008**).

131. **Jacob F., Monod J.** Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356 (**1961**).

132. **Capaldi D.C., Gaus H., Krotz A.H., Arnold J., Carty R.L., Moore M.N., Scozzari A.N., Lowery K., Cole D.L., Ravikumar V.T.** Synthesis of high-quality antisense drugs. Addition of acrylonitrile to phosphorothioate oligonucleotides: adduct characterization and avoidance. *Org. Process Res. Dev.* **7**, 832-838 (**2003**).

133. **Umemoto T., Wada T.** Nitromethane as a scavenger of acrylonitrile in the deprotection of synthetic oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **46**, 4251-4253 (**2005**).

134. **Shaw J.P., Kent K., Bird J., Fishback J., Froehler B.** Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. *Nucleic Acids Research* **19**, 747-750 (**1991**).

135. **Esteban J.A., Salas M., Blanco L.** Activation of S1 nuclease at neutral pH. *Nucleic Acids Research* **20**, 4932 (**1992**).

136. **Pritchard A.E., Kowalski D., Laskowski M.** An endonuclease activity of venom phosphodiesterase specific for single-stranded and superhelical DNA. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 8652-8659 (**1977**).

137. **Kaufman D.L., Evans G.A.** Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *BioTechniques* **9**, 304-306 (**1990**).

138. **Schlingensiepen K-H., Schlingensiepen R., Fischer D., Mitsch A.** Oligonucleotide-, protein and/or peptide-polymer conjugates. Patentanmeldung der Antisense Pharma GmbH. (Appl. No. EP20070858105 20071221, Pat. No. EP2121028, Europe: A61K47/48H4P). 25-11-2009.

139. **Graham M.J., Freier S.M., Crooke R.M., Ecker D.J., Maslova R.N., Lesnik E.A.** Tritium labeling of antisense oligonucleotides by exchange with tritiated water. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3737-3743 (**1993**).

140. **Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (**1970**).

8. Anhang

8.1. Oligonukleotidsequenzen

für die PEG-Derivatisierung (Kap. 4.1 - 4.4):

ONT1: 18mer Thiophosphat M= 5681Da, ε_{260}= 172,2 OD/µmol (att acc gtc tac cct gat)

ONT2: 18mer Thiophosphat M= 5778Da, ε_{260}= 176,6 OD/µmol (cgt gca att gtg tct gca)

ONT3: 18mer Thiophosphat

PCR-Primer (Kap. 4.5):

BamH1-EGFP (+): ATATAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC

Kpn1-EGFP (-): GCAGTGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCC

BamH1-TSA43 (+): ATATAGGATCCATGGGCATCACCGGCACC

Kpn1-TSA43 (-): GCAGTGGTACCGCGACCCATTTGCTGTCC

BamH1-PenEGFP(+): ATATAGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAACCGT CGTATGAAATGGAAAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC

BamH1-PenTSA43(+): ATATAGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAACCG TCGTATGAAATGGAAAAAAATGGGCATCACCGGCACC

BamH1-PenEGFPa(+): ATATAGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAGAACCG TCGTATGAAATGGAAAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA GCTG

BamH1-PenTSA43a(+): ATATAGGATCCCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCAG

pQE-FP: CGGATAACAATTTCACACAG

pQE-RP: GTTCTGAGGTCATTACTGG

T7: TAATACGACTCACTATAGGG

8.2. RP-HPLC Chromatogramme der Nuklease-Abbauversuche

8.2.1. Abbau mit 3´-Exonuklease (Phosphodiesterase I)

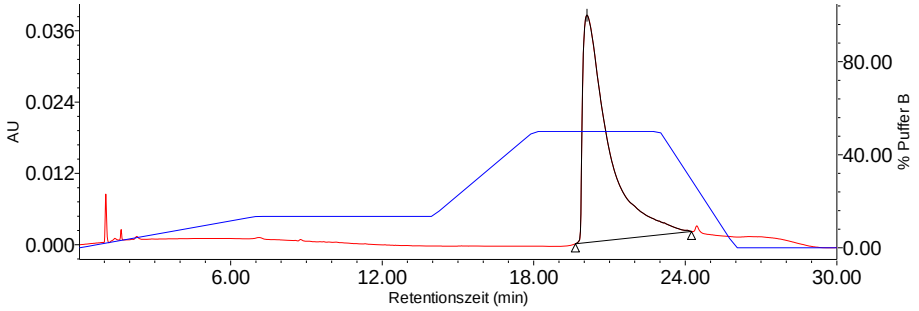


Abb. 399: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo1 0min (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **0%**

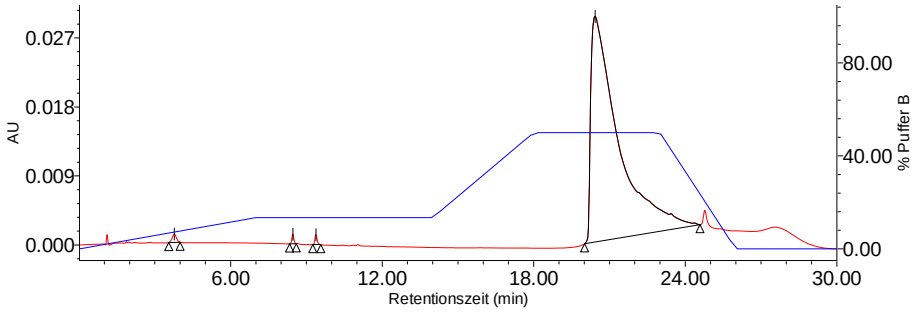


Abb. 400: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo1 30min (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **1%**

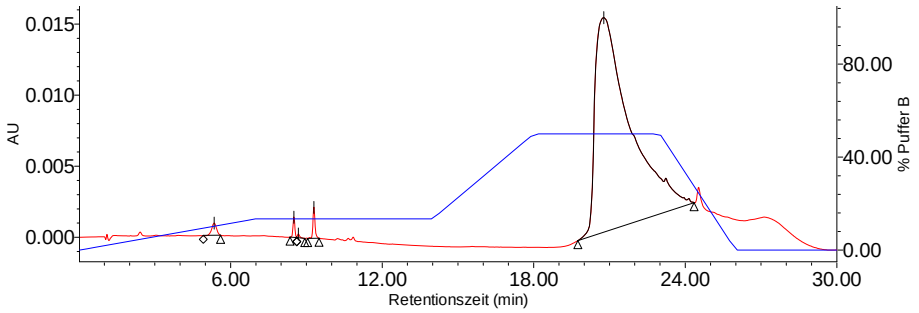


Abb. 401: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo1 1h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **2%**

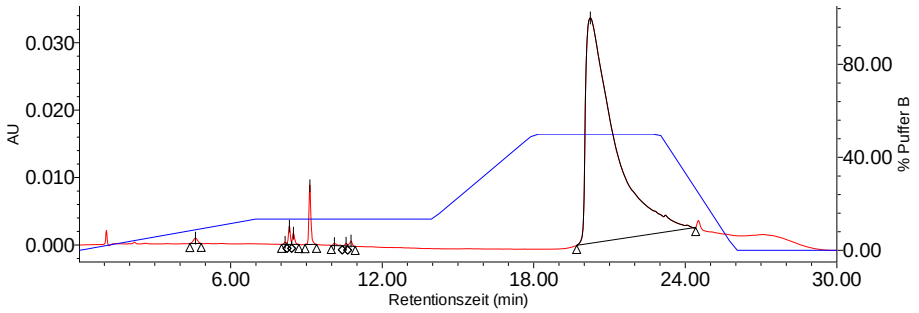


Abb. 402: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo1 3h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **4%**

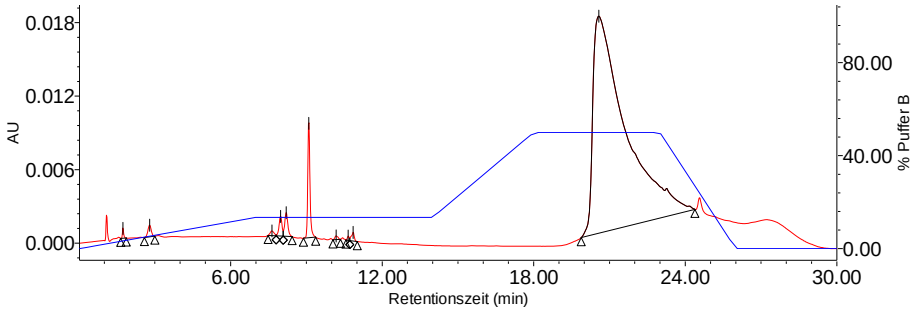


Abb. 403: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo1 6h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **7%**

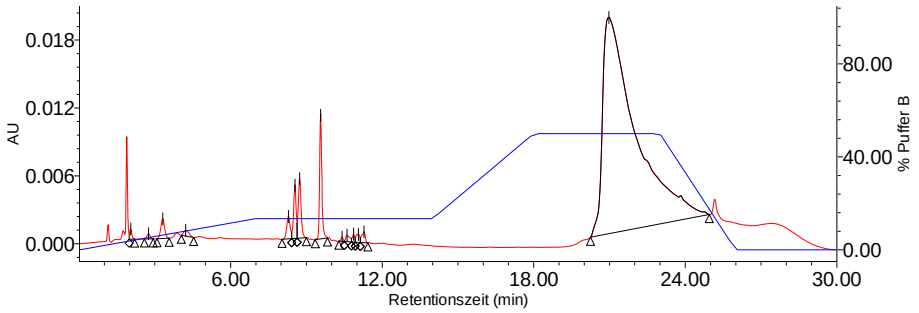


Abb. 404: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo1 24h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **11%**

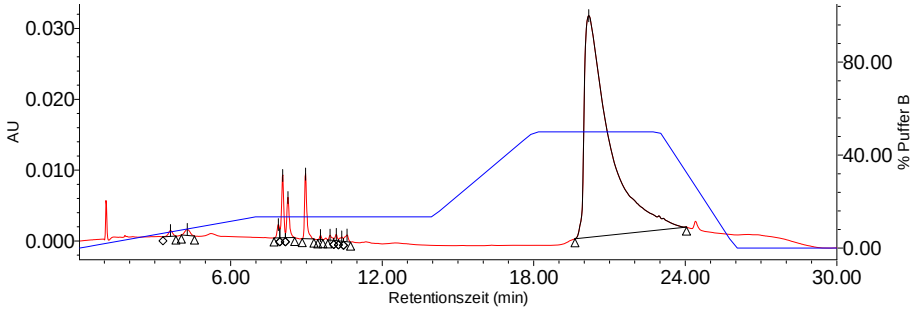


Abb. 405: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo1 48h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **10%**

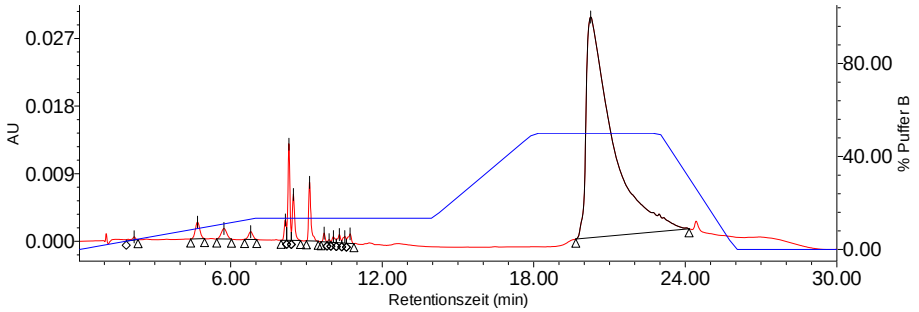


Abb. 406: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo1 72h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **12%**

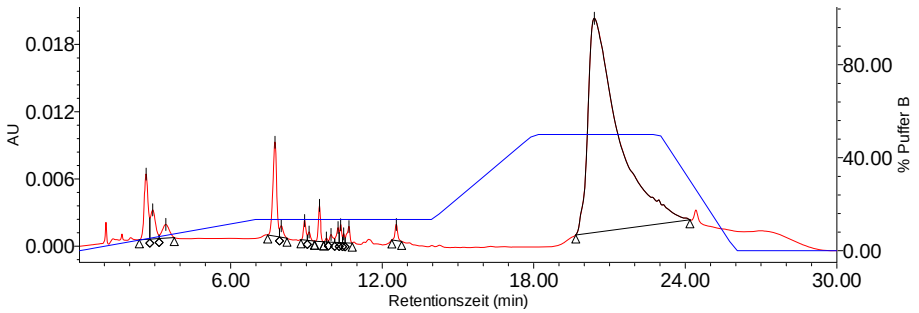


Abb. 407: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo1 144h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **16%**

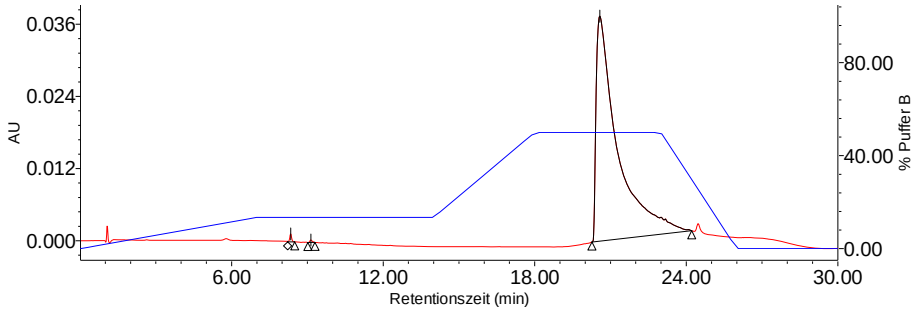


Abb. 408: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo2 0min (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

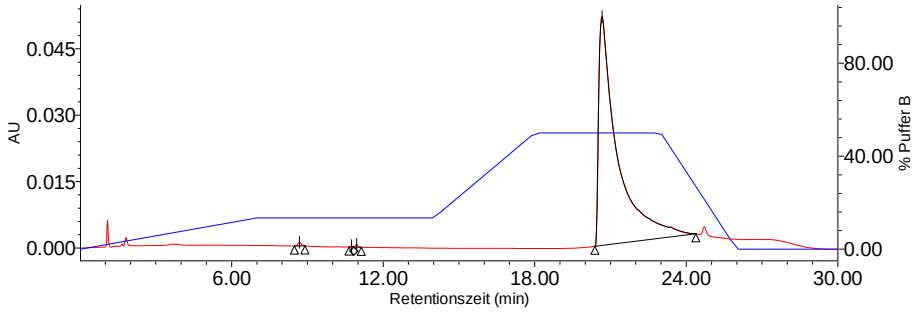


Abb. 409: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo2 30min (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

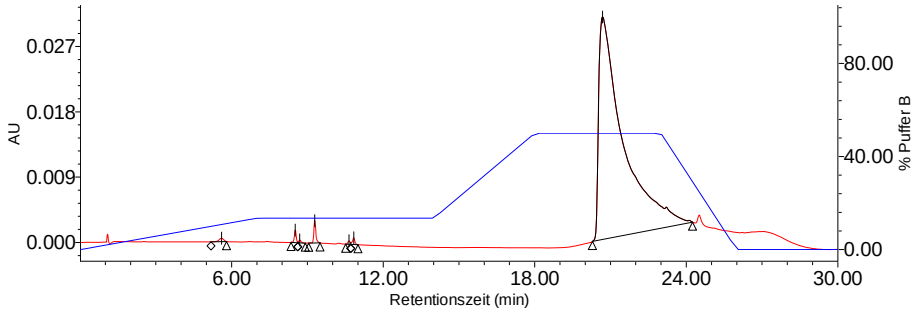


Abb. 410: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo2 1h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **2%**

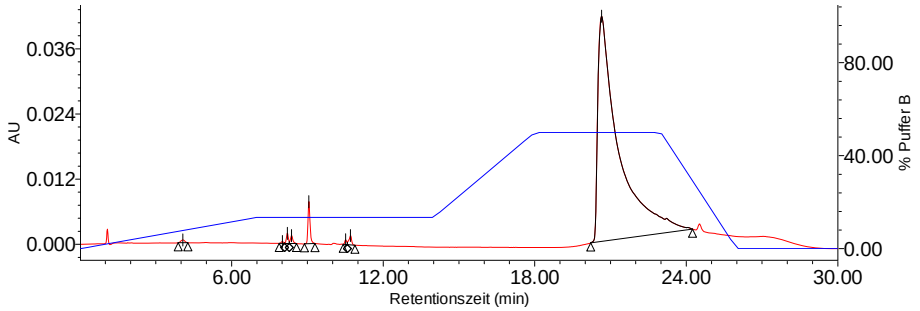


Abb. 411: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo2 3h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **4%**

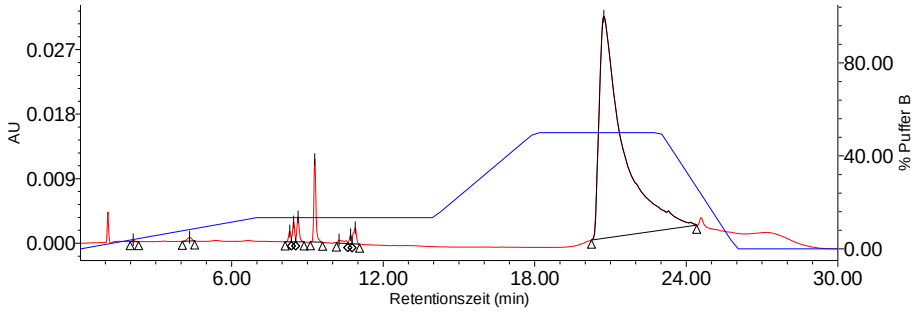


Abb. 412: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo2 6h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **7%**

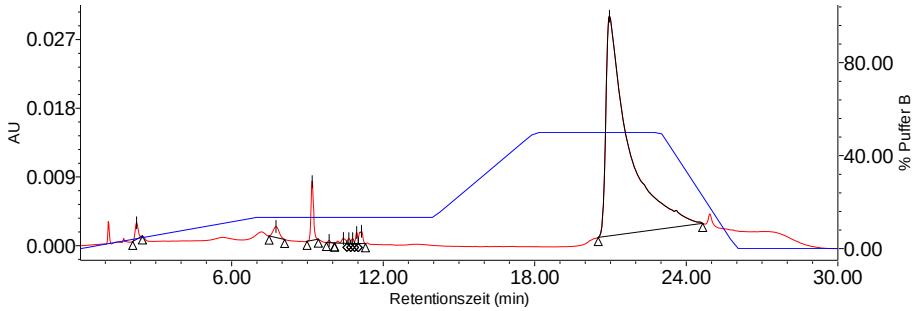


Abb. 413: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo2 24h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **7%**

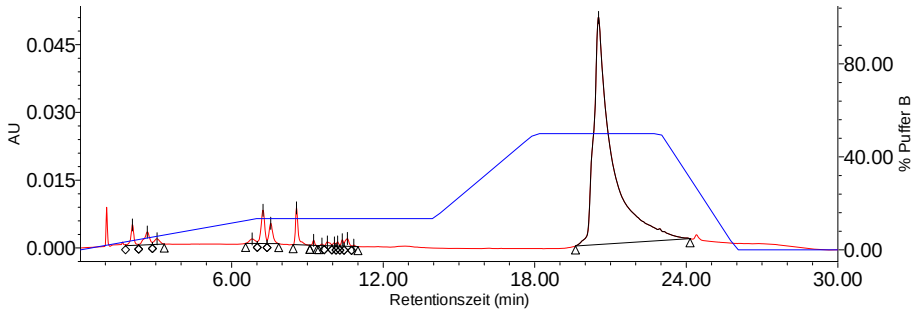


Abb. 414: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo2 48h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **12%**

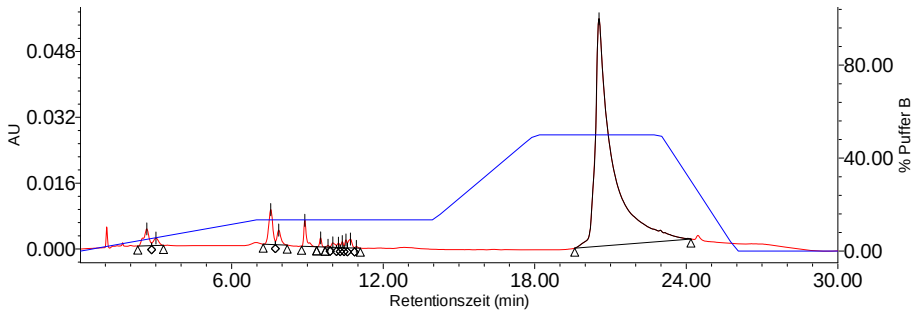


Abb. 415: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo2 72h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **12%**

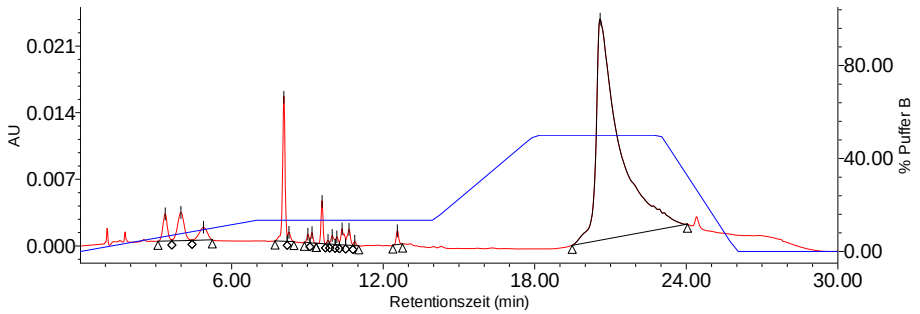


Abb. 416: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo2 144h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **18%**

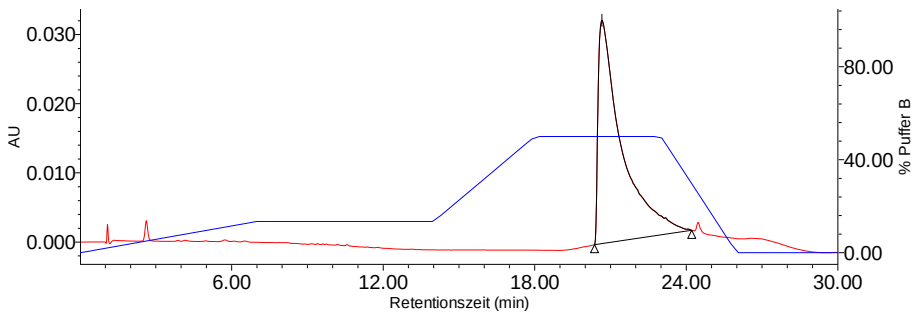


Abb. 417: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo3 0min (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **0%**

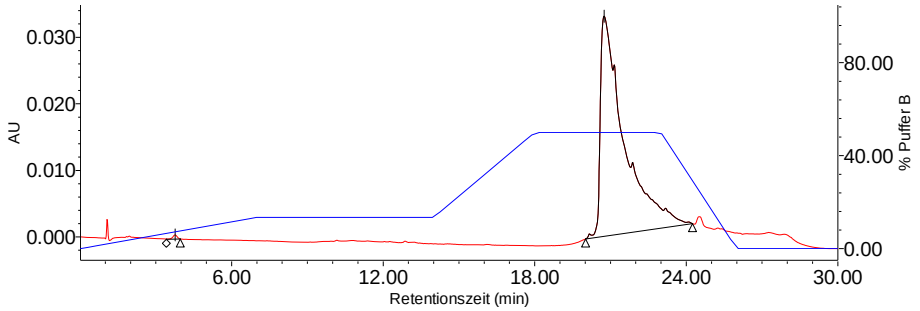


Abb. 418: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo3 30min (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

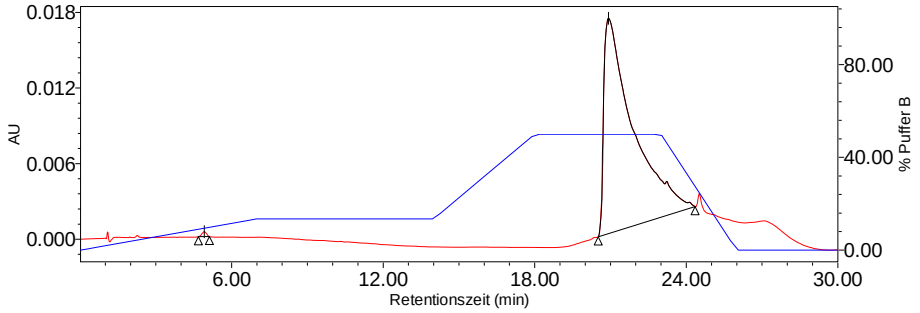


Abb. 419: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo3 1h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

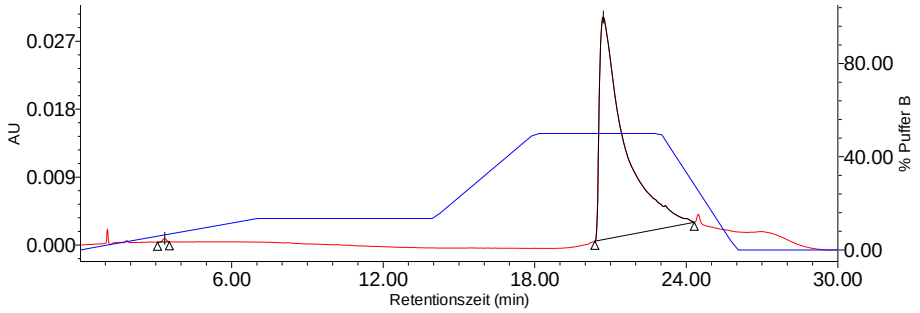


Abb. 420: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo3 3h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

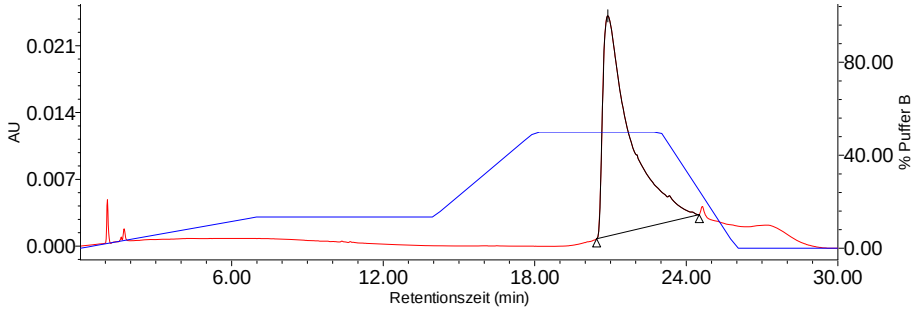


Abb. 421: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo3 6h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **0%**

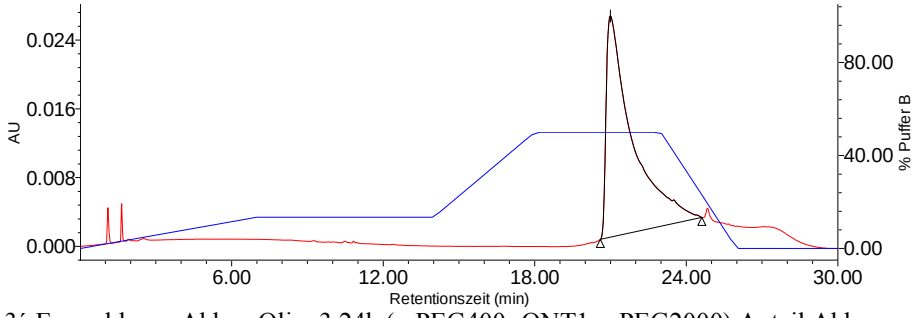


Abb. 422: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo3 24h (mPEG400- ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **0%**

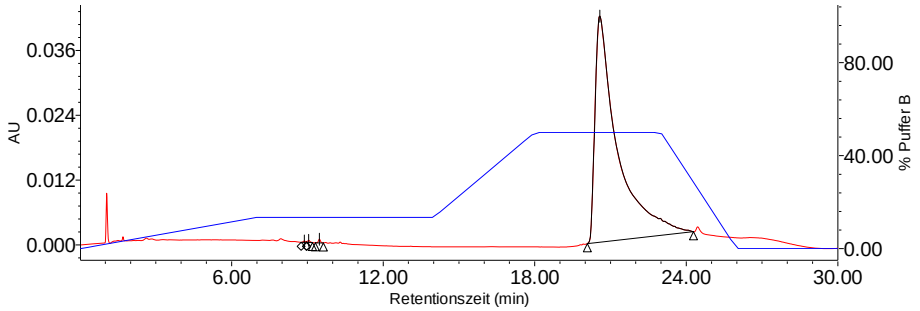


Abb. 423: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo3 48h (mPEG400- ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

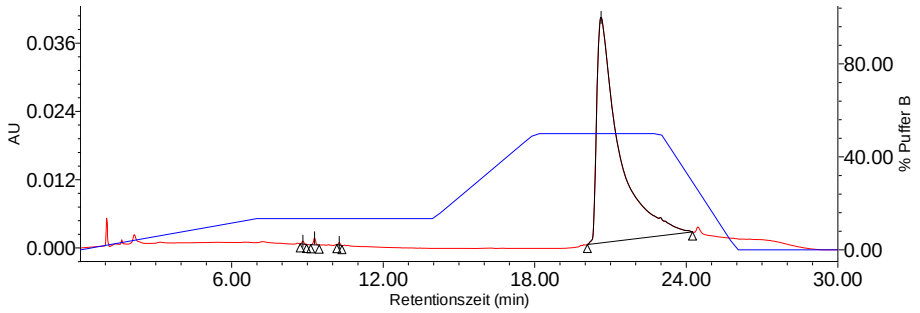


Abb. 424: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo3 72h (mPEG400- ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

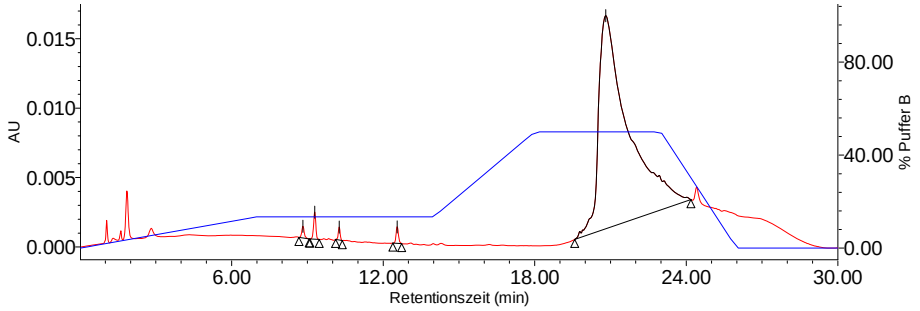


Abb. 425: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo3 144h (mPEG400- ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **2%**

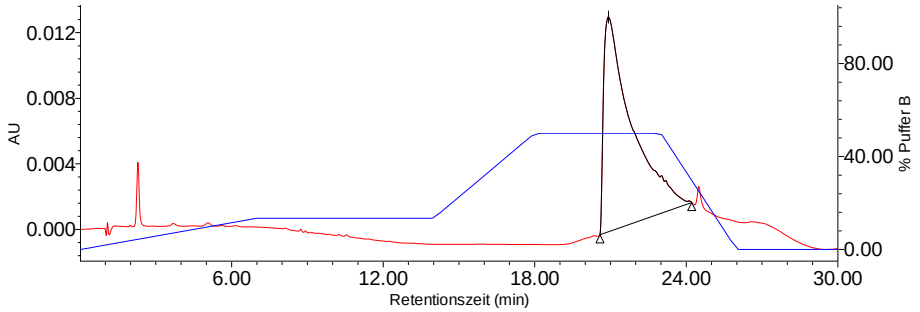


Abb. 426: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo4 0min (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

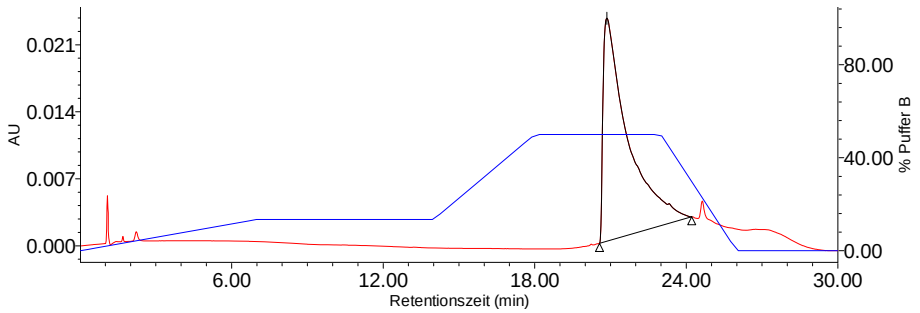


Abb. 427: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo4 30min (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

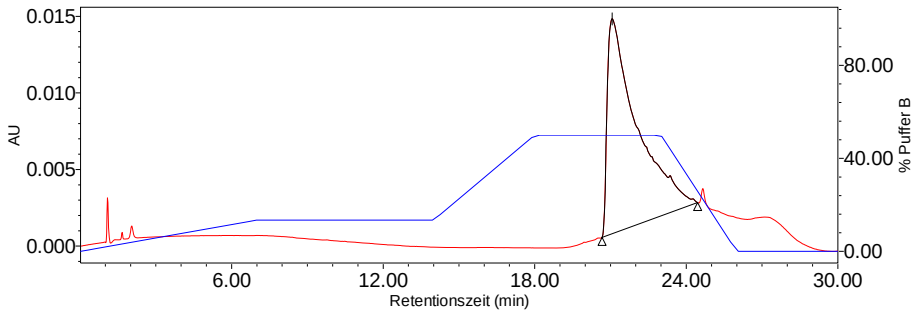


Abb. 428: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo4 1h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

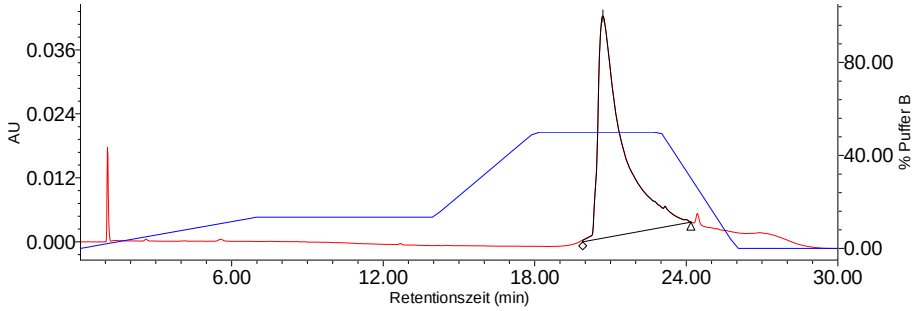


Abb. 429: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo4 3h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

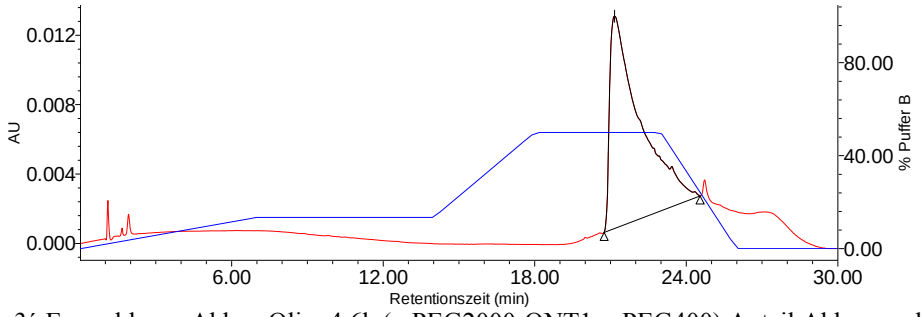


Abb. 430: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo4 6h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

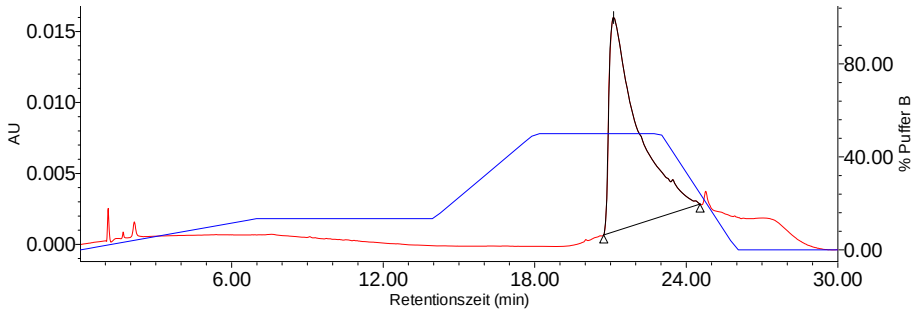


Abb. 431: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo4 24h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

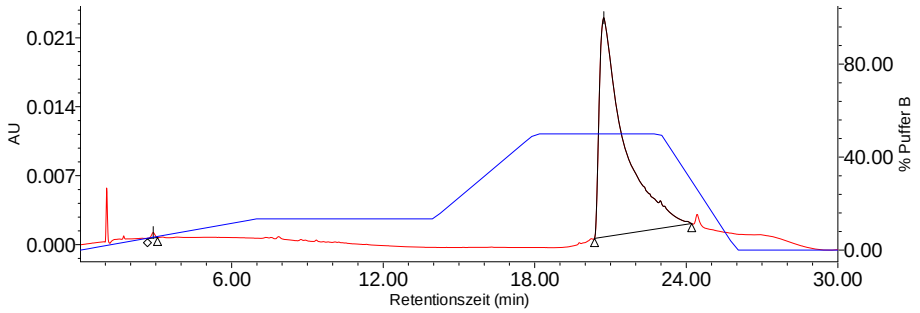


Abb. 432: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo4 48h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

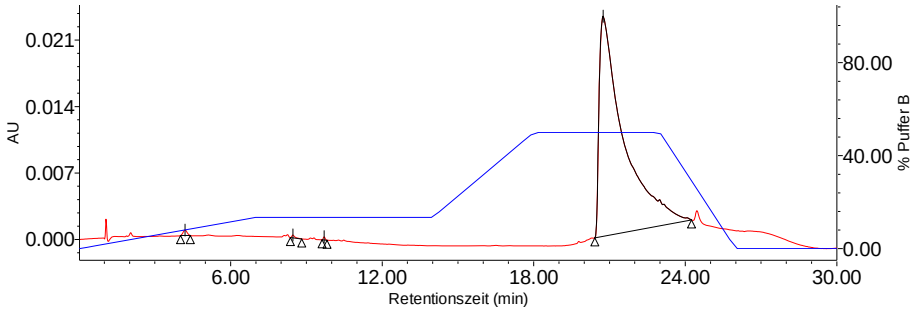


Abb. 433: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo4 72h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **1%**

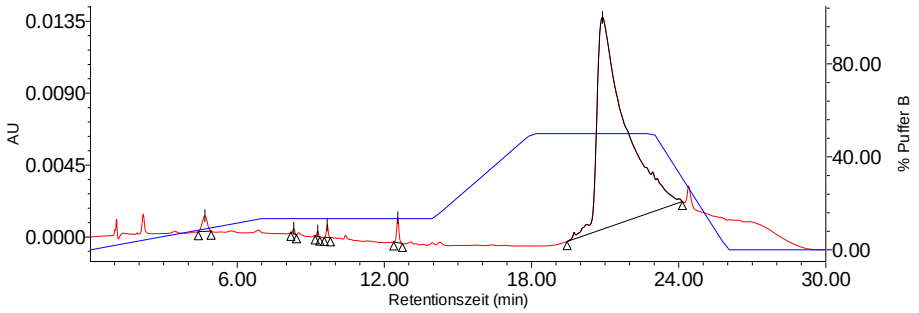


Abb. 434: 3´-Exonuklease-Abbau Oligo4 144h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **3%**

8.2.2. Abbau mit 5´-Exonuklease (Phosphodiesterase II)

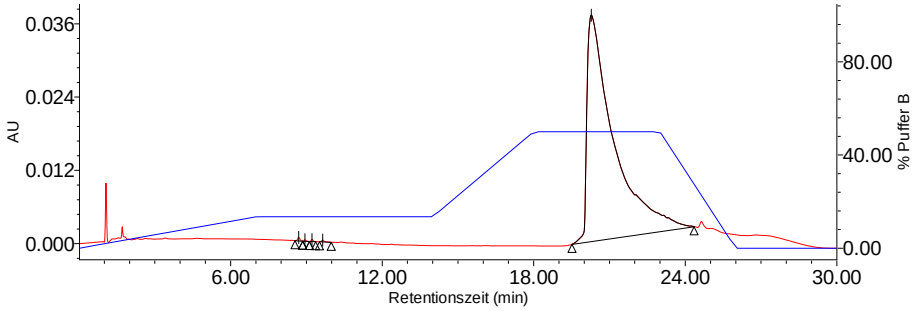


Abb. 435: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo1 0min (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

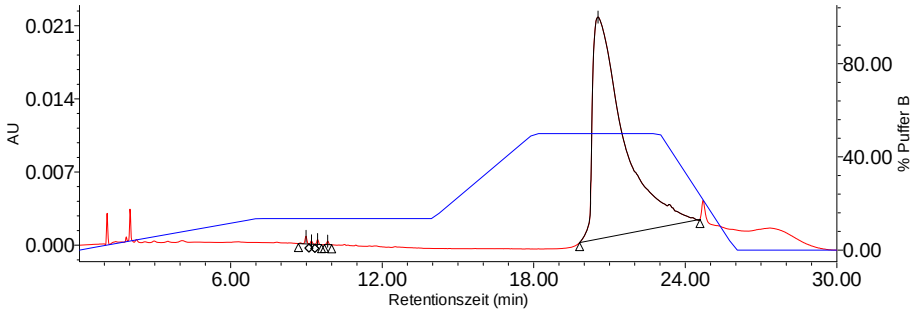


Abb. 436: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo1 30min (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

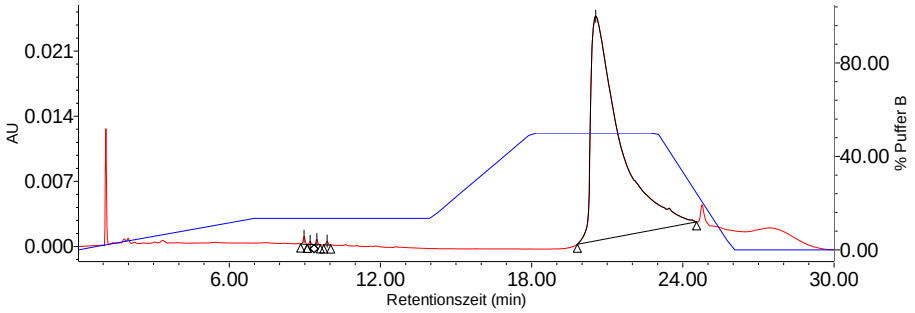


Abb. 437: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo1 1h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **1%**

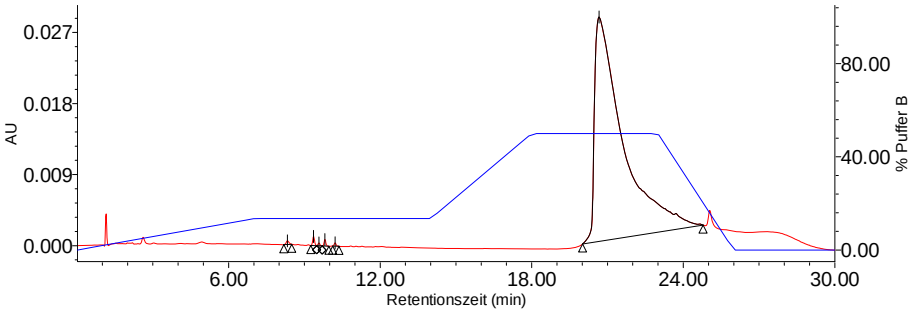


Abb. 438: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo1 3h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **1%**

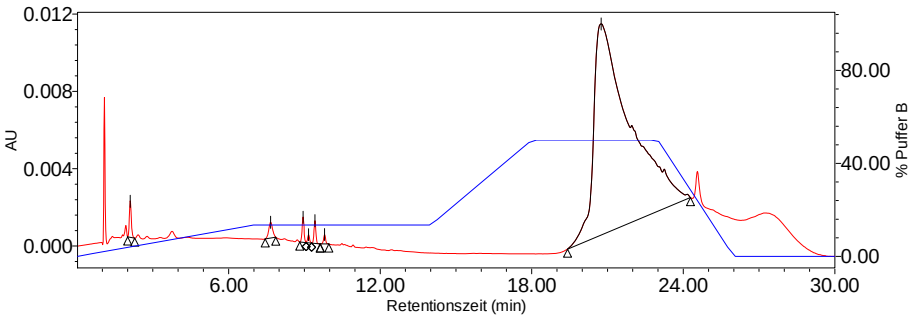


Abb. 439: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo1 6h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **3%**

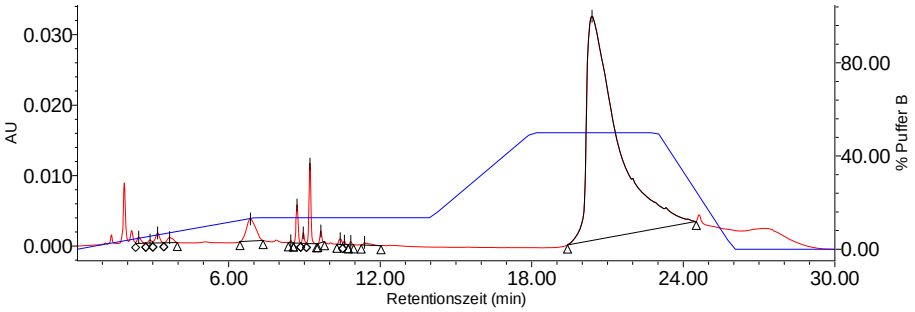


Abb. 440: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo1 24h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **8%**

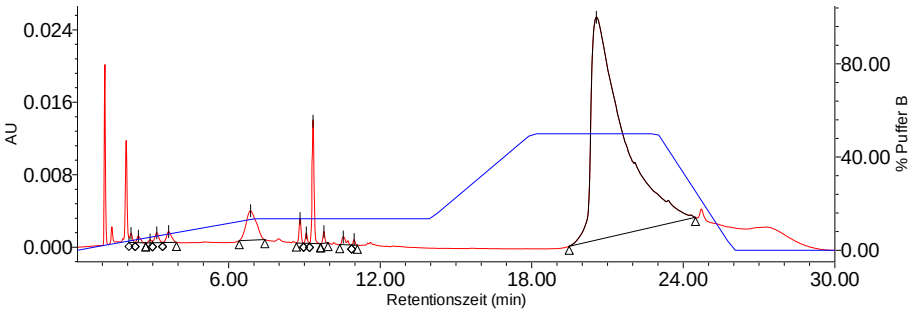


Abb. 441: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo1 48h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **10%**

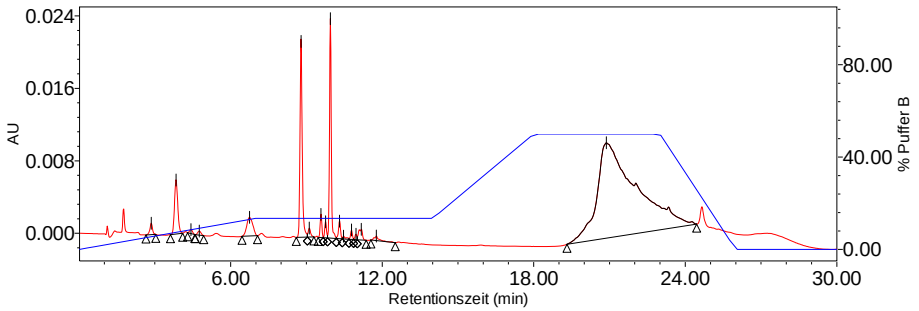


Abb. 442: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo1 72h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **27%**

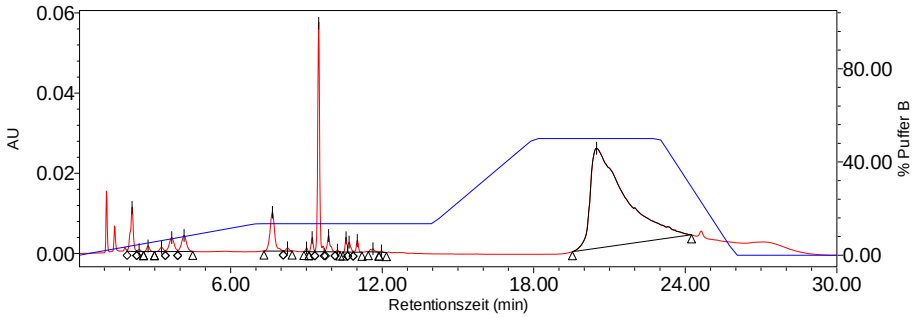


Abb. 443: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo1 144h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **25%**

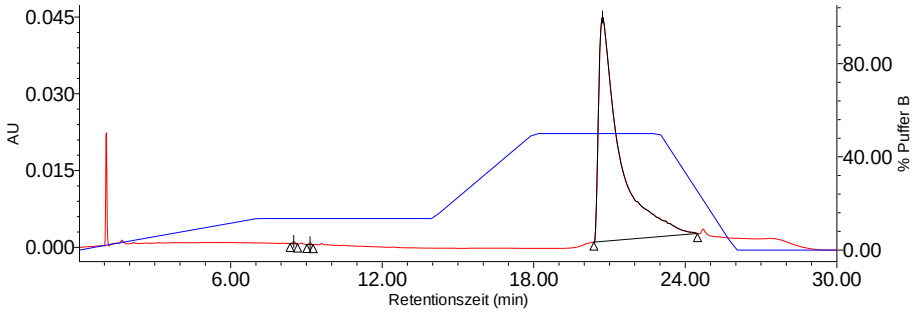


Abb. 444: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo2 0min (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

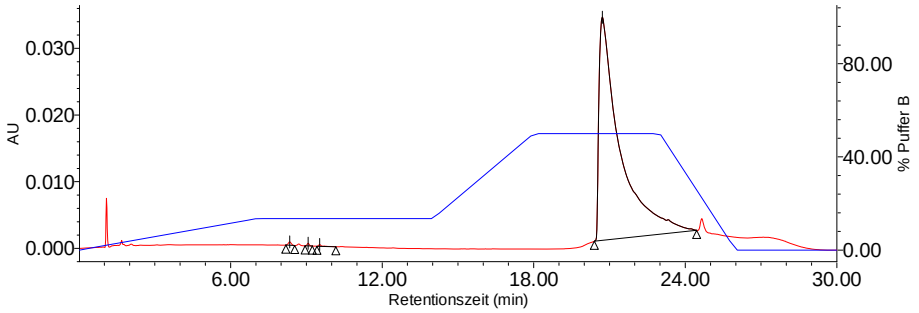


Abb. 445: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo2 30min (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

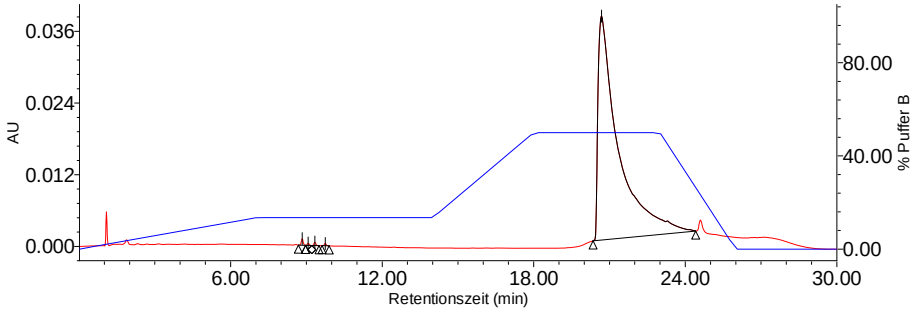


Abb. 446: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo2 1h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

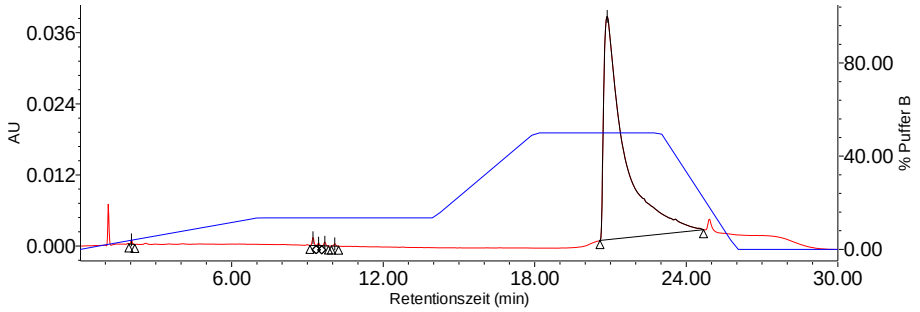


Abb. 447: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo2 3h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **1%**

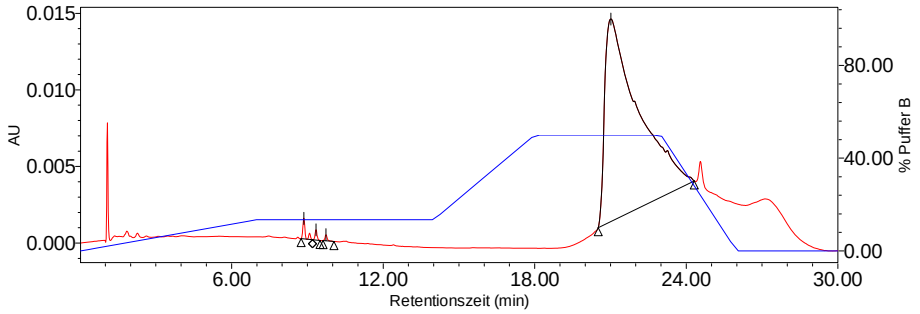


Abb. 448: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo2 6h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **1%**

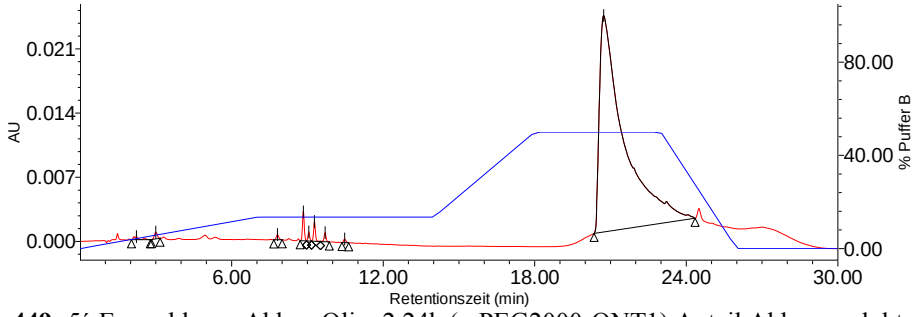


Abb. 449: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo2 24h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **4%**

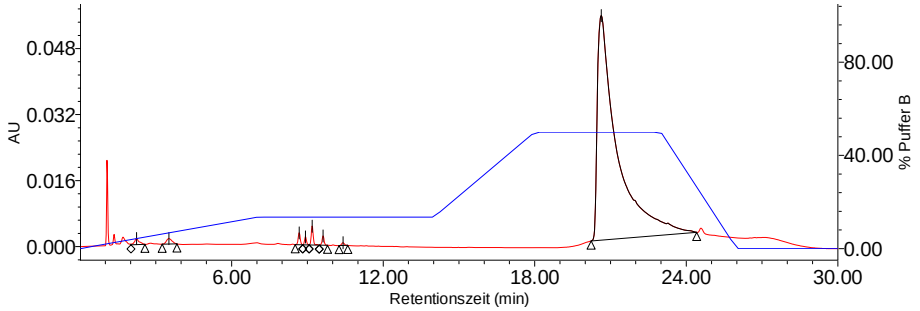


Abb. 450: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo2 48h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **4%**

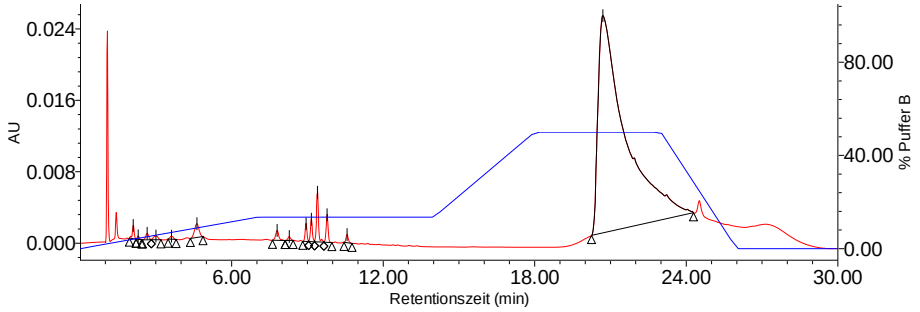


Abb. 451: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo2 72h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **7%**

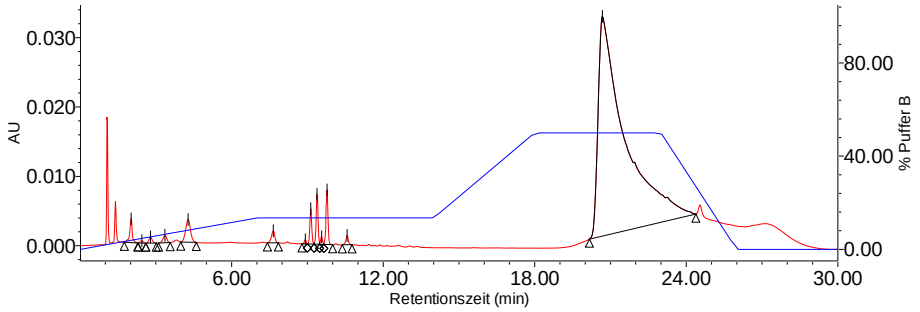


Abb. 452: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo2 144h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **9%**

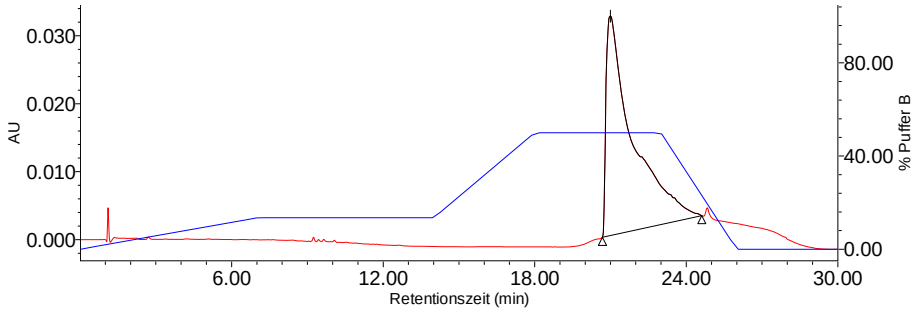


Abb. 453: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo3 0min (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **0%**

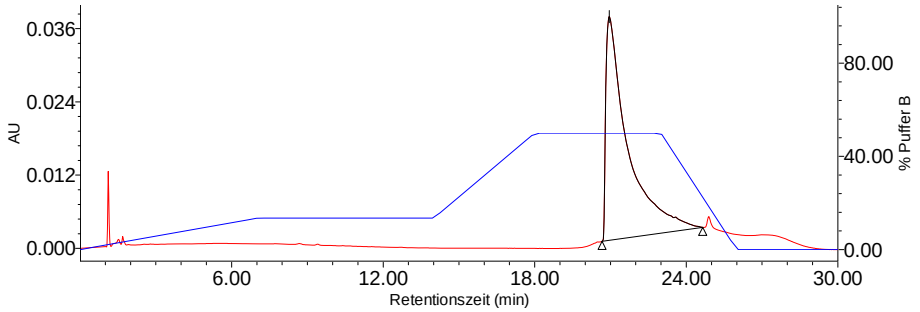


Abb. 454: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo3 30min (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **0%**

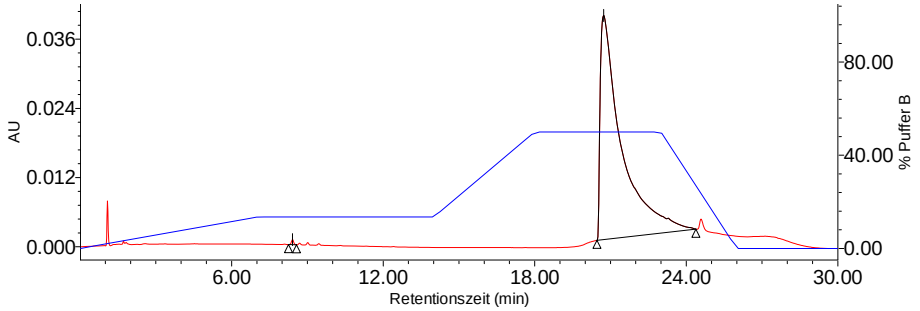


Abb. 455: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo3 1h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

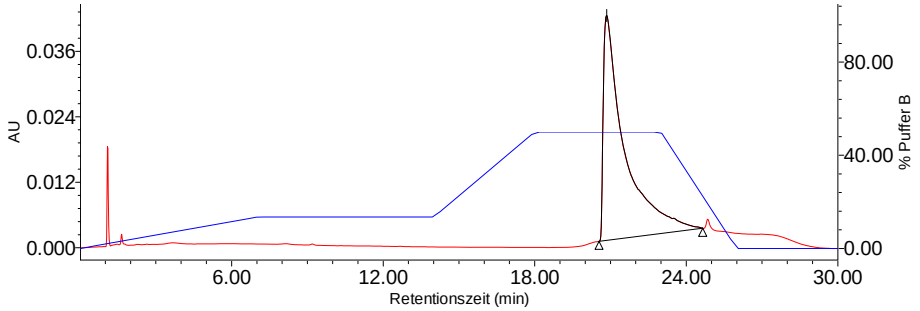


Abb. 456: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo3 3h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **0%**

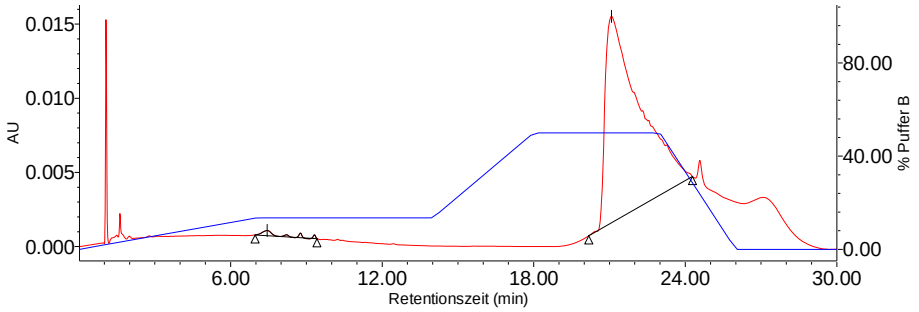


Abb. 457: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo3 6h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **1%**

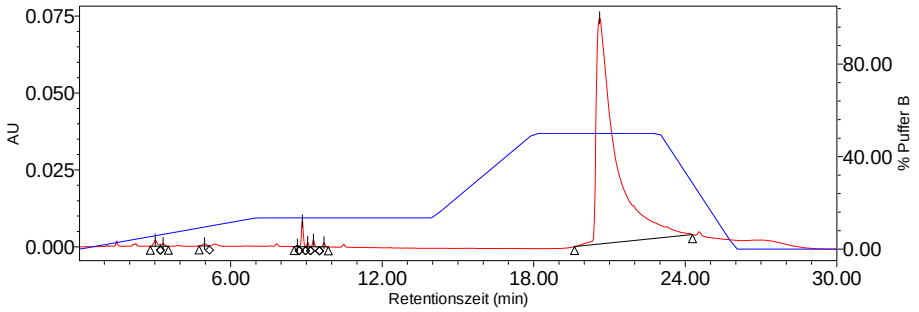


Abb. 458: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo3 24h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **2%**

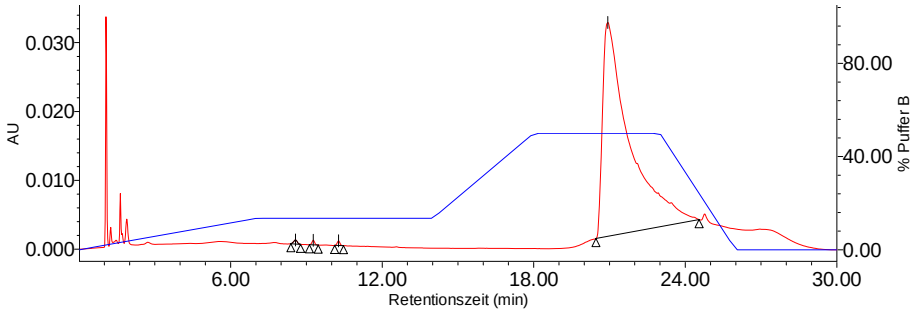


Abb. 459: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo3 48h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **1%**

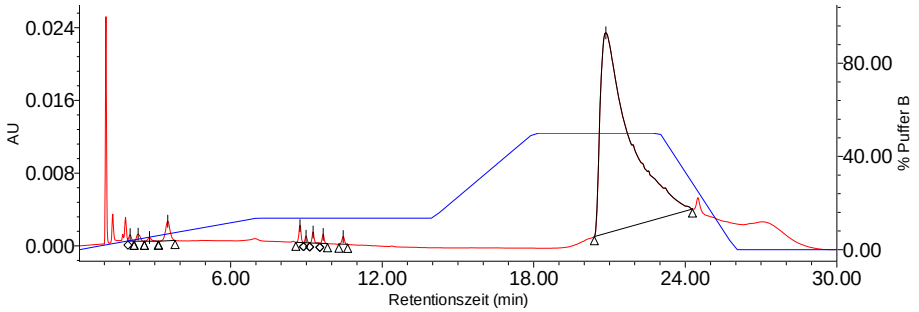


Abb. 460: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo3 72h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **4%**

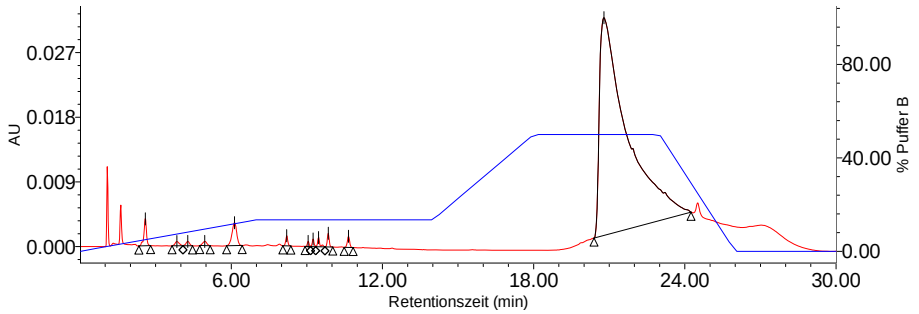


Abb. 461: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo3 144h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **5%**

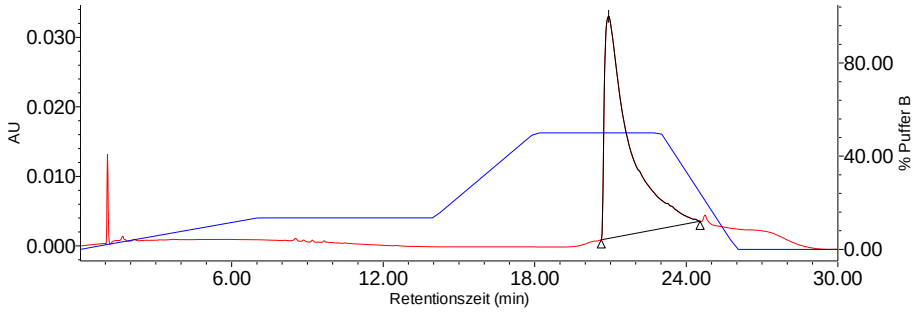


Abb. 462: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo4 0min (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

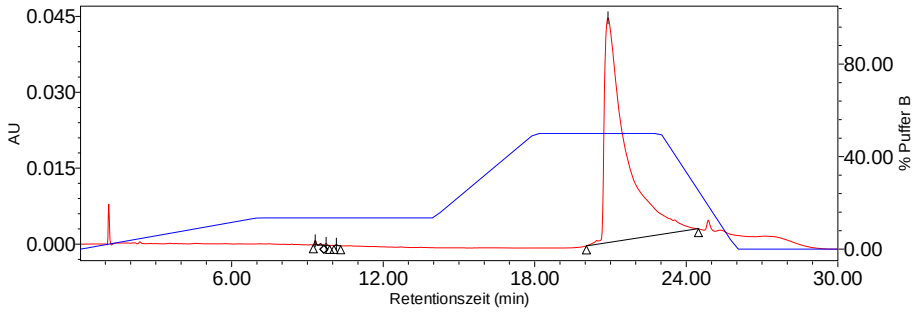


Abb. 463: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo4 30min (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

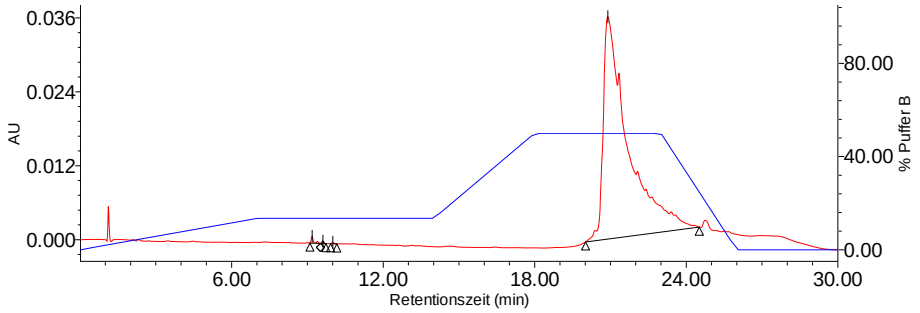


Abb. 464: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo4 1h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **< 1%**

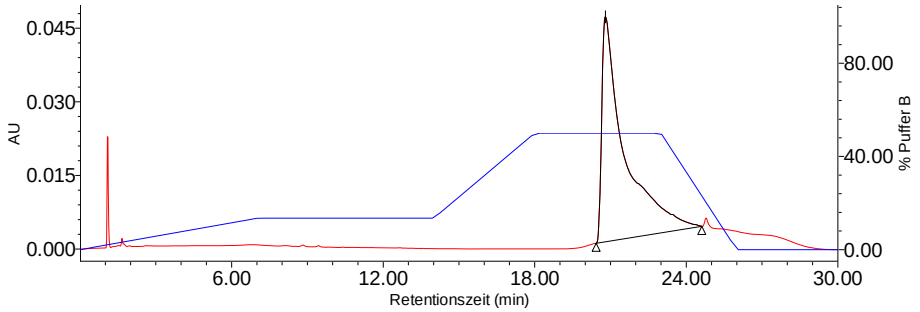


Abb. 465: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo4 3h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

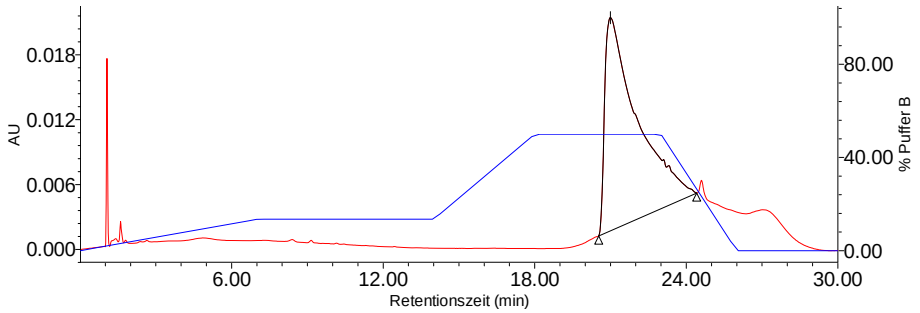


Abb. 466: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo4 6h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

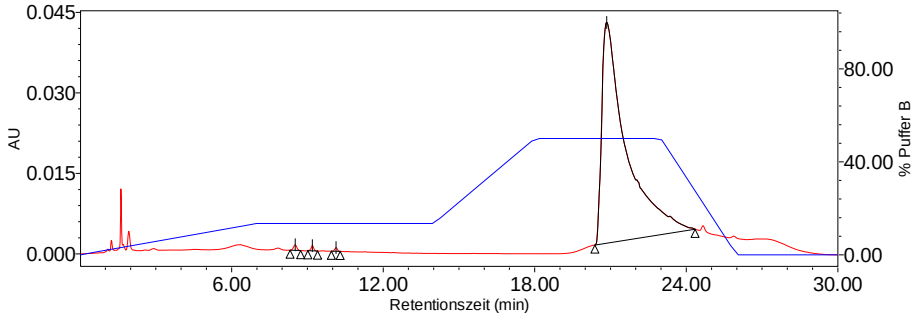


Abb. 467: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo4 24h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **1%**

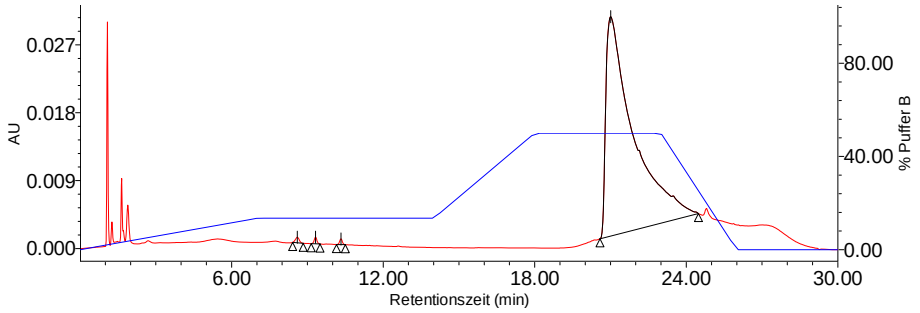


Abb. 468: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo4 48h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **1%**

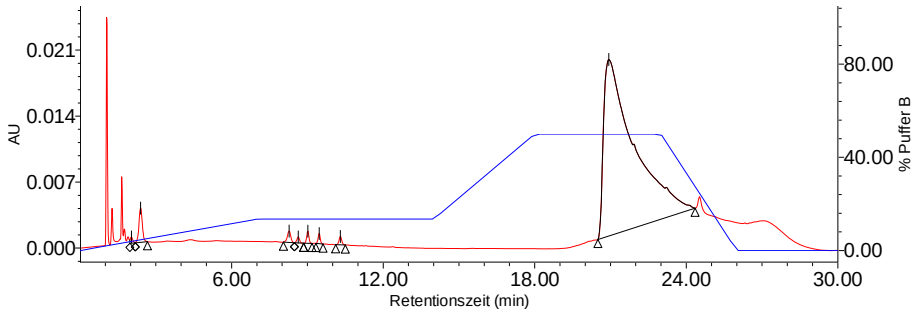


Abb. 469: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo4 72h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **4%**

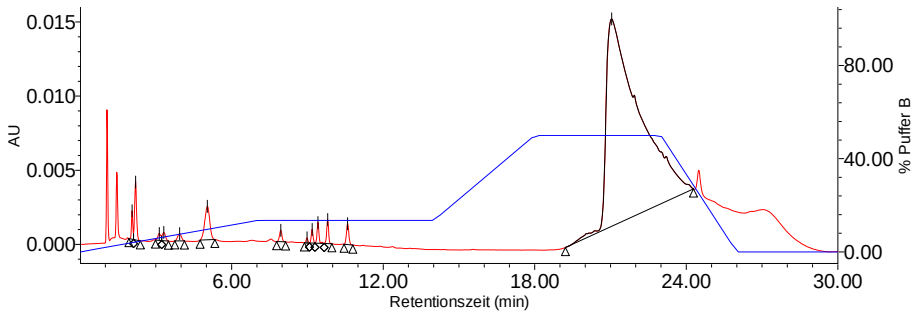


Abb. 470: 5´-Exonuklease-Abbau Oligo4 144h (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **8%**

8.2.3. Abbau mit S1-Endonuklease

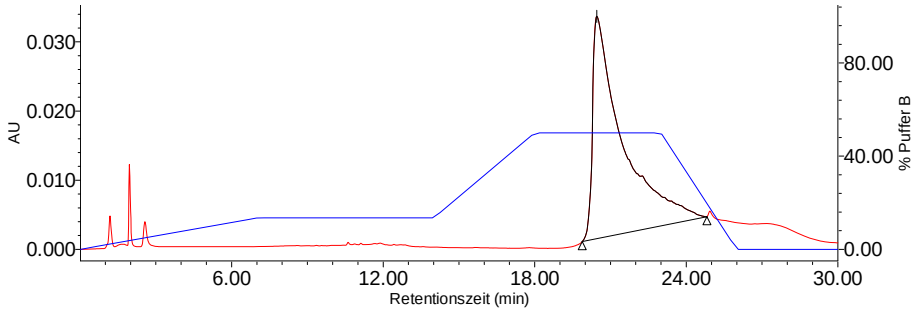


Abb. 471: S1-Endonuklease-Abbau Oligo1 0min (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **0%**

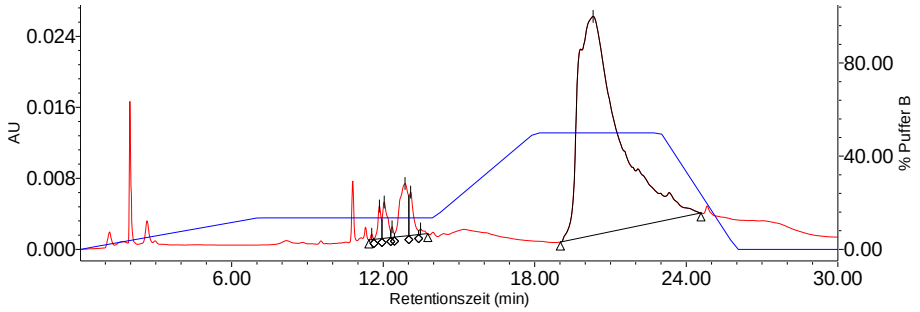


Abb. 472: S1-Endonuklease-Abbau Oligo1 10min (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **10%**

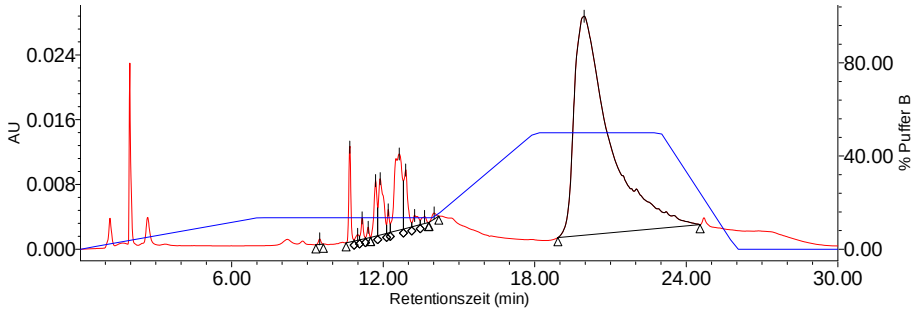


Abb. 473: S1-Endonuklease-Abbau Oligo1 30min (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **18%**

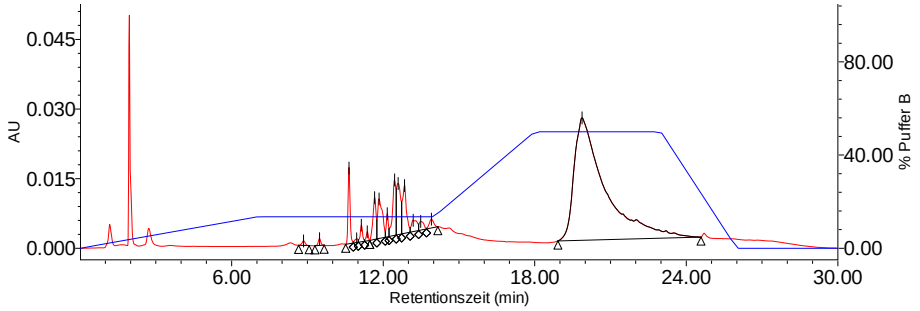


Abb. 474: S1-Endonuklease-Abbau Oligo1 1h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **26%**

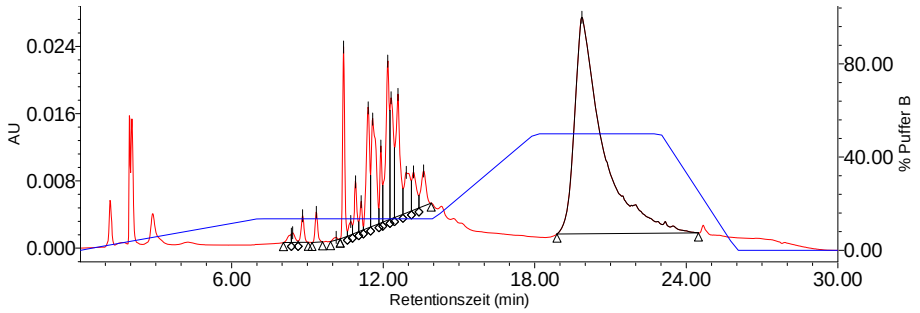


Abb. 475: S1-Endonuklease-Abbau Oligo1 3h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **40%**

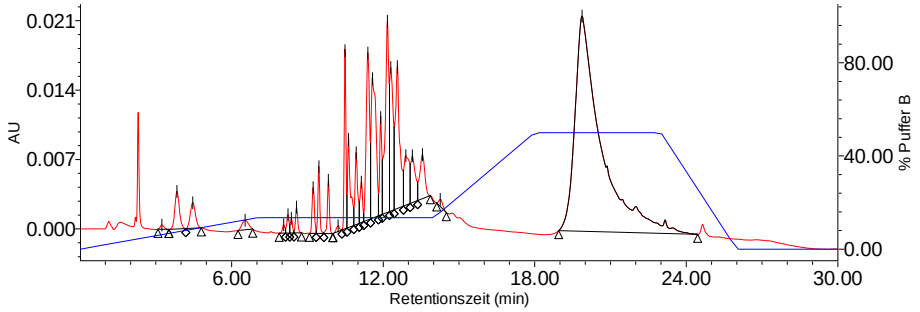


Abb. 476: S1-Endonuklease-Abbau Oligo1 6h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **50%**

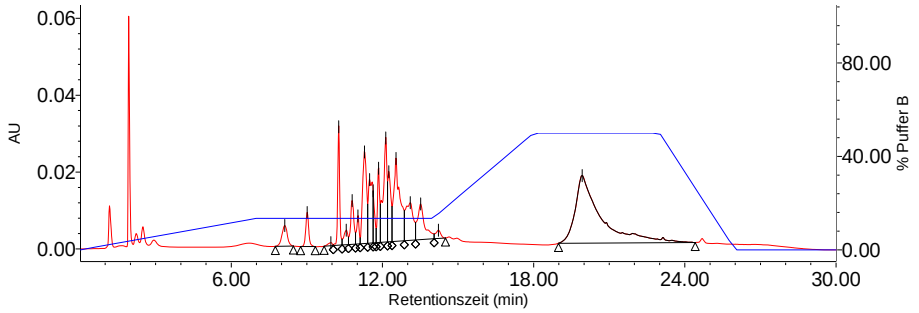


Abb. 477: S1-Endonuklease-Abbau Oligo1 24h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **66%**

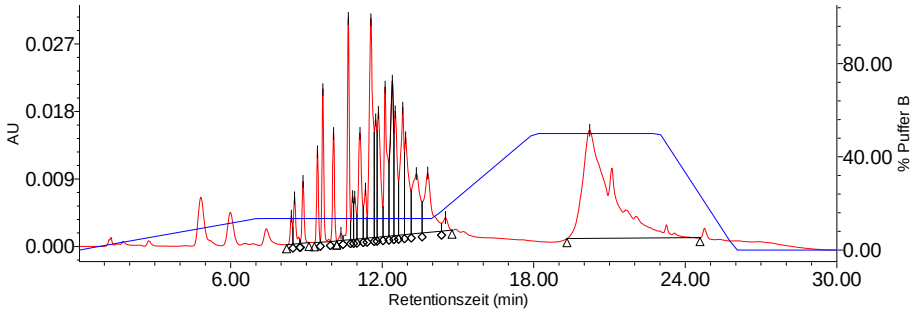


Abb. 478: S1-Endonuklease-Abbau Oligo1 48h (ONT1) Anteil Abbauprodukte: **68%**

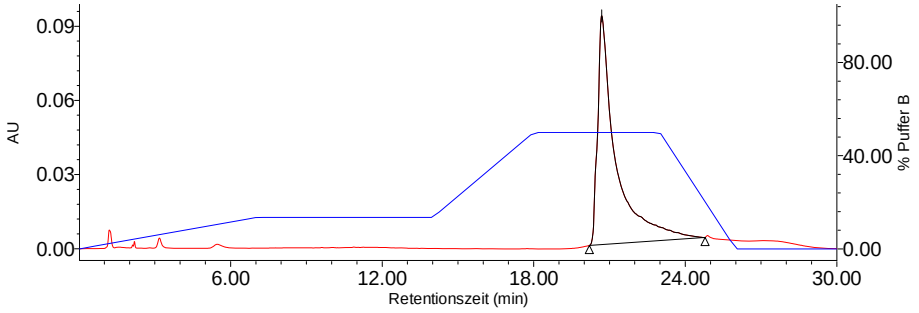


Abb. 479: S1-Endonuklease-Abbau Oligo2 0min (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **0%**

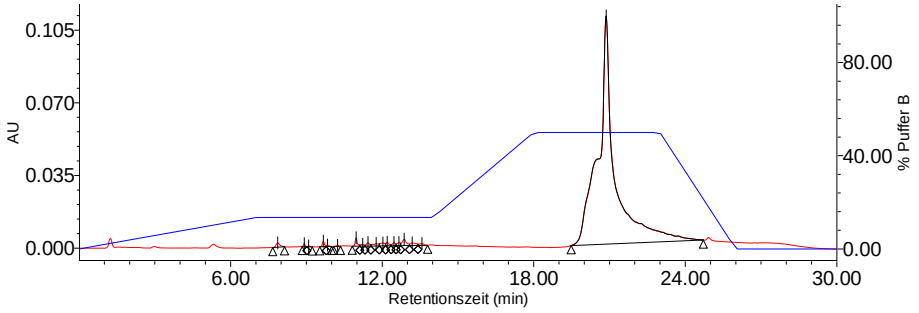


Abb. 480: S1-Endonuklease-Abbau Oligo2 10min (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **5%**

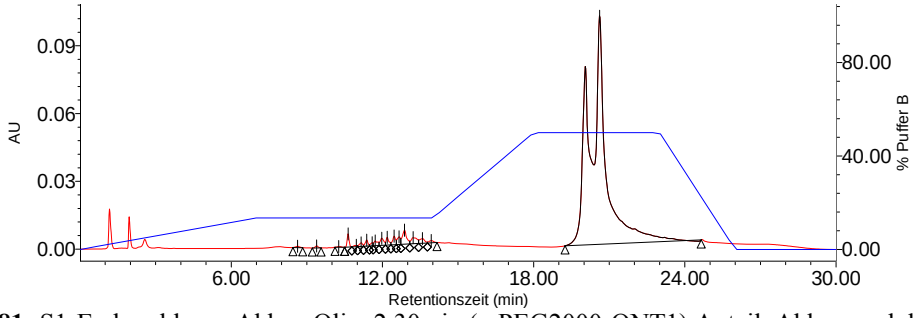


Abb. 481: S1-Endonuklease-Abbau Oligo2 30min (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **8%**

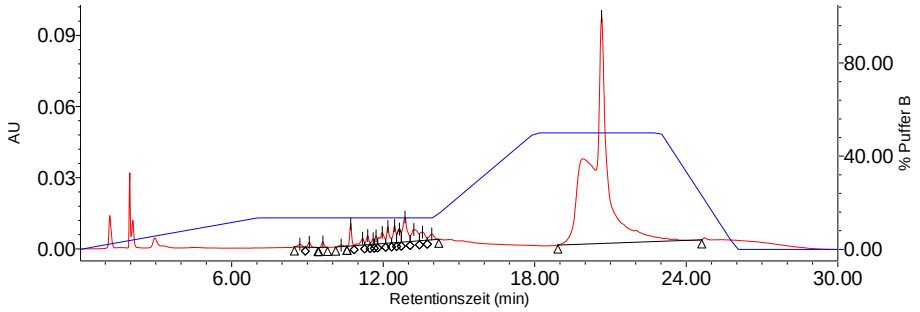


Abb. 482: S1-Endonuklease-Abbau Oligo2 1h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **14%**

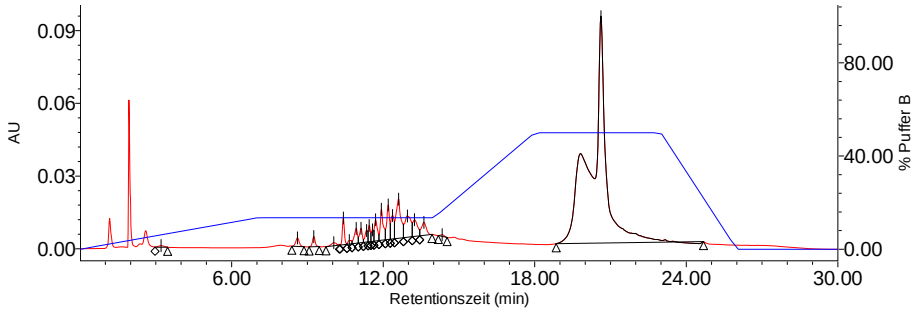


Abb. 483: S1-Endonuklease-Abbau Oligo2 3h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **25%**

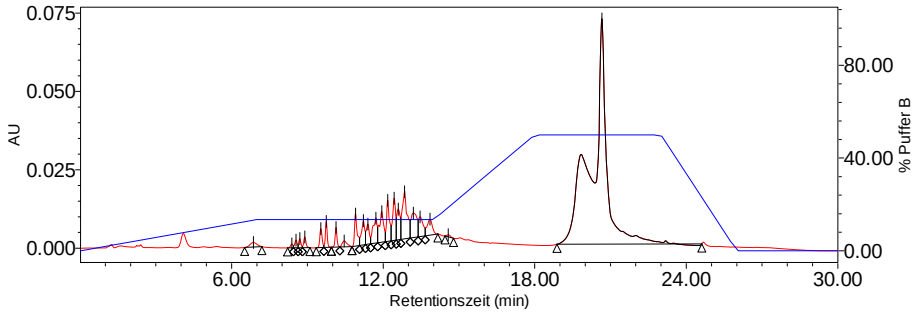


Abb. 484: S1-Endonuklease-Abbau Oligo2 6h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **33%**

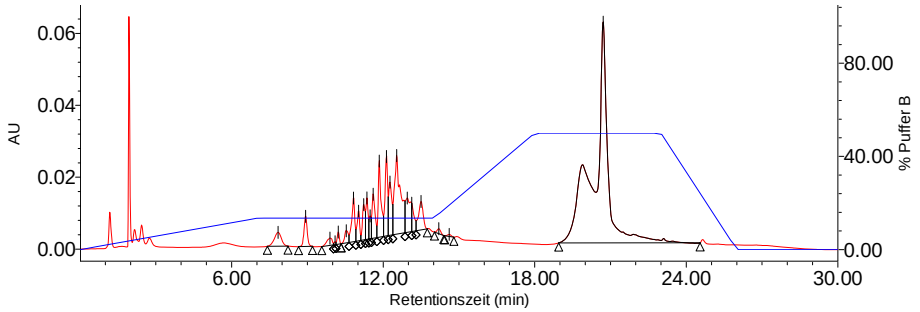


Abb. 485: S1-Endonuklease-Abbau Oligo2 24h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **44%**

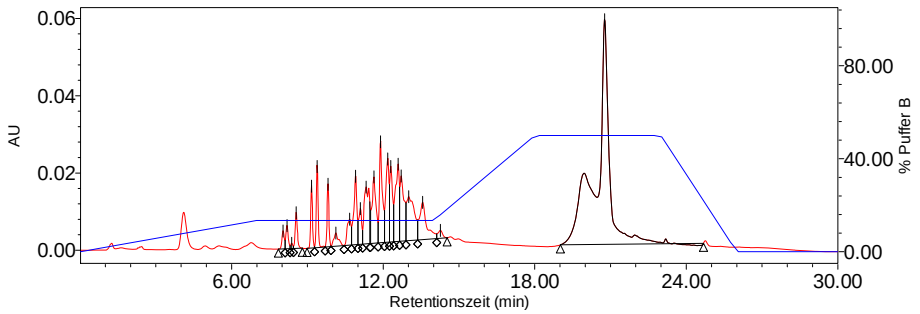


Abb. 486: S1-Endonuklease-Abbau Oligo2 48h (mPEG2000-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **55%**

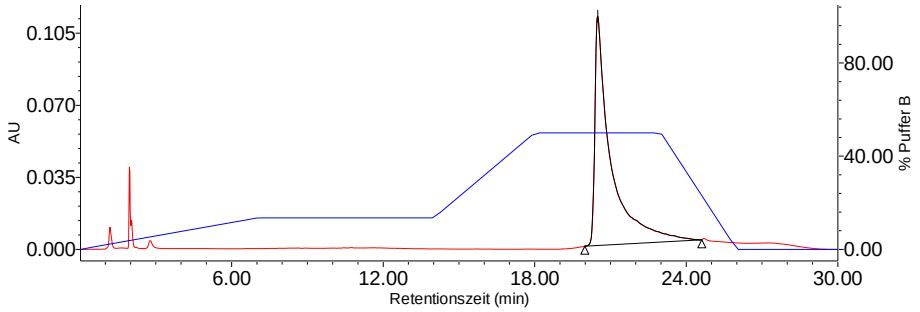


Abb. 487: S1-Endonuklease-Abbau Oligo3 0min (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **0%**

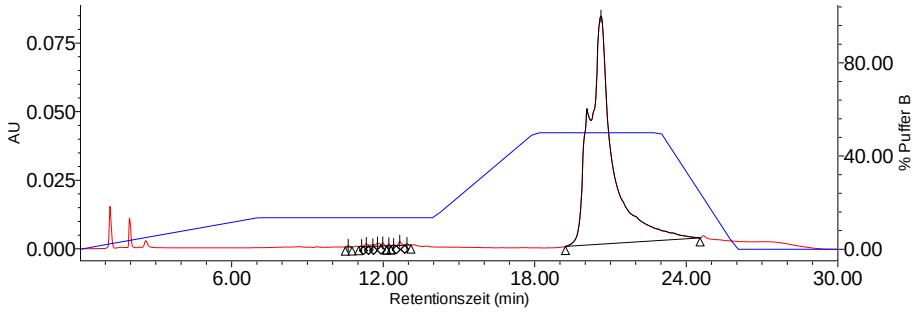


Abb. 488: S1-Endonuklease-Abbau Oligo3 10min (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **1%**

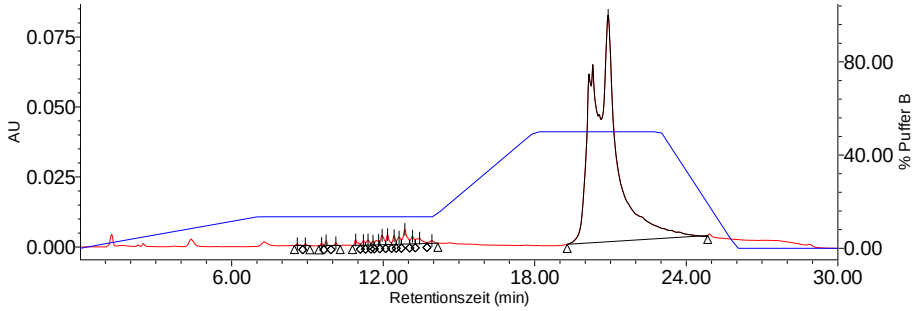


Abb. 489: S1-Endonuklease-Abbau Oligo3 30min (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **6%**

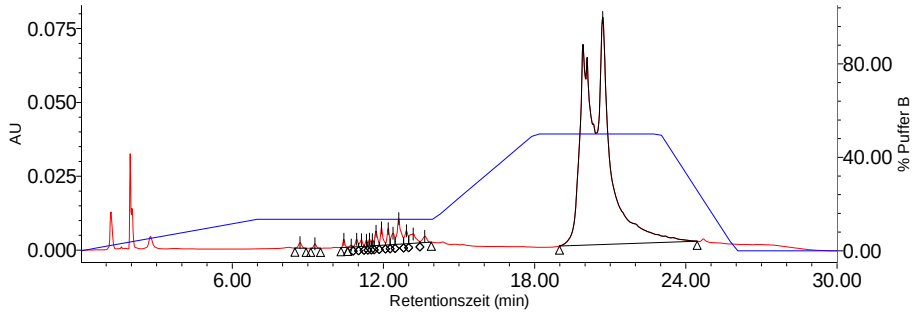


Abb. 490: S1-Endonuklease-Abbau Oligo3 1h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **9%**

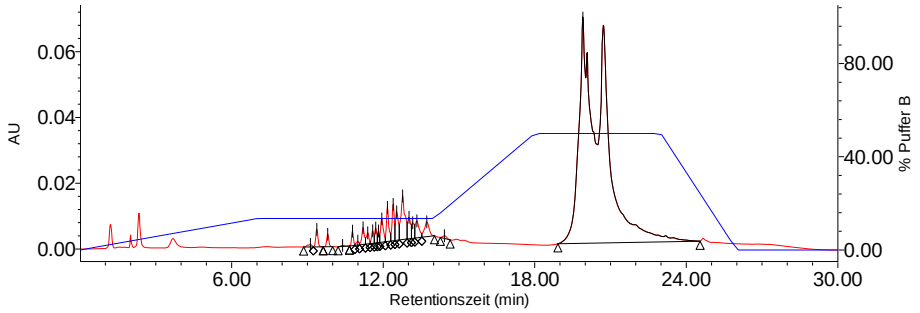


Abb. 491: S1-Endonuklease-Abbau Oligo3 3h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **16%**

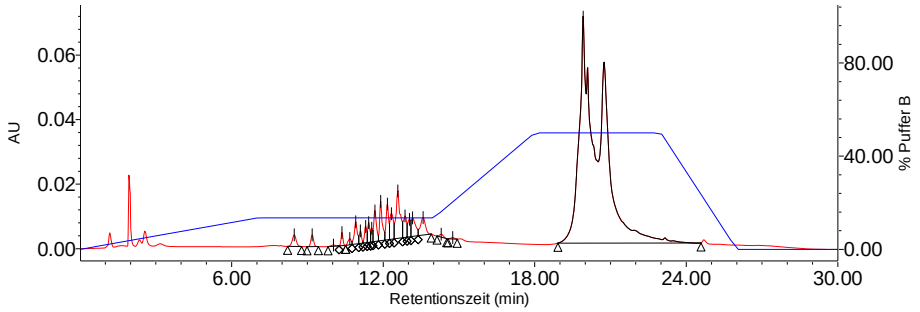


Abb. 492: S1-Endonuklease-Abbau Oligo3 6h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **21%**

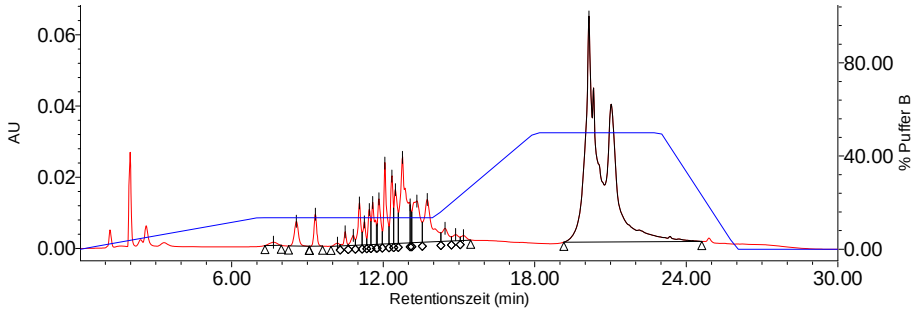


Abb. 493: S1-Endonuklease-Abbau Oligo3 24h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **41%**

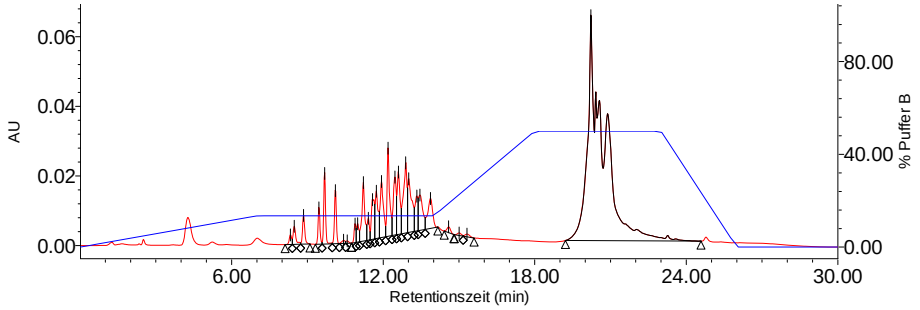


Abb. 494: S1-Endonuklease-Abbau Oligo3 48h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **43%**

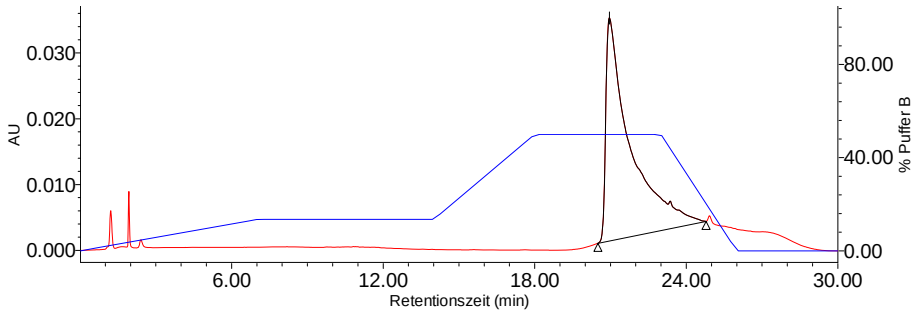


Abb. 495: S1-Endonuklease-Abbau Oligo4 0min (mPEG2000-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

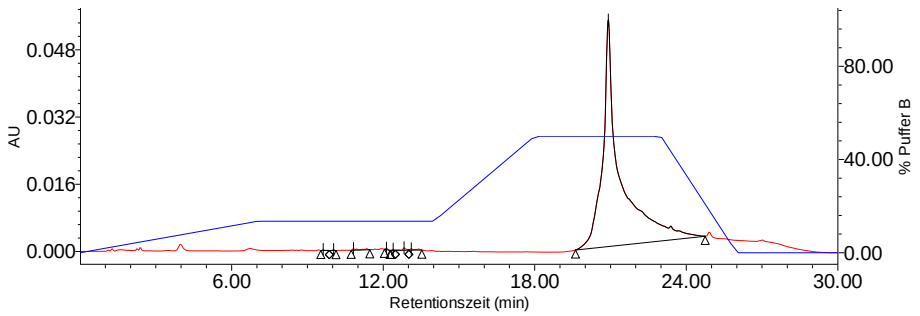


Abb. 496: S1-Endonuklease-Abbau Oligo4 10min (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **1%**

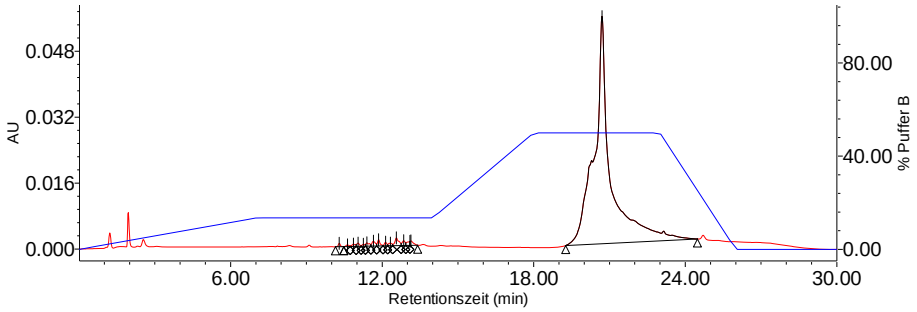


Abb. 497: S1-Endonuklease-Abbau Oligo4 30min (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **4%**

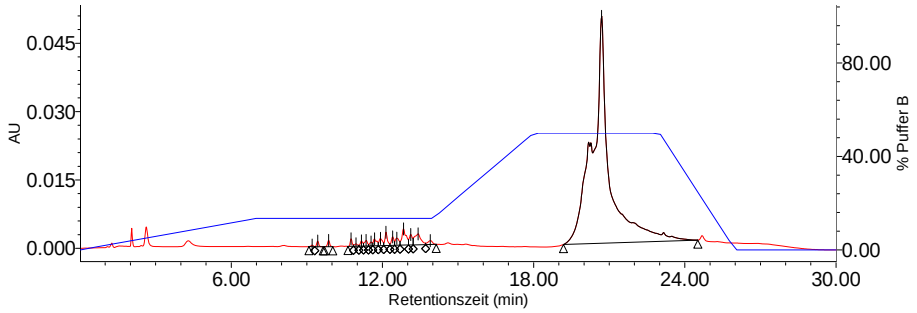


Abb. 498: S1-Endonuklease-Abbau Oligo4 1h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **9%**

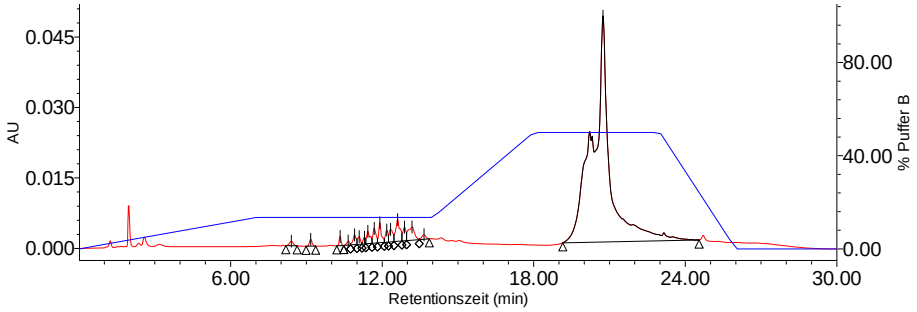


Abb. 499: S1-Endonuklease-Abbau Oligo4 3h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **13%**

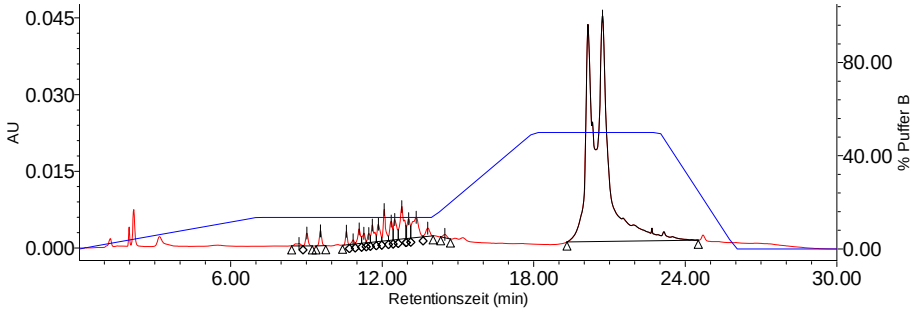


Abb. 500: S1-Endonuklease-Abbau Oligo4 6h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **18%**

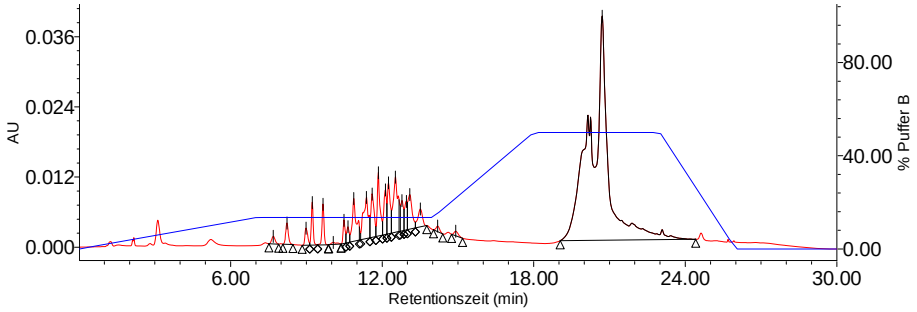


Abb. 501: S1-Endonuklease-Abbau Oligo4 24h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **35%**

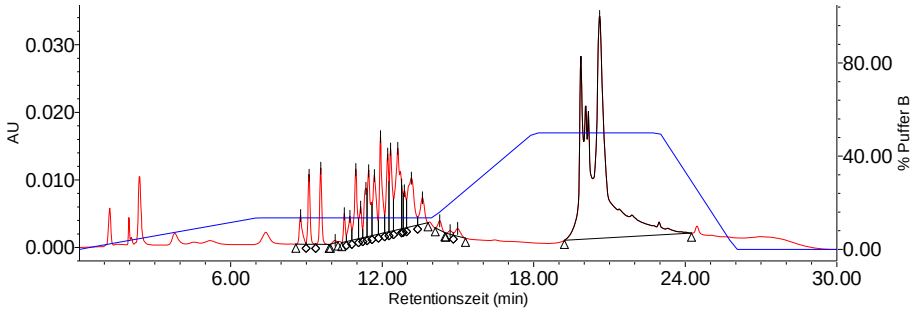


Abb. 502: S1-Endonuklease-Abbau Oligo4 48h (mPEG400-ONT1-mPEG2000) Anteil Abbauprodukte: **44%**

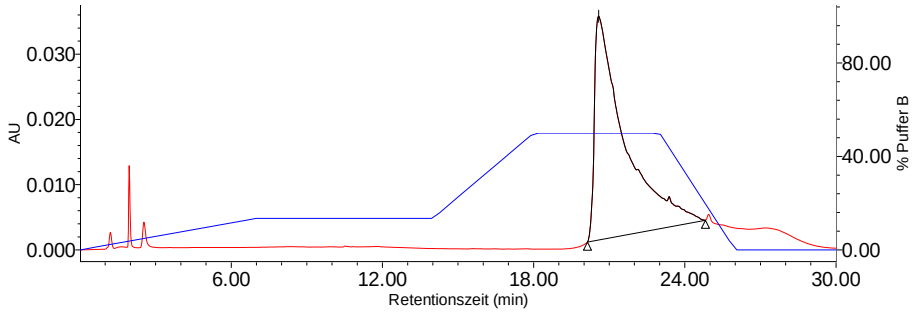


Abb. 503: S1-Endonuklease-Abbau Oligo5 0min (mPEG400-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **0%**

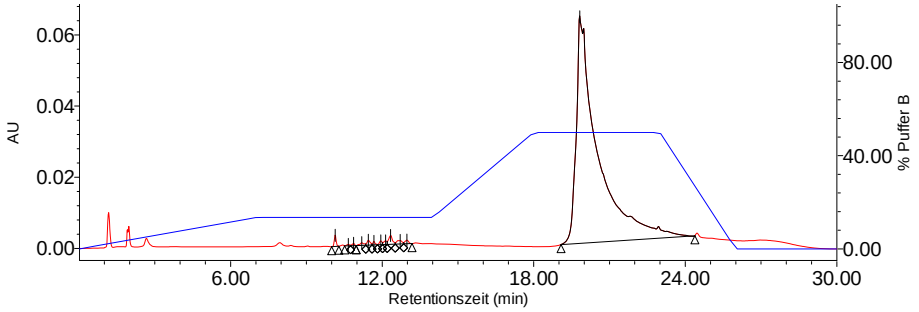


Abb. 504: S1-Endonuklease-Abbau Oligo5 10min (mPEG400-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **3%**

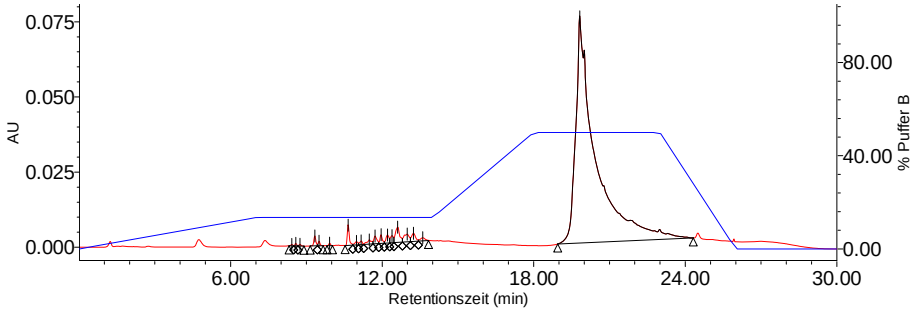


Abb. 505: S1-Endonuklease-Abbau Oligo5 30min (mPEG400-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **7%**

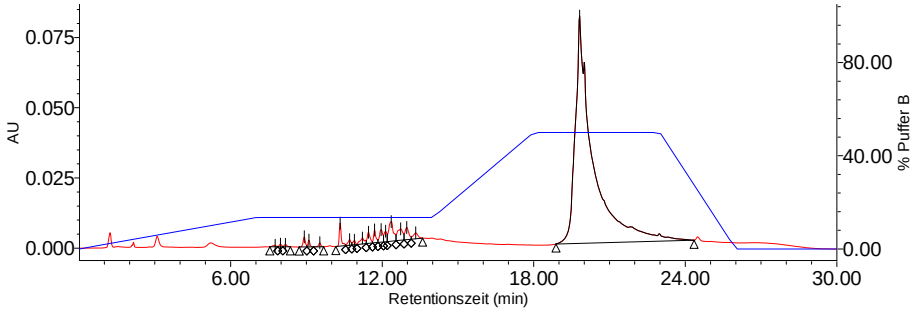


Abb. 506: S1-Endonuklease-Abbau Oligo5 1h (mPEG400-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **12%**

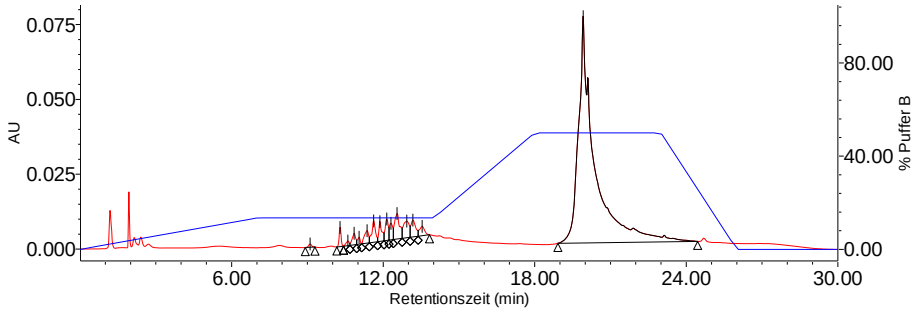


Abb. 507: S1-Endonuklease-Abbau Oligo5 3h (mPEG400-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **18%**

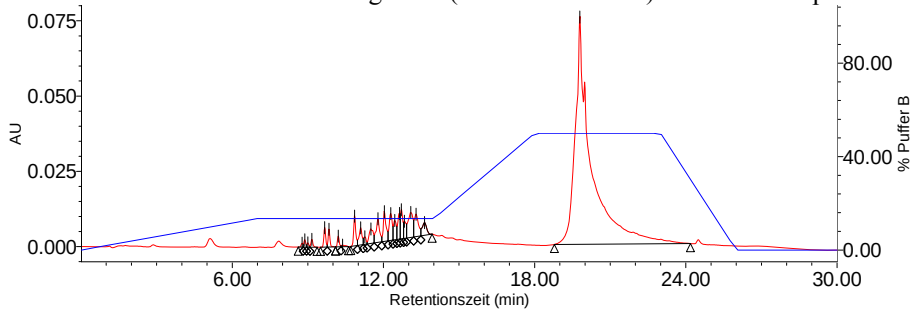


Abb. 508: S1-Endonuklease-Abbau Oligo5 6h (mPEG400-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **23%**

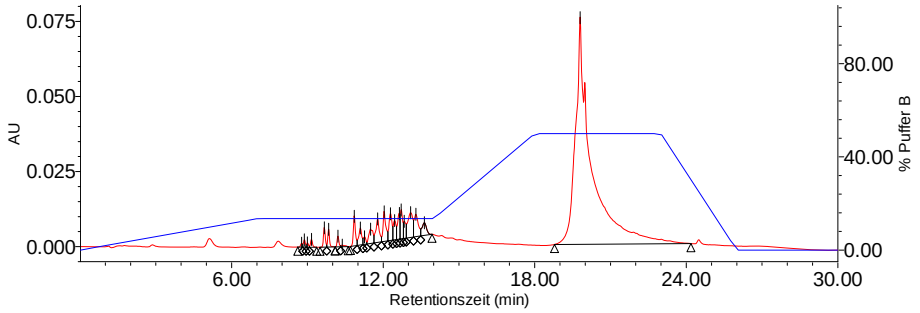


Abb. 509: S1-Endonuklease-Abbau Oligo5 24h (mPEG400-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **48%**

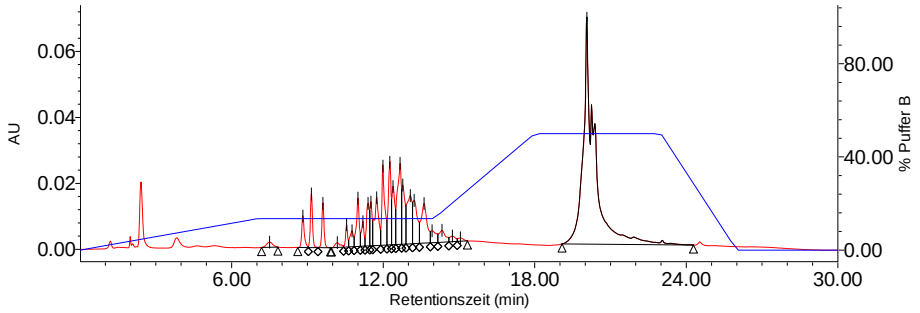


Abb. 510: S1-Endonuklease-Abbau Oligo5 48h (mPEG400-ONT1) Anteil Abbauprodukte: **54%**

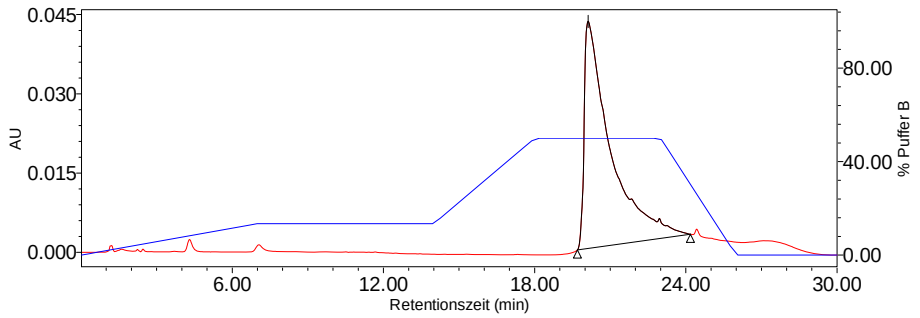


Abb. 511: S1-Endonuklease-Abbau Oligo6 0min (ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

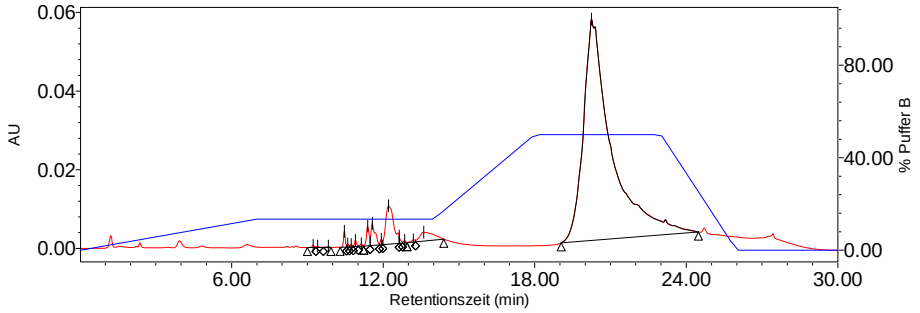


Abb. 512: S1-Endonuklease-Abbau Oligo6 10min (ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **10%**

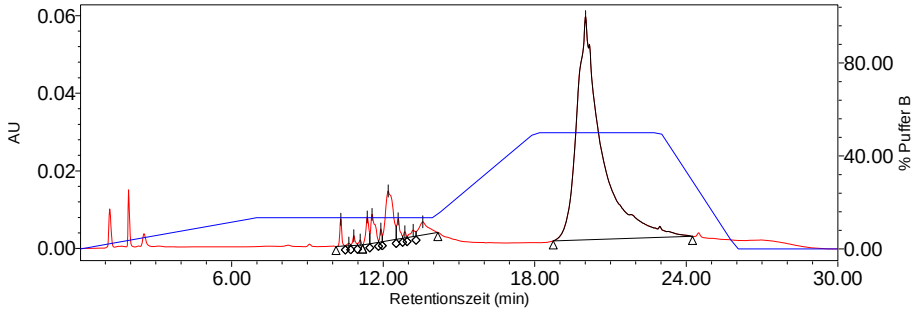


Abb. 513; S1-Endonuklease-Abbau Oligo6 30min (ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **14%**

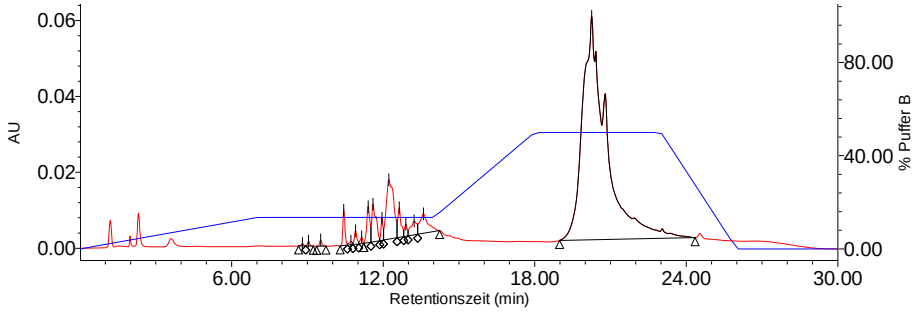


Abb. 514: S1-Endonuklease-Abbau Oligo6 1h (ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **20%**

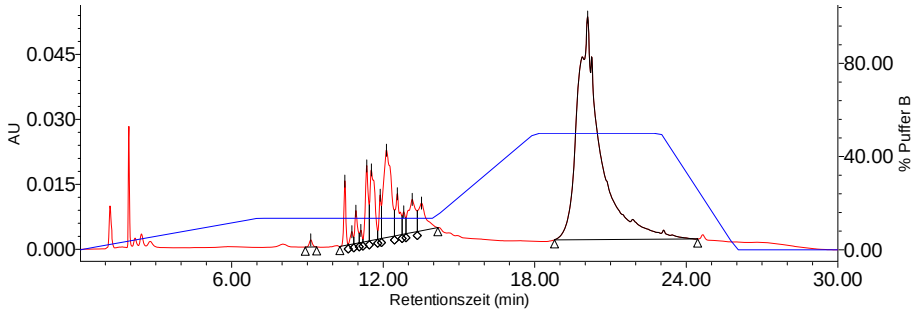


Abb. 515: S1-Endonuklease-Abbau Oligo6 3h (ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **31%**

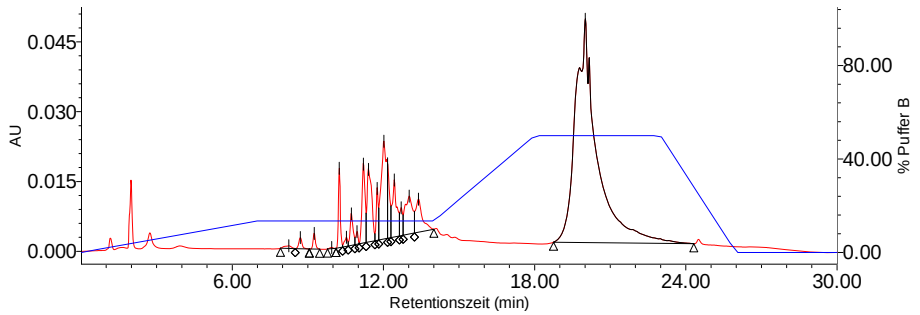


Abb. 516: S1-Endonuklease-Abbau Oligo6 6h (ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **35%**

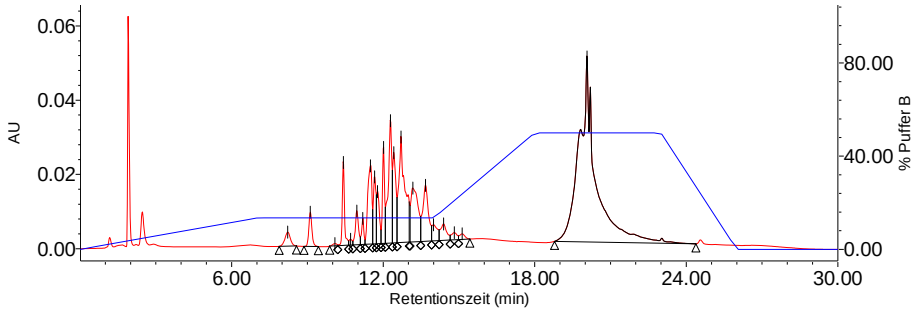


Abb. 517: S1-Endonuklease-Abbau Oligo6 24h (ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **55%**

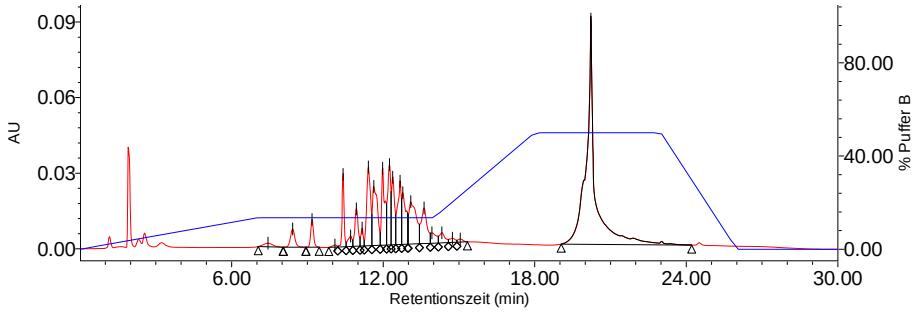


Abb. 518: S1-Endonuklease-Abbau Oligo6 48h (ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **60%**

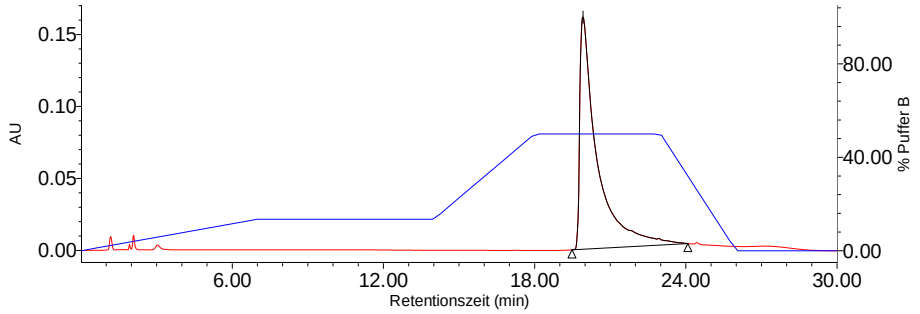


Abb. 519: S1-Endonuklease-Abbau Oligo7 0min (mPEG400-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **0%**

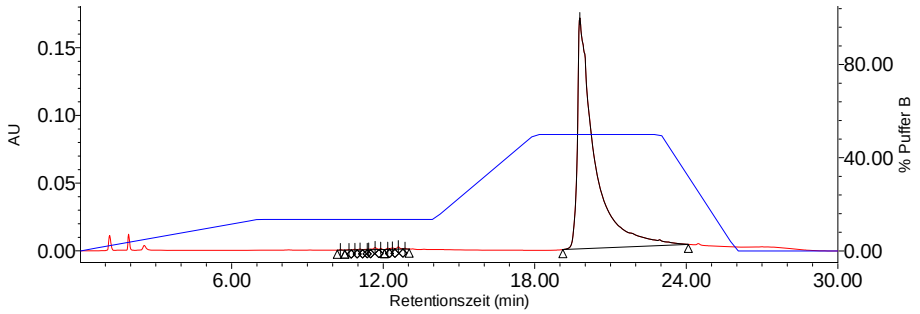


Abb. 520: S1-Endonuklease-Abbau Oligo7 10min (mPEG400-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **1%**

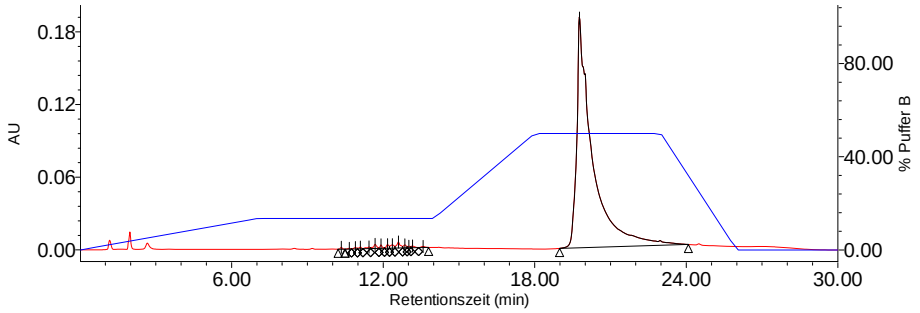


Abb. 521: S1-Endonuklease-Abbau Oligo7 30min (mPEG400-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **3%**

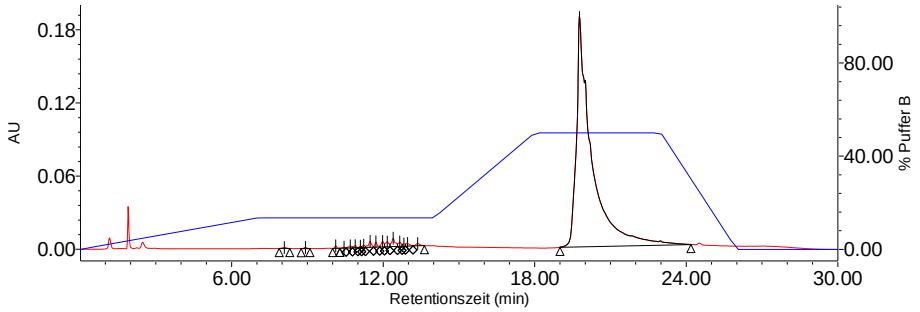


Abb. 522: S1-Endonuklease-Abbau Oligo7 1h (mPEG400-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **4%**

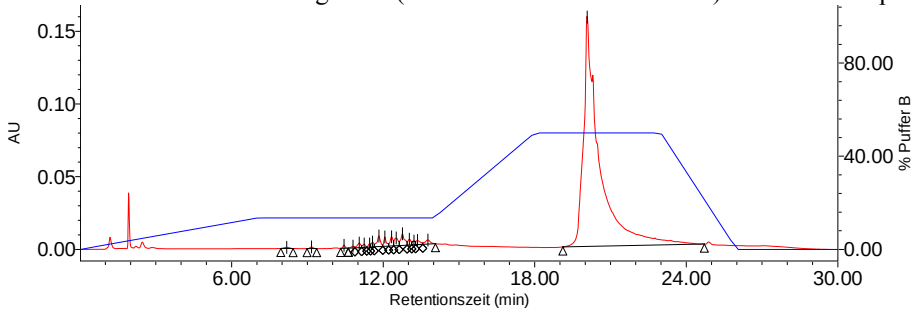


Abb. 523: S1-Endonuklease-Abbau Oligo7 3h (mPEG400-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **7%**

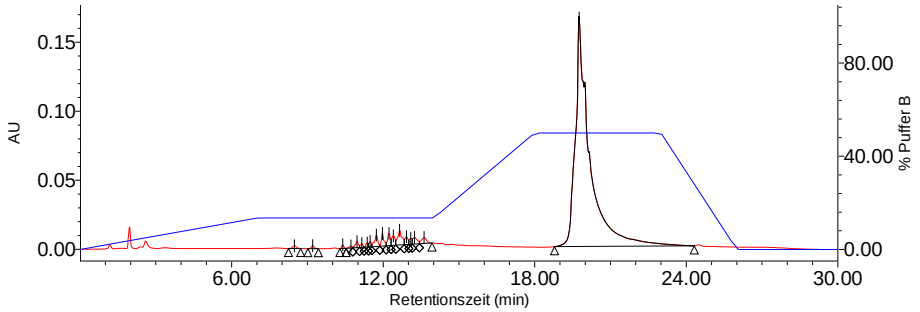


Abb. 524: S1-Endonuklease-Abbau Oligo7 6h (mPEG400-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **10%**

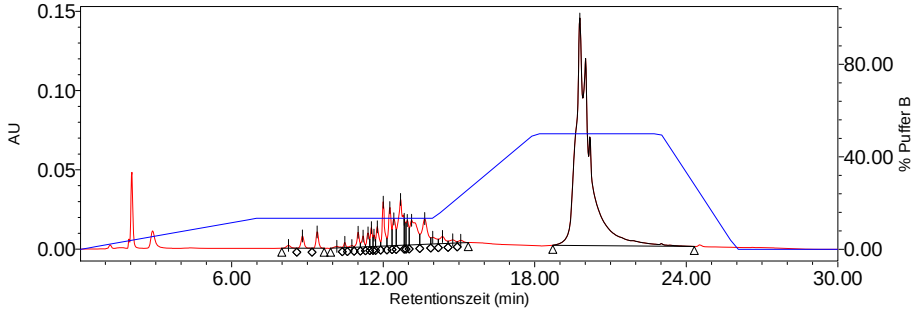


Abb. 525: S1-Endonuklease-Abbau Oligo7 24h (mPEG400-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **30%**

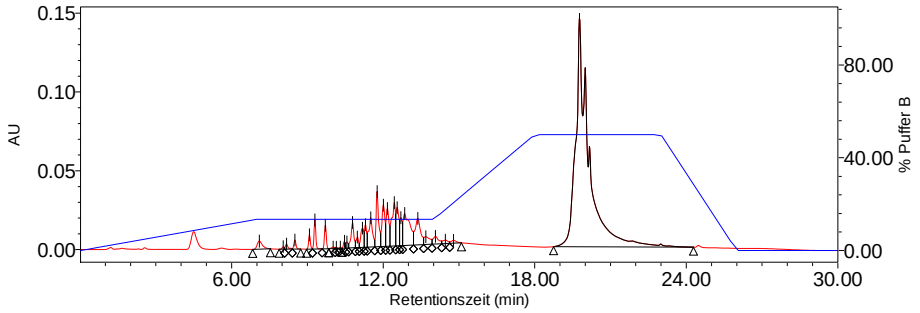
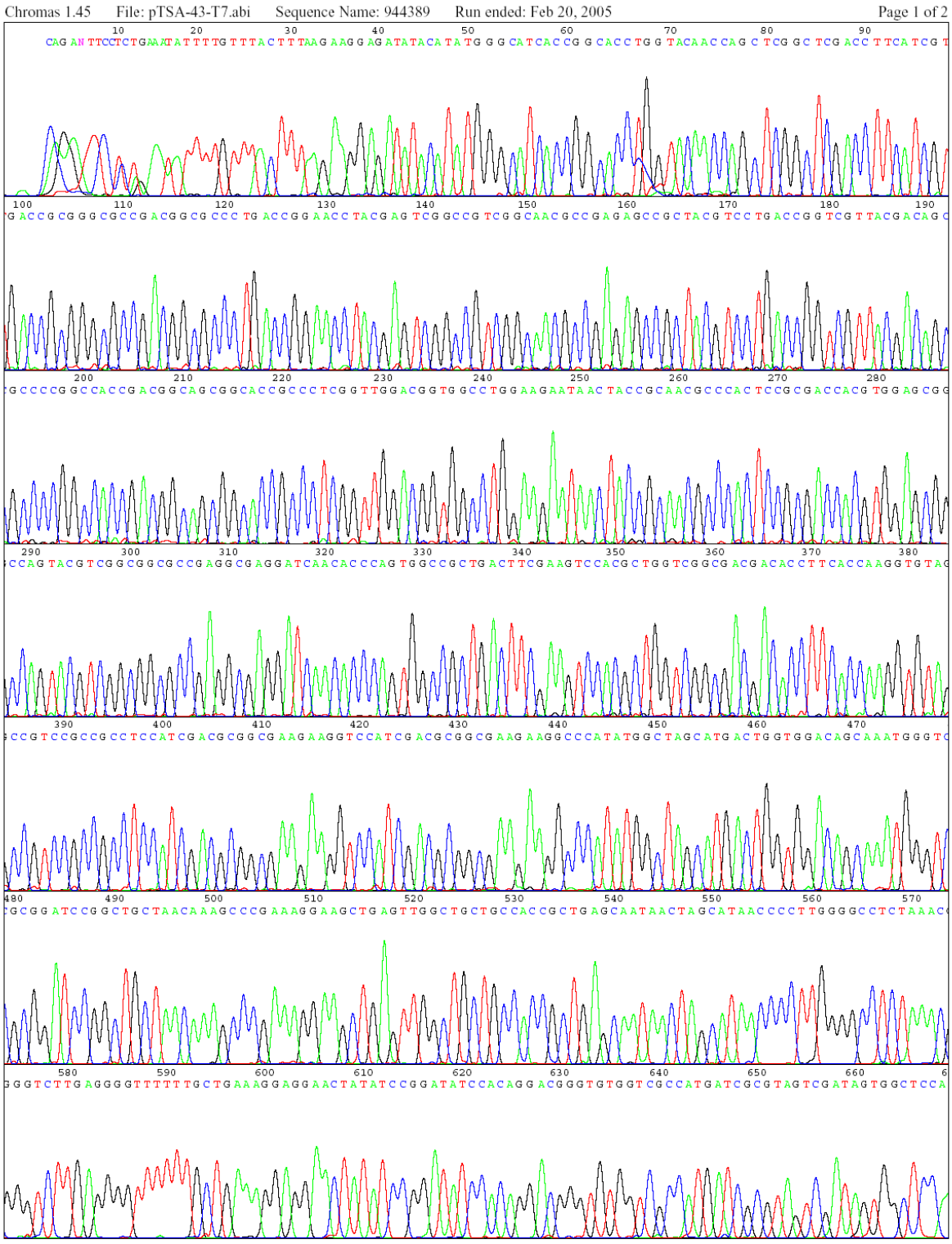


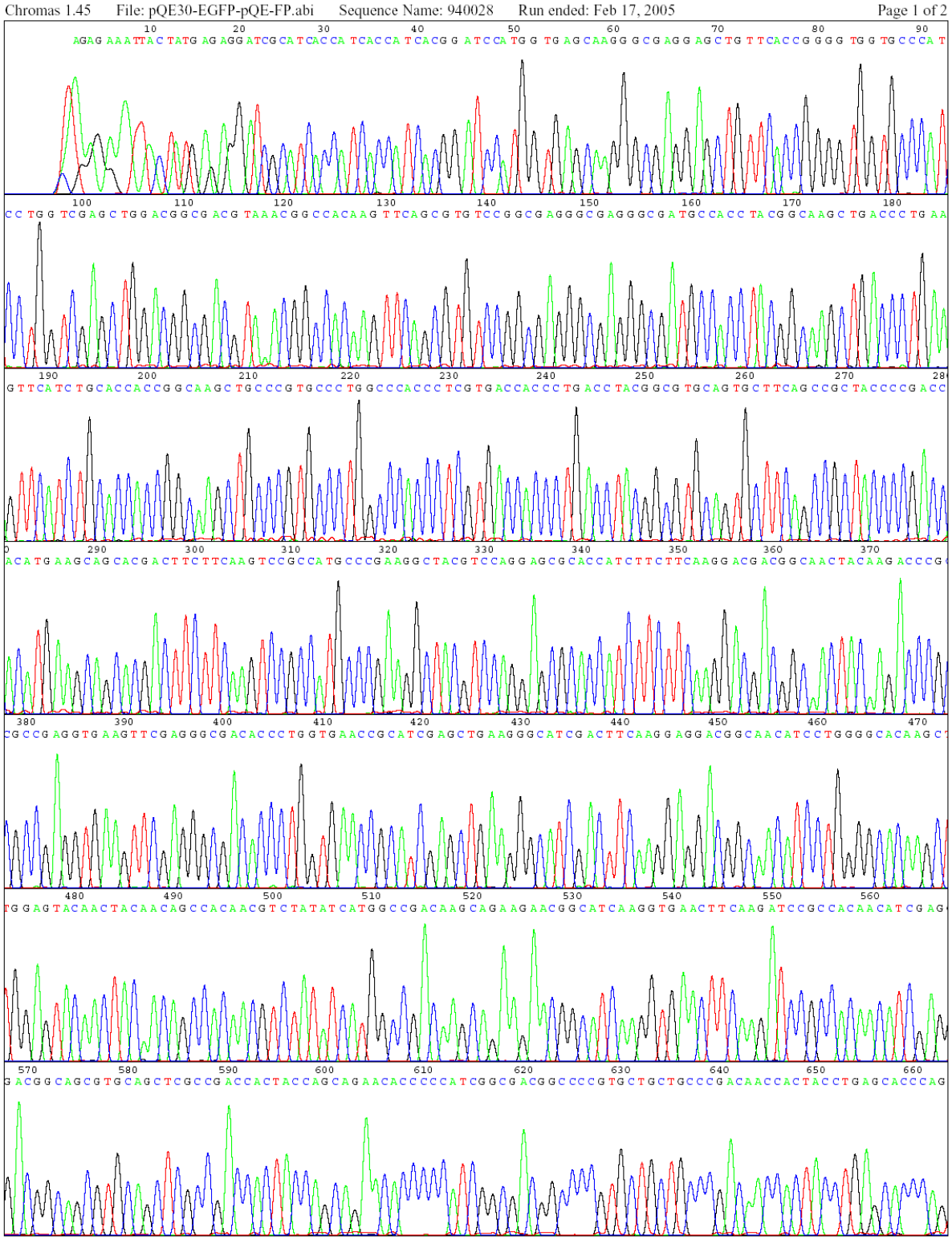
Abb. 526: S1-Endonuklease-Abbau Oligo7 48h (mPEG400-ONT1-mPEG400) Anteil Abbauprodukte: **37%**

8.3. Sequenzierergebnisse

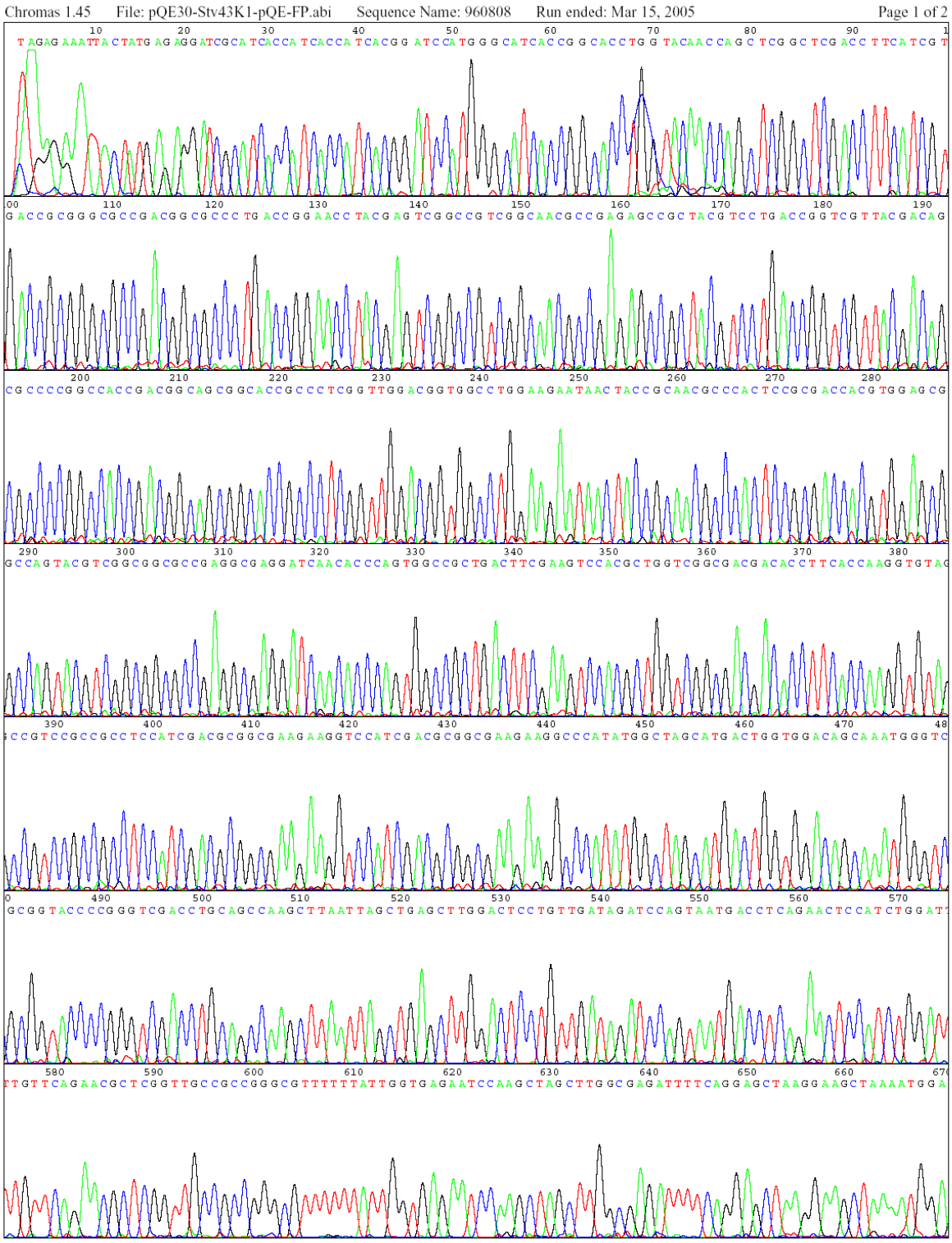
8.3.1. pTSA43



8.3.2. pQE30-EGFP

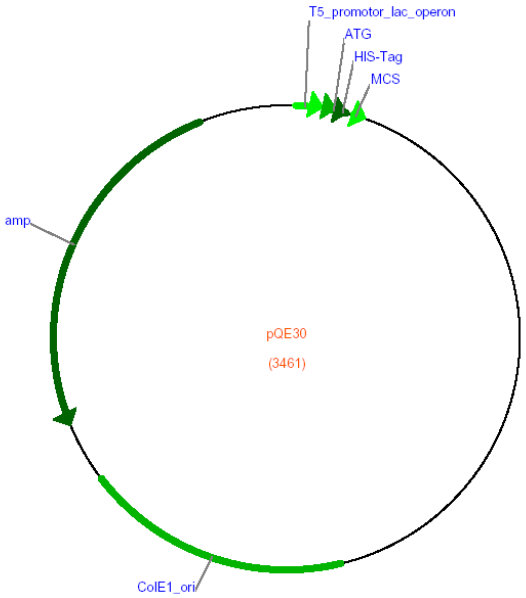


8.3.3. pQE30-TSA43



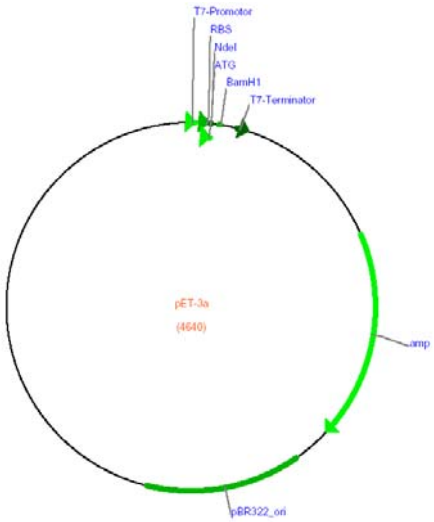
8.4. Vektorsequenzen

8.4.1. pQE30



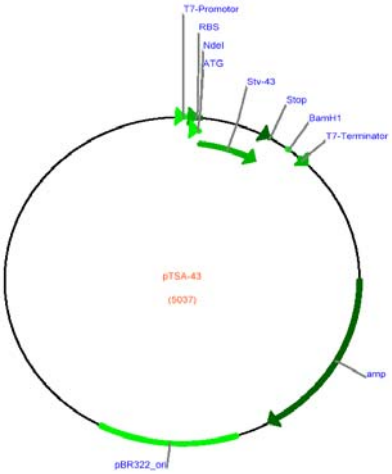
ctcgag<+T5_promotor_lac_operon>aaatcataaaaaatttatttgctttgtgagcggataacaattataatagattcaattgtgagc
ggataacaatttcacaca</T5_promotor_lac_operon>gaattcattaaagaggagaaattaact<+ATG>atg</ATG>agaggatcg
<+HISTag>catcaccatcaccatcac</HISTag><+MCS>ggatccgcatgcgagctcggtaccccgggtcgacctgcagccaagctt</MC
S>aattagctgagcttggactcctgttgatagatccagtaatgacctcagaactccatctggatttgttcagaacgctcggttgccgccgggcg
ttttttattggtgagaatccaagctagcttggcgagattttcaggagctaaggaagctaaaatggagaaaaaaatcactggatataccaccgtt
gatatatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacgg
cctttttaaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcacattcttgcccgcctgatgaatgctcatccggaatttcg
tatggcaatgaaagacggtgagctggtgatatgggatagtgttcacccttgttacaccgttttccatgagcaaactgaaacgttttcatcgctc
tggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaag
ggtttattgagaatatgtttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttcttcgc
ccccgttttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctgatgccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgtgatggcttc
catgtcggcagaatgcttaatgaattacaacagtactgcgatgagtggcagggcggggcgtaatttttttaaggcagttattggtgcccttaaa
cgcctggggtaatgactctctagcttgaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcgg
tgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccctctagagctgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccg
gagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagcca
tgacccagtcacgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaa
ataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggc
gagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatg<ColE1_ori>tgagcaaaa
ggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgct
caagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgcc
gcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgtt
cgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagac
acgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaa
ctacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaa
caaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttcta
c</ColE1_ori>ggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagat
ccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaa<amp>acttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgagg
cacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctgg
ccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagt
ggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttg
ttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatc
ccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggca
gcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgc
ggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttc
ggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttc
accagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcc
tttttc</amp>aatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggg
ggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgagg
ccctttcgtcttcac

8.4.2. pET-3a



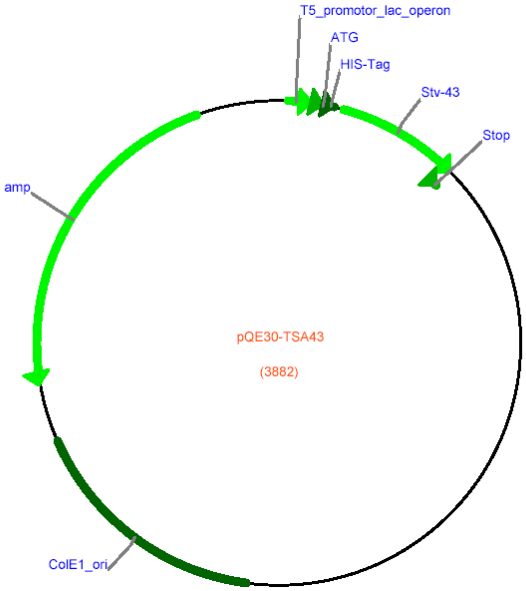
t<+T7Promotor>taatacgactcactatag</T7Promotor>ggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaactttaa<+
RBS>gaaggag</RBS>atata<NdeI>cat<+ATG>atg</ATG></NdeI>gctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgc<BamH1>g
gatcc</BamH1>ggctgctaacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgcca<+T7Terminator>ccgctgagcaataactagcata
acccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaaggа</T7Terminator>ggaactatatccggatatccacaggacggg
tgtggtcgccatgatcgcgtagtcgatagtggctccaagtagcgaagcgagcaggactgggcggcggccaaagcggtcggacagtgctccgaga
acgggtgcgcatagaaattgcatcaacgcatatagcgctagcagcacgccatagtgactggcgatgctgtcggaatggacgatatcccgcaaga
ggcccggcagtaccggcataaccaagcctatgcctacagcatccagggtgacggtgccgaggatgacgatgagcgcattgttagatttcataca
cggtgcctgactgcgttagcaatttaactgtgataaactaccgcattaaagcttatcgatgataagctgtcaaacatgagaattcttgaagacg
aaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgc
ggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaa
ggaagagt<+amp>atgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaac
gctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttt
cgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactcg
gtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatg
cagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaac
atgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaa
tggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgc
aggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagca
ctggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgaga
taggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagt</amp>ttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatt
taaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacccc<pBR32
2_ori>gtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgg
tggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgta
gccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgat
aagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagct
tggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatcc
ggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctc
tgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttt
gctggccttttgctca</pBR322_ori>catgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctg
ataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtattttctccttacgcatct
gtgcggtatttcacaccgcatatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacg
tgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagct
gtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgt
gaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataaagcgggccat
gttaagggcggttttttcctgtttggtcactgatgcctccgtgtaagggggatttctgttcatgggggtaatgataccgatgaaacgagagagg
atgctcacgatacgggttactgatgatgaacatgcccggttactggaacgttgtgagggtaaacaactggcggtatggatgcggcgggaccaga
gaaaaatcactcagggtcaatgccagcgcttcgttaatacagatgtaggtgttccacagggtagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaa
cataatggtgcagggcgctgacttccgcgtttccagactttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgttgctcaggtcgcagacgtt
ttgcagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgtatcggtgattcattctgctaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacg
acaggagcacgatcatgcgcacccgtggccaggacccaacgctgcccgagatgcgccgcgtgcggctgctggagatggcggacgcgatggatat
gttctgccaagggttggtttgcgcattcacagttctccgcaagaattgattggctccaattcttggagtggtgaatccgttagcgaggtgccgc
cggcttccattcaggtcgaggtggcccggctccatgcaccgcgacgcaacgcggggaggcagacaaggtatagggcggcgcctacaatccatgc
caacccgttccatgtgctcgccgaggcggcataaatcgccgtgacgatcagcggtccagtgatcgaagttaggctggtaagagccgcgagcgat
ccttgaagctgtccctgatggtcgtcatctacctgcctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatgccgccggaagcgagaagaatca
taatggggaaggccatccagcctcgcgtcgcgaacgccagcaagacgtagcccagcgcgtcggccgccatgccggcgataatggcctgcttctc
gccgaaacgtttggtggcgggaccagtgacgaaggcttgagcgagggcgtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgcg
ctccagcgaaagcggtcctcgccgaaaatgacccagagcgctgccggcacctgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataagtgcgg
cgacgatagtcatgccccgcgcccaccggaaggagctgactgggttgaaggctctcaagggcatcggtcgacgctctcccttatgcgactcctg
cattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccg
gccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatat
aggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaa

8.4.3. pTSA43



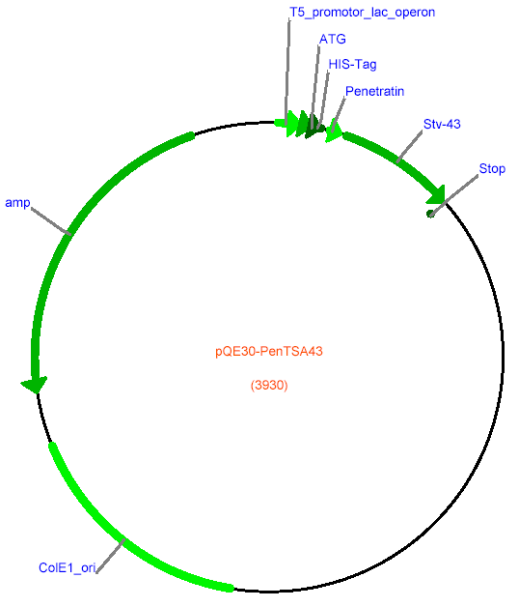
t<+T7Promotor>taatacgactcactatag</T7Promotor>ggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaactttaa<+
RBS>gaaggag</RBS>atata<NdeI>cat<+Stv43><+ATG>atg</ATG></NdeI>ggcatcaccggcacctggtacaaccagctcggc
tcgaccttcatcgtgaccgcgggcgccgacggcgccctgaccggaacctacgagtcggccgtcggcaacgccgagagccgctacgtcctgaccg
gtcgttacgacagcgccccggccaccgacggcagcggcaccgccctcggttggacggtggcctggaagaataactaccgcaacgcccactccgc
gaccacgtggagcggccagtacgtcggcggcgccgaggcgaggatcaacacccagtggccgctgacttcgaagtccacgctggtcggcgacgac
accttcaccaaggtg<+Stop>tag</Stop></Stv43>ccgtccgccgcctccatcgacgcggcgaagaaggtccatcgacgcggcgaagaa
ggcccatatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgc<BamH1>ggatcc</BamH1>ggctgctaacaaagcccgaaaggaagctga
gttggctgctgcca<+T7Terminator>ccgctgagcaataactagcataaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctg
aaagga</T7Terminator>ggaactatatccggatatccacaggacgggtgtggtcgccatgatcgcgtagtcgatagtggctccaagtagc
gaagcgagcaggactgggcggcggccaaagcggtcggacagtgctccgagaacgggtgcgcatagaaattgcatcaacgcatatagcgctagca
gcacgccatagtgactggcgatgctgtcggaatggacgatatcccgcaagaggcccggcagtaccggcataaccaagcctatgcctacagcatc
cagggtgacggtgccgaggatgacgatgagcgcattgttagatttcatacacggtgcctgactgcgttagcaatttaactgtgataaactaccg
cattaaagcttatcgatgataagctgtcaaacatgagaattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatg
ataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgt
atccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagt<+amp>atgagtattcaacatttccgtgtcgccct
tattccctttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacga
gtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttc
tgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactc
accagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaactta
cttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagc
tgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttac
tctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttatt
gctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctaca
cgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagt
</amp>ttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacc
aaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccc<pBR322_ori>gtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttt
ttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaa
ggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcct
acatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccgg
ataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtga
gctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagctt
ccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcgga
gcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctca</pBR322_ori>catgttctttcctg
cgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagt
gagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatatggtgcactctcagtacaa
tctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgct
gacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgt
catcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctc
gttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataaagcgggccatgttaagggcggttttttcctgtttggtcactgatgcctccgtg
taaggggatttctgttcatgggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaacatgcccggttac
tggaacgttgtgagggtaaacaactggcggtatggatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgcttcgttaatacaga
tgtaggtgttccacagggtagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaacataatggtgcagggcgctgacttccgcgtttccagactttac
gaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgttgctcaggtcgcagacgttttgcagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgtatcggtgatt
cattctgctaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcacgatcatgcgcacccgtggccaggacccaacgct
gcccgagatgcgccgcgtgcggctgctggagatggcggacgcgatggatatgttctgccaagggttggtttgcgcattcacagttctccgcaag
aattgattggctccaattcttggagtggtgaatccgttagcgaggtgccgccggcttccattcaggtcgagggtggcccggctccatgcaccgcg
acgcaacgcggggaggcagacaaggtatagggcggcgcctacaatccatgccaacccgttccatgtgctcgccgaggcggcataaatcgccgtg
acgatcagcggtccagtgatcgaagttaggctggtaagagccgcgagcgatccttgaagctgtccctgatggtcgtcatctacctgcctggaca
gcatggcctgcaacgcgggcatcccgatgccgccggaagcgagaagaatcataatggggaaggccatccagcctcgcgtcgcgaacgccagcaa
gacgtagcccagcgcgtcggccgccatgccggcgataatggcctgcttctcgccgaaacgtttggtggcgggaccagtgacgaaggcttgagcg
agggcgtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgcgctccagcgaaagcggtcctcgccgaaaatgacccagagcgctg
ccggcacctgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataagtgcggcgacgatagtcatgccccgcgcccaccggaaggagctgactgg
gttgaaggctctcaagggcatcggtcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcacc
gccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctca
tgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccac
gatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaa

8.4.4. pQE30-TSA43



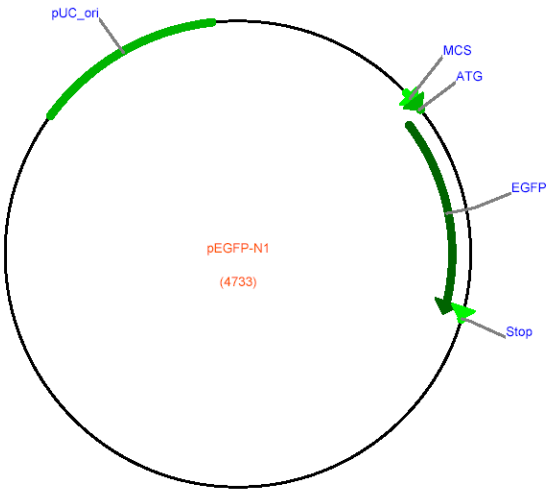
ctcgag<+T5_promotor_lac_operon>aaatcataaaaaatttatttgctttgtgagcggataacaattataatagattcaattgtgagc
ggataacaatttcacaca</T5_promotor_lac_operon>gaattcattaaagaggagaaattaact<+ATG>atg</ATG>agaggatcg
<+HISTag>catcaccatcaccatcac</HISTag>ggatcc<+Stv43>atgggcatcaccggcacctggtacaaccagctcggctcgacctt
catcgtgaccgcgggcgccgacggcgccctgaccggaacctacgagtcggccgtcggcaacgccgagagccgctacgtcctgaccggtcgttac
gacagcgccccggccaccgacggcagcggcaccgccctcggttggacggtggcctggaagaataactaccgcaacgcccactccgcgaccacgt
ggagcggccagtacgtcggcggcgccgaggcgaggatcaacacccagtggccgctgacttcgaagtccacgctggtcggcgacgacaccttcac
caaggtg<+Stop>tag</Stop></Stv43>ccgtccgccgcctccatcgacgcggcgaagaaggtccatcgacgcggcgaagaaggcccata
tggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgcggtaccccgggtcgacctgcagccaagcttaattagctgagcttggactcctgttgata
gatccagtaatgacctcagaactccatctggatttgttcagaacgctcggttgccgccgggcgttttttattggtgagaatccaagctagcttg
gcgagattttcaggagctaaggaagctaaaatggagaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatatcccaatggcatcgtaaagaacatt
ttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaaagaccgtaaagaaaaataagca
caagttttatccggcctttattcacattcttgcccgcctgatgaatgctcatccggaatttcgtatggcaatgaaagacggtgagctggtgata
tgggatagtgttcacccttgttacaccgttttccatgagcaaactgaaacgttttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagt
ttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgtttttcgtctcagc
caatccctgggtgagtttcaccagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttcttcgcccccgttttcaccatgggcaaatattatacg
caaggcgacaaggtgctgatgccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgcttaatgaattacaac
agtactgcgatgagtggcagggcggggcgtaatttttttaaggcagttattggtgcccttaaacgcctggggtaatgactctctagcttgaggc
atcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgcc
ctctagagctgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatg
ccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagtgta
tactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataacc
gcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaat
acggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatg<ColE1_ori>tgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaagg
ccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggact
ataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctccct
tcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccc
ccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactgg
taacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggt
atctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttg
tttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctac</ColE1_ori>ggggtctgacgctcagtg
gaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatca
atctaaagtatatatgagtaa<amp>acttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttc
atccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccca
cgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagt
ctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacg
ctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctcc
ttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccat
ccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaat
acgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctg
ttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaa
ggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttc</amp>aatattattgaagcattta
tcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgcca
cctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcac

8.4.5. pQE30-PenTSA43



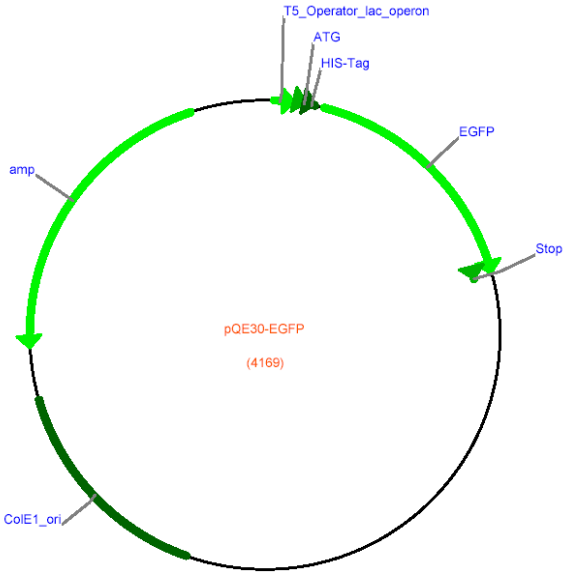
ctcgag<+T5_promotor_lac_operon>aaatcataaaaaatttatttgctttgtgagcggataacaattataatagattcaattgtgagc
ggataacaatttcacaca</T5_promotor_lac_operon>gaattcattaaagaggagaaattaact<+ATG>atg</ATG>agaggatcg
<+HISTag>catcaccatcaccatcac</HISTag>ggatcc<+Penetratin>cgtcagatcaaaatctggttccagaaccgtcgtatgaaa
tggaaaaaa</Penetratin><+Stv43>atgggcatcaccggcacctggtacaaccagctcggctcgaccttcatcgtgaccgcgggcgccg
acggcgccctgaccggaacctacgagtcggccgtcggcaacgccgagagccgctacgtcctgaccggtcgttacgacagcgcccggccaccga
cggcagcggcaccgccctcggttggacggtggcctggaagaataactaccgcaacgcccactccgcgaccacgtggagcggccagtacgtcggc
ggcgccgaggcgaggatcaacacccagtggccgctgacttcgaagtccacgctggtcggcgacgacaccttcaccaaggtg<Stop>tag</St
op></Stv43>ccgtccgccgcctccatcgacgcggcgaagaaggtccatcgacgcggcgaagaaggcccatatggctagcatgactggtggac
agcaaatgggtcgcggtaccccgggtcgacctgcagccaagcttaattagctgagcttggactcctgttgatagatccagtaatgacctcagaa
ctccatctggatttgttcagaacgctcggttgccgccgggcgttttttattggtgagaatccaagctagcttggcgagattttcaggagctaag
gaagctaaaatggagaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttg
ctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggccttttat
tcacattcttgcccgcctgatgaatgctcatccggaatttcgtatggcaatgaaagacggtgagctggtgatatgggatagtgttcacccttgt
tacaccgttttccatgagcaaactgaaacgttttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaag
atgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgtttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcac
cagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttcttcgcccccgttttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctgatg
ccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgcttaatgaattacaacagtactgcgatgagtggcagg
gcgggggcgtaatttttttaaggcagttattggtgcccttaaacgcctggggtaatgactctctagcttgaggcatcaaataaaacgaaaggctc
agtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccctctagagctgcctcgcgcgt
ttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtc
agggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggca
tcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgctt
cctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcagg
ggataacgcaggaaagaacatg<ColE1_ori>tgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttcc
ataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcc
ccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttct
catagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcg
ccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgag
gtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagcca
gttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgc
gcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctac</ColE1_ori>ggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagg
gattttggtcatgagattatcaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaa
<amp>acttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccc
cgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagattta
tcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaag
ctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttc
attcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtc
agaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtga
ctggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccaca
tagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaa
cccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagg
gaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttc</amp>aatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgag
cggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccatt
attatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcac

8.4.6. pEGFP-N1



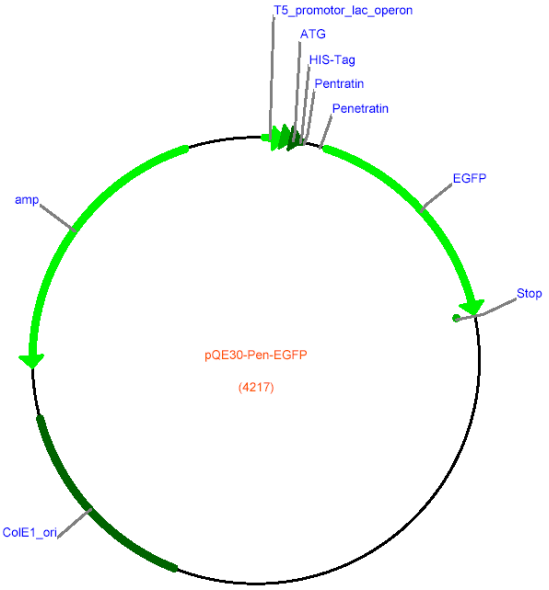
tagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggc
tgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtgg
agtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgc
ctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttt
tggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcacc
aaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcag
agctggtttagtgaaccgtcagatcc<+MCS>gctagcgctaccggactcagatctcgagctcaagcttcgaattctgcagtcgacggtaccgc
gggcccgggatcc</MCS>accggtcgccacc<+ATG><+EGFP>atg</ATG>gtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgccca
tcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaa
gttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgac
cacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaaga
cccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggca
caagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaac
atcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctga
gcacccagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcat
ggacgagctgtacaag<+Stop>taa</Stop></EGFP>agcggccgcgactctagatcataatcagccataccacatttgtagaggttttac
ttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttattgcagcttataatgg
ttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatct
taaggcgtaaattgtaagcgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcatttttttaaccaataggccgaaatcggc
aaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtgttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacgtggactcca
acgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcaccctaatcaagtttttttggggtcgaggtgccgtaaagc
actaaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaagga
gcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgtcaggtg
gcactttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgata
aatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtcctgaggcggaaagaaccagctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtccccaggct
ccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccaggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgca
aagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcccgcccctaactccgcccatcccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgccc
catggctgactaatttttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttttggaggcc
taggcttttgcaaagatcgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttggg
tggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttct
ttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgca
gctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctg
ccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcat
cgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgcc
aggctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgctttt
ctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcga
atgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgagcg
ggactctggggttcgaaatgaccgaccaagcgacgcccaacctgccatcacgagatttcgattccaccgccgccttctatgaaaggttgggctt
cggaatcgttttccgggacgccggctggatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcgcccaccctagggggaggctaactgaa
acacggaaggagacaataccggaaggaacccgcgctatgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacggtgttgggtcgtttgttcataaac
gcggggttcggtcccagggctggcactctgtcgataccccaccgagaccccattggggccaatacgcccgcgtttcttccttttccccacccca
ccccccaagttcgggtgaaggcccagggctcgcagccaacgtcggggcggcaggccctgccatagcctcaggttactcatatatactttagatt
gatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttcc
actgagcgtcagaccccc<pUC_ori>gtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaa
aaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacca
aatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccag
tggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggg
ttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggg
agaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtc
ctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctt
tttacggttcctggccttttgctggccttttgctca</pUC_ori>catgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattac
cgccatgcat

8.4.7. pQE30-EGFP



ctcgag<+T5_Operator_lac_operon>aaatcataaaaaatttatttgctttgtgagcggataacaattataatagattcaattgtgagc
ggataacaatttcacaca</T5_Operator_lac_operon>gaattcattaaagaggagaaattaact<+ATG>atg</ATG>agaggatcg
<+HISTag>catcaccatcaccatcac</HISTag>ggatcc<+EGFP>atggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatc
ctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagt
tcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgacca
catgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacc
cgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcaca
agctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacat
cgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagc
acccagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatgg
acgagctgtacaag<+Stop>taa</Stop></EGFP>ggtaccccgggtcgacctgcagccaagcttaattagctgagcttggactcctgttg
atagatccagtaatgacctcagaactccatctggatttgttcagaacgctcggttgccgccgggcgttttttattggtgagaatccaagctagc
ttggcgagattttcaggagctaaggaagctaaaatggagaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatatcccaatggcatcgtaaagaac
attttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaaagaccgtaaagaaaaataa
gcacaagttttatccggccttattcacattcttgcccgcctgatgaatgctcatccggaatttcgtatggcaatgaaagacggtgagctggtg
atatgggatagtgttcacccttgttacaccgttttccatgagcaaactgaaacgttttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggc
agtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgtttttcgtctc
agccaatccctgggtgagtttcaccagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttcttcgcccccgttttcaccatgggcaaatattat
acgcaaggcgacaaggtgctgatgccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgcttaatgaattac
aacagtactgcgatgagtggcagggcggggcgtaatttttttaaggcagttattggtgcccttaaacgcctggggtaatgactctctagcttga
ggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatcc
gccctctagagctgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcgg
atgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagt
gtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaat
accgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggt
aatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatg<ColE1_ori>tgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaa
aggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacagg
actataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctc
ccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaac
cccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccac
tggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtattt
ggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttt
ttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctac</ColE1_ori>ggggtctgacgctca
gtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaa
tcaatctaaagtatatatgagtaa<amp>acttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcg
ttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagac
ccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatcc
agtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtc
acgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagc
tccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgc
catccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtc
aatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccg
ctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacag
gaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttc</amp>aatattattgaagcat
ttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtg
ccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcac

8.4.8. pQE30-PenEGFP



ctcgag<+T5_promotor_lac_operon>aaatcataaaaaatttatttgctttgtgagcggataacaattataatagattcaattgtgagc
ggataacaatttcacaca</T5_promotor_lac_operon>gaattcattaaagaggagaaattaact<+ATG>atg</ATG>agaggatcg
<+HISTag>catcaccatcaccatcac</HISTag>ggatcc<+Pentratin>cgtcagatcaaaatctggttccagaaccgtcgtatgaaat
ggaaaaaa</Penetratin><+EGFP>atggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgac
gtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagc
tgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttctt
caagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgag
ggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaaca
gccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagct
cgccgaccactaccagcagaacaccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagcaaa
gaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaag<Stop>t
aa</Stop></EGFP>ggtaccccgggtcgacctgcagccaagcttaattagctgagcttggactcctgttgatagatccagtaatgacctcag
aactccatctggatttgttcagaacgctcggttgccgccgggcgtttttttattggtgagaatccaagctagcttggcgagattttcaggagcta
aggaagctaaaatggagaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagt
tgctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggccttt
attcacattcttgcccgcctgatgaatgctcatccggaatttcgtatggcaatgaaagacggtgagctggtgatatgggatagtgttcaccctt
gttacaccgttttccatgagcaaactgaaacgttttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgca
agatgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgtttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttc
accagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttcttcgcccccgttttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctga
tgccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgcttaatgaattacaacagtactgcgatgagtggca
gggcggggcgtaatttttttaaggcagttattggtgcccttaaacgcctggggtaatgactctctagcttgaggcatcaaataaaacgaaaggc
tcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccctctagagctgcctcgcgc
gtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccg
tcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcgg
catcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgc
ttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatca
ggggataacgcaggaaagaacatg<ColE1_ori>tgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgcgttgctggcgttttt
ccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgttt
ccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgcttt
ctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctg
cgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcg
aggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagc
cagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattac
gcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctac</ColE1_ori>ggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaa
gggattttggtcatgagattatcaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagt
aa<amp>acttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactc
cccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatt
tatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccggga
agctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggct
tcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttg
tcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgt
gactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgcca
catagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgt
aacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaa
gggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttc</amp>aatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatg
agcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaacca
ttattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcac

8.5. Sequenzen der Expressionsprodukte

EGFP (251 Aminosäuren; 28340 Da):

MRGSHHHHHHGSMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTY
GVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN
SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTA
AGITLGMDELYK

PenEGFP (267 Aminosäuren; 30568 Da):

MRGSHHHHHHGSRQIKIWFQNRRMKWKKMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICT
TGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGID
FKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKD
PNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

Stv43 (123 Aminosäuren; 13119 Da):

MRGSHHHHHHGSMGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAW
KNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWPLTSKSTLVGDDTFTKV

PenStv43 (139 Aminosäuren; 15348 Da):

MRGSHHHHHHGSRQIKIWFQNRRMKWKKMGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAP
ATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWPLTSKSTLVGDDTFTKV

Farbcodierung: His-tag Sequenz Penetratin Sequenz EGFP Sequenz Stv43 Sequenz

9. Zusammenfassung / Summary

9.1. Zusammenfassung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine universelle Methode zur beidseitig asymetrischen Derivatisierung von therapeutisch wirksamen Oligonukleotiden (vornehmlich Antisense-Oligonukleotid-Thiophosphaten) mit Polyethylenglykolen verschiedener Länge zu entwickeln. Die Bindung sollte dabei möglichst stabil sowie biokompatibel sein, weshalb das Hauptaugenmerk auf die Ausbildung von Amidbindungen durch N-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester gelegt wurde.
Die naheliegendste Methode zur beidseitig asymmetrischen Derivatisierung, durch einen temporären Schutz des 5´-Terminus eines beidseitig aminomodifizierten Oligonukleotid-Thiophosphats und der Umsetzung des freien 3´-Endes mittels PEG-NHS, erwies sich leider, aufgrund der Instabilität der MMT-Schutzgruppe, als nicht zufriedenstellend.
Aus diesem Grunde wurde eine immobilisierte Strategie entwickelt, bei der das Oligonukleotid zunächst auf einem aminofunktionalisierten Träger belassen wird. Die Umsetzung des ebenfalls aminofunktionalisierten 5´-Endes erfolgt mittels eines PEG-NHS Esters, während das Oligonukleotid mit dem 3´-Ende noch auf dem Träger verankert ist. Nach der Abspaltung vom Träger und der Abtrennung der unumgesetzten Sequenzen erfolgt die Derivatisierung des nun freien 3´-Endes mit einem anderen PEG-NHS Ester in Lösung.
Diese Methode gerät ebenfalls an ihre Grenzen, wenn eine asymmetrische Derivatisierung mit einem langkettigen, polydispersen und einem kurzkettigen, monodispersen Polyethylenglykol erfolgen soll. In diesem Falle muß die erste, trägergebundene Umsetzung mit dem monodispersen PEG erfolgen, da ansonsten, aufgrund der sich überschneidenden Molekülmassen, keine saubere Abtrennung der nur einseitig derivatisierten Nebenprodukte möglich ist. Das dadurch zunächst strikt vorgegebene Muster der PEGylierung in Form des monodispersen PEG am freien 5´-Ende des trägergebundenen Oligonukleotids konnte allerdings durch die Verwendung von 5´-Phosphorigsäureesteramiden umgangen werden.
Die auf diesem Wege mit Polyethylenglykolen unterschiedlicher Länge derivatisierten Oligonukleotid-Thiophosphate wurden daraufhin mittels verschiedener Methoden auf eine erhöhte Stabilität gegenüber Exo- sowie auch gegenüber Endonukleasen untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine alleinige Betrachtung mittels RP-HPLC nicht ausreicht, da auf diese Weise die verkürzten Sequenzen eines Oligonukleotids ohne PEG-Derivatisierung nicht erkannt werden können. Als gute Methoden zur Untersuchung des Abbauverhaltens erwiesen sich eine Kopplung aus RP-HPLC und MALDI-TOF MS sowie die Verwendung eines Polyacrylamid-Gels. Diese Methoden ergaben, dass alle PEGylierungsmuster zu einer stark erhöhten Stabilität sowohl gegenüber 5´-Exonukleasen als auch gegenüber 3´-Exonukleasen führen. Eine leichte Erhöhung der Stabilität gegenüber Endonukleasen ist jedoch nur bei Verwendung von längerkettigen Polyethylenglykolen zu erkennen.
Nach der Kopplung eines PEG-derivatisierten Oligonukleotids mit dem Internalisierungs-peptid Penetratin stellte sich die Aufreinigung des Konjugats als besonders problematisch dar. Da das Konjugat aus einem argininreichen, stark polykationischen Peptidcarrier und einem polyanionischen Oligonukleotidteil besteht, neigt es, besonders bei hohen Überschüssen des polykationischen Peptids, stark zur Prezipitation. Erst durch die Anwendung von Ionenaustauschchromatographie im Zusammenspiel mit einem stark formamidhaltigen Puffersystem konnte eine zufriedenstellende Produktreinheit erreicht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde durch Expression in E. coli ein rekombinantes Fusionsprotein aus dimerem Streptavidin und Zell-internalisierendem Penetratin hergestellt. Weiterführend könnten auf diese Weise biotinylierte Oligonukleotide über das dimere Streptavidin an den Carrier gekoppelt werden, wodurch die Möglichkeit geschaffen würde,

den gesamten Komplex durch die internalisierende Wirkung des Penetratins in eine Zelle einzuschleusen.
Dazu wurde ein Expressionsvektor konstruiert, welcher die Penetratin-codierende Basensequenz zusammen mit dem Gen eines dimeren Streptavidins (TSA43) enthält.
Die codierende Nukleinsäure-Sequenz des dimeren Streptavidins wurde durch PCR aus dem von Prof. Dr. Takeshi Sano (Boston University) zur Verfügung gestellten Plasmid pTSA43 gewonnen. Die 48 Nukleotide lange Penetratin-codierende Sequenz wurde synthetisch in einen der beiden PCR-Primer eingebaut, welche auch die kompatiblen Schnittstellen für die Klonierung in den pQE-30 Zielvektor enthielten.
Dabei erwies sich eine leichte Toxizität des Penetratins als großes Problem bei der Klonierung mittels des zunächst verwendeten E. coli Stammes DH5α. Dieser Stamm trägt keine $lacI^q$-Mutation, wodurch es, aufgrund fehlender Produktion des lac-Repressors, auch ohne externe Induktion zu einer schwachen Expression des im Vektor codierten Proteins kommt. Dies führte beim leicht toxischen Penetratin zu einer Selektion von Mutanten ohne funktionelles Protein. Erst durch die Verwendung des E. coli Stammes JM109 mit $lacI^q$-Mutation gelang es, ein fehlerfreies Konstrukt zu exprimieren, welches in der Lage war Biotin zu binden.

9.2. Summary

The first aim of this project was to develop a universal method for the double sided asymmetrical modification of therapeutical oligonucleotides (particularly antisense oligonucleotide phosphorothioates) with polyethylene glycols (PEG) of different length. The binding should be as stable as possible, as well as biocompatible. Therefore, main attention was paid to the formation of amide bonds using N-hydroxysuccinimide (NHS) esters.
When starting the project, a temporary MMT-protection of the 5´-end of a double sided amino modified oligonucleotide appeared to be the most promising method.
Unfortunately, this method turned out to be not satisfactory, because of the instability of the MMT group. For this reason an immobilising strategy was developed with the oligonucleotide initially attached to an amino functionalised support. The reaction of the likewise amino functionalised free 5´-end with PEG-NHS was carried out while the 3´-end was still anchored to the support. After the cleavage from the support and the separation of unreacted sequences by RP-HPLC, the reaction of the free 3´-end with another PEG-NHS was carried out in solution.
This method also reaches its limits, when the double sided asymmetrical modification was to be carried out with a long chain, polydisperse polyethylene glycol and a short chain, monodisperse polyethylene glycol. In this case, the first reaction with the immobilised oligonucleotide must be carried out with the monodisperse PEG. Otherwise the separation from unreacted by-products is impossible because of the overlapping molecular masses. The thus strictly given pattern of modification, with the monodisperse PEG at the 5´-end of the immobilised oligonucleotide could, however, be circumvented by using 5´-phosphoramidites.
The oligonucleotide phosphorothioates, substituted in this way with polyethylene glycols of different length, were then tested for increased stability towards exo- and endonucleases by different methods. These investigations showed that mere examination by RP-HPLC is not sufficient, because the truncated sequences without PEG modification cannot be detected. A coupling of RP-HPLC and MALDI-TOF MS, as well as the application of a polyacryamide gel, turned out to be good methods for monitoring nucleolytic degradation. All these tests proved that every PEGylation pattern leads to a strongly improved stability against 5´-exonucleases, as well as against 3´-exonucleases. However, a slight rise in stability against endonucleases can only be recognised by the use of long chain polyethylenglycols.

In case of the coupling of a PEG modified oligonucleotide with the cell penetrating peptide penetratin, the isolation of the conjugate turned out to be the main problem. Because the conjugate itself consists of an arginin-rich, strongly polycationic peptide carrier and a polyanionic oligonucleotide, it has a tendency to precipitate, in particular when a large excess of the polycationic peptide is used. Satisfying product purity could only be accomplished by using ion exchange chromatography, in combination with a buffer system containing high amounts of formamide.

In the second part of the thesis, a recombinant fusion protein of dimeric streptavidin and cell internalising penetratin was produced by expression in E. coli. In future research this construct may be used to couple a biotinylated oligonucleotide non-covalently to the streptavidin part of the carrier. This would provide an opportunity to introduce the whole complex into cells by the internalising effect of the penetratin part.
For that purpose an expression vector containing the penetratin encoding base sequence in combination with a dimeric streptavidin gene (TSA43) was constructed. The encoding sequence for the dimeric streptavidin was PCR amplified using the plasmid pTSA43 as template, which was provided by Prof. Dr. Takeshi Sano (Boston University). The 48 nucleotides penetratin encoding sequence was inserted by synthesis into one of the PCR primers which also contained compatible restriction enzyme recognition sites for cloning into the pQE-30 target vector.
A slight toxicity of penetratin turned out to be a big problem, when using the E. coli strain DH5α for cloning. This strain does not contain a chromosomal $lacI^q$ mutation. For that reason no lac repressor is produced, which causes a low-efficiency expression of the vector-encoded protein even without external induction. The toxicity of the penetratin, co-expressed with low efficiency, resulted in a selection of mutants without functional protein. Only by use of the E. coli strain JM109 with $lacI^q$ mutation, it was possible to express an error free construct that showed biotin binding properties.

10. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.