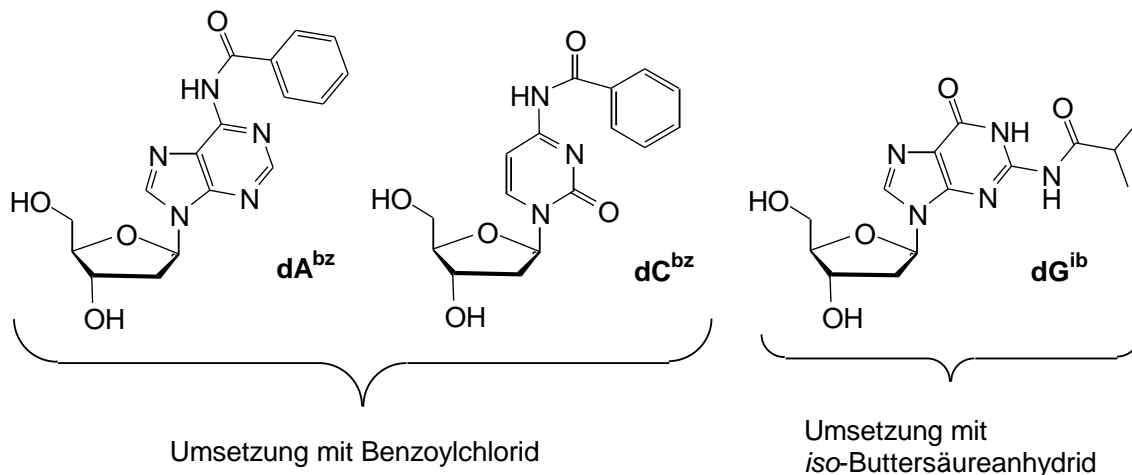


2.3 Synthese von Oligodesoxyribonukleinsäuren

2.3.1 Allgemeines und Schutzgruppen

Definiert synthetisierte Einzelstränge nennt man Oligonukleotide. Ist die Sequenz nicht ganz eindeutig definiert wird von Polynukleotiden gesprochen. Bei der Synthese von Oligonukleotiden muß grundsätzlich die Gefahr der Hydrolyse der P-Diester Brücke berücksichtigt werden. Darüber hinaus können leicht Säure-induzierte Öffnungen der glycosidischen Bindungen sowie Alkylierungen, Oxidationen oder Reduktionen der Basen erfolgen. Potentiell nukleophile Zentren sind die 3'-OH oder 5'-OH Gruppe sowie die Aminogruppen vom A, C oder G. Für die Oligonukleotidsynthese werden daher temporäre Schutzgruppen im Rahmen des Kettenaufbaus für die 5'-OH-Gruppe und permanente Schutzgruppen für die NH₂-Gruppen der Basen benötigt.

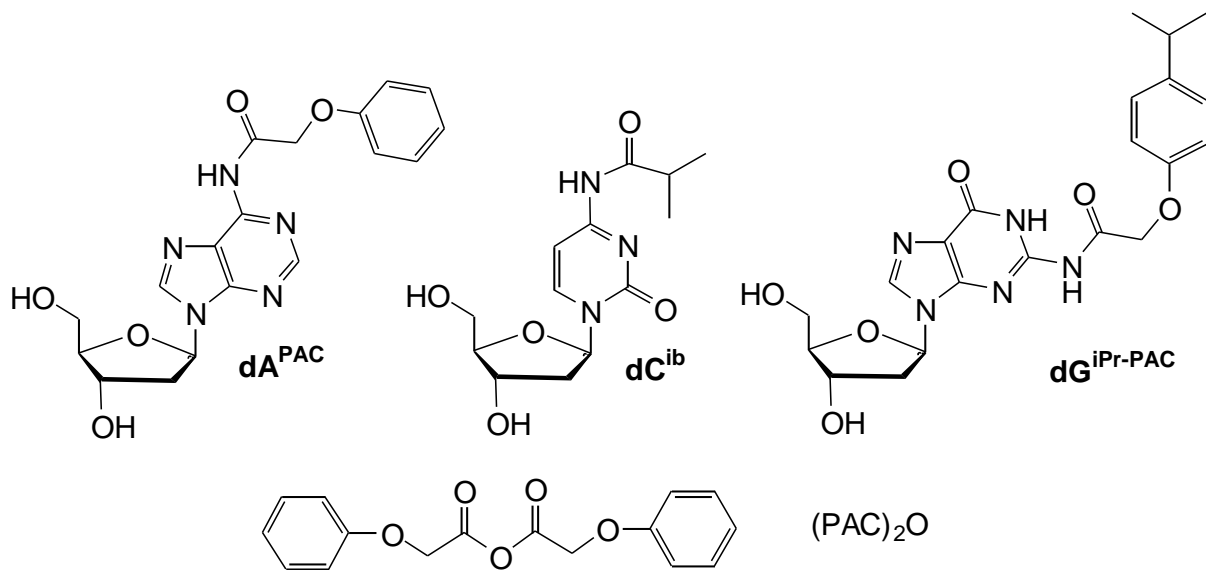
Permanente Schutzgruppen an den Basen:



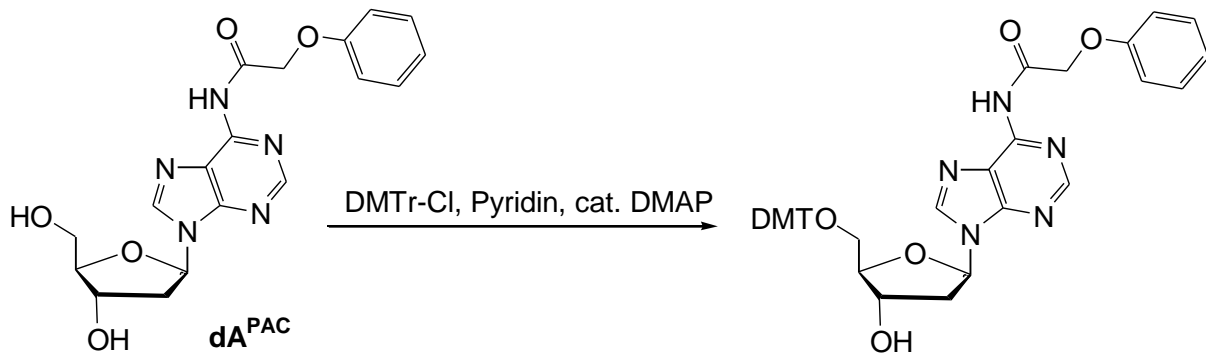
Abspaltung der Schutzgruppen geschieht mit NH₃/MeOH/H₂O bei 50°C über 12h.

Für viele Anwendungen werden mildere Entschützungsbedingungen benötigt. Zu diesem Zweck wurden die PAC-Amidite entwickelt. Zur Abspaltung werden die Oligonukleotide entweder 4 - 5 h bei 50 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt.

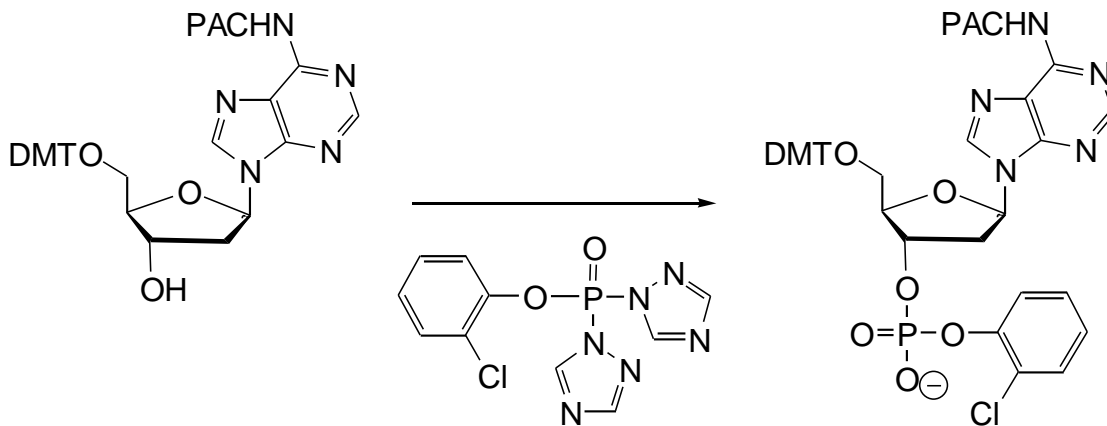
Zum Einführen der PAC-Schutzgruppe wird das Anhydrid (PAC)₂O verwendet.



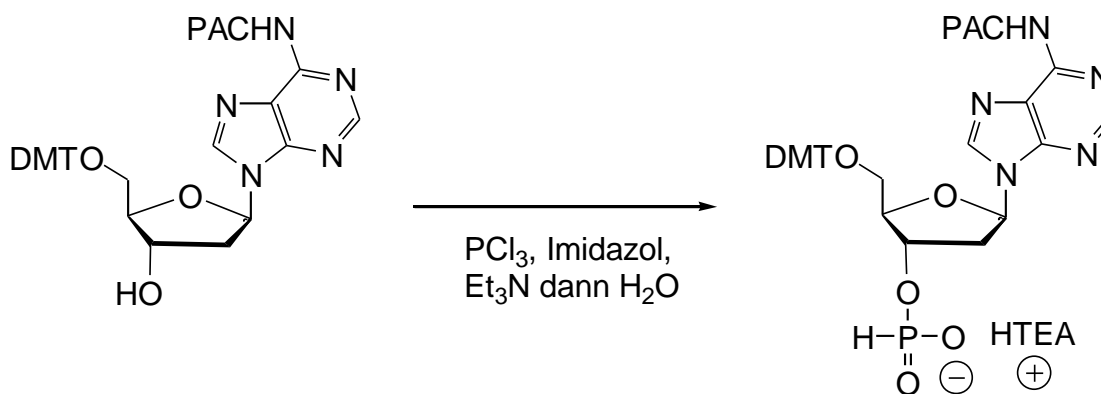
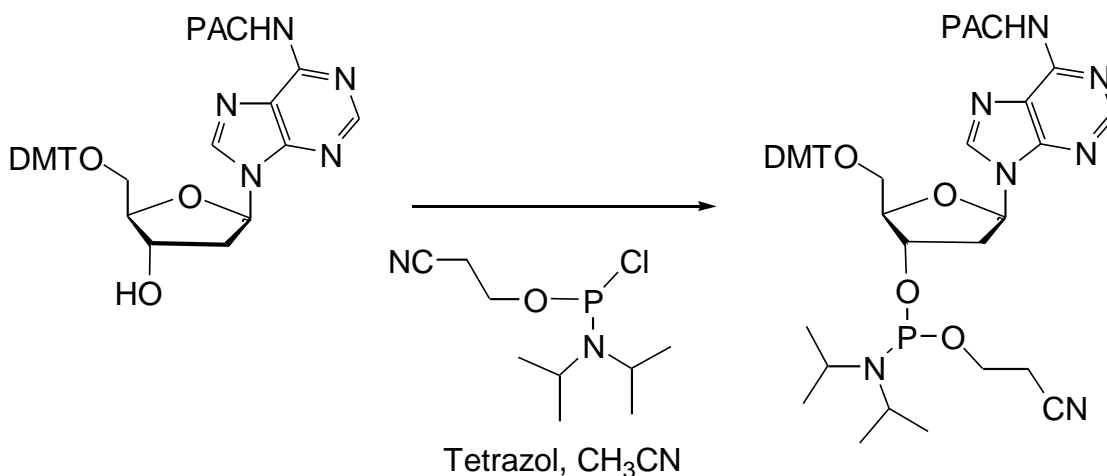
Als semipermanente Schutzgruppe verwendet man in der Regel die Dimethoxytrityl- oder seltener die Monomethoxytrityl-Schutzgruppe. Die Abspaltung vom 5'-O erfolgt am Synthesizer mit Dichloressigsäure oder Trichloressigsäure. Eingeführt wird die Schutzgruppe mit DMTr-Cl in Pyridin, oft in Gegenwart einer katalytischen Menge an DMAP. Aus sterischen Gründen reagiert diese Schutzgruppe lediglich mit der primären 5'-OH Gruppe. des Zuckers.



Der Phosphor kann auf verschiedenen Wegen in das Molekül eingebaut werden. Bei der Phosphortriester-Methode wird auf der Oxidationsstufe P(V) gearbeitet:



Bei der Phosphoramidit- und H-Phosphonatchemie arbeitet man auf der Oxidationsstufe P(III). Die Phosphitylierungen erfolgen entweder mit dem Cyanoethyl-geschützten-Diisopropylaminochloroamidit (Phosphoramidit) oder mit PCl_3 in Gegenwart von Imidazol (H-Phosphonat).

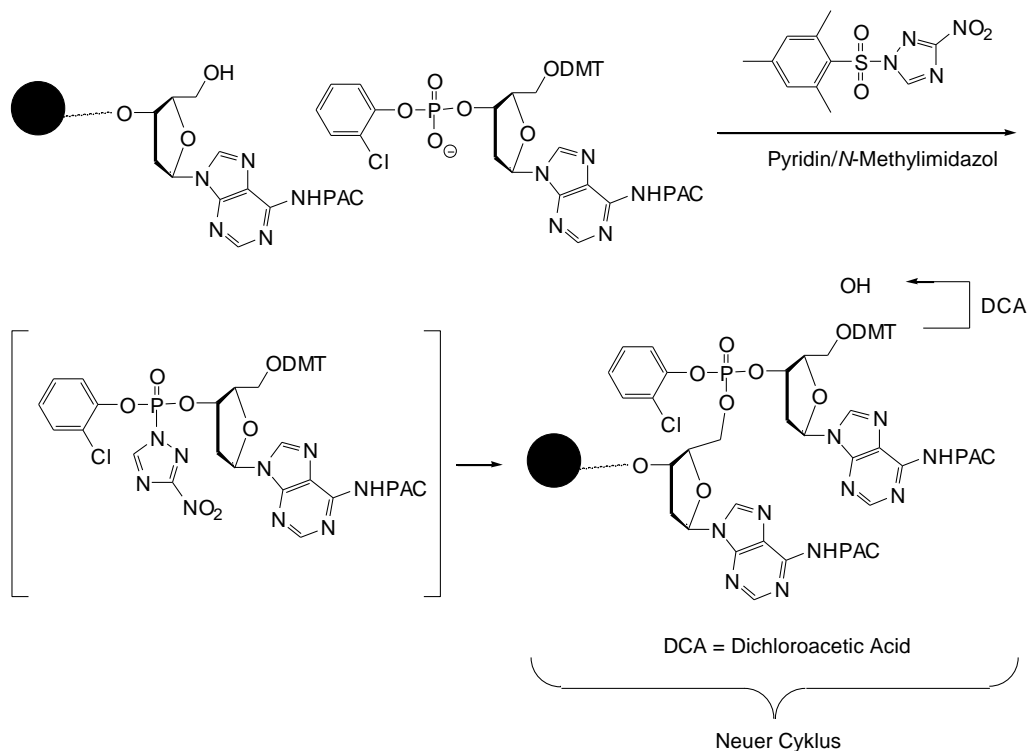


Der entscheidende Vorteil der H-Phosphonatchemie ist, daß keine Schutzgruppe am Phosphor benötigt wird.

2.3.2 Festphasensynthese von DNA

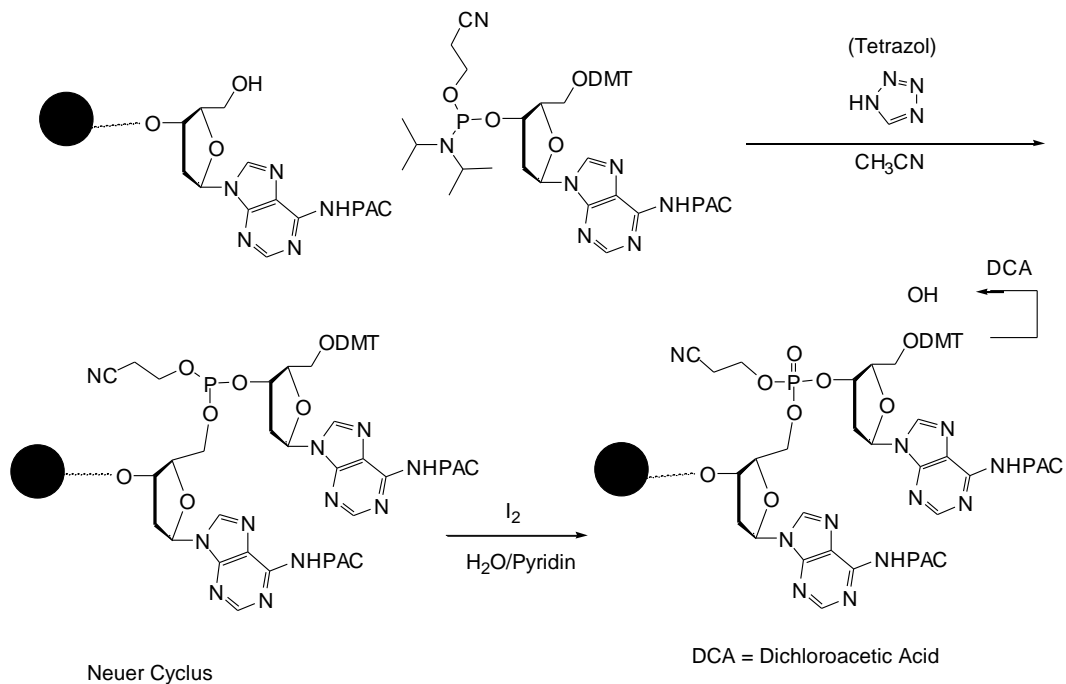
Für die Aneinanderreihung der einzelnen Bausteine zu einem DNA-Strang benutzt man die Festphasensynthese. Hierbei wird das erste Nukleotid an einem festen Träger immobilisiert. Alle weiteren Nukleotide werden dann einem repetitiven Protokoll folgend an diesem Träger aneinandergehängt. Für derartige Synthese an einem festen Träger erhielt Prof. Merrifield den Nobelpreis für Chemie. Für die Oligonukleotidsynthese wird als fester Träger meist CPG = *controlled pore glass beads* verwendet. das sind kleine raue Glasperlen. Die Poren auf der Oberfläche der Glaskugeln haben eine definierte Größe von 500 - 1000Å.

Phosphortriester-Chemie



Der Aufbau des DNA-Stranges erfolgt von 3' in 5' Richtung. (Enzyme in der Natur bauen von 5' in 3' Richtung auf). Die Phosphortriester Chemie hat sich vor allem für die Synthese kurzer Oligonukleotide in großen Mengen sehr bewährt.

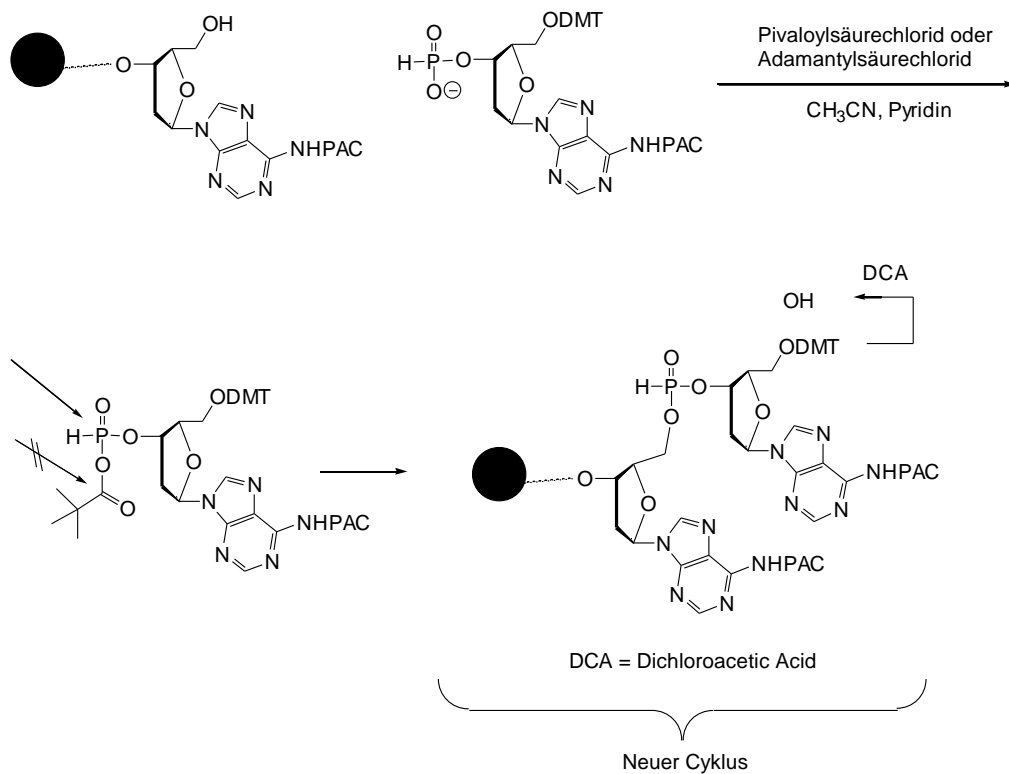
Phosphit-Triester (Phosphoramidit)-Chemie



Die Phosphoramidit Chemie wurde von Caruthers in den 1980er Jahren entwickelt. Sie hat die Oligonukleotid Chemie revolutioniert und die Gründung zahlreicher Biotech Firmen zur Folge gehabt, die seitdem Oligonukleotide beliebiger Sequenz heute im 24h Service verkaufen. Firmen in München sind z. B. MWG oder Metabion.

Vor allem kleine Mengen eines Oligonukleotide bis zu 120 Basen lang lassen sich heute routinemäßig gut herstellen.

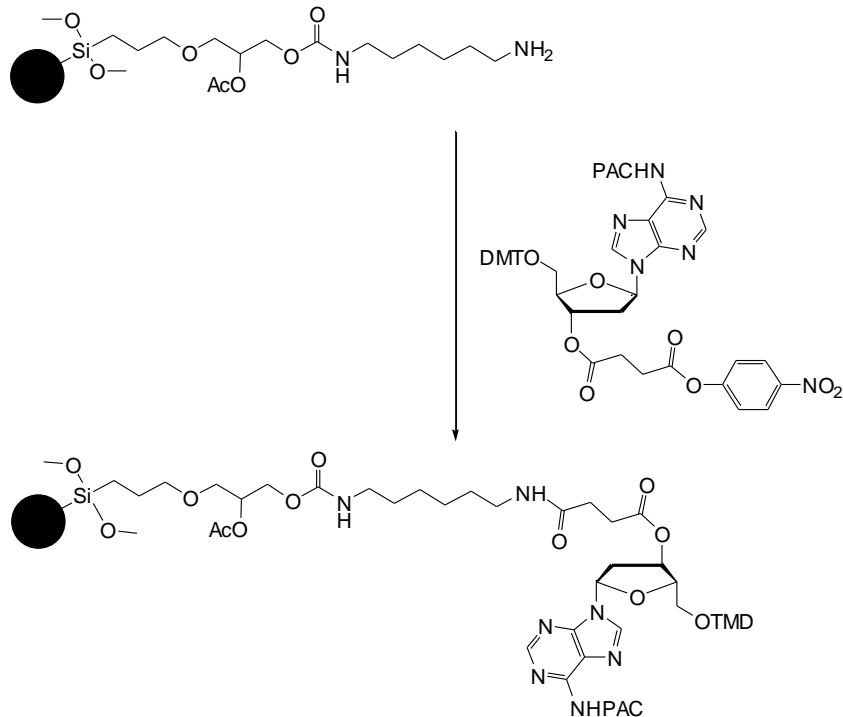
H-Phosphonat Chemie



Die zugrunde liegende Chemie bei der H-Phosphonat-Methode ist relativ alt. Sie beruht auf den Arbeiten von Todd 1950. Es handelt sich um eine tetrakoordinierte P(III)-Spezies. Die H-Phosphonat Methode braucht keine Schutzgruppe am Phosphor. Die Aufoxidation aller P(III) zu den Phosphordiester erfolgt am Ende der Synthese durch Spülen des Harzes mit I_2 über ca. 5 Minuten. Die Chemie ist noch nicht so verbreitet, weil die Aktivierung des H-Phosphonats sehr kritisch ist. Es kann zur Dimerisierung der H-Phosphonate zu Phosphit-Anhydriden kommen.

Befestigung der Oligonukleotide am CPG-Träger

Das CPG Material wird mit 10 - 50 μmol Nukleotid pro Gramm Träger beladen. Als Träger wird CPG 500 -1000Å oder stark vernetztes Polystyrol Material mit 100Å oder 300Å Porengröße verwendet. Für die Synthese sehr langer Oligonukleotide werden die großporigen Materialien bevorzugt verwendet.

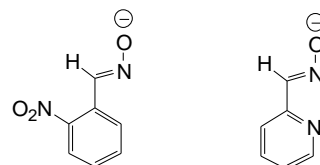


Für den Syntheseautomaten ergibt sich das folgende Protokoll für die Phosphoramidit Chemie:

- 1) Detritylierung der Base mit DCA in Dichlormethan
- 2) Kupplung des Phosphoramidits in Acetonitril nach Aktivierung mit einem Tetrazol-Derivat
- 3) Capping mit PAC₂O in Pyridin
- 4) Oxidation der Phosphit-Triester mit I₂/Pyridin in Acetonitril
- 5) Zurück zu Schritt 1

Am Ende der gesamten Synthese wird zunächst die DMTr-Schutzgruppe entfernt durch spülen des Trägers in der Synthesekartusche mit DCA in Dichlormethan.

Im Fall der Triester Chemie wird anschließend mit *syn*-2-Nitrobenzaldoximat oder Pyridincarbaldoxmiat entschützt.



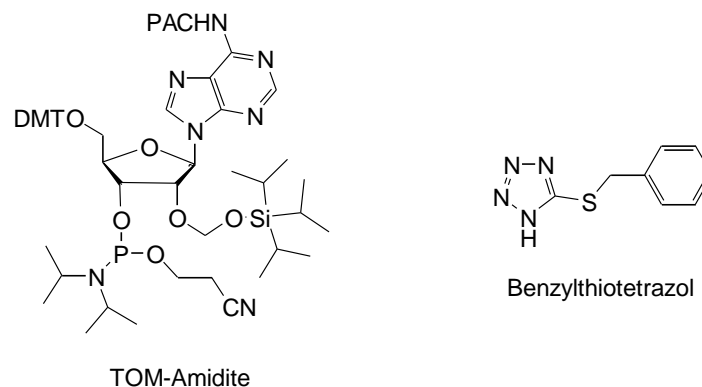
Dann wird das Oligonukleotid vom Träger mit NH₃ in MeOH/H₂O abgespalten. Gleichzeitig werden alle permanenten Basenschutzgruppen entfernt.

Im Fall der Phosphoramidite wird mit der Basenbehandlung auch alle Cyanoethylschutzgruppen am Phosphortriester entfernt. Wichtig ist, dass die Abspaltung der Cyanoethylschutzgruppe wesentlich schneller als die Hydrolyse der Triester erfolgt.

Alle Oligonukleotide werden anschließend entweder durch Gelelektrophorese oder *reversed* Phase HPLC oder Ionentauschen HPLC gereinigt.

2.3.2 Festphasensynthese von RNA

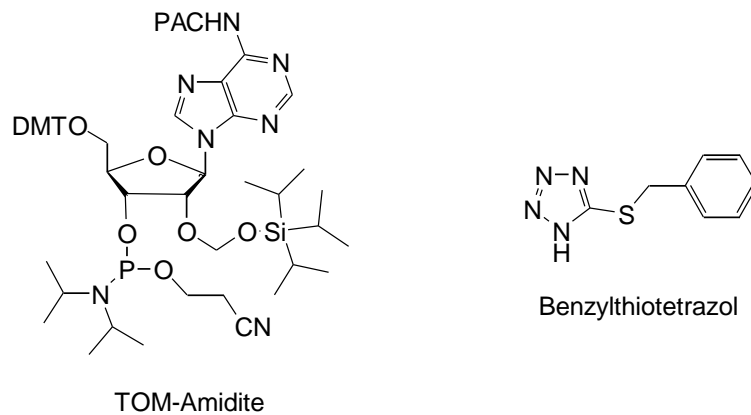
Die RNA-Synthese verläuft ganz ähnlich wie die DNA-Synthese. Es wird eine weitere Schutzgruppe für die 2'-OH Gruppe benötigt. Hier hat sich die TBDMS-Schutzgruppe bewährt. Es ist entscheidend, daß während der Entschützung nicht das 2'-Oxyanion entsteht. Es käme dann sofort zur Hydrolyse des Phosphordiesters. Meist werden PAC-Schutzgruppen auf den Basen verwendet.



Die TBDMS-Schutzgruppe wird erst ganz zum Schluss nach der Ammoniak-Entschützung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in Tetrahydrofuran (THF) abgespalten. Auf Grund der sterischen Abschirmung, die durch die TBDMS-Schutzgruppe verursacht wird, sind die Kupplungszeiten wesentlich länger während der RNA-Synthese. Die Kupplungsausbeuten sind nicht so hoch, was die Synthese langer Oligoribonukleotide (ab 50) sehr schwierig macht.

Neue Entwicklungen konzentrieren sich auf den Ersatze der 2'-Schutzgruppe und die Verwendung anderen Tetrazole. Eine von S. Pitsch entwickelte Schutzgruppe für die

2'-OH-Gruppe ist die Triisopropylsilyloxymethyl-Schutzgruppe. Hierbei handelt es sich um ein Fluorid-labiles Formacetal.

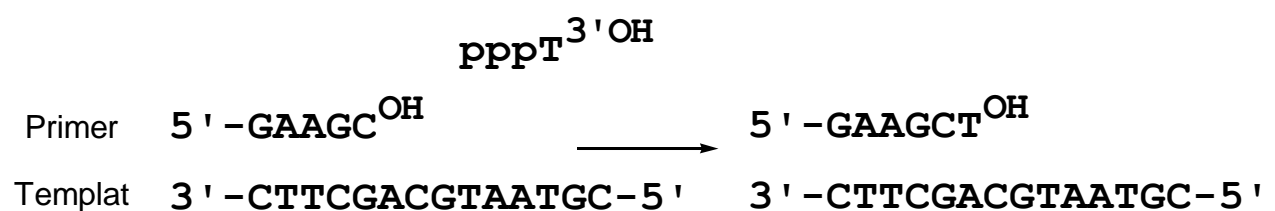


2.4 Methoden enzymatischer Synthese von DNA und RNA

DNA-Synthese

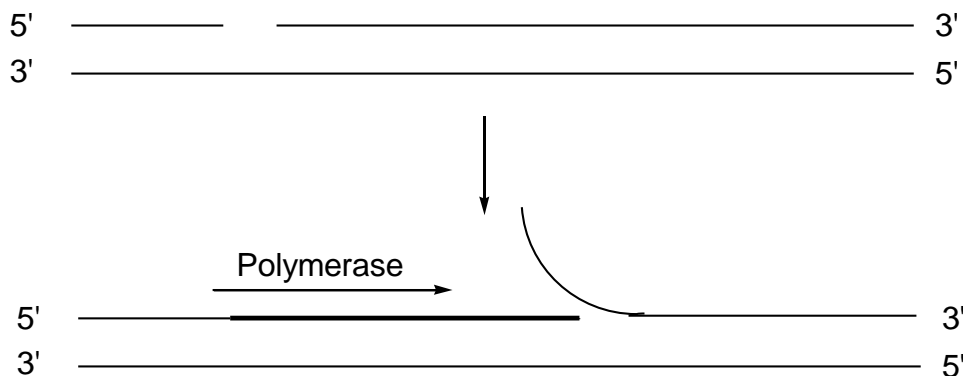
Es gibt heute eine große Anzahl spezifischer Nukleinsäure-modifizierender Enzyme. Das Methodenarsenal ist soweit fortgeschritten, dass wir eher an ethische als an technische Grenzen stoßen.

A) DNA abhängige DNA-Polymerasen



Diese Polymerasen verknüpfen eine neue Base als dessen 5'-Triphosphat mit dem 3'-Ende eines *primer* Stranges. Viele Polymerasen haben neben dieser katalytischen Aktivität von eine 3'→5' Exonuklease Aktivität. Sie hydrolysieren fehlerhaft eingebaute Basen von 3' in 5' Richtung also entgegen der Polymerisierungsrichtung. Gleichzeitig verfügen einige über eine 5'→3' Exonuklease Aktivität. Diese Enzyme können einen vor Ihnen liegenden Strang während der Polymerisierung

hydrolysieren. Sie binden an eine geöffnete Stelle im Doppelstrang und polymerisieren in einem Verdrängungsmodus (*strand displacement*).



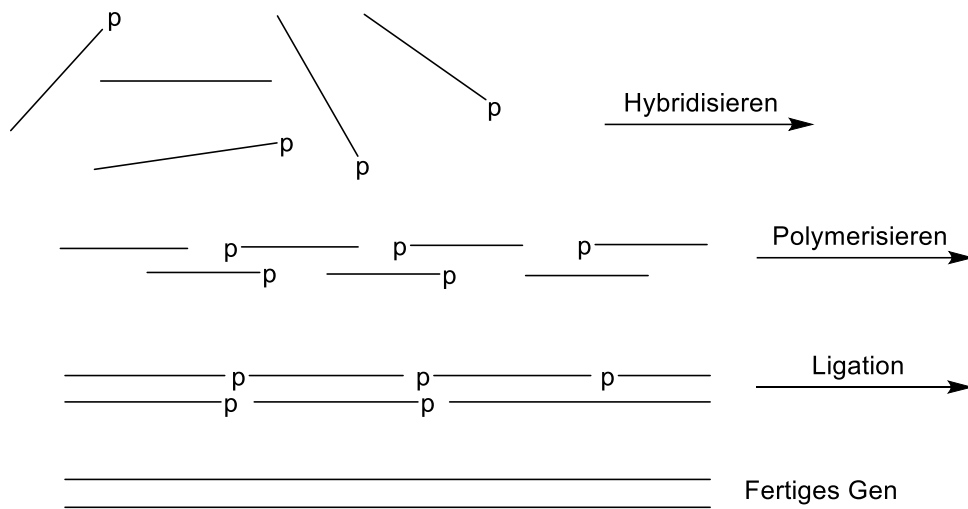
Im Labor werden u.a. eingesetzt:

- *E. coli* Pol I
- Ein Derivat der *E. coli* Pol I ohne die 5'→3' Exonuklease Aktivität (Klenow Fragment)
- T4-Polymerase
- T7-Polymerase
- Thermostabile Polymerasen für die polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion) PCR

Angewendet werden diese Polymerasen zum Beispiel bei Gen-Synthesen. Gene können zunehmend direkt synthetisiert werden. Im Gegensatz zum molekularbiologischen Herausheben des Gens aus Organismen hat man durch die Synthese die komplette Kontrolle über den Aufbau des Gens und zum Beispiel die Art der verwendeten Kondons (*codon usage*).

In der Gensynthese werden mit Hilfe einer DNA-Synthesemaschine zunächst eine Reihe überlappender Sequenzen synthetisiert. Diese Genstücke werden zusammengegeben und kurz auf 80 - 90 °C erhitzt. Es kommt zur Ausbildung partieller Doppelstränge (Hybridisierung). Man erhält so das „Skelett“ eines Gens. Die verbleibenden Einzelstrangbereiche werden durch die T4-Polymerase (keine 5'→3' Exonuklease Aktivität) aufgefüllt. Man erhält den DNA-Doppelstrang des Gens, allerdings noch mit Einschnitten im Rückgrad (*nicks*). Mit einem zweiten Enzym der T4-Ligase (s.u.) werden die Stränge miteinander verbunden. Dieses Enzym

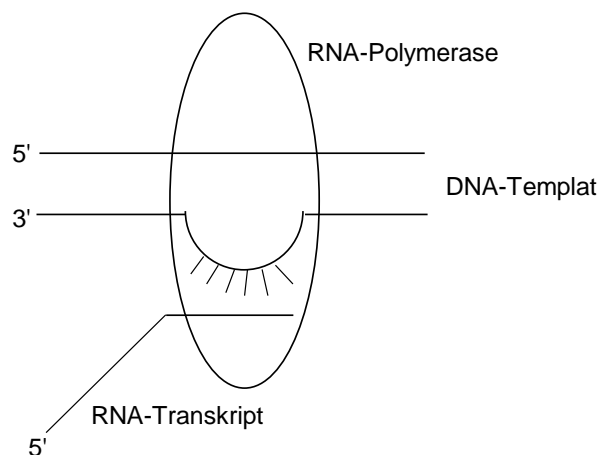
katalysiert die Phosphordiester-Verbrückung zwischen dem 3'-Ende und dem 5'-Ende der voreinander stoßenden Stränge.



RNA-Synthese

Zwei Enzyme werden maßgeblich zur RNA-Synthese eingesetzt: T7 RNA-Polymerase, SP6 RNA-Polymerase. Diese Enzyme verwenden DNA-Template und RNA-5'-Triphosphate um RNA-Stränge auch großer Länge zu produzieren. Es werden keine Stop Codons benötigt. Die RNA-Polymerasen laufen über den Templatestrang hinweg und assoziieren anschließend mit einem neuen Templatestrang (*run-off transcription*). Gebraucht wird lediglich ein Transkriptionsstart.

Die Technik liefert *m*-RNA vom DNA-Templat und erlaubt die Synthese sowohl von *t*-RNA als auch katalytischer RNA.

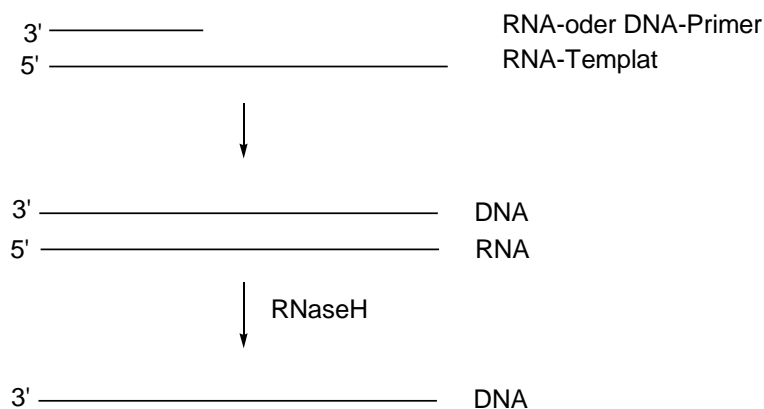


Reverse Transkriptasen

Diese Enzyme verwendet ein RNA-Template um DNA dazu komplementär zu synthetisieren. Die Enzyme stammen aus Retroviren, die ihre genetische

Erbinformation in Form von RNA kodieren und bei Infektion einer zelle, diese Information in DNA zur Integration des eigenen Genoms in das Wirtsgenom in DNA umschreiben müssen. Die reversen Transkriptasen sind heute wichtige Targets in der Pharmaindustrie. Hemmung der Enzyme könnte die Vermehrung von Retroviren, wie dem AIDS-Virus, eindämmen.

Verwendet werden z.B. die Enzyme aus dem *avian myeloblastosis virus* (AMV), *moloney leukemia virus* und aus *thermus thermophilus* (Tth). Alle diese Enzyme besitzen eine zusätzliche Ribonuclease-H (RNaseH) Aktivität, d. h. sie hydrolysieren den RNA-Strang in einem DNA-RNA Hybrid Duplex während der *reversen* Transkription. Als Primer-Strang kann entweder DNA oder RNA fungieren.



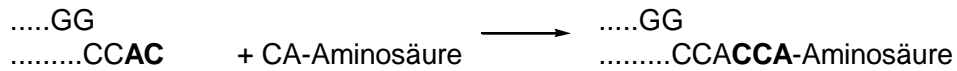
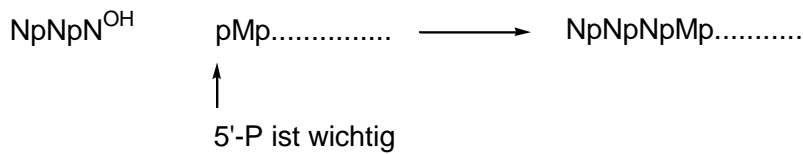
Die reversen Transkriptasen sind heute sehr wichtig.

In höheren Organismen besteht ein Gen nicht nur aus, für das Protein kodierenden, Bereichen (Exons) sondern enthält auch "mittendrin" sogenannte Introns, die nicht kodieren und die aus der *mRNA* in einem Spleißprozess vor der Translation am Ribosom herausgeschnitten werden (Reifung der *mRNA*). Bei der Klonierung eines Gens von höheren Organismen startet man daher gerne bei der zugehörigen gereiften *mRNA*. Diese enthält ausschließlich die für die Proteinsynthese notwendige Information. Die gereifte *mRNA* wird dann mit Hilfe der *reversen* Transkriptasen in DNA umgeschrieben, welche anschließend für das Klonieren verwendet wird. Diese durch reverse Transkription entstandenen DNA nennt man komplementäre (zur RNA) DNA oder kurz cDNA.

RNA-Ligasen

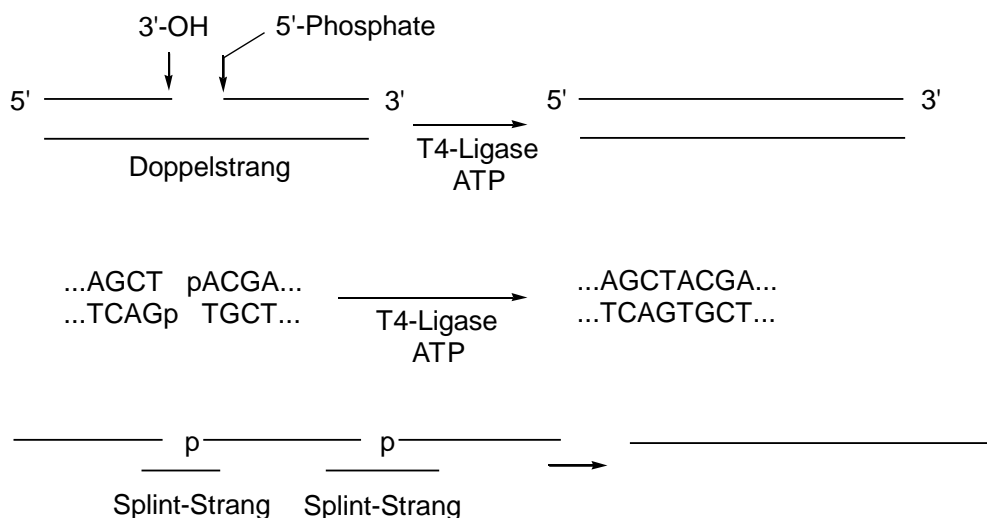
Diese Enzyme verknüpfen RNA-Stücke und verwenden dafür ATP als Energiequelle. Die Enzyme weisen eine geringe Substratspezifität auf. So können auch unnatürliche

Bausteine in RNA eingebaut werden. Mit diesem Enzym gelingt zum Beispiel die fehlerhafte Acylierung von tRNA.

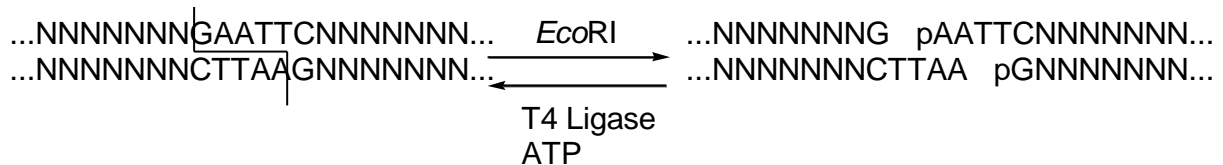


T4 DNA-Ligase

Dieses Enzyme ligiert (s.v.) doppelsträngige DNA die einen *nick* enthält. Als Energiequelle wird ATP verwendet. Wichtig ist erneut das vorliegen der 3'-OH Funktion und eines 5'-Phosphates. Das Enzym akzeptiert auch RNA-Substrate, und Doppelstränge mit Fehlpaarungen. Wichtig ist alleine das Vorliegen eines Doppelstranges. So gelingt es auch Doppelstrangenden zu verknüpfen (*blunt-ends*). Eine Anwendung der *blunt-end* Ligation ist die Synthese langer Einzelstränge. Hierbei werden DNA-Stränge mit Brücken (Splint-Strängen) lose verknüpft. Anschließend ligiert die T4-Ligase die Bruchstücke zu einem langen Einzelstrang. Durch Erhitzen löst sich der Doppelstrang auf (Denaturieren), dann können die Splint-Stränge durch Gelelektrophorese oder HPLC abgetrennt werden. Auch sehr lange RNA-Einzelstränge können so hergestellt werden. Vorteilhaft wirkt sich vor allem die Verwendung eines Splint-Stranges aus, der unerwünschte Ligationen unterbindet.



Die T4 DNA-Ligase ist vor allem für das Verknüpfen sogenannter *sticky-ends* vonnöten. Die ergeben sich wenn DNA-Doppelstränge von Restriktionsenzymen geschnitten werden. Aus der Kombination von Restriktionsenzyme und T4 DNA-Ligase ergibt sich die Möglichkeit von *Cut and Paste* mit Genen und DNA-Stücken.



Restriktions/Modifikationsenzyme

Restriktionsenzyme sind immens wichtig in der Molekularbiologie. Sie schneiden DNA an ganz definierten Stellen, so dass *sticky-ends* entstehen. In Bakterien dienen sie der Abwehr von Viren. Um sich selber zu schützen haben die Bakterien noch spezifische methylierende Enzyme, die die Schnittstellen der Restriktionsenzyme methylieren. Nach der Methylierung können die Restriktionsenzyme nicht mehr schneiden. So wird das eigene Genom geschützt. Heute ist eine Vielzahl unterschiedlicher Restriktionsenzyme bekannt und im Handel erhältlich.

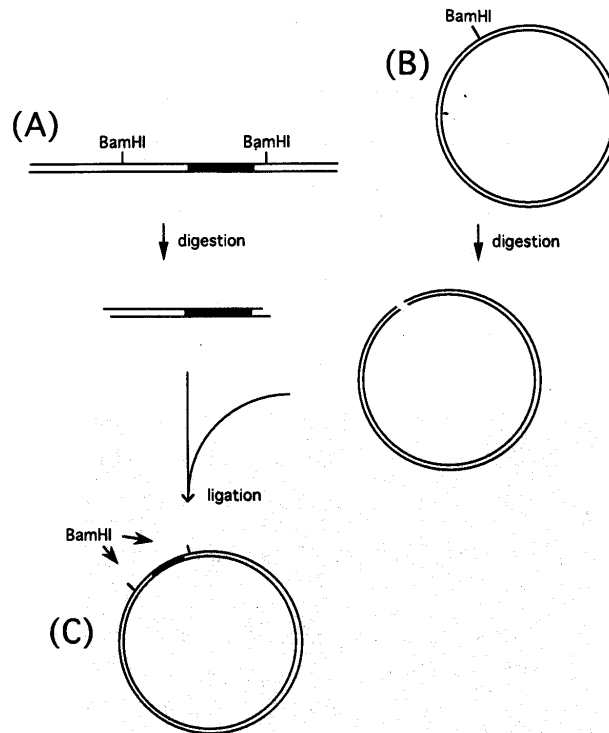


Mit Hilfe von Restriktionenzymen lassen sich ganze Genome in kleinere wohldefinierte Bruchstücke schneiden. Durch die *sticky-ends* können die Bruchstücke anschließend in Vektoren (Plasmide) hineingesetzt (hineingeklont) werden. Natürlich kann der Einbau in zwei Richtungen erfolgen. Die sticky-ends des Plasmids werden vor dem Hineinsetzen durch Reaktion mit einer Phosphatase dephosphoryliert, so dass keine Selbstligation erfolgen kann. Plasmide mit definierten Schnittstellen für die verschiedensten Restriktionsenzyme zum Klonieren sind heute im Handel in großer Vielzahl vorhanden.

Table 3-1 Restriction Enzyme Names, Sites, and Sources

Enzyme ^a	Recognition Sequence ^b	Source Organism ^c
<i>Bam</i> HI ^d	..G G A T C C.. ..C C T A G G..	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Bsr</i> I ^d	..A C T G G N N.. ..T G A C C N N..	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>Bsa</i> B ^d	..G A T N N N N A T C.. ..C T A N N N N T A G..	<i>Bacillus stearothermophilus</i> B
<i>Dde</i> I ^d	..C T N A G.. ..G A N T C..	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>Hpa</i> II ^d	..G T T A A C.. ..C A A T T G..	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Not</i> I ^d	..G C G G C C G C.. ..C G C C G C G..	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>
<i>Sph</i> I ^d	..G C A T G C.. ..C G T A C G..	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
<i>Xho</i> I ^d	..C T C G A G.. ..G A G C T C..	<i>Xanthomonas holcicola</i>

Zusammenstellung einer Reihe wichtiger Restriktionsenzyme



Grundlage des Klonierungsprozesses

Weitere wichtige Enzyme

T4-Polynukleotid Kinase: Sie hängt an das 5'-Ende von Oligonukleotiden ein Phosphat aus ATP an. Verwendet man radioaktives ATP mit ³²P, so kann man Oligonukleotide radioaktiv markieren, was für die Detektion z.B. auf Gelen sehr wichtig ist.

Phosphatasen: Sie entfernen Phosphate von DNA-Strängen, sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende. Hier wird die *bacterial alkaline phosphatase* oder die *calf intestinal alkaline phosphatase* verwendet.

Nukleasen: Sie hydrolysieren Oligonukleotide. Hier sind sehr viele Nukleasen käuflich erhältlich mit allen erdenklichen Spezifitäten. Man unterscheidet die Exonukleasen von den Endonukleasen. Exonukleasen bauen einen Strang vom Ende her ab. Endonukleasen greifen in der Mitte des Stranges an.