

Oligosaccharid-gerichtete RNA-Aptamere

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat-
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der
Universität Bayreuth

vorgelegt von

Mária Milovníková

aus Želovce, Slowakei

Bayreuth, 2005

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2000 bis Juli 2004 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Sprinzl angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 28.11.2005
Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 02.05. 2006

Erster Gutachter: Prof. Dr. M. Sprinzl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. C. Unverzagt

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Oligosaccharide	1
1.2 RNA als Regulator und Katalysator	3
1.3 Die <i>in vitro</i> Selektion von Nucleinsäuren	4
1.4 Zielsetzung der Arbeit	8
2 Materialien und Methoden	9
2.1 Materialien	9
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Proteine	9
2.1.1.1 Chemikalien	9
2.1.1.2 Enzyme und Proteine	9
2.1.1.3 Radiochemikalien	10
2.1.2 Chromatographie-Materialien	10
2.1.3 Desoxyoligonucleotide	10
2.1.4 Sonstiges	10
2.1.5 Bakterienstämme, Nährmedien und Lösungen	11
2.1.5.1 Bakterienstämme	11
2.1.5.2 Nährmedien	11
2.1.5.3 Puffer und Lösungen	11
2.2 Methoden	14
2.2.1 Chemische Synthese	14
2.2.2 Absorptionsmessung und Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration	36
2.2.3 Radioaktivitätsmessung	36
2.2.4 Spektroskopische Methoden	36
2.2.4.1 Elektrospraymassenspektrometrie	36
2.2.4.2 NMR	37
2.2.4.3 Drehwertmessung	38
2.2.5 Chromatographische Verfahren	38
2.2.5.1 Dünnschichtchromatographie	38
2.2.5.2 Flashchromatographie	38
2.2.5.3 Gelpermeationschromatographie	38
2.2.6 Gelelektrophoretische Verfahren	39
2.2.6.1 Agarosegelelektrophorese	39
2.2.6.2 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
2.2.6.3 Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen	40
2.2.7 Detektion und Elution von RNA aus Polyacrylamidgelen	40
2.2.8 Phenolextraktion und Ethanol-fällung von RNA und DNA	40
2.2.9 Isolierung und Reinigung von DNA	41
2.2.9.1 Plasmidisolierung	41
2.2.9.2 Elution von DNA aus Agarose-Gelen	41
2.2.10 Enzymatische Behandlung von DNA	41
2.2.10.1 Hydrolyse mit Restriktionsendonucleasen	41
2.2.10.2 Ligation	42
2.2.11 Polymerasekettenreaktion	42
2.2.12 Transformation von <i>E. coli</i>	42
2.2.12.1 Herstellung kompetenter Zellen	42
2.2.12.2 Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α Zellen durch Hitzeschock	43
2.2.13 Präparation der RNA	43

2.2.13.1	In vitro Transkription mit T7-RNA-Polymerase.....	43
2.2.14	Modifikation der RNA	44
2.2.14.1	Dephosphorylierung der RNA am 5'-Ende.....	44
2.2.14.2	Markierung der RNA und synthetisierter einzelsträngiger DNA am 5'- Ende	44
2.2.15	Untersuchung der RNA-Struktur mittels Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen.....	45
2.2.16	Sepharose Aktivierung	45
2.2.16.1	Bestimmung des Extinktionskoeffizientes von Dipyridyldisulphid bei 343 nm	45
2.2.16.2	Aktivierung der Sepharose 6B mit Oligosacchariden, dem Spacer und Iodoacetamid	45
2.2.17	Aktivierung der Glasperlen	46
2.2.17.1	Silanisierung der Glasperlen und Nachweis von freien SH-Gruppen.....	46
2.2.17.2	Modifizierung von Glasperlen mit Oligosacchariden und Iodoacetamid	47
2.2.18	<i>In vitro</i> Selektion von RNA-Aptameren	47
2.2.18.1	Gewinnung der DNA-Ausgangsbibliothek	47
2.2.18.2	Polymerasekettenreaktion	47
2.2.18.3	<i>In vitro</i> Transkription	48
2.2.18.4	Präselektion	48
2.2.18.5	Selektion.....	49
2.2.18.6	Reverse Transkription und Amplifikation.....	50
2.2.18.7	Klonierung und Sequenzierung der DNA	51
2.2.19	RNA-Sekundärstruktur Berechnung	51
2.2.20	Bindung der RNA-Aptamere an verschiedene Säulenmaterialien unter Selektionsbedingungen.....	51
2.2.21	Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Bindung von RNA-Aptameren an die nichtmodifizierte Sepharose 6B	52
2.2.22	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie	53
2.2.22.1	Aktivierung der Chip-Oberfläche.....	53
2.2.22.2	Untersuchung der Wechselwirkung der RNA-Aptamere mit Oligosacchariden mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.	53
2.2.23	Aufnahme der UV-Schmelzkurven	56
2.2.23.1	Einfluss der NaCl-Konzentration auf das Schmelzverhalten der RNA- Aptameren. 56	
2.2.23.2	Einfluss des Trisaccharides β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-OCH ₃ auf das Schmelzverhalten von RNA-Aptameren.	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Chemische Synthese.....	57
3.2	<i>In vitro</i> Selektion von RNA-Aptameren gegen das Trisaccharid β -Gal-1,4- β - GlcNAc-1,2-Man.....	62
3.2.1	Aktivierung der Festphase.....	62
3.2.2	<i>In vitro</i> Selektion 1 an Thiopropyl-Sepharose 6B.....	65
3.2.3	Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere	66
3.2.3.1	Sequenzen der an das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man bindenden RNA-Aptamere	66
3.2.3.2	Sekundärstrukturen der an das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man bindenden RNA-Aptamere.....	67
3.2.3.3	Untersuchung der RNA-Struktur mittels Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen.....	68
3.2.3.4	UV- Schmelzkurven der selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G	70

3.2.4	Bestimmung der Bindungsparameter der RNA-Trisaccharid Wechselwirkung mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.....	74
3.2.5	Untersuchung der Bindung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G an verschiedene Säulenmaterialien.....	82
3.2.6	Untersuchung der Wechselwirkung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G mit dem Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man an der Glasoberfläche.....	85
3.3	<i>In vitro</i> Selektion von RNA-Aptameren gegen das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR, Tetrasaccharid α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR, Pentasaccharid 2,4-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc) ₂ - α -Man-OR und Heptasaccharid 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc) ₂ - α -Man-OR.....	88
3.3.1	<i>In vitro</i> Selektion 2/1 an Thiopropyl-Sepharose 6B.....	88
3.3.1.1	Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere gegen das Heptasaccharid 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc) ₂ - α -Man-OR aus der Selektion 2/1.....	90
3.3.2	<i>In vitro</i> Selektion 2/2 alternierend an Thiopropyl-Sepharose 6B und silanisierten Glasperlen.....	91
3.3.2.1	Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere gegen das Heptasaccharid 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc) ₂ - α -Man-OR aus der Selektion 2/2.....	93
3.3.3	<i>In vitro</i> Selektion 3/1 an silanisierten Glasperlen.....	94
3.3.3.1	Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere aus der Selektion 3/1 ..	95
3.3.3.1.1	Sequenzen der selektierten RNA-Aptamere ..	95
3.3.3.1.2	Qualitativer Nachweis der Wechselwirkung der selektierten RNA-Aptameren mit dem Heptasaccharid 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc) ₂ - α -Man-OR mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.....	97
3.3.3.1.3	Untersuchung der Bindung der selektierten RNA-Aptamere an nichtmodifizierte Sepharose 6B ..	98
3.3.4	<i>In vitro</i> Selektion 3/2 alternierend an silanisierten Glasperlen und Thiopropyl-Sepharose 6B.....	99
3.3.4.1	Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere aus der Selektion 3/2	100
4	Diskussion	101
4.1	<i>In vitro</i> Selektion von RNA-Aptameren gegen das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man.....	101
4.1.1	Selektion 1 an Thiopropyl-Sepharose 6B.....	102
4.2	<i>In vitro</i> Selektion von RNA-Aptameren gegen Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR, Tetrasaccharid α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR, Pentasaccharid 2,4-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc) ₂ - α -Man-OR und Heptasaccharid 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc) ₂ - α -Man-OR.....	104
4.2.1	Selektion 2/1 an Thiopropyl-Sepharose 6B	105
4.2.2	Selektion 2/2 alternierend an Thiopropyl-Sepharose 6B und silanisierten Glasperlen.....	106
4.2.3	Selektion 3/1 an silanisierten Glasperlen.....	107
4.2.4	Selektion 3/2 alternierend an silanisierten Glasperlen und Thiopropyl-Sepharose 6B.....	109
4.3	Abschließender Überblick über die Selektionen.....	109
4.4	Schlussfolgerung aus den Ergebnissen dieser Arbeit für weitere aufbauende Selektionen.....	113
5	Zusammenfassung.....	115
6	Summary	116
7	Literatur	117

8 Anhang	127
Danksagung.....	132
Erklärung.....	134

Abkürzungen

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
[α]	spezifischer Drehwert
Å	Angström (10 ⁻¹⁰ m)
A _x	Absorption bei x nm
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Acetanhydrid
Amp ^r	Resistenz gegen Ampicilin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	<i>base paire</i> (Basenpaar)
ber	berechnet
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Bu	<i>n</i> -Butyl
Bzl	Benzyl
CD ₃ CN	
Ci	Curie
CM	Carboxymethyl
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	Dublett
D	Natrium-Licht mit einer Wellenlänge von 589 nm
D ₂ O	Deuteriumoxid
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin
DBU	1,8-Diazabicyclo-[5,4,0]-undec-7-en

DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Doppeldublett
dCTP	2'-Desoxycytosin
dGTP	2'-Desoxyguanosin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Gemisch aus 2'-Desoxyribonuklotiden dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DPDS	Dipyridyldisulphid
dTTP	2'-Desoxythymidin
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl-carbodiimid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPA	Elutionspuffer A
EPB	Elutionspuffer B
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry</i>
EtOH	Ethanol
Gal	D-Galactopyranose
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
gef	gefunden
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
gem	geminal
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H ₃ BO ₃	
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-ethanesulfonsäure
HMQC-COSY	heteronuclear multiple quantum coherence correlated spectroscopy
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAA	Iodacetamid

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	scalare Kopplung
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
k _{off}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
k _{on}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
LB	Luria-Bertani
LeX	Lewix X
m	multipllett
M	molar
Man	D-Mannose
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
Mops	3-[N-morpholino]propanesulfonic acid
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>Molecular Weight</i> (Molekulargewicht)
MPTS	(3-Mercaptopropyl)-trimethoxysilan
mU	<i>miliunits</i>
NAc	Acetamido
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
NHS	N-hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
NPht	Phthalimido
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PNK	Polynukleotid Kinase
py	pyridyl

R _f	Retentionsfactor
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>Revolution Per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
r.t.	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RU	Response Units
s	Singulett
S	Swedberg-Einheit
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SPA	Selektionspuffer A
SPB	Selektionspuffer B
SPC	Selektionspuffer C
SPD	Selektionspuffer D
SPDP	Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionat
ssRNA	<i>single stranded Ribonucleic acid</i>
t	Triplett
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-ethandiamin
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
tRNA	<i>transfer RNA</i>
U	unit
UV	<i>Ultra Violet</i>
UTP	Uridin-5'-triphosphat
vic	vicinal

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
δ	chemische Verschiebung

1 Einleitung

1.1 Oligosaccharide

Kohlenhydrate sind in der Natur überall zu finden. Sie bilden das Gerüst der Zellen und sind Bestandteile des Stoffwechsels. Zusätzlich dazu spielen die Kohlenhydrate eine wichtige Rolle bei Protein-Modifikationen. Mehr als 50 % von allen bekannten eukaryotischen Proteinen sind nach den Angaben der Protein Datenbank „SWISS-PROT“ glykosyliert (<http://www.expasy.org/sprot/>). Die Verknüpfung des Kohlenhydratanteiles bei Glykoproteinen erfolgt dabei hauptsächlich durch eine O- oder N-glykosidische Bindung. O-Glykane sind an die Aminosäureseitenkette durch Serin oder Threonin gebunden. Die Erkennungssequenz für N-Glykane ist Asn-X-Ser/Thr, wobei X jede Aminosäure bis auf Prolin sein kann. Die N-Glykane sind in diesem Fall durch Asparagin gebunden. An dieser Stelle dienen die Kohlenhydrate als Vermittler unterschiedlicher intra- und interzellulärer Prozesse (1) wie z. B. Zell-Zell-Adhäsion, Faltung und Stabilisierung (2) von Glykoproteinen und zu ihrem Schutz vor proteolytischen Enzymen (3).

Die Oligosaccharid-Modifikationen von Proteinen entstehen in komplizierten post- und/oder co-translationalen Prozessen durch das Zusammenspiel von vielen Enzymen (Glykosyl-Transferasen, Glykosidasen, Isomerasen) im Golgi-Apparat und im Endoplasmatischen Retikulum. Von Spezies zu Spezies, von Organ zu Organ, sowie bei vielen Krankheiten können deutliche Unterschiede und Abnormalitäten im Glykosylierungsmuster auftreten (4, 5).

Kohlenhydrate können durch spezialisierte Bindeproteine, zu denen Rezeptoren, Enzyme, Lektine (6) und Antikörper gehören (7, 8) erkannt werden. Die Selektivität der Erkennung und der Bindung findet durch eine Kombination von Wasserstoffbrücken, van-der-Waals Wechselwirkungen und hydrophoben Interaktionen statt. Zu den direkten Interaktionen zwischen den Kohlenhydraten und den Proteinen gehören durch das Wasser oder Metallionen vermittelte Wechselwirkungen, die die Spezifität der Bindung noch zusätzlich erhöhen (6). Trotzdem handelt es sich um relativ schwache Interaktionen (6, 9, 10). Die Bindung wird durch „clustering“ von einfachen Kohlenhydrat erkennenden Domänen und Oligomerisierung von Lektinen erhöht (6). So können ganz bestimmte Kohlenhydrat-Muster spezifisch erkannt werden. Die Kohlenhydrat- Lektin Interaktionen spielen unter anderem eine Rolle beim

Anbinden von Leukozyten an Endothelzellen der Gefäßwände(11) der Adhäsion von vielen Viren (12, 13) sowie Bakterien (14) an die Wirtszellen.

Die Mikroheterogenität der Glykosylierung erschwert die Isolierung von reinen Oligosacchariden bzw. Glykoproteinen aus natürlichen Quellen. Erforderlich ist daher ein synthetisches Verfahren zur Gewinnung von definierten und charakterisierten Oligosaccharidstrukturen. Die Synthese von Oligosacchariden ist durch die Notwendigkeit von vielen synthetischen Schritten, in welchen die funktionellen Gruppen spezifisch geschützt und entschützt werden, komplizierter als die Synthese von Peptiden oder Polynukleotiden. Gleichzeitig ist oft eine mehrstufige Aufreinigung nötig. Eine Kombination von chemischer und enzymatischer Synthese wurde erst durch genetische Methoden ermöglicht, die eine Isolierung und Überexpression einer Vielzahl von Glykosylierungs-Enzymen, vereinfacht haben. Zu den Vorteilen einer enzymatischen Synthese gehören Regio- und Stereospezifität, hohe Ausbeuten und die Verwendung von einzelnen Komponenten in der natürlichen Form ohne zusätzliche Aktivierung oder Schutz von funktionellen Gruppen. Limitierende Faktoren bleiben weiterhin die Zugänglichkeit, die Menge und die Kosten für die erforderlichen Enzyme. Die Automatisierung der Oligosaccharid-Synthese (15-18) und genaue Positionierung der Kopplung von Oligosacchariden an Proteine gehören weiterhin zu den wichtigsten Problemen.

Aufgrund des breiten Interesses an Oligosaccharid-vermittelten Zell-Zell Erkennungsprozessen und deren Blockierung wird die Suche nach neuen spezifischen Adhäsions-Inhibitoren in mehreren Richtungen durchgeführt. Eine Strategie führt zum Anfang der Glykosylierung, zu der Inhibition von Enzymen die an der Biosynthese von Kohlenhydraten teilnehmen. Dies geschieht mittels synthetischer Übergangszustands-Analoga (19).

Der zweite Angriffspunkt ist die Blockierung der Kohlenhydrat Bindungspartner durch Kohlenhydratmimetika mit verbesserten Eigenschaften im Bezug auf Stabilität, Spezifität, Affinität und synthetischer Verfügbarkeit (19-22),. Als Beispiel dienen synthetische sLeX-Mimetika sowie polymere und in Liposomen-einbaubare sLeX-Derivate, die im Vergleich zu den monomeren Verbindungen 70 - 5000 mal höhere Aktivität bei der Inhibition von E-Selektinen aufweisen .

Die dritte Möglichkeit besteht in der sterischen Blockierung der Zugänglichkeit des Oligosaccharid-Zielmoleküls durch Oligosaccharid-Antikörper (23) oder kurze positiv geladene Polypeptide, sogenannte Defensine (24).

In dieser Doktorarbeit wurden *in vitro* Selektionsmethoden zur Gewinnung von Oligosaccharid-bindenden RNA-Molekülen benutzt. Die potentiellen Oligosaccharid-bindenden Moleküle gehören ebenfalls in diese dritte Gruppe der Adhäsions Inhibitoren.

1.2 RNA als Regulator und Katalysator

Über Jahrzehnte stand die Ribonukleinsäure im Schatten der Desoxyribonukleinsäure. Lange wurde die RNA nur für einen Zwischenschalter der Informationsübertragung zwischen DNA und Proteinen gehalten. Doch seit einigen Jahren gewinnt die RNA durch zahlreiche Entdeckungen eine Vielfalt von Funktionen und Fähigkeiten und stellt einen Hoffnungsträger für mögliche therapeutische Anwendung dar. Kurze RNA-Moleküle, wie z. B. siRNA (small interfering RNAs) (25), miRNA (micro RNA) (26), stRNAs (small temporal RNAs) (27), katalytisch aktive RNAs (Ribozyme), *in vitro* selektierte hochaffine RNA-Aptamere und natürlich vorkommende RNA-Aptamere (Riboswitches) (28), gehören heutzutage zu den meist untersuchten RNAs.

Der Einsatz von kurzen siRNA und stRNA findet eine Anwendung beim „gene-silencing“. Die kurzen Oligonukleotide werden entweder *in situ* durch die Spaltung einer beliebigen doppelsträngigen RNA (dsRNA) oder durch eine chemische Synthese hergestellt. Durch eine komplementäre Hybridisierung der kurzen Oligonukleotide mit mRNA wird die mRNA im entstehenden Doppelstrang entweder durch Nukleasen zerschnitten oder die Translation des entsprechenden Gens verhindert.

Die „Riboswitches“ sind dagegen schon in den nicht translatierten Regionen der Transkripte von vielen metabolischen Genen kodiert und sind in der Lage unterschiedliche Gene an der Transkriptions- oder Translationsebene zu aktivieren oder zu hemmen (28).

Die katalytisch aktiven Ribozyme sind natürlich vorkommende (29-31) oder *in vitro* selektierte RNAs. Einige Beispiele der Reaktionen, die durch selektierte RNA-Moleküle katalysiert werden, sind Peptidyltransferasereaktion (32), Ligation und Endonucleasereaktion (33), Polynucleotid Kinasereaktion (34), Diels-Alder Reaktion (35), RNA-Aminoacylierung (36-39) und RNA Polymerisation (40, 41). Diese Vielfalt von RNA-Katalysatoren unterstützt die Hypothese einer RNA-Welt (42, 43), in der RNA-Moleküle alle wichtigen Prozesse ausgeführt hatten.

1.3 Die *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren

Die Automatisierung der Festphasensynthese von einzelsträngiger DNA (ssDNA) mittels der Phosphoramidit-Methode (44) ermöglichte die Herstellung von komplexen DNA- bzw. RNA-Bibliotheken, die gewöhnlich 10^{13} - 10^{16} unterschiedliche Moleküle enthalten. Zusätzlich lassen sich die Nukleinsäuren-Bibliotheken mittels enzymatischer Verfahren, wie Polymerasekettenreaktion und *in vitro* Transkription einfach vervielfältigen.

RNA- und DNA-Moleküle einer Bibliothek bilden eine große Vielfalt von sekundären und tertiären Strukturen, die eine Oberfläche für die Wechselwirkung mit unterschiedlichen Liganden anbieten oder eine katalytische Aktivität aufweisen können. Die Wechselwirkung findet dabei, wie auch bei den Proteinen, durch Wasserstoffbrücken, hydrophobe und ionische Interaktionen statt.

Die Technik mittels welcher die Oligonukleotide (sogenannte Aptamere, lat. „aptus“ = „es passt“) spezifisch selektiert und vermehrt werden, ist das SELEX-Verfahren (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) (45-47). Eine *in vitro* Selektion basiert auf gleichen Prinzipien wie eine natürliche Selektion: auswählen und vermehren. Das große Potenzial, die Entwicklung der Methode und die Vielfalt von Liganden, die als Zielmoleküle verwendet wurden, zeigt sich in der großen Anzahl von Publikationen, die sich mit SELEX seit dem Jahr 1990 beschäftigen.

Bei der SELEX-Methode wird die ssDNA-Bibliothek so konzipiert, dass eine 30 bis 120 Nukleotide lange und möglichst zufällige Sequenz von zwei konstanten Regionen am 5'- und 3'-Ende umgeben wird, die als Primer Bindungsstellen bei der PCR dienen. Der Grad der Zufälligkeit einer chemisch synthetisierten ssDNA-Bibliothek wird durch die Veränderung der Stöchiometrie von einzelnen Phosphoramidit-Nukleotiden in einzelnen Syntheseschritten kontrolliert. Die Randomisierung längerer Sequenzen ist dabei durch die DNA Synthese limitiert (48). Falls eine RNA-Bibliothek benutzt wird, beinhaltet die konstante Region auf der 5'-Seite der Sequenz zusätzlich die Sequenz des T7-Promotors, der für eine *in vitro* Transkription benötigt wird. Durch eine PCR wird die ssDNA in eine doppelsträngige DNA umgewandelt und anschließend in der *in vitro* Transkription in eine RNA überschrieben.

In einem Selektionsschritt werden die bindenden Moleküle von den nichtbindenden bzw. schwach bindenden Molekülen der Bibliothek mittels unterschiedlicher Trennverfahren wie Filterbindung, Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen, Immunoprecipitation, Zentrifugation, Affinitäts-Chromatographie usw., getrennt. Die selektierten bindenden Moleküle werden wieder in eine cDNA revers transkribiert, durch PCR vermehrt und in einer

neuen *in vitro* Transkription in eine neue und reduzierte RNA-Bibliothek überschrieben. In mehreren Selektionszyklen werden so aus einer komplexen Ausgangsbibliothek die spezifisch und mit hoher Affinität bindenden Moleküle selektiert (Abb. 1).

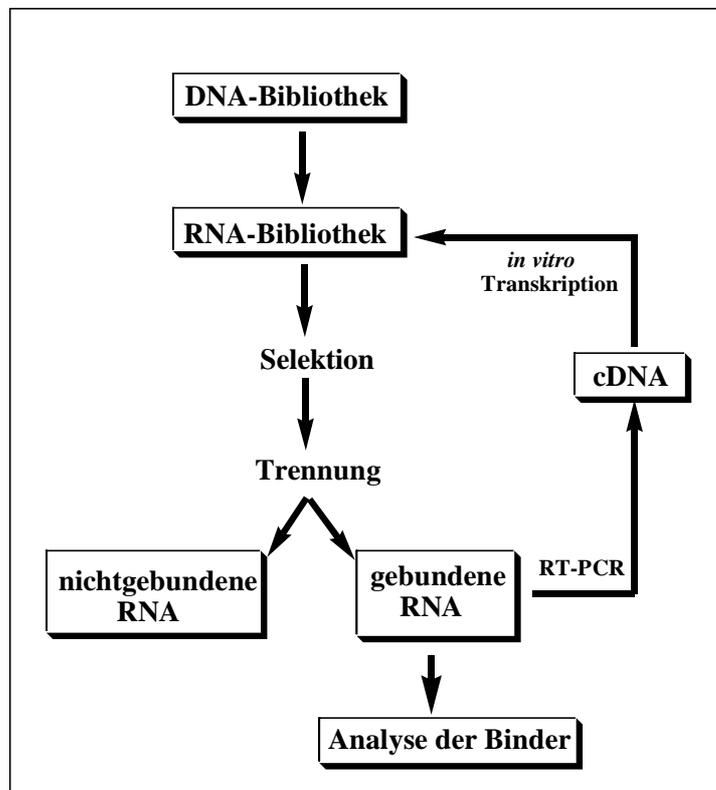


Abb. 1 Schema der *in vitro* Selektion bindender RNA-Moleküle.

Aus einer großen Bibliothek von Nucleinsäuren können RNA-Moleküle einer gewünschten Eigenschaft durch Wiederholung der Selektionszyklen isoliert werden.

Es ist nicht vorhersagbar wie viele Selektionszyklen für eine erfolgreiche Selektion benötigt werden. Die in der Literatur übliche Spanne bewegt sich zwischen 5 bis 15 Selektionszyklen. Die Anzahl der Selektionszyklen hängt von mehreren Parametern ab, wie z. B. von der Oligonukleotid- und Ligandenkonzentration, der Diversität der Ausgangsbibliothek (49, 50), dem Verhältnis zwischen schwachen und starken bindenden Molekülen, der Effektivität der Trennung und der Stringenz der Selektion.

Für jeden Ligand und seine gewünschte Affinität gibt es theoretisch eine minimale effektive Größe der Bibliothek. In Falle einer nicht bekannten Ligand-Nucleinsäure-Wechselwirkung sollte für die Selektion eine komplett zufällige Bibliothek von längeren Sequenzen benutzt werden. Hier ist die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens einer bindenden Sequenz oder eines gesuchten Faltungsmotives höher. Allgemein gilt, dass je länger die randomisierte Sequenz der Nucleinsäure ist, eine umso bessere Bindung des selektierten Aptameres erreicht

werden kann. Ein Beispiel an dieser Stelle ist die *in vitro* Selektion gegen Arginin, wodurch eine verlängerte Zufallsequenz eine Erhöhung der Affinität von 4 mM auf 300 nM erreicht wurde (51-53). Eine niedrige Selektionsstringenz liefert diverse bindende Moleküle mit daraus folgenden unterschiedlichen Eigenschaften. Dadurch wird die Spannweite der bindenden Moleküle vergrößert. Im Gegensatz dazu liefert eine höhere Selektionsstringenz Moleküle mit definierteren Bindungsmotiven (54).

Nach einer ausreichenden Anreicherung bindender Moleküle werden diese kloniert und sequenziert. Die Analyse der Sequenzen liefert sehr oft auf der Ebene der primären Struktur konservierte Motive, sogenannte Konsensussequenzen. Die Aptamere werden aufgrund der Konsensussequenz in verschiedene Familien eingeteilt. Es ist aber genauso möglich, dass das Bindungsmotiv durch die Sekundär- oder Tertiärstruktur der Aptamere gebildet wird.

Eine sehr hohe Spezifität der selektierten Aptamere wurde oft gezeigt. Die Aptamere sind in der Lage die kleinsten Unterschiede in der Struktur des Liganden wie z. B. An- oder Abwesenheit einer Methyl- (55, 56) oder Hydroxylgruppe (57, 58) oder D- und L-Enantiomere (53) zu erkennen. Die Dissoziationskonstanten können aber vom pikomolaren bis zum mikromolaren Bereich liegen. Eine Reselektion nach partieller Randomisierung der isolierten Sequenzen durch „error prone“ PCR (59) oder „DNA shuffling“ (60) erlauben oft eine Verbesserung der Eigenschaften der selektierten Aptamere.

Das Interesse für *in vitro* selektierte RNA-Aptamere ist durch ihre therapeutische und diagnostische Verwendung als Biosensoren in letzter Zeit gewachsen (61). Einige Beispiele zeigen, dass die *in vitro* selektierten RNA-Aptamere ihre Liganden auch *in vivo* erkennen. Sie werden *in vivo* durch den zelleigenen Transkriptionsapparat ohne Verlust der Aktivität exprimiert (62-64).

Eine Automatisierung der *in vitro* Selektion soll zu der Optimierung der Selektionsbedingungen für einzelne Liganden führen, bzw. eine parallele Selektion gegen mehrere Liganden in kurzer Zeit ermöglichen (65-68).

Grundsätzliches Problem der selektierten RNA-Aptamere ist ihre Labilität vor allem gegenüber dem Angriff von Nukleasen unter physiologischen Bedingungen. Die isolierten Aptamere werden deswegen nach einer erfolgreichen Selektion für den *in vivo* Einsatz durch eine Modifizierung der Oligonucleotide im Rückgrat, an der 2'-Position der Ribose oder der Base stabilisiert (54, 69-73). Auch eine Einführung von unnatürlichen Basenpaaren (74, 75) oder Zirkularisierung der RNA (76) schützt diese RNA vor dem Abbau durch Nukleasen. Allerdings kann eine postselektionelle Modifikation auch zum Verlust der Aktivität von

selektierten Aptameren führen. Deswegen wird die Selektion oft mit einer modifizierten Nukleinsäure-Bibliothek (77), oder mit einer Bibliothek von L-Nukleinsäuren, sogenannten Spiegelmeren (78), die durch Nukleasen nicht erkannt werden, durchgeführt.

Im Vergleich zu der Herstellung von Antikörpern wäre die *in vitro* Selektion ein schneller, einfacher und billiger Weg zur Gewinnung von spezifischen Inhibitoren einer Kohlenhydratwechselwirkung. Ein Beispiel dafür sind erfolgreiche *in vitro* Selektionen gegen Lektine (79, 80).

Allerdings wurde die Interaktion zwischen Nukleinsäuren und Kohlenhydraten nur sehr wenig untersucht. Die meisten Arbeiten beschäftigen sich mit der Selektion und der Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen aminoglykosidischen Antibiotika und Nukleinsäuren (81-85). Die Ergebnisse zeigen dabei, dass die Interaktionen sehr spezifisch sind. Die Bindungskonstanten liegen im Bereich von $KD = 10^{-4}$ bis zu 10^{-10} M. Die Bindung wird vor allem durch die elektrostatischen Interaktionen von positiv geladenen Amino-Gruppen des Antibiotikums und negativ geladenen Phosphat-Gruppen des RNA-Rückgrats stabilisiert. Aminoglykoside binden dabei an die einzelsträngigen Regionen der RNA, bzw. in durch die dreidimensionale Faltung der RNA-Kette entstandene elektronegative Taschen (86-91).

Im Unterschied hierzu scheinen kleine Kohlenhydrate, die keine Ladung und keine hohe Hydrophobizität aufweisen, eine relativ flexible Konformation und nur wenige nichtmodifizierte Hydroxyl-Gruppen besitzen, nicht sehr geeignet für eine Interaktion mit Nukleinsäuren zu sein. Die *in vitro* Selektion gegen Galaktose, Glukose und Mannose lieferte RNA-Aptamere, die im Bereich von $KD = 10^{-4}$ bis zu 10^{-5} M binden (92). DNA-Aptamere gegen Sialyllaktose zeigen trotz einer negativen Ladung in dem Oligosaccharid-Molekül keine sehr hohe Bindungsaffinität ($KD = 4.9 \mu\text{M}$) (93). Auffällig ist, dass die Affinität der selektierten Aptamere zu Kohlenhydraten ähnlich der *in vivo* vorkommenden Lektin-Kohlenhydrat Interaktion ist. Erst größere und verzweigte Oligosaccharide, wie z. B. $s\text{Le}^x$ (94), das an der Oberfläche von Leukozyten und Krebszellen sehr oft vorkommt, oder Polysaccharide, wie z. B. Cellobiose (95), Chitin (96) oder Dextran (97) scheinen für die Erkennung durch Nukleinsäuren besser geeignet zu sein.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die *in vitro* Selektion von spezifischen RNA-Aptameren, die gegen biologisch relevante lineare und verzweigte Oligosaccharide gerichtet sind. Diese Zielsetzung setzt folgende Einzelschritte voraus:

1. Die chemisch-enzymatische Synthese und Charakterisierung von ausgewählten, biologisch relevanten, linearen und verzweigten Oligosacchariden. Mit unterschiedlichen Spacern verbunden sollten sie für die *in vitro* Selektion als Ausgangsliganden verwendet werden (Abb. 2).

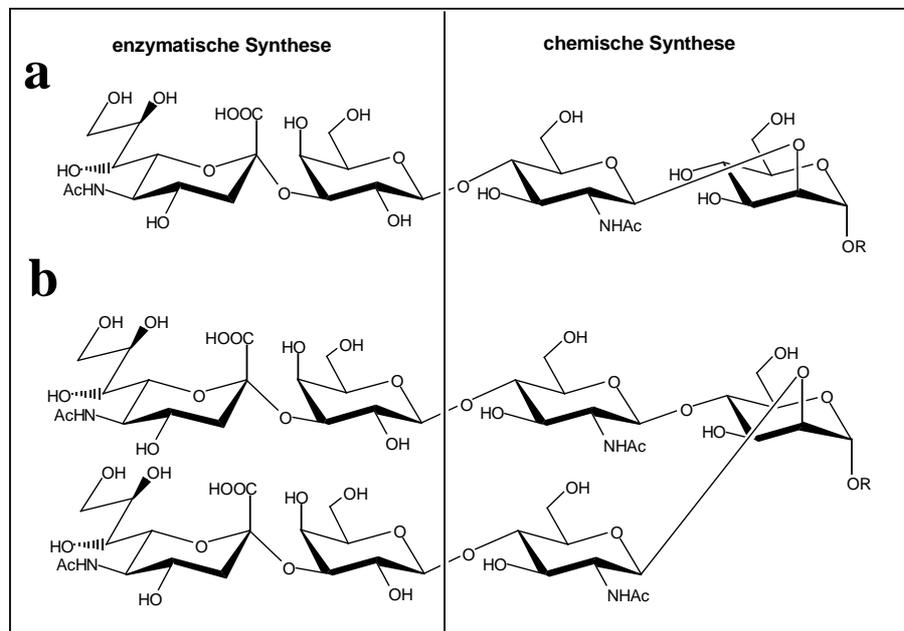


Abb. 2 Zielmoleküle der chemisch-enzymatischen Synthese: (a) Lineare Oligosaccharide und (b) verzweigte Teilstrukturen von N-Glykanen. Für die lineare Oligosaccharide ist $R = \text{CH}_3, (\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2, (\text{CH}_2)_6\text{-NH-CO-(CH}_2)_2\text{-S-S-py}$; für die verzweigten Oligosaccharide $R = (\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2, (\text{CH}_2)_6\text{-NH-CO-(CH}_2)_2\text{-S-S-py}$.

2. Die Optimierung der *in vitro* Selektion als Methode zur Gewinnung der spezifisch Oligosaccharid bindenden RNA-Aptamere.
3. Qualitativer Nachweis der Oligosaccharid/RNA-Interaktion und quantitative Bestimmung der Bindungsparameter.
4. Die Charakterisierung der Eigenschaften und insbesondere der Spezifität von selektierten RNA-Aptameren mittels biochemischer Methoden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Proteine

2.1.1.1 Chemikalien

Agar von AppliChem GmbH (Darmstadt); Ampicillin von GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg); Agarose, EDTA, Ethidiumbromid, Hepes, Roti-Phenol (TE-gesättigt, pH 7,5-8,0), rotiphorese[®] Gel 40, TRIS, X-Gal, dATP, dGTP, dCTP, dTTP von Roth (Karlsruhe); IPTG, Dithiothreitol von GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg); Dipyridyldisulphid, Iodoacetamid, (3-Mercaptopropyl)-trimethoxysilan, N-Hydroxysuccinimid von Sigma (Steinheim, Germany); Glykogen von Peqlab (Erlangen); Natrium Cacodylate, Triton X-100 von Fluka (Taufkirchen, Germany); Surfactant p20 von Biacore (Uppsala, Schweden); Xylencyanol von Serva (Heidelberg); ATP, GTP, UTP, CTP von Roche (Mannheim), Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionat von Molecular Probes (Leiden).

Alle anderen Chemikalien stammten von der Firma Merck (Darmstadt) und waren in Analysequalität.

2.1.1.2 Enzyme und Proteine

Rinderserumalbumin (BSA), Galactosyltransferase β -1,4 (EC 2.4.1.22) von Sigma (Steinheim, Germany); Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (EC 3.1.3.1), DNase I, RNase-free (EC 3.1.21.1) aus Rindepankreas, Polynukleotid Kinase (EC 2.7.1.78), HindIII von Roche (Mannheim); PegGold AMV-Reverse Transkriptase (EC 2.7.7.49), SAWADY Taq-DNA-Polymerase (EC 2.7.7.7) von Peqlab (Erlangen); Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor, T4 DNA Ligase (EC 6.5.1.1) von Promega (Mannheim); *EcoR*I von New England BioLabs (Frankfurt am Main, Germany); T7-RNA Polymerase (EC 2.7.7.6) von Lehrstuhl für Biochemie (Universität Bayreuth); β -Galactosid- α -2,3 Sialyltransferase (EC 2.4.99.6) von Prof. Dr. J. C. Paulson (Cytel Corp., San Diego).

2.1.1.3 Radiochemikalien

[γ - ^{32}P] ATP (110 TBq/mmol) Hartmann Analytic (Braunschweig)

[α - ^{32}P] ATP (110 TBq/mmol) Hartmann Analytic (Braunschweig)

[α - ^{32}P] GTP (110 TBq/mmol) Hartmann Analytic (Braunschweig)

2.1.2 Chromatographie-Materialien

Sepharose 6B, Superdex G-25, Sephadex G25, Superdex 200, Sephacryl S200HR (Pharmacia Freiburg); Thiopropyl aktivierte Sepharose 6B (Sigma, Taufkirchen); Biogel P6 (Biorad, München).

2.1.3 Desoxyoligonukleotide

Desoxyoligonukleotid d5G: 5'-ACCTGCTTGTTCTGA-3'

Desoxyoligonukleotid d9G: 5'-GTCTGCTTGTTCCA-3'

Desoxyoligonukleotid d10G: 5'-CCCTGCTTGTTCTG-3'

Primer P45:

5'-GCGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGATACTACACGTG-3'

Primer P25:

5'-CGGAAAGCTTCTGCTACATGCAATGG-3'

Desoxyoligonukleotide wurden chemisch synthetisiert und HPLC aufgereinigt (MWG-Biotech AG). Die Desoxyoligonukleotide P45 und P25 wurden als Primer für die Amplifikation der DNA mittels PCR verwendet. Primer P45 enthält einen T7-Promotor (fett gedruckt) und ermöglicht die direkte *in vitro* Transkription des PCR-Produktes mittels T7-Polymerase. Zusätzlich enthalten P45 und P25 Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *HindIII* (unterstrichen).

2.1.4 Sonstiges

Sterilfilter Porengröße 0,2 μm (Sartorius, Göttingen); Molekularsieb 4Å (Kugeln) (Fluka, Taufkirchen); Sensor chip CM5 (Biacore, Uppsala, Schweden); Glasperlen: 150-212 microns,

acid washed (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany); Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim, Baden); Kunststoffküvetten (Hartenstein, Würzburg); Pipetten (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf); Whatman 3MM-Filter (Whatman, Maidstone, England); SepPak-Cartridges (Waters Corporation, Milford, Massachusetts USA), Szintillationsröhrchen (Wörl, Brunthal).

2.1.5 Bakterienstämme, Nährmedien und Lösungen

2.1.5.1 Bakterienstämme

***E.coli* DH5 α :**

supE44,ΔlacU169,(ϕ80lacZΔM15), hsdR17,recA1,endA1,gyrA96,thi-1,relA (98).

2.1.5.2 Nährmedien

LB Medium: 10 g Trypton/Pepton, 5 g Hefeextract, 5 g NaCl pro 1 Liter H₂O, pH 7,0

Das Medium wurde 20 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert. Feste Nährböden wurden durch Zusatz von 1,5 % (w/v) Agar erhalten. Die eingesetzte Ampicillin-Konzentration war 100 µg/ml.

Für blau-weiß Screening wurden die LB-Platten kurz vor der Bakterienausplattierung mit 40 µl einer 20 mg/ml X-Gal-Lösung und 4 µl einer 200 mg/ml IPTG-Lösung bestrichen.

2.1.5.3 Puffer und Lösungen

TBE-Puffer: 89 mM Tris (pH 8,4 bei 25 °C); 89 mM H₃BO₃; 2 mM EDTA

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0 bei 25 °C), 1 mM EDTA

Probenpuffer für Agarose- und native Polyacrylamidgelelektrophorese: 0,25 % (w/v)

Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylenecyanol; 30 % (v/v) Glycerin

RNA-Probenpuffer für denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese: 10 mM EDTA

(pH 7,5 bei 25 °C); 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 % (w/v)

Xylenecyanol; 80 % Formamid (HCHO)

DNA-Probenpuffer: 50 mM EDTA (pH 7,5 bei 25 °C); 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 %

(w/v) Xylenecyanol; 30 % (v/v) Glycerol

Laufpuffer für native Polyacrylamidgelelektrophorese: 25 mM Tris/AcOH

(pH ~ 7 bei 25 °C); 5 mM MgCl₂

Toluidinblau-Lösung: 0,05 % (w/v) Toluidinblau in H₂O

PCR-Puffer: 10 mM Tris/HCL (pH 8,8 bei 25 °C); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂;
0,01 % (v/v) Triton X-100

PNK-Puffer: 50 mM Tris/HCl (pH 8,2 bei 25 °C); 10 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA;
5 mM Dithiothreitol; 0,1 mM Spermidin

Puffer für Alkalische Phosphatase: 50 mM Tris/HCl (pH 8,5 bei 20 °C); 0,1 mM EDTA

Ligationspuffer: 30 mM Tris/HCl (pH 7,8 bei 25 °C), 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol,
1 mM ATP, 5 % (v/v) Polyethylenglykol

Aktivierungspuffer: 100 mM Tris/HCl (pH 7,5 oder 7,0 bei 25 °C); 250 mM NaCl;
1 mM EDTA

Selektionspuffer A: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5 bei 25 °C); 250 mM NaCl; 5 mM MgCl₂

Selektionspuffer B: 50 mM HepesNaOH (pH 7,5 bei 25 °C); 100 mM NaCl; 1 mM MgCl₂;
1 mM CaCl₂

Selektionspuffer C: 50 mM Hepes/NaOH (pH 7,5 bei 25 °C); 100 mM NaCl

Selektionspuffer D: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5 bei 25 °C); 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂

Elutionspuffer A: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5 bei 25 °C); 250 mM NaCl; 5 mM MgCl₂;
20 mM DTT

Elutionspuffer B: 50 mM Hepes/NaOH (pH 7,5 bei 25 °C); 100 mM NaCl; 1 mM MgCl₂;
1 mM CaCl₂; 20 mM DTT

Puffer A für UV-Schmelzkurven: 50 mM NaCac/HCl (pH 7,5 bei 25 °C), 5 mM MgCl₂ und
folgende NaCl-Konzentrationen: 0 mM, 30 mM, 60 mM, 90 mM, 120 mM,
150 mM, 180 mM, 210 mM, 250 mM

Puffer B für UV-Schmelzkurven: 20 mM NaCac/HCl (pH 7,5 bei 25 °C), 2,5 mM MgCl₂,
150 mM NaCl

TfB I Puffer: 30 mM KAc/AcOH (pH 5,8 bei 25 °C); 100 mM RbCl₂; 50 mM MnCl₂;
10 mM CaCl₂; 15 % Glycerol (v/v)

TfB II Puffer: 10 mM Mops/NaOH (pH 7,0 bei 25 °C); 10 mM RbCl₂; 75 mM CaCl₂;
15 % Glycerol (v/v)

HBS-Puffer: 10 mM Hepes/NaOH (pH 7,4 bei 25 °C); 150 mM NaCl; 3 mM EDTA

X-Gal: 2 % X-Gal in 100 % Dimethylformamid

Repelsilan: 2 % (v/v) Dimethyldichlorosilan in Chloroform

Fixierlösung: 10 % Methanol or Ethanol; 10 % Essigsäure in H₂O

Stains-all-Lösung: 0,005 % (w/v) in 45 % Formamid (aq)

Ellmans Reagenz: 0,1 % (w/v) 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzolsäure) in einer 1:1 Mischung von 100 % EtOH : 450 mM Tris/HCl (pH 8,2 bei 25 °C)

Kohlenhydratspezifische Anfärbereagenz : 1:1-Mischung von 2 N H₂SO₄ und 0,2 %-iger ethanolischer Resorcinmonomethyletherlösung

2.2 Methoden

2.2.1 Chemische Synthese

Acetyl O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetyl-β-D-mannopyranosid 3
(β-Ac₃GlcNPht-1,2-β-Ac₄Man)

21,54 g (37,2 mmol) α-Imidat **1** (99) und 8,61 g (24,69 mmol) Halbacetal **2** (100) werden in 240 ml absolutem Dichlormethan aufgelöst und mit 11,95 g Molekularsieb 4Å in Kugelform 20 Minuten bei - 50 °C gerührt. Man gibt 430,7 µl (3,47 mmol) Bortrifluorid-Ether innerhalb von 5 Minuten zu und rührt die Reaktion 4 Stunden bei - 30 °C (DC: Hexan/Aceton 1:1). Die Reaktionslösung wird über Celite abfiltriert, mit 500 ml Dichlormethan nachgewaschen und mit gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird durch Flaschchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1; Säulendurchmesser: 7,5 cm; Füllhöhe: 20 cm) gereinigt.

Ausbeute: 13,27 g (68,7 %)

R_f = 0,61 (Hexan/Aceton 1:1)

[α]_D²³ = - 42,3° (0,5, Dichlormethan)

C₃₄H₃₉NO₁₉ (765,67)

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7,9-7,8 (m, 4H, Pht); 5,96 (dd, J_{2,3} = 10,7 Hz, 1H, H-3'); 5,78 (d, J_{1,2} < 1 Hz, 1H, H-1); 5,26 (d, J_{1,2} = 8,3 Hz, 1H, H-1'); 5,03 (dd, J_{4,5} = J_{3,4} = 9,42, 1H, H-4'); 4,96 (m, 2H, H-3, H-4); 4,27 (dd, J_{1,2}, J_{2,3} < 1 Hz, 1H, H-2); 4,14-3,91 (m, 4H, H-6', H-5', H-6b', H6a); 3,78-3,76 (m, 2H, H-5, H-6); 2,05; 2,04; 2,01; 1,99; 1,97; 1,84 (6s, 18H, Ac).

O-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -*D*-mannopyranosyl-trichloracetimidat **4**

(β -Ac₃GlcNPht-1,2- α -Ac₃Man-TCAI)

19,9 g (25,98 mmol) Disaccharid **3** und 3,23 g Hydrazinacetat werden in 70 ml DMF gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC: Hexan/Ethylacetat 1:1) gibt man 300 ml Aceton zu und rührt 15 Minuten. Die Reaktionslösung wird eingengt, der Rückstand wird in 750 ml Dichlormethan aufgelöst und je einmal mit 300 ml 0,5 M HCl, gesättigter KHCO₃-Lösung und Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und im Hochvakuum eingengt. Das Halbacetal wird anschließend in 300 ml absolutem Dichlormethan aufgenommen und bei 0 °C mit 20 ml Trichloracetonitril (199,17 mmol) und 630 μ l (4,2 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en versetzt. Nach Beendigung der Reaktion (DC: Hexan/Ethylacetat 1:1) wird eingengt und durch Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 1:1; Säulendurchmesser: 6 cm; Füllhöhe: 20 cm) gereinigt.

Ausbeute: 13,1 g (60,2 %)

R_f Halbacetal = 0,53 (Hexan/Ethylacetat 1:1)

R_f Imidat = 0,59 (Hexan/Ethylacetat 1:1)

$[\alpha]_D^{23} = +1,7^\circ$ (1.5, Dichlormethan)

C₃₄H₃₇N₂O₁₈ (868,11)

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 10,02$ (s, 1H, NH); 7,89 (m, 4H, Pht); 5,85 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1); 5,69 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10,72$ Hz, 1H, H-3'); 5,57 (d, $J_{1,2} = 8,6$ Hz, 1H, H-1'); 5,06 (m, 2H, H-4, H-4'); 4,98 (dd, $J_{1,2} = 3$ Hz, 1H, H-3); 4,4 (dd, 1H, H-2); 4,22 (dd, 1H, H-6a'); 4,19 (dd, 1H, H-2'); 4,03 (m, 2H, H-5', H-6b'); 3,8 (m, 1H, H-5); 3,67 (dd, $J_{gem} = 12,44$ Hz, $J_{vic} = 4,3$ Hz, 1H, H-6a); 3,63 (dd, $J_{vic} < 1$ Hz, 1H, H-6b); 2,04; 2,01; 1,99; 1,98; 1,89; 1,82 (6s, 18H, Ac).

6-Azidohexyl *O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -*D*-mannopyranosid **5**

(β -Ac₃GlcNPht-1,2- α -Ac₃Man-OHexN₃)

1 g (1,152 mmol) Imidat **4** und 0,659 g (4,61 mmol) Azidohexanol, sowie 0,984 g getrocknetes Molekularsieb 4 Å werden 30 Minuten in 9,5 ml absolutem Dichlormethan bei

15 °C gerührt. Anschließend werden 104 µl (0,76 mmol) TMSOTf innerhalb von 30 Minuten langsam zugetropft und weiter bei - 15 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC: Hexan/Aceton 1:1) wird die Reaktionslösung über Celite abfiltriert, mit Dichlormethan gewaschen und mit 10 % KHCO₃-Lösung extrahiert. Man trocknet die organische Phase über MgSO₄, engt ein und reinigt den Rückstand durch Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 3:1; Säulendurchmesser: 3,5 cm; Füllhöhe: 25 cm).

Ausbeute: 0,81 g (82,9 %)

R_f = 0,59 (Hexan/Aceton 1:1)

C₃₈H₄₈N₄O₁₈ (848,8)

ESI-MS: M_{ber} = 848,30 M_{gef} = 871,27 (M + Na)⁺

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7,85 (m, 4H, Pht); 5,69 (dd, J_{2',3'} = J_{3',4'} = 10,93 Hz, 1H, H-3'); 5,43 (d, J_{1',2'} = 8,56 Hz, 1H, H-1'); 4,99 (m, 1H, H-4'); 4,85 (m, 2H, H-4, H-3); 4,36 (d, J_{1,2} = 1,49 Hz, 1H, H-1); 4,2 (dd, J_{vic} = 4,94 Hz, J_{gem} = 12,02 Hz, 1H, H-6a'); 4,16-4,09 (m, 2H, H-2', H-2); 4,04-3,98 (m, 3H, H-5', H-6b', H-6b); 3,57-3,53 (m, 2H, H-6a, H-5); 3,44-3,2 (m, 4H, CH₂O, CH₂N₃); 2,03; 1,99; 1,95; 1,94; 1,89; 1,81 (6s, 18H, Ac); 1,56-1,43 (m, 4H, H-β); 1,27 (m, 4H, H-γ).

Methoxy O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosid 6

(β-Ac₃GlcNPht-1,2-α-Ac₃Man-OCH₃)

0,5 g (0,579 mmol) Imidat **4** und 0,413 g getrocknetes Molekularsieb 4Å werden 30 Minuten in 5 ml absolutem Methanol bei - 25 °C gerührt. Anschließend werden 50 µl (0,39 mmol) Bortrifluorid-Ether innerhalb von 2,5 Stunden langsam zugetropft und weiter bei - 15 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC: Cyclohexan/ Essigester 1:2) wird die Reaktionslösung über Celite abfiltriert, mit Dichlormethan gewaschen und mit 10 % KHCO₃-Lösung extrahiert. Man trocknet die organische Phase über MgSO₄, engt ein und reinigt den Rückstand durch Flashchromatographie (Cyclohexan/ Essigester 1:1,5; Säulendurchmesser: 3,5 cm; Füllhöhe: 22 cm).

Ausbeute: 72 mg (17 %)

R_f = 0,58 (Cyclohexan/ Essigester 1:2)

$C_{33}H_{39}NO_{18}$ (737,66)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 737,22$ $M_{\text{gef}} = 760,25$ (M+Na)⁺

6-Azidohexyl O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-α-D-mannopyranosid 7
(β-GlcNAc-1,2-α-Man-OHexN₃)

361,5 mg (0,426 mmol) Disaccharid **5** werden in 12 ml n-Butanol und 6 ml Ethylendiamin bei 80 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC: Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1) destilliert man die Reagenzien ab und trocknet bis zur Gewichtskonstanz im Hochvakuum. Der Rückstand wird in 4 ml Pyridin und 2 ml Acetanhydrid aufgenommen und bei Raumtemperatur 1,5 Stunde gerührt (DC: Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1). Man engt ein und codestilliert viermal mit Toluol. Das Peracetat wird in 4 ml Methylamin (40 % in Wasser) aufgenommen und bis zur Vollständigkeit der Reaktion (DC: Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1) bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Hochvakuum eingengt und der Rückstand wird in 10 ml Wasser aufgenommen. Diese Lösung wird über vier miteinander verbundenen SepPak-Kartuschen Classic gegeben. Man wäscht mit 30 ml Wasser nach und eluiert mit 60 ml Acetonitril-Wasser 1:9. Anschließend wird das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 195 mg (90,3 %)

R_f Amin = 0,54 (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1)

R_f Peracetat = 0,81 (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1)

R_f Amid = 0,67 (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1)

$C_{20}H_{36}N_4O_{11}$ (508,52)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 508,24$ $M_{\text{gef}} = 531,22$ (M + Na)⁺

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-D₂O): δ = 4,71 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1); 4,4 (d, $J_{1,2} = 8,4$ Hz, 1H, H-1'); 3,9 (m, 1H, H-2); 3,79-3,74 (m, 2H, H-6a', H-6a); 3,68-3,55 (m, 4H, H-3, H-6b', H-4', H-2'); 3,52-3,28 (m, 7H, CH₂Oa, H-6b, H-5, H-3', CH₂Ob, H-4, H-5'); 3,21-3,18 (m, 2H, CH₂N₃); 1,89 (s, 3H, Ac); 1,5-1,48 (m, 4H, H-β); 1,28 (m, 4H, H-γ).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]-D₂O): δ = 173,03 C=O Ac; 99,79 C-1'; 96,99 C-1; 76,69 C-2; 76,06 C-5'; 73,54 C-3'; 73,09 C-5; 70,13 C-3; 69,92 C-4'; 68,14 CH₂O; 67,52 C-4; 61,75 C-6; 60,83 C-6'; 55,59 C-2'; 51,37 CH₂N₃; 28,66; 28,14 C-β; 25,95; 25,24 C-γ; 22,53 Ac.

Methoxy O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-α-D-mannopyranosid **8**
(β-GlcNAc-1,2-α-Man-OCH₃)

75 mg (0,102 mmol) Disaccharid **6** werden in 2 ml *n*-Butanol und 0,1 ml Ethylendiamin bei 80 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC: Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1) destilliert man die Reagenzien ab und trocknet bis zur Gewichtskonstanz im Hochvakuum. Der Rückstand wird in 0,5 ml Pyridin und 0,25 ml Acetanhydrid aufgenommen und bei Raumtemperatur 4 Stunden gerührt (DC: Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1). Man engt ein und codestilliert viermal mit Toluol. Das Peracetat wird in 2 ml Methylamin (40 % in Wasser) aufgenommen und bis zur Vollständigkeit der Reaktion (DC: Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1) bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Hochvakuum eingengt und der Rückstand wird in 10 ml Wasser aufgenommen. Diese Lösung wird über vier miteinander verbundenen SepPak-Kartuschen Classic gegeben. Man eluiert das Produkt mit 60 ml Wasser. Anschließend wird das Produkt lyophilisiert, durch Gelpermeationschromatographie (Säule: Hi Load Superdex 16/60; Eluent: 100 mM NH₄HCO₃; Flussrate 0,75 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm) getrennt und nochmals lyophilisiert.

Ausbeute: 30,1 mg (74,5 %)

R_f Amin = 0,41 (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1)

R_f Peracetat = 0,82 (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1)

R_f Amid = 0,56 (Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1)

C₁₅H₂₇NO₁₁ (397,37)

ESI-MS: M_{ber} = 397,16 M_{gef} = 419,95 (M+Na)⁺

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-D₂O): δ = 4,61 (d, J_{1,2} < 1 Hz, H-1); 4,4 (d, J_{1',2'} = 8,36 Hz, 1H, H-1'); 3,9-3,88 (dd, J_{1,2} = 1,4 Hz, J_{3,4} = 3,21 Hz, 1H, H-2); 3,8-3,7 (m, 2H, H-6a', H-6a); 3,64-3,24 (m, 9H, H-3, H-6b', H-4', H-2', H-6b, H-5, H-3', H-4, H-5'); 3,19 (s, 3H, OCH₃); 1,89 (s, 3H, Ac).

¹³C-NMR (90,56 MHz, [D₆]-D₂O): δ = 174,36 C=O Ac; 98,99 C-1'; 97,42 C-1; 75,68 C-2; 75,30 C-5'; 72,82 C-3'; 72,15 C-5; 69,38 C-3; 69,06 C-4'; 66,78 C-4; 61,75 C-6; 60,36 C-6'; 54,81 C-2'; 54,29 OCH₃; 21,77 Ac.

6-Aminohexyl O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)- α -D-mannopyranosid **9**
(β -GlcNAc-1,2- α -Man-OHexNH₂)

297 mg (0,584 mmol) Disaccharid **7** werden in 10 ml absolutem Methanol gelöst, mit 300 mg PdO-H₂O versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre stark gerührt. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 4:1) wird der Katalysator abfiltriert und mehrmals mit Methanol gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden lyophilisiert.

Ausbeute: 282 mg (100 %)

R_f (Edukt) = 0,71 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1)

R_f (Produkt) = 0,24 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1)

C₂₀H₃₈N₂O₁₁ (482,52)

ESI-MS: M_{ber} = 482,25 M_{gef} = 505, 23 (M+Na)⁺

3-(dithio-2-pyridyl)-propanoyl-6-aminohexyl-[O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)- α -D-mannopyranosid] **10**
(β -GlcNAc-1,2- α -Man-OHexNH-CO-(CH₂)₂-S-S-py)

287 mg (0,595 mmol) Disaccharid **9** und 332 mg (1,06 mmol) SPDP **28** werden in 15 ml MeOH gelöst und bei Raumtemperatur 1,5 Stunde gerührt. Die Reaktionsgemisch wird im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand wird in MeOH aufgenommen und durch Gelfiltration (Säule: Sephadex LH20; Eluent: MeOH; Flussrate: 0,5 ml/min; Säulendurchmesser: 30 mm; Füllhöhe: 800mm; Detektion: 214, 254 und 280 nm) getrennt.

Ausbeute: 30,8 mg (76,1 %)

R_f (Edukt) = 0,31 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1)

R_f (Produkt) = 0,72 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1)

C₂₈H₄₅N₃O₁₂S₂ (679,8)

ESI-MS: M_{ber} = 679,24 M_{gef} = 701,85 (M+Na)⁺

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-D₂O): δ = 4,7 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1); 4,49 (d, $J_{1',2'} = 8,15$ Hz, 1H, H-1'); 3,98 (m, 1H, H-2); 3,9-3,3 (m, 13H, H-6a', H-6a, H-3, H-6b', H-4', H-2', CH₂Oa, H-6b, H-5, H-3', CH₂Ob, H-4, H-5'); 3,15-2,95 (m, 4H, CH₂N, CH₂S); 2,55 (m, 2H, CH₂CO); 2,0 (s, 3H, Ac); 1,65-1,35 (m, 4H, H- β); 1,34-1,2 (m, 4H, H- γ).

Methoxy β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosid 11

(β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-OCH₃)

10 mg (25,52 μmol) Disaccharid **8** werden in 10 ml 20 mM Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) gelöst. Der Puffer enthält 6,7 mg Rinderserumalbumin, 1,7 mM NaN₃, 1 mM MnCl₂, 21,27 mg (31,66 μmol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 39 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 1 U GlcNAc-β-1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird bei 37 °C, inkubiert wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH bei 7,0 gehalten wird. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1) wird MnCl₂ zu einer Endkonzentration von 14 mM zugegeben und die Reaktionsmischung 17 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Der Überstand wird lyophilisiert und das Pellet in ddH₂O aufgelöst. Das Gemisch wird durch Gelpermeationschromatographie (Säule: Hi Load Superdex 16/60; Eluent: 100 mM NH₄HCO₃; Flussrate 0,75 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm) getrennt und das Produkt wird lyophilisiert.

Ausbeute: 8,4 mg (60 %)

R_f = 0,18 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1)

C₂₁H₃₇NO₁₆ (559,52)

ESI-MS: M_{ber} = 559,21 M_{gef} = 582,18 (M+Na)⁺

¹H-NMR (360 MHz, D₂O, Aceton d₆ als interner Standard): δ = 4,62 (d, J_{1,2} = 1,28 Hz, 1H, H-1); 4,43 (d, J_{1,2} = 7,69 Hz, 1H, H-1'); 4,31 (d, J_{1,2} = 7,78 Hz, 1H, H-1''); 3,9 (dd, J_{1,2} = J_{2,3} = 1H, H-2); 3,84 (m, 1H, H-6a'); 3,8-3,56 (m, 9H, H-4'', H-6a, H-6b', H-3, H-6a'', H-2', H-5'', H-4', H-6b''); 3,55-3,34 (m, 7H, H-3'', H-6b, H-5, H-5', H-2'', H-3', H-4); 3,25 (s, 3H, OCH₃); 1,89 (s, 3H, Ac).

¹³C-NMR (90,5 MHz, D₂O, Aceton d₆ als interner Standard): δ = 174,24 C=O; 102,42 C-1''; 98,84 C-1'; 97,39 C-1; 77,95 C-2; 75,65 C-4'; 74,84 C-5'; 74,22 C-5; 72,15 C-3''; 71,98 C-5''; 71,49 C-2''; 70,45 C-3; 69,05 C-4''; 68,03 C-4; 66,78 C-3'; 61,06 C-6; 60,50 C-6''; 59,44 C-6'; 54,35 C-2'; 54,29 OCH₃; 22,66 Ac.

6-Aminoethyl β-D-galactopyranosyl-(1→4)- 2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosid 12

(β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-OHexNH₂)

30 mg (62,2 μmol) Disaccharid **9** werden in 30 ml 20 mM Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) gelöst. Der Puffer enthält 21 mg Rinderserumalbumin, 1,7 mM NaN₃, 1 mM MnCl₂, 63,4 mg (95,1 μmol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 120 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 300 mU GlcNAc-β-1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird 16 Stunden bei 25 °C inkubiert, wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH bei 7,0 gehalten wird. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1) wird MnCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 9,5 mM zugegeben und die Reaktionsmischung 24 Stunden bei 25 °C inkubiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Der Überstand wird lyophilisiert und das Pellet wird in ddH₂O aufgelöst. Das Gemisch wird durch Gelpermeationschromatographie (Säule: Hi Load Superdex 26/60; Eluent: 100 mM NH₄HCO₃; Flussrate 1,875 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm) getrennt und das Produkt wird lyophilisiert.

Ausbeute: 27,3 mg (67,3 %)

R_f = 0,29 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1)

C₂₆H₄₈N₂O₁₆ (644,66)

ESI-MS: M_{ber} = 644,3 M_{gef} = (645,37+H)⁺

¹H-NMR (360 MHz, D₂O, Aceton d₆ als interner Standard): δ = 4,74 (d, J_{1,2} < 1 Hz, 1H, H-1); 4,47 (d, J_{1,2} = 7,1 Hz, 1H, H-1'); 4,43 (d, J_{1,2} = 7,7 Hz, 1H, H-1''); 3,9 (m, 1H, H-2); 3,85 (dd, J_{gem} = 11,5 Hz, J_{vic} = 1,1 Hz, 1H, H-6a'); 3,8-3,7 (m, 3H, H-4'', H-6a, H-6b'); 3,68-3,59 (m, 7H, H-3, H-6a'', H-2', CH₂Oa, H-5'', H-4', H-6b''); 3,55-3,34 (m, 8H, H-3'', H-6b, H-5, H-5', H-2'', H-3', CH₂Ob, H-4,); 2,86-2,8 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂N₃); 1,91 (s, 3H, Ac); 1,53-1,50 (m, 4H, H-β); 1,27 (m, 4H, H-γ).

¹³C-NMR (90,5 MHz, D₂O, Aceton d₆ als interner Standard): δ = 175 C=O; 103,3 C-1''; 99,7 C-1'; 97,05 C-1; 78,95 C-2; 75,69 C-4'; 75,09 C-5'; 73,25 C-5; 72,88 C-3''; 72,28 C-5''; 71,29 C-2''; 70,07 C-3; 68,86 C-4''; 68,09 CH₂O; 67,6 C-4; C-3'; 61,89 C-6; 61,31 C-6''; 60,32 C-6'; 55,24 C-2'; 39,813 CH₂NH₂; 28,73 CH₂CH₂O; 27,3 CH₂CH₂N; 25,75 CH₂CH₂CH₂O; 25,33 CH₂CH₂CH₂N; 22,66 Ac.

3-(dithio-2-pyridyl)-propanoyl-6-aminohexyl-[O-(β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)- α -D-mannopyranosid] **13**

(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-OHexNH-CO-(CH₂)₂-S-S-py)

30 mg (44,1 μ mol) Disaccharid **10** werden in 30 ml 20 mM Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) gelöst. Der Puffer enthält 21 mg Rinderserumalbumin, 1,7 mM NaN₃, 1 mM MnCl₂, 46 mg (69 μ mol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 120 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 300 mU GlcNAc- β -1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird 16 Stunden bei 25 °C inkubiert, wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH bei 7,0 gehalten wird. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1) wird MnCl₂ zu einer Endkonzentration von 9,5 mM zugegeben und die Reaktionsmischung wird 7 Stunden bei 25 °C inkubiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Der Überstand wird lyophilisiert und das Pellet wird in ddH₂O aufgelöst. Das Gemisch wird durch Gelpermeationschromatographie (Säule: Hi Load Superdex 26/60; Eluent: 100 mM NH₄HCO₃; Flussrate 1,875 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm) getrennt und das Produkt wird lyophilisiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthalten werden in Wasser aufgelöst und über drei SepPak-Kartuschen Classic gegeben. Man wäscht mit 80 ml Wasser nach und eluiert mit 80 ml Methanol-Wasser 1:1. Anschließend wird das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 33,8 mg (97 %)

R_f (Edukt) = 0,76 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1)

R_f (Produkt) = 0,63 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 4:1)

C₃₄H₅₅N₃O₁₇S₂ (841,94)

ESI-MS: M_{ber} = 841,3 M_{gef} = 842,3 (M+H)⁺

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-D₂O): δ = 8,25 (m, 1H, py); 7,68 (m, 2H, py); 7,14 (m, 1H, py); 4,74 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1); 4,47 (d, $J_{1,2} = 7,57$ Hz, 1H, H-1'); 4,43 (d, $J_{1,2} = 7,75$ Hz, 1H, H-1''); 3,9 (m, 1H, H-2); 3,85 (dd, $J_{gem} = 11,69$ Hz, $J_{vic} < 1$ Hz, 1H, H-6a'); 3,8-3,59 (m, 10H, H-4'', H-6a, H-6b', H-3, H-6a'', H-2', CH₂Oa, H-5'', H,4', H-6b''); 3,55-3,34 (m, 8H, H-3'', H-6b, H-5, H-5', H-2'', H-3', CH₂Ob, H-4); 2,9 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH₂N₃); 2,8 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H, CH₂S); 2,5 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH₂CO); 1,91 (s, 3H, Ac); 1,45 (m, 2H, CH₂CH₂O); 1,35 (t, $J = 6,09$ Hz, 2H, CH₂CH₂N); 1,2 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂O, CH₂CH₂CH₂O).

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): $\delta = 179,68$; $165,38$ C=O; $149,32$; $138,92$; $122,18$; $121,5$ py; $103,16$ C-1''; $99,68$ C-1'; $96,96$ C-1; $78,66$ C-2; $76,73$ C-4'; $75,58$ C-5'; $74,97$ C-5; $73,08$ C-3''; $72,74$ C-5''; $72,29$ C-2''; $71,2$ C-3; $68,77$ C-4''; $68,17$ CH_2O ; $67,5$ C-4; C-3'; $61,74$ C-6; $61,25$ C-6''; $60,17$ C-6'; $55,44$ C-2'; $39,55$ CH_2N ; $34,73$ $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$; $33,96$ $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{S}$; $28,72$ $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}$; $28,28$ $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{N}$; $25,28$ $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$; $25,19$ $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$; $22,57$ Ac.

*6-Aminohexyl O-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-mannopyranosid **14***

(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-OHexNH₂)

7,12 mg (11,67 μmol) Disaccharid **9** werden in 0,433 ml 20 mM Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) gelöst. Der Puffer enthält 0,4 mg Rinderserumalbumin, 1,78 mM NaN_3 , 1 mM MnCl_2 , 7,12 mg (11,67 μmol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 3,25 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 79 mU GlcNAc- β -1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird 16 Stunden bei 26 °C inkubiert, wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH bei 7,4 gehalten wird. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) werden 7,7 mg (11,7 μmol) Cytidin-5'-monophospho-N-acetylneuraminsäure, 5 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 34,8 mU β -Galactosid- α -2,3-Sialyltransferase (EC 2.4.99.6) zugegeben und die Reaktion wird auf ein Endvolumen von 866 μl verdünnt. Nach 24 Stunden bei 26 °C unter pH-Kontrolle (pH 7,4) werden weitere 1,6 mg (2,37 μmol) Cytidin-5'-monophospho-N-acetylneuraminsäure und 8,7 mU β -Galactosid- α -2,3-Sialyltransferase (EC 2.4.99.6) zugegeben. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) wird der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird lyophilisiert und das Pellet wird in ddH₂O aufgelöst. Das Gemisch wird durch Gelpermeationschromatographie (Säule: Hi Load Superdex 16/60; Eluent: 100 mM NH_4HCO_3 ; Flussrate 0,75 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm) getrennt und das Produkt wird lyophilisiert.

Ausbeute: 6,5 mg (77,3 %)

R_f (Disaccharid **9**) = 0,56 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f (Galactosid **12**) = 0,45 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f (Sialosid **14**) = 0,34 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

$C_{37}H_{65}N_3O_{24}$ (935,92)

ESI-MS: $M_{ber} = 935,92$ $M_{gef} = 934,44 M^+$

*3-(dithio-2-pyridyl)-propanoyl-6-aminohexyl-[O-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-mannopyranosid] **15***

(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-OHexNH-CO-(CH₂)₂-S-S-py)

7,87 mg (12,72 μ mol) Disaccharid **10** werden in 0,366 ml 20 mM Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) gelöst. Der Puffer enthält 0,5 mg Rinderserumalbumin, 1,78 mM NaN₃, 1 mM MnCl₂, 7,9 mg (12,7 μ mol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 3,7 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 64,4 mU GlcNAc- β -1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird 16 Stunden bei 26 °C inkubiert, wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH bei 7,4 gehalten wird. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) werden 7,7 mg (11,7 μ mol) Cytidin-5'-monophospho-N-acetylneuraminsäure, 5 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 34,8 mU β -Galactosid- α -2,3-Sialyltransferase (EC 2.4.99.6) zugegeben und die Reaktion wird auf Endvolumen von 896 μ l verdünnt. Nach 24 Stunden bei 26 °C unter pH-Kontrolle (pH 7,4) werden weitere 1,6 mg (2,37 μ mol) Cytidin-5'-monophospho-N-acetylneuraminsäure und 8,7 mU β -Galactosid- α -2,3-Sialyltransferase (EC 2.4.99.6) zugegeben. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) wird der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird lyophilisiert und das Pellet wird in ddH₂O aufgelöst. Das Gemisch wird durch Gelpermeationschromatographie (Säule: Hi Load Superdex 16/60; Eluent: 100 mM NH₄HCO₃; Flussrate 0,75 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm) getrennt und das Produkt wird lyophilisiert.

Ausbeute: 50 %

R_f (Disaccharid **10**) = 0,78 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f (Galactosid **13**) = 0,71 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f (Sialosid **15**) = 0,6 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

$C_{45}H_{72}N_4O_{25}S_2$ (1133,19)

ESI-MS: $M_{ber} = 1132,39$ $M_{gef} = 1131,44 M^+$; 566,06 M^{2+}

O-[(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-*O*-[(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-3,6-di-*O*-acetyl- α -*D*-mannopyranose **17**

(2,4-(β -Ac₃GlcNPht)₂- α -Ac₂Man-OH)

1,35 g (1,139 mmol) Benzylglykosid **16** (123) werden in 62 ml absolutem Methanol und 9 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Man gibt 4 ml Essigsäure und 0,94 g (7,39 mmol) Palladiumoxid-Hydrat zu. Nachdem der Kolben gründlich mit Argon gespült wurde, wird die Reaktion unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC: Cyclohexan/Aceton 1:1) wird der Katalysator abfiltriert und dreimal mit Aceton gewaschen. Die organischen Phasen werden vereinigt, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 400 ml Dichlormethan gelöst und mit gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1 g (80,4 %)

R_f = 0,25 (Cyclohexan/Aceton 1:1)

C₅₀H₅₄N₂O₂₆ (1098,96)

ESI-MS: M_{ber} = 1098,3 M_{gef} = 1121,38 (M+Na)⁺

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7,92- 7,62 (m, 8H, Pht); 5,7-5,58 (m, 2H, H-3', H-3''); 5,4 (d, $J_{1,2}$ = 8,39 Hz, 1H, H-1''); 5,34 (d, $J_{1,2}$ = 8,59 Hz, 1H, H-1'); 5,02-4,9 (m, 3H, H-4', H-4'', H-3); 4,53 (d, $J_{1,2}$ < 1 Hz, 1H, H-1); 4,27-4,18 (m, 2H, H-6a'', H-6a'); 4,12- 4,38 (m, 6H, H-5'', H-2', H-5', H-2'', H-2, H-6b''); 3,66-3,52 (m, 2H, H-6a, H-4); 3,06- 2,98 (m, 2H, H-6b, H-5); 2,09; 2,06; 2,03; 2,0; 1,99; 1,79; 1,76; 1,49 (8s, 24H, Ac).

¹³C-NMR (90,56 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 170,13; 170,11; 169,6; 169,58; 169,51; 169,23; 168,96; 167,62 C=O; 135,09; 134,71 C-4/5 Pht; 130,57; 130,38 C-1/2 Pht; 123,73; 123,26 C-3/6 Pht; 96,61 C-1''; 96,31 C-1'; 90,58 C-1; 74,71 C-2; 72,75 C-4; 70,74; 70,58 C-5'; C-5''; 70,07 C-3; 69,73; 69,66 C-3''; C-3'; 68,65; 68,28 C-4''; C-4'; 66,83 C-5; 62,16 C-6; 61,78 C-6'; C-6''; 54,56 C-2''; 53,81 C-2'; 20,512; 20,39; 20,14; 20,01; 19,69 Ac.

O-{*O*-[(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-*O*-[(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-3,6-di-*O*-acetyl- α -*D*-mannopyranosyl}-trichloracetimidat **18**

(2,4-(β -Ac₃GlcNPht)₂- α -Ac₂Man-TCAI)

1,006 g (915,4 μ mol) Trisaccharid **17** und 0,85 ml (8,36 mmol) Trichloracetonitril werden in 10 ml absolutem Dichlormethan gelöst und bei 0 °C unter Argonatmosphäre 10 Minuten gerührt. Danach werden 42,7 μ l (285,5 μ mol) 1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en tropfenweise zugegeben und das Reaktionsgemisch wird weiter bei 0 °C 1 Stunde gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC: Cyclohexan/Aceton 1:1) wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und zweimal mit gesättigter KHCO₃-Lösung und Wasser extrahiert. Man trocknet über MgSO₄ und engt ein. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 2:1 \rightarrow 1:1; Säulendurchmesser: 5,5 cm; Füllhöhe: 12 cm) gereinigt.

Ausbeute: 1,07 g (93,7 %)

R_f = 0,37 (Cyclohexan/Aceton 1:1)

[α]_D²³ = 11,79° (0,25; Dichlormethan)

C₅₂H₅₄Cl₃N₃O₂₆ (1243,35)

ESI-MS: M_{ber} = 1241,21 M_{gef} = 1266,31 (M+Na)⁺

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7,89-7,71 (m, 8H, Pht); 5,69 (d, $J_{1,2} < 1,0$ Hz, 1H, H-1); 5,63 (dd, $J_{2,3} = 13,8$ Hz, 1H, H-3''); 5,61 (dd, $J_{2,3} = 12,69$ Hz, 1H, H-3'); 5,49 (d, $J_{1,2} = 11,8$, 1H, H-1'); 5,46 (d, $J_{1,2} = 15,4$, 1H, H-1''); 5,02 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,58$ Hz, 1H, H-4'); 4,98 (dd, $J_{3,4} = J_{4,3} = 9,3$ Hz, 1H, H-4''); 4,93 (dd, $J_{2,3} = 3,06$ Hz, $J_{3,4} = 9,17$ Hz, 1H, H-3); 4,29-4,2 (m, 3H, H-2, H-6a', H-6a''); 4,13-4,05 (m, 2H, H-2', H-5''); 4,02-3,95 (m, 3H, H2'', H-5', H-6b'); 3,86 (dd, $J_{gem} = 11,43$ Hz, $J_{vic} < 1$ Hz, 1H, H-6b''); 3,79 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,58$ Hz, 1H, H-4); 3,72 (dd, $J_{gem} = 11,5$ Hz, $J_{vic} < 1$ Hz, 1H, H-6a); 3,61 (m, 1H, H-5); 3,14 (m, 1H, H-6b); 2,07; 2,04; 2,03; 2,0; 1,98; 1,78; 1,73; 1,42 (8s, 24H, Ac).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 170,1; 170,08; 169,64; 169,58; 169,41; 169,21; 168,84; 167,45 C=O; 156,68 C=NH; 135,15; 134,85 C-4/5 Pht; 130,35 C-1/2 Pht; 123,74; 123,48 C-3/6 Pht; 96,88 C-1''; 96,47 C-1'; 93,39 C-1; 72;26 C-2; 71,81 C-4; 70,89 C-5'; 70,71 C-5''; 69,82 C-3'; 69,75 C-5; 69,63 C-3; 68,61 C-3''; 68,35 C-4'; 68,17 C-4''; 61,74

C-6''; 61,68 C-6'; 61,1 C-6; 54,48 C-2''; 53,77 C-2'; 20,46; 20,44; 20,42; 20,39; 20,37; 20,10; 19,99; 19,48 Ac.

6-Azidohexyl O-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)]-O-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)]-3,6-di-O-acetyl-α-D-mannopyranosid 19

(2,4-(β-Ac₃GlcNPht)₂-α-Ac₂Man-OHexN₃)

218 mg (175,33 μmol) Trichloracetimidat **18** und 134 mg Azidohexanol werden in 3,27 ml absolutem Dichlormethan gelöst und 15 Minuten bei - 15 °C gerührt. Man gibt innerhalb von 2 Stunden 8 μl (8,2 μmol) TMSOTf zu und lässt 4 Stunden rühren (DC: Cyclohexan/Aceton 1:1). Die organische Phase wird zweimal mit gesättigter KHCO₃-Lösung und Wasser extrahiert. Man trocknet über MgSO₄ und engt ein. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 2:1; Säulendurchmesser: 3,5 cm; Füllhöhe: 12 cm) gereinigt.

Ausbeute: 113 mg (52,6 %)

R_f = 0,44 (Cyclohexan/Aceton 1:1)

[α]_D²³ = 14,75° (0,2, Dichlormethan)

C₅₆H₆₅N₅O₂₆ (1224,13)

ESI-MS: M_{ber} = 1223,39 M_{gef} = 1246,51 (M+Na)⁺

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8,0-7,63 (m, 8H, Pht); 5,62 (m, 1H, H-3'); 5,6 (m, 1H, H-3''); 5,41 (d, J_{1',2''} = 8,5 Hz, 1H, H-1''); 5,37 (d, J_{1',2'} = 8,5 Hz, 1H, H-1'); 5,04-4,92 (m, 2H, H-4'', H-4'); 4,79 (dd, J_{2,3} = 3,9 Hz, J_{3,4} = 9,6 Hz, 1H, H-3); 4,29 (d, J_{1,2} < 1 Hz, 1H, H-1); 4,24-4,18 (m, 2H, H-6a', H-6a''); 4,4,14-3,94 (m, 6H, H-5', H-2'', H-2, H-5'', H-6b'', H-2'); 3,89-3,61 (m, 3H, H-6b', H6b, H-4); 3,37-3,28 (m, 3H, H-5, CH₂O); 3,2-3,05 (m, 2H, CH₂N₃, H-6a); 2,07; 2,06; 2,05; 2,04; 2,017; 1,99; 1,79; 1,75 (8s, 24H, Ac); 1,52-1,41 (m, 4H, CH₂CH₂N, CH₂CH₂O); 1,34-1,15 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂N, CH₂CH₂CH₂O).

¹³C-NMR (90,56 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 170,15; 170,01; 169,7; 169,48; 169,27; 169,16; 168,94 C=O; 135,1; 134,8 C-4/5 Pht; 130,49; 130,38 C-1/2 Pht; 123,72; 123,2 C-3/6 Pht; 96,8 C-1''; 96,6 C-1'; 96,38 C-1; 73,7 C-2; 72,4 C-4; 70,8 C-5'; 70,7 C-5''; 70,6 C-3; 69,8 C-3''; 69,7 C-3'; 68,6 C-4'; 68,2 C-4''; 67,4 C-5; 67,2 CH₂O; 61,8 C-6; C-6''; C-6'; 54,53 C-2';

53,8 C-2''; 50,5 CH₂N₃; 28,31 CH₂CH₂O; 28,0 CH₂CH₂N; 25,8 CH₂CH₂CH₂N; 24,98 CH₂CH₂CH₂O; 20,5; 20,4; 20,1; 19,9; 19,6 Ac.

6-Azidohexyl O-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)]-O-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)]-α-D-mannopyranosid 20
(2,4-(β-GlcNAc)₂-α-Man-OHexN₃)

113 mg (92,31 μmol) Trisaccharid **19** werden in 2 ml *n*-Butanol und 0,54 ml Ethylendiamin gelöst und 39 Stunden bei 80 °C gerührt (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1). Die Reaktionsmischung wird anschließend eingengt, zweimal mit 30 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Rückstand wird in 20 ml Pyridin und 10 ml Essigsäureanhydrid aufgenommen. Nach 5 Stunden bei Raumtemperatur (DC: Dichlormethan/Methanol 10:1) engt man ein und codestilliert dreimal mit 30 ml Toluol. Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet und durch Flashchromatographie (Dichlormethan/Methanol 25:1, Säulendurchmesser: 3 cm, Füllhöhe: 9 cm) gereinigt. Die Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthalten werden vereinigt und eingengt. Der Rückstand wird in 10 ml Methylaminlösung (40 % in Wasser) gelöst und 67 Stunden bei Raumtemperatur (DC: Isopropanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 20 ml Wasser gelöst und über eine 2 g SepPak-Kartusche gegeben. Man wäscht mit 200 ml Wasser nach und eluiert das Produkt mit 200 ml Acetonitril-Wasser 1:9. Anschließend wird das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 38,8 mg (59,2 %)

R_f Amin = 0,65 (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f Peracetat = 0,43 (DC: Dichlormethan/ Methanol 10:1)

R_f Acetamid = 0,82 (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

[α]_D²³ = 11,32° (0,38, Methanol)

C₂₈H₄₉N₅O₁₆ (711,71)

ESI-MS: M_{ber} = 711,32 M_{gef} = 734,35 (M+Na)⁺

¹H-NMR (360 MHz, D₂O, Aceton d₆ als interner Standard): δ = 4,71 (d, J_{1,2} < 1 Hz, 1H, H-1); 4,4 (d, J_{1',2'} = 8,57 Hz, 1H, H-1'); 4,37 (d, J_{1'',2''} = 8,7 Hz, 1H, H-1''); 3,91 (dd, J_{1,2} < 1 Hz, J_{2,3} < 1 Hz, 1H, H-2); 3,82-3,73 (m, 3H, H-3, H-6ax, H-6ax); 3,68-3,2 (m, 16H, H-6a, H-6bx,

H-6bx, H-2'', CH₂Oa, H-2', H-4, H-5, H-6b, H-3', H-3'', CH₂Ob, H-5x, H-4', H-4'', H-5x); 3,17 (t, J = 6,79 Hz, CH₂N₃); 1,92, 1,91 (2s, 6H, Ac); 1,45 (m, 4H, H-β); 1,25 (m, 4H, H-γ).

¹³C-NMR (90,56 MHz, D₂O, Aceton d₆ als interner Standard): δ = 174,91; 174,36 C=O Ac; 101,92 C-1''; 100,02 C-1'; 96,87 C-1; 78,38 C-4; 76,35 C-2; 76,28 C-5x; 76,24 C-5x; 73,9 C-3''; 73,6 C-3'; 71,59 C-5; 70,27 C-4x; 70,12 C-4x; 68,78 C-3; 68,18 CH₂O; 61,35 C-6; 61,06 C-6x; 61,02 C-6x; 55,8 C-2''; 55,7 C-2'; 51,4 CH₂N₃; 28,79 C-β; 25,37 C-γ; 22,74; 22,47 Ac.

6-Aminohexyl O-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)]-O-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)]-α-D-mannopyranosid **21**
(2,4-(β-GlcNAc)₂-α-Man-OHexNH₂)

13 mg (18,27 μmol) Trisaccharid **20** werden in 1 ml Wasser gelöst und mit 20 mg PdO-H₂O versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre stark gerührt. Nach 2,5 Stunden (DC: c wird der Katalysator abfiltriert und mehrmals mit Wasser nachgewaschen. Die vereinigten Wasserphasen werden lyophilisiert.

Ausbeute: 12,5 mg (99 %)

R_f = 0,45 (Cyclohexan/Aceton 1:1)

[α]_D²³ = 10,9° (0,35, MeOH)

C₂₈H₅₁N₃O₁₆ (685,72)

ESI-MS: M_{ber} = 685,33 M_{gef} = 686,42 (M+H)⁺

3-(dithio-2-pyridyl)-propanoyl-6-aminohexyl-[O-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)]-O-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)]-α-D-mannopyranosid] **22**
(2,4-(β-GlcNAc)₂-α-Man-OHexNH-CO-(CH₂)₂-S-S-py)

32 mg (46,69 μmol) Trisaccharid **21** und 69,5 mg (222,5 μmol) SPDP **28** werden in 7,5 ml absolutem MeOH gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) engt man ein. Der Rückstand wird in 80 ml Wasser gelöst und über zwei miteinander verbundene SepPak-Kartuschen Classic gegeben. Man wäscht mit 80 ml Wasser nach und eluiert das Produkt mit 60 ml Acetonitril-Wasser 1:9. Anschließend wird das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 19,9 mg (48,4 %)

$R_f = 0,74$ (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

$[\alpha]_D^{23} = 7,5^\circ$ (0,08, Methanol)

$C_{36}H_{58}N_4O_{17}S_2$ (882,99)

ESI-MS: $M_{ber} = 882,32$ $M_{gef} = 905,27$ (M+Na)⁺

¹H-NMR (360 MHz, D₂O, DMSO als interner Standard): $\delta = 8,25-8,24$ (m, 1H, Py); 7,7-7,65 (m, 2H, Py); 7,18-7,12 (m, 1H, Py); 4,66 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1); 4,36 (m, 1H, H-1'); 4,33 (m, 1H, H-1''); 3,89 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2); 3,8-3,7 (m, 3H, H-3, H-6ax, H-6ax); 3,79-3,2 (m, 16H, H-6a, H-6bx, H-6bx, H-2'', CH₂Oa, H-2', H-4, H-5, H-6b, H-3', H-3'', CH₂Ob, H-5x, H-4', H-4'', H-5x); 2,96 (t, $J = 6,62$ Hz, 2H, CH₂N); 2,9 (t, $J = 6,65$ Hz, 2H, CH₂S); 2,47 (t, $J = 6,65$ Hz, CH₂CO); 1,92; 1,9 (2s, 6H, Ac); 1,43-1,17 (m, 8H, H- β , H- γ).

¹³C-NMR (90,56 MHz, D₂O, DMSO als interner Standard): $\delta = 174,3$; 173,86; 173,04 C=O; 148,59; 138,19; 121,6; 121,44; 120,74 Py; 101,08 C-1''; 99,198 C-1'; 96,03 C-1; 77,58 C-4; 75,56 C-2; 75,4 C-5x; 75,33 C-5x; 73,05 C-3''; 72,82 C-3'; 70,74 C-5; 69,39 C-4x; 69,24 C-4x; 67,89 C-3; 67,49 CH₂O; 60,56 C-6; 60,21 C-6x; 60,13 C-6x; 54,84 C-2''; 54,61 C-2'; 38,84 CH₂N₃; 34,03 CH₂CO; 33,24 CH₂S; 27,95 C- β ; 27,59 C- β ; 25,29; 24,57 C- γ ; 21,89; 21,64 Ac.

*6-Aminoethyl O-[(β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-O-[(β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]- α -D-mannopyranosid **23***
(2,4-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OHexNH₂)

10 mg (14,58 μ mol) Trisaccharid **21** werden in 30 ml 20 mM Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) gelöst. Der Puffer enthält 7,5 mg Rinderserumalbumin, 640 μ M NaN₃, 1 mM MnCl₂, 28 mg (42 μ mol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 12 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 100 mU GlcNAc- β -1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird bei 23 °C inkubiert wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH bei 7,0 gehalten wird. Nach 42 Stunden werden weitere 25 mU GlcNAc- β -1,4-Galactosyltransferase

(E.C. 2.4.1.22) zugegeben und es wird nochmals 24 Stunden bei 23 °C inkubiert. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) wird MnCl_2 bis zu einer Endkonzentration von 9,5 mM zugegeben und die Reaktionsmischung 24 Stunden bei 23 °C inkubiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Der Überstand wird lyophilisiert und das Pellet wird in ddH₂O aufgelöst. Das Gemisch wird durch Gelpermeationschromatographie (Säule: Hi Load Superdex 26/60; Eluent: 100 mM NH_4HCO_3 ; Flussrate 1,875 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm) getrennt und das Produkt wird lyophilisiert.

Ausbeute: 9,5 mg (64,5 %)

R_f (Edukt) = 0,06 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f (Produkt) = 0,03 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

$\text{C}_{40}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_{26}$ (1010)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 1009,43$ $M_{\text{gef}} = 1010,45$ (M+H)⁺

3-(dithio-2-pyridyl)-propanoyl-6-aminohexyl-[O-[(β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)]-O-[(β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)]-α-D-mannopyranosid] 24
(2,4-(β-Gal-1,4-β-GlcNAc)₂-α-Man-OHexNH-CO-(CH₂)₂-S-S-py)

2,5 mg (2,8 μmol) Trisaccharid **22** werden in 1,4 ml 20 mM Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) gelöst. Der Puffer enthält 1 mg Rinderserumalbumin, 1,78 mM NaN_3 , 1 mM MnCl_2 , 5 mg (8,2 μmol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 10 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 120 mU GlcNAc-β-1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird 15 Stunden bei 23 °C inkubiert, wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH bei 7,2 gehalten wird. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) wird MnCl_2 bis zu einer Endkonzentration von 9,5 mM zugegeben und die Reaktionsmischung wird 24 Stunden bei 23 °C inkubiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Der Überstand wird lyophilisiert und das Pellet in ddH₂O aufgelöst. Das Gemisch wird durch Gelpermeationschromatographie (Säule: Hi Load Superdex 26/60; Eluent: 100 mM NH_4HCO_3 ; Flussrate 1,875 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm) getrennt und das Produkt wird lyophilisiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthalten werden im Wasser gelöst und durch zwei miteinander verbundene SepPak-Kartuschen Classic gereinigt. Man wäscht mit 80 ml Wasser nach und eluiert das Produkt mit 60 ml 50 % MeOH (aq). Anschließend wird das Produkt eingengt und lyophilisiert.

Ausbeute: 3,65 mg (22,3 %)

R_f (Edukt) = 0,86 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f (Produkt) = 0,61 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

[α]_D²³ = 26,2° (0,1, Wasser)

C₄₈H₇₈N₄O₂₇S₂ (1207,27)

ESI-MS: M_{ber} = 1206,43 M_{gef} = 1207,5 (M+H)⁺

¹H-NMR (360 MHz, D₂O): δ = 8,26 (m, 1H, py); 7,72-7,57 (m, 2H, py); 7,16 (m, 1H, py); 4,7 (d, J_{1,2} < 1 Hz, 1H, H-1); 4,43 (d, 1H, H-1'); 4,4 (d, J_{1,2} = 8,5 Hz, 1H, H-1'); 4,33 (d, J_{1,2} = 7,28 Hz, 2H, H-1''', H-1'''''); 3,91-3,38 (m, ?H, H-2, H-6a', H-6a'', H-3, H-4''', H-4''''', H-6b', H-6b'', H-2'', H-6x, H-6x, H-2', H-5''', H-5''''', H-4'', H-3'', CH₂Oa, H-3', H-4', H-3''', H-3''''', H-4, H-5'', H-5, H6x, H6x, H-5', H-2''', H-2''''', CH₂Ob, H-6, H-6); 3,0 (m, 2H, CH₂N); 2,9 (m, 2H, CH₂S); 2,47 (m, 2H, CH₂CO); 1,9 (2s, 6H, Ac); 1,43-1,33 (m, 2H, H-β); 1,19 (m, 4H, H-γ).

¹³C-NMR (90,56 MHz, D₂O): δ = 175,1; 174,68; 173,89 C=O; 149,45; 139,23; 139,05; 122,29; 121,59 Py; 103,29; 103,26 C-1'''; C-1'''''; 101,85 C-1'; 99,87 C-1' ; 96,82 C-1; 78,83; 78,55 C-4'; C-4''; 78,32 C-4; 76,46 C-2; 75,69 C-5'''; C-5'''''; 75,16; 75,11 C-5''; C-5'; 72,83 C-4'''; C-4'''''; 72,55; 72,35 C-3''; C-3'; 71,61 C-5; 71,29 C-2'''; C-2'''''; 68,89 C-3; 68,73 C-3'''; C-3'''''; 68,33 CH₂O; 61,36; 60,37; 60,34 C6x; 55,46; 55,22 C-2''; C-2'; 39,67 CH₂N; 35,29 CH₂CO; 34,87 CH₂S; 28,79; 28,42 CH₂CH₂O; CH₂CH₂N; 26,15; 25,42; 24,99 CH₂CH₂CH₂O; CH₂CH₂CH₂N; 22,77; 22,49 Ac.

6-Aminohexyl O-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2→3)-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)]-O-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2→3)-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)]-α-D-mannopyranosid 25
(2,4-(α-Neu5Ac-2,3-β-Gal-1,4-β-GlcNAc)₂-α-Man-OHexNH₂)

3 mg (4,38 μmol) Trisaccharid **21** werden in 1,4 ml 20 mM Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) gelöst. Der Puffer enthält 1 mg Rinderserumalbumin, 1,78 mM NaN₃, 1 mM MnCl₂, 4,39 mg (7,2 μmol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 5 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 120

mU GlcNAc- β -1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird bei 26 °C inkubiert, wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH bei 7,0 gehalten wird. Nach 19 Stunden werden weitere 25 mU GlcNAc- β -1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22) und 3,03 mg (4,9 μ mol) Uridin-5'-diphosphogalactose zugegeben und es wird nochmals 13 Stunden bei 26 °C inkubiert. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) werden 5,53 mg (8,4 μ mol) Cytidin-5'-monophospho-N-acetylneuraminsäure und 53,3 mU β -Galactosid- α -2,3-Sialyltransferase (EC 2.4.99.6) zugegeben. Nach 12 Stunden bei 26 °C unter pH-Kontrolle werden weitere 3,46 mg (5,3 μ mol) Cytidin-5'-monophospho-N-acetylneuraminsäure und 11,6 mU β -Galactosid- α -2,3-Sialyltransferase (EC 2.4.99.6) zugegeben. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) wird der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird lyophilisiert und das Pellet wird in ddH₂O aufgelöst. Das Gemisch wird durch Gelpermeationschromatographie (Säule: Hi Load Superdex 16/60; Eluent: 100 mM NH₄HCO₃; Flussrate 0,75 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm) getrennt und das Produkt wird lyophilisiert.

Ausbeute: 50 %

R_f (Trisaccharid **21**) = 0,54 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f (Digalactosid **23**) = 0,34 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f (Disialosid **25**) = 0,22 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

C₆₂H₁₀₅N₅O₄₂ (1592,51)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 1591,62$ $M_{\text{gef}} = 1590,79 M^+$; 794,89 M^{2+}

*3-(dithio-2-pyridyl)-propanoyl-6-aminohexyl-[O-[(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-O-[(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)- α -D-mannopyranosid] **26***

(2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OHexNH-CO-(CH₂)₂-S-S-py)

2,47 mg (2,8 μ mol) Trisaccharid **22** werden in 1,4 ml 20 mM Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) gelöst. Der Puffer enthält 1 mg Rinderserumalbumin, 1,78 mM NaN₃, 1 mM MnCl₂, 4,39 mg (7,2 μ mol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 5 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und

120 mU GlcNAc- β -1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird bei 26 °C inkubiert, wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH bei 7,0 gehalten wird. Nach 19 Stunden werden weitere 25 mU GlcNAc- β -1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22) und 3,03 mg (4,9 μ mol) Uridin-5'-diphosphogalactose zugegeben und es wird nochmals 13 Stunden bei 26 °C inkubiert. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) werden 5,53 mg (8,4 μ mol) Cytidin-5'-monophospho-N-acetylneuraminsäure und 53,3 mU β -Galactosid- α -2,3-Sialyltransferase (EC 2.4.99.6) zugegeben. Nach 12 Stunden bei 26 °C unter pH-Kontrolle werden weitere 3,46 mg (5,3 μ mol) Cytidin-5'-monophospho-N-acetylneuraminsäure und 11,6 mU β -Galactosid- α -2,3-Sialyltransferase (EC 2.4.99.6) zugegeben. Nach vollständiger Reaktion (DC: Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1) wird der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird lyophilisiert und das Pellet in ddH₂O aufgelöst. Das Gemisch wird durch Gelpermeationschromatographie (Säule: Hi Load Superdex 16/60; Eluent: 100 mM NH₄HCO₃; Flussrate 0,75 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm) getrennt und das Produkt wird lyophilisiert.

Ausbeute: 2,6 mg (52 %)

R_f (Trisaccharid **22**) = 0,68 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f (Digalactosid **24**) = 0,62 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

R_f (Disialosid **26**) = 0,5 (Isopropanol/ 1 M Ammoniumacetat 2:1)

C₇₀H₁₁₂N₆O₄₃S₂ (1789,78)

ESI-MS: M_{ber} = 1788,62 M_{gef} = 1787,82 M⁺; 893,38 M²⁺

6-Azidohexanol **27**

0,5 g (3,65 mmol) 1-Chlorhexanol und 1,47 g (22,5 mmol) NaN₃ werden in 10 ml DMSO bei 80 °C fünf Stunden (DC: Dichlormethan/ Ethylacetat 10:1) gerührt. Man gibt 100 ml Dichlormethan zu und extrahiert zwei mal mit 150 ml Wasser. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und im Hochvakuum eingeengt.

Ausbeute: 0,5 g (96,8 %)

R_f = 0,30 (Dichlormethan/ Ethylacetat 10:1)

C₆H₁₃N₃O (143,19)

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 4,2-4,37$ (t, $J = 5,2$, 1H, OH); 3,42-3,36 (t, $J = 6,21$, 5,35 1H, CH_2O); 3,34-3,29 (t, $J = 6,85$, 7,52 1H, CH_2N_3); 1,6-1,38 (m, 4H, H- β); 1,38-1,25 (m, 4H, H- γ).

3-(dithio-2-pyridyl)-propanoyl-6-aminohexanol **30**

0,208 g (1,45 mmol) Azidohexanol **27** und 22 mg $\text{Pd.H}_2\text{O}$ werden in 1 ml absolutem Methanol 2,5 Stunden bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre kräftig gerührt. Nach vollständiger Reaktion (Hexan/Aceton 2,5:1) wird der Katalysator abfiltriert, mit Methanol gewaschen und die organische Phasen werden eingengt. 20 mg des Rohproduktes werden zusammen mit 51 mg (0,163 mmol) SPDP **28** in 1 ml absolutem MeOH gelöst und bei Raumtemperatur 2,5 Stunde gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC: Cyclohexan/Aceton 1:1) wird eingengt und durch Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 1:1, Säulendurchmesser: 6 cm, Füllhöhe: 20 cm) gereinigt.

Ausbeute: 44,1 mg (92 %)

R_f (Azidohexanol **27**) = 0,4 (Hexan/Aceton 2,5:1)

R_f (Aminohexanol **29**) = 0,05 (Hexan/Aceton 2,5:1)

R_f (Aminohexanol **29**) = 0,05 (Cyclohexan/Aceton 1:1)

R_f (Produkt **30**) = 0,53 (Cyclohexan/Aceton 1:1)

$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ (314,47)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 314,11$ $M_{\text{gef}} = 315,34$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, $[\text{D}_6]$ - CDCl_3): $\delta = 8,43$ (m, 1H, py); 7,63 (m, 2H, py); 7,11 (m, 1H, py); 3,61 (t, 2H, CH_2O); 3,26 (dd, 2H, CH_2NH); 3,06 (t, 2H, CH_2S); 2,58 (t, 2H, CH_2CO); 1,67-1,35 (m, 8H, H- β , H- γ).

2.2.2 Absorptionsmessung und Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Absorptionsmessungen wurden mit einem Spektralphotometer (Beckmann DU 640, Beckmann, München) durchgeführt.

Die Absorbptionsmessung von Nukleinsäuren erfolgte in 1 ml bzw. 100 µl Quartzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm im Bereich von 220 bis 320 nm. Die molaren Konzentrationen konnten aus der Differenz ($A_{260\text{ nm}} - A_{320\text{ nm}}$) in ddH₂O berechnet werden. Dabei ist eine Absorptionseinheit (1 OD₂₆₀) als die Substanzmenge definiert, die in einem Volumen von 1 ml bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm die Extinktion 1 ergibt. 1 OD₂₆₀ entspricht etwa: 50 µg/ml dsDNA, 40 µg/ml ssRNA und 33 µg/ml ssDNA.

2.2.3 Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivitätsmessungen wurden in einem Szintillationszähler vom Typ LS 1801 (Beckman, München) oder Tri-Carb 2900TR (Packard, Dreieich) nach Cerenkov durchgeführt. Die Visualisierung von radioaktiv markierten RNA-bzw. DNA-Banden in Polyacrylamidgelen nach der Elektrophorese wurde mit einem Instant Imager Electronic Autoradiography-System 2024 (Hewlett Packard, Meriden, USA) durchgeführt und mittels entsprechender Software ausgewertet. Dabei wurden Zerfälle pro Minute (cpm) detektiert.

2.2.4 Spektroskopische Methoden

2.2.4.1 Elektrospraymassenspektrometrie

ESI-MS Messungen wurden auf einem LCT ESI-TOF-MS Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK), das mit einer Agilent HP 1100 HPLC mit Dioden-Array-Detektor gekoppelt war durchgeführt. Die Einstellungen waren (in der Regel) wie folgt: Kapillarenspannung 3200 V, *sample cone* Spannung 20 - 80 V, *extraction cone* Spannung 3 – 5 V, *RF-Lens* Spannung 300 V, RF DC Offset 1: 5 V, RF DC Offset 2: 3 V, Acceleration 200 V. Die Temperatur des Desolvatisierung-Gases wurde auf 150 °C und der Quelle auf 120 °C eingestellt. Der Direkteinlass wurde über eine Spritzenpumpe durchgeführt. Sowohl für einen Direkteinlass als auch für HPLC-MS Läufe wurden ausschließlich Wasser, Acetonitril, Methanol oder Gemische davon benutzt.

2.2.4.2 NMR

NMR-Spektren wurden an einem Jeol JNM-EX-270-FT-Spektrometer, einem Bruker Avance-360 und Bruker Avance DRX-500-FT-Spektrometer gemessen. Als Lösungsmittel und interner Standard wurden $[D_6]$ -DMSO ($\delta(^1H) = 2,49$ ppm; $\delta(^{13}C) = 39,5$ ppm), CD_3CN ($\delta(^1H) = 1,939$ ppm; $\delta(^{13}C) = 1,3$ ppm), bzw. D_2O verwendet. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm) und wurden in ppm Kopplungskonstanten J in Hertz angegeben. Die Zuordnung erfolgte anhand von Spektrensätzen bestehend aus 1H , ^{13}C , HH-COSY, HH-TOXY, NOESY, HMQC-COSY und HMQC-TOCSY Experimenten.

Die Zuordnung der NMR-Spektren wurde nach der Konvention in Abbildung 3 getroffen. Bei Teilstrukturen wurde die Nummerierung beibehalten:

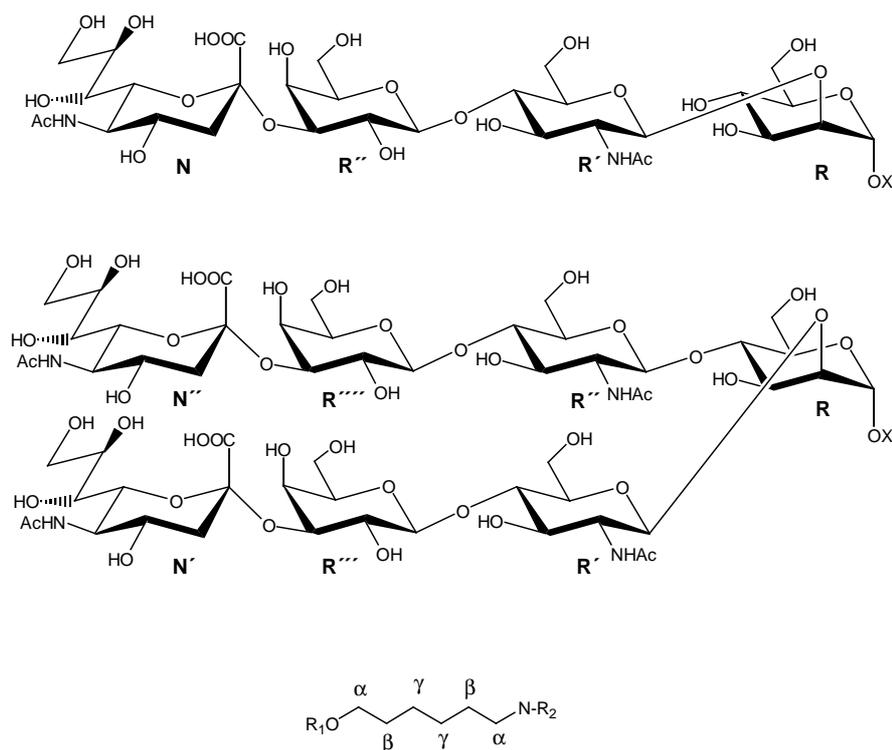


Abb. 3 Nummerierung der synthetisierten Oligosaccharide. Die Nummerierung wurde auch bei Teilstrukturen beibehalten.

2.2.4.3 Drehwertmessung

Spezifische Drehwerte wurden an einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 bei 589 nm in 5 ml Küvetten der Länge 10 cm bestimmt.

2.2.5 Chromatographische Verfahren

2.2.5.1 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfertigfolien „Alugram Sil G/UV₂₅₄“ (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenz unter UV-Licht bei 254 nm und/oder Eintauchen in eine Kohlenhydratspezifische Anfärbereagenz und nachfolgendem Erhitzen im Heißluftstrom. Zum Anfärben von Kohlenhydraten wurde ein Kohlenhydrat-spezifisches Anfärbereagenz (1:1-Mischung von 2 N H₂SO₄ und 0,2 %-iger ethanolischer Resorcinmonomethyletherlösung) verwendet.

2.2.5.2 Flashchromatographie

Zur Flachchromatographie wurde Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt) mit einer Korngröße von 0,04 - 0,063 mm (230 - 400 mesh ASTM) verwendet. Der Stickstoffdruck betrug 1,5 - 2,0 bar. Die angegebenen Mischungsverhältnisse verstehen sich als Volumenanteile.

2.2.5.3 Gelpermeationschromatographie

Die Trennung wurde an einer Pharmacia LKB Gradientenpumpe 2249 mit einem Pharmacia LKB Detektor VWM 2141 durchgeführt. Detektiert wurde bei 214 nm und bei 254 nm. Als Trennsäulen kamen Pharmacia HiLoad Superdex 30 (600 x 16 mm) und Pharmacia HiLoad Superdex 75 (600 x 26 mm) Säulen zum Einsatz. Als Lösungsmittel diente 0,1 M Ammoniumbicarbonat-Puffer.

2.2.6 Gelelektrophoretische Verfahren

2.2.6.1 Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese wurde für die analytische und präparative Auftrennung von DNA verwendet. Es wurden je nach der Größe der DNA-Fragmente 1 - 2 %-ige (w/v) Agarosegele in 0,5 x TBE-Puffer mit 0,03 % (w/v) Ethidiumbromid verwendet. Die DNA-Probe wurde mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 20 - 40 min bei 100 V. Als Standard wurde eine PeqGOLD 100 bp DNA-Leiter (PeqLab, Erlangen) oder der 1 kb DNA Marker (NEB) verwendet. Die Detektion der DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator durch Anregung der Fluoreszenz von in die DNA interkaliertem Ethidiumbromid durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm.

2.2.6.2 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen wurde mittels vertikaler Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden nach den jeweiligen Erfordernissen unterschiedliche Volumina einer Acrylamid-Stammlösung (38 % (w/v) Acrylamid + 2 % (w/v) Bisacrylamid) und Harnstoff (Endkonzentration 8 M) in TBE-Puffer (89 mM Tris (pH = 8,4 bei 25 °C), 89 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA,) kurz vor der Verwendung zusammengemischt. Die Polymerisation wurde durch 0,1 % (v/v) TEMED und 0,08 % (w/v) APS gestartet. Nach der vollständigen Polymerisation erfolgte für 30 min die Präelektrophorese bei 35 W. Zur gleichmäßigen Wärmeverteilung wurde eine Aluminiumplatte an die Gelplatten angebracht. Die Proben wurden mit Probenpuffer für denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese versetzt, aufgetragen und durch Elektrophorese bei 35 W aufgetrennt. Die Gelelektrophorese-Dauer wurde je nach der Gelgröße, angelegter Spannung und Acrylamidkonzentration gewählt (Tab. 1). Nach erfolgter Auftrennung wurden die DNA- und RNA-Fragmente durch Toluidinblau oder Stainsall Färbung, Radioaktivitätsmessung (Kapitel 2.2.3) bzw. "UV-Shadowing" (Kapitel 2.2.7) visualisiert.

Gelgröße (cm)	% Acrylamid	Spannung (V)	Dauer (min)
20 x 20 x 0,1	8-16	400	45-90
40 x 20 x 0,05	10-15	1000-1100	120-180
40 x 20 x 0,1	8-16	600-800	120 -180

Tab. 1 Elektrophoresebedingungen für Harnstoff-Polyacrylamidelektrophorese.

2.2.6.3 Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Die Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen wurde im *Mighty-Small-System* SE 200 (Hoefer Scientific Instr., San Francisco, USA) durchgeführt. Die Polymerisation der Gele (8 % Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 19:1)) im Laufpuffer für native Polyacrylamidgelelektrophorese (25 mM Tris/AcOH, 5 mM MgCl₂, pH ~ 7 bei 25 °C) wurde durch 0,05 % (v/v) TEMED und 0,05 % (v/v) APS gestartet. Die Elektrophorese erfolgte für 1 Stunde bei 4 °C und 100 V. Die RNA bzw. DNA Banden im Gel wurden durch Radioaktivitätsmessung nachgewiesen (Kapitel 2.2.3).

2.2.7 Detektion und Elution von RNA aus Polyacrylamidgelen

RNA-Banden wurden entweder durch „UV-Shadowing“ auf einer mit Cellulose- und Fluoreszenzindikator-beschichteten Platte oder durch deren radioaktive Markierung detektiert (Kapitel 2.2.3) und aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in etwa 2 Volumina 0,3 M NaOAc (pH 6,5 bei 25 °C) für 30 min bei - 70 °C eingefroren, zerkleinert und bei 4 °C oder Raumtemperatur für jeweils 3 - 6 Stunden bzw. über Nacht geschüttelt. Die RNA wurde so aus dem Gel durch Diffusion eluiert. Kleine Gelfragmente wurden abfiltriert und die RNA durch Zugabe von EtOH gefällt (Kapitel 2.2.8).

2.2.8 Phenolextraktion und Ethanolfällung von RNA und DNA

Die Entfernung von Proteinen und anderen Verunreinigungen von DNA (nach der PCR) bzw. RNA (nach der *in vitro* Transkription)-Lösungen wurde durch Extraktion mit einem Volumen TE-gesättigten Phenol (pH 7,5) durchgeführt. Um Phenolreste zu entfernen, wurde die wässrige Phase zwei mal mit Diethylether extrahiert. Nach der Verdampfung von Diethyletherresten bei 37 °C, wurden die Lösungen auf 0,3 M NaOAc (pH 6,5 bei 25 °C) eingestellt und durch die Zugabe von 2,5 Volumina 100 % EtOH bei - 70 °C (20 min) oder bei - 20 °C (2 - 12 Stunden) präzipitiert. Bei geringen DNA- oder RNA-Mengen wurden zusätzlich 35 µg/ml Glykogen pro 500 µl als „carrier“ zugegeben. Die Zentrifugation wurde in der Tischzentrifuge (Biofuge 13R, Heraeus, Osterode) bei 10 000 - 13 000 rpm und bei 4 °C 10 min durchgeführt, das Pellet mit 70 % (v/v) kaltem Ethanol gewaschen und nochmal 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde kurz im Vakuum oder an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

2.2.9 Isolierung und Reinigung von DNA

2.2.9.1 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde der „FlexiPrep Plasmid Purification Kit“ (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers verwendet. Eine 5 ml Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (Tischzentrifuge Eppendorf 5414, Hamburg) und das Bakterienpellet durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Die plasmidale DNA wurde in Gegenwart von Guanidinium-HCl an eine Glasoberfläche gebunden, mehrmals gewaschen und anschließend mit ddH₂O eluiert. Die so gewonnene Plasmid-DNA kann direkt zur Restriktionsanalyse (Kapitel 2.2.10.1), PCR (Kapitel 2.2.11) oder Sequenzierung eingesetzt oder bei - 20 °C bzw. - 70 °C gelagert werden.

2.2.9.2 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Um ein bestimmtes DNA-Fragment aus einem Gemisch von Fragmenten z. B. nach PCR oder Restriktionsendonuklease-Behandlung zu isolieren, wurde die DNA durch Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.6.1) aufgetrennt und das gewünschte Fragment ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Gel mittels des „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert. Dabei wird die Agarose in Gegenwart von Guanidinium-HCl gelöst und die DNA an eine Glas-Matrix gebunden. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA mit ddH₂O eluiert und kann direkt zur Ligation (Kapitel 2.2.10.2) eingesetzt oder bei - 20 °C bzw. - 70 °C gelagert werden.

2.2.10 Enzymatische Behandlung von DNA

2.2.10.1 Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse von aufgereinigten Plasmiden (Kapitel 2.2.9.1) mit Restriktionsendonukleasen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. In Regel wurde 1 µg DNA mit 5 U *EcoR* I oder *Hind* III für 60 - 180 min bei 37 °C inkubiert. Der Hydrolyseverlauf wurde durch Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.6.1) analysiert. Die geschnittene Plasmid-DNA wurde als DNA-Matrize für die *in vitro* T7-Transkription (Kapitel 2.2.13.1) verwendet.

2.2.10.2 Ligation

Der Einbau von einem DNA-Fragment in einen Vektor erfolgte durch Ligation mit der T4-DNA-Ligase aus dem „pGEM-T Vector System I Kit“ (Promega, Madison, USA). Die Ligation wurde in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Für die Reaktion wurden 25 ng linearisierten pGEM-T Vektor-DNA (Promega, Madison, USA), 200 ng aufgereinigtes DNA-Fragment (Kapitel 2.2.9.2) und 3U T4-DNA Ligase in Ligationspuffer (30 mM Tris/HCl (pH 7,8 bei 25 °C), 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 1 mM ATP, 5 % (v/v) Polyethylenglykol) bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Der komplette Ligationsansatz wurde ohne weitere Aufreinigung für die Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen (Kapitel 2.2.12) verwendet.

2.2.11 Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde in einem Volumen von 100 µl PCR-Puffer (10 mM Tris/HCL (pH 8,8 bei 25 °C); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,01 % (v/v) Triton X-100) im PCR Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Folgende Komponenten wurden eingesetzt: 0,5 µM Primer P45, 0,5 µM Primer P25, 200 µM dATP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 200 µM dCTP, 2 mU Taq-DNA-Polymerase und DNA-Matritze (1 µg Plasmid-DNA oder 0,2 µg 120 bp DNA). Die Amplifikation erfolgte nach einer Anfangsdenaturierung von 10 min für Plasmid-DNA und Zellen oder 1 min für 120 bp DNA-Fragment bei 95 °C in 20 bis 30 Zyklen von je 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 55 °C und 30 s Polymerisation bei 72 °C. Zur Vervollständigung der PCR-Produkte wurde am Ende noch einmal 5 min bei 72 °C inkubiert. Ein Aliquot von 7 µl direkt aus der PCR Reaktion wurde durch Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.6.1) analysiert. Die PCR Reaktion wurde anschließend nach Phenolextraktion einer Ethanol-fällung (Kapitel 2.2.8) unterzogen und bei - 20 °C bzw. - 70 °C in ddH₂O gelagert.

2.2.12 Transformation von *E. coli*

2.2.12.1 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen wurden nach der Mehr-Ionen-Technik (98) hergestellt. 100 ml LB-Medium wurde mit 1 ml Bakterienkultur (*E.coli* DH5α) inokuliert. Nach Erreichen einer

OD₆₀₀ von 0,3 - 0,4 wurden die Zellen sofort 2 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min durch Zentrifugation bei 7000 rpm und 4 °C, (Sorvall SS34-Rotor, Kühlzentrifuge Sorvall RC5B, Du Pont, Bad Hamburg) geerntet. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem TfB I Puffer (30 mM KAc/AcOH (pH 5,8 bei 25 °C), 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerol (v/v)) resuspendiert und 30 - 60 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml eiskaltem TfB II Puffer (10 mM Mops/NaOH (pH 7,0 bei 25 °C), 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerol (v/v)) aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Je 100 µl Aliquots der Zellsuspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 70 °C gelagert.

2.2.12.2 Transformation von *E.coli* DH5α Zellen durch Hitzeschock

Je 100 µl kompetente Zellen *E. coli* DH5α (Kapitel 2.2.12.1) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µg aufgereinigter Plasmid-DNA (Kapitel 2.2.9.1) oder einem kompletten Ligationsansatz (Kapitel 2.2.10.2) 30 min auf Eis inkubiert. Nach 90 s Hitzebehandlung bei 42 °C und Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen 45 - 60 min bei 37 °C (Thermostat Heizblock 5436 und 5320, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die Bakterien wurden in der Tischzentrifuge (Eppendorf 5414, Hamburg) 30 s abzentrifugiert und das Bakterien-Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Ein Teil der Bakteriensuspension oder der ganze Ansatz wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum, IPTG und X-Gal (Kapitel 2.1.5.2) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.13 Präparation der RNA

2.2.13.1 In vitro Transkription mit T7-RNA-Polymerase

Die zur *in vitro* Selektion eingesetzte RNA-Bibliothek sowie auch einzelne RNA-Aptamere wurden ausgehend von PCR-Produkten (Kapitel 2.2.11) oder gereinigten Plasmiden (Kapitel 2.2.9.1) durch *in vitro* Transkription hergestellt. Der starke T7-Promotor wurde durch den Primer P45 bei der PCR eingeführt. Die optimierten 100 µl-Ansätze enthielten 80 mM Hepes/NaOH (pH 8,1 bei 25 °C), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM GTP, 1 mM UTP, 1 mM CTP, 1 mM Spermidin, 10 mM DTT, 0,01 % (v/v) Triton X-100, 20 U rRNasin sowie 0,3 OD₂₆₀ (~ 15 µg) DNA Matrize. Für die radioaktive Markierung der RNA wurde 1 µCi [α -³²P] ATP oder 1 µCi [α -³²P] GTP zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl T7-

RNA-Polymerase (19,9 mg/ml) gestartet. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden 20 U DNase I (RNase-frei) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für weitere Stunde bei 37 °C. Nach Zugabe von EDTA (pH 7,5) zu einer Endkonzentration von 45 mM wurden die Ansätze in der Tischzentrifuge (Eppendorf 5414, Hamburg) kurz zentrifugiert und die im Überstand enthaltenen RNA-Fragmente wurden direkt mittels eines 8 % (v/v) denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (Kapitel 2.2.6.2). Die Produktbande wurde durch „UV-Shadowing“ (Kapitel 2.2.7) oder Radioaktivität (Kapitel 2.2.3) detektiert und ausgeschnitten. Die RNA wurde aus dem Gel eluiert (Kapitel 2.2.7) und gefällt (Kapitel 2.2.8). Die in ddH₂O aufgenommene RNA wurde bei - 20 °C bzw. - 70 °C gelagert.

2.2.14 Modifikation der RNA

2.2.14.1 Dephosphorylierung der RNA am 5'-Ende

Die Transkripte aus der *in vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase (Kapitel 2.2.13.1) enthielten am 5'-Ende ein Nukleotidtriphosphat, dessen Phosphate zunächst entfernt werden mussten. Dazu wurden in einem Volumen von 15 µl 10 µg RNA in 7 % (v/v) wässriger DMF-Lösung 1 Minute bei 90 °C denaturiert und sofort auf Eis (2 min) gestellt.

Es wurden 5 µl 10 x Puffer für alkalische Phosphatase (50 mM Tris/HCl (pH 8,5 bei 20 °C), 0,1 mM EDTA) und 30 U alkalische Phosphatase zugegeben. Der 50 µl-Ansatz wurde 3 Minuten auf Eis und anschließend 50 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einer Phenol- und Etherextraktion (Kapitel 2.2.8) wurde die RNA präzipitiert und gefällt (Kapitel 2.2.8). Bei der Fällung wurden 35 µg/ml Glykogen pro 500 µl als „carrier“ zugegeben.

2.2.14.2 Markierung der RNA und synthetisierter einzelsträngiger DNA am 5'-Ende

Die 5'-Markierung erfolgte in einem 12 µl-Ansatz mit 3 µg dephosphorylierter RNA (Kapitel 2.2.14.1) oder 100 pmol synthetisierter einzelsträngiger DNA in PNK- Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 8,2 bei 25 °C), 10 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM Spermidin), mit 30 - 50 µCi [γ -³²P] ATP und 10 U Polynukleotidkinase bei 37 °C für 35 Minuten. Nach der Zugabe von 2 nmol ATP wurde die Reaktion weitere 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Abkühlung auf Eis und gleichzeitige Zugabe von RNA-Probenpuffer für denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese wurde die Reaktion gestoppt, sofort auf ein 8 % (v/v) denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt (Kapitel 2.2.6.2). Die

eluierte (Kapitel 2.2.7) und mittels Glykogen präzipitierte RNA bzw. einzelstrangige DNA (Kapitel 2.2.8) wurde in ddH₂O aufgenommen und bei - 20 °C gelagert.

2.2.15 Untersuchung der RNA-Struktur mittels Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen

RNA-Aptamere wurden mit 5'-³²P-endmarkierten RNA-Aptameren (Kapitel 2.2.14.2) in 4 µl ddH₂O für 1 min bei 90 °C denaturiert und langsam in 15 min auf Raumtemperatur gebracht. Nach der Zugabe von 1 µl 5 x Selektionspuffer D (50 mM Tris/HCl (pH7,5 bei 25 °C), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) 15 min inkubiert. Danach wurden 2 µl des Probenpuffers für native Polyacrylamidgelelektrophorese zugegeben und die Proben mittels 8 %-igen Polyacrylamidgele unter nativen Bedingungen analysiert (Kapitel 2.2.6.3).

2.2.16 Sepharose Aktivierung

2.2.16.1 Bestimmung des Extinktionskoeffizientes von Dipyridyldisulphid bei 343 nm

Für die Bestimmung des Extinktionskoeffizientes von 2-Thiopyridon bei pH = 7,5 wurden unterschiedliche Dipyridyldisulphid-Konzentrationen mit 25 Äquivalenten DTT in Aktivierungspuffer (100 mM Tris/HCl (pH 7,5 bei 25 °C), 250 mM NaCl, 1 mM EDTA) 5 min bei 23 °C reduziert. Die Absorption von entstandenem 2-Thiopyridon wurde bei 342 nm (UV-Spektrophotometer Du 640, Beckmann, München) gemessen. Das Extinktionskoeffizient wurde aus der linearen Abhängigkeit der Absorption des entstandenen 2-Thiopyridons bei 342 nm von der 2-Thiopyridons-Konzentration bestimmt.

2.2.16.2 Aktivierung der Sepharose 6B mit Oligosacchariden, dem Spacer und Iodoacetamid

3,1 g Thiopropylaktivierte Sepharose 6B wurden in 50 ml ddH₂O über Nacht bei Raumtemperatur gequollen, dreimal mit 50 ml ddH₂O und sechsmal mit 50 ml Aktivierungspuffer (100 mM Tris/HCl (pH 7,5 bei 25 °C), 250 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend in Aktivierungspuffer (pH 7,5) bei Raumtemperatur äquilibriert. Die Sepharose wurde mit 20 mM DTT in entgastem Aktivierungspuffer (pH 7,5) bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Der Verlauf der Reduktion wurde durch UV-Messung

der Absorption des entstandenen 2-Thiopyridons bei 342 nm (UV-Spektrophotometer Du 640, Beckmann, München) verfolgt. Das Säulenmaterial wurde gründlich über eine Fritte mit Aktivierungspuffer (pH 7,5) gewaschen, bis keine Absorption im Bereich von 190 bis 500 nm mehr nachweisbar war. Die Thiopropyl-Sepharose 6B mit freien SH-Gruppen wurde aufgeteilt. 1/6 des Materials (~ 0,5 g) wurde jeweils mit 3 mg Trisaccharid **13**, 1,5 mg Tetrasaccharid **15**, 5 mg Pentasaccharid **24** und 2 mg Heptasaccharid **26** in 4 ml Aktivierungspuffer (pH 7,5) bei Raumtemperatur über Nacht umgesetzt. Der Rest des Materials (~ 1,1 g) wurde für die Aktivierung mit 3,3 mg Spacer **30** in 7,5 ml Aktivierungspuffer (pH 7,5) verwendet. Die Aktivierung wurde durch die Messung der Absorption des entstandenen 2-Thiopyridons bei 342 nm verfolgt. Das Säulenmaterial wurde gründlich über eine Fritte mit Aktivierungspuffer (pH 7,5) gewaschen bis keine Absorption im Bereich von 190 nm bis 500 nm nachweisbar war. Der Rest von freien SH-Gruppen wurde mit 500 mM Iodoacetamid in 100 % EtOH bei Raumtemperatur für 1 Stunde deaktiviert. Das Säulenmaterial wurde über eine Fritte mit 100 % EtOH gewaschen und die Absorption im Bereich von 190 bis 500 nm gemessen. Modifizierte Säulenmaterialien wurden in 5 % (v/v) EtOH (aq) bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.17 Aktivierung der Glasperlen

2.2.17.1 Silanisierung der Glasperlen und Nachweis von freien SH-Gruppen

300 mg Glasperlen wurden über Nacht in 1 ml wässriger 200 mM NaOH-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Auswaschen mit ddH₂O und 100 % EtOH wurden die Glasperlen im Vakuum (Vacuum-Concentrator BA-VC-300H, H.Saur, Reutlinger) für 40 Minuten bei 55 °C getrocknet. Die Glasperlen wurden mit unverdünnter (3-Mercaptopropyl)-trimethoxysilan-Lösung bei Raumtemperatur für 1 Stunde silanisiert (101). Danach wurden die Glasperlen gründlich mit 100 % EtOH gewaschen und für 2 Stunden bei 55 °C im Vakuum getrocknet. Der Nachweis von freien SH-Gruppen an der Glasoberfläche sowie im Überstand nach dem Waschen mit EtOH erfolgte mittels Ellmans Reagenz und der Absorptionmessung (UV-Spektrophotometer Du 640, Beckmann, München) bei 440 nm (102).

2.2.17.2 Modifizierung von Glasperlen mit Oligosacchariden und Iodoacetamid

300 mg frisch silanisierte Glasperlen (Kapitel 2.2.17.1) wurden in 300 µl Aktivierungspuffer (100 mM Tris/HCl (pH 7,0 bei 25 °C), 250 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit 0,75 mg Trisaccharid **13**, 3,31 mg Tetrasaccharid **15**, 1,15 mg Pentasaccharid **24** oder 0,45 mg Heptasaccharid **26** bei Raumtemperatur 17 Stunden modifiziert. Der Verlauf der Modifikation wurde durch UV-Messung (UV-Spektrophotometer Du 640, Beckmann, München) der Absorption des entstandenen 2-Thiopyridons bei 342 nm verfolgt. Nach gründlichem Auswaschen mit ddH₂O wurden die restlichen freien SH-Gruppen in 300 µl 420 mM Iodoacetamid-Lösung in EtOH bei Raumtemperatur für 1 Stunde deaktiviert und die Glasperlen gründlich mit 100 % EtOH gewaschen. Die modifizierten Glasperlen wurden in 5 % (v/v) EtOH (aq) bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.18 *In vitro* Selektion von RNA-Aptameren

2.2.18.1 Gewinnung der DNA-Ausgangsbibliothek

Die einzelsträngige DNA-Matrize zur Schaffung der Ausgangsbibliothek wurde nach der Phosphoamiditmethode synthetisiert und umfasste 50 Nukleotide (N50), die von Primerbindungsstellen einer definierten Sequenz flankiert wurden. Die DNA-Bibliothek kann theoretisch 4⁵⁰ verschiedene Moleküle enthalten. Synthesebedingt enthält die DNA-Bibliothek jedoch nur 10¹³ - 10¹⁵ verschieden Moleküle (48, 103).

2.2.18.2 Polymerasekettenreaktion

Die DNA-Ausgangsbibliothek sollte aus einer möglichst großen Anzahl verschiedener Sequenzen bestehen. Dazu wurden ausgehend von 1,62 µg (40,9 pmol) chemisch synthetisierter einzelsträngiger DNA-Matrize fünfzehn 100 µl PCR-Ansätze („1. Generation“) durchgeführt. Mit den Primern P45 und P25 wurde im ersten PCR-Zyklus die doppelsträngige DNA hergestellt, die in weiteren 18 PCR-Zyklen vervielfältigt wurde. Die PCR-Ansätze enthielten jeweils PCR-Puffer (10 mM Tris/HCL (pH 8,8 bei 25 °C); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,01 % (v/v) Triton X-100); 0,5 µM Primer P45; 0,5 µM Primer P25; 200 µM dATP; 200 µM dGTP; 200 µM dTTP; 200 µM dCTP; 2 mU Taq-DNA-Polymerase. Nach einer Anfangsdenaturierung von 1 min bei 90 °C wurde im PCR-Thermocycler (Biometra)

folgender PCR-Zyklus wiederholt: 30 s bei 90 °C, 30 s bei 55 °C, 30 s bei 72 °C. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 72 °C inkubiert und auf 4 °C abgekühlt. Nach der Reaktion wurden die Ansätze Phenol/Ether extrahiert und gefällt (Kapitel 2.2.8). Das Pellet wurde in ddH₂O aufgenommen und bei - 20 °C aufbewahrt. Für die Gewinnung der „2. Generation“ der Ausgangsbibliothek wurde das oben beschriebene Verfahren wiederholt. Ausgehend von 2,6 µg (32,8 pmol) DNA Matrize aus der „1. Generation“ wurden zwanzig 100 µl PCR-Ansätze mit 21 PCR-Zyklen durchgeführt.

2.2.18.3 *In vitro* Transkription

Die RNA-Bibliothek wurde für die *in vitro* Selektion durch *in vitro* Transkription synthetisiert (Kapitel 2.2.13.1). Als Matrize für die RNA-Ausgangsbibliothek dienten 87 µg (~ 1,1 nmol) der „2. DNA-Generation“ (Kapitel 2.2.18.2). Für jeden weiteren Selektionszyklus wurden als Matrize 0,25 A₂₆₀ des RT-PCR Produkts verwendet (Kapitel 2.2.18.6). Die RNA-Ausgangsbibliothek wurde in sechs und die RNA-Bibliothek für die nächsten Selektionszyklen in drei 100 µl-Transkriptionsansätzen pro Selektion transkribiert (Kap. 2.2.13.1). Die radioaktiv markierte und gereinigte RNA wurde in ddH₂O bei - 20 °C aufbewahrt.

2.2.18.4 Präselektion

Der Präselektionschritt diente der teilweisen Entfernung von RNA-Molekülen der verwendeten RNA-Bibliotheken, die an das Säulenmaterial unspezifisch binden. Eine Präselektion wurde deswegen als erster Schritt der *in vitro* Selektion bei allen Selektionszyklen durchgeführt. Das Säulenmaterial (Vorsäule) (Kapitel 2.2.16.2, 2.2.17.2) wurde gründlich mit ddH₂O gewaschen und im entsprechenden Selektionspuffer äquilibriert (Tab. 2). Die RNA-Bibliothek wurde in ddH₂O oder in Selektionspuffer C ohne divalente Metalionen denaturiert und entweder langsam auf Raumtemperatur oder sofort auf 4 °C abgekühlt. Die gefaltete RNA wurde danach auf die Endkonzentration von Selektionspuffer A, B oder C gebracht, äquilibriert und mit dem Säulenmaterial bei entsprechender Temperatur inkubiert. Nicht gebundene RNA wurde in mehreren Waschschritten vom Vorsäulenmaterial durch die Wegnahme des Überstandes im „batch“-Verfahren oder durch mehrfache kurzzeitige Zentrifugation (Tischzentrifugen Microfuge E und 5414, Eppendorf, Hamburg)

im „Filtrationssystem“ entfernt. Die Details einzelner Präselektionen sind genauer in Tabelle 2 angegeben.

Tab. 2 Die Zusammenfassung der Bedingungen in einzelnen Präselektionen.

Präselektion	1	2/1	2/2		3/1	3/2
Vorsäule Material	Sepharose 6B- Spacer 30 + IAA	Sepharose 6B- Spacer 30 + IAA	Silanisierte Glasperlen- IAA	Nicht modifizierte Sepharse 6B	Silanisierte Glasperlen- IAA (1.-3. SZ) Silan (4.-5. SZ)	Nicht modifizierte Sepharse 6B
Verfahren	„batch“	Filtration	Filtration	Filtration	Filtration	Filtration
Vorsäule	20 µl	110 µl	100 µl	100 µl	40 µl	100 µl
Waschen mit H ₂ O	2 x 500 µl	3 x 200 µl	3 x 200 µl	3 x 200 µl	4 x 500 µl	3 x 200 µl
Waschen mit Selektionspuffer	2 x 500 µl SPA	3 x 200 µl SPB	3 x 200 µl SPB	3 x 200 µl SPB	4 x 500 µl SPB	3 x 200 µl SPB
RNA Bibliothek	40 µg (1 A ₂₆₀)	40 µg (1 A ₂₆₀)	24 µg (0,6 A ₂₆₀)	16 µg (0,4 A ₂₆₀)	40 µg (1 A ₂₆₀)	12 µg (0,3 A ₂₆₀)
RNA Denaturation	in 75 µl ddH ₂ O 3 min, 85 °C	in 100 µl ddH ₂ O 3 min, 80 °C	in 100 µl ddH ₂ O 2 min, 80 °C	in 100 µl ddH ₂ O 2 min, 80 °C	in 200 µl SPC 3 min, 80 °C	in 200 µl SPC 3 min, 80 °C
c (RNA) bei der Denaturation	~16,7 µM	~12,5 µM	~7,5 µM	~5 µM	~ 6,3 µM	~1,9 µM
Renaturation	15 min, 25 °C	Sofort 5 min, 4 °C	Sofort 5 min, 4 °C	Sofort 5 min, 4 °C	15 min, 23 °C	15 min, 23 °C
Zugabe von	25 µl 4 x SPA	25 µl 5 x SPB	25 µl 5 x SPB	25 µl 5 x SPB	2 µl MgCl ₂ (0,1 mM) 2 µl CaCl ₂ (0,1 mM)	2 µl MgCl ₂ (0,1 mM) 2 µl CaCl ₂ (0,1 mM)
Inkubation	10 min, 25 °C	10 min, 21 °C	10 min, 23 °C	10 min, 23 °C	10 min, 23 °C	10 min, 23 °C
Inkubation mit dem Säulenmaterial	10 min, 25 °C	15 min, 21 °C	15 min, 23 °C	30 min, 23 °C	30 min, 23 °C	30 min, 23 °C
c(RNA) bei der Präselektion	~12,5 µM	~10 µM	~6 µM	~4 µM	~6,1 µM	~1,8 µM
Waschen mit Selektionspuffer	4 x 100 µl SPA	1 x 75 µl SPB	1 x 100 µl SPB	1 x 200 µl SPB	1 x 200 µl SPB	1 x 200 µl SPB
Endvolumen aus der Präselektion	500 µl	200 µl	225 µl	325 µl	404 µl	404 µl

2.2.18.5 Selektion

Das mit dem Ligand modifizierte Säulenmaterial (Selektionssäule) (Kapitel 2.2.16.2, 2.2.17.2) wurde mit ddH₂O gewaschen und im entsprechenden Selektionspuffer äquilibriert. Die gesamte RNA aus der Präselektion wurde mit dem äquilibrierten Säulenmaterial inkubiert und die nicht gebundene RNA in mehreren Waschschrinen durch die Wegnahme des Überstands im „batch“-Verfahren oder durch mehrfache kurzzeitige Zentrifugation (Tischzentrifugen Microfuge E und 5414, Eppendorf, Hamburg) im „Filtrationssystem“ entfernt. Die gebundene RNA wurde entweder in der Anwesenheit des Säulenmaterials oder erst nach der Elution des Oligosaccharid/RNA-Komplexes durch chemische Reduktion mit 20 mM DTT in Elutionspuffer und Ethanolpräzipitation mit Glykogen (Kapitel 2.2.8) in RT-PCR

(Kapitel 2.2.18.6) vermehrt und für den nächsten Selektionszyklus verwendet. Die Details einzelner *in vitro* Selektionen sind genauer in Tabelle 3 angegeben.

Tab. 3 Die Zusammenfassung der Bedingungen in einzelnen Selektionen.

Selektion	1	2/1	2/2		3/1	3/2
Selektionssäule Material	Sepharose 6B Trisaccharide (13) + IAA	Sepharose 6B- Oligosaccharide (13, 15, 24, 26) + IAA	Silanisierte Glasperlen- Oligosaccharide (13, 15, 24, 26) + IAA	Sepharose 6B- Oligosaccharide (13, 15, 24, 26) + IAA	Silanisierte Glasperlen- Oligosaccharide (13, 15, 24, 26) + IAA	Sepharose 6B- Oligosaccharide (13, 15, 24, 26) + IAA
Verfahren	„batch“	Filtration	Filtration	Filtration	Filtration	Filtration
Selektionssäule	20 µl	110 µl	100 µl	80 µl	50 µl	80 µl
Waschen mit H ₂ O	2 x 500 µl	3 x 200 µl	3 x 200 µl	3 x 200 µl	4 x 500 µl	3 x 200 µl
Waschen mit Selektionspuffer	2 x 500 µl SPA	3 x 200 µl SPB	3 x 200 µl SPB	3 x 200 µl SPB	4 x 500 µl SPB	3 x 200 µl SPB
RNA aus der Präselektion	500 µl	200 µl	225 µl	325 µl	404 µl	404 µl
Inkubation mit dem Säulenmaterial	10 min, 25 °C	30 min, 21 °C	30 min, 23 °C	90 min, 23 °C	18 h, 4 °C (1. SZ) 2,5 h, 4 °C (2.-5. SZ)	17 h, 4 °C (5.SZ) 2,5 h, 4 °C (6.SZ)
Waschen mit Selektionspuffer	3 x 100 µl SPA	3 x 200 µl SPB (1.-5. SZ.) 6 x 200 µl SPB (5.-9. SZ.)	3 x 200 µl SPB	4 x 200 µl SPB	4 x 200 µl SPB	4 x 200 µl SPB
RT-PCR mit dem Säulenmaterial	-	im 1.-5. SZ	-	-	-	-
Elution	5-8x 100 µl EPA 10-1 min, 25 °C	2 x 100 µl EPB 30 min, 21 °C	2 x 100 µl EPB 15 min, 23 °C	2 x 200 µl EPB 30 min, 23 °C	2 x 100 µl EPB 30 min, 23 °C	2 x 200 µl EPB 30 min, 23 °C

2.2.18.6 Reverse Transkription und Amplifikation

Die selektierte RNA wurde in Anwesenheit des Säulenmaterials oder nach der spezifischen Elution durch chemische Reduktion (Kapitel 2.2.18.5) und Ethanolpräzipitation (Kapitel 2.2.8) in einer reverse Transkription in einzelsträngige DNA überschrieben. Dabei wurde die gesamte RNA zusammen mit 3,33 µM Primer P25 in ddH₂O in einem Volumen von 60 µl für 1 min bei 80 °C denaturiert und langsam über 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe der übrigen Komponenten zu einer Endkonzentration von 50 mM Tris/HCl (pH 8,7 bei 25 °C), 47,5 mM KCl, 6 mM MgCl₂, je 0,5 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP wurde die 80 µl-Reaktion durch Zugabe von 40 U AMV-Reverse Transkriptase gestartet, 1,5 h bei 42 °C inkubiert und danach auf Eis gestellt.

Die gewonnene einzelsträngige DNA wurde in einer PCR-Reaktion vermehrt. Dazu wurden zu dem Ansatz aus der reversen Transkription 32 µl 10 x PCR-Puffer, 0,5 µM Primer P45, 4 µl einer 10 mM dNTP-Lösung und 10 U Taq-DNA-Polymerase zugegeben. Der Ansatz wurde durch Zugabe von ddH₂O auf 400 µl Endvolumen gebracht. Das gesamte Gemisch wurde

danach direkt in jeweils 100 µl PCR-Reaktionen aufgeteilt und die PCR-Reaktion wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben in 21 PCR-Zyklen durchgeführt.

Eine neue RNA-Bibliothek wurde durch eine *in vitro* Transkription der gebildeten PCR-Produkte synthetisiert (Kapitel 2.2.13.1) und für einen neuen Selektionszyklus verwendet.

2.2.18.7 Klonierung und Sequenzierung der DNA

Das entsprechende RT-PCR-Produkt der selektierten RNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.6.1) aufgereinigt und in pGEM-T Vektor ligiert (Kapitel 2.2.10.2). Nach der Transformation von *E.coli* DH5 (Kapitel 2.2.12.2) wurden einzelne weiße Kolonien für die Plasmidreinigung (Kapitel 2.2.9.1) ausgewählt und einzelne Klone sequenziert. Die Anwesenheit des Inserts wurde vorher bei den einzelnen Klonen durch PCR (Kapitel 2.2.11) oder durch Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen (Kapitel 2.2.10.1) überprüft. Die Plasmid-DNA wurden für die Sequenzierung an MWG-Biotech (Ebersberg) geschickt.

2.2.19 RNA-Sekundärstruktur Berechnung

Die Sekundärstruktur von einzelnen Aptameren wurde nach dem Algorithmus von Zuker (104) mit dem Computerprogramm „RNA Structure 3.7“ (<http://128.151.176.70/RNAstructure.html>) und „Mfold“ (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/form3.cgi>) analysiert.

2.2.20 Bindung der RNA-Aptamere an verschiedene Säulenmaterialien unter Selektionsbedingungen

RNA-Aptamere wurden bei der *in vitro* Transkription radioaktiv markiert (Kapitel 2.2.13.1), mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (Kapitel 2.2.6.2) aufgereinigt und präzipitiert (Kapitel 2.2.8).

Für jeden Bindungstest wurde 0,1 A₂₆₀ RNA 5G, 9G und 10G in 100 µl ddH₂O 2 min bei 80 °C denaturiert und langsam in 15 min auf 23 °C gebracht. Es wurden 25 µl 5 x Selektionspuffer A zugegeben und die RNA 10 min bei 23 °C äquilibriert.

0,1 A₂₆₀ RNA (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34) wurden in 100 µl Selektionspuffer C für 2,5 min bei 80 °C denaturiert und langsam in 15 min auf 23 °C gebracht. Es wurden MgCl₂ und CaCl₂ zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Probe wurde weitere 10 min bei 23 °C äquilibriert.

Folgende Säulenmaterialien wurden für spezifische und/oder unspezifische Bindung der RNA getestet: Sephadex G25, Sephacryl S200HR, Biogel P6, Superdex 200, nichtmodifizierte Sepharose 6B, Sepharose 6B modifiziert mit dem Trisaccharid **13** oder Heptasaccharid **26** (Kapitel 2.2.16.2), silanisierte Glasperlen (Kapitel 2.2.17.1), silanisierte Glasperlen modifiziert mit dem Trisaccharid **13** (Kapitel 2.2.17.2).

100 µl Säulenmaterial wurden im „Filtrationssystem“ gewaschen (4 x 200 µl ddH₂O, 4 x 200 µl Selektionspuffer A oder B) und für 30 min bei Raumtemperatur in entsprechendem Selektionspuffer äquilibriert. Die RNA wurde mit dem Säulenmaterial 60 min inkubiert, dabei dreimal durchmischt und der Überstand in der Tischzentrifuge (Eppendorf 5414, Hamburg) kurz abzentrifugiert. Danach wurden die Säulchen mit 200 µl Aliquots des entsprechenden Selektionspuffers durchmischt und der Überstand wurde kurz abzentrifugiert. An der Festphase gebundene Radioaktivität bzw. die Radioaktivität im abzentrifugierten Durchfluss wurde im Szintillationszähler mittels Cerenkov Verfahren (Kapitel 2.2.3) gemessen.

2.2.21 Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Bindung von RNA-Aptameren an die nichtmodifizierte Sepharose 6B

Der Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Bindung der RNA-Aptamere an die nichtmodifizierte Sepharose 6B wurde untersucht. Einzelne RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G wurden in der *in vitro* Transkription radioaktiv markiert (Kapitel 2.2.13.1), mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (Kapitel 2.2.6.2) aufgereinigt und präzipitiert (Kapitel 2.2.8).

Für jeden Bindungstest wurde 0,1 A₂₆₀ in 100 µl ddH₂O 2 min bei 80 °C denaturiert und langsam in 15 min auf Raumtemperatur gebracht. Es wurden 100 µl 2 x Puffer (100 mM Hepes/NaOH pH = 7,5; 10 mM MgCl₂ und verschiedene NaCl-Konzentrationen) zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur äquilibriert. 100 µl nichtmodifizierte Sepharose 6B wurden gewaschen (4 x 200 µl ddH₂O, 4 x der entsprechende Puffer) und im entsprechenden Puffer für 1 Stunde bei 23 °C äquilibriert.

Die RNA-Aptamere wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur mit nichtmodifizierter Sepharose 6B im Filtrationssystem äquilibriert und der Überstand wurde in der Tischzentrifuge (Eppendorf 5414, Hamburg) kurz abzentrifugiert. Das Säulenmaterial wurde danach mit 200 µl Aliquots des entsprechenden Puffers durchmischt und der Überstand wieder abzentrifugiert. An der Festphase gebundene Radioaktivität nach dem 4., 7., 10., 13. und 15. Waschschrift bzw. die Radioaktivität im abzentrifugierten Durchfluss nach jedem

Waschschritt wurde im Szintillationszähler mittels Cerenkov Verfahren (Kapitel 2.2.3) gemessen.

2.2.22 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

2.2.22.1 Aktivierung der Chip-Oberfläche

Für alle Messungen mit dem BIACORE X Gerät (Biacore, Uppsala, Schweden) wurden CM5-Chips benutzt. Als Flußpuffer bei der gesamten Aktivierung wurde HBS-Puffer (10 mM Hepes/NaOH (pH 7,4 bei 25 °C), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA) verwendet. Vor der Aktivierung wurde der Chip im Gerät bei 25 °C bei einer Flussrate von 30 µl/min äquilibriert bis eine stabile Baseline erreicht wurde. Die beiden Flusszellen Fc1 und Fc2 wurde mit 100 µl wässriger Lösung (50 mM N-hydroxysuccinimid und 200 mM N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) bei einer Flussrate von 5 µl/min in einem „multi-channel modus“ aktiviert. Im zweiten Schritt wurde die Flusszelle Fc2 in einem „single-channel modus“ mit 20 µl 42 mM Trisaccharid **12** in ddH₂O, 20 µl 10 mM Heptasaccharid **25** in ddH₂O oder 15 µl 5 mM Spacer **29** in HBS-Puffer bei einer Flussrate von 2 µl/min aktiviert. An der Oberfläche wurden durchschnittlich 514 RU Trisaccharid **12**, 495 RU Heptasaccharid **25** und 10 RU Spacer **29** kovalent immobilisiert. Am Ende der Aktivierung wurden restliche aktivierte COO⁻-Gruppen in beiden Flusszellen in dem „multi-channel modus“ mit 40 µl 1 M Ethanolamin (aq, pH = 8,22) bei einer Flussrate von 5 µl/min deaktiviert. Der Verlauf der Aktivierung wurde durch die Aufnahme der Sensorgramme verfolgt.

2.2.22.2 Untersuchung der Wechselwirkung der RNA-Aptamere mit Oligosacchariden mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.

Der aktivierte CM5-Sensorchip (Kapitel 2.2.22.1) wurde vor jeder Messung im BIACORE X Gerät (Biacore, Uppsala, Schweden) bei 25 °C und einer Flußrate von 30 µl/min mit dem entsprechenden Flusspuffer (Tab. 4) equilibriert bis eine stabile Basislinie erreicht wurde. Die Proben wurden vorbereitet (Tab. 4) und in einer zufälligen Reihenfolge bei 25 °C injiziert. Nach der Aufnahme der Sensorgramme für jede Probe wurde die Chip-Oberfläche mit 1 x 80 µl 1 M NaCl, 2 x 100 µl ddH₂O und Flusspuffer bei einer Flussrate von 80 µl/min regeneriert. Weitere Bedingungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der Programms BiaEvaluation 3.0 (Biacore, Uppsala, Schweden). Es wurden folgende Gleichungen einer Reaktionskinetik pseudo 1. Ordnung benutzt:

Für die Assoziationsreaktion:

$$R(t) = \text{Offset} + \text{Drift} * (t - t_0) + R_{\text{max}} * (1 - \exp(-(k_a * \text{conc} + k_d) * (t - t_0)))$$

Für die Dissoziationsreaktion:

$$R = \text{Offset} + (R_0 * \exp(-k_d * (t - t_0))) + \text{Drift} * (t - t_0)$$

Der K_D -Wert wurde ausgerechnet:

$$K_D = k_d / k_a$$

mit k_a : Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion; k_d : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion; t_0 : Anfangszeit; t : Zeit; R : Response. Das sogenannte „Bulk“-Effekt das bei der Injektion der Probe entsteht und einen Rechteckimpuls im Signal verursacht wurde in Form eines „Offsets“ berücksichtigt. Das langsame Abdissoziieren der RNA vom Chip wird in Form einer Geradengleichung mit der konstanten Steigung „Drift“ eingerechnet.

	Wechselwirkung mit dem Dextran	Wechselwirkung mit dem Spacer 29	Einfluss der NaCl-Konzentration	Einfluss der Mg ²⁺ -Anwesenheit	Einfluss der Mg ²⁺ -Abwesenheit	Einfluss der Hybridisierung	Wechselwirkung mit dem Dextran	Wechselwirkung mit dem Heptasaccharid 25
RNA-Aptamer	5G, 9G, 10G	5G, 9G, 10G	5G, 9G, 10G, tRNA-Asp	5G, 9G, 10G	5G, 9G, 10G	5G, 9G, 10G +Desoxyoligonukleotide d5G, d9G, d10G	9G, 6, 26	4, 6, 26, 27, 28, 30, 31, tRNA-Phe
RNA-Denaturierung	in ddH ₂ O 80 °C, 1,5 min	in ddH ₂ O 80 °C, 1,5 min	in ddH ₂ O 80 °C, 1,5 min	in ddH ₂ O 80 °C, 1,5 min	in ddH ₂ O 80 °C, 1,5 min	in ddH ₂ O 80 °C, 1,5 min	9G in ddH ₂ O 6 und 26 in SPC 80 °C, 1,5 min	in SPC 80 °C, 1,5 min
RNA-Konzentration bei Denaturierung	400 nM	2 x Endkonzentration	400 nM	100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM, 1200 nM	100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM	2 x Endkonzentration	400 nM RNA9G, 451 nM RNA26, 408 nM RNA6	~ 400 nM siehe Abb. 38
RNA-Renaturierung	in 15 min auf 23 °C	in 15 min auf 23 °C	in 15 min auf 23 °C	in 15 min auf 23 °C	in 15 min auf 23 °C	in 15 min auf 23 °C	in 15 min auf 23 °C	in 15 min auf 23 °C
Zugabe von	2 x Flusspuffer ohne p20	2 x Flusspuffer	2 x Flusspuffer ohne p20	2 x Flusspuffer ohne p20	2 x Flusspuffer ohne p20	2 x Flusspuffer ohne p20	MgCl ₂ und CaCl ₂ zu einer Endkonzentration von 1 mM	MgCl ₂ und CaCl ₂ zu einer Endkonzentration von 1 mM
Inkubation	15 min, 23 °C	15 min, 23 °C	15 min, 23 °C	15 min, 23 °C	15 min, 23 °C	15 min, 23 °C	15 min, 23 °C	15 min, 23 °C
RNA-Endkonzentration	200 nM	Sehe Abb. 17	200 nM	50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 600 nM	50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM	Sehe Abb. 22	400 nM RNA9G, 451 nM RNA26, 408 nM RNA6	~ 400 nM siehe Abb.38
Ligand	-	10 RU Spacer 29	447 RU Trisaccharid 12	514 RU Trisaccharid 12	514 RU Trisaccharid 12	514 RU Trisaccharid 12	-	495 RU Heptasaccharid 25
Flusspuffer	50 mM Tris/HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,005 % p20	50 mM Tris/HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,005 % p20	50 mM Tris/HCl pH = 7,5, 5 mM MgCl ₂ , 0,005 % p20 NaCl (50 mM, 150 mM, 250 mM und 400 mM)	50 mM Tris/HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,005 % p20	50 mM Tris/HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 0,005 % p20	50 mM Tris/HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,005 % p20	50 mM Hepes/NaOH pH = 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 0,005 % p20	50 mM Hepes/NaOH pH = 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 0,005 % p20
Flussrate	7 µl/min	7 µl/min	7 µl/min	7 µl/min	7 µl/min	7 µl/min	7 µl/min	14 µl/min
Injiziert	21 µl	14 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl
Modus	single-channel Fc1	multi-channel von Fc1 in Fc2	multi-channel von Fc1 in Fc2	multi-channel von Fc1 in Fc2	multi-channel von Fc1 in Fc2	multi-channel von Fc1 in Fc2	multi-channel von Fc1 in Fc2	multi-channel von Fc1 in Fc2

Tab. 4 Die Zusammenfassung der Bedingungen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

2.2.23 Aufnahme der UV-Schmelzkurven

2.2.23.1 Einfluss der NaCl-Konzentration auf das Schmelzverhalten der RNA-Aptameren.

Die einzelnen RNA-Aptamere wurden *in vitro* transkribiert (Kapitel 2.2.13.1) und mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (Kapitel 2.2.6.2) aufgereinigt.

Für jedes Experiment wurde 0,1 OD₂₆₀ RNA in 500 µl ddH₂O bei 90 °C 2 min denaturiert und langsam in 15 min auf 23 °C abgekühlt. Es wurden 500 µl 2 x Puffer A (50 mM NaCac/HCl (pH = 7,5 bei 25 °C); 5 mM MgCl₂ und unterschiedliche NaCl-Konzentrationen) zugegeben und die Proben 15 min bei 25 °C äquilibriert. Die Proben wurden in eine Quarzküvette einer Schichtdicke von 1 cm umgefüllt und im Diodenarray-Spektralphotometer 8452A (Hewlett Packard) langsam erhitzt. Die Schmelzkurven wurden in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 90 °C aufgenommen. Die Temperatur wurde in jedem Schritt um 0,5 °C erhöht, die Probe bei der entsprechenden Temperatur 1,5 min äquilibriert und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Auswertung der Schmelzkurven erfolgte mit Origin 6.0.

2.2.23.2 Einfluss des Trisaccharides β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-OCH₃ auf das Schmelzverhalten von RNA-Aptameren.

Für die Aufnahme von Schmelzkurven der RNA-Aptamere in der An- oder Abwesenheit des Trisaccharids **11** wurden einzelne RNA-Aptamere *in vitro* transkribiert (Kapitel 2.2.13.1) und mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (Kapitel 2.2.6.2) aufgereinigt.

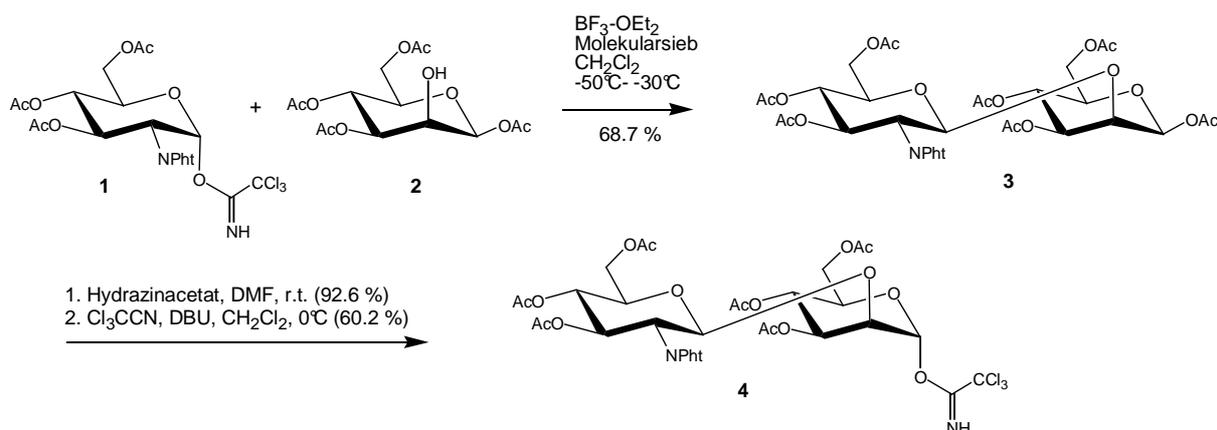
Die RNA wurde in 4 µl ddH₂O bei 90 °C 1 Min denaturiert und in 15 min auf 23 °C abgekühlt. Es wurde 1 ml Puffer B (20 mM NaCac/HCl (pH =7,5 bei 25 °C); 150 mM NaCl und 2,5 mM MgCl₂) und 5 µl Trisaccharid **11** entsprechender Konzentration (Abb. 13 und 44) zugegeben und die Probe bei 25 °C 10 min äquilibriert. Die Schmelzkurven wurden im Bereich von 25 °C bis 90 °C wie in der Kapitel 2.2.23.1 beschrieben, aufgenommen und ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Chemische Synthese

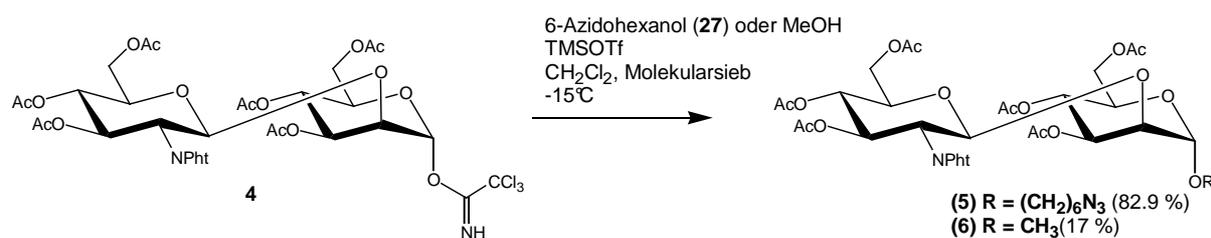
Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gewünschten Oligosaccharide durch eine Kombination von chemischen und enzymatischen Schritten synthetisiert (Abb. 2). Dabei wurden die linearen und verzweigten Oligosaccharide mit Spacern verknüpft, die eine kovalente Immobilisierung durch freie Amino- oder aktivierte Thiolgruppen ermöglichen (Abb. 2).

Um die Möglichkeit der Einführung des Spacers zu haben, wurde zunächst das aktivierte Disaccharid **4** (105, 106) synthetisiert (107). Die einzelnen Bausteine **1** und **2** wurden durch optimierte Synthesewege dargestellt (99, 100) und konnten zum Disaccharid **3** regio- und stereoselektiv gekoppelt werden.



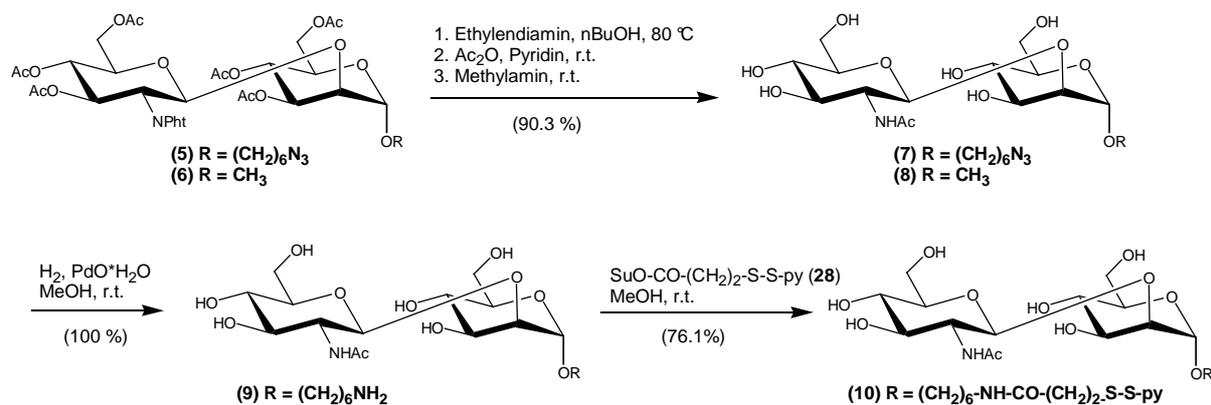
Schema 1 Synthese des Imidats **4**.

Der Azidohexyl-Spacer oder eine Methoxygruppe lassen sich auf sehr einfache Weise aus dem Imidat **4** durch Umsetzung mit 6-Azidohexanol **27** oder Methanol einfügen. Die niedrige Ausbeute des Disaccharides **6** ist durch die Zersetzung des Imidats **4** zu erklären.



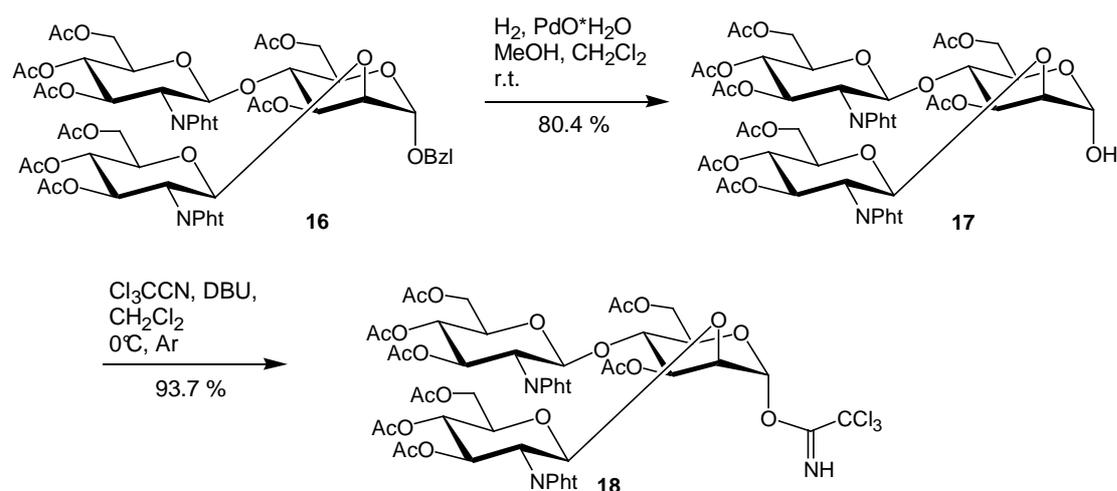
Schema 2 Synthese der Disaccharide **5** und **6**.

Die peracetylierten Disaccharide **5** und **6** wurden entschützt. Die Azidogruppe des Disaccharides **5** wurde vollständig zu einer Aminogruppe reduziert. Die Aminogruppe diente für die spätere Immobilisierung der Oligosaccharide oder für die Einführung des weiteren Spacerteiles. So konnte das Disaccharid **10** mit einem aktivierten Disulphid in guten Ausbeuten synthetisiert werden.



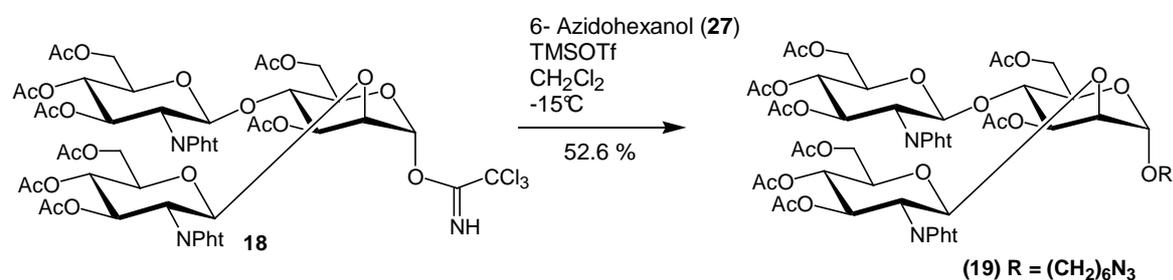
Schema 3 Synthese der Disaccharide **9** und **10**.

Auch für die Synthese der verzweigten Oligosaccharide wurde das synthetische Prinzip, das zu den Disacchariden **9** und **10** führte, verwendet. Es wurde der peracetylierte Baustein **16** (123) durch eine Reduktion der Benzylgruppe in das Halbacetal **17** überführt. Mittels Trichloracetonitril und DBU wurde im nächsten Schritt das Imidat **18** mit sehr guten Ausbeuten hergestellt (107).



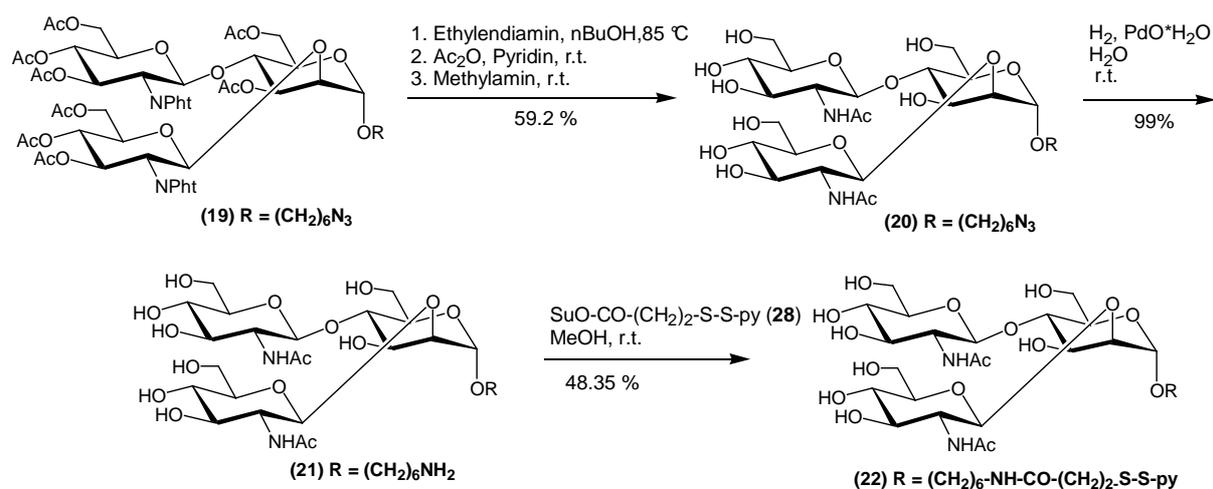
Schema 4 Synthese des Imidats **18**.

Der aktivierte Donor **18** wurde mit 6-Azidohexanol **27** unter TMSOTf-Aktivierung umgesetzt. Die Reaktion erfolgte auch hier α -selektiv, die Ausbeuten waren allerdings im Vergleich zu dem Disaccharid **5** niedriger.



Schema 5 Synthese des Trisaccharides **19**.

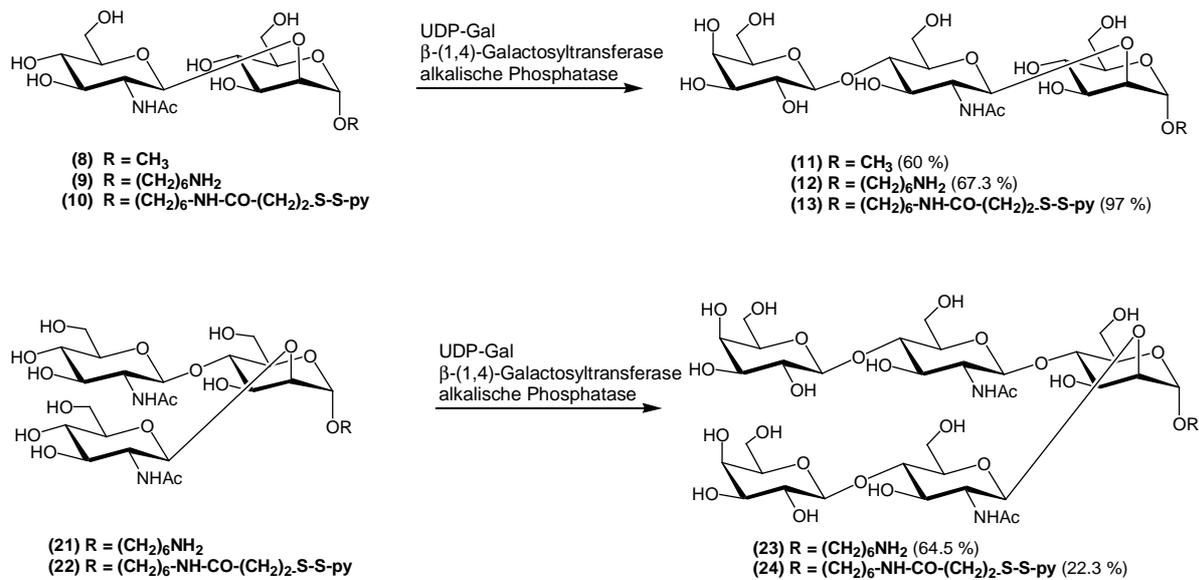
In der dreistufigen Entschützung des Trisaccharides **19** wurde zuerst die Phthalimido-Schutzgruppe mit Ethylendiamin in Butanol bei 85°C (**124**) entschützt. Anschließend wurde die Verbindung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin reacctyliert und die O-Acetylreste selektiv mit wässriger Methylamin-Lösung entfernt. Die Azidogruppe des Spacers der Verbindung **20** wurde auch hier unter Wasserstoffatmosphäre zu einer Aminogruppe vollständig reduziert. So konnte das Trisaccharid **21** mit dem zweiten Teil des Spacers verlängert werden. Dadurch wurde in die Verbindung **22** ein aktiviertes Disulphid eingeführt.



Schema 6 Synthese der Trisaccharide **21** und **22**.

Um die Zielverbindungen zu gewinnen, wurden die linearen (**8**, **9**, **10**) und die verzweigten Oligosaccharide (**21** und **22**) enzymatisch verlängert. Dabei wurde zuerst Galactose auf GlcNAc-Reste übertragen (**11**, **12**, **13**, **23**, **24**). Die enzymatischen Reaktionen erfolgten in einer Kakodylatpufferlösung unter pH-Kontrolle (pH = 7,0 – 7,5) bei 23 °C bis 26 °C. Die Glykosyltransferasen werden durch die Anwesenheit von Nucleosidphosphaten stark inhibiert. Aus diesem Grund wurde zu den Reaktionen auch alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) zugefügt. Dies erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit und die Ausbeuten.

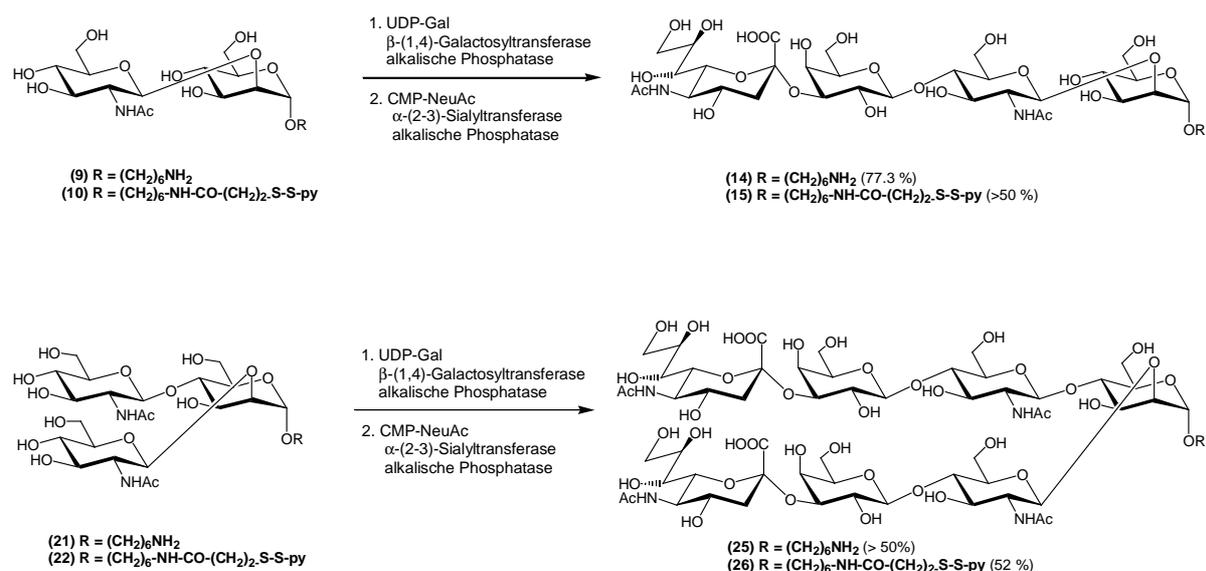
Für die enzymatische Galactosylierung wurde UDP-Galactose eingesetzt. Diese wird durch GlcNAc-β-1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22) über Mn²⁺ Ionen gebunden und übertragen. Anhand des Dünnschichtchromatogramms zeigte sich vollständiger Reaktionsumsatz. Der Überschuss von UDP-Galactose wurde danach durch die Inkubation mit hoher Mn²⁺-Konzentration zersetzt, was eine einfachere Aufreinigung der galactosylierten Produkte ermöglichte.



Schema 7 Enzymatische Verlängerung der linearen und verzweigten Oligosaccharide **8**, **9**, **10**, **21** und **22**.

Die Reaktionsgemisch wurde mittels Gelpermeationschromatographie oder zusätzlich mittels Festphasenextraktion (RP-18) getrennt.

Die Übertragung von Galactose und Neuraminsäure auf GlcNAc-Reste lässt sich auch als Eintopfreaktion durchführen (107). Dieser Weg wurde für die enzymatische Verlängerung der Oligosaccharide **9**, **10**, **21** und **22** zu Sialosiden **14**, **15**, **25** und **26** benutzt. Die enzymatische Galactosylierung erfolgte wie bereits beschrieben. Nach der vollständigen Galactosylierung wurde zu der Reaktion CMP-NeuAc und β -Galactosid- α -2,3-Sialyltransferase (EC 2.4.99.6) zugegeben. Die Inkubation erfolgte weiter bei 23 °C unter pH-Kontrolle.



Schema 8 Enzymatische Verlängerung der linearen und verzweigten Oligosaccharide **8**, **10**, **21** und **22**.

Auch hier zeigte sich Anhang des Dünnschichtchromatogramms vollständiger Reaktionsumsatz aber die Aufreinigung der Produkte war, wie vorher beobachtet, problematisch. Die Mengen an reinen Substanzen **14**, **15**, **23**, **25** und **26** waren nicht ausreichend um eine NMR-Analyse durchzuführen. Die Verbindungen wurden deswegen nur mittels ESI-MS charakterisiert.

3.2 *In vitro* Selektion von RNA-Aptameren gegen das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man

Die *in vitro* Selektion ist ein sehr geeignetes Verfahren zur Isolierung von RNA-Molekülen mit gewünschten Eigenschaften aus einer kombinatorischen RNA-Bibliothek. Generell wird dabei ein Bindungspartner (Ligand) immobilisiert und aus der RNA-Bibliothek werden in mehreren Selektionszyklen nur spezifisch und mit hoher Affinität bindende RNA-Moleküle (Aptamere) selektiert und angereicht.

3.2.1 Aktivierung der Festphase

Als eine „Modellverbindung“ für die in dieser Arbeit durchgeführten Etablierung der *in vitro* Selektion gegen Oligosaccharide wurde das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR (Abb. 2) ausgewählt und mit unterschiedlichen Spacern versehen (Kapitel 2.2.1).

Die *in vitro* Selektion wurde an einer Oberfläche mit kovalent und reversibel immobilisiertem Trisaccharid **13** durchgeführt, um nach der erfolgten Selektion die Isolierung des intakten Trisaccharid/RNA-Komplexes zu ermöglichen. Für die Immobilisierung des Trisaccharides **13** wurde als Festphase Thiopropyl-Sepharose 6B ausgewählt, da diese für sehr geringe (< 1 % bei 500 mM NaCl) (82) unspezifische Wechselwirkungen mit RNA bekannt ist. Es handelt sich um eine stabile Polysaccharid-Gelmatrix, die aus einer 6 %-igen quervernetzten Agarose ((1-4)-3,6-anhydro- α -L-galactopyranosyl-(1-3)- β -D-galactopyranan) (Pharmacia, Freiburg) besteht. Der hydrophile 2-Hydroxy-thiopropyl-Spacer ermöglicht die Bindung von Liganden über eine Disulphidbrücke und ihre spezifische Elution durch chemische Reduktion. Zwei kritische Punkte müssen bei der Aktivierung berücksichtigt werden: Die Länge des Spacers des Liganden sowie auch die Menge des immobilisierten Liganden. Ein kurzer Spacer kann die Zugänglichkeit der Liganden für die RNA behindern, ein sehr langer Spacer kann dagegen eine unspezifische hydrophobe Wechselwirkung der RNA mit dem Spacer bewirken.

Generell werden für die *in vitro* Selektion zwei Säulen benötigt: Die Vorsäule dient zur Entfernung von an das Säulenmaterial unspezifisch bindenden RNA-Moleküle und die Selektionssäule zur eigentlichen Selektion von spezifisch an den Liganden bindenden RNA-Aptameren. Für die Aktivierung der Thiopropyl-Sepharose 6B (Kapitel 2.2.16.2) wurde das Trisaccharid **13** mit einem 9-Atom langen Spacer synthetisiert (Kapitel 2.2.1), der eine aktivierte Disulphidbrücke enthält (Schema 7). Alle Hydroxyl-Gruppen des Trisaccharides **13** bleiben dabei für die Wechselwirkung mit den RNA-Molekülen frei verfügbar. Der Spacer **30** wurde ebenfalls separat synthetisiert (Kapitel 2.2.1). Nach der Reduktion der Thiopropyl-Sepharose 6B mit Dithiothreitol wurde das Säulenmaterial geteilt und mit dem aktivierten Spacer **30** (Vorsäule) oder mit dem aktivierten Trisaccharid **13** (Selektionssäule) derivatisiert. Die restlichen freien SH-Gruppen wurden in beiden Fällen mittels Iodoacetamid deaktiviert (Abb. 4).

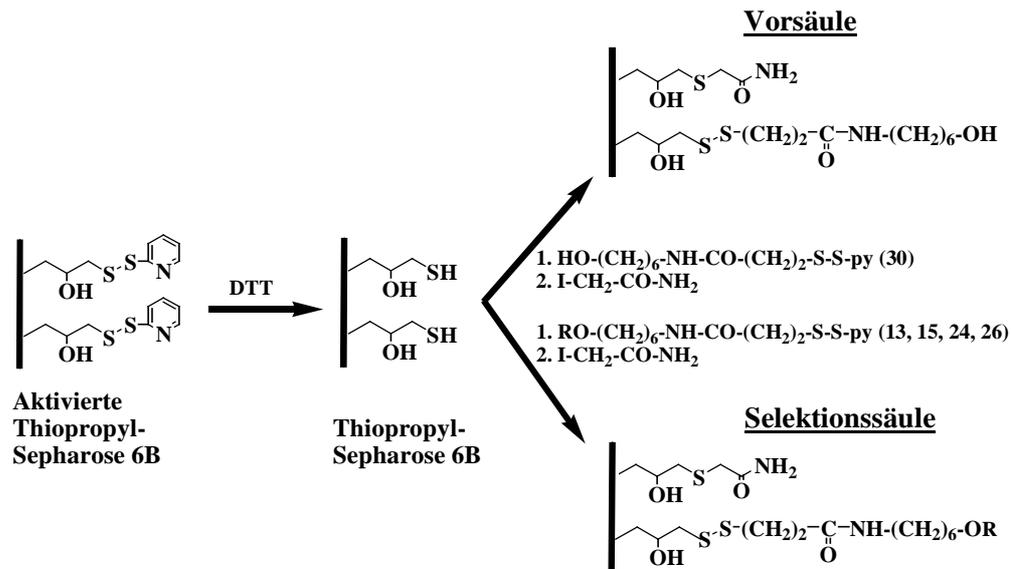


Abb. 4 Schema der Aktivierung der Thiopropyl-Sepharose 6B mit dem aktivierten Spacer 30 und aktivierten Oligosacchariden 13, 15, 24 und 26.

2-Thiopyridon (A_{max} bei 342 nm) eignet sich als Nebenprodukt der Aktivierung zur Bestimmung der Menge an immobilisiertem Liganden. Dafür wurde zuerst der Extinktionskoeffizient des 2-Thiopyridons aus der linearen Abhängigkeit der Absorption bei 342 nm und pH 7,5 von der Konzentration des 2-Thiopyridons experimentell bestimmt (Kapitel 2.2.16.1). Er beträgt $\sim 11\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Abb. 5).

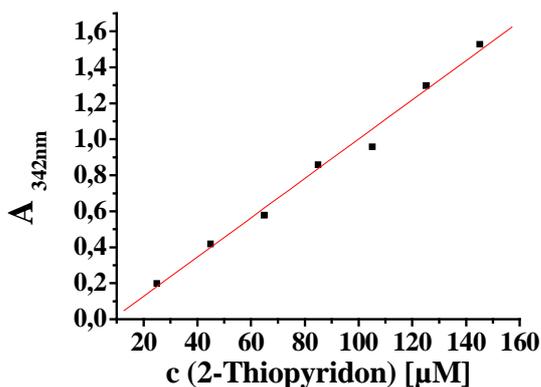


Abb. 5 Abhängigkeit der Absorption von 2-Thiopyridon bei 342 nm und pH 7,5 von der Konzentration.

Es wurden folgende Dipyridyldisulphid-Konzentrationen vorbereitet: 12,4; 22,4; 32,4; 42,4; 52,5; 62,5 und 72,5 μM. Der experimentell bestimmte Extinktionskoeffizient von 2-Thiopyridon beträgt $\epsilon_{342\text{ nm}}(2\text{-Thiopyridon}) = 11\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Die gesamte Aktivierung der Thiopropyl-Sepharose 6B wurde mittels UV-Spektroskopie durch die Messung der $A_{342\text{ nm}}$ verfolgt (Abb. 6) und so die Konzentration des immobilisierten Spacers 30 oder Trisaccharides 13 ermittelt. In einer Aktivierung wurde Thiopropyl-Sepharose 6B für 3 - 5 Selektionszyklen aktiviert. Es wurden von den gesamten freien SH-Gruppen ($\sim 55\ \mu\text{mol}$ freie SH-Gruppen/g Thiopropyl-Sepharose 6B = 5,42

$\mu\text{mol/ml}$ gequollener Thiopropyl-Sepharose 6B, Kapitel 2.2.16.2) $\sim 50 - 80 \%$ mit dem Spacer **30** oder $\sim 15 - 30 \%$ mit dem Trisaccharid **13** modifiziert.

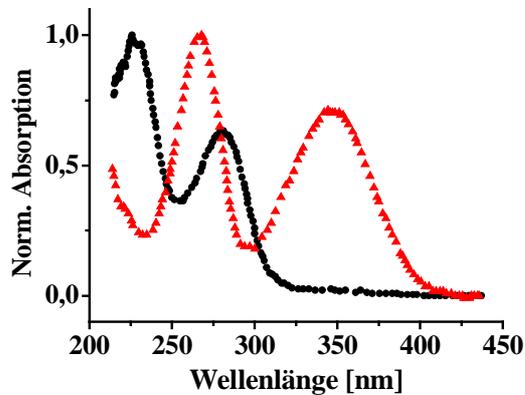


Abb. 6 UV-Spektren von Trisaccharid **13** (Punkte in schwarz) im Vergleich mit dem UV-Spektrum des bei der Aktivierung der Thiopropyl-Sepharose **6B** entstandenen 2- Thiopyridons (Dreieck in rot).

3.2.2 *In vitro* Selektion 1 an Thiopropyl-Sepharose 6B

Die eigentliche *in vitro* Selektion wurde im sogenannten „batch“-Verfahren bei Raumtemperatur unter möglichst konstanten Selektionsbedingungen durchgeführt (Kapitel 2.2.18.4 und 2.2.18.5, Tab. 10a). Die nicht gebundene RNA wurde in mehreren Waschschritten nach Absetzen der Festphase und Abnahme des Überstandes von der gebundenen RNA getrennt und der Trisaccharid/RNA-Komplex aus der Selektionssäule durch eine reduktive Spaltung der Disulphidbrücken eluiert. Abbildung 7 zeigt die Anreicherung der RNA in den einzelnen Selektionszyklen an der Selektionssäule mit dem immobilisierten Trisaccharid **13**. In den ersten Selektionszyklen blieb weniger als 1 % der gesamten RNA an der Festphase gebunden. Dieser Anteil steigt in dem 13. Selektionszyklus bis zu 5 % an und nimmt in den weiteren Selektionszyklen wieder ab (Tab. 10a).

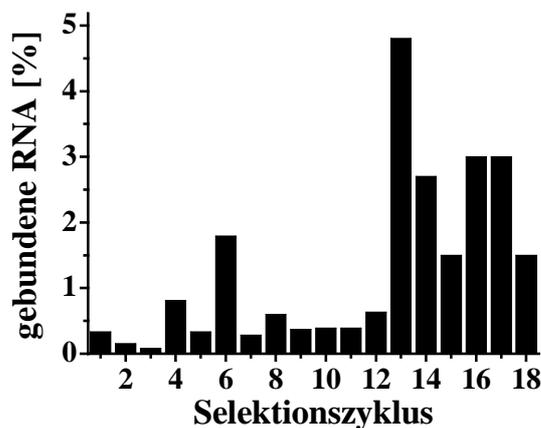


Abb. 7 Graphische Darstellung der Anreicherung der bindenden RNA in der Selektion 1 an Trisaccharid-Thiopropyl-Sepharose **6B** in den einzelnen Selektionszyklen.

Die Prozentanteile der gebundenen RNA beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge in den einzelnen Selektionszyklen.

Nach 18 Selektionszyklen wurde die Selektion beendet, da keine weitere Anreicherung beobachtet wurde. Die selektierten RNAs wurden für weitere Untersuchungen verwendet.

3.2.3 Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere

3.2.3.1 Sequenzen der an das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man bindenden RNA-Aptamere

Die RNA-Bibliotheken aus dem 6., 11., 13., 16. und 17. Selektionszyklus wurden in DNA überschrieben (Kapitel 2.2.18.6) und mittels PCR vermehrt (Kapitel 2.2.18.2). Nach der Ligation der DNA in den Vektor pGEM-T (Kapitel 2.2.10.2) und der Transformation in kompetente *E.coli* Zellen (Kapitel 2.2.12.2) wurden die Plasmide aus Einzelkolonien gereinigt und sequenziert (Kapitel 2.2.9.1). Die Sequenzierung lieferte verschiedene DNA-Sequenzen, die im Vergleich zu der eingesetzten DNA Matrize, die eine 50 Nukleotide lange Zufallssequenz enthielt, teilweise verkürzt oder verlängert waren (Abb. 8 und 41). Die DNA-Sequenzen wurden zurück in die RNA-Sequenzen überschrieben und miteinander verglichen. Die RNA-Sequenzen aus dem 6. Selektionszyklus, in dem erstmals eine Anreicherung beobachtet wurde (Abb. 41), deuten auf eine große Diversität der bis dahin selektierten RNA-Bibliotheken hin (Abb. 41). Die Sequenzierung der selektierten Bibliotheken aus späteren Selektionszyklen lieferte Sequenzen, die alle eine sehr stark konservierte 10 Nukleotide lange Konsensussequenz (5'-GAACAAGCAG-3') enthalten (Tab. 5, Abb. 8). Man kann Teile dieser Konsensussequenz schon in den Sequenzen aus dem 6. Selektionszyklus (Abb. 41) finden, was auf eine Anreicherung von Sequenzen mit spezifischen Eigenschaften in der RNA-Bibliothek während der Selektion hindeutet. In den drei gefundenen RNA-Aptameren 5G, 9G und 10G wurden weitere kürzere identische Sequenzen (5'- CAACU-3', 5'- GAGCGC-3', 5'- CAGAG-3', 5'- ACCA-3') gefunden (Abb. 8).

RNA 1F (44 Nt):

5'- AUCGAUGUCAGGCUAGAUGCUAUACAGUGUCAAAAGCACGAAUGU-3'

RNA 8F (31 Nt):5'- GACGAACAACCCAGACACCGCUUUCGAGUUC-3'**RNA 5G (45 Nt):**5'- GUCAACUACUGAGCGCGAUGGAUUUCGAAACAAGCAGGUACGAGUA-3'**RNA 9G (50 Nt):**5'- GAAACAAGCAGACAGAGGACAACUCGAACCACCAGAUAACUCCGUUGGGCG-3'**RNA 10G (44 Nt):**5'- UACCAGAACAAGCAGGGUGCUCUCAGAGUAUUCCGAGCGCUGAA-3'**RNA 18G (46 Nt):**5'- UGUACCAGAACAAGCAGGGUGCUCUCAAAGUAUUCCGAACGCUGAU-3'

Abb. 8 Sequenzen der gegen das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man selektierten RNA-Aptamere. Es sind nur die Sequenzen und die Länge des ursprünglich randomisierten Bereichs gezeigt. Die gefundenen Konsensussequenzen sind fett gedruckt und unterstrichen.

Die Tatsache, dass im 13. Selektionszyklus nur vier RNA (5G, 9G, 10G, 18G) und im 16. und 17. Selektionszyklus nur noch eines dieser vier RNA-Aptameren (RNA 5G) gefunden wurden deutet auf eine sehr starke und spezifische Selektion hin (Tab. 5).

Selektions- zyklus	Sequenzierte DNA						Anzahl der sequenzierten Plasmide
	DNA 1F	DNA 8F	DNA 5G	DNA 9G	DNA 10G	DNA 18G	
11.	1 x	1 x	-	2 x	1 x	-	5
13.	-	-	2 x	3 x	6 x	1 x	12
16.	-	-	3 x	-	-	-	3
17.	-	-	2 x	-	-	-	2

Tab. 5 Die Anzahl der gefundenen DNA-Sequenzen in entsprechenden Selektionszyklen gegen das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man.

3.2.3.2 Sekundärstrukturen der an das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man bindenden RNA-Aptamere

Für die selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G wurden Sekundärstrukturanalysen nach dem Algorithmus von Zuker (104) mittels des Computerprogramms „Mfold“ durchgeführt (Abb. 9). Diesem Algorithmus liegen ΔG° -Werte für die Stapelung und Basenpaarungen in unterschiedlichen Sequenzkontexten zugrunde, welche aus Untersuchungen über das

Schmelzverhalten von Ribooligonukletiden, die systematisch veränderte Sequenzen enthielten, abgeleitet wurden. In dem eingegebenen ΔG° -Wert für die freie Energie drückt sich die Stabilität der einzelnen Sekundärstrukturen aus. Da es sich hier um Vorhersagen handelt, können die Sekundärstrukturen nur unter Vorbehalt genutzt werden.

Wie aus Abbildung 9 zu ersehen ist, befinden sich die Konsensussequenzen in allen selektierten RNA-Aptameren in nichthelikalen Bereichen, wie in Schleifen und internen Schleifen, die sich durch erhöhte Flexibilität auszeichnen.

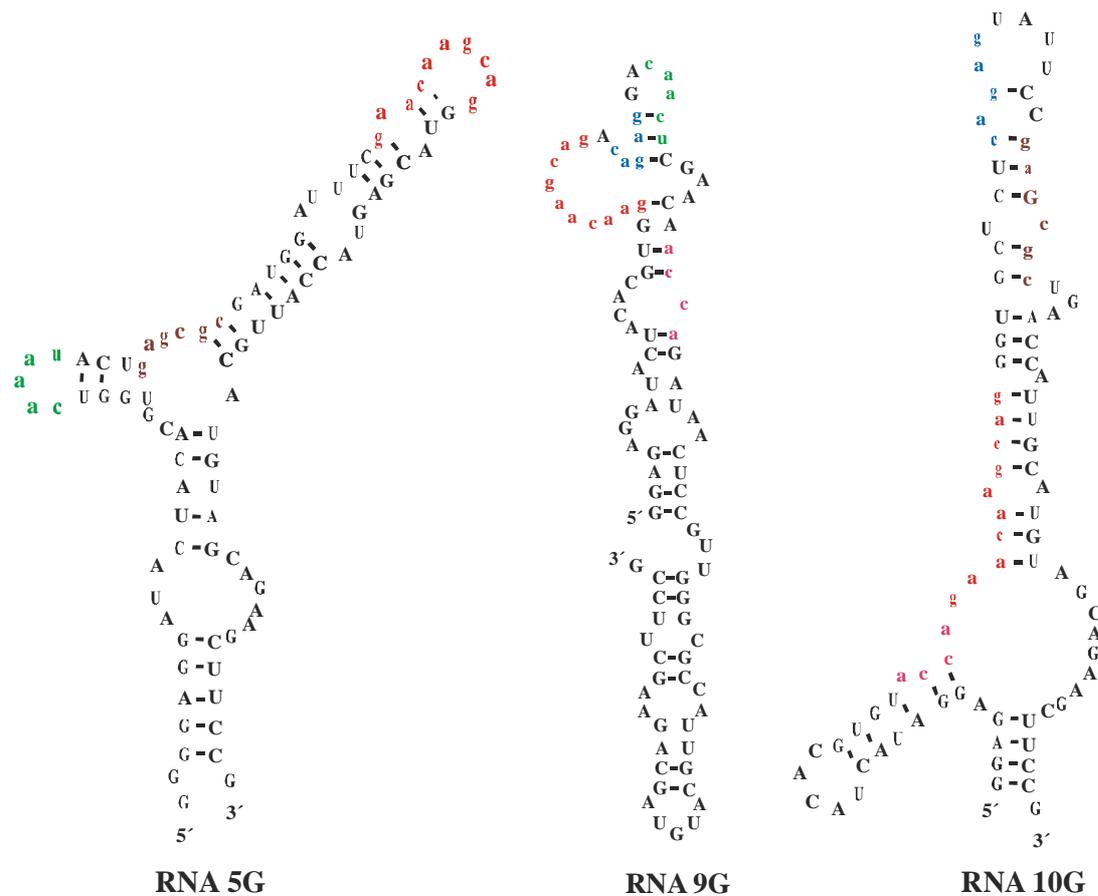


Abb. 9 Berechnete Sekundärstruktur der selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G.

Die Sekundärstrukturanalyse wurde nach dem Algorithmus von Zuker (104) mittels Computerprogramms „Mfold“ durchgeführt. Es sind nur die RNA-Sekundärstrukturen mit dem niedrigsten ΔG° -Wert (-26,38 kcal/mol für RNA 5G, -18,3 kcal/mol für RNA 9G, -20,01 kcal/mol für RNA 10G) gezeigt. Die gefundenen Konsensussequenzen sind klein geschrieben und in Farbe dargestellt.

3.2.3.3 Untersuchung der RNA-Struktur mittels Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen

RNA-Moleküle sind in der Lage sich in verschiedene komplexe Strukturen zu falten, die für ihre biologische Aktivität benötigt werden. RNA-Sequenzen, die eine Haarnadelstruktur

bilden, können entweder in einer Monomer- oder Dimerform mit einem inneren Loop existieren. Bei hoher RNA-Konzentration und niedriger Temperatur kann die RNA die Dimerform bevorzugen, die sich während einer Temperaturerhöhung zuerst in eine monomere Haarnadelstruktur und dann in eine einzelsträngige RNA entfaltet (108).

Es besteht die Möglichkeit, dass bei der Faltung der hier selektierten RNA mehrere RNA-Konformationen entstehen (109). Dies könnte die relativ niedrige Anreicherung der RNA während der Selektion erklären könnten. Die Existenz von mehreren RNA-Konformationen wurde mittels Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen bei 4 °C überprüft (Kapitel 2.2.15). Die Ergebnisse für die RNA 5G, 9G und 10G sind in Abbildung 10 gezeigt. Mit steigender RNA-Konzentration entstehen bei der Denaturierung der RNA nicht näher charakterisierte Oligomere (Abb. 12). Die Neigung zu einer Oligomerisierung ist vor allem bei der RNA 9G (Abb. 10b) und 10G (Abb. 10c) zu beobachten. Bei der Denaturierung dieser RNAs bildeten sich ab RNA-Konzentrationen von 25 μM nicht lösliche Oligomere.

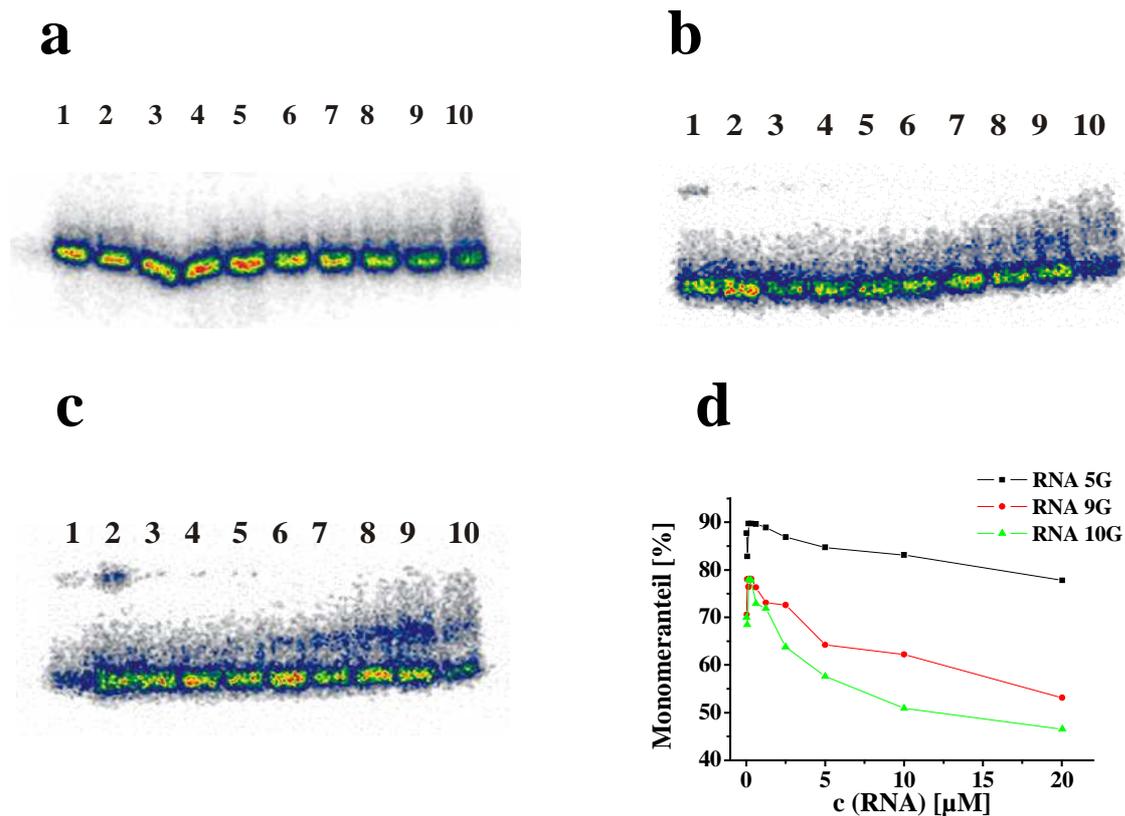


Abb. 10 Native Polyacrylamidgelelektrophorese zur Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Oligomerisierung der RNA-Aptamere 5G (a), 9G (b) und 10G (c) und graphische Auftragung des Monomeranteiles gegen die RNA-Konzentration (d).

Folgende Konzentration der RNA 5G, 9G und 10G wurden untersucht (Spur 1 bis 10): 0,04; 0,08; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 μM . Die Prozentangaben der Monomere (d) beziehen sich auf die gesamte Radioaktivitätsmenge (RNA-Menge) in der entsprechenden Spur.

Nach den Sekundärstrukturberechnungen mit dem Computerprogramm „RNA Structure 3.7“ ist die Dimerisierung einzelner RNA-Aptamere durchaus möglich. Für RNA 5G und 10G können theoretisch bis zu 40 % der Basen in Basenpaarungen mit einem anderen RNA-Molekül beteiligt sein (Daten nicht gezeigt). Aus der Sekundärstrukturvorhersage (Abb. 9) der RNA-Aptamere ist zu erwarten, dass die RNAs innerhalb des Molekül mindestens eine Haarnadelstruktur bilden und so in der Lage sind zu dimerisieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass viele RNA-Moleküle erst bei ~ 1 mM Konzentration aggregieren (110). Es ist zu erwarten, dass sich die Monomere- und die Oligomereformen der RNA in der Bindung an das Trisaccharid **13** unterscheiden.

3.2.3.4 UV- Schmelzkurven der selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G

Die Messung von Schmelzkurven ist eine einfache Methode, die die Untersuchung der thermodynamischen Stabilität und der Konformationsänderungen von Nukleinsäuren während des Übergangs von einem nativen zu einem denaturierten Zustand ermöglicht (108). Die Methode beruht auf der Messung der UV-Absorption in Abhängigkeit von der Temperatur. Durch das Auflösen der Basenstapelung innerhalb eines RNA-Moleküls kommt es bei der Entfaltung zu einer Zunahme der Absorption, die sogenannte Hyperchromizität, die bei gewählter Wellenlänge (meistens 260 nm) von Anzahl und Typ der Basenpaare abhängig ist. Die Schmelzkurven können qualitative (die Molekularität des Übergangs) oder quantitative (thermodynamische Parameter, Schmelztemperatur (T_m)) Ergebnisse liefern. Das Schmelzen von RNA kann im einfachsten Fall durch ein Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden (108), wo eine einzelsträngige (denaturierte) RNA im Gleichgewicht mit einer vollständig basengepaarten (nativen) RNA-Struktur ist. Teilweise basengepaarte Zwischenstufen werden in diesem Modell nicht berücksichtigt. Allerdings gilt diese Annäherung nur für kurze Duplexe (< 12 bp). Bei komplexeren RNA-Strukturen werden oft mehrere Übergänge beobachtet, die dem Schmelzen von einzelnen unabhängigen Regionen entsprechen. Die Schmelzkurven lassen sich in diesem Fall nur mit großem Rechenaufwand analysieren. Für eine Aussage über die Stabilität eines RNA-Moleküls wird die Schmelztemperatur (T_m) bestimmt, die der Temperatur am Mittelpunkt des Schmelzüberganges entspricht.

Die Faltung von RNA-Molekülen ist ein sehr komplizierter Prozess, in dem die Abstoßungskraft der negativen Ladungen des Polyphosphat-Rückgrades durch die Bindung

von mono- und/oder divalenten Metallionen kompensiert wird. Die Metallionen stabilisieren dabei mehr die native tertiäre als die teilweise entfaltete sekundäre Struktur (110-112).

Um den Effekt der Na^+ -Konzentration auf die Stabilität der Struktur der selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G zu untersuchen, wurde die Änderung der Schmelztemperatur in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration gemessen (Kapitel 2.2.23.1, Abb. 42). Bei einer konstanten MgCl_2 -Konzentration (5 mM) wurde die NaCl-Konzentration von 0 mM bis 250 mM variiert. Die T_m -Werte wurden aus dem Hauptmaximum der ersten Ableitung der $A_{260\text{ nm}}$ in Abhängigkeit von der Temperatur (dA/dT) bestimmt (Abb. 11) und in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration aufgetragen (Abb. 11d).

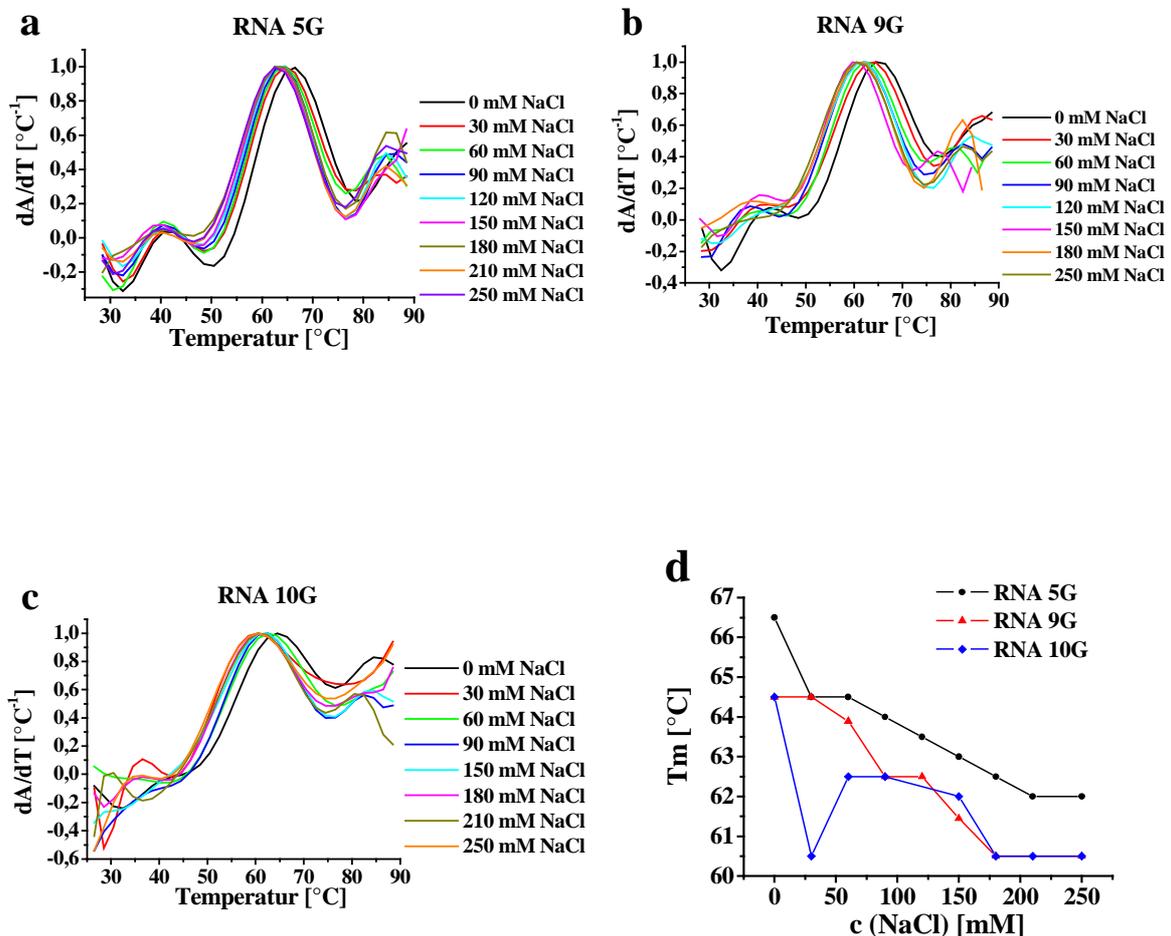


Abb. 11 Schmelzverhalten der RNA 5G (a), 9G (b) und 10G (c) und die Änderung der Schmelztemperatur (T_m) des jeweiligen RNA-Aptamers in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration (d). Es ist die erste Ableitung der Absorption $A_{260\text{ nm}}$ (dA/dT) in Abhängigkeit von der Temperatur sowie auch die Änderung der Schmelztemperatur (T_m) des Hauptmaximums der RNA-Aptamere in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration gezeigt. Bei der Messung wurden folgende RNA-Konzentrationen eingesetzt: 139 nM RNA 5G, 130 nM RNA 9G und 140 nM RNA 10G.

Eine erhöhte NaCl-Konzentration hat gewöhnlich einen stabilisierenden Effekt auf die Struktur der Nukleinsäuren (113) und T_m steigt mit zunehmender Na^+ -Konzentration (108). Im vorliegenden Fall wurde im Gegensatz dazu mit zunehmender NaCl-Konzentration für alle drei RNA-Aptamere eine Abnahme des T_m -Wertes (4,5 °C für RNA 5G, 4 °C für RNA 9G und 10G) beobachtet (Abb. 11d). Bei dem Experiment wurden RNA-Konzentrationen von 130 bis 140 nM benutzt, da hier der Anteil der Oligomerisierung gering ist (Abb. 10). Ein ähnliches Phänomen wurde auch bei der Untersuchung des Einflusses der Na^+ -Konzentration auf die Stabilität der tRNA^{Phe} und der Initiator-tRNA aus Hefe gezeigt (112). Die Destabilisierung der Tertiärstruktur der RNA mit steigender NaCl-Konzentration (bis ~ 500 - 750 mM) in Gegenwart von Mg^{2+} wurde durch die Abhängigkeit des stabilisierenden Effektes der Mg^{2+} -Bindung von der Ionenstärke der Lösung interpretiert (112). Die selektierten Aptamere zeigen hier damit kein abnormales Verhalten.

Zusätzlich zum Hauptübergang bei ~ 60 °C sind noch zwei weitere weniger intensive Übergänge bei ~ 40 °C und ~ 85 °C zu beobachten (Abb. 12 a, b, c).

Die Bindung des Liganden an die RNA kann theoretisch zu einer Konformationsänderung der RNA führen. Dies würde sich in der Änderung der Schmelztemperatur oder des Profils der Schmelzkurve äußern würde. Der Einfluss des Trisaccharides **11** auf das Schmelzverhalten der selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G wurde daher ebenfalls untersucht (Kapitel 2.2.23.2). Die Schmelzkurven wurden bei einer konstanten Mg^{2+} -Konzentration (2,5 mM) und Na^+ -Konzentration (150 mM) aufgenommen (Abb. 43) und die Schmelztemperatur (T_m) in An- oder Abwesenheit des Trisaccharides **11** bestimmt (Tab. 6). Der Hauptschmelzübergang für alle drei RNA-Aptamere ist relativ steil (Abb. 43) was darauf hindeuten könnte, dass es sich um einen Übergang ohne Zwischenstufen handelt (108). Aus der ersten Ableitung der $A_{260 \text{ nm}}$ in Abhängigkeit von der Temperatur (dA/dT) sieht man aber eine Verschiebung des Hauptschmelzüberganges (Abb. 12, Tab. 6) und die Entstehung bzw. Destabilisierung von RNA-Domänen in Abhängigkeit von der Trisaccharid **11**-Anwesenheit und Konzentration (Abb. 13).

Für RNA 5G wurde nach Zugabe eines 40-fachen und für die RNA 10G schon nach Zugabe eines 10-fachen Überschusses von Trisaccharid **11** für das Hauptmaximum eine T_m -Abnahme von 1,7 °C beobachtet (Tab. 6). Bei der RNA 9G wurde im Gegenteil zu RNA 5G und 10G für das Hauptmaximum eine T_m -Zunahme von 1,7 °C beobachtet (Tab. 6).

Die Entstehung einer neuen RNA-Domäne im Temperaturbereich von 30 °C bis 45 °C und gleichzeitige Destabilisierung der RNA-Domäne im Temperaturbereich von 72 °C bis 80 °C

durch Zugabe von Trisaccharid **11** wurde am deutlichsten für das RNA-Aptamer 10G (Abb. 12c). Das könnte auf eine Konformationsänderung der RNA durch die Bindung von Trisaccharid **11** hindeuten.

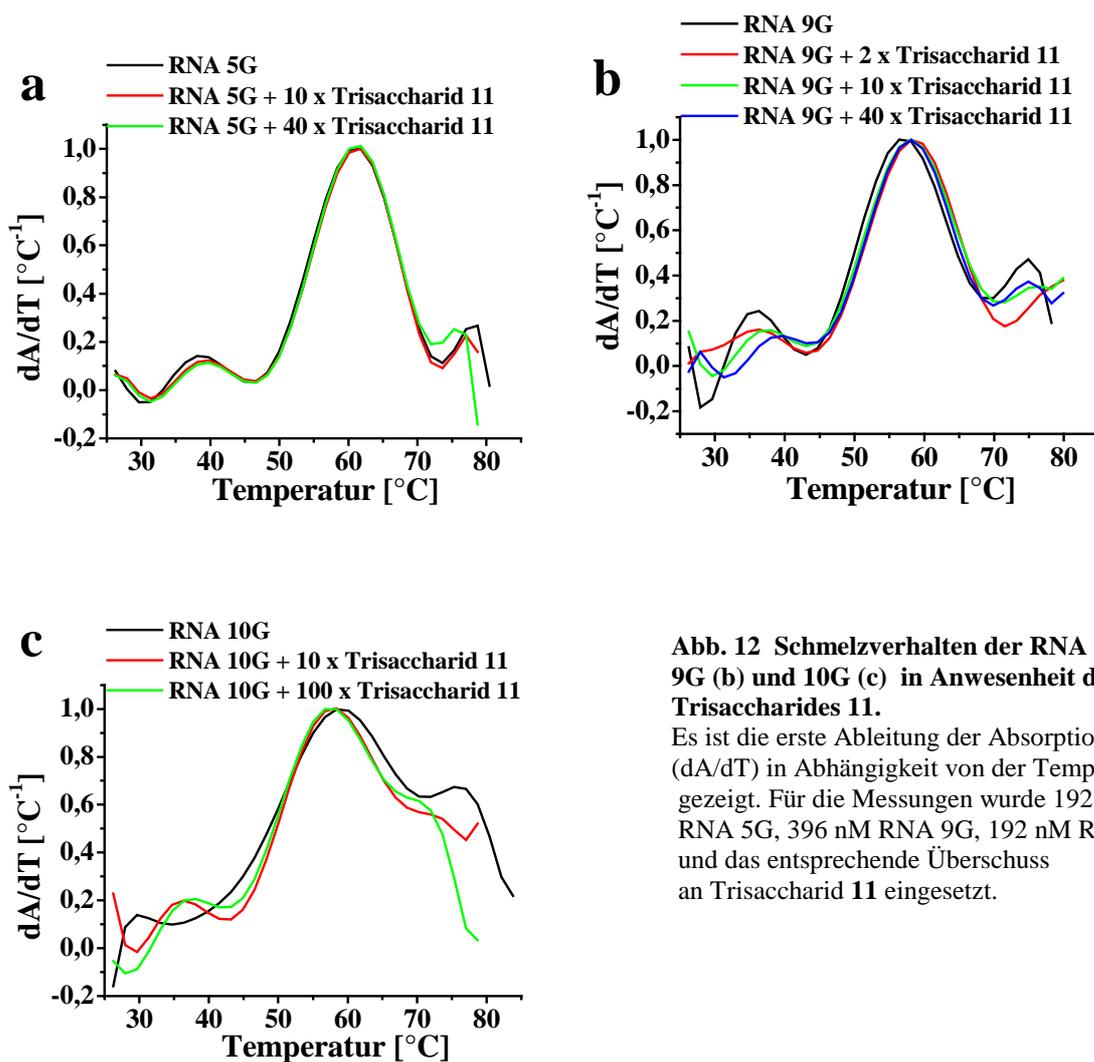


Abb. 12 Schmelzverhalten der RNA 5G (a), 9G (b) und 10G (c) in Anwesenheit des Trisaccharides **11**.

Es ist die erste Ableitung der Absorption $A_{260\text{ nm}}$ (dA/dT) in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt. Für die Messungen wurde 192 nM RNA 5G, 396 nM RNA 9G, 192 nM RNA 10G und das entsprechende Überschuss an Trisaccharid **11** eingesetzt.

Trisaccharid 11- Überschuss	T _m [°C]		
	RNA 5G (192 nM)	RNA 9G (396 nM)	RNA 10G (192 nM)
-	61,8	56,4	58,4
2 x	-	58,1	-
10 x	61,8	58,1	56,7
40 x	60,1	58,1	56,7

Tab. 6 Übersicht der Schmelztemperaturen der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G in Abhängigkeit von der Trisaccharid 11-Konzentration.

3.2.4 Bestimmung der Bindungsparameter der RNA-Trisaccharid Wechselwirkung mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.

Die Wechselwirkung der selektierten RNA-Aptamere mit dem Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man wurde mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie untersucht (Kapitel 2.2.22.2). Es handelt sich um eine optische Methode, die ein physikalisches Phänomenen, die sogenannten evaneszierenden Wellen verwendet, um primär den Brechungsindex einer wässrigen Lösung in der Nähe der Sensoroberfläche zu bestimmen. Qualitative und quantitative Informationen über die Wechselwirkung von Biomolekülen werden in Echtzeit ohne zusätzliche Markierung erhalten. Dabei wird ein Bindungspartner (Ligand) an der Chip-Oberfläche immobilisiert und der zweite Bindungspartner (Analyt) in der Lösung über die Chip-Oberfläche injiziert. Die Bildung eines Komplexes an der Chip-Oberfläche ruft eine Änderung des Brechungsindex der Lösung über der Sensoroberfläche hervor und korreliert mit der Massenzu- oder abnahme. Die Assoziation und Dissoziation des jeweiligen Analyten wird kontinuierlich registriert und durch ein Sensorgramm aufgezeichnet, wo die sogenannten Resonance Units (RU) in Abhängigkeit von der Zeit angegeben werden. Das BIACORE X-Gerät verfügt über zwei Flusszellen Fc1 und Fc2. Die Fc1-Zelle diente als Referenzzelle, um Artefakte bei der Messung, die durch eine unspezifische Wechselwirkung der RNA mit der Chip-Oberfläche entstehen, zu minimieren. Die Fc2-Zelle wurde als eigentliche Messzelle verwendet. Um möglichst identische Oberflächeneigenschaften in beiden Messzellen zu erreichen, wurden die beiden Flusszellen bis auf das Trisaccharid **12** oder den Spacer **29** auf gleiche Weise chemisch modifiziert (Kapitel 2.2.22.1, Abb. 13). Die freien COO⁻-Gruppen der Carboxymethyldextran-Oberfläche wurden in beiden Flusszellen mit einer N-Hydroxysuccinimid- und N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Lösung aktiviert (Abb. 13). Dies ermöglichte eine kovalente Immobilisierung des synthetisierten Trisaccharides **12** oder des Spacers **29** durch einen Spacer mit einer freien Aminogruppe allein in der Messzelle Fc2 (Abb. 13). Die restlichen aktivierten COO⁻-Gruppen wurden in beiden Flusszellen mit Ethanolamin deaktiviert (Abb. 13).

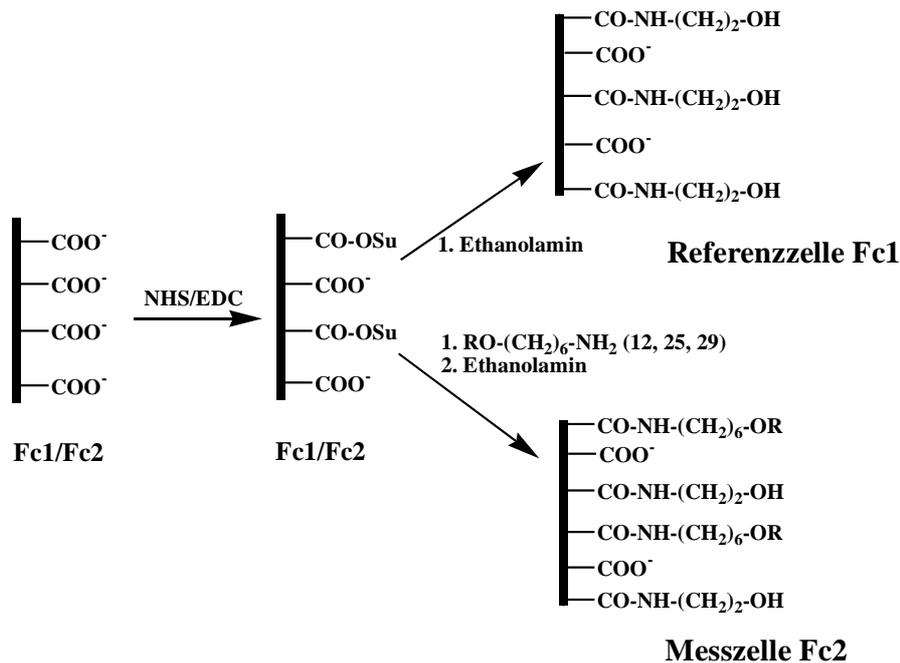


Abb. 13 Schema des Prinzips der Aktivierung der Carboxymethyldextran-Oberfläche.

Während und nach der Aktivierung der Carboxymethyldextran-Oberfläche wurden Sensorgramme aufgenommen (Abb. 14). Es wurden nach der Aktivierung der COO^- -Gruppen in beiden Flusszellen (Abb. 14a) 514 RU des Trisaccharides **12** (Abb. 14b) und 10 RU Spacer **29** (Abb. 14b) in der Messzelle Fc2 immobilisiert und anschließend die aktivierten COO^- -Gruppen in beiden Flusszellen deaktiviert (Abb. 14c). Die kovalente Immobilisierung von Liganden gewährleistet eine stabile Basislinie während aller Messungen.

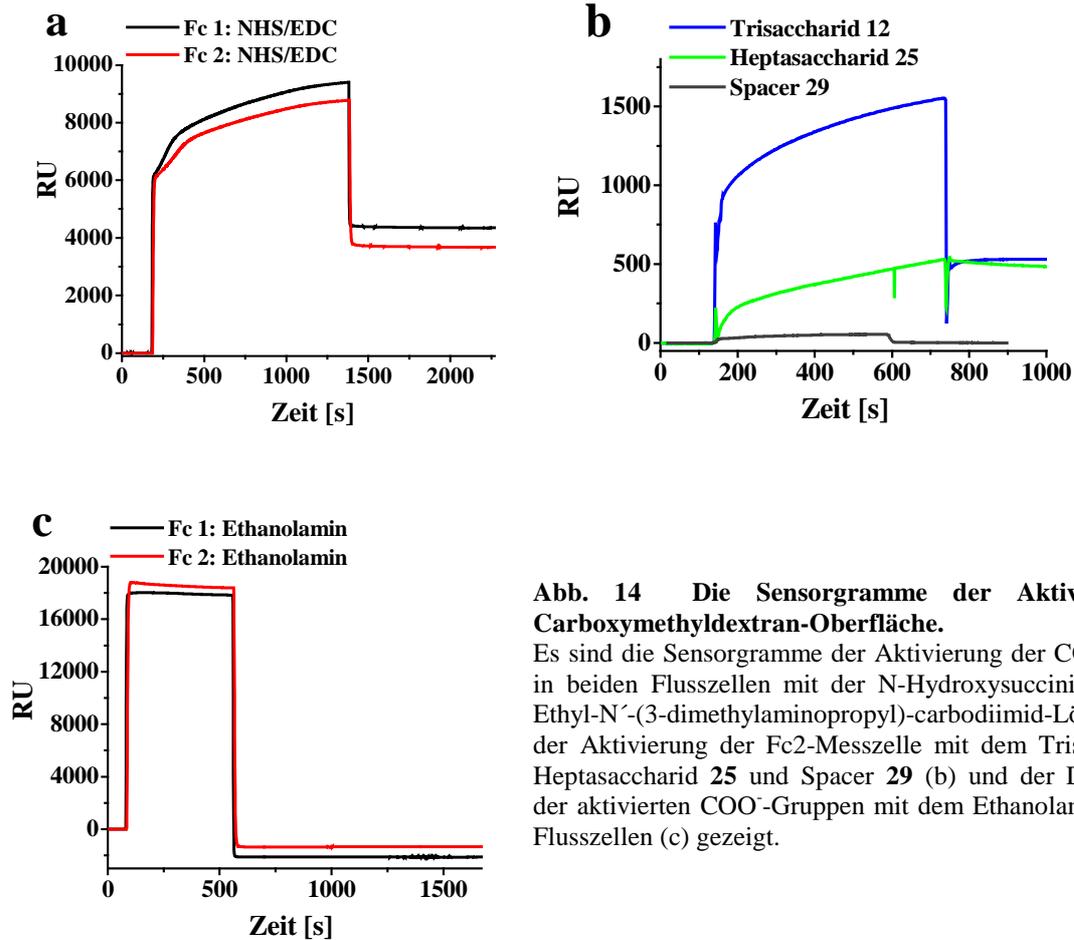


Abb. 14 Die Sensorgramme der Aktivierung der Carboxymethyldextran-Oberfläche.

Es sind die Sensorgramme der Aktivierung der COO^- -Gruppen in beiden Flusszellen mit der N-Hydroxysuccinimid- und N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Lösung (a), der Aktivierung der Fc2-Messzelle mit dem Trisaccharid **12**, Heptasaccharid **25** und Spacer **29** (b) und der Deaktivierung der aktivierten COO^- -Gruppen mit dem Ethanolamin in beiden Flusszellen (c) gezeigt.

Die selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G wurden über die nichtmodifizierte Carboxymethyldextran-Oberfläche injiziert. Man hat keine unspezifische Wechselwirkung mit der Oberfläche beobachtet (Abb. 15), was eine wichtige Voraussetzung für eine genaue Messung ist.

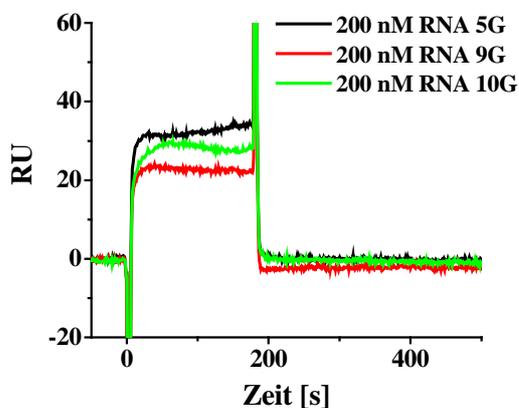


Abb. 15 Sensorgramme der Bindung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G an die nichtmodifizierte Carboxymethyldextran-Oberfläche des CM5-Chips in der Referenzzelle Fc1.

Es wurde ebenfalls keine Wechselwirkung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G mit dem immobilisierten Spacer **29** beobachtet (Abb. 16).

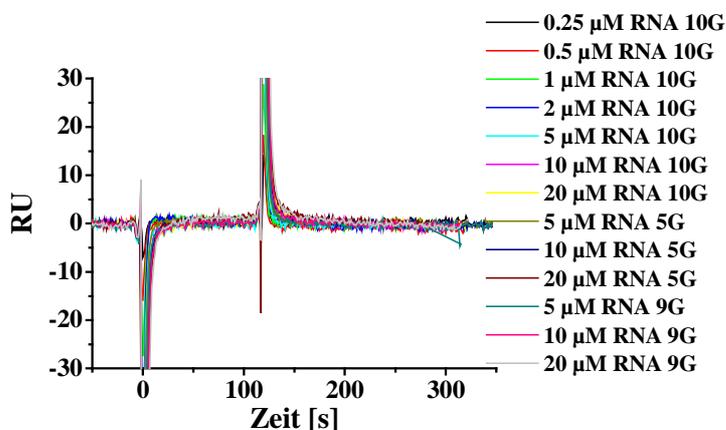


Abb. 16 Sensorgramme der Wechselwirkung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G mit dem Spacer **29**. Es sind die Differenzkurven gezeigt.

Von allen Messdaten aus der Messzelle Fc2 wurde das Signal aus der Referenzzelle Fc1 subtrahiert, um das Messsignal für die unspezifische Bindung an die modifizierte Chip-Oberfläche zu korrigieren. Schon die Injektion des Puffers ohne RNA führt zu einem messbaren Signal. Deswegen wurde dieser Effekt separat gemessen und von den gemessenen Kurven subtrahiert. Ohne diese doppelte Referenzierung sind keine auswertbaren Sensorgramme messbar (114). Die Auswertung der Sensorgramme erfolgte mit der Software BiaEvaluation 3.0 (BIACORE, Uppsala).

Die Wechselwirkung der Biomoleküle und die eigentlichen Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Messungen werden von mehreren Faktoren, wie z.B. der Reinheit der verwendeten Substanzen, der Ligand- und Analyt-Konzentration, der Temperatur, der Flussrate, der Zeit der Assoziations- und Dissoziationsphase, der Zusammensetzung des Fluß- und RNA-Puffers, Anwesenheit von bivalenten Metallionen oder Detergenzien, der Salzkonzentration, der Homogenität der aktivierten Chip-Oberfläche und den Regenerationsbedingungen beeinflusst.

Der Einfluß der NaCl-Konzentration im Konzentrationsbereich von 50 mM bis 400 mM auf die Bindung der RNA an das immobilisierte Trisaccharid **12** wurde für die RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G und die tRNA-Asp als Kontrolle untersucht (Kapitel 2.2.22.2, Tab. 4, Abb. 17). Nach der Injizierung aller RNAs steigt das Signal exponentiell an und nähert sich im Fall einer niedrigen (50 mM) oder hohen (400 mM) NaCl-Konzentration in der Assoziationsphase nach 10 min einer Sättigung, was theoretisch der Besetzung aller potenziellen Bindungsstellen an der Oberfläche entspricht. Die niedrigen RU-Werte bei 50 mM und 400 mM NaCl deuten auf eine Inhibition der RNA-Bindung hin und diese Messdaten sind nicht auswertbar (Abb. 17). Für die weiteren Messungen wurde eine 150 mM NaCl-Konzentration verwendet.

Die Sensorgramme der unspezifischen Interaktion von tRNA-Asp und der mit Trisaccharid **12** aktivierten Chip-Oberfläche in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration sind in Abbildung 17d gezeigt. Es wurde eine Sättigung der Bindung in der Assoziationsphase und eine schnelle Dissoziation der gebundenen tRNA-Asp von der Oberfläche in der Dissoziationsphase bei 150 mM und 250 mM NaCl beobachtet. Dies muss als Hintergrund aller Messungen betrachtet werden. Die unspezifische Wechselwirkung der tRNA-Asp mit der Oberfläche konnte bei 400 mM NaCl vollständig inhibiert werden (Abb. 17d).

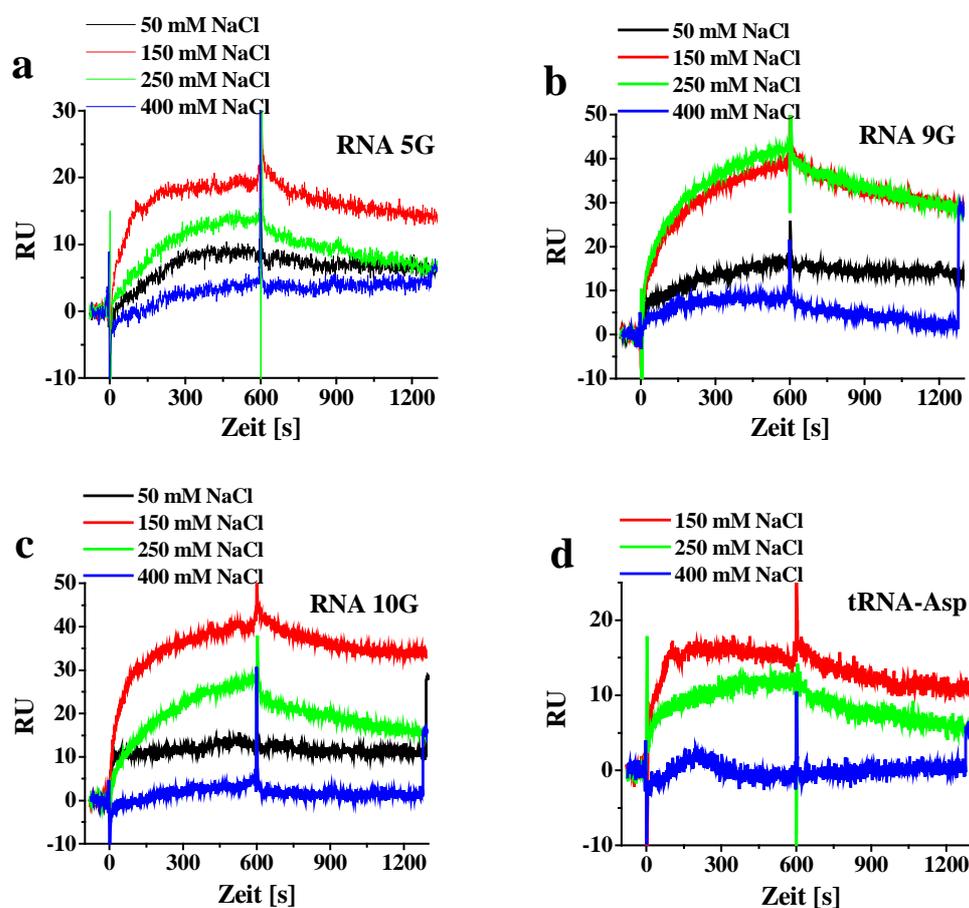


Abb. 17 Sensorgramme der Wechselwirkung der RNA-Aptamere 5G (a), 9G (b), 10G (c) und der tRNA-Asp (d) bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. Es sind die Differenzkurven gezeigt.

Mg^{2+} -Ionen spielen oft eine wichtige Rolle bei der Faltung und Stabilisierung von RNA-Strukturen (110). In mehreren Fällen sind Mg^{2+} -Ionen direkt an der Wechselwirkung der RNA-Moleküle beteiligt. Deswegen wurde der Einfluss der Ab- oder Anwesenheit von Mg^{2+} auf die Wechselwirkung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G mit dem immobilisierten Trisaccharid **12** mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie untersucht und die Bindungsparameter wurden bestimmt (Kapitel 2.2.22.2, Tab. 4). Zur Auswertung der

Sensorgramme wurde in beiden Fällen eine Reaktionskinetik nach Pseudo-1. Ordnung vorausgesetzt (Kapitel 2.2.22.2), die einen linearen Abfall der Basislinie während der Messung berücksichtigt. Die Assoziations- und Dissoziationsphase wurde dabei global und getrennt gefittet (Abb. 44). Die Sensorgramme der Wechselwirkung der RNA-Aptamere mit dem immobilisierten Trisaccharid **12** in Anwesenheit von Mg^{2+} sind in Abbildung 18 gezeigt. Die Dissoziationskonstanten (KD) liegen für alle drei Aptamere im nM Bereich (Tab. 7).

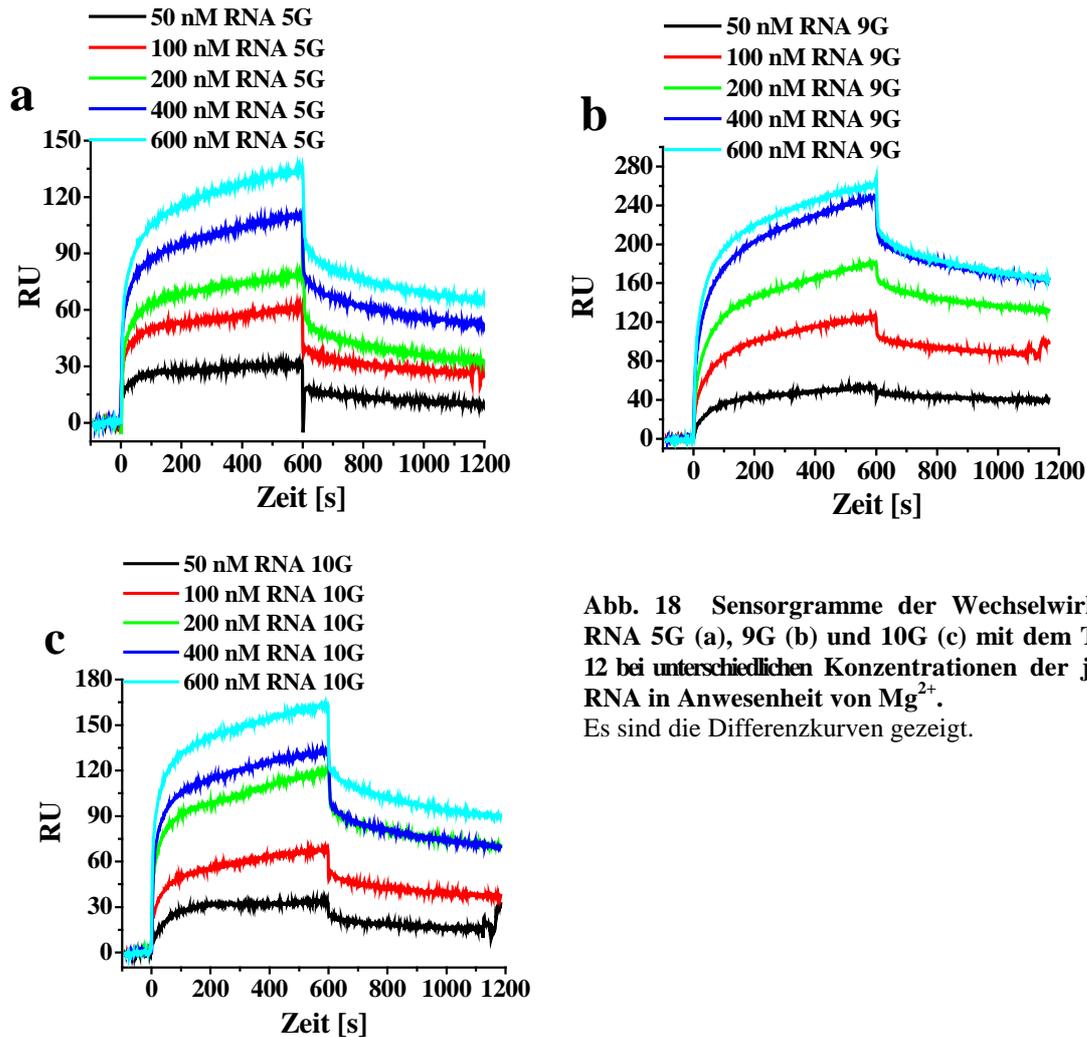


Abb. 18 Sensorgramme der Wechselwirkung der RNA 5G (a), 9G (b) und 10G (c) mit dem Trisaccharid **12** bei unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen RNA in Anwesenheit von Mg^{2+} . Es sind die Differenzkurven gezeigt.

RNA	kd (s^{-1})	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	KD (M)
5G	$7,6 \cdot 10^{-3}$	$2,25 \cdot 10^4$	$3,38 \cdot 10^{-7}$
9G	$1,05 \cdot 10^{-2}$	$2,08 \cdot 10^4$	$5,05 \cdot 10^{-7}$
10G	$1,07 \cdot 10^{-2}$	$2,59 \cdot 10^4$	$4,13 \cdot 10^{-7}$

Tab. 7 Kinetische Konstanten der Trisaccharid/RNA-Komplexbildung in Anwesenheit von Mg^{2+} .

Abbildung 19 zeigt die Sensorgramme der Wechselwirkung der RNA-Aptamere mit dem immobilisierten Trisaccharid **12** in Abwesenheit des divalenten Mg^{2+} . Die entsprechenden

kinetische Konstanten sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Interaktion der RNA-Aptamere mit dem Trisaccharid **12** wurde durch das Mg^{2+} nicht deutlich beeinflusst, was darauf hindeuten könnte, dass Mg^{2+} nicht an der Wechselwirkung der RNA-Aptamere mit dem immobilisierten Trisaccharid **12** beteiligt ist.

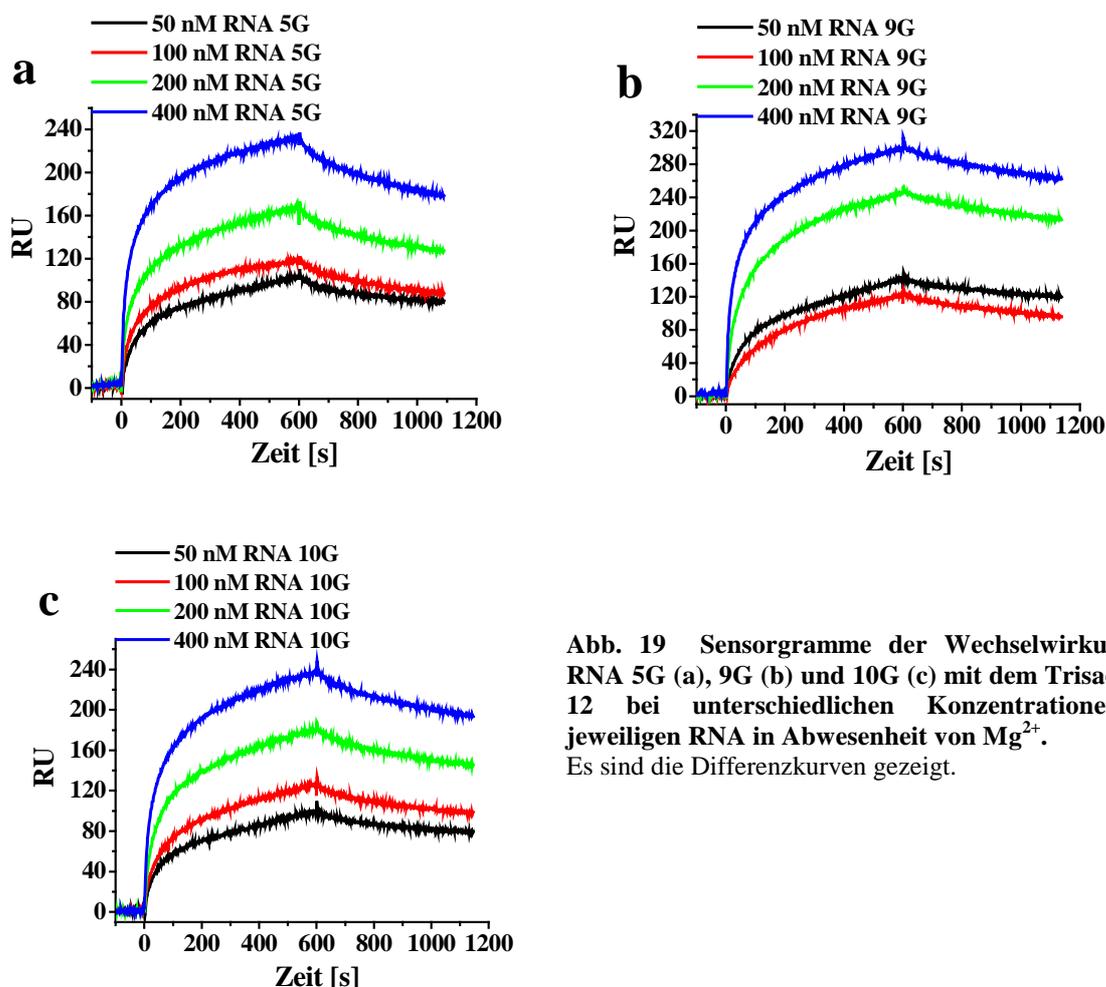


Abb. 19 Sensorgramme der Wechselwirkung der RNA 5G (a), 9G (b) und 10G (c) mit dem Trisaccharid **12** bei unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} . Es sind die Differenzkurven gezeigt.

RNA	kd (s^{-1})	ka ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	KD (M)
5G	$1,13 \cdot 10^{-2}$	$1,27 \cdot 10^4$	$8,89 \cdot 10^{-7}$
9G	$9,97 \cdot 10^{-3}$	$1,42 \cdot 10^4$	$7,02 \cdot 10^{-7}$
10G	$8,56 \cdot 10^{-3}$	$2,59 \cdot 10^4$	$3,31 \cdot 10^{-7}$

Tab. 8 Kinetische Konstanten der Trisaccharid/RNA-Komplexbildung in Abwesenheit von Mg^{2+} .

Die Hybridisierung von RNA mit einem komplementären Desoxyoligonukleotid führt zu einer Änderung der RNA-Konformation und kann dadurch die Bindung von selektierten RNA-Aptameren wesentlich beeinflussen. Die Wechselwirkung der RNA-Aptamere und von

RNA/DNA-Hybriden mit dem immobilisierten Trisaccharid **12** wurde daher mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie untersucht (Kapitel 2.2.22.2, Tab.4). Für die Hybridisierung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G wurden 14 Nukleotid lange chemisch synthetisierte Desoxyoligonukleotide d5G, d9G und d10G benutzt, die komplementär zum Bereich der gefundenen RNA-Konsensussequenz 5'-GAACAAGCAG-3' sind (Abb. 20).

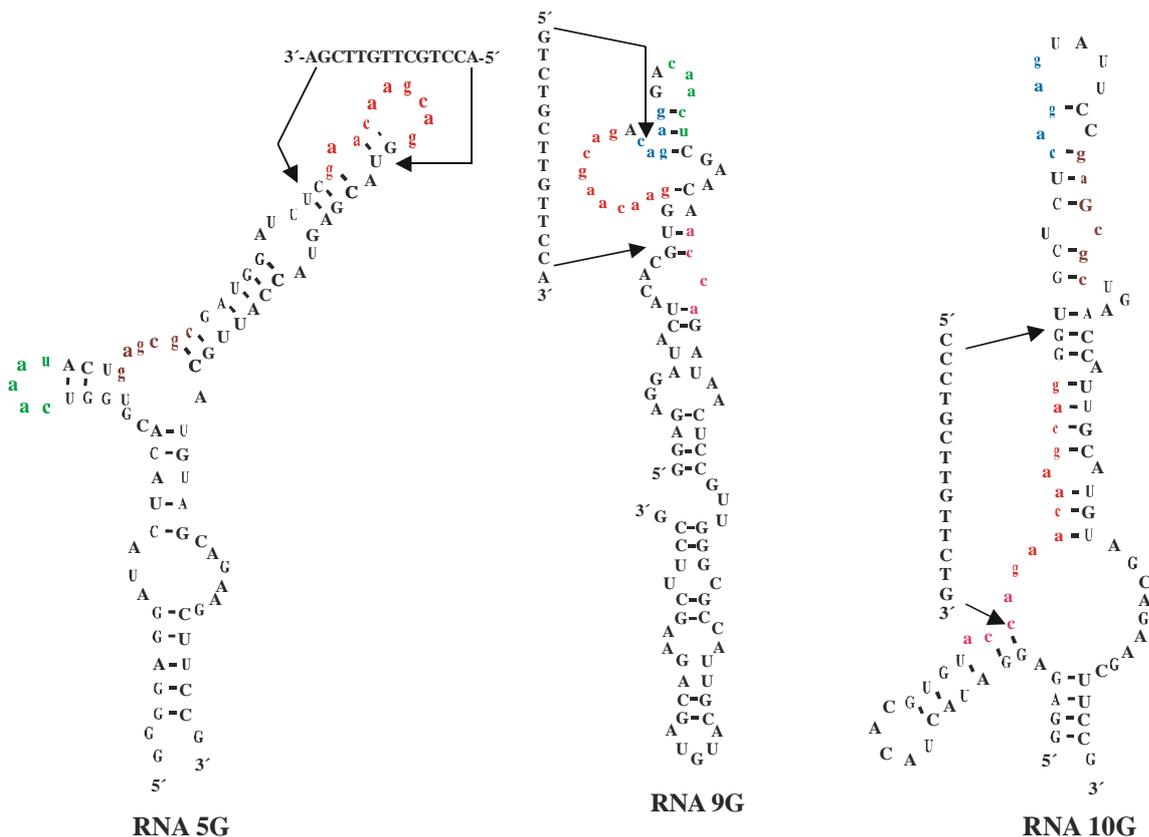


Abb. 20 Die Sekundärstruktur der RNA-Aptamere 5G, 9G, 10G, Sequenz und Lage der komplementären Desoxyoligonukleotide d5G, d9G und d10G.

Die Sekundärstrukturanalyse der RNA-Aptamere wurde nach dem Algorithmus von Zuker (104) mittels des Computerprogramms „Mfold“ durchgeführt. Es sind nur die RNA-Sekundärstrukturen mit dem niedrigsten ΔG° -Wert (-26,38 kcal/mol RNA 5G; -18,3 kcal/mol RNA 9G; -20,01 kcal/mol RNA 10G) gezeigt. Die gefundenen Konsensussequenzen sind klein geschrieben und in Farbe dargestellt.

Durch die Hybridisierung sollte die gefundene Konsensussequenz, die vermutlich an der spezifischen Bindung der RNA-Aptamere an das Trisaccharid beteiligt ist, für die Interaktion nicht mehr zugänglich sein bzw. die RNA-Struktur verändert werden. Das würde sich in einer Verschlechterung der Bindung der RNA/DNA-Hybride an das Trisaccharid **12** zeigen.

Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 21 eine bessere Bindung der RNA/DNA-Hybride, was sich durch eine wesentliche Erhöhung der RU-Werte für die RNA/DNA-Hybride im Vergleich zu den RU-Werten der RNA-Aptamere ausdrückt. Es wurde keine unspezifische

Interaktion der Desoxyoligonukleotide d5G, d9G und d10G mit dem immobilisierten Trisaccharid **12** beobachtet (Abb. 21). Das gleiche Phänomen wurde auch bei der Hybridisierung der RNA-Aptamere mit dem komplementären Desoxyoligonukleotid-Primer P25 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich hier wahrscheinlich um eine komplizierte Interaktion der RNA/DNA-Hybride mit der modifizierten Chip-Oberfläche, die weiter nicht untersucht wurde.

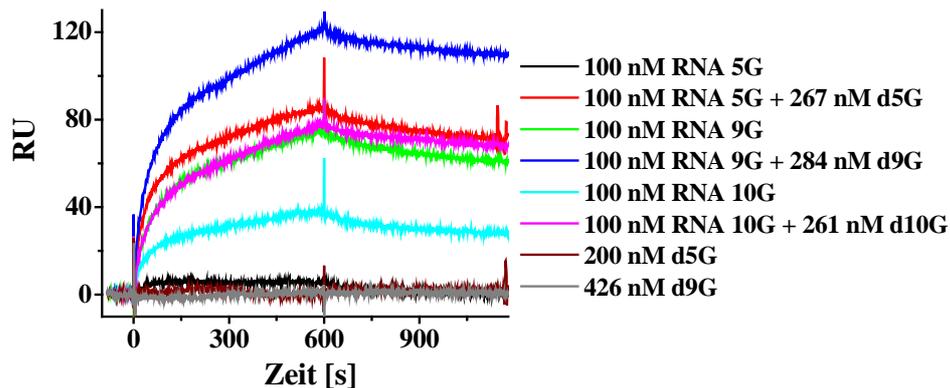


Abb. 21 Sensorgramme der RNA 5G, 9G und 10G hybridisiert mit den komplementären Desoxyoligonukleotiden d5G, d9G und d10G. Es sind die Differenzkurven gezeigt.

3.2.5 Untersuchung der Bindung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G an verschiedene Säulenmaterialien

Im Folgenden wurde die Spezifität der selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G gegen das Trisaccharid **13** untersucht. Dabei wurde die Bindung der RNA-Aptamere an die Trisaccharid-Thiopropyl-Sepharose 6B mit der Bindung an verschiedene andere Festphasen verglichen (Kapitel 2.2.20). Es wurden Festphasen mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgewählt, die aus einer Polysaccharid- oder Acrylamidmatrix oder aus einem Gemisch beider bestanden. Folgende Säulenmaterialien wurden getestet: Sephadex G25 (quervernetztes Dextran B512), Superdex 200 (quervernetzte Agarose/Dextran), Sephacryl S200HR (quervernetztes Allyldextran/N,N'-Methylenbisacrylamid), Biogel P6 (Polyacrylamid), Sepharose 6B (quervernetzte Agarose) und Sepharose 6B modifiziert mit dem Trisaccharid **13** (Kapitel 2.2.16.2). Die entsprechende Festphase wurde dabei mit dem jeweiligen RNA-Aptamer bei Selektionsbedingungen in dem Filtrationssystem äquilibriert. Der nicht gebundene RNA-Anteil wurde von der Festphase nach jedem Waschschrift durch eine kurze Zentrifugation entfernt. Wie in Abbildung 22 gezeigt, binden die RNA-Aptamere an die Sepharose 6B und die Trisaccharid-Thiopropyl-Sepharose 6B im Vergleich zu den anderen

Festphasen sehr stark. Prozentuell bleiben nach dem 4. Waschschrift an der Sepharose 6B 20 bis 24 % und an Trisaccharid-Thiopropyl-Sepharose 6B 11 bis 18 % der gesamten RNA gebunden (Abb. 22). Dieser gebundene RNA-Anteil nimmt nach weiteren Waschschriften stufenweise weiter ab. Es ist nicht klar ob es sich hier um eine unspezifische Wechselwirkung der RNA-Aptamere mit der Sepharose 6B handelt, die durch die Modifizierung mit dem Trisaccharid **13** inhibiert wird, oder ob eine gleichzeitige Erkennung des Säulenmaterials und des immobilisierten Trisaccharids **13** stattfindet. Für andere Festphasen gilt allgemein, dass 40 bis 70 % der gesamten RNA bereits im ersten Durchfluss eluiert (Abb. 45 a, b, c). Hier findet also keine unspezifische Wechselwirkung der RNA mit der Festphase statt.

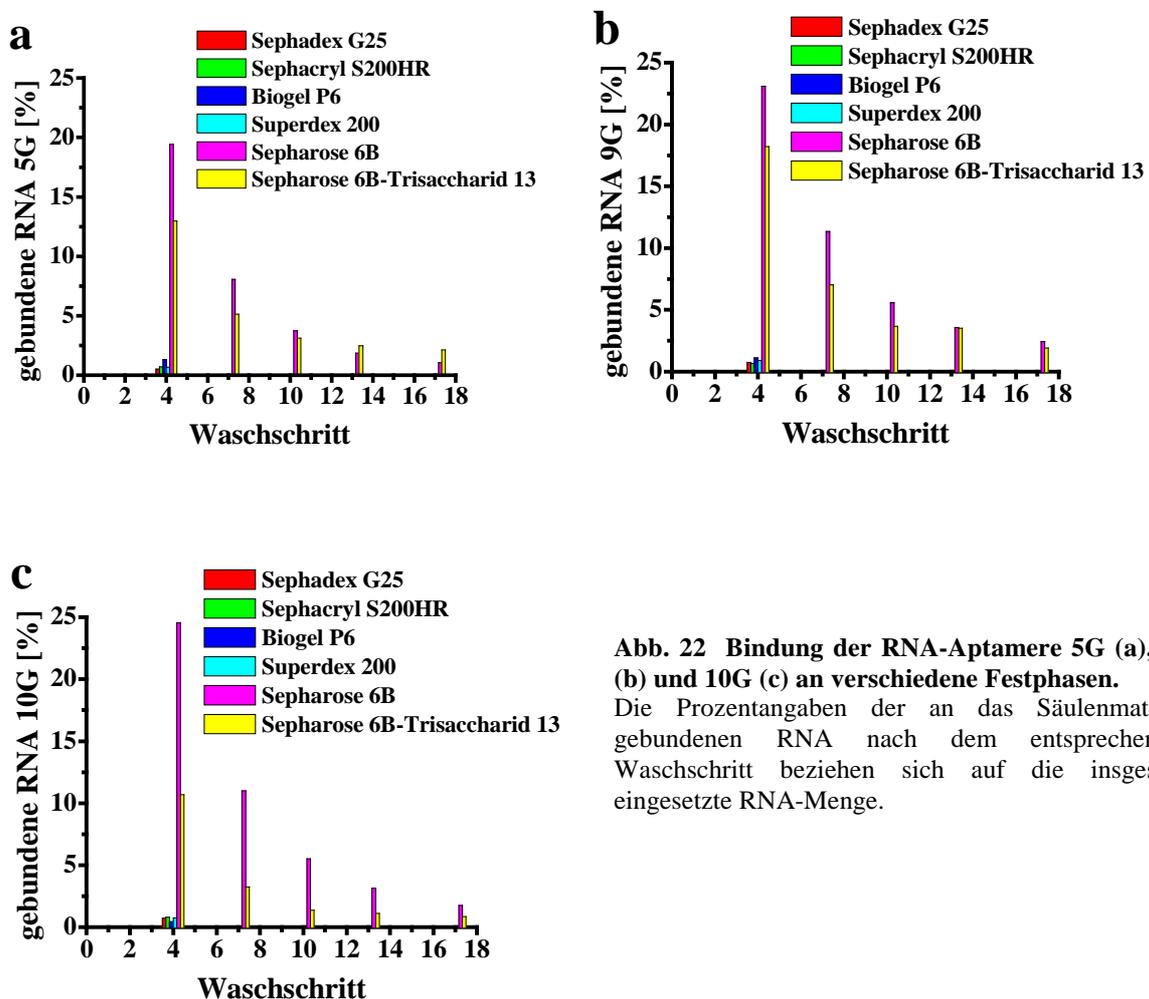


Abb. 22 Bindung der RNA-Aptamere 5G (a), 9G (b) und 10G (c) an verschiedene Festphasen.

Die Prozentangaben der an das Säulenmaterial gebundenen RNA nach dem entsprechenden Waschschrift beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge.

Eine unspezifische Interaktion der RNA mit der Festphase kann durch höhere Salzkonzentration unterdrückt werden. Deswegen wurde untersucht, ob die Wechselwirkung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G mit der Sepharose 6B durch Variation der NaCl-Konzentration von 0 mM bis 400 mM beeinflusst wird (Kapitel 2.2.21, Abb. 23). Die RNA-

Aptamere wurden mit der Sepharose 6B in Filtrationssystem bei entsprechenden NaCl-Konzentration bei Raumtemperatur äquilibriumiert und der nicht gebundene RNA-Anteil wurde durch kurze Zentrifugation nach jedem Waschschrift getrennt. Der an der Sepharose 6B gebundene RNA-Anteil nimmt mit steigender NaCl-Konzentration eindeutig ab, wird aber mit 400 mM NaCl nicht komplett inhibiert (Abb. 23). Es handelt sich wahrscheinlich nicht um eine hydrophobe sondern um eine ionische Wechselwirkung der RNA-Aptamere mit der Festphase. Die unspezifischen Interaktionen können mit hoher Salz-Konzentration eliminiert werden. Da die Erkennung des Trisaccharids **13** durch die Aptamere sehr wahrscheinlich auch auf Wasserstoffbrücken beruht wurde der Einfluss einer höheren NaCl-Konzentrationen als 400 mM nicht getestet.

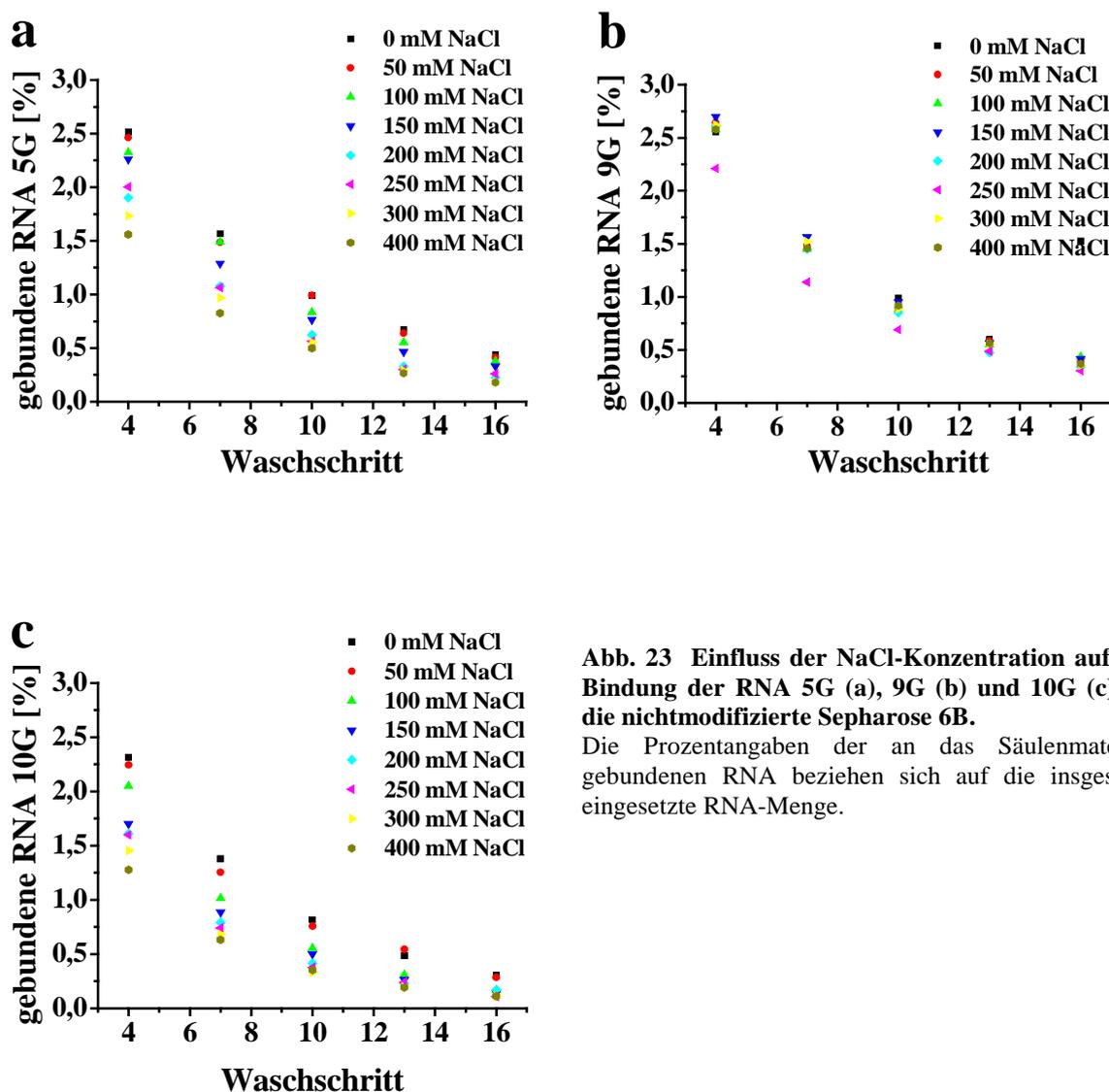


Abb. 23 Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Bindung der RNA 5G (a), 9G (b) und 10G (c) an die nichtmodifizierte Sepharose 6B.

Die Prozentangaben der an das Säulenmaterial gebundenen RNA beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge.

3.2.6 Untersuchung der Wechselwirkung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G mit dem Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man an der Glasoberfläche

Um die Spezifität der RNA-Aptamere gegen das Trisaccharid **13** zu zeigen, wurde das Trisaccharid **13** auch an einer Glasoberfläche kovalent immobilisiert (Kapitel 2.2.17.2). Diese Glasoberfläche unterscheidet sich in ihren Eigenschaften von der bei der Selektion verwendeten Thiopropyl-Sepharose 6B deutlich. Dazu musste die Glasoberfläche nach einer basischen Behandlung zuerst mit (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilan silanisiert werden (Kapitel 2.2.17.1), wodurch die Hydrophobizität der Oberfläche erhöht wurde (Abb. 24). Die Anwesenheit von freien SH-Gruppen wurde durch die spezifische Reaktion mit Ellman's Reagenz nachgewiesen (Abb. 24). Die Absorption des entstandenen 2-nitro-5-thiobenzoat Anions wurde dabei mittels UV-Spektroskopie bei 412 nm gemessen ($\epsilon_{412\text{nm}} = 13\ 600\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in 50 % (v/v) aceton/20 mM Phosphatpuffer bei pH 8,0) (102).

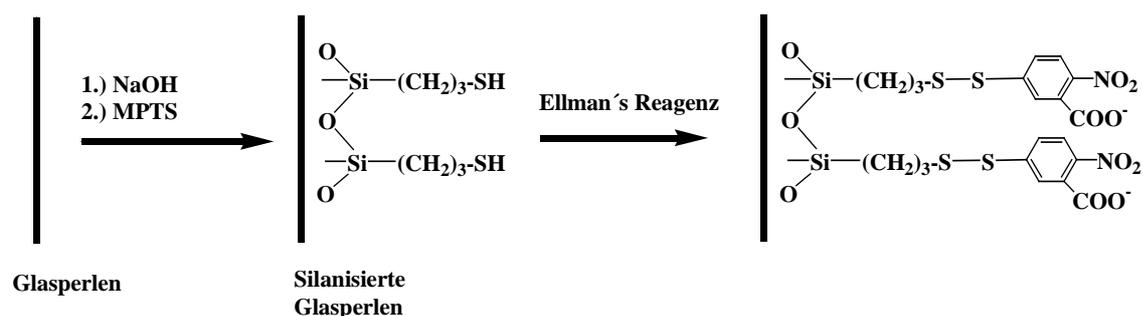


Abb. 24 Schema der Silanisierung von Glasperlen und des Nachweises von freien SH-Gruppen durch Ellman's Reagenz.

Das Trisaccharid **13** wurde durch eine aktivierte Disulphidbrücke in dem Spacer kovalent an der silanisierten Glasperlenoberfläche immobilisiert. Der Rest von freien SH-Gruppen wurde mit Iodoacetamid deaktiviert (Kapitel 2.2.17.2, Abb. 25).

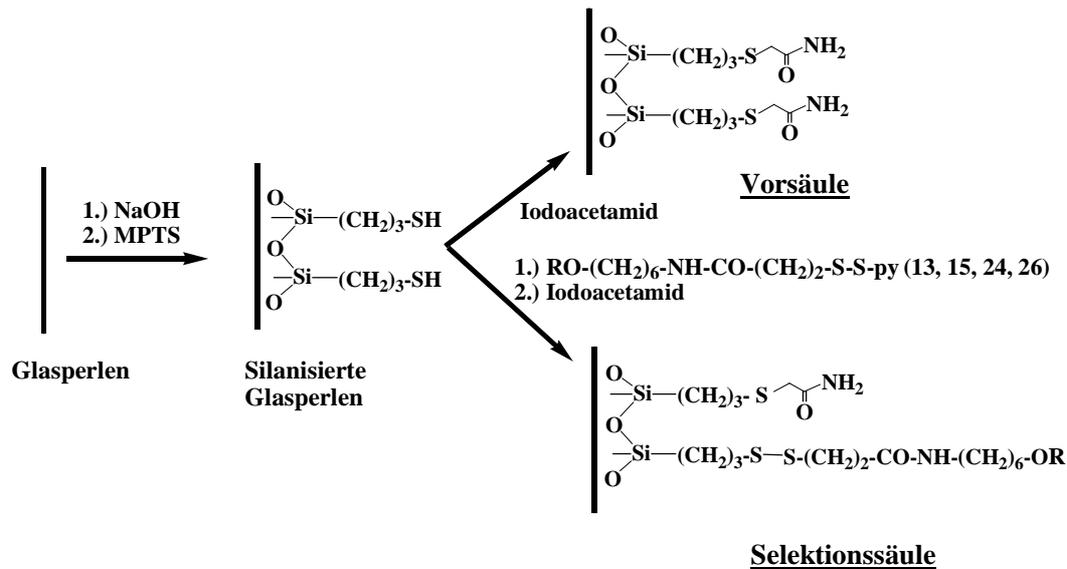


Abb. 25 Schema der Silanisierung und der Aktivierung von Glasperlen mit den aktivierten Oligosacchariden 13, 15, 24 und 26.

Der qualitative Verlauf der Aktivierung der silanierten Glasperlen mit dem Trisaccharid **13** wurde mittels UV-Spektroskopie durch die Messung der Absorption des entstandenen 2-Thiopyridons bei 342 nm ($\epsilon_{342 \text{ nm}} = 11\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Kapitel 2.2.16.1) verfolgt (Abb. 26). Die Glasperlen-Oberfläche ließ sich im Vergleich zu der Thiopropyl-Sepharose 6B wesentlich schlechter aktivieren. Die Menge des immobilisierten Trisaccharides **13** wurde dabei nicht bestimmt.

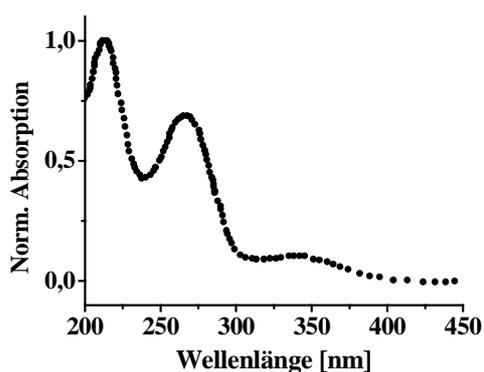


Abb. 26 UV-Spektrum des bei der Aktivierung der silanierten Glasperlen entstandenen 2-Thiopyridons im Überstand.

Die Bindung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G an das immobilisierte Trisaccharid **13** wurde mit der Bindung an silanierte Glasperlen im Filtrationssystem wie bereits beschrieben verglichen (Kapitel 2.2.20). Die RNA-Aptamere binden nach vier Waschschrinen auf die silanierte Glasoberfläche stärker als auf die silanierte und mit dem Trisaccharid **13**

modifizierte Glasoberfläche (Abb. 27 und 45 d, e, f). Allerdings bleibt der gebundene RNA-Anteil nach dem 7. Waschschrift auf beiden Oberflächen fast gleich, was auf eine sehr starke Bindung der RNA hindeutet. Es könnte sich hierbei um eine unspezifische hydrophobe Wechselwirkung der RNA mit der silanisierten Glasoberfläche handeln, die eine potenzielle Interaktion der RNA mit dem Trisaccharid überdeckt. Die Aussage dieses Experiments ist deswegen nicht eindeutig.

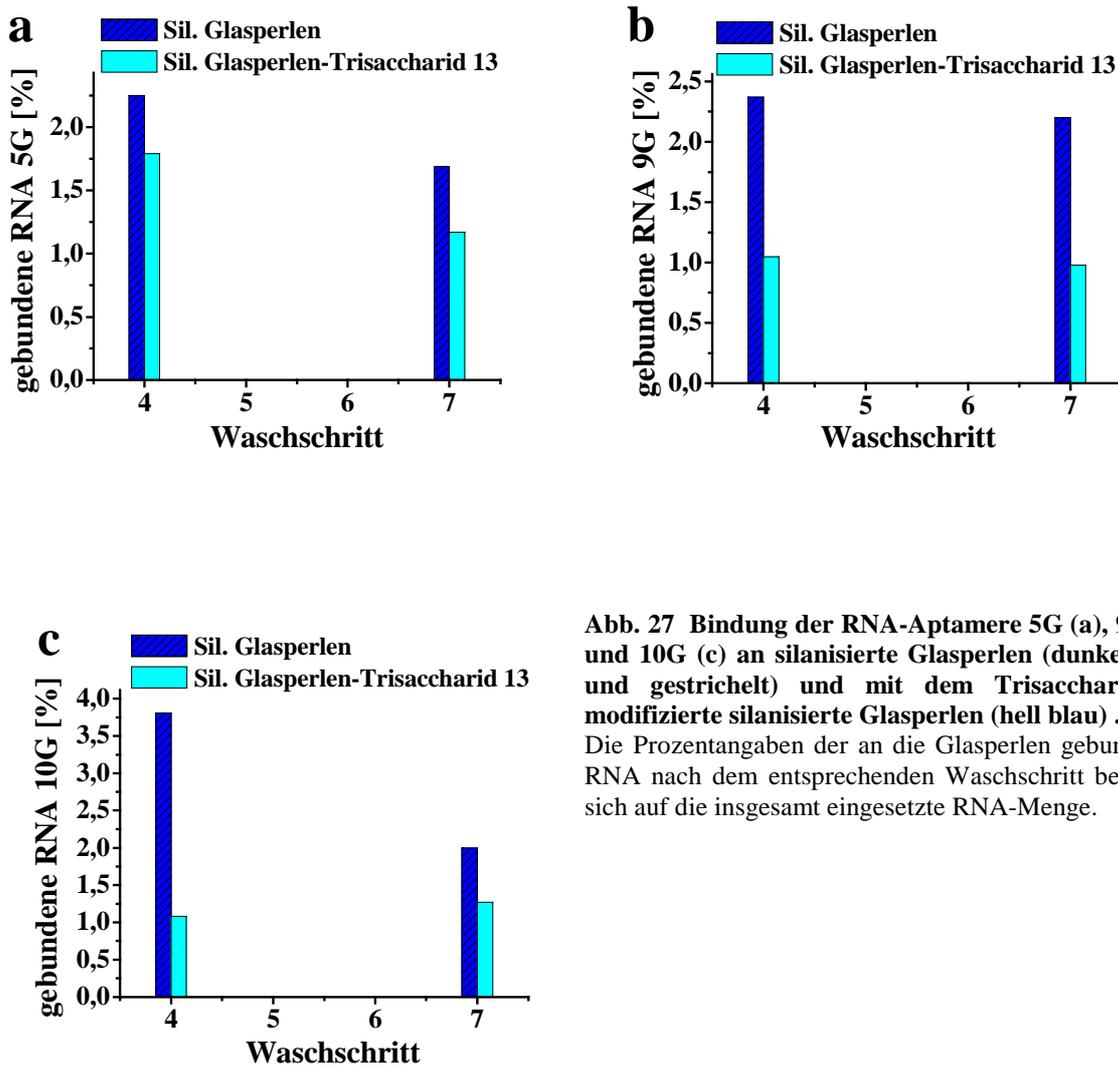


Abb. 27 Bindung der RNA-Aptamere 5G (a), 9G (b) und 10G (c) an silanisierte Glasperlen (dunkel blau und gestrichelt) und mit dem Trisaccharid 13 modifizierte silanisierte Glasperlen (hell blau). Die Prozentangaben der an die Glasperlen gebundenen RNA nach dem entsprechenden Waschschrift beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge.

3.3 *In vitro* Selektion von RNA-Aptameren gegen das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR, Tetrasaccharid α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR, Pentasaccharid 2,4-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR und Heptasaccharid 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR

3.3.1 *In vitro* Selektion 2/1 an Thiopropyl-Sepharose 6B

Die erste *in vitro* Selektion gegen das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man ergab keine eindeutige Antwort auf die Frage, ob die selektierten RNA-Aptamere spezifisch an das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man, unspezifisch an die Sepharose 6B als Festphase bzw. an beide gleichzeitig binden. Eine erfolgreiche *in vitro* Selektion ist von vielen Parametern abhängig. Deswegen wurde ausgehend von den bisherigen Ergebnissen in dieser Arbeit eine neue *in vitro* Selektion 2/1 mit mehreren Modifikationen durchgeführt (Kapitel 2.2.18.4 und 2.2.18.5).

Um eine Kontamination mit dem Säulenmaterial aus der Präselektion zu verhindern und einfachere Phasentrennung durch kurze Zentrifugation zu ermöglichen, wurde statt dem bisher verwendeten „batch“-Verfahren ein Filtrationssystem verwendet. Das Filtrationssystem ermöglichte es gleichzeitig mehrere *in vitro* Selektionen parallel durchzuführen.

Drei neue Oligosaccharide α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR (**15**), 2,4-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR (**24**) und 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR (**26**) wurden synthetisiert (Kapitel 2.2.1, Schema 7 und 8), die sich in der Größe, der Verzweigung und der Ladung unterscheiden. Ähnlich wie das Trisaccharid **13** wurden auch diese Oligosaccharide mit einem 9 Atome langen Spacer, der eine aktivierte Disulphidbrücke enthielt, synthetisiert (Kapitel 2.2.1, Schema 7 und 8). Dadurch blieb die Möglichkeit einer kovalenten Immobilisierung von Oligosacchariden und der Isolierung des Oligosaccharid/RNA-Komplexes durch eine chemische Reduktion nach der Selektion beibehalten.

Das Trisaccharid **13**, die Oligosaccharide **15**, **24**, **26** und der aktivierte Spacer **30** wurden an Thiopropyl-Sepharose 6B immobilisiert (Kapitel 2.2.16.2, Abb. 4). Die Aktivierung wurde mittels UV-Spektroskopie durch die Messung der Absorption des entstandenen 2-Thiopyridons bei 342 nm verfolgt (Abb. 6 und 28).

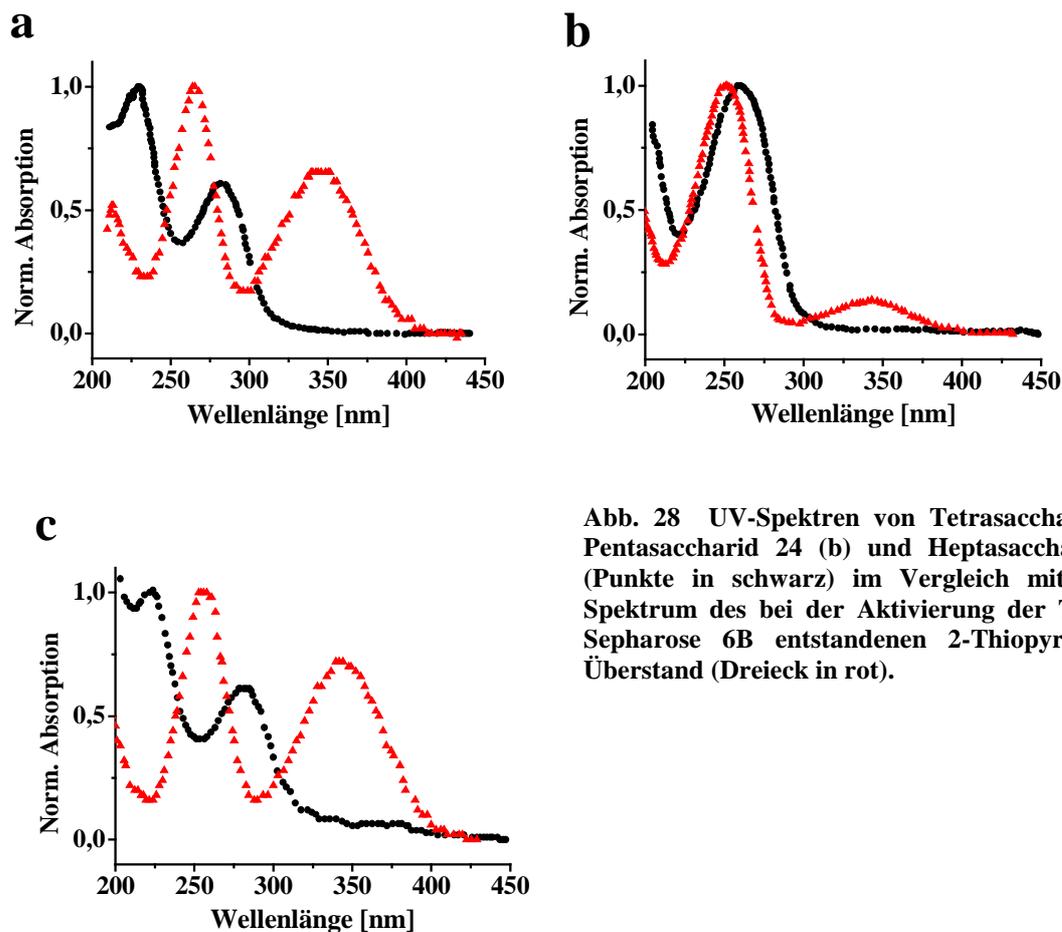


Abb. 28 UV-Spektren von Tetrasaccharid **15** (a), Pentasaccharid **24** (b) und Heptasaccharid **26** (c) (Punkte in schwarz) im Vergleich mit dem UV-Spektrum des bei der Aktivierung der Thiopropyl-Sepharose **6B** entstandenen 2-Thiopyridons im Überstand (Dreieck in rot).

Aus der $A_{342 \text{ nm}}$ wurde mittels des experimentell bestimmten Extinktionskoeffizienten des 2-Thiopyridons ($\epsilon_{342 \text{ nm}} = 11\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Kapitel 2.2.16.1, Abb. 5) die Menge an immobilisiertem Spacer- und Oligosaccharid ausgerechnet. Es wurden von den gesamten freien SH-Gruppen ($\sim 55 \mu\text{mol}$ freie SH-Gruppen/g Thiopropyl-Sepharose **6B** = $5,42 \mu\text{mol/ml}$ gequollener Thiopropyl-Sepharose **6B**, Kapitel 2.2.16.2) $\sim 3 \%$ mit Spacer **30**, oder $\sim 5,8 \%$ mit dem Trisaccharid **13**, $\sim 2,7 \%$ mit dem Tetrasaccharid **15**, $\sim 1,8 \%$ mit dem Pentasaccharid **24** und $\sim 2 \%$ mit dem Heptasaccharid **26** derivatisiert. Restlichen freien SH-Gruppen wurden mit Iodoacetamid deaktiviert (Abb. 4).

Die Oligosaccharide **15** und **26** enthielten auch einen bzw. zwei negativ geladene Neuraminsäurereste (Abb. 2). Es ist bekannt, dass Neuraminsäure Ca^{2+} -Ionen für die Wechselwirkung mit Proteinen durch Wasserstoffbrücken bevorzugt. Deswegen wurden im Selektionspuffer im Vergleich zu der ersten *in vitro* Selektion 1 zusätzlich zu Mg^{2+} -Ionen auch Ca^{2+} -Ionen zugegeben, um eine Bindung der Neuraminsäure zu begünstigen. Gleichzeitig wurde eine niedrigere NaCl-Konzentration (100 mM im Vergleich zu 250 mM NaCl bei der *in vitro* Selektion 1) benutzt.

Die *in vitro* Selektion gegen das Trisaccharid **13** wurde parallel mit den *in vitro* Selektionen gegen die Oligosaccharide **15**, **24** und **26** wiederholt. Um den Verlust des geringen Anteils von Oligosaccharid-bindenden RNA-Molekülen am Anfang der Selektion zu minimieren, wurden die gebundenen RNA-Moleküle in ersten fünf Selektionszyklen in der Anwesenheit des Säulenmaterials revers transkribiert und in einer PCR vermehrt. Die Anreicherung der bindenden RNA an der Selektionssäule in den einzelnen Selektionszyklen ist in Abbildung 29 gezeigt. Erst nach einer deutlichen Anreicherung im 5. Selektionszyklus (2,2 % für Trisaccharid **13**; 2,42 % für Tetrasaccharid **15**; 3 % für Pentasaccharid **24**; 3,9 % für Heptasaccharid **26**) (Abb. 29, Tab 10b) wurde die Stringenz der Selektion durch stärkeres Auswaschen und spezifische Elution von Oligosaccharid/RNA-Komplexen unter reduzierenden Bedingungen erhöht. Der 5. Selektionszyklus wurde dazu bei höherer Stringenz wiederholt und die Selektionsbedingungen blieben dann bis zum Ende der Selektion unverändert. Nach der Erhöhung der Selektionsstringenz nahm die Menge der gebundenen RNA im 5. Selektionszyklus ab (1,04 % für Trisaccharid **13**; 0,82 % für Tetrasaccharid **15**; 1,27 % für Pentasaccharid **24** und 2,14 % für Heptasaccharid **26**), stieg aber in den folgenden Zyklen wieder an (Abb. 29, Tab. 10b).

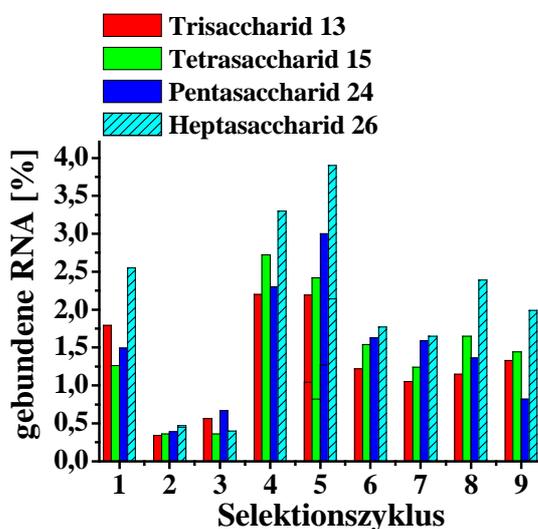


Abb. 29 Graphische Darstellung der Anreicherung der bindenden RNA in der Selektion 2/1 an Thiopropyl-Sepharose 6B gegen Trisaccharid **13** (rot), Tetrasaccharid **15** (grün), Pentasaccharid **24** (dunkel blau) und Heptasaccharid **26** (hell blau und gestrichelt) in den einzelnen Selektionszyklen. Die Prozentangaben der gebundenen RNA beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge in den einzelnen Selektionszyklen. Im 5. Selektionszyklus ist die Anreicherung vor und nach der Erhöhung der Selektionsstringenz gezeigt.

3.3.1.1 Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere gegen das Heptasaccharid 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR aus der Selektion 2/1

Nur die RNA-Bibliotheken aus dem 4. und 8. Selektionszyklus der Selektion 2/1 gegen das Heptasaccharid **26** wurden weiter analysiert. Der bindende RNA-Anteil aus der Heptasaccharid-Thiopropyl-Sepharose 6B (Selektionssäule) und nichtmodifizierter Sepharose

6B (Vorsäule) wurde nach mehreren Waschschritten in Anwesenheit der Festphase revers transkribiert (Kapitel 2.2.18.6), in einer PCR vermehrt und kloniert (Kapitel 2.2.18.7). Die Sequenzierung der Plasmide lieferte in beiden Fällen wieder die Aptamere 5G, 9G und 10G (Tab. 9, Abb. 9), die auch in der Selektion 1 gegen das Trisaccharid **13** (Kapitel 3.2.2) gefunden wurden. Die *in vitro* Selektion 2/1 gegen das Heptasaccharid **26** hat also bei geänderten Selektionsbedingungen und einem anderen Liganden keine neuen RNA-Aptamere im Vergleich zu der Selektion gegen das Trisaccharid **13** (Kapitel 3.2.2) hervorgebracht.

Sepharose 6B				Thiopropyl-Sepharose 6B-Heptasaccharid 26			
Selektionszyklus	RNA 5G	RNA 9G	RNA 10G	Selektionszyklus	RNA 5G	RNA 9G	RNA 10G
4.	-	4 x	4 x	4.	1 x	10 x	1 x
8.	1 x	2 x	3 x	8.	2 x	2 x	3 x

Tab. 9 Anzahl der an Sepharose 6B und Heptasaccharid-Thiopropyl-Sepharose 6B bindenden RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G in entsprechenden Selektionszyklen der Selektion 2/1.

3.3.2 *In vitro* Selektion 2/2 alternierend an Thiopropyl-Sepharose 6B und silanisierten Glasperlen

Um die an Thiopropyl-Sepharose 6B unspezifisch bindenden RNA-Moleküle zu entfernen, wurde parallel für alle vier Oligosaccharide **13**, **15**, **24** und **26** eine andere Selektionsstrategie getestet. Zuerst wurden zwei Selektionszyklen gegen Oligosacchariden an modifizierter Thiopropyl-Sepharose 6B durchgeführt, wobei die bindenden RNA-Aptamere wieder in Anwesenheit der Festphase vermehrt wurden. Folgenden zwei Selektionszyklen wurden an einer Glasoberfläche und anschließend zwei Selektionszyklen auf der modifizierten Thiopropyl-Sepharose 6B durchgeführt (Abb. 31) und die Oligosaccharid/RNA-Komplexe durch eine chemische Reduktion der Disulphidbrücke eluiert (Kapitel 2.2.18.4 und 2.2.18.5). Dazu wurden die Oligosaccharide **15**, **24** und **26** ähnlich wie das Trisaccharid **13** über den Spacer mit einer Disulphidbrücke an silanierte Glasperlen kovalent immobilisiert (Kapitel 2.2.17.2, Abb. 25). Der qualitative Verlauf der Aktivierung wurde mittels UV-Spektroskopie durch die Messung der Absorption des entstandenen 2-Thiopyridons bei 342 nm ($\epsilon_{342 \text{ nm}} = 11\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Kapitel 2.2.16.1) verfolgt (Abb. 30). Die Glasperlen-Oberfläche ließ sich mit den Oligosacchariden **13**, **15**, **24** und **26** im Vergleich zu der Thiopropyl-Sepharose 6B wesentlich schlechter aktivieren. Die Menge der immobilisierten Oligosaccharide **13**, **15**, **24** und **26** wurde nicht bestimmt.

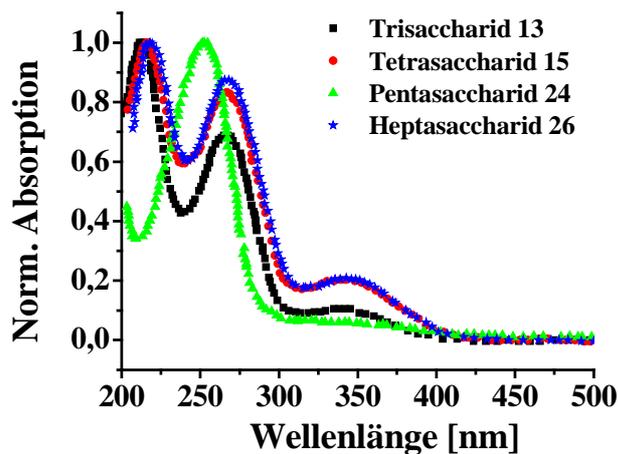


Abb. 30 UV-Spektrum des bei der Aktivierung der silanisierten Glasperlen mit den Oligosacchariden 13, 15, 24, 26 entstandenen 2-Thiopyridons im Überstand.

Aus der Anreicherung der bindenden RNA-Moleküle (Abb. 31b, Tab. 10c) sieht man, dass die Änderung der Oberfläche nach zwei Selektionszyklen zu einer Abnahme der gebundenen RNA geführt hat. Die Anreicherung ist wesentlich niedriger als die Anreicherung an der mit den Oligosacchariden modifizierten Thiopropyl-Sepharose 6B (Abb. 29). Die Abnahme der Anreicherung kann durch den Verlust von RNA-Moleküle aus der RNA-Bibliothek erklärt werden, die unspezifisch an Thiopropyl-Sepharose 6B binden, durch unterschiedliche Mengen der immobilisierten Oligosaccharide an Thiopropyl-Sepharose 6B und den silanisierten Glasperlen und durch die Änderung der Oberflächeneigenschaften. Nach der Rückkehr zu Thiopropyl-Sepharose 6B im 5. und 6. Selektionszyklus wurde wieder ein Anstieg der Anreicherung der gebundenen RNA beobachtet (Abb. 31b).

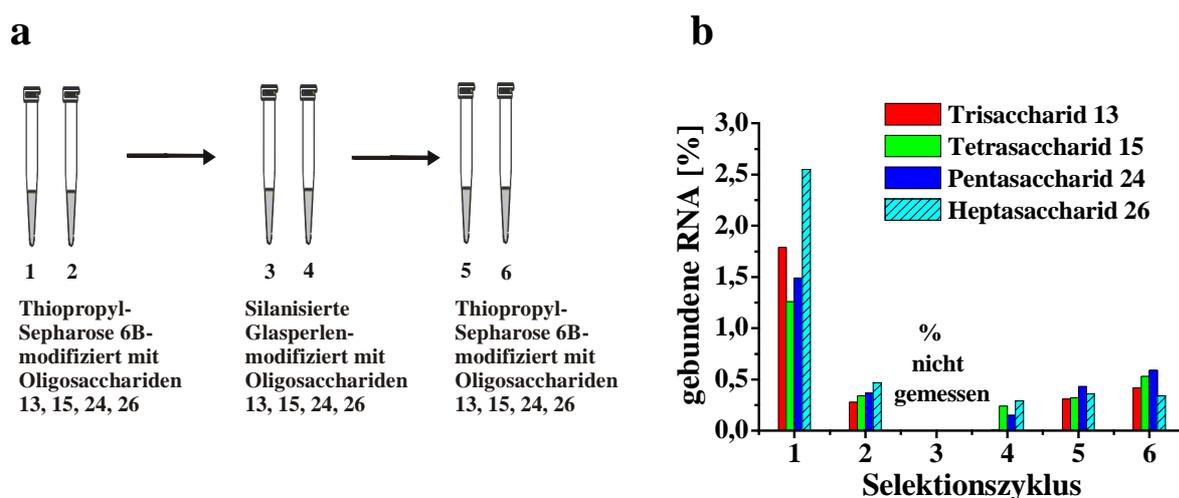


Abb. 31 Selektionsschema der Selektion 2/2 (a) und graphische Darstellung der Anreicherung der bindenden RNA in der Selektion 2/2 an den Selektionssäulen gegen das Trisaccharid 13 (rot), Tetrasaccharid 15 (grün), Pentasaccharid 24 (dunkel blau) und Heptasaccharid 26 (hell blau und gestrichelt) in den einzelnen Selektionszyklen (b). Die Prozentangaben der gebundenen RNA beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge in den einzelnen Selektionszyklen.

3.3.2.1 Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere gegen das Heptasaccharid 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR aus der Selektion 2/2

Aus der Selektion 2/2 (Kapitel 2.2.18.4, 2.2.18.5) wurde nach dem 6. Selektionszyklus der bindende RNA-Anteil von der Heptasaccharid-Thiopropyl-Seharose 6B spezifisch unter reduzierenden Bedingungen eluiert und nach RT-PCR (Kapitel 2.2.18.6) in das Plasmid ligiert (Kapitel 2.2.18.7). Nach der Analyse der Sequenzen wurde ein neues RNA-Aptamer 6D (1x) (Abb. 32) und wiederum das Aptamer 10G (10x) gefunden. Die RNA 6D enthält eine ähnliche Sequenz (**5'-GAACUAGCA-3'**) (Abb. 32), die auch in den RNA-Aptameren 5G, 9G und 10G (**5'-GAACAAGCAG-3'**) (Abb. 8) gefunden wurde. Die Sequenz ist allerdings um einen Nukleotid kürzer und enthält eine Punktmutation (Abb. 32).

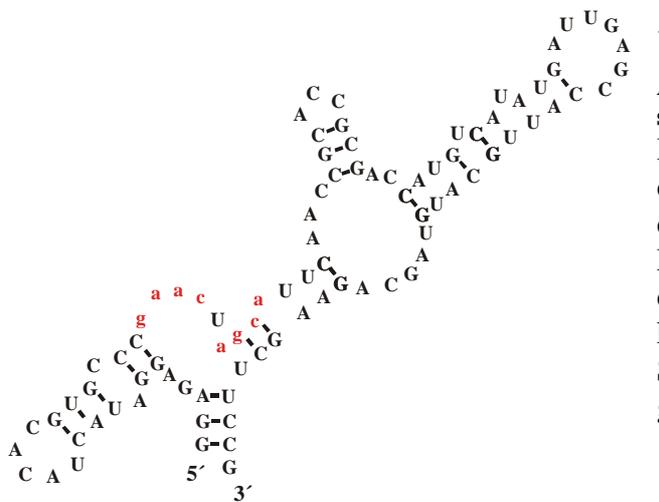
RNA 6D (46 Nt) :

5'- CCC**GAACUAGCA**UUCAACCGCACCGCGACCAUGUCAUAUGAUUGAG-3'

Abb. 32 Sequenz der selektierten RNA 6D.

Es ist nur die Sequenz und die Länge des der ursprünglich randomisierten Bereichs gezeigt. Die gefundene Sequenz (5'-**GAACUAGCA**-3') ist fett gedruckt und unterstrichen.

Die Sekundärstruktur der RNA 6D wurde mittels des Computerprogramms „Mfold“ analysiert (Abb. 33). Die gefundene Sequenz **5'-GAACUAGCA-3'** liegt ähnlich wie die Konsensussequenz **5'-GAACAAGCAG-3'** der RNA Aptamere 5G, 9G und 10G (Abb. 9) teilweise im nichthelikalen Bereich.



RNA 6D

Abb. 33 Sekundärstrukturvorhersage der selektierten RNA 6D.

Die Sekundärstrukturanalyse wurde nach dem Algorithmus von Zuker (104) mittels des Computerprogramms „Mfold“ durchgeführt. Es ist nur die RNA-Sekundärstruktur mit dem niedrigsten ΔG° -Wert (-10,22 kcal/mol) gezeigt. Die gefundene Sequenzen 5'-**GAACUAGCA**-3' ist klein geschrieben und in Farbe dargestellt.

3.3.3 *In vitro* Selektion 3/1 an silanisierten Glasperlen

In allen vorherigen *in vitro* Selektionen wurde Thiopropyl-Sepharose 6B, die aus einer 6 %-ig quervernetzten Agarose besteht, entweder durchweg (Selektionen 1 und 2/1) oder nur teilweise (Selektion 2/2) in den *in vitro* Selektionen als Festphase benutzt. Während der gesamten *in vitro* Selektion war die Festphase im Überschuss zu den immobilisierten Oligosacchariden vorhanden und konnte als potentieller Ligand für die bindende RNA dienen. Trotz einer Präselektion gegen das Säulenmaterial konnten die unspezifisch bindenden RNA-Moleküle nicht vollständig abgetrennt werden. Deswegen wurde der Ausschluss der Polysaccharid-Gelmatrix bereits zu Beginn der Selektion getestet (Kapitel 2.2.18.4, 2.2.18.5). Dazu wurden die synthetisierten Oligosaccharide **13**, **15**, **24** und **26** an einer silanisierten Glasoberfläche (Kapitel 2.2.17.2) immobilisiert, wodurch eine Selektionssäule entstand (Abb. 25). Für die Präselektion wurden silanisierte Glasperlen als Vorsäule benutzt (Abb. 25). Die Trennung der gebundenen RNA von den nicht gebundenen RNA-Molekülen und der Festphase erfolgte im Filtrationssystem. Um die Stabilität des entstandenen Oligosaccharid/RNA-Komplexes zu erhöhen, wurde die gesamte *in vitro* Selektion bei 4 °C durchgeführt.

Die Anreicherung der bindenden RNA an der Selektionssäule ist in Abbildung 34 gezeigt. Das Maximum der Anreicherung wurde im 3. Selektionszyklus beobachtet (Tab. 10d). Im 4. und 5. Selektionszyklus nahm der gebundene RNA-Anteil wieder ab. Im Vergleich zu der Anreicherung der bindenden RNA in den vorherigen Selektionen war die gebundene RNA-Menge sehr niedrig.

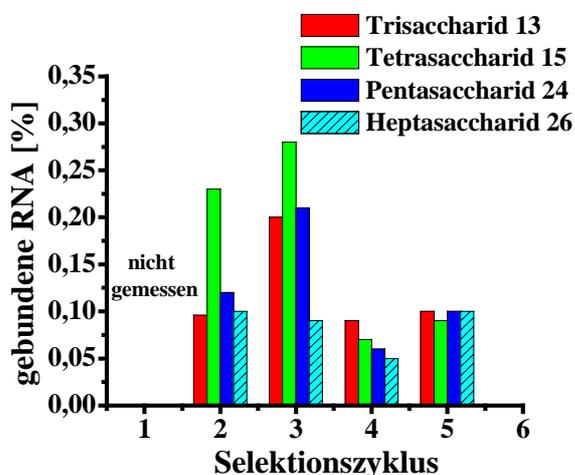


Abb. 34 Graphische Darstellung der Anreicherung der bindenden RNA an Glasperlen modifiziert mit Oligosacchariden 13, 15, 24 und 26 in den einzelnen Selektionszyklen der Selektion 3/1.

Die Prozentangaben der gebundenen RNA beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge in den einzelnen Selektionszyklen.

3.3.3.1 Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere aus der Selektion 3/1

3.3.3.1.1 Sequenzen der selektierten RNA-Aptamere

Die gebundenen RNA-Aptamere aus der Selektion 3/1 (Kapitel 2.2.18.4, 2.2.18.5) nach dem 5. Selektionszyklus wurden von den Selektionssäulen durch chemische Reduktion eluiert, revers transkribiert und in einer PCR vermehrt (Kapitel 2.2.18.6). Nach der Klonierung der DNA-Fragmente in den Vektor pGem-T und der Transformation von kompetenten Zellen (Kapitel 2.2.18.7) wurden die Plasmide aus Einzelkolonien isoliert und sequenziert. Die Sequenzierung lieferte verschiedene DNA-Sequenzen, die im Vergleich zu der eingesetzten DNA-Matrize, die eine 50 Nukleotid lange Zufallssequenz enthielt, teilweise verkürzt oder verlängert waren (Abb. 35). Die DNA-Sequenzen wurden in RNA überschrieben. Es wurden sehr unterschiedliche RNA-Sequenzen gegen alle vier Oligosaccharide **13**, **15**, **24** und **26** gefunden (Abb. 35). Nach dem Vergleich und der Analyse der RNA-Sequenzen wurden mehrere Motive gefunden, die sich in einigen RNA-Aptameren wiederholen. Es ist allerdings nicht klar, ob es sich um Konsensussequenzen handelt. Bei den selektierten RNA-Aptameren gegen das Tetrasaccharid **13** und Heptasaccharid **26** wurde auch das RNA-Aptamer 10G gefunden. Es wurde keine Ähnlichkeit mit RNA-Aptameren, die bereits gegen eine silikonisierte Glasoberfläche selektiert wurden, gefunden (115).

Aptamere gegen das Trisaccharid 13:

RNA 1 (49 Nt):

5'-GUAAAGAUCGUGGGUUCGCGGCGAGACUAAACUACCCCUUUCGAGUGG-3'

RNA 2 (50 Nt):

5'-ACAUCACUCUUGUACUACCAAUCGCCAAAACAAACGAUUGAAACUCAAG-3'

RNA 3 (50Nt):

5'-GGACACACACUCACACCACAACCCACACCAAACGCGGGAAACUUGCACGA-3'

RNA 4 (46 Nt):

5'-AUGCGCGGGUCCUCGAGCAGAGAAAAGUAAUGCUUAUGACUUGUA-3'

RNA 5 (44 Nt):

5'-GCGGUACCAACCAUCUGCGAUCCAAACCAACUCGGCAGAAACAG-3'

RNA 6 (50 Nt):

5'-CGCGGCCAGCCCGUACGCGUCAAACACCACGCGAUACUACAUCACUCGG-3'

RNA 7 (50 Nt):

5'-ACUACUGACAAAAGGAUUGAAGACCCCAAUUACCACCCAUCCACCAGACCA-3'

RNA 8 (50 Nt):

5'-CUGCUACGAGCAACAUCAAGCCCCACGACAAACUUGAUCCGCGGUUAGAA-3'

RNA 9 (51 Nt):

5'-CAAUCCAGAGCAUUAUCGAUAACCCCAAGACGCCUGACCGCCAAUCGA-3'

Aptamere gegen das Tetrasaccharid 15:

RNA 10 (50 Nt):

5'-ACCACAACUUGUGUCGACGGAACAAGGCCUCGCAUUCUUCUGUUCGUUA-3'

RNA 11 (50 Nt):

5'-ACCAGGAAACGAAAUAUGCACCUUGCCGUGAUUGUCAUGACAACCCACAA-3'

RNA 12 (49 Nt):

5'-UCAACCUAACCCGGGAACCACGCACCGGUAACUCUGAAUACAGCCGGUU-3'
RNA 13 (50 Nt):
 5'-CAAAGCCAUACCUGAGAAAGCUGUAGCUACUAACCAUGACGACCGGUUGA-3' (2x)
RNA 14 (50 Nt):
 5'-AUCUGCCCAGGCCAUACCUACAUGUGGCAACUACUCAUGGGAACAGUAAU-3'
RNA 15 (50 Nt):
 5'-CGCCGCCCCUCAAACUCCAGAUGUGUCCAUGUUAAGGUCACACUCAUGAG-3'
RNA 16 (50 Nt):
 5'-ACCAUUGCAGUUUCUAGUUGUCUUAGAUCUUACCUUCCCGAACCGGCUUC-3'
RNA 17 (49 Nt):
 5'-UUGGAAACUAGGCCCGCAAAGUAACAUGUCCAAAAAGCGAACCCGCAG-3'
RNA 10G (44 Nt):
 5'-UACCAGAACAAGCAGGGUGCUCUCAGAGUAUUCGAGCGCUGAA-3'

Aptamere gegen das Pentasaccharid 24:

RNA 18 (43 Nt):
 5'-GCAUGAAUCAGAGGACCAUUCAUUCAGCUAAAGCAACGAAGAG-3'
RNA 19 (48 Nt):
 5'-CCACAGAUUAAAAGGACCUGAAAACCUUCUAAAGCAAACUAUGUCGCAU-3'
RNA 20 (44 Nt):
 5'-CACCAUGAAAAACUCUAGAUCACCACGCUUUAUACGAGGUCA-3'
RNA 21 (44 Nt):
 5'-GGUACCAAUAACACAUACACCAAGCGGCUACCCUCUACAAACGA-3'
RNA 22 (39 Nt):
 5'-AUUCCAUAUAAAAGACAAACAAUACAUAUCUUGCCUCAU-3'
RNA 23 (50 Nt):
 5'-CAUACCAGAGUCAUUUGCGACUAAACUACACCCAGAUACCCUGUGCCUU-3'
RNA 24 (49 Nt):
 5'-AAGGAUACCAUCGCACCUUCCCAAUCGAACAUUUCACCGCCCCUGGUAA-3'
RNA 25 (48 Nt):
 5'-AACCCGCGAGUCGCACUGUGCCCCCAUACAAAAUGUGUUAACGGC-3'

Aptamere gegen das Heptasaccharid 26:

RNA 26 (41 Nt):
 5'-CUAAGGAAACUGCUGAAACCGUCACAACCCUUACUACAUAC-3'
RNA 27 (50 Nt):
 5'-AAUUGGCAACCUAGACUCUAAGCGCGCAAAAGCAGCCGCUACCAUACACG-3'
RNA 28 (45 Nt):
 5'-GGGGGCUAGCUAACAAUUCACCGCACACUCCCCGCACUUUGACA-3'
RNA 29 (47 Nt):
 5'-CACUUUAAAAACAUUCUCACUGCAUGACCUCGUCCGCACUGCCAACA-3'
RNA 30 (43 Nt):
 5'-CAUUACCCGCUAUGUCCCCUAUAAAACCGUUGACUUGGCGCU-3'
RNA 31 (50 Nt):
 5'-CCACUAAUCCGCGCCGUGCCGCACAUGCUAUCCAACGAAGCAACGCCAAA-3'
RNA 32 (50 Nt):
 5'-AUGCGACCUUCCCCCGAGCAGGAGACAUCCACGCGUACAAGCUGAUUAC-3'
RNA 33 (46 Nt):
 5'-GGGGCUGAAUCCCUAGGAAGUAUGACUCGCUCUCACAAAUCCGUUG-3'
RNA 34 (44 Nt):
 5'-ACCCGUGACCUACGCGAUACUAACCCAAAACGAAUGUCUAUAG-3'
RNA 35 (49 Nt):
 5'-AGCGGAUAAACCACUGAACAGAAAAGACCCCAUCAGGAACGCAGGUAUA-3'
RNA 36 (50 Nt):
 5'-UCGACCAUACACGUUCCCAAGCUGAAUCGCCCCGUAACUAGUAUCAUAGUC-3'
RNA 10G (44 Nt):
 5'-UACCAGAACAAGCAGGGUGCUCUCAGAGUAUUCGAGCGCUGUA-3' (3x)

Abb. 35 Sequenzen der gegen die Oligosaccharide 13, 15, 24 und 26 selektierten RNA-Aptamere aus der Selektion 3/1. Es sind nur die Sequenzen und die Länge des ursprünglich randomisierten Bereichs gezeigt. In Klammern ist die Anzahl der gefundenen RNA-Sequenzen eingegeben.

3.3.3.1.2 Qualitativer Nachweis der Wechselwirkung der selektierten RNA-Aptameren mit dem Heptasaccharid 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

Die Wechselwirkung der selektierten RNA-Aptameren mit dem Heptasaccharid **25** wurde mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie untersucht (Kapitel 2.2.22.2, Tab. 4). Es wurde keine unspezifische Wechselwirkung der RNA-Aptamere mit der nichtmodifizierten Carboxymethyl-dextran-Oberfläche beobachtet (Abb. 36).

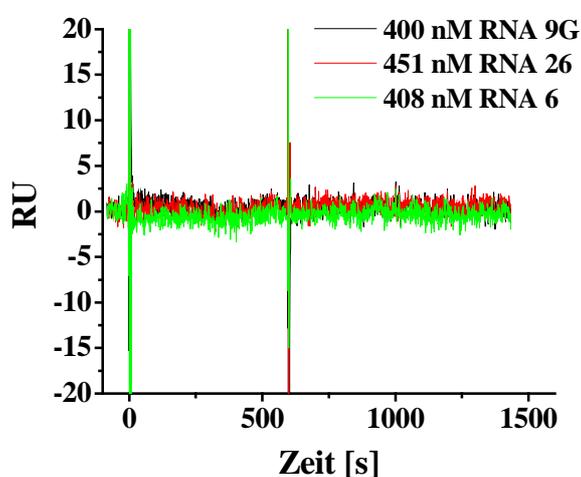


Abb. 36 Sensorgramme der Bindung der RNA-Aptamere 6, 26 und 9G an die nichtmodifizierte Carboxymethyl-dextran-Oberfläche des CM5-Chips. Es sind die Differenzkurven gezeigt.

Die freien COO⁻-Gruppen der Carboxymethyl-dextran-Oberfläche in beiden Flusszellen wurden mit einer N-Hydroxysuccinimid- und N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Lösung aktiviert. In der Messzelle Fc2 wurde das Heptasaccharid **25** durch einen Spacer mit einer freien Aminogruppe immobilisiert und die aktivierten COO⁻-Gruppen anschliessend in beiden Flusszellen mit Ethanolamin deaktiviert (Kapitel 2.2.22.1, Abb. 13). Während und nach der Aktivierung wurden Sensorgramme aufgenommen (Abb. 14). Es wurden in der Messzelle Fc2 495 RU des Heptasaccharids **25** immobilisiert (Abb. 14b).

Die Wechselwirkungen der selektierten RNA-Aptamere mit dem immobilisierten Heptasaccharid bei 25 °C wurden nur qualitativ untersucht (Abb. 37). Die Messdaten wurden durch doppelte Referenzierung (114) bearbeitet. Um einen Massentransporteffekt auszuschliessen, wurden die Sensorgramme bei einer Flußrate von 14 µl/min aufgenommen (Abb. 37). Als Kontrolle wurde die Wechselwirkung von tRNA-Phe und gegen das Trisaccharid **13** selektierter RNA-Aptamere (4, 6, 5G, 9G und 10G) mit dem Heptasaccharid **25** überprüft (Abb. 37). Für tRNA-Phe wurde in der Assoziationsphase eine Sättigung

beobachtet, was auf eine Besetzung von allen potentiellen Bindungsstellen oder auf eine Sättigung der unspezifischen Wechselwirkungen der RNA mit der modifizierten Chip-Oberfläche hinweist (Abb. 37). Diese unspezifische Interaktion der tRNA-Phe mit der modifizierten Chip-Oberfläche muss auch hier als ein Hintergrund aller Messungen betrachtet werden.

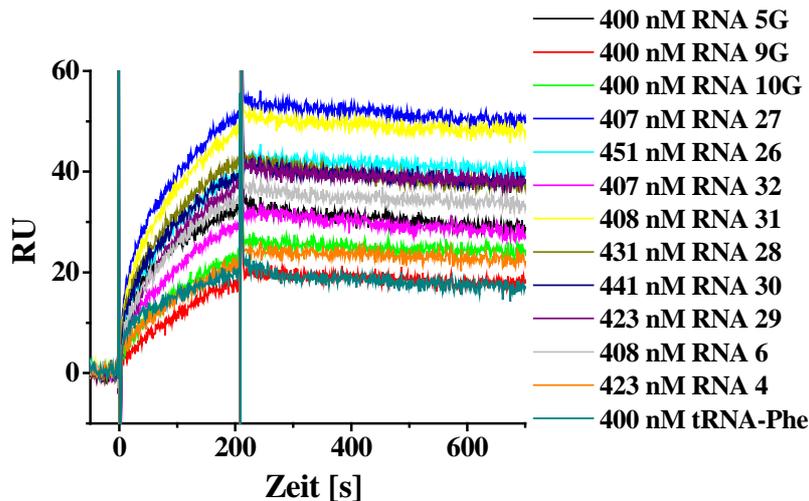


Abb. 37 Sensorgramme der Wechselwirkung der selektierten RNA-Aptamere mit dem immobilisierten Heptasaccharid **25**.

Es sind die Differenzkurven gezeigt.

Zwischen den gemessenen RNA-Aptameren wurden auch solche RNA-Aptamere (4, 9G, 10G) gefunden, die an das Heptasaccharid **25** sehr schwach binden (Abb. 37). Die positive Wechselwirkung der RNA-Aptamere 6, 5G, und 10G mit dem immobilisierten Heptasaccharid **25** ist durch die Anwesenheit der Trisaccharid **13**-Teilstruktur in dem Heptasaccharid-Molekül erklärbar. Das RNA-Aptamer 10G wurde zusätzlich auch in der *in vitro* Selektion gegen das Trisaccharid **13**, Tetrasaccharid **15** und Heptasaccharid **26** ausselektiert (Kapitel 3.2.2 und 3.3.3).

Obwohl die hier getesteten RNA-Aptamere in der Selektion 3/1 bei 4 °C selektiert wurden, findet die Wechselwirkung auch bei 25 °C statt, was eine sehr nützliche Eigenschaft der RNA-Aptamere für weitere Experimente und ihre eventuelle Verwendung ist.

3.3.3.1.3 Untersuchung der Bindung der selektierten RNA-Aptamere an nichtmodifizierte Sepharose 6B

Die Spezifität der selektierten RNA-Aptamere gegen das Trisaccharid **13** (RNA 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9) und das Heptasaccharid **26** (RNA 26, 27, 28, 30, 31, 32, 34) aus der Selektion 3/1 wurde untersucht. Dazu wurde die Bindung der RNA-Aptamere an die nichtmodifizierte Sepharose

6B getestet (Kapitel 2.2.20). Die Sepharose 6B wurde dabei mit dem jeweiligen RNA-Aptamer bei Selektionsbedingungen im Filtrationssystem äquilibriert. Die an die Festphase nicht gebundene RNA wurde nach jedem Waschschrift durch eine kurze Zentrifugation getrennt. Wie in Abbildung 38 gezeigt, eluierte 50 bis 90 % der RNA bereits nach dem ersten Waschschrift. Nach dem 4. Waschschrift blieb an der Festphase weniger als 1 % der eingesetzten RNA gebunden. Die neu selektierten RNA-Aptamere gegen das Trisaccharid **13** und das Heptasaccharid **26** weisen also keine unspezifische Wechselwirkung mit der Sepharose 6B auf.

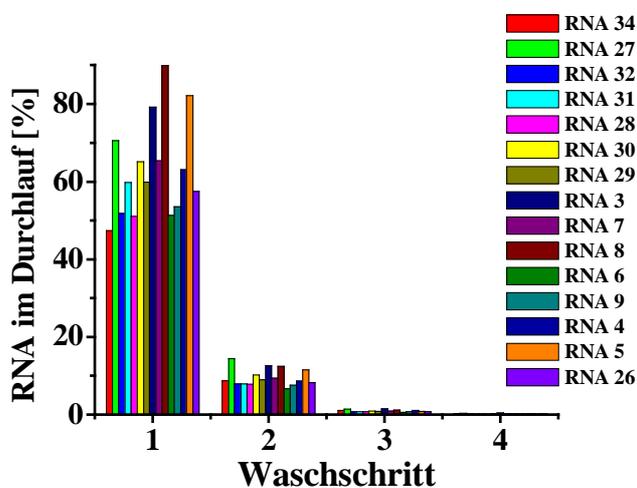


Abb. 38 Bindung der RNA-Aptamere 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 26, 27, 28, 30, 32, 34 an nichtmodifizierte Sepharose 6B. Die Prozentangabe der RNA im Durchlauf nach dem entsprechenden Waschschrift bezieht sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge.

3.3.4 *In vitro* Selektion 3/2 alternierend an silanisierten Glasperlen und Thiopropyl-Sepharose 6B

Die Frage ob zwei Selektionszyklen an den silanisierten Glasperlen ausreichend für eine Entfernung der an Thiopropyl-Sepharose 6B unspezifisch bindenden RNA-Moleküle waren, wurde in der Selektion 3/2 getestet (Kapitel 2.2.28.4, 2.2.18.5). Nach zwei Selektionszyklen an der Glasoberfläche wurden weitere zwei Zyklen gegen die Oligosaccharide **13**, **15**, **24** und **26** an Thiopropyl-Sepharose 6B durchgeführt (Abb. 39a). Durch diese „Doppelselektion“ sollten gleichzeitig an die silanierte Glasoberfläche unspezifisch bindende RNA-Aptamere entfernt werden. Es wurde auch hier eine niedrige Anreicherung der bindenden RNA an den mit Glasperlen gefüllten Selektionssäulen beobachtet. Ein Maximum wurde nach der Einführung von Thiopropyl-Sepharose 6B als Festphase im 3. Selektionszyklus erreicht (0,73 % für Trisaccharid **13**; 0,93 % für Tetrasaccharid **15**; 1,06 % für Pentasaccharid **24**; 0,84 % für Heptasaccharid **26**) (Abb. 39b, Tab. 10e). Im 4. Zyklus nahm die Anreicherung wieder ab.

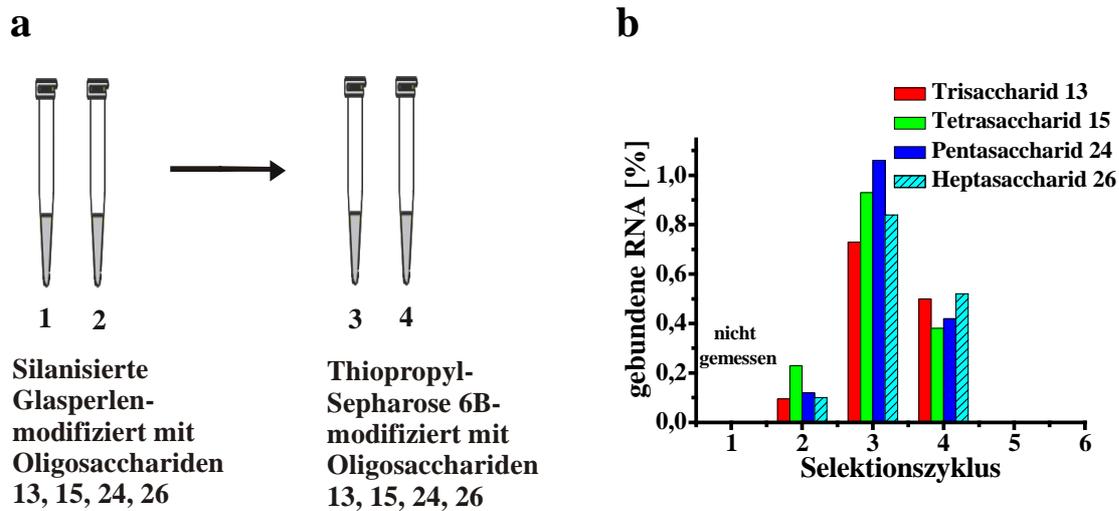


Abb. 39 Selektionsschema der Selektionen 3/2 (a) und graphische Darstellung der Anreicherung der bindenden RNA an Selektionssäulen modifiziert mit Oligosacchariden 13, 15, 24 und 26 in den einzelnen Selektionszyklen der Selektion 3/2.

Die Prozentangaben der gebundenen RNA beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge in den einzelnen Selektionszyklen.

3.3.4.1 Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere aus der Selektion 3/2

Aus der Selektion 3/2 wurde nur der bindende RNA-Anteil gegen das Heptasaccharid **26** nach dem 4. Selektionszyklus von den Selektionssäulen durch chemische Reduktion eluiert (Kapitel 2.2.18.5). Nach der reversen Transkription (Kapitel 2.2.18.6) wurde die DNA kloniert, sequenziert (Kapitel 2.2.18.7) und zurück in die RNA überschrieben. Die Analyse der bindenden RNA-Bibliotheken lieferte wieder die RNA-Aptamere 5G (1x), 9G (2x) und 10G (1x), die bereits in vorherigen Selektionen gefunden wurden (Kapitel. 3.2.3.1, 3.3.1.1, 3.3.3.1.1).

4 Diskussion

Die systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX) (34, 45, 47), hat sich als ein sehr effizientes und erfolgreiches Verfahren für die Isolierung von RNA-Molekülen, die verschiedene Liganden spezifisch und mit hoher Affinität erkennen, erwiesen (Kapitel 1.3). Auch in Bayreuth wurde die SELEX-Methode mehrmals erfolgreich bei der Selektion von Protein-erkennenden RNA-Aptameren benutzt (116, 117).

Das Ziel dieser Arbeit war allerdings die Adaption dieser Methode in einem fundamental neuen Bereich. Die Methode sollte zur Gewinnung von RNA-Aptameren gegen ausgewählte Oligosaccharide verwendet werden. Erfolgreiche Selektionen konzentrierten sich bislang mit der Isolierung und Charakterisierung von RNA-Aptameren gegen positiv geladene Aminoglykoside (81-85) und nur wenige dagegen mit der Selektion gegen nicht geladene bzw. negativ geladene Kohlenhydrate (92-97).

4.1 *In vitro* Selektion von RNA-Aptameren gegen das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man

Als Oligosaccharid-Modellverbindung wurde das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR (Abb. 2), das häufig in unterschiedlichen Oligosacchariden an der Zelloberfläche vorkommt, ausgewählt und synthetisiert (Kapitel 2.2.1, 3.1). Die Synthese erfolgte in mehreren chemischen Schritten und wurde durch die enzymatische Einführung der Galaktose beendet (Schema 7). Das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR wurde mit zwei unterschiedlichen Spacern synthetisiert (**12**, **13**), die für kovalente Immobilisierung an die Festphase durch freie NH₂- oder SH-Gruppen benutzt wurden. Gleichzeitig wurde das Trisaccharid für weitere Analysen auch ohne Spacer synthetisiert (Kapitel 2.2.1). Jeder Schritt der Synthese wurde durch chromatographische Auftrennung und Charakterisierung der einzelnen Produkte mittels NMR, ESI-MS und Polarimetrie belegt. Die Synthesen lieferten die im Vergleich mit der Literatur erwarteten Ausbeuten. Es handelte sich allerdings um Milligramm-Mengen, die für eigene *in vitro* Selektionen limitierend waren.

4.1.1 Selektion 1 an Thiopropyl-Sepharose 6B

Am Anfang einer erfolgreichen Selektion steht die Auswahl der Selektionsbedingungen, die für eine optimale RNA/Oligosaccharid-Erkennung nicht bekannt sind. In der ersten Selektion (Kapitel 3.2.2) wurden deswegen die Selektionsbedingungen ausgewählt, die den physiologischen Bedingungen *in vivo* ähneln (150 mM NaCl, 5 mM Mg²⁺, pH 7,5) (Kapitel 2.2.18.4, 2.2.18.5). Um das System möglichst einfach zu halten, wurde zuerst auf weitere Zusätze, wie spezifische divalente Ionen (Ca²⁺, Mn²⁺) und RNA-stabilisierende Zusätze (Spermidin, Spermin) (118) verzichtet.

Für die kovalente Immobilisierung des Trisaccharides **13** durch den Spacer mit der aktivierten Disulphid-Gruppe wurde Thiopropyl-Sepharose 6B als Festphase benutzt.

Die Trennung der Festphase mit dem immobilisierten Trisaccharid **13** von der Lösung bzw. der bindenden und nichtbindenden RNA-Moleküle erfolgte in mehreren Waschschritten im sogenannten „batch“-Verfahren. Die spezifische Isolierung der bindenden RNA-Moleküle sollte durch chemische Reduktion der Disulphidbrücke zwischen dem Trisaccharid und der Festphase und anschließender Elution des Trisaccharid/RNA-Komplexes gewährleistet werden. Trotz einer Präselektion gegen die mit dem Spacer aktivierte Festphase (Vorsäule) und mehreren Waschschritten kann die Bindung und Elution von unspezifisch bindenden RNA-Molekülen nicht ausgeschlossen werden. Gerade am Anfang der Selektion sind die gesuchten bindenden Moleküle in der RNA-Ausgangsbibliothek sehr stark verdünnt und schon eine Koelution von wenigen Prozent der unspezifisch bindenden RNAs führt zu ihrem hohen Überschuss im Vergleich zu den gewünschten RNA-Molekülen. Deswegen mussten mehrere Selektionszyklen durchgeführt werden, um eine hohe Anreicherung der spezifisch bindenden RNAs zu erzielen (Abb. 7). Bei der technischen Durchführung der Selektion hatte sich gezeigt, dass die Festphase kein festes Pellet ergab. Deswegen konnte die Kontamination der Selektionssäule mit der Vorsäulen-Festphase und damit der Transfer von unspezifisch bindenden RNA-Molekülen in den Selektionsschritt nicht komplett ausgeschlossen werden.

Es wurden 18 Selektionszyklen durchgeführt (Abb. 7). Prozentual blieb die Anreicherung bis zum Ende der Selektion relativ niedrig (max 5 % in dem 13. Selektionszyklus), was aber für *in vitro* Selektionen gegen Oligosaccharide nicht ungewöhnlich ist (persönliche Mitteilung von Prof. D. R. Engelke). Unter der Annahme, dass es in der RNA-Ausgangsbibliothek Aptamere, die das Trisaccharid binden gibt, sollten diese Aptamere relativ selten in der RNA-Bibliothek vorhanden sein.

Die Analyse der selektierten RNA-Bibliotheken aus dem 13. Selektionszyklus mit maximaler Anreicherung lieferte nur drei RNA-Aptamere (5G, 9G und 10G), wobei zwei RNA-

Aptamere (9G und 10G) schon in dem 11. Selektionszyklus und das RNA-Aptamer 5G als einziges im 16. und 17. Selektionszyklus vorhanden waren (Kapitel 3.2.3.1). Dies deutet auf eine starke Selektion hin. Zusätzlich dazu enthielten alle gefundene RNA-Aptamere eine 10 Nukleotide lange Konsensussequenz 5'-GAACAAGCAG-3' auf deren Bedeutung später eingegangen wird.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Eigenschaften und die Spezifität der Bindung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G mit mehreren biochemischen Methoden untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die RNA-Aptamere schon im mikromolaren Konzentrationsbereich stark zur Oligomerisierung neigen (Kapitel 3.2.3.3). Es handelt sich hierbei nicht um einen schnellen Gleichgewichtsprozess, da die Oligomerform nicht durch einfaches Verdünnen in die Monomerform umgewandelt werden kann. Bei der Selektion wurde eine mikromolare RNA-Konzentration (1,5 – 10 μM in der Präselektion; 0,7 – 2 μM in der eigentlichen Selektion) benutzt. Dies war ein Kompromiss zwischen der Größe der RNA-Bibliothek (~ 10^{13} unterschiedliche Moleküle) und der Multiplizität der einzelnen Sequenzen (oversampling 6x). Man kann deswegen vermuten, dass die Oligomerform dieser Aptamere schon während der Selektion vorhanden war, spätestens aber ab dem 11. Selektionszyklus, als die Aptamere schon stark angereichert wurden. Fraglich bleibt dabei die Rolle der Konsensussequenz 5'-GAACAAGCAG-3' bei der Oligomerisierung, die hier allerdings nicht weiter untersucht wurde.

Die Bindungsspezifität der selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G wurde überprüft. Zwei Bindungsexperimente, die UV-Schmelzexperimente (Kapitel 3.2.3.4) und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (Kapitel 3.2.4) deuten auf eine Interaktion zwischen den selektierten RNA-Aptameren und dem Trisaccharid **13** hin. In den UV-Schmelzexperimenten (Kapitel 3.2.3.4) wurde eine Verschiebung des Hauptübergangs bei 60 - 65 °C in Gegenwart vom Trisaccharid **11** beobachtet. Gleichzeitig wurde hier ein reproduzierbarer Effekt auf eine Domäne oder ein Motiv der RNA, das bei ungefähr 40 °C schmilzt, beobachtet.

In den Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie-Experimenten (Kapitel 3.2.4) wurde keine Wechselwirkung mit dem für die Immobilisierung verwendeten Spacer **29** und der auf einer Polysaccharid basierenden Dextran-Oberfläche des Sensorchips beobachtet. Dagegen wurde eine Bindung der selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G auf der mit dem Trisaccharid **12** beschichteten Oberfläche gezeigt, was auf eine spezifische Erkennung des Trisaccharides **12** hindeutet. Die aus den Schmelzexperimenten abgeschätzten

Dissoziationskonstanten (Kapitel 3.2.3.4) unterscheiden sich stark von den Dissoziationskonstanten aus den gefitteten Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie-Messdaten (Kapitel 3.2.4). Es wurde gleichzeitig gezeigt, dass die gefundene Konsensussequenz 5'-GAACAAGCAG-3' vermutlich keine Rolle bei der Bindung der RNA-Aptamere an die mit dem Trisaccharid **12** modifizierten Chip-Oberfläche spielt.

Im Gegensatz zu den zwei erwähnten Experimenten sprechen die Ergebnisse des dritten Experiments eher für eine Erkennung der Festphase. Bei der Untersuchung der Wechselwirkung der selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G mit unterschiedlichen Festphasen wurde eine relativ spezifische Erkennung der bei der Selektion benutzten Sepharose 6B festgestellt (Kapitel 3.2.5). Die Sepharose 6B besteht aus 6 %-tig quervernetzter Agarose. Die Ähnlichkeit zwischen den Kohlenhydrat-Bausteinen in der Agarose und dem Trisaccharid **13** könnte die unspezifische Bindung der RNA-Aptamere erklären. Die Superdex 200-Festphase die aus einem Gemisch quervernetzter Agarose und Dextran bestand, sowie die anderen getesteten Festphasen wurden von selektierten RNA-Aptameren nicht mehr erkannt. RNA-Aptamere, die eine Sephadex-Matrix erkennen, wurden schon in der Literatur beschrieben (97). Auch diese Aptamere weisen eine hohe Spezifität gegenüber Sephadex auf. Die Struktur der Matrix spielt dabei wichtige Rolle.

Diese drei Experimente (Abb. 40) zeigen also auf eine gemischte, bzw. nicht eindeutige Bindungsspezifität und eine Neigung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G zur Oligomerisierung.

4.2 *In vitro* Selektion von RNA-Aptameren gegen Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR, Tetrasaccharid α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR, Pentasaccharid 2,4-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR und Heptasaccharid 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR

Aufgrund der unklaren Ergebnisse der ersten Selektion wurden weitere Selektionen durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der neuen Ergebnisse und eine systematische Analyse des Einflusses einzelner Parameter zu ermöglichen, wurden die Veränderungen der Selektionsbedingungen stufenweise getestet.

4.2.1 Selektion 2/1 an Thiopropyl-Sepharose 6B

In der *in vitro* Selektion 2/1 wurde der Einfluss der Größe, der Verzweigung und der Ladung des Oligosaccharid-Liganden auf die Selektion untersucht (Kapitel 3.3.1).

Dazu wurden die Oligosaccharide α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR (**14**, **15**); 2,4-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR (**23**, **24**) und 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR (**25**, **26**) mittels chemisch-enzymatischer Verfahren synthetisiert (Abb. 2, Kapitel 3.1). Ähnlich wie das Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR (Abb. 2, Kapitel 3.1) wurden auch diese Oligosaccharide mit zwei Spacern versehen, die eine freie NH₂- oder eine aktivierte Disulphid-Gruppe enthielten. Zwei der drei Oligosaccharide (α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR und 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR) sind durch die Anwesenheit der Carboxylgruppe der Neuraminsäure negativ geladen (Abb. 2).

Für die Bestätigung der Ergebnisse aus der ersten Selektion (Kapitel 3.2) wurde eine neue Selektion gegen das Trisaccharid **13** parallel mit Selektionen gegen die drei neuen Liganden **15**, **24** und **26** durchgeführt (Kapitel 3.3.1).

Die Selektionstechnik wurde in mehreren Punkten verbessert. Erstens wurde für die Trennung der Festphase und der Lösung bzw. der nicht gebundenen und gebundenen RNA-Moleküle das Filtrationssystem eingeführt. Dies ermöglichte eine gleichzeitige Durchführung von mehreren Selektionen und die Kontamination des Überstandes aus der Präselektion mit der Vorsäulen-Festphase wurde vermieden. Zweitens wurde die fünffache Menge an Festphase in der Präselektion als auch in der eigentlichen Selektion bei der gleichen RNA-Menge benutzt. Damit sollte genügend große Kapazität der Festphase für die Bindung der RNA vorhanden sein. Drittens wurde dem Selektionspuffer Ca²⁺ beigefügt, um eine Bindung der Neuraminsäure zu ermöglichen.

Thiopropyl-Sepharose 6B wurde weiterhin zu der kovalenten Immobilisierung von Liganden als Festphase verwendet (Kapitel 3.2.1).

In den ersten fünf Selektionszyklen wurden die bindenden RNA-Moleküle direkt nach der Selektion in Anwesenheit des Säulenmaterials mittels reversen Transkription und PCR vermehrt. Dadurch wurden auch an der Festphase unspezifisch gebundene RNA-Moleküle angereichert. Dieser nicht sehr stringente Selektionsschritt sollte den Verlust der bindenden RNA-Aptamere, die am Anfang der Selektion in den Bibliotheken sehr verdünnt sind, vermeiden.

Die Erhöhung der Selektionsstringenz erfolgte ab dem 5. Selektionszyklus durch die Erhöhung der Anzahl von Waschschritten und durch eine spezifische Elution des Oligosaccharid/RNA-Komplexes durch chemische Reduktion. Es wurde kein wesentlicher Unterschied in der RNA-Anreicherung gegen alle vier Liganden festgestellt und die Anreicherung blieb wie in der ersten Selektion sehr niedrig (Abb. 29). Überraschenderweise wurden nach der Analyse des an Heptasaccharid **26** bindenden RNA-Anteils bereits nach vier Selektionszyklen wieder die RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G gefunden (Kapitel 3.3.1.1, Abb. 40).

Die naheliegende Erklärung ist eine Kontamination oder außerordentlich spezifische Bindungseigenschaften der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G. Eine dritte Selektion sollte dies klären.

4.2.2 Selektion 2/2 alternierend an Thiopropyl-Sepharose 6B und silanisierten Glasperlen

Falls es sich in den Selektionen 1 und 2/1 um eine unspezifische Interaktion der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G mit Sepharose 6B handelte, sollte eine Zwischenselektion gegen die Oligosaccharide **13**, **15**, **24** und **26** an einer anderen Oberfläche zu der Entfernung der Sepharose 6B-bindenden RNAs und der Anreicherung der Oligosaccharid-erkennenden RNA-Moleküle führen (Kapitel 3.3.2).

Nach zwei Selektionszyklen an Thiopropyl-Sepharose 6B wurden alternierend zwei weitere Selektionszyklen an der mit den Oligosacchariden **13**, **15**, **24** und **26** modifizierten Glasoberfläche und anschließend zwei Selektionszyklen an Thiopropyl-Sepharose 6B durchgeführt. Die bindenden RNA-Moleküle wurden dabei nur in den ersten zwei Selektionszyklen in Anwesenheit der Festphase vermehrt. In den weiteren Selektionszyklen wurde die bindende RNA im Komplex mit dem entsprechenden Oligosaccharid durch chemische Reduktion spezifisch eluiert. Die Anreicherung war auch bei dieser Selektion sehr niedrig (Abb. 31b). Es wurde wieder nur der Anteil der bindenden RNA-Moleküle aus der Selektion gegen das Heptasaccharid **26** analysiert. Die Zwischenselektion an der Glasoberfläche brachte ein neues RNA-Aptamer 6D hervor (Kapitel 3.3.2.1). Auch in diesem RNA-Aptamer wurde die gleiche Konsensussequenz 5'-GAACAAGCAG-3' wie in den selektierten und charakterisierten RNA-Aptameren 5G, 9G und 10G gefunden. Allerdings war

die Sequenz um ein Nukleotid kürzer und enthielt eine Punktmutation. Zusätzlich wurde wieder das RNA-Aptamer 10G isoliert (Kapitel 3.3.2.1, Abb. 40).

Diese Fakten können in zwei Richtungen interpretiert werden. Die Zwischenselektion an der Glasoberfläche war nicht ausreichend und bereits nach zwei Selektionszyklen an Thiopropyl-Sepharose 6B waren in der RNA-Bibliothek nur unspezifisch an die Festphase bindende RNA-Moleküle vorhanden. Die zweite Möglichkeit wäre, dass das RNA-Aptamer 10G in gleicher Weise an das Heptasaccharid **26** und das Trisaccharid **13** bindet. Die Selektion des RNA-Aptamers 6D würde gleichzeitig bestätigen, dass die gefundene Konsensussequenz ein überlappender Bindungsbereich für die Oligosaccharide und Sepharose 6B darstellt.

Im dritten Komplex der Selektionen gegen die Oligosaccharide **13**, **15**, **24** und **26** wurde der Selektionsdruck weiter erhöht.

4.2.3 Selektion 3/1 an silanisierten Glasperlen

Ziel der Selektion 3/1 war eine Eliminierung der potentiellen Spezifität der RNA-Aptamere für Sepharose 6B (Kapitel 3.3.3). Die Kohlenhydratoberfläche wurde deswegen vollständig vermieden und die Selektion 3/1 erfolgte ausschließlich an der mit den Oligosacchariden **13**, **15**, **24** und **26** modifizierten Glasoberfläche. Nach der Silanisierung der Glasoberfläche (Kapitel 2.2.17.2) erfolgte die kovalente Kopplung der Oligosaccharide **13**, **15**, **24** und **26** durch den Spacer mit der aktivierten Disulphid-Gruppe. Hier muss man noch einmal betonen, dass die Modifikation der Glasoberfläche mit den Oligosacchariden deutlich weniger effizient war, als die Derivatisierung von Thiopropyl-Sepharose 6B. Dies kann durch die hydrophoben Eigenschaften der Oberfläche nach der Silanisierung erklärt werden. Es könnte auch die Kapazität bzw. die Zugänglichkeit von freien SH-Gruppen zu gering sein.

Es wurden wiederum vier parallele Selektionen gegen die Oligosaccharide **13**, **15**, **24** und **26** durchgeführt. Der experimentelle Ansatz blieb wie in der Selektion 2/1 gleich, allerdings wurden einige Verbesserungen der Selektionsbedingungen eingeführt (Abb. 40).

Erstens wurden die Renaturierungsbedingungen verändert, was zu einer definierteren Faltung der RNA führen sollte. Im Gegensatz zu bisherigen Selektionen, in welchen die RNA nur in ddH₂O denaturiert wurde, wurde hier die RNA in dem Selektionspuffer mit 100 mM NaCl denaturiert. Die bivalenten Ionen Mg²⁺ und Ca²⁺ wurden erst nach der Abkühlung der Probe auf Raumtemperatur zugegeben. Zweitens wurden alle Selektionen bei 4°C durchgeführt, was

zu einer Stabilisierung der Oligosaccharid/RNA-Komplexe und der Einschränkung der konformationellen Diversität der Oligosaccharide und der RNA führen sollte. Drittens wurde die Inkubationszeit für die Bildung der Oligosaccharid/RNA-Komplexe verlängert.

Das Bindungsniveau war nochmals niedriger als in den vorherigen Selektionen (Abb. 34), was vermutlich mit der Modifikation und der Bindungskapazität der Glasoberfläche zusammenhängt. Die Analyse der gebundenen RNA-Moleküle nach der spezifischen Elution des Oligosaccharid/RNA-Komplexes durch chemische Reduktion aus allen vier Selektionen hat völlig neue und unabhängige Familien von RNA-Aptameren hervorgebracht (Kapitel 3.3.3.1.1). Erstaunlicherweise wurde das RNA-Aptamer 10G gegen das Tetrasaccharid **15** und das Heptasaccharid **26** wiederum auch an der Glasoberfläche isoliert. Das Aptamer 10G scheint also das einzige Molekül zu sein, das bei allen Selektionen als ein potentielles und gegen die Oligosaccharide spezifisches Bindungsmolekül selektiert wurde (Abb. 40).

Die relativ hohe Diversität der selektierten RNAs nach fünf Selektionszyklen an der modifizierten Glasoberfläche zeigt, dass die Selektion 3/1 nicht so weit wie in den vorherigen Selektionen vorgeschritten ist und eine Aptamer-Bibliothek mit unterschiedlichen Bindungsmotiven und Bindungsparameter liefern könnte (Kapitel 3.3.3.1.1). Dies ist vielversprechend in der Hinsicht, dass in diesen selektierten Bibliotheken wahrscheinlich immer noch RNA-Aptamere vorhanden sind, die bessere Eigenschaften als die bislang selektierten RNA-Aptamere haben.

Die neu selektierten RNA-Aptamere weisen keine Interaktion mit der Sepharose 6B auf (Kapitel 3.3.3.1.3). Zusätzlich lässt sich eine Affinität der RNA-Aptamere zu der Glasoberfläche ausschließen, da keine Sequenzähnlichkeit mit selektierten RNA-Aptameren die vermutlich die modifizierte Glasoberfläche erkennen, gefunden wurden (115).

Eine positive Wechselwirkung der neuen gegen das Trisaccharid **13** und das Heptasaccharid **26** selektierten RNA-Aptamere mit dem immobilisierten Heptasaccharid **25** wurde mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie ebenfalls bestätigt (Kapitel 3.3.3.1.2). Dabei wurde keine unspezifische Interaktion der RNA-Aptamere mit der nichtmodifizierten Dextran-Oberfläche beobachtet. Auch die selektierten RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G wechselwirken mit dem immobilisierten Heptasaccharid **25**. Diese Ergebnisse deuten auf ein gemeinsames Erkennungsmotiv der RNA-Aptamere für die ausgewählten Oligosaccharide **13** und **26** hin. Eine nähere Charakterisierung ist aber erforderlich. Dies sollte durch präzise Analyse der selektierten RNA-Aptamere erfolgen und falls nötig sollten weitere Selektionsrunden durchgeführt werden. Eine Verkürzung der RNA-Sequenz kann minimale

Bindungsmotive liefern, die gerade bei den RNA-Aptameren 5G, 9G und 10G sehr interessant sein könnten.

4.2.4 Selektion 3/2 alternierend an silanisierten Glasperlen und Thiopropyl-Sepharose 6B

Im Rahmen des dritten Selektionskomplexes wurde in der Selektion 3/2 (Kapitel 3.3.4) der Einfluss der umgekehrten Reihenfolge von Festphasen im Vergleich zu der Selektion 2/2 (Kapitel 3.3.2) untersucht. Dies sollte zeigen, ob eine Anfangs Selektion an einer mit den Oligosacchariden **13**, **15**, **24** und **26** modifizierten Glasoberfläche und erst spätere Verwendung der Thiopropyl-Sepharose 6B als Festphase zu anderen RNA-Aptameren führt. Auch hier wurde der bindende RNA-Anteil spezifisch durch chemische Reduktion eluiert und nach niedriger Anreicherung (Abb. 39b) nur die an Heptasaccharid **26** bindenden RNA-Moleküle analysiert (Kapitel 3.3.4.1).

Erstaunlicherweise führte auch diese Selektion zu der Isolierung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G, was wiederum die Vermutung unterstützt, dass die RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G eine Kreuzreaktivität mit Sepharose 6B und den Oligosacchariden **13**, **15**, **24** und **26** aufweisen (Abb. 40).

4.3 Abschließender Überblick über die Selektionen

Bei *in vitro* Selektionen von spezifischen RNA-Aptameren gegen die Oligosaccharide **13**, **15**, **24** und **26** zeigte sich, dass es sich um eine viel kompliziertere Aufgabe als bei der Selektion gegen Proteine handelt. Allgemein wurde eine niedrige Anreicherung der bindenden RNA-Moleküle unter allen Selektionsbedingungen beobachtet. Erstaunlich ist, dass bei unabhängigen Selektionen aus einer RNA-Bibliothek, die aus $\sim 10^{13}$ unterschiedlichen RNA-Molekülen besteht, die gleichen RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G mehrfach selektiert wurden. Die Selektionsbedingungen waren dabei modifiziert und als Liganden wurden unterschiedliche Oligosaccharide (**13**, **15**, **24**, **26**) benutzt, die allerdings in der Struktur große Ähnlichkeit aufwiesen (Abb. 2). Eine Kontamination mit RNA-Aptameren 5G, 9G und 10G bei einzelnen Selektionen konnte ausgeschlossen werden. Gemeinsam für diese Selektionen war die Anwesenheit der Sepharose 6B, die entweder in der gesamten Selektion (Selektion 1 und 2/1) oder zumindest in einigen Selektionszyklen (Selektion 2/2 und 3/2) als Festphase

verwendet wurde. Die niedrige Diversität der selektierten RNA-Aptamere weist auf eine sehr starke und spezifische Selektionen hin.

Die Analyse der selektierten RNA-Aptameren lieferte folgende Erkenntnisse:

1. Ein gemeinsames Konsensusmotiv 5'-GAACAAGCAG-3', das laut Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie-Experimenten keine direkte Rolle bei der Bindung und Erkennung der Oligosaccharide spielt.
2. Neigung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G bei höheren RNA-Konzentrationen zur Oligomerisierung. Dies sind ungünstige Voraussetzungen für die Selektion und die Charakterisierung der RNA-Aptamere. Offen bleibt die Rolle der Konsensussequenz bei der Oligomerisierung.
3. Spezifische Erkennung und Bindung der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G an die nicht modifizierte und mit den Oligosacchariden **13**, **15**, **24** und **26** modifizierte Sepharose 6B. Dies kann durch Ähnlichkeit der Festphase (6 %-ig quervernetzte Agarose) mit den Zucker-Resten in den Liganden erklärt werden.

An dieser Stelle bietet sich als die einfachste Erklärung an, dass die RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G unspezifisch gegen die Festphase selektiert wurden.

Dagegen sprechen aber weitere Ergebnisse:

1. Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz- und UV-Schmelzexperimente zeigen eine Spezifität der RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G gegen die Trisaccharide **11** und **12**.
2. Die RNA-Aptamere 5G, 9G und 10G binden in Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie-Experimenten an das Heptasaccharid **25**
3. Das RNA-Aptamer 10G wurde auch in der Selektion 3/1 gefunden, in der die Sepharose 6B als Festphase ganz ausgeschlossen wurde. Dabei wurde neben völlig neuen bindenden RNA-Sequenzen das RNA-Aptamer 10G gegen das Tetrasaccharid **15** und das Heptasaccharid **26** selektiert.

Ausgehend von den erwähnten Ergebnissen kann man also vermuten, dass es sich bei den selektierten RNA-Aptameren 5G, 9G und 10G um ein überlappendes Bindungsmotiv handelt. Das erlaubt dabei der selektierten RNA sowohl die Sepharose 6B als auch die Oligosaccharide als Liganden zu erkennen. Gleichzeitig wird die Bindung der selben RNA an ähnliche Oligosaccharide ermöglicht. Die Art der Bindung ist dabei noch unklar. Die

Bestätigung aller dieser Punkte ist notwendig. Dies könnte z. B. durch Verwendung einer error-prone PCR und einer neuen Selektion oder gezielten RNA-Sequenz-Mutationen durchgeführt werden. Diese Experimente könnten zu einer Verbesserung der Bindungseigenschaften, Vermeidung der Oligomerisierung aber auch zu dem totalen Verlust der Bindungsfähigkeit der RNA-Aptamere führen. Dies wäre gleichzeitig eine wichtige Information über das Bindungsmotiv. Eine Verkürzung der RNA-Aptamere könnte ein minimales Bindungsmotiv gegenüber Oligosacchariden oder auch Sepharose 6B liefern. Ähnlich wie in dem Fall der RNA-Aptamere gegen Sephadex (97, 119) und Streptavidin (120, 121) könnte es als „RNA-tag“ für die spezifische Aufreinigung von transkribierten RNA-Molekülen verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung der Spezifität von selektierten RNA-Aptameren wäre z. B. eine Fluoreszenzassay mit markierten RNA-Aptameren.

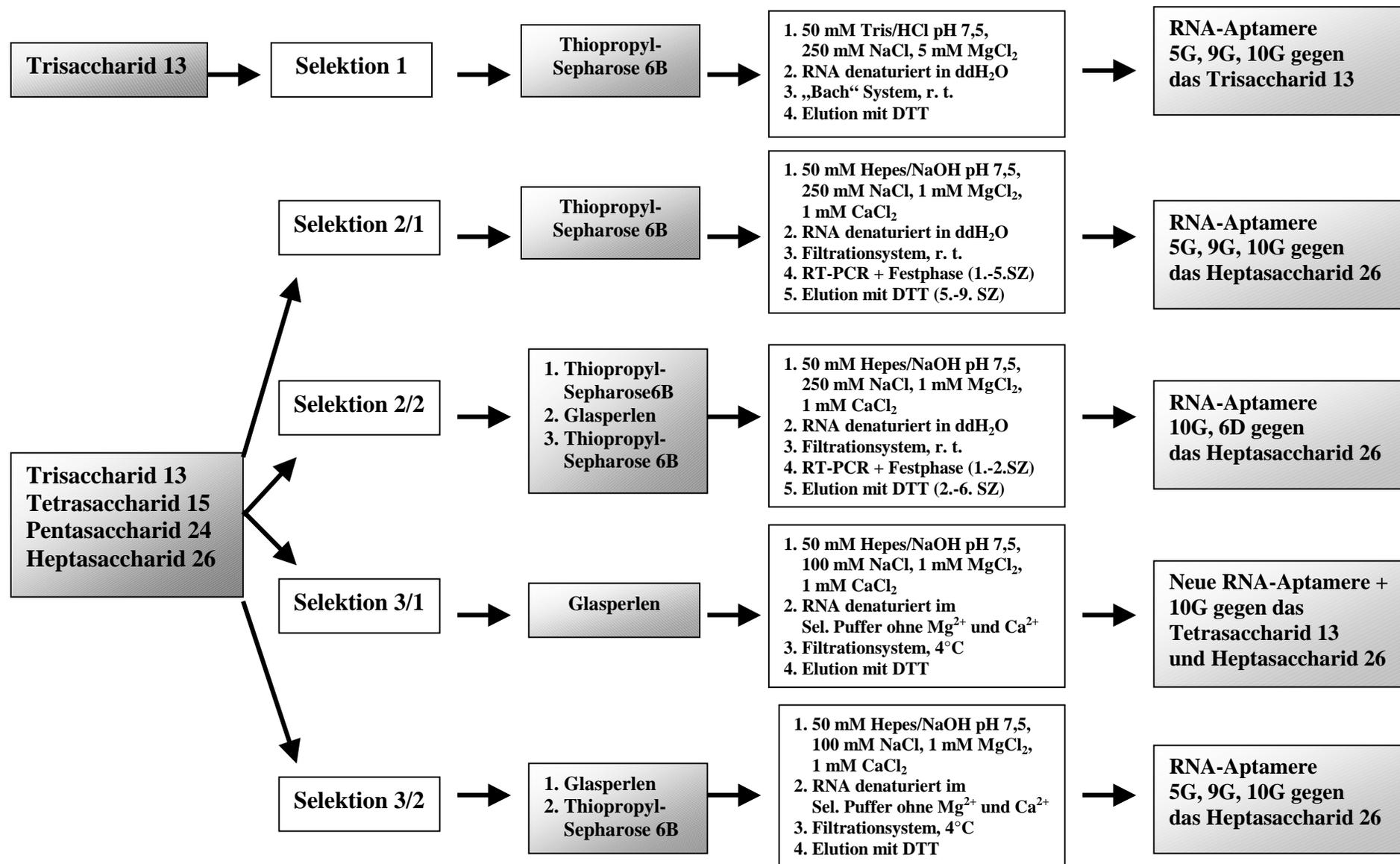


Abb. 40 Übersicht der Selektionsbedingungen und der Ergebnisse in einzelnen Selektionen.

4.4 Schlussfolgerung aus den Ergebnissen dieser Arbeit für weitere aufbauende Selektionen

Der Erfolg einer *in vitro* Selektion hängt von mehreren Parametern ab. Auf folgende wichtige methodische Punkte wird einzeln hingewiesen:

1. Eine gut definierte und frisch synthetisierte RNA- bzw. DNA-Bibliothek sollte für jede Selektion gegen einen beliebigen Ligand benutzt werden. Eine Ausgangsbibliothek, die in der Komplexität und Multiplizität von unterschiedlichen RNA-Sequenzen ausgewogen ist, mindert die Probleme mit dem Selektionshintergrund (48, 50),.
2. Die Länge der Nukleinsäure-Sequenzen in der Ausgangsbibliothek spielt eine sehr wichtige Rolle, (48-50, 54).
3. Der Selektionsverlauf und die Richtung der Selektion sollten nicht nur durch die Menge an angereicherter RNA beurteilt werden, sondern viel mehr durch die Zwischencharakterisierung und Untersuchung der selektierten Bibliotheken und der einzelnen Sequenzen.
4. Eine Konsensussequenz ist keine notwendige Voraussetzung für die Bindung.
5. Zwischenselektionen an einer anderen Oberfläche helfen unspezifisch bindende Moleküle aus der selektierten Bibliothek zu entfernen.
6. Die richtig ausgewählte Stringenz der Selektion ist vor allem am Anfang der Selektion ein sehr wichtiger Punkt, da gerade dort eine Gefahr der Anreicherung von unspezifisch bindenden Molekülen am größten ist.
7. Die Elution von gebundenen Aptameren sollte so spezifisch wie möglich sein. Am besten eignet sich dazu eine kompetitive Elution mit einem freien Liganden. Das Verhältnis der unspezifisch und spezifisch bindenden Aptamere in den selektierten Bibliotheken sollte damit deutlich verbessert werden. Dies benötigt eine relativ große Menge an freien Liganden, was gerade bei der Selektion gegen Oligosaccharide ein Problem darstellen kann. In dieser Arbeit wurden die Oligosaccharide selbst synthetisiert (Kapitel 2.2.1). Deren Menge war während der Selektion, für die Analysen als auch für eine kompetitive Elution limitierend.
8. Konstante Rückfaltungsbedingungen während der gesamten Selektion liefern reproduzierbare Konformationen der RNA. Dies verhindert den Verlust der bindenden

Sequenzen bzw. hält das Verhältnis zwischen einzelnen Konformationen in der Lösung konstant (109, 122).

9. Eine unvermeidbare partielle Mutation der selektierten Sequenzen während der Selektion durch PCR und *in vitro* Transkription oder die beabsichtigten Mutationen durch error-prone PCR kann die Bindungseigenschaften der Moleküle verbessern aber auch zu ihrem Verlust führen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die SELEX Methode (34, 45, 47), zur Gewinnung von RNA-Aptameren, die ausgewählte an der Membranoberfläche eukaryotischer Zellen häufig vorhandene Oligosaccharide spezifisch erkennen, etabliert werden.

Zum Erreichen dieser Ziele wurden vier Oligosaccharide Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR; α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR; 2,4-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR und 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR (Abb. 2) mittels chemisch-enzymatischer Verfahren mit zwei unterschiedlichen Spacern synthetisiert (Kapitel 2.2.1). Die Spacer ermöglichten eine kovalente Immobilisierung der Oligosaccharide an verschiedenen Oberflächen durch eine Amino- oder Thiolgruppe. Es wurde der Einfluss der Zusammensetzung, der Größe, der Verzweigung und der Ladung der Oligosaccharide auf die Ergebnisse der *in vitro* Selektion unter verschiedenen Selektionsbedingungen untersucht.

Die biochemischen Eigenschaften und die Bindungsspezifität von drei selektierten RNA-Aptameren 5G, 9G und 10G, die bei mehreren unabhängigen Selektionen isoliert wurden, wurden analysiert. Zur qualitativen Analyse der RNA/Oligosaccharid-Interaktion wurde auch die Oberflächen-Plasmon-Resonanz- Spektroskopie benutzt. Gleichzeitig wurden die Bindungskonstanten für RNA Aptamere 5G, 9G, 10G und das Trisaccharid Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man bestimmt. Um auswertbare Resultate aus den Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie-Experimenten zu erhalten, mussten diese für die spezifischen Eigenschaften der Bindungspartner optimiert werden.

Wahrscheinlich auch wegen der Tendenz der Aptamere zur Oligomerisierung konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob die selektierten Aptamere die Oligosaccharide, die auf Sepharose 6B-basierende Festphase oder beides erkennen. Dies führte zu weiteren Selektionen mit modifizierten und optimierten Bedingungen. Es hat sich gezeigt, dass man durch gezielte Variationen des Selektionsprozesses die Selektion von RNA-Aptameren gegen Oligosaccharide lenken kann. Die Selektionen lieferten neue Oligosaccharid-bindende RNA-Aptamere. Es zeigt sich, dass die Optimierung der Selektionsbedingungen für eine erfolgreiche *in vitro* Selektion und Gewinnung von spezifisch bindenden Aptameren wesentlich ist. Den größten Einfluss auf die Ergebnisse der Selektion hatten die Eigenschaften der Festphase, die zu der Immobilisierung der Oligosaccharide benutzt wurde.

6 Summary

The goal of this work was to establish the SELEX method (34, 45, 47), for the selection of RNA-aptamers which bind to selected oligosaccharides abundant on the surface of eukaryotic cells. Surface plasmon resonance technology (SPR) was used for the analysis of the RNA/oligosaccharide interaction.

Four distinct oligosaccharides Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR; α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man-OR; 2,4-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR and 2,4-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc)₂- α -Man-OR (Fig. 2) have been synthesized using a combined chemical-enzymatic approach and have been attached to two different spacers (Chapter 2.2.1). The spacers allowed immobilization of the oligosaccharides on various surfaces via amino- or thiol-coupling. Several selections were set up to study the influence of the composition, the dimensions, the branching and the charge state of the oligosaccharides on the outcome of the *in vitro* selections. Three RNA-aptamers 5G, 9G and 10G were selected in a number of independent selections. The biochemical properties and the binding specificities of these three aptamers were analyzed. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy was used for qualitative analysis of oligosaccharide/RNA interaction. The binding constants were determined for RNA-aptamers 5G, 9G, 10G and trisaccharide Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-Man. The conditions of the Surface Plasmon Resonance Spectroscopy experiments were thoroughly optimized for the properties of the binding partners in order to achieve interpretable results.

Probably because of the tendency of the selected aptamers to dimerize, it was not possible to show unambiguously whether the RNA-aptamers recognize the oligosaccharides, the Sepharose 6B-based solid phase or both. Therefore, further selection experiments with modified and optimized conditions were performed. The ability to drive the selection of RNA-aptamers against the oligosaccharides through targeted variation of the selection conditions was demonstrated. These later selections yielded new RNA-aptamers not present in the previous experiments, showing the importance of the optimization. The properties of the solid phase used for the immobilization of the oligosaccharides had a major influence on the outcome of the selection.

7 Literatur

1. Helenius A, Aebi M: **Intracellular functions of N-linked glycans.** *Science* 2001, **291**:2364-2369.
2. Hammond C, Braakman I, Helenius A: **Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994, **91**:913-917.
3. Kelm S, Shukla AK, Paulson JC, Schauer R: **Reconstitution of the masking effect of sialic acid groups on sialidase-treated erythrocytes by the action of sialyltransferases.** *Carbohydr.Res.* 1986, **149**:59-64.
4. Whitehouse C, Burchell J, Gschmeissner S, Brockhausen I, Lloyd KO, Taylor-Papadimitriou J: **A transfected sialyltransferase that is elevated in breast cancer and localizes to the medial/trans-Golgi apparatus inhibits the development of core-2-based O-glycans.** *J.Cell Biol.* 1997, **137**:1229-1241.
5. Chaumeton B, Saunier B, Nato F, Goulut C, Bourrillon R: **Changes in surface glycopeptides after malignant transformation of rat liver cells and during the regression of hepatoma cells.** *J.Cell Biochem.* 1987, **34**:269-281.
6. Weis WI, Drickamer K: **Structural basis of lectin-carbohydrate recognition.** *Annu.Rev.Biochem.* 1996, **65**:441-473.
7. Ramsland PA, Farrugia W, Bradford TM, Mark HP, Scott AM: **Structural convergence of antibody binding of carbohydrate determinants in lewis y tumor antigens.** *J.Mol.Biol.* 2004, **340**:809-818.
8. Calarese DA, Scanlan CN, Zwick MB, Deechongkit S, Mimura Y, Kunert R, Zhu P, Wormald MR, Stanfield RL, Roux KH, Kelly JW, Rudd PM, Dwek RA, Katinger H, Burton DR, Wilson IA: **Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition.** *Science* 2003, **300**:2065-2071.
9. Pavliak V, Nashed EM, Pozsgay V, Kovac P, Karpas A, Chu C, Schneerson R, Robbins JB, Glaudemans CP: **Binding of the O-antigen of Shigella dysenteriae type 1 and 26 related synthetic fragments to a monoclonal IgM antibody.** *J.Biol.Chem.* 1993, **268**:25797-25802.
10. Glaudemans CP.: **Mapping of Subsites of Monoclonal, Anti-Carbohydrate Antibodies Using Deoxy and Deoxyfluoro Sugars.** *Chem.Rev.* 1991, **91**:25-33.
11. Rosen SD: **Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond.** *Annu.Rev.Immunol.* 2004, **22**:129-156.

12. Su SV, Hong P, Baik S, Negrete OA, Gurney KB, Lee B: **DC-SIGN binds to HIV-1 glycoprotein 120 in a distinct but overlapping fashion compared with ICAM-2 and ICAM-3.** *J.Biol.Chem.* 2004, **279**:19122-19132.
13. Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC: **L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003, **100**:4498-4503.
14. Namavar F, Sparrius M, Veerman EC, Appelmek BJ, Vandenbroucke-Grauls CM: **Neutrophil-activating protein mediates adhesion of Helicobacter pylori to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin.** *Infect.Immun.* 1998, **66**:444-447.
15. Seeberger PH, Haase WC: **Solid-phase oligosaccharide synthesis and combinatorial carbohydrate libraries.** *Chem.Rev.* 2000, **100**:4349-4394.
16. Koeller KM, Wong CH: **Complex carbohydrate synthesis tools for glycobologists: enzyme-based approach and programmable one-pot strategies.** *Glycobiology* 2000, **10**:1157-1169.
17. Koeller KM, Wong CH: **Synthesis of complex carbohydrates and glycoconjugates: enzyme-based and programmable one-pot strategies.** *Chem.Rev.* 2000, **100**:4465-4494.
18. Sears P, Wong CH: **Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins.** *Science* 2001, **291**:2344-2350.
19. Wong CH.: **Mimics of complex carbohydrates recognized by receptors.** *Accounts of chemical Research* 1999, **32**:376-385.
20. Sears P, Wong CH: **Intervention of carbohydrate recognition by proteins and nucleic acids.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996, **93**:12086-12093.
21. Simanek EE, McGarvey GJ, Jablonowski JA, Wong CH: **Selectinminus signCarbohydrate Interactions: From Natural Ligands to Designed Mimics.** *Chem.Rev.* 1998, **98**:833-862.
22. Bertozzi CR, Kiessling LL: **Chemical glycobiology.** *Science* 2001, **291**:2357-2364.
23. Hanai N, Nakamura K, Shitara K: **Recombinant antibodies against ganglioside expressed on tumor cells.** *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2000, **46 Suppl**:S13-S17.
24. Gorter AD, Oostrik J, van der LP, Hiemstra PS, Dankert J, van Alphen L: **Involvement of lipooligosaccharides of Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis in defensin-enhanced bacterial adherence to epithelial cells.** *Microb.Pathog.* 2003, **34**:121-130.
25. Schutze N: **siRNA technology.** *Mol.Cell Endocrinol.* 2004, **213**:115-119.
26. Murchison EP, Hannon GJ: **miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery.** *Curr.Opin.Cell Biol.* 2004, **16**:223-229.

27. Moss EG: **RNA interference: it's a small RNA world.** *Curr.Biol.* 2001, **11**:R772-R775.
28. Nudler E, Mironov AS: **The riboswitch control of bacterial metabolism.** *Trends Biochem.Sci.* 2004, **29**:11-17.
29. Ferre-D'Amare AR: **The hairpin ribozyme.** *Biopolymers* 2004, **73**:71-78.
30. Eckstein F, Bramlage B: **The hammerhead ribozyme.** *Biopolymers* 1999, **52**:147-154.
31. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR: **Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena.** *Cell* 1982, **31**:147-157.
32. Sun L, Cui Z, Gottlieb RL, Zhang B: **A selected ribozyme catalyzing diverse dipeptide synthesis.** *Chem.Biol.* 2002, **9**:619-628.
33. Kumar RM, Joyce GF: **A modular, bifunctional RNA that integrates itself into a target RNA.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003, **100**:9738-9743.
34. Lorsch JR, Szostak JW: **In vitro evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity.** *Nature* 1994, **371**:31-36.
35. Seelig B, Jaschke A: **A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity.** *Chem.Biol.* 1999, **6**:167-176.
36. Illangasekare M, Sanchez G, Nickles T, Yarus M: **Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA.** *Science* 1995, **267**:643-647.
37. Illangasekare M, Yarus M: **Small-molecule-substrate interactions with a self-aminoacylating ribozyme.** *J.Mol.Biol.* 1997, **268**:631-639.
38. Illangasekare M, Kovalchuk O, Yarus M: **Essential structures of a self-aminoacylating RNA.** *J.Mol.Biol.* 1997, **274**:519-529.
39. Lee N, Bessho Y, Wei K, Szostak JW, Suga H: **Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation.** *Nat.Struct.Biol.* 2000, **7**:28-33.
40. Reader JS, Joyce GF: **A ribozyme composed of only two different nucleotides.** *Nature* 2002, **420**:841-844.
41. Johnston WK, Unrau PJ, Lawrence MS, Glasner ME, Bartel DP: **RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension.** *Science* 2001, **292**:1319-1325.
42. Yarus M: **Primordial genetics: phenotype of the ribocyte.** *Annu.Rev.Genet.* 2002, **36**:125-151.
43. Dworkin JP, Lazcano A, Miller SL: **The roads to and from the RNA world.** *J.Theor.Biol.* 2003, **222**:127-134.

44. Caruthers MH: **Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses.** *Science* 1985, **230**:281-285.
45. Joyce GF: **RNA evolution and the origins of life.** *Nature* 1989, **338**:217-224.
46. Ellington AD, Szostak JW: **In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands.** *Nature* 1990, **346**:818-822.
47. Tuerk C, Gold L: **Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase.** *Science* 1990, **249**:505-510.
48. Marshall KA, Ellington AD: **In vitro selection of RNA aptamers.** *Methods Enzymol.* 2000, **318**:193-214.
49. Sabeti PC, Unrau PJ, Bartel DP: **Accessing rare activities from random RNA sequences: the importance of the length of molecules in the starting pool.** *Chem.Biol.* 1997, **4**:767-774.
50. Griffiths AD, Tawfik DS: **Man-made enzymes--from design to in vitro compartmentalisation.** *Curr.Opin.Biotechnol.* 2000, **11**:338-353.
51. Connell GJ, Illangesekare M, Yarus M: **Three small ribooligonucleotides with specific arginine sites.** *Biochemistry* 1993, **32**:5497-5502.
52. Tao J, Frankel AD: **Arginine-binding RNAs resembling TAR identified by in vitro selection.** *Biochemistry* 1996, **35**:2229-2238.
53. Geiger A, Burgstaller P, von der EH, Roeder A, Famulok M: **RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity.** *Nucleic Acids Res.* 1996, **24**:1029-1036.
54. Osborne SE, Ellington AD: **Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry.** *Chem.Rev.* 1997, **97**:349-370.
55. Haller AA, Sarnow P: **In vitro selection of a 7-methyl-guanosine binding RNA that inhibits translation of capped mRNA molecules.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997, **94**:8521-8526.
56. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B: **High-resolution molecular discrimination by RNA.** *Science* 1994, **263**:1425-1429.
57. Sassanfar M, Szostak JW: **An RNA motif that binds ATP.** *Nature* 1993, **364**:550-553.
58. Mannironi C, Di Nardo A, Fruscoloni P, Tocchini-Valentini GP: **In vitro selection of dopamine RNA ligands.** *Biochemistry* 1997, **36**:9726-9734.
59. Cadwell RC, Joyce GF: **Mutagenic PCR.** *PCR Methods Appl.* 1994, **3**:S136-S140.
60. Stemmer WP: **DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994, **91**:10747-10751.

61. Kirby R, Cho EJ, Gehrke B, Bayer T, Park YS, Neikirk DP, McDevitt JT, Ellington AD: **Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins.** *Anal.Chem.* 2004, **76**:4066-4075.
62. Blind M, Kolanus W, Famulok M: **Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999, **96**:3606-3610.
63. Famulok M, Blind M, Mayer G: **Intramers as promising new tools in functional proteomics.** *Chem.Biol.* 2001, **8**:931-939.
64. Shi H, Hoffman BE, Lis JT: **RNA aptamers as effective protein antagonists in a multicellular organism.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999, **96**:10033-10038.
65. Cox JC, Rudolph P, Ellington AD: **Automated RNA selection.** *Biotechnol.Prog.* 1998, **14**:845-850.
66. Cox JC, Ellington AD: **Automated selection of anti-protein aptamers.** *Bioorg.Med.Chem.* 2001, **9**:2525-2531.
67. Cox JC, Hayhurst A, Hesselberth J, Bayer TS, Georgiou G, Ellington AD: **Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer.** *Nucleic Acids Res.* 2002, **30**:e108.
68. Sooter LJ, Riedel T, Davidson EA, Levy M, Cox JC, Ellington AD: **Toward automated nucleic acid enzyme selection .** *Biol.Chem.* 2001, **382**:1327-1334.
69. Gallo M, Montserrat JM, Iribarren AM: **Design and applications of modified oligonucleotides.** *Braz.J.Med.Biol.Res.* 2003, **36**:143-151.
70. Jayasena SD: **Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics.** *Clin.Chem.* 1999, **45**:1628-1650.
71. Agrawal S: **Antisense oligonucleotides: towards clinical trials.** *Trends Biotechnol.* 1996, **14**:376-387.
72. Pieken WA, Olsen DB, Benseler F, Aurup H, Eckstein F: **Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes.** *Science* 1991, **253**:314-317.
73. Uhlmann E, Peyman A.: **Antisense Oligonucleotides: a new therapeutic Principle.** *Chem.Rev.* 1990, **90**[4]:544-579.
74. Piccirilli JA, Krauch T, Moroney SE, Benner SA: **Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet.** *Nature* 1990, **343**:33-37.
75. Bain JD, Switzer C, Chamberlin AR, Benner SA: **Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code.** *Nature* 1992, **356**:537-539.

76. Kim SJ, Kim MY, Lee JH, You JC, Jeong S: **Selection and stabilization of the RNA aptamers against the human immunodeficiency virus type-1 nucleocapsid protein.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2002, **291**:925-931.
77. Jellinek D, Green LS, Bell C, Lynott CK, Gill N, Vargeese C, Kirschenheuter G, McGee DP, Abesinghe P, Pieken WA, .: **Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor.** *Biochemistry* 1995, **34**:11363-11372.
78. Sooter LJ, Ellington AD: **Reflections on a novel therapeutic candidate.** *Chem.Biol.* 2002, **9**:857-858.
79. O'Connell D, Koenig A, Jennings S, Hicke B, Han HL, Fitzwater T, Chang YF, Varki N, Parma D, Varki A: **Calcium-dependent oligonucleotide antagonists specific for L-selectin.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996, **93**:5883-5887.
80. Hicke BJ, Watson SR, Koenig A, Lynott CK, Bargatze RF, Chang YF, Ringquist S, Moon-McDermott L, Jennings S, Fitzwater T, Han HL, Varki N, Albinana I, Willis MC, Varki A, Parma D: **DNA aptamers block L-selectin function in vivo. Inhibition of human lymphocyte trafficking in SCID mice.** *J.Clin.Invest* 1996, **98**:2688-2692.
81. Wallace ST, Schroeder R: **In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics.** *RNA.* 1998, **4**:112-123.
82. Lato SM, Boles AR, Ellington AD: **In vitro selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution.** *Chem.Biol.* 1995, **2**:291-303.
83. Wallis MG, von Ahsen U, Schroeder R, Famulok M: **A novel RNA motif for neomycin recognition.** *Chem.Biol.* 1995, **2**:543-552.
84. Famulok M, Huttenhofer A: **In vitro selection analysis of neomycin binding RNAs with a mutagenized pool of variants of the 16S rRNA decoding region.** *Biochemistry* 1996, **35**:4265-4270.
85. Schurer H, Stempera K, Knoll D, Mayer G, Blind M, Forster HH, Famulok M, Welzel P, Hahn U: **Aptamers that bind to the antibiotic moenomycin A.** *Bioorg.Med.Chem.* 2001, **9**:2557-2563.
86. Jiang L, Majumdar A, Hu W, Jaishree TJ, Xu W, Patel DJ: **Saccharide-RNA recognition in a complex formed between neomycin B and an RNA aptamer.** *Structure.Fold.Des* 1999, **7**:817-827.
87. Cho J, Hamasaki K, Rando RR: **The binding site of a specific aminoglycoside binding RNA molecule.** *Biochemistry* 1998, **37**:4985-4992.
88. Hermann T, Westhof E: **Saccharide-RNA recognition.** *Biopolymers* 1998, **48**:155-165.
89. Walter F, Vicens Q, Westhof E: **Aminoglycoside-RNA interactions.** *Curr.Opin.Chem.Biol.* 1999, **3**:694-704.

90. Wallis MG, Schroeder R: **The binding of antibiotics to RNA.** *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 1997, **67**:141-154.
91. Schroeder R, Waldsich C, Wank H: **Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics.** *EMBO J.* 2000, **19**:1-9.
92. Kawakami J, Kawase Y, Sugimoto N.: **In vitro selection of aptamers that recognize a monosaccharide.** *Ann.Chem.Acta* 1998, **36**:95-100.
93. Masud MM, Kuwahara M, Ozaki H, Sawai H: **Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX.** *Bioorg.Med.Chem.* 2004, **12**:1111-1120.
94. Jeong S, Eom T, Kim S, Lee S, Yu J: **In vitro selection of the RNA aptamer against the Sialyl Lewis X and its inhibition of the cell adhesion.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001, **281**:237-243.
95. Yang Q, Goldstein IJ, Mei HY, Engelke DR: **DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998, **95**:5462-5467.
96. Fukusaki E, Kato T, Maeda H, Kawazoe N, Ito Y, Okazawa A, Kajiyama S, Kobayashi A: **DNA aptamers that bind to chitin.** *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 2000, **10**:423-425.
97. Srisawat C, Goldstein IJ, Engelke DR: **Sephadex-binding RNA ligands: rapid affinity purification of RNA from complex RNA mixtures.** *Nucleic Acids Res.* 2001, **29**:E4.
98. Hanahan D: **Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.** *J.Mol.Biol.* 1983, **166**:557-580.
99. Grundler G, Schmidt RR. : **Anwendung des trichloracetimidatverfahrens auf 2-desoxy-2-phthalimido-D-glucose-derivative. Synthese von oligosacchariden der "Core-Region" von O-glycoproteinen des mucin-typs.** *Carbohydr.Res.* 1985, **135**, 203-218.
100. Deferari JO, Gros EG, Mastronardi IO. : **Methylation of carbohydrates bearing base-labile substituents, with diazomethane-boron trifluoride etherate : II. A new synthesis of 2-O-methyl-D-mannose.** *Carbohydr.Res.* 1967, **4**:432-434.
101. Rogers YH, Jiang-Baucom P, Huang ZJ, Bogdanov V, Anderson S, Boyce-Jacino MT: **Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: A method for preparation of DNA microarrays.** *Anal.Biochem.* 1999, **266**:23-30.
102. Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B: **Reassessment of Ellman's reagent.** *Methods Enzymol.* 1983, **91**:49-60.
103. Szostak JW, Ellington AD.: **In vitro selection of functional RNA sequences.** *The RNA World*, Cold Spring Harbour Press 1993, 511-533.

104. Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH: **Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure.** *J.Mol.Biol.* 1999, **288**:911-940.
105. Seifert J, Unverzagt C. : **Synthesis of a core-fucosylated, biantennary octasaccharide as a precursor for glycopeptides of complex N-glycans.** *Tetrahedron Lett.* 1996, **37**:6527-6530.
106. Unverzagt C. : **Synthesis of a Biantennary Heptasaccharide by Regioselective Glycosylations.** *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 1994, **33**:1170-1173.
107. Unverzagt C.: **Habilitationsschrift**, München 1996.
108. Puglisi JD, Tinoco I, Jr.: **Absorbance melting curves of RNA.** *Methods Enzymol.* 1989, **180**:304-325.
109. Uhlenbeck OC: **Keeping RNA happy.** *RNA.* 1995, **1**:4-6.
110. Bukhman YV, Draper DE: **Affinities and selectivities of divalent cation binding sites within an RNA tertiary structure.** *J.Mol.Biol.* 1997, **273**:1020-1031.
111. Shiman R, Draper DE: **Stabilization of RNA tertiary structure by monovalent cations.** *J.Mol.Biol.* 2000, **302**:79-91.
112. Heerschap A, Walters JA, Hilbers CW: **Interactions of some naturally occurring cations with phenylalanine and initiator tRNA from yeast as reflected by their thermal stability.** *Biophys.Chem.* 1985, **22**:205-217.
113. Misra VK, Draper DE: **On the role of magnesium ions in RNA stability.** *Biopolymers* 1998, **48**:113-135.
114. Myszka DG: **Improving biosensor analysis.** *J.Mol.Recognit.* 1999, **12**:279-284.
115. Horstmann N.: **Diplomarbeit**, LS Biochemie, Bayreuth 2003.
116. Hornung V, Hofmann HP, Sprinzl M: **In vitro selected RNA molecules that bind to elongation factor Tu.** *Biochemistry* 1998, **37**:7260-7267.
117. Szkaradkiewicz K, Nanninga M, Nesper-Brock M, Gerrits M, Erdmann VA, Sprinzl M: **RNA aptamers directed against release factor 1 from *Thermus thermophilus*.** *FEBS Lett.* 2002, **514**:90-95.
118. Igarashi K, Kashiwagi K: **Polyamines: mysterious modulators of cellular functions.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2000, **271**:559-564.
119. Srisawat C, Engelke DR: **RNA affinity tags for purification of RNAs and ribonucleoprotein complexes.** *Methods* 2002, **26**:156-161.

120. Bachler M, Schroeder R, von Ahsen U: **StreptoTag: a novel method for the isolation of RNA-binding proteins.** *RNA*. 1999, **5**:1509-1516.
121. Srisawat C, Engelke DR: **Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins.** *RNA*. 2001, **7**:632-641.
122. Brion P, Westhof E: **Hierarchy and dynamics of RNA folding.** *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 1997, **26**:113-137.
123. Freundlicherweise von Dr. Ralf Schuberth von LS BOC erhalten.
124. Kanie O, Crawley SC, Palcic MM, Hindsgaul O: **Acceptor-substrate recognition by N-acetylglucosaminyltransferase-V: Critical role of the 4''-hydroxyl group in β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-OR.** *Carbohydr. Res.* 1993, **243**: 139-164

8 Anhang

a

Selektion 1	Ligand
Zyklus	Trisaccharid 13
	%
1	0,33
2	0,15
3	0,08
4	0,81
5	0,33
6	1,79
7	0,28
8	0,6
9	0,37
10	0,39
11	0,39
12	0,63
13	4,8
14	2,7
15	1,5
16	3
17	3
18	1,5

b

Selektion 2/1	Ligand				
	Zyklus	Tri-saccharid 13	Tetra-saccharid 15	Penta-saccharid 24	Hepta-saccharid 25
		%	%	%	%
1	1,79	1,26	1,49	2,55	
2	0,28	0,34	0,37	0,47	
2	0,34	0,36	0,39	0,45	
3	0,56	0,36	0,67	0,4	
4	2,2	2,72	2,3	3,3	
5	2,19	2,42	3	3,9	
5	1,04	0,82	1,27	2,14	
6	1,22	1,54	1,63	1,77	
7	1,05	1,24	1,59	1,65	
8	1,15	1,65	1,36	2,39	
9	1,33	1,44	0,82	1,99	

d

Selektion 3/1	Ligand				
	Zyklus	Tri-saccharid 13	Tetra-saccharid 15	Penta-saccharid 24	Hepta-saccharid 26
		%	%	%	%
1	-	-	-	-	
2	0,096	0,23	0,12	0,1	
3	0,2	0,28	0,21	0,09	
4	0,09	0,07	0,06	0,05	
5	0,1	0,09	0,1	0,1	

c

Selektion 2/2	Ligand				
	Zyklus	Tri-saccharid 13	Tetra-saccharid 15	Penta-saccharid 24	Hepta-saccharid 26
		%	%	%	%
1	1,79	1,26	1,49	2,55	
2	0,28	0,34	0,37	0,47	
3	?	?	?	?	
4	0,01	0,24	0,15	0,29	
5	0,31	0,32	0,43	0,36	
6	0,42	0,53	0,59	0,34	

e

Selektion 3/2	Ligand				
	Zyklus	Tri-saccharid 13	Tetra-saccharid 15	Penta-saccharid 24	Hepta-saccharid 26
		%	%	%	%
1	-	-	-	-	
2	0,096	0,23	0,12	0,1	
3	0,73	0,93	1,06	0,84	
4	0,5	0,38	0,42	0,52	

Tab. 10 Anreicherung der an Selektionssäule gebundenen RNA in der Selektion 1(a), Selektion 2/1 (b), Selektion 2/2 (c), Selektion 3/1(d) und Selektion 3/2 (e) gegen Oligosaccharide 13, 15, 24 und 26 in den einzelnen Selektionszyklen. Die Prozentangaben der gebundenen RNA beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge in einzelnen Selektionszyklen.

RNA 2A (50 Nt):

GGACUCCUUCUUUCAGACCUCAUGCUCCGACUUGAACGAAUAUCAUCA

RNA 5A (46 Nt):

UACUGCUAGCAAACAUCGAAAGUUUGUAUCACUUCAGCCCCGAUAC (2x)

RNA 8A (52 Nt):

AUCUGAUCCCUGAGCAAGAAAAACGGAUACCAUCCGUAAUGCCAAGACGGUA

RNA 2B (50 Nt):

GUAACUGCCAUCCACUCGAUAACACAGUCUAUUGGAUCUGGUCACCAAUA

RNA 3B (50 Nt):

CACGAACACCCUGUCAAUUCUCCUCCGCUCGCGCUCUGUGACAAUGCUAC

RNA 8B (40 Nt):

UCAAUUGCGGAGCCAGUCCUAAACUGGAGCCUACUGCCCAU

RNA 11B (50 Nt):

CUGACAGUCGUACGACCUAGCUCACAUGCACAAAAUCUCAACAAGACCAA

RNA 12B (40 Nt):

CUCUGCCUCAAAACCGUUGAGUAUCCACCGGGUUUAAGCG

RNA 13B (50 Nt):

AAGAGUUGUGCGAGUUUAAGUAAAAUCCACCCUUAGAUUCACCUAACAGU

RNA 18B (52 Nt):

CACUGCGCUAGUCCGGGGCCUAGCUGACCAUUUUUGCUGACCCAAUGUGAC

RNA 19B (51 Nt):

AGGUUAAGCAGACCUACGGUGCUGUUUCCCCGAUAGGUGAACAUGAUAAU

Abb. 42 RNA-Sequenzen aus dem 6. Selektionszyklus der Selektion 1 gegen das Trisaccharid 13.

Es sind nur die Sequenzen und die Länge des ursprünglich randomisierten Bereichs gezeigt.

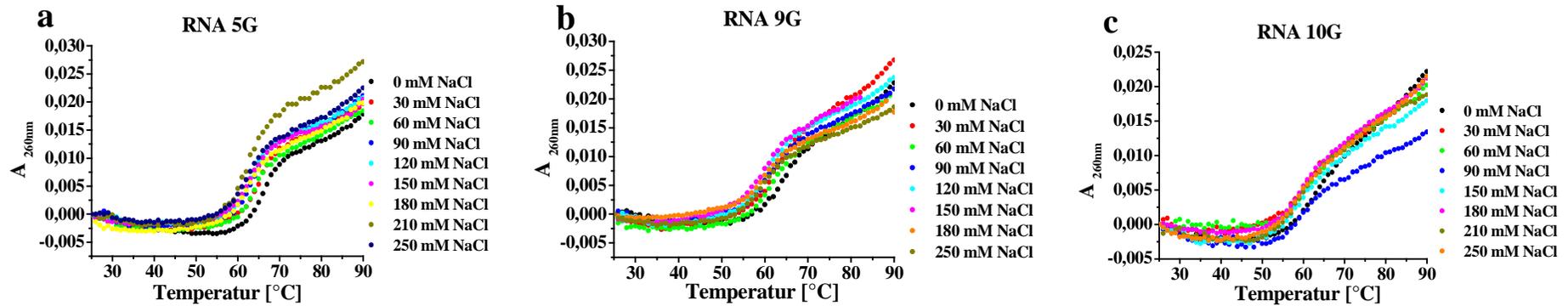


Abb. 43 Vergleich der Schmelzkurven der RNA 5G (a), 9G (b) und 10G (c) in Abhängigkeit von von der NaCl-Konzentration.

Es ist die Absorption bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur für jeweilige RNA gezeigt. Für die Messungen wurde 138.5 nM RNA 5G, 130 nM RNA 9G und 140 nM RNA 10G eingesetzt.

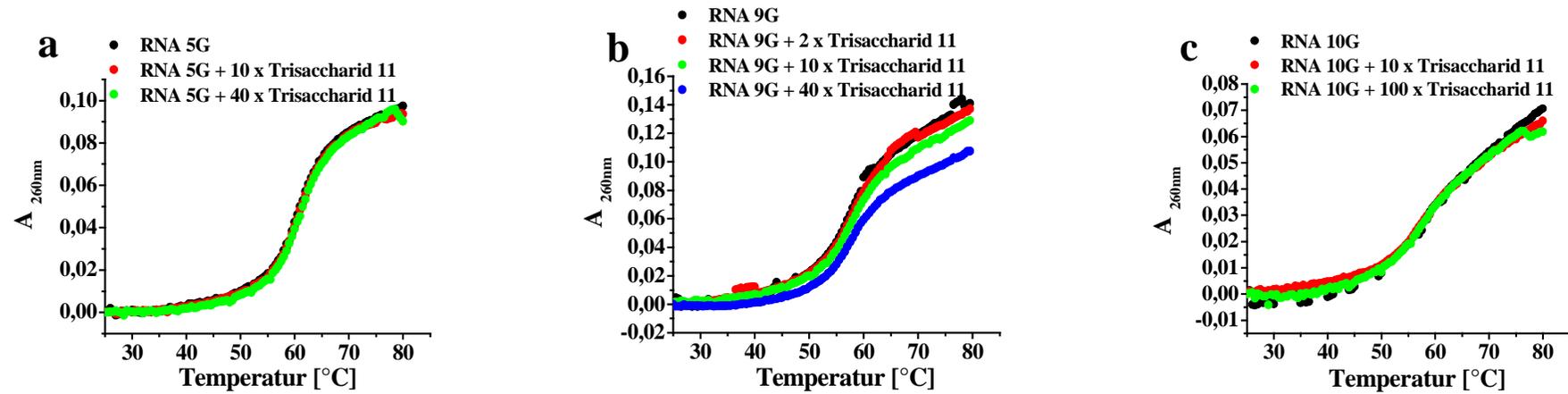


Abb. 44 Vergleich der Schmelzkurven der RNA 5G (a), 9G (b) und 10G (c) in Abhängigkeit von von der Trisaccharid β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-OCH₃ - Konzentration. Es ist die Absorption bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur für jeweilige RNA gezeigt. Für die Messungen wurde 192 nM RNA 5G, 396 nM RNA 9G und 192 nM RNA 10G und das entsprechende Überschuss an Trisaccharid 11 eingesetzt.

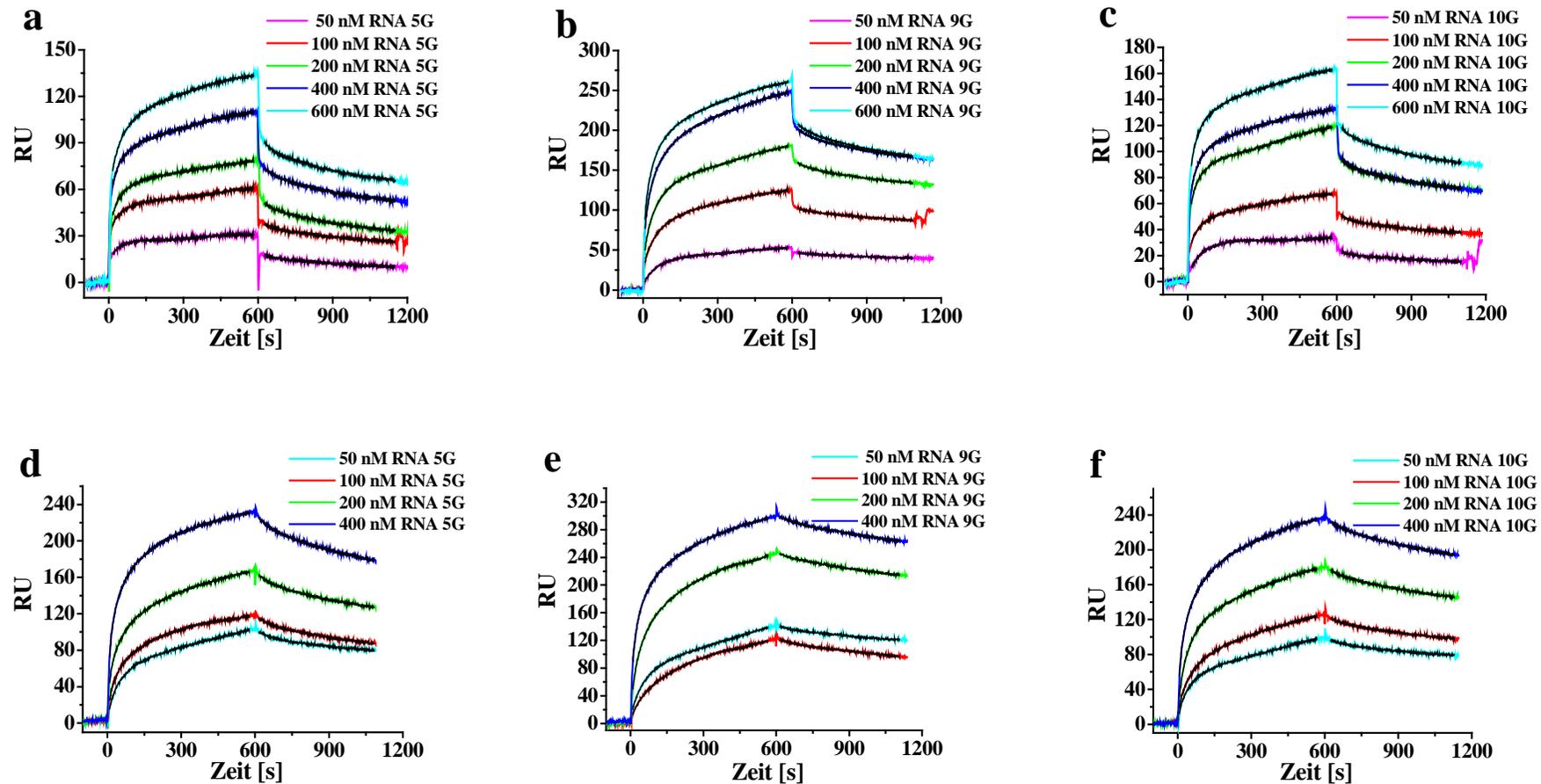


Abb. 45 Sensorgramme und die Fitts der Wechselwirkung der RNA-Aptemere 5G, 9G und 10G bei unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen RNA in der Mg^{2+} -Anwesenheit (a, b, c) oder Mg^{2+} -Abwesenheit (d, e, f). Es sind die Differenzkurven gezeigt. Die Auswertung erfolgte mit der Software BiaEvaluation 3.0 (BIACORE, Uppsala). Zur Auswertung der Sensorgramme wurde eine Reaktionskinetik nach Pseudo-1. Ordnung vorausgesetzt (Kapitel 2.2.22.2), die ein lineares Abfall der Basislinie während der Messung berücksichtigt. Die Assoziations- und Dissoziationsphase wurden dabei global und getrennten gefittet.

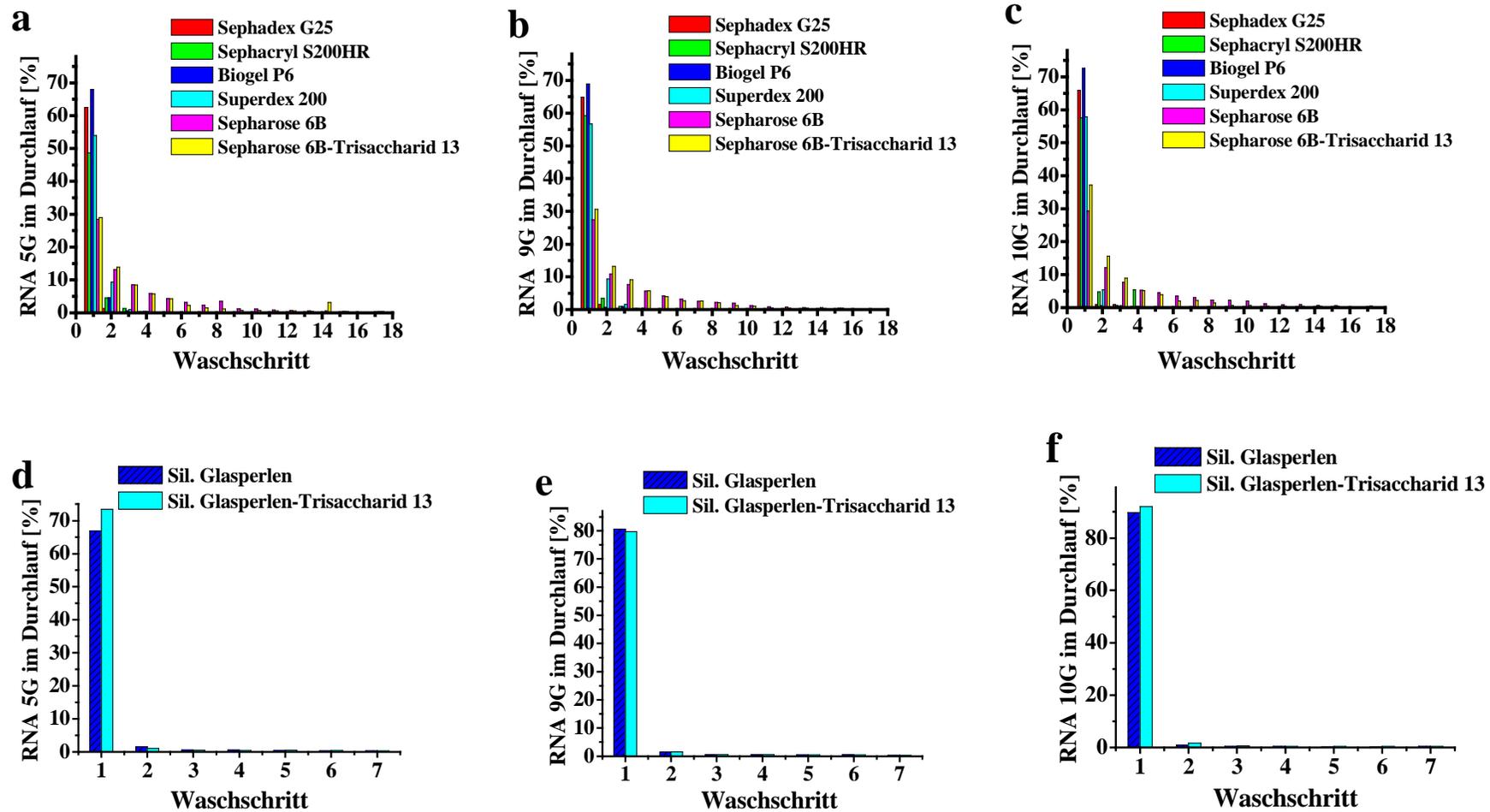


Abb. 46 Bindung der RNA-Aptamere 5G (a, d), 9G (b, e) und 10G (c, f) an verschiedene Säulenmaterialien.

Die Prozentangaben der RNA im Durchlauf nach dem entsprechenden Waschschrift beziehen sich auf die insgesamt eingesetzte RNA-Menge.

Danksagung

Ich danke:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Mathias Sprinzl für die Möglichkeit in seiner Gruppe zu arbeiten, für die interessante Themenstellung dieser Doktorarbeit und die vielen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Carlo Unverzagt für die Aufnahme in den Arbeitskreis BOC, die Hilfe, Ratschläge und viele Diskussionen betreffend chemische Synthese von Oligosacchariden.

der Arbeitsgruppe von Prof. Georg Krausch für die Möglichkeit die Biacore-Messungen durchzuführen und besonders Frank Schubert und Dr. Rasa Kellner-Bienoraviciute für die technische Hilfe und Diskussionen.

Xaver Schratt, Dr. Harald Weiß, Dr. Stefano Mezzato und Sabine Schramm von BOC für die Messung der EI-Massenspektren.

Dr. Ralf Schuberth, Melanie Schnabel, Dr. Stefano Mezzato, Dr. Sabine Reicheneder, Dr. Gisilinde Gundel und Dr. Harald Weiß von BOC für die Messung der NMR-Spektren von allen synthetisierten Verbindungen.

Dr. Gundula Voß und Dr. Bettina Hoffmann für die Hilfe bei IR-Messungen.

Melanie Schnabel und Dr. Gundula Voß für die Einführung in Drehwertmessung.

Dr. Sabine Reicheneder für die Einführung in Online-Literaturrecherchen.

Dr. Harald Weiß und Dr. Gisilinde Gundel für die Einführung und Hilfe in die chemische Synthese von Oligosacchariden und Laboralltag am Lehrstuhl BOC.

Dr. Markus Püttner, Dr. Ingo Prahl, Xaver Schratt und Petra Zippelius für die Hilfe in Computerfragen.

Norbert Grillenbeck, Phuong Tue., Petra Zippelius, Antje Doppel, Jörg Kastner und Sandra Leuschner für die Hilfe im Laboralltag.

Hannelore Kurzer, Petra Binder, Anette Behr und Traudl Herold dafür, dass sie auch für mich da waren.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit und viele wertvolle Ratschläge: Dr. Alexandra Wolfrum, Dr. Stefan Vörtler und Melanie Schnabel.

Ein ganz herzliches Dankeschön weiter allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des BC- und BOC-Arbeitskreises für alle Augenblicke, die das Leben im Labor mitgebracht hat.

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann Peter, unserer Tochter Bianka, meiner Familie und Freunden. Ohne Euch wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Zürich, den 25. November 2005

Mária Milovníková