Replikationsexperimente an offenen Systemen: Oligomerisierung von 5'-Amino-3'-phosphat-Oligodeoxynucleotidderivaten mit alternierenden Pyrimidin-Purin-Sequenzen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Oliver Thoennessen

aus Düsseldorf

Bochum 2003

Erster Referent: Prof. Dr. G. von Kiedrowski

Zweiter Referent: Prof. Dr. M. Feigel

Dritter Prüfer: Prof. Dr. M. Hollmann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 1996 bis Mai 2003 an der Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum unter der Leitung von Prof. Dr. Günter von Kiedrowski angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Günter von Kiedrowski für die interessante Themenstellung und für die Freiheiten bei der Durchführung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Allgemeiner Teil

1. EINLEITUNG 1

1.1 Der Ursprung des Lebens 1

1.2 RNA-Welt 3

1.3 Nichtenzymatische, templatgesteuerte Reaktionen 5

1.4 Selbstreplizierende, chemische Minimalsysteme 6

1.5 Stufenweise arbeitende Replikatoren 14

1.6 Replikatoren aus organischen Bausteinen 18

1.7 Peptid-Replikatoren 20

1.8 Selbstreplizierende Ribozyme 22

1.9 Offene Systeme 23

2. AUFGABENSTELLUNG 26

3. AUSWAHL DER GEEIGNETEN BAUSTEINE 27

4. SYNTHESE DER NUCLEOTIDDERIVATE 31

4.1 Grundlagen der Oligonucleotidsynthese 31

4.1.1 Phosphodiesterverfahren 32

4.1.2 Phosphotriesterverfahren 32

4.1.3 Phosphit- und Phosphoamiditverfahren 33

4.1.4 H-Phosphonatverfahren 34

4.1.5 DNA-Schutzgruppen 34

4.1.6 Automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden 35

4.2 Synthese der 5'-Amino- und 3'-Phosphat-Oligomere nach dem Phosphoamiditverfahren 38

4.3 Synthese der 5'-3'-geschützten Dimere 41

4.4 5'-3'-Deblockierung der Dimere 46

5. DURCHFÜHRUNG UND AUSWERTUNG DER KINETIKEXPERIMENTE 49

5.1 Konzentrationsbestimmung durch UV-Spektroskopie 49

5.2 Durchführung der Replikationsexperimente 51

5.2.1 Vorbereitung der Reaktionsansätze 51

5.2.2 Reaktionsstart 51

5.2.3 Reaktionsabbruch 52

5.3 Chromatografische Analyse der Proben 52

5.3.1 HPLC-Systeme 52

5.3.2 Eichfaktorbestimmung 53

6. KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN – CYCLISIERUNG VS. OLIGOMERISIERUNG 55

6.1 Vorversuche 55

6.1.1 Reaktionsbedingungen der Vorversuche 55

6.1.2 Cyclisierung bei niedrigen Konzentrationen 55

6.1.3 Cyclisierung von $^{n}TG^{p}$ 57

6.1.4 Cyclisierung von $^{n}TA^{p}$ 60

6.1.5 Cyclisierung von $^{n}CG^{p}$ 62

6.1.6 Massenspektroskopie der Cyclisierungsprodukte 63

6.2 Einfluss mono- und divalenter Kationen 66

6.3 Tetramer-Templatzugabe 68

6.4 Variation der Reaktionsparameter 69

6.4.1 Variation der Temperatur 72

6.4.2 Variation der Konzentration 72

6.4.3 Acetatproblematik 73

7. OLIGOMERISATION BEI HOHER EDUKTKONZENTRATION 76

7.1 Detektion und Charakterisierung der Oligomerisierungsprodukte 76

7.2 Variation der Temperatur bei 50 mM Edukt 80

7.3 Die nicht-selbstkomplementären Dimere $^{n}TG^{p}$ und $^{n}CA^{p}$ 82

7.3.1 Oligomerisierung von $^{n}TG^{p}$ ... 82
7.3.2 Diskussion der Konzentrations-Zeit-Kurven ... 87
7.3.3 Oligomerisierung von $^{n}CA^{p}$ ... 98

7.4 Die selbstkomplementären Dimere $^{n}TA^{p}$ und $^{n}CG^{p}$ ... 101
7.4.1 Oligomerisierung von $^{n}TA^{p}$ ... 107
7.4.2 Oligomerisierung von $^{n}CG^{p}$ ... 111

7.5 Vergleich der Konzentrations-Zeit-Kurven der vier Dimer-Systeme ... 116
7.5.1 Vergleich der Oligomerbildung bei 2 °C ... 117
7.5.2 Vergleich der Oligomerbildung bei 15 °C ... 118
7.5.3 Vergleich der Oligomerbildung bei 30 °C ... 119

7.6 Diskussion der Reaktivitätsreihenfolge ... 120

7.7 Das Nearest-Neighbour-Modell ... 123

7.8 Selektion des CG-Systems für weitere Untersuchungen ... 133

8. DETAILUNTERSUCHUNG DES CG-SYSTEMS ... 134

8.1 Untersuchungen mit einseitig geschützten Bausteinen auf Basis des CG-Systems ... 136
8.1.1 Einzelreaktion: Bildung des Tetramers ... 137
8.1.2 Einzelreaktion: Bildung des Hexamers ... 139
8.1.3 Einzelreaktion: Bildung des Octamers ... 142

8.2 Diskussion der Einzelreaktionskinetiken ... 144
8.2.1 Thermodynamische Betrachtung der termolekularen Komplexe ... 145
8.2.2 Das Slidomer ... 148
8.2.3 Slidomertheorie nach dem RY-Modell ... 150
8.2.4 Struktur der hybridisierten Oligomere des CG-Systems ... 157
8.2.5 Thermodynamische Betrachtung der Slidomere ... 160
8.2.6 Diskussionszusammenfassung der Einzelreaktionskinetiken ... 170

8.3 Untersuchung des offenen CG-Systems ... 170
8.3.1 Die Struktur gemischter Slidomere ... 170
8.3.2 Die Ligation innerhalb von Slidomeren ... 175
8.3.3 Aktivierung, Reaktivierung und Katalyse in Slidomeren ... 177
8.3.4 Kinetische Experimente am offenen CG-System ... 180
8.3.5 Kinetik des Systems $^{n}CG^{p}$ + $^{HO}(CG)_{2}{}^{OH}$ ... 181
8.3.5.1 Effekte der Integration von unreaktivem Templat in die Slidomerstruktur ... 184
8.3.6 Kinetik des Systems $^{n}CG^{p}$ + $^{HO}(CG)_{3}{}^{OH}$ ... 186
8.3.7 Kinetik des Systems $^{n}CG^{p}$ + $^{HO}(CG)_{4}{}^{OH}$ ... 188

8.3.8 Kinetik des Systems $^{n}CG^{p}$ + $^{n}(CG)_2{}^{p}$ 190

8.4 Reaktionsmodell der spontanen Ligation 196

8.5 Das Reaktionsmodell des Slidomereffektes 201

8.6 Das Oligomerisierungspotenzial des CG-Systems 214

9. ZUSAMMENFASSUNG, DISKUSSION UND AUSBLICK 219

Experimenteller Teil

1. MATERIAL UND METHODEN 236

1.1 Spektroskopische Methoden 236

1.1.1 Magnetische Kernresonanzspektroskopie 236

1.1.2 UV/VIS-Spektroskopie 236

1.1.3 Massenspektrometrie 237

1.1.3.1 MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization - Time Of Flight) 237

1.1.3.2 Electrospray-Ionisation (ESI) 237

1.2 Chromatografische Methoden 238

1.1.1 Dünnschichtchromatografie 238

1.2.2 Adsorptionschromatografie 238

1.2.3 Reversed-Phase HPLC 238

1.2.4 Ionenaustauscherchromatografie 239

1.2.4.1 Präparative Ionenaustauscherchromatografie I 239

1.2.4.2 Präparative Ionenaustauscherchromatografie II 240

1.2.4.3 Analytische Ionenaustauscherchromatografie 240

1.2.5 Gel-Permeationschromatografie 240

1.3 Geräte und Chemikalien 241

2. SYNTHESEN 242

2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) der Synthesen 242

2.1.1 Oxidative Entfernung der 3'-terminalen Phenylthioethyl-(PTE)-Gruppe (AAV 1) 242

2.1.2 Staudinger-Reduktion der 5'-terminalen Azidogruppe zur Aminofunktion (AAV 2) 242

2.2 Reduktionen der 5'-3'-geschützten $^{N3}XY^{PTE}$ Dimere 243

2.2.1 Darstellung von d-NH_2-Cp-d-Ap-PTE ($^{NH2}CA^{PTE}$) (53a) 243

2.2.2 Darstellung von d-NH_2-Cp-d-Gp-PTE ($^{NH2}CG^{PTE}$) (53b) 243
2.2.3 Darstellung von d-NH_2-Tp-d-Ap-PTE ($^{NH2}TA^{PTE}$) (53c) 244
2.2.4 Darstellung von d-NH_2-Tp-d-Gp-PTE ($^{NH2}TG^{PTE}$) (53d) 244

2.3 Oxidationen der 5'-3'-geschützten $^{N3}XY^{PTE}$ Dimere 245
2.3.1 Darstellung von d-Az-Cp-d-Ap ($^{N3}CA^{PO4 2-}$) (55a) 245
2.3.2 Darstellung von d-Az-Cp-d-Gp ($^{N3}CG^{PO4 2-}$) (55b) 245
2.3.3 Darstellung von d-Az-Tp-d-Ap ($^{N3}TA^{PO4 2-}$) (55c) 246
2.3.4 Darstellung von d-Az-Tp-d-Gp ($^{N3}TG^{PO4 2-}$) (55d) 246

2.4 Reduktionen der 5'-geschützten $^{N3}XY^{PO4 2-}$ Dimere 247
2.4.1 Darstellung von d-NH_2-Cp-d-Ap ($^{NH2}CA^{PO4 2-}$) (56a) 247
2.4.2 Darstellung von d-NH_2-Cp-d-Gp ($^{NH2}CG^{PO4 2-}$) (56b) 247
2.4.3 Darstellung von d-NH_2-Tp-d-Ap ($^{NH2}TA^{PO4 2-}$) (56c) 248
2.4.4 Darstellung von d-NH_2-Tp-d-Gp ($^{NH2}TG^{PO4 2-}$) (56d) 248

2.5 Automatisierte Synthese der Oligonucleotide 249

2.6 Aufreinigung und Charakterisierung der Oligonucleotide 249

3. DATEN DER REPLIKATIONSEXPERIMENTE 251

3.1 SimFit Command-Files 251

3.2 Messdaten der Kinetikexperimente 257
3.2.1 Kinetikmessdaten der einseitig geschlossenen Bausteine 257
3.2.2 Kinetikmessdaten des offenen $^{n}CG^{p}$-Systems 259
3.2.3 Messdaten der Oligomerisierung der vier Dimere bei 50 mM 261
3.2.4 Messdaten des Systems $^{n}TG^{p}$ + M^{+} bzw. M^{2+} 265
3.2.5 Cyclisierungskinetiken der Dimere bei 1 und 2 mM 266

Anhang

1. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME 268

2. ABSTRACT 270

3. LITERATURVERZEICHNIS 271

Allgemeiner Teil

1. Einleitung

1.1 Der Ursprung des Lebens

Die Suche nach dem Ursprung des Lebens beschäftigt den Menschen schon seit jeher und ist seit den Arbeiten von *Lamarck* und *Darwin*, die im 19. Jahrhundert alle existierenden Lebensformen auf einen gemeinsamen Vorfahren, die 'Urzelle' zurückführten, Gegenstand intensiver naturwissenschaftlicher Forschung[1]. Der biologische Ansatz, die Evolution von der heutigen Artenvielfalt bis zur Entstehung des Lebens aus unbelebter Materie (Biogenese) zurück zu verfolgen, endet jedoch bei primitiven Einzellern, deren Mikrofossilien ein Alter von ca. 3.6 Milliarden Jahren aufweisen[2]. Es bleibt demnach Aufgabe der präbiotischen Chemie, den weissen Fleck auf der Landkarte der Evolution bis zur Entstehung der 'Urzelle' zu erkunden, der einen Zeitrahmen von ca. 1 Milliarde Jahre umfasst, die zwischen der Entstehung der Erde vor ca. 4.6 Milliarden Jahren und dem ersten Auftreten von Einzellern vergingen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein derart hochkomplexes System wie eine Zelle zufällig entstand, ist nahezu gleich Null, so dass von zuvor existierenden einfachen evolvierenden und damit lebenden chemischen Systemen auszugehen ist. Diese müssen nach *Oparin*[3] folgende drei elementaren, nach *Eigen*[4] evolutionsbedingenden Eigenschaften besitzen, um als Leben definiert werden zu können:

- *Selbstreplikation* - die Induktion der eigenen Synthese aus einfacheren Bausteinen zur Vermehrung des Systems durch wiederholte Generierung von Kopien.
- *Metabolismus* - die Aufnahme und der Verbrauch von Energie aus der Umgebung zur Aufrechterhaltung der Selbstreplikation.
- *Mutabilität* - das Auftreten von Mutanten mit veränderten Eigenschaften durch sporadische Fehler im Kopierprozess der Selbstreplikation.

Für die Bildung präbiotischer organischer Grundbausteine auf abiogenetischen Wege, aus denen erstes Leben hätte entstehen können, liegen derzeit eine Reihe konkurrierender Theorien vor. *Oparin*[3] und *Haldane*[5] gingen in den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts von einer reduzierenden Uratmosphäre aus Ammoniak, Methan, Kohlendioxid, Kohlenmonoxid, Wasserstoff und Wasser aus, in der die chemische Evolution stattgefunden

habe. *Miller* nahm den Gedanken auf und verband ihn mit der Theorie starker elektrischer Entladungen in der Uratmosphäre infolge von Gewittern, deren Bedingungen er 1953 in aufsehenerregenden Experimenten im Labor durch Funkenentladungen in einem der angenommenen Atmosphäre entsprechenden Gasgemisch simulierte[6]. Nach einigen Tagen konnten in der Reaktionsmischung neben einfachen organischen Moleküle wie Formaldehyd und Blausäure auch die biologisch relevanten Aminosäuren Alanin, Glycin, Asparaginsäure und Glutaminsäure identifiziert werden. In den anschließenden Jahren wurden weitere Modelle präbiotischer Synthesewege für die Selbstkonstituierung einiger anderer organischer Moleküle aufgestellt. Dazu zählt die Bildung von Ribose als Bestandteil der RNA[7] aus Formaldehyd in Gegenwart von Kaolinit und Aluminiumoxid in der Formose-Reaktion[8], sowie die Generierung der Nucleobase Adenin aus Blausäure unter geeigneten Bedingungen[9]. Die Herstellung von Nucleosiden aus den beiden Komponenten gelang *Orgel* durch Eindampfen von Nucleobasen und Ribosederivaten in Gegenwart von Magnesiumchlorid[10]. Erneutes Eindampfen in Gegenwart von anorganischen Phosphaten und Harnstoff führte neben 2'- und 3'-Phosphaten auch zu 5'-Phosphaten und damit zu Nucleotiden, die die Grundbausteine für RNA und DNA bilden[11].

Diese in sich schlüssige Theorie der reduzierenden Uratmosphäre wurde durch spätere Untersuchungen angegriffen[12], die eine nicht-reduzierende Uratmosphäre aus den Hauptbestandteilen Kohlendioxid, Stickstoff und Wasser postulierten, so dass die Frage nach der Selbstkonstituierung der Grundbausteine des Lebens nach wie vor offen bleibt. Auch andere Thesen wie die primordiale Autolithotrophie von H_20, N_2 und CO_2 in HCN, NH_3, Aldehyden und Carbonsäuren[13] oder die Reduktion von CO_2 am Eisensulfid heißer Quellen am Grund der Ozeane[14] oder auch die Theorie der Zufuhr reduzierter Kohlenstoffformen durch Meteoriten[15] führten bislang nicht zu einem allgemein anerkannten Modell für die Entstehung der ersten primitiven Lebensformen.

Unabhängig von der Ungewissheit über die Herkunft präbiotischer organischer Bausteine sollten die ersten lebensfähigen Systeme primitive Vorläufer des hochkomplexen Replikationsapparates gewesen sein, der allen heutigen Lebensformen zugrunde liegt und der die Aufgabenteilung der Informationsspeicherung in Nucleinsäuren und der Funktions-übernahme durch Proteine beinhaltet. Die ersten einfachen Systeme auf dem Wege von der unbelebten zur belebten Materie dürften über keinen Translationsapparat verfügt[16] und aus Polymeren bestanden haben, die in der Lage waren, sowohl Informationen zu speichern, als

auch sich selbst unter Informationstransfer zu kopieren. Da gezeigt werden konnte, dass RNA in der Lage ist, enzymartige Funktionen zu übernehmen und damit Information und Funktion als Ribozym (in Analogie zu den klassischen proteinbasierten Enzymen) vereinigen kann[17], gewann die Vorstellung einer RNA-Welt Aufschwung, die der heutigen auf DNA, RNA und Proteinen basierenden Welt vorausgegangen sein könnte[18].

1.2 RNA-Welt

Die Befürworter einer RNA-Welt gehen von der Existenz homomolekularen Lebens auf RNA-Basis aus, das in der Lage war sich enzymfrei selbst zu replizieren, zu mutieren und damit auch zu evolvieren[18,19]. *Spiegelman* konnte 1967 zeigen, dass RNA *Darwin*'scher Selektion unterworfen werden kann, indem er das 'Serial Transfer'-Verfahren auf das RNA-Genom des Bakteriophagen Qβ anwendete, das zuvor neben dem Replikationsenzym Qβ-Replikase aus befallenen E.Coli Bakterien isoliert worden war[20]. An dieser Qβ-RNA-Matrize wurden in einer Lösung mit aktivierten Ribonucleotidtriphosphaten mit Hilfe der Qβ-Replikase neue RNA-Stränge repliziert. Durch Entnahme einer Probe und Überführung derselben in eine neue Nährlösung ohne das ursprüngliche Phagengenom wurde ein neuer Replikationszyklus gestartet, der nach mehreren Runden zu RNA-Strängen führte, die deutlich kürzer als die Ausgangs-RNA waren. Da der 'Serial Transfer' einen zeitlichen Selektionsdruck erzeugte, wurden insbesondere mutierte, kürzere RNA-Stränge innerhalb der gegebenen Zeit repliziert, die durch ihre schnellere Replikation die Qβ-RNA verdrängten. *Spiegelmann* stellte damit ein erstes translationsfreies Replikationssystem vor, dessen Produkte mit neuartigen Eigenschaften aus einem evolutionären Selektionsprozess im Sinne *Darwins* hervorgegangen waren. Da mit dem Enzym Qβ-Replikase ein Translationsprodukt für die Vervielfältigung der RNA verwendet wurde, klärte das Experiment zwar Teilaspekte der Evolutionsmechanismen, doch für ein schlüssiges homomolekulares Modell der RNA-Welt musste RNA auch die Funktion des Replikationsenzyms übernehmen.

Cech entdeckte 1981 die enzymartigen Eigenschaften von RNA, als er die enzymfreie Umesterung am Phosphodiesterrückgrat der RNA des Protozoons *Tetrahymena thermophila* beobachtete und diese auf die katalytische Aktivität der RNA (Ribozym) selbst zurückführte[21] (Abb. 1.1). Das Intron der Gruppe I katalysierte während der reversiblen Spleißreaktion seine eigene Eliminierung, wobei zunächst 5'-GMP als Cofaktor durch

Umesterung mit der 5'-Spleißstelle reagierte. Die dabei entstehende freie 3'-OH Gruppe des Exons griff anschließend an der 3'-Spleißstelle an, so dass die Umesterungsreaktionen letztendlich zu einer Freisetzung des Introns unter Verknüpfung der beiden Exons führten.

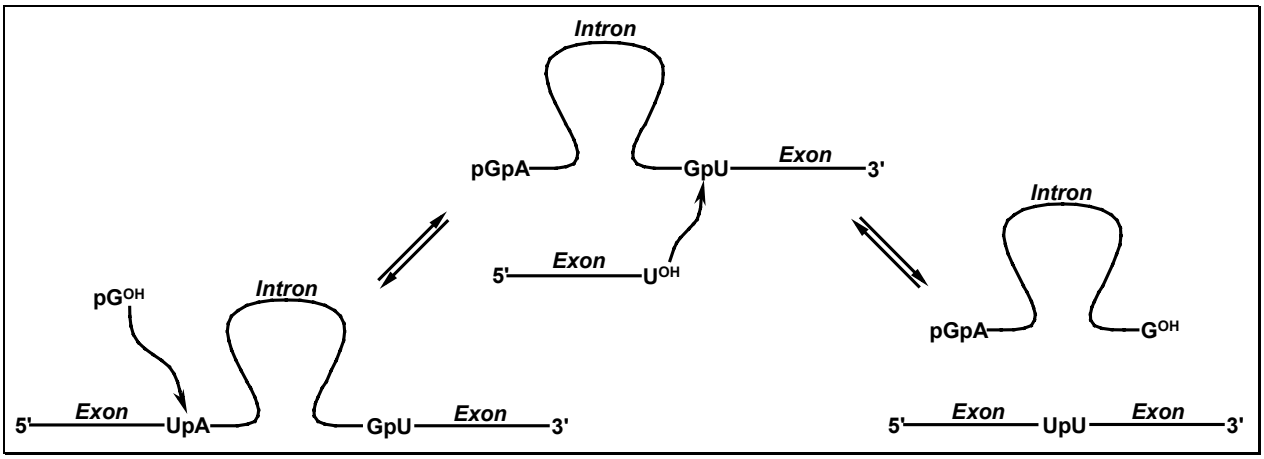


Abb. 1.1: Spleißreaktionen bei *Tetrahymena thermophila*

Mittlerweile sind neben weiteren Ribozymen, die in der Lage sind Reaktionen wie Phosphoryl- oder Acyltransfer, Nucleosidtriphosphat-Polymerisationen oder auch Peptidbindungsbildungen mit hoher Effektivität zu katalysieren[22], auch zahlreiche Deoxyribozyme, unter anderem mit DNA-Ligaseaktivität, entwickelt worden, so dass darüber hinaus die Idee einer DNA-Welt diskutiert wurde[23]. Erst 2002 wurde von Joyce ein 61meres Ligase-Ribozym beschrieben, das die Fähigkeit zur Selbstreplikation besaß[24] (siehe Kap. 1.8).

Zusätzliche Unterstützung erhält die Theorie einer RNA-Welt durch die Existenz von Ribonucleotiden in Coenzymen, die evolutiv aus Ribozymen hervorgegangen sein könnten[25]. Doch selbst kurze Ribozyme mit Replikasewirkung im Bereich von 60 Nucleotiden sind für eine spontane Bildung bereits viel zu komplex, so dass sich die Frage nach vorangegangenen, einfacheren Replikationssystemen stellt, die sich ohne Ribozyme vervielfältigen konnten[26]. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Ausbildung komplementärer Watson-Crick-Basenpaare bieten sich Nucleotidstränge als Template bzw. Matrizen zum Studium nichtenzymatischer, templatgesteuerter Kondensationsreaktionen an.

1.3 Nichtenzymatische, templatgesteuerte Reaktionen

Templatgesteuerte Kondensationreaktionen beruhen auf der Fähigkeit des oligomeren oder polymeren Templats mit chemisch aktivierten Bausteinen in einem Komplex zu assozieren, in dem die an der Kondensation beteiligten Gruppen in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden und damit gegenüber einer spontanen Kondensation beschleunigt reagieren. Die Anwesenheit des Templats begünstigt demnach die Kondensationsreaktion, die in Abwesenheit nur deutlich langsamer oder in nicht mehr nachweisbarem Umfang stattfindet. Nucleotidtemplate können auf diese Weise über *Watson-Crick*-Basenpaarung sequenzspezifische Informationen an die Tochterstränge weitergeben.

Nach experimentellen Vorarbeiten von *Schramm*[27] im Jahre 1962 wurde ein erstes Beispiel dieses Reaktionstyps 1966 von *Naylor* und *Gilham* veröffentlicht, die zwei Moleküle Hexathymidylsäure-5'-phosphat nach Aktivierung der 5'-terminalen Phosphatgruppe mit dem wasserlöslichen Carbodiimid EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) an dem Templat Polyadenylsäure zur Ligation brachten, wobei Dodecathymidylsäure-5'-phosphat entstand[28].

Seit 1968 beschäftigte sich *Orgel* mit matrizengesteuerten Polykondensationen von monomeren Ribonucleosid-5'-phosphoimidazolid-Bausteinen[29] (ImpB, Abb. 1.2). In seinen wegweisenden Arbeiten stellte er eine hohe Abhängigkeit der Kondensation von divalenten Kationen fest[30]. In Gegenwart von z.B. Zn^{2+} oder Pb^{2+} wurden native 3'-5'-Phoshodiesterbindungen gebildet, bei Abwesenheit jedoch unnatürliche 2'-5'-Phosphodiesterbindungen. Weiterhin gelang die Kondensation monomerer Purinbausteine an komplementären Pyrimidin-Templaten, während die umgekehrte Oligomerisierung von Pyrimidinmonomeren an Purin-Templaten aufgrund von Selbstkomplexierung der Purinstränge fehlschlug. Damit war auf diesem Wege kein Replikationszyklus und auch keine Selbstreplikation möglich[31].

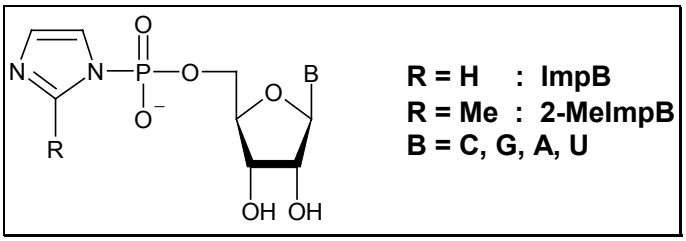


Abb. 1.2: Ribonucleosid-5'-phosphoimidazolide

Der obige Befund stand auch der Selbstreplikation des ersten informationsübertragenden Systems im Wege, das 1984 von *Orgel* vorgestellt wurde[32]. In Gegenwart der definierten Templatsequenz CCGCC wurde eine Mischung aus 2-MeImpC und 2-MeImpG (Abb. 1.2) mit einer Ausbeute von 18% zu dem komplementären Pentamer GGCGG cooligomerisiert, das bei Abwesenheit des Templats nicht nachweisbar war. Selbstreplikation wurde bei diesem ersten erfolgreichen Informationstransfer aufgrund des hohen Purinanteils im Templat nicht gefunden.

1.4 Selbstreplizierende, chemische Minimalsysteme

1986 entwickelte *von Kiedrowski* unter Berücksichtigung der *Orgel*'schen Erkenntnisse das erste zur Selbstreplikation befähigte chemische Minimalsystem, das aus den folgenden Oligodeoxynucleotidbausteinen bestand[33] (Abb. 1.3):

- Baustein **A** - d(^{Me}CCG^{p}), ein durch eine 5'-O-Methylgruppe geschütztes Trideoxynucleotid-3'-phosphat mit reaktiver 3'-Phosphatgruppe.
- Baustein **B** - d(^{HO}CGG$^{p\text{-}(o\text{-Cl-Ph})}$), ein komplementäres durch eine 3'-ortho-Chlorphenyl-gruppe geschütztes Trideoxynucleotid-3'-phosphat mit reaktiver 5'-Hydroxygruppe.
- Baustein **C** - d(^{Me}CCGCGG$^{p\text{-}(o\text{-Cl-Ph})}$), ein durch 5'-O-Methyl, 3'-ortho-Chlorphenyl-geschütztes selbstkomplementäres Hexadeoxynucleotid als inertes Templat.

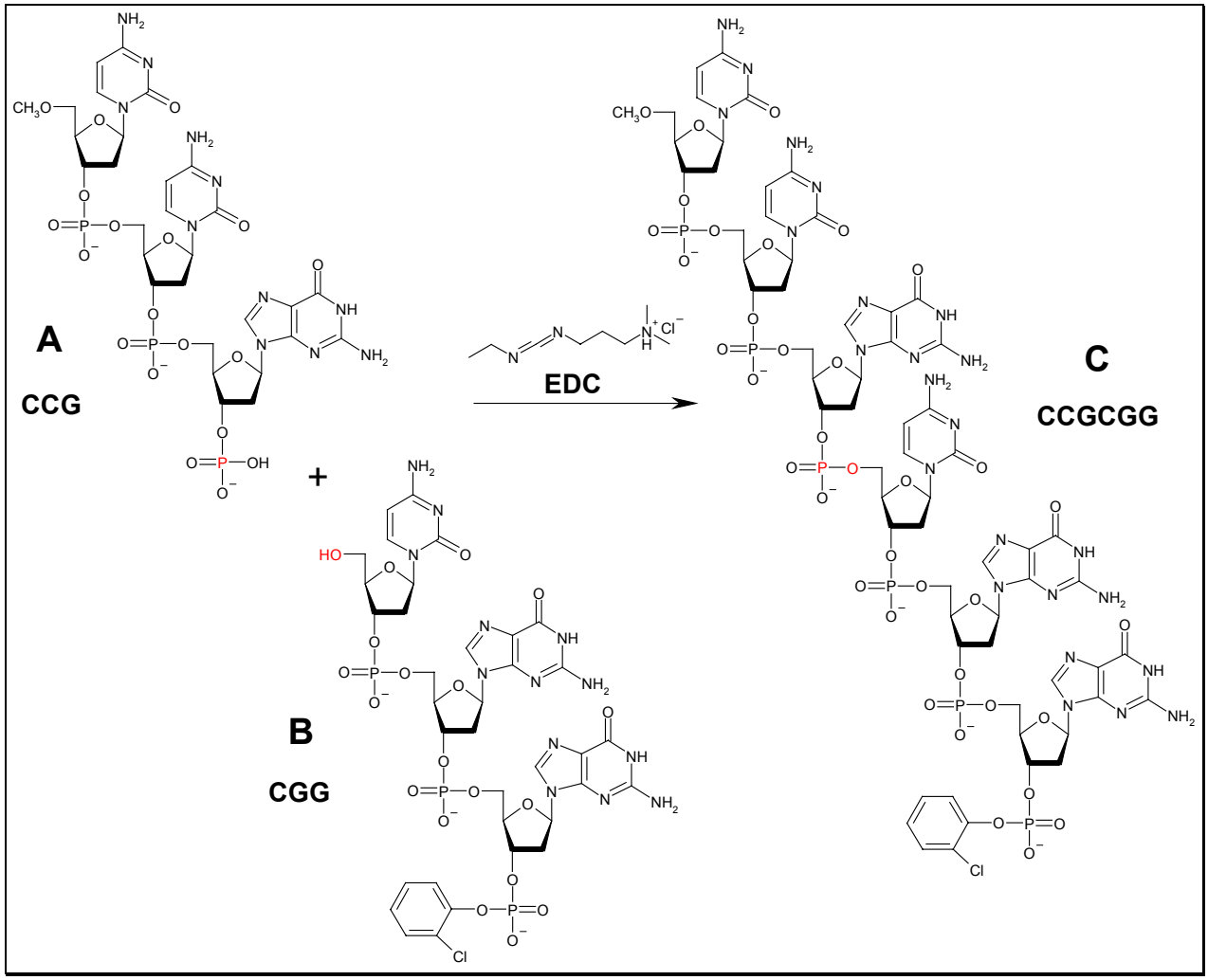


Abb. 1.3: Selbstreplizierendes Minimalsystem nach *von Kiedrowski*

Durch die Selbstkomplementarität des Templats, die zwangsläufig mit einer Gleichverteilung von Purin- und Pyrimidinbasen im Strang einhergeht, war die Funktion des Ligationsprodukts als Templat in weiteren Replikationszyklen gewährleistet. Der Einsatz von Schutzgruppen an den Strangenden, die nicht an der Reaktion teilnehmen sollten, reduzierte das Auftreten unerwünschter Nebenprodukte. Durch die Verwendung von DNA anstatt RNA wurde die Bildung von unnatürlichen 2'-5'-Phosphodiesterbindungen verhindert und eine leichtere Handhabung der stabileren DNA-Derivate erreicht.

Das Trimer **A** wurde mit dem wasserlöslichen Carbodiimid EDC am 3'-Phosphatterminus aktiviert und lagerte sich mit dem Trimer **B** über Watson-Crick-Basenpaarung an das hexamere Templat **C** an. Im termolekularen Komplex **ABC** erfolgt die Ligation der Trimere durch die räumliche Nähe der reaktiven Enden schneller, als durch die alleinige, ebenfalls stattfindende, templatunabhängige spontane Ligation möglich wäre. Das Reaktionsprodukt ist identisch mit dem Templat **C**, so dass die Reaktion autokatalytisch verlaufen kann (Abb. 1.4).

Infolge der höheren strukturellen Komplexität besitzt das Kondensationsprodukt **C** einen höheren Informationsgehalt als seine Edukte, die es über molekulare Erkennung zu binden vermag, wodurch die Voraussetzungen für Selbstreplikation gegeben sind (Selbstreplikation = Autokatalyse + Informationstransfer)[34].

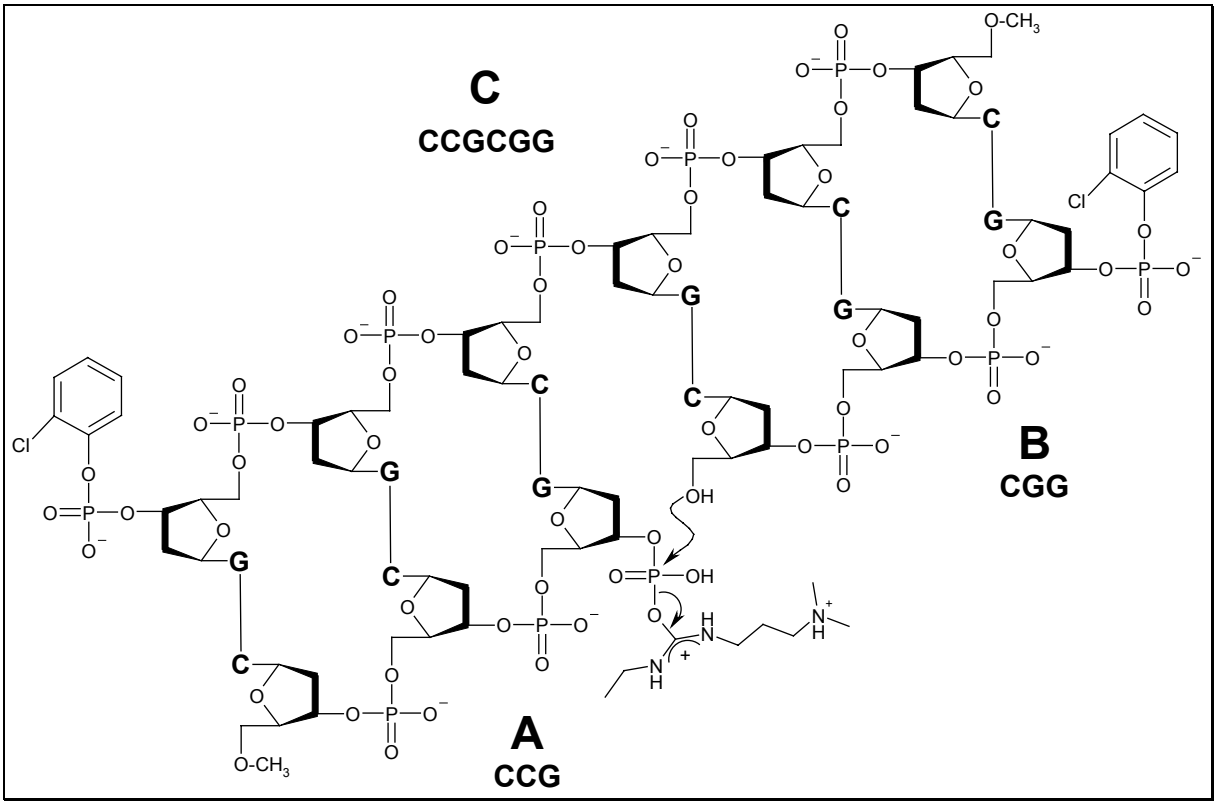


Abb. 1.4: Ligation der Bausteine A und B am Templat C im termolekularen Komplex ABC

Der autokatalytische Charakter dieses Systems konnte durch die kinetische Verfolgung der Ligationsreaktion bestätigt werden, die um so stärker stattfand, je mehr katalytisch wirkendes Templat **C** initial in der Reaktionsmischung vorhanden war. Die Steigerung der Reaktionsrate des autokatalytischen Reaktionskanals zeigte sich dabei nicht linear proportional zur Steigerung der Anfangskonzentration des Templats **C**, sondern proportional zur Quadratwurzel der Templatstartkonzentration.

Die gefundene Reaktionsordnung bezüglich der Templatkonzentration betrug damit p=0.5 und entsprach parabolischem Wachstum, im Gegensatz zu dem für biologische Systeme typischen exponentiellen Wachstum, bei dem die Templatkonzentration mit einer Reaktionsordnung von p=1 linear in die eigene Synthese eingeht. Der ebenfalls vorgefundene nicht-autokatalytische, spontane Reaktionskanal war naturgemäß unabhängig von der Templatkonzentration.

Aus diesen Befunden konnte das empirische Geschwindigkeitsgesetz der Anfangsbildungsgeschwindigkeit v_c des Templats **C** abgeleitet werden, das sowohl den spontanen, als auch auch den autokatalytischen Reaktionskanal berücksichtigt und als Quadratwurzelgesetz der Autokatalyse in die Literatur einging:

$$v_c = \frac{dc}{dt} = a \cdot \sqrt{c_0} + b$$

mit v_c: Anfangsbildungsgeschwindigkeit des Templats C

a: empirische Konstante des autokatalytischen Reaktionkanals

b: Anfangsgeschwindigkeit des spontanen, nicht-autokatalytischen Reaktionskanals (ohne Templat C)

c_0: Konzentration des Templats C zum Zeitpunkt t = 0

c: Gesamtkonzentration des Templats C zum Zeitpunkt t > 0

Der Reaktionsmechanismus des Autokatalysecyclus, der allgemein für selbstreplizierende Minimalsysteme gilt und eine Erklärung für das parabolische Wachstumsverhalten liefert, wird in Abb. 1.5 skizziert.

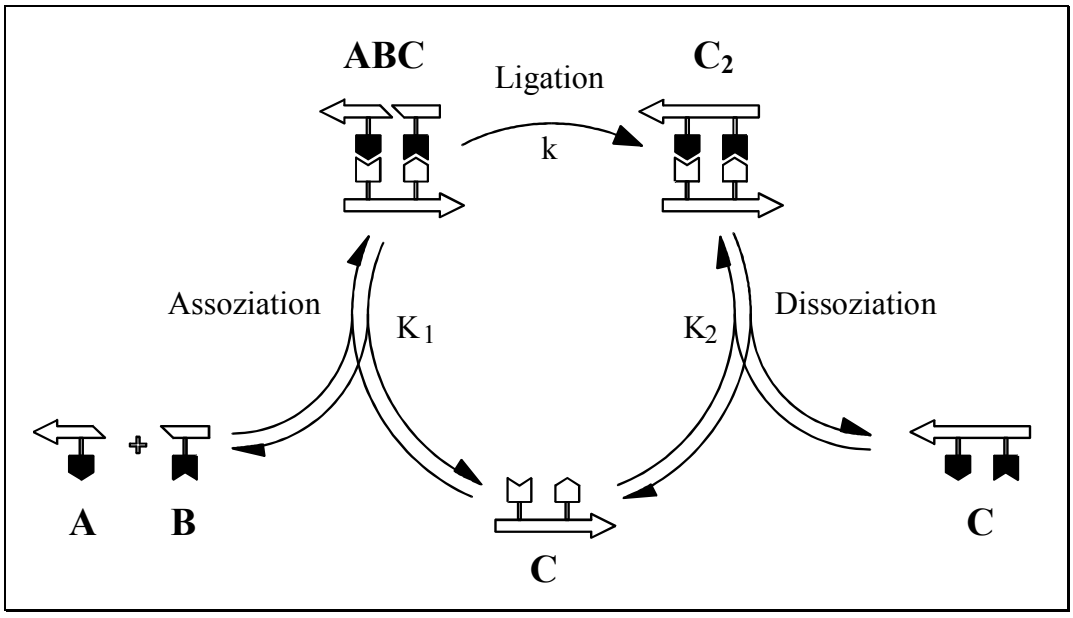


Abb. 1.5: Reaktionsmechanismus eines selbstreplizierenden Minimalsystems

Nach Assoziation der Bausteine **A** und **B** am Templat **C** zum termolekularen Komplex **ABC** im vorgelagerten schnellen Gleichgewicht K_1 stellt die irreversible Ligation des aktivierten **A** mit **B** zu **C** den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion dar. Der entstehende Duplex $\mathbf{C_2}$ dissoziiert reversibel in einer weiteren Gleichgewichtsreaktion, die das ursprüngliche sowie das neu gebildete Templat freisetzt, welche wiederum neue Autokatalysecyclen starten können.

Das Gleichgewicht K_2 liegt jedoch weitestgehend auf der Seite des Duplexes $\mathbf{C_2}$. Zudem ist der Templatduplex $\mathbf{C_2}$ aus entropischen Gründen stabiler als der termolekulare Komplex **ABC** (mit $(2K_2c)^{½} >> K_1ab >> 1$), so dass das Gesamtgleichgewicht zu den Templatduplexen $\mathbf{C_2}$ verschoben ist und die Konzentration einzelsträngiger, katalytisch aktiver Templatmoleküle **C** nur mit der Quadratwurzel der Templatgesamtkonzentration skaliert. Der Entzug von potenziellen Templatmolekülen aus dem Replikationscyclus durch Bildung katalytisch inaktiver Templatduplexe wird Produktinhibition genannt und führt zu dem beobachteten parabolischem Wachstum, das mit dem Quadratwurzelgesetz beschrieben werden kann.

Zielinsky und *Orgel* stellten 1987 ein auf einem selbstreplizierenden Tetraribonucleotid basierendes System vor, das das Quadratwurzelgesetz bestätigte und ein erstes Beispiel für die Selbstreplikation eines Nukleinsäurederivates mit Phosphoamidatbindungen anstelle von natürlichen Phosphodiesterbindungen im Rückgrat darstellte[35]. Durch Einsatz der deutlich nucleophileren 3'-Aminogruppe anstelle einer 3'-Hydroxyfunktion gelang die vollständige Unterdrückung der unerwünschten 2'-5'-Phosphodiesterbildung bei gleichzeitiger Beschleunigung der Ligationsreaktion. Die per EDC aktivierte 5'-Phosphatfunktion wurde hierbei unter Ausbildung einer 5'-3'-Phosphoamidatbindung vom 3'-Aminorest des benachbarten Bausteins angegriffen (Abb. 1.6).

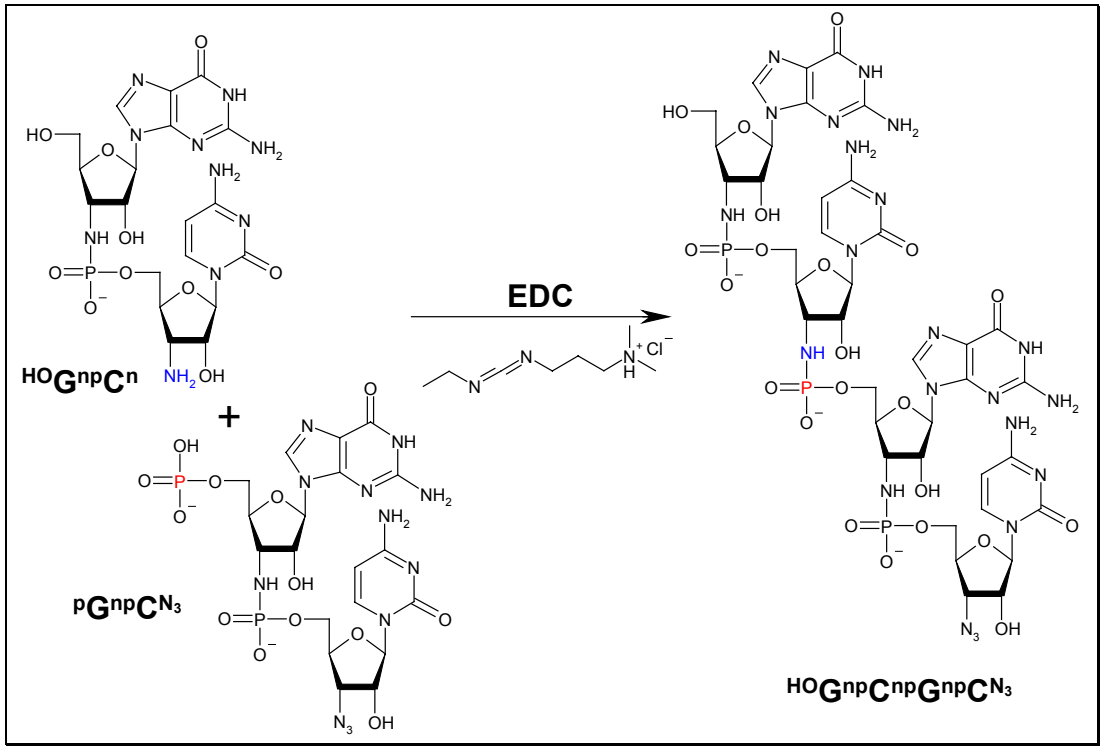


Abb. 1.6: Selbstreplizierendes Tetraribonucleotid nach *Zielinsky* und *Orgel*

1991 modifizierten *von Kiedrowski et. al.* das erste selbstreplizierende Minimalsystem (siehe Abb. 1.3) derart, dass die ursprüngliche 5'-Hydroxygruppe des Bausteins **B** durch eine nucleophilere 5'-Aminogruppe ersetzt wurde, die durch die schnellere Ligation zu einer 3'-5'-Phosphoamidatbindung eine Beschleunigung des autokatalytischen Reaktionskanals um den Faktor 6000 zur Folge hatte. Dadurch wurde die Autokatalyse schneller als der spontane Reaktionskanal und erstmalig eine sigmoide Form der Konzentrations-Zeit-Kurve des Produktes beobachtet, die bei überwiegender Autokatalyse mit begrenzter Eduktmenge zu erwarten war[36].

Auf Basis dieser effektiven Ligationschemie war die Entwicklung weiterer Replikationssysteme möglich, die sich mit komplexeren Fragestellungen der Selbstreplikation beschäftigten. Ein solches System mit drei Eduktbausteinen **A**, **B** und **C** wurde 1993 von *Achilles* und *von Kiedrowski* beschrieben[37], die in einem Netzwerk katalytischer Kopplungen mit parabolischem Wachstumsverhalten zu fünf Produkten **AB**, **AC**, **BC**, **BB** und **ABC** reagierten, die zum Teil nur ihre eigene Synthese im autokatalytischen Sinne (Egoisten), sich zum Teil aber auch kreuzkatalytisch gegenseitig in der Synthese beschleunigten (Altruisten) (Abb. 1.7). Die beiden sowohl egoistisch als auch sich gegenseitig altruistisch katalysierenden Replikatoren **AB** und **ABC** zeigten bei Zugabe des Hexamers CCGCGG

Reaktionsbeschleunigung auf Kosten des rein egoistischen Tetramers **AC**, was als Hinweis auf schwache Selektion und Informationstransfer gedeutet wurde. Bei parabolischem Wachstum findet man in solchen Konkurrenzsystemen, die später auch als "molekulare Ökosysteme" bezeichnet wurden[38], ein "Survival of everybody" mit Koexistenz vor, wie theoretische Arbeiten von *Szathmary* zeigen konnten[39]. Echte Selektion im Sinne der *Darwin'*schen Evolution ("Survival of the fittest") unter vollständiger Verdrängung eines Konkurrenten von den Ressourcen ist erst bei exponentiellem Wachstum zu erwarten. Eines der wichtigsten Ziele der Replikationsforschung ist demnach die Entwicklung exponentieller Replikatoren.

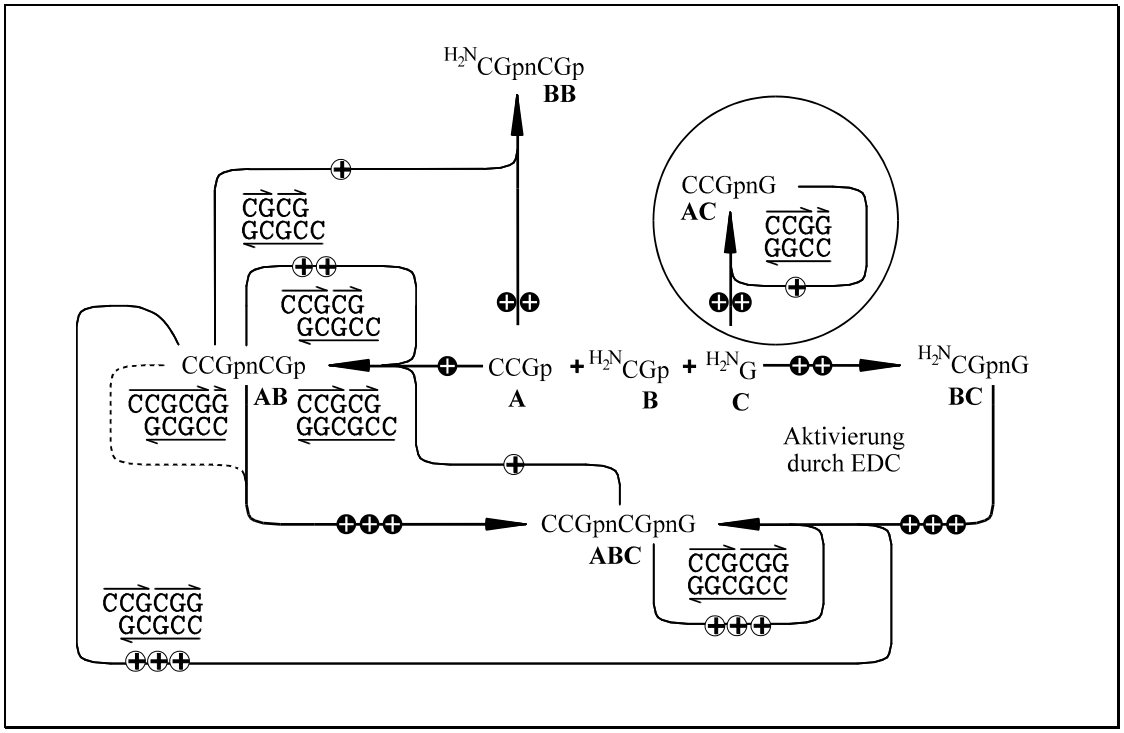


Abb. 1.7: Selbstreplizierendes System aus drei Eduktbausteinen nach *Achilles* und *von Kiedrowski*

Die Frage, ob die in der natürlichen Nucleinsäurereplikation gängige Synthese eines Stranges an einem komplementären und nicht wie bisher verwendeten selbstkomplementären Templat möglich sei, beantworteten *Sievers* und *von Kiedrowski* 1994 mit einem kreuzkatalytischen minimalen Replikationssystem, dessen Effizienz den autokatalytischen selbstkomplementären Replikatoren in keinster Weise nachstand[40]. Abb. 1.8 verdeutlicht die kreuzkatalytische Kopplung der Synthese des Stranges **AA** durch die Bildung des Stranges **BB** und vice versa.

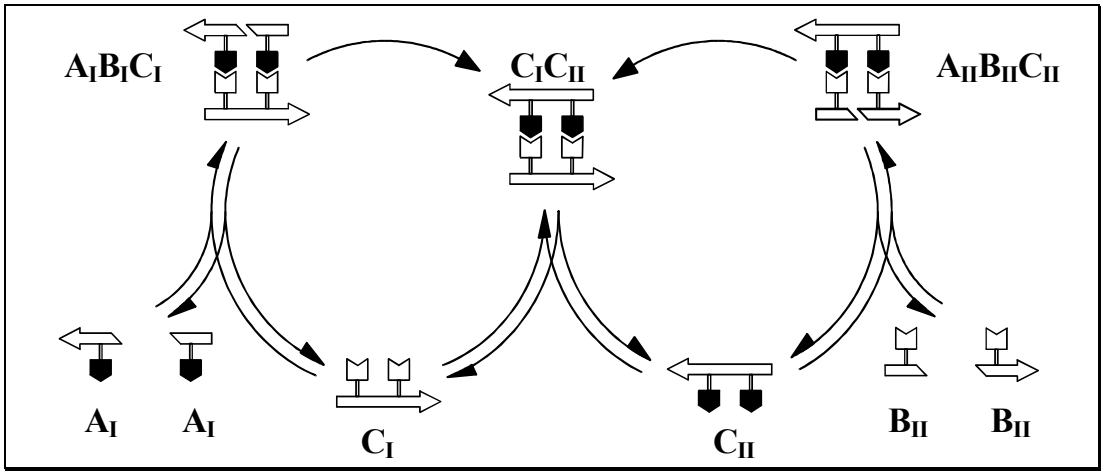
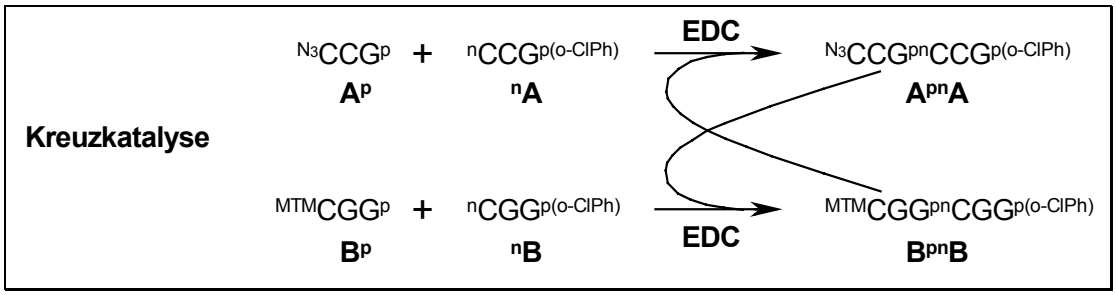
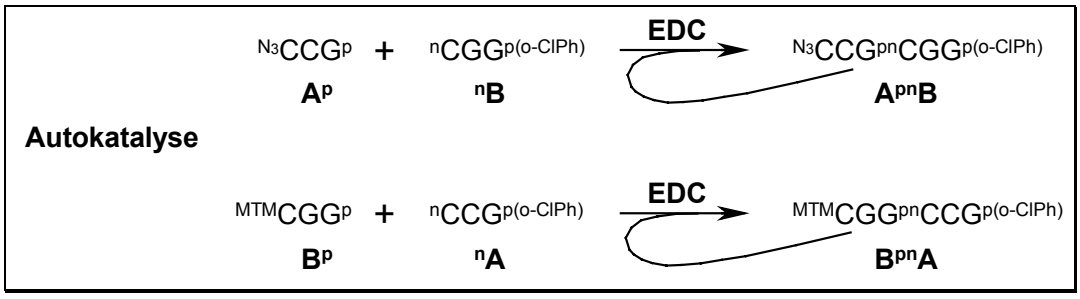


Abb. 1.8: Schema eines kreuzkatalytischen selbstreplizierenden Minimalsystems nach *Sievers*

Bei den verwendeten Eduktbausteinen handelte es sich um vier endständig geschützte Deoxynucleotid-Trimere (**A**^{p}, **B**^{p}, ^{n}**A**, ^{n}**B**), um die zwei komplementäre (**A**^{pn}**A** und **B**^{pn}**B**) und zwei selbstkomplementäre Template (**A**^{pn}**B** und **B**^{pn}**A**) konkurrierten. **A**^{pn}**A** und **B**^{pn}**B** bilden dabei gemeinsam ein kreuzkatalytisches System. Die geringen Unterschiede in der Bildungsgeschwindigkeit dieser beiden Produkte konnten durch die maßgebliche Abhängigkeit der Ligation von den die Reaktionsstelle flankierenden Basen begründet werden, die in beiden Fällen eine G^{pn}C-Sequenz aufwiesen.



Die autokatalytischen Systeme der Hexamere **A**^{pn}**B** und **B**^{pn}**A** konkurrierten ebenfalls um die selben Edukte. Alle vier Systeme zeigten aufgrund der Produktinhibition wie erwartet parabolisches Wachstum.



1.5 Stufenweise arbeitende Replikatoren

Nicolaou entwickelte 1994 ein Replikationssystem, dem, im Gegensatz zu den bisher aufgeführten autonom arbeitenden Systemen, die Bausteine stufenweise zugeführt wurden[41] (Abb. 1.9). Derartige periodische Veränderungen der Reaktionsbedingungen z.B. durch Variation der Temperatur, des Lichts (Tag/Nachtcyclus), der Konzentration (Verdunstung in Becken) oder der Zuführung von Reaktanten (Gezeiten) könnten in einem präbiotischen Szenario durchaus eine Rolle gespielt haben.

Nicolaou verwendete einen aus zwei palindromen 24meren bestehenden DNA-Duplex, dessen einer Strang nur Purinbasen, der andere ausschließlich Pyrimidinbasen enthielt. Dieser Duplex war in der Lage, unter leicht sauren Bedingungen über die schwächere Hoogsteen-Basenpaarung mit zwei dodecameren Homopyrimidinteilsträngen (parallel zum Homopurinstrang) in einer Tripelhelix zu assoziieren und so als Templat zu dienen. Nach der Fragmentligation wurde der pH-Wert von 6 auf 7 leicht erhöht, so dass der neu gebildete Baustein durch Zerstörung der Hoogsteen-Basenpaarung aus der Tripelhelix dissoziierte und als Templat für die Ligation zweier komplementärer Homopurinfragmente zur Verfügung stand, die im nächsten Schritt hinzugegeben wurden. Die Kondensation der beiden 12mere führte zu einem Duplex, der exakt dem ursprünglichen Templatduplex entsprach und einen weiteren Replikationszyklus einleiten konnte. Die Hoffnung, auf diese Weise die Produktinhibition auszuschalten und damit exponentielles Wachstum zu erreichen, konnte experimentell nicht bestätigt werden.

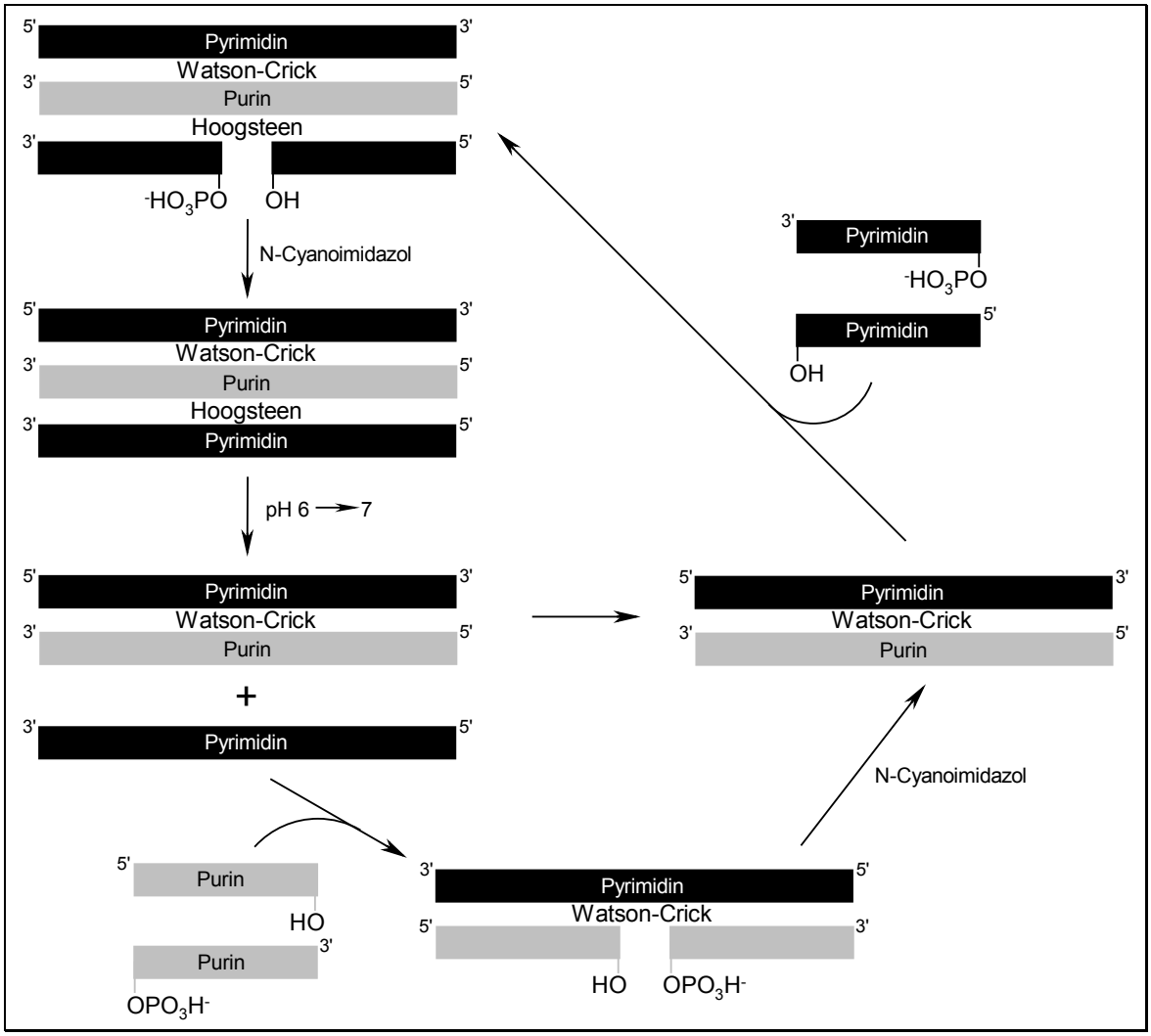


Abb. 1.9: Selbstreplikationssystem über Tripelhelices nach *Nicolaou*[41]

Ferris und *Orgel* beobachteten 1996 einen unspezifischen katalytischen Einfluss von Mineralienoberflächen auf die Oligomerisierung von Peptiden und Nucleotiden, die in Lösung durch die Hydrolyse der aktivierten Bausteine auf kurze Oligomere im Bereich von bis zu 10 Einheiten begrenzt ist[42]. Durch vielstufige Zugabe von Adenosin-5'-phosphorimidazolid (ImpA) zu einem decameren Adenylprimer in Anwesenheit des Tonminerals Montmorillonit gelang innerhalb von 14 Tagen die Generierung von bis zu 55meren. Die Katalyse der Oligomerisierung wurde durch den Aufkonzentrationseffekt der Bausteine auf der Mineralienoberfläche, an die die wachsenden Oligomere über Mg^{2+}-Brücken mit steigender Länge zusehends stärker gebunden wurden, erzeugt. Der decamere Primer wurde so schrittweise auf dem Mineral verlängert. Diese Befunde erweiterten im Zusammenhang mit den Arbeiten von *Wächtershäuser*[43], *Kuhn*[44], *Bernal*[45], *Cairns-Smith*[46] und anderen die Vorstellung einer "Ursuppe" um das Bild von Polykondensationen an Oberflächen im Sinne von "Ur-Pizzen"[47] oder "Ur-Crêpes"[48].

Das Prinzip der schrittweisen Replikation verband *von Kiedrowski et al.* 1998 mit der Replikation an Oberflächen im sequenzuniversellen SPREAD-Verfahren[49] (Surface Promoted Replication and Exponential Amplification of DNA-Analogues) (Abb. 1.10). Die nicht-kovalenten Bindungen wurden hierbei durch eine kovalente Bindung an der Festphase ersetzt, indem man 14mere DNA-Templatmoleküle über Disulfidaustauschreaktionen an einer Thiol-Festphase immobilisierte. Nach Hybridisierung zweier komplementärer 7merer Fragmente und anschließender Ligation mit EDC wurde die entstandene 14mere Kopie mit 0.1 M NaOH vom Templat dissoziiert und durch Spülen entfernt. Nach der Trennung wurde das 14mer an einer neuen Festphase verankert, um dort wiederum als Templat für eine weitere Replikationsrunde zu dienen, an deren Ende eine Kopie des ursprünglich eingesetzten Templatmoleküls stand. Da das Verfahren eine räumliche Trennung von Templat und Produkt erlaubte, fand keine Produktinhibition statt, so dass erstmals nicht-enzymatisches exponentielles Wachstum beobachtet werden konnte. Die verwendeten Bedingungen können zwar nicht uneingeschränkt auf die präbiotische Chemie übertragen werden, aber ein "proof of concept" für exponentielles Wachstum an Oberflächen war damit erbracht. Das Prinzip der stufenweisen exponentiellen Replikation wurde 1999 von *Albagli* in einem System mit photochemisch induzierter Ligation per 2+2 Cycloaddition der modifizierten Nucleobasen aufgegriffen[50].

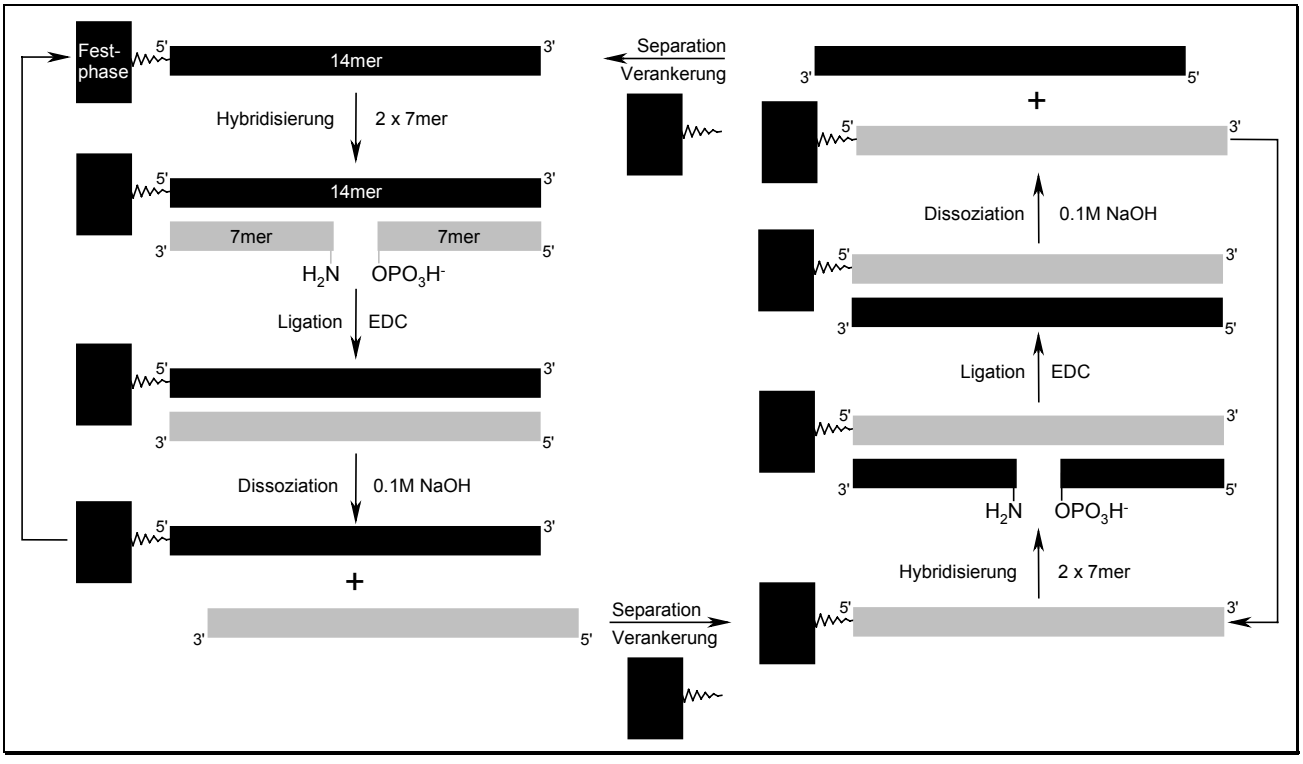


Abb. 1.10: Replikationsschema des SPREAD-Verfahrens

In neueren Arbeiten zielen *von Kiedrowski et al.* auf die Anwendbarkeit der Selbstreplikationsmechanismen bei der Vervielfältigung von nicht-kovalent verbundenen, selbstgenerierenden DNA-Nanoarchitekturen ab, die auf Tris-Oligonucleotidylen basieren. Hierbei konnten "Nano-Acetylen", "Nano-Cyclobutadien" und "Nano-Benzol" als Beispiele derartiger selbstordnender Strukturen nachgewiesen werden[51]. 2002 gelang ihnen auf dem Weg zur Selbstreplikation verzweigter Oligonucleotide die templatgesteuerte Herstellung der Kopie eines Tris-Oligonucleotidyls aus drei verschiedenen 5'-Hydrazid modifizierten Einzelsträngen (11mer, 13mer, 15mer (B_1-B_3) - komplementär zu den Strängen A_1-A_3 des Templatmoleküls) und einem trifunktionellen Linkermolekül[52] (Abb. 1.11). Die dreifache Ligation verlief unter Tris-Hydrazonbildung zum gewünschten Produkt, das bei Abwesenheit des Templates nicht gebildet wurde. Zukünftige Arbeiten sollen den begonnenen Replikationszyklus schließen und die Anwendbarkeit des SPREAD-Verfahrens prüfen.

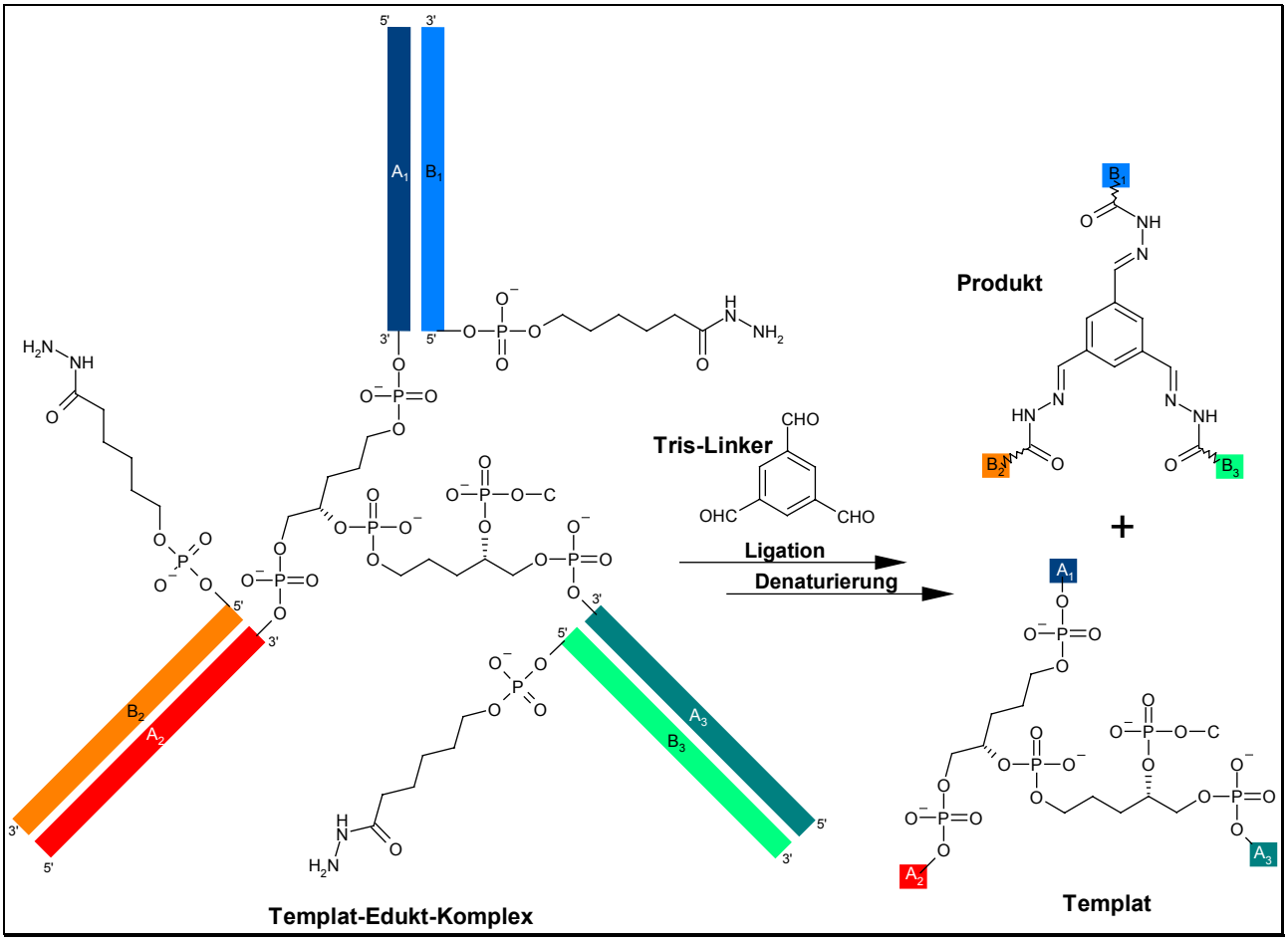


Abb. 1.11: Templatgesteuerter Kopiervorgang eines Tris-Oligonucleotidyls

Auch bei der Analyse von Selbstreplikationskinetiken wurden 2001 Fortschritte gemacht, die eine Beobachtung der Kinetik über FRET-Effekte (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)

der an den Molekülenden eingeführten Farbstoffe während der eigentlichen Reaktion unter Aufnahme einer hohen Zahl von Messpunkten ermöglichten[53].

1.6 Replikatoren aus organischen Bausteinen

Abweichend von der auf Nucleinsäuren basierenden Linie der Selbstreplikations-Untersuchungen entwickelte *Rebek* 1990 ein artifizielles System, das mit relativ komplexen organischen Bausteinen in nicht-wässrigen Lösungsmitteln replizierte[54] (Abb. 1.12).

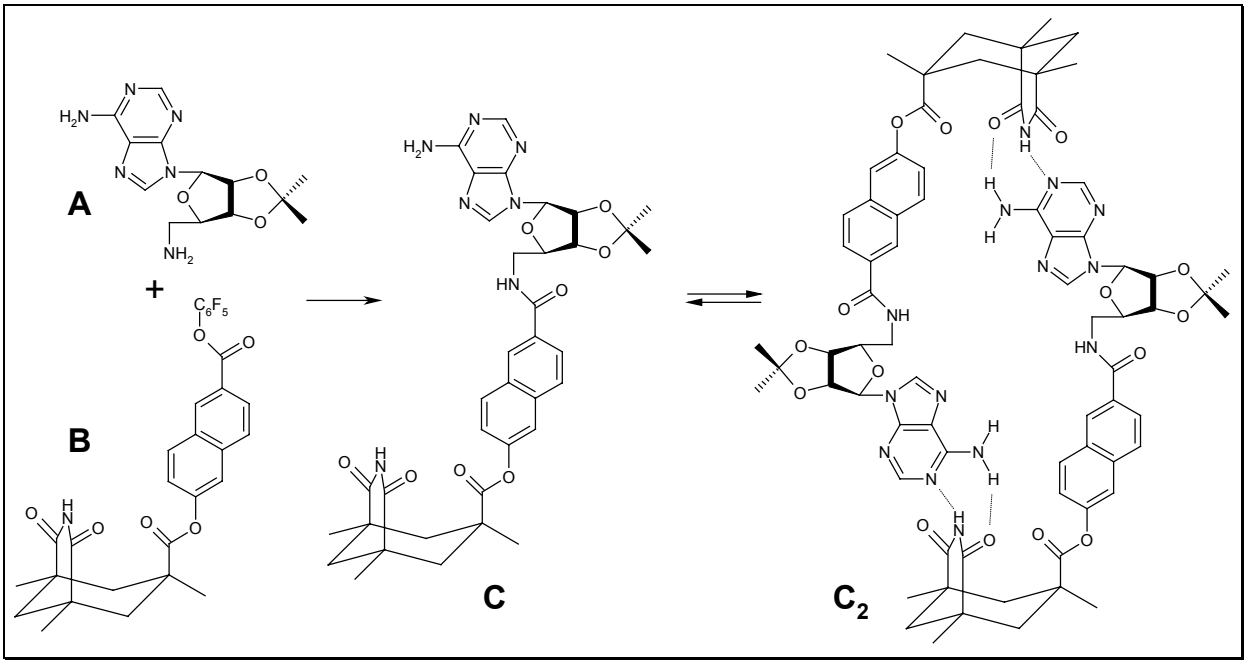


Abb. 1.12: Selbstreplizierendes System nach *Rebek*

Die molekulare Erkennung fand über ein Adenosinderivat statt, dass von einer Adenin erkennenden Stelle des Templats über Wasserstoffbrückenbindungen fixiert wurde und damit die aktivierte Carboxylgruppe (Pentafluorphenylester) des einen Edukts in die räumliche Nähe der primären Aminofunktion des anderen Edukts brachte. Das aus der Kondensation unter Amidbildung hervorgehende selbstkomplementäre Molekül konnte als Templat weiterer Selbstreplikationscyclen dienen. Trotz von *Menger*[55] angestoßener kontroverser Diskussionen bezüglich der replikativen Eigenschaften des Systems konnte gezeigt werden, dass bei Amid-Konzentrationen unterhalb von 30 mM Selbstreplikation vorliegt, die mit dem Quadratwurzelgesetz beschrieben werden kann[56,57]. Erst bei höheren Konzentrationen sind die Templateffekte auf unspezifische Amidkatalyse zurückzuführen, die eine gewöhnliche

Autokatalyse ohne Informationsübertragung und damit ausbleibende Selbstreplikation zur Folge hat.

Terfort und *von Kiedrowski* beschrieben 1992 ein artifizielles selbstreplizierendes System aus simpleren organischen Molekülen, das vollständig auf Watson-Crick Erkennungsmotive der Nucleinsäuren verzichtet[58]. Stattdessen erfolgte die Assoziation über Salzbrücken zwischen Amidiniumsalzen und Carboxylaten, während die Ligation der Eduktbausteine durch Kondensation von 2-Formylphenoxyessigsäuren (**A**) mit 3-Aminobenzamidinen (**B**) unter Bildung von Benzanilen (**C**, **C$_2$**) vollzogen wurde (Abb. 1.13).

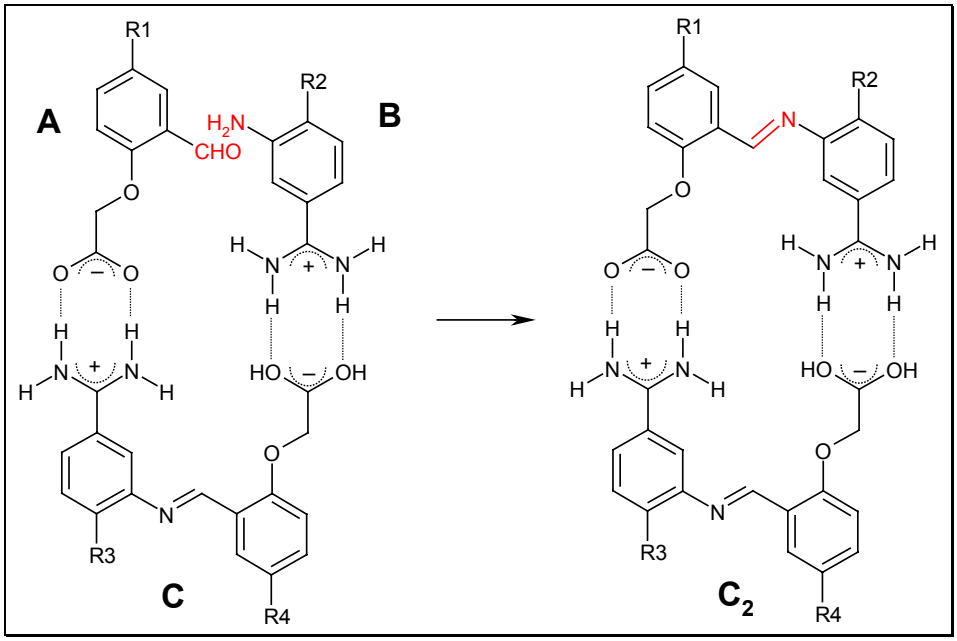


Abb. 1.13: Selbstreplizierendes System nach *Terfort* und *von Kiedrowski*

Das System zeigte Selbstreplikation bei parabolischem Wachstum nach dem Quadratwurzelgesetz (Reaktionsordnung p=0.5). Durch Einsatz von Templaten, die sich von den Kondensationsprodukten bezüglich der Reste an den Aromaten unterschieden (R1 ≠ R4, R2 ≠ R3), beobachtete man exponentielles Wachstum mit linearer Abhängigkeit der Produktbildungsrate von der Templatkonzentration (p=1). Hierbei ist des Reaktionsprodukt jedoch nicht identisch mit dem Templat und keine Selbstreplikation mehr gegeben. Durch die Modifikation mussten die termolekularen Komplexe stabiler als die Templatduplexe geworden sein, so dass das Prinzip der Stabilitätserhöhung des termolekularen Komplexes gegenüber dem Duplex als Möglichkeit zur Realisierung exponentiellen Wachstums vorgeschlagen wurde.

Nach dieser Vorgabe gelang *Sutherland* 1997 die Entwicklung eines artifiziellen Selbstreplikators, dessen autokatalytische Reaktionsordnung mit p=0.8 in die Nähe exponentiellen Wachstums rückte[59]. Die auf einer Diels-Alder-Reaktion basierende Ligationschemie führte offenbar zu einem Produkt, dessen Duplexbildung sterisch gegenüber der Bildung termolekularer Komplexe benachteiligt war (Abb. 1.14).

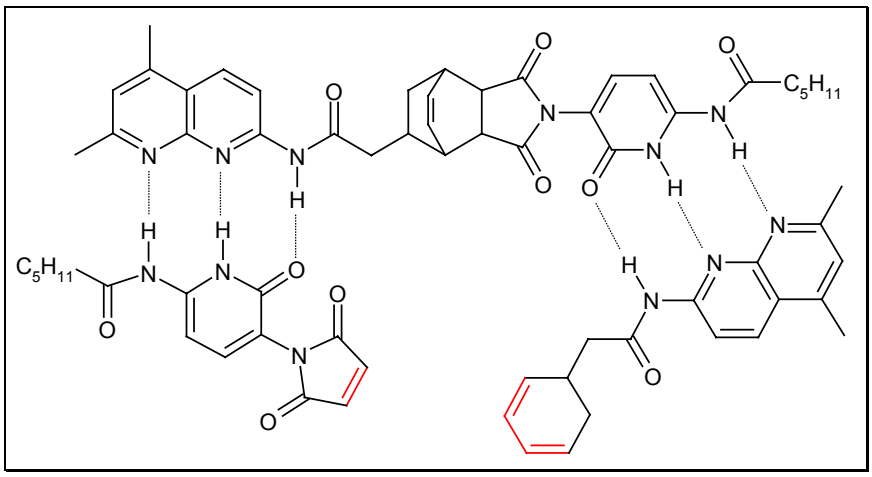


Abb. 1.14: Selbstreplizierendes System nach *Sutherland*

1.7 Peptid-Replikatoren

Da die Replikation von Peptiden in der Natur so gut wie unbekannt war[60], fand 1996 das erste selbstreplizierende Peptid von *Ghadiri* besondere Beachtung[61]. Der aus 32 Aminosäuren bestehende α-helicale Replikator basierte auf einem modifizierten Leucin-Zipper-Motiv (coiled coil) des Transkriptionsfaktors GCN4. In den beteiligten Peptiden kommen durch entsprechende Sequenzen hydrophobe Leucin- und Valin-Seitenketten übereinander auf einer Seite der α-Helix zu liegen, während die übrige Helix weitestgehend hydrophile Aminosäuren aufweist. Im wässrigen Medium aggregieren Reaktionsmischungen aus Templat und Eduktbausteinen (15mere und 17mere) über das Erkennungsmotiv der hydrophoben Wechselwirkungen zu termolekularen Komplexen (Abb. 1.16a) und ermöglichen so eine Katalyse der Kondensationsreaktion zum Amid, die auf der *Kent*'schen Ligationschemie beruht[62]. Hierbei wird ein durch Thiobenzylester aktivierter C-Terminus des einen Peptidbausteins mit dem Cystein am N-Terminus des anderen Peptidbausteins zu einem Thioester umgesetzt, der nachfolgend zum Amid umlagert (Abb. 1.15).

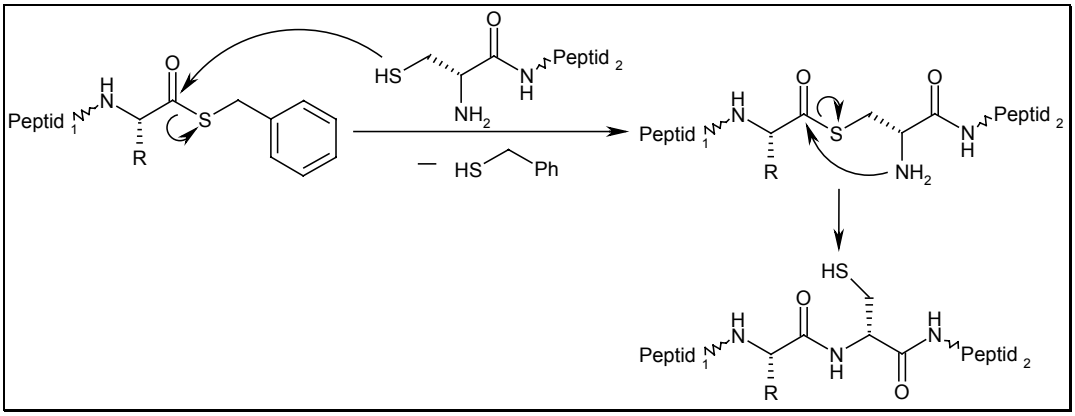


Abb. 1.15: Peptidkopplung nach *Kent*

Die kinetische Analyse des Systems zeigte zunächst aufgrund der Produktinhibition parabolisches Wachstum mit einer Reaktionsordnung von p = 0.5, das jedoch nach Verdoppelung der Eduktkonzentration in ein Wachstum mit einer Reaktionsordnung nahe p = 2/3 überging. Es wurde vermutet, dass bei diesen Verhältnissen auch tetramolekulare Komplexe aus zwei Templatmolekülen und den beiden Eduktmolekülen gebildet werden konnten (Abb. 1.16b), da die autokatalytische Reaktionsordnung von der Anzahl der nach der Ligation am Produktkomplex beteiligten Bausteine n mit p = (n-1/n) abhängig ist. Für den aus der Ligation hervorgegangenen termolekularen Komplex ergäbe sich mit n = 3 so die beobachtete Reaktionsordnung von p = 2/3. Bei Produktduplexen mit n = 2 beträgt p = 1/2, was parabolischem Wachstum entspricht. Dieses könnte jedoch theoretisch in exponentielles Wachstum mit p=1 übergehen, wenn die Anzahl der am Komplex beteiligten Templatmoleküle gegen unendlich gehen würde.

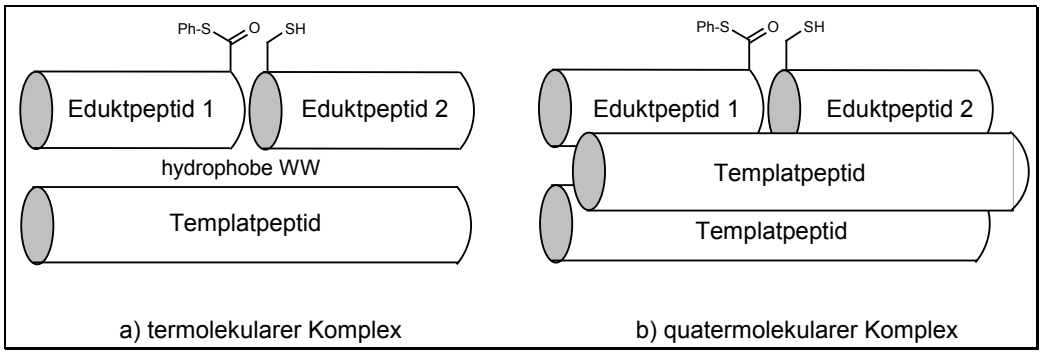


Abb. 1.16: Ter- und quatermolekulare Peptidkomplexe nach *Ghadiri*

Neben weiteren Arbeiten von *Ghadiri*[63] wurde das Themenfeld der selbstreplizierenden Peptide insbesondere von der Gruppe um *Chmielewski* behandelt[64], die 2002 einen bemerkenswert starken Peptidreplikator entwickelte[65]. *Chmielewski* variierte ihr bereits

selbstreplizierendes Peptid E1E2, um eine geringere Stabilität des Produktkomplexes gegenüber dem Templat-Eduktkomplex zu erzielen und damit die Produktinhibition zu verhindern. Das dabei erhaltene 26mere Peptid RI26 zeigte Selbstreplikation über einen Komplex aus drei Templat- und zwei 13meren Eduktbausteinen. Theoretisch wäre demnach mit $n = 4$ eine Reaktionsordnung von $p = 0.75$ ($p = (n-1)/n = 3/4$) zu erwarten gewesen, gemessen wurde jedoch eine Reaktionsordnung von $p = 0.91$ und damit schwach exponentielles Produktwachstum. Als Grund für das unvermutet starke Replikationsverhalten wurde die erfolgreiche Stabilitätsreduktion der coiled-coil Struktur des tetrameren Produktes im Vergleich zur Stabilität des basierenden E1E2-Produktkomplexes angeführt.

1.8 Selbstreplizierende Ribozyme

Neueste Arbeiten von *Joyce* beschrieben 2002 die Entwicklung eines selbstreplizierenden Ligase-Ribozyms (**T**) aus 61 Nucleotiden, das seine eigene Synthese aus zwei Eduktsequenzen (**A**, **B**) unter 3'-5'-Phosphodiesterbildung bei exponentiellem Wachstum zu Beginn der Reaktion katalysierte[24] (Abb. 1.17).

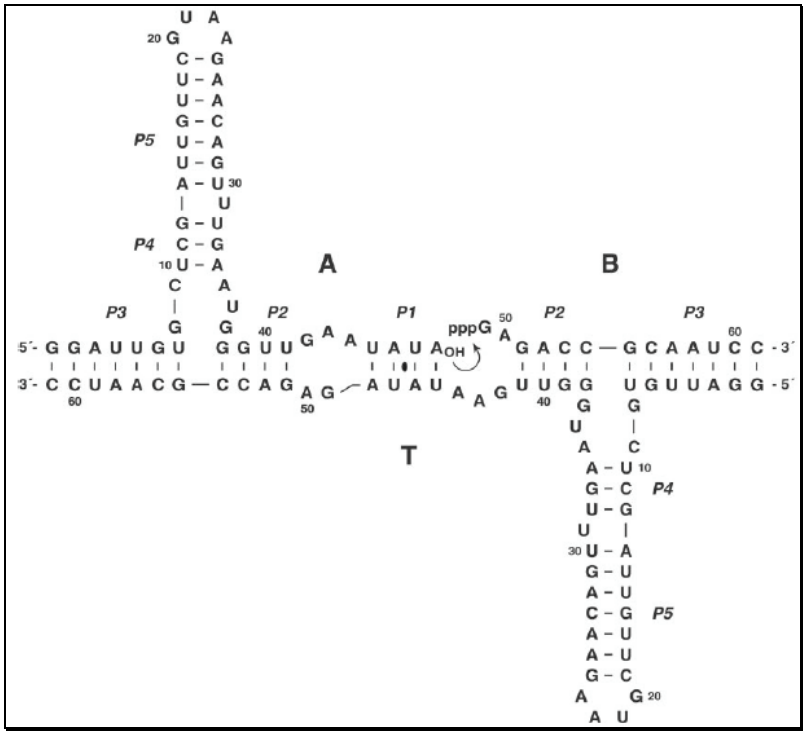


Abb. 1.17: Termolekularer Komplex des selbstreplizierenden Ribozyms nach *Joyce*

Der Templat-Duplex **T•T** war gegenüber dem termolekularen Komplex **A•B•T** instabil und dissoziierte weitestgehend, so dass das Templat **T** überwiegend für die Katalyse der Ligation des aktivierten 5'-Triphosphat-Bausteins **B** mit dem 3'-Hydroxy-Strangende des Bausteins **A**

zur Verfügung stand. Die Bausteine **A** und **B** lagen jedoch bevorzugt als **A•B**-Duplex vor, so dass das linear von der Konzentration des Templates abhängige Produktwachstum nur dann beobachtet werden konnte, wenn das Templat mit einem der beiden Edukte zunächst ungestört komplexierte und das jeweils andere Edukt erst im nächsten Schritt hinzugegeben wurde, woraufhin termolekulare Komplexe der Form **A•B•T** gebildet wurde. Sobald der Vorrat an präorganisierten **A•B•T**-Komplexen abreagiert war, verlangsamte sich die Produktbildung nachhaltig auf den Wert der spontanen, nicht templatkatalysierten Reaktion, da die neu gebildeten Template nicht mehr in der Lage waren Edukte aus den stabileren **A•B**-Duplexen zu binden und die Ligation zu katalysieren. Das exponentielle Wachstum konnte somit nicht aufrechterhalten werden.

1.9 Offene Systeme

Abgesehen von der bereits angesprochenen Problematik, wie ein solch weit entwickeltes Replikationssystem, wie das in Kap. 1.8 beschriebene 61mer spontan entstanden sein soll, stellt laut *Joyce* die fehlende Mutabilität des obigen und der meisten anderen beschriebenen geschlossenen selbstreplizierenden Systeme ein größeres Hindernis auf dem Weg zu einem evolvierenden System dar[24]. Bisher wurden Replikatoren aus einer begrenzten Menge von Eduktbausteinen generiert, wobei sich die Informationsübertragung üblicherweise auf eine oder wenige Verknüpfungsreaktionen beschränkte - eine Modifizierung der Sequenzlänge oder der Sequenz selber war nicht vorgesehen. Selbstreplikationsprodukte erstellen naturgemäß nur Kopien ihrer selbst und sind bei fehlender Mutation bezüglich der weiteren Entwicklung eingeschränkt und gemäß der *Oparin*'schen Definition von Leben[3] (Kap.1.1) nicht als evolvierendes, 'lebendes' System anzusehen.

Einen aussichtsreichen Ansatz stellen selbstreplikationsfähige offene Systeme aus beidseitig ligationsfähigen Bausteinen dar, deren Oligomerisationsmöglichkeiten theoretisch unbegrenzt sind und damit eine Vielzahl divergierender Produkte generierbar ist. Nach *Monteireo*[66] stellt bereits die Verlängerung eines bestehenden Oligomers um eine Edukteinheit eine Mutation dar, die auf nachfolgende Generationen vererbt werden kann. Mutation wäre damit im Gegensatz zu geschlossenen Systemen eine immanente Eigenschaft offener Replikationssysteme. Zur Definition eines offenen Systems seien zunächst die bisher zu Studien nicht-enzymatischer Replikationen herangezogenen Nucleotidderivate aufgeführt, die sich nach *Orgel*[67] in drei Klassen einteilen lassen und in Tab. 1.1 zusammengefasst werden:

1. **Monofunktionelle Bausteine** oder Templatbausteine, sind lediglich zur Ausbildung von Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nucleobasen zweier Nucleotid-Stränge befähigt und somit für den Einsatz als Templatmoleküle prädestiniert (die Fähigkeit zur molekularen Erkennung wird hier als Funktionalität gewertet). Ihre 5'- und 3'-Termini sind geschützt oder unter den Bedingungen der Replikationsexperimente inert.

2. **Bifunktionelle Bausteine** bzw. einseitig offene Bausteine, besitzen neben ihrer Fähigkeit zur molekularen Erkennung in Form einer oder mehrerer zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigter Nucleobasen auch eine 5'- *oder* 3'-terminale funktionelle Gruppe zur Ausbildung einer Internucleotidbindung. Einer der beiden Termini ist demnach geschützt oder unter den jeweiligen Kondensationsbedingungen unreaktiv. Derartige Moleküle wurden in replizierenden Systemen, in denen zwei bifunktionelle Bausteine (gelegentlich mit einer begrenzten Anzahl eingeschobener trifunktioneller Nucleotide[37]) an einer Matrize zu einem monofunktionellen Baustein reagieren, eingesetzt. In nicht-autokatalytischen Reaktionen wurden bifunktionelle Oligomere als Primer für trifunktionelle Bausteine zur Bildung längerer Oligomere verwendet (z.B. *Ferris et. al.*[42]).

3. **Trifunktionelle Bausteine** bzw. **beidseitig offene Bausteine**, verfügen neben der Fähigkeit zur molekularen Erkennung nach Watson-Crick sowohl über eine 5'- **als auch** eine 3'-terminale funktionelle Gruppe zur Ausbildung von Internucleotidbindungen. Mit diesen beidseitig ligationsfähigen Molekülen lassen sich offene Modellsysteme generieren, deren Produktspielraum theoretisch nur von der Menge und Diversität der zur Verfügung stehenden Eduktbausteine begrenzt ist.

Bausteinklasse	Symbol	Beispiele	Eigenschaften
Monofunktionell	N	^{HO}CCGCGG^{OH}	Nicht reaktiv, reines Templat
Bifunktionell	N*, *N	^{N_3}CGCG$^{PO_4^{2-}}$, ^{NH_2}CG^{PTE}	Einseitig reaktiv, Templatwirkung möglich
Trifunktionell	*N*	^{NH_2}CGCG$^{PO_4^{2-}}$	Beidseitig reaktiv, Templatwirkung möglich

Tab. 1.1: Bausteinklassen der Replikation unter dem Gesichtspunkt der Funktionalitäten, reaktive Funktionalitäten sind blau und rot gekennzeichnet, N=Nucleotid, PTE=Phenylthioethyl

Unter selbstreplizierenden offenen Systemen versteht man Replikationssysteme, deren Edukte ausschließlich aus trifunktionellen Bausteinen bestehen, so dass prinzipiell Produkte beliebiger Länge und bei Variation der Eduktbausteinsequenz auch mit unterschiedlichster Basenabfolge entstehen, die wiederum als Template dienen können. *Orgel* setzte trifunktionelle aktivierte Ribonucleosid-5'-phosphoimidazolid-Monomere (Abb. 1.2) sowie verwandte offene RNA- und DNA-Bausteine als Edukte für templatgesteuerte Polykondensationen ein, die jedoch ein bereits existierendes Templat erforderten und keine Selbstreplikation zeigten[31,32,68,69,70]. Weitere Oligomerisationsexperimente *Orgels* mit offenen Bausteinen, in denen Glycin mit der 3'-Aminofunktion eines 3'-Amino-3'-deoxyguanosin-5'-phosphats verbunden war, führten bis zu 25meren-Oligomeren, deren Kondensation wahrscheinlich über G-Tetraden-ähnliche Komplexe katalysiert wurde[71]. Die unspezifische Oligomerisierung von aktivierten Monomeren auf Mineralienoberflächen nach *Ferris* und *Orgel* kann ebenfalls nicht zur Selbstreplikation gezählt werden[42]. Auch Mischexperimente mit trifunktionellen Bausteinen bei gleichzeitiger Verwendung bifunktioneller Moleküle führen zu eingeschränkter Produktvielfalt[37], da letztere die Oligomerisierung durch ihre einseitige Funktionalität unterbrechen.

In geschlossenen Replikationssystemen wirken die Template wie spezifische Ligasen, die nur die Ligation zwischen einigen wenigen komplementären Edukten katalysieren. Nach *Kauffman*[72] könnten komplexe Systeme von Oligomeren, die ihre Synthese in einem Netzwerk von Reaktionsbeziehungen gegenseitig katalytisch unterstützen, kollektiv autokatalytisches Verhalten entwickeln und evolvieren. Dabei braucht keines der beteiligten Oligomere die Fähigkeit zur Selbstreplikation zu besitzen, da solche Systeme als Ganzes replizieren könnten. Ein derartiges "autocatalytic set", das gemäß der *Kauffman*'schen Hypothese ab einem gewissen Komplexitätslevel Leben hervorbringen und evolvieren sollte, wäre auf Basis offener Replikatoren denkbar.

Offene, zur nicht-enzymatischen Selbstreplikation befähigte Systeme sind bislang, nicht zuletzt aufgrund ihrer inhärenten Komplexität, selten Mittelpunkt experimenteller Untersuchungen gewesen, so dass derartige Vorstöße abseits der beschriebenen geschlossenen Minimalsysteme explorativen Charakter erhalten. Die Analyse eines solchen offenen Systems, dessen Oligomerisierung aus möglichst einfachen Nucleotiden zunehmend komplexere Strukturen generiert, sollte interessante Erkenntnisse zu den Mechanismen liefern können, die zu höher entwickelten Replikationssystemen führen.

2. Aufgabenstellung

Untersuchungen zur nicht-enzymatischen Replikation von DNA-Analoga fanden bislang überwiegend an Systemen mit mono- und bifunktionellen Bausteinen statt, die nur eine begrenzte Anzahl und Länge der Reaktionsprodukte erlaubten. Von besonderem Interesse sind deshalb Replikationsexperimente offener Systeme mit beidseitig ligationsfähigen trifunktionellen Molekülen, die jedoch, bedingt durch die Vielzahl an realisierbaren Reaktionsprodukten, einen weitaus höheren Komplexitätsgrad als Minimalsysteme mit bifunktionellen Einheiten besitzen. Vor diesem Hintergrund sollte die Anzahl der verschiedenen Basen in den eingesetzten Nucleotiden in einem zu untersuchenden offenen System minimal und deren Sequenz möglichst kurz sein, um das System so einfach wie möglich zu gestalten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Untersuchung der Oligomerisierung und deren Sequenzabhängigkeit eines offenen, zur Replikation befähigten Systems aus Deoxynucleotid-derivaten, das folgende Eigenschaften in sich vereint:

- Möglichst kurze Sequenz mit höchstens zwei verschiedenen Nucleobasen, um die Komplexität minimal zu halten.
- Hochreaktive terminale Funktionalitäten zur Maximierung der Ligationsausbeute.
- Stabilisierung des intermediären Komplexes während der Ligation durch starke Stapelung der die Kondensationsstelle flankierenden Basen.

Die kinetische Verfolgung der Oligomerisierung sollte mittels HPLC-Chromatografie geschehen.

3. Auswahl der geeigneten Bausteine

Ein wichtiger Aspekt bei der Auswahl der Sequenzen war die Optimierung der Oligomerisierungseigenschaften durch den Einsatz von hochreaktiven Gruppen an den 3'- und 5'-Termini der Bausteine, da die Bildung von Oligonucleotiden mit hoher Ausbeute nur realisierbar ist, wenn die Kondensation effektiv mit der Hydrolyse der aktivierten Nucleotide konkurriert[36,70]. Für die enzymfreie Kondensation auf Basis der EDC-katalysierten Ligation liegen Reaktivitätsdaten von *Shabarova*[73] vor, aus denen hervorgeht, dass die Phosphoamidatbildung aus einer 5'-Amino- und einer EDC-aktivierten 3'-Phosphatfunktion aufgrund der hohen Nucleophilie der Aminogruppe die höchste Reaktionsrate aufweist (Tab. 3.1).

3'-Terminus	5'-Terminus	rel. Reaktivität
OH	PO_4^{2-}	1
PO_4^{2-}	OH	10
PO_4^{2-}	PO_4^{2-}	45
NH_2	PO_4^{2-}	70
PO_4^{2-}	NH_2	100

Tab. 3.1: relative Kondensations-Reaktivitäten der verschiedenen Nucleotidtermini

Untersuchungen von *Wlotzka et. al.*[36,74] zeigten, dass die die Verknüpfungsstelle flankierenden Basen wesentlichen Einfluss auf die Kondensationsraten der EDC-katalysierten Ligation ausübten. Hierbei waren Reaktionen zwischen 5'-Pyrimidin und 3'-Purin terminalen Basen besonders effektiv, weil diese im Übergangszustand der Phosphoamidatbildung gegenüber Ligationen zwischen 5'-Purin und 3'-Pyrimidin terminalen Basen stärkere Basenstapelung aufwiesen und somit thermodynamisch bevorzugt waren.

Da pyrimidinreiche Oligomere als Template für Ligationen offener Bausteine geeignet sind, die aus der Replikation hervorgehenden zwangsläufig purinreichen Produkte jedoch nicht[31,75], sollten Oligomere mit gleich hohem Purin- wie Pyrimidinanteil verwendet werden. Berücksichtigt man außerdem die möglichst kurze Oligomerlänge als Faktor bei der Auswahl der Nucleotidsequenz kommen insbesondere Dimere mit 5'-Amino- und 3'-Phosphatfunktionen in Betracht, die eine 5'-Pyrimidin-3'-Purin Basenabfolge besitzen. Nach *Monteiro*[66] würden in einem präbiotischen Szenario durch spontane Ligation von Monomeren vor allem Dimere als höhere Edukte möglicher Repliktionssysteme in Frage

kommen. Dadurch reduziert sich die Anzahl der geeigneten Sequenzen auf die vier dimeren Deoxynucleotidderivate der Abb. 3.1.

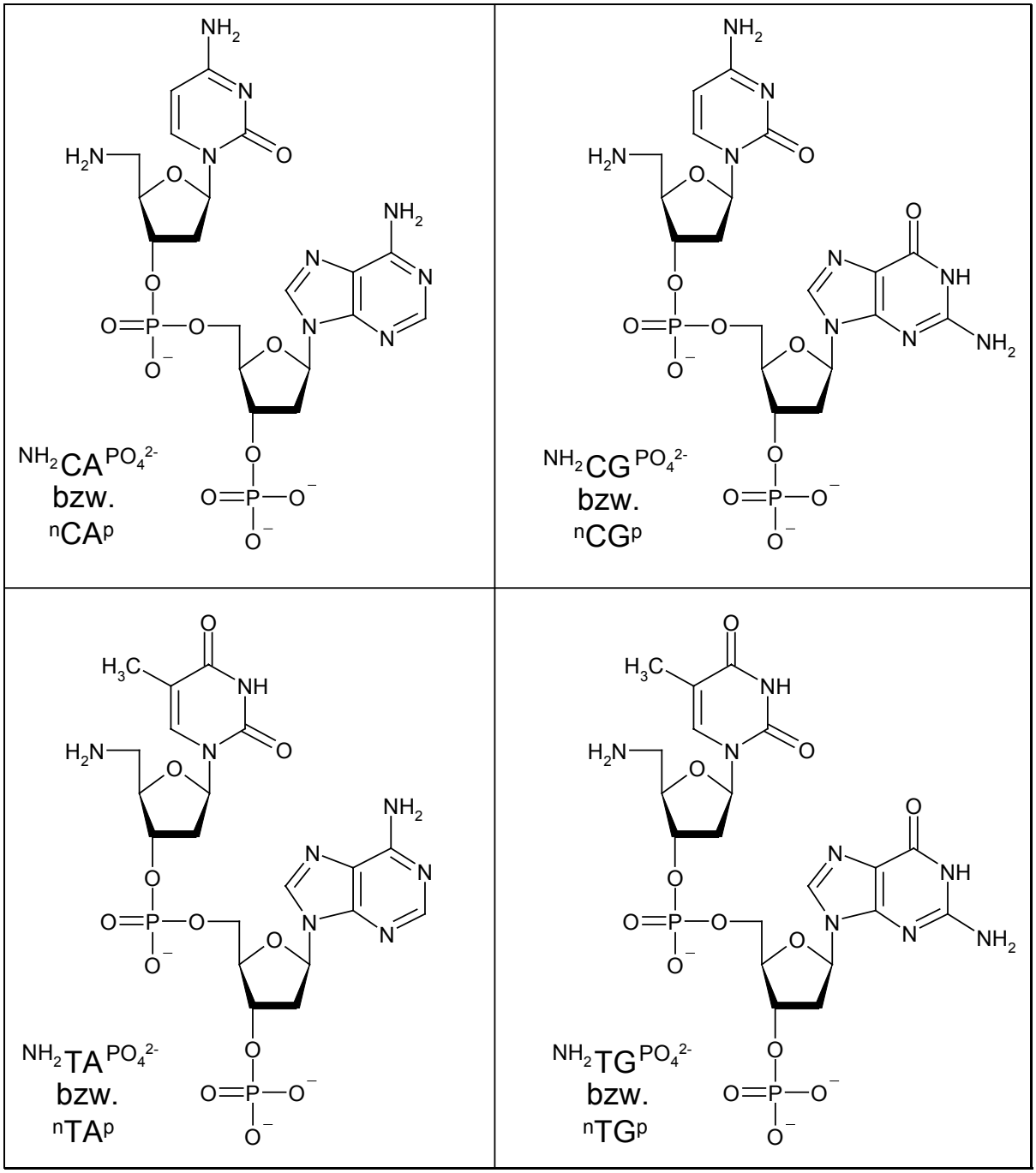


Abb. 3.1: Die vier für offene Systeme geeigneten Dimere und ihre Abkürzungen

Von diesen vier Molekülen, die im folgenden in der Form $^{n}XY^{p}$ abgekürzt werden, sind $^{n}TG^{p}$ und $^{n}CA^{p}$ komplementär und könnten miteinander ein zur Replikation geeignetes kreuzkatalytisches System bilden. $^{n}CG^{p}$ und $^{n}TA^{p}$ dagegen sind selbstkomplementäre Dimere, die die kleinsten offenen und prinzipiell zur autarken Selbstreplikation befähigten Systeme

darstellen (neben den voraussichtlich weniger reaktiven und nicht betrachteten Dimeren $^{n}GC^{p}$ und $^{n}AT^{p}$), da die oligomeren Produkte als Template der eigenen Synthese im autokatalytischen Sinne dienen könnten.

Die Oligomerisierung kann durch Aktivierung der Bausteine mit EDC eingeleitet werden und sollte theoretisch über den Reaktionskanal der spontanen Ligation (Abb. 3.2) erst dann zum totalen Stillstand kommen, wenn das EDC verbraucht oder sämtliche Dimere zu einem einzigen Nucleotidstrang kondensiert und dessen Enden unter Ringschluss verbunden sind. Real wird die spontane Reaktion natürlich durch den Verbrauch an Aktivator und reaktionsfähigen Termini nach dem Start zunehmend gebremst und an Geschwindigkeit verlieren, so dass das vollständige Reaktionsende außerhalb eines sinnvollen Beobachtungszeitraums liegt.

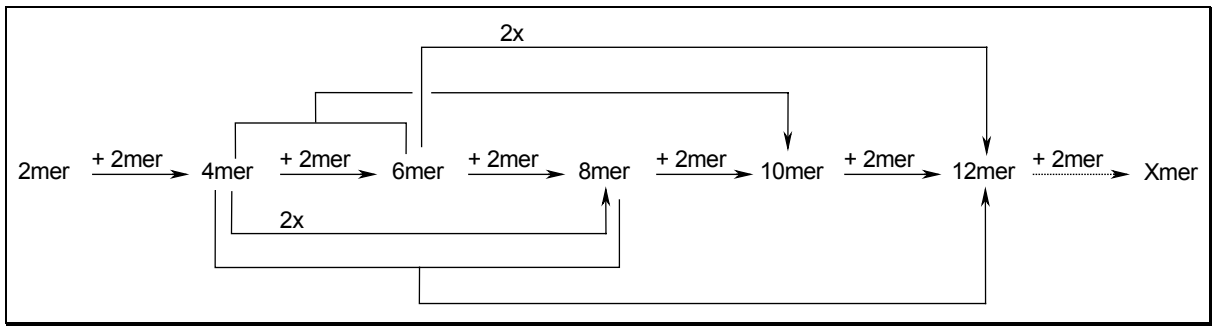


Abb. 3.2: Vereinfachtes Schema der Oligomerisation eines 2mer-Systems über spontane Ligation bis zum 12mer

Zusätzliche Reaktionskanäle auf katalytischer Basis können dem Geschwindigkeitsverlust entgegenwirken. Bei Auftreten der bekannten termolekularen Komplexe aus den entstehenden längeren Oligomerisationsprodukten mit den kürzeren Produktoligomeren oder den zu Beginn der Reaktion vorliegenden Dimeren könnten diese Komplexe zusätzlich zum spontanen Reaktionskanal Oligomere generieren und so zu einer beschleunigten Oligomerisierung auf Selbstreplikationsbasis führen (Abb. 3.3).

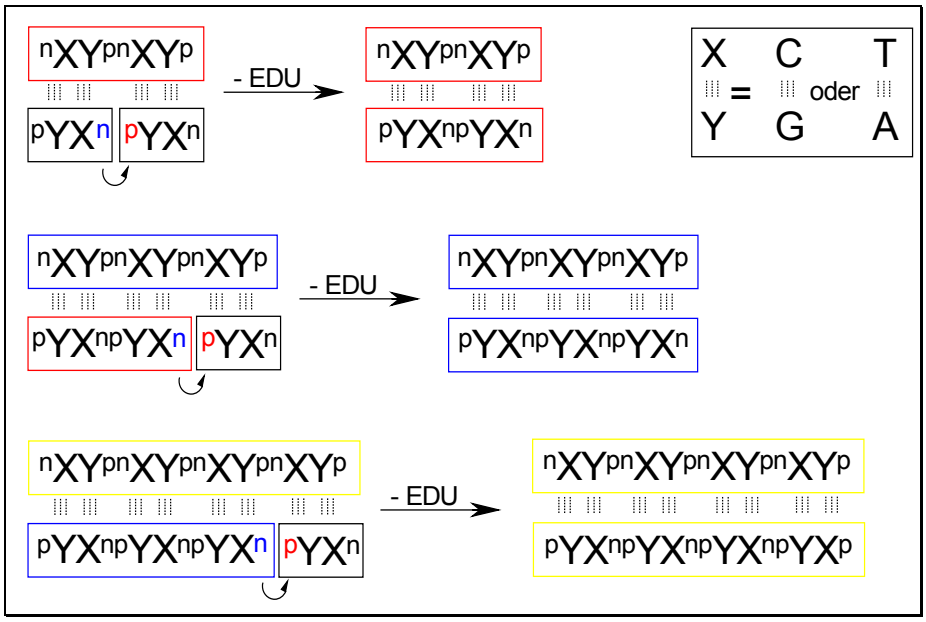


Abb. 3.3: Beispiele möglicher termolekularer Komplexe, rotes p: EDC-aktiviertes Phosphat

Durch Zugabe inerter Templatoligomere würden derartige autokatalytische Reaktionskanäle aufgrund der verstärkten Bildung des jeweiligen gleich langen Produktes identifiziert werden können. Die Aufklärung der Reaktionsmechanismen muss bei den vielfältigen Komplexbildungsmöglichkeiten, die sich nicht auf termolekulare Komplexe beschränken müssen, Priorität haben, um in diesem exploratorischen Thema Fuß fassen zu können.

Für die Replikationsexperimente wurden demnach größere Mengen der vier in Abb. 3.1 aufgeführten Deoxynucleotiddimere $^{n}(XY)^{p}$ benötigt, sowie geringere Mengen inerter Templatmoleküle der Form $^{HO}(XY)_{z}{}^{OH}$ mit diversen Längen, die über die Synthese per DNA-Synthesizer zugänglich sind. Da es sich bei den in dieser Arbeit behandelten Nucleotiden vorwiegend um 2'-Deoxynucleotide handelt, werden diese nicht weiter gekennzeichnet und nur Ribonucleotide gesondert hervorgehoben.

4. Synthese der Nucleotidderivate

4.1 Grundlagen der Oligonucleotidsynthese

Die Struktur eines DNA-Einzelstrangs ist gekennzeichnet durch 2'-Deoxyriboseeinheiten, die durch Phosphodiesterbrücken zwischen den 3'- und 5'-Hydroxyfunktionen benachbarter Einheiten verknüpft sind. An den 1'-Positionen dieser Deoxyribose-Phosphat-Backbone sind die Heterobasen Guanin **1** und Adenin **2** (Purinderivate), sowie Thymin **3** und Cytosin **4** (Pyrimidinderivate) jeweils N-glykosidisch verknüpft **5**. Eine aus Zucker und Nucleobase bestehende Einheit nennt man Nucleosid **6**, die weitere Veresterung mit einer Phosphorsäuregruppe führt zu einem 3'-Nucleotid **7** oder 5'-Nucleotid **8** (Abb. 4.1).

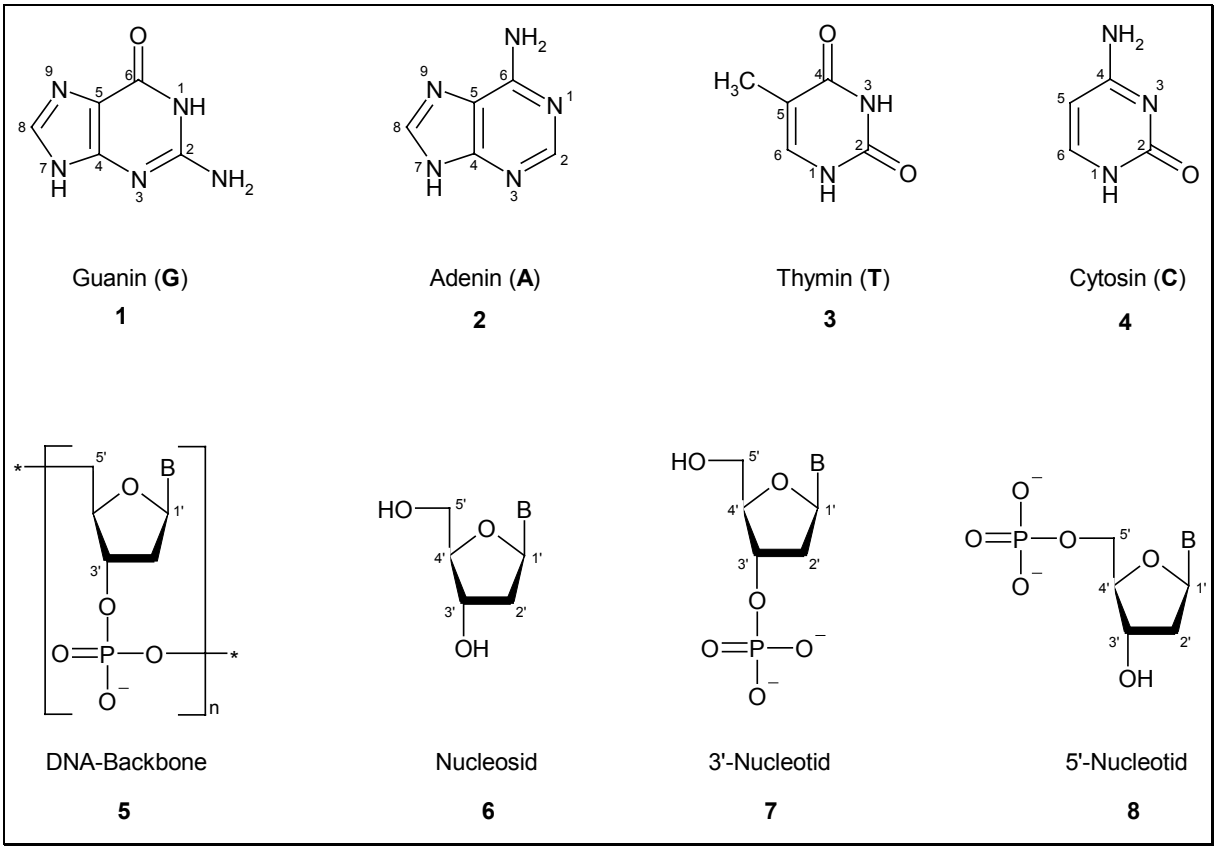


Abb. 4.1: Bausteine der DNA. B= **G**, **A**, **T** oder **C**

Die Synthese eines DNA-Stranges erfordert die Generierung von Internucleotid-Bindungen zwischen monomeren oder oligomeren Nucleotideinheiten unter Ausbildung von Phosphodiesterbrücken. Hierzu kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz, die im folgenden kurz vorgestellt werden.

4.1.1 Phosphodiesterverfahren

Das auf den Arbeiten von *Khorana*[76,77] basierende klassische *Phosphodiesterverfahren* stellt die älteste Methode dar. Bei diesem Verfahren wird ein am 5'-Terminus und an den Aminogruppen der Nucleobasen geschütztes 3'-Hydroxy-Nucleosid **9** in Gegenwart von Kondensationsreagenzien wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder Mesitylensulfonsäurechlorid (MesCl) mit einem 5'-Nucleotid **10** zu einem Phosphorsäurediester **11** kondensiert (Abb. 4.2). Die selektive Entschützung der 3'-Acetylgruppe im basischen und der 5'-DMT-Gruppe im sauren Medium erlaubt den gezielten Aufbau längerer Sequenzen. Problematisch sind jedoch sowohl die langen Reaktionszeiten des Phosphodiesterverfahrens, als auch die Nebenprodukte (z.B. das 5'-5'-Pyrophosphat) und die schlechte Löslichkeit der ionischen Reaktionsprodukte in organischen Lösungsmitteln, so dass diese Methode durch bessere (s.u.) abgelöst wurde und heute bedeutungslos ist.

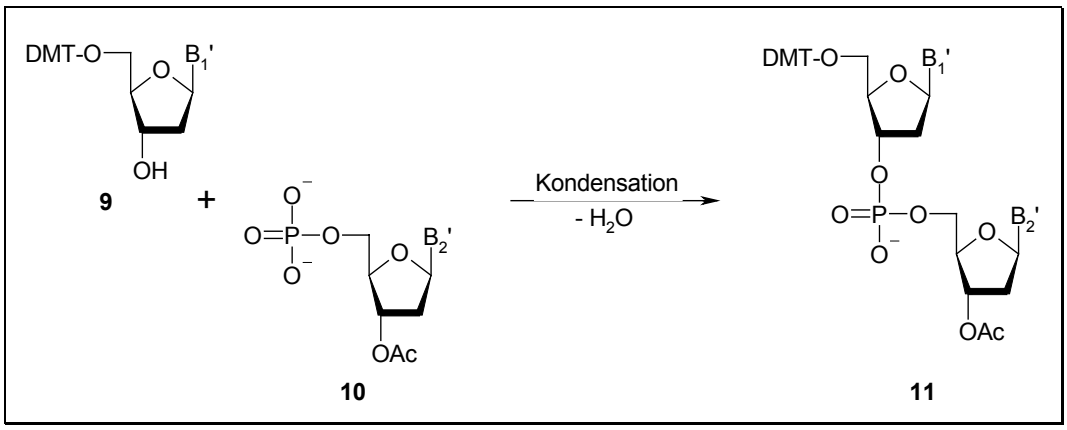


Abb. 4.2: Phosphodiesterverfahren nach *Khorana*

4.1.2 Phosphotriesterverfahren

Das *Phosphortriesterverfahren*[78,79,80] besitzt gegenüber dem Phosphodiesterverfahren den Vorteil, dass das einzuführende Nucleotid bereits als ein in organischen Lösungsmitteln gut löslicher Phosphorsäurediester vorliegt. Die dazu notwendige zusätzliche Schutzgruppeneinführung verlangt zwar einen höheren synthetischen Aufwand, der aber durch die Möglichkeit zur chromatographischen Aufreinigung der Rohprodukte und der geringeren Kopplungszeit überkompensiert wird. Unter Einsatz geeigneter Kopplungsreagenzien, wie z.B. den von *Efimov* vorgeschlagenen Arylsulfonsäurechloriden in Gegenwart O-nucleophiler Pyridin-N-Oxide als Katalysatoren[81], wird ein 5'-geschützter 3'-Phosphodiesterbaustein **12** mit einem mit 5'-Hydroxy-Baustein **13** zu einem Phosphotriester **14** kondensiert, dessen

Internucleotidverbindung gegenüber dem Aktivierungsreagenz aufgrund fehlender Nucleophilie inert ist (Abb. 4.3).

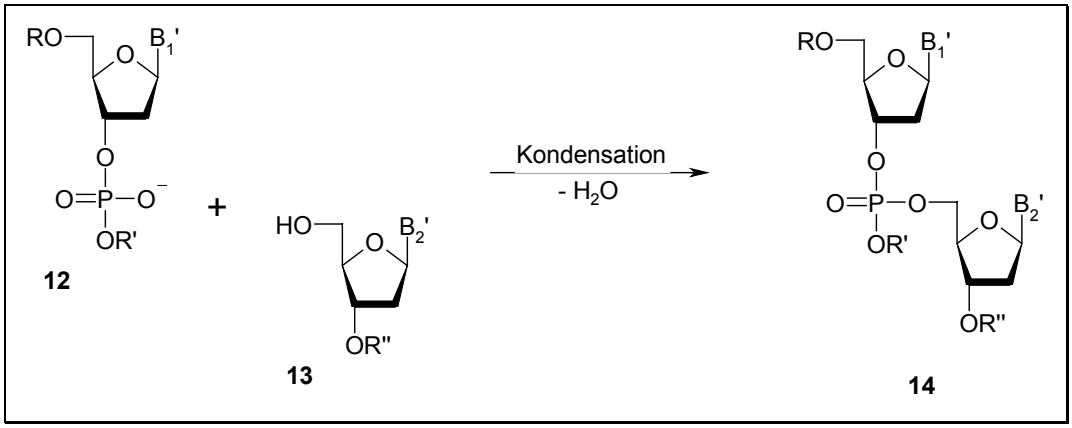


Abb. 4.3: Phosphotriesterverfahren

4.1.3 Phosphit- und Phosphoamiditverfahren

Bemühungen die Reaktionszeit weiter zu minimieren führten zum *Phosphitverfahren*, das auf den Arbeiten von *Letsinger*[82,83] beruht. Hierbei wird ein 3'-Hydroxynucleosid mit Hilfe von hochreaktiven Chlorphosphiten zu **15** phosphoryliert und dann mit einem 5'-Hydroxy-nucleosid **16** zu einem Triester **17** gekoppelt, dessen dreiwertiger Phosphor der Phosphit-internucleotidbindung anschließend in Gegenwart wässriger Iodlösung zum fünfwertigen Phosphor des korrespondierenden Phosphotriesters **18** oxidiert wird (Abb. 4.4).

Angesichts der Oxidations- und Hydrolyseempfindlichkeit der sehr reaktiven Chlorphosphite entwickelte *Caruthers* das *Phosphoamiditverfahren*[84,85,86]. Dieses profitiert gegenüber dem Phosphitverfahren aufgrund der Substitution des Chlors durch ein sekundäres Amin (z.B. N,N-Diisopropylamin) von der besseren Handhabbarkeit und Stabilität der reaktiven dreiwertigen Intermediate. Die aktivierten, am Amiditstickstoff protonierten Phosphoamidite werden in Gegenwart organischer Basen (Pyridin oder Collidin) zu Estern der phosphorigen Säure **17** umgesetzt und anschließend unter Bildung der entsprechenden Phosphotriester **18** oxidiert[87,88] (Abb. 4.4). Das Phosphoamiditverfahren wird insbesondere bei der automatisierten Festphasensynthese am DNA-Synthesizer verwendet, auf die später genauer eingegangen wird.

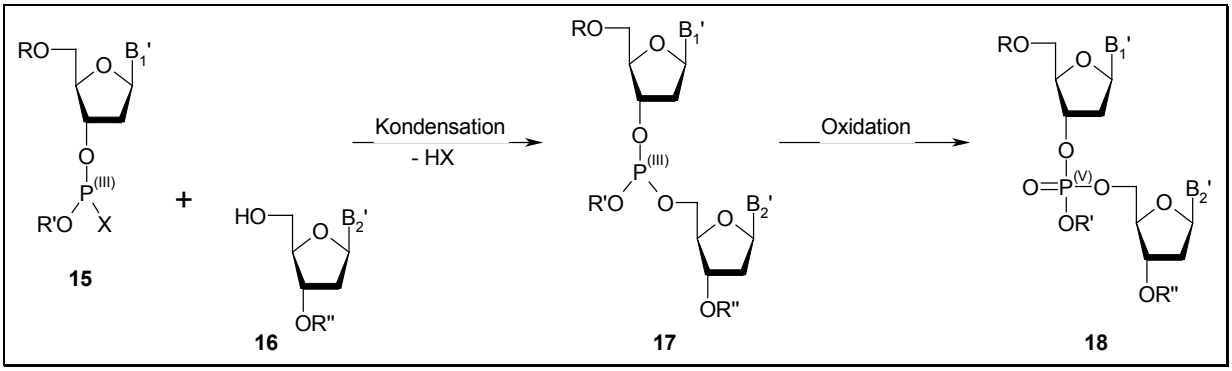


Abb. 4.4: Phosphit- (X=Cl) bzw. Phosphoamiditverfahren ($X=NR_2$)

4.1.4 H-Phosphonatverfahren

Das *H-Phosphonatverfahren*[89] hat als Festphasensynthese für Oligonucleotide und insbesondere RNA Bedeutung erlangt. Hierbei wird ein geschütztes H-Phosphonat **19** durch Säurechloride aktiviert und mit einem 5'-Hydroxybaustein **20** gekoppelt. Die folgende Oxidation überführt den Nucleosid-H-phosphonsäurediester **21** in das entsprechende Phosphat **22**. Da die Oxidation am Ende der Reaktionsabfolge liegt, ist keine Phosphatschutzgruppe erforderlich (Abb. 4.5).

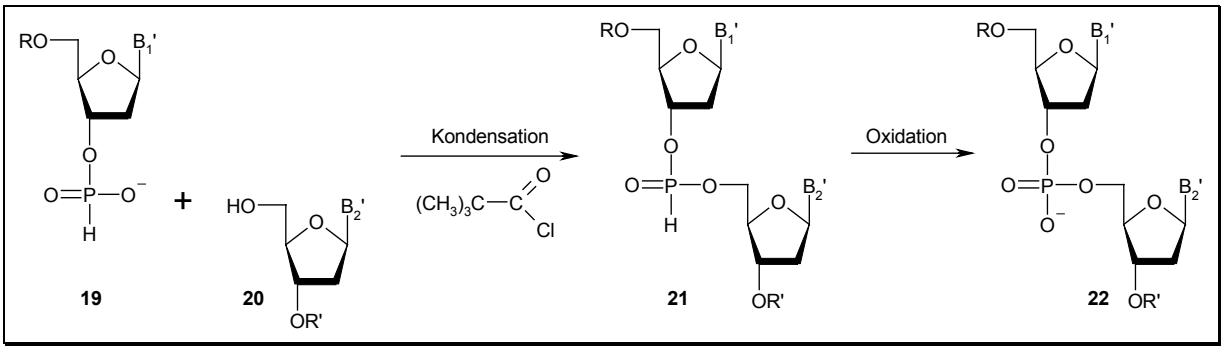


Abb. 4.5: H-Phosponatverfahren

4.1.5 DNA-Schutzgruppen

Voraussetzung für eine nebenreaktionsarme Synthese sind Kopplungsschritte, in denen sämtliche nicht an der Ligationsreaktion teilnehmenden Funktionalitäten durch Schutzgruppen reversibel blockiert sind (Abb. 4.6), die später wieder entfernt werden können. Exocyclische Aminogruppen werden hierzu nach *Khorana*[90] acyliert, wobei für die Basen Cytosin **23** und Adenin **24** die Benzoyl-, für Guanin **25** dagegen die Isobuturylschutzgruppe Verwendung findet. Aufgrund der fehlenden exocyclischen Aminofunktion ist für Thymidin keine Blockierung notwendig. Die Einführung der Acylschutzguppen bewirkt eine Erhöhung

der Lipophilie und somit auch der Löslichkeit der geschützten Verbindungen in organischen Lösungsmitteln. Des weiteren sind die schnell abspaltbare Phenoxyacetyl- (PAC)[91,92,93], die durch Palladiumreagenzien abspaltbare Allyloxycarbonyl- (AOC)[94,95,96] und die Npeoc/Npe-Schutzgruppe[97,98] in Gebrauch. Die 5'-Hydroxyfunktion der Deoxyribose wird meist mit der säurelabilen 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe nach *Khorana*[90] reversibel blockiert (**A**). Über die Auswahl der geeigneten Phosphatschutzgruppe entscheidet die verwendete Kondensationsmethode. Die β-Cyanoethylschutzgruppe[78-80],[82-86] (**B**) wird sowohl im Phosphotriester- als auch im Phosphoamiditverfahren verwendet und wird durch basenkatalysierte β-Eliminierung im finalen Deblockierungsschritt entfernt, wohingegen die o-Chlorphenylschutzgruppe (**C**) nur im Phosphotriesterverfahren Anwendung findet und mit Tetrabutylammoniumfluorid nach *Miller*[99] abgespalten wird.

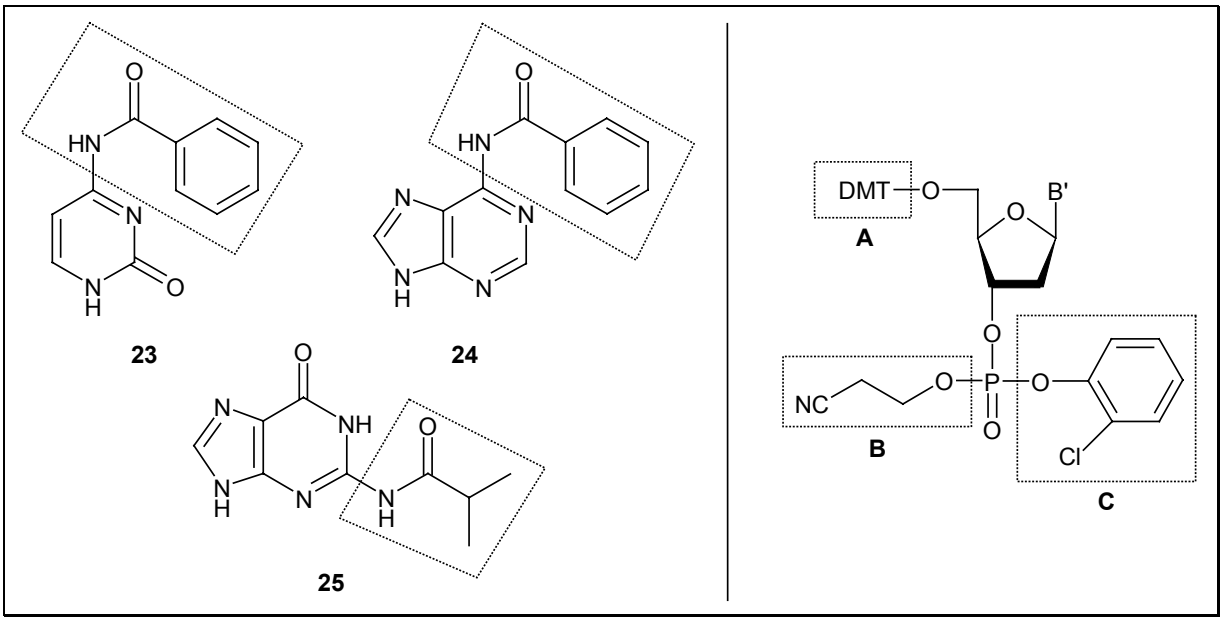


Abb. 4.6: DNA-Schutzgruppen

4.1.6 Automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden

Der Transfer des Peptidfestphasensyntheseprinzips nach *Merrifield*[100,101] auf die Oligonucleotiddarstellung führte zu einer deutlichen Beschleunigung der Reaktionen gegenüber der Flüssigphasensynthese[102]. Moderne Synthesemethoden bedienen sich des H-Phosphonat- oder insbesondere des Phosphoamiditverfahrens an der festen Phase (Abb. 4.7). Die einzelnen Schritte der Festphasensynthese bestehen primär aus Filtrations- und Spülvorgängen und lassen sich weitestgehend automatisieren, so dass die Oligonucleotidsynthese heute bevorzugt an DNA-Synthesizern stattfindet[103].

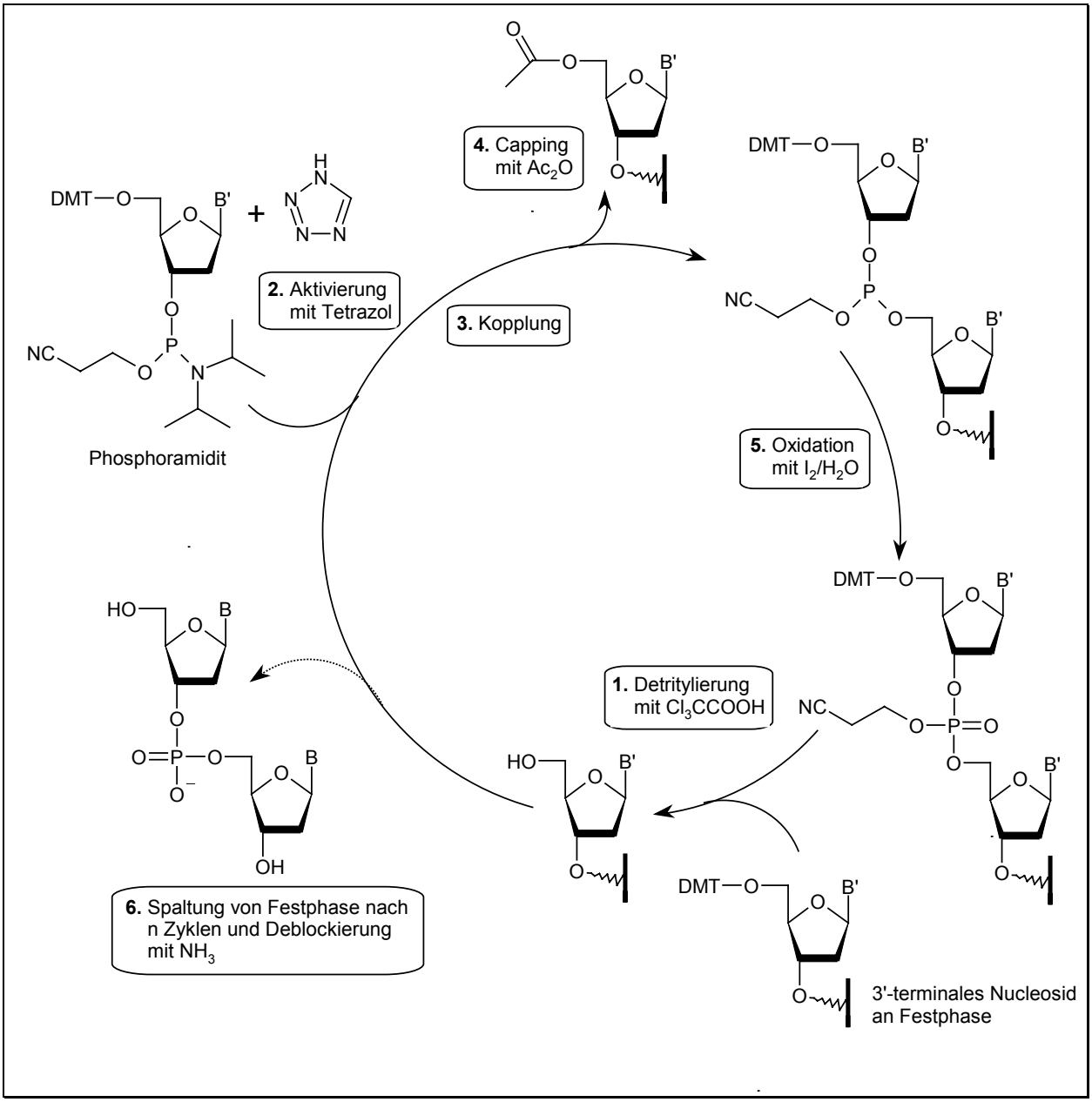


Abb. 4.7: Prinzip der automatisierten Festphasensynthese am DNA-Synthesizer nach dem Phosphoamiditverfahren

Basis dieser Methode sind organische Polymere oder CPG (controlled pore glass), die als unlösliche Trägermaterialien in der Lage sind über geeignete Linker (z.B. Succinatgruppe) Nucleoside am 3'-Ende zu immobilisieren. Da vorbereitete Festphasen mit 3'-terminalen Nucleosiden im Handel erhältlich sind, ist die manuelle Verankerung des ersten Nucleotids meist nicht notwendig. Dieser immobilisierte und 5'-terminal mit einer Dimethoxytritylschutzgruppe (DMT-Schutzgruppe) versehene Nucleosidbaustein wird zunächst im Sauren detrityliert (Schritt 1). Der so deblockierte Baustein wird daraufhin mit einem als Tetrazolid aktivierten Phosphoamidit (Schritt 2) zum 5'-terminal geschützten Dinucleotid gekoppelt (Schritt 3). Für die Tetrazol-Katalyse wird der von *Seliger*[104] und

Dahl[105] postulierte Mechanismus allgemein anerkannt (Abb. 4.8). Als weitere Aktivierungsreagenzien kommen neben Tetrazol auch Ethylthio-1H-tetrazol, Pyridiniumsalze oder 4,5-Dicyanoimidazol in Frage.[106,107]

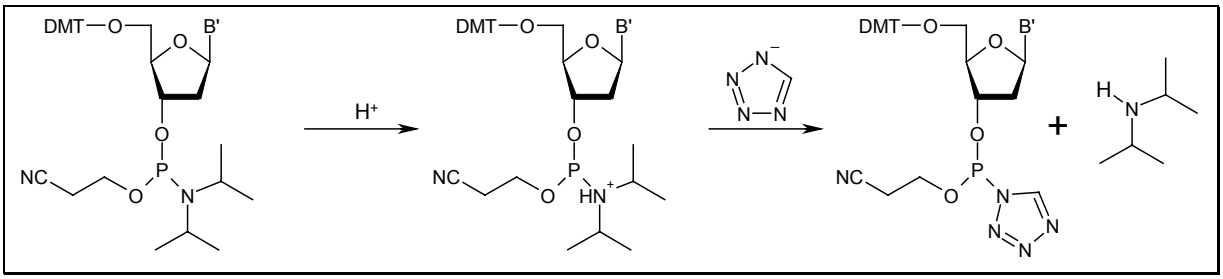


Abb. 4.8: Mechanismus der Tetrazol-Katalyse

Durch sogenanntes Capping (Acetylierung mit Acetanhydrid) werden die primären 5'-Hydroxyfunktionen nicht umgesetzter, trägergebundener Nucleoside irreversibel vor nun unerwünschten Reaktionen geschützt (Schritt 4). Diese Nebenprodukte, auch Deletionsmutanten genannt, müssen am Ende der Synthese z.B. chromatografisch vom Produkt abgetrennt werden. Die Oxidation des dreiwertigen Phosphors des Kopplungsproduktes zum fünfwertigen Phosphor mit wässriger Iodlösung führt zum entsprechenden Phosphotriester und schließt den ersten Synthesecyclus ab (Schritt 5). Mit Abspaltung der DMT-Schutzgruppe im Sauren, deren UV-Absorption bei 500 nm zur quantitativen Kopplungsausbeutenbestimmung nach jedem Kopplungsschritt verwendet werden kann, leitet man einen neuen Synthesecyclus ein. Durch Wahl geeigneter Phosphoamidite lassen sich so Oligomere beliebiger Sequenz erzeugen. Zum Abschluss der Synthese wird das Oligomer mittels ammoniakalischer Lösung vom Träger abgespalten, wobei gleichzeitig die Schutzgruppen an den exocyclischen Aminofunktionen der Heterobasen und den Phosphotriestern entfernt werden (Schritt 6). Nach Aufreinigung des Rohproduktes erhält man das gewünschte Oligomer. Hohe Ausbeuten und ein immenser zeitlicher Vorteil gegenüber der Flüssigphasensynthese sicherten der automatisierten Festphasensynthese ihren heute bevorzugten Platz bei Oligonucleotidsynthesen im µmol-Maßstab.

Die für diese Arbeit verwendeten Dimere wurden aus Kostengründen nach dem Phosphotriesterverfahren in der Variante nach *Efimov* synthetisiert, das kurze Kopplungszeiten mit guten Ausbeuten verbindet. Die Template und weitere 5'-Amino bzw. 3'-Phosphat funktionalisierte Oligomere wurden in kleineren Mengen durch Festphasensynthese am DNA-Synthesizer nach dem Phosphoamiditverfahren generiert.

4.2 Synthese der 5'-Amino- und 3'-Phosphat-Oligomere nach dem Phosphoamiditverfahren

Während für die Herstellung von Templatbausteinen mit 5'- und 3'-Hydroxytermini das Standardprotokoll des DNA-Synthesizers mit den Standard-Phosphoamiditen und mit 3'-terminalen Nucleosiden versehene käufliche Festphasen verwendet werden können, erfordert die Synthese von Oligonucleotiden mit 3'-Phosphatenden die Verwendung einer speziell modifizierten CPG-Festphase[108] (**26**) (Abb. 4.9). Diese wird im Rahmen eines DNA-Synthesizer Synthesezyklus zunächst detrityliert und dann mit einem aktivierten Phosphoamidit zu **29** gekoppelt. Der nachfolgende Sequenzaufbau erfolgt wie bereits geschildert (Kap. 4.1.6). Während der basischen Spaltung von der Festphase am Ende der Synthese wird der 3'-Phosphatterminus von **31** durch β-Eliminierung unter Bildung eines Vinylsulfons und Acrylnitril freigesetzt.

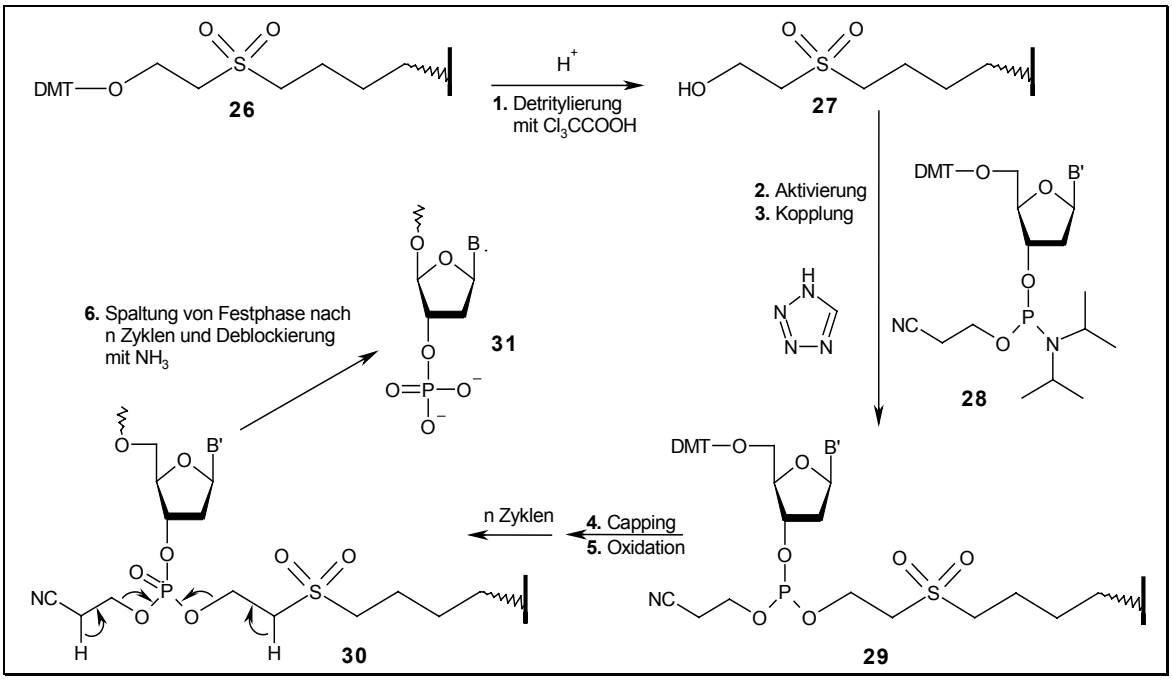


Abb. 4.9: Festphasensynthese von 3'-Phosphat-Oligomeren

Die Generierung von 5'-Amino funktionalisierten Oligomeren im Zuge des automatisierten Phosphoamiditverfahrens gelingt durch den Einsatz von 5'-MMT-Amino-Phosphoamiditen, die in Acetonitril gelöst als letztes Nucleotid der DNA-Synthese gekoppelt werden. Die Synthese eines solchen modifizierten Phosphoamidits sei am Beispiel des Cytidins demonstriert.

Die exozyklische Aminogruppe der Nucleobase des käuflichen 2'-Deoxycytidins **32** wird nach *Jones*[109] mit einer Benzoylgruppe geschützt (Abb. 4.10). Hierzu werden zunächst die Hydroxygruppen durch Silylierung mit Trimethylsilylchlorid zu **33** blockiert, dann die Aminofunktion mit Benzoylchlorid zu **34** umgesetzt und die Silylether anschließend unter basisch-wässrigen Bedingungen zu **35** hydrolysiert.

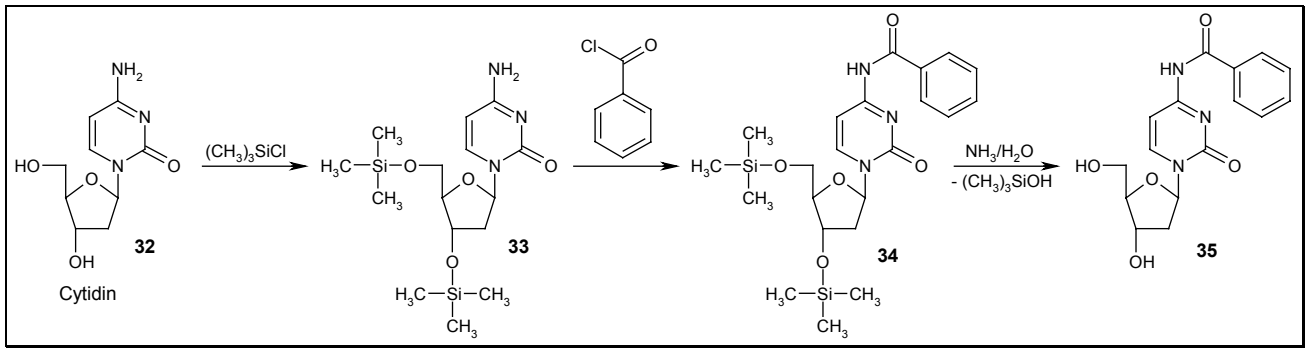


Abb. 4.10: Transient-Protection nach *Jones* zur Schützung der exocyclischen Aminogruppe mit Benzoylchlorid

Die 5'-Hydroxyfunktion von **35** wird nach *Hata*[110] in das Azid **36** überführt und daraufhin nach *Staudinger* mit Triphenylphosphin zum Amin **37** reduziert[70,111]. Die Aminogruppe kann mit MMT-Cl geschützt werden[110] (**38**). Zuletzt erfolgt die Kopplung mit dem Phosphitylierungsreagenz **39**, das wiederum aus Phosphortrichlorid, 3-Hydroxypropionitril und Diisopropylamin hergestellt wird[112]. Das so hergestellte 5'-MMT-Amino-C-Phosphoamidit **40** kann für die Kopplung in der automatisierten Festphasensynthese eingesetzt werden (Abb. 4.11).

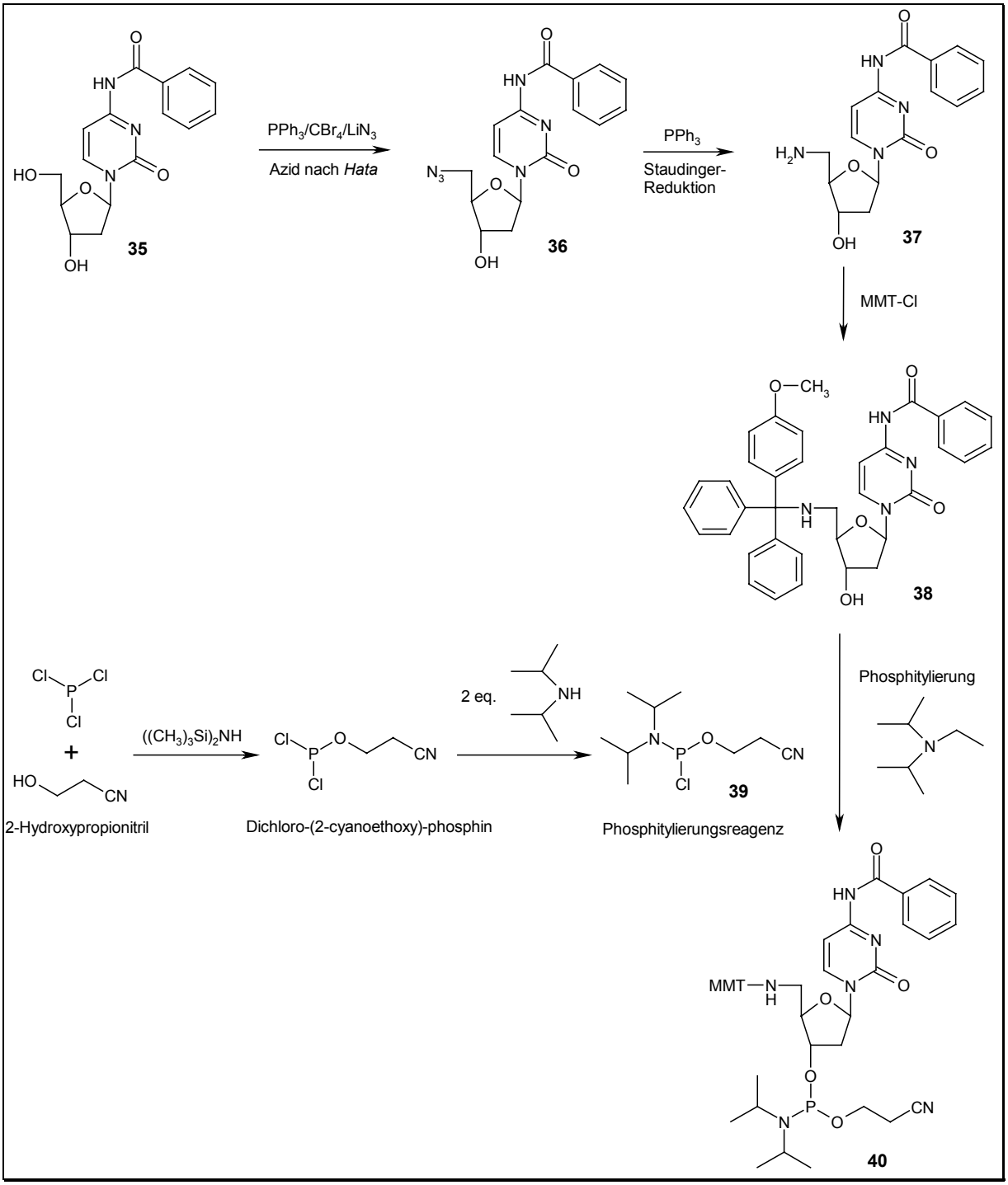


Abb. 4.11: Darstellung von 5'-MMT-Amino-C-Phosphoamidit für die automatisierte Festphasensynthese

Die mit Hilfe des DNA-Synthesizers unter Einsatz der oben beschriebenen Methoden generierten Template und 5'- bzw. 3'-modifizierten Oligomere sind in Kap. 2.5 des experimentellen Teils aufgelistet und charakterisiert.

4.3 Synthese der 5'-3'-geschützten Dimere

Die vier 5'-3'-geschützten Pyrimidin-Purin-Dimere wurden in Form von 5'-Azidodideoxynucleotid-3'-phenylthioethylphosphaten nach einer Synthesestrategie von *J. Helbing*[113] von *M. Scheffler*[114] im Phosphotriesterverfahren hergestellt. Der erste Teil der Synthese bestand in der Generierung der für die spätere *Efimov*-Kopplung benötigten funktionalisierten monomeren Nucleotide **49**,**50** (Übersicht in Abb. 4.12).

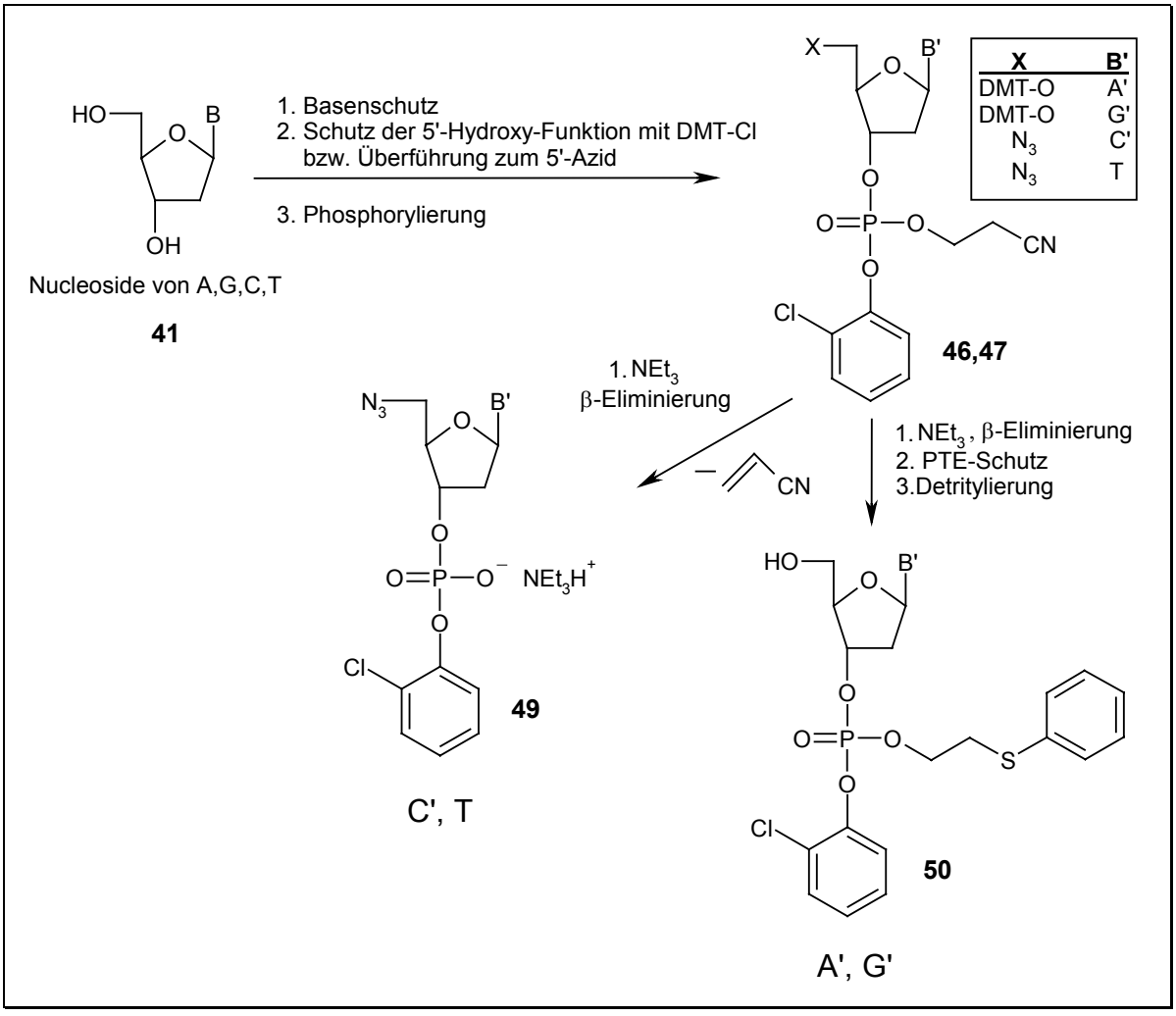


Abb. 4.12: Syntheseübersicht der funktionalisierten monomeren Nucleotide

Im zweiten Teil wurden die Monomere nach *Efimov* gekoppelt und die entstandenen Dimere anschließend bis zur 5'-3'-geschützten Form **52** deblockiert (Übersicht in Abb. 4.13). Die einzelnen Syntheseschritte werden im folgenden näher erläutert.

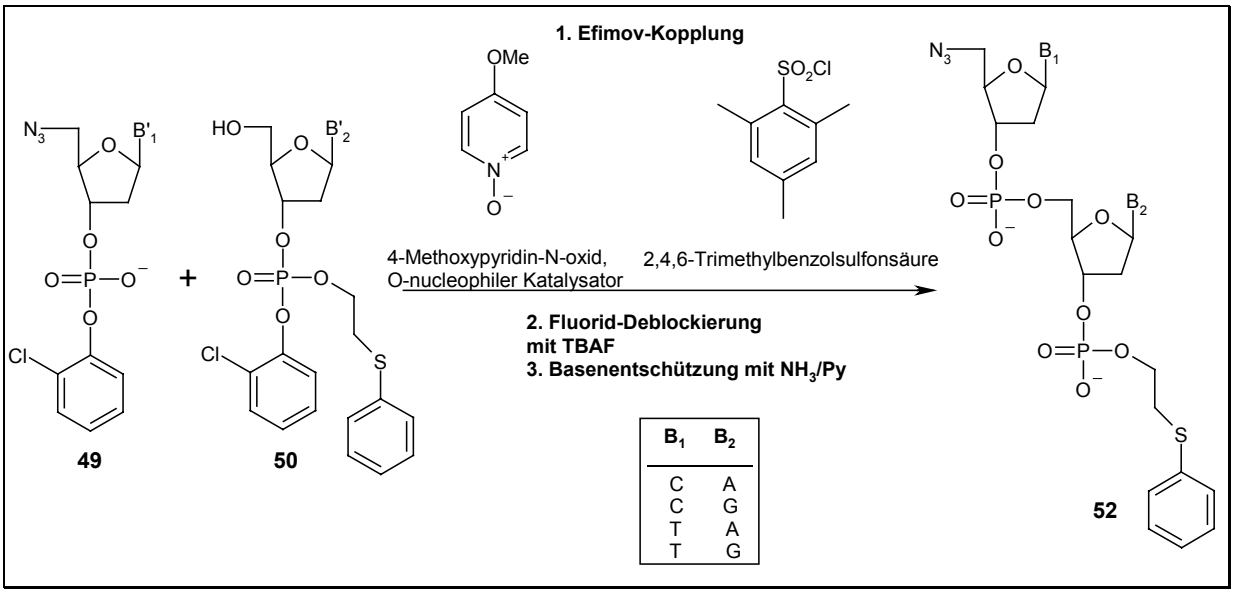


Abb. 4.13: Kopplung der funktionalisierten Monomere und Entschützung

Zunächst wurden die exocyclischen Aminofunktionen der Heterobasen der käuflichen Nucleoside **41a-c** über das 'Transient-Protection'-Eintopfverfahren nach *Jones*[109] durch N-Acylierung geschützt (Abb. 4.14), was beim Thymidin entfällt. Hierzu erfolgt zunächst der Schutz der OH-Gruppen durch Silylierung mit Trimethylsilylchlorid (1), anschließende Acylierung der exocyclischen Aminofunktionen mit Benzoylchlorid oder Isobuttersäureanhydrid (2) und schließlich die Hydrolyse der Silylether unter basisch-wässrigen Bedingungen (3).

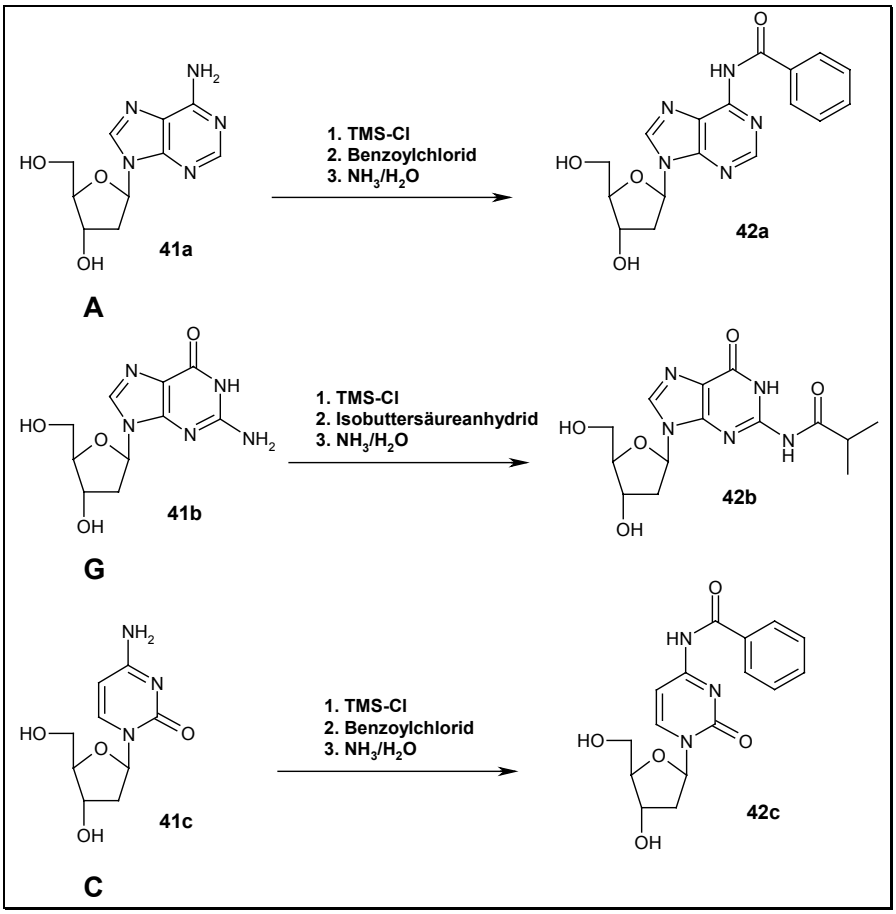


Abb. 4.14: Transient-Protection-Eintopfverfahren nach *Jones* zum Schutz der exocyclischen NH_2-Funktionen

Anschließend wurden dann die 5'-Hydroxyfunktionen der Purin-Nucleoside **42a,b** durch Veretherung mit 4,4'-Dimethoxy-tritylchlorid[115] (**43**) und die der Pyrimidin-Nucleoside **42c,d** durch Überführung in die entsprechenden 5'-Azidoverbindungen **44** nach *Hata*[110] geschützt (Abb. 4.15).

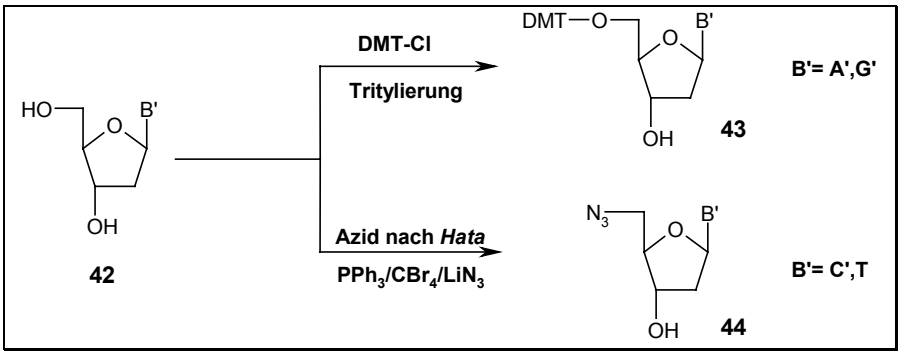


Abb. 4.15: Schutz der 5'-Hydroxyfunktionen

Die erhaltenen Nucleosidderivate **43,44** wurden nach *Efimov*[81] an der 3'-Hydroxygruppe zu den Phosphorsäuretriestern **46,47** phosphoryliert, wobei 2,4,6-Trimethyl-benzolsulfonsäurechlorid (MesCl) als Aktivator und 4-Methoxypyridin-N-oxid als O-nucleophiler Katalysator zum Einsatz kam (Abb. 4.16).

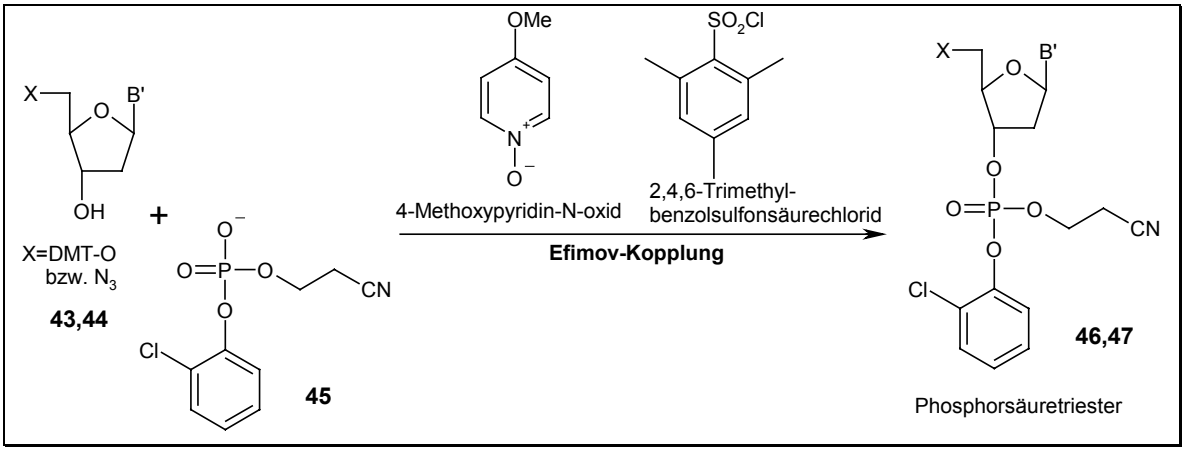


Abb. 4.16: Phosphorylierung der Nucleosidderivate nach *Efimov*

Das Phosphorylierungsreagenz Triethylammonium-(o-chlorphenyl,ß-cyanoethyl)-phosphat **45** wurde auf dem Wege der Umsetzung von Phosphorylchlorid mit 2-Chlorphenol, nachfolgender Veresterung mit 2-Hydroxypropionitril und abschließender β-Eliminierung der Cyanoethylgruppe unter Abspaltung von Acrylnitril nach Zugabe von Triethylamin gewonnen[116] (Abb. 4.17).

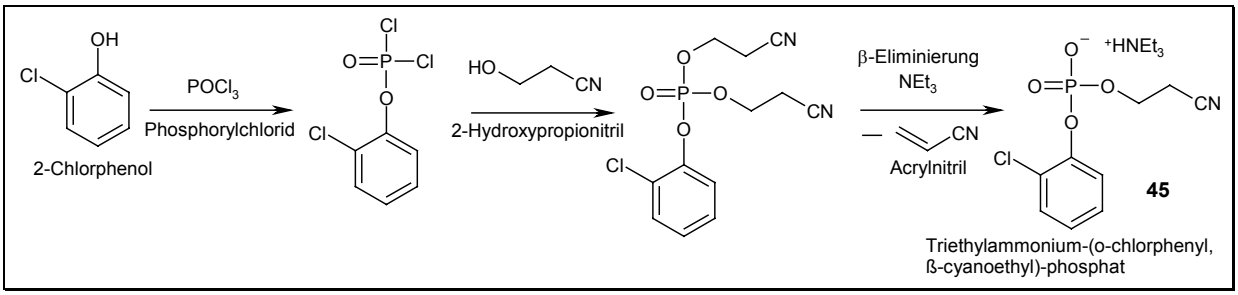


Abb. 4.17: Synthese des Phosphorylierungsreagenzes

Die Decyanoethylierung der Phosphorsäuretriester **46,47** erfolgte ebenfalls über basenkatalysierte β-Eliminierung mittels NEt_3[115] und führte zu den monomeren Phosphodiestern **48,49**. Die purinhaltigen Monomere wurden als zukünftige Schwanzbausteine zusätzlich unter *Efimov*-Bedingungen, die sich gut zur Kopplung von Alkoholen an Phosphate eignen, mit

Phenylthioethanol verestert[117] und anschließend durch säurekatalisierte Detritylierung in die reaktiven 5'-Hydroxyverbindungen **50a,b** überführt (Abb. 4.18).

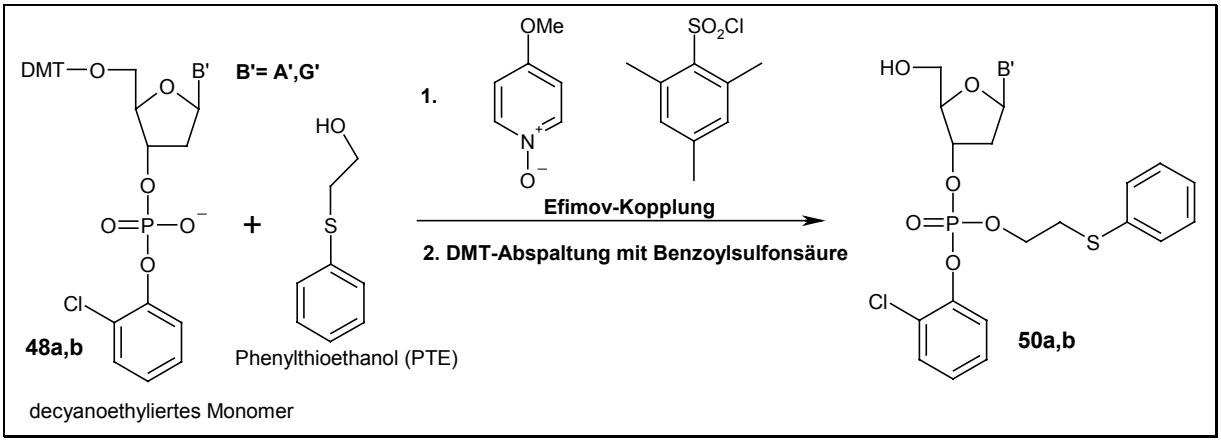


Abb. 4.18: PTE-Schutzgruppeneinführung und Detritylierung der purinhaltigen Monomere

Die funktionalisierten monomeren Pyrimidinnucleotiddiester **49a,b** setzte man mit den 5'-Hydroxypurinnucleotidtriestern **50a,b** mittels *Efimov*-Kopplung zu den vollgeschützten Dimeren **51** um[89] (Abb. 4.20).

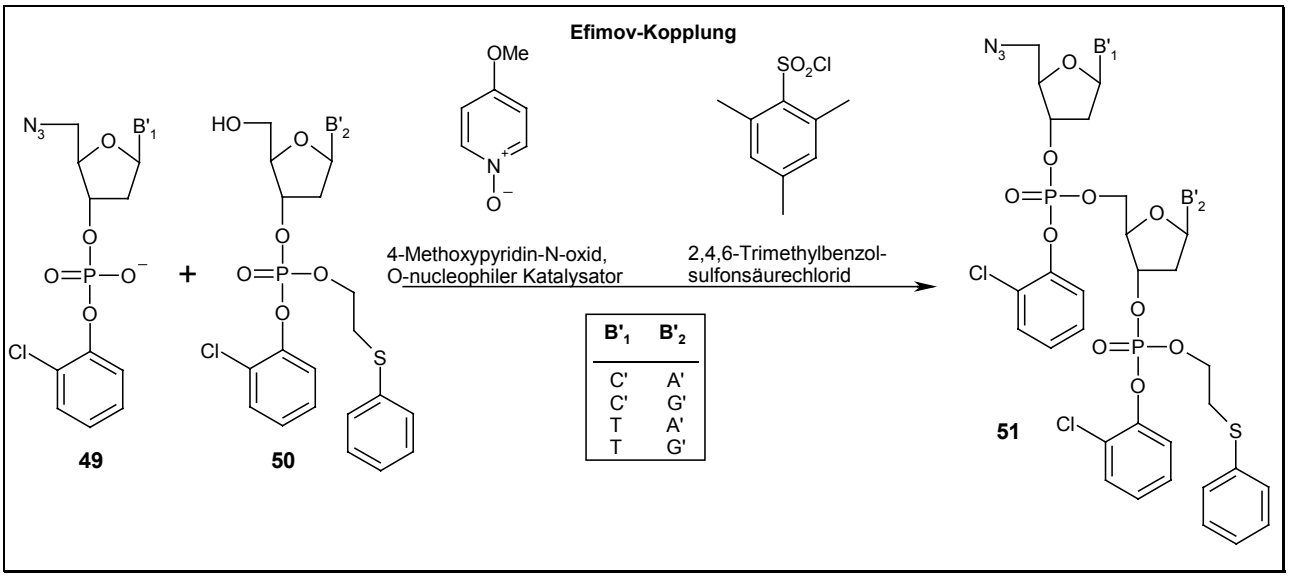


Abb. 4.19: *Efimov*-Kopplung der funktionalisierten Monomere zu den vollgeschützten Dimeren

Die anschließende Fluoriddeblockierung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF), bei der das o-Chlorphenolat durch ein Fluoridion nucleophil substituiert wird, führte nach anschließender hydrolytischer Spaltung zur Freisetzung der Phosphodiester. Durch Entschützung der Nucleobasen über N-Deacylierung mit Ammoniak erhielt man die 5'-3'-geschützten Dimere **52** (Abb. 4.20).

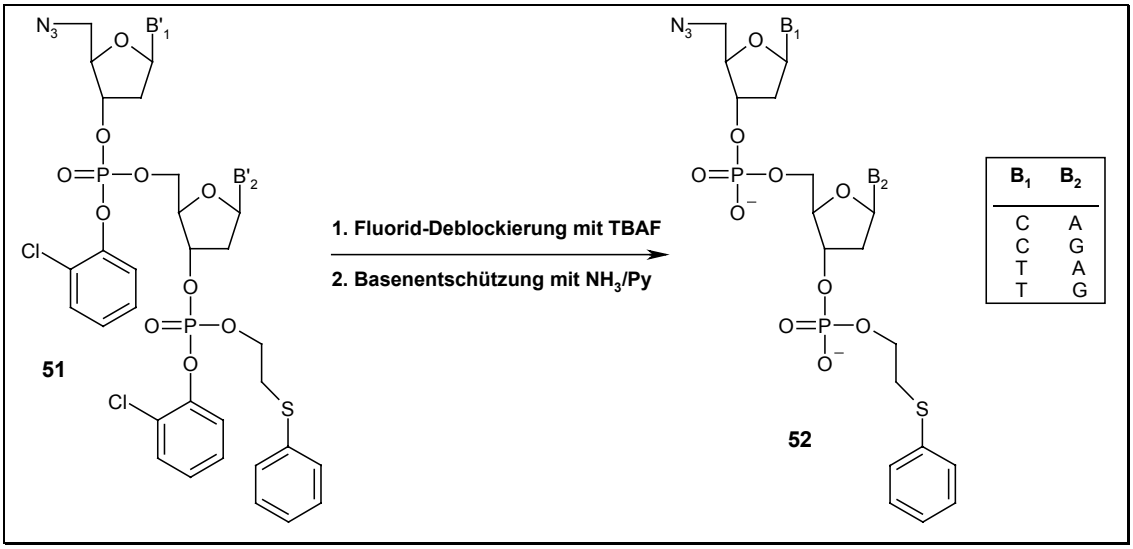


Abb. 4.20: Deblockierung der vollgeschützten Dimeren zu den 5'-3'-geschützten Dimeren

4.4 5'-3'-Deblockierung der Dimere

Für die Verwendung der Dimere in Replikationskinetiken sollte ein Teil der 5'-3'-endständig-geschützten Bausteine **52** in die 5'-geschützten Dimere **53**, ein anderer in die 3'-geschützten Dimere **55** und ein weiterer Teil in die vollständig 5'-3'-entschützten Dimere **56** überführt werden.

Die Umwandlung der 5'-Azidogruppe zum Amin erfolgte durch die *Staudinger* Reduktion mit 6 Äquivalenten Triphenylphosphin in 32% NH_3-Lösung/Pyridin (4:3)[70,111]. Nach 18h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das angefallene Triphenylphosphinoxid ($OP(Ph)_3$) mit Diethylether extrahiert. Die Aufreinigung erfolgte chromatografisch und lieferte 96% Ausbeute.

Die Entfernung der PTE-Gruppe gelang durch Oxidation des Thioethers in TEAB mit 0.1 M Periodat und anschließender β-Eliminierung des entstandenen Phenylvinylsulfoxids mit 2 M Natronlauge sowie nachfolgender Neutralisierung mit Essigsäureanhydrid[117]. Die 3'-entschützten Produkte wurden chromatografisch an DEAE-Sephadex gereinigt. Nach Aufreinigung erhielt man die Produkte in max. 89%iger Ausbeute.

Ausgehend vom beidseitig geschützten Edukt **52** war zur Generierung des beidseitig entschützten Produkts sowohl die Reduktion des 3'-entschützten Dimers **55**, als auch die Oxidation des 5'-entschützten Dimers **53** gangbar. Gewählt wurde der Weg über die Reduktion des Oxidationsproduktes **55**, weil die deutlich aufwendigere Aufarbeitung der Oxidationsprodukte so nur einmal anfiel (Abb. 4.21).

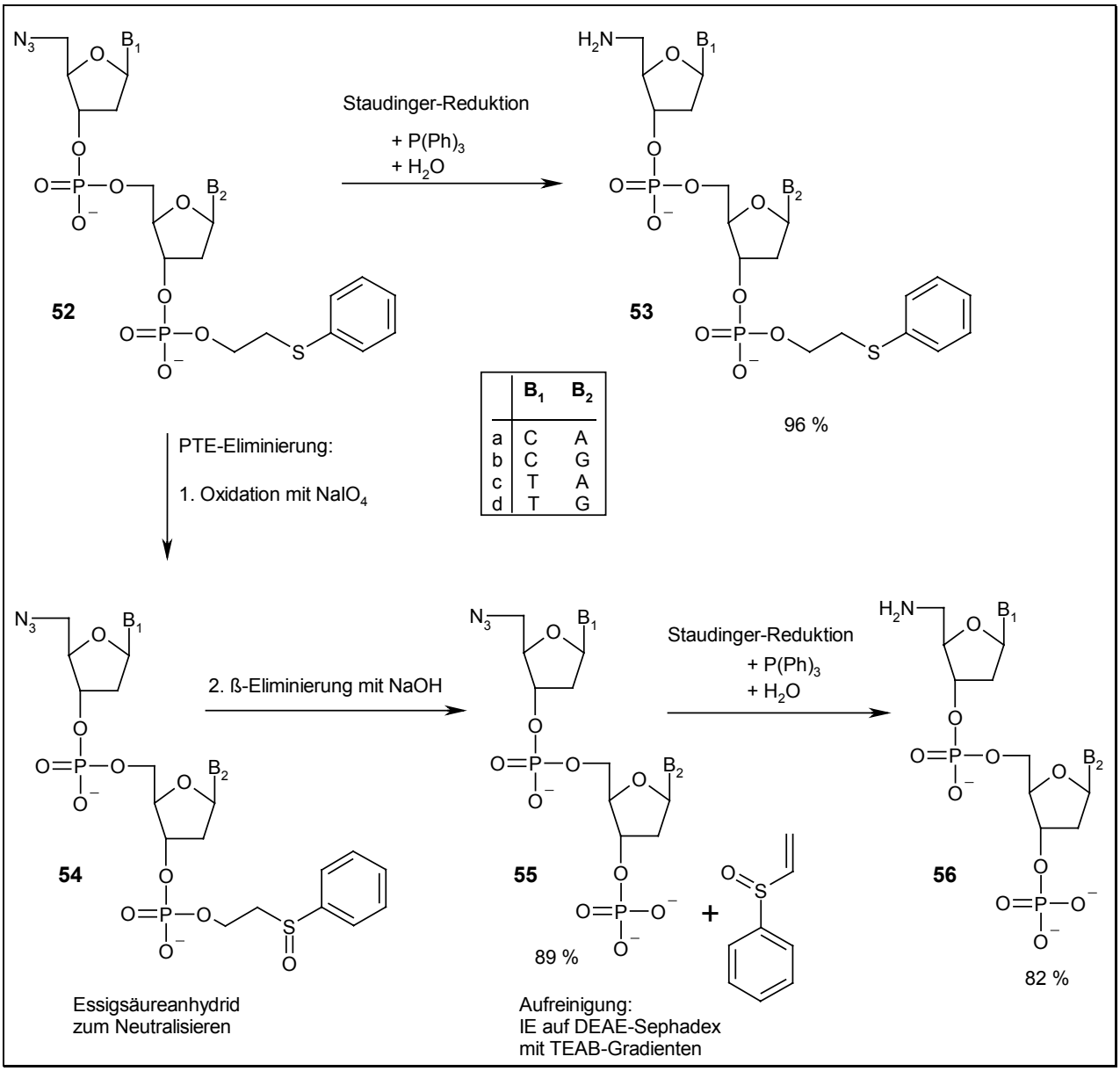


Abb. 4.21: Entschützungsstrategie für die Deblockierung der 5'-N_3-3'-PTE-geschützten Dimere

Während die Aufreinigung der Oxidationsprodukte bei Testsynthesen im kleineren Maßstab von 10 µmol Edukt problemlos gelang, zeigten die präparativen Umsetzungen mit 500 µmol Edukt problematisches Verhalten bezüglich der Aufnahmekapazität der präparativen DEAE-Ionenaustauschersäule. Diese war zwar prinzipiell zur Absorption der Produktmenge fähig,

nicht aber bei der hohen Ionenstärke der Lösung, die durch die während der Neutralisierung angefallenen großen Mengen an Natriumacetat bedingt war. Die Überladung der Säule durch die hohe Salzfracht führte zum sofortigen Durchbrechen des Produktes mit der Lösungsmittelfront.

Da eine Aufteilung der Eduktmengen auf jeweils ca. 50 Aufreinigungsvorgänge nicht praktikabel war und alternative Reinigunsmethoden wie z.B. Gel-Permeationschromatografie mit Sephadex G10, Dialyse und RP-HPLC mit NH_4HCO_3-Gradienten aufgrund der geringen Sequenzlänge der dimeren Oligomere scheiterten, wurde die Ionenstärke der Lösung durch Verdünnung auf ca. 12 l soweit heruntergesetzt ([NaAc]= 0.05 M), dass ein langsames Auftragen des zu reinigenden Produktes auf die DEAE-Säule innerhalb von 40h pro Dimer und anschließende Elution mit TEAB-Gradientem möglich war.

Die einseitig entschützten 5'-Amino-3'-PTE-Dimere **53** und 5'-Azido-3'-Phosphat-Dimere **55**, sowie die vollentschützten 5'-Amino-3'-Phosphat-Dimere **56** wurden verdünnt, auf mehrere Eppendorf-Gefäße aufgeteilt und bei -24 °C gelagert.

5. Durchführung und Auswertung der Kinetik-experimente

5.1 Konzentrationsbestimmung durch UV-Spektroskopie

Die Konzentrationen der synthetisierten und aufgereinigten Bausteine wurden durch Messung der UV-Extinktion bei 254 nm bestimmt. Hierzu wurde der Lösung des entsprechenden Bausteines ein definiertes Volumen entnommen und mit H_2O auf das jeweilige Küvettenvolumen aufgefüllt, welches für normale 10 mm Küvetten 3 ml und für die bei Substanzmengen im nmol-Bereich eingesetzte Suprasil-Küvette 100 µl betrug. Die Messung der Extinktion bei $\lambda = 254$ nm gegen eine H_2O-Referenzküvette lieferte nach Anwendung des *Lambert-Beer*'schen Gesetzes die Konzentration der Stammlösung, die daraufhin bei -24 °C gelagert wurde.

$\mathbf{E = c \cdot \varepsilon \cdot d}$	E: Extinktion c: Konzentration [$mol \cdot l^{-1}$] ε: Extinktionskoeffizient [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$] d: Küvettendicke [cm]

Gleichung 5.1: *Lambert-Beer*'sches Gesetz

Unter Annahme, dass die Extinktion der Nucleosidmonophosphate durch die Heterobasen erfolgt, die Extinktion der Azido-Schutzgruppe vernachlässigbar klein ist und Hypochromizitätseffekte bei kleinen Konzentrationen ebenfalls vernachlässigbar sind, lassen sich die zur Berechnung der Konzentrationen benötigten Extinktionskoeffizienten der Oligonucleotide durch Addition der Extinktionskoeffizient-Inkremente aus Tab. 5.1 berechnen (siehe auch Kap. 1.1.2, experimenteller Teil).

Nucleosidmonophosphat / Schutzgruppe	Extinktionskoeffizient ε_{254} [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]
CMP	6541
GMP	13679
TMP	7250
AMP	13200
PTE	8104

Tab. 5.1: Extinktionskoeffizient-Inkremente bei $\lambda = 254$ nm und pH 7

Auf dieser Basis erhält man die in Tab. 5.2 aufgeführten Gesamtextinktionskoeffizienten für die einzelnen Oligonucleotide, die für die Konzentrationsbestimmung verwendet werden.

Verbindung	Kurzform	ε_{254} [l·mol^{-1}·cm^{-1}]
^{N_3}**CA**^{PTE}	-/-	27845
^{N_3}**CG**^{PTE}	-/-	28324
^{N_3}**TA**^{PTE}	-/-	28554
^{N_3}**TG**^{PTE}	-/-	29033
^{N_3}**CA**$^{PO_4^{2-}}$	^{N_3}**CA**^{p}	19741
^{N_3}**CG**$^{PO_4^{2-}}$	^{N_3}**CG**^{p}	20220
^{N_3}**TA**$^{PO_4^{2-}}$	^{N_3}**TA**^{p}	20450
^{N_3}**TG**$^{PO_4^{2-}}$	^{N_3}**TG**^{p}	20929
^{NH_2}**CA**^{PTE}	^{n}**CA**^{pte}	27845
^{NH_2}**CG**^{PTE}	^{n}**CG**^{pte}	28324
^{NH_2}**TA**^{PTE}	^{n}**TA**^{pte}	28554
^{NH_2}**TG**^{PTE}	^{n}**TG**^{pte}	29033
^{NH_2}**CA**$^{PO_4^{2-}}$	^{n}**CA**^{p}	19741
^{NH_2}**CG**$^{PO_4^{2-}}$	^{n}**CG**^{p}	20220
^{NH_2}**TA**$^{PO_4^{2-}}$	^{n}**TA**^{p}	20450
^{NH_2}**TG**$^{PO_4^{2-}}$	^{n}**TG**^{p}	20929
^{HO}**TGTG**^{OH}	^{HO}**(TG)$_2$**^{OH}	41858
^{HO}**CACA**^{OH}	^{HO}**(CA)$_2$**^{OH}	39482
^{HO}**CGCG**^{OH}	^{HO}**(CG)$_2$**^{OH}	40440
^{HO}**CGCGCG**^{OH}	^{HO}**(CG)$_3$**^{OH}	60660
^{HO}**CGCGCGCG**^{OH}	^{HO}**(CG)$_4$**^{OH}	80880
^{HO}**CGCGCGCGCG**^{OH}	^{HO}**(CG)$_5$**^{OH}	101100
^{HO}**TGTGTGTGTGTG**^{OH}	^{HO}**(TG)$_6$**^{OH}	125574
^{HO}**TATATATATATA**^{OH}	^{HO}**(TA)$_6$**^{OH}	122700
^{HO}**CGCGCGCGCGCG**^{OH}	^{HO}**(CG)$_6$**^{OH}	121320
^{HO}**CACACACACACA**^{OH}	^{HO}**(CA)$_6$**^{OH}	118446
^{HO}**CACACACA**^{OH}	^{HO}**(CA)$_4$**^{OH}	78964
^{HO}**CGCG**$^{PO_4^{2-}}$	^{HO}**(CG)$_2$**^{p}	40440
^{HO}**CGCGCG**$^{PO_4^{2-}}$	^{HO}**(CG)$_3$**^{p}	60660
^{NH_2}**CGCG**$^{PO_4^{2-}}$	^{n}**(CG)$_2$**^{p}	40440
^{HO}**CGCGCGCGCGCGCGCGCGCG**^{OH}	^{HO}**(CG)$_{12}$**^{OH}	242640
^{HO}**TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG**^{OH}	^{HO}**(TG)$_{12}$**^{OH}	251148
^{HO}**CACACACACACACACACACACA**^{OH}	^{HO}**(CA)$_{12}$**^{OH}	236892
^{HO}**TATATATATATATATATATATA**^{OH}	^{HO}**(TA)$_{12}$**^{OH}	245400

Tab. 5.2: Gesamtextinktionskoeffizienten der synthetisierten Verbindungen

5.2 Durchführung der Replikationsexperimente

5.2.1 Vorbereitung der Reaktionsansätze

Bedingt durch die geringen Substanzmengen erfolgte die Einwaage der Oligonucleotide nicht gravimetrisch, sondern volumetrisch. Hierzu wurden durch Entnahme der entprechenden Volumina aus den Stammlösungen mit Eppendorf-Pipetten die für die Experimente benötigten Mengen an Oligonucleotiden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, gemischt und mittels eines Speed-Vac-Konzentrators evaporiert. Sollten mehrere Versuche mit denselben Edukten bei gleichen Konzentrationen durchgeführt werden, so wurde eine Mehrkomponenten-Stammlösung mit genau bekannten Konzentrationsverhältnissen der beteiligten Bausteine hergestellt. Aus dieser Lösung konnte dann durch einen einzigen Pipettierschritt das für ein Experiment benötigte Volumen mit reproduzierbaren Mengenverhältnissen entnommen werden, wodurch die Anzahl der Pipettierschritte reduziert und die Genauigkeit erhöht wurde. Je nach Größe des Reaktionsansatzes wurden Eppendorf-Gefäße mit 0.3 ml, 0.7 ml oder 1.5 ml Volumen verwendet.

5.2.2 Reaktionsstart

Für das Aktivator-Puffer-Gemisch aus EDC in HEPES (N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure) wurde eine definierte Menge EDC frisch eingewogen und in dem entsprechenden Volumen einer 0.1 M HEPES-Puffer-Stammlösung (pH 7.55) gelöst. Je nach Anforderung des Experiments wurden so EDC-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen von 0.05 M bis 2 M hergestellt.

Die lösungsmittelfrei gelagerten aliquotierten Substanzproben wurden mit einem definierten Volumen der EDC-Lösung versetzt, auf dem Vortexer intensiv gemischt und anschließend zentrifugiert. Den zeitlichen Verlauf der Reaktion verfolgte man mit einem Timer, der bei Reaktionsbeginn nach Zugabe des Aktivator-Reagenzes EDC gestartet wurde. Der nach dem Zentrifugieren zu einem Tropfen vereinigte Reaktionsansatz wurde auf mehrere Mikrokapillaren verteilt.

Hierzu setzte man je nach Konzentration der Oligonucleotide und Volumen des Ansatzes Mikrokapillaren der Größen 0.2 µl, 0.25 µl, 0.5 µl oder 1 µl ein, wobei die Flüssigkeit durch die Kapillarkräfte aufgesogen und die vollständige Befüllung optisch kontrolliert wurde. Die Kapillaren wurden in einem Probenhalter durch Silikonkautschukringe fixiert und sofort in einen vortemperierten verschließbaren Glasbehälter mit gesättigter Wasserdampfatmosphäre überführt. Unerwünschte Konzentrationsschwankungen aufgrund von Verdampfungseffekten an den Kapillaröffnungen wurden dadurch vermieden.

5.2.3 Reaktionsabbruch

Nach definierten Zeitintervallen wurden dem Glasgefäß einzelne Kapillaren entnommen und deren Inhalt mit einer Pipettierhilfe in 200 µl H_2O verdünnt, wobei die Kapillaren mehrfach gespült wurden, um die Proben vollständig zu überführen. Durch die starke Verdünnung (Faktor 200-1000) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit auf vernachlässigbar kleine Werte verringert, so dass eine kurze Lagerung von ein bis zwei Stunden bis zur HPLC-Analyse ermöglicht wurde.

5.3 Chromatografische Analyse der Proben

5.3.1 HPLC-Systeme

Für die chromatografische Analyse der Experimente standen drei HPLC-Systeme der Firma Kontron zur Verfügung, deren Komponenten je nach Anforderungen untereinander ausgetauscht und kombiniert wurden. Für die quantitative Analyse wurden die im experimentellen Teil vorgestellte Kombinationen eingesetzt (siehe Kap. 1.2.3 und Kap. 1.2.4.3). Hierbei setzte man sowohl Reversed-Phase- als auch Ionenauschtausch-Chromatografie ein. Die genauen Chromatografiebedingungen (Laufmittelsystem, Säulenmaterial, etc.) werden im jeweiligen Experiment später genannt.

5.3.2 Eichfaktorbestimmung

Durch Integration der detektierten HPLC-Signale lieferte die Software die Peakfläche der jeweiligen Substanz im Chromatogramm. Diese für die quantitative Auswertung maßgebliche Messgröße wurde durch Aufnahme von Eichkurven und die darüber ermittelten Eichfaktoren später in die Konzentration der entsprechenden Komponente im Reaktionsansatz umgerechnet. In der Regel mußte die von der Software vorgeschlagene Integration durch Verschieben der Peakmarker manuell korrigiert werden.

Da die Eichfaktoren der Reaktionsprodukte nicht direkt bestimmt werden konnten, ging man davon aus, dass sich deren Extinktionskoeffizienten additiv aus den einzelnen Extinktionskoeffizienten ihrer Edukte berechnen ließen ($\varepsilon_{\text{gesamt}} = \sum_x \varepsilon_{\text{Edukt x}}$). Die Eichfaktoren verhalten sich zu den Extinktionskoeffizienten reziprok, so dass die fehlenden Produkteichfaktoren über folgende Gleichung bestimmbar waren:

$$\frac{1}{Eichfaktor_{\text{Produkt}}} = \sum_x \frac{1}{Eichfaktor_{\text{Edukt x}}}$$

Die Differenz zwischen den Eichfaktoren der gleichen Substanz auf Reversed-Phase- und Ionenaustausch-Chromatografiesäulen ist auf das unterschiedliche Wechselwirkungsverhalten der Bausteine mit dem Trägermaterial der Säulen und damit ihrer Wiederfindungsrate zurückzuführen. Die gemessenen Eichfaktoren in Tab. 5.3 sind gültig für Kinetikbedingungen mit 0.2 µl Kapillaren, 200 µl Quenchvolumen und 180 µl HPLC-Injektionsvolumen und mit dem Vermerk *a)* gekennzeichnet. Die berechneten Werte der höheren Oligomerisations-produkte tragen den Vermerk *b)*. Die mit Hilfe der Eichfaktoren berechneten Konzentrationswerte der einzelnen Spezies wurden gegen die Zeit aufgetragen und lieferten die für die kinetischen Untersuchungen benötigten Konzentrations-Zeit-Kurven.

Verbindung	Reversed Phase-Säule		Ion Exchange-Säule	
	Peakfläche [mV·min·nmol^{-1}]	Eichfaktor [mM·mV^{-1}·min^{-1}]	Peakfläche [mV·min·nmol^{-1}]	Eichfaktor [mM·mV^{-1}·min^{-1}]
^{N_3}**CG**^{p}	85.29	$6.514\cdot10^{-2}$ *a)*	-/-	-/-
^{n}**CG**^{PTE}	118.79	$4.677\cdot10^{-2}$ *a)*	100.21	$5.544\cdot10^{-2}$ *a)*
^{N_3}**CG**^{pn}**CG**^{PTE}	204.10	$2.722\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
^{HO}**(CG)$_2$**^{pn}**CG**^{PTE}	-/-	-/-	260.64	$2.132\cdot10^{-2}$ *b)*
^{HO}**(CG)$_3$**^{pn}**CG**^{PTE}	-/-	-/-	361.40	$1.537\cdot10^{-2}$ *b)*
^{n}**CG**^{p}	77.42	$7.176\cdot10^{-2}$ *a)*	83.86	$6.625\cdot10^{-2}$ *a)*
(^{n}**CG**^{p}**)$_2$**	154.84	$3.588\cdot10^{-2}$ *b)*	167.72	$3.313\cdot10^{-2}$ *b)*
(^{n}**CG**^{p}**)$_3$**	232.26	$2.392\cdot10^{-2}$ *b)*	251.58	$2.208\cdot10^{-2}$ *b)*
(^{n}**CG**^{p}**)$_4$**	309.68	$1.794\cdot10^{-2}$ *b)*	335.44	$1.656\cdot10^{-2}$ *b)*
(^{n}**CG**^{p}**)$_5$**	387.10	$1.435\cdot10^{-2}$ *b)*	419.30	$1.325\cdot10^{-2}$ *b)*
(^{n}**CG**^{p}**)$_6$**	464.52	$1.196\cdot10^{-2}$ *b)*	503.16	$1.104\cdot10^{-2}$ *b)*
^{HO}**(CG)$_2$**^{OH}	170.21	$3.264\cdot10^{-2}$ *a)*	167.29	$3.321\cdot10^{-2}$ *a)*
^{HO}**(CG)$_3$**^{OH}	-/-	-/-	239.27	$2.322\cdot10^{-2}$ *a)*
^{HO}**(CG)$_4$**^{OH}	-/-	-/-	345.80	$1.607\cdot10^{-2}$ *a)*
^{HO}**(CG)$_2$**^{p}	-/-	-/-	160.43	$3.463\cdot10^{-2}$ *a)*
^{HO}**(CG)$_3$**^{p}	-/-	-/-	261.19	$2.127\cdot10^{-2}$ *a)*
^{n}**(CG)$_2$**^{p}	-/-	-/-	165.34	$3.360\cdot10^{-2}$ *a)*
^{n}**CA**^{p}	82.60	$6.726\cdot10^{-2}$ *a)*	-/-	-/-
(^{n}**CA**^{p}**)$_2$**	165.20	$3.363\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**CA**^{p}**)$_3$**	247.80	$2.242\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**CA**^{p}**)$_4$**	330.40	$1.681\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**CA**^{p}**)$_5$**	413.00	$1.345\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**CA**^{p}**)$_6$**	495.60	$1.121\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
^{n}**TA**^{p}	82.29	$6.751\cdot10^{-2}$ *a)*	-/-	-/-
(^{n}**TA**^{p}**)$_2$**	164.58	$3.376\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**TA**^{p}**)$_3$**	246.87	$2.250\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**TA**^{p}**)$_4$**	329.16	$1.688\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**TA**^{p}**)$_5$**	411.45	$1.350\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**TA**^{p}**)$_6$**	493.74	$1.125\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
^{n}**TG**^{n}	85.63	$6.488\cdot10^{-2}$ *a)*	-/-	-/-
(^{n}**TG**^{p}**)$_2$**	171.26	$3.244\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**TG**^{p}**)$_3$**	256.89	$2.163\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**TG**^{p}**)$_4$**	342.52	$1.622\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**TG**^{p}**)$_5$**	428.15	$1.298\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-
(^{n}**TG**^{p}**)$_6$**	513.78	$1.081\cdot10^{-2}$ *b)*	-/-	-/-

Tab. 5.3: Eichfaktoren der für die kinetische Auswertung verwendeten Oligonucleotide, sowie der Kondensationsprodukte

6. Kinetische Untersuchungen – Cyclisierung vs. Oligomerisierung

6.1 Vorversuche

Im Rahmen der Vorversuche sollte die Eignung der Dimere für die geplanten Oligomerisationsreaktionen geprüft werden.

6.1.1 Reaktionsbedingungen der Vorversuche.

Bei der Wahl der Reaktionsbedingungen für die ersten Oligomerisierungen der vier Dimere orientierte man sich an den bereits am Lehrstuhl durchgeführten Arbeiten an selbstreplizierenden Minimalsystemen mit kurzen 5'-Amino- und 3'-Phosphatbausteinen[36,37,40]. Die Konzentration des Aktivator-Puffergemisches wurde hierzu auf 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES, die des zu untersuchenden Dimers auf 1 mM bei Reaktionstemperaturen zwischen 20 °C und 30 °C festgelegt. Mit dieser Eduktkonzentration war die quantitative Erfassung sowohl des Edukts, als auch der denkbaren Produkte per HPLC-Detektion bei gutem Signal-Rauschverhältnis gewährleistet. Die Kinetiken wurden in 1 µl Kapillaren durchgeführt. Da der HPLC-Injektor stets einige Mikroliter mehr Flüssigkeit einzog, als letztendlich in die Probenschleife gelangten, setzte man das Injektionsvolumen auf 180 µl der 200 µl Quenchlösung (Reaktionslösung + H_2O) fest.

6.1.2 Cyclisierung bei niedrigen Konzentrationen

Erste Versuche mit 1 mM $^{n}CA^{p}$ bei 30 °C zeigten überraschenderweise lediglich einen einzigen Produktpeak in der HPLC-Analyse. Die naheliegendste Erklärung für dieses Verhalten war die Cyclisierung des Dimers, die unter den gegebenen Reaktionsbedingungen der Oligomerisierung bevorzugt zu sein schien (Abb. 6.1).

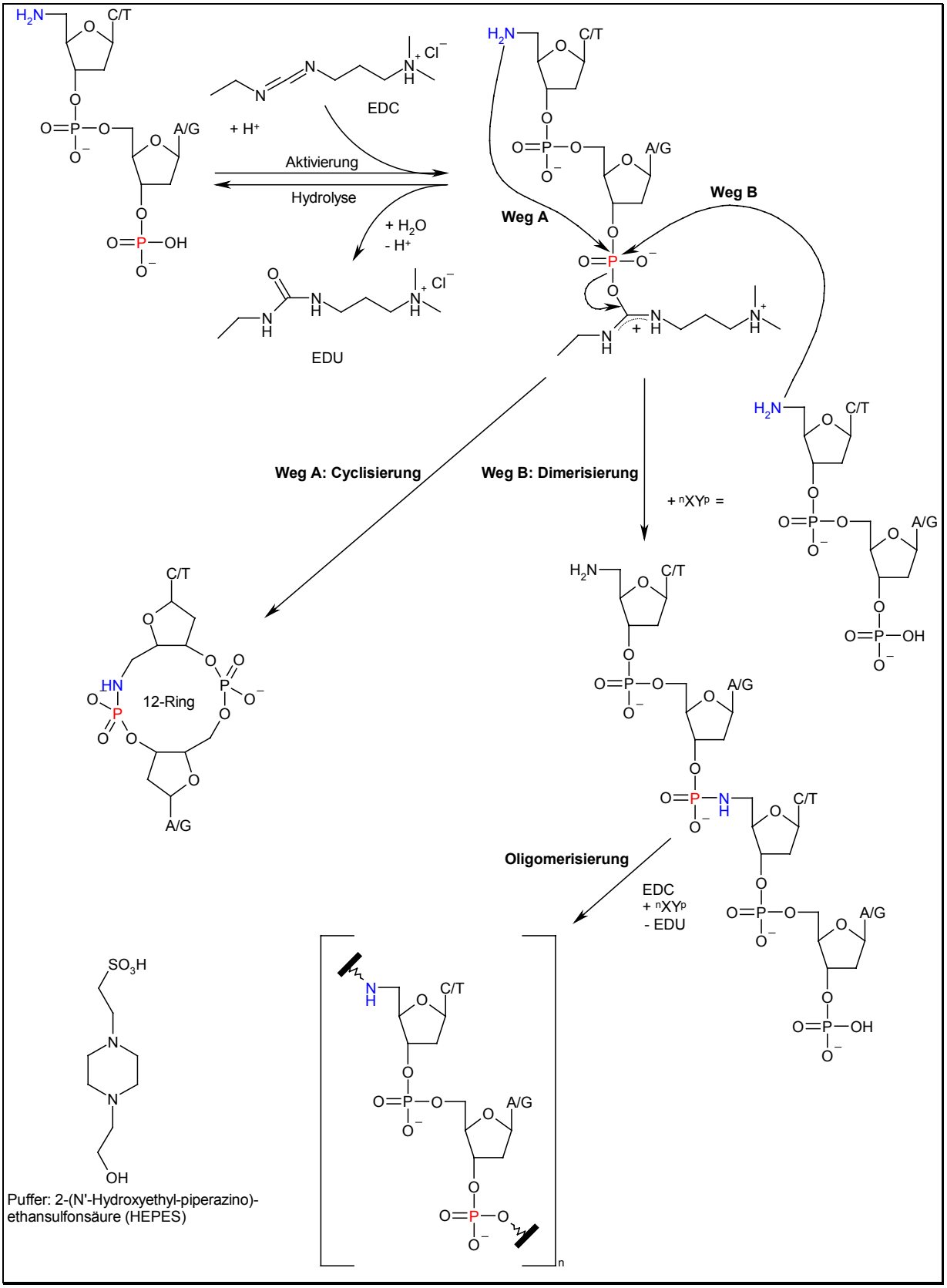


Abb. 6.1: Mechanismen der Cyclisierung (**A**) und der Dimerisierung (**B**) bzw. Oligomerisierung der Dimere

Eine genauere Betrachtung der Reaktionsordnung sollte näheren Aufschluss über den beobachteten Reaktionstyp geben. Bei einer Cyclisierung des Dimers handelt es sich um eine monomolekulare Reaktion (Reaktion 1. Ordnung), deren Geschwindigkeit nur von der Konzentration des Dimers bestimmt wird, während die Dimerisierung eine bimolekulare Reaktion (Reaktion 2. Ordnung) darstellt, deren Geschwindigkeit vom Quadrat der Dimerkonzentration abhängig ist:

Monomolekulare Reaktion:	Bimolekulare Reaktion:
$\text{Dimer} \rightarrow \text{cycl.Dimer}$	$\text{Dimer} + \text{Dimer} \rightarrow \text{Tetramer}$
$\frac{d[\text{cycl.Dimer}]}{dt} = k_1 \cdot [\text{Dimer}]$	$\frac{d[\text{Tetramer}]}{dt} = k_2 \cdot [\text{Dimer}]^2$

Verdoppelt man nun die Eduktkonzentration, dann sollte sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Cyclisierung lediglich verdoppeln, während sie sich für die Dimerisierung vervierfacht:

$$\frac{d[\text{cycl.Dimer}]}{dt} = k_1 \cdot 2 \cdot [\text{Dimer}]$$

$$\frac{d[\text{Tetramer}]}{dt} = k_2 \cdot (2 \cdot [\text{Dimer}])^2 = k_2 \cdot 4 \cdot [\text{Dimer}]$$

Basierend auf den obigen Überlegungen wurden nun zur Aufklärung der Reaktionsordnung Kinetikexperimente mit den Dimeren bei Konzentrationen von 1 mM und 2 mM durchgeführt. Gleichzeitig konnte man so auch die Cyclisierungsneigung der Dimere $^{n}TG^{p}$, $^{n}TA^{p}$ und $^{n}CG^{p}$ feststellen. Die Reaktionsbedingungen sind im folgenden tabellarisch aufgeführt, die Elutionssysteme werden im exp. Teil näher erläutert (siehe Kap.1.2, exp. Teil).

6.1.3 Cyclisierung von $^{n}TG^{p}$

Die Untersuchungen des Konzentrationseinflusses von $^{n}TG^{p}$ auf die Bildungsgeschwindigkeit des oder der Produkte wurden unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}TG^{p}$	**c(Edukt)**	1 mM, 2 mM
c(EDC)	0.2 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	20 °C	**HPLC-Säulentyp**	C18-RP
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	1 µl	**Elutionssystem**	TEAA/AcN

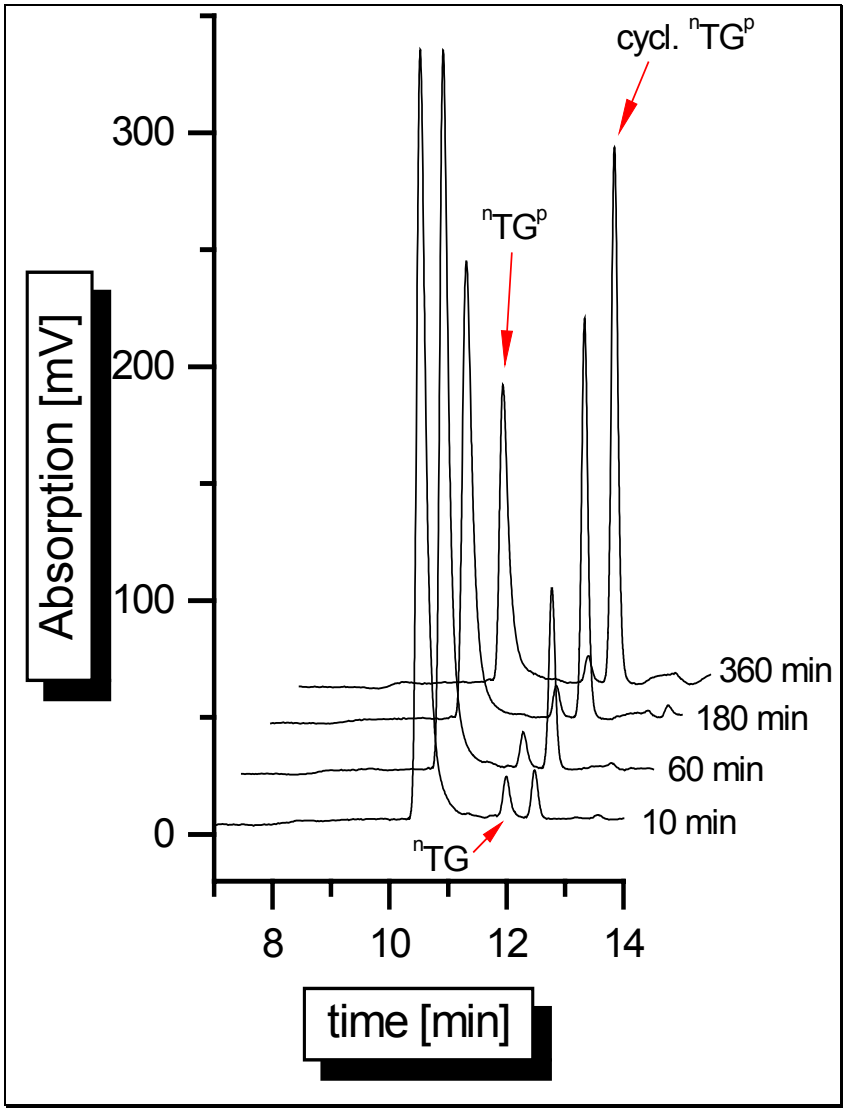


Abb. 6.2: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}TG^{p}$, 1 mM, 20 °C

Der Stackplot der HPLC-Chromatogramme der Reaktion von 1 mM $^{n}TG^{p}$ bei 20 °C zeigt deutlich die Abnahme des Edukts $^{n}TG^{p}$ und die Zunahme eines einzigen Reaktionsproduktes. Der wegen seiner Ähnlichkeit nicht aufgeführte Stackplot für c($^{n}TG^{p}$) = 2 mM zeigt ebenfalls nur ein Produkt. Unter anderem ist Dephosphorylierung sichtbar, die schon von *Sievers* bei der RP-Chromatografie von 3'-Phosphatbausteinen beobachtet wurde[40] und höchstwahrscheinlich während der Chromatografie auf der Säule stattfindet.

Spätere HPLC-Untersuchungen mit höheren Konzentrationen der gleichen Charge ergaben, dass die Konzentration des dephosphorilierten Edukts nicht linear mit der Konzentration des Edukts ansteigt. Eine Verzehnfachung der Eduktkonzentration hatte nur etwa eine Verdoppelung der Konzentration des Dephosphorylierungsproduktes zur Folge, so dass eine Dephosphorylierung des Edukts in der Stammlösung unwahrscheinlich wird.

Eine Messung der Kinetik nach ca. 24 h zeigte die vollständige Umsetzung des Edukts zum Produkt, wobei kein dephosphoryliertes Edukt mehr sichtbar war. Würde dephosphoryliertes Edukt schon zum Zeitpunkt der Kinetikdurchführung vorhanden sein, so müßte dieses auch noch am Ende der Reaktion übrigbleiben, da es durch den fehlenden Phosphatrest nicht zu einer Cyclisierung befähigt wäre. Diese Befunde stützen die Theorie der Dephosphorylierung auf der Säule unter den Chromatografiebedingungen.

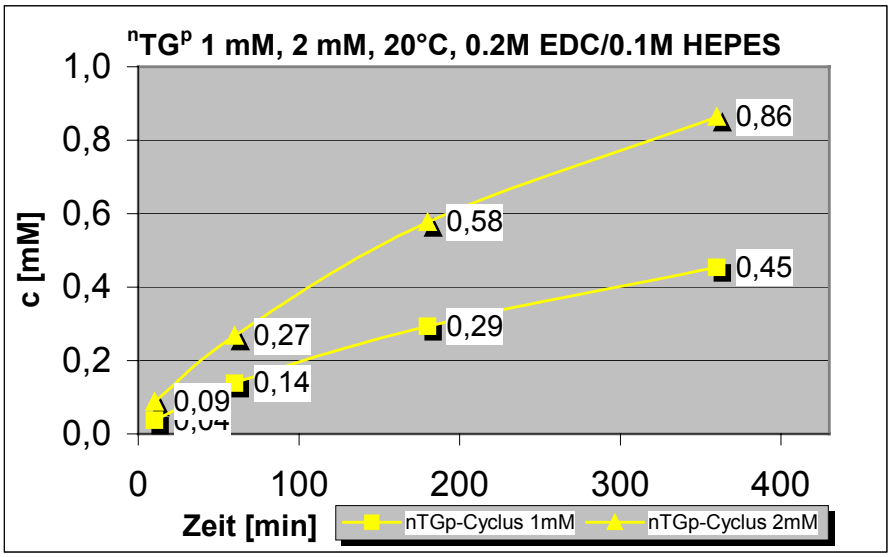


Abb. 6.3: Bildung von cyclisiertem $^{n}TG^{p}$ bei 1 und 2 mM $^{n}TG^{p}$-Eduktkonzentrationen

Die Auftragung der Konzentration des gebildeten Produktes gegen die Zeit (Abb. 6.3) verdeutlicht die Geschwindigkeitsunterschiede hinsichtlich der beiden $^{n}TG^{p}$-Ausgangskonzentrationen. Die Verdoppelung der Dimerkonzentration hat auch ungefähr eine Verdoppelung der Produktkonzentration zu einem beliebigen Zeitpunkt innerhalb der beobachteten 360 Minuten nach Reaktionsstart zur Folge. Damit wäre der monomolekulare Reaktionstyp für $^{n}TG^{p}$ bei den gegebenen Kinetikbedingungen hinreichend nachgewiesen und der Dimer-Cyclus als Reaktionsprodukt postuliert. Den endgültigen Beweis der Cyclisierung wird die MALDI-TOF-Massenspektroskopie liefern (Kap. 6.1.6).

6.1.4 Cyclisierung von $^{n}TA^{p}$

Die Untersuchungen des Konzentrationseinflusses von $^{n}TA^{p}$ auf die Bildungsgeschwindigkeit des oder der Produkte wurden unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}TA^{p}$	**c(Edukt)**	1 mM, 2 mM
c(EDC)	0.2 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	20 °C	**HPLC-Säulentyp**	C18-RP
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	1 µl	**Elutionssystem**	TEAA/AcN

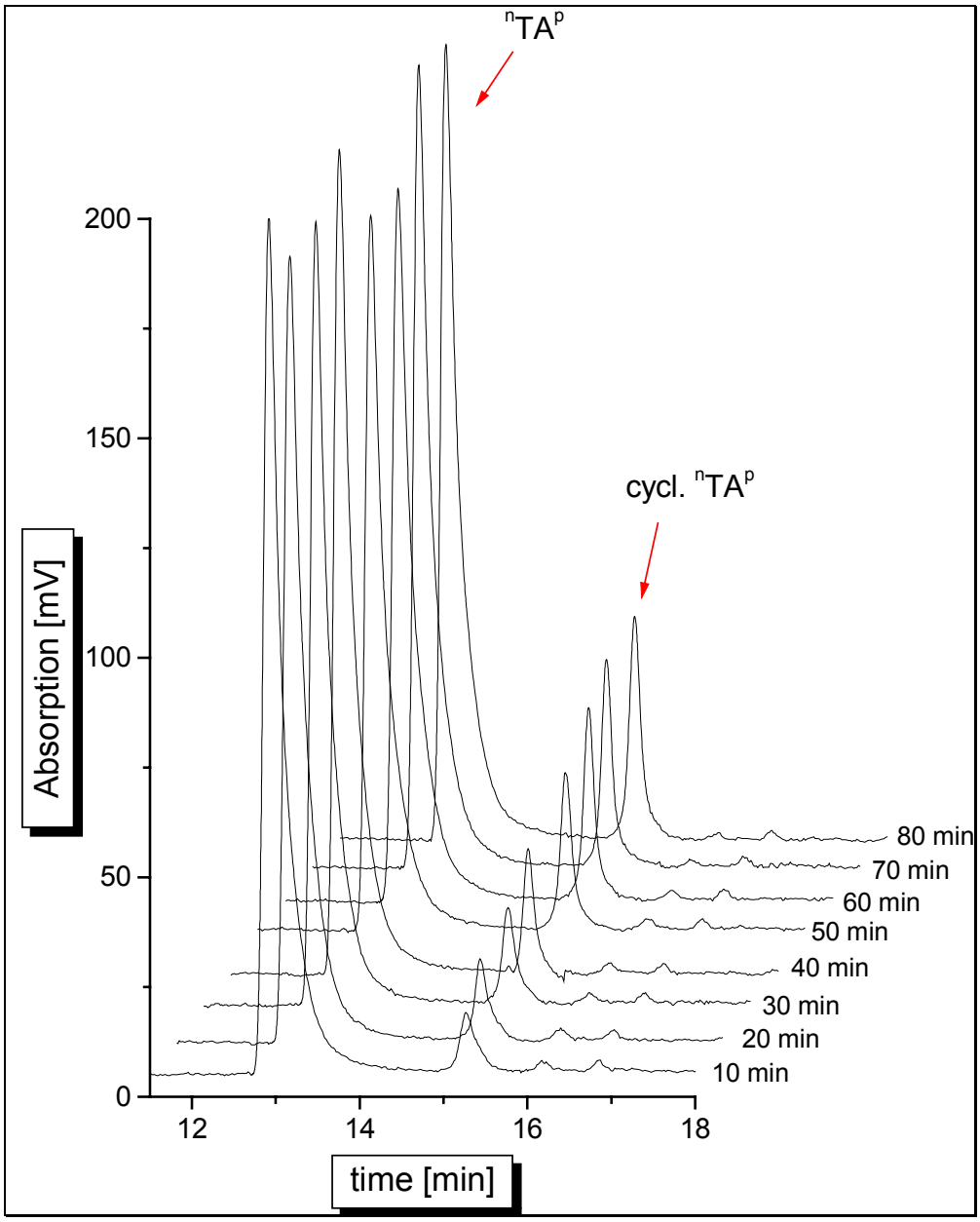


Abb. 6.4: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}TA^{p}$, 1 mM, 20 °C

Der Stackplot der HPLC-Chromatogramme der Reaktion von 1 mM $^{n}TA^{p}$ bei 20 °C sowie der ähnliche, nicht aufgeführte Stackplot für c($^{n}TA^{p}$) = 2 mM zeigen ebenfalls die Zunahme eines Reaktionsproduktes. Die monomolekulare Reaktionsordnung und damit der Hinweis auf das Cyclisierungsprodukt wurden wiederum aus der Auftragung der beiden Produktbildungskurven gewonnen, da sich auch hier die Reaktionsgeschwindigkeit bei Verdoppelung der Eduktkonzentration um den Faktor 2 steigerte.

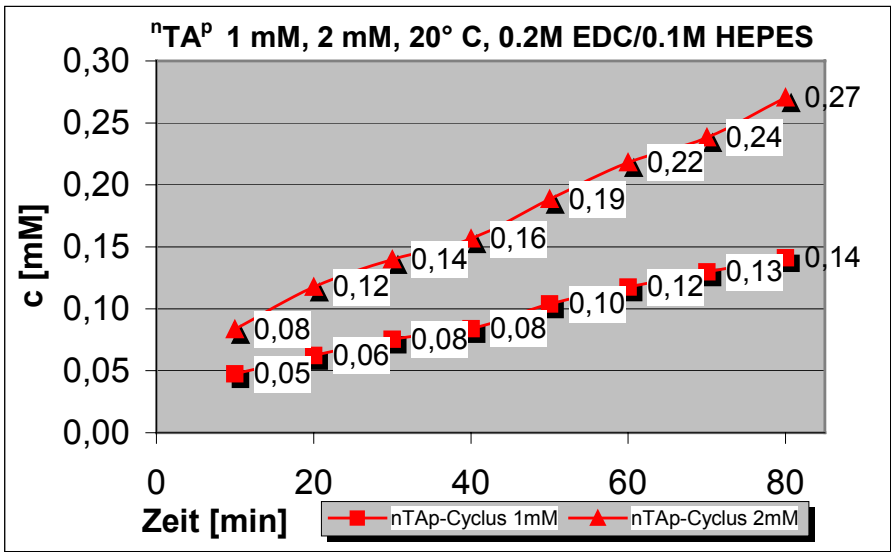


Abb. 6.5: Bildung von cyclisiertem $^{n}TA^{p}$ bei 1 und 2 mM $^{n}TA^{p}$-Eduktkonzentrationen

6.1.5 Cyclisierung von $^{n}CG^{p}$

Die Untersuchungen des Konzentrationseinflusses von $^{n}CG^{p}$ auf die Bildungsgeschwindigkeit des oder der Produkte wurden unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}CG^{p}$	**c(Edukt)**	1 mM, 2 mM
c(EDC)	0.2 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	30 °C	**HPLC-Säulentyp**	C18-RP
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	1 µl	**Elutionssystem**	TEAA/AcN

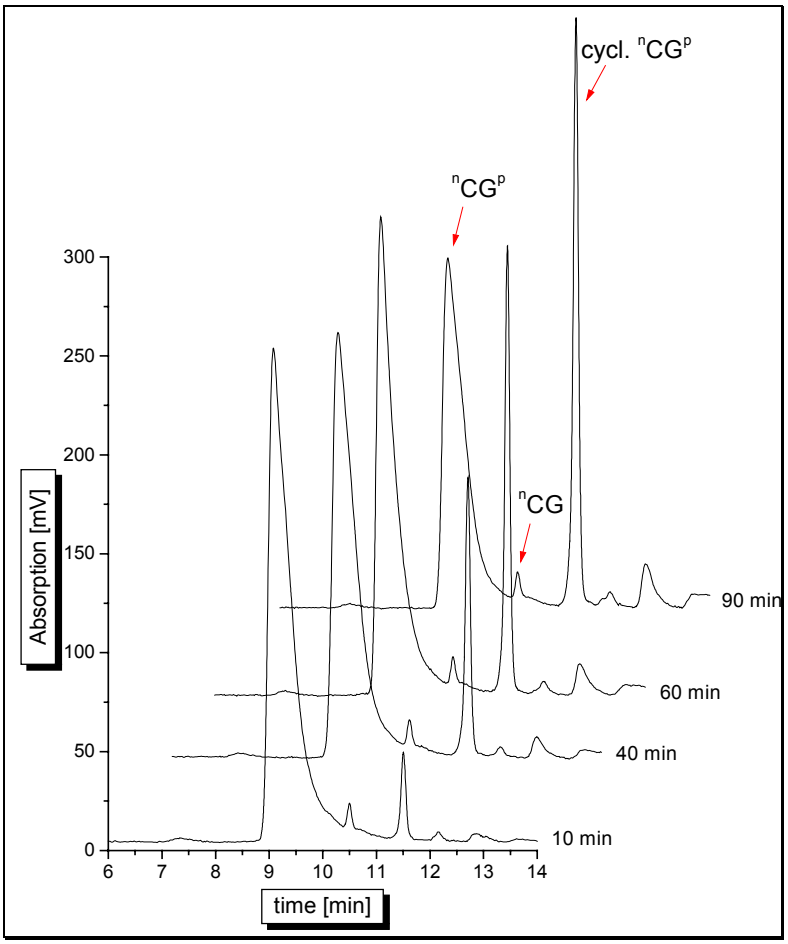


Abb. 6.6: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}CG^{p}$, 2 mM, 30 °C

Der oben aufgeführte Stackplot der HPLC-Chromatogramme der Reaktion von 2 mM $^{n}CG^{p}$ bei 30 °C sowie der nicht aufgeführte Stackplot für c($^{n}CG^{p}$) = 1 mM zeigen wie zuvor die Abnahme des Edukts und die Zunahme eines Reaktionsproduktes. In diesem Falle ist jedoch auch noch die langsame Bildung eines weiteren Reaktionsproduktes sichtbar, das jedoch gegenüber der Bildung des Hauptproduktes deutlich in den Hintergrund tritt.

Betrachtet man die beiden Produktbildungskurven des Hauptproduktes, dann erkennt man den gleichen Effekt, wie bei den vorhergehenden Untersuchungen. Damit schlägt sich auch hier die Verdoppelung der Eduktkonzentration in der Verdoppelung der Produktbildungsgeschwindigkeit nieder und deutet auf die Cyclisierung des Dimers hin.

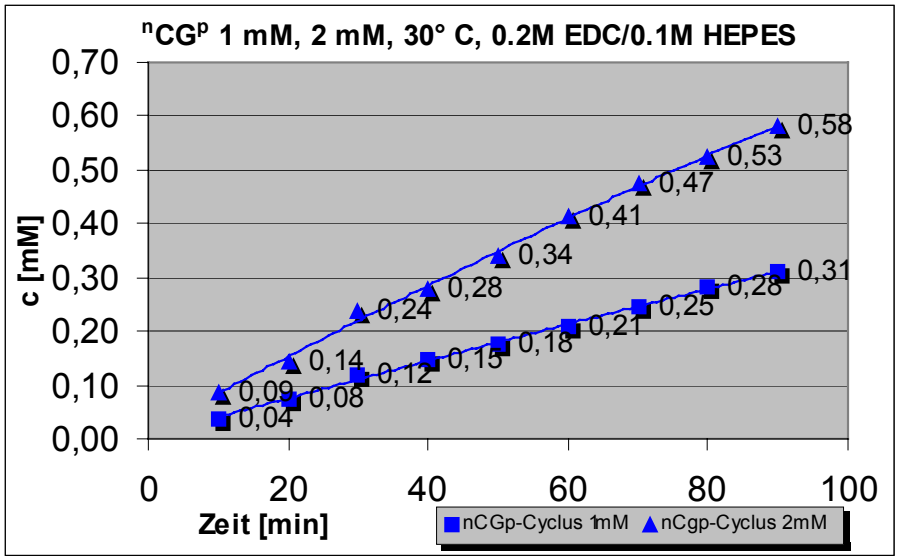


Abb. 6.7: Bildung von cyclisiertem $^{n}CG^{p}$ bei 1 und 2 mM $^{n}CG^{p}$-Eduktkonzentrationen

6.1.6 Massenspektroskopie der Cyclisierungsprodukte

Die Aufnahme von MALDI-TOF-Spektren (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation - Time Of Flight) erlaubte die genaue Massenbestimmung der mutmaßlichen Cyclisierungsprodukte. Zu diesem Zweck wurde während der Chromatografie die den HPLC-Detektor verlassende Flüssigkeit für den Zeitraum der Peak-Detektion in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen und anschließend im Speedvac evaporiert. Die auf diesem Wege isolierte Substanz wurde in ca. 5 µl H_2O aufgenommen, mit etwas Ionenaustauscher in Pulverform versetzt, um störende Kationen (z.B. Na^+) weitestgehend zu entfernen und auf die goldbeschichtete MALDI-Platte aufgetragen. Dort wurde der Flüssigkeitstropfen mit der gewünschten Matrix gemischt und nachfolgend im Luftstrom getrocknet. Das in Festform zurückbleibende Substanz/Matrix-Kristallisat konnte nachfolgend per MALDI analysiert werden. Normalerweise wurde die Masse jeder zu untersuchenden Probe mit mehreren verschiedenen Matrices ermittelt, um größtmögliche Genauigkeit zu erlangen. Der Fehler lag im Massenbereich um 600 $g \cdot mol^{-1}$ bei +/- 1 $g \cdot mol^{-1}$.

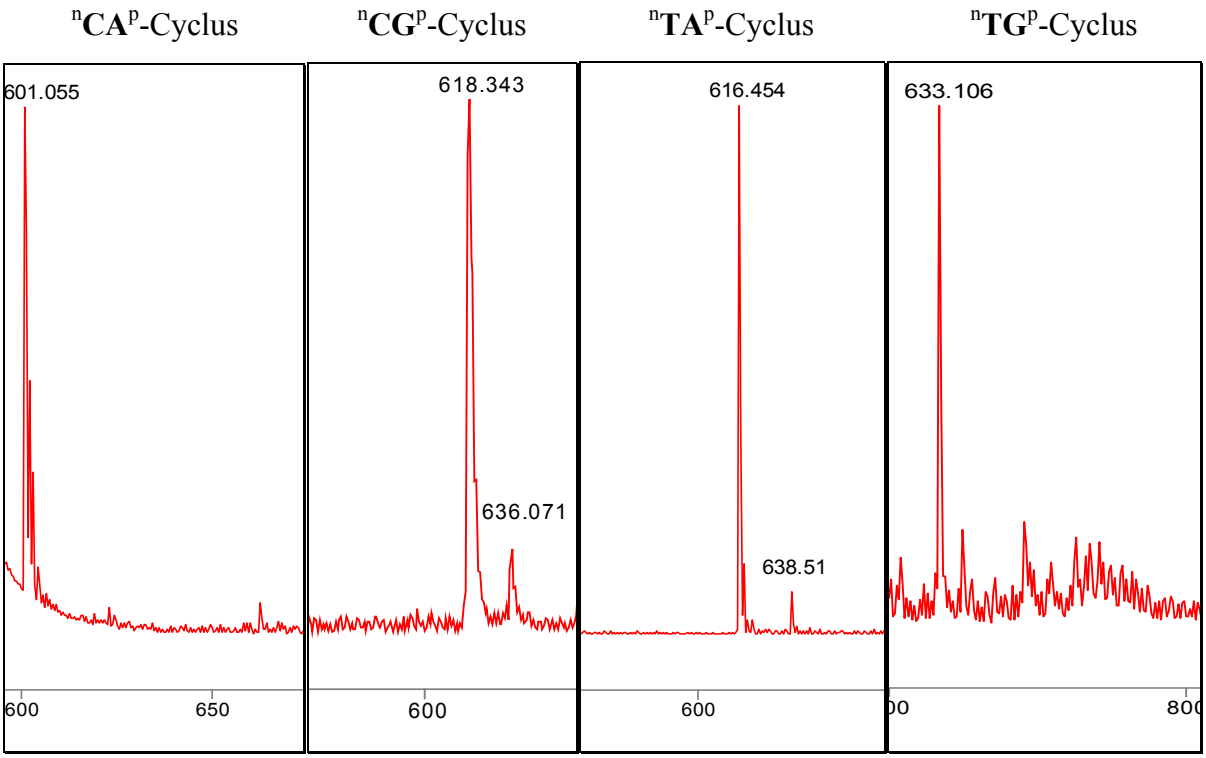


Abb. 6.8: MALDI-Spektren der isolierten cyclisierten Dimere

Der für eine Cyclisierung postulierte Massenverlust von 18 g·mol^{-1} durch die Abspaltung von H_2O findet sich im Rahmen der Messgenauigkeit beim Vergleich der theoretischen Dimermassen mit den gefundenen Massen der Reaktionsprodukte (Tab. 6.1).

Verbindung	$M_{exp.}$	$M_{theor.}$	$\Delta (M_{theor.}-M_{exp.})$	$\Delta (M_{theor.Dimer} - M_{exp.Cyclus})$
^{n}**CA**^{p}	618.6	619.4	0.8	-
^{n}**CG**^{p}	636.1	635.4	- 0.7	-
^{n}**TA**^{p}	634.8	634.4	- 0.4	-
^{n}**TG**^{p}	650.1	650.4	0.3	-
^{n}**CA**^{p}-Cyclus	601.1	601.4	0.3	18.3
^{n}**CG**^{p}-Cyclus	618.3	617.4	- 0.9	17.1
^{n}**TA**^{p}-Cyclus	616.4	616.4	0	18.0
^{n}**TG**^{p}-Cyclus	633.1	632.4	- 0.7	17.3

Tab. 6.1: MALDI-TOF Massenbestimmung der Dimere und deren Cyclisierungsprodukte

Zusammen mit der ermittelten monomolekularen Reaktionsordnung ist damit bestätigt, dass es sich bei den chromatografisch beobachteten Produkten um die cyclisierte Form der Dimere handelt.

Da alle vier untersuchten Kondensationsreaktionen der offenen Dimere mit EDC fast ausschließlich die cyclisierte Form des Dimers als Hauptprodukt generierten, mußte ein Lösungsansatz gefunden werden, der die Beobachtung von höheren Oligomerisations-produkten erlaubte. Hierzu war es notwendig den Reaktionskanal der Cyclisierung gegenüber der Oligomerisierung stark zu unterdrücken oder wenn möglich gänzlich auszuschalten. Als Ausgangspunkt für die Problemlösung war eine genauere Betrachtung der Struktur des Reaktionsproduktes geeignet.

Einzelstränge bilden aufgrund der Hydrophobie ihrer aromatischen Basen in wässrigem Medium bevorzugt Einzelstranghelices aus, in denen die Basen analog denen eines Doppelhelixstranges übereinander gestapelt sind. Eine mit *Hyperchem* geometrie-optimierte Studie (Kraftfeld: MM+, *Polak-Ribiere*-Algorithmus) des cyclisierten $^{n}CA^{p}$ zeigt den 12-Ring mit maximaler Distanz zwischen den beiden Nucleobasen (Abb. 6.9)[118]. Im Übergangszustand der Cyclisierung müssen demnach evtl. vorhandene π-π-Basenstapel-Wechselwirkungen der beiden Aromaten überwunden und das Rückgrat der Dimer-Mini-Helix gegenüber einer normalen DNA-Helix stark deformiert werden. Durch den Einsatz von mono- oder divalenten Kationen wäre evtl. eine 'Streckung' oder 'Fixierung' des Rückgrats möglich, so dass die Bildung des ringförmigen Übergangszustandes erschwert wäre und damit die Cyclisierungsgeschwindigkeit verringert werden könnte.

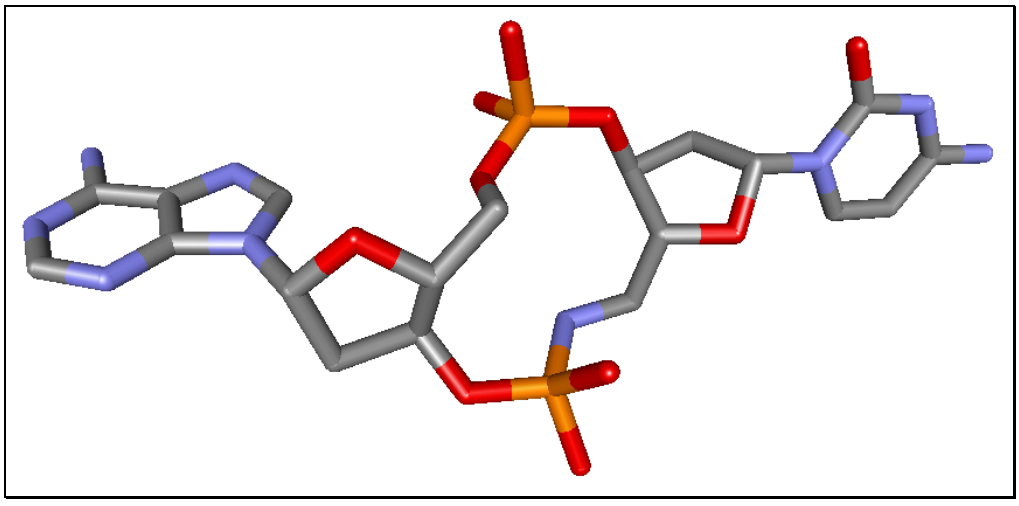


Abb. 6.9: Geometrie-optimiertes Modell des cyclisierten $^{n}CA^{p}$

6.2 Einfluss mono- und divalenter Kationen

Der Einfluss von Kationen auf die Kondensation von DNA- bzw. RNA-Bausteinen ist bekannt, ebenso ihre Fähigkeit zur Wechselwirkung mit der DNA-Backbone[119,120,121,122]. Eine Komplexierung des negativ geladenen Rückgrats mit geeigneten Kationen könnte in der Lage sein, die Konformation der Dimere soweit stabil zu halten, dass der für eine Cyclisierung notwendige ringartige Übergangszustand nicht oder nur erheblich langsamer erreicht würde. Zur Untersuchung eines möglichen cyclisierungsbremsenden Effektes mono- oder divalenter Kationen bei der Dimerkondensation wurde stellvertretend der $^{n}TG^{p}$-Baustein bei folgenden Reaktionsbedingungen herangezogen:

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}TG^{p}$	**c(Edukt)**	2 mM
c(EDC)	0.2 M	**c(HEPES)**	0.1 M bzw. 0 M
Salzzugabe	s.u.	**c(Salz)**	0.1 M
Temperatur	30 °C	**HPLC-Säulentyp**	C18-RP
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	1 µl	**Elutionssystem**	TEAA/AcN

Die Kationen wurden als Salze in ihrer Chorid-Form in die Reaktion eingebracht, wobei man je vier mono- und vier divalente Metallkationen einsetzte.

Metallkation	Salz
Li^{+}	LiCl
K^{+}	KCl
Rb^{+}	RbCl
Cs^{+}	CsCl
Mg^{2+}	$MgCl_2$
Ca^{2+}	$CaCl_2$
Mn^{2+}	$MnCl_2$
Co^{2+}	$CoCl_2$

Abb. 6.10: Verwendete Kationen und ihre Salze

Da HEPES-Puffer standardmäßig bereits 0.05 M NaCl enthält, wurden alle Experimente unter Ausschluss von HEPES-Puffer in reinem H_2O wiederholt, um den Einfluss des Na^{+} zu ermitteln. In (nicht aufgeführten) Kontrollexperimenten mit NaCl-Konzentrationen von bis zu 1 M konnte keine Verringerung der Cyclisierungsneigung beobachtet werden.

Die Auswertung der Chromatogramme zeigte unabhängig vom eingesetzten Kation nach wie vor die alleinige Bildung des Cyclisierungsproduktes. Hierbei war auffällig, dass sich die Cyclisierungsgeschwindigkeit im Vergleich zur normalen Cyclisierung unter Zugabe von M^+ leicht (Ausnahme Li^+ in H_2O), bei Zugabe von M^{2+} jedoch stark verringerte. Ca^{2+} liegt in seiner die Phosphoamidatbindungsbildung hemmenden Wirkung zwischen den verwendeten ein- und zweiwertigen Kationen. Die Verwendung von HEPES-Puffer und damit die Anwesenheit von 50 mM NaCl hatte nur eine leichte Verlangsamung der Phosphoamidatbindungsbildung zur Folge, die unter den Bedingungen der Experimente durchweg zur Cyclisierung der Dimere führte. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.11 zusammengefasst.

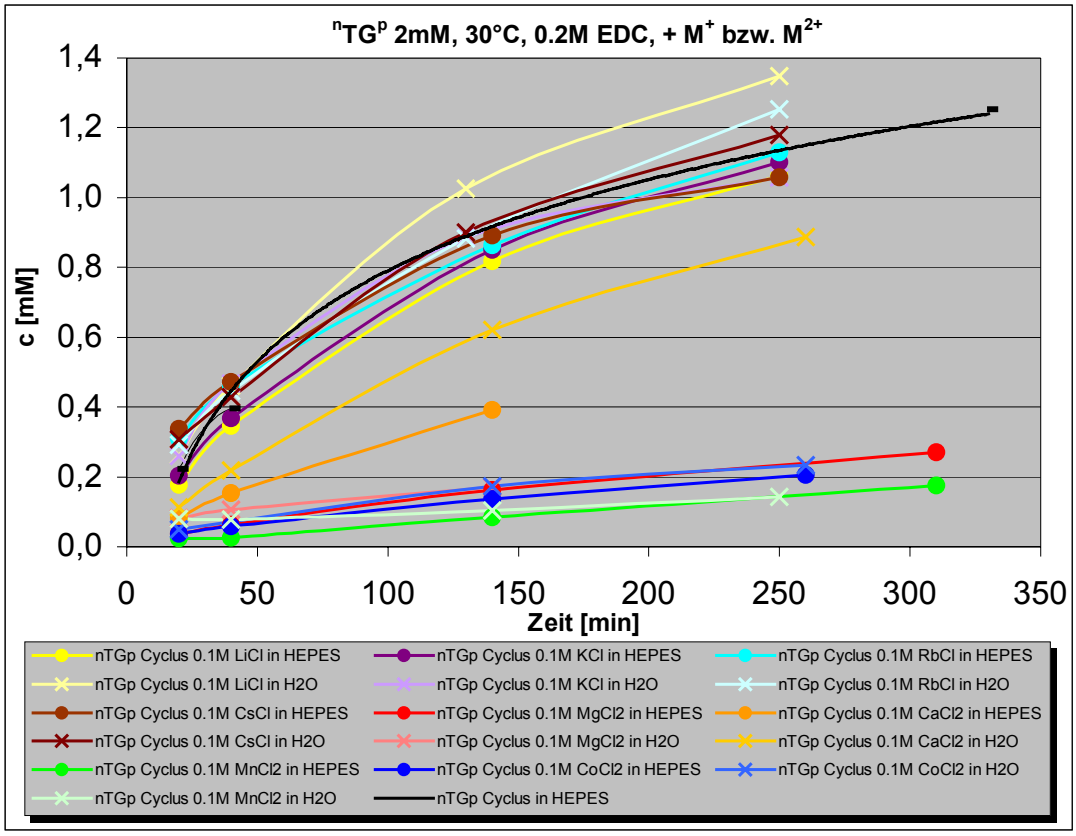


Abb. 6.11: Bildung von cyclisiertem $^nTG^p$ unter Zugabe von 0.1 M M(I)Cl bzw. $M(II)Cl_2$

Die Beobachtungen bestätigen die Untersuchungen von *Achilles*, der eine die Phosphoamidatbildung stark inhibierende Wirkung von M^{2+}-Ionen festgestellt hatte[119]. *Matzen* fand Hinweise auf eine Hemmung der Aktivierung durch M^{2+}-Ionen[122] und auch *Orgel* beobachtete eine allgemeine Reduzierung der Phosphoamidatbindungsbildung bei Zugabe mono- oder divalenter Metallionen[121].

Der gewünschte Backbone-stabilisierende Effekt konnte jedoch nicht gefunden werden. Höhere Oligomerisationsprodukte blieben aus, während der Cyclus das Hauptprodukt darstellte. Der Grund für dieses Verhalten könnte in der Komplexierung der endständigen Phosphatgruppe durch das jeweilige Kation zu finden sein, die damit für die Aktivierung sowie folgende intra- oder intermolekulare Reaktionen schwerer zugänglich wird (Abb. 6.12).

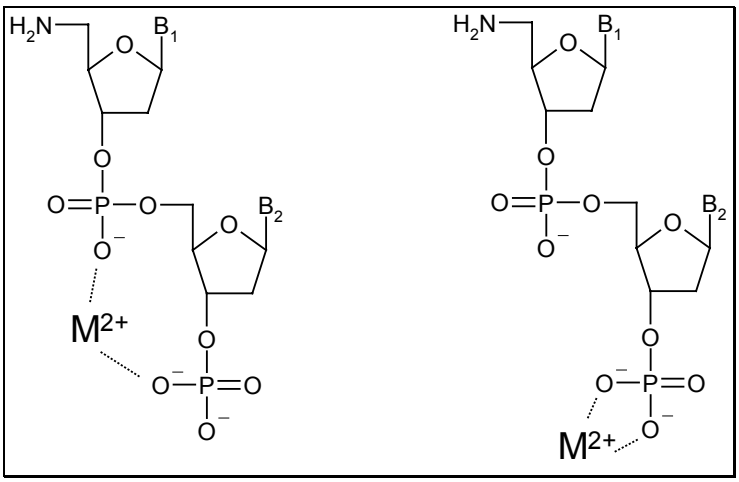


Abb. 6.12: Vorschlag für die Anlagerung von M^{2+} an das Dimer-Rückgrat oder an die 3'-Phosphatgruppe

Damit wurden die Erwartungen an die Zugabe von Kationen zur Verringerung der Cyclisierungsneigung der Dimere nicht erfüllt, so dass andere Wege gefunden werden mussten.

6.3 Tetramer-Templatzugabe

Eine naheliegende Möglichkeit die Dimerisierung gegenüber der Cyclisierung zu forcieren war die Umsetzung der Dimere mit den entsprechenden Tetramer-Templaten. In den intermediär entstehenden termolekularen Komplexen wären die beiden reaktiven Enden innerhalb eines Dimers räumlich voneinander getrennt, so dass die Cyclisierung erschwert würde. Dagegen befänden sich die aktivierte 3'-Phosphatgruppe des einen und die 5'-Aminogruppe des anderen Dimers in einem solchen termolekularen Komplex in unmittelbarer Nachbarschaft, wodurch der Anteil der tetrameren Reaktionsprodukte steigen sollte.

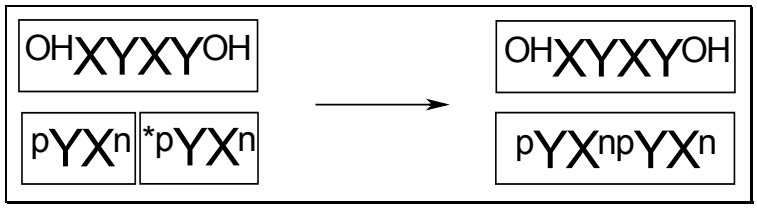


Abb. 6.13: Tetramerbildung über termolekularen Komplex, X = C bzw. T , Y = G bzw. A

Selbstkomplementäre Tetramertemplate wie ^{OH}TATA^{OH} und ^{OH}CGCG^{OH} könnten allerdings bevorzugt miteinander tetramere Duplexe anstelle von termolekularen Komplexen bilden und damit evtl. ihre Templatwirkung nicht voll entfalten. Um diese Effekte von vorneherein auszuschließen, wurden zur Ermittlung eines cyclisierungshemmenden Einflusses der Templatzugabe die beiden Systeme ^{n}TG^{p}-Dimer mit ^{OH}CACA^{OH}-Templat sowie ^{n}CA^{p} mit ^{OH}TGTG^{OH}-Templat untersucht (Templatsynthese in Kap. 2.5, Exp.-Teil).

Die Experimente bei Edukt/Templatverhältnissen zwischen 1 : 0.08 und 1 : 1 mit Konzentrationen von 1 und 5 mM bei Temperaturen zwischen 10 und 30 °C wiesen die unerwünschte Cyclisierung als primären Reaktionskanal auf. Der Anteil an termolekularen Komplexen scheint somit unter diesen Bedingungen nicht ausreichend groß zu sein, um einen sichtbaren Effekt auf das Reaktionsergebnis zu erzielen. Unter den gegebenen Bedingungen scheidet damit die Templatzugabe als Methode zur maßgeblichen Hemmung der Cyclisierung aus.

6.4 Variation der Reaktionsparameter

Mit der Problematik der Cyclisierung bei EDC-aktivierten Bausteinen hatten bereits auch *Orgel* und *Ferris* zu kämpfen. *Ferris* fand Cyclisierungsprodukte bei Kondensationsreaktionen von EDC-aktivierten Cytidin- und Thymidin-5'-Phosphatmonomeren sowie von 3'-Phosphatderivaten der Deoxynucleosidmonomere[123] (Abb. 6.14).

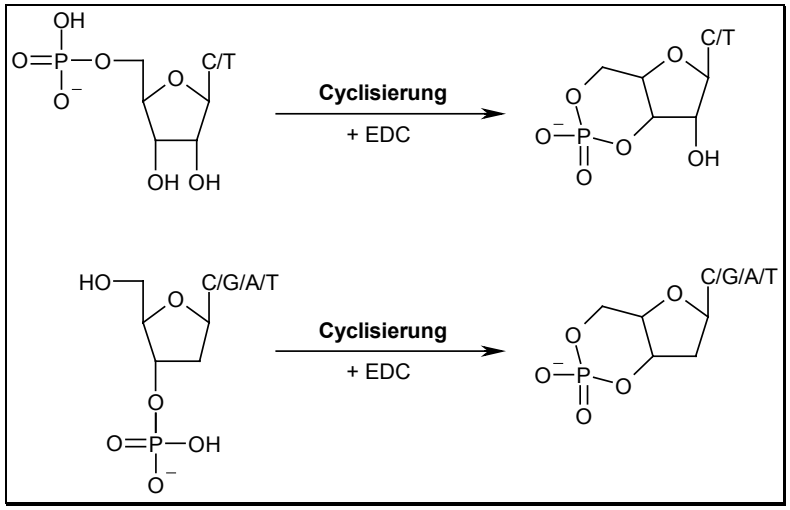


Abb. 6.14: Cyclisierung von 5'-Phosphat C bzw. T und 3'-Phosphat-deoxymononucleosiden

Außerdem stieß er bei der EDC-aktivierten Umsetzung des 5'-Phosphat-deoxyguanosin mit dem Tonmineral Montmorillonit neben dem dimeren Produkt $^{p}G^{p}G$ auch auf signifikante Mengen cyclisierten dimeren Produktes[124] (Abb. 6.15).

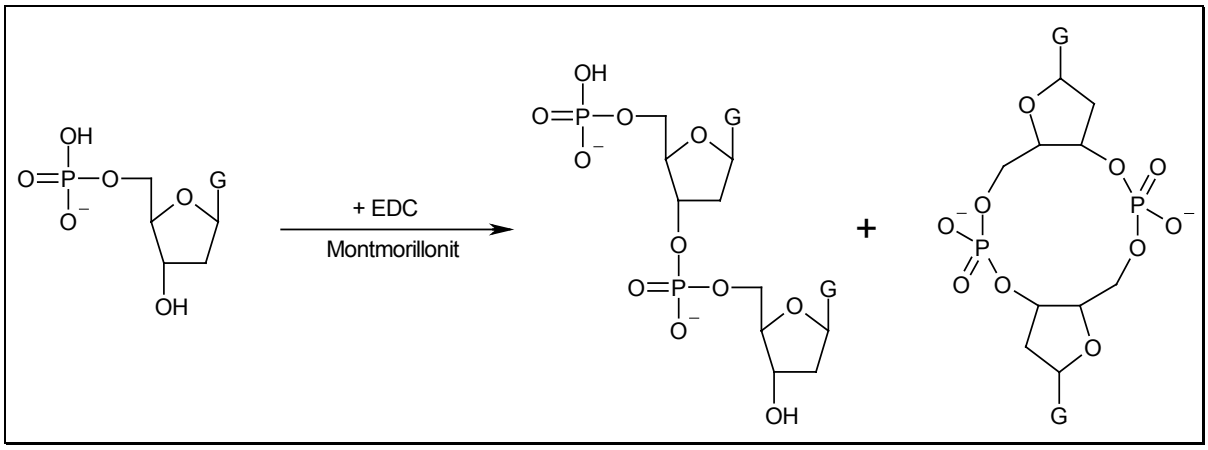


Abb. 6.15: Dimerisierung von ^{p}G und Cyclisierung des Dimerisierungsproduktes nach *Ferris*

Auch *Kawamura*[125] beobachtete bei der jeweiligen Oligomerisierung der Hexamere 5'-pGGGCCrC, 5'-pGCGCGrC und 5'-pGCCCGrG mit EDC und Imidazol bei 0 °C hauptsächlich Cyclisierung (Abb. 6.16b) und nur in geringen Ausbeuten von unter 10% die entsprechenden 12mere (Abb. 6.16a).

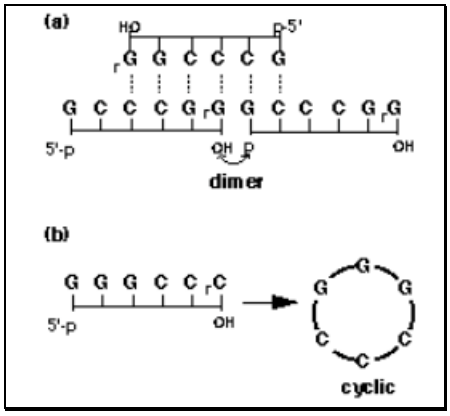


Abb. 6.16: Templatgesteuerte Ligation (a) und Cyclisierung (b) eines 6mers nach *Kawamura*

Orgel deutete in einem Review Artikel das generelle Cyclisierungspotenzial solcher Bausteine an, die beidseitig Funktionalitäten zur Backbone-Generierung besitzen[67] (siehe Kap. 1.9, trifunktionelle Bausteine). Er beschäftigte sich hierbei unter anderem mit den RNA-Derivatdimeren r($^{p}C^{np}G^{n}$) und r($^{p}G^{np}C^{n}$), bei deren Oligomerisierungsversuchen er mit EDC als Aktivator starke Cyclisierungseffekte beobachtete[121] (Abb. 6.17).

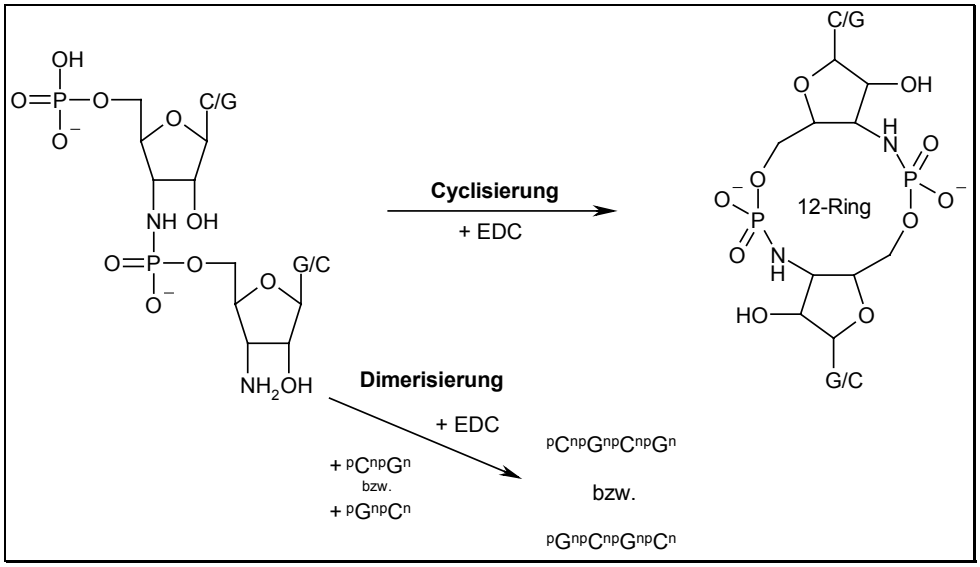


Abb. 6.17: *Orgel'sche* 5'-Phosphat-3'-Amino-RNA-Derivatdimersysteme $^{p}C^{np}G^{n}$ und $^{p}G^{np}C^{n}$

Hierbei stellte er im Falle des $^{p}G^{np}C^{n}$ eine Cyclisierungsrate von ca. 30 % des Gesamtumsatzes des Dimers fest, während ungefähr 60 % des $^{p}C^{np}G^{n}$ cyclisierten. Die sequenzabhängige Cyclisierungsneigung wurde mit der höheren Mini-Helixstabilität des GC RNA-Dimers gegenüber dem CG RNA-Dimer begründet[126], weil dadurch die reaktiven Enden des $^{p}G^{np}C^{n}$ seltener in die für einen Ringschluss notwendige Nachbarschaft geraten könnten. DNA-CG-Minihelices sind laut *SantaLucia's* "unified nearest-neighbour"-Modell für DNA[127] in etwa gleich stabil wie GC-Minihelices (siehe auch Kap. 7.7).

Die besten Ergebnisse erzielte *Orgel* bei möglichst niedrigen Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt und mit hohen Konzentrationen von 50 mM Dimer in HEPES-Puffer. Überträgt man die *Orgel'schen* Reaktionsbedingungen auf die in dieser Arbeit verwendeten, den *Orgel'schen* RNA-Derivaten ähnlichen DNA-Derivatdimersysteme, könnten die im folgenden diskutierten Effekte erzielt werden.

6.4.1 Variation der Temperatur

Eine geringere Temperatur sollte bei selbstkomplementären Sequenzen (TA, CG) den Anteil der in Mini-Doppelhelices involvierten Dimere und bei nicht-selbstkomplementären (TG, CA) sowie bei selbstkomplementären Sequenzen den Anteil der durch Basenstapelung stabilisierten Dimerhelices erhöhen. Die reaktionsfähigen Funktionalitäten wären innerhalb dieser rigideren Konformation weitestgehend voneinander getrennt. Dadurch wäre eine Verringerung der Cyclisierung zugunsten der Oligomerisierung denkbar, die jedoch gleichzeitig mit einer Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeiten erkauft würde. Ausserdem ist mit dem Gefrierpunkt des verwendeten Lösungsmittels (H_2O) bei 0 °C eine minimale Temperatur vorgegeben, so dass ein völliges Ausbleiben der Cyclisierung mit dieser Methode eher unwahrscheinlich ist.

Versuche die vier Dimere bei niedrigen Temperaturen und niedrigen Eduktkonzentrationen umzusetzen führten zur ausschließlichen Cyclisierung bei stark reduzierten Reaktionsgeschwindigkeiten. So verlangsamte sich beispielsweise die Umsetzung von 1 mM $^{n}CA^{p}$ bei 3 °C im Vergleich zu der Reaktion bei 30 °C unter ansonsten denselben Bedingungen um den Faktor 40. Damit war die alleinige Temperaturerniedrigung nicht geeignet, die Cyclisierungsrate ausreichend zu verringern.

6.4.2 Variation der Konzentration

Betrachtet man die Geschwindigkeitsgleichungen für den mono- und den bimolekularen Fall wird deutlich, dass ab einer bestimmten Konzentration, die durch den Quotienten k_1/k_2 bestimmt ist, die Dimerisierung genau so schnell wie die Cyclisierung wird. Die Dimerkonzentration geht als Quadrat in die Tetramerbildungsgeschwindigkeit ein, so dass ab einem gewissen Konzentrationswert die Tetramerbildung die Cyclusbildung überholen sollte.

Monomolekulare Reaktion:	Bimolekulare Reaktion:
$\text{Dimer} \rightarrow \text{cycl.Dimer}$	$\text{Dimer} + \text{Dimer} \rightarrow \text{Tetramer}$
$\frac{d[\text{cycl.Dimer}]}{dt} = k_1 \cdot [\text{Dimer}]$	$\frac{d[\text{Tetramer}]}{dt} = k_2 \cdot [\text{Dimer}]^2$

$$\text{Gleiche Geschwindigkeit } \frac{d[\text{cycl.Dimer}]}{dt} = \frac{d[\text{Tetramer}]}{dt},$$

$$\text{wenn } k_1 \cdot [\text{Dimer}] = k_2 \cdot [\text{Dimer}]^2 \Leftrightarrow [\text{Dimer}] = \frac{k_1}{k_2}$$

Die Zahl der potenziellen Reaktionspartner steigt mit zunehmender Dimerkonzentration an, so dass immer mehr intermolekulare 2-Teilchen Stöße stattfinden, die zum gewünschten Tetramer führen. Je geringer dagegen die Konzentration an Dimer, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer intramolekularen Cyclisierungsreaktion. Die Geschwindigkeitskonstante k_2 der Tetramerbildung sollte dabei deutlich höher als k_1 der Cyclisierung sein, damit die Eduktkonzentration in einem handhabbarem Rahmen von weit unter 1 mol/l liegt.

Auf dem Wege der Konzentrationserhöhung wäre damit theoretisch eine derart starke Betonung des bimolekularen Reaktionskanals möglich, dass die Cyclisierungsreaktion einen vernachlässigbar kleinen Anteil am Gesamtumsatz hätte. Der beträchtliche Nachteil dieses Lösungsansatzes wäre der stark erhöhte Substanzverbrauch an Edukt.

6.4.3 Acetatproblematik

Für die Experimente mit höheren Eduktkonzentrationen wurden zunächst Dimere bei Konzentrationen zwischen 10 und 100 mM umgesetzt. Die HPLC-Chromatogramme dieser Versuche zeigten eine ganze Reihe neuer Peaks, während die Peakfläche des jeweiligen Cyclisierungsproduktes zu einem gegebenen Zeitpunkt mit steigender Eduktkonzentration abnahm. Zur Charakterisierung der neu aufgetauchten Reaktionsprodukte wurde das Eluat des jeweiligen Peaks aufgefangen, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Substanz einer Massenanalyse unterzogen. Die MALDI-TOF-Spektren der abgetrennten Peaks zeigten, neben den mit steigender Eduktkonzentration sinkenden Cyclisierungsprodukten und vermehrt auftretenden höheren Oligomerisationsprodukten wie Tetramer, Hexamer und

Octamer, große Mengen acylierter Formen sowohl der Edukte als auch der Oligomerisationsprodukte. Diese unerwünschten Nebenprodukte erschienen im MALDI-Spektrum als Massenpeak des jeweiligen Moleküls zuzüglich einer Massenzunahme von 42 g·mol^{-1} (Beispielspektren für $^{n}TA^{p}$ und $^{n}CA^{p}$ in Abb. 6.18).

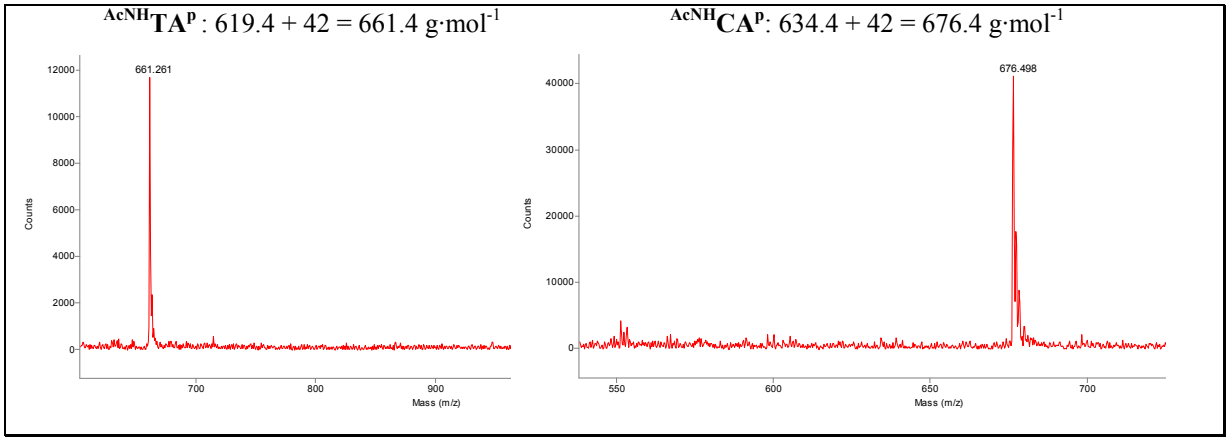


Abb. 6.18: MALDI-Spektren der Acylierungsprodukte von $^{n}TA^{p}$ und $^{n}CA^{p}$

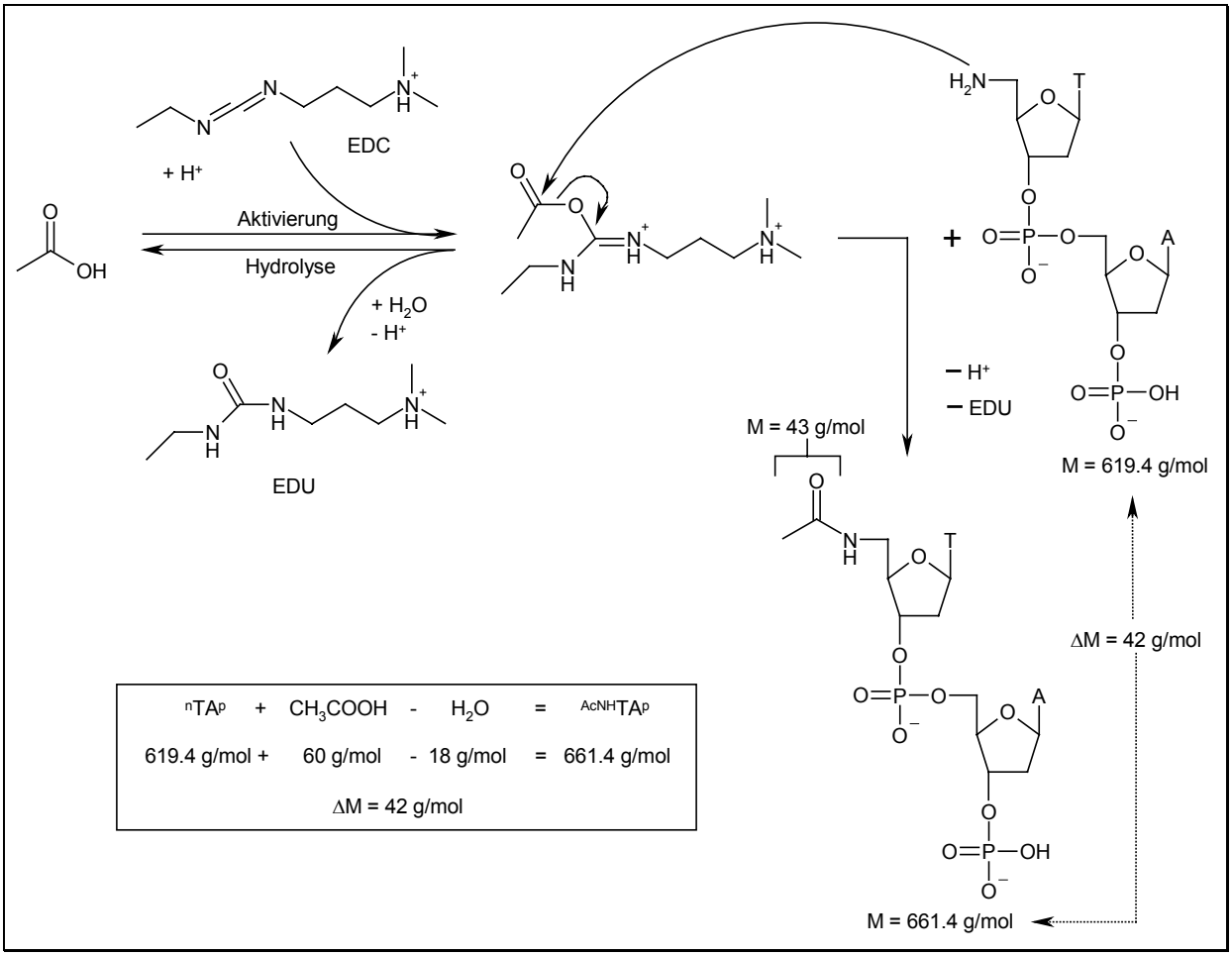


Abb. 6.19: Acylierungsmodell am Beispiel des $^{n}TA^{p}$. Massendifferenz zwischen $^{n}TA^{p}$ und $^{AcNH}TA^{p}$: 42 g·mol^{-1}

Demnach mussten bei der Reaktion für Acylierungen ausreichende Mengen an Essigsäure anwesend gewesen sein, die durch EDC aktiviert werden konnten und mit der 5'-Aminogruppe eines Dimers zum jeweiligen Acetat kondensierten. Das acylierte Produkt verzeichnete dabei einen Massenzuwachs von 42 $g \cdot mol^{-1}$ gegenüber dem Edukt (Abb. 6.19).

Dieses Modell wurde durch die erfolgreiche forcierte vollständige Acylierung von 1 mM $^{n}CA^{p}$ mit 50 mM Triethylammoniumacetat (TEAA) zu $^{AcNH}CA^{p}$ sowie Literaturbeispielen zur Aktivierungsreaktion von Acetat mit EDC gestützt[128]. Auch die Acylierung der Phosphatgruppe zu Monoacylphosphorsäureestern wird beschrieben[129], die in geringem Umfang in Form von insgesamt zweifach acylierten Produkten ($^{AcNH}CA^{pAc}$) durch Massenspektroskopie nachgewiesen wurden. MALDI-TOF-Messungen direkt aus der Kinetiklösung ohne vorherige chromatografische Reinigung zeigten ebenfalls Peaks mit einer Massenzunahme von 42 $g \cdot mol^{-1}$, so dass eine Reaktion mit dem Acetat des TEAA aus dem Eluentensystems der Chromatografie auszuschließen war. Die Acylierung sollte damit bereits in der Reaktionslösung stattgefunden haben.

Da die Acylierung eine Reaktion zweiter Ordnung darstellt, wird sie gegenüber der Cyclisierung (Reaktion erster Ordnung) bei hohen Essigsäurekonzentrationen bevorzugt - der überwiegende Teil der aktivierten Reaktionspartner wird durch das aktivierte Acetat geliefert. Auf diese Weise wurde zwar beiläufig die Theorie der Abschwächung der Cyclisierung durch Betonung des bimolekularen Reaktionskanals aufgrund einer Konzentrationserhöhung der Reaktionspartner bestätigt; bei dem Reaktionspartner mit der höchsten Konzentration handelte es sich allerdings um die unerwünschte Essigsäure, deren Herkunft zu diesem Zeitpunkt unbekannt war.

Reinigungsversuche mittels HPLC und Ionenaustausch-Chromatografie schlugen zunächst fehl, bis NMR-Untersuchungen zeigten, dass beim Evaporieren der Proben im Speedvac-Konzentrator geringe, aber zur Kontamination ausreichende Mengen Essigsäure von vorhergehenden Evaporierungen der Lehrstuhlmitarbeiter aus der gefrorenen Kühlfalle über die Gasphase in die einzurotierenden Proben gelangen konnten. Nach strikter Probentrennung und vollständiger Reinigung aller Oligonucleotide mittels Ionenaustausch-Chromatografie ließen sich in den Kinetiken keine acylierten Produkte mehr nachweisen.

7. Oligomerisation bei hoher Eduktkonzentration

7.1 Detektion und Charakterisierung der Oligomerisierungsprodukte

Zur Untersuchung des Oligomerisationspotenzials nicht-selbstkomplementärer Dimere bei hohen Eduktkonzentrationen wurde $^{n}TG^{p}$ bei einer Konzentration von 50 mM unter folgenden Bedingungen umgesetzt:

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}TG^{p}$	**c(Edukt)**	50 mM
Templat	$^{HO}(CA)_6{}^{OH}$	**c(Templat)**	16.7 mM
c(EDC)	0.2 M	**c(MeIm)**	0.1 M
Temperatur	20 °C	**HPLC-Säulentyp**	C18-RP
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	0.5 µl	**Elutionssystem**	TEAA/AcN

Die Zugabe von 12mer-Templat $^{OH}(CA)_6{}^{OH}$ und der Einsatz von 0.1 M 1-Methylimidazol (MeIm, pH 7.4) als Puffer und zusätzlichem Katalysator dienten der Steigerung der Oligomerisierungsrate (siehe Dissertation *Achilles*, S.91 f.)[130]. Das Verhältnis Dimer zu 12mer-Templat wurde mit 3 : 1 (50 mM : 16.7 mM) derart gewählt, dass doppelt so viel Templat vorhanden war, wie maximal vom Dimer besetzt werden konnte. Das Chromatogramm der Kinetik nach 120 min zeigt Oligomerisationsprodukte des TG-Dimers bis zum 16mer bei fast vollständigem Ausbleiben der Cyclisierung (Abb. 7.1).

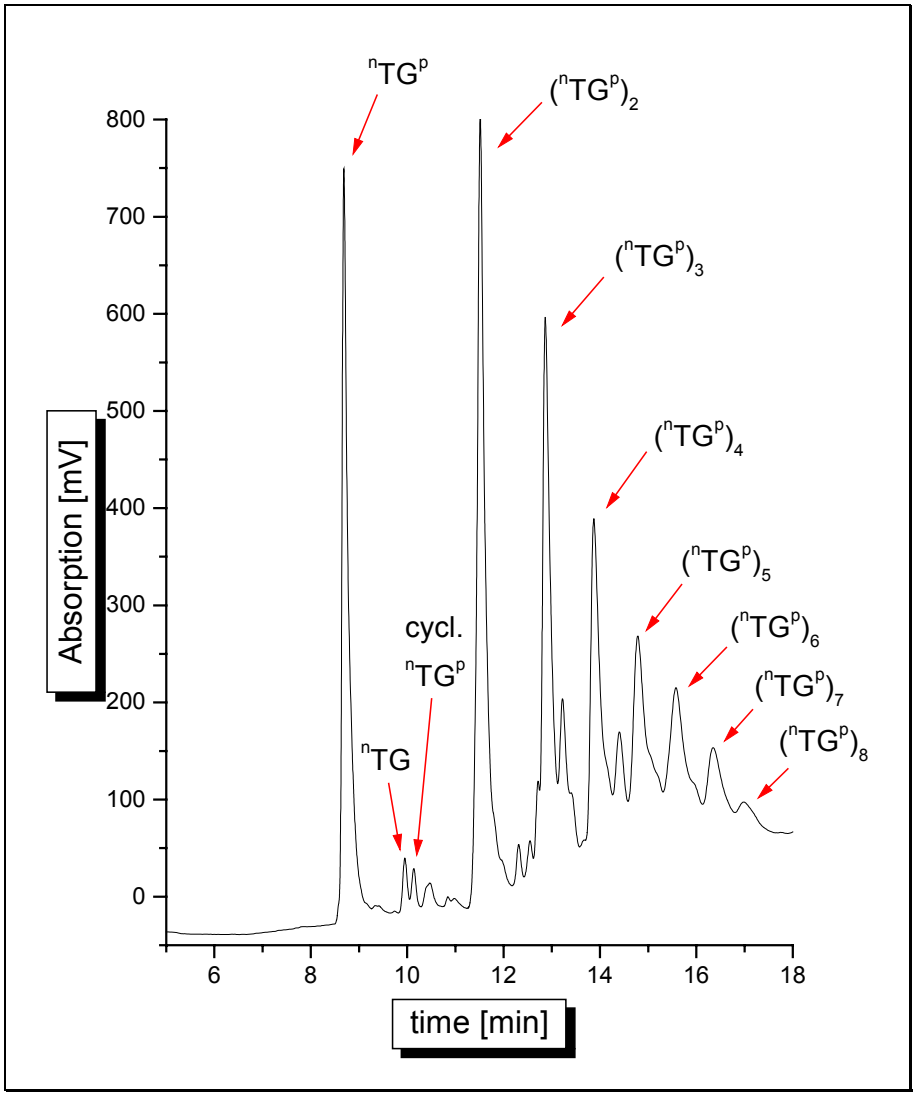
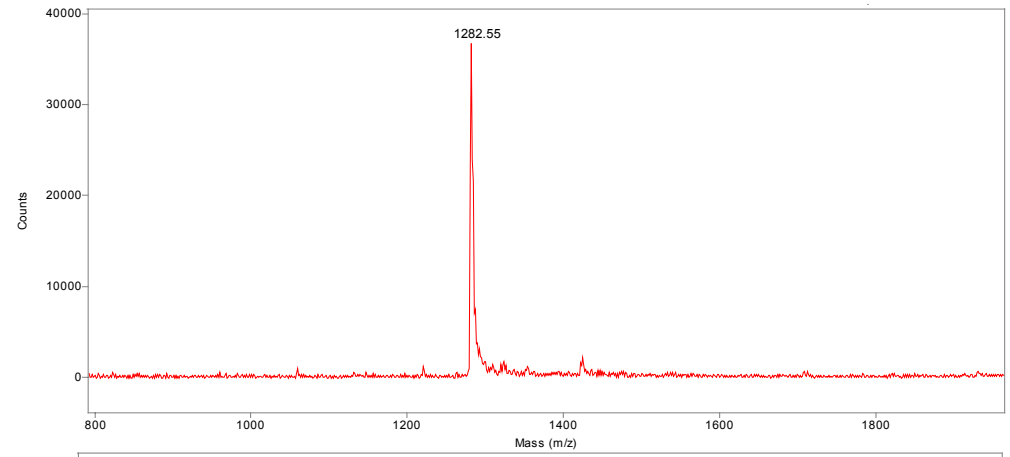


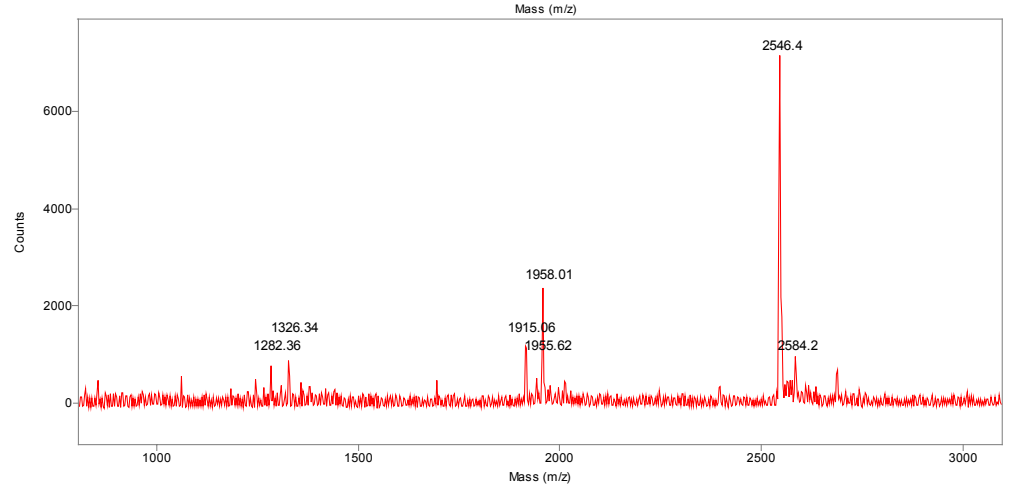
Abb. 7.1: HPLC-Chromatogramm von 50 mM $^{n}TG^{p}$ mit 16.7 mM $(CA)_6$ bei 20 °C nach 120 min

Die nicht gekennzeichneten Peakschultern lassen sich auf während der Chromatografie auftretende Dephosphorylierungsprodukte zurückführen, die bei höheren Retentionszeiten mit den Ursprungspeaks zusammenfallen (siehe Kap.6.1.3). Wie man am Überlappen der Peaks im obigen Chromatogramm sehen kann, sind der Peakauflösung auf der RP-HPLC Grenzen gesetzt, die einer quantitativen Auswertung derartiger Kinetiken Probleme bereiten können. Zunächst wurde das Eluat der jeweiligen Peakspitzen während der Chromatografie aufgefangen und per Massenspektroskopie analysiert. Auf der folgenden Seite sind repräsentative MALDI-Beispielspektren der Peaks von $(^{n}TG^{p})_2$, $(^{n}TG^{p})_4$, $(^{n}TG^{p})_6$ und $(^{n}TG^{p})_8$ aufgeführt.



$({}^{n}TG^{p})_2$, 4mer

M_{exp} = 1282.6 g·mol^{-1}
M_{theor} = 1281.8 g·mol^{-1}

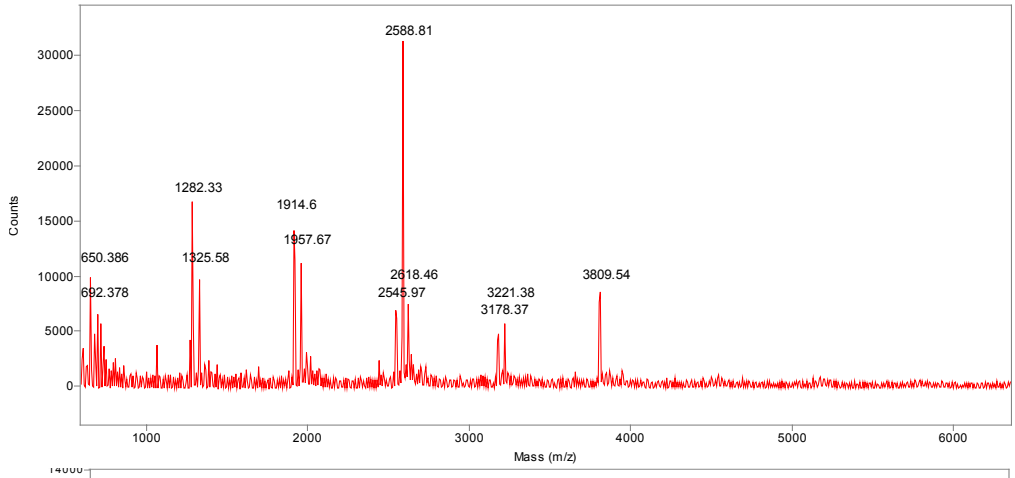


$({}^{n}TG^{p})_4$, 8mer

M_{exp} = 2546.4 g·mol^{-1}
M_{theor} = 2546.6 g·mol^{-1}

Fragmente:

1282 / 1326 , Δ=44, 4mer
1915 / 1958 , Δ=43, 6mer

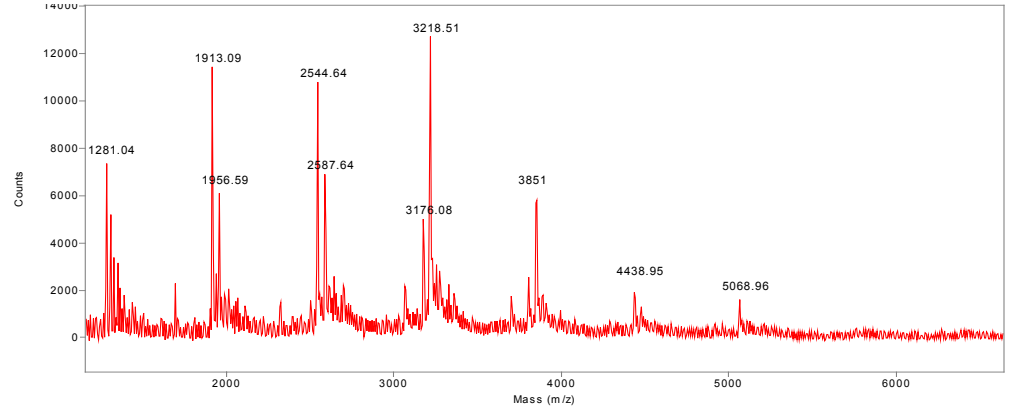


$({}^{n}TG^{p})_6$, 12mer

M_{exp} = 3809.5 g·mol^{-1}
M_{theor} = 3811.5 g·mol^{-1}

Fragmente:

650 / 692 , Δ=42, 2mer
1282 / 1325 , Δ=43, 4mer
1915 / 1958 , Δ=43, 6mer
2546 / 2589 , Δ=43, 8mer
3178 / 3221, Δ=43, 10mer



$({}^{n}TG^{p})_8$, 16mer

M_{exp} = 5069.0 g·mol^{-1}
M_{theor} = 5076.3 g·mol^{-1}

Fragmente:

2mer, 4mer, 6mer, 8mer,
10mer, 12mer, 14mer

Abb. 7.2: MALDI-Spektren der $({}^{n}TG^{p})_x$-Produkte, mit x = 2, 4, 6, 8

Bei kürzeren Reaktionsprodukten wie dem 4mer $(^{n}TG^{p})_2$ war der Massenhauptpeak identisch mit dem Massenpeak des längsten Reaktionsproduktes. Je länger die untersuchten Oligomere jedoch wurden, desto stärker traten auch Peaks mit Massen auf, die exakt den kürzeren Oligomerfragmenten und deren Acylierungsprodukten entsprachen. Der Massenpeak des eigentlichen bzw. längsten Reaktionsproduktes zeigte keinerlei Acylierung, so dass man davon ausgehen konnte, dass die beobachtete Fragmentierung und Acylierung während oder unmittelbar vor der MALDI-Messung stattfand und kein Acetat bei der Kinetik zugegen war. Ab einer bestimmten Oligomerlänge, die im Falle des $^{n}TG^{p}$ unter den gegebenen MALDI-Messbedingungen das 12mer darstellte, wurde die Fragmentierung derart ausgeprägt, dass der Massenhauptpeak von einem der Fragmentierungsprodukte gebildet wurde, während der eigentliche Produktpeak mit der höchsten Masse relativ klein war.

Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte in der allgemeinen Instabilität von Phosphoamidatbindungen gegenüber Acetat gefunden werden[131,132], das in Form des Triethylammoniumacetats (TEAA) im Elutionssystem der HPLC-Trennungen reichlich vorhanden ist und somit auch bei der chromatografischen Auftrennung der Kinetikproben in den zu untersuchenden abgetrennten Oligomerproben anfällt. Ein Austausch des TEAA/AcN HPLC-Elutionsmittelsystems gegen ein NH_4HCO_3/AcN basiertes System scheidet im übrigen aufgrund der erheblich schlechteren Trenneigenschaften des letzteren Systems bei längeren Oligomeren aus.

Mechanistisch würde die Spaltung der Phosphoamidatbindung über einen nucleophilen Angriff des Acetat-Anions erfolgen. Die entstehenden Fragmente entsprächen dabei zum einen dem entsprechenden 5'-Amino-3'-Phosphat-Fragment, zum anderen aber dem gemischten Phosphorsäureanhydrid des anderen Fragments mit einem Massenzuwachs von 43 $g \cdot mol^{-1}$ (siehe Abb. 7.3). Je länger das Oligomerisierungsprodukt und die damit einhergehende steigende Anzahl an spaltbaren Phosphoamidatbindungen ist, desto stärker würde auch die in den MALDI-Spektren sichtbare Fragmentierung, was auch genau den Beobachtungen entspricht. Berücksichtigt man die obige Fragmentierungstheorie, so kann man den HPLC-Peaks jeweils die größte in ihrem MALDI-Spektrum auftretende Masse zuordnen. Dabei stimmen die ermittelten Massen mit den laut HPLC-Peakreihenfolge erwarteten Massen überein. Die hier gemachten Beobachtungen lassen sich auch auf die MALDI-Spektren von Oligomerisationsprodukten der anderen drei Dimere übertragen.

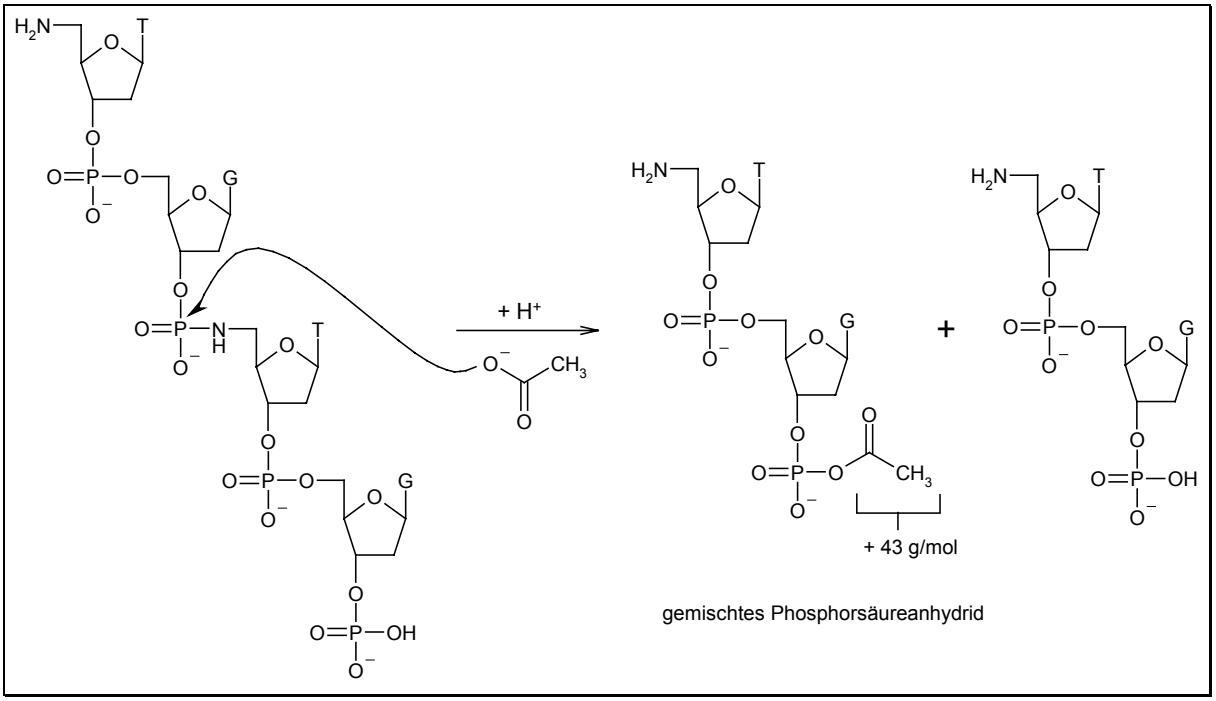


Abb. 7.3: Modell der Fragmentierung durch Spaltung der Phosphoamidatbindung am Beispiel des 4mers

Für die folgenden Experimente kehrte man zum reinen HEPES-Puffersystem zurück, da der Einsatz von MeIm die kinetische Analyse verkompliziert und eine ausreichende Oligomerisierung den zusätzlichen Katalysator überflüssig macht.

7.2 Variation der Temperatur bei 50 mM Edukt

Der Durchbruch bei der Oligomerisierung der Dimere durch Erhöhung der Eduktkonzentration auf 50 mM öffnete die Tür zum näheren Studium der vier Systeme. Hierbei stellte sich insbesondere die Frage, welchen Einfluss die Dimersequenz auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat und wie sich eine Variation der Temperatur auf die Oligomerisierung auswirkt. Ferner sollten die beiden selbstkomplementären Systeme (TA und CG) in der Lage sein katalytisch wirksame Komplexe mit ihren Reaktionsprodukten zu bilden, auf die im entsprechenden Kapitel 7.4 genauer eingegangen wird.

Dabei ist anzumerken, dass ein offenes System kein einfaches eng definiertes katalytisches Temperaturoptimum besitzt, wie es bei einem einseitig geschlossenen System mit einem einzigen möglichen katalytisch aktiven termolekularen Komplex der Fall wäre. Die Geschwindigkeit der Autokatalyse ist bei normalen termolekularen Komplexen zum einen

von dessen Gleichgewichtskonzentration und zum anderen von der Geschwindigkeitskonstante der Ligation im Komplex nach *Arrhenius* von der Temperatur abhängig[133]. Diese beiden Effekte zeigen bei steigender Temperatur gegenläufige Einflüsse und führen in einem begrenzten Temperaturintervall, das man als Temperaturoptimum bezeichnet, zu einer maximalen Geschwindigkeit der Autokatalyse. Da aber bei einem offenen System durch die Menge an verschieden langen Oligomerisationsprodukten eine Vielzahl an unterschiedlich stabilen Komplexen mit jeweils eigenem katalytischen Temperaturoptimum gebildet werden können, existiert kein allgemeingültiges Temperaturoptimum für die gesamte Oligomerisierung. Um den Einfluss eines weiten Temperaturspektrums auf die Reaktionen zu ermitteln, wurde ein Screening des für Replikationsexperimente in Frage kommenden Temperaturbereichs von 2 °C bis 30 °C durchgeführt. Temperaturen unterhalb von 0 °C sind bei wässrigen Lösungsmitteln nur über Gefrierpunktserniedrigung durch störende Salze möglich, oberhalb 30 °C kommt es vermehrt zu störenden Nebenreaktionen des EDC[134].

Für die Untersuchungen wurden demnach Kinetiken bei Temperaturen von 2 °C, 15 °C und 30 °C sowie einer Eduktkonzentration von 50 mM mit allen vier Dimeren unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukte	$^{n}TA^{p}$, $^{n}TG^{p}$, $^{n}CA^{p}$, $^{n}CG^{p}$	**c(Edukt)**	50 mM
c(EDC)	0.2 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2°C, 15°C, 30°C	**HPLC-Säulentyp**	C18-RP
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	0.2 µl	**Elutionssystem**	TEAA/AcN

Dem erhöhten Substanzverbrauch wurde durch eine Verkleinerung der Kapillaren auf 0.2 µl entgegen getreten, die jedoch aufgrund ihrer geringen Größe schwieriger zu handhaben waren. Tests mit 0.1 µl Kapillaren zeigten, dass sich noch kürzere Kapillaren einer manuellen Bedienung entzogen und deshalb nicht sinnvoll eingesetzt werden konnten. Neben der Ressourcenschonung hatte die Verringerung des Reaktionsvolumens auch einen positiven Einfluss auf den Quenching-Effekt, der die bimolekulare Reaktion nun nach dem Quenchen der 0.2 µl in 200 µl Wasser um den Faktor 1.000.000 bremste. Die Reaktionsansätze wurden im Kühlraum hergestellt.

7.3 Die nicht-selbstkomplementären Dimere $^{n}TG^{p}$ und $^{n}CA^{p}$

7.3.1 Oligomerisierung von $^{n}TG^{p}$

Die Umsetzung des acetatfreien $^{n}TG^{p}$ bei einer Konzentration von 50 mM führte zur Bildung der gewünschten Oligomerisierungsprodukte, wie sie z.B. im HPLC-Stackplot der Reaktion bei 2 °C in Abb. 7.4 sichtbar sind. Die Cyclisierungsreaktion ist unter diesen Bedingungen weitestgehend in den Hintergrund gedrängt, jedoch nicht völlig abwesend. Schwankungen der Peakbreite können trotz konstant abnehmender Fläche zu unregelmäßigen Peakhöhenvariationen führen, ausschlaggebend ist jedoch nicht die Peakhöhe, sondern die Peakfläche.

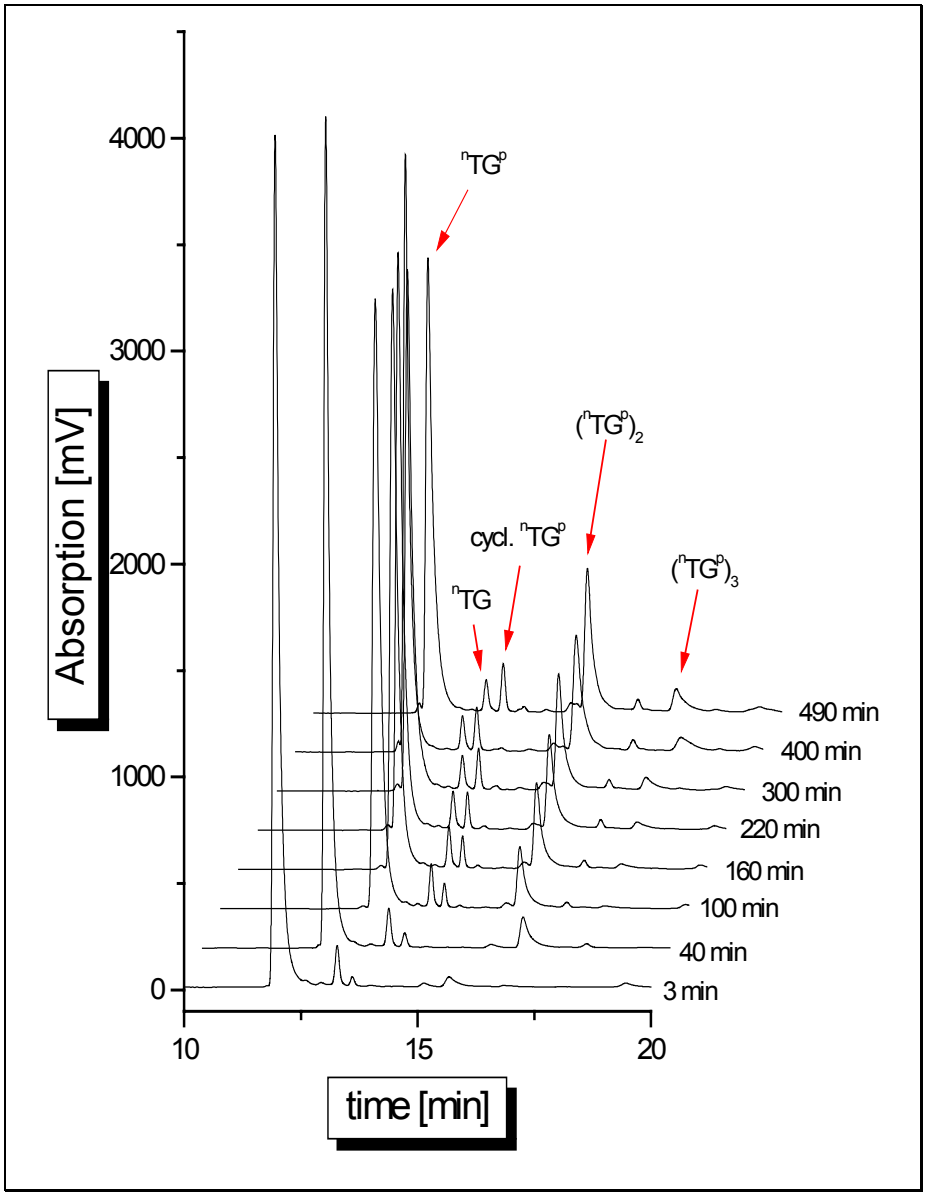


Abb. 7.4: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}TG^{p}$, 50 mM, 2 °C

Die Auftragung der Konzentrations-Zeit-Kurven offenbart den Temperatureinfluss bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit. Zunächst erfolgt eine nach Reaktionstemperatur getrennte Abbildung der Diagramme, die neben der Abnahme des Eduktes die Bildungskurven aller bei der jeweiligen Kinetik auftretenden Produkte beinhaltet (Abb. 7.5). Dem jeweiligen Diagramm wird dabei rechts eine Vergrößerung (Y-Achsen Zoom) hinzugefügt, um den Bildungsverlauf der Oligomerisationsprodukte zu verdeutlichen. Danach werden die Reaktionskurven der einzelnen Oligomere bei den drei verwendeten Temperaturen miteinander verglichen (Abb. 7.6). Bei den Kurven handelt es sich um polynomische Trendlinien zur optimierten Visualisierung des Kurvenverlaufs, die von Excel für jede Datenreihe, soweit möglich, separat generiert werden und damit keine auf einem gemeinsamen Modell basierenden Fitkurven darstellen.

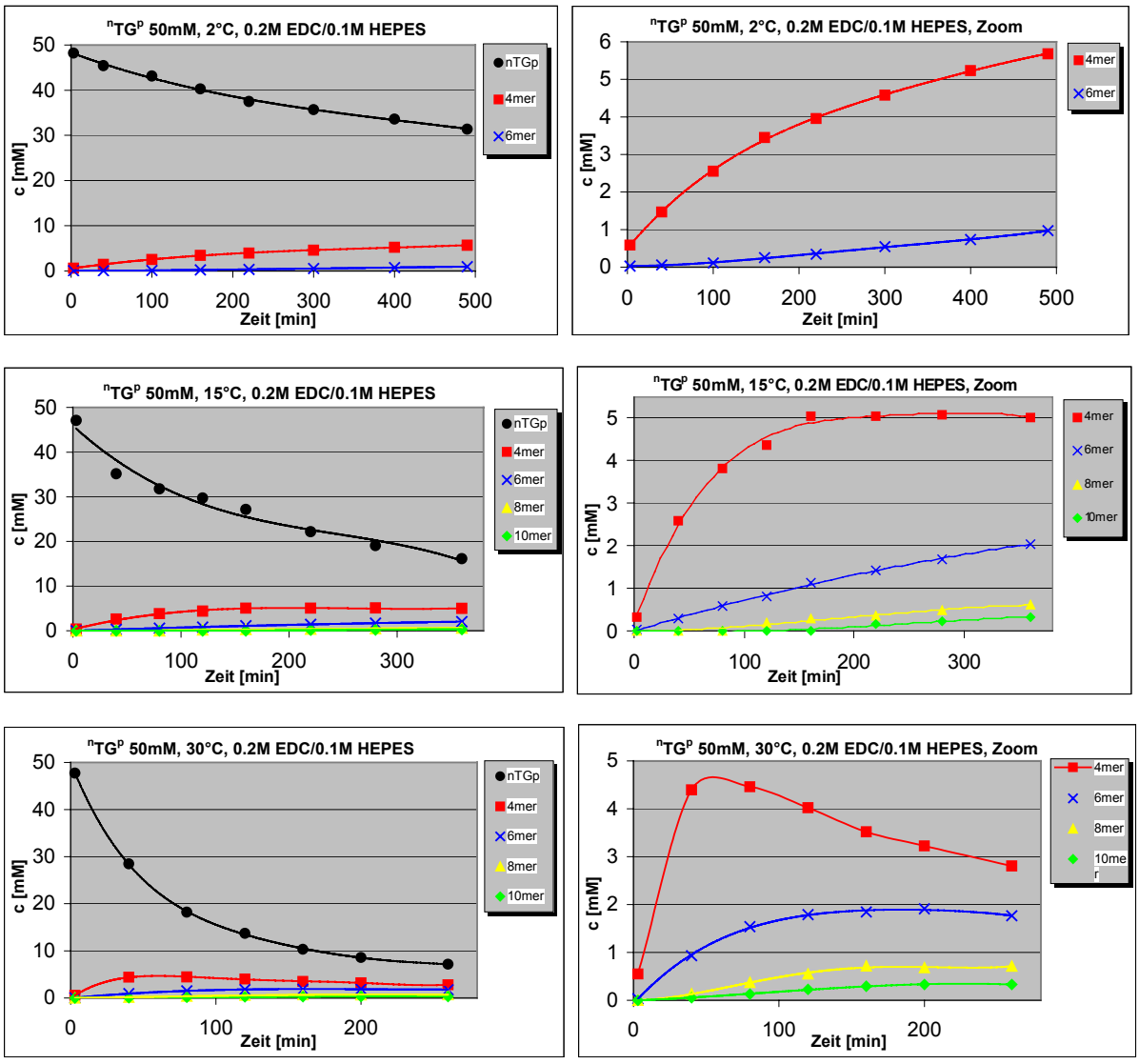


Abb. 7.5: Konzentrations-Zeit-Kurven der $({}^{n}TG^{p})_{x}$-Oligomere bei Temperaturen von 2, 15 oder 30 °C

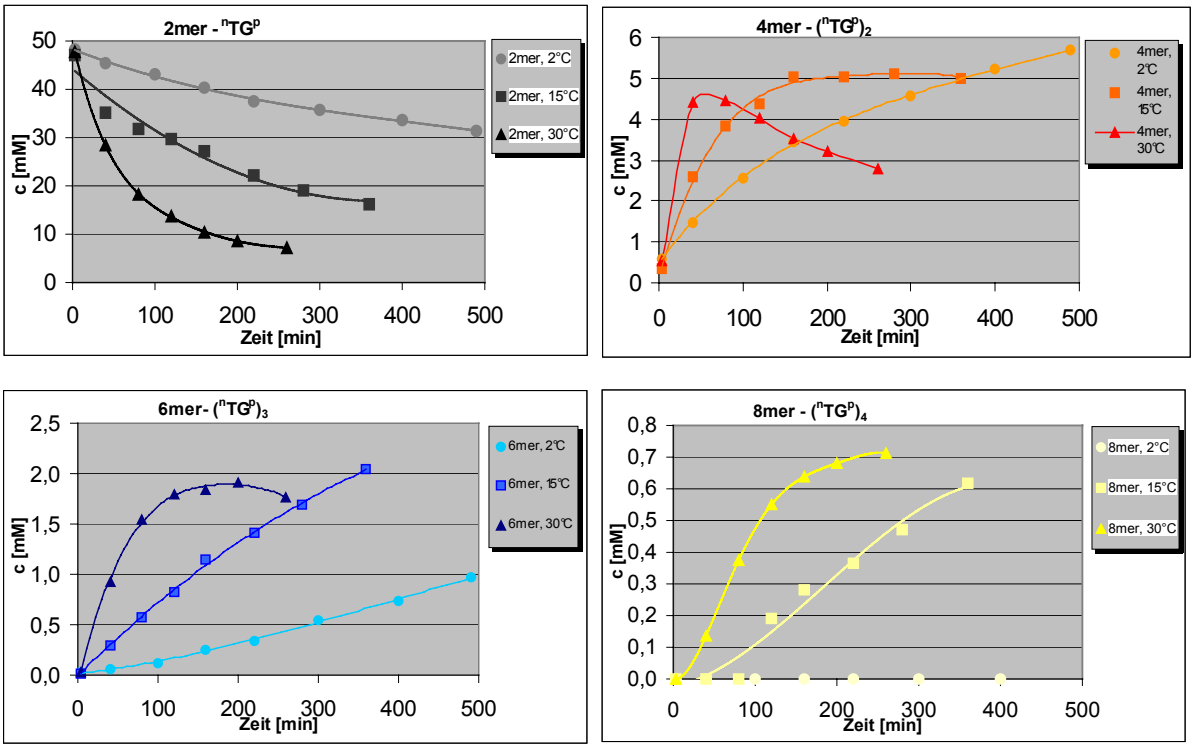


Abb. 7.6: Konzentrations-Zeit-Kurven der $(^{n}TG^{p})_{x}$-Oligomere der Länge x = 1 bis 4

Bei 2 °C wurde innerhalb eines Untersuchungszeitraums von ca. 500 Minuten maximal die Bildung des Hexamers $(^{n}TG^{p})_{3}$ beobachtet, während bei 15 und 30 °C sowohl das Octamer $(^{n}TG^{p})_{4}$ als auch das Decamer $(^{n}TG^{p})_{5}$ zu sehen waren. Gerade noch erkennbare HPLC-Peaks der höheren Oligomere wurden aufgrund ihrer geringen Integrationsfläche und den damit einhergehenden großen Messfehlern aufgrund des ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnisses nicht mit in die Auswertung übernommen.

Die Diagramme zeigen Kurvenverläufe, die für Oligomerisationsreaktionen erwartet werden. Anhand der starken Unterschiede in der Konzentrationsabnahmekurve des Edukts $^{n}TG^{p}$ bei 2, 15 und 30 °C lässt sich die hohe Temperaturabhängigkeit der Gesamtreaktion verifizieren. Das aus der Dimerisierung zweier $^{n}TG^{p}$-Bausteine hervorgehende 4mer $(^{n}TG^{p})_{2}$ wird stetig gebildet und stellt während des Beobachtungszeitraumes bei allen drei Temperaturen das Produkt mit der höchsten Konzentration dar. Das einzig aus der Reaktion von 4mer mit 2mer hervorgehende 6mer tritt erwartungsgemäß erst bei fortschreitender 4mer Bildung signifikant in Erscheinung. Es erreicht aber zu keinem Zeitpunkt die Konzentration des 4mers, da es, wie alle anderen Oligomerisationsprodukte auch, ein Zwischenprodukt der Oligomerisierungskette verkörpert, das wiederum zu höheren Oligomeren abreagiert. Aus Tab. 7.1 kann man entnehmen, aus welchen Eduktkombinationen ein gegebenes Oligomer gebildet werden kann.

Bei einem Oligomer, das aus M Dimereinheiten aufgebaut ist, findet sich die Anzahl N der Reaktionswege, die zu dem Oligomer führen über N = M-1. Die gesamte Anzahl der Reaktionskanäle zu den Produkten wächst demnach mit $N_{ges} = \sum_{M=1}^{M_{max}} M-1$. Für die acht Oligomerisierungsprodukte bis zum 16mer finden sich also schon 1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6 + 7 = 28 Reaktionskanäle.

Produkt:	4mer	6mer	8mer	10mer	12mer	14mer	16mer
Edukte:	2 + 2	2 + 4	2 + 6	2 + 8	2 + 10	2 + 12	2 + 14
		4 + 2	6 + 2	8 + 2	10 + 2	12 + 2	14 + 2
			4 + 4	4 + 6	4 + 8	4 + 10	4 + 12
				6 + 4	8 + 4	10 + 4	12 + 4
					6 + 6	6 + 8	6 + 10
						8 + 6	10 + 6
							8 + 8
M	2	3	4	5	6	7	8
N	1	2	3	4	5	6	7

Tab. 7.1: mögliche Reaktionskanäle zu den Oligomerisierungsprodukten, exemplarisch bis zum 16mer. N_{ges}=28

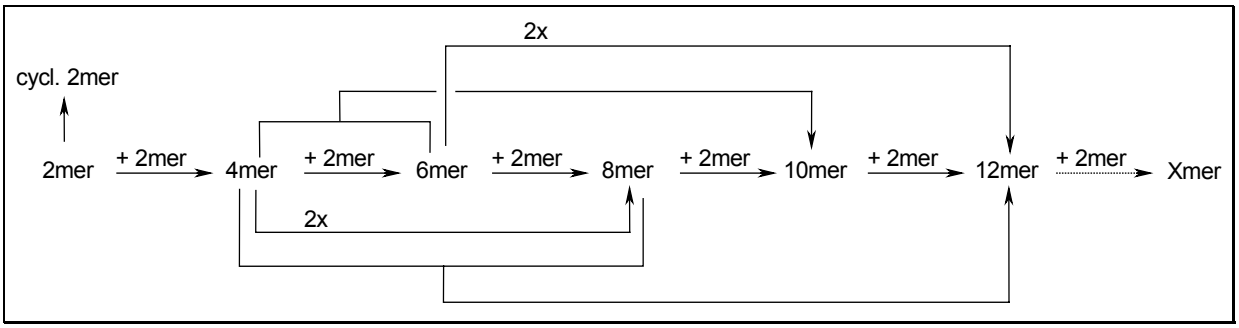


Abb. 7.7: vereinfachtes Oligomerisierungsschema des Dimersystems bis zum 12mer

Die Charakteristika einer Oligomerisierungsreaktion, in der jedes aus kürzeren Oligomeren enstandene Produkt auch Edukt für noch längere Oligomere darstellt und damit parallel abreagieren oder nachgebildet werden kann, werden insbesondere bei den Kinetiken mit höheren Temperaturen und damit auch höheren Reaktionsgeschwindigkeiten deutlich. So scheint z.B. die Tetramer-Konzentration bei 15 °C nach ca. 200 min fast zu stagnieren, während alle anderen Reaktionspartner größere Konzentrationsveränderungen aufweisen. Real wird aber in diesem Zeitraum gerade so viel Tetramer aus Dimer-Bausteinen generiert, wie simultan Tetramer mit anderen Bausteinen zu höheren Oligomeren abreagiert. Noch deutlicher wird der Zwischenproduktcharakter dann, wenn die Bildungskurve wie z.B. beim

4mer bei 30 °C nach steilem Anstieg ein Maximum durchläuft und daraufhin beständig abfällt. Hier ist die Eduktkonzentration für das Tetramer innerhalb kurzer Zeit auf einen so geringen Wert gefallen, dass das Tetramer schneller mit seinen Reaktionspartnern abreagiert, als es aus den Dimerbausteinen nachgebildet werden kann. Zum Zeitpunkt, an dem die 4mer Bildungskurve ihr Maximum durchläuft, wird das Tetramer trotzdem noch vorrangig mit Dimer zum Hexamer reagieren, da die Konzentration des Dimers noch bei weitem höher als die der möglichen längeren (4mer, 6mer, etc.) Reaktionspartner ist.

Betrachtet man die Gesamtreaktion, dann fällt vor allem bei höheren Temperaturen auf, dass die Kurven mit fortschreitender Reaktionszeit zunehmend abflachen. Letztendlich wird die Geschwindigkeit der Oligomerisierungs-Gesamtreaktion sowohl durch die Konzentration an reaktionsfähigem Oligomer bestimmt, als auch durch den Verbrauch an EDC im vorgeschalteten Aktivierungsschritt. Die Konzentration beider Spezies nimmt im Verlaufe der Reaktion stetig ab. Das Verhältnis von EDC zu Oligomermolekülen verschiebt sich jedoch mit steigender Reaktionsdauer von anfänglich 4:1 (200 mM EDC : 50 mM Dimer) zusehends weiter auf die Seite des EDC. So sollte nach Abreaktion von 25 mM Oligomer und damit auch 25 mM EDC das obige Verhältnis unter theoretischer Vernachlässigung der EDC-Hydrolyse bei 7:1 liegen (25 mM Oligomer : 175 mM EDC). Die EDC-Hydrolyse selbst wird real aufgrund der sinkenden Oligomer-Konzentration ohnehin zunehmend gebremst, da die Hydrolysereaktion durch freie Phosphat-Enden katalysiert wird und um Größenordnungen schneller als die unkatalysierte spontane Hydrolyse ist. Verfolgt man diesen Gedanken weiter, dann würde man bei der im Extremfall maximal möglichen Oligomerisation aller Dimere zu einem einzigen Strang, der am Ende der Reaktion stände, 50 mM von 200 mM, also 25 % des eingesetzten EDC verbrauchen. Die theoretisch verbleibende EDC-Konzentration von 150 mM stände dann einem einzigen extrem langen Polymermolekül gegenüber. Auf die Geschwindigkeitsgleichung einer bimolekularen Reaktion bezogen, die sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Oligomerisierung Geltung hat, bewirkt diese prozentual geringere Abnahme der EDC-Konzentration im Vergleich zur Abnahme der Oligomer-konzentration eine stärkere Verlangsamung der Oligomerisierungs- als der Aktivierungs-reaktion. So würde nach einer theoretischen Reaktion von 50 mM Dimer zu 25 mM Tetramer unter Verbrauch von 25 mM EDC die Oligomerisierungsgeschwindigkeit zu diesem Zeitpunkt auf $(25/50)^2 \cdot 100\% = 25\%$ der Ausgangsgeschwindigkeit abgenommen haben. Die Aktivierungsgeschwindigkeit dagegen würde noch $(175/200) \cdot (25/50) \cdot 100\% = 43.75\%$ ihrer Anfangsgeschwindigkeit besitzen. Damit wäre die Oligomerisierung gegenüber der

Aktivierung um den Faktor 1.75 langsamer geworden. Dieser Wert vergrößert sich im Laufe der Reaktion durch die Verschiebung der Konzentrationsverhältnisse zwischen EDC und Oligomeren zugunsten des EDC immer mehr. Zum Zeitpunkt der theoretischen Bildung von beispielsweise 12.5 mM Octamer aus 50 mM Dimer würde er bei ca. 3.25 liegen. Aus diesem Gedankenexperiment kann somit der Schluss gezogen werden, dass der Einfluss der EDC-Konzentration auf den Rückgang der Gesamtgeschwindigkeit mit fortschreitender Oligomerisation immer geringer wird. Die sichtliche Verflachung der Konzentrations-Zeit-Kurven der beteiligten Oligomere mit längerer Reaktionszeit und damit die Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit sollte deshalb nicht hauptsächlich auf die sinkende EDC-Konzentration zurückzuführen sein, sondern vorrangig auf die niedrigere Gesamt-konzentration an Oligomeren, bzw. reaktiven Funktionalitäten.

7.3.2 Diskussion der Konzentrations-Zeit-Kurven

Die Auftragung der Konzentrations-Zeit Verläufe einer bestimmten Oligomersequenz bei verschiedenen Temperaturen (2 °C, 15 °C, 30 °C) offenbart weitere Details der Reaktion. Neben der bereits angesprochenen sichtbaren Verflachung der Kurven zu späteren Reaktionszeiten ist es auffallend, dass das Konzentrationsmaximum, das ein Oligomer einer bestimmten Länge durchläuft, mit zunehmender Reaktionstemperatur kleiner wird, anstatt nach steilem Kurvenanstieg auch entsprechend hohe Maxima zu erreichen. Dieser Effekt ist nicht allein auf Nebenreaktionen, wie die Cyclisierung zurück zu führen, da er im CG-System am stärksten beobachtet werden kann, obwohl dieses System die geringste Cyclisierungsneigung aufweist (siehe Kap. 7.4.2). Durch die erhöhte Energiezufuhr wird vielmehr die Bildung aller Oligomere beschleunigt. Da es aber deutlich mehr Abreaktionskanäle (theoretisch unbegrenzt) zu längeren Produkten für ein gegebenes Oligomer als Hinreaktions- bzw. Bildungsreaktionskanäle gibt, hat die Erhöhung der Temperatur im Rahmen der untersuchten Reaktionszeit eine stärkere Abreaktion der kürzeren Oligomere gegenüber den längeren Oligomeren zur Folge, die ihre Edukte aus den kürzeren Bausteinen beziehen. Damit tritt bei Temperaturerhöhung der Zeitpunkt des Maximum-durchlaufs, nach dem ein betrachtetes Oligomer schneller abreagiert, als es nachgebildet werden kann, früher ein, so dass die Maximalkonzentration dieses Oligomers kleiner als bei einer niedrigeren Reaktionstemperatur wird. Die Rolle der Oligomere als Edukt oder Produkt ist hierbei nicht mehr differenzierbar, da jedes Produkt ab dem Tetramer im Verlauf der Reaktion als Edukt für noch längere Oligomersequenzen dienen kann.

Letzterer Sachverhalt äußert sich auch in der Kurvenform. Während z.B. die 6mer Bildungskurve bei 2 °C zunehmend ansteigt, zeigt sie bei 15 °C einen nahezu linearen bis leicht abflachenden Kurvenverlauf bei stark erhöhter Ausgangssteigung. Die Anfangsgeschwindigkeit der 30 °C Kurve ist noch höher, die Kurve selbst durchläuft jedoch ein Maximum und fällt dann ab. Diese drei auf den ersten Blick unterschiedlichen Kurvenformen sind im Endeffekt in der x-Achse gestauchte oder gestreckte Ausschnitte einer anfänglich sigmoiden Kurve, die später durch Abreaktion der entsprechenden Spezies ein Konzentrations-Maximum durchläuft und dann abfällt. Die Bildungskurve des Hexamers bei 2 °C zeigt beispielsweise den Beginn einer sigmoiden Kurve, die ihren Wendepunkt noch nicht erreicht hat. Die 15 °C Kurve lässt einen Wendepunkt erahnen, während die 30 °C Kurve eine sigmoide Kurve darstellt, die, bedingt durch die Reaktion des 6mers zu höheren Oligomeren, nach Durchlaufen des Maximums wieder abfällt. Wie im Falle des 6mers ist die Anzahl der Messpunkte bei höheren Temperaturen in den ersten Minuten mitunter nicht groß genug, um den parabelförmigen Anfang der Kurve mit steigender Reaktionsgeschwindigkeit herauszuarbeiten. Besonders deutlich dagegen wird die Sigmoidalität z.B. in der 8mer $(^{n}TG^{p})_4$ Bildungskurve bei 30 °C.

Grund für diese Kurvenform ist der Mangel an Edukt für Oligomere ab dem 6mer zu Beginn der Reaktion, der erst mit fortschreitender Reaktionsdauer beseitigt wird, so dass die Bildungsgeschwindigkeit des jeweiligen Oligomers zunächst beschleunigt wird. Für das 6mer beispielsweise bedeutet dies, dass es umso schneller gebildet wird, je mehr 4mer entstanden ist. Je länger das beobachtete Oligomer ist, desto später werden die für dessen Bildung benötigten Edukte gebildet und desto ausgeprägter ist der ansteigende Anteil der sigmoidalen Kurve. Sobald die Bildungsgeschwindigkeit eines Oligomers langsamer wächst, als seine Abreaktionsgeschwindigkeit, durchläuft die Kurve einen Wendepunkt und flacht langsam ab. Wird die Bildungsgeschwindigkeit des Oligomers kleiner als seine Abreaktions-geschwindigkeit, dann durchläuft die Kurve ihr Maximum und nimmt fortan stetig ab.

Die Diskussion der zugrunde liegenden Kurvenform bezüglich ihrer Minima, Maxima, Wendepunkte, etc. erlaubt eine genauere Betrachtung der Reaktionsgeschwindigkeits-verhältnisse zu einem bestimmten Zeitpunkt und deren Veränderung im Verlauf der Reaktion. Hierzu ist die Analyse einer qualitativ ähnlichen Simulationskurve bereits ausreichend.

Oligomere ≥ 6mer:

Der typische Konzentrations-Zeit Verlauf für Produkte der Oligomerisierungskette ab dem 6mer lässt sich sehr gut an Hand von Exponentialfunktionsgleichungen des Typs $y = a \cdot x^b \cdot e^{c \cdot x}$ mit a > 0, b > 1 und c < 0 grafisch simulieren. Die Simulation demonstriert den Kurvenverlauf vom Start bis zur vollständigen Abreaktion, während die gemessenen Kurven überwiegend nur Ausschnitte aus dieser Gesamtkurve zeigen können. Die Ähnlichkeit der auf diese Weise simulierten Kurve mit den realen Kurven wird bei Betrachtung aller Kinetiken der vier Dimere offenkundig. So zeigt z.B. die 8mer $({}^{n}TA^{p})_4$ Bildungskurve bei 30 °C (Abb. 7.8) zu Beginn Sigmoidalität und ein Maximum gegen Ende der Messung, die sich in einer Kurve des Typs $y = x^2 \cdot e^{-x}$ wiederfinden lassen (Abb. 7.9, blaue Kurve).

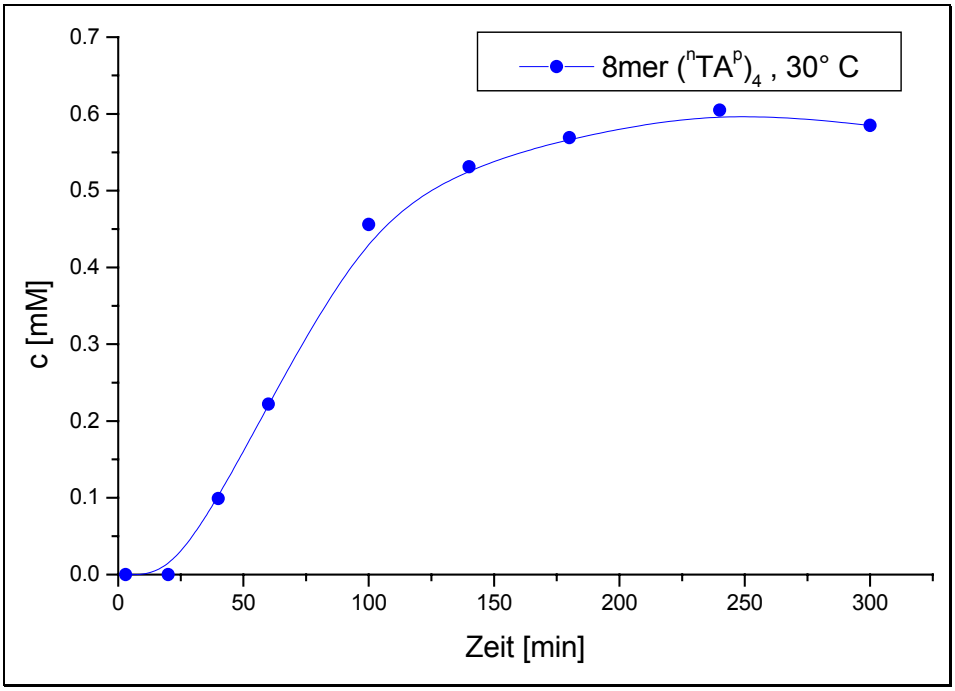


Abb. 7.8: Beispiel: Bildungskurve des 8mers $({}^{n}TA^{p})_4$, 30 °C

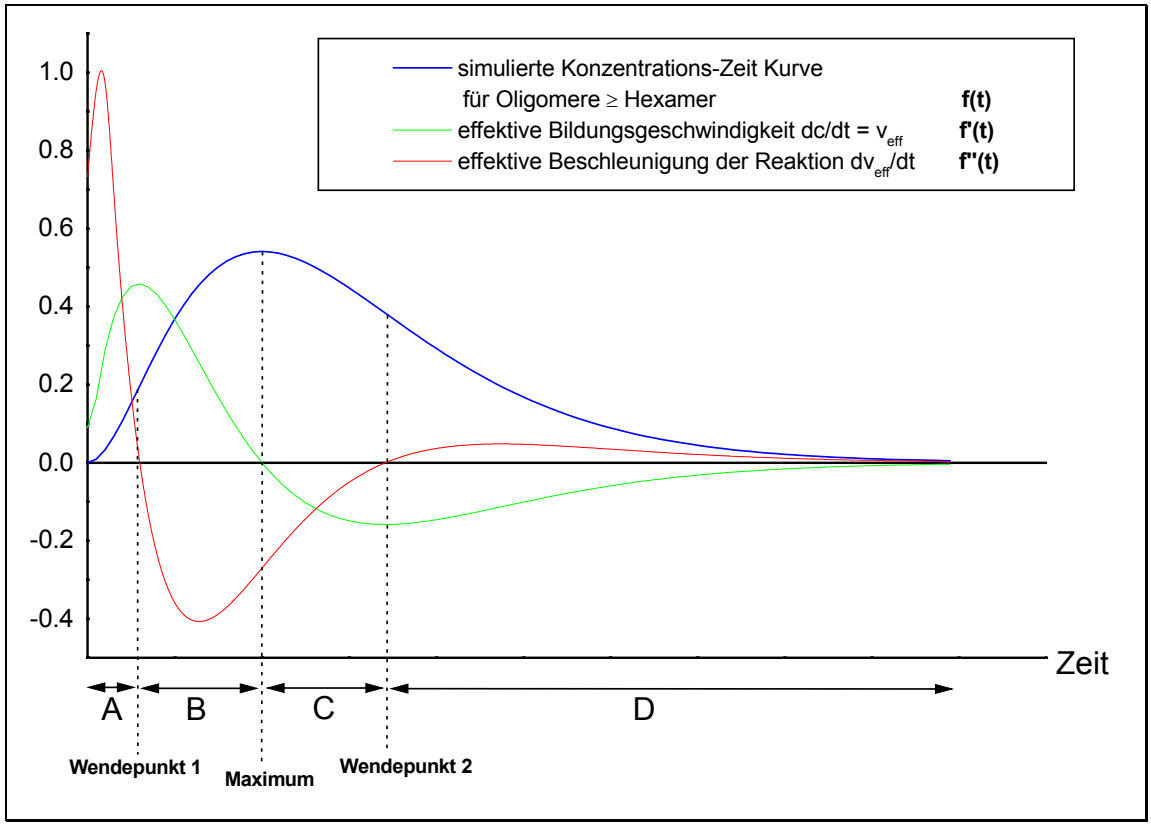


Abb. 7.9: Simulierte Bildungskurve für Oligomere ≥ 6mer auf Basis der Gleichung $y = x^2 \cdot e^{-x}$, sowie 1. und 2. Ableitung

Die simulierte Konzentrations-Zeit-Kurve f(t) (blau, Abb. 7.9) lässt sich in vier Abschnitte A, B, C und D unterteilen, die die jeweilige Phase kennzeichnen, in denen sich die Bildung des Oligomers befindet. Die erste Ableitung der Kurve entspricht mit $\frac{dc}{dt} = v_{eff}$ der effektiven Bildungsgeschwindigkeit eines Oligomers, welche sowohl positiv, als auch negativ ausfallen kann. Diese setzt sich letztendlich mit $v_{eff} = v_{Bildung} - v_{Abreaktion}$ aus der Differenz von realer Bildungsgeschwindigkeit und Abreaktionsgeschwindigkeit des Oligomers zusammen. Beide antagonistisch wirkenden Geschwindigkeiten setzen sich wiederum jeweils aus den verschiedenen Bildungs- oder Abreaktionskanälen zusammen. So besteht z.B. die reale Bildungsgeschwindigkeit eines 8mers aus den Geschwindigkeiten der Reaktionen 2mer + 6mer → 8mer sowie 4mer + 4mer → 8mer, während die Abreaktions-geschwindigkeit eine ungleich höhere Zahl von Einzelgeschwindigkeiten der Reaktionen des 8mers mit potenziellen Reaktionspartnern umfasst, die im Laufe der Oligomerisation gebildet werden (4mer, 6mer, 8mer, 10mer, etc.) oder die wie das 2mer bereits vorhanden waren. Die zweite Ableitung $\frac{dv_{eff}}{dt}$ ist mit der effektiven Beschleunigung der Reaktion gleichzusetzen, die ebenfalls positive und negative Werte annehmen kann und sich

über $\frac{dv_{eff}}{dt} = \frac{dv_{Bildung}}{dt} - \frac{dv_{Abreaktion}}{dt}$ definiert. Wie oben bereits bei den Geschwindigkeiten erörtert, setzen sich auch hier die Beschleunigungen der Bildungs- und der Abreaktion aus einer oder mehreren Einzelbeschleunigungen zusammen. Aufgrund der Dynamik des Reaktionsgeschehens sind Geschwindigkeit und Beschleunigung der Reaktion nie konstant. Mit Hilfe der beiden Ableitungen ist es möglich, das Reaktionsverhalten des Systems zu unterteilen und sowohl Reaktionsgeschwindigkeit als auch Reaktionsbeschleunigung näher zu analysieren. Da die Untersuchung für alle Oligomere ab dem Hexamer gelten soll, ist eine genauere Betrachtung des Einflusses eines bestimmten Oligomers auf die Bildungskurve eines anderen Oligomers nicht sinnvoll und würde durch die Vielzahl an Reaktionskanälen, die zur Bildung oder Abreaktion eines langen Oligomers führen können, beliebig komplex. Aus diesem Grunde wird im folgenden eine allgemeine Analyse der Kurven durchgeführt.

Abschnitt A (Abb. 7.9):

Abschnitt A befindet sich zwischen dem Start der Reaktion und dem ersten Wendepunkt der Konzentrations-Zeit Kurve und kennzeichnet den Beginn der Oligomerbildung. Das Eduktmaterial für das betrachtete Oligomer nimmt in diesem Zeitraum an Menge zu, so dass sowohl die Bildungsgeschwindigkeit als auch die effektive Beschleunigung der Reaktion zunächst steigen. Gleichzeitig wird dadurch aber ein Teil des Eduktes wieder verbraucht. Außerdem wird mit der eigenen Produktion ein zusätzlicher Abreaktionspartner geschaffen, dessen Konzentration ebenfalls steigt, so dass die effektive Beschleunigung der Reaktion schon nach kurzem Anstieg wieder abfällt. Die effektive Bildungsgeschwindigkeit steigt letztendlich zunehmend langsamer an, da die effektive Beschleunigung sinkt.

Wendepunkt 1:

Am Wendepunkt 1 hat die Bildungskurve ihre maximale Steigung, d.h. die effektive Bildungsgeschwindigkeit ist zu diesem Zeitpunkt am größten, während die effektive Beschleunigung ihren Nullpunkt durchläuft, da die reale Beschleunigung der Bildung genauso groß wie die Beschleunigung der Abreaktion ist.

Abschnitt B:

Im Abschnitt B wird der bremsende Aspekt der Abreaktion zunehmend stärker, die Bildungkurve flacht langsam ab und erreicht ein Maximum. Die reale Beschleunigung der Bildung ist in diesem Bereich kleiner als die Beschleunigung der Abreaktion, so dass es zu einer effektiv negativen Beschleunigung (Abbremsung) der Oligomerbildung kommt.

Abschnitte A und B bilden insgesamt den sigmoid ansteigenden Teil der Bildungskurve, in dem die effektive Bildungsgeschwindigkeit durchweg positiv ist.

Maximum:

Am Maximum ist die effektive Bildungsgeschwindigkeit gleich null, da hier die reale Bildungsgeschwindigkeit genauso groß wie die Abreaktionsgeschwindigkeit ist. An diesem Punkt werden demnach genauso viele Moleküle des betrachteten Oligomers gebildet, wie verbraucht werden. Das Maximum verdeutlicht den Zwischenproduktcharakter des jeweiligen Oligomers.

Abschnitt C:

In Abschnitt C setzt sich der bremsende Trend der Abreaktion fort und führt zu einem Abfallen der Konzentrations-Zeit Kurve, das über den nächsten Wendepunkt hinaus aufrecht erhalten wird. Die reale Bildungsgeschwindigkeit ist hierbei kleiner als die Abreaktions-geschwindigkeit, so dass eine zunehmend negative effektive Bildungsgeschwindigkeit resultiert. Die negative effektive Reaktionsbeschleunigung wird in diesem Bereich zunehmend geringer, wodurch die Bremswirkung an Einfluss verliert.

Wendepunkt 2:

Am Wendepunkt 2 der Konzentrations-Zeit Kurve erreicht die effektive Bildungs-geschwindigkeit ein Minimum. Die reale Beschleunigung der Bildung ist hier gleich der Beschleunigung der Abreaktion und somit die effektive Beschleunigung an diesem Punkt null.

Abschnitt D:

In Abschnitt D erlangt die effektive Beschleunigung nach ihrem Nulldurchlauf positive Werte, die zu einer Verkleinerung der durchgehend negativen effektiven Bildungs-geschwindigkeit führen. Die reale Beschleunigung der Bildungsreaktion ist in diesem Bereich größer als die Beschleunigung der Abreaktion. Gegen Ende der Reaktion nähern sich alle Kurven der x-Achse an, die für die drei betrachteten Funktionen die Asymptote bildet.

In Tab. 7.2 sind die Verhältnisse der Reaktionsgeschwindigkeit und der Beschleunigung in Bezug auf die Kurvenabschnitte zusammengefasst.

A	WP 1	B	Maximum	C	WP 2	D
$v_{Bildung} > v_{Abreaktion}$			$v_{Bildung} = v_{Abreaktion}$	$V_{Bildung} < v_{Abreaktion}$		
$v_{eff} > 0$			$V_{eff} = 0$	$v_{eff} < 0$		
$\frac{dv_{Bildung}}{dt} > \frac{dv_{Abreaktion}}{dt}$	$\frac{dv_{Bildung}}{dt} = \frac{dv_{Abreaktion}}{dt}$	$\frac{dv_{Bildung}}{dt} < \frac{dv_{Abreaktion}}{dt}$			$\frac{dv_{Bildung}}{dt} = \frac{dv_{Abreaktion}}{dt}$	$\frac{dv_{Bildung}}{dt} > \frac{dv_{Abreaktion}}{dt}$
$\frac{dv_{eff}}{dt} > 0$	$\frac{dv_{eff}}{dt} = 0$	$\frac{dv_{eff}}{dt} < 0$			$\frac{dv_{eff}}{dt} = 0$	$\frac{dv_{eff}}{dt} > 0$

Tab. 7.2: Abschnitte der simulierten Bildungskurve, mit $v_{eff} = v_{Bildung} - v_{Abreaktion}$ und $\frac{dv_{eff}}{dt} = \frac{dv_{Bildung}}{dt} - \frac{dv_{Abreaktion}}{dt}$ und WP = Wendepunkt

Das 4mer:

Für den Fall des 4mers lässt sich die Simulation der Konzentrations-Zeit Kurve auch mit Hilfe von Exponentialfunktionsgleichungen des Typs $y = a \cdot x^b \cdot e^{c \cdot x}$ mit a > 0, 0 < b < 1 und c < 0 durchführen. Als Beispiel sei hier die 4mer $({}^{n}CG^{p})_2$ Bildungskurve bei 15 °C aufgeführt (Abb. 7.10), deren zunächst ansteigender Kurvenverlauf nach Abflachen ein Maximum durchläuft, anschließend abfällt und sich nach einem Wendepunkt der Zeit-Achse asymptotisch annähert. Diese Kurvenform entspricht in ihren Charakteristika einer Kurve des Typs $y = x^{\frac{1}{2}} \cdot e^{-x}$ (Abb. 7.11, blaue Kurve).

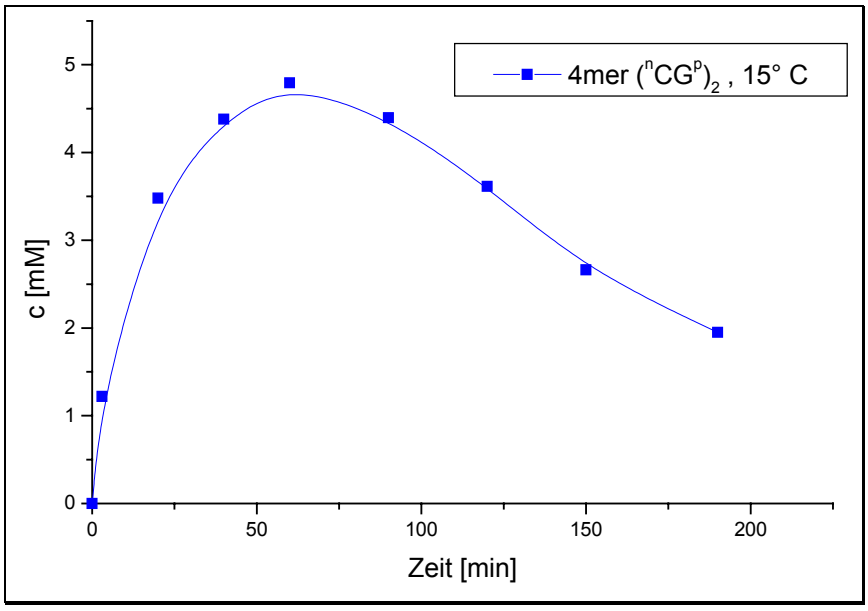


Abb. 7.10: Beispiel: Bildungskurve des 4mers $({}^{n}CG^{p})_2$, 15 °C

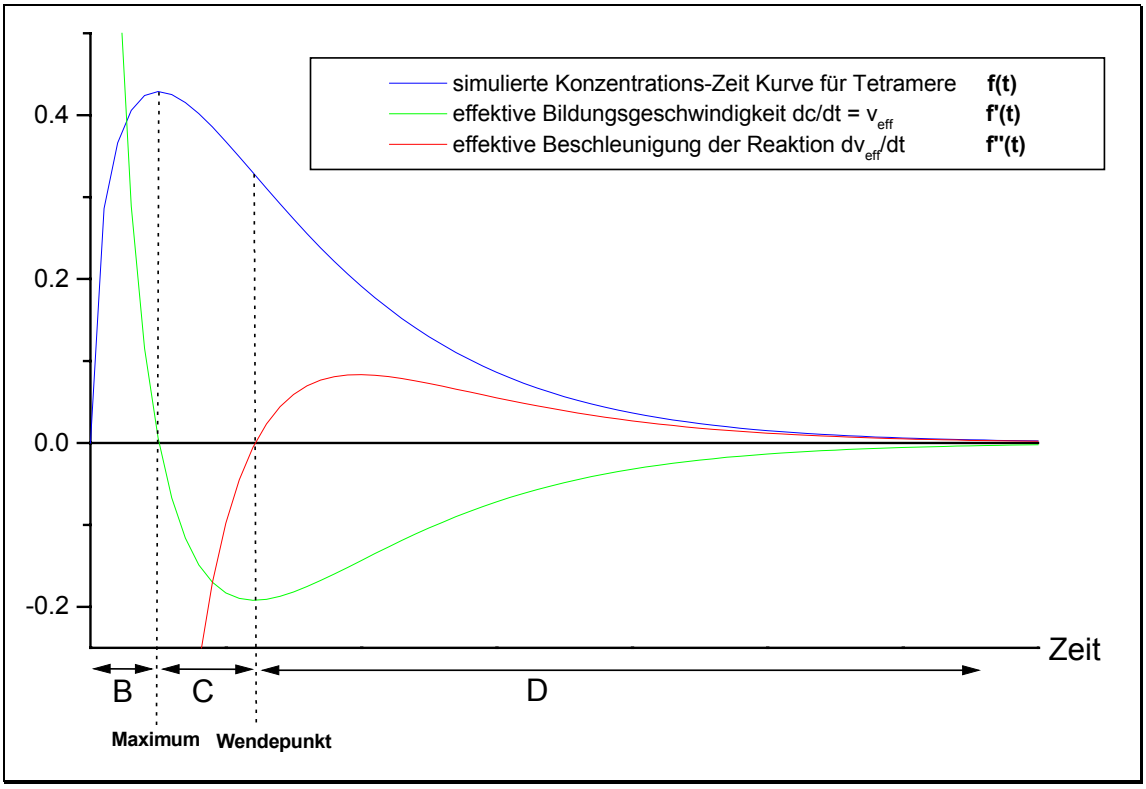


Abb. 7.11: Simulierte 4mer-Bildungskurve auf Basis der Gleichung $y = x^{\frac{1}{2}} \cdot e^{-x}$, sowie 1. und 2. Ableitung

Die simulierte 4mer-Kurve unterscheidet sich von der weiter oben analysierten simulierten Bildungskurve für Oligomere ab dem Hexamer (Abb. 7.9) nur durch den fehlenden Abschnitt A, der durch die langsam einsetzende Geschwindigkeitssteigerung aufgrund von dynamisch entstehendem Edukt gekennzeichnet ist. Dagegen steht dem 4mer mit 50 mM 2mer schon zu Beginn der Reaktion Edukt in hoher Konzentration zur Verfügung, so dass die Bildungskurve hier direkt mit dem Abschnitt B beginnt. Die in Tab. 7.2 aufgeführten Verhältnisse für die Abschnitte B bis D lassen sich damit ebenfalls auf die 4mer Kurve übertragen. Da ein 4mer lediglich aus der Dimerisierung zweier Dimere entstehen kann, ist eine detailiertere Betrachtung der Bildungsreaktion bei der Kurvendiskussion möglich, wohingegen der Einfluss der vielfältigen Abreaktionskanäle nur angedeutet werden kann.

Abschnitt B (Abb. 7.9):

Die effektive Bildungsgeschwindigkeit des 4mers fällt ausgehend von einem hohen Startwert vom Anbeginn der Reaktion. Für diesen Effekt ist maßgeblich die sinkende reale Bildungsgeschwindigkeit aufgrund der schwindenden Dimermenge verantwortlich, die das einzige Edukt für die Generierung des 4mers darstellt. Gleichzeitig steigt mit der Bildung des 4mers die Konzentration dieses potenziellen Selbst-Reaktionspartners für Octamere

(4mer + 4mer => 8mer) sowie aus dem 4mer gebildeter höherer Oligomere, die wiederum potenzielle Reaktionspartner sind. Daraus resultiert ein anhebender Einfluss auf die Abreaktionsgeschwindigkeit. Andererseits stellt das 2mer ebenso einen potenziellen Reaktionspartner für die Abreaktion des 4mers zum 6mer dar. Die sinkende Menge an 2mer hat demnach auch einen reduzierenden Einfluss auf die Abreaktionsgeschwindigkeit. Im Endeffekt beobachtet man eine vom Nullpunkt aus steil ansteigende Konzentrations-Zeitkurve, die bis zum Maximum zusehends flacher verläuft, da eine negative effektive Reaktionsbeschleunigung (Abbremsung) vorliegt.

Maximum:

An diesem Punkt halten sich Bildung und Abreaktion des 4mers die Waage, da genauso viel 4mer aus 2mer gebildet wird, wie gleichzeitig zu höheren Oligomeren abreagiert. Reale Bildungsgeschwindigkeit und Abreaktionsgeschwindigkeit sind hier gleich groß, so dass die effektive Bildungsgeschwindigkeit Null beträgt.

Abschnitt C:

Die 4mer Bildungskurve hat ihr Maximum überschritten und fällt nun stetig ab. Die effektive Bildungsgeschwindigkeit weist negative Werte auf, da die reale Geschwindigkeit der Bildungsreaktion aus zwei Dimeren kleiner als die Geschwindigkeit der Abreaktion zu höheren Oligomeren geworden ist. Die Konzentration der längeren Reaktionspartner (6mer, 8mer, etc.), die für eine Abreaktion zu Verfügung stehen, nimmt stetig zu und damit auch ihr Anteil an der Beschleunigung der Abreaktion. Der Reaktionspartner für eine Abreaktion mit der höchsten Konzentration ist aber nach wie vor das Dimer. Dessen Konzentration nimmt stetig ab, ebenso wie die Konzentration des 4mers, das den Reaktionspartner mit der zweithöchsten Konzentration darstellt. Dadurch wird die Beschleunigung der Abreaktion immer kleiner und zwar schneller, als die reale Beschleunigung der Bildungsreaktion aufgrund der sinkenden Dimerkonzentration abnimmt. Insgesamt resultiert daraus eine zusehends geringer werdende negative effektive Reaktionsbeschleunigung bzw. Bremswirkung.

Wendepunkt:

Die effektive Reaktionsbeschleunigung hat am Wendepunkt der Konzentrations-Zeit Kurve des 4mers einen Nulldurchgang, da an diesem Punkt die reale Beschleunigung der Bildung genauso groß wie die Beschleunigung der Abreaktion ist. Die effektive Bildungsgeschwindigkeit durchläuft hier ein Minimum.

Abschnitt D:

Die Bildungsreaktion des 4mers ist ausschließlich von der sinkenden Konzentration des 2mer abhängig, wodurch sowohl die reale Bildungsgeschwindigkeit, als auch die reale Beschleunigung der Bildung stetig kleiner werden. Dagegen ist die Geschwindigkeit der Abreaktion und deren Beschleunigung sowohl von der sinkenden Konzentration des 2mers und 4mers, als auch von der Gesamtkonzentration der Oligomere ab dem 6mer abhängig. Letztere erhöht sich zwar im Laufe der Reaktion, hat aber aufgrund ihrer geringen Menge gegenüber dem 2mer und 4mer zunächst wenig Einfluss. Durch die Verringerung der Konzentrationen zweier Species (2mer und 4mer) sinkt die Beschleunigung der Abreaktion schneller, als die reale Beschleunigung der Bildungsreaktion, die lediglich durch die Verringerung der 2mer Konzentration beeinflusst wird. Durch diesen Effekt ist es möglich, dass die reale Beschleunigung der Bildung wieder größer, als die Beschleunigung der Abreaktion wird und die effektive Beschleunigung der Reaktion nach ihrem Nulldurchgang im Wendepunkt der Bildungskurve auf positive Werte steigt. Hierdurch kommt es letztendlich zu einer Verringerung der durchgehend negativen effektiven Bildungsgeschwindigkeit, so dass sich die Konzentrations-Zeit Kurve des 4mers gegen Ende der Reaktion ebenso wie ihre beiden Ableitungen asymptotisch der Zeit-Achse annähern.

Das 2mer:

Die Konzentrations-Zeit Kurve des Dimers stellt den einfachsten der drei vorgestellten Kurventypen dar. Ihre exponentielle Abnahme kann man mittels einer Exponentialfunktion des Typs $y = e^{-x}$ simulieren (Abb. 7.13, blaue Kurve). Ihre Ähnlichkeit zu den Messkurven wird beispielsweise in der Abnahmekurve des $^{n}CG^{p}$-Dimers bei 30 °C deutlich (Abb. 7.12).

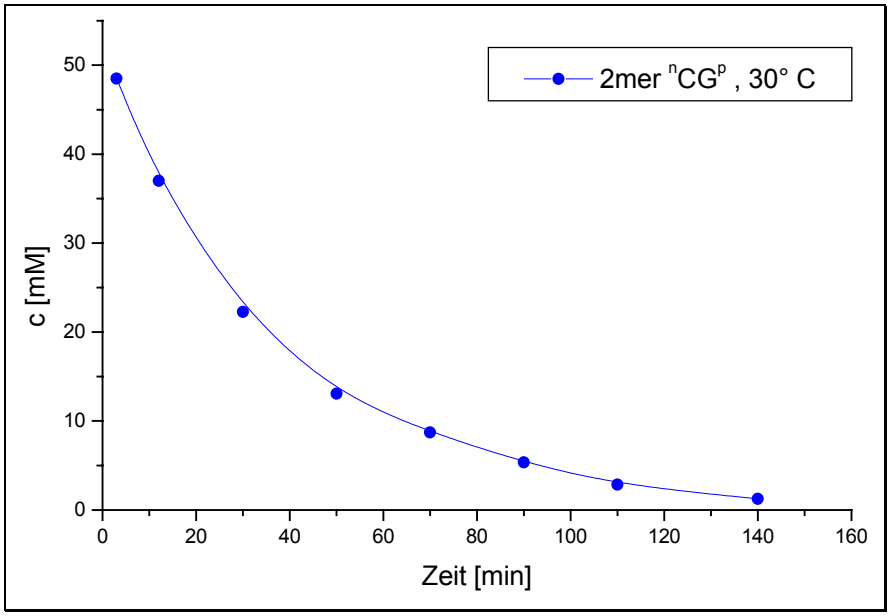


Abb. 7.12: Beispiel: Konzentrations-Zeit Kurve des 2mers $^{n}CG^{p}$, 30 °C

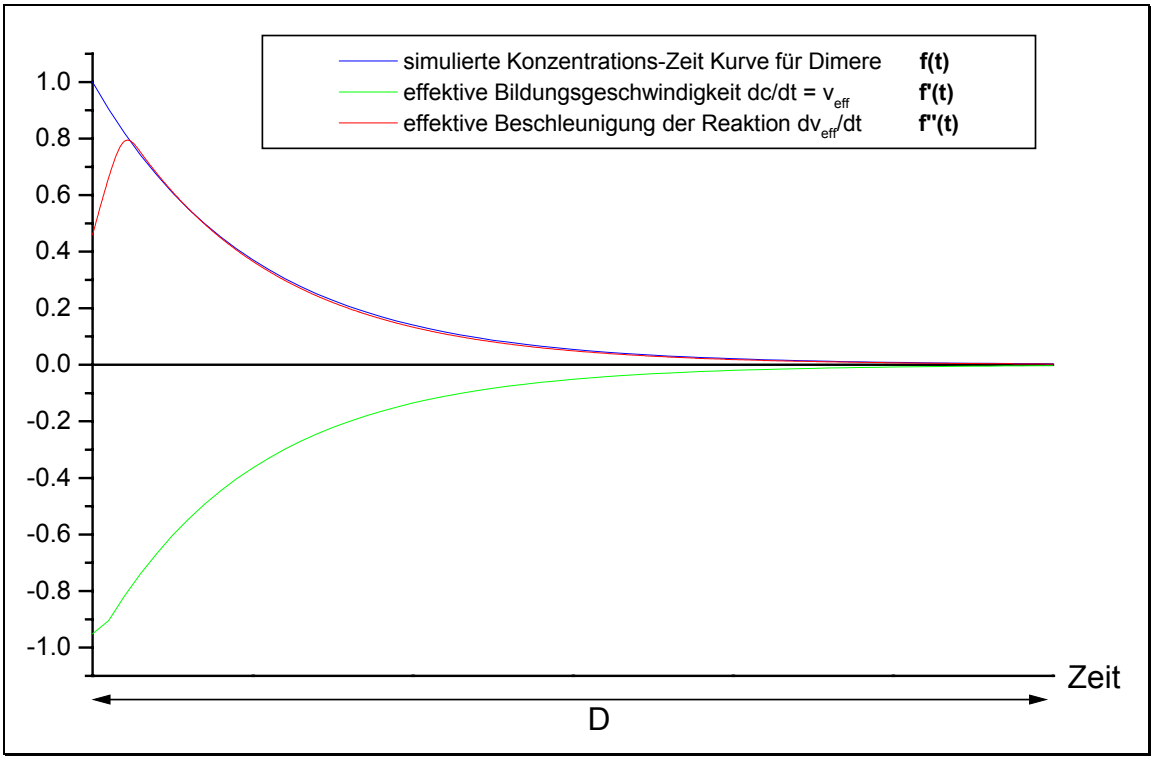


Abb. 7.13: Simulierte 2mer-Abnahmekurve auf Basis der Gleichung $y = e^{-x}$, sowie 1. und 2. Ableitung

Da das Dimer als Edukt für die gesamte Oligomerisierungsreaktion dient und nicht nachgebildet wird, ist der Begriff 'Bildungskurve' nicht mehr zutreffend. Die Kurve selbst reiht sich in die bereits besprochenen Kurvenformen ein, wobei sie lediglich aus Abschnitt D mit dessen Charakteristika (Tab. 7.2) besteht. Die reale Bildungsgeschwindigkeit ist natürlich

gleich Null, während die langsam kleiner werdende Abreaktionsgeschwindigkeit positiv ist, so dass die effektive 'Bildungsgeschwindigkeit' letztendlich durchgehend negative Werte besitzt; das 2mer wird verbraucht. Die Beschleunigung der Abreaktion wird durch die rückläufige Gesamtkonzentration aller Oligomere zusehends geringer und weist zudem negative Werte auf. Da die reale Beschleunigung der Bildung beim dimeren Edukt naturgemäß gleich null ist, erhält man für die effektive Beschleunigung insgesamt durchgehend positive, aber sinkende Werte und damit eine asymptotische Annäherung der drei Kurven an die x-Achse.

Damit sind alle beobachteten Messkurven einer der drei vorgestellten Kategorien zuzuordnen, die den Kurvenverlauf näher beschreiben und differenzieren. Das 2mer hat als Edukt mit seiner durchgehenden Abnahme die einfachste Kurvenform, während das 4mer als Zwischenprodukt einen komplexeren Verlauf inklusive eines Maximums zeigt. Hierbei nimmt es als einziges Oligomer, dessen Edukt zu Beginn der Reaktion in ausreichendem Maße vorhanden ist, eine Sonderstellung unter den Produkten ein. Sämtliche höheren Oligomere ab dem 6mer lassen sich bezüglich ihrer Kurvenform und ihres Reaktionsverhaltens zusammenfassen. Die Kurven des 2mers (Abschnitt D) und 4mers (Abschnitte B-D) finden sich als Teilkurven in der komplexeren Kurvenform der höheren Oligomere wieder (Abschnitte A-D). Wie die folgenden Kapitel zeigen werden, lässt sich diese Systematik auch auf die Kinetiken der anderen drei Dimere übertragen.

7.3.3 Oligomerisierung von $^{n}CA^{p}$

Die Umsetzung des zweiten nicht-selbstkomplementären Dimers $^{n}CA^{p}$ bei Temperaturen von 2, 15 und 30 °C zeigte neben geringfügiger Cyclisierung die Oligomerisationsprodukte $(^{n}CA^{p})_{x}$. Als Beispiel sei der HPLC-Stackplot der Reaktion bei 2 °C aufgeführt (Abb. 7.14).

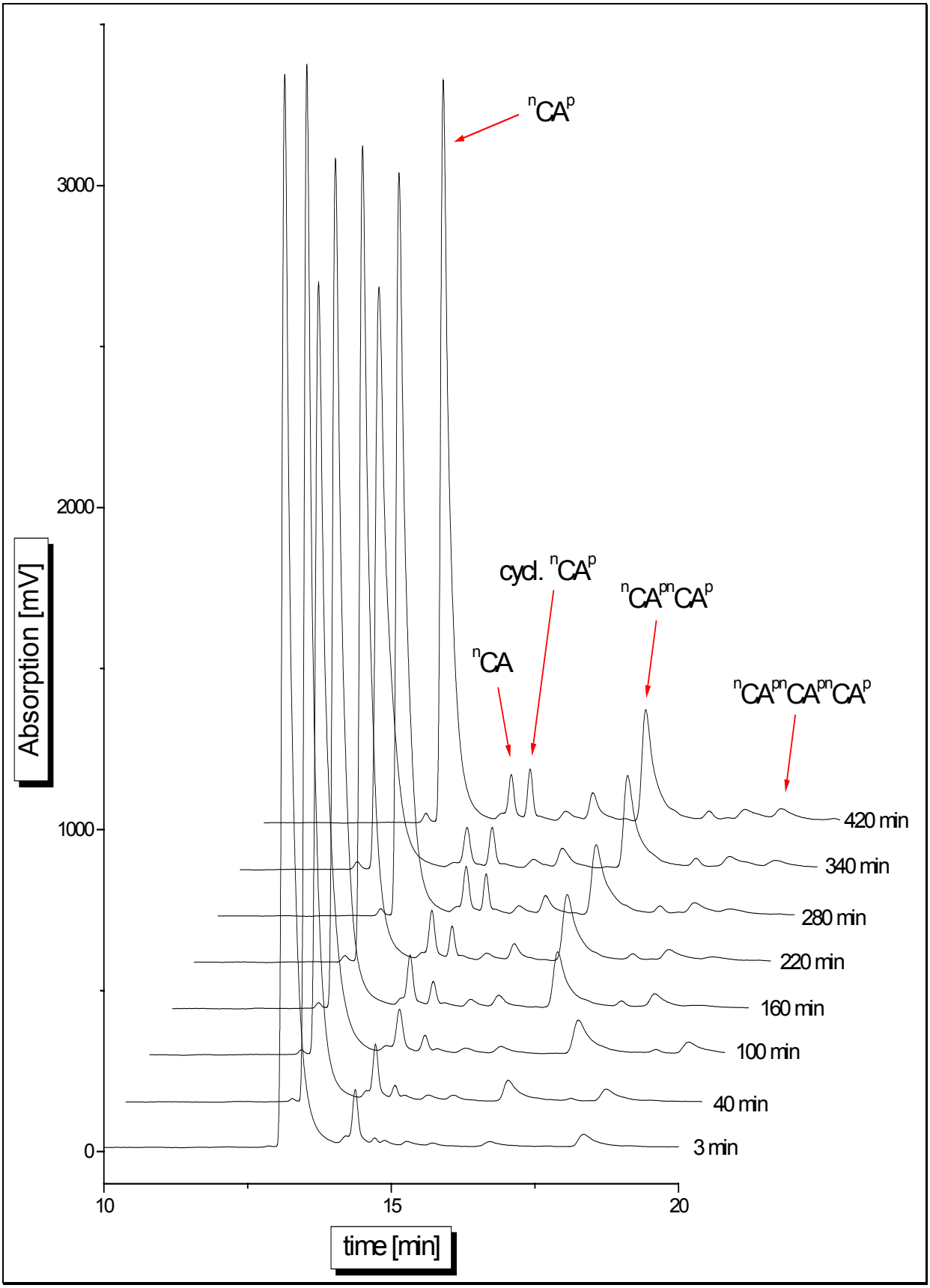


Abb. 7.14: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}CA^{p}$, 50 mM, 2 °C

Für die folgenden Konzentrations-Zeit Diagramme des $^{n}CA^{p}$-System gelten die bereits beim $^{n}TG^{p}$-System beschriebenen Bedingungen und Verhältnisse in Bezug auf Diagramme und Kurvenformen.

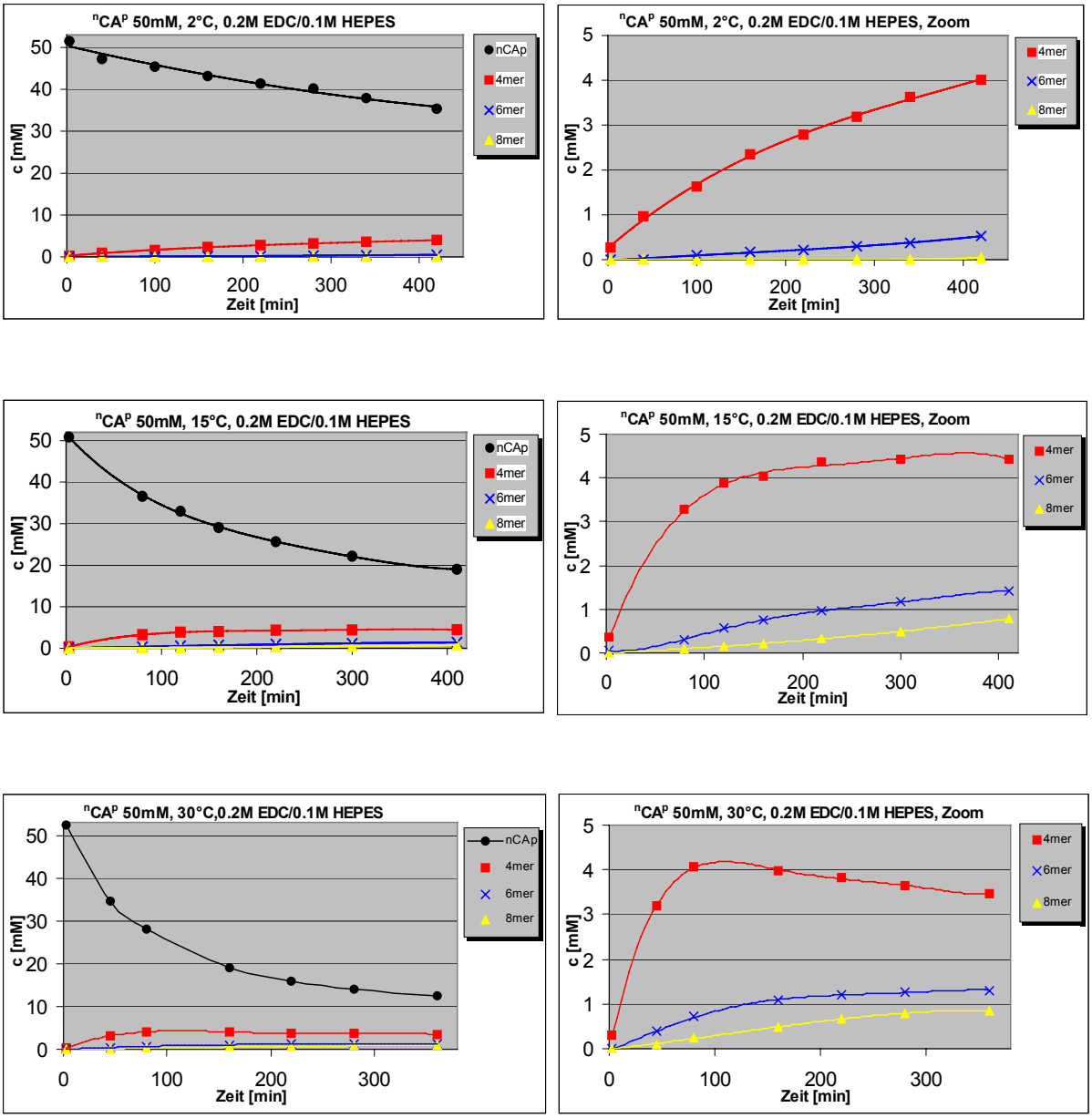


Abb. 7.15: Konzentrations-Zeit-Kurven der $(^{n}CA^{p})_{x}$-Oligomere bei Temperaturen von 2, 15 oder 30 °C

Die Kurven ähneln qualitativ denen des $^{n}TG^{p}$-Systems. Ein genauer Vergleich der Systeme untereinander erfolgt am Ende der Vorstellung der vier Einzelsysteme. Nachfolgend werden die Kurven je eines Oligomers bei den drei verschiedenen Temperaturen gegenübergestellt (Abb. 7.16).

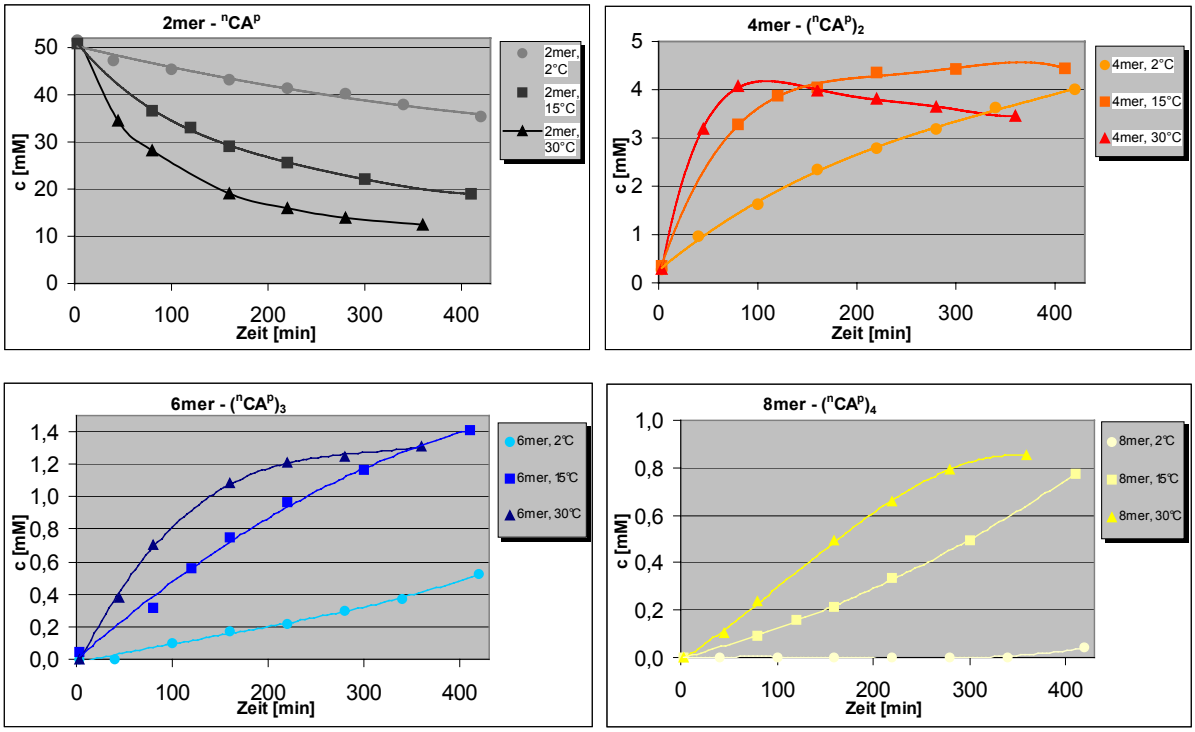


Abb. 7.16: Konzentrations-Zeit-Kurven der $({}^{n}CA^{p})_{x}$-Oligomere der Länge x = 1 bis 4

7.4 Die selbstkomplementären Dimere $^{n}TA^{p}$ und $^{n}CG^{p}$

Die Dimere $^{n}TA^{p}$ und $^{n}CG^{p}$ unterscheiden sich von den beiden zuvor behandelten Dimeren neben ihrer Sequenz vor allem durch ihre inhärente Selbstkomplementarität. Hierdurch ist es prinzipiell jedem Oligomerisationsprodukt möglich seinerseits als Templat seiner eigenen Synthese (Autokatalyse), der Synthese eines längeren Oligomers (Eduktkatalyse) oder der Synthese eines kürzeren Oligomers (Templatkatalyse) zu dienen. Am Beispiel des $^{n}CG^{p}$ sind verschiedene denkbare Komplexe aufgeführt, die aus den am Reaktionsgeschehen beteiligten Bausteinen entstehen können.

In den autokatalytisch wirkenden termolekularen Komplexen lagern sich an ein $({}^{n}CG^{p})_{x}$-Templat zwei Bausteine genau so an, dass keine Base des Templats ungepaart bleibt und das Produkt der Kondensationsreaktion einer exakten Kopie des Templatbausteins entspricht. Theoretisch lassen sich Komplexe beliebiger Templatlänge formulieren. Das Beispiel geht auf Komplexe bis zum 10mer-Templat ein. Die Reaktionsstelle ist farblich markiert, wobei das mit EDC aktivierte 3'-Phosphatende rot hervorgehoben wurde, das reaktive benachbarte 5'-Aminoende blau (Abb. 7.17).

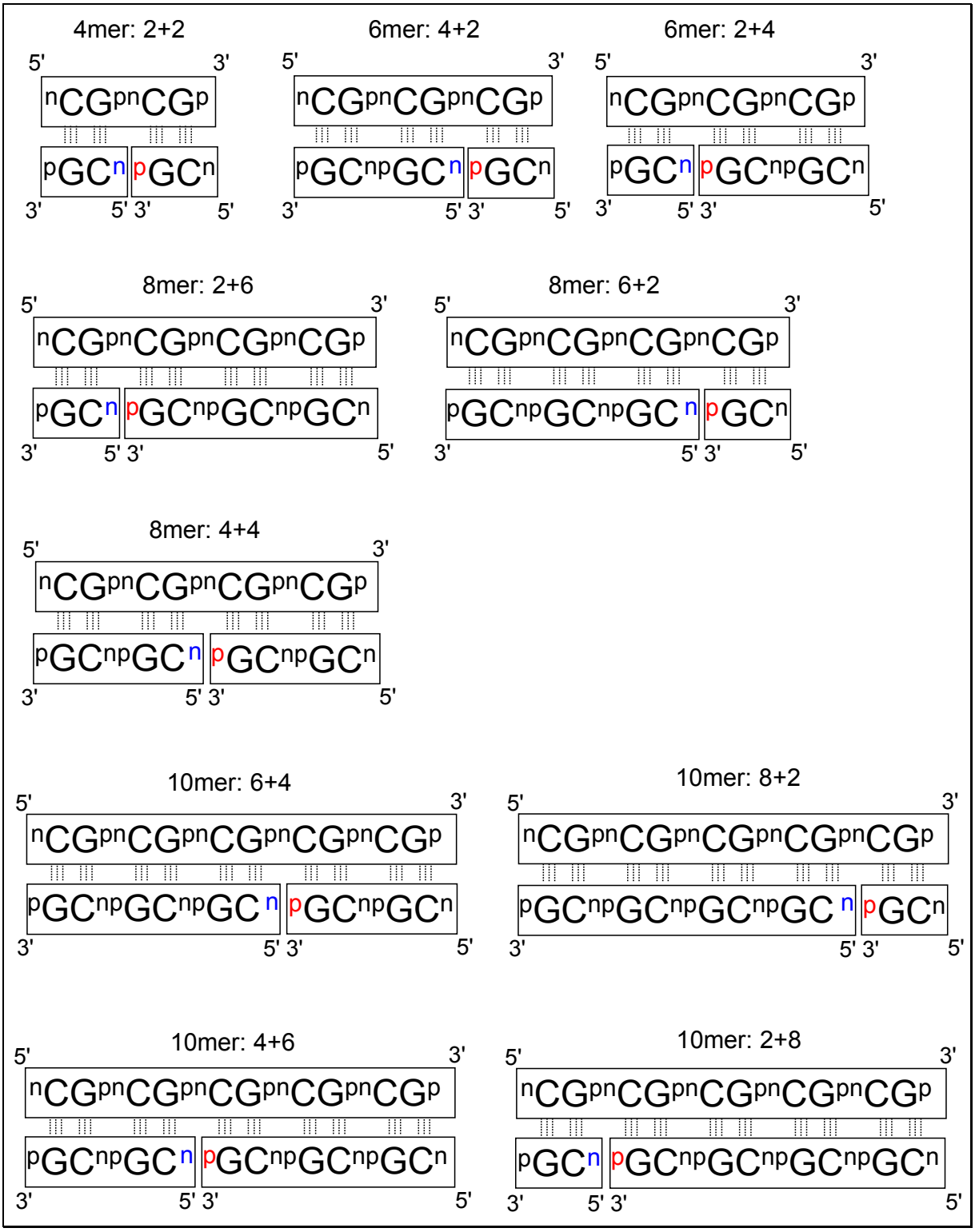


Abb. 7.17: Autokatalytisch wirksame termolekulare Komplexe der Bausteine bis zum 10mer

Neben diesen Komplexen, die aufgrund der maximalen Basenpaarung die höchste Stabilität aufweisen sollten, sind auch solche vorstellbar, deren Basen nicht vollständig gepaart sind. Dazu zählt z.B. die Templatkatalyse kürzerer Oligomere am Templat, in dem die Länge des Produkts kleiner ist, als die des Templats, an dem die beiden kurzen nebeneinander liegenden

Bausteine kondensieren. Im Beispiel reagieren zwei Dimere am 6mer-Templat zu einem 4mer.

Einen anderen Typus stellt die Eduktkatalyse dar, in der die Länge des Kondensationsproduktes die des Templates überschreitet. So können beispielsweise zwei 4mere an einem Tetramer-Templat zu einem 8mer reagieren. Beide Komplexarten werden mit zunehmender Zahl an ungepaarten Basen aufgrund ihrer niedrigeren Stabilität gegenüber Komplexen mit vollständiger Basenpaarung immer unwahrscheinlicher, ihr Einfluss ist dennoch nicht völlig ausgeschlossen[130] (Abb. 7.18).

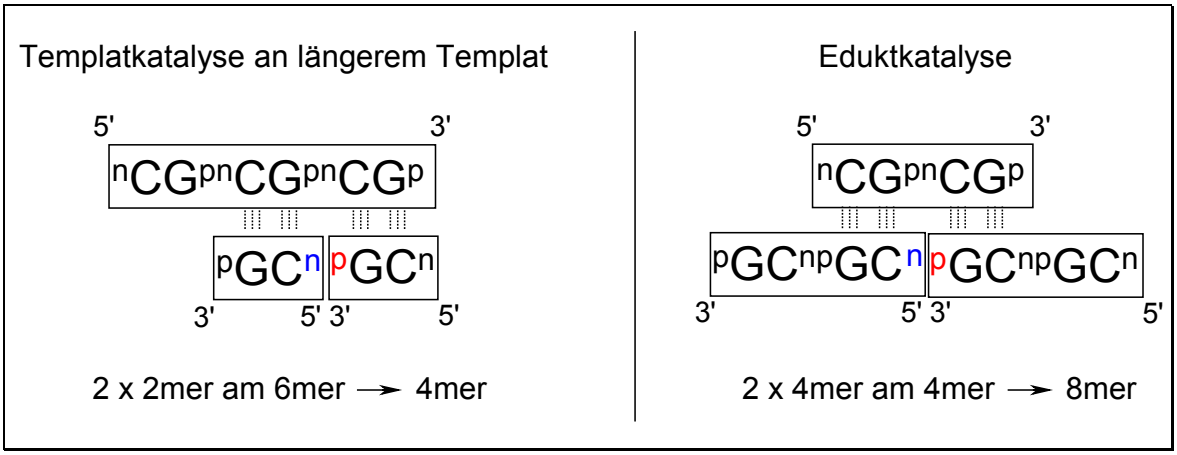


Abb. 7.18: Beispiele für Templatkatalyse kürzerer Oligomere am längeren Templat und Eduktkatalyse

Da Basestacking-Effekte nicht nur intrahelical zwischen nebeneinanderliegenden Basen innerhalb eines Stranges sondern ebenso interhelical zwischen den Basen zweier Stränge einer Doppelhelix auftreten können, lassen sich mögliche Blunt-End-Komplexe formulieren. Die reaktionsbeschleunigende Wirkung von Blunt-End-Komplexen wurde bereits von *Wlotzka*[74] und *Achilles*[130] beschrieben und beruht allgemein auf der höheren Stabilität ihrer Übergangszustände bei der Phosphoamidatbildung gegenüber der spontanen Reaktion, deren Intermediat allein durch das Basestacking zweier nebeneinanderliegender Basen stabilisiert wird. Vor allem für den Start der Oligomerisierungsreaktion, bei dem potenziell katalytisch wirkendes 4mer nur in geringer Menge vorliegt, kann ein Komplextypus bedeutsam werden, der aus vier Dimeren besteht, die sich wiederum zu zwei Dimer-Duplexhelices zusammenfügen (Abb. 7.19).

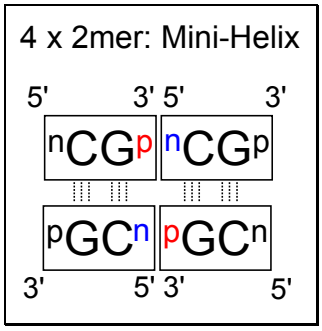


Abb. 7.19: Blunt-End Mini-Helix-Komplex aus zwei Dimer-Duplexen

Der Stabilitätszuwachs dieses Komplexes gegenüber dem Übergangszustand der spontanen Reaktion stammt hier aus dem Energiegewinn durch Bildung der Wasserstoffbrückenbindungen sowie aus der Stabilisierung durch intra- und interhelicale Basenstapelung. Darüberhinaus lassen sich Blunt-End Komplexe aus längeren Oligomeren formulieren (Abb. 7.20).

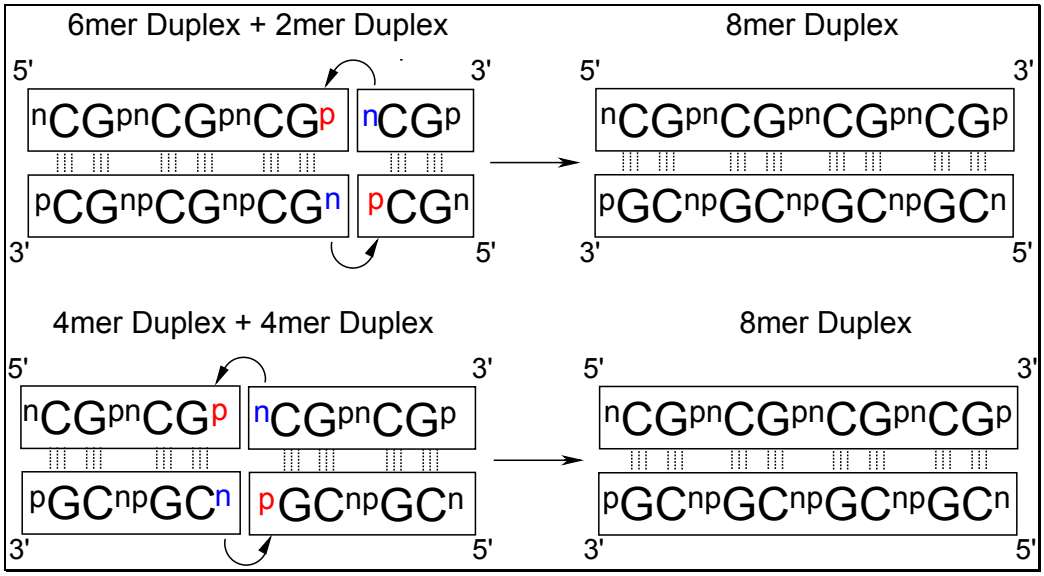


Abb. 7.20: Ligation in Blunt-End Komplexen aus zwei Duplexen

Blunt-End Komplexe sollten jedoch aufgrund der entropisch ungünstigen hohen Anzahl an vier beteiligten Bausteinen einen geringeren Einfluss auf das Reaktionsgeschehen haben, als termolekulare Komplexe aus drei Bausteinen mit vollständiger Basenpaarung, sobald genügend entsprechend langes Templat vorhanden ist.

Berücksichtigt man, dass ungepaarte Basen am Ende eines Stranges (dangling bases) durch interhelicale Basenstapelung zur Stabilitätserhöhung von Duplexen beitragen können[135,136,137,138] dann lassen sich zudem Komplexe aus einem Duplex und einem Einzelbaustein in Betracht ziehen (Abb. 7.21). Diese sollten jedoch aufgrund der ungepaarten Basen und der eingeschränkten Basenstapelungsmöglichkeiten die geringste Stabilität der vorgestellten Komplexe aufweisen und durch das unterbrochene Rückgrat deutlich geringeren Einfluss als kovalent gebundene überstehende Basen haben.

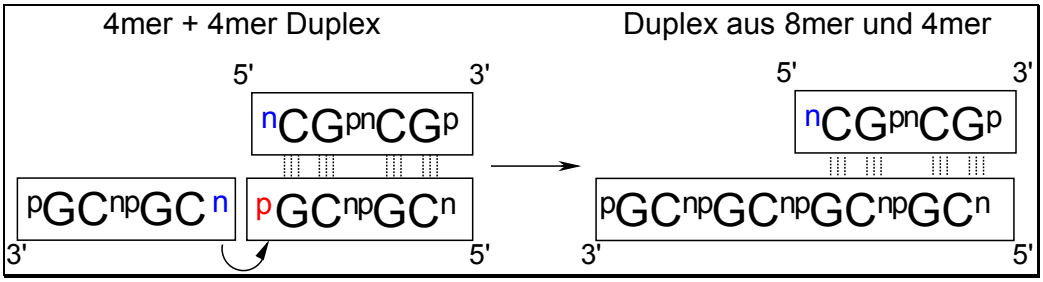


Abb. 7.21: Ligation in Blunt-End Komplexen aus Einzelbaustein und Duplex

Deweiteren ist eine interhelicale Ligation der reaktiven Gruppen an einem Ende einer Duplex-Doppelhelix denkbar (Abb. 7.22), die sich jedoch trotz ihrer relativen Nachbarschaft durch die DNA-Struktur im Abstand des Doppelhelixdurchmessers gegenüberliegen und somit räumlich voneinander weiter voneinander getrennt sind, als Funktionalitäten, die intrahelical benachbart sind. Die Flexibilität der endständigen Nucleotide könnte jedoch auch einen solchen Reaktionstyp in den Bereich des Möglichen rücken.

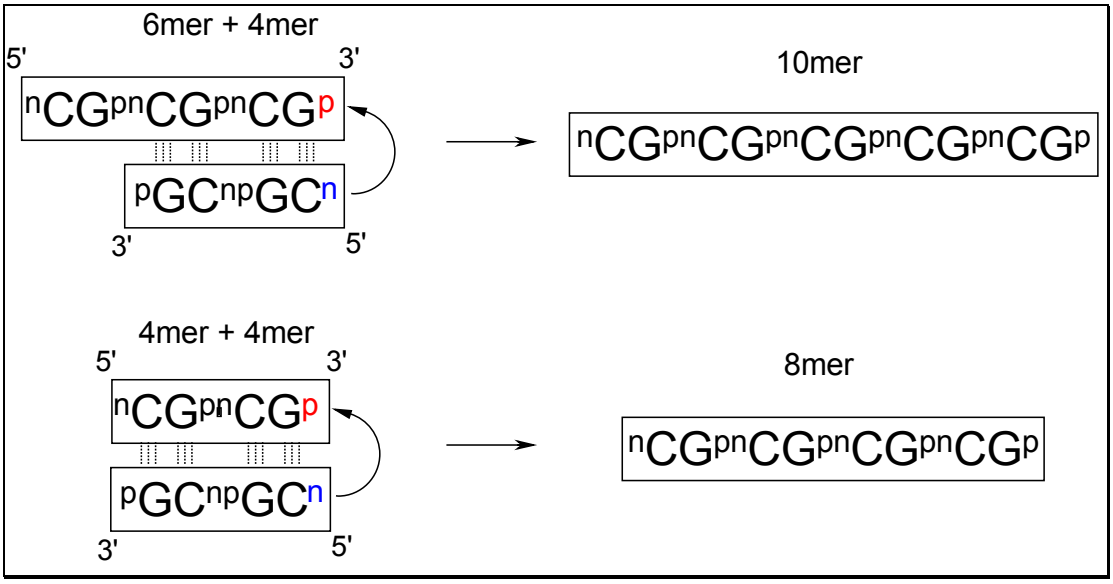


Abb. 7.22: Interhelicale Ligation innerhalb eines Duplex

Zur Verdeutlichung der räumlichen Verhältnisse bei intra- oder interhelicaler Ligation ist in Abb. 7.23 ein termolekularer Beispielkomplex der Bausteine CGC und GCG am Templat CGCGCG dargestellt.

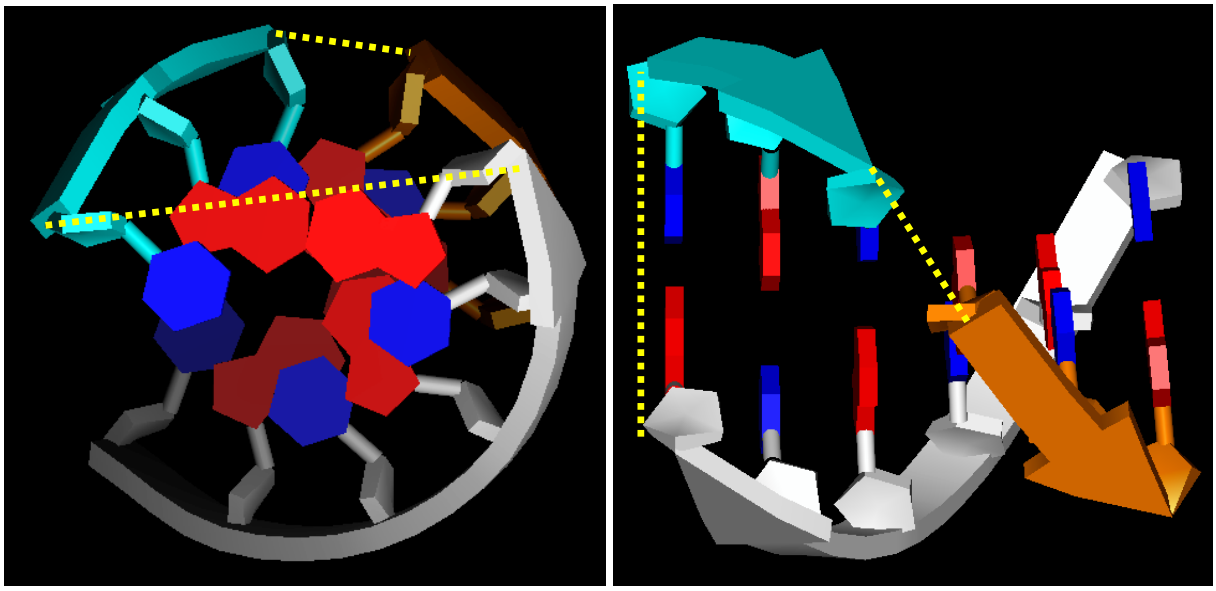


Abb. 7.23: Inter- und intrahelicale Ligationsabstände im termolekularen Beispielkomplex CGCGCG•CGC•GCG

Die Pfeile stellen den Verlauf des Rückgrats in 5'-3'-Richtung dar, Rückgrat, Riboseeinheiten und Basen sind schematisch wiedergegeben. Für eine interhelicale Ligation muss der komplette Doppelhelixdurchmesser überwunden werden, während bei einer intrahelicalen Ligation die zu verbindenden Enden unmittelbar nebeneinander liegen, so dass der letztere Ligationsvorgang deutlich schneller ablaufen sollte.

Letztendlich ist bei einem Auftreten der beschriebenen potenziell katalytisch wirksamen Komplexe eine Steigerung der Oligomerisationsgeschwindigkeit gegenüber einer rein spontanen Oligomerisierung, wie sie bei den nicht selbstkomplementären Systemen $^{n}TG^{p}$ und $^{n}CA^{p}$ vorherrschen sollte, wahrscheinlich.

7.4.1 Oligomerisierung von $^{n}TA^{p}$

Das selbstkomplementäre Dimer $^{n}TA^{p}$ oligomerisiert wie die beiden zuvor untersuchten 2mere bei einer Konzentration von 50 mM und Temperaturen von 2, 15 und 30 °C zu längeren Sequenzen der Form $(^{n}TA^{p})_{x}$. Der HPLC-Beispielstackplot für 15 °C offenbart innerhalb der Kinetikmesszeit von 450 Minuten Produkte bis zum 10mer und leichte Cyclisierung (Abb. 7.24).

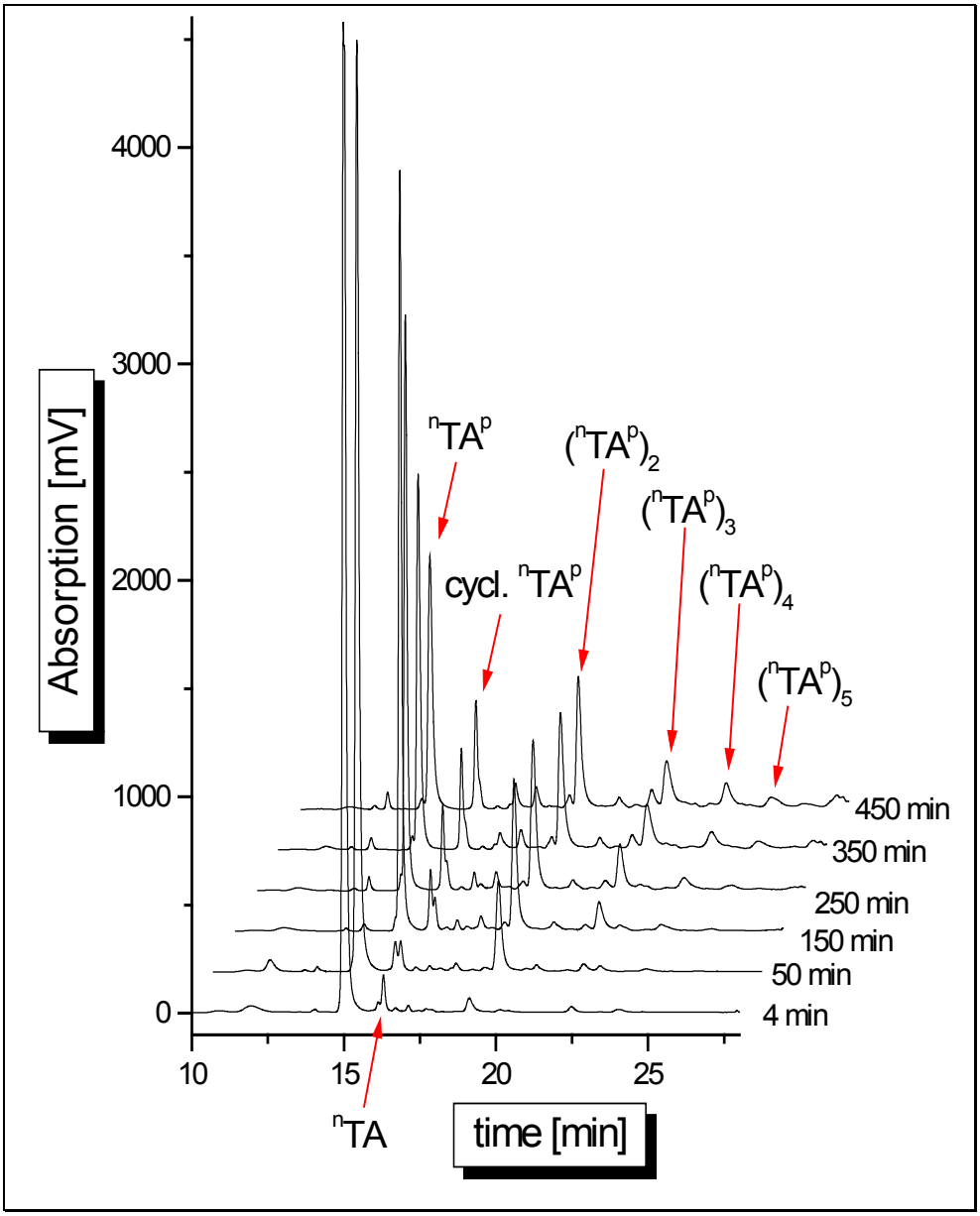


Abb. 7.24: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}TA^{p}$, 50 mM, 15 °C

Auch in diesem Fall lässt sich die bereits in Kap. 7.3.2 erläuterte Systematik der Kurvenformen auf die erhaltenen Messkurven anwenden.

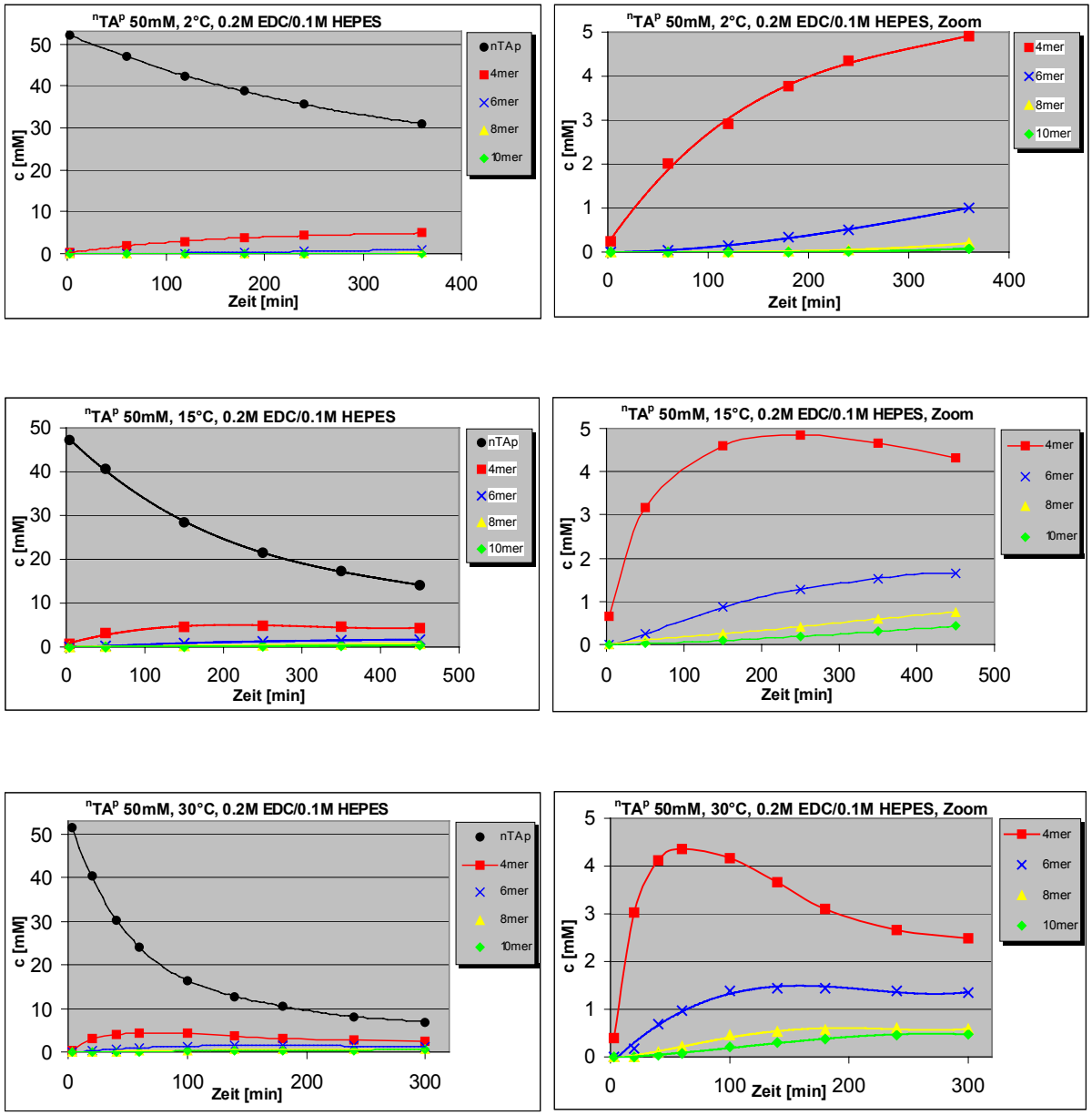


Abb. 7.25: Konzentrations-Zeit-Kurven der $(^{n}TA^{p})_x$-Oligomere bei Temperaturen von 2, 15 oder 30 °C

Zusätzlich zu den Kinetiken ohne initiale Templatzugabe wurden zwei weitere 4 Punkt Kinetiken mit je 8.3 mM (6:1) 12mer-Templat $^{OH}(TA)_6{}^{OH}$ bei 2 und 30 °C durchgeführt, um den Templateinfluss abschätzen zu können. Bei einem Verhältnis von 6 zu 1 von Dimer zu 12mer finden theoretisch alle vorhandenen Dimere auf dem Templat gleichzeitig Platz.

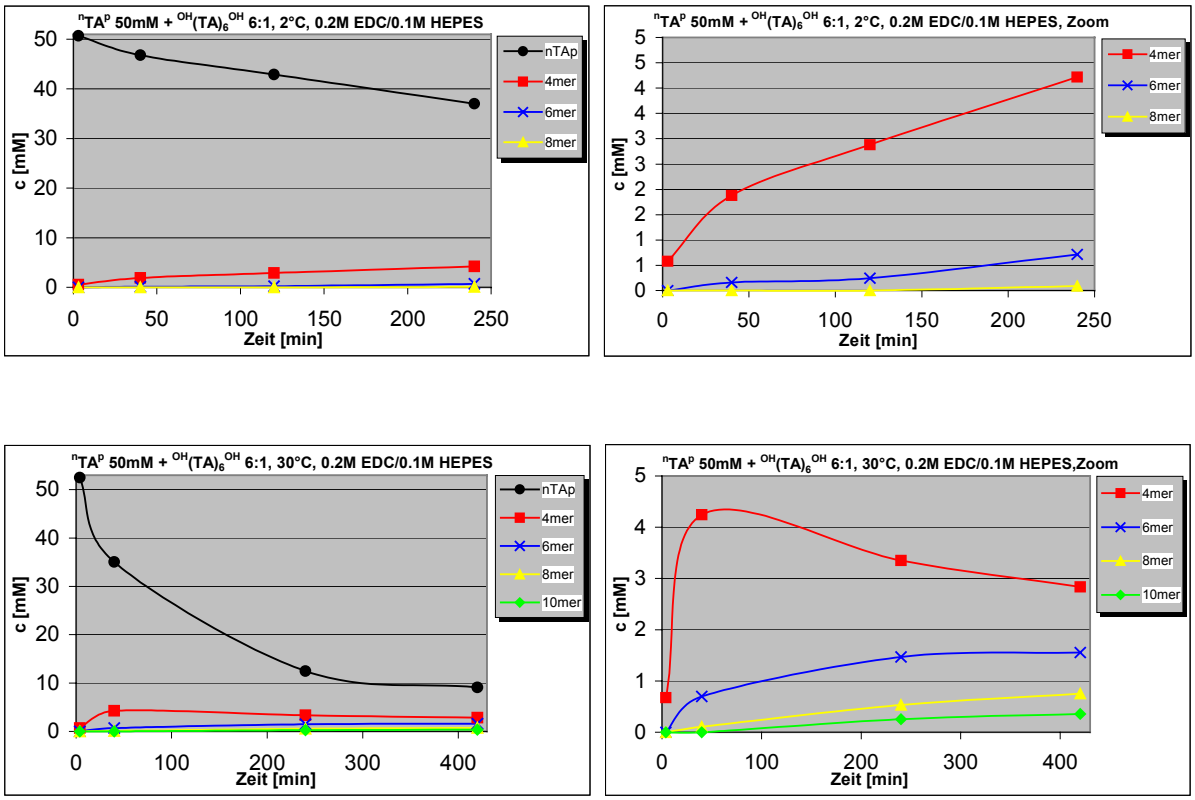


Abb. 7.26: Konzentrations-Zeit-Kurven der $(^{n}TA^{p})_x$-Oligomere mit 12mer Templat bei 2 und 30 °C

Die Gegenüberstellung der Produktbildungskurven eines Oligomers bei verschiedenen Temperaturen ohne Templatzugabe ähnelt qualitativ denen der bereits untersuchten $^{n}TG^{p}$- und $^{n}CA^{p}$-Systeme. Die mitaufgeführten Test-Kinetiken inklusive Templat deuten auf einen ungewöhnlichen Templateinfluss hin (s.u.).

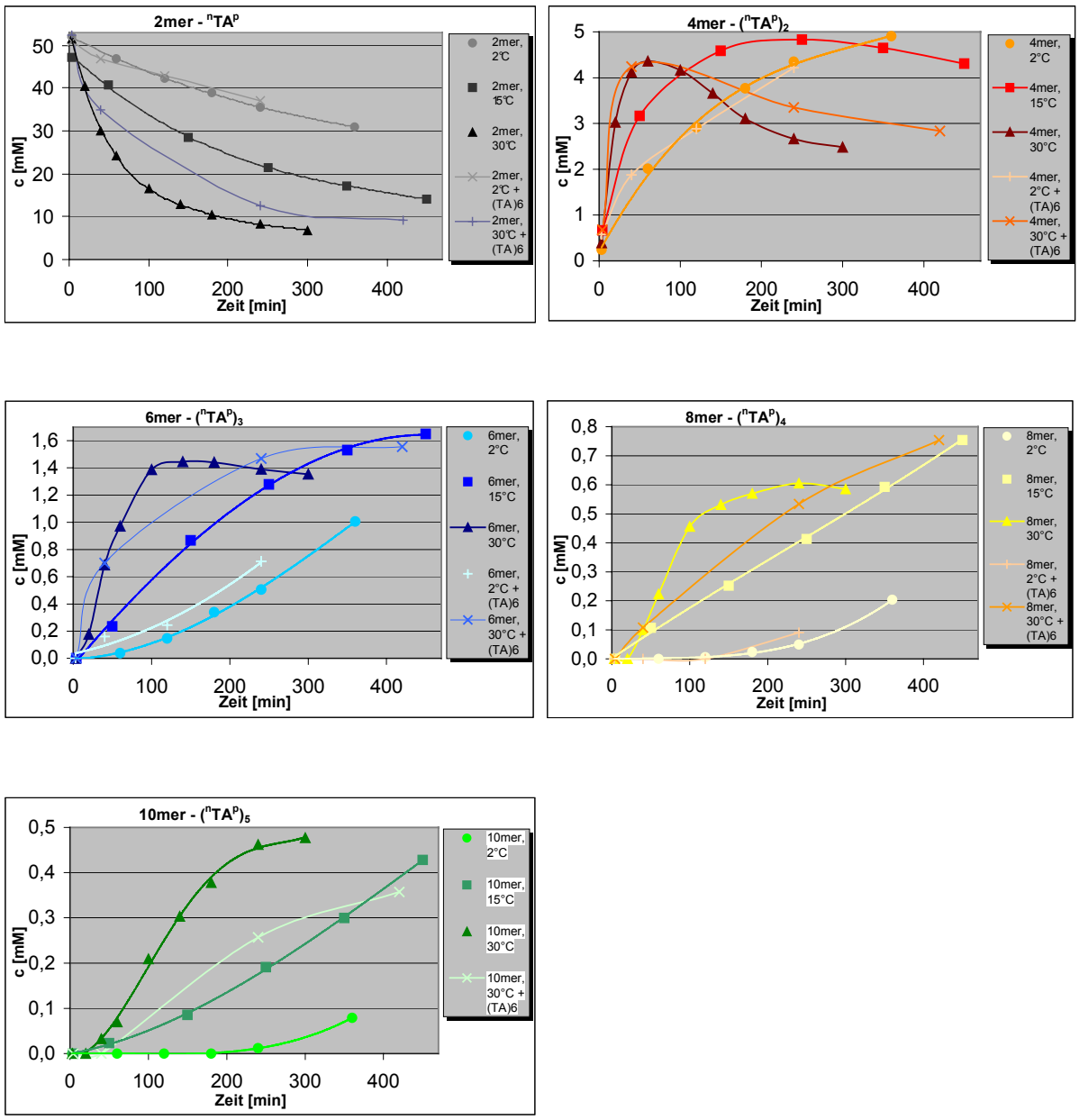


Abb. 7.27: Konzentrations-Zeit-Kurven der $(^{n}TA^{p})_{x}$-Oligomere der Länge x = 1 bis 5

Wie man insbesondere an der Dimer-Abnahmekurve bei 30 °C erkennen kann, scheint das 12mer Templat keinerlei katalytischen bzw. reaktionsbeschleunigenden Effekt zu besitzen, sondern eine geradezu reaktionshemmende Wirkung zu entfalten. Die Bildung höherer Oligomere wird offenbar gebremst, die Gesamtreaktionsrate ist geringer als ohne Templat. Der Einfluss des Templates bei 2 °C ist im Rahmen der Messung dagegen zunächst nur geringfügig, könnte aber theoretisch bei längeren Reaktionszeiten eine ähnliche Richtung, wie die der 30 °C Reaktion einschlagen.

Ein völliges Ausbleiben des reaktionsbeschleunigenden Templateinflusses könnte noch ansatzweise mit einer weitgehenden Duplexierung der 12mer $^{OH}(TA)_6{}^{OH}$-Template bei den gegebenen Temperaturen von 2 und 30 °C erklärt werden. Das Templat sollte allerdings unter den Reaktionsbedingungen mit einer Schmelztemperatur von ca. T_m = 30 °C (Berechnung mittels Nearest-Neighbour Verfahren, Kap. 7.7, mit $[(TA)_6] = 8.3$ mM) nur zur Hälfte duplexiert sein und damit durchaus noch zur Bildung termolekularer Komplexe zur Verfügung stehen und die Oligomerbildung beschleunigen, man beobachtet jedoch den gegenteiligen Effekt. Die Schmelztemperaturen der Duplexe der kürzeren Bausteine (2mer, 4mer, 6mer) sollten unter 0 °C liegen (Berechnung mittels Nearest-Neighbour Verfahren, Kap. 7.7), so dass Templateffekte evtl. erst bei der Bildung von längeren Oligomeren bei niedrigen Reaktionstemperaturen zum Tragen kommen könnten.

Möglich wäre auch eine unvollständige Besetzung des Templates mit daraus resultierenden Lücken zwischen den hybridisierten Eduktmolekülen, deren reaktive Enden daraufhin nicht mehr in unmittelbarer Nähe liegen und somit eine Inhibierung der Oligomerisierung zur Folge hätten[139]. Die hohe Eduktkonzentration, die eine vollständige Besetzung des Templates erzielen kann, spricht jedoch dagegen. Das bisherige Reaktionsmodell kann eine hemmende Templatwirkung nicht vollständig erklären. Ein erweitertes Modell, das einen weiteren Erklärungsansatz für das obige Phänomen bereithält, wird später näher erläutert (siehe Kap. 8.3.5.1).

7.4.2 Oligomerisierung von $^{n}CG^{p}$

Die Kinetiken zur Oligomerisierung des selbstkomplementären $^{n}CG^{p}$ mit einer Konzentration von 50 mM wurden wie zuvor bei Temperaturen von 2, 15 und 30 °C durchgeführt. Der HPLC-Beispielstackplot für 2 °C zeigt innerhalb der Kinetikmesszeit von 250 Minuten eine ungewöhnliche starke Entwicklung des 8mer Peaks bei nahezu völligem Ausbleiben höherer Kondensationsprodukte (Abb. 7.28). Die Cyclisierung ist vor allem bei 2 °C so gut wie vernachlässigbar.

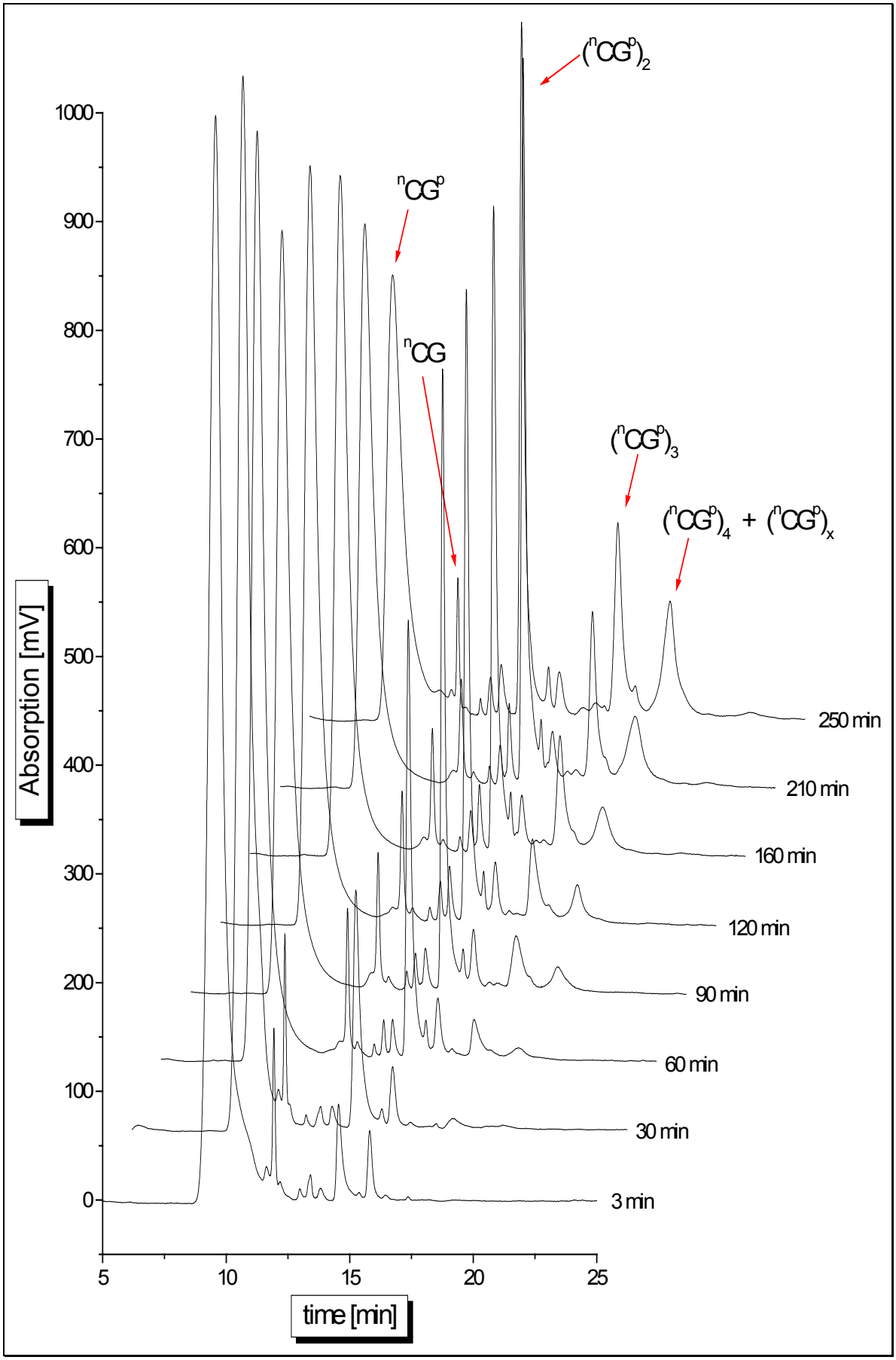


Abb. 7.28: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}CG^{p}$, 50 mM, 2 °C

Eine Massenbestimmung des im vermeintlichen 8mer-Peak enthaltenen Oligomers per MALDI-TOF zeigt, dass der Peak neben dem 8mer auch 10mer und in Spuren höhere Oligomere enthält. Offenbar ist die Trennleistung des auf Oligomere bereits hochoptimierten Reversed-Phase HPLC-Systems mit TEAA/AcN-Eluentensystem nicht groß genug, um die unter den Chromatografiebedingungen aggregierenden höheren Oligomere ab dem 8mer voneinander zu trennen. Das der Reversed-Phase Chromatografie zugrunde liegende Prinzip der Retention von Molekülen am Trägermaterial über hydrophobe Wechselwirkungen benötigt Bedingungen, die gleichzeitig auch die Bildung von hydrophoben Komplexen fördern. Das Unvermögen der RP-HPLC trotz Einsatz von chaotropen (komplexbrechenden) Solventien wie Acetonitril im Elutionsmittel die Aggregate aus längeren CG-Oligomeren aufzutrennen weist auf eine hohe Stabilität der CG-Komplexe im Gegensatz zum ebenfalls selbstkomplementären TA-System hin. Die Betrachtung des HPLC-Beispielstackplots für 30 °C bekräftigt diese These (Abb. 7.29). Der nach 30 Minuten noch definierte 8mer $({}^{n}CG^{p})_4$ Peak geht bei längeren Reaktionszeiten in ein unspezifisches Peakband über. Erst in der Spülphase der Chromatographie nach 24 Minuten, in der sämtliche längeren Oligomere bei hohem Acetonitrilgehalt (80%) des HPLC-Puffers von der Säule entfernt werden, tritt ein durch den kurzen und intensiven Spülvorgang bedingter scharfer Peak auf.

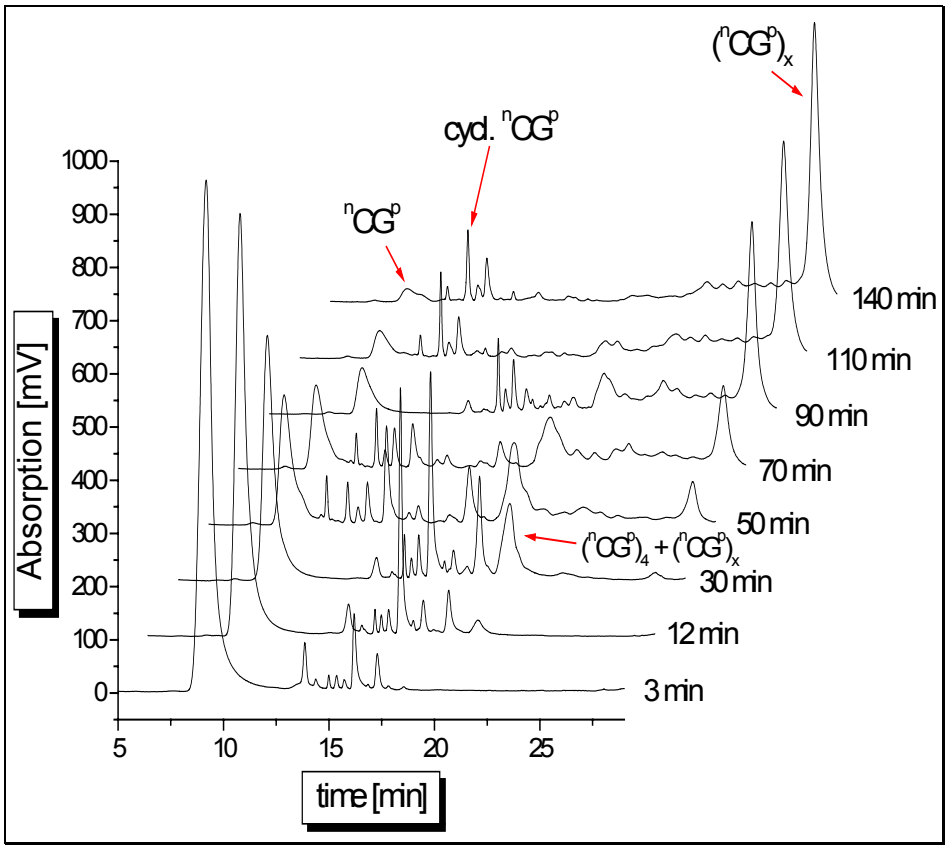


Abb. 7.29: HPLC-Stackplot der Reaktion ${}^{n}CG^{p}$, 50 mM, 30 °C

Eine Massenbestimmung dieses letzten Peaks per MALDI liefert das durch Fragmentierung (vgl. Kap.7.1) bedingte komplette Spektrum der $(^{n}CG^{p})_{x}$-Massen bis zum 16mer, so dass dieser Peak mindestens $(^{n}CG^{p})_{8}$ ($M_{theor.}$= 4964 g·mol^{-1}) enthalten sollte (Abb. 7.30).

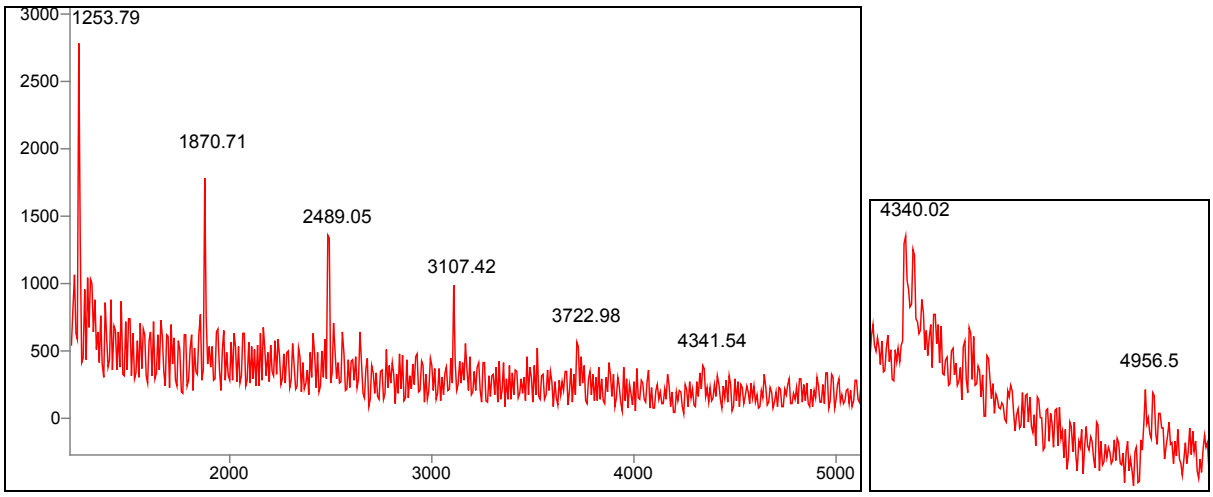


Abb. 7.30: MALDI-TOF-Massenbestimmung des $(^{n}CG^{p})_{x}$-Peaks, rechts schwache Peaks ab M = 4000 g·mol^{-1}

Da die Fragmentierung mit steigender Anzahl an Phosphoamidatbindungen zunimmt, wird eine Detektion höherer Oligomere per MALDI zunehmend schwieriger. Aus diesem Grunde ist es durchaus möglich, dass der untersuchte Peak höhere Oligomere als das beobachtete 16mer enthält, das auch ein Fragment eines längeren Produktes sein kann. Die Massenbestimmung der Oligomerisationsprodukte mittels MALDI-TOF-MS stößt hier durch den Fragmentierungseffekt an ihre Grenzen, obwohl sie prinzipiell in der Lage ist weitaus größere Molekülmassen zu bestimmen.

Durch das Auftreten von Aggregationseffekten auf der Reversed-Phase-Säule verbietet sich eine kinetische Betrachtung der CG-Oligomere ab dem 8mer, so dass im folgenden nur die Konzentrations-Zeit-Verläufe des 2mers, 4mers und 6mers aufgeführt sind. Auch hier lässt sich die in Kap. 7.3.2 dargelegte Systematik und Diskussion der Kurvenformen auf die gemessenen Kurven anwenden.

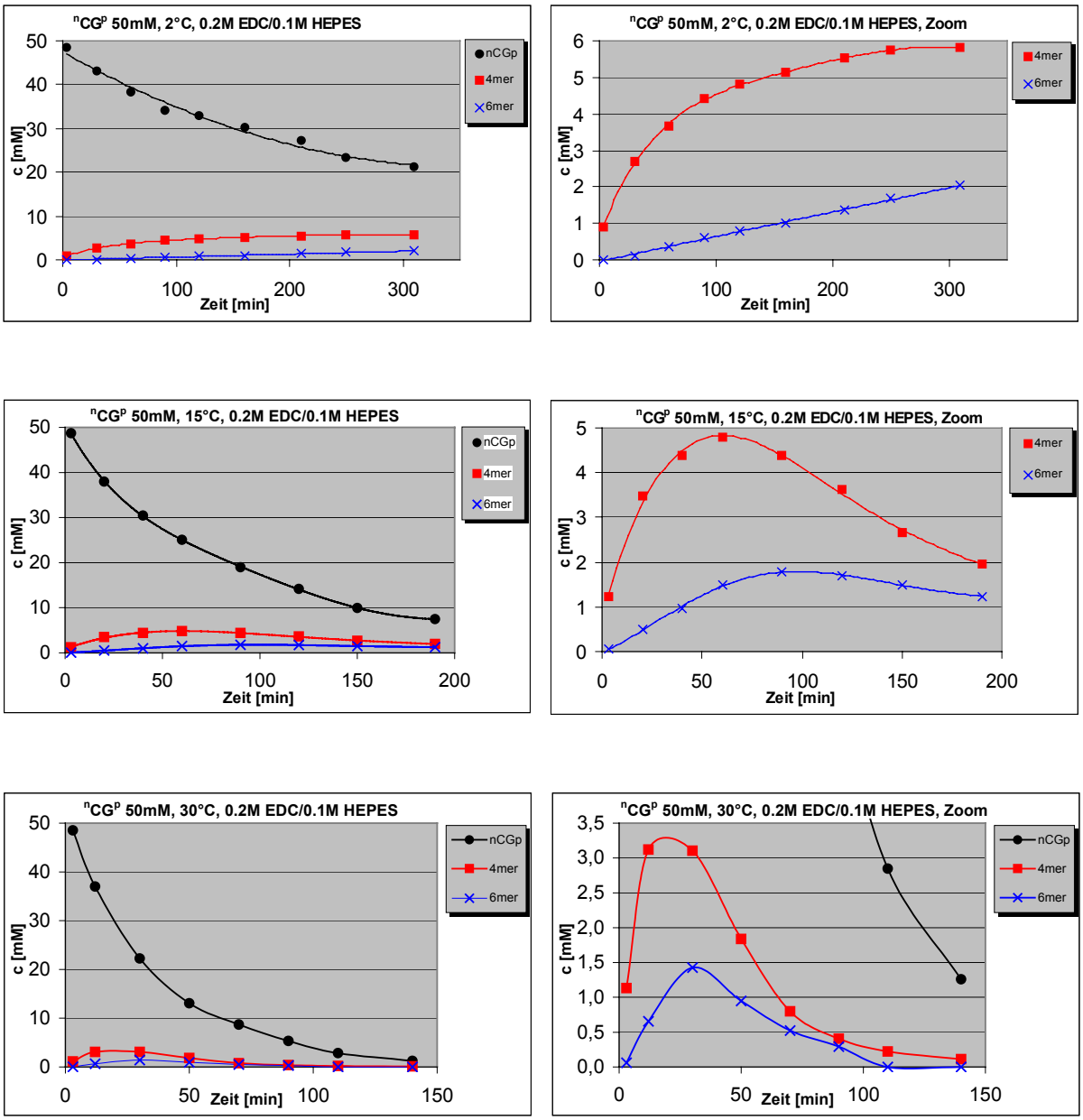


Abb. 7.31: Konzentrations-Zeit-Kurven der $(^{n}CG^{p})_{x}$-Oligomere bei Temperaturen von 2, 15 oder 30 °C

Nachfolgend werden die Kurven je eines Oligomers bei den drei verschiedenen Temperaturen gegenübergestellt (Abb. 7.32).

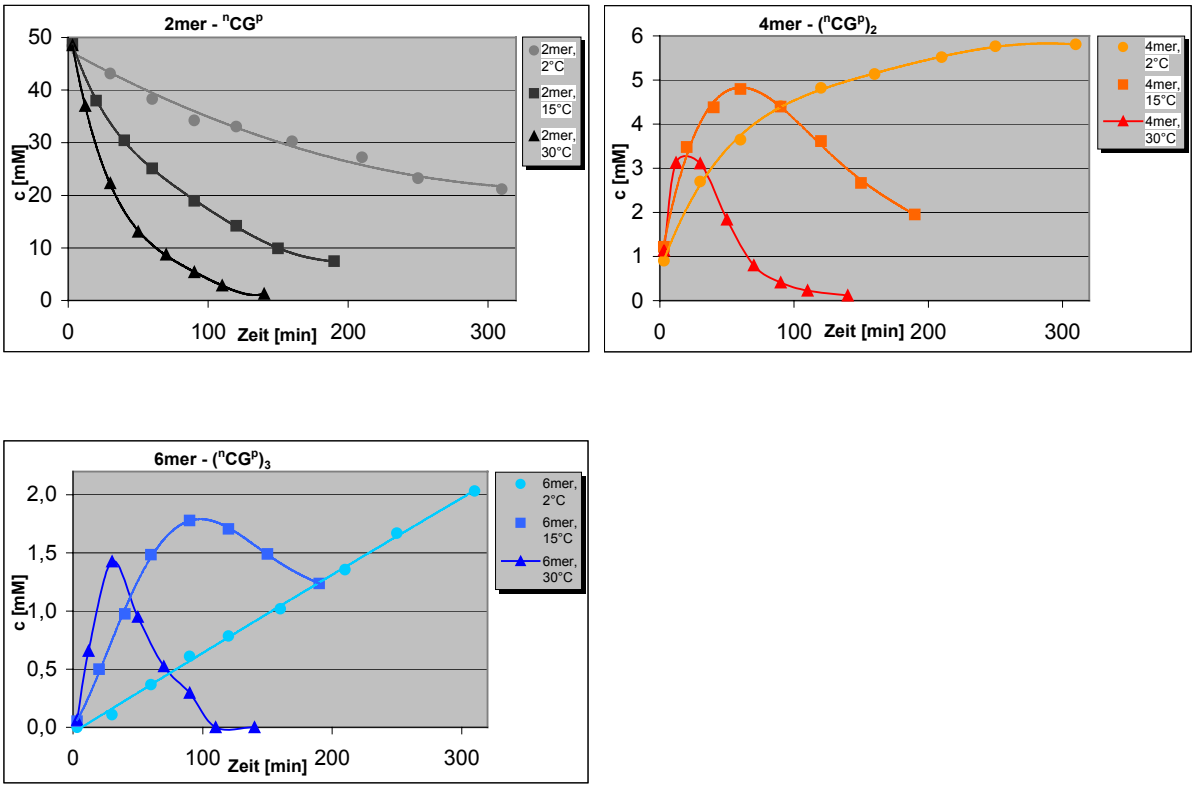


Abb. 7.32: Konzentrations-Zeit-Kurven der $({}^{n}CG^{p})_{x}$-Oligomere der Länge x = 1, 2 und 3

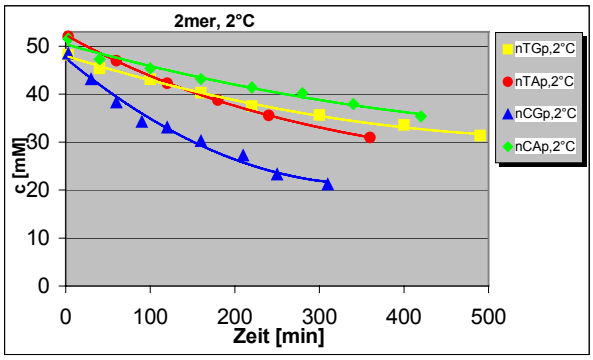
Bemerkenswert ist die fast vollständige Umsetzung des Eduktes und auch der Primärprodukte (4mer, 6mer) zu höheren Produkten bei 30 °C innerhalb des kurzen Zeitraumes. Die Ausnahmestellung des ${}^{n}CG^{p}$-Systems wird bei dem Vergleich der Systeme untereinander deutlich, wobei jedoch aus den oben aufgeführten Gründen auf einen Vergleich der Bildungskurven ab dem 8mer verzichtet werden muss.

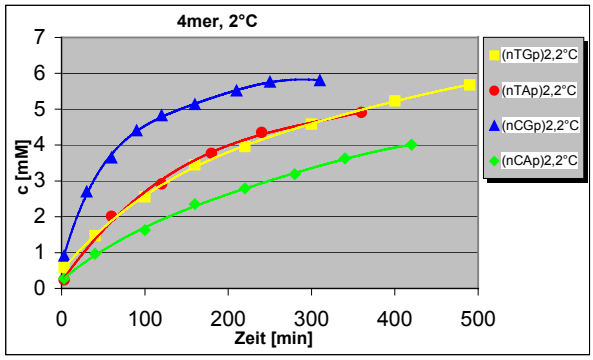
7.5 Vergleich der Konzentrations-Zeit-Kurven der vier Dimer-Systeme

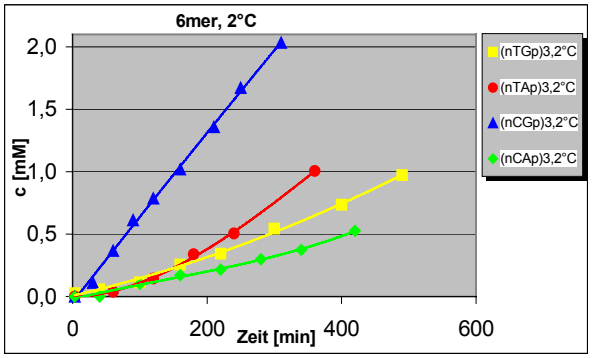
Die Auftragung der Konzentrations-Zeit-Verläufe der vier möglichen Produktsequenzen $({}^{n}XY^{p})_{Z}$ einer bestimmten Länge Z bei einer gegebenen Temperatur erlaubt den direkten Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit eines Produktoligomers der vier Dimer-Systeme in Abhängigkeit von der Sequenz. Die Abnahme des Dimers liefert eine gute

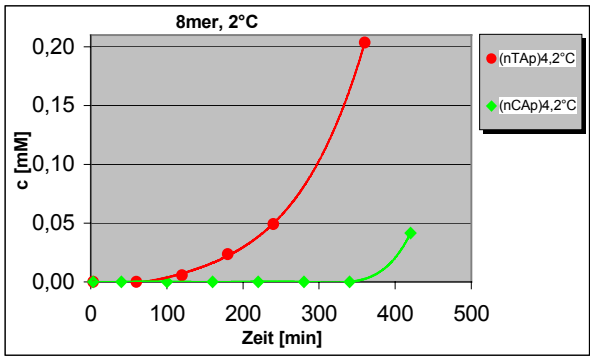
Vergleichsmöglichkeit der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit zu frühen Reaktionsszeiten innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Oligomere die keine verlässlichen (z.B. $(^{n}CG^{p})_{x}$ ab 8mer) oder nahe dem Grundrauschen liegende Messwerte lieferten (z.B. $(^{n}TG^{p})_{4}$, diverse 10mere) wurden nicht aufgeführt, so dass zumindest ein direkter Vergleich der 2mere, 4mere und 6mere untereinander möglich ist.

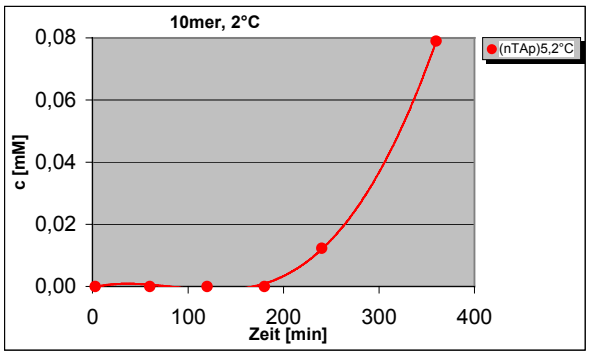
7.5.1 Vergleich der Oligomerbildung bei 2 °C







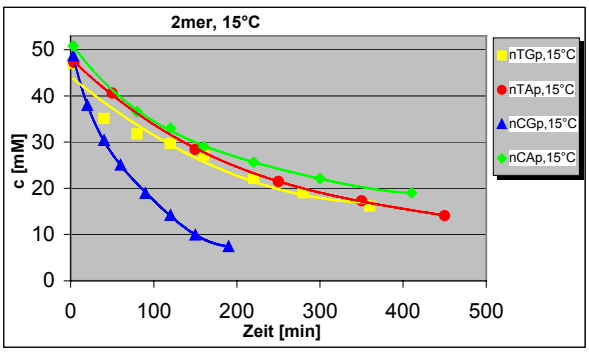


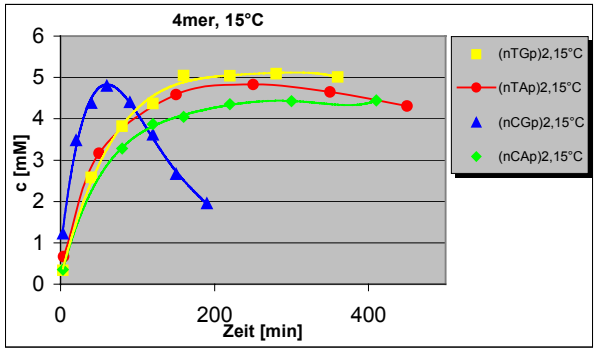


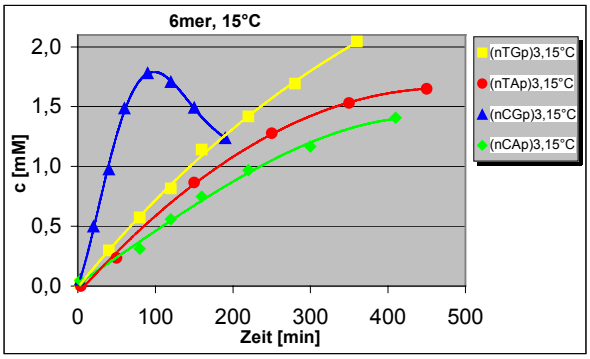
Die Betrachtung der Kurven offenbart einen Trend, der auch von den folgenden Vergleichen bei höheren Temperaturen bestätigt wird: Das $^{n}CG^{p}$-System zeigt mit weitem Abstand die höchste Reaktivität, das $^{n}TA^{p}$-System und das $^{n}TG^{p}$-System liegen nahe beieinander im

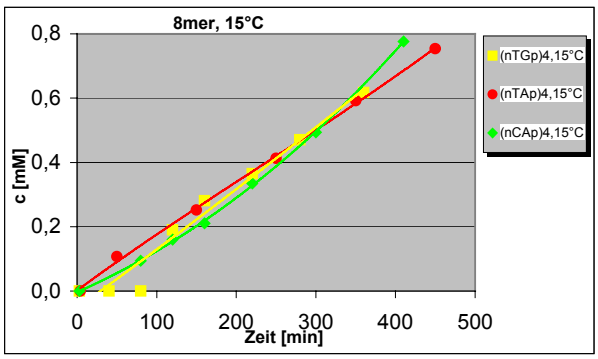
Mittelfeld während das $^{n}CA^{p}$-System das Schlusslicht bildet. Interessant ist in diesem Zusammenhang die gegenüber den nicht selbstkomplementären Systemen starke Bildung von 8mer und 10mer im $^{n}TA^{p}$-System bei 2 °C. Obwohl in der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit dem $^{n}TG^{p}$-System nahezu ebenbürtig, zeigt das selbstkomplementäre $^{n}TA^{p}$-System, evtl. aufgrund von Katalyseeffekten der in Kap.7.4 diskutierten Komplexe, eine vermehrte Bildung höherer Oligomere. Darin wird es, sichtbar am Gesamtumsatz, vom $^{n}CG^{p}$-System übertroffen, dessen Bildungskurven für 8mer und höhere Oligomere wie bereits erwähnt durch ihr Aggregationsverhalten auf RP-HPLC-Säulen nicht für einen Vergleich zur Verfügung stehen, aber voraussichtlich erheblich höher sind.

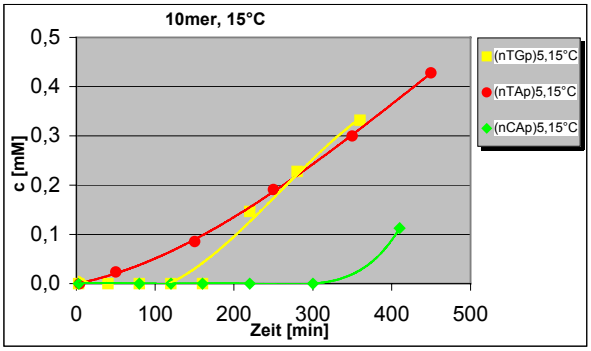
7.5.2 Vergleich der Oligomerbildung bei 15 °C





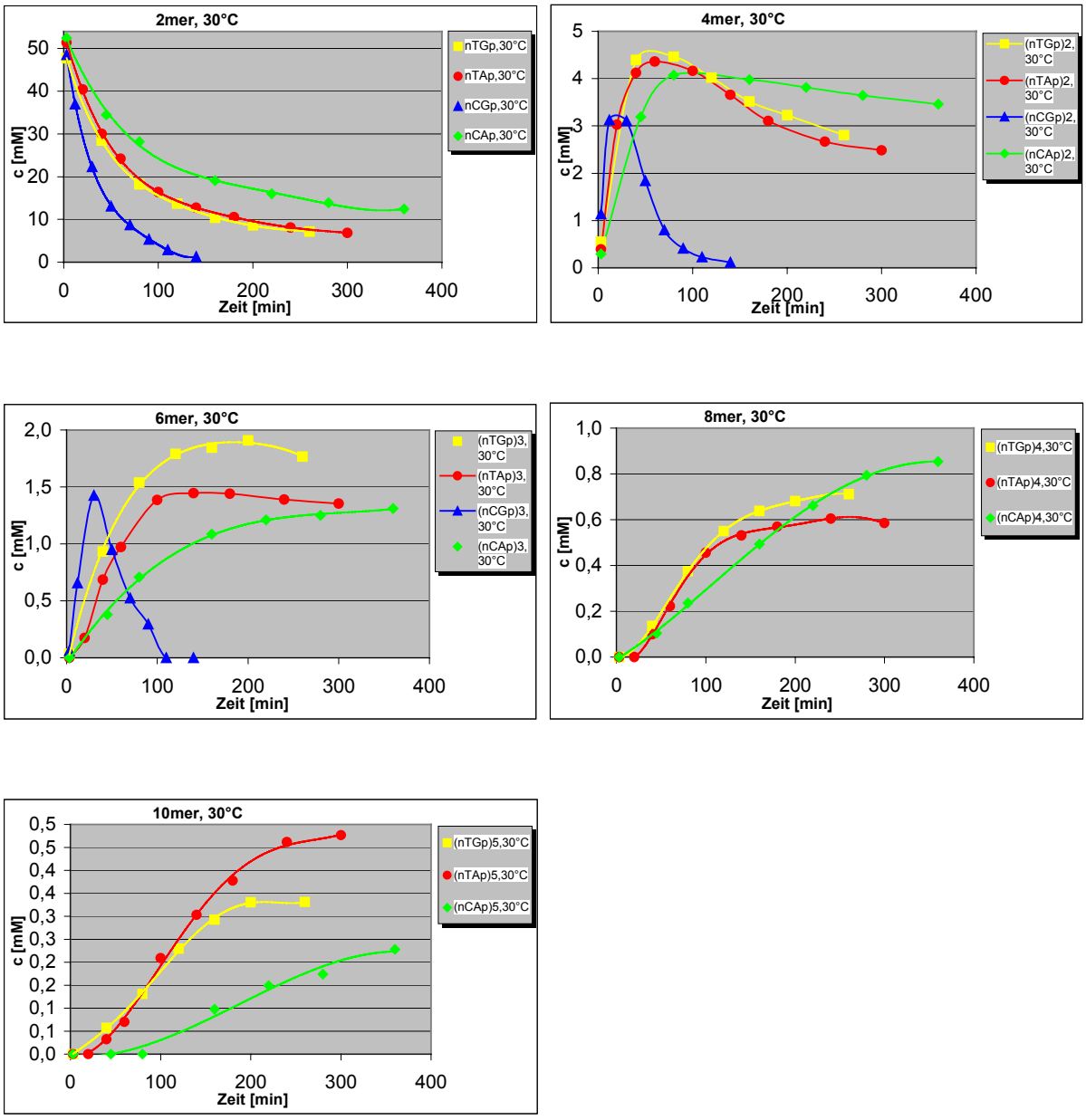






Auch bei 15 °C verläuft die Oligomerisierung im $^{n}CG^{p}$-System wesentlich schneller, als bei den drei anderen Systemen, deren Kurven hier relativ nahe beieinander liegen. Nach wie vor liegt aber das $^{n}CA^{p}$-System bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit an letzter Stelle, wenn auch nicht ganz so deutlich wie bei 2 °C.

7.5.3 Vergleich der Oligomerbildung bei 30 °C



Bei 30 °C Reaktionstemperatur zieht sich das Feld wieder etwas auseinander, wobei die Reihenfolge unverändert bleibt. Das $^{n}CG^{p}$-System reagiert mit Abstand am schnellsten, danach folgen das $^{n}TG^{p}$-System und das $^{n}TA^{p}$-System, die in etwa gleichauf liegen und

diesmal deutlich langsamer folgt das $^{n}CA^{p}$-System. $(^{n}TA^{p})_5$ wird offenbar schneller als $(^{n}TG^{p})_5$ gebildet, obwohl die Bildung kürzerer $(^{n}TG^{p})_x$-Bausteine schneller ist. Im Falle des selbstkomplementären $^{n}TA^{p}$-Systems wäre demnach ein Katalyseeffekt bei den längeren Oligomeren denkbar.

7.6 Diskussion der Reaktivitätsreihenfolge

Die Reaktivitätsreihenfolge der einzelnen Systeme lässt sich anhand des Gesamtumsatzes bei den verschiedenen Temperaturen bestimmen. Daraus ergibt sich die folgende Einteilung:

$$^{n}CG^{p} >> (^{n}TA^{p} \approx {}^{n}TG^{p}) > {}^{n}CA^{p}$$

Die beobachtete Sequenzabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit hat verschiedene Gründe. Grundsätzlich kann man bei allen vier Systemen von Basestacking-Effekten am Reaktionsort im Übergangszustand der Kondensation ausgehen, die zwischen der 3'-endständigen Purinbase des einen und der 5'-endständigen Pyrimidinbase des anderen Bausteins auftreten. Falls die Oligomerisierung aller vier untersuchter Dimere ausschließlich über den rein spontanen Reaktionskanal stattfindet, sollte die Reaktionsgeschwindigkeit von der Stärke der Basenstapelung zwischen den Nucleobasen abhängig sein, die die entstehende Phosphoamidatbindung flankieren. Hierbei wird angenommen, dass der Übergangszustand der Reaktion im Einzelstrang dem im Doppelstrang ähnlich ist. Die beiden beteiligten Einzelstränge nehmen dabei vermutlich eine Einzelhelixstruktur an, die aufgrund der Überlappung der übereinander geschichteten Basen (Basenstapelung) sowohl über aromatische π-π Wechselwirkungen, als auch insbesondere durch hydrophobe Effekte der Basen gegenüber dem Lösungsmittel Wasser stabilisiert wird[74].

Durch geschickte Auswahl passender Oligodeoxynucleotidsequenzen gelang *Mirzabekov et al.* auf einem DNA-Microchip mittels diverser Hybridisierungsexperimente die Messung der Stabilisierungsenergien aus intra-helicaler Basenstapelung zwischen den die Unterbrechungsstelle flankierenden Basen in termolekularen DNA-Komplexen[140]. Diese Werte könnten als Richtwerte für die Stabilitätsreihenfolge möglicher intermediärer Übergangszustände bei der Kondensationsreaktion dienen. Wenn die Oligomerisierung aller vier untersuchten

Dimersysteme einzig und alleine über den spontanen Reaktionskanal ablaufen würde, dann sollte laut der Reihenfolge in Tab. 7.3 nach *Mirzabekov* z.B. das CG-System am langsamsten reagieren, das CA-System dagegen am schnellsten.

Stack	$\Delta G°_{37}$ [kcal·mol^{-1}]
C-A | C-A	-1.9
T-A | T-A	-1.7
T-G | T-G	-1.0
C-G | C-G	-0.8

Tab. 7.3: $\Delta G°_{37}$-Werte der intrahelicalen DNA-Basenstapelungs-Stabilisierungsenergien, ±0.2 kcal·mol^{-1}

Die beobachteten Reaktionsumsätze korrelieren jedoch in keiner Weise mit diesen Werten, so dass zusätzliche, stärkere Reaktionskanäle über die in Kap. 7.4 erörterten Komplexe anzunehmen sind, die die Geschwindigkeiten maßgeblich beeinflussen sollten. Derartige Komplexe können voraussichtlich nur von den selbstkomplementären Systemen $^{n}TA^{p}$ und $^{n}CG^{p}$ gebildet werden. Setzt man voraus, dass katalysierende Komplexe unter den gegebenen Reaktionsbedingungen in relevantem Ausmaß entstehen, dann sollten sich die Differenzen zwischen den Komplexstabilitäten der beiden selbstkomplementären Dimere in den Reaktionsgeschwindigkeiten widerspiegeln.

Die Stabilität eines Duplex resultiert aus dem Energiegewinn bei dessen Hybridisierung und setzt sich zum einen aus der intermolekularen Basenstapelung z.B. der beiden Purinbasen im CG/GC-Duplex und zum anderen aus der Bildung der Wasserstoffbrückenbindungen während der Basenpaarung zusammen. Sowohl das Ausmaß der Basenüberlappung, als auch die Anzahl der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen bestimmen die Stärke der Duplex-Stabilisierung. Der CG/GC-Duplex liefert hierbei sechs, der TA/AT-Duplex dagegen nur vier Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 7.33).

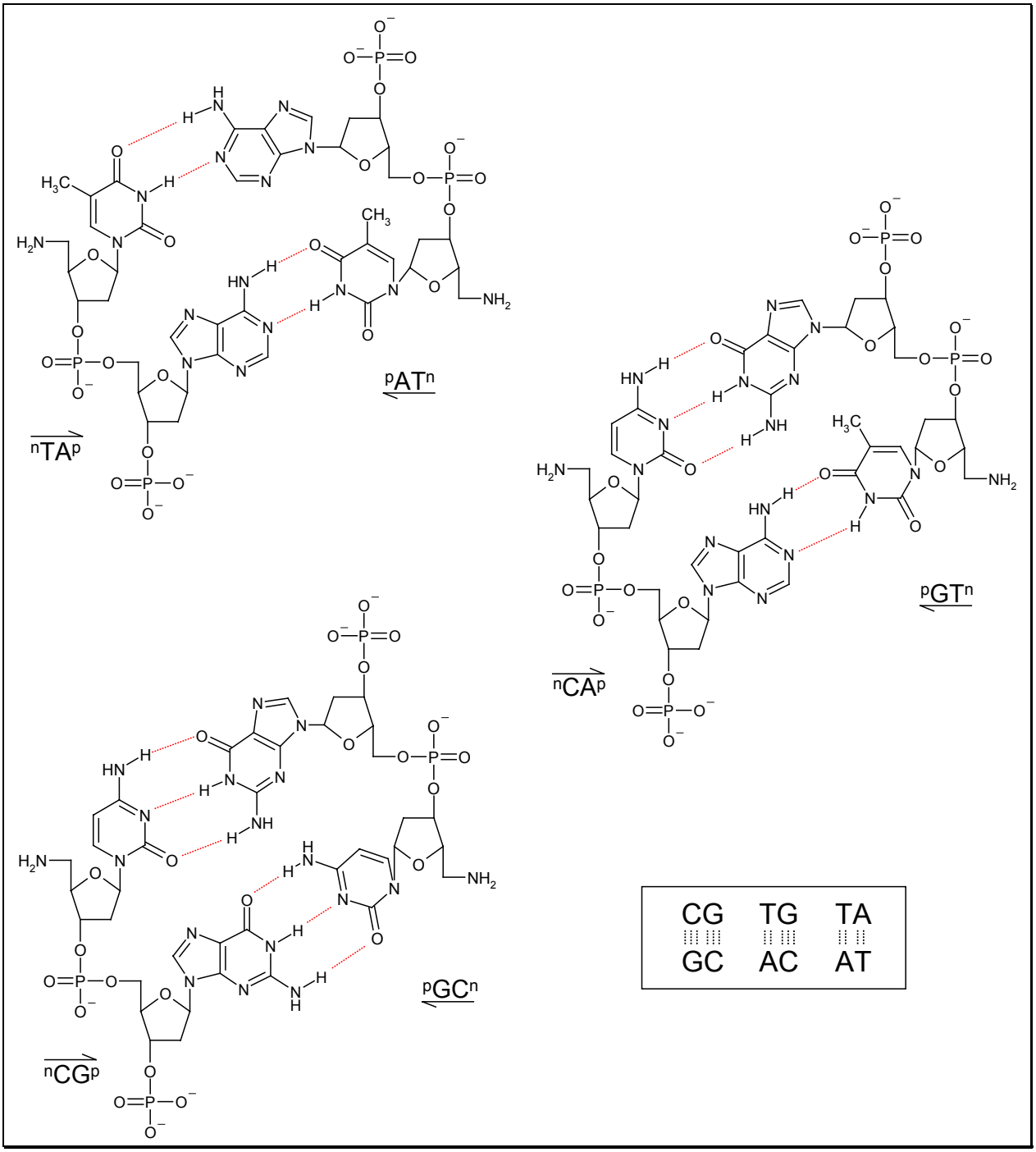


Abb. 7.33: Wasserstoffbrückenbindungen in Duplexen aus CG (6), TG bzw. CA (5) und TA (4)

Allgemein geht man davon aus, dass die auf hydrophoben Kräften in wässrigen Lösungen beruhende Basenstapelung einen höheren Einfluss auf die Duplexstabilität hat, als die Basenpaarung über H-Brückenbildung und für die verschiedenen Stabilitäten von Duplexen gleicher Zusammensetzung, aber unterschiedlicher Sequenz verantwortlich ist[141].

Der kleinste gemeinsame Nenner der in Kap. 7.4 betrachteten Komplexe wären die Dimer-Duplexe. Deren Stabilität lässt sich unter der berechtigten Annahme der weitestgehenden

strukturellen Ähnlichkeit von DNA mit den in dieser Arbeit verwendeten 5'-Amino-3'-Phosphat-Bausteinen und deren Produkten[35,36,37,40,49,53,132] mittels der thermodynamischen Daten des Nearest-Neighbour Modells vergleichen.

7.7 Das Nearest-Neighbour-Modell

Das Nearest-Neighbour-Modell, künftig als NN-Modell abgekürzt, basiert auf der Annahme, dass die thermodynamische Stabilität eines Basenpaares innerhalb eines Duplexes von der Identität der unmittelbar angrenzenden Nachbarn abhängig ist. Mit Hilfe eines Satzes thermodynamischer Parameter der 10 möglichen Dimer-Duplexe, die aus zahlreichen Experimenten empirisch gewonnen wurden, können allein durch Analyse der Basensequenz Voraussagen über die Stabilität und den Schmelzpunkt eines beliebigen DNA- oder RNA-Duplexes gemacht werden, die nahe an den tatsächlichen experimentellen Daten bei einer durchschnittlichen Abweichung von ca. 6 % liegen[142].

Man unterteilt den Duplex gedanklich in Dimer-Duplexe, deren thermodynamische Wechselwirkungsparameter ($\Delta H°$, $\Delta S°$, $\Delta G°$) experimentell bestimmt wurden und bekannt sind. Für die Berechnung der freien Energie $\Delta G°_{total}$ eines Duplexes benötigt man neben den $\Delta G°_{x}$-Inkrementen, die die NN-Wechselwirkungen innerhalb der Dimer-Duplexe beschreiben, auch die Helix-Initiationsenergie $\Delta G°_{init}$ und den Symmetrie-Term ΔG_{sym} (Gleichung 7.1).

$$\Delta G°_{total} = \sum_{x} \Delta G°_{x} + \Delta G°_{init} + \Delta G_{sym}$$

Gleichung 7.1

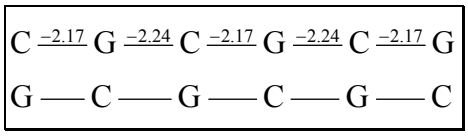
Der Helix-Initiationsterm $\Delta G°_{init}$ steht für die freie Initiationsenergie und berücksichtigt neben anderen Faktoren den Entropieverlust durch geringere Translation und Rotation aufgrund der Zusammenführung von zwei Partikeln zu quasi einem einzigen. Der Symmetrie-Term ΔG_{sym} muss bei selbstkomplementären DNA- oder RNA-Duplexen eingeführt werden, da die Aufrechterhaltung der zweifachen Rotationssymmetrie einen solchen Duplex gegenüber einem nicht selbstkomplementären Duplex entropisch um 1.4 $cal \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ ungünstiger werden lässt. Bei der NN-Standardtemperatur von 37 °C ist ΔG_{sym} für einen beliebigen selbstkomplementären Duplex 0.43 $kcal \cdot mol^{-1}$, für einen nicht selbstkomplementären Duplex ist $\Delta G_{sym} = 0$.

Sowohl für DNA als auch für RNA existieren Varianten des gleichen Prinzips, die sich zwangsläufig in ihren $\Delta G°_x$-Inkrementen unterscheiden, aber auch verschiedene Betrachtungsweisen der Helix-Initiationsenergie $\Delta G°_{init}$ zeigen. Das *Turner'sche* RNA-NN-Modell[142] beispielsweise unterteilt $\Delta G°_{init}$ in einen fixen Initiationsterm, der bei jeder Duplexbildung einbezogen wird und einen 'Initiations-Strafterm', der nur bei terminalen A-U Basenpaaren berücksichtigt werden muss, da diese den Duplex gegenüber terminalen G-C Basenpaaren destabilisieren würden. Das normierte DNA-NN-Modell nach *SantaLucia*[127] dagegen, das die NN-Werte aus sechs verschiedenen Studien bewertet, vereinigt und mittelt, unterscheidet lediglich zwischen terminalen G-C und A-T Basenpaaren, die sich in ihren $\Delta G°_{init}$-Werten nur geringfügig unterscheiden. Die für diese Arbeit relevanten NN-Parameter der sechs von zehn möglichen NN-Dimerduplexen sind in Tab. 7.4 zusammengefasst. Die RNA-Werte finden später in Kap. 8.2.5 Anwendung und sind hier zum Vergleich mit aufgeführt.

DNA-Duplex	**ΔH°** kcal·mol^{-1}	**ΔS°** cal·mol^{-1}·K^{-1}	**ΔG°$_{37°C}$** kcal·mol^{-1}	**RNA-Duplex**	**ΔH°** kcal·mol^{-1}	**ΔS°** cal·mol^{-1}·K^{-1}	**ΔG°$_{37°C}$** kcal·mol^{-1}
CG/GC	-10.6	-27.2	-2.17	CG/GC	-10.6	-26.7	-2.36
GC/CG	-9.8	-24.4	-2.24	GC/CG	-14.9	-36.9	-3.42
TA/AT	-7.2	-21.3	-0.58	UA/AU	-7.7	-20.5	-1.33
AT/TA	-7.2	-20.4	-0.88	AU/UA	-9.4	-26.7	-1.10
CA/GT	-8.5	-22.7	-1.45	CA/GU	-10.4	-26.9	-2.11
AC/TG	-8.4	-22.4	-1.44	AC/UG	-11.4	-29.5	-2.24
$\Delta G°_{init\ G-C}$	0.1	-2.8	0.98	$\Delta G°_{init}$	3.61	-1.5	4.09
$\Delta G°_{init\ A-T}$	2.3	4.1	1.03	$\Delta G°_{term.A-U}$	3.72	10.5	0.45
ΔG_{sym}	0	-1.4	0.43	ΔG_{sym}	0	-1.4	0.43

Tab. 7.4: NN-Parameter für DNA und RNA nach *SantaLucia*[127] und *Turner*[142], c(NaCl)=1M, pH 7

Auf der Basis dieser Daten lässt sich nach Gleichung 7.1 der ΔG_{total}-Wert einer beliebigen Sequenz vorhersagen. Für einen dCGCGCG-Duplex würde $\Delta G_{total,37°C}$ (c(NaCl)=1M, pH 7) beispielsweise folgendermaßen berechnet werden:



$$\Delta G°_{total,37°C} = \Delta G°_x + \Delta G°_{init} + \Delta G_{sym}$$
$$= 3\cdot(-2.17\ \text{kcal·mol}^{-1}) + 2\cdot(-2.24\ \text{kcal·mol}^{-1}) + 2\cdot(0.98\ \text{kcal·mol}^{-1}) + 0.43\ \text{kcal·mol}^{-1}$$
$$= \underline{8.60\ \text{kcal·mol}^{-1}}$$

Die Initiationsenergie $\Delta G°_{\text{init G-C}}$ von 0.98 kcal·mol^{-1} wird mit dem Faktor 2 multipliziert, da sie für jeden Duplexterminus separat berücksichtigt werden muss. Von unabhängiger Seite wurden für $\Delta G°_{\text{total,37°C}}(\text{d(CG)}_3)$ experimentell Werte von 8.5 [143] bzw. 8.1 kcal·mol^{-1} [137] gefunden, die neben vielen anderen Veröffentlichungen die hohe Vorhersagekraft des NN-Modells unterstreichen[127,142].

Für eine beliebige Temperatur kann man $\Delta G°_{\text{total}}$ nach Gleichung 7.2 aus $\Delta H°$ und $\Delta S°$ berechnen. Damit ist die Duplexstabilität auch für die in dieser Arbeit relevanten Temperaturen von 2, 15 und 30 °C vorhersagbar.

$$\Delta G°_{\text{total, T}} = \Delta H° - T\Delta S°$$

Gleichung 7.2

Weiterhin ist für DNA eine Salzkorrektur von $\Delta S°$ und damit auch $\Delta G°$ möglich, die auf empirischen Daten von *SantaLucia et al.*[127] beruht und so die verwendete Na^+-Konzentration von 0.05 M berücksichtigen kann (Gleichung 7.3).

$$\Delta S°([\text{Na}^+]) = \Delta S°(1\,\text{M NaCl}) + 0.368 \cdot \text{N} \cdot \ln[\text{Na}^+] \quad \text{N = Anzahl der Phosphate/2}$$

Gleichung 7.3

Die Schmelztemperatur eines Duplexes bei gegebener Konzentration lässt sich über Gleichung 7.4 berechnen.

$$\text{Tm} = \frac{\Delta H°_{\text{total}}}{\Delta S°_{\text{total}} + R \cdot \ln C_T}$$

Gleichung 7.4

C_T ist die totale Oligonucleotidkonzentration, die im Falle von nicht-selbstkomplementären Molekülen durch $C_T/4$ ersetzt wird.

Mit Hilfe der oben aufgeführten Gleichungen erhält man einen Überblick über die Stabilitäten und Schmelztemperaturen der DNA-Duplexe unter verschiedenen Bedingungen. Die TG/AC-Duplexe sind zu Vergleichszwecken mitaufgeführt und nur in den Experimenten mit Templatzugabe von praktischem Belang. Neben den Duplexen bis zum 10mer wurde

zudem noch das Zahlenmaterial für 24mer- und 60mer-Duplexe berechnet. Die Vergleichskonzentration der Oligomere beträgt 1 mM. Für Dimere wurde zudem die Ausgangskonzentration von 50 mM, für Tetramere die mittlere Maximalkonzentration von 5 mM berücksichtigt. Werte, die sich direkt auf in dieser Arbeit verwendete Bedingungen beziehen lassen, sind grau hinterlegt.

Sequenz	c(Oligo) [mM]	$\Delta G°_{37°C}$ [kcal·mol^{-1}] 1M NaCl	$\Delta G°_{2°C}$ [kcal·mol^{-1}] 1M NaCl	$\Delta G°_{2°C}$ [kcal·mol^{-1}] 0.05M NaCl	T_m [°C] 1M NaCl	T_m [°C] 0.05M NaCl
TA	1	1.91	1.39	2.00	-181.0	-187.7
CG	1	0.22	-0.99	-0.38	-56.1	-65.7
TG/AC	1	0.56	-0.21	0.39	-112.1	-121.0
TA	50	1.91	1.39	2.00	-146.0	-158.4
CG	50	0.22	-0.99	-0.38	-14.1	-27.6
TG/AC	50	0.56	-0.21	0.39	-70.5	-84.4
$(TA)_2$	1	0.45	-1.54	-0.32	-30.0	-44.5
$(CG)_2$	1	-4.19	-7.19	-5.98	36.3	23.2
$(TG)_2/(AC)_2$	1	-2.33	-4.70	-3.49	4.0	-10.0
$(TA)_2$	5	0.45	-1.54	-0.32	-18.4	-34.2
$(CG)_2$	5	-4.19	-7.19	-5.98	46.6	32.6
$(TG)_2/(AC)_2$	5	-2.33	-4.70	-3.49	15.1	0.0
$(TA)_3$	1	-1.01	-4.46	-2.64	8.1	-7.6
$(CG)_3$	1	-8.60	-13.39	-11.57	65.6	51.4
$(TG)_3/(AC)_3$	1	-5.22	-9.19	-7.37	38.4	23.1
$(TA)_4$	1	-2.47	-7.39	-4.96	25.6	9.3
$(CG)_4$	1	-13.01	-19.60	-17.17	80.0	65.3
$(TG)_4/(AC)_4$	1	-8.11	-13.68	-11.26	54.8	38.9
$(TA)_5$	1	-3.93	-10.32	-7.28	35.5	19.0
$(CG)_5$	1	-17.42	-25.80	-22.77	88.6	73.6
$(TG)_5/(AC)_5$	1	-11.00	-18.17	-15.14	64.5	48.3
$(TA)_{12}$	1	-14.15	-30.80	-23.52	57.5	40.5
$(CG)_{12}$	1	-48.29	-69.21	-61.93	108.3	92.6
$(TG)_{12}/(AC)_{12}$	1	-31.23	-49.61	-42.33	86.4	69.4
$(TA)_{30}$	1	-40.43	-83.47	-65.27	66.4	49.2
$(CG)_{30}$	1	-127.67	-180.86	-162.66	116.7	100.7
$(TG)_{30}/(AC)_{30}$	1	-83.25	-130.44	-112.24	95.6	78.3

Tab. 7.5: $\Delta G°_{total}$- und T_m-Werte von DNA-Duplexen unter verschiedenen Konz.- und Temperatur-Bedingungen

Die Verringerung der Beobachtungstemperatur von 37 auf 2 °C bewirkt eine deutliche Erniedrigung der $\Delta G°_{total}$-Werte und damit eine Erhöhung der Duplexstabilität. Die Verringerung der NaCl-Konzentration und damit der Ionenstärke des Lösungsmittels hat dagegen den erwarteten gegenteiligen Effekt. Die Duplexstabilität bei c(NaCl) = 0.05 M und T = 2 °C ist gegenüber c(NaCl) = 1 M und T = 2 °C verringert, liegt aber jederzeit klar über der Duplexstabilität bei c(NaCl) = 1 M und T = 37 °C. Der Einsatz derart hoher NaCl-Konzentration war aufgrund der reduzierten Geschwindigkeit der Phosphoamidatbildung bei Erhöhung der NaCl-Konzentration jedoch nicht ratsam (siehe Kapitel 6.2).

Die Stabilität der betrachteten Duplexe ist unabhängig von ihrer Konzentration. Die Schmelztemperatur T_m ist dagegen die Temperatur, bei der eine Hälfte der Gesamtkonzentration an Oligomer hybridisiert als Duplex vorliegt und die andere Hälfte als Einzelstrang, wobei dieses Gleichgewicht von der Ausgangskonzentration abhängig ist (siehe Gleichung 7.4). Geringere Oligomerkonzentrationen führen zu verringerten Schmelztemperaturen und damit zu einem kleineren Anteil an Duplexen in Lösung bei gleicher Beobachtungstemperatur. Die Länge der Oligomere nimmt durch die unterschiedliche Duplexstabilität ebenfalls Einfluss auf die Gleichgewichtslage. Bei kürzeren Oligomeren hat die Verlängerung des Duplexes große Auswirkungen auf die Schmelztemperatur, weil das Gleichgewicht in diesem Bereich noch starken Verschiebungen vom Einzelstrang in Richtung Duplex unterworfen ist. Beispielsweise geht die Verlängerung des $(CG)_x$-Duplexes um 50 % von 2 auf 3 Dimereinheiten mit einer Steigerung der freien Energie $\Delta G°_{total,37°C}$ und damit der Stabilität um ca. 105 % und einer Schmelztemperaturerhöhung von ca. 80 % einher. Je länger aber die Oligomerduplexe werden, desto geringer wird die Differenz ihrer Schmelztemperaturen, da das Gleichgewicht bereits weit auf der Seite der Duplexe liegt. So führt die Verlängerung des $(CG)_x$-Duplexes um 150 % von 12 auf 30 Dimereinheiten zwar zu einer Steigerung der freien Energie $\Delta G°_{total,37°C}$ und damit der Stabilität um ca. 160 %, aber gleichzeitig nur zu einer Schmelztemperaturerhöhung um ca. 8 % (für c(Oligo) = 1 mM, c(NaCl) = 1 M).

Die Erniedrigung der NaCl-Konzentration vom Standardwert 1 M auf 0.05 M hat ebenfalls eine Verkleinerung von T_m zur Folge, die mit steigender Sequenzlänge wächst, jedoch im gesamten untersuchten Bereich lediglich zwischen 10 und 16 °C liegt.

Betrachtet man die Schmelztemperaturen der Dimerduplexe bei einer NaCl-Konzentration von 0.05 M, so fällt auf, dass diese auch bei einer Dimer-Konzentration von 50 mM weit unter 0 °C und damit unter den Versuchstemperaturen von minimal 2 °C liegen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass keinerlei Oligomer bei den Versuchsbedingungen als Duplex vorliegt, sondern nur dass ein geringerer Teil als 50 % der Oligomer-Ausgangskonzentration zu Duplexen hybridisiert ist. Dieser geringe Anteil wäre zu Beginn der Oligomerisierung durchaus in der Lage Dimer-Duplexe oder sogar einen reaktionskatalysierenden Komplex aus zwei Dimer-Duplexen (siehe Abb. 7.19, Kap.7.4) auszubilden, dessen Stabilität evtl. durch Basenstapelung zwischen den beiden benachbarten Duplexen höher als der $\Delta G°_{total}$-Wert von zwei einzelnen Dimer-Duplexen ist. Die Berechnung des Duplex-Anteiles wäre von Interesse, um eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit reaktionskatalysierender Komplexe zum Start und im weiteren Verlauf der Oligomerisierungsreaktion machen zu können.

Hierzu ist das Gleichgewicht 2 Einzelstrang (E) ↔ Duplex (D) zu betrachten. Die Gleichgewichtskonstante K des Hybridisierungs-Gleichgewichtes (Gleichung 7.5) kann über die Gleichung 7.6 berechnet werden, wobei mögliche Salzkorrekturen in $\Delta S°$ eingehen.

$$K = \frac{c(D)}{c(E)^2}$$

Gleichung 7.5

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G°_T}{R \cdot T}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta H°}{R \cdot T} + \frac{\Delta S°}{R}\right)$$

Gleichung 7.6

Der prozentuale Anteil von Molekülen die als Einzelstrang vorliegen gegenüber Molekülen die im Duplex gepaart sind, lässt sich dagegen nicht pauschal von der Gleichgewichtskonstante K ableiten, da dieses Verhältnis neben T, $\Delta H°$ und $\Delta S°$ auch von der Ausgangskonzentration c_0(Oligo) abhängig ist.

Die Duplexkonzentration entspricht der Oligomer-Ausgangskonzentration abzüglich der Einzelstrangkonzentration geteilt durch zwei. Basierend auf der Gleichgewichts-Gleichung 7.5 lässt sich mittels Austausch von c(D) durch den Term $(c_0\text{-}c(E))/2$ eine quadratische Gleichung mit zwei Lösungen $x_{1,2}$ für c(E) herleiten, von denen eine Lösung negativ und damit physikalisch auszuschließen ist (siehe Gleichungsschema unten).

Für das Gleichgewicht 2 Einzelstrang (E) ⇄ Duplex (D) gilt:

$$K = \frac{c(D)}{c(E)^2} \qquad \text{mit } c(D) = \frac{c_0 - c(E)}{2} \text{ folgt}$$

$$K = \frac{c_0 - c(E)}{2 \cdot c(E)^2}$$

$$\Leftrightarrow\ 2 \cdot K \cdot c(E)^2 + c(E) - c_0 = 0 \quad \big| : 2 \cdot K$$

$$\Leftrightarrow\ c(E)^2 + \underbrace{\frac{1}{2 \cdot K}}_{p} \cdot c(E) - \underbrace{\frac{c_0}{2 \cdot K}}_{q} = 0$$

Die quadratische Gleichung $x^2 + p \cdot x + q$ besitzt zwei Lösungen der Form:

$$x_{1,2} = -\frac{p}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{p}{2}\right)^2 - q}$$

Daraus folgt:

$$c(E)_{1,2} = -\frac{1}{4 \cdot K} \pm \sqrt{\left(\frac{1}{4 \cdot K}\right)^2 + \frac{c_0}{2 \cdot K}}$$

Gleichung 7.7

Mit Hilfe der Gleichung 7.7 lassen sich für eine gegebene Ausgangskonzentration c_0 und die über Gleichung 7.6 bestimmte Gleichgewichtskonstante K die Konzentrationen von Einzelstrang und Duplex sowie ihr Verhältnis zueinander berechnen. Tab. 7.6 zeigt die K-Werte (der Übersichtlichkeit wegen grau hinterlegt) sowie den prozentualen Anteil der Moleküle in Einzelsträngen (% E) bzw. in Duplexen (% D) an der Gesamtkonzentration c_0 für die bereits in Tab. 7.5 aufgeführten Sequenzen bei den verwendeten Reaktionstemperaturen 2, 15 und 30 °C. Die Stabilitätsunterschiede der Duplexe verschiedener Sequenzen schlagen sich hier im Duplex/Einzelstrangverhältnis nieder. Die Prozentwerte wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet, so dass bei extremer Gleichgewichtslage in der Tabelle Verhältnisse von 100 % zu 0 % auftauchen, obwohl noch sehr geringe Mengen am scheinbar nicht mehr existenten Gleichgewichstpartner vorhanden sind. Die Salzkorrektur für eine NaCl-Konzentration von 0.05 M wurde im $\Delta S°$-Wert der Gleichung 7.6 zur Berechnung der

Gleichgewichtskonstante K berücksichtigt. Die erhaltenen Werte des Einzelstrang-Duplex Gleichgewichts können lediglich als Schätzung der prinzipiellen Komplexbildungsneigung zum Vergleich der verschiedenen Dimer-Systeme untereinander verwendet werden, da unter realen Bedingungen eine Vielzahl möglicher Komplexe gebildet werden kann. Durch die mannigfaltigen Variationsmöglichkeiten ist eine exakte Aussage über die Population der Komplexe und damit über den jeweiligen Anteil am Reaktionsgeschehen kaum möglich.

Sequenz	c_0 [mM]	K 2°C	% E an c_0	% D an c_0	K 15°C	% E an c_0	% D an c_0	K 30°C	% E an c_0	% D an c_0
TA	1	0.026	99.99	0.01	0.021	100	0	0.017	100	0
CG	1	2.016	99.60	0.40	0.854	99.83	0.17	0.348	99.93	0.07
TG/AC	1	0.486	99.90	0.10	0.294	99.94	0.06	0.173	99.97	0.03
TA	50	0.026	99.74	0.26	0.021	99.79	0.21	0.017	99.83	0.17
CG	50	2.016	85.33	14.67	0.854	92.66	7.34	0.348	96.74	3.26
TG/AC	50	0.486	95.56	4.44	0.294	97.22	2.78	0.173	98.32	1.68
$(TA)_2$	1	1.81	99.64	0.36	0.444	99.91	0.09	0.102	99.98	0.02
$(CG)_2$	1	$5.61\cdot10^{4}$	9.00	91.00	4421	28.45	71.55	309	69.87	30.13
$(TG)_2/(AC)_2$	1	591	58.94	41.06	88.6	86.69	13.31	12.1	97.68	2.32
$(TA)_2$	5	1.81	98.26	1.74	0.444	99.56	0.44	0.102	99.90	0.10
$(CG)_2$	5	$5.61\cdot10^{4}$	4.13	95.87	4421	13.95	86.05	309	42.98	57.02
$(TG)_2/(AC)_2$	5	591	33.53	66.47	88.6	63.87	36.13	12.1	90.14	9.86
$(TA)_3$	1	126	82.77	17.23	9.42	98.18	1.82	0.624	99.88	0.12
$(CG)_3$	1	$1.56\cdot10^{9}$	0.06	99.94	$2.29\cdot10^{7}$	0.47	99.53	$2.74\cdot10^{5}$	4.18	95.82
$(TG)_3/(AC)_3$	1	$7.19\cdot10^{5}$	2.60	97.40	$2.67\cdot10^{4}$	12.77	87.23	850	52.73	47.27
$(TA)_4$	1	8748	21.22	78.78	200	76.57	23.43	3.82	99.25	0.75
$(CG)_4$	1	$4.36\cdot10^{13}$	0	100	$1.18\cdot10^{11}$	0.01	99.99	$2.43\cdot10^{8}$	0.14	99.86
$(TG)_4/(AC)_4$	1	$8.76\cdot10^{8}$	0.08	99.92	$8.07\cdot10^{6}$	0.78	99.22	$5.96\cdot10^{4}$	8.75	91.25
$(TA)_5$	1	$6.09\cdot10^{5}$	2.82	97.18	4237	28.95	71.05	23.3	95.73	4.27
$(CG)_5$	1	$1.21\cdot10^{18}$	0	100	$6.12\cdot10^{14}$	0	100	$2.16\cdot10^{11}$	0	100
$(TG)_5/(AC)_5$	1	$1.07\cdot10^{12}$	0	100	$2.43\cdot10^{9}$	0.05	99.95	$4.17\cdot10^{6}$	1.09	98.91
$(TA)_{12}$	1	$4.81\cdot10^{18}$	0	100	$8.18\cdot10^{12}$	0	100	$7.41\cdot10^{6}$	0.82	99.18
$(CG)_{12}$	1	$1.58\cdot10^{49}$	0	100	$6.08\cdot10^{40}$	0	100	$9.36\cdot10^{31}$	0	100
$(TG)_{12}/(AC)_{12}$	1	$4.22\cdot10^{33}$	0	100	$5.55\cdot10^{26}$	0	100	$3.45\cdot10^{19}$	0	100
$(TA)_{30}$	1	$7.06\cdot10^{51}$	0	100	$6.16\cdot10^{36}$	0	100	$1.04\cdot10^{21}$	0	100
$(CG)_{30}$	1	$1.61\cdot10^{129}$	0	100	$4.29\cdot10^{107}$	0	100	$1.09\cdot10^{85}$	0	100
$(TG)_{30}/(AC)_{30}$	1	$1.45\cdot10^{89}$	0	100	$2.39\cdot10^{71}$	0	100	$5.69\cdot10^{52}$	0	100

Tab. 7.6: K-Werte und Gleichgewichtslage von DNA-Duplexen unter versch. Konz.- und Temp.-Bedingungen

Beim Studium dieser und der vorhergehenden thermodynamischen Daten wird schnell deutlich, dass das CG-System dem TA-System bezüglich Komplexstabilität bei gleich aufgebauten Komplexen und damit potenziell reaktionskatalysierender Komplexbildung weit überlegen ist. Auch wenn die berechneten Werte unter anderem aufgrund der dynamischen Konzentrationsveränderung nicht exakt mit den realen Reaktionsparametern übereinstimmen werden, so sind doch deutliche Trends erkennbar.

Schon zu Beginn der Reaktion sollten bei einer Ausgangskonzentration um den Faktor 20 bis 50 mehr CG-Dimere in Dimerduplexen gepaart sein (temperaturabhängig), als dies bei TA-Dimeren der Fall ist, wobei der CG-Dimeranteil in Duplexen von 3 bis 15 % bereits Einfluss auf das Reaktionsgeschehen haben sollte. Noch deutlicher wird dieser Sachverhalt bei den CGCG-Tetrameren, die von 30 % bei 30 °C bis zu 90 % bei 2 °C in Duplexen hybridisieren, während TATA-Tetramere auch bei 2 °C nicht über 0.36 % Tetramere im Duplex hinauskommen. Damit sollten reaktionskatalysierende Komplexe, die, wie beispielsweise ein termolekularer Komplex aus zwei 4meren an einem 8mer, CGCG-Tetramere enthalten, die Oligomerisierung theoretisch stark beschleunigen (siehe auch Abb. 7.17, Kap. 7.4).

Der Anteil an einzelsträngiger DNA wird mit fortschreitender Moleküllänge immer geringer und so sollte bereits das Hexamer $(CG)_3$ bei allen Versuchstemperaturen und einer Konzentration von 1 mM fast ausschließlich in komplexierter Form vorliegen. Das TA-System erreicht erst ab dem Octamer signifikante Duplex-Anteile. Der deutliche Reaktivitäts-unterschied bei der Oligomerisierung ist ein Ausdruck dieser Stabilitätsunterschiede zwischen den beiden selbstkomplementären Systemen.

Der Vergleich der Oligomerbildungskurven (Kap. 7.4.1) des TA-Systems mit denen des nicht selbstkomplementären und damit nicht autokatalysefähigen CA-Systems (Kap. 7.3.3) weist darauf hin, dass bei kurzen TA-Oligomeren nur in geringem Maße reaktionskatalysierende Komplexe ausgebildet werden, da die $(TA)_x$-Bildungskurven bis zum Hexamer relativ nahe an denen der $(CA)_x$-Bildungskurven liegen.

Für kürzere TA-Oligomere scheint der spontane Reaktionskanal demnach insbesondere bei höheren Temperaturen ähnlich stark zu sein wie die Oligomerisierung über Komplexe, obwohl in allen Fällen die $(TA)_x$-Bildung gegenüber der $(CA)_x$-Bildung überwiegt. Erst ab dem Octamer zeigt das TA-System seine auf der Fähigkeit zur Komplexbildung basierende

Überlegenheit gegenüber dem CA-System, da $(TA)_4$ und $(TA)_5$ in erheblich stärkerem Maße als die CA-Äquivalente $(CA)_4$ und $(CA)_5$ gebildet werden.

Die Reaktivitätsreihenfolge der CG-, TA- und CA-Systeme konnte demnach anhand thermodynamischer Parameter erklärt werden. Das CG-System reagiert hierbei wahrscheinlich maßgeblich über katalytische Komplexe ab und liegt weit vor dem TA-System, das wiederum schneller als das nicht selbstkomplementäre und damit nicht katalysefähige CA-System reagiert. Aus dieser Systematik fällt jedoch das nicht-selbstkomplementäre TG-System heraus, dessen Reaktivität durchaus mit der des TA-Systems konkurriert bzw. fast gleichauf liegt.

Eine Erklärung dieses Phänomens würde die Annahme von TG-Duplexen liefern, die anstelle von normaler Watson-Crick-Basenpaarung eine durchgehende T/G-"Wobble"-Basenpaarung aufweisen könnten (Abb. 7.34). In Erweiterung der *Watson-Crick* Basenpaarungstheorie erlaubt *Cricks* Wobble-Hypothese (1966) neben C/G- auch U(T)/G-Basenpaare, die vor allem in der dritten Base des Codons bei tRNA und mRNA gefunden werden. Diese Base wird aufgrund ihrer Redundanz und geringen Spezifität auch Wobble-Base genannt. Aufgrund der ungünstigen Abweichung der TG-Doppelhelix von der normalen B-DNA-Form ist die T/G-Wobble-Basenpaarung gegenüber der Watson-Crick-Basenpaarung zwar energetisch benachteiligt, aber durchaus denkbar, da es sich bei reinen TG-Oligomeren um die einzig mögliche Form der Basenpaarung handelt.

Das Phänomen der T/G-Wobble-Basenpaarung wurde unter anderem in d(G-T)-Polymeren[144], in Duplexen aus $d(G_5T_5)$[145] oder in Duplexen von d(CGCGTG)[146] beobachtet, die in der Lage waren stabile Doppelhelices auszubilden. Ein TG/GT-Duplex würde wie der TA/AT-Duplex über vier Wasserstoffbrückenbindungen verfügen. Obgleich keine Aussage über die genaue Geometrie möglicher reaktionskatalysierender TG-Komplexe und somit über die Stabilisierung per Basenstapelung gemacht werden kann, könnte die Stabilität der TG-Komplexe in die Nähe der TA-Komplexe rücken. Die beobachtete, sehr ähnliche Reaktivität der beiden Dimer-Systeme unterstützt diese Theorie.

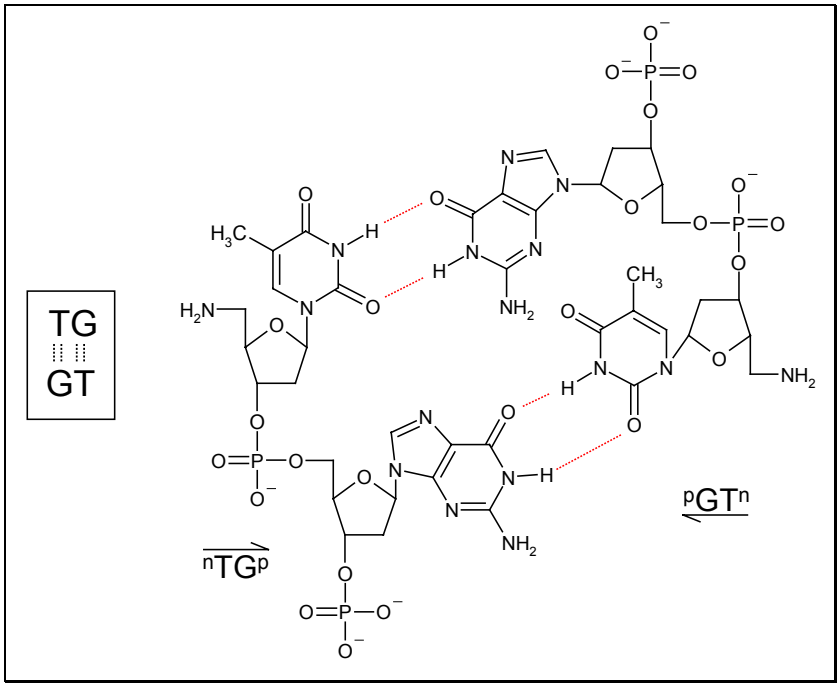


Abb. 7.34: T/G-"Wobble"-Basenpaarung im TG-Duplex

7.8 Selektion des CG-Systems für weitere Untersuchungen

Die Erhöhung der Dimer-Eduktkonzentration auf 50 mM brachte den gewünschten Durchbruch bei der Forcierung der Oligomerisierung gegenüber der Cyclisierung. Alle vier Dimere reagierten primär zu ihren entsprechenden Oligomeren ab, während die monomolekulare Cyclisierung in den Hintergrund gedrängt werden konnte.

Die mit Abstand geringste Cyclisierungsneigung bei ausgezeichneten Oligomerisierungsgeschwindigkeiten zeigte das selbstkomplementäre CG-System bei niedrigen Temperaturen, so dass die Wahl für die detailliertere Analyse eines der vier Dimere auf dieses System fiel. Hinzu kommen mehrere Hinweise, dass frühe Gene überwiegend aus Cytosin- und Guanin-reichen Nucleinsäuren bestanden haben könnten, die dem CG-System besonderes Gewicht verleihen[147].

8. Detailuntersuchung des CG-Systems

Die Konzentration auf das am besten handhabbare und am effektivsten oligomerisierende CG-System erlaubte eine genauere Untersuchung der Eigenschaften eines offenen Systems. Da aufgrund der vorhergegangenen Analysen ein katalytischer Reaktionskanal bei der Oligomerisierung zu erwarten war, sollte im folgenden die Natur der katalytisch wirkenden Komplexe Gegenstand weiterer kinetischer Experimente werden.

Um die geplanten Kinetikversuche des offenen Systems hinsichtlich des Substanzverbrauchs, des Verhältnisses von Edukt zu EDC sowie der Trennleistung des chromatografischen Systems zu optimieren, wurden nach diversen Tests Veränderungen an den bisherigen Reaktionsbedingungen vorgenommen.

Versuche mit geringeren Konzentrationen an $^{n}CG^{p}$ als 50 mM zeigten, dass bei 2 °C Reaktionstemperatur die Cyclisierung auch bei $^{n}CG^{p}$-Konzentrationen von 20 mM vernachlässigbar bleibt, so dass die Konzentration der $^{n}CG^{p}$-Eduktmoleküle einheitlich auf 20 mM festgelegt wurde. Außerdem wurde die EDC-Konzentration auf 0.4 M verdoppelt und somit das Verhältnis von EDC zu Edukt im Ganzen von 4:1 (0.2 M EDC : 50 mM Dimer) auf 20:1 (0.4 M EDC : 20 mM Dimer) erhöht. Damit wird zum einen der Bremseffekt durch die während der Reaktion sinkende Menge an aktivierendem EDC geringer. Zum anderen wird der allgemein geringeren Reaktionsgeschwindigkeit entgegengewirkt, die durch die auf 20 mM erniedrigte $^{n}CG^{p}$-Konzentration bedingt ist. Eine größere Steigerung der EDC-Konzentration führt zu einer Zunahme an unerwünschten Nebenreaktionen, unter anderem auch der Cyclisierung.

Der problematischen Aggregatbildung der selbstkomplementären höheren Oligomere wurde durch den Einsatz von Anionenaustauscher-Materialen für die Chromatografie unter stark denaturierenden Bedingungen begegnet ($NaClO_4$-Puffer bei pH 12.0, siehe Exp.-Teil, Kap. 1.2.4.3), nachdem eine Vielzahl von Reaktionsbedingungen (z.B. Säulentemperierung[148], Zugabe von Formamid zur Duplexunterdrückung[149], pH-Werterhöhung[150], Verwendung chaotroper Elutionssysteme) auf verschiedenen Reversed-Phase-Säulen unbefriedigende Ergebnisse geliefert hatten. Hierbei bewährten sich insbesondere IE-Säulen mit dem Resource Q[151] bzw. Mono/Mini Q[152] Anionenaustauschermaterial von *Pharmacia*, deren exzellentes Trennungsverhalten nach Länge der Oligonucleotide das Trennproblem entschärfte. Im Verbund mit dem chaotropen Elutionssystem $HClO_4/NaClO_4$, das aufgrund

der Polaritätserniedrigung des Wassers komplexbrechende Effekte auf hydrophobe Aggregate hat und neben dem hohen pH-Wert zur Denaturierung der CG-Komplexe auf der Säule führt, ließen sich auch die längeren Oligomerisierungsprodukte voneinander trennen. Der HPLC-Stackplot einer Oligomerisierungskinetik auf einer Resource Q in Abb. 8.1 demonstriert das Auflösungsvermögen der IE-Säulen und das Oligomerisierungspotenzial des CG-Systems bis zum sichtbaren 26mer innerhalb von 4h unter den modifizierten Bedingungen.

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}CG^{p}$	**c(Edukt)**	20 mM
c(EDC)	0.4 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2 °C	**HPLC-Säulentyp**	Resource Q IE
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	100 µl
Kapillarvolumen	0.2 µl	**Elutionssystem**	$HClO_4/NaClO_4$

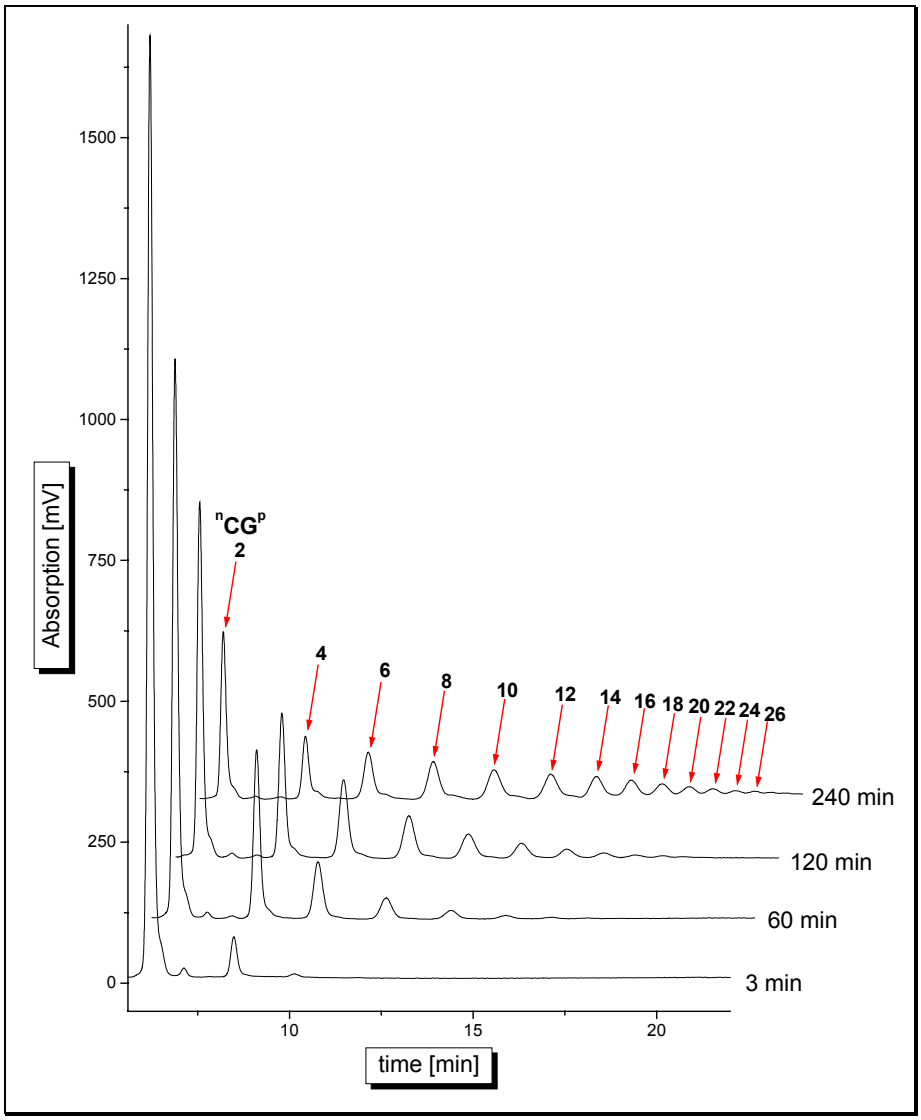


Abb. 8.1: HPLC-Stackplot der Oligomerisierung von 20 mM $^{n}CG^{p}$, 0.4M EDC, 2 °C, IE-Material: Resource Q

Die Ionenaustauschersäulen basieren auf nicht-porösen Matrices, die aus monodispersen hydrophilen polymer-basierten 3 µm Kügelchen bestehen, welche wiederum mit quaternären Ammoniumgruppen ($-CH_2N^+(CH_3)_3$) als Anionenaustauscher derivatisiert sind. Dabei bietet die Mini Q Säule mit 3 µm Partikelgröße eine noch höhere Auflösung bei eingeschränktem Beladungsvermögen gegenüber der Mono Q Säule mit 10 µm Partikelgröße und wird im folgenden für die analytische Ionenaustauscher-Chromatografie eingesetzt.

8.1 Untersuchungen mit einseitig geschützten Bausteinen auf Basis des CG-Systems

Von den bislang in Kap. 7.4 erörterten katalytisch wirksamen Komplexen sollten nach den bisherigen Erkenntnissen unter thermodynamischen Aspekten termolekulare Komplexe nach Abb. 7.17 am stabilsten bzw. stärksten populiert und damit auch am kinetisch einflussreichsten sein. Weil man in der Gesamtoligomerisationsreaktion die einzelnen Reaktionskanäle nicht separat betrachten konnte, bot sich eine Untersuchung der Einzelreaktionen an, über die ein einziges Produkt entstehen kann, wobei als wichtigste Produkte 4mer, 6mer und 8mer in Frage kamen. Hier wäre durch Analyse der experimentellen Daten eine Trennung des spontanen vom autokatalytischen Reaktionskanal möglich, deren Geschwindigkeitskonstanten später in eine mögliche Gesamtanalyse des kompletten Systems eingehen könnten.

Zu diesem Zweck musste die weiter führende Oligomerisierung durch den Einsatz einseitig geschützter Bausteine ausgeschlossen werden. Partiell waren die dafür notwendigen Moleküle bereits vorhanden, andere wurden neu synthetisiert. Für die Kinetiken der Einzelreaktionen wurden die in Tab. 8.1 aufgeführten Systeme verwendet, die im einzelnen vorgestellt werden.

Oligo 1	Oligo 2	Templat	Temp.	c(EDC)	Puffer
20mM $^{N_3}CG^{p}$	20mM $^{n}CG^{pte}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES
20mM $^{HO}(CG)_2{}^{p}$	20mM $^{n}CG^{pte}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES
20mM $^{HO}(CG)_3{}^{p}$	20mM $^{n}CG^{pte}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES

Tab. 8.1: Einzelreaktions-Systeme für 4mer, 6mer und 8mer-Bildung

8.1.1 Einzelreaktion: Bildung des Tetramers

Ein Tetramer $(CG)_2$ kann prinzipiell als Produkt der Kondensation zweier CG-Dimere unter Ausbildung eines termolekularen Komplexes an einem $(CG)_2$ Tetramer-Templat generiert werden. Für die Untersuchung des autokatalytischen Potenzials dieses Reaktionstyps wurden die 5'- bzw. 3'-geschützten CG-Dimerbausteine, sowie ein unreaktives $(CG)_2$-Templat benötigt.

Als Vorstufe aus der Synthese des beidseitig entschützten $^{n}CG^{p}$-Dimers standen zum einen das 5'-geschützte $^{N_3}CG^{p}$ und zum anderen das 3'-geschützte $^{n}CG^{pte}$ zur Verfügung (siehe Kap. 4.4). Das $^{HO}CGCG^{OH}$-Templat wurde hingegen per DNA-Synthesizer in ausreichender Menge hergestellt und aufgereinigt (siehe Kap. 4.1.6).

Der Reaktionsweg über den termolekularen Komplex sieht nach der Aktivierung des 3'-Phosphatrests des $^{N_3}CG^{p}$ durch EDC die reversible Anlagerung des aktivierten $^{N_3}CG^{p}$ und des $^{n}CG^{pte}$ am Templat vor (Abb. 8.2). Bei ausreichender Population der katalytisch wirksamen termolekularen Komplexe würde die räumliche Nähe der reaktiven Enden eine sichtbare Steigerung der Kondensationsrate im Vergleich zur rein spontanen Tetramerbildung bewirken. Nach Ausbildung der Phosphoamidatbindung und Dissoziation des Produktduplexes sollte das entstandene $^{N_3}CG^{pn}CG^{pte}$-Tetramer in der Lage sein seinerseits im Sinne eines autokatalytischen Reaktionszyklus als Templat für die eigene Synthese zu dienen.

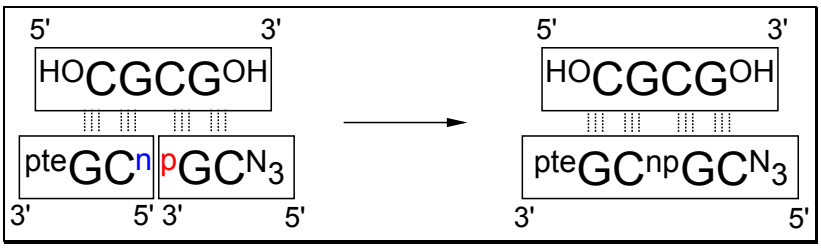


Abb. 8.2: Tetramerbildung aus $^{N_3}CG^{p}$ und $^{n}CG^{pte}$ im termolekularen Komplex an $^{HO}CGCG^{OH}$-Templat; rotes p: aktiviertes Phosphat

Für die kinetische Untersuchung der Einzelreaktionen wurden die in der Einleitung zu Kap. 8 modifizierten Reaktionsbedingungen verwendet. Die Chromatografie wurde dagegen noch auf einer Reversed-Phase-Säule durchgeführt, da sich die beiden dimeren Eduktbausteine auf einer vorwiegend nach Länge trennenden Ionenaustauscher-Säule nicht vollständig voneinander separieren ließen und der Einsatz der IE-Chromatografie bei den kurzen

CG-Bausteinen noch nicht notwendig war. Als Templatkonzentrationen wurden 0, 2, 4 und 8 mM entsprechend einer Zugabe von 0, 10, 20 und 40% $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$ gewählt, so dass ein möglicher Templateffekt deutlich sichtbar sein sollte.

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt 1	$^{N_8}CG^{p}$	**C(Edukt 1)**	20 mM
Edukt 2	$^{n}CG^{pte}$	**C(Edukt 2)**	20 mM
Templat	$^{HO}(CG)_2{}^{OH}$	**c(Templat)**	0 / 2 / 4 / 8 mM
c(EDC)	0.4 M	**C(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2 °C	**HPLC-Säulentyp**	C18-RP
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	0.2 µl	**Elutionssystem**	TEAA/AcN

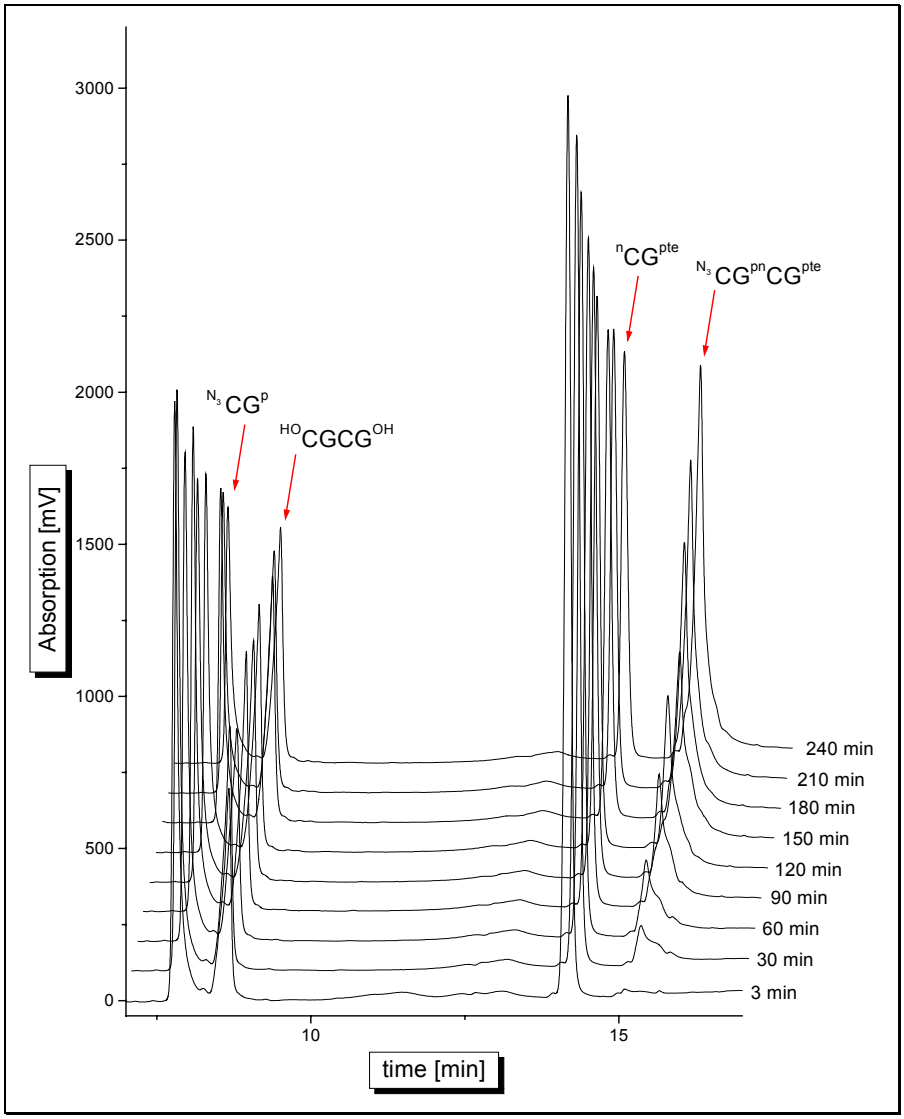


Abb. 8.3: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{N_3}CG^{p}$ + $^{n}CG^{pte}$, je 20 mM, an $^{HO}CGCG^{OH}$ 4 mM, 0.4M EDC, 2 °C

Der Beispiel-Stackplot für die Kinetik mit 20% Templat zeigt gutes Trennungsverhalten und die alleinige Bildung des gewünschten Produktes.

Die Auftragung der Konzentrations-Zeit-Kurven der Kinetik bei den verschiedenen Templatkonzentrationen offenbart ein ungewöhnliches Verhalten des Systems.

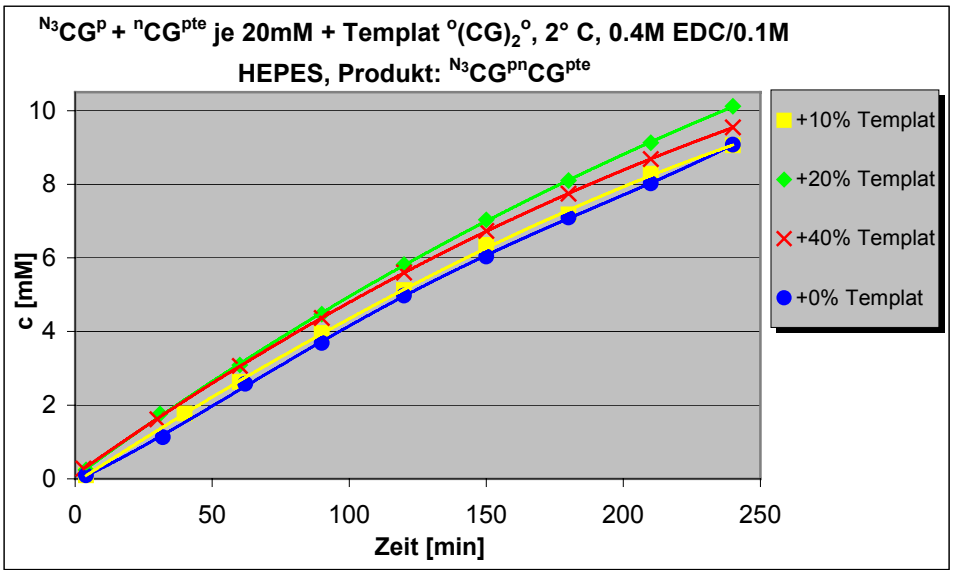


Abb. 8.4: Konzentrations-Zeit-Kurven der Kinetik 2mer + 2mer am 4mer

Ein Templateffekt ist, wenn überhaupt vorhanden, nur sehr schwach ausgeprägt und korreliert nicht mit der Menge des zugegebenen Templates. Es scheint fast so, als würde die Reaktion bei Zugabe von 40% gegenüber 20% Templat wieder abgebremst werden. Eine Diskussion der beobachteten Effekte erfolgt nach Vorstellung aller Einzelreaktionssysteme.

8.1.2 Einzelreaktion: Bildung des Hexamers

Ein Hexamer $(CG)_3$ geht bei den in dieser Arbeit verwendeten Bausteinen aus der Kondensationsreaktion eines Tetramers mit einem Dimer hervor. Für die Untersuchung des katalytischen Einflusses eines möglichen termolekularen Komplexes sollte die Orientierung der Bausteine (2mer+4mer oder 4mer+2mer) am Templat unerheblich sein. Demzufolge wurde für das benötigte Dimer wieder $^{n}CG^{pte}$ verwendet, während sowohl das Hexamer-Templat $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$ (siehe Kap. 4.1.6) als auch der Tetramerbaustein $^{HO}CGCG^{p}$ (siehe Kap. 4.2) per DNA-Synthesizer hergestellt und anschließend aufgereinigt wurde. Für die Generierung des 5'-Phosphatbausteins wurde eine modifizierte Festphase eingesetzt (Kap. 4.2). Das hexamere Produkt der Ligation $^{HO}CGCG^{pn}CG^{pte}$ könnte im autokatalytischen Sinne als Templat dienen (Abb. 8.5).

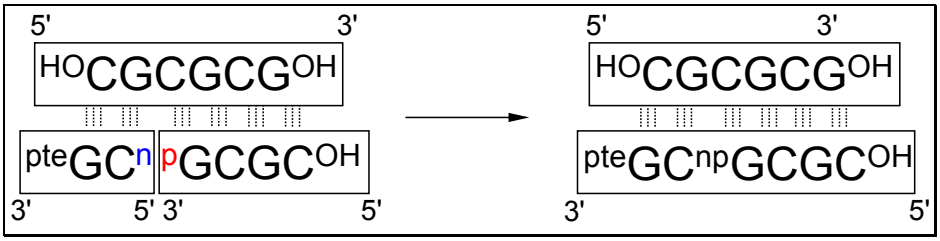


Abb. 8.5: Hexamerbildung aus ^{HO}CGCG^{p} und ^{n}CG^{pte} im termolekularen Komplex an $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$-Templat; rotes p: aktiviertes Phosphat

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt 1	^{HO}CGCG^{p}	**c(Edukt 1)**	20 mM
Edukt 2	^{n}CG^{pte}	**c(Edukt 2)**	20 mM
Templat	$^{HO}(CG)_3{}^{OH}$	**c(Templat)**	0 / 2 / 4 / 8 mM
c(EDC)	0.4 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2 °C	**HPLC-Säulentyp**	Mini Q IE
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	0.2 µl	**Elutionssystem**	$HClO_4$/$NaClO_4$

Die Reaktionsbedingungen entsprechen denen der Tetramer-Einzelreaktion, wobei die Chromatografie auf einer Mini Q Ionenaustauschersäule durchgeführt wurde. Wie der Beispiel-Stackplot für die Kinetik mit 10% Templat in Abb. 8.6 zeigt, wird ausschließlich das gewünschte Hexamerprodukt gebildet.

Das Ionenaustauschermaterial neigt mitunter zur Nachpeakbildung, die aber auf die Chromatografie selbst zurückzuführen ist und nicht auf Verunreinigungen oder Nebenreaktionen beruht, wie das gleichmäßige Auftreten von Nachpeaks bei allen vorhandenen Peaks zeigt. Desweiteren treten derlei Effekte ebenso bei IE-Chromatografie von Einzelsubstanzen auf und da auch keinerlei Verunreinigungen in der RP-Chromatografie von ^{n}CG^{pte} in Abb. 8.3 sichtbar wird, ist von Chromatografie-Artefakten auszugehen.

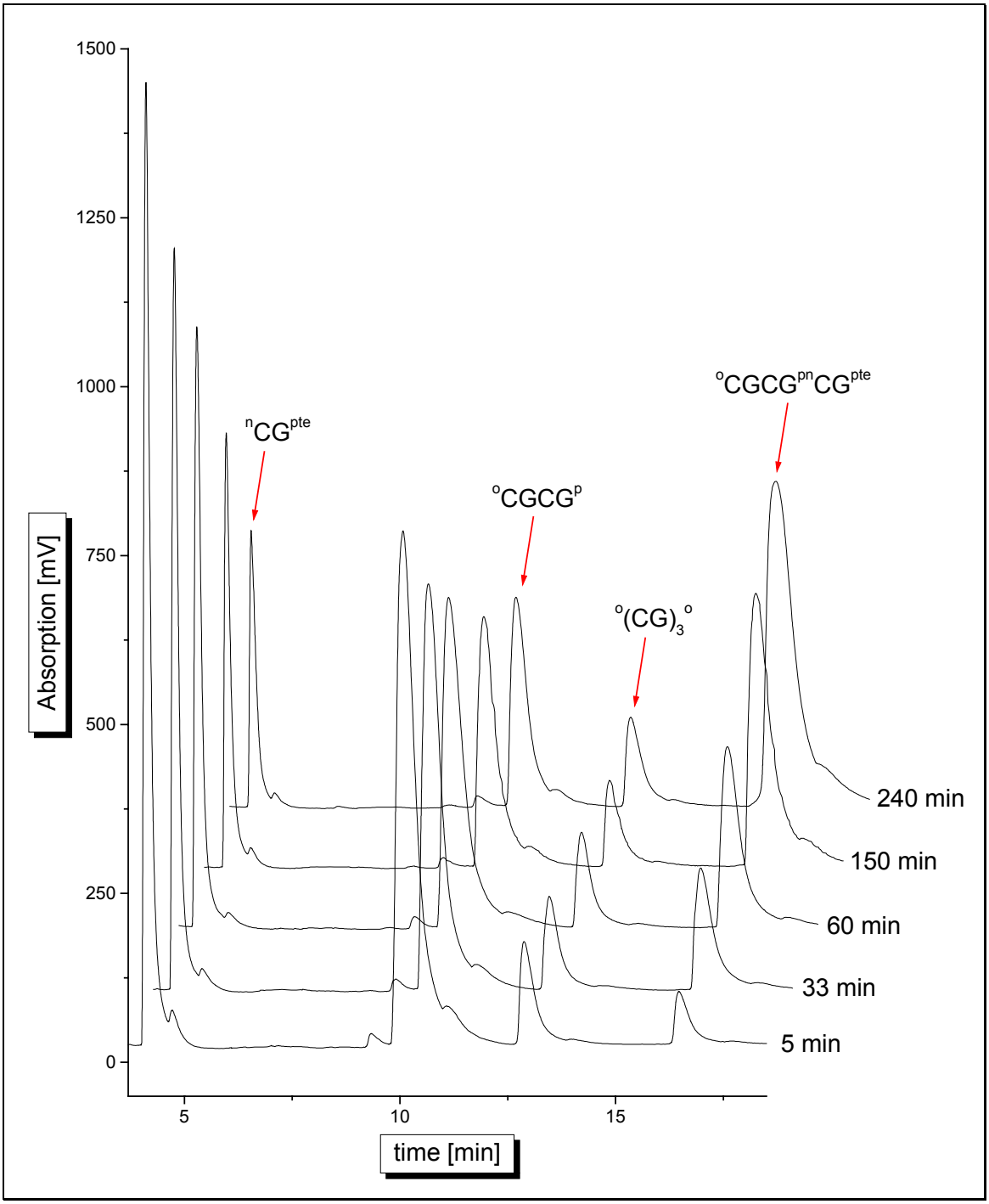


Abb. 8.6: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{HO}CGCG^{p}$ + $^{n}CG^{pte}$, je 20 mM, an $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$ 2 mM, 0.4M EDC, 2 °C

Die Auftragung der Konzentrations-Zeit-Kurven deutet auf ein vollständiges Ausbleiben eines positiven Templateffektes hin. Im Gegenteil scheint die Zugabe von Templat die Ligation sogar geringfügig zu bremsen.

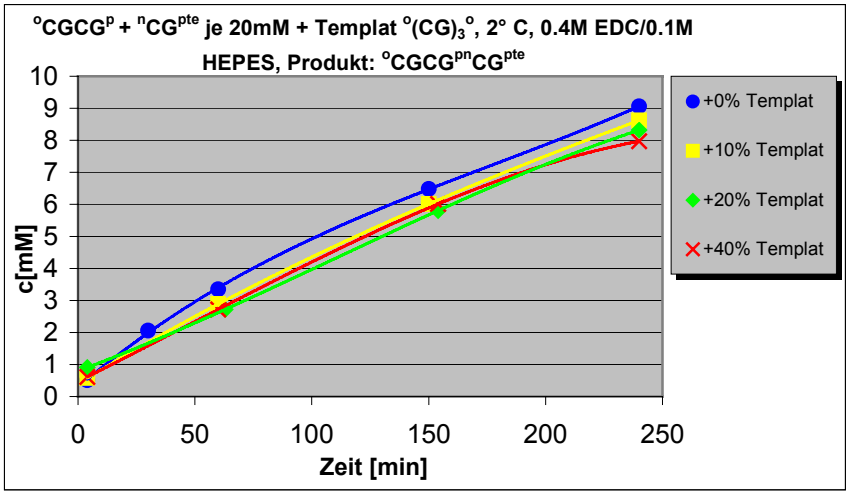


Abb. 8.7: Konzentrations-Zeit-Kurven der Kinetik 4mer + 2mer am 6mer

8.1.3 Einzelreaktion: Bildung des Octamers

Ein Octamer $(CG)_4$ kann zum einen aus der Ligation zweier Tetramere und zum anderen aus der Kondensation eines Dimers mit einem Hexamer gebildet werden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den vorhergehenden Experimenten wurde die Generierung des Octamers aus Dimer und Hexamer am Octamertemplat untersucht. Als Dimer kam wieder $^{n}CG^{pte}$ zum Einsatz, das Hexamer $^{HO}(CG)_3{}^{p}$ (siehe Kap. 4.2) und der Templatbaustein $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$ (siehe Kap. 4.1.6) wurden am DNA-Synthesizer hergestellt und aufgereinigt. Das aus der Kondensation hervorgehende Octamer $^{HO}(CG)_3{}^{pn}CG^{pte}$ (Abb. 8.8) wäre theoretisch in der Lage als Templat weiterer autokatalytischer Reaktionszyklen zu dienen.

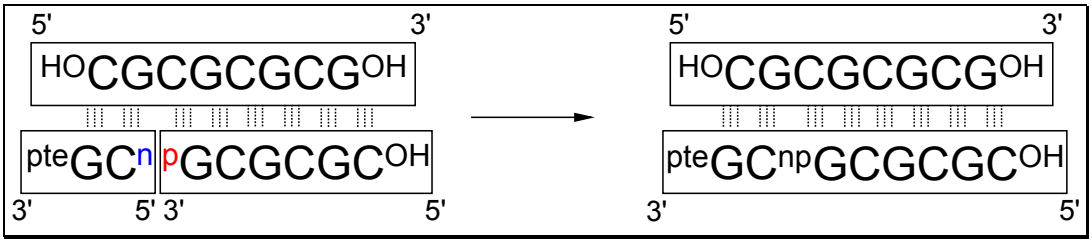


Abb. 8.8: Octamerbildung aus $^{HO}CGCGCG^{p}$ und $^{n}CG^{pte}$ im termolekularen Komplex an $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$-Templat; rotes p: aktiviertes Phosphat

Die Reaktionsbedingungen entsprechen denen der vorhergehenden Untersuchungen, die Chromatografie wurde auf einer Mini Q Ionenaustauschersäule durchgeführt. Der Beispiel-Stackplot für die Kinetik mit 10% Templat in Abb. 8.9 zeigt die erwartete alleinige Bildung des octameren Produkts. Das Ausbleiben der Nachpeakbildung bestätigt die Annahme von Chromatografie-Artefakten in Kap.8.1.2. Die Peakhöhe kann natürlich bei gleicher Fläche durch Verbreiterung oder Verschmälerung der Peaks variieren.

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt 1	$^{HO}(CG)_3{}^{p}$	**c(Edukt 1)**	20 mM
Edukt 2	$^{n}CG^{pte}$	**c(Edukt 2)**	20 mM
Templat	$^{HO}(CG)_4{}^{OH}$	**c(Templat)**	0 / 2 / 4 / 8 mM
c(EDC)	0.4 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2 °C	**HPLC-Säulentyp**	Mini Q IE
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	0.2 µl	**Elutionssystem**	$HClO_4/NaClO_4$

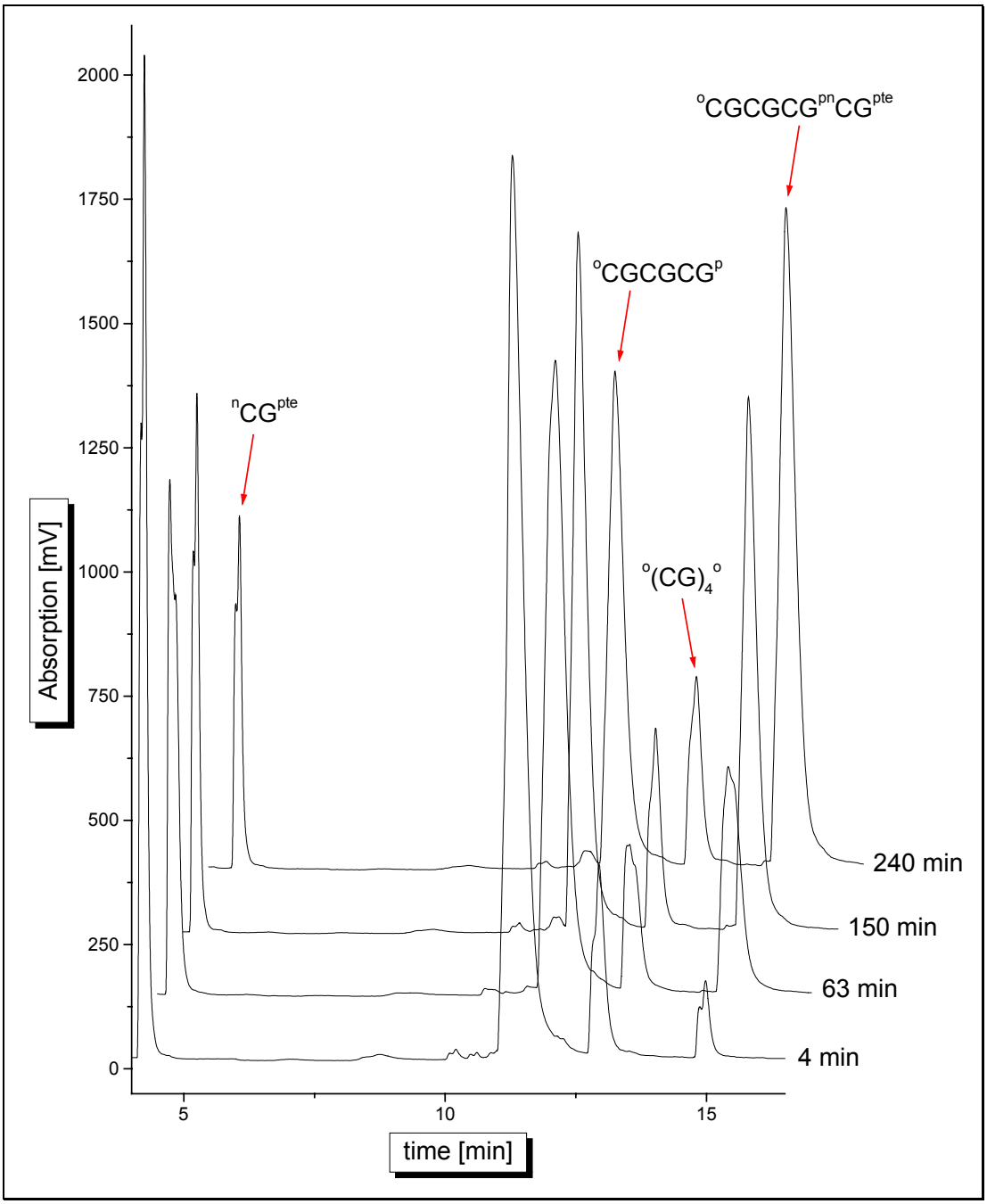


Abb. 8.9: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{HO}(CG)_3{}^{p}$ + $^{n}CG^{pte}$, je 20 mM, an $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$ 2 mM, 0.4M EDC, 2 °C

Ähnlich den vorhergehenden Reaktionen ist bei Betrachtung der Konzentrations-Zeit-Kurven in Abb. 8.10 ebenfalls kein positiver Templateffekt zu sehen, sondern eher ein leicht negativer, obwohl prinzipiell ein autokatalytischer Effekt durch Bildung termolekularer Komplexe möglich wäre.

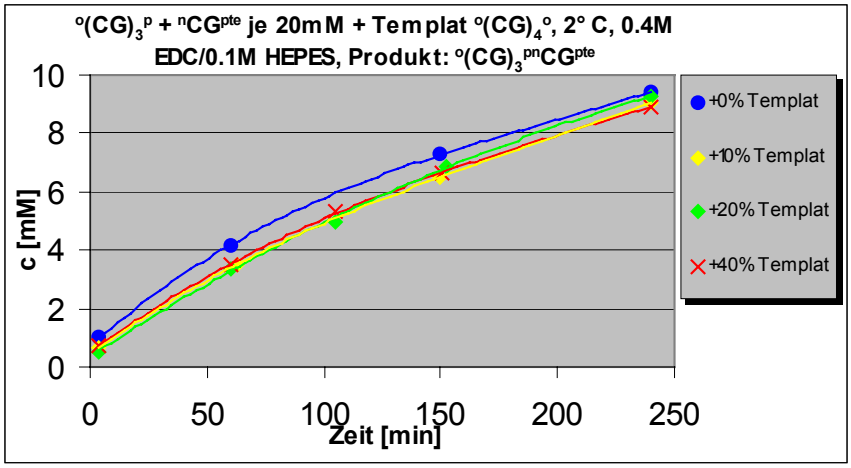


Abb. 8.10: Konzentrations-Zeit-Kurven der Kinetik 6mer + 2mer am 8mer

8.2 Diskussion der Einzelreaktionskinetiken

In Anbetracht der postulierten Existenz katalytisch wirksamer Komplexe zur Erklärung der hohen Oligomerisationsgeschwindigkeit des offenen CG-Systems, lassen die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Einzelreaktionen mit einseitig geschlossenen Bausteinen zwei verschiedenen Interpretationsmöglichkeiten zu:

1) Die termolekularen Komplexe sind unter den Reaktionsbedingungen nicht ausreichend populiert, um einen spürbaren katalytischen Effekt zu erzielen.

2) Eine Katalyse des offenen CG-Systems läuft nicht über termolekulare, sondern über anders geartete Komplexe ab.

Erstere Aussage lässt sich durch eine thermodynamisch-kinetische Abschätzung überprüfen.

8.2.1 Thermodynamische Betrachtung der termolekularen Komplexe

Mit Hilfe der thermodynamischen Parameter des NN-Modells aus Kap. 7.7 und der 'Minimal Replicator Theory' nach *von Kiedrowski*[133], kann man den Anteil der termolekularen Komplexe im Gesamtgleichgewicht abschätzen. Hierzu betrachtet man die folgenden Gleichgewichte, wobei A und B die beiden einseitig geschützten Bausteine darstellen, C das Templat, ABC den termolekularen Komplex und C_2 den Templatduplex. Das Bildungsgleichgewicht für den termolekularen Komplex ABC fasst hierbei die konsekutive Anlagerung der Bausteine am Templat in einem Schritt zusammen. Eckig geklammerte Ausdrücke entsprechen den Gleichgewichtskonzentrationen:

$$\mathbf{A + B + C \rightleftarrows ABC} \qquad K_1 = \frac{[ABC]}{[A][B][C]}$$

$$\mathbf{2\,C \rightleftarrows C_2} \qquad K_2 = \frac{[C_2]}{[C]^2}$$

Nimmt man an, dass der relative Anteil der Gleichgewichtskonzentration des termolekularen Komplexes ABC an den Gesamtkonzentrationen von Baustein A und B gering ist (gültig bei niedriger Templatkonzentration c im Vergleich zu den Gesamtkonzentrationen a und b), dann lassen sich die Gesamtkonzentrationen aller drei beteiligten Spezies folgendermaßen ausdrücken:

$$\mathbf{a = [A] + [ABC] \approx [A]}$$
$$\mathbf{b = [B] + [ABC] \approx [B]}$$
$$\mathbf{c = [C] + [ABC] + 2[C_2]} \qquad \text{Gleichung 8.1}$$

Vereinfachend wird außerdem angenommen, dass die Bausteine A und B nicht miteinander interagieren und keine Duplexe ausbilden. Die Gleichgewichtskonzentrationen der beteiligten Moleküle lassen sich dann über die folgenden Gleichungen ausdrücken:

$$[C] = \frac{[ABC]}{K_1[A][B]} \approx [ABC]q \qquad \textbf{mit } q = \frac{1}{K_1 ab} \qquad \text{Gleichung 8.2}$$

$$[C_2] = K_2[C]^2 \approx K_2[ABC]^2 q^2 \qquad \text{Gleichung 8.3}$$

Einsetzen von Gleichung 8.2 und Gleichung 8.3 in Gleichung 8.1 führt ähnlich wie in Kap. 7.7 zu einer quadratischen Gleichung 8.4, deren physikalisch sinnvolle Lösung die Gleichung 8.5 liefert:

$$[ABC]^2 + \frac{1+q}{2K_2 q^2} \cdot [ABC] - \frac{c}{2K_2 q^2} = 0 \qquad \text{Gleichung 8.4}$$

$$[ABC] = \frac{\sqrt{8K_2 q^2 c + (1+q)^2} - q - 1}{4K_2 q^2} \qquad \text{Gleichung 8.5}$$

Die Geschwindigkeit der autokatalytischen Templatsynthese wird bestimmt durch:

$$\frac{dc}{dt} = k[ABC] \qquad \text{mit k = Geschwindigkeitskonstante der Ligation}$$

Dem zufolge ist die Population der termolekularen Komplexe ABC ausschlaggebend für die Stärke des autokatalytischen Effekts. Die für die Berechnung der Gleichgewichtskonzentrationen an ABC und C_2 fehlenden Parameter K_1 und K_2 lassen sich aus den thermodynamischen Daten des NN-Modells aus Kap. 7.7 ermitteln.

$$\boxed{K = \exp\left(-\frac{\Delta G^\circ_T}{R \cdot T}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta H^\circ}{R \cdot T} + \frac{\Delta S^\circ}{R}\right)}$$

Im Gegensatz zur einfachen Helix-Initiation bei der Duplexbildung sind für einen termolekularen Komplex ABC aufgrund der Anlagerung zweier Bausteine am Templat auch zwei Helix-Initiationsschritte bei der Berechnung von ΔG°, ΔH° und ΔS° neben der obligatorischen Salzkorrektur zu berücksichtigen. Hierbei wird angenommen, dass der termol. Komplex ABC und der Duplex C_2 ähnliche Konformationen einnehmen. Anhand der so berechneten Daten lassen sich für die drei untersuchten Systeme Voraussagen bezüglich des Anteils der termolekularen Komplexe am Gesamtgleichgewicht unter den Versuchsbedingungen mit variierenden Templatzuschüssen anstellen, die in Tab. 8.2 zusammengefasst sind. Die Gesamtkonzentrationen von a und b liegen bei jeweils 20 mM, die Temperatur

beträgt 2 °C, die Salzkonzentration c(NaCl) = 0.05 M. Der besonders interessante Anteil an Templat in termolekularen Komplexen ABC als Maßstab für die Autokatalysetendenz eines Systems ist grau hinterlegt.

	2mer + 2mer an 4mer Templat	2mer + 4mer an 6mer Templat	2mer + 6mer an 8mer Templat
K_1	$2.33 \cdot 10^{3}$	$6.48 \cdot 10^{7}$	$1.80 \cdot 10^{12}$
K_2	$5.61 \cdot 10^{4}$	$1.56 \cdot 10^{9}$	$4.36 \cdot 10^{13}$
Für c = 2 mM Templat			
[C] in [mM]	0.12	$7.65 \cdot 10^{-8}$	$2.77 \cdot 10^{-12}$
[C_2] in [mM]	0.88	$9.15 \cdot 10^{-6}$	$3.34 \cdot 10^{-10}$
[ABC] in [mM]	0.12	1.98	2.00
% von c in ABC	5.8	99.1	100
% von c in C_2	87.9	0.9	0
% von A bzw. B in ABC	0.6	9.9	10
Für c = 4 mM Templat			
[C] in [mM]	0.18	$1.52 \cdot 10^{-7}$	$5.54 \cdot 10^{-12}$
[C_2] in [mM]	1.83	$3.59 \cdot 10^{-5}$	$1.34 \cdot 10^{-9}$
[ABC] in [mM]	0.17	3.93	4.00
% von c in ABC	4.2	98.2	100
% von c in C_2	91.3	1.8	0
% von A bzw. B in ABC	0.8	19.6	20
Für c = 8 mM Templat			
[C] in [mM]	0.26	$2.98 \cdot 10^{-7}$	$1.11 \cdot 10^{-11}$
[C_2] in [mM]	3.75	0.14	$5.35 \cdot 10^{-9}$
[ABC] in [mM]	0.24	7.72	8.00
% von c in ABC	3.0	96.5	100
% von c in C_2	93.8	3.5	0
% von A bzw. B in ABC	1.2	38.6	40

Tab. 8.2: Geschätzte Gleichgewichtsverhältnisse der drei Einzelreaktionssysteme mit [a] = [b] = 20 mM

Im Falle des ersten Systems (2mer + 2mer an 4mer Templat) sollte der Anteil der Templatmoleküle, die termolekulare Komplexe ausbilden, mit 3 % bis 5.8 % klein, aber nicht unerheblich sein. Der größte Teil des Tetramer-Templats läge dann voraussichtlich als Duplex C_2 vor. Jeweils bis zu 1.2 % der Dimer-Eduktmoleküle sollten z.B. bei 8 mM Templatzugabe zu Beginn der Reaktion in termolekularen Komplexen gebunden sein. Die Steigerung der initialen Templatmenge hat zwar eine Verringerung des prozentualen Anteils von

Templatbausteinen in termolekularen Komplexen zur Folge, da aber mehr Templat zur Verfügung steht, steigt gleichzeitig auch die absolute Menge an ABC und damit die Autokatalyserate.

Spätestens aber beim zweiten System (2mer + 4mer an 6mer Templat) müsste ein Templateffekt deutlich sichtbar sein, da hier zwischen 96.5 % und 99 % des Templats in Form termolekularer Komplexe vorläge und damit je nach zugegebener Menge zwischen 10 % und 39 % des Eduktmaterials binden sollte. Beim dritten System (2mer + 6mer an 8mer Templat) verschieben sich die Verhältnisse nur noch geringfügig weiter in Richtung Maximalpopulation der termolekularen Komplexe ABC, so dass hier fast alles zugegebene Templat in termolekularen Komplexen involviert wäre und damit einen starken Autokatalyseeffekt zeigen sollte. Hierbei ist festzuhalten, dass die termolekularen Komplexe zu keinem Zeitpunkt eine höhere Stabilität als die entsprechenden Duplexe aufweisen. Die Populationen der jeweiligen Komplexe sind aber neben ihrer Stabilität auch von den Konzentrationen der beteiligten Bausteine abhängig, so dass ein Überschuss an termolekularen Komplexen möglich wird.

Da die erwartete Autokatalyse und damit die Bildung termolekularer Komplexe aber ausbleibt, ist von der zweiten These des Kap. 8.2 auszugehen die besagt, dass eine Katalyse des offenen CG-Systems nicht über termolekulare, sondern über anders geartete Komplexe ablaufen muss. Gleichzeitig stellt sich die Frage, warum die drei untersuchten einseitig geschlossenen Systeme trotz der theoretisch guten Voraussetzungen offenbar keine termolekularen Komplexe ausbilden.

8.2.2 Das Slidomer

Ein dem ersten Einzelreaktionsystem (2mer + 2mer am 4mer Templat) verwandtes System auf Ribonucleotidbasis wurde von *Orgel et al.* untersucht, der auf ähnliche Ergebnisse stieß[153]. *Orgel* führte dabei Selbstreplikationsexperimente mit den einseitig geschützten Ribonucleotid-Dimeren r($^{HO}C^{np}G^{n}$) und r($^{p}C^{np}G^{N}{}_{3}$) (jeweils 10 mM) in Gegenwart von 0.1 M EDC bei 0 °C durch. Als Templat setzte er r($^{HO}C^{np}G^{np}C^{np}G^{OH}$) in steigenden Anfangskonzentrationen ein.

Die Ligation verlief ohne Anzeichen von Autokatalyse, obwohl ein zuvor untersuchtes analoges System mit GC-Sequenzen deutliche Autokatalyse mit parabolischem Wachstum gezeigt hatte (siehe Abb. 1.6, Kap.1.4,)[35]. Den Grund für das überraschende Verhalten vermutete *Orgel* in der Hybridisierung der r(CGCG) Tetramer-Templatbausteine zu intermolekularen Aggregaten.

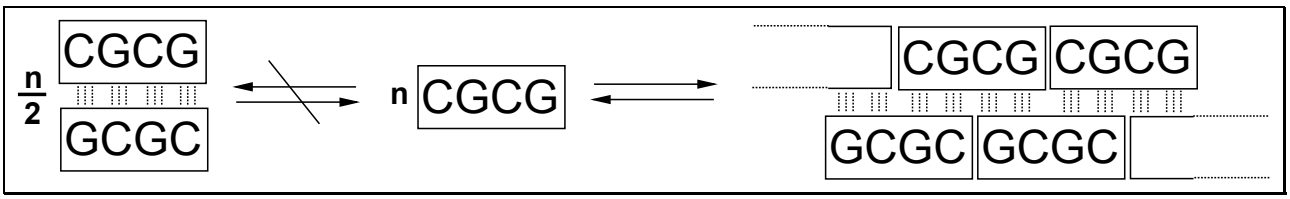


Abb. 8.11: *Orgel'sches* Slidomermodell der Tetramer-Templatbausteine

Durch die Aggregation standen die Tetramere nicht mehr für die Bildung termolekularer Komplexe aus dem in Abb. 8.12 abgebildeten Gleichgewicht zur Verfügung, so dass die Produktbildung nur noch über den rein spontanen Reaktionskanal ablaufen konnte.

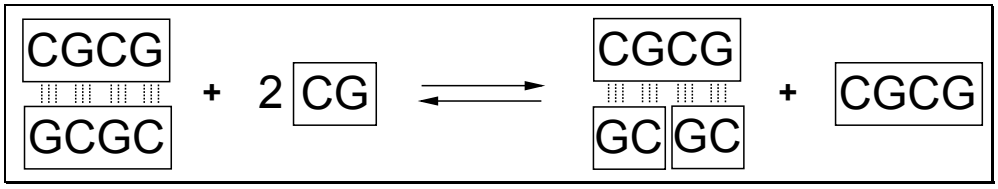


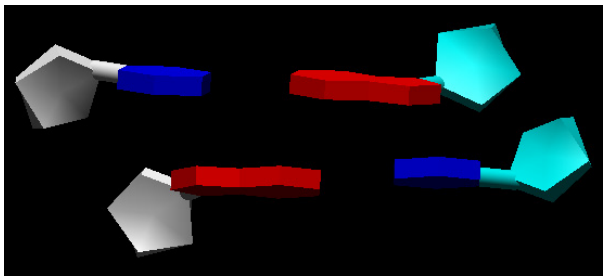
Abb. 8.12: Gleichgewicht zwischen Duplex und termolekularem Komplex

Diese Aggregate, von *Orgel* an anderer Stelle als 'Slidomere' (zusammengesetzt aus 'to slide' und Oligomer) bezeichnet[69], wurden auch von *Sinclair et al.* für r(CGCG) postuliert, der NMR-Untersuchungen an diversen Ribonucleotid-Tetrameren durchführte und im Falle des r(CGCG) einen 'gestaffelten Duplex mit hohem Molekulargewicht' annahm, für r(GCGC) dagegen normale Duplexe[126]. Das sehr breite und undefinierte Schmelzintervall bei r(CGCG) deutete auf eine stark verringerte Kooperativität des Schmelzvorganges und das Vorliegen von Slidomeren hin. *Sinclair* verwies dabei auf das RY-Modell (Kap. 8.2.3), um die ungewöhnliche Stabilität der Slidomere gegenüber normalen Duplexen zu erklären.

8.2.3 Slidomertheorie nach dem RY-Modell

Das RY-Modell von *Bubienko* und *Borer* beschreibt die strukturellen Besonderheiten eines Nucleotidstranges mit bestimmten Purin (R) - Pyrimidin (Y) - Basensequenzen in Bezug auf intra- und interhelicale Basenstapelung[154]. Ihre Theorie basiert auf NMR-Untersuchungen und postuliert eine erhöhte Stabilität von Doppelhelices aufgrund von verlängerten Basenstapeln, wobei es den bekannten NN-Modellen ähnelt. Das RY-Modell erweitert jedoch die betrachtete Umgebung auf den zweiten und den dritten Nachbarn innerhalb einer Doppelhelix, da Zweit- und Drittnachbar-Effekte zwar wesentlich schwächer, aber nicht unerheblich sein sollen. Bei alternierenden Pyrimidin-Purin-Sequenzen (Pyr/Pu) seien dadurch Stapel aus bis zu vier Basen möglich, die sich aus interhelicalen Basenstapeln zwischen zwei Purinbasen und intrahelicalen Basenstapeln zwischen 5'-Purin und 3'-Pyrimidin zusammensetzen.

Abb. 8.13 und Abb. 8.14 zeigen die beiden möglichen Stufen einer A-Form Doppelhelix aus alternierenden Pyrimidin- und Purinbasen am Beispiel der CG/GC- bzw. GC/CG-Stufen in Seit- und Aufsicht. Die schematisierten Modelle der verschiedenen Ansichten wurden mit *Hyperchem* erstellt und mit *Weblabviewer* visualisiert[118]. Blau steht hierbei für Cytosin, rot für Guanin, grau/türkis für eine Zuckereinheit des angedeuteten und real kovalent verbundenen Rückgrats.



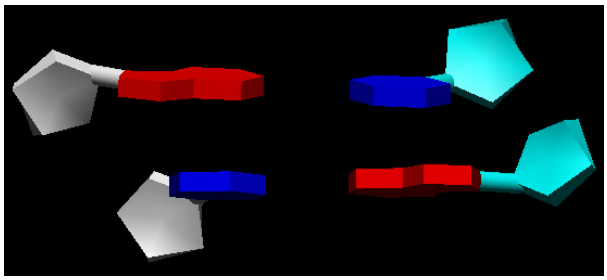
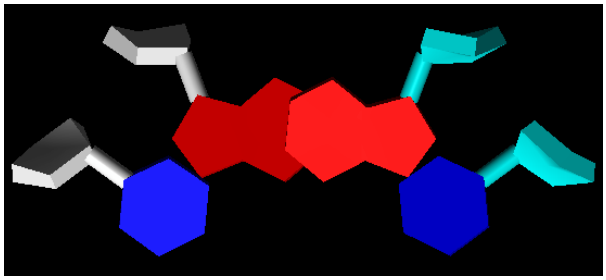


Abb. 8.13: Seitsicht CG/GC, A-Form

Seitsicht GC/CG, A-Form



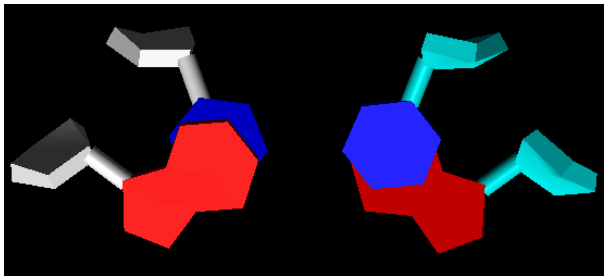


Abb. 8.14: Aufsicht CG/GC, A-Form

Aufsicht GC/CG, A-Form

Auf der linken Seite erkennt man deutlich die ausgeprägte interhelicale Stapelung der beiden Guaninbasen im Falle der CG/GC-Stufe, wohingegen die intrahelicale Stapelung zwischen Cytosin und Guanin nur gering ist. Auf der anderen Seite herrschen diametrale Verhältnisse bei der GC/CG-Stufe, in der so gut wie keine interhelicale aber dafür sehr gute intrahelicale Basenstapelung sichtbar wird. Am Beispiel der Tetramerduplexe von CGCG und GCGC sollen die Basenstapel in Abb. 8.15 (gepunktete gelbe Linie) näher betrachtet werden. Die Pfeile deuten den Verlauf des Rückgrats von 5'- in 3'-Richtung an.

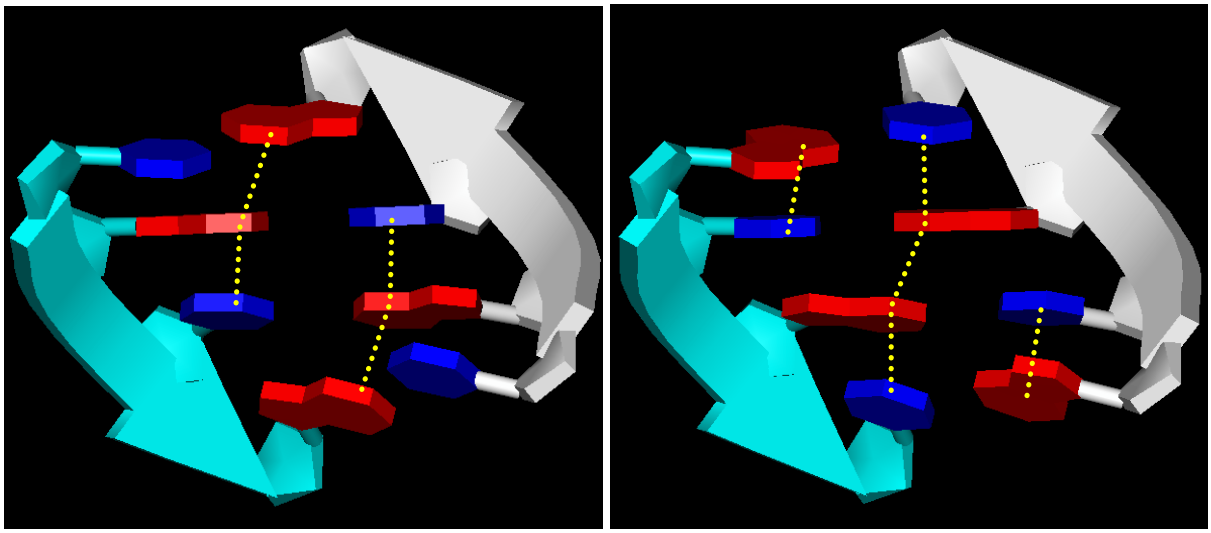


Abb. 8.15: CGCG-Duplex, A-Form, 2 x 3er Stapel GCGC-Duplex, A-Form, 1 x 4er , 2 x 2er Stapel

Schematisiert lassen sich die beiden Duplexe wie in Abb. 8.16 darstellen (Basenstapel rot umrandet).



Abb. 8.16: Basenstapelung innerhalb der Duplexe von CGCG und GCGC

Ein CGCG-Duplex wäre demnach in der Lage zwei 3er-Basenstapel auszubilden, die jeweils aus einem interhelicalen G-G-Stapel und einem intrahelicalen G-C-Stapel bestehen. 5'-C stapelt kaum auf 3'-G, so dass die endständigen Cytosinbasen nicht in den Genuss einer Stabilisierung durch Basenstapelung kommen. Ein GCGC-Duplex dagegen würde einen vollen 4er-Stapel, sowie zwei kurze 2er-Stapel ausbilden können und somit die bestmögliche Stabilisierung erfahren. Der GCGC-Duplex wäre folglich stabiler, als ein CGCG-Duplex. *Bubienko* und *Bohrer* vermuten, dass die Länge des Stacks über die Stabilität des Duplex

entscheidet, wahrscheinlich ist aber die fehlende Stapelung der endständigen Cytosinbase beim CGCG-Duplex nicht weniger einflussreich, da der geringere Energiegewinn durch ausbleibende Basenstapelung die Stabilität des gesamten Duplex senkt.

Bei der B-Form einer DNA-Doppelhelix mit alternierender Pyr/Pur-Sequenz verläuft die Basenstapelung analog, wobei der Unterschied zwischen den beiden möglichen Stufen CG/GC und GC/CG nicht mehr so drastisch ausfällt. Der Grund dafür liegt darin, dass eine B-Form GC/CG-Stufe neben der guten G-C intrahelicalen Stapelung auch leichte G-G interhelicale Stapelung aufweist und eine CG/GC-Stufe neben guter G-G interhelicaler Stapelung auch leichte G-C intrahelicale Stapelung zeigt.

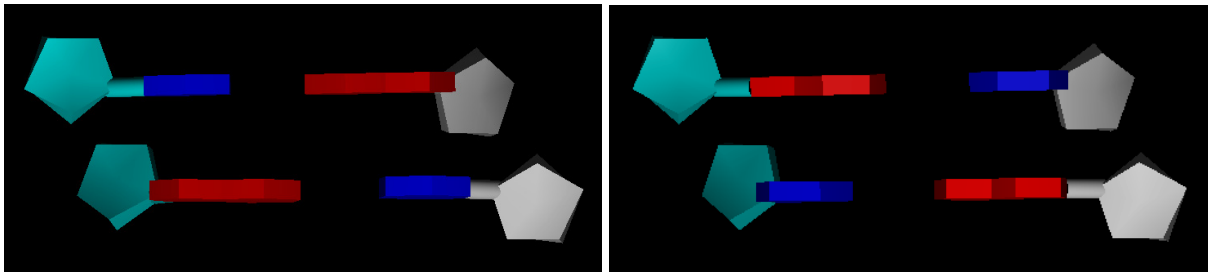


Abb. 8.17: Seitsicht CG/GC, B-Form Seitsicht GC/CG, B-Form

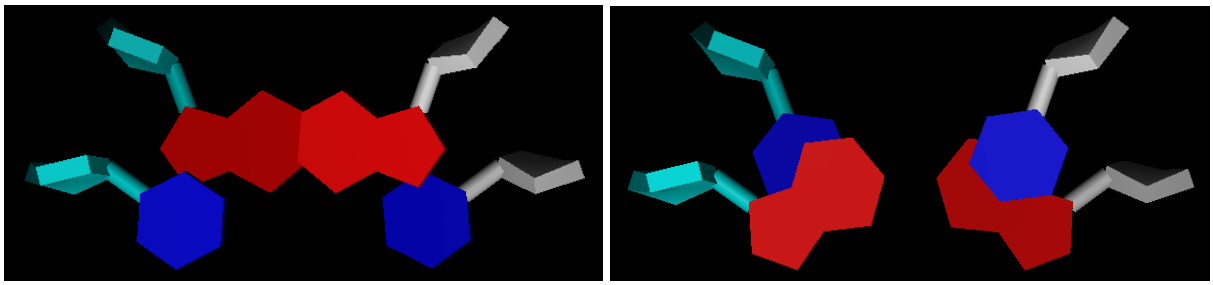


Abb. 8.18: Aufsicht CG/GC, B-Form Aufsicht GC/CG, B-Form

Laut molecular modelling Studien von *Hartmann*[155] weist aber gerade die CG/GC-Stufe (neben CA/AC) die schwächste und die GC/CG-Stufe eine der stärksten intrahelicalen Stapelungen unter den acht möglichen DNA-Dimerstufen auf. Damit sollten sich die Basenstapelungs-Verhältnisse in etwas abgeschwächter Form auch auf B-DNA übertragen lassen, wobei die Effekte des RY-Modells dort nicht ganz so deutlich auftreten dürften. Die Stapelung innerhalb eines B-DNA-Duplex wird in Abb. 8.19 am Beispiel des CGCG-Duplex demonstriert.

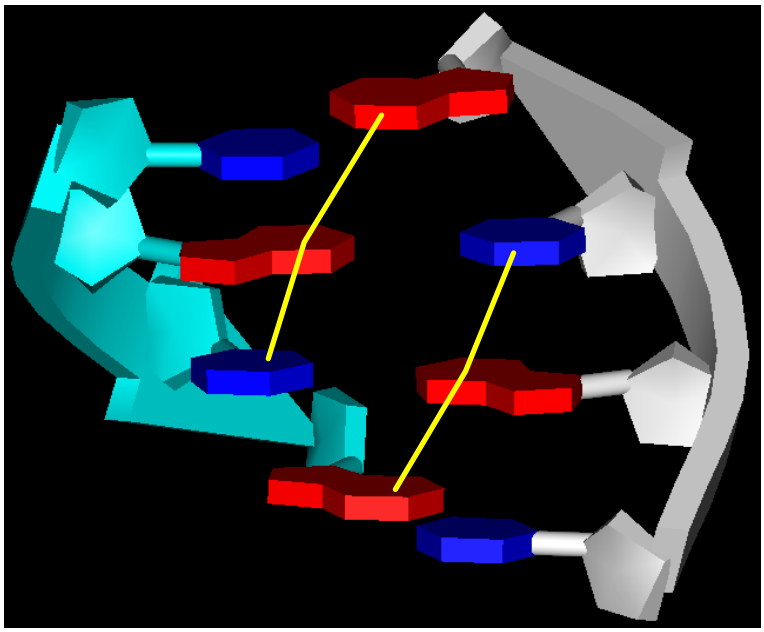


Abb. 8.19: CGCG-Duplex, B-Form, 2 x 3er Stapel

Aufgrund ihrer Selbstkomplementarität ist es den beiden Tetrameren CGCG und GCGC theoretisch möglich auch 'gestaffelte Duplexe' bzw. Slidomere zu bilden. Während bei GCGC, wie in Abb. 8.16 gezeigt, alle Basen des Duplex gestapelt und damit optimal stabilisiert vorliegen, neigt CGCG zur Slidomerbildung, um die ansonsten ungestapelten endständigen hydrophoben Cytosinbasen ebenfalls zu stapeln und damit in eine wasserfreiere Umgebung zu überführen.

Dem RY-Modell folgend würde der aus zwei Tetrameren bestehende 'Initiationskeim' eines CGCG-Slidomers jeweils 3'-überhängende Enden bevorzugen, da diese Ausrichtung den längsten Basenstapel mit vier involvierten Basen zur Folge hätte (siehe Abb. 8.20). Der Slidomerduplex mit 5'-überhängenden Enden hätte dagegen nur einen interhelicalen Stapel aus zwei Basen, sowie zwei intrahelicale G-C-Stapel, wobei letztere in der Abbildung nicht visualisiert werden. Wasserstoffbrückenbindungen sind grün angedeutet, für die Darstellung der Helices wurde die B-Form verwendet.

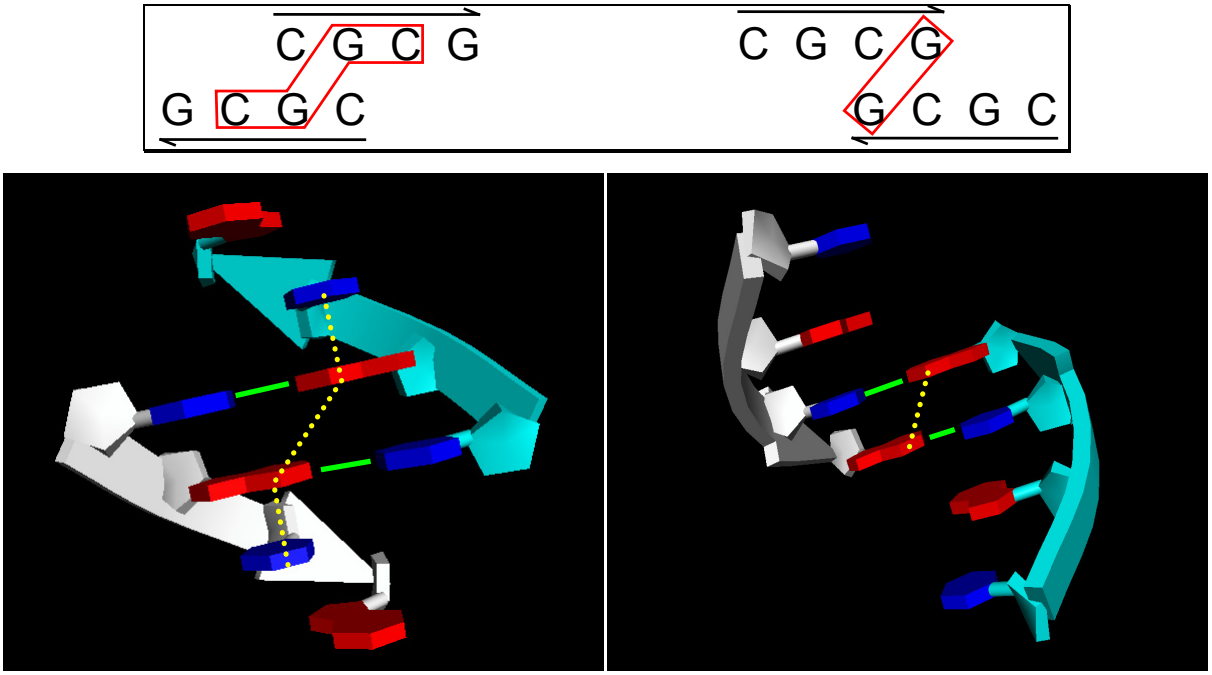


Abb. 8.20: CGCG-Slidomerduplex, B-Form, 3'-überhängend - CGCG-Slidomerduplex, B-Form 5'-überhängend

Während die Orientierung der Tetramere wohl nur bei den ersten Bausteinen des Slidomers von Belang ist, fällt sie bei hoher Anzahl von Molekülen im Slidomer immer weniger ins Gewicht, da der Anteil der innerhalb des Slidomers lokalisierten Oligomere gegenüber den endständigen Molekülen mit steigender Slidomerlänge zunimmt.

Die besondere slidomerstabilisierende Wirkung der Basenstapel im CGCG-Slidomer beruht auf mehreren Faktoren und lässt sich mit Hilfe der Abb. 8.21 nachvollziehen. Zum einen werden die Basenstapel nicht nur interhelical zwischen den Doppelhelixsträngen und intrahelical innerhalb eines Moleküls ausgebildet, sondern auch intrahelical zwischen den G-C-Basen zweier Bausteine innerhalb eines Stranges. Dadurch werden die bislang im normalen Duplex ungestapelten endständigen Cytosinbasen in den Basenstapelverbund aufgenommen und die Gesamtstruktur stabilisiert. Außerdem bildet jeder Baustein im Slidomer zu allen anderen vier umgebenden Bausteinen Basenstapel aus, wobei die endständigen Guanine sogar mit den Basen zweier benachbarter Bausteine gleichzeitig stapeln. Dieser Vernetzungseffekt durch Basenstapelungen mit allen benachbarten Oligomeren trägt zu einer weiteren Steigerung der Slidomerstabilität bei. Im hochmolekularen Slidomer wird so die Anzahl der dem wässrigen Lösungsmittel ausgesetzten hydrophoben Basen minimiert.

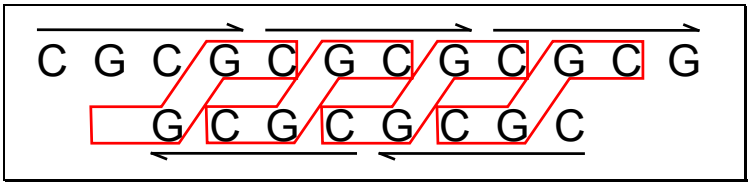


Abb. 8.21: Ausschnitt eines CGCG-Slidomers

Diese Betrachtungsweise löst sich von dem auf Basenstapellängen fixierten RY-Modell und lässt auch eine Interpretation mit Hilfe des NN-Modells zu, das jeweils nur den nächsten Nachbarn betrachtet. Da das RY-Modell keine thermodynamischen Daten für Zweit- und Drittnachbareffekte liefert, ist mit diesem Modell nur eine rein qualitative Analyse des Slidomerphänomens möglich. Qualitativ wird demnach sowohl im RY-Modell, als auch im NN-Modell das CGCG-Slidomer gegenüber normalen CGCG-Duplexen favorisiert. Eine genauere quantitative thermodynamische Betrachtung auf Basis des NN-Modells erfolgt in Kap. 8.2.5 unter Berücksichtigung der entropischen Nachteile bei der Bildung eines Slidomers.

Im Gegensatz zum CGCG-Slidomer fehlen einem aus GCGC-Tetrameren aufgebauten möglichen Slidomer die intrahelicalen Basenstapel zwischen den Bausteinen eines Stranges (Abb. 8.22). Außerdem bildet ein Tetramer innerhalb des GCGC-Slidomers lediglich Basenstapel zu einem einzigen anderen Baustein aus, so dass die Stabilität eines solchen Slidomers gegenüber einem CGCG-Slidomer deutlich niedriger sein sollte.

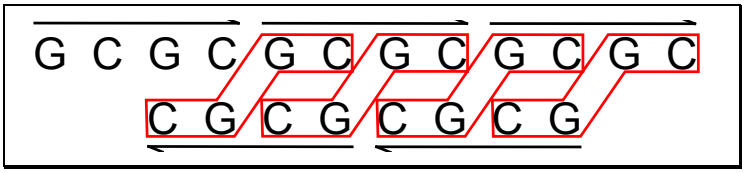


Abb. 8.22: Ausschnitt eines GCGC-Slidomers

Die direkte Gegenüberstellung der Slidomerverlängerung in Abb. 8.23 verdeutlicht die höhere Triebkraft der CGCG-Slidomerbildung gegenüber GCGC. Die Verlängerung eines bestehenden Slidomers um einen weiteren gestaffelten Duplex führt im Falle des CGCG neben der CG/GC-Basenpaarung laut RY-Modell zur Bildung eines neuen 4er-Basenstapels bzw. laut NN-Modell zu drei neuen Stapeln direkt benachbarter Basen. Die Verlängerung eines GCGC-Slidomers kann dem gegenüber nur Energiegewinn aus der GC/CG-Basenpaarung beziehen, da keinerlei neue Basenstapel gebildet werden und so der entropische Nachteil durch die Vereinigung zweier Teile in eines offenbar nicht aufgewogen werden kann.

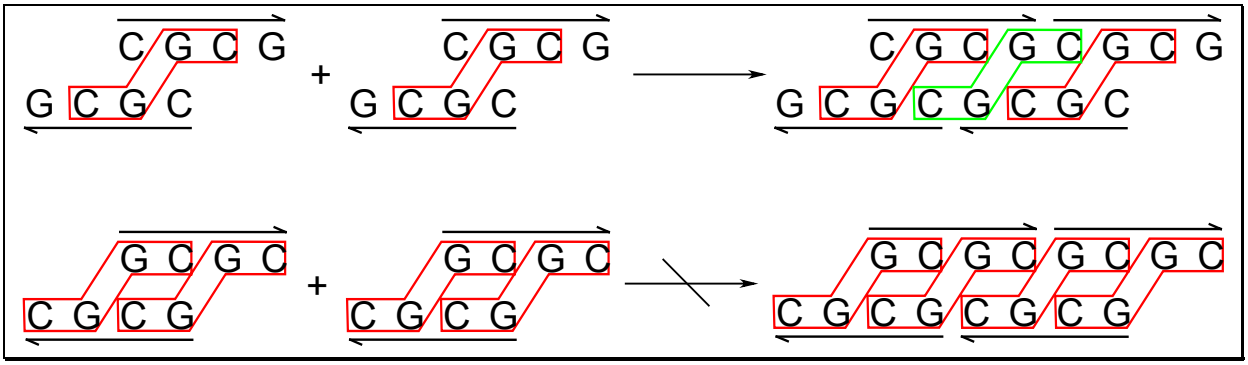


Abb. 8.23: Vergleich der Slidomerverlängerung für CGCG und GCGC. Grün: neu gebildeter Basenstapel

Die höhere Stabilität eines GCGC-Duplex gegenüber einem CGCG-Duplex führt zusätzlich dazu, dass GCGC hauptsächlich normale Duplexe bildet und damit als Templat in einem autokatalytischen Reaktionszyklus dienen kann, wie *Orgel* beobachten konnte[35], während CGCG in Slidomerkomplexe integriert wird und nicht mehr als Templat zur Verfügung steht.

Die Unterbindung der katalytischen Kondensationsbeschleunigung bezüglich der drei in dieser Arbeit untersuchten Einzelreaktionssysteme durch Bildung von Slidomeren kann mit dem Schema der Abb. 8.24 grafisch zusammengefasst werden.

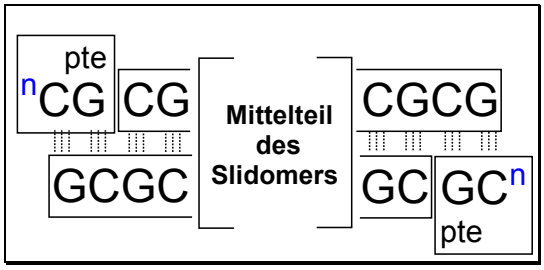


Abb. 8.24: Schema der katalytisch inaktiven Slidomerkomplexe der Einzelreaktionsysteme

Die in Lösung befindlichen Oligomere mit einer Länge größer oder gleich dem Tetramer können an der Bildung und Verlängerung der Slidomere beteiligt sein. Die dimeren $^{n}CG^{pte}$-Bausteine können jedoch lediglich endständig an einem Slidomerkomplex hybridisieren, wobei die reaktive 5'-Aminofunktion nicht in unmittelbarer Nähe einer aktivierten Phosphatfunktion zu liegen kommt und damit keine komplexkatalysierte Ligation stattfinden kann. Die ausbleibende Katalyse unterstützt unter anderem die vermutete Präferenz der 3'-überhängenden Enden, da bei 5'-überhängenden Enden durchaus Katalyse in begrenztem Umfang möglich gewesen wäre. Eine detailliertere Strukturbetrachtung der Slidomere, ihrer Variationsformen, Aktivierung und Zerfall erfolgt später in Kap. 8.3.1.

Mit Hilfe des RY-Modells und des NN-Modells finden die beobachteten Phänomene der ausbleibenden Autokatalyse mit CGCG-Templaten ihre qualitative theoretische Erklärung. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die in dieser Arbeit verwendeten Systeme variiert aber auch mit der Struktur der Oligomere.

8.2.4 Struktur der hybridisierten Oligomere des CG-Systems

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, neigt die A-Form einer Doppelhelix bedingt durch die ausgeprägteren Unterschiede in der Basenstapelung zwischen CG/GC- und GC/CG-Stufen eher zur Slidomerbildung, als die B-Form. Informationen über die Doppelhelixstruktur der eingesetzten Sequenzen könnten näheren Aufschluss über deren Tendenz zur Ausbildung von Slidomeren liefern. Die Ergebnisse sollten auf die in dieser Arbeit verwendeten und generierten Oligomere übertragbar sein. Replikationsprodukte aus artifiziellen Nucleotid-bausteinen mit Phosphoamidatbrücken im Rückgrat sind z.B. in der Lage als Template für Selbstreplikationen zu dienen[35,36,37,40,49,53] und ähneln in ihrer Hybridisierungsgeometrie weitestgehend den entsprechenden Doppelhelices mit Phosphodiesterbrücken[132]. *Dickerson* betont, dass die Basensequenz bzw. die Basenstapelung einen wesentlich größeren Einfluss auf die Struktur der Doppelhelix hat, als das Rückgrat[156,157].

Ein DNA- oder RNA-Rückgrat besitzt in jedem Monomer Rotationsmöglichkeiten um sechs Bindungen. Wichtige Determinanten der Struktur sind hierbei die Faltung und die Orientierung der Base gegenüber dem Zucker. Die Propellerverdrehung (*propeller twist*) kann die Basenstapelung verstärken. Weitere Variationsmöglichkeiten sind zudem durch die Neigung der Basenpaare in Bezug auf ihre Nachbarbasen (*base roll*) gegeben. Diese und andere lokale Veränderungen der Doppelhelix sind insbesondere von der Basensequenz abhängig. So ist bei einem Oligomer, das aus zwei verschiedenen Basen in alternierender $(XY)_z$-Sequenz besteht, im Gegensatz zu einem Oligomer, in dem eine statistische Verteilung der vier Basen vorliegt und das den normalen Doppelhelixmodellen zugrunde liegt, mit größeren Abweichungen vom Normmodell zu rechnen. Diese Annahme wird von mehreren Veröffentlichungen bestätigt, die sich mit der Struktur von $(CG)_x$-Oligomeren beschäftigen.

Adamiak et al. berichten beispielsweise in ihren NMR-Untersuchungen des $r(CG)_3$-Duplex, dass dessen außergewöhnliche konformative Eigenschaften zu signifikanten Abweichungen von der normalen A-RNA Struktur führen[158]. Sehr niedriger *helical rise* (2.0-2.5 Å), hoher

helical twist (ca. 38°) und *propeller twist* (30°) und andere auffallend veränderte Parameter resultieren in einer Struktur, die an der Grenze der A-RNA Strukturfamilie liegt, wobei ähnliche Tendenzen auch bei C/G-reichen A-DNA Duplexen gefunden wurden. Die im vorhergehenden Kapitel erläuterten Differenzen der Basenstapelungsverhältnisse zwischen CG/GC- und GC/CG-Stufen wurden hier beobachtet, obgleich die interhelicale Stapelung der Guaninbasen etwas schwächer als in einem normalen A-RNA-Duplex ist. Damit rückt diese Struktur bezüglich ihres Überlappungsgrades der Guaninbasen ein Stück in Richtung B-DNA.

DNA-Oligomere mit alternierender CG-Sequenz zeigen unter verschiedenen Bedingungen eine hohe Diversität ihrer Strukturen. So wurden wegweisende Röntgenstruktur-untersuchungen zur Charakterisierung der Parameter von linksgängiger Z-DNA an $d(CG)_3$-Kristallen aufgenommen[159]. Man kann jedoch nicht unbedingt von der Kristallstruktur auf die Struktur in Lösung schließen. Hier findet man erst bei hohen Salzkonzentration ab ca. 3 M NaCl die Z-DNA Form bei $(CG)_x$-Sequenzen vor[160,161]. Bei niedrigen NaCl-Konzentrationen von z.B. 0.1 M hingegen lässt sich keine eindeutige Bestimmung der Helixklasse erzielen. *Birke et al.* gehen von einer rechtsgängigen Doppelhelix aus, deren gemessene VCD-Spektren für dCGCG-Duplexe jedoch eher den berechneten Spektren der A-Form als der B-Form gleichen[161]. Ihr mit AMBER durchgeführtes molecular modelling präferiert ebenfalls eine offene, der A-Form verwandte Konformation. Die Spektren deuten darauf hin, dass die Struktur von der normalen B-DNA Doppelhelix abweicht, jedoch auch keine klare A-DNA darstellt. Sie weisen zudem Merkmale der polymeren Form auf, da weniger 'ausgefranste bzw. flatternde Enden' (*fraying ends*) und eine stärkere Kopplung zwischen dem GC-Kern und den terminalen Basen zu sehen sind, als beim dGCGC-Duplex. Auch *Patel* kann den dCGCG-Duplexen keine eindeutige B-DNA Geometrie zuordnen[162]. Die Strukturen der $(CG)_x$-Sequenzklasse erscheinen demnach relativ unbestimmt.

Dickerson bemerkt hierzu, dass A- und B-DNA keine separaten, isolierten Konformationen darstellen, sondern in Abhängigkeit von der Basensequenz stabile Intermediate zwischen A- und B-Form möglich sind[157]. Insgesamt weichen die Strukturen der $r(CG)_x$- und $d(CG)_x$-Oligomerduplexe von den erwarteten klassischen A- oder B-Formen ab und scheinen Konformationen anzunehmen, die zwischen den beiden Helixklassen liegen und sich damit strukturell annähern, wobei einige der obigen Veröffentlichungen bei $d(CG)_x$-Sequenzen eine leichte Tendenz zur B-Form andeuten. Für $d(CG)_x$-Sequenzen könnte dies eine ähnliche Bereitschaft zur Slidomerbildung bedeuten, wie sie auch für das Tetramer $r(CG)_2$ beobachtet

wird, da, wie bereits erläutert, die A-Form einer Doppelhelix voraussichtlich stärker zur Generierung von Slidomeren neigt als die reine B-Form.

Tatsächlich fanden *Rokita el al.* ein ungewöhnliches, nicht mit dem traditionellen statischen DNA-Modell konsistentes Hybridisierungsverhalten während des Abbaus der DNA-Duplexe von $d(CG)_4$, $d(CG)_5$ und $d(CG)_6$ mit S-1 Nuclease[163]. Bei einer NaCl-Konzentration von 0.1 M und 22 °C produzierte die Exonuclease, die spezifisch DNA-Einzelstrangregionen nucleotidweise vom 3'- und 5'- Ende her abbaut, außergewöhnlich schnell um jeweils eine CG-Einheit verkürzte Oligomere. Dieses Verhalten war nicht mit simpler Instabilität der endständigen Basenpaare zu erklären, sondern deutete darauf hin, dass die eingesetzten Oligomere verschobene Duplexe bildeten, in denen jeweils zwei Basen überhingen (Slidomer-Duplex). Darüberhinaus wurden Oligonucleotide wie $d(CG)_3C$ und $d(CG)_4C$, die nicht in der Lage waren vollständig zu hybridisieren, um eine Größenordnung schneller abgebaut, als die Sequenzen, die komplett hybridisieren könnten. Dieser Befund lässt zwei verschiedene Schlüsse zu: Entweder es liegt ein Gleichgewicht zwischen den gestaffelten Duplexen und den vollständig gepaarten Duplexen vor, so dass nicht jederzeit die gesamte Menge an Oligomer zum Abbau zur Verfügung steht oder die teilweise ungepaarten Duplexe befinden sich in einem höheren Molekülverbund, einem intermolekularen Aggregat aus gestaffelten Duplexen (Slidomer), der den Angriff der Nuclease behindert, da viel weniger freie Enden vorliegen. Der Abbau aus Haarnadel- oder anderen komplexeren Strukturen heraus wurde durch entsprechende Versuche ausgeschlossen.

In Anbetracht der bisher aufgestellten These, dass $(CG)_x$-Sequenzen zur Maximierung der Basenstapelung bei Minimierung der Kontaktflächen der Basen mit dem Lösungsmittel neigen, ist von hochmolekularen Slidomer-Aggregaten anstelle von einzelnen Slidomer-Duplexen aus je zwei Bausteinen auszugehen. Die Anzahl der Slidomere oder die Menge der innerhalb eines Slidomers hybridisierten Oligomere ist dabei unbekannt, der Einbau sämtlicher vorhandener Bausteine in ein einziges Slidomer ist jedoch aufgrund des zu erwartenden Komplexdissoziationsgleichgewichtes eher unwahrscheinlich.

Untermauert wird die Existenz von DNA-Slidomeren, die aus einer hohen Anzahl gestaffelter Oligomere bestehen können, durch Röntgenstruktur-Untersuchungen von *Seeman et al.* an Kristallen des 10mers dCGACGATCGT[164]. Die spezielle Sequenz bewirkt ein Hybridisierungsschema, in dem die letzten acht Basen des 10mers paaren, während je zwei

Basen an den 5'-Enden überhängen. Die Strukturanalyse offenbarte eine im Rahmen der Beobachtbarkeit endlose Doppelhelix, die durch 'sticky ends' bzw. überhängende komplementäre Enden zusammengehalten wird und in der die Unterbrechungen des Rückgrats gestaffelt auftreten. Durch diesen Aufbau liegt jeder Strangunterbrechung ein Teilstück mit kovalenter Bindung gegenüber (Abb. 8.25).

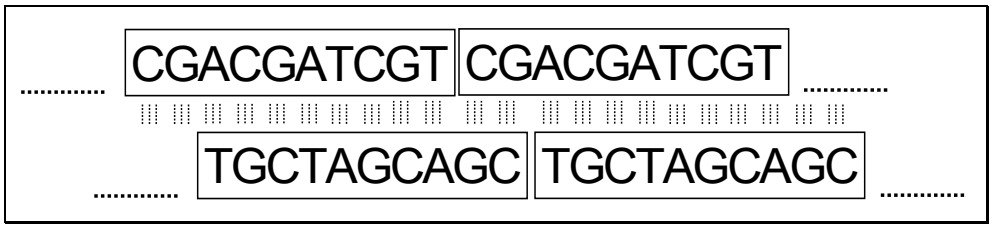


Abb. 8.25: Slidomerstrukturausschnitt des dCGACGATCGT-Kristalls

Trotz des Bruchs der kovalenten Rückgratkette wurde keine Veränderung oder Deformation der helicalen Struktur gefunden. Auch die Basenstapel-Wechselwirkungen sind identisch zu einer Struktur ohne Unterbrechungen.

In diesem Kontext sollte man demnach auch bei Oligomeren auf DNA-Basis von der Möglichkeit der Slidomerbildung ausgehen können. Da die beschriebenen Strukturveränderungen offenbar maßgeblich auf die Sequenz der Oligomere zurückzuführen sind, ist es wahrscheinlich, dass sie auch für die in dieser Arbeit verwendeten CG-Oligonucleotide gelten und somit Slidomere auf Basis von artifiziellen DNA-Oligomeren mit Phosphoamidatrückgrat denkbar sind.

8.2.5 Thermodynamische Betrachtung der Slidomere

Neben der bereits erfolgten qualitativen Betrachtung der Stabilitätsunterschiede zwischen normalen Duplexen und Slidomeren erlaubt eine quantitative Betrachtung tiefere Einblicke in die Kräfte, die zur bevorzugten Bildung der Slidomere des CG-Systems führen. Da aber die genaue Struktur der Slidomere nicht bekannt ist und zwischen A- und B-Form der Doppelhelix liegen kann, ist eine exakte thermodynamische Analyse schwierig - zudem man in der Literatur entweder NN-Werte für die eine oder die andere Form, aber nicht für Zwischenformen findet. Einen Ausweg aus dieser Problematik würde die getrennte Untersuchung der jeweiligen Sequenz sowohl in der A-Form als auch in der B-Form liefern. Die realen Stabilitäten sollten dann zwischen den theoretischen Eckwerten einzuordnen sein, mit Tendenz zur B-DNA-Form.

Für den Vergleich wird auf das bereits in Kap. 7.7 vorgestellte NN-Modell für RNA und DNA zurückgegriffen, das die thermodynamischen Parameter für A- und B-Form Helices zur Verfügung stellt. Das NN-Modell wurde ursprünglich für die Stabilitätsvorhersage von normalen Duplexen verwendet, kann aber durch entsprechende Erweiterungen auch für Strukturen mit überhängenden Enden oder Unterbrechungen im Rückgrat eingesetzt werden. Auf die Vorhersage von Slidomerstrukturen wurde es bislang nicht angewendet und ist demnach lediglich als Abschätzung zu verstehen, die aber zu einem besseren quantitativen Verständnis der Stabilitätsverhältnisse beitragen kann. Da Slidomere eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu entsprechend langen Doppelhelices ohne Brüche im Rückgrat haben sollten, erscheint eine solche Vorgehensweise legitim.

Für die Betrachtung des Templatverhaltens der Einzelreaktionskinetiken des CG-Systems mit einseitig geschlossenen Bausteinen sowie der ersten Produkte zu Beginn der Reaktion des offenen CG-Systems, sind 4mer, 6mer und 8mer von besonderem Interesse, so dass im folgenden ein Vergleich der Stabilität der entsprechenden Duplexe und Slidomere aufgeteilt nach A- und B-Form der Doppelhelix durchgeführt wird. Dazu muss der $\Delta G°$-Wert des Slidomers, das aus einer gegebenen Anzahl z an Bausteinen einer Länge y gebildet werden kann, mit der Summe der $\Delta G°$-Werte der Duplexe, die aus dieser Anzahl Bausteine entstehen können, miteinander verglichen werden. Die Berechnung der $\Delta G°$-Werte der Duplexe erfolgt wie in Kap. 7.7 beschrieben, mit anschließender Addition über alle Duplexe. Auf Basis des NN-Modells für A-RNA nach *Turner* wird demnach für die Gesamtheit der Duplexe die $\Delta G°$-Berechnung nach Gleichung 8.6 durchgeführt, mit y = Bausteinlänge und z = Anzahl der Bausteine:

$$\left[\begin{matrix}\mathrm{CG}\\ \mathrm{GC}\end{matrix}\right]_{\mathbf{x}} \qquad \text{mit } x = \frac{y}{2}$$

$$\begin{aligned}\Delta G°_{Duplexe} &= \frac{z}{2}\cdot\left(x\cdot\Delta G°_{\left(\frac{CG}{GC}\right)} + (x-1)\cdot\Delta G°_{\left(\frac{GC}{CG}\right)} + \Delta G_{Initiation} + \Delta G_{sym}\right)\\ &= \frac{z}{2}\cdot\left(\frac{y}{2}\cdot\Delta G°_{\left(\frac{CG}{GC}\right)} + \left(\frac{y}{2}-1\right)\cdot\Delta G°_{\left(\frac{GC}{CG}\right)} + \Delta G_{Initiation} + \Delta G_{sym}\right)\end{aligned}$$

Gleichung 8.6: $\Delta G°$-Berechnung über alle Duplexe nach *Turner* für A-RNA

Für B-DNA Duplexe kommt die Gleichung 8.7 nach dem NN-Modell von *SantaLucia* zum Einsatz:

$$\Delta G^\circ_{Duplexe} = \frac{z}{2} \cdot \left(x \cdot \Delta G^\circ_{\left(\frac{CG}{GC}\right)} + (x-1) \cdot \Delta G^\circ_{\left(\frac{GC}{CG}\right)} + 2 \cdot \Delta G_{initial\,C/G} + \Delta G_{sym} \right)$$

$$= \frac{z}{2} \cdot \left(\frac{y}{2} \cdot \Delta G^\circ_{\left(\frac{CG}{GC}\right)} + \left(\frac{y}{2} - 1 \right) \cdot \Delta G^\circ_{\left(\frac{GC}{CG}\right)} + 2 \cdot \Delta G_{initial\,C/G} + \Delta G_{sym} \right)$$

Gleichung 8.7: Δ*G*°-Berechnung über alle Duplexe nach *SantaLucia* für B-DNA

Für die Bestimmung des Δ*G*°-Wertes des Slidomers dagegen wird das Slidomer gedanklich Oligomer für Oligomer aufgebaut, so dass für jedes eingebaute Nucleotid erneut die Initiationsenergie für die Bildung einer Doppelhelix berücksichtigt wird. Rechnerisch wird das Slidomer dabei wie ein großer Duplex behandelt, der aufgrund der 3'-überhängenden CG-Enden bzw. der dadurch fehlenden stabilisierenden Wechselwirkungen um eine CG-Einheit verkürzt wird (Abb. 8.26) und in dessen Δ*G*°-Wert (z-1) Helixinitiationen einbezogen werden.



Abb. 8.26: Für Δ*G*°-Berechnung vereinfachte Darstellung des Slidomers ohne Unterbrechungen des Rückgrats

Auf diese Weise wird dem Entropieverlust Rechnung getragen, der durch den Aufbau der geordneten Slidomerstruktur aus den vormals freien Oligomeren bedingt ist. Dieser sollte durch die Bildung eines einzigen Komplexes aus z Einzelmolekülen erheblich größer als bei der Generierung der Duplexe sein, deren Anzahl z/2 beträgt.

Die zentrale Fragestellung für die Bevorzugung des Slidomers gegenüber den Duplexen ist nun, ob der energetische Vorteil der zusätzlichen Basenstapelung im Slidomer den Entropieverlust ausgleichen kann und ihm darüberhinaus noch Stabilitätsvorteile vor den Duplexen verschafft.

Die Stabilisierung eines Slidomers durch die beiden überhängenden Enden (dangling ends), die im Bereich von $\Delta G°_{dangling\ end}$ = -0.2 bis -0.7 kcal·mol^{-1} pro Überhang liegt[138], ist nur für kurze Slidomere von Belang und wird bei höheren Bausteinzahlen und damit längeren Slidomeren im Vergleich zum gesamten $\Delta G°$-Wert vernachlässigbar klein, so dass auf eine Berücksichtigung verzichtet wurde.

Damit ergibt sich für die $\Delta G°$-Berechnung eines Slidomers auf Basis des NN-Modells für A-RNA nach *Turner* folgende Gleichung 8.8, mit y = Bausteinlänge und z = Anzahl der Bausteine:

$$\Delta G°_{Slidomer} = \mathbf{x}\cdot\Delta G°_{\left(\frac{CG}{GC}\right)} + \mathbf{(x-1)}\cdot\Delta G°_{\left(\frac{GC}{CG}\right)} + \mathbf{(z-1)}\cdot\Delta G_{Initiation} + \Delta G_{sym}$$

$$= \left(\frac{\frac{\mathbf{z\cdot y}}{\mathbf{2}}-2}{2}\right)\cdot\Delta G°_{\left(\frac{CG}{GC}\right)} + \left(\frac{\frac{\mathbf{z\cdot y}}{\mathbf{2}}-2}{2}-1\right)\cdot\Delta G°_{\left(\frac{GC}{CG}\right)} + \mathbf{(z-1)}\cdot\Delta G_{Initiation} + \Delta G_{sym}$$

Gleichung 8.8: $\Delta G°$-Berechnung eines A-RNA Slidomers

Der $\Delta G°$-Wert eines B-DNA Slidomers kann mit Gleichung 8.9 nach dem NN-Modell von *SantaLucia* ermittelt werden:

$$\Delta G°_{Slidomer} = \mathbf{x}\cdot\Delta G°_{\left(\frac{CG}{GC}\right)} + \mathbf{(x-1)}\cdot\Delta G°_{\left(\frac{GC}{CG}\right)} + \mathbf{(z-1)}\cdot(\mathbf{2}\cdot\Delta G_{initial\ C/G}) + \Delta G_{sym}$$

$$= \left(\frac{\frac{\mathbf{z\cdot y}}{\mathbf{2}}-2}{2}\right)\cdot\Delta G°_{\left(\frac{CG}{GC}\right)} + \left(\frac{\frac{\mathbf{z\cdot y}}{\mathbf{2}}-2}{2}-1\right)\cdot\Delta G°_{\left(\frac{GC}{CG}\right)} + \mathbf{(z-1)}\cdot(\mathbf{2}\cdot\Delta G_{initial\ C/G}) + \Delta G_{sym}$$

Gleichung 8.9: $\Delta G°$-Berechnung eines B-DNA Slidomers

In diesem Zusammenhang liefert die thermodynamische Untersuchung von *Turner et al.* an termolekularen RNA-Komplexen eine wichtige Ergänzung des Modells[165]. *Turner* bemerkte bei vergleichenden Schmelztemperaturexperimenten, dass die Unterbrechung im Rückgrat eines termolekularen Komplexes zwischen G und C eine Stabilitätserhöhung der entsprechenden nearest-neighbour Wechselwirkung um ca. -1 kcal·mol^{-1} zur Folge hatte. Das entsprechende NN-Inkrement des Dimer-Duplex mit Unterbrechung G-C/C|G ist demnach bei

der Berechnung der Gesamtstabilität eines termol. Komplexes mit ca. -4.4 kcal·mol^{-1} anstelle des normalen NN-Inkrements des Dimer-Duplex ohne Unterbrechung G-C/C-G von -3.4 kcal·mol^{-1} zu berücksichtigen (Abb. 8.27).

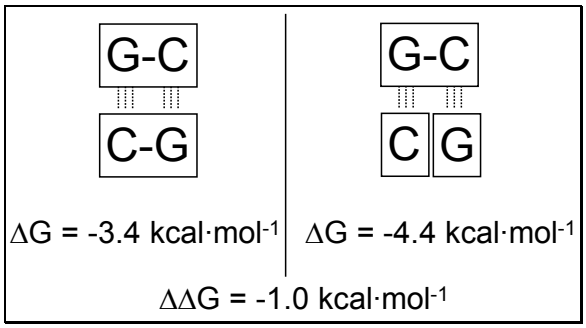


Abb. 8.27: NN-Dimerduplexinkremente nach *Turner* ohne und mit Unterbrechung des RNA-Rückgrats

Hierbei ist zu beachten, dass für eine Gesamtstabilitätsbetrachtung eines termolekularen Komplexes der entropische Nachteil gegenüber einem Duplex gleicher Sequenz durch die zusätzliche Helixinitiation zum Tragen kommt und somit der Duplex insgesamt immer noch stabiler als der termolekulare Komplex bleibt, wobei sich aber der Stabilitätsunterschied zwischen den beiden Komplexformen durch die Turnerkorrektur um ca. 1 kcal·mol^{-1} verringert.

Die Ursache dieser auf den ersten Blick überraschenden Stabilisierung bei doppelhelicalen Strukturen mit unterbrochenem Rückgrat liegt laut *Turner* in den zusätzlichen Freiheiten, über welche die beiden benachbarten Nucleotide aufgrund der fehlenden Phosphodiesterbindung verfügen. Dadurch seien diese flexibleren Basen in der Lage die inter- und intrahelicalen Stapelwechselwirkungen mit den benachbarten Basen zu maximieren sowie mögliche Ladungsabstoßungen zu reduzieren und damit eine Stabilisierung in der Größenordnung von 1 kcal·mol^{-1} zu erzielen. Die allgemein enthalpisch begünstigte, aber entropisch ungünstige Basenstapelung profitiert von der höheren Beweglichkeit im Sinne eines lokalen Entropiegewinns. In seiner Gesamtbetrachtung des NN-Modells für RNA weist *Turner* ebenfalls auf eine allgemeine zusätzliche Stabilisierung derartiger Strukturen im Bereich von $\Delta G_{37°C}$ = -0.8 bis -1.5 kcal·mol^{-1} hin, die in Strukturvorhersage-Algorithmen einfließen und auch für DNA Gültigkeit besitzen sollten[142].

Modelling-Studien von *Hartmann* unterstützen diese Theorie, da die Basenstapelung der dGC/CG-Stufe einer Doppelhelix, die primär intrahelical stapelt, eine schwache destabilisierende interhelicale Basenstapelungskomponente aufweisen soll[155]. Durch den Bindungsbruch zwischen G und C wären die Basen in der Lage eine günstigere Konformation anzunehmen und die destabilisierende Wirkung der interhelicalen Stapelung zu minimieren.

Diese Verhältnisse und die Turnerkorrektur sollten sich auch auf Slidomere übertragen lassen, die im Endeffekt eine Erweiterung eines termolekularen Komplexes zu einem multimolekularen Komplex mit entsprechend mehr Rückgratunterbrechungen darstellen. Bei der bislang vorgestellten Methode zur Berechnung des $\Delta G°$-Wertes des Slidomers werden für alle enthaltenen NN-Dimerduplexe die $\Delta G°$-Inkremente des NN-Modells verwendet, unabhängig davon, ob Brüche im Rückgrat vorliegen oder nicht. Mit dem von Turner gefundenen Wert für einen unterbrochenen Dimerduplex ist man nun in der Lage, zwischen Dimer-Duplexinkrementen mit und ohne Bruch zu differenzieren und die Berechnung der Slidomerstabilität zu korrigieren bzw. zu verfeinern (Abb. 8.27). Für eine nachträgliche Korrektur des berechneten $\Delta G°$-Wertes eines Slidomers genügt die Addition von z-2 Stabilitätsbeiträgen aus den Rückgrat-Unterbrechungen im Slidomer in Höhe von je $\Delta G_{Turnerkorrekturwert}$ = -1 kcal·mol^{-1} (Gleichung 8.10).

$$\Delta G°_{Slidomer+Turnerkorrektur} = \Delta G°_{Slidomer} + (z-2)\cdot\Delta G_{Turnerkorrekturwert}$$

Gleichung 8.10: $\Delta G°$-Wert eines Slidomers mit Turnerkorrektur, A-RNA und B-DNA

Für die Berechnung der $\Delta G°$-Werte wurden die Standardbedingungen für NN-Parameter verwendet (T = 37 °C, c(NaCl) = 1M), die eine vergleichende Abschätzung der Duplex- und Slidomerstabilitäten erlauben. Der Stabilitätsunterschied des Slidomers gegenüber den Duplexen wird zum einen absolut in $\Delta\Delta G°_{(Slidomer\text{-}Duplex)}$ aufgeführt, zum anderen über $\Delta\Delta G°_{(Slidomer\text{-}Duplex)}$ / $\Delta G°_{(Duplex)}$ in Prozent ermittelt, wobei für das Slidomer die Turner-korrigierten Werte verwendet werden. Die Anzahl der zu vergleichenden Bausteine wird auf 512 begrenzt, da höhere Werte keinen nennenswerten prozentualen Stabilitätszuwachs der Slidomer- gegenüber der Duplexform mehr erzielen und sich dieser asymptotisch einem Grenzwert annähert. Die Gleichgewichtskonstante K wird nach Gleichung 7.6 unter Verwendung von $\Delta\Delta G°_{(Slidomer\text{-}Duplex)}$ berechnet und vermittelt einen Eindruck, inwieweit sich der Stabilitätsunterschied auf die Population des Slidomers gegenüber den Duplexen auswirkt. Es folgt zunächst der Vergleich der Slidomere mit den Duplexen auf A-RNA-Basis.

Anzahl der Bausteine	$\Delta G°_{37°C,Slidomer}$ + Turnerkorrektur [kcal·mol^{-1}]	$\Delta G°_{37°C,}$ Duplexe [kcal·mol^{-1}]	$\Delta\Delta G°_{37°C}$ (Slidomer-Duplex) [kcal·mol^{-1}]	$\Delta\Delta G°_{(Slidomer-Duplex)}$ / $\Delta G°_{(Duplex)}$ in %	K Duplexe ⇄ Slido
Tetramer $r(CG)_2$					
2	2.16	-3.62	5.78	-159.7	$8.45\cdot10^{-5}$
4	-3.22	-7.24	4.02	-55.5	$1.47\cdot10^{-3}$
8	-13.98	-14.48	0.50	-3.5	0.44
16	-35.5	-28.96	-6.54	22.6	$4.06\cdot10^{4}$
32	-78.54	-57.92	-20.62	35.6	$3.40\cdot10^{14}$
128	-336.78	-231.68	-105.10	45.4	$1.16\cdot10^{74}$
512	-1369.74	-926.72	-443.02	47.8	$> 10^{300}$
Hexamer $r(CG)_3$					
2	-3.62	-9.40	5.78	-61.5	$8.45\cdot10^{-5}$
4	-14.78	-18.80	4.02	-21.4	$1.47\cdot10^{-3}$
8	-37.10	-37.60	0.50	-1.3	0.44
16	-81.74	-75.20	-6.54	8.7	$4.06\cdot10^{4}$
32	-171.02	-150.40	-20.62	13.7	$3.40\cdot10^{14}$
128	-706.70	-601.60	-105.10	17.5	$1.16\cdot10^{74}$
512	-2849.42	-2406.40	-443.02	18.4	$> 10^{300}$
Octamer $r(CG)_4$					
2	-9.40	-15.18	5.78	-38.1	$8.45\cdot10^{-5}$
4	-26.34	-30.36	4.02	-13.2	$1.47\cdot10^{-3}$
8	-60.22	-60.72	0.50	-0.8	0.44
16	-127.98	-121.44	-6.54	5.4	$4.06\cdot10^{4}$
32	-263.50	-242.88	-20.62	8.5	$3.40\cdot10^{14}$
128	-1076.62	-971.52	-105.10	10.8	$1.16\cdot10^{74}$
512	-4329.1	-3886.08	-443.02	11.4	$> 10^{300}$

Abb. 8.28: Vergleich der ΔG°-Werte für Slidomer und Duplexe für $r(CG)_x$ mit x=2-4

Aus den Daten in Abb. 8.28 wird ersichtlich, dass bereits ein aus 16 Bausteinen bestehendes Slidomer stabiler ist, als die entsprechende Menge von 8 Duplexen (Bereich grau hinterlegt). Diese Tendenz verstärkt sich noch mit zunehmender Anzahl der betrachteten Moleküle, so dass die Slidomerbildung gegenüber der Duplexbildung bevorzugt werden sollte. Die absoluten Stabilitätsdifferenzen $\Delta\Delta G°_{(Slidomer-Duplex)}$ zwischen Slidomeren und Duplexen bleiben bei gegebener Anzahl an Bausteinen, aber variierender Bausteinlänge gleich, da beide Komplexformen im selben Ausmaß von den zusätzlichen NN-Wechselwirkungen profitieren. Die Menge der slidomerstabilisierenden zusätzlichen Basenstapel und damit die

Stabilitätsdifferenz des Slidomers gegenüber den Duplexen ist demnach von der Anzahl der betrachteten Oligomere abhängig, nicht von der Bausteinlänge.

Die aus der absoluten Stabilitätsdifferenz ΔΔG° berechneten Gleichgewichtskonstanten machen deutlich, wie stark die Tendenz zur Slidomerbildung ist. Während das Gleichgewicht bei aus zwei Oligomeren bestehenden Slidomeren durch die fehlenden Basenpaarungen und Basenstapelungen gegenüber normalen Duplexen um den Faktor 10000 auf der Seite der Duplexe liegen sollte, so wäre das Verhältnis zwischen den Duplexen und aus acht Oligomeren bestehenden Slidomeren nahezu ausgeglichen. Bei Einbau weiterer Oligomere in das Slidomer wird das Gleichgewicht immer weiter auf Kosten der Duplexe in Richtung Slidomer verschoben, so dass bereits bei relativ kleinen, aus 16 Bausteinen bestehenden Slidomeren das Gleichgewicht um den Faktor 40000 auf Seite der Slidomere liegt. Durch die e-Funktion (Gleichung 7.6) wächst dieses Verhältnis exponential mit der Anzahl der Bausteine im Slidomer an.

Die Auftragung der prozentualen Stabilitätsdifferenzen des Slidomers gegenüber den Duplexen in Abhängigkeit von der Anzahl der betrachteten Bausteine verdeutlicht den Punkt, an dem das Slidomer stabiler als die entsprechenden Duplexe wird (Abb. 8.29).

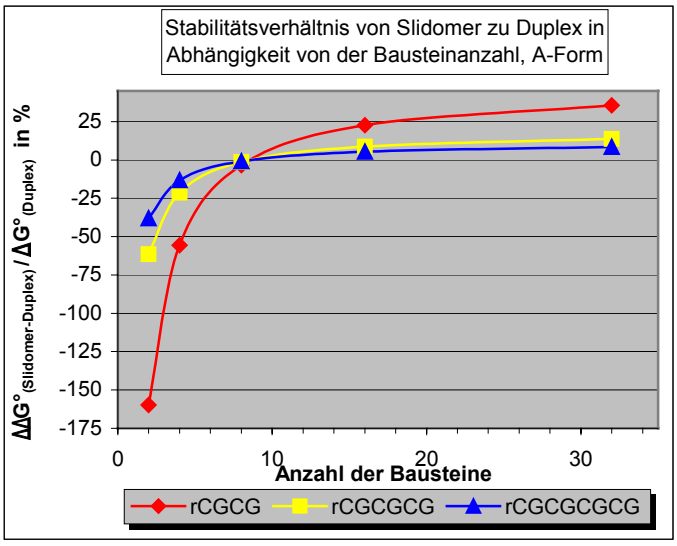


Abb. 8.29: Stabilitätsverhältnis des Slidomers zu Duplexen, A-Form

Bereits ab ca. 8 Bausteinen ist die Generierung eines Slidomers oder die Bildung von 4 Duplexen nahezu gleich favorisiert. Je länger das Slidomer wird bzw. je mehr Bausteine es enthält, desto deutlicher wird sein Stabilitätsvorteil, wobei dieser einem Grenzwert entgegenstrebt. Der Stabilitätsvorteil wird mit zunehmender Bausteinlänge aufgrund des

höheren Anteils 'normaler' NN-Wechselwirkungen zwar kleiner, die Gesamtstabilität des Slidomers bleibt aber immer über der der Duplexe. Der Vergleich der Slidomere mit den Duplexen auf B-DNA-Basis erfolgt analog zu den obigen Ausführungen und verwendet ebenfalls die Turner-Korrektur.

Anzahl der Bausteine	$\Delta G°_{37°C,Slidomer}$ + Turnerkorrektur [kcal·mol^{-1}]	$\Delta G°_{37°C}$ Duplexe [kcal·mol^{-1}]	$\Delta\Delta G°_{37°C}$ (Slidomer-Duplex) [kcal·mol^{-1}]	$\Delta\Delta G°_{(Slidomer-Duplex)}$ / $\Delta G°_{(Duplex)}$ in %	K Duplexe ⇄ Slido
Tetramer $d(CG)_2$					
2	0.22	-4.19	4.41	-105.3	$7.80\cdot10^{-4}$
4	-6.68	-8.38	1.70	-20.3	$6.34\cdot10^{-2}$
8	-20.48	-16.76	-3.72	22.2	$4.18\cdot10^{2}$
16	-48.08	-33.52	-14.56	43.4	$1.82\cdot10^{10}$
32	-103.28	-67.04	-36.24	54.1	$3.46\cdot10^{25}$
128	-434.48	-268.16	-166.32	62.0	$1.62\cdot10^{117}$
512	-1759.28	-1072.64	-686.64	64.0	$> 10^{300}$
Hexamer $d(CG)_3$					
2	-4.19	-8.6	4.41	-51.3	$7.80\cdot10^{-4}$
4	-15.5	-17.2	1.70	-9.9	$6.34\cdot10^{-2}$
8	-38.12	-34.4	-3.72	10.8	$4.18\cdot10^{2}$
16	-83.36	-68.8	-14.56	21.2	$1.82\cdot10^{10}$
32	-173.84	-137.6	-36.24	26.3	$3.46\cdot10^{25}$
128	-716.72	-550.4	-166.32	30.2	$1.62\cdot10^{117}$
512	-2888.24	-2201.6	-686.64	31.2	$> 10^{300}$
Octamer $d(CG)_4$					
2	-8.6	-13.01	4.41	-33.9	$7.80\cdot10^{-4}$
4	-24.32	-26.02	1.70	-6.5	$6.34\cdot10^{-2}$
8	-55.76	-52.04	-3.72	7.1	$4.18\cdot10^{2}$
16	-118.64	-104.08	-14.56	14.0	$1.82\cdot10^{10}$
32	-244.4	-208.16	-36.24	17.4	$3.46\cdot10^{25}$
128	-998.96	-832.64	-166.32	20.0	$1.62\cdot10^{117}$
512	-4017.2	-3330.56	-686.64	20.6	$> 10^{300}$

Abb. 8.30: Vergleich der ΔG°-Werte für Slidomer und Duplexe für $d(CG)_x$ mit x=2-4

Die Daten in Abb. 8.30 zeigen eine aufgrund der für B-DNA geringeren NN-Parameter erwartete leicht niedrigere Stabilität beider Komplextypen gegenüber gleich aufgebauten A-RNA-Komplexen. Indessen erscheint die gegenüber der A-Form stärkere Stabilisierung der Slidomere vor den Duplexen auf den ersten Blick überraschend, da die A-Form durch die

ausgeprägteren Unterschiede in der Basenstapelung eher zur Slidomerbildung neigen sollte (siehe Kap. 8.2.3). Bemerkenswert ist auch die bereits bei kleineren Bausteinzahlen als bei A-RNA eintretende Bevorzugung der Slidomere vor den Duplexen, die in der Auftragung der prozentualen Stabilitätsdifferenzen des Slidomers gegenüber den Duplexen in Abhängigkeit von der Anzahl der betrachteten Bausteine sichtbar wird (Abb. 8.31).

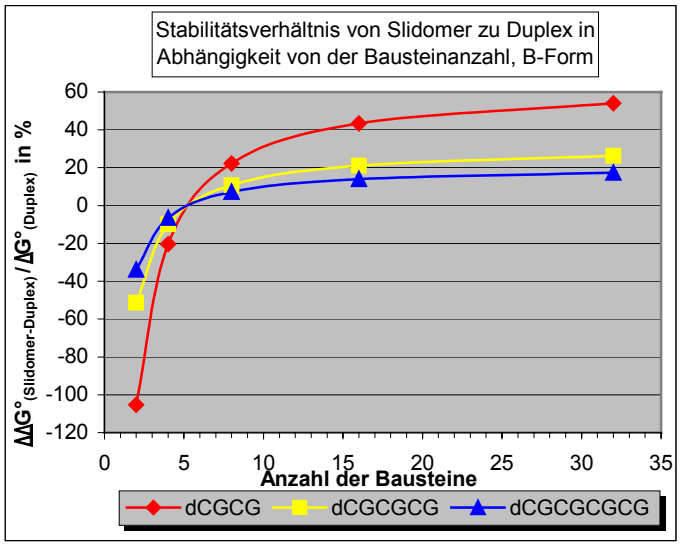


Abb. 8.31: Stabilitätsverhältnis des Slidomers zu Duplexen, B-Form

Hier wirkt sich insbesondere die im NN-Modell *SantaLucia's* für B-DNA gegenüber dem *Turner'schen* NN-Modell für A-RNA um ca. die Hälfte niedrigere Initiationsenergie $\Delta G°_{init\ G\text{-}C}$ von insgesamt 1.96 kcal·mol^{-1} pro Helixinitiation vorteilhaft auf die Slidomerbildungstendenz aus, da die Initiationsenergie wiederum mit dem Faktor z-1 in die Gesamtstabilität $\Delta G°$ des Slidomers eingeht. Insofern hat die Initiationsenergie, die den Entropieverlust durch die Komplexierung mehrerer Bausteine berücksichtigt, wesentlichen Einfluss auf die Gesamtstabilität eines Slidomers. Weil jedoch die NN-Modelle auf die Stabilitätsvorhersage von Duplexen und damit der Einbeziehung einer einzigen Helixinitiation ausgerichtet sind, ist eine größere Abweichung der Initiationsparameter zwischen den Modellen nicht erstaunlich, insbesondere, da bei längeren Duplexen die Initiationsenergie immer weniger ins Gewicht fällt. Außerdem wird die prinzipielle Längenabhängigkeit der Initiationsenergie in den NN-Modellen nicht berücksichtigt. Weiterhin ist nicht bekannt, ob und inwiefern sich die Initiationsenergie beim Aufbau eines Slidomers anstelle eines Duplex verändert. Demzufolge kann es sich bei den Stabilitätsvergleichen wie bereits angedeutet nur um Abschätzungen handeln, die jedoch sowohl für die A- als auch für die B-Form der Doppelhelix eindeutig die Slidomergenerierung der Duplexbildung bevorzugen.

8.2.6 Diskussionszusammenfassung der Einzelreaktionskinetiken

Das Ausbleiben von positiven Templateffekten bei den Kinetiken des CG-Systems mit einseitig geschlossenen Bausteinen deutet unter Berücksichtigung des RY- und NN-Modells, sowie quantitativer thermodynamischer Abschätzungen auf die Bildung von hochmolekularen Aggregaten, sogenannten Slidomeren hin, die gegenüber normalen Duplexen und damit auch gegenüber den thermodynamisch noch ungünstigeren termolekularen Komplexen bevorzugt sind. Eine Oligomerisierungsbeschleunigung des offenen CG-Systems sollte demnach über diesen Komplextyp ablaufen und wird im folgenden Kapitel näher betrachtet.

8.3 Untersuchung des offenen CG-Systems

Da man aufgrund der Diskussion der Kinetiken mit einseitig geschlossenen Bausteinen und den Beobachtungen an ähnlichen Oligomeren annehmen kann, dass das CG-System prinzipiell zur Slidomerbildung neigt, sollte auch beim offenen System eine starke Tendenz zur Generierung der hochmolekularen Aggregate vermutet werden können, die in den folgenden Untersuchungen überprüft wird.

8.3.1 Die Struktur gemischter Slidomere

Die bislang betrachteten Slidomere bestanden lediglich aus ein bis drei Bausteinsorten mit festgelegter Länge. Im Laufe der Oligomerisierungsreaktion eines offenen Systems entsteht dagegen eine Vielzahl an unterschiedlich langen Bausteinen, die einen enormen Variantenreichtum an Slidomeren zur Folge haben können. Aus diesem Grunde ist eine erweiterte Strukturtheorie für Slidomere in offenen Systemen zu formulieren, die die zusätzlichen Komplexe berücksichtigt und beschreibt, wobei nur die wichtigsten Slidomervarianten schematisch als Ausschnitte oder Kurzformen angedeutet werden können. Demnach lassen sich theoretisch zwei verschiedene Grundstrukturen gemischter Slidomere unterscheiden, die in Abb. 8.32 am Beispiel eines kurzen, aus je zwei 4, 6 und 8meren aufgebauten Slidomerausschnitts dargestellt werden.

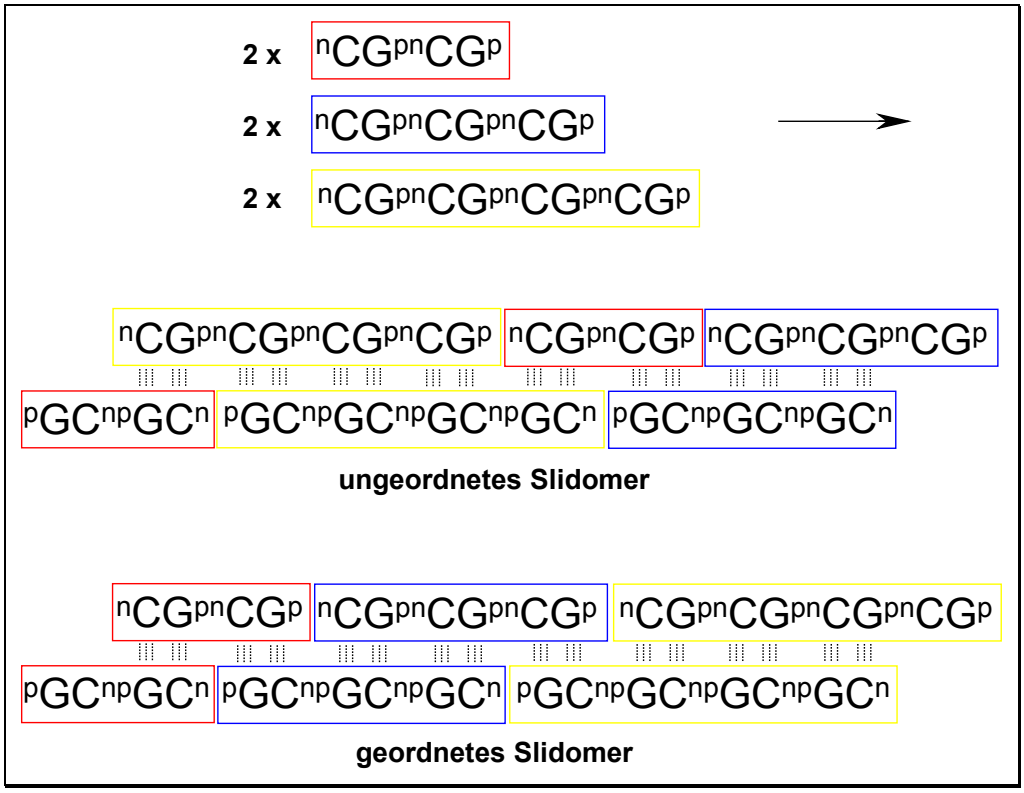


Abb. 8.32: Ausschnitte aus ungeordneten und geordneten Slidomeren mit gleicher Zusammensetzung

Zum einen könnte man von einem zufällig zusammengesetzten, ungeordneten Slidomer ausgehen, dessen Bausteine einzeln nacheinander in den Komplex eingefügt werden. Diese Form der Slidomerbildung hat jedoch den Nachteil, dass während des sequenziellen Aufbaus immer wieder Enden mit mehr als zwei ungepaarten und ungestapelten Basen entstehen, die energetisch ungünstig sind. Zum anderen besteht die Möglichkeit eines geordneten Slidomers, das sich aus einzelnen Slidomer-Duplexen (farblich gekennzeichnet) zusammensetzt und damit nie Enden besitzt, die mehr als zwei ungepaarte Basen aufweisen. Die Slidomer-Duplexe können wiederum bildlich gesehen durch einen Verschiebevorgang ('sliding') aus primär gebildeten normalen Duplexen entstehen. Auch die Hybridisierung der überhängenden Enden zweier bereits existierender längerer Slidomere unter Ausbildung eines vereinigten, entsprechend größeren Slidomers ist denkbar.

Letztendlich ist das ungeordnete Slidomer thermodynamisch ebenso stabil, wie die geordnete Variante gleicher Zusammensetzung. Die 'Intermediate' bzw. nicht vollständigen Komplexe mit mehr als vier ungepaarten Basen sind jedoch thermodynamisch ungünstiger, so dass die Bildung des ungeordneten bzw. unregelmäßigen Aggregats unwahrscheinlicher sein sollte. Eine quantitative Aussage darüber, ob und in welchem Ausmaß ungeordnete Slidomere gebildet werden, ist an diesem Punkt jedoch nicht möglich.

Bei einer derart dynamischen hochmolekularen Komplexform wie dem Slidomer ist es schwierig zwischen Intermediaten und einem vollständigen Komplex zu differenzieren, da ein Slidomer streng genommen erst dann vollständig wäre, wenn sämtliche in Lösung vorhandenen Oligomere ab dem 4mer in einem einzigen Aggregat eingebaut wären. Die normale Komplexdissoziation wird aber dafür sorgen, dass bereits gebildete Slidomere entweder durch Verlust eines überbrückenden Bausteins (Abb. 8.33 oben) oder an den gestaffelten Lücken des Rückgrates in zwei kürzere Slidomere zerbrechen (Abb. 8.33 unten), die wiederum als Basis für den weiteren Einbau von Oligomeren dienen können.

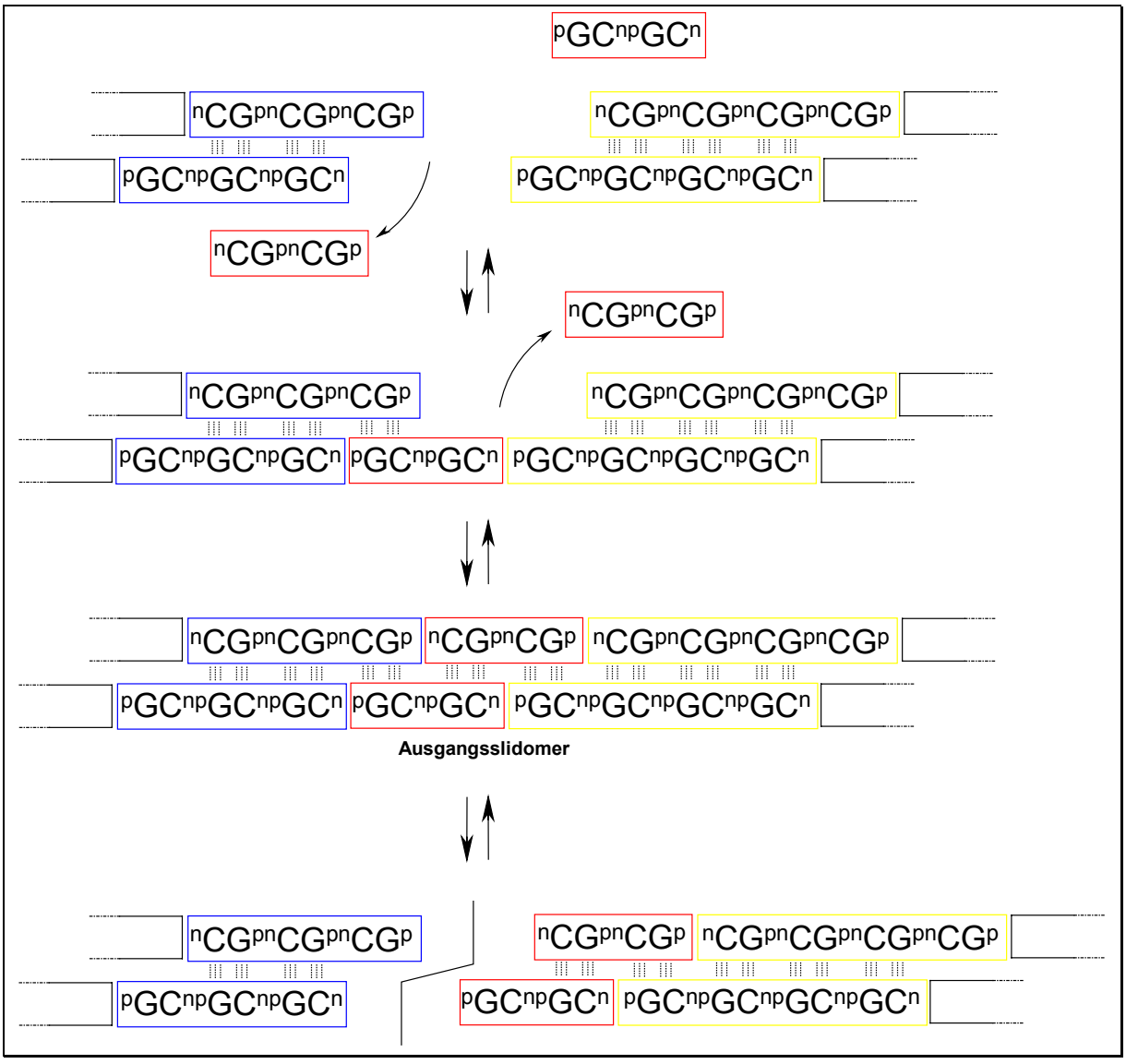


Abb. 8.33: Zerfall eines geordneten Slidomers - oben: konsekutive Dissoziation, unten: einmalige Dissoziation

Dabei wird die Dissoziation von Bausteinen mit steigender Länge bzw. Anzahl an Basenpaarungen aufgrund der zunehmenden Duplexstabilität gegenüber dem kompletten

Dissoziationsbruch des Slidomers an den gestaffelten Unterbrechungen des Rückgrates immer unwahrscheinlicher, so dass letztere im Laufe der Reaktion zu einer Art Sollbruchstelle des Slidomers werden.

Da die endständigen Oligomere aufgrund der geringenen Basenstapelungen nicht so stark von den thermodynamischen Vorteilen des Slidomereinbaus profitieren, wie die Oligomere innerhalb des Slidomers, ist eine Dissoziation dieser am wenigsten stabilisierten Bausteine gegenüber den zentralen Bausteinen bei gleicher Oligomerlänge auch am wahrscheinlichsten. Die stärkste Oligomer-Fluktuation im Slidomer sollte demnach an den Enden stattfinden. Während der Oligomerisierung in einem offenen System befinden sich Slidomere durch die Zuführung neuer, längerer Bausteine und durch die stetigen Konzentrationsveränderungen der Oligomere ständig im Wandel, sowohl in der Länge, als auch in der Zusammensetzung. Abb. 8.34 zeigt das Schema eines kurzen geordneten Beispiel-Slidomerkomplexes (blaue Basen: C, rote Basen: G).

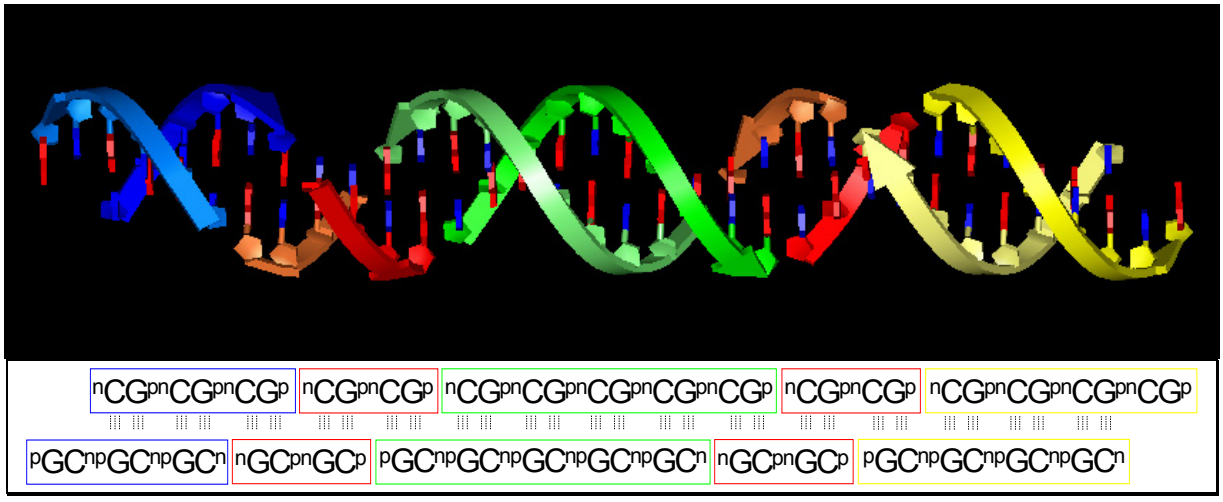


Abb. 8.34: Schema eines gemischten, geordneten Slidomers

Zum Beginn der Oligomerisationsreaktion ist allein das Dimer als Edukt in Lösung vorhanden. Sobald über den spontanen Reaktionskanal aus der Kondensation zweier Dimere die ersten Tetramere entstanden sind, können diese bereits Slidomerstrukturen ausbilden, wobei deren Länge mit der Menge an verfügbarem Tetramer korrelieren sollte. Das Dimer ist zu diesem Zeitpunkt jedoch noch das Oligomer mit der höchsten Konzentration. Dessen Einbau ist in einem Slidomer aus Tetrameren oder einem geordneten Slidomer mit längeren Bausteinen nur endständig möglich und führt zu einem Abbruch der Slidomerverlängerung und damit eher zur Bildung von vielen kürzeren Slidomeren (Beispiel in Abb. 8.35). Die endständigen Dimere sind aber diejenigen Bausteine eines Slidomers, die am wenigsten

stabilisiert sind und damit die höchste Dissoziationstendenz besitzen, so dass andere Oligomere deren Platz einnehmen können. Infolgedessen werden auch diese kürzeren, vorübergehend endständig blockierten Slidomerkomplexe langfristig wachsen.

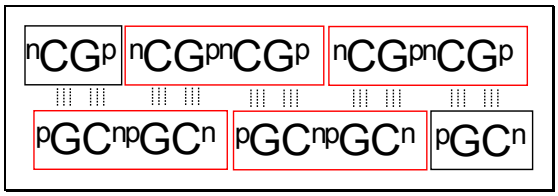


Abb. 8.35: Tetramer-Slidomerbeispiel aus 4 Tetrameren mit endständig hybridisierten Dimeren

Innerhalb eines ungeordneten Slidomers, dessen Bildung erst ab dem Auftreten von Hexameren realisierbar ist, wäre auch der Einbau von Dimeren innerhalb des Slidomers mit fortschreitender Verlängerung denkbar, jedoch unwahrscheinlicher, da auch hier die Existenz von intermediären Slidomerenden mit mehr als zwei ungepaarten Basen vorausgesetzt wird (Beispielslidomer in Abb. 8.36).

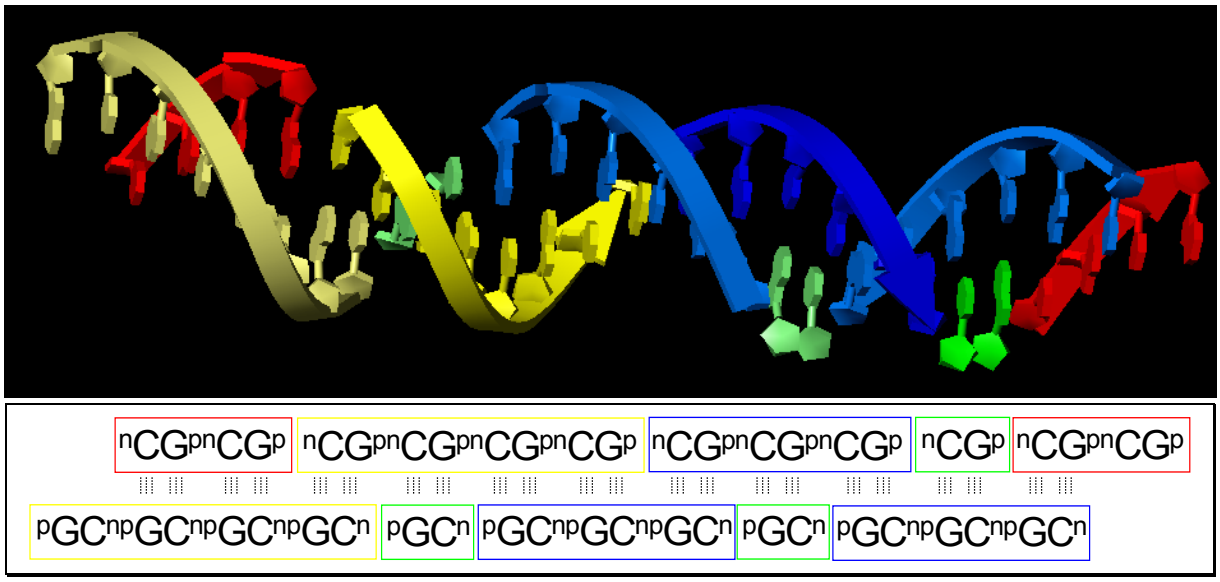


Abb. 8.36: Schema eines gemischten, ungeordneten Slidomers

Theoretisch sind auch eine ganze Reihe weiterer Strukturen von Slidomeren aus dem DNA/RNA-Strukturfundus denkbar, wie z.B. Hairpin-loops, Bulbs oder plasmidartige Ringe, die zwar aufgrund des dynamischen Austausches der beteiligten Bausteine durch Dissoziation nicht lange Bestand haben sollten, aber intermediär möglich sind. Je länger die Oligomere im Reaktionsverlauf werden, desto wahrscheinlicher und stabiler werden derartige Strukturen, die u.U. neue katalytische Funktionalitäten erzeugen könnten.

8.3.2 Die Ligation innerhalb von Slidomeren

Im Gegensatz zur spontanen Ligation zweier Oligomere, die auf einem 2-Teilchenstoß basiert und deren Übergangszustand höchstens durch Basenstapelung der dem Reaktionszentrum benachbarten Basen stabilisiert wird, liegt ein aktiviertes Oligomer innerhalb der Doppelhelix eines Slidomerkomplexes aufgrund der stärkeren Wechselwirkungen wesentlich länger in direkter Nachbarschaft eines Reaktionspartners und in optimaler Konformation zur Ausbildung einer Phosphoamidatbindung, so dass das Auftreten von Slidomeren eine Beschleunigung der Oligomerisierung zur Folge haben sollte.

Die Bildung von Komplexen wird hierbei durch die prinzipiell sterisch anspruchsvollen EDC-aktivierten Phosphatgruppen offenbar nicht gestört[130,166]. Unterstützung erfährt diese Annahme durch thermodynamische Untersuchungen von *Mirzabekov et al.*[140], der auch bei der Einführung von zwei Phosphatgruppen an den beiden Nucleotiden links und rechts der Unterbrechungstelle eines termolekularen Komplexes keinen Einfluss auf die Basenstapelung der benachbarten Basen feststellen konnte, wofür auch die exponierte Lage des Rückgrates am Rand der Doppelhelix verantwortlich sein dürfte.

Das Slidomer bietet, neben der spontanen Ligation mit einem einzelnen Baustein ohne Hybridisierung, mehrere Formen der Ligation im Komplex an. Zunächst ist zu klären, wie sich aktivierte Bausteine im Slidomer verhalten können. Da nur ein geringer Prozentsatz der in Lösung vorhandenen Nucleotide durch EDC aktiviert vorliegt[122,134] und somit auch nur ein kleiner Teil der Bausteine im Slidomer zur Ligation befähigt ist, sollte die sofortige Ligation aller in das Slidomer eingefügten Oligomere und damit der vorwiegende Aufbau einer unterbrechungsfreien DNA-Doppelhelix auszuschließen sein. Bei einer solchen kontinuierlichen Kettenverlängerung müssten zudem hauptsächlich längere Oligomere als Reaktionsprodukte zu finden sein, was nicht der Fall ist.

Daher kann man innerhalb eines Slidomers mit einem geringen Anteil aktivierter Oligomere rechnen, die mit ihrem jeweiligen Nachbarn in einer Kondensationsreaktion zu einem entsprechend längeren Oligomer abreagieren (Abb. 8.37).

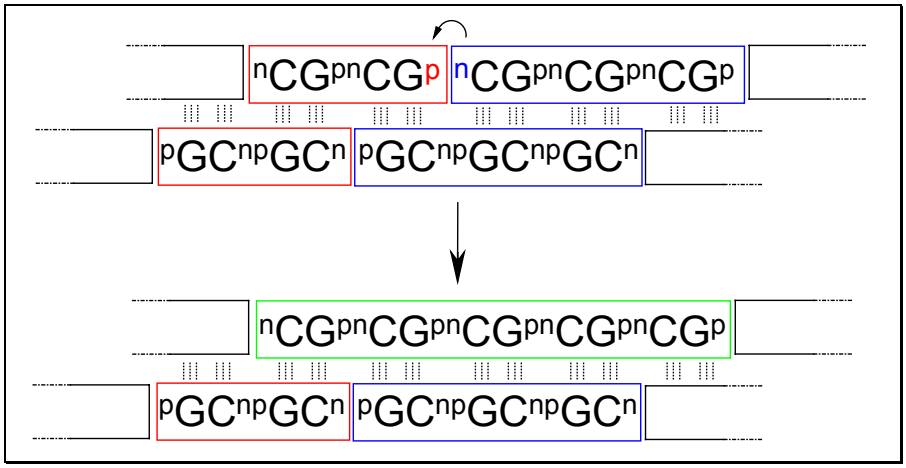


Abb. 8.37: Ligation innerhalb eines Slidomers. Rotes p: EDC-aktivierter Phosphatrest.

Geht man von einem geordneten Slidomer aus, so wird sich am Anfang der Oligomerisierung aufgrund der hohen Dimerkonzentration vorwiegend aktiviertes Dimer an den Enden der Slidomere anlagern und mit den dort befindlichen Bausteinen kondensieren. Abb. 8.38 zeigt eine Beispielkondensation zweier Dimere mit einem kurzen Slidomer, die real in Einzelschritten von statten geht, da eine synchrone Anlagerung zweier aktivierter Dimere infolge des geringen Aktivierungsgrades unwahrscheinlich ist.

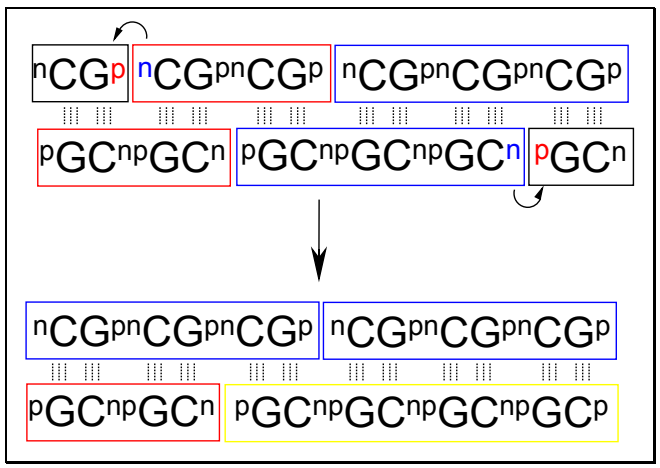


Abb. 8.38: Dimereinbau im geordneten Slidomer führt zu blunt-ends

Es verdeutlicht aber, dass nach der Ligation des Dimers mindestens ein Ende 'stumpf' (*blunt-end*) und nicht mehr in der Lage ist, weitere Oligomere anzulagern. Da aber gerade die Moleküle der Slidomerenden die stärkste Dissoziationsneigung des Komplexes aufweisen sollten, können derartige für das Slidomerwachstum blockierte Enden entweder durch Dissoziation der beiden endständigen Oligomere oder durch kompletten Dissoziationsbruch entlang der gestaffelten Unterbrechungen des Rückgrats wieder befreit werden (vgl.

Dissoziation und Bruch innerhalb des Slidomers, Abb. 8.33). Mit zunehmender Oligomerlänge sollte die Dissoziation einzelner Bausteine in den Hintergrund treten, so dass Bruch und Dissoziation des aus zwei ungleich langen Nucleotiden bestehenden stumpfen Endes bevorzugt werden sollte, dessen beiden Bausteine anschließend nach Dissoziation mit entsprechend gleich langen Oligomeren neue, stabilere Slidomer-Duplexe ausbilden können. Je mehr Dimer jedoch abreagiert ist, desto weniger stumpfe Enden werden generiert, so dass das Phänomen der Slidomerenden-Blockierung im Verlauf der Reaktion immer unbedeutender wird und die Slidomerbildung nicht mehr stören sollte.

8.3.3 Aktivierung, Reaktivierung und Katalyse in Slidomeren

Durch die regen Austauschprozesse und den Zerfall der längeren Slidomere in kürzere Formen ist eine Dynamik gegeben, die den ständigen Einbau aktivierter Bausteine in Slidomere erlaubt und damit die Oligomerisierung aufrechterhält. Würden sich die Slidomere statisch verhalten und keinerlei Neuordnung ihrer Struktur durchführen, würden lediglich die bereits im Slidomer befindlichen aktivierten Spezies abreagieren und die Oligomerisierung ab dem Einbau aller Bausteine in Slidomere zum Stillstand kommen. Die beobachtete vollständige Abreaktion kürzerer Bausteine im Laufe der Reaktion hin zu längeren Oligomeren widerlegt das statische Modell (siehe auch Abb. 8.66, Kap. 8.6).

Alternativ wäre ein Aktivierungsschema zu diskutieren, das von einer Aktivierung der Bausteine innerhalb der Slidomere ausgeht und damit von deren Zerfallsprozessen unabhängig wird. Diese Form der Phosphataktivierung würde eine deutlich geringere EDC-Hydrolyse und damit vor dem Hintergrund des EDC-Verbrauchs höhere Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge haben, weil mit der Aminogruppe des benachbarten Nucleotids der Reaktionspartner in unmittelbarer Nähe wäre und die Ligation sehr viel schneller von statten ginge, als wenn sich ein entsprechender Reaktionspartner erst noch anlagern müsste. Da die größere räumliche Abschirmung der Phosphatgruppen im Slidomer trotz ihrer randnahen Positionierung in der Doppelhelix diesen Aktivierungsweg gegenüber unblockierten Phosphaten unwahrscheinlicher werden lässt, findet die Aktivierung wahrscheinlich maßgeblich an den Slidomerenden sowie den freien Oligomeren statt. Beide vorgestellten Aktivierungswege sind prinzipiell möglich, aber nicht quantifizierbar (Abb. 8.39).

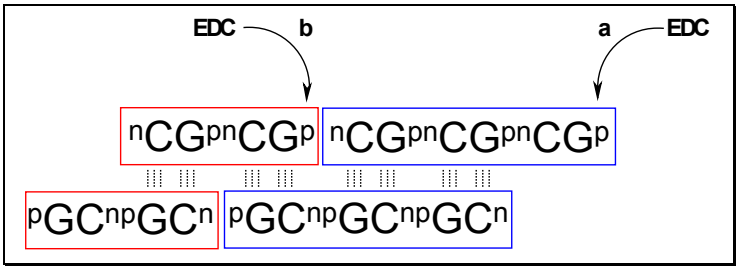


Abb. 8.39: Aktivierung der endständigen (a) oder inneliegenden (b) Bausteine des Slidomers

Je weiter die Oligomerisierung voranschreitet und je länger die gebildeten Oligomere unter Verbrauch der kürzeren Bausteine werden, desto stabiler werden auch die resultierenden geordneten Slidomere bzw. desto größer wird ihr katalyseartiger Einfluss. So würde theoretisch ein B-DNA Beispiel-Slidomer aus 16 reaktionsfähigen Tetrameren nach vollständiger interner Ligation zu 8 Octameren nach Kap. 8.2.5 einen Stabilitätszuwachs über 7.68 kcal·mol^{-1} von $\Delta G°_{37°C}$(Tetramer-Slidomer) = -48.08 kcal·mol^{-1} auf $\Delta G°_{37°C}$(Octamer-Slidomer) = -55.76 kcal·mol^{-1} infolge der günstigeren Entropieverhältnisse erfahren (Abb. 8.40).

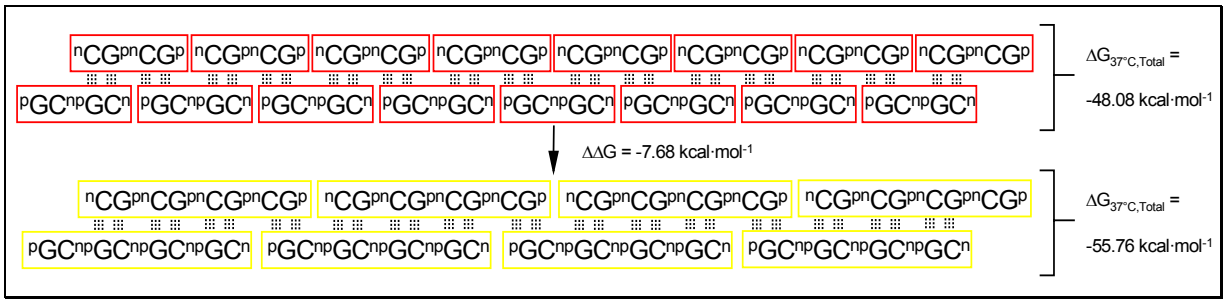


Abb. 8.40: Stabilitätsgewinn durch fortschreitende Oligomerisierung

Die Tendenz zur Slidomerbildung aus längeren Molekülen und somit zur Reaktionsbeschleunigung steigt damit. Dem gegenüber steht die Abnahme von potenziellen Templatbausteinen mit einer Länge größer oder gleich dem Tetramer durch Kondensation zweier kürzerer zu einem längeren Oligomer, die spätestens dann auftritt, wenn das dimere Edukt aufgebraucht ist und keine Tetramere mehr generiert werden können. Ohne Eduktnachschub existiert also ein Zeitpunkt, an dem die Konzentration der Templatmoleküle ab dem 4mer maximal ist und danach stetig abnimmt. Nach der Ligation zweier Bausteine zu einem längeren Baustein könnte das Slidomer an dieser Stelle dissoziieren und 3 Oligomere freisetzen, die wiederum in Slidomere integriert werden können. Das neu gebildete lange Oligomer wird die Stabilität des Slidomers, in dem es eingebaut wird, im Vergleich zu den beiden Bausteinen, aus denen es entstanden ist, erhöhen. Es verbleibt zeitlich länger im

Slidomerkomplex, wodurch seine Templatwirkung größer, als die eines kurzen Templates ist. Damit existieren zwei gegenläufige Effekte: Im Reaktionsverlauf sinkt die Templatanzahl bei gleichzeitig steigender Templatlänge. Der 'Verlust' an Templaten dürfte aber keine übermäßig starken Auswirkungen haben, da der größte Teil, insbesondere der längeren Oligomere, ohnehin in Slidomerkomplexen gebunden sein sollte, die durch die Kondensationen längere Template bilden, die wiederum das Slidomer stabilisieren und damit umso besser weitere Ligationen begünstigen oder selbst als Edukt für Ligationen wirken können.

Gleichzeitig ist der Stabilitätsvorteil der Slidomere gegenüber den entsprechenden normalen Duplexen zwar stetig existent, wird aber mit steigender Nucleotidlänge immer geringer (siehe Kap. 8.2.5.), da die slidomerstabilisierende Basenstapelung über gestaffelte Enden unverändert bleibt und gegenüber der Stabilisierung des Slidomers durch die Hybridisierung zunehmend längerer Oligomere an Bedeutung verliert. Die Folge wäre eine Gleichgewichtsverschiebung zur Duplexform und damit ein schwächer ausgeprägtes Slidomerbildungsverhalten.

An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass der Begriff der Katalyse für ein als Templat wirkendes Oligomer innerhalb eines Slidomers zwar zutrifft, nicht jedoch für das gesamte Slidomer, da dieses im Verlauf einer Ligationsreaktion geringfügig verändert wird und damit nicht mehr exakt der Definition eines Katalysators entspricht, der den zu katalysierenden Vorgang unverändert überstehen sollte. Aus diesem Grunde wird im folgenden der ligationsbeschleunigende, katalyseartige Einfluss eines Slidomers als Slidomereffekt beschrieben bzw. der Begriff der 'Katalyse' im Zusammenhang mit Slidomeren in Hochkommas gesetzt.

Im Reaktionsverlauf sollten die oben beschriebenen Effekte entsprechende beschleunigende bzw. bremsende Einflüsse auf die Oligomerisierungsgeschwindigkeit haben, die zu Beginn der Reaktion herrscht, wobei eine Abschätzung des Ausmaßes schwierig sein dürfte. Der hohe Oligomerisierungsgrad, der trotz zwangsläufig sinkender Gesamtkonzentration der Bausteine und des Aktivators EDC bei den Experimenten beobachtet wurde, spricht jedoch dafür, dass die katalyseartige Wirkung zumindest nicht gravierend abnimmt.

Einhergehend mit der zunehmenden Bausteinlänge und der steigenden Stabilität der Slidomere wird der Aktivierungspfad über freie Moleküle an Bedeutung verlieren, weil das Gleichgewicht zwischen freien und im Slidomer gebundenen Molekülen auf die Seite des Slidomers verschoben wird. Demnach wird die Aktivierung verstärkt an den Enden bestehender Slidomere oder aber an den Bausteinen innerhalb des Slidomers anstelle an den freien Molekülen stattfinden. Da die in Kap. 8.3.1 angesprochenen 'Sollbruchstellen' des Slidomers an den gestaffelten Unterbrechungen des Rückgrats über die gesamte Reaktion die gleiche Stabilität besitzen, sollte aber auch in späteren Phasen der Oligomerisierung die Möglichkeit des Bruchs und damit der Aufspaltung in zwei kürzere Slidomere sowie deren Aktivierung an den neu entstandenen Enden bestehen.

Durch ihre außergewöhnlichen Eigenschaften sind Slidomere in der Lage auch dann noch ligationsbeschleunigende und reaktionsfähige Komplexe auszubilden, wenn die Produkte anderer Komplexformen wie z.B. termolekularer Komplexe aufgrund ihres herkömmlichen Duplexierungsverhaltens nur noch katalytisch inaktive Duplexe aus Templat und Produkt generieren können. *Von Kiedrowski* bemerkt hierzu, dass bei Replikation über termolekule Komplexe die Dissoziation der Templatduplexe mit zunehmender Oligomerlänge geschwindigkeitsbestimmend wird[133]. Dahingegen können auch aus langen Oligomeren bestehende Slidomere reaktive Komplexe bilden und die Synthese längerer Produkte begünstigen. *Orgel* deutete das katalytische Potenzial von Slidomeren für die templatabhängige Replikation an, wies aber darauf hin, dass auf diesem Wege exponentielles Wachstum nicht erreichbar sei, sehr wohl aber eine Form des 'multiplikativen Wachstums', wobei er jedoch lediglich Slidomere aus vier Bausteinen betrachtete[69]. Der Inaktivierung des für die Katalyse zur Verfügung stehenden Templats durch Duplexbildung mit anderen Templat- oder Produktbausteinen könne bei Auftreten von Slidomeren somit entgegen getreten werden. Diese Art der unbegrenzten Kettenverlängerung sei den herkömmlichen templatbasierten Replikationsmethoden bezüglich der Templataktivität langfristig überlegen.

8.3.4 Kinetische Experimente am offenen CG-System

Der Einsatz von unreaktivem Templat soll experimentell klären, ob die postulierte Slidomerbildung beim offenen System ebenfalls bestätigt werden kann oder ob anders geartete, z.B. termolekulare Komplexe vorliegen, sowie welchen Einfluss die Templatzugabe auf die Oligomerisierung hat. Hierzu werden die bereits bei den Einzelreaktionskinetiken verwendeten Tetramer-, Hexamer-, Octamer-Template $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$, $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$ und $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$

mit dem offenen Dimer $^{n}CG^{p}$ zur Reaktion gebracht. Desweiteren wird der Einfluss der Zugabe des offenen Tetramers $^{n}(CG)_2{}^{p}$ untersucht, das gleichzeitig als Edukt und Templat dienen kann und dem ersten Reaktionsprodukt der Ligation zweier Dimere $(^{n}CG^{p})_2$ entspricht. Eine Übersicht der Kinetiken bietet die Tab. 8.3.

Oligo 1	Templat/Oligo 2	Temp.	c(EDC)	Puffer
20mM $^{n}CG^{p}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES
20mM $^{n}CG^{p}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES
20mM $^{n}CG^{p}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES
20mM $^{n}CG^{p}$	+ 0, 7.5, 15, 30% $^{n}(CG)_2{}^{p}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES

Tab. 8.3: Kinetiken des offenen CG-Systems

8.3.5 Kinetik des Systems $^{n}CG^{p}$ + $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$

Die Zugabe von tetramerem Templat $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$ sollte bei Existenz von Slidomerem im offenen System so gut wie keine Auswirkung auf die Bildung des tetrameren Produkts $(^{n}CG^{p})_2$ haben, da die für eine Reaktionsbeschleunigung notwendigen termolekularen Komplexe nicht ausgebildet werden könnten. Damit würde $(^{n}CG^{p})_2$ ausschließlich über den spontanen Reaktionskanal und die in Abb. 7.19, Kap. 7.4 vorgestellten möglichen Komplexe aus zwei Dimer-Duplexhelices entstehen. Zur Überprüfung der Slidomerhypothese wurde $^{n}CG^{p}$ mit steigenden Konzentrationen von $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$ bei 2 °C unter folgenden Bedingungen umgesetzt.

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}CG^{p}$	**c(Edukt)**	20 mM
Templat	$^{HO}(CG)_2{}^{OH}$	**c(Templat)**	0 / 2 / 4 / 8 mM
c(EDC)	0.4 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2 °C	**HPLC-Säulentyp**	Mini Q IE
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	0.2 µl	**Elutionssystem**	$HClO_4/NaClO_4$

Die Chromatografie erfolgte auf einer Mini Q Ionenaustauschersäule, die eine Grundlinientrennung der eingesetzten Moleküle und der Produkte erlaubte. Der Beispiel-Stackplot in Abb. 8.41 zeigt die Oligomerisierung während der ersten 60 min bei Zugabe von 20% $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$-Templat. Die leichten Nachpeaks dieser Messreihe sind, wie in Kap. 8.1.2 beschrieben, auf das Ionenaustauschermaterial zurückzuführen.

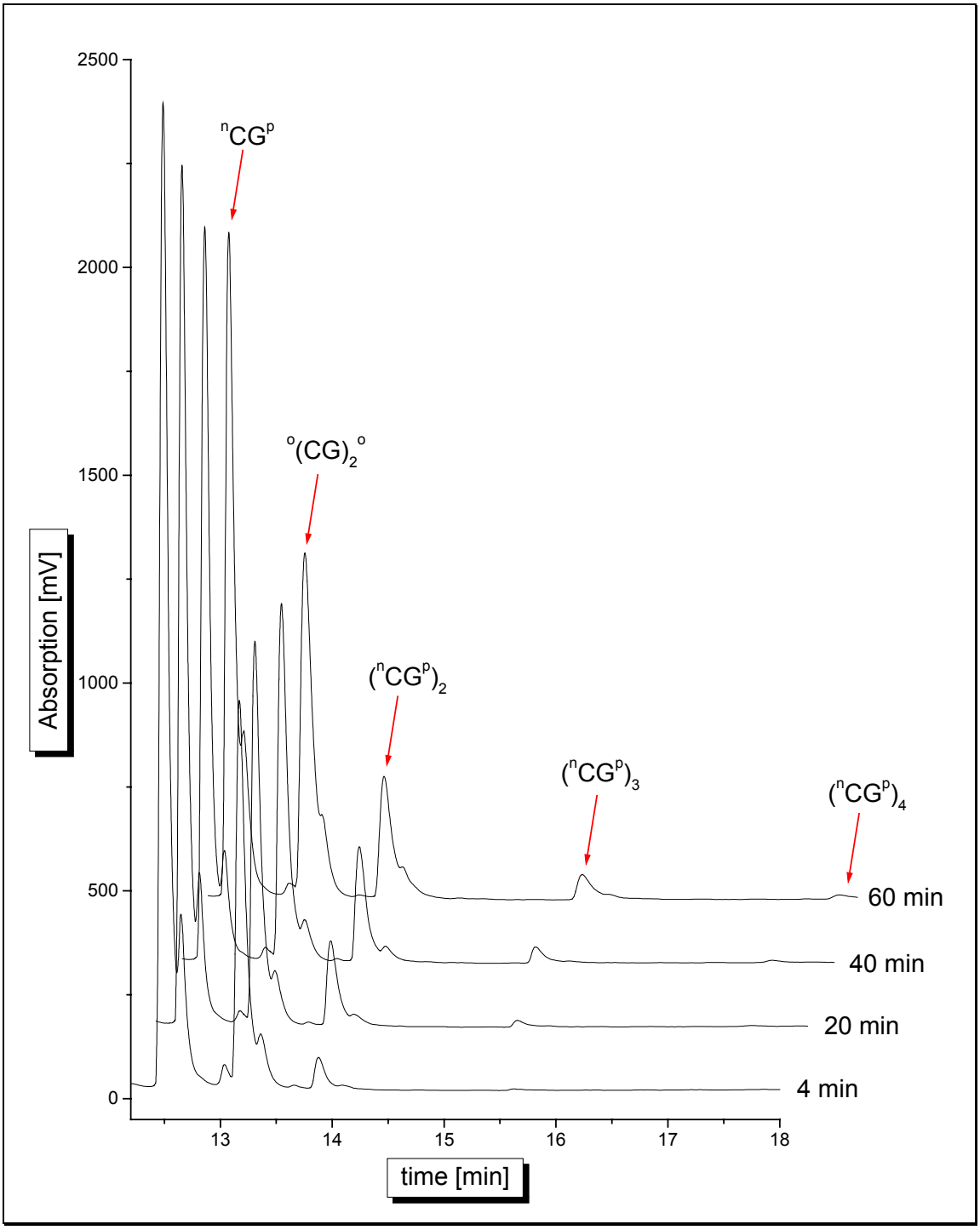


Abb. 8.41: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}CG^{p}$ 20 mM + $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$ 4 mM, 0.4M EDC, 2 °C

Die Auftragung der Konzentrations-Zeit-Kurven der Tetramerbildung bei unterschiedlichen Templatkonzentrationen bestätigt die vermutete Templatunabhängigkeit und unterstützt damit die Slidomertheorie. Die etwas aus dem Rahmen fallende Tetramerbildungskurve bei 40% Templat (rot) ist auf eine um etwa 10% höhere Dimerausgangskonzentration zurückzuführen, die sich auf die Bildung aller Oligomerisationsprodukte dieses einen Experimentes auswirkt. Bei Angleichung der Dimerkonzentration an die anderen Eduktkonzentrationen würde die

Tetramerbildungskurve auf gleicher Höhe wie die übrigen drei Produktkurven liegen. Eine Reaktionsbeschleunigung über termolekulare Komplexe hätte zudem deutlichere Differenzen in der Tetramerbildungsrate zwischen den Kurven zur Folge, wenn der autokatalytische Reaktionskanal schneller als der spontane Reaktionskanal ist, wovon man bei Selbstreplikationssystemen auf Phosphoamidatbasis über termolekulare Komplexe ausgehen kann[36].

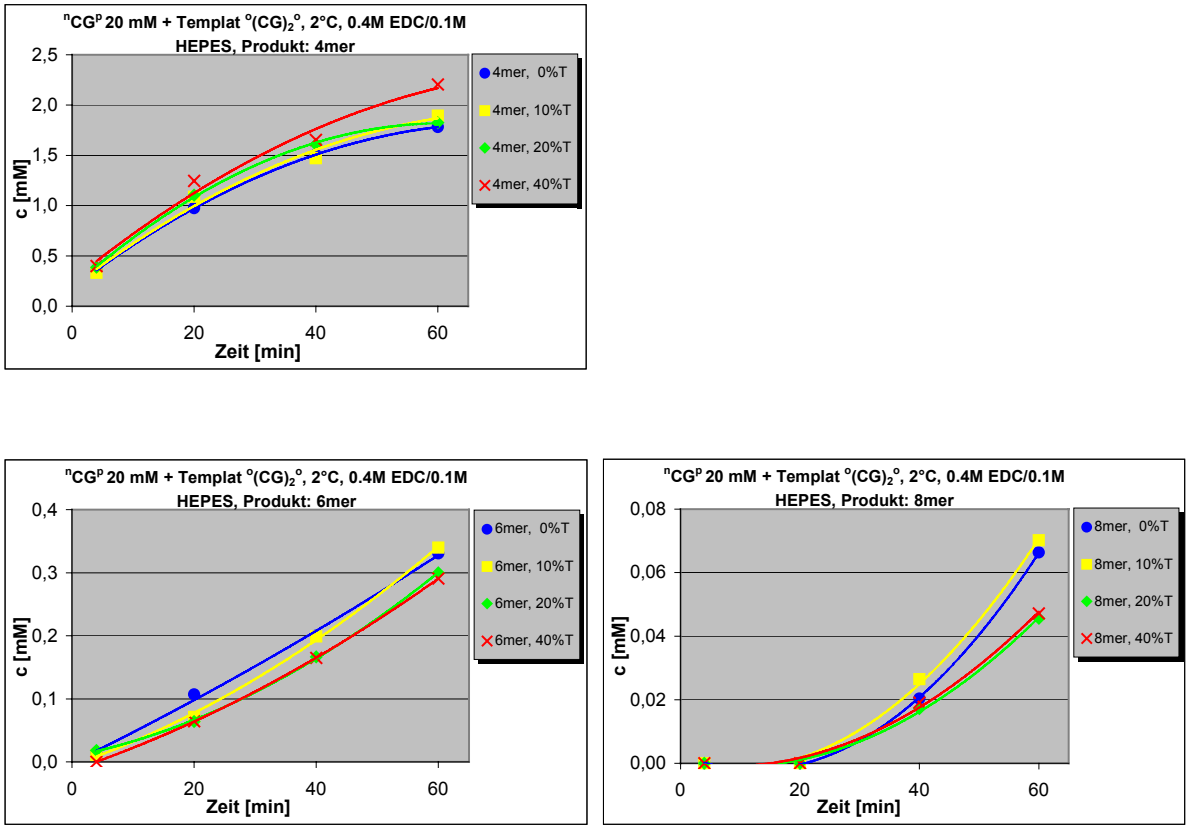


Abb. 8.42: Konzentrations-Zeit-Kurven der $(^{n}CG^{p})_{x}$-Oligomere bei 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_{2}{}^{OH}$-Templatzugabe

Die Bildungskurven des 6mers liegen ebenfalls nahe beieinander, wobei sich bei Erhöhung der Templatkonzentration auf 20% ein Trend andeutet, der sich bei der 8mer Bildung noch stärker beobachten lässt: Die Synthese höherer Oligomere scheint bei hoher Zugabe des inerten Tetramer-Templats gebremst zu werden. Die Bildungskurve bei 40% Templatzugabe sollte aufgrund der höheren Eduktkonzentration bei Angleichung theoretisch noch niedriger liegen als die Kurve bei 20% Templatzugabe und damit den Trend bestätigen.

8.3.5.1 Effekte der Integration von unreaktivem Templat in die Slidomerstruktur

Obiges Verhalten könnte mit dem Aufbau von Slidomeren aus unreaktivem $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$-Templat erklärt werden. Entstehendes reaktionsfähiges $(^{n}CG^{p})_2$-Tetramer würde in ein solches Aggregat eingebaut werden und falls es nicht schnell genug mit einem weiteren Baustein zu höheren Oligomeren wie dem 6mer oder 8mer abreagiert, wird es solange im Slidomer beidseitig blockiert reaktionsunfähig verbleiben (Abb. 8.43), bis es dissoziiert oder das Slidomer an den gestaffelten Lücken des Rückgrates bricht. Je mehr inertes Templatmaterial in Slidomere eingebaut werden kann, desto stärker wird auch dessen bremsender Effekt, der sich insbesondere auf die Bildung längerer Produkte auswirkt (>4mer).

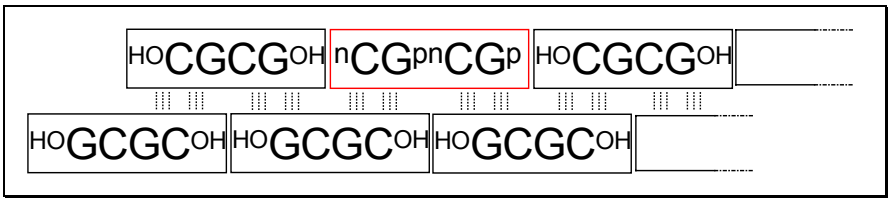


Abb. 8.43: Von unreaktiven Templatmolekülen umgebenes $(^{n}CG^{p})_2$ im Slidomer

Bei Zugabe von 10% Templat scheint der reaktionsbremsende Einfluss nicht existent zu sein, wahrscheinlicher ist aber, dass sich bei diesen Verhältnissen bremsende und beschleunigende Effekte die Wage halten. Solange ein aktivierter Baustein in einem Slidomer nicht beidseitig von unreaktiven Templatbausteinen umgeben ist, ist er zur Ligation fähig, so dass Template bei niedrigen Konzentrationen im Verbund mit reaktiven Oligomeren zur Generierung reaktionsbeschleunigender Slidomerkomplexe in der Lage wären.

Bei geringen Templatkonzentrationen ist die Wahrscheinlichkeit sicherlich höher, dass endständig in Slidomere eingebaute reaktive Bausteine längerfristig für eine Reaktion zur Verfügung stehen (Abb. 8.44 oben) oder bei der Slidomerverlängerung neben einem weiteren reaktiven Baustein zu liegen kommen (Abb. 8.44 unten).

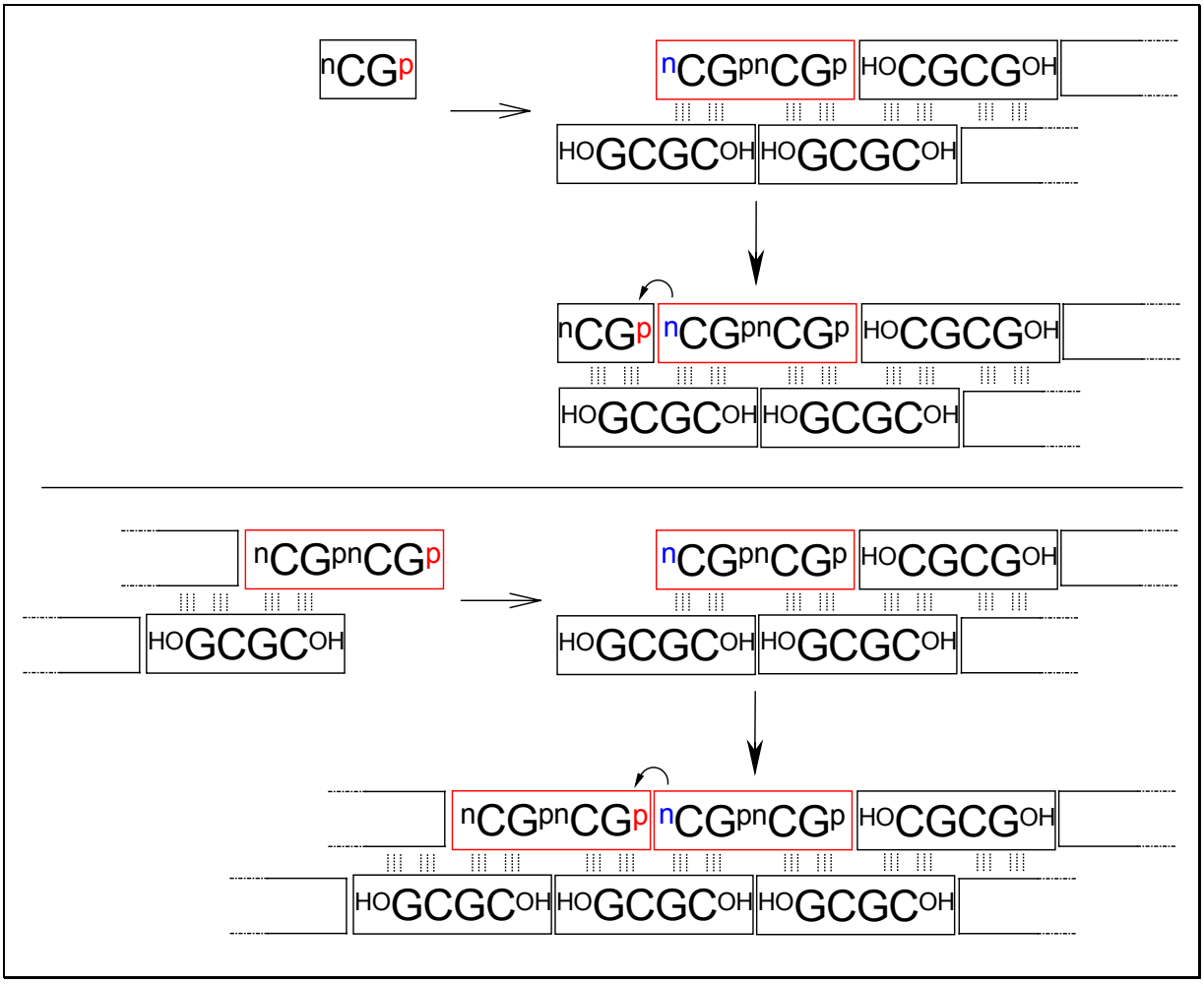


Abb. 8.44: Beispiele der katalysierenden Wirkung des Tetramer-Templats in regelmäßigen Slidomerkomplexen

Der Einfluss der Templatzugabe ist beim regelmäßigen (geordneten) Slidomermodell demnach zweischneidig zu betrachten: Auf der einen Seite kann zugegebenes Templat durchaus als solches fungieren, wenn zwei Reaktionspartner am Templat ligiert werden. Wird jedoch reaktionsfähiges Oligomer beidseitig von inerten Templatbausteinen umgeben, so kann aus diesem Komplex kein Produkt hervorgehen. Insofern ist zugegebenes Templat in der Lage, sowohl katalytisch als auch anti-katalytisch bzw. reaktionshemmend zu wirken. Auch in einem unregelmäßigen Slidomer wäre bei niedrigen Templatkonzentrationen ein beschleunigender, bei hohen dagegen ein bremsender Effekt zu erwarten. Das indifferente Verhalten des CG-Systems auf die Templatzugabe könnte Ausdruck dieser Effekte sein.

8.3.6 Kinetik des Systems $^{n}CG^{p}$ + $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$

Wenn das CG-System bei Zugabe von hexamerem Templat $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$ keine deutliche Beschleunigung der $(^{n}CG^{p})_3$-Bildung zeigt, sollte das Vorliegen termolekularer Komplexe auszuschließen und das Slidomermodell zu favorisieren sein. Für die Kinetiken wurde $^{n}CG^{p}$ mit steigenden Konzentrationen von $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$ unter folgenden Bedingungen umgesetzt:

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}CG^{p}$	**c(Edukt)**	20 mM
Templat	$^{HO}(CG)_3{}^{OH}$	**c(Templat)**	0 / 2 / 4 / 8 mM
c(EDC)	0.4 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2 °C	**HPLC-Säulentyp**	Mini Q IE
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	0.2 µl	**Elutionssystem**	$HClO_4/NaClO_4$

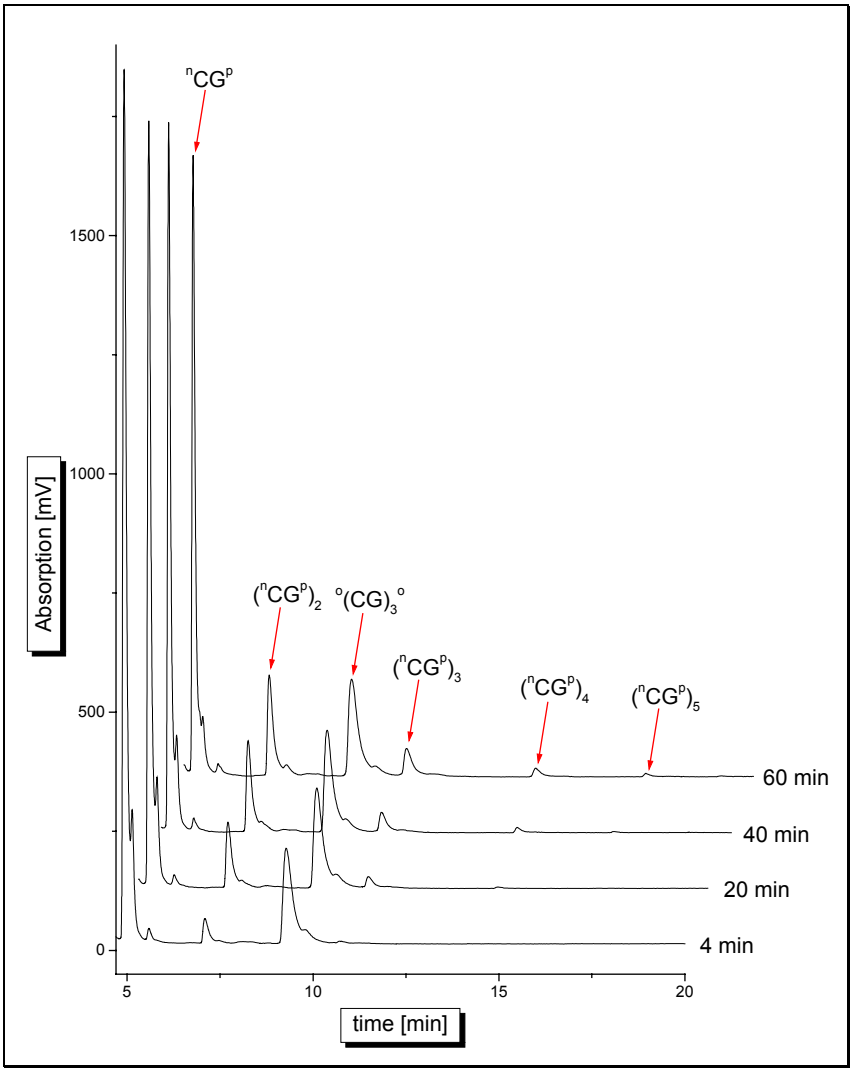


Abb. 8.45: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}CG^{p}$ 20 mM + $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$ 2 mM, 0.4M EDC, 2 °C

Der Beispiel-Stackplot in Abb. 8.45 zeigt die Oligomerisierung der ersten 60 min bei Zugabe von 10% $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$-Templat. Die Chromatografie wurde mit einem steileren Gradienten durchgeführt, der zu etwas schärferen und damit besser integrierbaren Peaks bei Grundlinientrennung des Templats von den Produktoligomeren führte.

Die Auftragung der Konzentrations-Zeit-Kurven der Bildung des hexameren Produktes $(^{n}CG^{p})_3$ zeigt keine im Sinne einer Templatkatalyse über termolekulare Komplexe systematisch ansteigende Bildungsgeschwindigkeit bei Erhöhung der Templatkonzentration. Die Kurven liegen bis auf die Bildungskurve bei Zugabe von 10% $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$ relativ nahe beieinander. Die auffallende Beschleunigung bei 10% Templat ist reproduzierbar und könnte, ähnlich dem im vorhergehenden Kapitel diskutierten Beschleunigungseffekt der höheren Oligomerbildung durch geringe Mengen Templat, auf die vermehrte Bildung von reaktionsfördenden Slidomerformen zurückzuführen sein (vgl. Abb. 8.44, Kap. 8.3.5.1). Bei weiterer Steigerung der Templatmenge wird der beschleunigende Effekt durch einen Bremseffekt des inerten Templats auf die im Slidomer eingebauten reaktionsfähigen, aber beidseitig blockierten Oligomere aufgehoben. Somit scheint bei 10% Templat ein Reaktionsoptimum vorzuliegen an dem die beschleunigenden die bremsenden Effekte überwiegen. Die beobachteten Kurvenverläufe deuten daher auf das Vorliegen von Slidomerkomplexen hin.

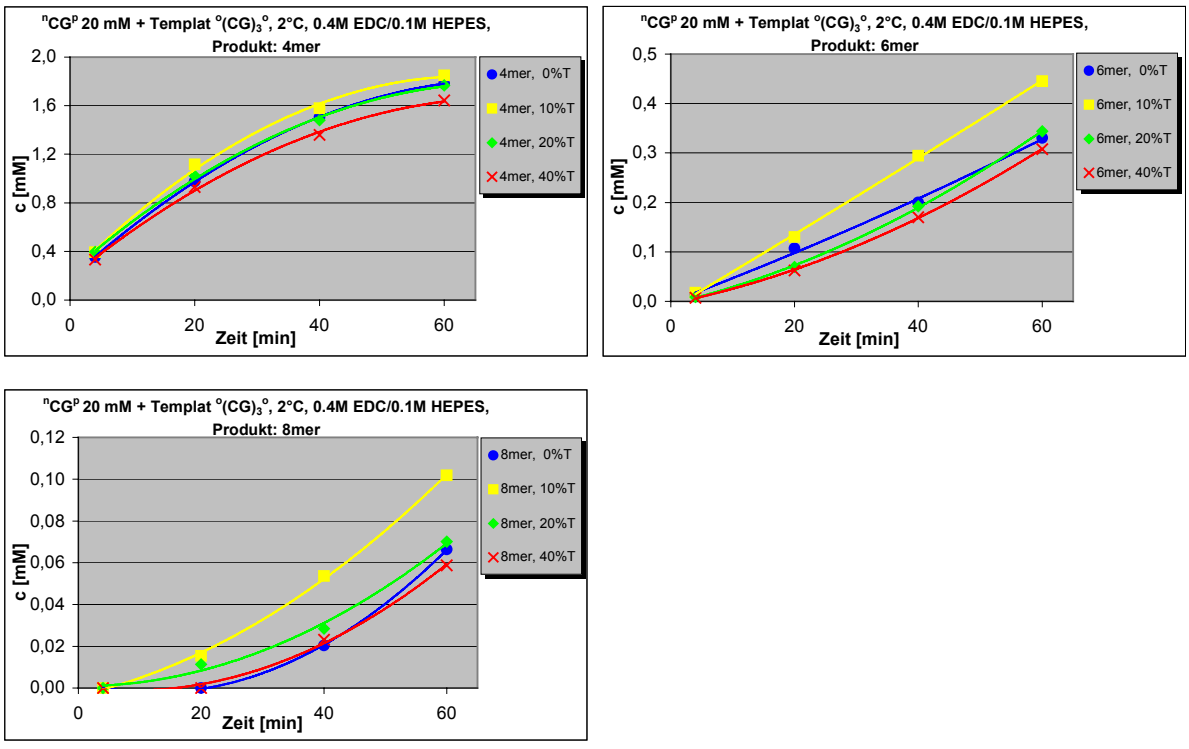


Abb. 8.46: Konzentrations-Zeit-Kurven der $(^{n}CG^{p})_x$-Oligomere bei 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$-Templatzugabe

8.3.7 Kinetik des Systems $^{n}CG^{p}$ + $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$

Die Oligomerisierung von $^{n}CG^{p}$ würde bei Anwesenheit von $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$-Templat im Falle der Bildung termolekularer Komplexe eine besondere Beschleunigung der Bildung des octameren Produkts $(^{n}CG^{p})_4$ aus zwei Tetrameren bzw. einem Dimer und einem Hexamer am Templat zur Folge haben, andernfalls ist das Vorliegen von Slidomeren anzunehmen. Für die Experimente wurde $^{n}CG^{p}$ mit steigenden Konzentrationen von $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$ bei 2 °C unter folgenden Bedingungen umgesetzt:

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}CG^{p}$	**c(Edukt)**	20 mM
Templat	$^{HO}(CG)_4{}^{OH}$	**c(Templat)**	0 / 2 / 4 / 8 mM
c(EDC)	0.4 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2 °C	**HPLC-Säulentyp**	Mini Q IE
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	0.2 µl	**Elutionssystem**	$HClO_4/NaClO_4$

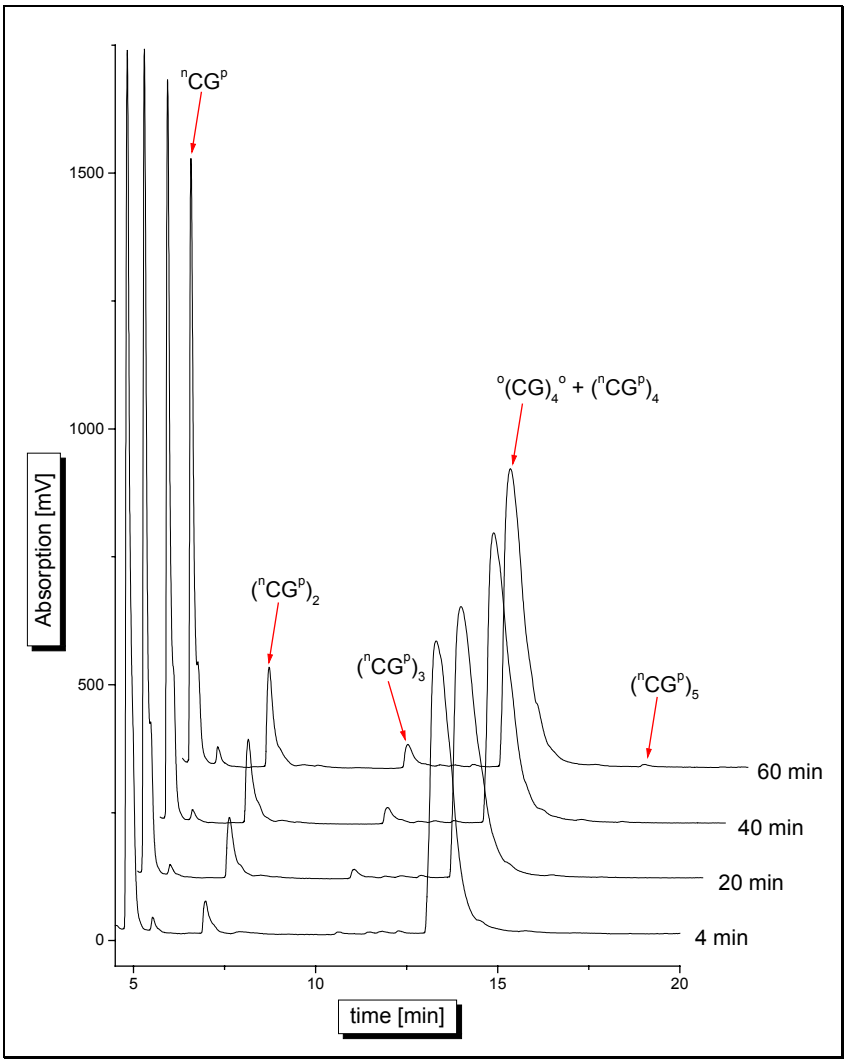


Abb. 8.47: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}CG^{p}$ 20 mM + $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$ 8 mM, 0.4M EDC, 2 °C

Der Beispiel-Stackplot in Abb. 8.47 zeigt die Oligomerisierung der ersten 60 min bei Zugabe von 40% $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$-Templat. Nachpeaks sind hier nicht zu erkennen, so dass die zuvor mitunter beobachteten Nachpeaks als Chromatografie-Artefakte eingeordnet werden können. Die Trennung des octameren Templats vom 8mer-Produkt $(^{n}CG^{p})_4$ ist unter den Chromatografiebedingungen nicht mehr möglich, so dass deren Peaks zusammenfallen.

Die Konzentrations-Zeit Bildungskurven des tetrameren Produktes liegen relativ nahe beieinander, wobei die Kurve für 40% Templatzugabe aufgrund einer um ca. 5% höheren Dimeranfangskonzentration nach oben hin abweicht und bei Angleichung an die anderen Eduktkonzentrationen niedriger liegen würde. Gleiches gilt für die 6mer-Bildungskurven, die, wie bereits in den beiden vorhergehenden Kapiteln diskutiert, von bremsenden als auch beschleunigenden Effekten durch den Einbau von Templatmolekülen in die Slidomere beeinflusst werden.

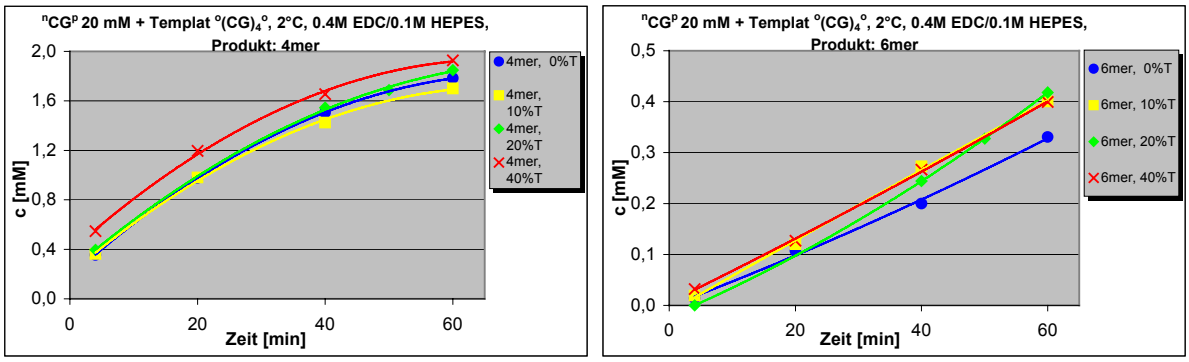


Abb. 8.48: Konzentrations-Zeit-Kurven der $(^{n}CG^{p})_x$-Oligomere bei 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$-Templatzugabe

Die Bildungskurve des 8mers wird leider vom octameren Templat überlagert, so dass dessen Einfluss auf die 8mer-Produktion nicht näher untersucht werden kann. Eine Subtraktion der Templatkonzentration von den einzelnen Messpunkten würde eine zu große Ungenauigkeit zur Folge haben. Aus dem vorliegenden Datenmaterial lässt sich wie bei den vorhergehenden Kinetiken keine Autokatalyse über termolekulare Komplexe erkennen, die einen deutlichen positiven Templateffekt zur Folge gehabt hätten.

Insgesamt zeigen alle drei Kinetiken des offenen CG-Systems mit Templatzugabe ein relativ indifferentes Verhalten, das auf ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den positiven und negativen Templateffekten zurückgeführt werden kann, die beim Einbau von unreaktiven Templatbausteinen in einen Slidomerkomplex zu erwarten sind (siehe Kap. 8.3.5.1). Da das Auftreten von termolekularen Komplexen einen rein positiven Templateffekt hätte zeigen müssen, ist vielmehr von Slidomerbildung auszugehen.

8.3.8 Kinetik des Systems $^{n}CG^{p}$ + $^{n}(CG)_2^{p}$

Das Tetramer $^{n}(CG)_2^{p}$ (Synthese siehe Kap. 4.2) stellt das tetramere Äquivalent zum Dimer $^{n}CG^{p}$ dar und ist aufgrund seiner beiden endständigen reaktiven Funktionalitäten wie das Dimer in der Lage mit anderen reaktiven Oligomeren nach Aktivierung spontan zu kondensieren. Gleichzeitig könnte es durch seine Länge im Gegensatz zum Dimer direkt Slidomere bilden und darüber die Oligomerisierung beschleunigen. Ein bremsender Templateffekt, wie er bei den beidseitig inaktiven $^{HO}(CG)_x^{OH}$-Templaten möglich war, kann hier nicht auftreten. Für die Kinetikexperimente wurde $^{n}CG^{p}$ mit steigenden Konzentrationen an $^{n}(CG)_2^{p}$ unter den folgenden Bedingungen umgesetzt:

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt 1	$^{n}CG^{p}$	**c(Edukt 1)**	20 mM
Edukt 2/Templat	$^{n}(CG)_2^{p}$	**c(Edukt 2)/Templat**	0 / 1.5 / 3 / 6 mM
c(EDC)	0.4 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2 °C	**HPLC-Säulentyp**	Mini Q IE
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	0.2 µl	**Elutionssystem**	$HClO_4/NaClO_4$

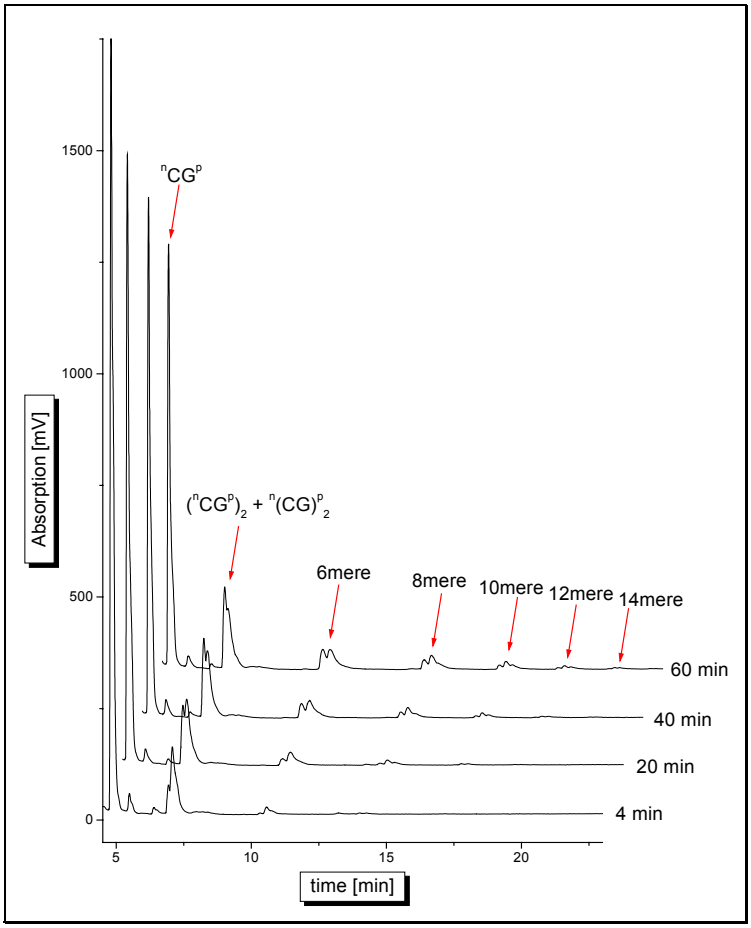


Abb. 8.49: HPLC-Stackplot der Reaktion $^{n}CG^{p}$ 20 mM + $^{n}(CG)_2^{p}$ 1.5 mM, 0.4M EDC, 2 °C

Der Beispiel-Stackplot in Abb. 8.49 zeigt die Oligomerisierung während der ersten 60 min bei Zugabe von 7.5% $^{n}(CG)_2^{p}$. Die Peaks des $^{n}(CG)_2^{p}$ und des aus der Kondensation zweier Dimere gebildeten $(^{n}CG^{p})_2$ überlappen zwar und können nur gemeinsam integriert werden, lassen aber erkennen, dass das zuerst eluierende Tetramer $(^{n}CG^{p})_2$ zunehmend gebildet wird, während der direkt folgende Peak des $^{n}(CG)_2^{p}$ im Laufe der Reaktion an Fläche verliert. Der geringe strukturelle Unterschied der Phosphoamidatbindung gegenüber der Phosphodiesterbindung genügt, um bei kurzen Produkten eine Antrennung zu erzielen, die bei den höheren Oligomeren für eine gegebene Länge zu Mehrfachpeaks führt.

Die Diversifikation der Produktvarianten einer bestimmten Länge steigt mit derselben. Während lediglich zwei verschiedene Hexamere generiert werden können, sind bei genügender Trennleistung theoretisch je drei verschiedene 8mer- und 10mer-Varianten und beim 12mer bereits vier Produkte differenzierbar. Die Zusammensetzung der entsprechenden Produkte ist in Tab. 8.4 aufgeführt, in der die HPLC-technisch nicht trennbaren Permutationen, die sich nur in den Positionen der Phosphodiesterbindungen unterscheiden, zusammengefasst sind. Hierbei symbolisiert die Zahl 2 das Dimer $^{n}CG^{p}$ und die Zahl 4 das zugegebene Tetramer $^{n}(CG)_2^{p}$.

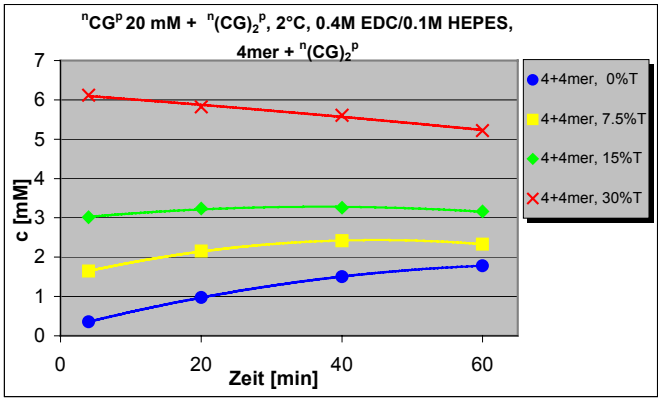
Anzahl der theoretisch trennbaren Produkte	4mer	6mer	8mer	10mer	12mer
1.	22	222	2222	22222	222222
2.	4	24 42	224 242 422	2224 2242 2422 4222	22224 22242 22422 24222 42222
3.			44	244 424 442	2244 2424 2442 4224 4242 4422
4.					444

Tab. 8.4: Produktvarianten aus den Basisbausteinen $^{n}CG^{p}$ (2) und $^{n}(CG)_2^{p}$ (4)

Der für das 6mer angenommene Doppelpeak ist im Chromatogramm gut zu erkennen, wobei der erste Peak, der langsamer an Fläche gewinnt, ursprünglich aus drei Dimeren hervor gegangen sein muss, während der zweite Peak aufgrund der initialen $^{n}(CG)_2^{p}$-Tetramerzugabe von vorneherein eine größere Fläche einnimmt, die sich aber im Reaktionsverlauf durch

$^{n}(CG)_2^{p}$-Abreaktion an die Fläche der ersten Hexamer-Variante angleicht. Die Trennleistung nimmt mit zunehmender Oligomerlänge ab, so dass die drei Octamervarianten nur noch andeutungsweise zu erkennen sind, während die Peaks der Produktvarianten der höheren Oligomere zusehends verschwimmen und breitere Buckel bilden. Insgesamt lässt sich aber an Hand der HPLC-Chromatogramme die Integration des zugegebenen Tetramers in die Oligomerisierung und die daraus hervorgehende Produktvielfalt gut beobachten.

Betrachtet man die Konzentrations-Zeit-Kurven der 4mer-Bildung, so fällt auf, dass ohne vorherige Zugabe von $^{n}(CG)_2^{p}$ innerhalb der 60 Minuten Reaktionszeit die Kurve auf bis zu ca. 2 mM Tetramer-Produkt ansteigt, während die Kurven nach Zugabe mit steigender Menge an $^{n}(CG)_2^{p}$ zunehmend flacher werden bzw. ein Maximum durchlaufen und bei Zugabe von 30% $^{n}(CG)_2^{p}$ sogar direkt nach dem Reaktionsbeginn abfallen. Dieses bereits in Kap. 7.3.2 beschriebene Verhalten der Konzentrations-Zeit-Kurven ist auf den Zwischenprodukt-charakter der Oligomerisationsprodukte zurückzuführen, die an Konzentration abnehmen, wenn die Summe der Bildungsreaktionen weniger Oligomer liefert, als über die Summe der Abreaktionskanäle verbraucht wird.



Die Kurven der 4mer-Bildung können in diesem Zusammenhang zusätzliche Hinweise zu der Theorie liefern, dass es sich bei der beobachteten Oligomerisierung nicht um eine rein spontane Reaktionsfolge handelt, sondern um eine katalytisch beeinflusste Reaktion. Hierbei ist die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit des Tetramers von zentraler Bedeutung, die sich zwischen den beiden Reaktionsmodellen unterscheiden sollte. Zu Beginn der Reaktion liegen mit dem Dimer und dem initial zugesetzten Tetramer zwei Reaktionspartner vor, die untereinander über die in Abb. 8.50 aufgeführten Reaktionskanäle spontan kondensieren können. Weitere Reaktionskanäle wie die Abreaktion des 4mers mit gebildetem 6mer zum 10mer sind aufgrund der geringen Konzentrationen höherer Oligomere zu Reaktionsbeginn vernachlässigbar.

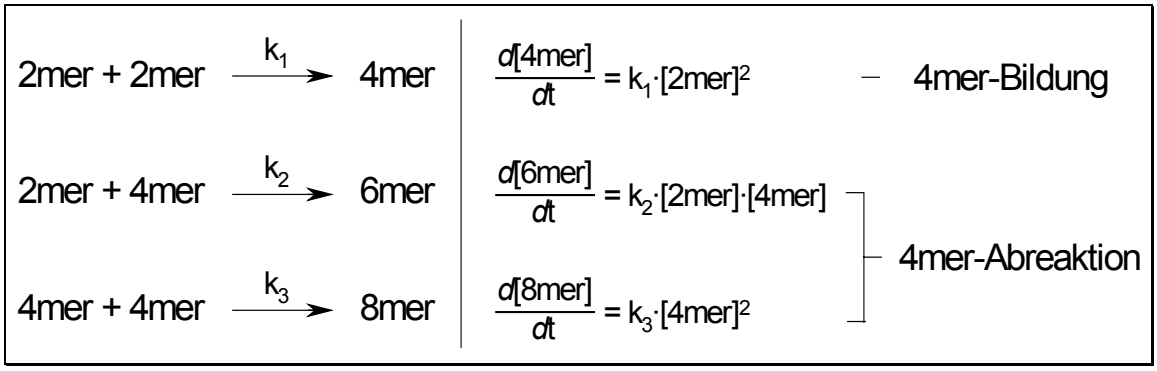


Abb. 8.50: Die vorherrschenden spontanen Reaktionskanäle zu Beginn der Oligomerisierung

Für alle drei spontanen, nicht katalysierten Ligationsreaktionen sollten die Geschwindigkeitskonstanten aufgrund der gleichen Umgebung am Reaktionsort identisch sein[74] und damit $k_1=k_2=k_3=k$ gelten. Für die Tetramerkonzentration, bei der die Bildungsgeschwindigkeit des 4mers genauso hoch ist wie die Summe der Abreaktionsgeschwindigkeiten, gilt folgendes Gleichungsschema, in der die Dimerausgangskonzentration bekannt ist ([2mer] = 20 mM):

$$\frac{d[4\text{mer}]}{d\text{t}} = \frac{d[6\text{mer}]}{d\text{t}} + \frac{d[8\text{mer}]}{d\text{t}}$$

$$\Rightarrow \; \text{k}\cdot[2\text{mer}]^2 = \text{k}\cdot[2\text{mer}]\cdot[4\text{mer}] + \text{k}\cdot[4\text{mer}]^2$$

$$\Leftrightarrow \; \text{k}\cdot[4\text{mer}]^2 + \text{k}\cdot[2\text{mer}]\cdot[4\text{mer}] - \text{k}\cdot[2\text{mer}]^2 = 0 \quad \big| : \text{k}$$

$$\Leftrightarrow \; [4\text{mer}]^2 + \underbrace{[2\text{mer}]}_{\text{p}}\cdot[4\text{mer}] \underbrace{- [2\text{mer}]^2}_{\text{q}} = 0$$

Die quadratische Gleichung $x^2 + p\cdot x + q$ besitzt eine physikalisch sinnvolle Lösung:

$$[4\text{mer}] = -\frac{[2\text{mer}]}{2} + \sqrt{\left(\frac{[2\text{mer}]}{2}\right)^2 + [2\text{mer}]^2}$$
$$= \frac{\sqrt{5}-1}{2}\cdot[2\text{mer}] \approx 0.62\cdot[2\text{mer}]$$

Damit würde bei rein spontaner Reaktion bei einer Tetramer-Ausgangskonzentration von 12.4 mM (=0.62 · 20 mM) genauso viel Tetramer aus Dimeren gebildet werden, wie zu 6mer und 8mer abreagiert und die Tetramerbildung einen quasistationären Zustand erreichen. Durch Steigerung der 4mer-Anfangskonzentration über 12.4 mM würde die Tetramerkonzentration von Reaktionsbeginn an sinken. Da aber die beobachtete Konzentration, bei der der für die spontane Ligation postulierte fallende Kurvenverlauf auftritt, mit max. 6 mM Tetramer deutlich niedriger liegt, ist von einer katalytisch beschleunigten Reaktion auszugehen, in der das Tetramer bereits bei dieser geringen Konzentration schneller abreagiert, als es nachgebildet werden kann. Die Geschwindigkeitkonstanten k_1, k_2 und k_3 sind demnach entweder nicht identisch oder es liegen zusätzliche Abreaktionskanäle vor. Da für die spontanen Reaktionen gleiche Geschwindigkeitskonstanten angenommen werden können, sollte unter der Berücksichtigung der bereits erarbeiteten Informationen eine Beschleunigung der Tetramer-Abreaktion und damit auch der übrigen Oligomerisierung über Slidomerkomplexe als wahrscheinlich angenommen werden können. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Tetramerentwicklung lassen sich gut an den Bildungskurven der höheren Oligomere beobachten.

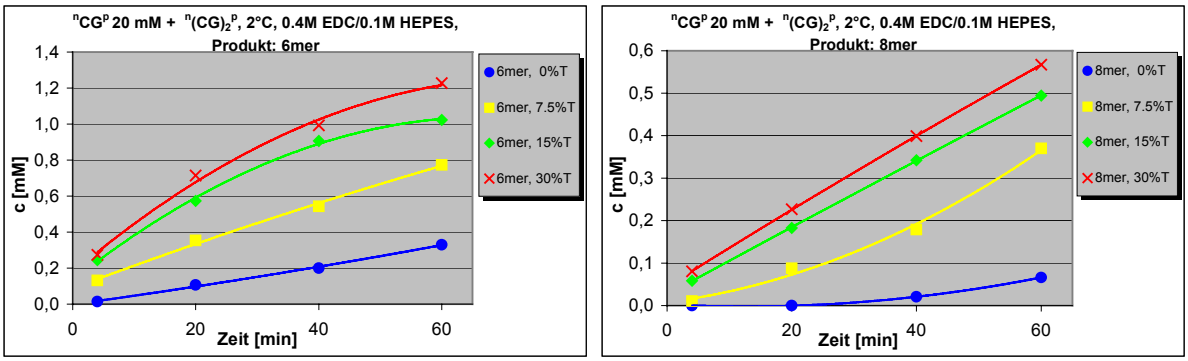


Abb. 8.51: Konzentrations-Zeit-Kurven der $({}^{n}CG^{p})_x$-Oligomere bei 0, 7.5, 15, 30% ${}^{n}(CG)_2{}^{p}$-Zugabe

Während Dimer als Edukt mit der höchsten Konzentration innerhalb des Beobachtungszeitraums in ausreichender Menge vorhanden ist, nimmt die Konzentration des Tetramers als zweitem Eduktbaustein des 6mers ohne weitere Zugabe von Tetramer (0% T) langsam zu und hat damit eine leicht ansteigende Hexamerbildungskurve zur Folge.

Die 6mer-Bildungskurve bei Zugabe von 7.5% ${}^{n}(CG)_2{}^{p}$ profitiert von der initial höheren Tetramerkonzentration, indem mehr Hexamer gebildet wird. Da die 4mer-Bildungskurve hier aber nur einen relativ schmalen Konzentrationsbereich inklusive Maximum durchläuft, ähnelt die 6mer-Bildungskurve einer Gerade.

Bei höheren Tetramerausgangskonzentrationen liegt die 6mer-Bildungskurve zwar noch höher, besitzt aber einen stetig abflachenden Kurvenverlauf. Während dieser Verlauf bei Zugabe von 30% $^{n}(CG)_2^{p}$ mit der sich durchgehend verringernden Tetramerkonzentration zu erklären ist, sollte die Hexamer-Bildungskurve bei 15% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe durch die zunächst leicht wachsende Tetramersynthese ebenfalls ansteigen und nach Maximumdurchlauf der 4mer-Bildung nach einem Wendepunkt wieder abflachen. Die hier aber schon von Beginn an auftretende Abflachung der 6mer-Bildungskurve deutet auf eine verstärkte Abreaktion zu höheren Oligomeren hin, die über den Rahmen der spontanen Oligomerisierung hinausgeht. Die Verdoppelung der Konzentration des Tetramers als Edukt für das 6mer von 3 mM auf 6 mM hat nicht auch eine entsprechende Steigerung der 6mer-Bildungsrate zur Folge, sondern nur eine leichte Erhöhung der Bildungskurve des Hexamers, das mit der größeren Menge an 4mer auch gleichzeitig mehr Reaktionspartner für die Abreaktion zu längeren Oligomeren zur Verfügung hat.

Die 8mer Kurven sind bei geringen $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugaben weitestgehend ansteigend, da die Konzentration des Tetramers als primärem Edukt für das Octamer im Reaktionsverlauf zunimmt. Die 8mer Bildung über die Reaktion von 2mer mit 6mer ist wegen der zu allen Zeitpunkten geringeren Hexamerkonzentration sekundär. Bei Zugabe von 15% $^{n}(CG)_2^{p}$ variiert die Tetramergesamtkonzentration nur in geringem Rahmen und führt zu einem nahezu linearen Octamerwachstum. Die Zugabe von 30% $^{n}(CG)_2^{p}$ hat ebenfalls einen linearen, aber nur leicht steileren 8mer Kurvenverlauf zur Folge, der auf eine starke Abreaktion des Octamers hindeutet, wobei eine Einschätzung der bei theoretisch rein spontaner Oligomerisierung stattfindenden Abreaktion und ein Vergleich mit der vorliegenden Bildungskurve ohne weitere Informationen schwer fällt.

Die manuelle Analyse der Kurvenverläufe wird demnach mit fortschreitender Reaktionszeit aufgrund der entstehenden Produkte und der damit auftretenden zusätzlichen Abreaktions-kanäle schnell zu komplex. Für eine genauere Untersuchung, inwieweit die beobachteten Konzentrations-Zeit-Kurven von denen abweichen, die bei rein spontaner Ligation auftreten würden, wurde deshalb für die Simulation des theoretischen Reaktionsverlaufs unter Berücksichtigung der Bildung höherer Oligomere das Programm *SimFit* herangezogen.

8.4 Reaktionsmodell der spontanen Ligation

Für die kinetische Überprüfung, ob es sich bei der Oligomerisierung des offenen Systems um eine rein spontane Polymerisation oder einen über Slidomere zusätzlich beschleunigten Prozess handelt, werden mit Hilfe des Programms *SimFit*[167] simulierte Konzentrations-Zeit-Verläufe einer spontanen Oligomerisierung des CG-Systems den realen Messwerten gegenübergestellt und mit ihnen verglichen (die Bedienung des Programms '*SimFit*' für nicht-lineares Fitting durch dynamische Simulation, sowie die Struktur der Daten- und Kommandofiles wurden bereits ausführlich beschrieben in [74,130,166]). *SimFit* passt hierbei die kinetischen Messdaten an einen vorgegebenen Reaktionsmechanismus an, in diesem Fall an den Mechanismus der spontanen Ligation. Falls die reale Reaktion schneller verläuft, als für eine rein spontane Ligation erwartet wird, ist von einem katalyseartigen Einfluss der Slidomere auszugehen.

Hierzu wird zunächst ein Modell der rein spontanen Ligation aufgestellt, das nur die innerhalb des Beobachtungszeitraums auftretenden Produkte bis maximal zum 16mer berücksichtigt. Innerhalb des Untersuchungszeitraums werden nur geringe Mengen der höheren Oligomere gebildet, so dass diese Vereinfachung zulässig erscheint. Um das Kinetikmodell in Anbetracht der späteren Verwendung innerhalb eines Slidomermodells nicht zu überfrachten, wird auf den Aktivierungsschritt per EDC verzichtet. Ansonsten müßte später bei den Slidomerkomplexen zwischen unzähligen Aktivierungsvarianten differenziert werden. Die unproduktive Hydrolyse des Aktivierungsmittels EDC zu EDU wird mit einem eigenen Reaktionskanal einbezogen. Da die Geschwindigkeit der rein spontanen Ligation nicht von der Länge der ligierenden Moleküle, sondern nur von den die Ligationsstelle benachbarten Basen abhängig sein sollte[36,74], kann für alle spontanen Reaktionskanäle die gleiche Geschwindigkeitkonstante k_1 verwendet werden. Für ein vereinfachtes Kinetikmodell der Oligomerisierung über rein spontane Ligation bis zum 16mer lässt sich demnach das in Tab. 8.5 abgebildete Reaktionsgleichungssystem formulieren. Das entsprechende komplette *SimFit* Commandfile des Modells der spontanen Ligation beim offenen System findet sich nebst weiteren Bemerkungen in Tab. 3.1, Kap. 3.1, Exp. Teil.

Nr.	Reaktionsgleichung	Simfit-Kurzform	k
1	$^{n}CG^{p} + {}^{n}CG^{p} + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_2 + EDU$	$n2 + n2 + EDC \rightarrow n4 + EDU$	k_1
2	$^{n}CG^{p} + (^{n}CG^{p})_2 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_3 + EDU$	$n2 + n4 + EDC \rightarrow n6 + EDU$	k_1
3	$^{n}CG^{p} + (^{n}CG^{p})_3 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_4 + EDU$	$n2 + n6 + EDC \rightarrow n8 + EDU$	k_1
4	$^{n}CG^{p} + (^{n}CG^{p})_4 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_5 + EDU$	$n2 + n8 + EDC \rightarrow n10 + EDU$	k_1
5	$^{n}CG^{p} + (^{n}CG^{p})_5 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_6 + EDU$	$n2 + n10 + EDC \rightarrow n12 + EDU$	k_1
6	$^{n}CG^{p} + (^{n}CG^{p})_6 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_7 + EDU$	$n2 + n12 + EDC \rightarrow n14 + EDU$	k_1
7	$^{n}CG^{p} + (^{n}CG^{p})_7 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_8 + EDU$	$n2 + n14 + EDC \rightarrow n16 + EDU$	k_1
8	$(^{n}CG^{p})_2 + (^{n}CG^{p})_3 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_4 + EDU$	$n4 + n4 + EDC \rightarrow n8 + EDU$	k_1
9	$(^{n}CG^{p})_2 + (^{n}CG^{p})_4 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_5 + EDU$	$n4 + n6 + EDC \rightarrow n10 + EDU$	k_1
10	$(^{n}CG^{p})_2 + (^{n}CG^{p})_5 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_6 + EDU$	$n4 + n8 + EDC \rightarrow n12 + EDU$	k_1
11	$(^{n}CG^{p})_2 + (^{n}CG^{p})_6 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_7 + EDU$	$n4 + n10 + EDC \rightarrow n14 + EDU$	k_1
12	$(^{n}CG^{p})_2 + (^{n}CG^{p})_7 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_8 + EDU$	$n4 + n12 + EDC \rightarrow n16 + EDU$	k_1
13	$(^{n}CG^{p})_3 + (^{n}CG^{p})_3 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_6 + EDU$	$n6 + n6 + EDC \rightarrow n12 + EDU$	k_1
14	$(^{n}CG^{p})_3 + (^{n}CG^{p})_4 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_7 + EDU$	$n6 + n8 + EDC \rightarrow n14 + EDU$	k_1
15	$(^{n}CG^{p})_3 + (^{n}CG^{p})_5 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_8 + EDU$	$n6 + n10 + EDC \rightarrow n16 + EDU$	k_1
16	$(^{n}CG^{p})_4 + (^{n}CG^{p})_4 + EDC \rightarrow (^{n}CG^{p})_8 + EDU$	$n8 + n8 + EDC \rightarrow n16 + EDU$	k_1
17	$EDC \rightarrow EDU$	$EDC \rightarrow EDU$	k_2

Tab. 8.5: Reaktionsgleichungssystem der rein spontanen Oligomerisierung bis zum 16mer

Dieses Reaktionsgleichungssystem lässt sich unter der Annahme, dass sich $(^{n}CG^{p})_2$ während der Ligation ähnlich wie $^{n}(CG)_2^{p}$ verhält, ebenso auf die Messreihen der $^{n}CG^{p}$-Oligomerisation mit $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe übertragen. In diesem Falle umfasst die Spezies n4 die Gesamtheit der in Lösung vorkommenden $(^{n}CG^{p})_2$- und $^{n}(CG)_2^{p}$-Moleküle, da diese HPLC-technisch nicht trennbar sind.

Ein Gesamtfit aller vier Messreihen mit 0%, 7.5%, 15% und 30% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe mittels *Simfit* bei freiem k_1 und k_2 zeigt eine asymmetrische Abweichung der gefitteten Produktkurven von den realen Messwerten (Abb. 8.52-Abb. 8.54). Die Produktoligomere mit einer Länge von 10 bis 16 Nucleotiden werden zudem unter der Observable 'Xmer' zusammengefasst.

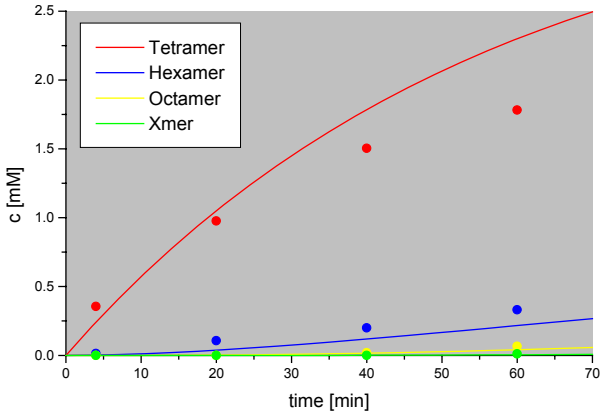


Abb. 8.52: 0% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe

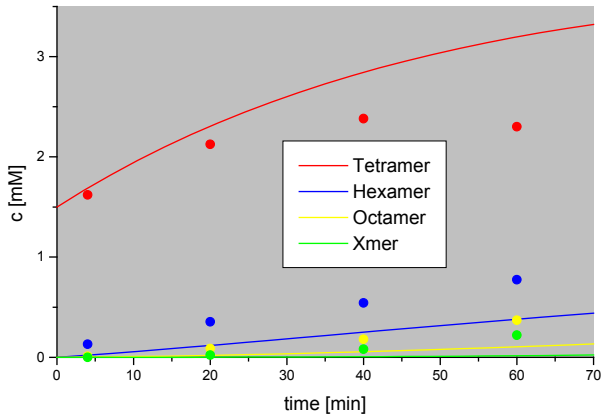


Abb. 8.53: 7.5% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe

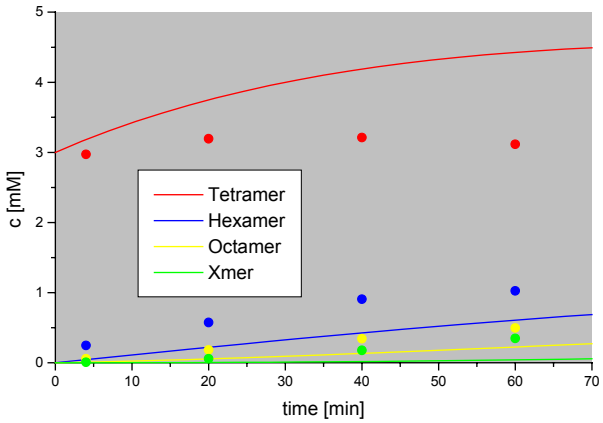


Abb. 8.54: 15% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe

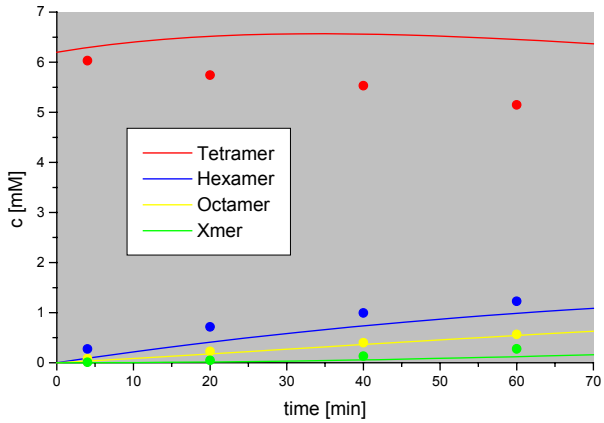


Abb. 8.55: 30% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe

Hierbei liegen die realen Messwerte der 4mer-Kurve mit zunehmender Reaktionszeit immer stärker unterhalb der gefitteten Kurve, während die Konzentrationswerte der längeren Oligomere oberhalb der entsprechenden Fitkurven liegen. Noch deutlicher wird die optische Abweichung, wenn man die Beobachtungszeit des Gesamtfits der spontanen Ligation z.B. auf 500 min verlängert (Abb. 8.56a-d). Die Oligomerisierung schreitet real deutlich schneller voran, als mit dem spontanen Ligationsmodell vorhergesagt.

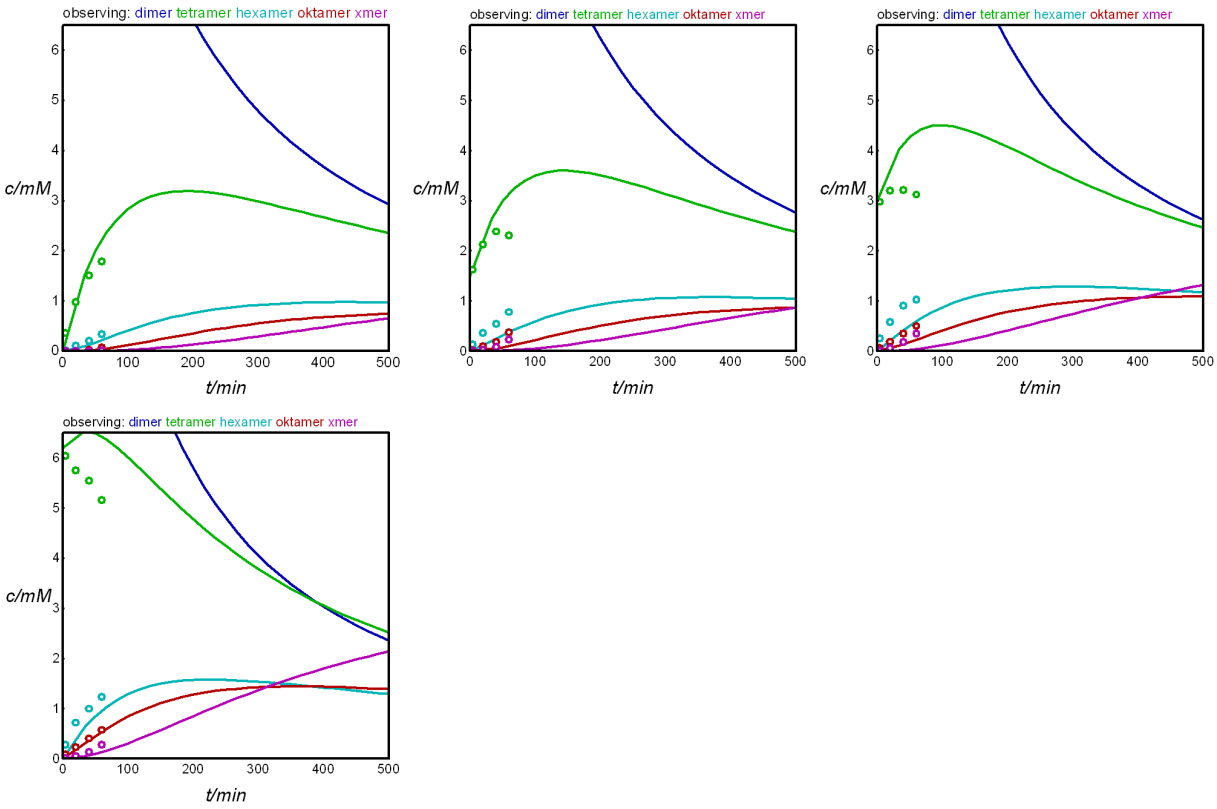


Abb. 8.56a-d: Fitting des rein spontanen Ligationsmodells für 20 mM $^{n}CG^{p}$ +0%, +7.5%, +15%, +30% $^{n}(CG)_2{}^{p}$

Diese Abweichung lässt sich gut mit der Theorie zusätzlicher Reaktionskanäle vereinbaren, die zu einer verstärkten Abreaktion der Bausteine zu höheren Oligomeren führen. Aufgrund der in den vorhergehenden Kapiteln angestellten Überlegungen zur Natur möglicher reaktionsfördernder Komplexe sollten Slidomere zur Erklärung der beobachteten Reaktionsbeschleunigung gegenüber einer rein spontanen Ligation herangezogen werden können. Da die Bildung des Tetramers nicht von einer Beschleunigungswirkung über Slidomerkomplexe profitieren kann, nimmt seine Konzentration durch die gesteigerte Abreaktion gegenüber der simulierten Kurve ab, während die längeren Oligomerisationsprodukte allesamt Konzentrationszuwächse verbuchen können. Die Slidomere bestehen bei $^{n}(CG)_2{}^{p}$-Zugabe wahrscheinlich zunächst maßgeblich aus dem Tetramer, das zu Reaktionsbeginn die höchste Konzentration slidomerfähiger Bausteine besitzt. Im weiteren Verlauf der Reaktion sollten die Anteile des $(^{n}CG^{p})_2$ und der höheren Oligomere in den Slidomeren zunehmen.

Für den Gesamtfit des Modells der rein spontanen Ligation an die Daten der Messreihen der $^{n}CG^{p}$-Oligomerisation unter $^{n}(CG)_2{}^{p}$-Zugabe erhält man für die Geschwindigkeitskonstante der spontanen Ligation k_1 einen Wert von $8.70 \cdot 10^{-3}$ $l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, für die Hydrolyse des EDC liegt k_2 bei $1.3 \cdot 10^{-8}$ s^{-1} Die mittlere Fehlerquadratsumme in % bzw. der RMS-Wert (Root

Mean Square), der ein Maß für die Güte des Fittings darstellt, verdeutlicht mit einem verhältnismäßig großen Wert von 12.87 % neben den optisch sichtbaren Abweichungen der Fittings von den experimentellen Kurven, wie unzureichend das reale System mit dem Modell der rein spontanen Ligation beschrieben wird.

k_1 aus der Kinetik der einseitig geschützten Bausteine:

Ein Fitting der in Kapitel 8.1 vorgestellten und in Kapitel 8.2 diskutierten Kinetiken mit einseitig geschützten Bausteinen auf ein herkömmliches Autokatalysemodell über termolekulare Komplexe zeigte, dass autokatalytische Reaktionskanäle keinen Einfluss auf die Produktbildung hatten. Geht man bei diesen Kinetiken von rein spontanen Ligationsreaktionen aus, so kann man durch das Fitting eines spontanen Reaktionsmodells auf die Messdaten die Geschwindigkeitskonstante der spontanten Ligation erhalten und in das Fittingmodell des offenen Systems einbeziehen bzw. mit der dort gefundenen Konstante vergleichen. Da die Geschwindigkeitskonstanten aller drei spontanen Ligationen gleich sein sollten und damit in k_1 zusammengefasst werden können, kann man die Daten einem Gesamtfit an dem in Tab. 8.6 aufgeführten Gleichungssystem unterziehen. Das entsprechende komplette *SimFit* Commandfile des Modells findet sich nebst weiteren Bemerkungen in Tab. 3.2, Kap. 3.1, Exp. Teil.

Nr.	Reaktionsgleichung	Simfit-Kurzform	k
1	$^{N_3}CG^{p} + {}^{n}CG^{pte} + EDC \rightarrow {}^{N_3}CG^{pn}CG^{pte} + EDU$	T2 + 2T_A + EDC → T4T + EDU	k_1
2	$^{HO}(CG)_2{}^{p} + {}^{n}CG^{pte} + EDC \rightarrow {}^{HO}(CG)_2{}^{pn}CG^{pte} + EDU$	T4 + 2T_B + EDC → T6T + EDU	k_1
3	$^{HO}(CG)_3{}^{p} + {}^{n}CG^{pte} + EDC \rightarrow {}^{HO}(CG)_3{}^{pn}CG^{pte} + EDU$	T6 + 2T_C + EDC → T8T + EDU	k_1
4	$EDC \rightarrow EDU$	EDC → EDU	k_2

Tab. 8.6: Reaktionsgleichungssystem der rein spontanen Ligationen der einseitig geschützten Bausteine

Die aus diesem Fitting erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten liegen mit $k_1=1.12\cdot10^{-2}$ $l\cdot mol^{-1}\cdot s^{-1}$ und $k_2=1.0\cdot10^{-9}$ s^{-1} in der Größenordnung der beim offenen System ermittelten Werte. Verwendet man diesen k_1-Wert als feste Konstante im Fittingmodell der rein spontanen Ligation des offenen Systems, so erhält man einen nur geringfügig schlechteren Fit mit einem RMS-Wert von 13.23 % (vorher 12.87 %), der sich optisch kaum vom Fit mit freiem k_1 unterscheidet und deshalb nicht abgebildet ist. Damit wird die mangelnde Eignung des rein spontanen Modells für die Beschreibung der Oligomerisierung bestätigt und die These der zusätzlichen Reaktionskanäle verifiziert.

8.5 Das Reaktionsmodell des Slidomereffektes

Für die Erklärung der Reaktionsbeschleunigung im CG-System stehen neben dem Slidomermodell eine Reihe alternativer Katalyseformen über Komplexe zur Diskussion, die bereits in Kap. 7.4 vorgestellt wurden. Da diese aber gegenüber den ausgeschlossenen termolekularen Komplexen thermodynamisch benachteiligt sind und demnach noch weniger Einfluss hätten, ist ein Fitting an Reaktionsmodelle, die auf diesen Alternativkomplexen basieren, nicht sinnvoll, so dass eine Fokussierung auf das Slidomermodell erfolgte.

Ein mögliches Slidomer-Kinetikmodell des offenen Systems muss auf dem Modell der spontanen Ligation aufbauen, die zu jedem Zeitpunkt der Reaktion stattfindet. Darüber hinaus sollte eine Beschleunigung der Oligomerisierung über die zusätzlichen Reaktionskanäle der Ligation innerhalb von Slidomer-Komplexen stattfinden. Bedingt durch die unüberschaubare Vielfalt an denkbaren Komplexzusammensetzungen der Slidomere in einem offenen System und den daraus resultierenden Reaktionsgleichungen des Fittings, muss man das Reaktionsgeschehen außerordentlich stark vereinfachen. Die wahrscheinlich selteneren ungeordneten Slidomere z.B. sind wegen der unregelmäßigen Oligomerverteilung innerhalb der Komplexe kaum systematisch zu erfassen und können deshalb nicht berücksichtigt werden. Durch diese Vereinfachungen läuft man allerdings Gefahr, das System derart zu simplifizieren, dass der Fit nur schlecht mit den Messdaten korreliert und die Geschwindigkeitskonstanten wenig aussagekräftig werden. Weiterhin ist eine Beschränkung auf möglichst wenige Geschwindigkeitskonstanten zu beachten, da ansonsten zwar der Fit gut passt, die Konstanten selbst dagegen aufgrund ihrer Unbestimmtheit ohne Wert sind.

Wenn man von einem geordneten Slidomer ausgeht (siehe Kap. 8.3.1), dann sind Slidomer-Duplexe aus zwei gleich langen, gestaffelt hybridisierten Oligomeren sowohl Keimzelle als auch Untereinheit eines solchen Slidomers.

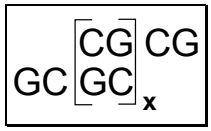


Abb. 8.57: Slidomer-Duplex

Das Gleichgewicht der Bildung und des Zerfalls der Slidomer-Duplexe kann mit einem Satz von Reaktionsgleichungen beschrieben werden, in denen von einer schnellen Slidomer-Duplex-Bildung mit einer festen, für Oligonucleotidkomplexe typischen Assoziations-Geschwindigkeitskonstante von $1 \cdot 10^6\ M^{-1} \cdot s^{-1}$ ausgegangen wird[168], die Dissoziation dagegen über eine freie Geschwindigkeitskonstante definierbar ist. Um nicht für jeden Slidomer-Duplex eine eigene freie Dissoziationskonstante einführen zu müssen, nutzt man den Umstand, dass sich die Duplexstabilitäten um einen bestimmten festen Faktor unterscheiden, der von der thermodynamischen Stabilitätsdifferenz zweier um eine CG-Einheit unterschiedlich langer Slidomer-Duplexe bestimmt ist. So ist beispielsweise ein Hexamer-Slidomerduplex um einen bestimmten Wert stabiler, als ein Tetramer-Slidomerduplex, so dass er eine Dissoziationskonstante aufweist, die der Dissoziationskonstante des Tetramer-Slidomerduplex multipliziert mit dem Equilibrierungsfaktor entspricht. Dessen Wert muss kleiner 1 sein, um die physikalisch sinnvolle Bedingung zu erfüllen, dass ein längerer Slidomerduplex stabiler als ein kürzerer Slidomerduplex ist. Auf diese Weise kann man die Zerfallsreaktionen mit einer einzigen freien Konstante erfassen, die für jeden Duplex-Typ mit dem entsprechenden Equilibrierungsfaktor multipliziert wird.

Unter Vernachlässigung der dangling-end Stabilitätszuwächse, die sich bei Differenzbildung der ΔG-Werte ohnehin gegenseitig aufheben, kann man die Stabilitätsdifferenzen $\Delta\Delta G$ zweier normaler Duplexe $({}^{n}CG^{p})_x$ und $({}^{n}CG^{p})_{x+1}$ (für 2 °C und c(NaCl) = 0.05M) aus Tab. 7.5 in Kap. 7.7 auch für die Stabilitätsdifferenzen der Slidomer-Duplexe verwenden. Über diesen Betrag von $\Delta\Delta G_{2°C}$ = -5.59 $kcal \cdot mol^{-1}$ (beispielsweise aus $\Delta G(({}^{n}CG^{p})_3$-Duplex) - $\Delta G(({}^{n}CG^{p})_2$-Duplex) = (-11.57 - (-5.98))$kcal \cdot mol^{-1}$ = -5.59 $kcal \cdot mol^{-1}$) lässt sich mittels $\Delta\Delta G = -R \cdot T \cdot ln\ \Delta K$ bzw. $\Delta K = e^{-\frac{\Delta\Delta G}{R \cdot T}}$ (siehe Gleichung 7.6) der Gleichgewichtskonstanten-unterschied ΔK berechnen, dessen reziproker Wert gleichzeitig auch den Equilibrierungs-faktor der Geschwindigkeitskonstanten zweier, um eine CG-Einheit verschieden langer, Slidomer-Duplexe darstellt und bei 2°C ca. $2.76 \cdot 10^{-4}$ beträgt. Die Dissoziationskonstante eines Slidomer-Duplexes aus zwei $({}^{n}CG^{p})_3$-Bausteinen, der vier vollständige Basenpaarungen aufweist, wäre damit um einen Faktor von $2.76 \cdot 10^{-4}$ kleiner, als die eines Slidomer-Duplexes aus zwei $({}^{n}CG^{p})_2$-Bausteinen mit nur zwei vollständigen Basenpaarungen. Dieser Equilibrierungsfaktor, der für das Fitting auf $1 \cdot 10^{-4}$ gerundet wird, veranschaulicht die geringere Dissoziationsneigung der längeren Slidomer-Duplexe und wird pro CG-Einheit über dem Tetramer multiplikativ auf die Dissoziationskonstante k_2 angewendet.

Tab. 8.7 zeigt das resultierende Reaktionsgleichungssystem des Gleichgewichtes zwischen Einzelsträngen und Slidomer-Duplexen, in dem die Zugabe von $^{n}(CG)_2^{p}$ bereits berücksichtigt wird und das somit auch zum Fitting der Kinetiken mit Tetramerzugabe geeignet ist. Da die Tetramere $(^{n}CG^{p})_2$ und $^{n}(CG)_2^{p}$ HPLC-technisch nicht trennbar sind, werden sie für *SimFit* in der Variable n4 zusammengefasst. Die maximal betrachtete Produkt-Sequenzlänge ist analog zum rein spontanen Modell auf 16 begrenzt. Auf den ersten 16 Gleichungen dieses Modells aufbauend werden die 14 neuen Gleichungen, die nur einen Teil des gesamten Slidomermodells enthalten, ab Nr.17 aufwärts durchnummeriert.

Nr.	Reaktionsgleichung	Simfit-Kurzform	k
17	$(^{n}CG^{p})_2 + (^{n}CG^{p})_2 \rightarrow (^{n}CG^{p})_2/(^{n}CG^{p})_2$-Slidomerduplex	n4 + n4 → n4s	10^{6}
	$(^{n}CG^{p})_2 + {}^{n}(CG)_2^{p} \rightarrow (^{n}CG^{p})_2/{}^{n}(CG)_2^{p}$- Slidomerduplex		
	${}^{n}(CG)_2^{p} + {}^{n}(CG)_2^{p} \rightarrow {}^{n}(CG)_2^{p}/{}^{n}(CG)_2^{p}$- Slidomerduplex		
18	$(^{n}CG^{p})_3 + (^{n}CG^{p})_3 \rightarrow (^{n}CG^{p})_3/(^{n}CG^{p})_3$- Slidomerduplex	n6 + n6 → n6s	10^{6}
19	$(^{n}CG^{p})_4 + (^{n}CG^{p})_4 \rightarrow (^{n}CG^{p})_4/(^{n}CG^{p})_4$- Slidomerduplex	n8 + n8 → n8s	10^{6}
20	$(^{n}CG^{p})_5 + (^{n}CG^{p})_5 \rightarrow (^{n}CG^{p})_5/(^{n}CG^{p})_5$- Slidomerduplex	n10 + n10 → n10s	10^{6}
21	$(^{n}CG^{p})_6 + (^{n}CG^{p})_6 \rightarrow (^{n}CG^{p})_6/(^{n}CG^{p})_6$- Slidomerduplex	n12 + n12 → n12s	10^{6}
22	$(^{n}CG^{p})_7 + (^{n}CG^{p})_7 \rightarrow (^{n}CG^{p})_7/(^{n}CG^{p})_7$- Slidomerduplex	n14 + n14 → n14s	10^{6}
23	$(^{n}CG^{p})_8 + (^{n}CG^{p})_8 \rightarrow (^{n}CG^{p})_8/(^{n}CG^{p})_8$- Slidomerduplex	n16 + n16 → n16s	10^{6}
24	$(^{n}CG^{p})_2/(^{n}CG^{p})_2$-Slidomerduplex → $(^{n}CG^{p})_2 + (^{n}CG^{p})_2$	n4s → n4 + n4	k_2
	$(^{n}CG^{p})_2/{}^{n}(CG)_2^{p}$-Slidomerduplex → $(^{n}CG^{p})_2 + {}^{n}(CG)_2^{p}$		
	${}^{n}(CG)_2^{p}/{}^{n}(CG)_2^{p}$-Slidomerduplex → ${}^{n}(CG)_2^{p} + {}^{n}(CG)_2^{p}$		
25	$(^{n}CG^{p})_3/(^{n}CG^{p})_3$-Slidomerduplex → $(^{n}CG^{p})_3 + (^{n}CG^{p})_3$	n6s → n6 + n6	$k_2 \cdot 10^{-4}$
26	$(^{n}CG^{p})_4/(^{n}CG^{p})_4$-Slidomerduplex → $(^{n}CG^{p})_4 + (^{n}CG^{p})_4$	n8s → n8 + n8	$k_2 \cdot 10^{-8}$
27	$(^{n}CG^{p})_5/(^{n}CG^{p})_5$-Slidomerduplex → $(^{n}CG^{p})_5 + (^{n}CG^{p})_5$	n10s → n10 + n10	$k_2 \cdot 10^{-12}$
28	$(^{n}CG^{p})_6/(^{n}CG^{p})_6$-Slidomerduplex → $(^{n}CG^{p})_6 + (^{n}CG^{p})_6$	n12s → n12 + n12	$k_2 \cdot 10^{-16}$
29	$(^{n}CG^{p})_7/(^{n}CG^{p})_7$-Slidomerduplex → $(^{n}CG^{p})_7 + (^{n}CG^{p})_7$	n14s → n14 + n14	$k_2 \cdot 10^{-20}$
30	$(^{n}CG^{p})_8/(^{n}CG^{p})_8$-Slidomerduplex → $(^{n}CG^{p})_8 + (^{n}CG^{p})_8$	n16s → n16 + n16	$k_2 \cdot 10^{-24}$

Tab. 8.7: Reaktionsgleichungssystem des Slidomer-Duplex Gleichgewichtes mit Equil-Faktor = $1 \cdot 10^{-4}$

Eine weitere Diversifizierung der Slidomerkomplexe ist zwar in geringem Umfang machbar, sprengt aber aufgrund der mit der Anzahl der involvierten Moleküle extrem stark ansteigenden Menge möglicher Komplexe sehr schnell die zur Verfügung stehenden Rechnerkapazitäten, so dass eine umfassende, vollständige kinetische Behandlung des Slidomerphänomens unter Berücksichtigung aller denkbaren Slidomer-Komplexe mittels *SimFit* in den Bereich des Unmöglichen rückt. Zudem hatten verschiedenste Modellansätze, die das System komplexer und damit realistischer darstellen sollten, entweder das Problem der hohen Anzahl

an frei variierbaren und damit unbestimmten, kaum interpretierbaren Geschwindigkeitskonstanten oder die Modelle ließen sich nur schlecht an die Messdaten fitten. So wurde z.B. der Versuch den Einfluss des unreaktiven Templats auf den Slidomereffekt in ein Modell zu fassen nach diversen Modellentwürfen verworfen, da sich das System aufgrund seiner immensen Komplexität einer sinnvollen Beschreibung mit *SimFit* entzieht.

Im Sinne der Vereinfachung werden deshalb alle längeren Slidomer-Komplexe ignoriert, so dass die Gesamtheit der im Fit betrachteten Slidomer-Duplexe stellvertretend für alle denkbaren Slidomer-Komplexe steht. Diese starke Vereinfachung muss aus Gründen der Handhabbarkeit des Fittings vorgenommen werden und ist eine mögliche Ursache für Abweichungen des Fits von den realen Messdaten.

Ligation im Slidomer:

Anhand des Slidomer-Duplexmodells ist man in der Lage die beiden vorherrschenden Ligationsarten in einem geordneten Slidomer zu simulieren. Im realen Slidomer findet die Ligation wahrscheinlich zum einen innerhalb des Slidomers zwischen zwei benachbarten Bausteinen, zum anderen an den Enden des Slidomers zwischen einem endständigen Baustein und einem am überhängenden Ende hybridisierten Dimer statt. Für das Fitting wurden deshalb vereinfacht Ligationen zwischen zwei Slidomer-Duplexen stellvertretend für intra-Komplex Ligationen bzw. zwischen einem Slidomer-Duplex und zwei Dimeren stellvertretend für Ligationen an den Slidomer-Enden angenommen (Abb. 8.58).

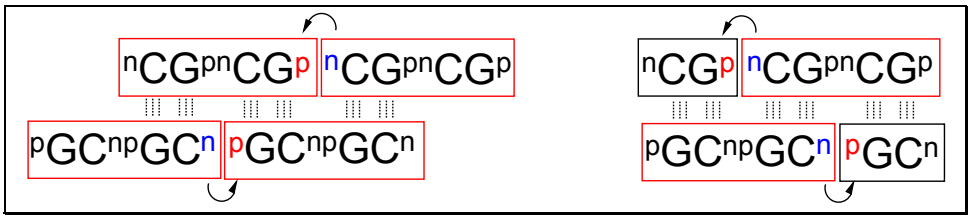


Abb. 8.58: Beispiele der beiden Ligationstypen des Slidomers; rotes p: EDC-aktiviertes Phosphat

Die vorhergehende Hybridisierung wird mit der eigentlichen Kondensation zusammengefasst, wobei die Reaktionen der einzelnen Komplexe mit der gleichen Geschwindigkeitskonstante k_3 erfasst werden können, da der Energiegewinn aus der Hybridisierung zweier Slidomer-Duplexe bzw. einem Slidomer-Duplex mit zwei Dimeren für alle Slidomer-Duplexlängen nach dem NN-Modell gleich groß ist und die Ligation selbst unabhängig von der Länge der unmittelbar beteiligten Oligomere sein sollte. Bei Vernachlässigung der dangling-end Stabilisierung unterscheiden sich die beiden Beispielkomplexe in Abb. 8.58 nicht in ihrer Stabilität.

Durch die $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe ergeben sich eine Reihe neuer Produktvarianten, die in Reaktionsgleichung 31 der Tab. 8.8 noch einmalig aufgeführt werden, in den folgenden Gleichungen aber nicht mehr gesondert gezeigt und als vorhanden angenommen werden, da diese Differenzierung wegen des mit dem entstehenden $(^{n}CG^{p})_2$ identischen kinetischen Verhaltens für das Fitting keine Rolle spielt. In Tab. 8.8 folgt zunächst die Auflistung der Ligationen zweier Slidomer-Duplexe in den Gleichungen 31 bis 39, danach die der Ligationen zwischen zwei Dimeren und einem Slidomer-Duplex in den Gleichungen 40 bis 45. Abschließend wird in Gleichung 46 die unproduktive Abreaktion des Aktivators EDC zu EDU mit einer eigenen Geschwindigkeitskonstante k_4 berücksichtigt. Das entsprechende komplette *SimFit* Commandfile des Slidomermodells findet sich nebst weiteren Bemerkungen in Tab. 3.3, Kap. 3.1, Exp. Teil.

Nr.	Reaktionsgleichung	Simfit-Kurzform	k
31	$(^{n}CG^{p})_2/(^{n}CG^{p})_2$-Slido + $(^{n}CG^{p})_2/(^{n}CG^{p})_2$-Slido + 2 EDC → $(^{n}CG^{p})_4/(^{n}CG^{p})_4$-Slido + 2 EDU	n4s + n4s + 2 EDC → n8s + 2 EDU	k_3
	$(^{n}CG^{p})_2/^{n}(CG)_2^{p}$-Slido + $(^{n}CG^{p})_2/(^{n}CG^{p})_2$-Slido + 2 EDC → $(^{n}CG^{p})_4/((^{n}CG^{p})_2(^{n}(CG)_2^{p}))$-Slido + 2 EDU		
	$(^{n}CG^{p})_2/^{n}(CG)_2^{p}$-Slido + $(^{n}CG^{p})_2/^{n}(CG)_2^{p}$-Slido + 2 EDC → $(^{n}CG^{p})_4/(^{n}(CG)_2^{p})_2$-Slido + 2 EDU		
	$(^{n}CG^{p})_2/^{n}(CG)_2^{p}$-Slido + $^{n}(CG)_2^{p}/^{n}(CG)_2^{p}$-Slido + 2 EDC → $((^{n}CG^{p})_2{}^{n}(CG)_2^{p})/(^{n}(CG)_2^{p})_2$-Slido + 2 EDU		
	$^{n}(CG)_2^{p}/^{n}(CG)_2^{p}$-Slido + $^{n}(CG)_2^{p}/^{n}(CG)_2^{p}$-Slido + 2 EDC → $(^{n}(CG)_2^{p})_2/(^{n}(CG)_2^{p})_2$-Slido + 2 EDU		
32	$(^{n}CG^{p})_2/(^{n}CG^{p})_2$-Slido + $(^{n}CG^{p})_3/(^{n}CG^{p})_3$-Slido + 2 EDC → $(^{n}CG^{p})_5/(^{n}CG^{p})_5$-Slido + 2 EDU	n4s + n6s + 2 EDC → n10s + 2 EDU	k_3
33	$(^{n}CG^{p})_2/(^{n}CG^{p})_2$-Slido + $(^{n}CG^{p})_4/(^{n}CG^{p})_4$-Slido + 2 EDC → $(^{n}CG^{p})_6/(^{n}CG^{p})_6$-Slido + 2 EDU	n4s + n8s + 2 EDC → n12s + 2 EDU	k_3
34	$(^{n}CG^{p})_2/(^{n}CG^{p})_2$-Slido + $(^{n}CG^{p})_5/(^{n}CG^{p})_5$-Slido + 2 EDC → $(^{n}CG^{p})_7/(^{n}CG^{p})_7$-Slido + 2 EDU	n4s + n10s + 2 EDC → n14s + 2 EDU	k_3
35	$(^{n}CG^{p})_2/(^{n}CG^{p})_2$-Slido + $(^{n}CG^{p})_6/(^{n}CG^{p})_6$-Slido + 2 EDC → $(^{n}CG^{p})_8/(^{n}CG^{p})_8$-Slido + 2 EDU	n4s + n12s + 2 EDC → n16s + 2 EDU	k_3
36	$(^{n}CG^{p})_3/(^{n}CG^{p})_3$-Slido + $(^{n}CG^{p})_3/(^{n}CG^{p})_3$-Slido + 2 EDC → $(^{n}CG^{p})_6/(^{n}CG^{p})_6$-Slido + 2 EDU	n6s + n6s + 2 EDC → n12s + 2 EDU	k_3
37	$(^{n}CG^{p})_3/(^{n}CG^{p})_3$-Slido + $(^{n}CG^{p})_4/(^{n}CG^{p})_4$-Slido + 2 EDC → $(^{n}CG^{p})_7/(^{n}CG^{p})_7$-Slido + 2 EDU	n6s + n8s + 2 EDC → n14s + 2 EDU	k_3

38	$(^nCG^p)_3/(^nCG^p)_3$-Slido + $(^nCG^p)_5/(^nCG^p)_5$-Slido + 2 EDC → $(^nCG^p)_8/(^nCG^p)_8$-Slido + 2 EDU	n6s + n10s + 2 EDC → n16s + 2 EDU	k_3
39	$(^nCG^p)_4/(^nCG^p)_4$-Slido + $(^nCG^p)_4/(^nCG^p)_4$-Slido + 2 EDC → $(^nCG^p)_8/(^nCG^p)_8$-Slido + 2 EDU	n8s + n8s + 2 EDC → n16s + 2 EDU	k_3
40	2 $(^nCG^p)_2$ + $(^nCG^p)_2/(^nCG^p)_2$-Slido + 2 EDC → $(^nCG^p)_3/(^nCG^p)_3$-Slido + 2 EDU	2 n2 + n4s + 2 EDC → n6s + 2 EDU	k_3
41	2 $(^nCG^p)_2$ + $(^nCG^p)_3/(^nCG^p)_3$-Slido + 2 EDC → $(^nCG^p)_4/(^nCG^p)_4$-Slido + 2 EDU	2 n2 + n6s + 2 EDC → n8s + 2 EDU	k_3
42	2 $(^nCG^p)_2$ + $(^nCG^p)_4/(^nCG^p)_4$-Slido + 2 EDC → $(^nCG^p)_5/(^nCG^p)_5$-Slido + 2 EDU	2 n2 + n8s + 2 EDC → n10s + 2 EDU	k_3
43	2 $(^nCG^p)_2$ + $(^nCG^p)_5/(^nCG^p)_5$-Slido + 2 EDC → $(^nCG^p)_6/(^nCG^p)_6$-Slido + 2 EDU	2 n2 + n10s + 2 EDC → n12s + 2 EDU	k_3
44	2 $(^nCG^p)_2$ + $(^nCG^p)_6/(^nCG^p)_6$-Slido + 2 EDC → $(^nCG^p)_7/(^nCG^p)_7$-Slido + 2 EDU	2 n2 + n12s + 2 EDC → n14s + 2 EDU	k_3
45	2 $(^nCG^p)_2$ + $(^nCG^p)_7/(^nCG^p)_7$-Slido + 2 EDC → $(^nCG^p)_8/(^nCG^p)_8$-Slido + 2 EDU	2 n2 + n14s + 2 EDC → n16s + 2 EDU	k_3
46	EDC → EDU	EDC → EDU	k_4

Tab. 8.8: Reaktionsgleichungssystem der Ligationen im Slidomer, sowie der unproduktiven EDC-Abreaktion

Bereits dieses stark vereinfachte und auf ein Minimum reduzierte Slidomermodell umfasst 46 Reaktionsgleichungen, geringfügig erweiterte Modelle kommen schnell auf weit über 100 Gleichungen. Durch die geringe Anzahl von vier freien Geschwindigkeitskonstanten erlaubt das Fitting allerdings relativ zuverlässige Aussagen über die k-Werte.

Fitting mit dem Slidomermodell

Um den Fit des Slidomermodells mit dem des rein spontanen Ligationsmodells zu vergleichen, wurden zunächst Einzelfits beider Modelle mit den Messwerten der vier Kinetiken des offenen CG-Systems bei 0%, 7.5%, 15% und 30% $^n(CG)_2{}^p$-Zugabe durchgeführt.

Im Einzelfit des 0% $^n(CG)_2{}^p$-Datensatzes mit dem rein spontanen Reaktionsmodell verbessert sich der RMS-Wert deutlich auf ca. 1.929 %, im Gegensatz zu den 12.866 % des Gesamtfits. Die zur Slidomergenerierung notwendigen längeren Oligomere werden erst im Laufe der Reaktion gebildet, so dass der Reaktionsstart noch recht gut mit dem Modell der spontanen Ligation beschrieben werden kann. Sobald aber ausreichend slidomerfähiges Material

(≥4mer) zum Beginn der Reaktion vorhanden ist, ist das spontane Ligationsmodell erheblich schlechter in der Lage die Vorgänge in Lösung hinreichend zu beschreiben, da die RMS-Werte der Kinetiken bei Zugabe von 7.5%, 15% und 30% $^{n}(CG)_2^{p}$ auf 10.141 %, 12.502 % und 10.479 % anspringen und die bereits beim Gesamtfit beobachtete Schere (Abb. 8.52-Abb. 8.54) in den Fits zwischen zu viel gebildetem 4mer und zu wenig generierten höheren Oligomeren klafft. Am Beispiel des Fits für 15% $^{n}(CG)_2^{p}$, dessen Kinetik im folgenden als Demonstrationsobjekt der Modelleffekte auf die Kurvenverläufe dient, sei dies in Abb. 8.59 (Direktplot aus *SimFit*) verdeutlicht.

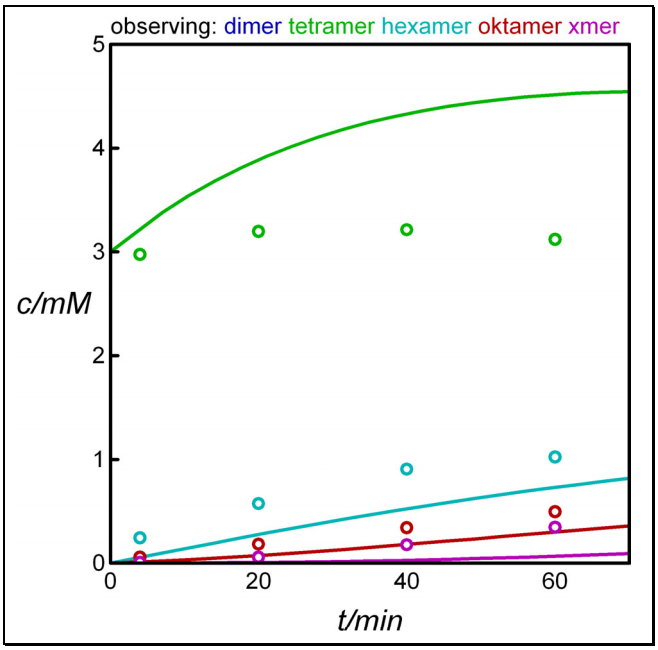


Abb. 8.59: Einzelfitbeispiel der rein spontanen Ligation für 20 mM $^{n}CG^{p}$ + 15% $^{n}(CG)_2^{p}$, RMS=12.502 %

Für das Slidomermodell werden die zuvor erarbeiteten 46 Reaktionsgleichungen mit einem Equilibrierungsfaktor von $1 \cdot 10^{-4}$ herangezogen und an die Messdaten gefittet. Der RMS-Wert verbessert sich bei allen vier Kinetiken deutlich auf 1.427 %, 5.340 %, 6.298 % und 5.285 % für jeweils 0%, 7.5%, 15% und 30% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe. Diese Verbesserung ist insbesondere auf den besseren Fit der 4mer Kurve zurückzuführen, wobei allerdings gleichzeitig zu viel 6mer und 8mer verbraucht werden, so dass das Modell insgesamt eine zu starke Bildung höherer Oligomere begünstigt, die unter Xmer zusammengefasst sind. Das Beispiel des Fits für 15% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe demonstriert diesen Effekt in Abb. 8.60.

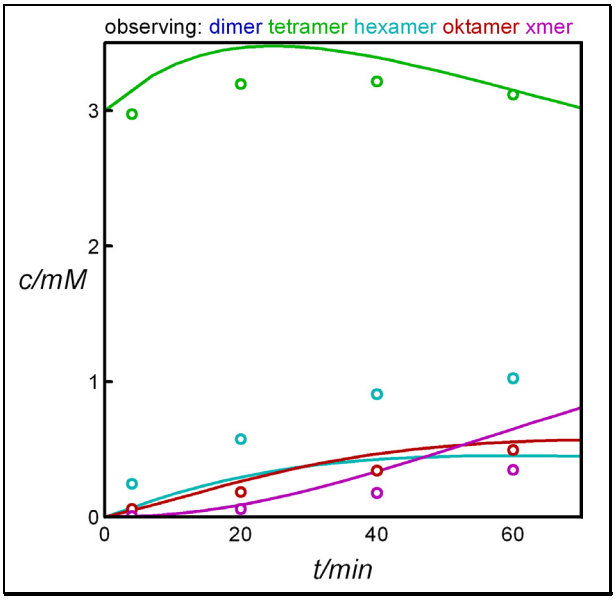


Abb. 8.60: Einzelfitbeispiel des Slidomermodells mit 15% $^{n}(CG)_2^{p}$, Equilibrierungsfaktor=$1\cdot10^{-4}$, RMS=6.298 %

Der Grund für die übermäßig starke Bildung höherer Oligomere im Modell liegt in der durch den Equilibrierungsfaktor von $1\cdot10^{-4}$ in den Gleichungen 25 bis 30 (siehe Tab. 8.7) hervorgerufenen Betonung der Bildung längerer Slidomer-Duplexe, die damit wesentlich weniger dissoziieren als ihre kürzeren Äquivalente und so die Synthese längerer Bausteine stark beschleunigen. Dieser Faktor ist zwar thermodynamisch vernünftig, um die Stabilitätsdifferenzen von Slidomer-Duplexen untereinander wiederzugeben, im vereinfachten Slidomer-Kinetikmodell hat er jedoch deutliche Abweichungen der Fitkurven von den Messpunkten der realen Reaktion zur Folge.

Da die Slidomer-Duplexe des Fittingmodells die Gesamtheit der Slidomer-Komplexe verkörpern müssen, war eine Abweichung zu erwarten, aber sie wird durch den Umstand verschärft, dass der katalyseartige Effekt der Slidomere im Modell wegen des hohen Equilibrierungsfaktors insbesondere bei den längeren Oligomeren zum Tragen kommt, während die kürzeren Slidomer-Duplexe des Modells eher dissoziieren. Real werden sich jedoch voraussichtlich lange Slidomere bilden, die eine Vielzahl unterschiedlicher Slidomer-Duplexe enthalten. In diesen gemischten Slidomeren und an deren Enden können die Ligationen stattfinden, die zu höheren Oligomeren führen. Die Zusammensetzung der einzelnen Slidomere wird bei ungefähr gleicher Anzahl der enthaltenen Bausteine untereinander sehr ähnlich sein, da der Energiegewinn bei der Anlagerung eines weiteren Slidomer-Duplexes unabhängig von der Länge der im Slidomer-Duplex befindlichen Oligomere $\Delta G_{37°C}$ = -7.12 kcal·mol^{-1} beträgt (für $\Delta G_{2°C,1M\ Nacl}$ = -9.95 kcal·mol^{-1}, Berechnung

nach NN-Modell, Kap.8.2.5). Das 'Interface' zwischen zwei Slidomer-Duplexen und damit auch der Stabilitätsgewinn bei Hybridisierung dieser Schnittstellen ist immer gleich (siehe Abb. 8.61). Die Stabilisierung des Slidomers kann man demnach in zwei Anteile aufspalten: Zum einen in die von der Länge der enthaltenen Oligomere abhängige Stabilisierung durch Slidomer-Duplexbildung, zum anderen in die von der Länge unabhängige, konstante Stabilisierung durch Hybridisierung der Interfaces zwischen den Slidomer-Duplexen.

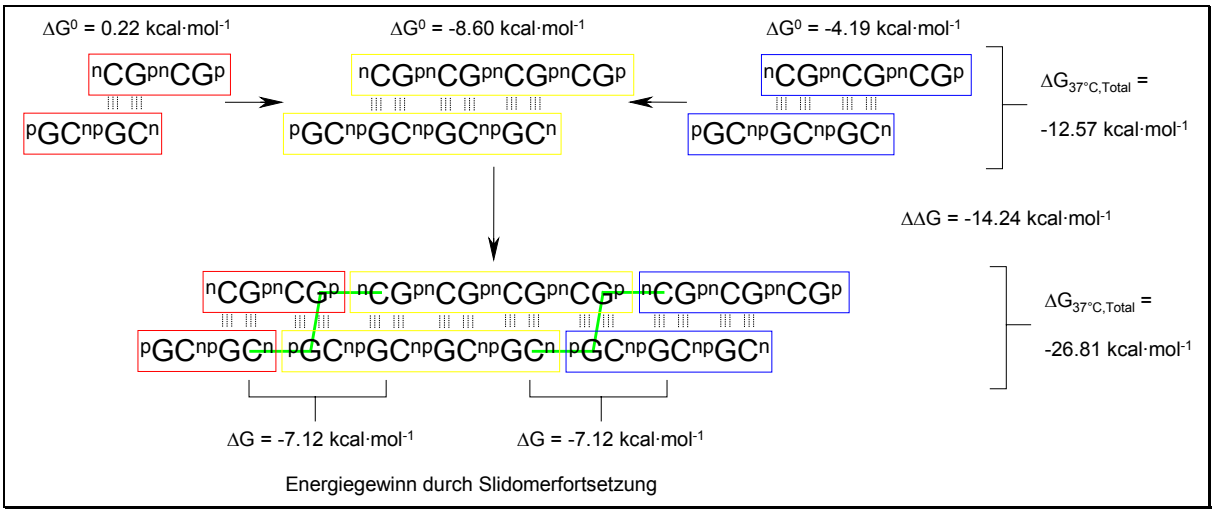


Abb. 8.61: Konstanter Betrag des Energiegewinns aus der Hybridisierung der Slidomer-Schnittstellen

Wenn Slidomere eine festgelegte Länge hätten, würde, wie bereits in Kap. 8.3.3 thermodynamisch diskutiert, beispielsweise ein kurzes Slidomer mit einer festen Länge von insgesamt 64 Nucleotiden pro Strang, das aus 8 x 8mer-Duplexen aufgebaut ist, durch den entropischen Vorteil stabiler sein als eines, das aus 16 x 4mer-Duplexen bestünde. Aber durch die freie Länge, dem einheitlichen Energiegewinn bei der Slidomer-Duplex Anlagerung, dem Austausch der Bausteine im Slidomer durch Assoziations-Dissoziations-Gleichgewichte und nicht zuletzt durch die größere Konzentration an kürzeren Oligomeren werden sich die vorhandenen Oligomere voraussichtlich statistisch auf alle Slidomere verteilen, so dass ein maximaler Stabilitätszuwachs durch die Generierung gemischter Slidomere erreicht wird. Theoretisch würde erst ein extrem langes Slidomer, das alle in Lösung befindlichen Bausteine ab dem 4mer umfasst, den Endpunkt der Slidomerbildung darstellen. Hier wird allerdings höchstwahrscheinlich, wie zuvor in Kap. 8.3.1 beschrieben, die Komplexdissoziation zu vielen kürzeren Slidomeren führen, deren maximale Länge unbekannt ist. Insgesamt wird es keine Populationen von Slidomeren geben, die primär aus einer bestimmten Sorte von Slidomer-Duplexen aufgebaut sind. Damit ist die streng getrennte Betrachtung der Slidomer-Duplexe im Modell nur eine grobe Annäherung an die Vorgänge in Lösung. Der Einfluss der

längeren Oligomere auf die Bildung der Slidomere und damit ihr katalytisches Gewicht sollte demzufolge real geringer sein, als er mit dem Equilibrierungsfaktor von $1 \cdot 10^{-4}$ des Slidomer-Kinetikmodells angedeutet wird. Insofern ist es sinnvoll den Equilibrierungsfaktor zu verringern, um die übermäßige katalytische Wirkung der langen Oligomere in den Fits zu reduzieren und eine realistischere Wiedergabe der Reaktionsverhältnisse zu erreichen. Die Dissoziationsreaktionen des Modells beschreiben auf diese Weise mit einem verringertem Equilibrierungsfaktor mehr die Dissoziation der Bausteine aus dem Slidomerverbund, als die Dissoziationen der einzelnen Slidomer-Duplexe, die real im Slidomer integriert vorliegen. Möglicherweise spielt bei längeren Oligomeren der in Kap. 8.3.3 bereits angedeutete, mit steigender Oligomerlänge zunehmend bremsende Effekt eine Rolle, der zur, evtl. auch nicht-linearen, Senkung des Equilibrierungsfaktors führen könnte. Der Equilibrierungsfaktor veranschaulicht somit in Kombination mit der jeweiligen Dissoziationskonstante k_2 den Anteil eines Oligomertyps an der Slidomerstabilisierung - je größer die negative Potenz des Faktors bzw. je länger das Oligomer, desto stärker trägt der Baustein zur Stabilisierung des Slidomers und letztendlich zur Katalyse bei.

Tatsächlich erzielt ein Equilibrierungsfaktor von $1 \cdot 10^{-1}$ in den Fits deutliche bessere RMS-Werte und eine Annäherung der Fitkurven an die Messwerte, wobei die Fitkurven der Xmer-Bildung wahrscheinlich aufgrund eines nicht-linearen Zusammenhangs zwischen Equilibrierungsfaktor und Slidomer-Duplexlänge immer noch ein wenig zu hoch liegen (siehe Beispiel des Fits für 15% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe in Abb.8.62a). Diese Ergebnisse offenbaren das Optimierungspotenzial des Slidomermodells durch weitere Variation des Equilibrierungs-faktors, wobei Werte größer 1 physikalisch wenig sinnvoll wären, weil dann der Einbau kürzerer Oligomere in Slidomere schneller vonstatten gehen müßte, als der Einbau längerer Bausteine. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurde ein Scan der Equilibrierungs-faktoren zwischen 0.1 und 1 durchgeführt, der eine erneute Verbesserung der RMS-Werte zur Folge hatte, wobei sich ein Equilibrierungsfaktoroptimum von ca. 0.3 für die Kinetiken mit 7.5% und 15% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe und von ca. 0.2 für die Kinetik mit 30% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe herauskristallisierte, während die Kinetik mit 0% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe bei allen Werten zwischen 0.1 und 1 den gleichen optimalen RMS-Wert lieferte. Abb.8.62 zeigt am Beispiel des Fits für 15% $^{n}(CG)_2^{p}$-Zugabe die Fortschritte des Fittings durch die Verwendung eines Equilibrierungsfaktors von 0.1 bzw. 0.3.

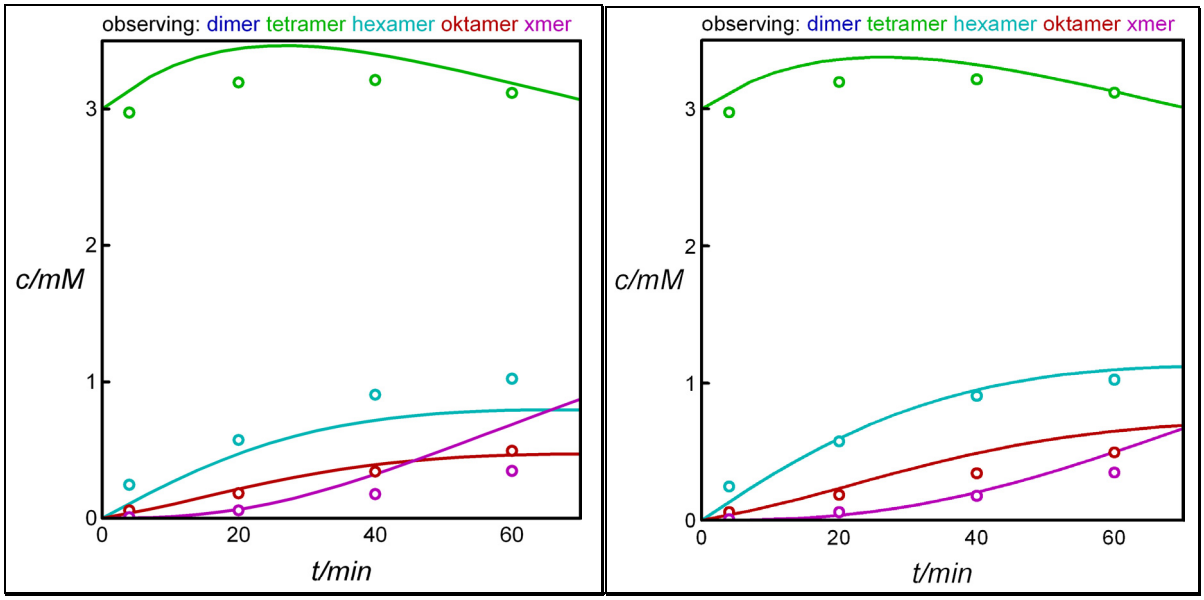
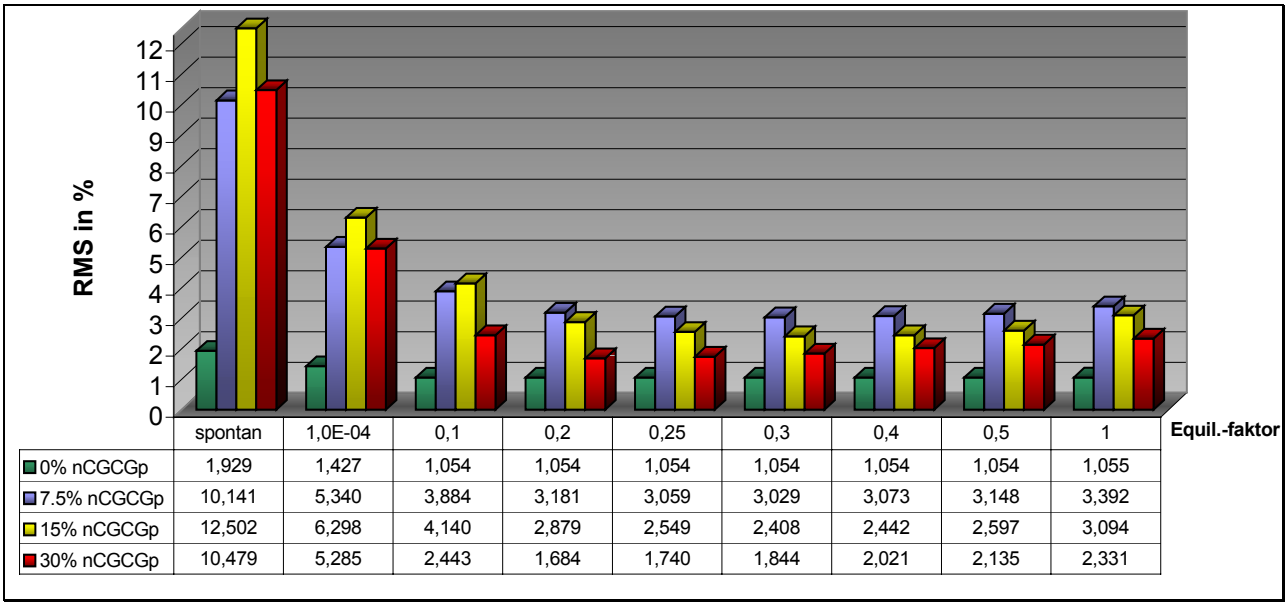


Abb.8.62a:+15% $^{n}(CG)_2^{p}$,Eq.-faktor=0.1,RMS=4.140% **b:** +15% $^{n}(CG)_2^{p}$,Eq.-faktor=0.3,RMS=2.408%

Abb. 8.63 fasst die Ergebnisse des Equilibrierungsfaktorscans der Einzelfits in einer Balkengrafikübersicht zusammen.



	spontan	1,0E-04	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	1
0% nCGCGp	1,929	1,427	1,054	1,054	1,054	1,054	1,054	1,054	1,055
7.5% nCGCGp	10,141	5,340	3,884	3,181	3,059	3,029	3,073	3,148	3,392
15% nCGCGp	12,502	6,298	4,140	2,879	2,549	2,408	2,442	2,597	3,094
30% nCGCGp	10,479	5,285	2,443	1,684	1,740	1,844	2,021	2,135	2,331

Equil.-faktor

Abb. 8.63: RMS-Werte der Spontanreaktion- bzw. der Slidomer-Einzelfits bei versch. Equilibrierungsfaktoren

Die Verbesserung der Fits per Slidomermodell gegenüber denen des rein spontanen Ligationsmodells ist deutlich sichtbar. Die Variation des Equilibrierungsfaktors erzielt nochmals eine starke Optimierung. Da eine bestmögliche Übereinstimmung der Fits mit den Messdaten aufgrund des stark vereinfachten Slidomermodells ohnehin nicht zu erwarten war, ist die erreichte Annäherung beachtlich und bestätigt die Theorie zusätzlicher

Reaktionskanäle über Slidomere, die zu einer Reaktionsbeschleunigung führen. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass die optimalen Equilibrierungsfaktoren der einzelnen Kinetiken relativ nahe beeinanderliegen. Diese Koinzidenz unterstreicht die Eignung des Modells, trotz seiner Simplizität die realen Verhältnissen zu beschreiben.

Für den Equilibrierungsfaktor 0.3 sind in den Abb. 8.64a-d die Einzelfits des Slidomermodells für die Kinetiken von 20 mM $^{n}CG^{p}$ +0%, +7.5% +15% und +30% $^{n}(CG)_2^{p}$ zusammengestellt.

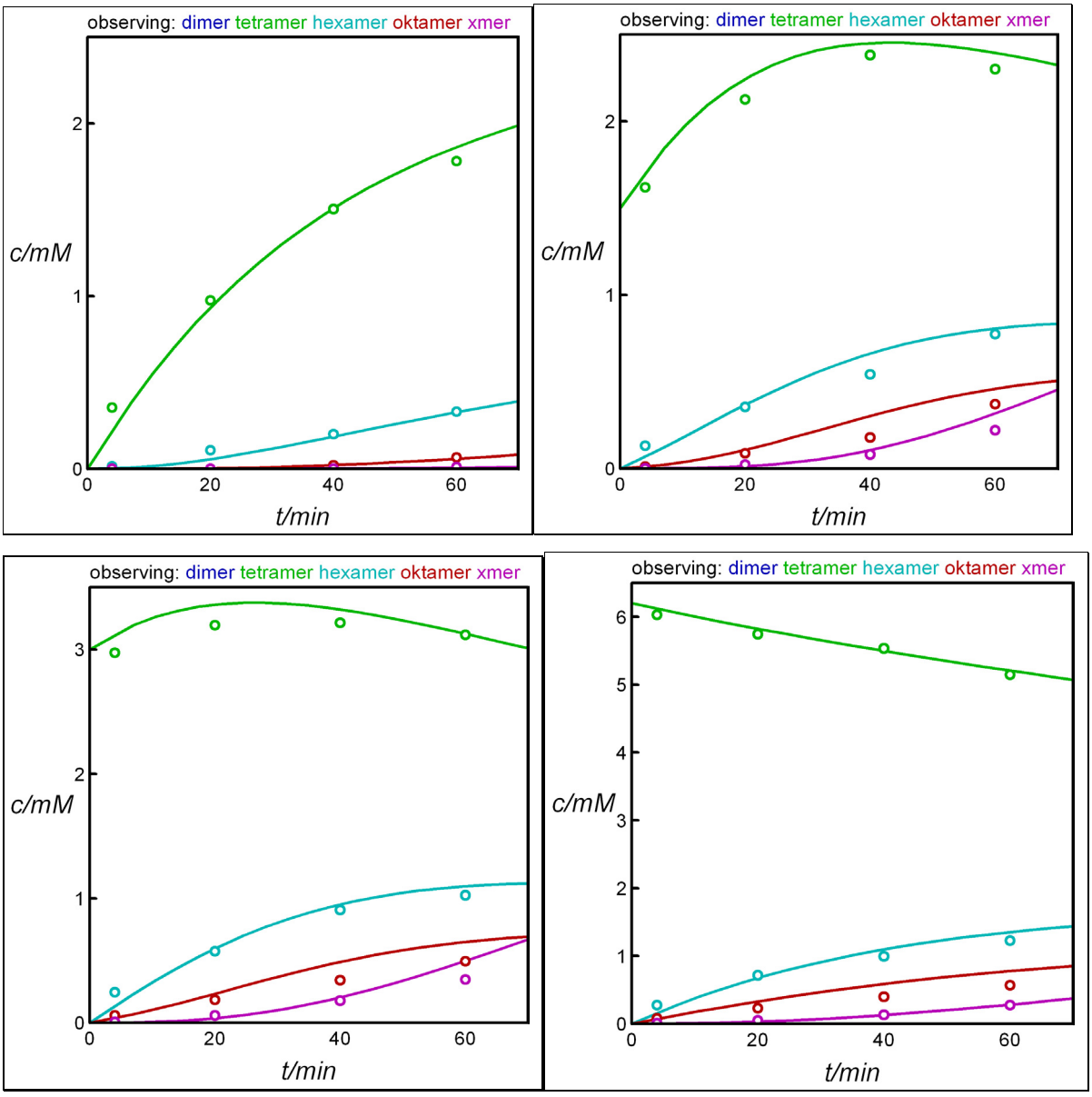


Abb. 8.64a-d:+0, 7.5, 15, 30% $^{n}(CG)_2^{p}$,Eq.-faktor = 0.3, RMS = 1.054% (a), 3.029% (b), 2.408% (c), 1.844%(d)

Aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten der spontanen Ligation und der über Slidomere beschleunigten Ligation kann man die 'katalytische' Effizienz ε über $\varepsilon = \frac{k_{spontane\ Ligation}}{k_{katalysierte\ Ligation}} = \frac{k_1}{k_3}$ berechnen. Die Geschwindigkeitskonstanten der Fittings und der resultierenden Effizienzen ε sind in Tab. 8.9 zusammengefasst, wobei für das Slidomermodell ein Equilibrierungsfaktor von 0.3 gewählt wurde, da dieser für den Gesamtfit den besten RMS-Wert erzielte, welcher aufgrund der Zusammenfassung mehrerer Fits naturgemäß schlechter als der der Einzelfits ist.

Fit-Modell	k_1 spontane Ligation	k_2 Slido-Duplex Dissoziation	k_3 Slidomer-Ligation	k_4 EDC-Hydrolyse	RMS in %	ε
Gesamtfit: spontane Ligation	$8.70 \cdot 10^{-3}$	-	-	$1.33 \cdot 10^{-8}$	12.866	-
Einzelfit: ${}^{n}CG^{p}$ + 0% ${}^{n}(CG)_2{}^{p}$	$8.21 \cdot 10^{-3}$	-	-	$9.34 \cdot 10^{-5}$	1.929	-
Einzelfit: ${}^{n}CG^{p}$ + 7.5% ${}^{n}(CG)_2{}^{p}$	$1.17 \cdot 10^{-2}$	-	-	$1.12 \cdot 10^{-9}$	10.141	-
Einzelfit: ${}^{n}CG^{p}$ + 15% ${}^{n}(CG)_2{}^{p}$	$1.10 \cdot 10^{-2}$	-	-	$1.70 \cdot 10^{-8}$	12.502	-
Einzelfit: ${}^{n}CG^{p}$ + 30% ${}^{n}(CG)_2{}^{p}$	$6.49 \cdot 10^{-3}$	-	-	$3.52 \cdot 10^{-9}$	10.479	-
Gesamtfit: Slidomermodell	$8.55 \cdot 10^{-3}$	$3.24 \cdot 10^{4}$	2.56	$4.93 \cdot 10^{-8}$	10.909	299
Einzelfit: ${}^{n}CG^{p}$ + 0% ${}^{n}(CG)_2{}^{p}$	$8.20 \cdot 10^{-3}$	$4.99 \cdot 10^{4}$	$2.54 \cdot 10^{1}$	$9.95 \cdot 10^{-5}$	1.054	3098
Einzelfit: ${}^{n}CG^{p}$ + 7.5% ${}^{n}(CG)_2{}^{p}$	$1.13 \cdot 10^{-2}$	$2.54 \cdot 10^{4}$	$1.31 \cdot 10^{1}$	$7.97 \cdot 10^{-9}$	3.029	1159
Einzelfit: ${}^{n}CG^{p}$ + 15% ${}^{n}(CG)_2{}^{p}$	$1.03 \cdot 10^{-2}$	$4.14 \cdot 10^{4}$	$1.15 \cdot 10^{1}$	$5.92 \cdot 10^{-8}$	2.408	1116
Einzelfit: ${}^{n}CG^{p}$ + 30% ${}^{n}(CG)_2{}^{p}$	$5.85 \cdot 10^{-3}$	$1.02 \cdot 10^{5}$	7.78	$2.44 \cdot 10^{-5}$	1.844	1330

Tab. 8.9: Geschwindigkeitskonstanten und ε-Werte für spont. Ligation und Slidomermodell mit Eq.-faktor 0.3

Die Senkung der RMS-Werte zwischen dem rein spontanen Modell und dem Slidomer Ligationsmodell verdeutlicht erneut die Verbesserung des Fittings durch die zusätzlichen Reaktionskanäle über Slidomere. Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 bis k_3 schwanken maximal um eine Größenordnung und sind damit relativ zuverlässig bestimmt. Die stärkere Variation der Geschwindigkeitskonstante k_4 der EDC-Hydrolyse liegt in ihrem geringen absoluten Wert und damit einhergehenden geringen Einfluss auf den Fit begründet, so dass diese Konstante unbestimmter als die anderen ist und größeren Schwankungen unterliegen kann, ohne das Fitting stark zu beeinflussen. Der Gesamtfit des Slidomermodells über alle vier Kinetiken liefert gemittelte Geschwindigkeitskontanten, die in den erwarteten Größenordnungen liegen. Die Beschleunigung der Oligomerisierung durch Slidomere liegt mit einer 'katalytischen' Effizienz ε zwischen ca. 300 und 3000 und zeigt damit für Replikationsexperimente typische Werte[33,36b,61,64,130,134,169].

8.6 Das Oligomerisierungspotenzial des CG-Systems

Nach dem bisherigen Kenntnisstand wird die Oligomerisierung des CG-Systems über Slidomerkomplexe in einer Größenordnung beschleunigt, die in etwa der der bekannten Reaktionsbeschleunigung über termolekulare Komplexe entspricht. Hierbei werden die gebildeten Oligomere in multimolekularen Komplexverbunden, den Slidomeren integriert, in denen die Ligation zwischen den reaktionsfähigen Enden zweier Bausteine durch die räumliche Nähe begünstigt wird. Geht man von geordneten Slidomeren aus, dann ist die kleinste Untereinheit eines Slidomerkomplexes ein Slidomer-Duplex aus zwei gestaffelt hybridisierten Oligomeren gleicher Länge, wobei pro Slidomer-Duplex 4 Basen endständig ungepaart sind. Diese universelle Schnittstelle der 'sticky ends' (siehe auch Abb. 8.32) kann nun durch Hybridisierung mit weiteren Slidomer-Duplexen zur Generierung sehr langer gemischter Slidomere dienen, in denen die beschleunigte Ligation stattfindet. Durch den einheitlichen Stabilitätsgewinn aus der Hybridisierung der überhängenden Enden ist der Aufbau völlig gemischter Slidomere möglich, in denen alle bislang entstandenen Bausteintypen vorkommen können.

Im Vergleich zur Autokatalyse über termolekulare Komplexe findet die Reaktionsbeschleunigung im Slidomer nicht durch direkte Anlagerung zweier Edukte an das Produkt bzw. Templat statt, sondern durch die Hybridisierung der ungepaarten Basen der Slidomer-Duplexenden. Die Bausteine eines Slidomers können auf diese Weise gleichzeitig Templat und Edukt längerer Oligomere sein. Während aus der Ligation in einem termolekularen Komplex ein Duplex entsteht, dessen Stabilität von der Länge und der Konzentration der Produktoligomere abhängt und somit das Templat als Katalysator im Reaktionsverlauf durch steigende Duplexierungsneigung 'inaktiviert', sind die Ligationsprodukte des Slidomers in der Lage, durch Slidomer-Duplexbildung sofort wieder am Slidomerverbund teilzunehmen und weitere Ligationen zu fördern, da die störende vollständige Duplexbildung der Produkte nicht stattfindet. So sollten z.B. 34mer-Slidomer-Duplexe ebenso schnell in ein Slidomer aufgenommen werden können, wie 4mer-Slidomer-Duplexe, da der Einbau eines Slidomer-Duplexes aus zwei 34meren in ein Slidomer durch die identische Überlappung der überhängenden Enden genauso viel Energiegewinn verbuchen würde, wie der eines Slidomer-Duplexes aus zwei Tetrameren. Der Energiegewinn aus der Hybridisierung der überhängenden Enden zwischen den Slidomer-Duplexen ist im Vergleich zur Stabilität der zunehmend wachsenden Slidomer-Duplexe relativ gering. Dieses Interface

stellt eine Art 'Sollbruchstelle' des Slidomers dar, die neben der normalen Slidomer-Duplex-Dissoziation eine rasche Reorganisation und Reaktivierung nach Ligationen im Slidomer gewährleisten kann (siehe Kap. 8.3.3).

Sowohl bei Katalyse über termolekulare Komplexe, als auch bei Reaktionsbeschleunigung über Slidomere führen die mit der Zeit sinkende Aktivatorkonzentration und die Abnahme der reaktiven Enden zu einer stetigen Verlangsamung der Gesamtreaktion. Aufgrund der ausbleibenden Produktinhibition bleibt aber die reaktionsfördende Aktivität der Slidomere über den gesamten Reaktionszeitraum offenbar auf hohem Niveau erhalten, so dass die Oligomerisierung insgesamt zügig und effektiv verläuft. Im Verbund mit der hohen Reaktivität der 5'-Amino- und 3'-Phosphatgruppe der Bausteine können auf diesem Wege deutlich längere Oligomere generiert werden, als nach *Ferris* bislang enzymfrei möglich waren (siehe auch Kap. 1.5).

In einer viel beachteten Arbeit beschrieben *Ferris* und *Orgel* die Synthese eines 55mers innerhalb von 14 Tagen durch mehrstufige Oligomerisierung über Verlängerung des Decanucleotidprimers $dA(pdA)_8pA$ mit aktivierten monomeren 5'-Phosphorimidazolid-nucleosiden (z.B. ImpA) an mineralischen Oberflächen (z.B. Montmorillonit)[42]. Die Aufkonzentration der Bausteine durch Adsorption an der Mineralienoberfläche hatte einen katalysierenden Effekt auf die Oligomerisation, die ansonsten in Lösung höchstens bis zum 10mer gelang. *Szostak* und *Ellington*[170] gehen davon aus, dass Oligomere eine Länge von 30-60 Nucleotiden haben sollten, um ein lebensfähiges genetisches System bilden zu können. In diesem Zusammenhang weist *Ferris* darauf hin, dass es bislang nicht möglich gewesen sei präbiotische Oligomere dieser Länge durch Kondensationreaktion in wässriger Lösung herzustellen, da die Hydrolyse mit der Kondensation konkurriere.

Die folgenden Oligomerisierungen mit 20 mM und 50 mM $^{n}CG^{p}$ zeigen dagegen deutlich, zu welchen Oligomerisationsgraden das CG-System innerhalb von nur 4 Stunden bei 2 °C in der Lage ist. Es folgt zunächst die Oligomerisierung mit 50 mM Edukt:

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}CG^{p}$	**c(Edukt)**	50 mM
c(EDC)	0.4 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2 °C	**HPLC-Säulentyp**	Mini Q IE
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	0.5 µl	**Elutionssystem**	$HClO_4/NaClO_4$

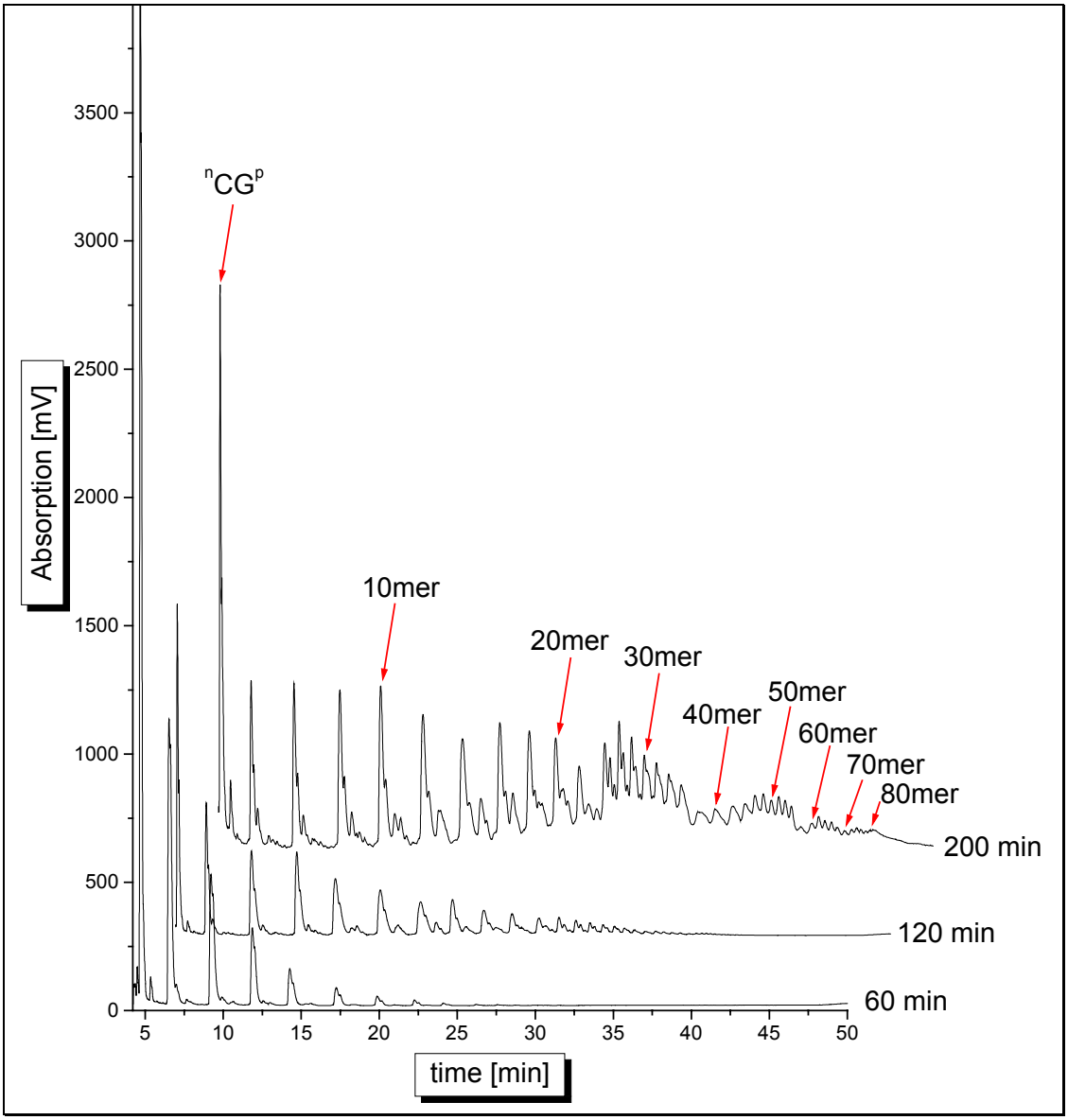


Abb. 8.65: HPLC-Stackplot der Kinetik von 50 mM $^{n}CG^{p}$,2°C, 0.4 M EDC, Y-Achsenzoom bei 200 min Mess.

Nach 120 min ist die Oligomerisation bereits bis zum 66mer fortgeschritten, während nach 200 min Peaks bis zum 80mer differenzierbar sind. Um die Produktpeaks besser herauszuarbeiten, wurde bei der 200 min Messung die Y-Achse vergrößert. Das Auflösungsvermögen der Ionenaustauschersäule hat für die Produkte bei diesen Längen sein Maximum erreicht, so dass längere Oligomere nicht mehr einzeln unterschieden werden können, obgleich sie stetig gebildet werden. Die leichte Nachpeakbildung ist wie bereits in Kap. 8.1.2 beschrieben durch Säuleneffekte zu erklären. Die Längenzuordnung der Peaks zu den Oligomeren erfolgt durch Abzählen. Diese Methode kann als zuverlässig angesehen werden, da die Identifizierung der ersten Produktpeaks per MALDI-TOF bereits erfolgreich durchgeführt wurde (Kap. 7.4.2) und die erwarteten Massen lieferte, so dass die in systematischem Abstand folgenden Peaks ebenfalls Oligomerisationsprodukte mit

entsprechender Längendifferenz sein müssen. Die Massenbestimmung der höheren Oligomere per MALDI konnte aufgrund der in Kap. 7.1 beschriebenen Fragmentierung während der Messung nicht ausgeführt werden. Auch mit einem ESI-Massenspektrometer war es nicht möglich die Maximalmasse im Kinetikansatz zu bestimmen, da sich die Massen der kürzeren Oligomerisationsprodukte mit den Massensignalen der mehrfach geladenen längeren Oligomere überschnitten und die ESI-Auswertungssoftware überforderten.

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, bis zu welchem Grad die Abreaktion des Edukts zu höheren Oligomeren erfolgt. Hierzu wurde ein Kinetikexperiment mit 20 mM $^{n}CG^{p}$ durchgeführt, dessen letzter Messpunkt nach drei Tagen Reaktionszeit aufgenommen wurde.

Reaktions- und Chromatografiebedingungen			
Edukt	$^{n}CG^{p}$	**c(Edukt)**	20 mM
c(EDC)	0.4 M	**c(HEPES)**	0.1 M
Temperatur	2 °C	**HPLC-Säulentyp**	Mini Q IE
Quenchvolumen	200 µl	**Injektionsvolumen**	180 µl
Kapillarvolumen	1 µl	**Elutionssystem**	$HClO_4/NaClO_4$

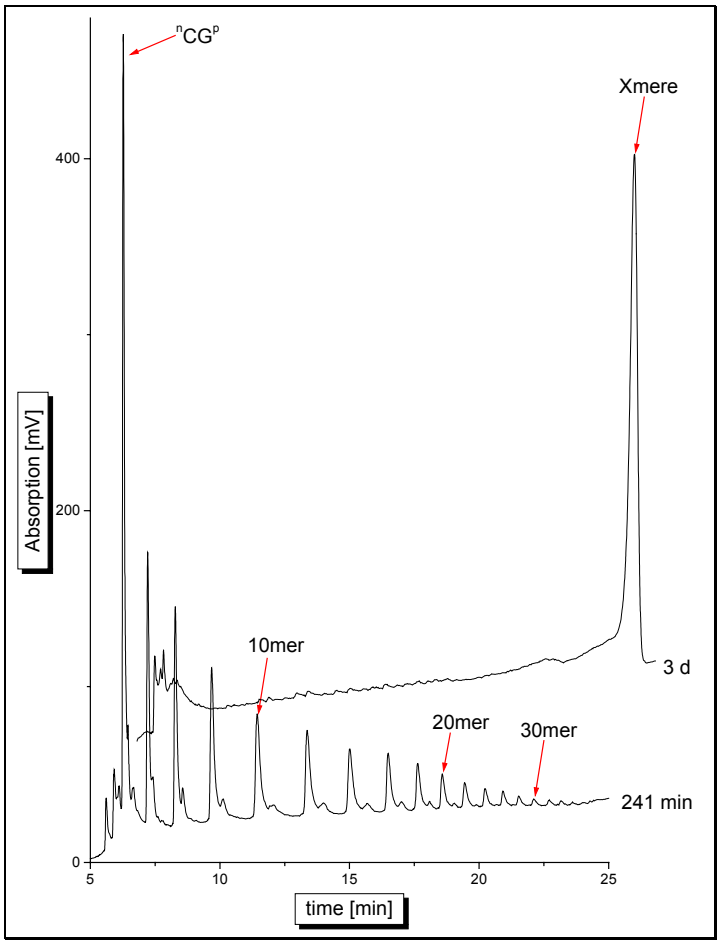


Abb. 8.66: HPLC-Stackplot der Kinetik von 20 mM $^{n}CG^{p}$, 2°C, 0.4 M EDC nach 241 min und nach 3 Tagen

Das HPLC-Chromatogramm der Messung nach drei Tagen zeigt einen einzigen sichtbaren Peak, der im Spülvorgang der Säule bei hohen $NaClO_4$-Konzentrationen eluiert wird. Folglich ist das Edukt $^{n}CG^{p}$ und sämtliche kürzeren Oligomere vollständig zu längeren Produktbausteinen abreagiert, die gemeinsam in einem Peak die Säule verlassen.

Das CG-System besitzt demnach die Fähigkeit lediglich durch Zugabe des Aktivators auch in Lösung Oligomerlängen zu erreichen, die anderweitig bei *Ferris* nur mit dem Einsatz von Mineralien nach wesentlich längerer Reaktionszeit und durch wiederholte Zugabe an aktiviertem Eduktmaterial zu einem bereits vorhandenen 10mer-Primer möglich waren. Die Aufkonzentrationswirkung an der Mineralienoberfläche wird beim CG-System durch die Slidomere übernommen, die die Bausteine durch Komplexierung in räumliche Nähe bringen. Die höheren Oligomere werden durch die anhaltende reaktionsbeschleunigende Wirkung der Slidomere stetig gebildet, obwohl die Anzahl der Reaktionspartner bzw. der reaktiven Gruppen und die Konzentration des Aktivators EDC beständig abnimmt.

9. Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung offener, d.h. beidseitig 5'-3'-ligationsfähiger Systeme von DNA-Derivaten bezüglich ihrer Oligomerisierung und deren Sequenzabhängigkeit, sowie ihrer replikativen Eigenschaften. Aufgrund ihrer kurzen Sequenz und hohen Reaktivität bei Kondensationsreaktionen mit dem Aktivator EDC unter Bildung von Phosphoamidaten wurden die vier möglichen 5'-Amino-3'-Phosphat-Pyrimidin-Purin-Dimere $^{NH_2}CA^{PO_4^{2-}}$ und $^{NH_2}TG^{PO_4^{2-}}$ (nicht selbstkomplementär), sowie $^{NH_2}TA^{PO_4^{2-}}$ und $^{NH_2}CG^{PO_4^{2-}}$ (selbstkomplementär) ausgewählt und generiert, wobei die jeweils einseitig 5'-Azido oder 3'-Phenylthioethyl (3'-PTE) geschützten Varianten als Vorstufen anfielen.

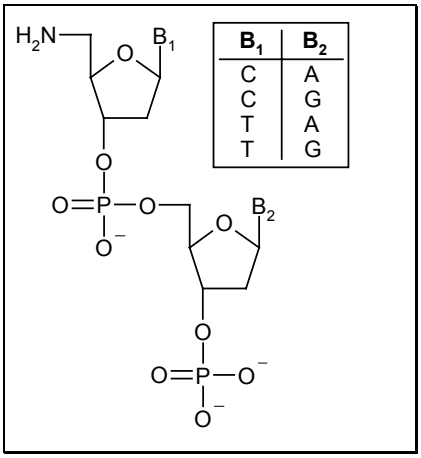


Abb. 9.1: Die vier möglichen 5'-Amino-3'-Phosphat-(Py/Pu)-Dimere

Erste Kondensationsreaktionsversuche zeigten bei Dimerkonzentrationen von 1 mM in 0.1 M HEPES-Pufferlösung mit 0.2 M EDC und Reaktionstemperaturen zwischen 2 und 30 °C ausschließlich die Bildung eines einzigen Produktes bei einer Reaktion 1. Ordnung, das mittels MALDI-TOF als cyclische Form des jeweiligen Dimers charakterisiert werden konnte. Diverse Ansätze zur Vermeidung der Cyclisierung durch Stabilisierung bzw. Streckung des Phosphatrückgrates und damit einhergehender räumlicher Trennung der reaktiven Enden innerhalb der Dimermoleküle durch Zugabe von mono- und divalenten Kationen bei allen vier Dimeren oder Zugabe von tetramerem Templat (CACA, TGTG) bei TG und CA waren nicht erfolgreich.

Erst die Erhöhung der Dimer-Ausgangskonzentration auf 50 mM brachte den erwarteten Durchbruch und führte zu den gewünschten Oligomerisationsprodukten, die mittels

MALDI-TOF-MS charakterisiert wurden. Daraufhin wurden die vier offenen Dimere separat bei Temperaturen von 2 °C, 15 °C und 30 °C und einer Konzentration von 50 mM mit 0.2 M EDC (Verhältnis Dimer zu EDC = 1:4) umgesetzt, um den Einfluss der Dimersequenz auf die Oligomerisierung bei verschiedenen Temperaturen zu untersuchen. Die monomolekulare Cyclisierungsreaktion, konnte durch die Edukt-Konzentrationserhöhung in den Hintergrund gedrängt werden und wurde besonders bei niedriger Temperatur (2 °C) weitestgehend unterdrückt, wobei vor allem das CG-System durch kaum nachweisbare Cyclisierung positiv auffiel. Die spontanen Reaktionskanäle der Oligomerisierung bis zu einem 16mer sind in Abb. 9.2 dargestellt. Mit jedem weiteren Produkt wächst die Anzahl möglicher Reaktionswege des Gesamtsystems überproportional an (siehe auch Tab. 7.1, Kap. 7.3.1).

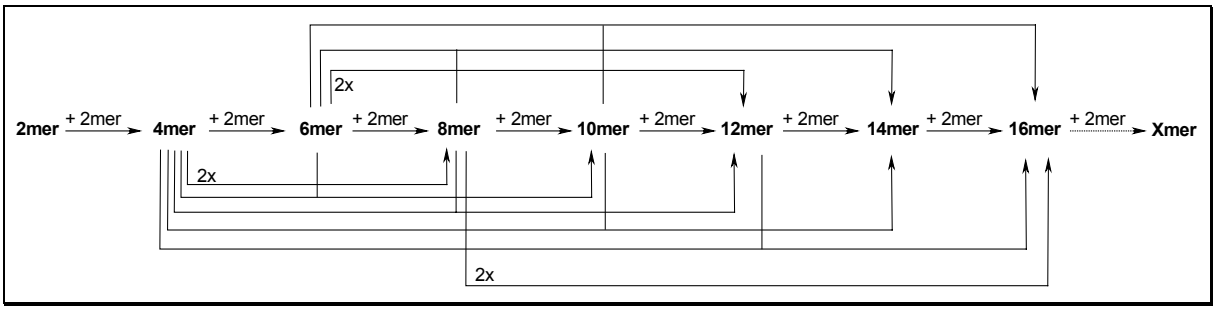


Abb. 9.2: Reaktionskanäle der Oligomerisierung bis zum 16mer

Die Konzentrations-Zeit-Kurven der Kinetiken wurden erstellt und mittels Kurvendiskussionsmethoden analysiert und klassifiziert. Die Einteilung der Kurven in Abschnitte erlaubte eine detailliertere Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeits-veränderungen und Beschleunigungsvorgänge innerhalb eines Bildungskurvenabschnittes. Hierbei wurden drei verschiedene Kurvenklassen identifiziert und den im Reaktionsverlauf auftretenden Oligomeren zugeordnet, die sich durch ihre Stellung im Oligomerisierungs-prozess unterschieden. Die Kurven beschrieben den Eduktcharakter des Dimers (1. Kurvenklasse), den Zwischenproduktcharakter und Sonderstatus des Tetramers (2. Kurvenklasse), dessen dimeres Edukt im Verlauf der Reaktion beständig an Konzentration abnimmt und den reinen Zwischenproduktcharakter aller Oligomere ab dem Hexamer (3. Kurvenklasse), deren Eduktkonzentrationen zunächst zu- und dann wieder abnehmen.

Anhand der Konzentrations-Zeit-Kurven konnte folgende Reaktivitätsreihenfolge der vier Dimere festgelegt werden:

$$\boxed{{}^{n}CG^{p} >> ({}^{n}TA^{p} \approx {}^{n}TG^{p}) > {}^{n}CA^{p}}$$

Da diese Rangfolge nicht den thermodynamischen Erwartungen einer rein spontanen Ligation der entsprechenden Sequenzen entsprach, wurde für die schnell reagierenden Systeme der Einfluss zusätzlicher Reaktionskanäle über katalysierende Komplexe angenommen, die mit den Oligomerisationsprodukten gebildet werden können. Von derartigen Komplexen sollten prinzipiell nur die selbstkomplementären Systeme CG und TA profitieren können.

Mit Hilfe des Nearest-Neighbour-(NN-)Modells wurde unter Beachtung der Salz- und Temperaturkorrektur die generelle Stabilität reaktionskatalysierender Komplexe anhand der Duplexstabilitäten bei diversen Oligomerlängen ermittelt, die die gefundene Reaktivitätsreihenfolge bezüglich der Systeme CG, TA und CA bestätigte. Die starke Komplexierungsneigung des CG-Systems führte bei Produktoligomeren ab dem Octamer bereits zu Aggregationseffekten auf der RP-HPLC-Säule. Die ungewöhnlich ähnlichen Reaktionsgeschwindigkeiten des TA- und TG-Systems könnten sowohl durch eine zu geringe Populierung katalysierender Komplexe des TA-Systems bei den Versuchstemperaturen, als auch durch mögliche T/G-Wobble-Basenpaarung im TG-System und damit einhergehender Bildung reaktionsbeschleunigender Komplexe bedingt sein.

Zur genaueren Untersuchung der katalytisch wirkenden Komplexe eines offenen Systems wurde das CG-System ausgewählt, das die effektivste Oligomerisierung bei geringster Cyclisierungsneigung zeigte. Optimale Versuchsparameter wurden bei 2 °C und einer erhöhten Aktivatorkonzentration von 0.4 M EDC gefunden, die eine Reduzierung der Dimer-Konzentration auf 20 mM bei nahezu vollständiger Vermeidung der Cyclisierung ermöglichte und ein günstigeres Verhältnis zwischen Dimer und EDC von 20:1 zur Folge hatte. Der Einsatz von Ionenaustauschersäulen (Mini Q, Resource Q) unter stark denaturierenden Bedingungen (pH 12, $NaClO_4$-Gradient) gestattete trotz der hohen Aggregationsbereitschaft des CG-Systems eine Separierung der Produktpeaks.

Um die Katalysewirkung möglicher termolekularer Komplexe auf die Bildung der ersten drei Produkte 4mer, 6mer und 8mer getrennt zu überprüfen, wurden die drei aus einseitig geschlossenen Bausteinen bestehenden Einzelreaktionssysteme in Tab. 9.1 Kinetikexperimenten mit Templatzugabe unterzogen. Die hierzu benötigten Moleküle wurden entweder mittels DNA-Synthesizer hergestellt ($^{HO}(CG)_x{}^{OH}$-Template und $^{HO}(CG)_x{}^{p}$-Edukte) oder waren als einseitig geschützte Vorstufen der Dimersynthese vorhanden ($^{N_3}CG^{p}$ und $^{n}CG^{pte}$).

Oligo 1	Oligo 2	Templat	Temp.	c(EDC)	Puffer
20mM $^{N_3}CG^{p}$	20mM $^{n}CG^{pte}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES
20mM $^{HO}(CG)_2{}^{p}$	20mM $^{n}CG^{pte}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES
20mM $^{HO}(CG)_3{}^{p}$	20mM $^{n}CG^{pte}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES

Tab. 9.1: Einzelreaktions-Systeme für 4mer, 6mer und 8mer-Bildung

Die Auftragung der Konzentrations-Zeit-Kurven aller drei Einzelreaktionssysteme zeigte, dass die Templatzugabe keinen signifikanten reaktionsbeschleunigenden Effekt hatte. Einer thermodynamischen Abschätzung zufolge hätten termolekulare Komplexe insbesondere bei der Hexamer- und Octamerbildung existieren und damit reaktionsbeschleunigende Wirkung haben müssen, die jedoch ausblieb. Dieser Befund ließ sich mit der angenommenen Reaktionsbeschleunigung des offenen CG-Systems über Komplexe nur dann vereinbaren, wenn man keine termolekularen, sondern anders geartete katalysierende Komplexe postulierte.

Die gleichzeitig auftauchende Frage, warum die untersuchten Systeme trotz geeigneter Voraussetzungen keine termolekularen Komplexe ausbilden, war mit der Formulierung der Slidomertheorie lösbar. Diverse Autoren beobachteten in ihren Arbeiten bei der Verwendung von DNA- oder RNA-Oligomeren der Form $(CG)_x$ Effekte, die sich mit der Bildung hochmolekularer hybridisierter Aggregate der jeweiligen Oligomere, sogenannter 'Slidomere' (von 'to slide' - rutschen, verschieben), erklären lassen. Slidomere zeichnen sich durch beidseitig um eine CG-Einheit überhängende Enden (double-dangling ends bzw. sticky ends) aus, die eine einheitliche Schnittstelle zur Anlagerung weiterer CG-Oligomere und damit zur Slidomerverlängerung darstellen. Der Bildungsmechanismus verläuft dabei vermutlich über intermediär gebildete Slidomer-Duplexe, die an den überhängenden Enden miteinander hybridisieren und längere Slidomere ausbilden können (Abb. 9.3).

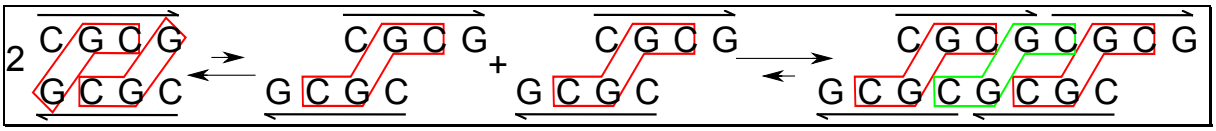


Abb. 9.3: Bildungsmechanismus eines kurzen Slidomers am Beispiel des Tetramers. Rot, Grün: Basenstapel

Mit Hilfe der RY-Theorie von *Bubienko* und *Borer*[154], die unter anderem die intra- und intermolekularen Basenstapel innerhalb einer Doppelhelix mit alternierender Pyrimidin-Purin-Sequenz beschreibt und unter Formulierung und Anwendung eines auf einem modifizierten NN-Modell basierenden thermodynamischen Modells zur Abschätzung der Slidomerstabilität

für einen Oligomertypus bei variabler Bausteinanzahl, ließ sich die Bevorzugung der Slidomer- vor der normalen Duplex-Bildung und damit auch vor den entropisch noch ungünstigeren termolekularen Komplexen sowohl qualitativ als auch thermodynamisch quantitativ begründen. Demnach wird durch maximale Integration der endständigen hydrophoben Basen der Oligomere in Basenstapel, die mit steigender Anzahl der Bausteine im Slidomer fortschreitet, die thermodynamisch stabilste Form erreicht. Durch die besondere Anordnung der Basenstapel innerhalb einer Doppelhelix mit $(Pyrimidin\text{-}Purin)_x$-Sequenz (Abb. 9.3, rote Basenstapel) führt die Hybridisierung der überhängenden Enden zweier Slidomere zur Bildung eines neuen, vier Basen umfassenden Stapels (Abb. 9.3, grüner Basenstapel). Er vernetzt gleichzeitig alle vier umliegenden Oligomere und stabilisiert das Slidomer zusätzlich zu den neu gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen. Der energetische Nachteil der jeweils vier ungepaarten endständigen Basen pro Slidomer fällt mit zunehmender Slidomerlänge bzw. steigender Anzahl eingebauter Oligomere immer weniger ins Gewicht und wird ab einer bestimmten Slidomerlänge vom Energiegewinn aus der Komplexierung überkompensiert. Dieser gleicht außerdem den entropischen Nachteil der Bildung eines multimolekularen Komplexes mehr als aus und stellt die Triebkraft der Slidomerbildung dar. Da die genaue Doppelhelix-Struktur möglicher Slidomere der in dieser Arbeit verwendeten Oligomere nicht zweifelsfrei bekannt ist und eine Mischform aufgrund entsprechender Veröffentlichungen bezüglich der Struktureigenschaften von $(CG)_x$-Oligomeren wahrscheinlich ist, wurde die obige thermodynamische Abschätzung sowohl für die A-, als auch die B-Form der Doppelhelix durchgeführt. Beide führten zu dem selben Ergebnis, dass die Slidomerbildung der Duplexbildung überlegen war. Das beobachtete Ausbleiben einer Autokatalyse deckt sich mit der These, dass die Oligomere der einseitig geschlossenen Einzelreaktionssysteme primär in Slidomere anstelle von termolekularen Komplexen integriert werden.

Die angenommene Reaktionsbeschleunigung des offenen CG-Systems sollte demnach über Slidomerkomplexe erfolgen. Aus diesem Grunde wurde zunächst das theoretische Modell der Slidomere für das offene CG-System um die Bildung gemischter geordneter und gemischter ungeordneter Slidomerstrukturen erweitert, die aus der Vielzahl unterschiedlich langer Produkte der Oligomerisierung entstehen können und einen enormen Variantenreichtum an Slidomeren zur Folge haben. Abb. 9.4 zeigt das Schema eines kurzen gemischten geordneten Beispiel-Slidomers (blaue Basen: C, rote Basen: G, Pfeile: angedeutetes Rückgrat in 5'-3'-Richtung).

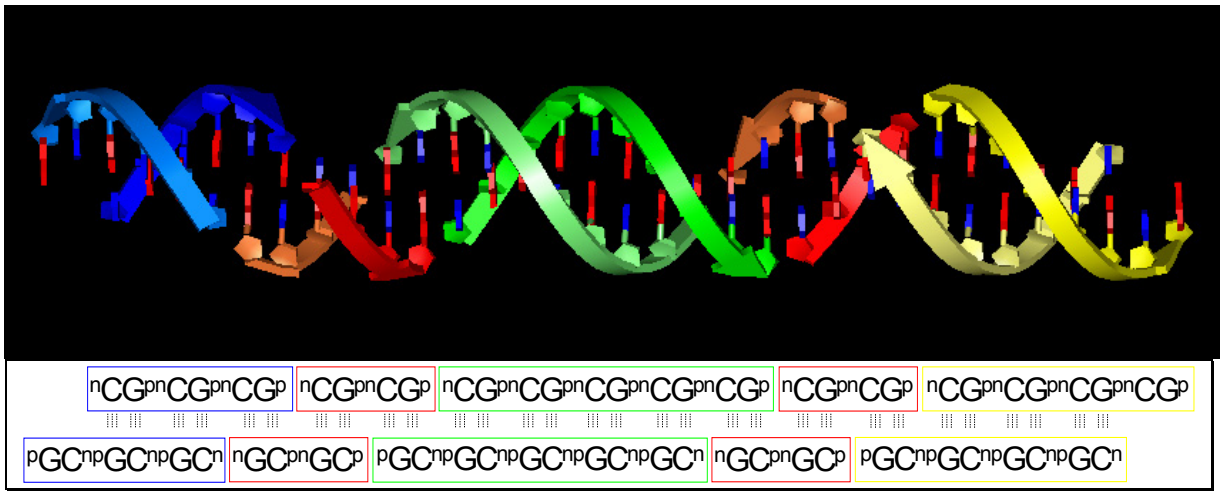


Abb. 9.4: Schema eines gemischten geordneten Slidomers

Weiterhin wurde die Aktivierung, die beiden Formen katalysierter Ligation im Komplex (Abb. 9.5), Zerfall und Reaktivierung, sowie die reaktionsbeschleunigende Wirkung des Slidomers (Slidomereffekt) formuliert und diskutiert (siehe Kap. 8.3.3).

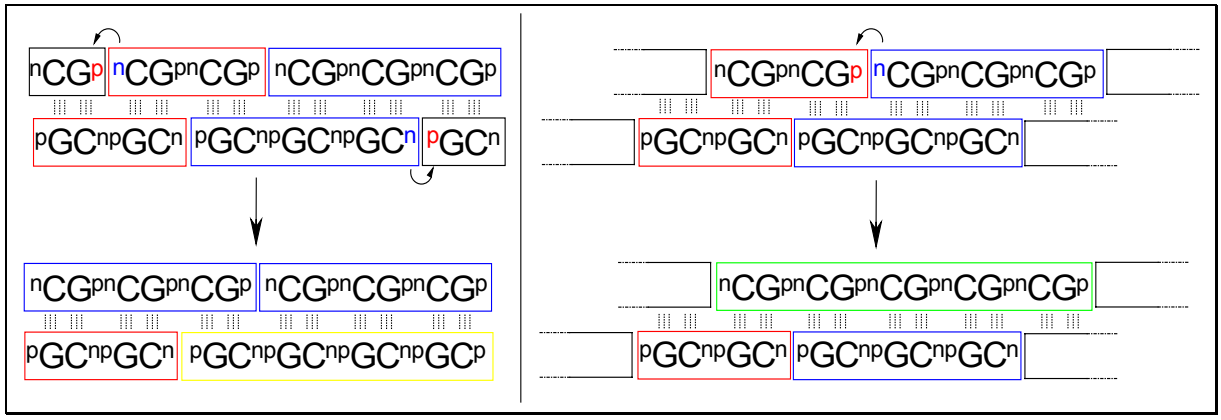


Abb. 9.5: Beispiele für endständige Ligation (links) und intra-Komplex Ligation (rechts) im Slidomer

Um die Slidomertheorie beim offenen CG-System zu überprüfen und die Bildung termolekularer Komplexe mit den Produkten der Oligomerisierung auszuschließen, wurden die bereits bei den Einzelreaktionskinetiken verwendeten inerten Template $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$, $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$ und $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$ mit dem Dimer $^{n}CG^{p}$ unter den Bedingungen der Tab. 9.2 zur Reaktion gebracht.

Oligo 1	Templat/Oligo 2	Temp.	c(EDC)	Puffer
20mM $^{n}CG^{p}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_2{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES
20mM $^{n}CG^{p}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES
20mM $^{n}CG^{p}$	+ 0, 10, 20, 40% $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES

Tab. 9.2: Kinetiken des offenen CG-Systems mit Templatzugabe

Alle drei Kinetiken zeigten wie erwartet keine stärkere Reaktionsbeschleunigung, die auf Autokatalyse über termolekulare Komplexe hingedeutet hätte. Stattdessen wiesen sie ein relativ indifferentes Produktbildungsverhalten auf, das auf ein dynamisches Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Templateffekten zurückgeführt werden konnte, die beim Einbau von unreaktiven Templatbausteinen in Slidomerkomplexe zu erwarten sind. So waren bei geringen Templatzugaben leichte Beschleunigungseffekte durch Unterstützung der Slidomerbildung bemerkbar. Bei größerer Templatmenge dagegen wurden reaktive Bausteine im Slidomer überwiegend von inerten Templatbausteinen umgeben, so dass die Reaktion abgebremst wurde (Beispielschema in Abb. 9.6). Insofern konnte das zugegebene Templat sowohl katalytisch, als auch inhibierend wirken und unterstützte in seiner Wirkung das angenommene Slidomermodell. Falls dieses Modell für alle Oligomere mit alternierender Pyrimidin-Purin-Sequenz gilt, ließe sich auf diese Weise auch der beobachtete negative Templateffekt bei der Zugabe des inerten 12meren $^{HO}(TA)_6{}^{OH}$-Templats durch Slidomerbildung beim offenen TA-System in Kap. 7.4.1 erklären.

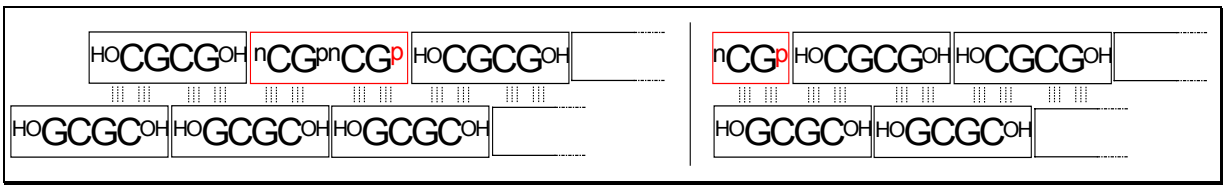


Abb. 9.6: Von unreaktiven Templatmolekülen umgebenes $(^nCG^p)_2$ (links) bzw. $^nCG^p$ (rechts) im Slidomer

Die Umsetzung des Dimers $^nCG^p$ mit steigenden Konzentrationen des offenen Tetramers $^n(CG)_2{}^p$ unter den Bedingungen in Tab. 9.3 erlaubte die Beobachtung rein positiver Templateffekte, da das zugegebene Tetramer als Templat in Slidomere integriert werden konnte, wobei es durch seine beidseitig reaktiven Funktionalitäten gleichzeitig als Edukt für höhere Oligomere ab dem Hexamer dienen konnte.

Oligo 1	Templat/Oligo 2	Temp.	c(EDC)	Puffer
20mM $^nCG^p$	+ 0, 7.5, 15, 30% $^n(CG)_2{}^p$	2 °C	0.4 M	0.1 M HEPES

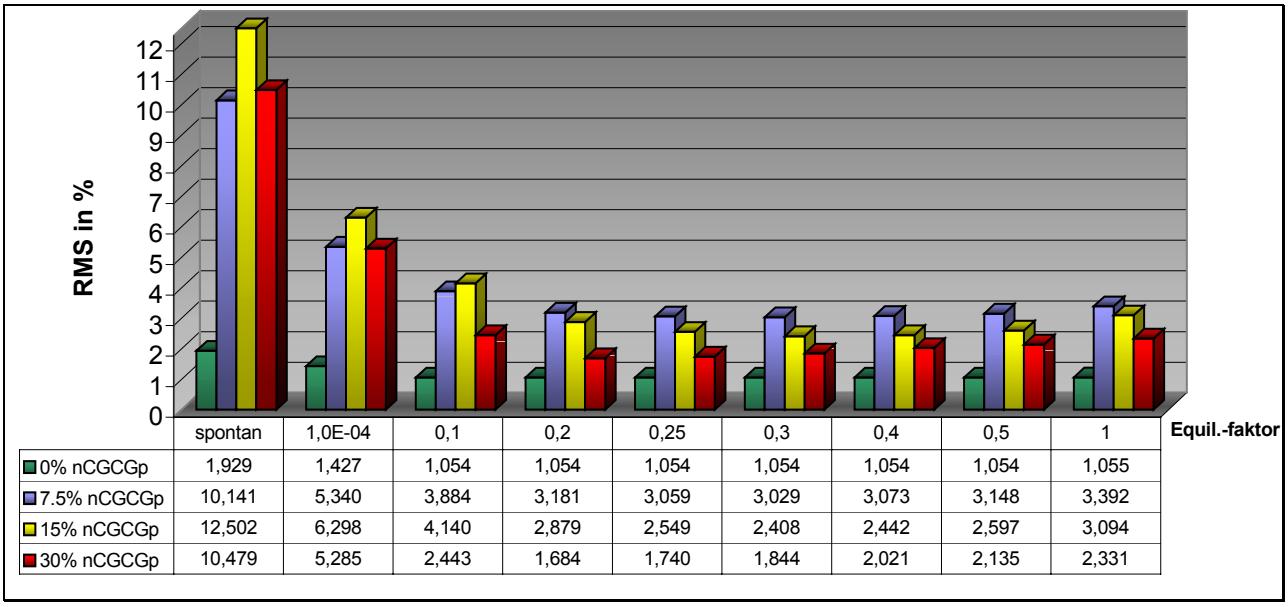
Tab. 9.3: Kinetiken des offenen CG-Systems mit dem offenen Tetramer $^n(CG)_2{}^p$

Die Betrachtung der Konzentrations-Zeit-Kurven verdeutlichte den Zwischenproduktcharakter des Tetramers $^n(CG)_2{}^p$, das erfolgreich in höhere Oligomere eingebaut wurde und wies auf eine Reaktionsbeschleunigung durch die Tetramerzugabe hin, die über dem für eine rein spontane Reaktion erwarteten Umfang lag. Durch Aufstellung eines Kinetikmodells für

die rein spontane Ligation konnten die Messdaten der Kinetik mittels *SimFit* unter Verwendung von zwei Geschwindigkeitskonstanten (k_1: spontane Ligation, k_2: Hydrolyse des EDC) an das Modell gefittet werden. Hierbei zeigten sich deutliche scherenförmige Abweichungen der Fitkurven von den Messkurven, die auf die geringe Abreaktion des 4mers zu höheren Oligomeren im spontanen Ligationsmodell zurückzuführen waren. Auch der aus dem Fitting der Einzelreaktionen ermittelte Wert für die Geschwindigkeitskonstante der spontanen Reaktion, der sich in derselben Größenordnung wie der im offenen System gefundene Wert befand, wurde als feste Konstante für einen Vergleich im Modell eingesetzt und resultierte in einer ähnlich starken Abweichung. Damit wurde die These der zusätzlichen Reaktionskanäle, die für eine Reaktionsbeschleunigung im CG-System über das Maß der spontanen Reaktion hinaus sorgen, experimentell bestätigt.

Durch Erweiterung des spontanen Reaktionsmodells um die Reaktionskanäle der Ligationen im Slidomer gelang die Aufstellung eines vereinfachten kinetischen Slidomermodells. Hierbei wurden maximal Produkte bis zum 16mer berücksichtigt und die Generierung sowie der Zerfall der Slidomerkomplexe wurde durch Assoziations- und Dissoziations-Gleichgewichte der Slidomer-Duplexe repräsentiert. Die Komplexbildungskonstante wurde dabei auf $10^6\ M^{-1}s^{-1}$ festgelegt, während die Dissoziationskonstante frei fitbar war. Über einen Equilibrierungsfaktor wurden die unterschiedlichen Stabilitäten der Slidomer-Duplexe berücksichtigt und so das Gleichgewicht und damit auch der längenabhängige, reaktionsbeschleunigende Einfluss im Modell gesteuert. Die beschleunigte Ligation in den Slidomerkomplexen konnte mit einer gemeinsamen, ebenfalls frei fitbaren Geschwindigkeits-konstanten beschrieben werden. Der Equilibrierungsfaktor veranschaulicht in Kombination mit der jeweiligen Dissoziationsgleichung gleichsam den Anteil eines Oligomertyps an der Slidomerstabilisierung - je kleiner der Faktor bzw. je länger das Oligomer und seine Verweil-dauer im Komplex, desto stärker trägt der Baustein zur Stabilisierung des Gesamtslidomers und letztendlich zur Reaktionsbeschleunigung bei.

Mit diesem Slidomermodell wurde trotz seiner Simplizität und Verwendung von nur vier freien Geschwindigkeitskonstanten unter Variation des Equilibrierungsfaktors ein deutlich besserer Fit erreicht, als mit dem rein spontanen Reaktionsmodell (Abb. 9.7, der RMS-Wert stellt ein Maß für die Güte des Fits dar).



	spontan	1,0E-04	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	1
0% nCGCGp	1,929	1,427	1,054	1,054	1,054	1,054	1,054	1,054	1,055
7.5% nCGCGp	10,141	5,340	3,884	3,181	3,059	3,029	3,073	3,148	3,392
15% nCGCGp	12,502	6,298	4,140	2,879	2,549	2,408	2,442	2,597	3,094
30% nCGCGp	10,479	5,285	2,443	1,684	1,740	1,844	2,021	2,135	2,331

Abb. 9.7: RMS-Werte der Spontanreaktion- bzw. der Slidomer-Einzelfits bei versch. Equilibrierungsfaktoren

Die Ergebnisse des Fittings unterstützten die postulierten zusätzlichen Reaktionskanäle des CG-Systems über Slidomerkomplexe und lieferten Geschwindigkeitskonstanten, die in den erwarteten Größenordnungen lagen (mittlere Werte der Gesamtfits in Tab. 9.4)

Fit-Modell	k_1 spontane Ligation	k_2 Slidomer-Duplex Dissoziation	k_3 Slidomer-Ligation	k_4 EDC-Hydrolyse
Gesamtfit: spontane Ligation	$8.70 \cdot 10^{-3}$	-	-	$1.33 \cdot 10^{-8}$
Gesamtfit: Slidomermodell	$8.55 \cdot 10^{-3}$	$3.24 \cdot 10^{4}$	2.56	$4.93 \cdot 10^{-8}$

Tab. 9.4: Geschwindigkeitskonstanten für spontane Ligation und Slidomermodell mit Eq.-faktor 0.3

Das für die enzymfreie Kondensierung von Nucleotiden enorme Oligomerisierungspotenzial des CG-Systems wurde bei Reaktionen von 20 und 50 mM $^{n}CG^{p}$ mit verlängerten Reaktionszeiten bei 2 °C und 0.4 M EDC untersucht. Innerhalb von 200 min erhielt man Kettenlängen von mehr als 80 Nucleotiden, die das Auflösungsvermögen der Mini-Q Ionenaustauschersäule ausreizten (Beispielplot in Abb. 9.8, nach 120 min). Die Abreaktion des Eduktes erfolgte vollständig, so dass nach drei Tagen keine kurzen Oligomere mehr in der Reaktionslösung detektierbar und auch keine kürzeren Zerfallsprodukte sichtbar waren.

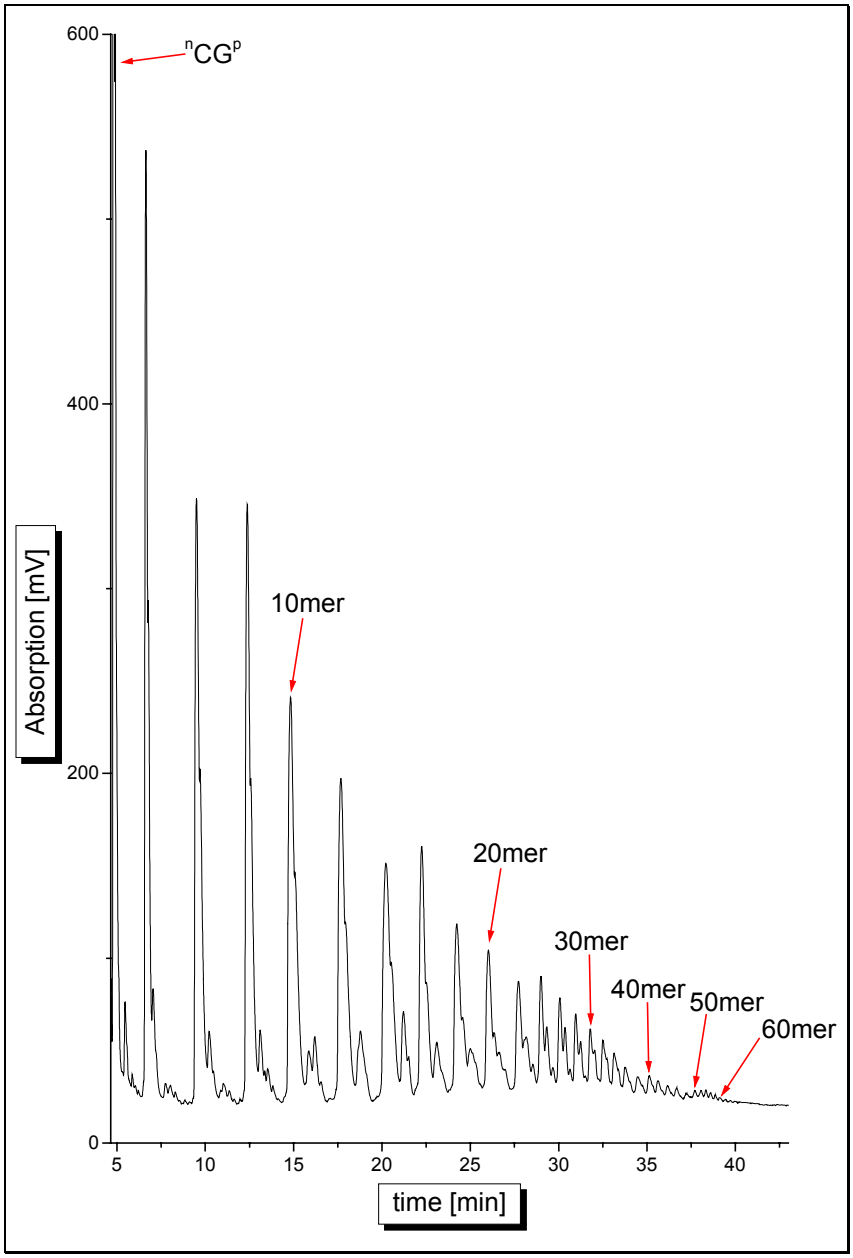


Abb. 9.8: IE-HPLC-Plot der Oligomerisierung von 50 mM $^{n}CG^{p}$ mit 0.4 M EDC, 2°C, nach 120 min

Bei der beschleunigten Ligation über Slidomere entfällt die im Gegensatz zur Katalyse über termolekulare Komplexe im Reaktionsverlauf fortschreitende Produktinhibition durch Duplexierung und damit Inaktivierung des Templats, da die Ligationsprodukte sofort wieder am dynamisch dissoziierenden und assoziierenden Slidomerverbund teilnehmen und weitere Ligationen fördern können (siehe Kap. 8.3.3). Deshalb blieb die reaktionsbeschleunigende Aktivität der Slidomere über den gesamten Untersuchungszeitraum auf hohem Niveau und die Oligomerisierung verlief zügig und effektiv. Die niedrige Reaktionstemperatur von 2 °C war dabei der Stabilität der Slidomere förderlich, während sie bei Vorliegen von termolekularen Komplexen eine stärkere Produktinhibition bewirkt hätte. Nicht zuletzt werden niedrige

Temperaturen als wahrscheinliche präbiotische Umweltbedingungen diskutiert[171]. Im Verbund mit der hohen Reaktivität der 5'-Amino- und aktivierten 3'-Phosphatgruppe der Moleküle konnten auf diesem Wege in kürzester Zeit und ohne wiederholte Zugabe von Eduktbausteinen deutlich längere Oligomere in Lösung generiert werden, als nach *Ferris* bislang enzymfrei möglich waren[42].

Prinzipiell könnten auch bei anderen Sequenzen, die durch Teilhybridisierung bzw. über "sticky-ends" in der Lage sind Slidomere zu bilden, ähnlich positive Effekte auf die Produktinhibition des Replikationsprozesses beobachtet werden. Die Besonderheit des CG-Systems (und möglicherweise anderer $(Py/Pu)_x$-Systeme) ist jedoch die Bevorzugung der Slidomerstruktur vor allen anderen Komplexen. Insofern dürfte dieser Komplextypus bei nicht-$(Py/Pu)_x$-Sequenzen nur dort auftreten, wo keine andere Komplexierung außer Slidomerbildung möglich ist (siehe z.B. *Seeman's* 10mer-Slidomer[164], Abb. 8.25)

Slidomerbasierte Ligationsbeschleunigung sollte zudem auch bei Ribonucleotiden möglich sein, da RNA-Slidomere mit Py/Pu-Sequenzen postuliert wurden[126,153] und thermodynamische Abschätzungen mit dem für Slidomere modifizierten NN-Modell Indizien liefern. Insofern könnte es sich bei dem Slidomereffekt um eine evolutionsgeschichtlich frühe enzymfreie Replikationsform handeln, die zwischen der spontanen Oligomerisierung und der Selbstreplikation unter exakter Kopie des Templates, beispielsweise eines selbstreplizierenden Ribozyms, einzuordnen ist. Die Informationsübertragung beschränkt sich dabei im CG-System auf die Py/Pu-Sequenz, nicht aber auf die Länge, da prinzipiell jedes gebildete Oligomer im geordneten Slidomer wiederum die Synthese eines längeren Oligomers mit alternierender Py/Pu-Sequenz katalysieren kann. Ein Produktoligomer katalysiert somit nicht zwingend die Bildung einer gleich langen Kopie im selbstreplikativen Sinne, sondern die einer $(Py/Pu)_x$-Sequenzfamilie unterschiedlichster Länge. Jedes Oligomer ab dem 4mer kann hierbei in einem geordneten Slidomer jederzeit sowohl Edukt für höhere Oligomere, als auch eduktkatalytisch aktives Templat der Ligation eines Bausteintyps gleicher Länge mit jedem beliebigen anderen Baustein sein. Je kürzer das Oligomer, desto universeller ist es als Templat-/Eduktbaustein einsetzbar, so dass ein Tetramer bzw. das jeweils vorhandene kürzeste Oligomer im Slidomer die Synthese praktisch aller höheren Oligomere direkt katalysieren kann. Falls (thermodynamisch unwahrscheinlichere) ungeordnete Slidomere aufträten, wäre jedes Produktoligomer des CG-Systems in der Lage die Synthese eines beliebigen anderen $(CG)_x$-Bausteintyps ab dem Tetramer direkt zu katalysieren. Durch die

Aufrechterhaltung und Stabilisierung der Slidomerkomplexe, die erst ab einer gewissen Anzahl integrierter Oligomere stabiler als die entsprechenden Oligomerduplexe sind (siehe Kap. 8.2.5), trägt in beiden Fällen jeder Baustein ab dem 4mer zusätzlich indirekt zur Beschleunigung der Synthese aller anderen per Slidomer gebildeten Bausteine des Systems bei. Ein derartiges, sich mit eingeschränkter Spezifität kollektiv reproduzierendes Oligomersystem erfüllt die minimalen Bedingungen eines "autocatalytic set" nach *Kauffman*, dessen Modell für den Ursprung des Lebens auf der kollektiven Selbstorganisation katalytischer Oligomere beruht[72].

In einem solchen kollektiv autokatalysierenden Satz von Oligomeren steigt bei wachsender Produktlänge die Anzahl der Reaktionswege N, die zu einem Produkt führen mit N = M-1 pro Oligomer an (M = Anzahl der Untereinheiten pro Oligomer, hier also der Dimereinheiten, siehe Tab. 7.1). Damit steigt auch die Anzahl der katalytisch unterstützbaren Synthesekanäle des entsprechenden Oligomers. Die gesamte Anzahl der Reaktionskanäle zu den Produkten wächst mit $N_{ges} = \sum_{M=1}^{M_{max}} M-1$ zuzüglich der gleichen Anzahl katalytischer Reaktionskanäle deutlich schneller, als die linear steigende Zahl der betrachteten unterschiedlich langen Produktoligomere. Durch die zügige Oligomerisierung über Slidomere wird eine große Bibliothek an Oligomeren unterschiedlichster Länge erzeugt. Dabei stellt nach *Monteiro*[66] die Längenvariation bereits einen Mutationsprozess dar, der nicht nur durch einen unpräzisen Replikationsvorgang, sondern auch durch die auf Kondensationen mit anderen Bausteinen beruhende Sequenz- bzw. Längenveränderung eines bestehenden Oligomers hervorgerufen werden kann. Da die $(CG)_x$-Oligomere mit wachsender Länge zur besseren Stabilisierung des reaktionsbeschleunigenden Slidomerkomplexes beitragen, führt diese Form der Mutation bereits zu besseren Katalysatoren.

Der Nachteil der slidomerbasierten Reaktionsbeschleunigung liegt in den begrenzten Sequenzmöglichkeiten, die sich auf alternierende Pyrimidin-Purin-Sequenzen beschränken. Während die selbstkomplementären Dimere ${}^{n}CG^{p}$ und ${}^{n}TA^{p}$ prinzipiell in der Lage sind jeweils autarke 'Slidomerkatalyse' zu betreiben, wären ${}^{n}CA^{p}$ und ${}^{n}TG^{p}$ nur miteinander zur 'Slidomerkreuzkatalyse' fähig. Eine gemeinsame Umsetzung aller vier Dimere mit EDC könnte den Sequenzspielraum der möglichen Produkte bei Aufrechterhaltung des Slidomereffektes aber deutlich erhöhen, wobei das CG-Systems durch seine besonders ausgeprägte Komplexbildungsfähigkeit am stärksten von der Reaktionsbeschleunigung über

Slidomere profitieren sollte. Die wesentlich größere Sequenzdiversität (Abb. 9.9) könnte bei entsprechender Oligomerlänge bereits Moleküle mit fortgeschrittener Katalyseaktivität hervorbringen.

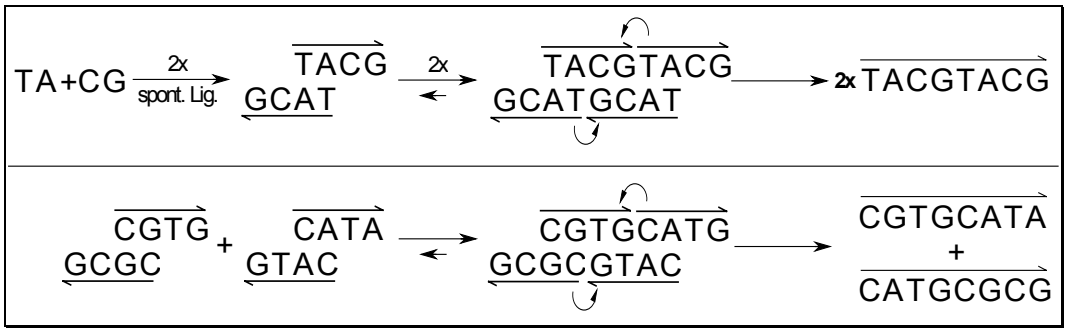


Abb. 9.9: Beispielschemata der Slidomerkatalyse bei gemischten Py/Pu-Dimeredukten

In einem präbiotischen Szenario könnten bei Vorliegen aller vier Nucleobasen die über Slidomere gebildeten Py/Pu-Oligomere theoretisch auch über den spontanen Reaktionskanal mit einigen wenigen Bausteinen (auch Monomeren) im Sinne einer Mutation abweichend von der Py/Pu-Sequenz erweitert werden oder mit langen Oligomeren anderer, evtl. ebenfalls mutierter Py/Pu-Sequenzen kondensieren, so dass verlängerte Oligomere mit veränderten Templat- und Replikationseigenschaften bzw. stärkerer Selektivität entstehen könnten. Die langen $(Py/Pu)_x$-Oligomere würden in diesem Fall gewissermaßen als Primer für höher entwickelte Replikationsysteme oder Oligomere mit enzymartigen Eigenschaften (Desoxyribozyme bei DNA, Ribozyme bei RNA), wie z.B. das *Joyce'*sche selbstreplizierende 61mere Ribozym[24], dienen, die erst ab einer gewissen Oligomerlänge ausgebildet werden können[170]. Eine weitere Möglichkeit zur Generierung katalytisch aktiver Formen böte die Variation der Überstruktur von bereits in ihrer Kondensation weit vorangeschrittenen Slidomersystemen mit langen Bausteinen, die vor allem nach Mutationen Haarnadelschleifen, Bulb-Sektionen ohne Basenpaarung, etc. aufweisen und durch die Strukturveränderung neue funktionelle bzw. katalytische Eigenschaften entwickeln könnten. Das Vorkommen von 33 Unterbrechungen im Rückgrat ribosomaler RNA in Form von $\begin{matrix}^{5'}\mathrm{G-C}^{3'}\\ _{3'}\mathrm{C/G}_{5'}\end{matrix}$-Basenstapeln (siehe auch Kap. 8.2.5), wie sie auch bei CG-Slidomeren postuliert werden, unterstreicht die Bedeutung dieses Strukturmotivs in der Natur[165].

Die Bildung langer Oligomere über Slidomere mit der Möglichkeit zur Mutation, die sowohl für DNA als auch für RNA mit Py/Pu-Sequenzen Gültigkeit besitzen sollte, könnte damit die

Lücke zwischen kurzen, spontan generierten Nucleotiden und weitaus längeren Desoxyribozymen bzw. Ribozymen oder auch einem komplexeren, kollektiv autokatalytischen *Kauffman*'schen Satz derartiger katalytischer Oligomere schließen. Diese komplexeren Formen sollten für die Entstehung einer hypothetischen präbiotischen DNA- bzw. RNA-Welt von Bedeutung und über rein spontane Ligation kaum realisierbar gewesen sein. Zu einem Zeitpunkt, an dem Nucleotidstränge mit mehreren tausend Basen noch nicht existent waren, könnten Slidomere, die eine Doppelhelixstruktur mit unterbrochenem Rückgrat annehmen, Vorläufer der heutigen Doppelhelixstrukturen mit weitestgehend kovalent verbundenem Rückgrat gewesen sein. Hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Strangexpansion durch Kondensation der im System vorhandenen Oligomere und der damit einhergehenden Eignung zur Variation und Mutation sollten offene Systeme im Gegensatz zu geschlossenen Replikationssystemen die Voraussetzung mitbringen zu evolvieren. Nach *Kauffman*[72] benötigt Leben einen minimalen Komplexitätsgrad, der auf dem Wege der slidomerbasierten Ligationsbeschleunigung erreicht werden könnte.

Ausblick

Der nächste Schritt nach der erfolgreichen Generierung einer umfangreichen $(CG)_x$-Sequenzfamilie und der Sondierung der katalytischen Reaktionsmechanismen, die effektiv zu überdurchschnittlich langen Oligomeren führten, wäre die Untersuchung der Oligomerisierung eines Gemisches aller vier Py/Pu-Dimere und der daraus entstehenden Produkte. Die hierdurch gegebenen Sequenzvariationsmöglichkeiten könnten zusätzlich zum bereits kollektiv autokatalytischen CG-System ein komplexeres, effektiveres "autocatalytic set" mit einem Netzwerk katalytischer Kopplungen zwischen den Produktoligomeren zur Folge haben, das auf einer evolutiv höheren Stufe stände. In Verbindung mit einem Fließreaktor, in dem stetiger Eduktnachschub gewährleistet wäre, könnten derartige Netzwerke stetig evolvieren, während sie um zugeführte Ressourcen konkurrieren. Der Selektionsdruck wäre dabei durch die andauernde Verdünnung gegeben, wodurch vor allem diejenigen autokatalytischen Systeme wachsen und Edukte verbrauchen könnten, die am schnellsten reagieren und ausreichend hohe Konzentrationen der beteiligten Oligomere erzeugen. Die kinetische und chromatografische Analyse des Produktgemisches eines solch komplexen Systems dürfte äußerst diffizil werden, da die Anzahl der unterscheidbaren Oligomere bei B verschiedenen Edukteinheiten und L Edukteinheiten pro Oligomer mit B^L

exponentiell ansteigt und damit insgesamt $\sum_{L=1}^{L_{max}} B^L$ verschiedene Oligomere aller Längen bis L_{max} gleichzeitig in Lösung denkbar sind[66,72]. Somit wären in einem hypothetischen Produktgemisch, in dem maximal 40mere aus den beiden Eduktdimeren CG und TA gebildet worden wären, mit $B^L = 2^{20}$ = ca. 1 Millionen verschiedene 40mere möglich, die neben 2^{19} 38meren, 2^{18} 36meren, usw. in Lösung auftreten könnten. Das evolutive Potenzial lässt ein solches Projekt jedoch aussichtsreich erscheinen.

Experimenteller Teil

1. Material und Methoden

1.1 Spektroskopische Methoden

1.1.1 Magnetische Kernresonanzspektroskopie

NMR-Spektrometer zur Aufnahme der ^{1}H-, ^{13}C-Spektren: *DPX 200*, *DRX 400* und *DRX 600 (Bruker)*. Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden unter ^{1}H-Breitbandentkopplung aufgenommen.
Die Angabe der chemischen Verschiebungen erfolgte in Einheiten der δ-Skala. Als interner Standard der Messungen in D_2O wurde HDO (δ =4.67 ppm) verwendet. Die entschützten Nucleotide wurden in einem Puffer aus 0.067 M $Na_{1.5}D_{1.5}PO_4$ und 0.067 M NaCl (pD_{obs} 6.8) vermessen.

Abkürzungen zur Kennzeichnung der Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, t = Triplett, q = Quartett, sept = Septett, m = Multiplett, m_c = zentriertes Multiplett, aa = analysiert als. Vicinalkopplungen werden mit dem Symbol *J,* Geminalkopplungen mit dem Symbol ^{2}J und Fernkopplungen (^{x}J) explizit gekennzeichnet.

1.1.2 UV/VIS-Spektroskopie

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte mit dem Modell *Cary 1E* der Firma *Varian* mit externer Temperaturregelung. Die Konzentrationen der verwendeten Oligonucleotide wurden auf Basis der in Tab. 1.1 aufgeführten Extinktionskoeffizient-Inkremente ε_{254} [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$] bei 254 nm und pH=7.0 [99,172] unter Anwendung des *Lambert Beer*'schen Gesetzes berechnet.

Chromophor	ε_{254} [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]
CMP (Cytidinmonophosphat)	6541
GMP (Guanosinmonophosphat)	13679
TMP (Thymidinmonophosphat)	7250
AMP (Adenosinmonophosphat)	13200
PTE (Phenylthioethanol)	8104

Tab. 1.1: Extinktionskoeffizient-Inkremente

1.1.3 Massenspektrometrie

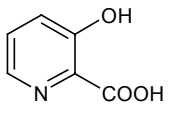
1.1.3.1 MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization - Time Of Flight)

Massenspektrometer: *Voyager-DE RP Biospectrometry (Perseptive Biosystems)*

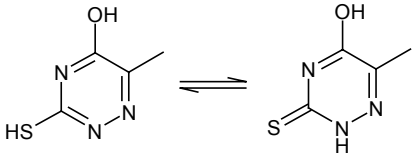
Eigenschaften:			
	Flight-Tube:	Linear Mode	1.3 m
		Reflector Mode	2.0 m
	Laser:		N_2 bei 337 nm
	Beschleunigungsspannung:		≤ 25 kV
	Ultrahochvakuum:		ca. 10^{-7} Torr

Methode: delayed extraction

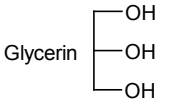
Verwendete Matrices:			
	2,4,6-Trihydroxyacetophenon	(THAP)	pH ≈ 5
	3-Hydroxypicolinsäure	(HPA)	pH ≈ 2
	6-Aza-2-thiothymin + Glycerin	(ATTG)	pH ≈ 9
	6-Aza-2-thiothymin	(ATT)	pH ≈ 9
	Aminonitropyridin	(ANP)	pH ≈ 9
	2-Chinolinol		pH ≈ 7-8

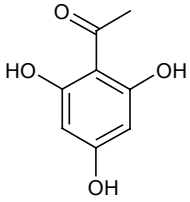


HPA: 3-Hydroxy-picolinic-acid
M=139.11 g/mol



ATTG: 6-Aza-2-thiothymin + Glycerin
M=143.2 g/mol





THAP: 2,4,6-Trihydroxy-acetophenon
M=168.04 g/mol

1.1.3.2 Electrospray-Ionisation (ESI)

ESI-Massenspektren wurden mit dem Gerät *Esquire-LC* der Firma *Bruker* aufgenommen.

1.2 Chromatografische Methoden

1.2.1 Dünnschichtchromatografie

Verwendete DC-Folien: Fertigfolien *SIL G/UV$_{254}$* von *Macherey&Nagel* (40×80mm, Schichtdicke: 0.25mm, Beschichtung: Kieselgel mit Fluoreszenzindikator)

Eluentensystem: Dichlormethan/Methanol 10:1

Detektion: UV-Detektion bei 254nm

Aminhaltige Verbindungen wurden mit Ninhydrinlösung angefärbt.

1.2.2 Adsorptionschromatografie

Säulenmaterial: Kieselgel von *ICN Biomedicals* , Korngröße 0.032 – 0.063mm

1.2.3 Reversed-Phase HPLC

System: Gradientenfähiges computergesteuertes HPLC-System der Firma *Kontron* mit zwei Pumpen des Typs 422 (mit Hinterkopfspülung, 0.05 - 10 ml/min Flussgeschwindigkeit), einem Autosampler 460 (Injektionsvolumen 20 µl - 200 µl), einem Mischungsblock 494 und einem Zweikanal UV-Detektor 430. Die Datenaquisition und Gerätesteuerung erfolgte durch das Programm Kroma 2000 (Version 1.6 – 1.8, Betriebsystem: Windows NT 4.0) der Firma *Kontron*. Die Detektion erfolgte bei 254 und 273 nm.

RP-Säulen: CC250/4 Nucleosil 120-5 RP C_{18} von *Macherey&Nagel* (analytisch, 1 ml/min Fluss)

CC250/4 Nucleosil 120-5 AB RP C_{18} von *Macherey&Nagel* (analytisch, 1 ml/min Fluss)

CC250/10 Nucleosil 120-5 RP C_{18} von *Macherey&Nagel*

(semi-präparativ, 5 ml/min Fluss)
Weiterhin wurden die Licrosphere-, Multosphere- und Xterra-Säulen für analytische Testtrennungen verwendet.

Eluentensysteme: 0.1 M Triethylammoniumacetatlösung pH = 7.0 / Acetonitril 100:1 (v/v) (**A**) + Acetonitril (**B**), Abkürzung: TEAA/AcN
0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung (**A**) + Acetonitril (**B**), Abkürzung: NH_4HCO_3/AcN

Die Pufferlösungen wurden mit Filtern der Firma *Sartorius* vor Gebrauch membranfiltriert (0.45 µm Porengröße) und anschließend entgast.

1.2.4 Ionenaustauscherchromatografie

1.2.4.1 Präparative Ionenaustauscherchromatografie I

System: Gradientenfähiges Niedrigdruck-System bestehend aus Schlauchpumpe Wiz, V4 Absorbance-Detektor und Fraktionssammler Foxy der Firma *ISCO*. UV-Detektion bei 254 nm.

Säule: DEAE-(Diethylaminoethyl)-Sephadex Anionenaustauscher der Firma *Sigma* (0.03-0.12 mm Korngröße), *Pharmacia* Säule (20 x 2.6 cm).

Eluentensystem: (**A**): 0.02 M TEAB-(Triethylammoniumhydrogencarbonat)-Lösung
(**B**): 1 M TEAB-(Triethylammoniumhydrogencarbonat)-Lösung

Die TEAB-(Triethylammoniumhydrogencarbonat)-Lösung wurde als 2 M Stammlösung (pH 8) durch mehrstündiges Einleiten von CO_2 (Trockeneis) in eine gekühlte 2 M Triethylaminlösung hergestellt. 200 g käufliches DEAE-Sephadex (Chloridform) wurden mit bidestilliertem Wasser versetzt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, bis im Filtrat keine Chloridionen durch Silbernitrat mehr nachgewiesen werden konnten. Man spülte zwei mal mit bidestilliertem Wasser und suspendierte in 500 ml 0.02 M Triethylammonium-hydrogencarbonat-(TEAB)-Lösung (pH 7.5). Die Suspension wurde bei 4 °C gelagert.

1.2.4.2 Präparative Ionenaustauscherchromatografie II

System: Gradientenfähige *Vision Chromatography-Workstation* der Firma *Perseptive Biosystems.* UV-Detektion bei 254 nm.

Säulen: *Merck Superformance* 150-10 Glaskartusche mit variablem Volumen (Bettlänge: 120-10)
Merck Fractogel EMD DEAE-650 (S) Säulenmaterial (25 - 40µm)

Eluentensystem: (**A**): bidest. H_2O
(**B**): 1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung

1.2.4.3 Analytische Ionenaustauscherchromatografie

System: siehe RP-HPLC (Kap. 1.2.3, Exp. Teil)

Säulen: Resource Q Anionenaustauscher (Säulendimensionen 6.4x30 mm, 1 ml Gel Volumen, 15 µm Partikelgröße, Fluss 1 ml/min, 40 bar Maximaldruck) der Firma *Amersham Pharmacia*[151].
Mini Q Anionenaustauscher (Säulendimensionen 4.6x50 mm, 0.8 ml Gel Volumen, 3 µm Partikelgröße, Fluss 1 ml/min, 180 bar Maximaldruck) der Firma *Amersham Pharmacia*.

Eluentensystem: (**A**): 2 mM Tris·$HClO_4$, pH 12.0
(**B**): 2 mM Tris·$HClO_4$ / 1 M $NaClO_4$ / 20% Acetonitril, pH 12.0
Abkürzung: $HClO_4$/$NaClO_4$

1.2.5 Gel-Permeationschromatografie

System: V4 Absorbance-Detektor und Fraktionssammler Foxy der Firma *ISCO.* UV-Detektion bei 254 nm.

Säule: Sephadex G-10 der Firma *Amersham Pharmacia* (Säulendimensionen 3x40 cm, 50 g Sephadex G-10 in bidest. H_2O suspensiert).

Eluentensystem: bidest. H_2O

1.3 Geräte und Chemikalien

- DNA-Synthesizer Gene Assembler Plus der Firma *Amersham Pharmacia.*
- Vakuumzentrifuge Speed-Vac Plus der Firma *Savant.*
- Vortex VF2 der Firma *IKA-Labortechnik*.
- Zentrifuge Centrifuge 5402 (kühlbar) der Firma *Eppendorf*.
- Wasserbad Ultratemp 2000 F30 der Firma *Julabo*.
- Blockthermostat BT 100 der Firma *Kleinfeld Labortechnik.*
- pH-meter 766 Calimatic der Firma *Knick*.
- Rotavaporen der Firma *Büchi*.
- Eppendorf Gefäße 0.3 - 1.5 ml.
- Ultraschallbad Sonorex (RK 52) der Firma *Bandelin*.
- Pipetten Research der Firma *Eppendorf*.
- Minicaps Mikro-Einmalpipetten 0.5 , 1 , 2 und 5 µl der Firma *Hirschmann*
- Mikro-Einmalpipetten 0.1, 0.2 und 0.25 µl der Firma *Drummond*.

Die Pufferlösungen für die Chromatografie wurden mit Filtern der Firma *Sartorius* vor Gebrauch membranfiltriert (0.45 µm Porengröße) und anschließend entgast. Bidestilliertes Wasser wurde mit Hilfe einer Wasserdestillationsapparatur der Firma *Wagner&Munz* gewonnen, die mit demineralisiertem Wasser aus dem Versorgungsnetz der Ruhr-Universität Bochum beschickt wurde (Qualitätskontrolle durch Leitfähigkeitsmessung). Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Qualitätsstandard des Herstellers, mindestens jedoch ‚zur Synthese'.

2. Synthesen

2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) der Synthesen

2.1.1 Oxidative Entfernung der 3'-terminalen Phenylthioethyl-(PTE)-Gruppe (AAV 1)

Man löste den Baustein in wässriger 0.1 M TEAB-Lösung (500 µl/µmol) und versetzte unter Rühren und Argon Schutzgasatmosphäre mit frisch angesetzter 0.1 M Natriumperiodatlösung (0.1 µl/µmol). Nach einer Stunde wurde Ethylenglykol (10µl/µmol) zum Reaktionsgemisch hinzugegeben und erneut eine Stunde gerührt. Man entfernte das Solvens im Vakuum und suspensierte den Rückstand in 2 M Natronlauge (0.6 µl/µmol). Der Ansatz wurde weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt und mit Eisessig (68 µl/µmol) neutralisiert. Man entfernte das Lösungsmittel im Vakuum, evaporierte mehrfach mit Wasser (500 µl/µmol) und chromatografierte das Gemisch an DEAE-Sephadex (Anfangspuffer 0.02 M TEAB, Endpuffer 1 M TEAB, linearer Gradient). Das Solvens wurde im Vakuum bei 30 °C Wasserbadtemperatur entfernt, der Rückstand anschließend zur Abtrennung von überschüssigem TEAB 10 mal mit Ethanol 60% wässrigem Ethanol coevaporiert. Die Ausbeute bestimmte man optisch mittels UV-Spektroskopie, die Reinheit durch HPLC.

2.1.2 Staudinger-Reduktion der 5'-terminalen Azidogruppe zur Aminofunktion (AAV 2)

Die Azidokomponente wurde in 32% Ammoniaklösung/Pyridin 4:3 (v/v) gelöst (100 µl/µmol) und mit 6 eq Triphenylphosphin versetzt, das zuvor in Toluol umkristallisiert und fein gemörsert wurde. Man rührte 18 h bei Raumtemperatur.

Zur Aufarbeitung entfernte man das Lösungsmittel im Vakuum, evaporierte den Rückstand mehrfach mit wenig Wasser und supendierte erneut in Wasser (700 µl/µmol). Die Lösung wurde mehrfach mit Ether extrahiert (350 µl/µmol), bis bei der Analyse der Etherphasen per DC (Dichlormethan/Methanol 10:1) kein PPh_3 mehr zu finden war. Die wässrige Phase wurde ggf. von unlöslichem Rückstand dekantiert, bevor das Wasser im Vakuum entfernt wurde. Die Ausbeute bestimmte man optisch mittels UV-Spektroskopie, die Reinheit durch HPLC.

2.2 Reduktionen der 5'-3'-geschützten $^{N_3}XY^{PTE}$ Dimere

2.2.1 Darstellung von d-NH_2-Cp-d-Ap-PTE ($^{NH_2}CA^{PTE}$) (53a)

175.3 µmol d-Az-Cp-d-Ap-PTE **52a** wurden nach AAV 2 umgesetzt. Man erhielt 162.6 µmol **53a** als weißen Schaum.

Ausbeute: 93 %

UV (Wasser): λ_{max}= 254 nm

MS (MALDI): MH^+=756.3 g/mol (Matrix: HPA)

$C_{27}H_{35}N_9O_{11}P_2S$ (M=755.63 g/mol) voll protoniert

^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.98 (m_c, 1H, 2'$_I$-H), 2.21 (m_c, 1H, 2'$_I$-H'), 2.50 (m_c, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.65 (m_c, 1H, 2'$_{II}$-H'), 3.20-3.29 (m, 4H, CH_2S, 5'$_I$-H,H'), 3.96-4.09 (m, 4H, $POCH_2$, 5'$_{II}$-H,H'), 4.13 (m_c, 1H, 4'$_I$-H), 4.30 (m_c, 1H, 4'$_{II}$-H), 4.55 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.92 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 5.75 (dd, aa t, *J* = 6.9 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 5.80 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, 5-H (Cyt)), 6.13 (dd, aa t, *J* = 6.1 Hz, 1H, 1'$_I$-H), 6.82 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, 4-PTE-H), 7.04 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, 3,5-PTE-H), 7.20 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, 2,6-PTE-H), 7.24 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, 6-H (Cyt)), 8.11 (s, 1H, 2-H (Aden)), 8.32 (s, 1H, 8-H (Aden)).

2.2.2 Darstellung von d-NH_2-Cp-d-Gp-PTE ($^{NH_2}CG^{PTE}$) (53b)

158.8 µmol d-Az-Cp-d-Gp-PTE **52b** wurden nach AAV 2 umgesetzt. Man erhielt 127.1 µmol **53b** als weißen Schaum.

Ausbeute: 80 %

UV (Wasser): λ_{max}= 251 nm

MS (MALDI): MH^+=771.5 g/mol (Matrix: HPA)

$C_{27}H_{35}N_9O_{12}P_2S$ (M=771.63 g/mol) voll protoniert

^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.90 (m_c, 1H, 2'$_I$-H), 2.26 (m_c, 1H, 2'$_I$-H'), 2.45 (ddd, ^2J = 14.0 Hz, *J* = 2.5 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.58 (ddd, ^2J = 14.1 Hz, *J* = 6.0 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H'), 3.10-3.30 (m, 4H, CH_2S, 5'$_I$-H,H'), 3.95-4.10 (m, 4H, $POCH_2$, 5'$_{II}$-H,H'), 4.13 (m_c, 1H, 4'$_I$-H), 4.26 (m_c, 1H, 4'$_{II}$-H), 4.51 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.91 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 5.86-5.91 (m, 2H, 1'$_I$-H, 5-H (Cyt)), 5.95 (dd, *J* = 6.0 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 6.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 4-PTE-H), 7.10 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, 3,5-PTE-H), 7.22 (dd, *J* = 7.0 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 2H, 2,6-PTE-H), 7.32 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 6-H (Cyt)), 7.94 (s, 1H, 8-H (Gua)).

2.2.3 Darstellung von d-NH_2-Tp-d-Ap-PTE ($^{NH_2}TA^{PTE}$) (53c)

65.0 µmol d-Az-Tp-d-Ap-PTE **52c** wurden nach AAV 2 umgesetzt. Man erhielt 51.3 µmol **53c** als weißen Schaum.

Ausbeute: 88 %

UV (Wasser): λ_{max}= 257 nm

MS (MALDI): MH^+=769.8 g/mol (Matrix: HPA)

$C_{28}H_{36}N_8O_{12}P_2S$ (M=770.64 g/mol) voll protoniert

^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.77 (s, 3H, CH_3 (Thym)), 1.91 (m_c, 1H, 2'$_I$-H), 2.17 (ddd, ^2J = 14.1 Hz, J = 2.5 Hz, J = 6.6 Hz, 1H, 2'$_I$-H'), 2.52 (ddd, ^2J = 13.5 Hz, J = 2.5 Hz, J = 5.5 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.67 (ddd, aa sept, ^2J = 14.0 Hz, J = 6.0 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H'), 2.98 (dd, ^2J = 13.0 Hz, J = 8.5 Hz, 1H, 5'$_I$-H), 3.12-3.27 (m, 3H, CH_2S, 5'$_I$-H'), 3.96-4.11 (m, 5H, $POCH_2$, 4'$_I$-H, 5'$_{II}$-H,H'), 4.30 (m_c, 1H, 4'$_{II}$-H), 4.55 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.93 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 5.77 (dd, J = 6.0 Hz, J = 7.5 Hz, 1H, 1'$_I$-H), 6.12 (dd, J = 5.5 Hz, J = 8.5 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 6.82 (t, J = 7.6 Hz, 1H, 4-PTE-H), 7.03 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 3,5-PTE-H), 7.10 (d, ^4J = 1.0 Hz, 1H, 6-H (Thym)), 7.18 (d, J = 7.6 Hz, 2H, 2,6-PTE-H), 8.09 (s, 1H, 2-H (Aden)), 8.32 (s, 1H, 8-H (Aden)).

2.2.4 Darstellung von d-NH_2-Tp-d-Gp-PTE ($^{NH_2}TG^{PTE}$) (53d)

152.7 µmol d-Az-Tp-d-Gp-PTE **52d** wurden nach AAV 2 umgesetzt. Man erhielt 129.5 µmol **53d** als weißen Schaum.

Ausbeute: 85 %

UV (Wasser): λ_{max}= 253 nm

MS (MALDI): MH^+=786.1 g/mol (Matrix: HPA)

$C_{28}H_{36}N_8O_{13}P_2S$ (M=786.64 g/mol) voll protoniert

^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.79 (d, ^4J = 1.0 Hz, 3H, CH_3 (Thym)), 1.97 (m_c, 1H, 2'$_I$-H), 2.25 (ddd, ^2J = 14.0 Hz, J = 2.5 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_I$-H'), 2.46 (ddd, ^2J = 14.0 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.60 (ddd, aa sept, ^2J = 14.0 Hz, J = 6.0 Hz, J = 8.5 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H'), 3.02 (dd, ^2J = 13.6 Hz, J = 9.0 Hz, 1H, 5'$_I$-H), 3.13-3.29 (m, 3H, CH_2S, 5'$_I$-H'), 3.96-4.09 (m, 4H, $POCH_2$, 5'$_{II}$-H,H'), 4.12 (m_c, 1H, 4'$_{II}$-H), 4.25 (m_c, 1H, 4'$_I$-H), 4.56 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.92 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 5.87 (dd, J = 6.0 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 1'$_I$-H), 5.95 (dd, J = 6.1 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 6.94 (t, J = 7.0 Hz, 1H, 4-PTE-H), 7.10 (t, J = 7.2 Hz, 2H, 3,5-PTE-H), 7.21 (m, 3H, 2,6-PTE-H, 6-H (Thym)), 7.95 (s, 1H, 8-H (Gua)).

2.3 Oxidationen der 5'-3'-geschützten $^{N_3}XY^{PTE}$ Dimere

2.3.1 Darstellung von d-Az-Cp-d-Ap ($^{N_3}CA^{PO_4^{2-}}$) (55a)

538.6 µmol d-Az-Cp-d-Ap-PTE **52a** wurden nach AAV 1 umgesetzt. Chromatografie an DEAE-Sephadex ergab 464.7 µmol **55a**.

Ausbeute: 86 %

UV (Wasser): λ_{max}= 261 nm
MS (MALDI): MH^+=645.1 g/mol (Matrix: HPA)
$C_{19}H_{25}N_{11}O_{11}P_2$ (M=645.40 g/mol) voll protoniert

2.3.2 Darstellung von d-Az-Cp-d-Gp ($^{N_3}CG^{PO_4^{2-}}$) (55b)

434.3 µmol d-Az-Cp-d-Gp-PTE **52b** wurden nach AAV 1 umgesetzt. Chromatografie an DEAE-Sephadex ergab 386.5 µmol **55b**.

Ausbeute: 89 %

UV (Wasser): λ_{max}= 253 nm
MS (MALDI): MH^+=661.2 g/mol (Matrix: HPA)
$C_{19}H_{25}N_{11}O_{12}P_2$ (M=661.40 g/mol) voll protoniert
^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.71 (m_c, 1H, 2'$_I$-H), 2.29 (ddd, ^2J = 14.1 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_I$-H'), 2.60 (ddd, ^2J = 13.5 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.80 (m_c, 1H, 2'$_{II}$-H'), 3.38 (dd, ^2J = 13.6 Hz, J = 5.5 Hz, 1H, 5'$_I$-H), 3.46 (dd, ^2J = 13.0 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, 5'$_I$-H'), 4.01-4.10 (m, 3H, 4'$_{II}$-H, 5'$_{II}$-H,H'), 4.29 (m_c, 1H, 4'$_I$-H), 4.49 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.85 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 5.94 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 5-H (Cyt)), 6.06 (dd, J = 6.0 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 6.20 (dd, J = 6.5 Hz, J = 7.5 Hz, 1H, 1'$_I$-H), 7.46 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 6-H (Cyt)), 8.02 (s, 1H, 8-H (Gua)).

2.3.3 Darstellung von d-Az-Tp-d-Ap ($^{N_3}TA^{PO_4^{2-}}$) (55c)

239.1 µmol d-Az-Tp-d-Ap-PTE **52c** wurden nach AAV 1 umgesetzt. Chromatografie an DEAE-Sephadex ergab 201.3 µmol **55c**.

Ausbeute: 84 %

UV (Wasser): λ_{max}= 259 nm

MS (MALDI): MH^+=659.6 g/mol (Matrix: HPA)

$C_{20}H_{26}N_{10}O_{12}P_2$ (M=660.41 g/mol) voll protoniert

^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.64 (m_c, 1H, 2'$_I$-H), 1.82 (s, 3H, CH_3 (Thym)), 2.15 (ddd, ^2J = 14.0 Hz, J = 2.5 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_I$-H'), 2.69 (ddd, ^2J = 14.0 Hz, J = 3.5 Hz, J = 6.5 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.87 (m_c, 1H, 2'$_{II}$-H'), 3.36 (dd, ^2J = 13.6 Hz, J = 5.5 Hz, 1H, 5'$_I$-H'), 3.45 (dd, ^2J = 13.6 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, 5'$_I$-H), 3.99-4.08 (m, 3H, 4'$_I$-H, 5'$_{II}$-H,H'), 4.33 (m_c, 1H, 4'$_{II}$-H), 4.47 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.87 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 5.89 (dd, J = 5.9 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 1'$_I$-H), 6.39 (dd, J = 6.0 Hz, J = 7.6 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 7.18 (d, ^4J = 1.5 Hz, 1H, 6-H (Thym)), 8.14 (s, 1H, 2-H (Aden)), 8.41 (s, 1H, 8-H (Aden)).

2.3.4 Darstellung von d-Az-Tp-d-Gp ($^{N_3}TG^{PO_4^{2-}}$) (55d)

387.6 µmol d-Az-Tp-d-Gp-PTE **52d** wurden nach AAV 1 umgesetzt. Chromatografie an DEAE-Sephadex ergab 348.1 µmol **55d**.

Ausbeute: 90 %

UV (Wasser): λ_{max}= 255 nm

MS (MALDI): MH^+=675.7 g/mol (Matrix: HPA)

$C_{20}H_{26}N_{10}O_{13}P_2$ (M=676.42 g/mol) voll protoniert

^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.79-1.86 (m, 4H, CH_3 (Thym), 2'$_I$-H), 2.25 (ddd, ^2J = 14.0 Hz, J = 2.5 Hz, J = 5.5 Hz, 1H, 2'$_I$-H'), 2.60 (ddd, ^2J = 13.5 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.79 (m_c, 1H, 2'$_{II}$-H'), 3.39 (dd, ^2J = 13.6 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, 5'$_I$-H), 3.45 (dd, ^2J = 13.6 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 5'$_I$-H'), 4.00-4.10 (m, 3H, 4'$_I$-H, 5'$_{II}$-H,H'), 4.29 (m_c, 1H, 4'$_{II}$-H), 4.53 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.85 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 6.02 (dd, J = 6.0 Hz, J = 8.5 Hz, 1H, 1'$_I$-H), 6.20 (dd, J = 6.5 Hz, J = 7.5 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 7.30 (d, ^4J = 1.0 Hz, 1H, 6-H (Thym)), 8.02 (s, 1H, 8-H (Gua)).

2.4 Reduktionen der 5'-geschützten $^{N_3}XY^{PO_4^{2-}}$ Dimere

2.4.1 Darstellung von d-NH_2-Cp-d-Ap ($^{NH_2}CA^{PO_4^{2-}}$) (56a)

100 µmol d-Az-Cp-d-Ap **55a** wurden nach AAV 2 umgesetzt. Man erhielt 62.2 µmol **56a** als weißen Schaum.

Ausbeute: 62 %

UV (Wasser): λ_{max}= 260 nm

MS (MALDI): MH^+=618.6 g/mol (Matrix: HPA)

$C_{19}H_{27}N_9O_{11}P_2$ (M=619.40 g/mol) voll protoniert

^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.91 (m_c, 1H, 2'$_I$-H), 2.22 (ddd, ^2J = 14.0 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.5 Hz, 1H, 2'$_I$-H'), 2.69 (ddd, ^2J = 14.1 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.81 (m_c, 1H, 2'$_{II}$-H'), 3.06 (dd, ^2J = 13.6 Hz, J = 8.6 Hz, 1H, 5'$_I$-H), 3.23 (dd, ^2J = 13.5 Hz, J = 4.0 Hz, 1H, 5'$_I$-H'), 4.03-4.09 (m_c, 2H, 5'$_{II}$-H,H'), 4.11 (m_c, 1H, 4'$_I$-H), 4.35 (m_c, 1H, 4'$_{II}$-H), 4.52 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.87 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 5.79 (dd, aa t, J = 6.5 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 5.86 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 5-H (Cyt)), 6.41 (dd, J = 6.6 Hz, J = 8.1 Hz, 1H, 1'$_I$-H), 7.29 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 6-H (Cyt)), 8.15 (s, 1H, 2-H (Aden)), 8.41 (s, 1H, 8-H (Aden)).

2.4.2 Darstellung von d-NH_2-Cp-d-Gp ($^{NH_2}CG^{PO_4^{2-}}$) (56b)

100 µmol d-Az-Cp-d-Gp **55b** wurden nach AAV 2 umgesetzt. Man erhielt 57.6 µmol **56b** als weißen Schaum.

Ausbeute: 58 %

UV (Wasser): λ_{max}= 253 nm

MS (MALDI): MH^+=636.1 (Matrix: HPA)

$C_{19}H_{27}N_9O_{12}P_2$ (M=635.40) voll protoniert

^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.92 (m_c, 1H, 2'$_I$-H), 2.29 (ddd, ^2J = 14.6 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.5 Hz, 1H, 2'$_I$-H'), 2.61 (ddd, ^2J = 13.5 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.76 (ddd, ^2J = 13.5 Hz, J = 6.0 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H'), 3.04 (dd, ^2J = 13.1 Hz, J = 8.6 Hz, 1H, 5'$_I$-H), 3.22 (dd, ^2J = 13.6 Hz, J = 4.5 Hz, 1H, 5'$_I$-H'), 4.00-4.10 (m_c, 2H, 5'$_{II}$-H,H'), 4.13 (m_c, 1H, 4'$_{II}$-H), 4.31 (m_c, 1H, 4'$_I$-H), 4.51 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.84 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 5.91 (dd, J = 6.0 Hz, J = 7.5 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 5.91 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 5-H (Cyt)), 6.21 (dd, J = 6.0 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 1'$_I$-H), 7.37 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 6-H (Cyt)), 8.05 (s, 1H, 8-H (Gua)).

2.4.3 Darstellung von d-NH_2-Tp-d-Ap ($^{NH_2}TA^{PO_4^{2-}}$) (56c)

100 µmol d-Az-Tp-d-Ap **55c** wurden nach AAV 2 umgesetzt. Man erhielt 81.6 µmol **56c** als weißen Schaum.

Ausbeute: 82 %

UV (Wasser): λ_{max}= 259 nm

MS (MALDI): MH^+=634.8 g/mol (Matrix: HPA)

$C_{20}H_{28}N_8O_{12}P_2$ (M=634.42 g/mol) voll protoniert

^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.80 (s, 3H, CH_3 (Thym)), 1.91 (ddd, ^2J = 14.0 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_I$-H), 2.18 (dd, J = 3.0 Hz, J = 6.5 Hz, 1H, 2'$_I$-H'), 2.69 (ddd, ^2J = 13.6 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.81 (ddd, aa sept, ^2J = 14.0 Hz, J = 6.5 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H'), 3.01 (dd, ^2J = 13.6 Hz, J = 9.0 Hz, 1H, 5'$_I$-H), 3.18 (m_c, 1H, 5'$_I$-H'), 4.01-4.11 (m, 3H, 4'$_I$-H, 5'$_{II}$-H,H'), 4.35 (m_c, 1H, 4'$_{II}$-H), 4.54 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.87 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 5.78 (dd, J = 7.0 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 1'$_I$-H), 6.40 (dd, J = 6.0 Hz, J = 7.6 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 7.14 (d, ^4J = 1.0 Hz, 1H, 6-H (Thym)), 8.13 (s, 1H, 2-H (Aden)), 8.41 (s, 1H, 8-H (Aden)).

2.4.4 Darstellung von d-NH_2-Tp-d-Gp ($^{NH_2}TG^{PO_4^{2-}}$) (56d)

100 µmol d-Az-Tp-d-Gp **55d** wurden nach AAV 2 umgesetzt. Man erhielt 69.2 µmol **56d** als weißen Schaum.

Ausbeute: 69 %

UV (Wasser): λ_{max}= 254 nm

MS (MALDI): MH^+=650.1 g/mol (Matrix: HPA)

$C_{20}H_{28}N_8O_{13}P_2$ (M=650.42 g/mol) voll protoniert

^{1}H-NMR (400 Mhz, D_2O, HDO): δ = 1.81 (d, ^4J = 1.0 Hz, 3H, CH_3 (Thym)), 1.97 (m_c, 1H, 2'$_I$-H), 2.26 (ddd, ^2J = 14.6 Hz, J = 3.0 Hz, J = 6.5 Hz, 1H, 2'$_I$-H'), 2.61 (ddd, ^2J = 13.5 Hz, J = 2.5 Hz, J = 6.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H), 2.75 (ddd, aa sept, ^2J = 14.0 Hz, J = 6.0 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 2'$_{II}$-H'), 3.00 (dd, ^2J = 13.0 Hz, J = 9.0 Hz, 1H, 5'$_I$-H), 3.17 (dd, ^2J = 13.5 Hz, J = 4.5 Hz, 1H, 5'$_I$-H'), 4.00-4.14 (m, 3H, 4'$_I$-H, 5'$_{II}$-H,H'), 4.31 (m_c, 1H, 4'$_{II}$-H), 4.55 (m_c, 1H, 3'$_I$-H), 4.84 (m_c, 1H, 3'$_{II}$-H), 5.91 (dd, J = 6.5 Hz, J = 8.5 Hz, 1H, 1'$_I$-H), 6.21 (dd, J = 6.0 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 1'$_{II}$-H), 7.23 (d, ^4J = 1.0 Hz, 1H, 6-H (Thym)), 8.04 (s, 1H, 8-H (Gua)).

2.5 Automatisierte Synthese der Oligonucleotide

Die Synthesen erfolgten vollautomatisch nach der Phosphoamidit-Methode (siehe Kap. 4.1.6) an einem DNA-Synthesizer *Gene Assembler Plus* der Firma *Pharmacia Biosystems* nach Standardprotokoll bei einem Maßstab von 1.3 bis 5 µmol pro Trägersäule. Für die Einführung der 5'-Aminogruppe wurde im letzten Kopplungsschritt 5'-MMT-Amino-C-Phosphoamidit[173] eingesetzt, für die Einführung der 3'-Phosphatgruppen verwendete man in der Arbeitsgruppe modifizierte CPG-Festphasen (siehe Kap. 4.2). Zur Abspaltung vom Trägermaterial und gleichzeitigen Entschützung der Oligonucleotide wurden die Trägersäulen in ein verschraubbares 1.5 ml Eppendorf Gefäß überführt, mit ca. 1 ml 33 %-iger NH_3-Lösung versetzt und in einem Heizblock 16 h bei 55 °C behandelt. Nach Abkühlung wurde die Lösung abpipettiert, die Kartusche zwei mal mit je 200 µl bidest. H_2O gespült und zentrifugiert (14000 g) und die vereinigten Lösungen im Speed-Vac Konzentrator evaporiert.

2.6 Aufreinigung und Charakterisierung der Oligonucleotide

Die Rohprodukte aus den automatisierten Synthesen wurden über präparative Ionenaustauscherchromatografie (*Vision Chromatography-Workstation* der Firma *Perseptive Biosystems*, Gradient: (**A**) H_2O (**B**) 1 M NH_4HCO_3, siehe Kap. 1.2.4.2, Exp. Teil) aufgereinigt. Die vereinigten Produktfraktionen wurden bei 30 °C Badtemperatur im Vakuum evaporiert. Der in kristalliner Form zurückbleibende Puffer wurde durch mehrfaches Coevaporieren (10 bis 20 mal) mit je 20 ml einer 1:1 (v/v) Mischung von Wasser/Ethanol entfernt. Die Reinheit der so gewonnenen Produkte überprüfte man per Reversed-Phase-HPLC Analyse. Falls notwendig erfolgte ein zweiter chromatografischer Reinigungsschritt mittels RP-HPLC (Gradient: (**A**) 0.1 M NH_4HCO_3 (**B**) CH_3CN, siehe Kap. 1.2.3, Exp. Teil). Die Entfernung des Puffers geschah widerum durch mehrfaches Coevaporieren mit einem Wasser/Ethanol-Gemisch.

Die gereinigten Verbindungen wurden durch MALDI-TOF-MS charakterisiert, die Produktmengen über UV-Messungen bei 254 nm ermittelt. Die wässrigen Lösungen der Oligonucleotide wurden bei –24 °C aufbewahrt. Tab. 2.1 Führt die mittels DNA-Synthesizer hergestellten Produkte auf.

Verbindung	Ausbeute (gemäß Reaktionsprotokoll)	ε_{254} [1] [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]	M [g/mol]	
			theoretisch	gemessen
$d(^{HO}\mathbf{(TA)_6}^{OH})$	98.1 %	122700	3642.4	3640.5
$d(^{HO}\mathbf{(TA)_{12}}^{OH})$	84.7 %	245400	7346.8	7346
$d(^{HO}\mathbf{(CG)_2}^{OH})$	98.1 %	40440	1174.83	1176.1
$d(^{HO}\mathbf{(CG)_3}^{OH})$	88.3 %	60660	1792.23	1794.3
$d(^{HO}\mathbf{(CG)_4}^{OH})$	78.2 %	80880	2411.62	2413.1
$d(^{HO}\mathbf{(CG)_5}^{OH})$	71.4 %	101100	3030.02	3031.8
$d(^{HO}\mathbf{(CG)_6}^{OH})$	82.3 %	121320	3648.4	3651.0
$d(^{HO}\mathbf{(CG)_{12}}^{OH})$	64.7 %	242640	7358.7	7360
$d(^{HO}\mathbf{(CA)_2}^{OH})$	98.1 %	39482	1139.81	1141.3
$d(^{HO}\mathbf{(CA)_4}^{OH})$	99.0 %	78964	2340.6	2342.1
$d(^{HO}\mathbf{(CA)_6}^{OH})$	95.1 %	118446	3541.3	3543.1
$d(^{HO}\mathbf{(CA)_{12}}^{OH})$	78.2 %	236892	7166.7	7168
$d(^{HO}\mathbf{(TG)_2}^{OH})$	86.7 %	41858	1201.83	1203.1
$d(^{HO}\mathbf{(TG)_6}^{OH})$	99.8 %	125574	3738.4	3734.6
$d(^{HO}\mathbf{(TG)_{12}}^{OH})$	67.6 %	251148	7538.8	7542
$d(^{HO}\mathbf{(CG)_2}^{PO_4^{2-}})$	80.6 %	40440	1254.80	1255.1
$d(^{HO}\mathbf{(CG)_3}^{PO_4^{2-}})$	79.6 %	60660	1873.20	1874.3
$d(^{NH_2}\mathbf{(CG)_2}^{PO_4^{2-}})$	71.7 %	40440	1253.82	1254.9

Tab. 2.1: Produkte der DNA-Synthesizer Synthesen

[1] Zur Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten verwendete man folgende Inkremente: TMP = 7250, CMP = 6541, AMP = 13200, GMP = 13679 [l mol^{-1} cm^{-1}]

3. Daten der Replikationsexperimente

3.1 SimFit Command-Files

Command-File der spontanen Ligation

Das SimFit Command-File des spontanen Ligationsmodells ist im linken Teil der Tab. 3.1 aufgeführt, im rechten Teil der Tabelle finden sich die Kommentare zur Filestruktur.

define (1,dimer,e,1) scale (3, 1) define (2,tetramer,p,2) scale (3, 1) define (3,hexamer,p,3) scale (3, 1) define (4,oktamer,p,4) scale (3, 1) define (5,xmer,p,5) scale (3, 1) define (6,di_init,e,6) scale (3, 1)	Observablendefinition: Dimer = $^{n}CG^{p}$, Tetramer = $(^{n}CG^{p})_2$, etc. Di_init = Ausgangskonz. von $^{n}CG^{p}$
select (dimer,tetramer,hexamer,oktamer,xmer)	Wählt die Observablen für die Darstellung.
read(A.txt,B.txt,C.txt,D.txt,E.txt,F.txt,G.txt,H.txt,I.txt)	Liest die Datenfiles der Experimente A bis I ein.
choose (exp1)	Wählt das Experiment 1 eines Datenfiles aus.
reaction (N2 + N2 + EDC --> N4 + EDU) constant (1, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	Gleichungen 1 bis 16 der spontanen Ligation mit freiem $k_1 = 8.70 \cdot 10^{-3}$, variabel von 10^{-6} bis 10^{4}. Nx
reaction (N2 + N4 + EDC --> N6 + EDU) constant (2, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N2 + N6 + EDC --> N8 + EDU) constant (3, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N2 + N8 + EDC --> N10 + EDU) constant (4, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N2 + N10 + EDC --> N12 + EDU) constant (5, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N2 + N12 + EDC --> N14 + EDU) constant (6, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N2 + N14 + EDC --> N16 + EDU) constant (7, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N4 + N4 + EDC --> N8 + EDU) constant (8, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N4 + N6 + EDC --> N10 + EDU) constant (9, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N4 + N8 + EDC --> N12 + EDU) constant (10, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N4 + N10 + EDC --> N14 + EDU) constant (11, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N4 + N12 + EDC --> N16 + EDU) constant (12, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	

reaction (N6 + N6 + EDC --> N12 + EDU) constant (13, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N6 + N8 + EDC --> N14 + EDU) constant (14, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N6 + N10 + EDC --> N16 + EDU) constant (15, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N8 + N8 + EDC --> N16 + EDU) constant (16, 8.70E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (EDC --> EDU) constant (17, 2E-8, 4, 1, 1E-10, 1E+2)	Gleichung 17 der unproduktiven Abreaktion des EDC mit freiem $k_2 = 2 \cdot 10^{-8}$, variabel von 10^{-10} bis 10^2.
reaction (compile)	Compiliert die Reaktionsgleichungen.
reaction (show)	Zeigt die Reaktions- und Differentialgleichungen.
dim (4)	Definiert die Zahl der frei wählbaren Konstanten.
assign (obs, dimer = N2) assign (obs, tetramer = N4) assign (obs, hexamer = N6) assign (obs, oktamer = N8) assign (obs, xmer = N10 + N12 + N14 + N16)	Ordnet den Observablen der Datenfiles die Spezies des Modells zu. Eine Observable kann dabei mehrere Spezies des Modells beinhalten.
assign (spec, N2 = di_init)	Legt die Anfangskonzentrationen der Spezies fest, die aus den Datenfiles eingelesen werden.
assign (spec, EDC = #0.4)	Setzt die Anfangskonzentrationen von EDC auf 0.4M.
time (min)	Definiert die Zeitskala des Plots.
conc (mM)	Definiert die Konzentrationsskala des Plots.
win (0,70,20,1,0,20,1,.0003)	Definiert das Koordinatensystem des Plots.
integ (stiff, .00001, 4, .05, 20, 30)	Definiert die Integrationsparameter.
plot	Erzeugt eine grafische Darstellung des Fits, den Plot.
newton (plot)	Iteration durch Newton-Algorithmus mit Plot.
simplex (plot)	Iteration durch Simplex-Algorithmus mit Plot.
make	Erzeugt neues cmd-File mit gefitteten k-Werten.

Tab. 3.1: SimFit Command-File der rein spontanen Ligation des offenen Systems

Command-File der Einzelkinetikfits

Das SimFit Command-File der Einzelkinetikfits ist im linken Teil der Tab. 3.2 aufgeführt, im rechten Teil der Tabelle finden sich die Kommentare zur Filestruktur.

define (1,T2,e,1)	scale (3, 1)	Observablendefinition der Edukte (e):
define (2,2T_A,e,2)	scale (3, 1)	Zahlen = Oligomerlänge (2=Dimer,etc.),
define (3,2T_B,e,3)	scale (3, 1)	T = terminiert, unreaktiv bzw. geschützt.
define (4,2T_C,e,4)	scale (3, 1)	T2 = $^{N3}CG^{p}$, 2T_(A,B,C) = $^{n}CG^{pte}$ in den drei
define (5,T4,e,5)	scale (3, 1)	verschiedenen Experimenttypen,
define (6,T6,e,6)	scale (3, 1)	T4 = $^{HO}(CG)_2{}^{p}$, T6 = $^{HO}(CG)_3{}^{p}$.

define (7,T4T,p,7) scale (3, 1) define (8,T6T,p,8) scale (3, 1) define (9,T8T,p,9) scale (3, 1)	Observablendefinition der Produkte (p): T4T = $^{N3}CG^{pn}CG^{pte}$, T6T = $^{HO}(CG)_2{}^{pn}CG^{pte}$, T8T = $^{HO}(CG)_3{}^{pn}CG^{pte}$.
select (T2,2T_A,2T_B,2T_C,T4,T6)	Wählt die Observablen für die Darstellung.
read (A.txt, B.txt, C.txt)	Liest die Datenfiles der Experimente A bis C ein.
choose (exp1,exp2,exp3,exp4)	Wählt die Experimente 1 bis 4 eines Datenfiles aus.
reaction (T2 + 2T_A + EDC --> T4T + EDU) constant (1, 1.166E-2, 1, 1, 1E-8, 1E+4)	Gleichungen 1 bis 3 der spontanen Ligation mit freiem $k_1 = 1.166 \cdot 10^{-2}$, variabel von 10^{-8} bis 10^4.
reaction (T4 + 2T_B + EDC --> T6T + EDU) constant (2, 1.166E-2, 1, 1, 1E-8, 1E+4)	
reaction (T6 + 2T_C + EDC --> T8T + EDU) constant (3, 1.166E-2, 1, 1, 1E-8, 1E+4)	
reaction (EDC --> EDU) constant (4, 1E-9, 2, 1, 1E-10, 1E+2)	Gleichung 4 der unproduktiven Abreaktion des EDC mit freiem $k_2 = 1 \cdot 10^{-9}$, variabel von 10^{-10} bis 10^2.
reaction (compile)	Compiliert die Reaktionsgleichungen.
reaction (show)	Zeigt die Reaktions- und Differentialgleichungen.
dim (2)	Definiert die Zahl der frei wählbaren Konstanten.
assign (obs, 2T_A = 2T_A) assign (obs, 2T_B = 2T_B) assign (obs, 2T_C = 2T_C) assign (obs, T2 = T2) assign (obs, T4 = T4) assign (obs, T6 = T6) assign (obs, T4T = T4T) assign (obs, T6T = T6T) assign (obs, T8T = T8T)	Ordnet den Observablen der Datenfiles die Spezies des Modells zu.
assign (spec, 2T_A = 2T_A) assign (spec, 2T_B = 2T_B) assign (spec, 2T_C = 2T_C) assign (spec, T2 = T2) assign (spec, T4 = T4) assign (spec, T6 = T6)	Legt die Anfangskonzentrationen der Spezies fest, die aus den Datenfiles eingelesen werden. Falls nicht definiert, ist die Ausgangskonz. einer Spezies 0.
assign (spec, EDC = #0.4)	Setzt die Anfangskonzentrationen von EDC auf 0.4M.
time (min)	Definiert die Zeitskala des Plots.
conc (mM)	Definiert die Konzentrationsskala des Plots.
win (0,250,20,1,0,20,1,.0003)	Definiert das Koordinatensystem des Plots.
integ (stiff, .00001, 4, .05, 20, 30)	Definiert die Integrationsparameter.
plot	Erzeugt eine grafische Darstellung des Fits, den Plot.
newton (plot)	Iteration durch Newton-Algorithmus mit Plot.
simplex (plot)	Iteration durch Simplex-Algorithmus mit Plot.
make	Erzeugt neues cmd-File mit gefitteten k-Werten.

Tab. 3.2: SimFit Command-File des Einzelkinetikfits

Command-File des Slidomermodells

Das SimFit Command-File des Slidomermodells ist im linken Teil der Tab. 3.3 aufgeführt, im rechten Teil der Tabelle finden sich die Kommentare zur Filestruktur.
Die Gleichungen 1 bis 16 setzen auf dem Gleichungssystem des spontanen Ligationsmodells auf, dessen Reaktionsgleichung 17 der unproduktiven Abreaktion des EDC hier die Reaktionsgleichung 46 stellt.

define (1,dimer,e,1) scale (3, 1) define (2,tetramer,p,2) scale (3, 1) define (3,hexamer,p,3) scale (3, 1) define (4,oktamer,p,4) scale (3, 1) define (5,xmer,p,5) scale (3, 1) define (6,di_init,e,6) scale (3, 1) define (7,te_init,e,7) scale (3, 1)	Observablendefinition: Dimer = $^{n}CG^{p}$, Tetramer = $(^{n}CG^{p})_2$, etc. Di_init = Ausgangskonz. von $^{n}CG^{p}$ Te_init = Ausgangskonz. von $^{n}(CG)_2{}^{p}$
select (dimer,tetramer,hexamer,oktamer,xmer)	Wählt die Observablen für die Darstellung.
read(A.txt,B.txt,C.txt,D.txt,E.txt,F.txt,G.txt,H.txt,I.txt)	Liest die Datenfiles der Experimente A bis I ein.
choose (exp1)	Wählt das Experiment 1 eines Datenfiles aus.
reaction (N2 + N2 + EDC --> N4 + EDU) constant (1, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	Gleichungen 1 bis 16 der spontanen Ligation mit freiem $k_1 = 8.55 \cdot 10^{-3}$, variabel von 10^{-6} bis 10^{4}. Nx
reaction (N2 + N4 + EDC --> N6 + EDU) constant (2, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N2 + N6 + EDC --> N8 + EDU) constant (3, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N2 + N8 + EDC --> N10 + EDU) constant (4, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N2 + N10 + EDC --> N12 + EDU) constant (5, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N2 + N12 + EDC --> N14 + EDU) constant (6, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N2 + N14 + EDC --> N16 + EDU) constant (7, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N4 + N4 + EDC --> N8 + EDU) constant (8, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N4 + N6 + EDC --> N10 + EDU) constant (9, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N4 + N8 + EDC --> N12 + EDU) constant (10, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	

reaction (N4 + N10 + EDC --> N14 + EDU) constant (11, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N4 + N12 + EDC --> N16 + EDU) constant (12, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N6 + N6 + EDC --> N12 + EDU) constant (13, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N6 + N8 + EDC --> N14 + EDU) constant (14, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N6 + N10 + EDC --> N16 + EDU) constant (15, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N8 + N8 + EDC --> N16 + EDU) constant (16, 8.55E-3, 1, 1, 1E-6, 1E+4)	
reaction (N4 + N4 ==> N4s) constant (17, 1e+6, 0) constant (18, 3.24E+4, 2, 1, 1E-9, 1E+9)	Gleichgewichtsgleichungen 17 bis 30 der Slidomer-Komplexbildung mit fester Assoziationskonstante (10^6) und freier Dissoziationskonstante k_2=3.24·10^4, variabel von 10^{-6} bis 10^4, repräsentiert durch die Slidomer-Duplexe Nxs. Der Equilibrierungsfaktor beträgt hier 0.3 und wird auf die Dissoziationskonstante der jeweiligen Gleichung multiplikativ angewendet, d.h. für Gleichung 20 beträgt er 0.3, für Gleichung 22 $(0.3)^2$=0.09, für Gleichung 24 $(0.3)^3$=0.027, usw. (resultierende Faktoren sind blau hervorgehoben). Auf diese Weise werden die Unterschiede in der Komplex-Dissoziation aufgrund der Stabilitätsunterschiede durch den Equilibrierungsfaktor erfasst.
reaction (N6 + N6 ==> N6s) constant (19, 1e+6, 0) constant (20, 3.24E+4, 2, 3E-1, 1E-9, 1E+9)	
reaction (N8 + N8 ==> N8s) constant (21, 1e+6, 0) constant (22, 3.24E+4, 2, 9E-2, 1E-9, 1E+9)	
reaction (N10 + N10 ==> N10s) constant (23, 1e+6, 0) constant (24, 3.24E+4, 2, 2.7E-2, 1E-9, 1E+9)	
reaction (N12 + N12 ==> N12s) constant (25, 1e+6, 0) constant (26, 3.24E+4, 2, 8.1E-3, 1E-9, 1E+9)	
reaction (N14 + N14 ==> N14s) constant (27, 1e+6, 0) constant (28, 3.24E+4, 2, 2.43E-3, 1E-9, 1E+9)	
reaction (N16 + N16 ==> N16s) constant (29, 1e+6, 0) constant (30, 3.24E+4, 2, 7.29E-4, 1E-9, 1E+9)	
reaction (N4s + N4s + 2 EDC --> N8s + 2 EDU) constant (31, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	Gleichungen 31 bis 39 der slidomerbeschleunigten Ligation innerhalb des Slidomers. Repräsentiert durch die Ligation der Slidomer-Duplexe miteinander (Überlappung immer zwei Basenpaare), mit freiem k_3 = 2.56, variabel von 10^{-9} bis 10^6.
reaction (N4s + N6s + 2 EDC --> N10s + 2 EDU) constant (32, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (N4s + N8s + 2 EDC --> N12s + 2 EDU) constant (33, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (N4s + N10s + 2 EDC --> N14s + 2 EDU) constant (34, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (N4s + N12s + 2 EDC --> N16s + 2 EDU) constant (35, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (N6s + N6s + 2 EDC --> N12s + 2 EDU) constant (36, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (N6s + N8s + 2 EDC --> N14s + 2 EDU) constant (37, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (N6s + N10s + 2 EDC --> N16s + 2 EDU) constant (38, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (N8s + N8s + 2 EDC --> N16s + 2 EDU) constant (39, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	

reaction (2 N2 + N4s + 2 EDC --> 2 N6s + 2 EDU) constant (40, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	Gleichungen 40 bis 45 der slidomerbeschleunigten Ligation des Dimers an den Enden des Slidomers. Repräsentiert durch die Ligation der Slidomer-Duplexe mit Dimeren, mit freiem $k_3 = 2.56$, variabel von 10^{-9} bis 10^{6}. Die Bildung von Slidomeren aus den Produktduplexen setzt voraus, dass die Duplexe durch einen schnellen Verschiebevorgang ('Slide') wieder in Slidomerkomplexe integriert werden. Da dieses Gleichgewicht für alle Oligomere weit auf der Seite der Slidomere angenommen wird und schnell sein sollte, ist keine separate Berücksichtigung notwendig.
reaction (2 N2 + N6s + 2 EDC --> 2 N8s + 2 EDU) constant (41, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (2 N2 + N8s + 2 EDC --> 2 N10s + 2 EDU) constant (42, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (2 N2 + N10s + 2 EDC --> 2 N12s + 2 EDU) constant (43, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (2 N2 + N12s + 2 EDC --> 2 N14s + 2 EDU) constant (44, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (2 N2 + N14s + 2 EDC --> 2 N16s + 2 EDU) constant (45, 2.56, 3, 1, 1E-9, 1E+6)	
reaction (EDC --> EDU) constant (46, 5E-8, 4, 1, 1E-10, 1E+2)	Gleichung 46 der unproduktiven Abreaktion des EDC mit freiem $k_4 = 5 \cdot 10^{-8}$, variabel von 10^{-10} bis 10^{2}.
reaction (compile)	Compiliert die Reaktionsgleichungen.
reaction (show)	Zeigt die Reaktions- und Differentialgleichungen.
dim (4)	Definiert die Zahl der frei wählbaren Konstanten.
assign (obs, dimer = N2) assign (obs, tetramer = N4 + 2 N4s) assign (obs, hexamer = N6 + 2 N6s) assign (obs, oktamer = N8 + 2 N8s) assign (obs, xmer = N10 + 2 N10s + N12 + 2 N12s + N14 + 2 N14s + N16 + 2 N16s)	Ordnet den Observablen der Datenfiles die Spezies des Modells zu. Eine Observable kann dabei mehrere Spezies des Modells beinhalten, wie z.B. die chromatografisch nicht sichtbaren Slidomere.
assign (spec, N2 = di_init) assign (spec, N4 = te_init)	Legt die Anfangskonzentrationen der Spezies fest, die aus den Datenfiles eingelesen werden.
assign (spec, EDC = #0.4)	Setzt die Anfangskonzentrationen von EDC auf 0.4M.
time (min)	Definiert die Zeitskala des Plots.
conc (mM)	Definiert die Konzentrationsskala des Plots.
win (0,70,20,1,0,20,1,.0003)	Definiert das Koordinatensystem des Plots.
integ (stiff, .00001, 4, .05, 20, 30)	Definiert die Integrationsparameter.
plot	Erzeugt eine grafische Darstellung des Fits, den Plot.
newton (plot)	Iteration durch Newton-Algorithmus mit Plot.
simplex (plot)	Iteration durch Simplex-Algorithmus mit Plot.
make	Erzeugt neues cmd-File mit gefitteten k-Werten.

Tab. 3.3: SimFit Command-File des Slidomermodells

3.2 Messdaten der Kinetikexperimente

Die für Fittings verwendeten Datenfiles haben die Form

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	...
1	1	5	18.92e-3	0.34e-3	0.01e-3	...
2	1	30	16.47e-3	1.18e-3	0.08e-3	...
3	1	60	14.39e-3	1.49e-3	0.21e-3	...
...	...	...	...	...	...	...

Die erste Spalte "num" enthält die Laufnummer der Messung, die zweite Spalte mit "exp" die jeweilige Nummer des Experiments, die Spalte "time" die seit Reaktionsstart vergangene Zeit in Minuten und die folgenden Spalten die Konzentrationen der jeweiligen Observable in $mol \cdot l^{-1}$. Observablennamen werden in den entsprechenden SimFit Command-Files näher erläutert. Die weiteren Messdaten-Tabellen der in dieser Arbeit verwendeten Kinetiken benötigen das "num" bzw. "exp" Feld nicht und führen die Konzentrationen der Observablen in mM auf.

3.2.1 Kinetikmessdaten der einseitig geschlossenen Bausteine

$^{N_3}CG^{p} + {}^{n}CG^{pte} + {}^{HO}(CG)_2{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES:

num	exp	time [min]	2t_a	2t_b	2t_c	t2	t4	t6	t4t	t6t	t8t	ho4oh	ho6oh	ho8oh
1	1	4	15.82e-3	0	0	17.97e-3	0	0	0.09e-3	0	0	0	0	0
2	1	32	14.47e-3	0	0	17.03e-3	0	0	1.13e-3	0	0	0	0	0
3	1	62	13.39e-3	0	0	15.38e-3	0	0	2.58e-3	0	0	0	0	0
4	1	90	12.49e-3	0	0	14.07e-3	0	0	3.69e-3	0	0	0	0	0
5	1	120	11.18e-3	0	0	12.82e-3	0	0	4.98e-3	0	0	0	0	0
6	1	150	10.19e-3	0	0	11.73e-3	0	0	6.04e-3	0	0	0	0	0
7	1	180	9.35e-3	0	0	10.53e-3	0	0	7.10e-3	0	0	0	0	0
8	1	210	8.53e-3	0	0	9.53e-3	0	0	8.03e-3	0	0	0	0	0
9	1	240	7.58e-3	0	0	8.44e-3	0	0	9.08e-3	0	0	0	0	0
1	2	4	15.13e-3	0	0	17.14e-3	0	0	9.67e-5	0	0	2.01e-3	0	0
2	2	40	13.46e-3	0	0	15.28e-3	0	0	1.77e-3	0	0	2.01e-3	0	0
3	2	60	12.55e-3	0	0	14.47e-3	0	0	2.63e-3	0	0	2.01e-3	0	0
4	2	90	11.26e-3	0	0	12.93e-3	0	0	3.96e-3	0	0	2.01e-3	0	0
5	2	120	10.23e-3	0	0	11.74e-3	0	0	5.13e-3	0	0	2.01e-3	0	0
6	2	150	9.24e-3	0	0	10.37e-3	0	0	6.35e-3	0	0	2.01e-3	0	0
7	2	180	8.34e-3	0	0	9.52e-3	0	0	7.18e-3	0	0	2.01e-3	0	0
8	2	210	7.39e-3	0	0	8.37e-3	0	0	8.29e-3	0	0	2.01e-3	0	0
9	2	240	6.29e-3	0	0	7.73e-3	0	0	9.06e-3	0	0	2.01e-3	0	0
1	3	4	17.67e-3	0	0	19.96e-3	0	0	2.47e-4	0	0	4.50e-3	0	0
2	3	31	16.23e-3	0	0	18.21e-3	0	0	1.76e-3	0	0	4.50e-3	0	0
3	3	60	14.87e-3	0	0	16.68e-3	0	0	3.09e-3	0	0	4.50e-3	0	0

4	3	90	13.76e-3	0	0	15.18e-3	0	0	4.47e-3	0	0	4.50e-3	0	0
5	3	120	12.34e-3	0	0	13.78e-3	0	0	5.81e-3	0	0	4.50e-3	0	0
6	3	150	11.22e-3	0	0	12.43e-3	0	0	7.03e-3	0	0	4.50e-3	0	0
7	3	180	10.22e-3	0	0	11.31e-3	0	0	8.11e-3	0	0	4.50e-3	0	0
8	3	210	9.26e-3	0	0	10.26e-3	0	0	9.13e-3	0	0	4.50e-3	0	0
9	3	240	8.38e-3	0	0	9.259e-3	0	0	1.01e-2	0	0	4.50e-3	0	0
1	4	3	15.26e-3	0	0	17.21e-3	0	0	2.75e-4	0	0	7.92e-3	0	0
2	4	30	13.72e-3	0	0	15.62e-2	0	0	1.62e-3	0	0	7.92e-3	0	0
3	4	60	12.33e-3	0	0	14.04e-3	0	0	3.07e-3	0	0	7.92e-3	0	0
4	4	90	10.96e-3	0	0	12.63e-3	0	0	4.37e-3	0	0	7.92e-3	0	0
5	4	120	9.90e-3	0	0	11.16e-3	0	0	5.60e-3	0	0	7.92e-3	0	0
6	4	150	8.72e-3	0	0	9.986e-3	0	0	6.73e-3	0	0	7.92e-3	0	0
7	4	180	7.90e-3	0	0	8.871e-3	0	0	7.74e-3	0	0	7.92e-3	0	0
8	4	210	7.04e-3	0	0	7.881e-3	0	0	8.68e-3	0	0	7.92e-3	0	0
9	4	240	6.34e-3	0	0	6.947e-3	0	0	9.54e-3	0	0	7.92e-3	0	0

$^{HO}(CG)_2^{p} + {}^{n}CG^{pte} + {}^{HO}(CG)_3{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES:

num	exp	time [min]	2t_a	2t_b	2t_c	t2	t4	t6	t4t	t6t	t8t	ho4oh	ho6oh	ho8oh
1	1	4	0	16.47e-3	0	0	16.79e-3	0	0	0.51e-3	0	0	0	0
2	1	30	0	14.57e-3	0	0	15.35e-3	0	0	2.06e-3	0	0	0	0
3	1	60	0	13.18e-3	0	0	14.01e-3	0	0	3.35e-3	0	0	0	0
4	1	150	0	9.58e-3	0	0	10.94e-3	0	0	6.48e-3	0	0	0	0
5	1	240	0	6.77e-3	0	0	8.30e-3	0	0	9.06e-3	0	0	0	0
1	2	5	0	17.32e-3	0	0	17.32e-3	0	0	0.81e-3	0	0	1.94e-3	0
2	2	33	0	15.17e-3	0	0	15.39e-3	0	0	2.63e-3	0	0	1.94e-3	0
3	2	60	0	13.22e-3	0	0	13.91e-3	0	0	4.18e-3	0	0	1.94e-3	0
4	2	150	0	9.19e-3	0	0	10.35e-3	0	0	7.72e-3	0	0	1.94e-3	0
5	2	240	0	5.89e-3	0	0	7.30e-3	0	0	10.70e-3	0	0	1.94e-3	0
1	3	4	0	17.30e-3	0	0	17.20e-3	0	0	0.91e-3	0	0	3.88e-3	0
2	3	30	0	15.01e-3	0	0	15.11e-3	0	0	2.76e-3	0	0	3.88e-3	0
3	3	60	0	13.50e-3	0	0	13.63e-3	0	0	4.14e-3	0	0	3.88e-3	0
4	3	150	0	9.25e-3	0	0	9.98e-3	0	0	7.77e-3	0	0	3.88e-3	0
5	3	240	0	5.89e-3	0	0	6.86e-3	0	0	10.83e-3	0	0	3.88e-3	0
1	4	5	0	16.57e-3	0	0	16.92e-3	0	0	0.95e-3	0	0	7.39e-3	0
2	4	30	0	14.57e-3	0	0	14.95e-3	0	0	2.57e-3	0	0	7.39e-3	0
3	4	61	0	12.48e-3	0	0	13.30e-3	0	0	4.18e-3	0	0	7.39e-3	0
4	4	150	0	8.09e-3	0	0	9.11e-3	0	0	8.18e-3	0	0	7.39e-3	0
5	4	240	0	5.25e-3	0	0	6.58e-3	0	0	10.67e-3	0	0	7.39e-3	0

$^{HO}(CG)_3^{p} + {}^{n}CG^{pte} + {}^{HO}(CG)_3{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES:

num	exp	time [min]	2t_a	2t_b	2t_c	t2	t4	t6	t4t	t6t	t8t	ho4oh	ho6oh	ho8oh
1	1	4	0	0	17.84e-3	0	0	15.44e-3	0	0	0.99e-3	0	0	0
2	1	60	0	0	13.54e-3	0	0	12.44e-3	0	0	4.18e-3	0	0	0
3	1	150	0	0	9.59e-3	0	0	9.44e-3	0	0	7.27e-3	0	0	0
4	1	240	0	0	6.80e-3	0	0	7.36e-3	0	0	9.43e-3	0	0	0
1	2	4	0	0	16.60e-3	0	0	16.73e-3	0	0	0.66e-3	0	0	1.97e-3
2	2	60	0	0	12.99e-3	0	0	13.75e-3	0	0	3.68e-3	0	0	1.97e-3
3	2	150	0	0	9.33e-3	0	0	10.96e-3	0	0	6.42e-3	0	0	1.97e-3
4	2	246	0	0	6.50e-3	0	0	8.76e-3	0	0	8.65e-3	0	0	1.97e-3
1	3	4	0	0	18.41e-3	0	0	18.97e-3	0	0	0.54e-3	0	0	3.97e-3

2	3	60	0	0	14.60e-3	0	0	16.14e-3	0	0	3.39e-3	0	0	3.97e-3
3	3	105	0	0	12.85e-3	0	0	14.53e-3	0	0	4.98e-3	0	0	3.97e-3
4	3	152	0	0	10.43e-3	0	0	12.68e-3	0	0	6.89e-3	0	0	3.97e-3
5	3	240	0	0	7.43e-3	0	0	10.37e-3	0	0	9.27e-3	0	0	3.97e-3
1	4	4	0	0	16.85e-3	0	0	17.08e-3	0	0	0.71e-3	0	0	6.86e-3
2	4	60	0	0	13.36e-3	0	0	14.29e-3	0	0	3.50e-3	0	0	6.86e-3
3	4	105	0	0	11.14e-3	0	0	12.55e-3	0	0	5.30e-3	0	0	6.86e-3
4	4	151	0	0	9.67e-3	0	0	11.17e-3	0	0	6.64e-3	0	0	6.86e-3
5	4	240	0	0	6.67e-3	0	0	8.93e-3	0	0	8.93e-3	0	0	6.86e-3

3.2.2 Kinetikmessdaten des offenen $^{n}CG^{p}$-Systems

Bei der Observable txt handelt es sich hier um $^{HO}(CG)_{x}{}^{OH}$-Templat, nicht um Produkt.

$^{n}CG^{p}$ + 0% Templat, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES:

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	16.970e-3	0.355e-3	0.014e-3	0.000e-3	0.000e-3	17.40e-3	0	0	0	0
2	1	20	15.449e-3	0.976e-3	0.107e-3	0.000e-3	0.000e-3	0	0	0	0	0
3	1	40	14.033e-3	1.504e-3	0.200e-3	0.020e-3	0.000e-3	0	0	0	0	0
4	1	60	12.843e-3	1.782e-3	0.331e-3	0.066e-3	0.011e-3	0	0	0	0	0

$^{n}CG^{p}$ + 10% $^{HO}(CG)_{2}{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES:

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	18.172e-3	0.333e-3	0.011e-3	0.000e-3	0.000e-3	18.40e-3	0	2.09e-3	0	0
2	1	20	16.442e-3	1.088e-3	0.071e-3	0.000e-3	0.000e-3	0	0	2.09e-3	0	0
3	1	40	14.725e-3	1.473e-3	0.199e-3	0.026e-3	0.000e-3	0	0	2.09e-3	0	0
4	1	60	13.570e-3	1.895e-3	0.340e-3	0.070e-3	0.016e-3	0	0	2.09e-3	0	0

$^{n}CG^{p}$ + 20% $^{HO}(CG)_{2}{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES:

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	18.902e-3	0.387e-3	0.018e-3	0.000e-3	0.000e-3	19.20e-3	0	4.31e-3	0	0
2	1	20	18.902e-3	1.105e-3	0.064e-3	0.000e-3	0.000e-3	0	0	4.31e-3	0	0
3	1	40	15.739e-3	1.608e-3	0.166e-3	0.017e-3	0.000e-3	0	0	4.31e-3	0	0
4	1	60	14.091e-3	1.825e-3	0.300e-3	0.046e-3	0.000e-3	0	0	4.31e-3	0	0

$^{n}CG^{p}$ + 40% $^{HO}(CG)_{2}{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES:

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	21.249e-3	0.399e-3	0.000e-3	0.000e-3	0.000e-3	21.50e-3	0	8.85e-3	0	0
2	1	20	18.850e-3	1.247e-3	0.064e-3	0.000e-3	0.000e-3	0	0	8.85e-3	0	0
3	1	40	18.182e-3	1.654e-3	0.165e-3	0.019e-3	0.000e-3	0	0	8.85e-3	0	0
4	1	60	15.747e-3	2.204e-3	0.291e-3	0.047e-3	0.000e-3	0	0	8.85e-3	0	0

$^{n}CG^{p}$ + 10% $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES:

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	17.580e-3	0.393e-3	0.017e-3	0.000e-3	0.000e-3	18.10e-3	0	0	1.97e-3	0
2	1	20	15.361e-3	1.116e-3	0.130e-3	0.015e-3	0.000e-3	0	0	0	1.97e-3	0
3	1	40	13.805e-3	1.579e-3	0.295e-3	0.054e-3	0.006e-3	0	0	0	1.97e-3	0
4	1	60	12.152e-3	1.849e-3	0.445e-3	0.102e-3	0.033e-3	0	0	0	1.97e-3	0

$^{n}CG^{p}$ + 20% $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	18.129e-3	0.395e-3	0.009e-3	0.000e-3	0.000e-3	18.60e-3	0	0	4.17e-3	0
2	1	20	16.338e-3	1.023e-3	0.070e-3	0.011e-3	0.000e-3	0	0	0	4.17e-3	0
3	1	40	14.823e-3	1.482e-3	0.192e-3	0.028e-3	0.004e-3	0	0	0	4.17e-3	0
4	1	60	13.234e-3	1.766e-3	0.344e-3	0.070e-3	0.011e-3	0	0	0	4.17e-3	0

$^{n}CG^{p}$ + 40% $^{HO}(CG)_3{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	16.545e-3	0.334e-3	0.007e-3	0.000e-3	0.000e-3	16.85e-3	0	0	8.07e-3	0
2	1	20	14.593e-3	0.931e-3	0.063e-3	0.000e-3	0.000e-3	0	0	0	8.07e-3	0
3	1	40	13.049e-3	1.358e-3	0.170e-3	0.023e-3	0.000e-3	0	0	0	8.07e-3	0
4	1	60	11.721e-3	1.643e-3	0.308e-3	0.059e-3	0.010e-3	0	0	0	8.07e-3	0

Der HPLC-Peak des 8mers $(^{n}CG^{p})_4$ fällt mit dem des 8mer-Templats $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$ zusammen, so dass die Aufführung beider Spezies unter der Observable "oktamer" erfolgen muss.

$^{n}CG^{p}$ + 10% $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	17.077e-3	0.362e-3	0.019e-3	1.645e-3	0.000e-3	17.40e-3	0	0	0	0
2	1	20	15.350e-3	0.981e-3	0.120e-3	1.689e-3	0.000e-3	0	0	0	0	0
3	1	40	13.454e-3	1.425e-3	0.273e-3	1.816e-3	0.006e-3	0	0	0	0	0
4	1	60	12.157e-3	1.700e-3	0.400e-3	1.888e-3	0.023e-3	0	0	0	0	0

$^{n}CG^{p}$ + 20% $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	17.686e-3	0.396e-3	0.000e-3	3.536e-3	0.000e-3	18.00e-3	0	0	0	0
2	1	40	14.012e-3	1.545e-3	0.244e-3	3.685e-3	0.007e-3	0	0	0	0	0
3	1	50	13.107e-3	1.688e-3	0.327e-3	3.765e-3	0.013e-3	0	0	0	0	0
4	1	60	12.216e-3	1.849e-3	0.418e-3	3.825e-3	0.021e-3	0	0	0	0	0

$^{n}CG^{p}$ + 40% $^{HO}(CG)_4{}^{OH}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	18.269e-3	0.547e-3	0.032e-3	7.458e-3	0.000e-3	18.57e-3	0	0	0	0
2	1	20	16.064e-3	1.196e-3	0.127e-3	7.609e-3	0.000e-3	0	0	0	0	0
3	1	40	14.472e-3	1.655e-3	0.266e-3	7.664e-3	0.006e-3	0	0	0	0	0
4	1	60	12.806e-3	1.927e-3	0.399e-3	7.821e-3	0.021e-3	0	0	0	0	0

$^{n}CG^{p}$ + 7.5% $^{n}(CG)_2{}^{p}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	15.762e-3	1.620e-3	0.131e-3	0.010e-3	0.000e-3	16.30e-3	1.50e-3	0	0	0
2	1	20	13.668e-3	2.125e-3	0.354e-3	0.088e-3	0.022e-3	0	0	0	0	0
3	1	40	11.909e-3	2.381e-3	0.543e-3	0.179e-3	0.081e-3	0	0	0	0	0
4	1	60	9.876e-3	2.300e-3	0.774e-3	0.370e-3	0.220e-3	0	0	0	0	0

$^{n}CG^{p}$ + 15% $^{n}(CG)_2{}^{p}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	16.799e-3	2.973e-3	0.245e-3	0.058e-3	0.007e-3	17.40e-3	3.00e-3	0	0	0
2	1	20	14.598e-3	3.194e-3	0.574e-3	0.183e-3	0.058e-3	0	0	0	0	0
3	1	40	12.298e-3	3.212e-3	0.906e-3	0.342e-3	0.177e-3	0	0	0	0	0
4	1	60	10.657e-3	3.117e-3	1.024e-3	0.495e-3	0.346e-3	0	0	0	0	0

$^{n}CG^{p}$ + 30% $^{n}(CG)_2{}^{p}$, 2°C, 0.4 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	dimer	tetramer	hexamer	oktamer	xmer	di_init	te_init	t4t	t6t	t8t
1	1	4	17.240e-3	6.031e-3	0.274e-3	0.081e-3	0.009e-3	17.70e-3	6.20e-3	0	0	0
2	1	20	15.714e-3	5.743e-3	0.714e-3	0.227e-3	0.048e-3	0	0	0	0	0
3	1	40	14.153e-3	5.532e-3	0.993e-3	0.399e-3	0.132e-3	0	0	0	0	0
4	1	60	12.795e-3	5.147e-3	1.227e-3	0.567e-3	0.276e-3	0	0	0	0	0

3.2.3 Messdaten der Oligomerisierung der vier Dimere bei 50 mM

$^{n}TG^{p}$, 50 mM, 2°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_2$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_3$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_4$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_5$ [mM]
1	1	3	48.20	0.59	0.03	0.00	0.00
2	1	40	45.39	1.47	0.06	0.00	0.00
3	1	100	43.10	2.56	0.11	0.00	0.00
4	1	160	40.29	3.45	0.26	0.00	0.00
5	1	220	37.50	3.95	0.34	0.00	0.00
6	1	300	35.68	4.58	0.55	0.00	0.00
7	1	400	33.61	5.23	0.74	0.00	0.00
8	1	490	31.35	5.68	0.97	0.00	0.00

$^{n}TG^{p}$, 50 mM, 15°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_2$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_3$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_4$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_5$ [mM]
1	1	3	47.09	0.34	0.02	0.00	0.00
2	1	40	35.12	2.58	0.30	0.00	0.00
3	1	80	31.79	3.82	0.57	0.00	0.00
4	1	120	29.70	4.37	0.82	0.19	0.00
5	1	160	27.19	5.05	1.14	0.28	0.00
6	1	220	22.17	5.04	1.42	0.37	0.15
7	1	280	19.06	5.09	1.69	0.47	0.23
8	1	360	16.16	5.01	2.04	0.62	0.33

$^{n}TG^{p}$, 50 mM, 30°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_2$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_3$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_4$ [mM]	$(^{n}TG^{p})_5$ [mM]
1	1	3	47.73	0.55	0.03	0.00	0.00
2	1	40	28.44	4.39	0.93	0.14	0.06
3	1	80	18.21	4.46	1.54	0.37	0.13
4	1	120	13.71	4.02	1.79	0.55	0.23
5	1	160	10.35	3.52	1.84	0.72	0.29
6	1	200	8.61	3.22	1.91	0.68	0.33
7	1	260	7.16	2.80	1.77	0.71	0.33

$^{n}CA^{p}$, 50 mM, 2°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}CA^{p}$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_2$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_3$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_4$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_5$ [mM]
1	1	3	51.55	0.27	0.00	0.00	0.00
2	1	40	47.26	0.97	0.00	0.00	0.00
3	1	100	45.38	1.63	0.10	0.00	0.00
4	1	160	43.18	2.35	0.17	0.00	0.00
5	1	220	41.40	2.79	0.22	0.00	0.00
6	1	280	40.23	3.19	0.30	0.00	0.00
7	1	340	37.92	3.63	0.37	0.00	0.00
8	1	420	35.37	4.01	0.53	0.04	0.00

$^{n}CA^{p}$, 50 mM, 15°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}CA^{p}$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_2$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_3$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_4$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_5$ [mM]
1	1	3	50.86	0.35	0.05	0.00	0.00
2	1	80	36.61	3.28	0.31	0.09	0.00
3	1	120	33.01	3.87	0.56	0.16	0.00
4	1	160	29.05	4.04	0.75	0.21	0.00
5	1	220	25.63	4.35	0.97	0.33	0.00
6	1	300	22.14	4.43	1.17	0.49	0.00
7	1	410	19.00	4.44	1.41	0.78	0.00

$^{n}CA^{p}$, 50 mM, 30°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}CA^{p}$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_2$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_3$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_4$ [mM]	$(^{n}CA^{p})_5$ [mM]
1	1	3	52.42	0.29	0.00	0.00	0.00
2	1	45	34.47	3.19	0.38	0.10	0.00
3	1	80	28.19	4.07	0.71	0.24	0.00
4	1	160	19.06	3.98	1.08	0.49	0.00
5	1	220	15.98	3.81	1.21	0.66	0.00
6	1	280	13.89	3.64	1.25	0.79	0.00
7	1	360	12.45	3.46	1.31	0.85	0.00

$^{n}TA^{p}$, 50 mM, 2°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}TA^{p}$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_2$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_3$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_4$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_5$ [mM]
1	1	3	52.05	0.24	0.00	0.00	0.00
2	1	60	46.97	2.01	0.04	0.00	0.00
3	1	120	42.28	2.91	0.14	0.01	0.00
4	1	180	38.78	3.77	0.34	0.02	0.00
5	1	240	35.54	4.35	0.50	0.05	0.01
6	1	360	30.99	4.91	1.01	0.20	0.08

$^{n}TA^{p}$, 50 mM, 15°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}TA^{p}$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_2$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_3$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_4$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_5$ [mM]
1	1	4	47.22	0.66	0.00	0.00	0.00
2	1	50	40.65	3.16	0.23	0.11	0.02
3	1	150	28.46	4.59	0.87	0.25	0.08
4	1	250	21.49	4.83	1.28	0.41	0.19
5	1	350	17.31	4.65	1.53	0.59	0.30
6	1	450	14.08	4.31	1.65	0.75	0.43

$^{n}TA^{p}$, 50 mM, 30°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}TA^{p}$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_2$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_3$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_4$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_5$ [mM]
1	1	3	51.38	0.39	0.00	0.00	0.00
2	1	20	40.41	3.03	0.17	0.00	0.00
3	1	40	30.05	4.12	0.68	0.01	0.03
4	1	60	24.19	4.36	0.97	0.22	0.07
5	1	100	16.41	4.16	1.39	0.46	0.21
6	1	140	12.75	3.66	1.44	0.53	0.30
7	1	180	10.50	3.10	1.44	0.57	0.38
8	1	240	8.12	2.66	1.39	0.60	0.46
9	1	300	6.85	2.48	1.35	0.58	0.48

$^{n}TA^{p}$, 50 mM + 8.3 mM (6:1) $^{HO}(TA)_6^{OH}$, 2°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}TA^{p}$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_2$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_3$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_4$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_5$ [mM]
1	1	3	50.717	0.580	0.000	0.000	0.00
2	1	40	46.802	1.878	0.159	0.000	0.00
3	1	120	42.902	2.882	0.243	0.000	0.00
4	1	240	37.025	4.220	0.713	0.091	0.00

$^{n}TA^{p}$, 50 mM + 8.3 mM (6:1) $^{HO}(TA)_6^{OH}$, 30°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}TA^{p}$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_2$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_3$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_4$ [mM]	$(^{n}TA^{p})_5$ [mM]
1	1	4	52.487	0.678	0.000	0.000	0.000
2	1	40	35.057	4.241	0.701	0.107	0.000
3	1	240	12.488	3.351	1.469	0.534	0.257
4	1	420	9.083	2.835	1.556	0.754	0.357

$^{n}CG^{p}$, 50 mM, 2°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}CG^{p}$ [mM]	$(^{n}CG^{p})_2$ [mM]	$(^{n}CG^{p})_3$ [mM]
1	1	3	48.44	0.90	0.00
2	1	30	43.14	2.70	0.11
3	1	60	38.28	3.65	0.37
4	1	90	34.22	4.40	0.61
5	1	120	33.06	4.82	0.78
6	1	160	30.24	5.13	1.02
7	1	210	27.23	5.52	1.36
8	1	250	23.25	5.76	1.67
9	1	310	21.18	5.80	2.03

$^{n}CG^{p}$, 50 mM, 15°C, bzw. 30°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

num	exp	time [min]	$^{n}CG^{p}$ [mM]	$(^{n}CG^{p})_2$ [mM]	$(^{n}CG^{p})_3$ [mM]
1	1	3	48.71	1.22	0.05
2	1	20	38.00	3.48	0.50
3	1	40	30.41	4.38	0.98
4	1	60	25.07	4.79	1.48
5	1	90	18.96	4.40	1.78
6	1	120	14.19	3.61	1.71
7	1	150	9.91	2.66	1.49
8	1	190	7.45	1.95	1.24

num	exp	time [min]	$^{n}CG^{p}$ [mM]	$(^{n}CG^{p})_2$ [mM]	$(^{n}CG^{p})_3$ [mM]
1	1	3	48.51	1.13	0.06
2	1	12	36.99	3.12	0.66
3	1	30	22.27	3.11	1.43
4	1	50	13.08	1.84	0.95
5	1	70	8.72	0.80	0.52
6	1	90	5.36	0.41	0.29
7	1	110	2.85	0.22	0.00
8	1	140	1.26	0.11	0.00

3.2.4 Messdaten des Systems $^{n}TG^{p}$ + Me^{+} bzw. Me^{2+}

$^{n}TG^{p}$, 2 mM, 30°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES oder H_2O ohne Puffer mit folgenden Kationen:

+ $MgCl_2$ / HEPES

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	2.02	0.04
40	1.93	0.06
140	1.54	0.16
310	0.92	0.27

+ $MnCl_2$ / HEPES

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	2.03	0.02
40	1.84	0.03
140	1.62	0.08
310	1.07	0.17

+ $CaCl_2$ / HEPES

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.92	0.08
40	1.81	0.15
140	1.31	0.39

+ $CoCl_2$ / HEPES

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.66	0.04
40	1.30	0.06
140	1.26	0.14
260	3.00	0.21

+ LiCl / HEPES

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.85	0.18
40	1.57	0.35
140	0.81	0.82
250	0.44	1.06

+ KCl / HEPES

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.79	0.20
40	1.47	0.37
140	0.78	0.85
250	0.40	1.10

+ RbCl / HEPES

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.33	0.31
40	1.14	0.46
140	0.57	0.86
250	0.32	1.13

+ CsCl / HEPES

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.24	0.34
40	1.10	0.47
140	0.59	0.89
250	0.31	1.06

ohne / HEPES

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.90	0.22
40	1.54	0.40
330	0.21	1.25

+ $MgCl_2$ / H_2O

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.83	0.08
40	1.63	0.11
140	1.18	0.17

+ $MnCl_2$ / H_2O

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.72	0.08
40	1.54	0.08
140	1.40	0.10
250	1.13	0.14

+ $CaCl_2$ / H_2O

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.83	0.11
40	1.76	0.22
140	1.21	0.62
260	0.70	0.89

+ $CoCl_2$ / H_2O

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	0.78	0.05
140	0.71	0.17
260	0.60	0.23

+ LiCl / H_2O

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.84	0.26
40	1.44	0.46
130	0.67	1.03
250	0.24	1.35

+ KCl / H_2O

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.60	0.26
40	1.43	0.47
130	0.75	0.89
250	0.34	1.06

+ $RbCl / H_2O$

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.63	0.29
40	1.34	0.45
130	0.68	0.88
250	0.37	1.25

+ $CsCl / H_2O$

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
20	1.61	0.31
40	1.19	0.43
130	0.71	0.90
250	0.39	1.18

3.2.5 Cyclisierungskinetiken der Dimere bei 1 und 2 mM

$^{n}CG^{p}$ bei 30°C, $^{n}TG^{p}$ und $^{n}TA^{p}$ bei 20°C, 1 mM, 20°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

time [min]	$^{n}CG^{p}$ [mM]	$^{n}CG^{p}$-Cyclus
10	0.99	0.04
20	0.95	0.08
30	0.92	0.12
40	0.89	0.15
50	0.85	0.18
60	0.82	0.21
70	0.78	0.25
80	0.75	0.28
90	0.72	0.31

time [min]	$^{n}TA^{p}$ [mM]	$^{n}TA^{p}$-Cyclus
10	0.81	0.05
20	0.78	0.06
30	0.78	0.07
40	0.78	0.08
50	0.73	0.10
60	0.73	0.12
70	0.74	0.13
80	0.74	0.14

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
10	0.94	0.04
60	0.83	0.14
180	0.57	0.29
360	0.35	0.45

$^{n}CG^{p}$ bei 30°C, $^{n}TG^{p}$ und $^{n}TA^{p}$ bei 20°C, 2 mM, 20°C, 0.2 M EDC in 0.1 M HEPES

time [min]	$^{n}CG^{p}$ [mM]	$^{n}CG^{p}$-Cyclus
10	1.95	0.08
20	1.89	0.14
30	1.76	0.24
40	1.72	0.28
50	1.64	0.34
60	1.56	0.41
70	1.49	0.47
80	1.42	0.52
90	1.36	0.58

time [min]	$^{n}TA^{p}$ [mM]	$^{n}TA^{p}$-Cyclus
10	1.58	0.08
20	1.55	0.12
30	1.55	0.14
40	1.54	0.16
50	1.49	0.19
60	1.46	0.22
70	1.47	0.24
80	1.42	0.27

time [min]	$^{n}TG^{p}$ [mM]	$^{n}TG^{p}$-Cyclus
10	1.80	0.09
60	1.63	0.27
180	1.13	0.58
360	0.69	0.86

Anhang

1. Verwendete Abkürzungen und Akronyme

A	Adenosin
aa	analysiert als
Ac	Acetyl
AcN	Acetonitril
aq.	wässrig
Ar	Aryl
ATT	6-Aza-2-thiothymin
ATTG	6-Aza-2-thiothymin + Glycerin
B	Nucleobase (in Nucleotidsequenzen)
B'	geschützte Nucleobase
Bz	Benzoyl
C	Cytidin
CPG	Controlled Pore Glass
d	2'-Deoxy, Dublett
DC	Dünnschichtchromatografie
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
dest.	destilliert
DMT	Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid
eq.	Äquivalent
ESI	Electrospray-Ionisation
G	Guanosin
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	High-Pressure/Performance-Liquid-Chromatography
IE	Ion-Exchange
m	Multiplett
m_c	korreliertes Multiplett
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation - Time Of Flight
Me	Methyl
M^+, M^{2+}	mono- bzw. divalente Metallkationen
MeIm	1-Methylimidazol

MMT	Monomethoxytriphenylmethyl
MP	Monophosphat
MS	Massenspektrometrie
M_r	relative Molekularmasse
n	NH_2-, Amino-
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NN	Nearest-Neighbour
OD	Optische Dichte
o-ClPh	*ortho*-Chlorphenyl
p	PO_3^--, Phospho-
Ph	Phenyl
PPh_3	Triphenylphosphin
Pu	Purin
Py, Pyr	Pyrimidin
q	Quartett
R	Purin
RMS	Root Mean Square
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Reversed-Phase
RT	Raumtemperatur
s	singulett
Sdp.	Siedepunkt
sept	Septett
t	Triplett
T	Thymidin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
T_m	Schmelztemperatur
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TOF	Time Of Flight
UV	Ultraviolett
Y	Pyrimidin

2. Abstract

Für die Untersuchung der Oligomerisierung und der replikativen Eigenschaften eines offenen, beidseitig 5'-3'-ligationsfähigen Systems wurden die 5'-Amino-3'-Phosphat-Derivate $^{H_2N}TA^{PO_4^{2-}}$, $^{H_2N}TG^{PO_4^{2-}}$, $^{H_2N}CA^{PO_4^{2-}}$, $^{H_2N}CG^{PO_4^{2-}}$ der vier möglichen Pyrimidin-Purin-deoxy-nucleotiddimere generiert. Die chromatografisch verfolgte Oligomerisierung mit EDC als Aktivator gelang bei Eduktkonzentrationen von 50 mM und Reaktionstemperaturen zwischen 2 und 30 °C. Niedrige Eduktkonzentrationen führten bevorzugt zu den cyclisierten Dimeren. Die Reaktivitätsreihenfolge war mit CG >> (TA ≈ TG) > CA für unkatalysierte Ligations-reaktionen ungewöhnlich, so dass zusätzliche Reaktionskanäle für die prinzipiell autokatalysefähigen selbstkomplementären Systeme CG und TA postuliert wurden. Aufgrund der effektivsten Oligomerisierung und ausbleibender Cyclisierung bei 2 °C und 20 mM Eduktkonzentration wurde das CG-System für genauere Untersuchungen ausgewählt. Da die Zugabe von tetra-, hexa- oder octameren Templatbausteinen $^{HO}(CG)_x^{OH}$ (x=2-4) weder bei einseitig geschlossenen Einzelreaktionssystemen der Form $^{Y}(CG)_x^{PO_4^{2-}} + {}^{H_2N}CG^{Y}$ (x=1-3, y=Schutzgruppe oder OH), noch beim offenen $^{H_2N}CG^{PO_4^{2-}}$-System eine Reaktions-beschleunigung zur Folge hatte, wurde Autokatalyse über termolekulare Komplexe ausgeschlossen. Zur Erklärung der beobachteten ungewöhnlich hohen Reaktivität des CG-Systems wurde eine umfassende Theorie formuliert, die die Beschleunigung der Ligationsreaktionen auf hochmolekulare Aggregate verschobener Oligomerduplexe, sogenannte Slidomere, mit alternierender Pyrimidin-Purin-Sequenz zurückführt. Die Slidomertheorie diskutiert Bildung und Zerfall von Slidomeren, den Katalysemechanismus während der Ligation im Komplex, sowie Aktivierung und Reaktivierung der beteiligten Oligomere. Durch thermodynamische Berechnungen über ein modifiziertes Nearest-Neighbour-Modell wurde die Slidomertheorie zusätzlich gestützt. Die Zugabe des offenen Tetramers $^{H_2N}(CG)_2^{PO_4^{2-}}$ zum CG-System erlaubte unter Aufstellung eines kinetischen Slidomermodells und Auswertung der Messdaten mit dem Programm *SimFit* die experimentelle Bestätigung und Quantifizierung der zusätzlichen slidomerbasierenden Reaktionskanäle. Das für enzymfreie Kondensationen hohe Oligomerisierungspotenzial des CG-Systems, das unter den Reaktionsbedingungen innerhalb von 200 min Oligomere mit einer Kettenlänge von über 80 Nucleotiden generierte, deutete auf eine geringe Produktinhibition während der slidomerbeschleunigten Reaktion hin, die zu deutlich längeren Oligomeren führte, als bislang enzymfrei in Lösung möglich waren. Durch seine Fähigkeit im Rahmen des Slidomereffektes kollektiv autokatalytisch zu wirken, kann das oligo-merisierende CG-System als einfaches "autocatalytic set" nach *Kauffman* angesehen werden.

3. Literaturverzeichnis

[1] G. Czihak, H. Langer, H. Ziegler, *Biologie* **1983**, 3. Aufl., S. 803 f., Springer, Berlin.

[2] M. R. Walter in *Earth's Earliest Biosphere* (Ed. Schopf) **1983**, S. 187, Princeton University Press;
S. J. Mojzsis, G. Arrhenius, K. D. McKeegan, T. M. Harrison, A. P. Nutman, C. R. L. Friend, *Nature* **1996**, *384*, 55.

[3] A. I. Oparin, *The Origin Of Life* **1924**, Rabochii, Moskau.

[4] M. Eigen, *Naturwissenschaften* **1971**, *58*, 465;
M. Eigen, P. Schuster, *The Hypercycle. A Principle of Natural Self-Organization*, **1979**, Springer, Berlin;
M. Eigen, *Stufen zum Leben* **1992**, 2. Aufl., Pieper, München.

[5] J. B. S. Haldane, *Rationalist* **1927**, 198.

[6] S. L. Miller, *Science* **1953**, *117*, 528.

[7] A. Butlerow, *Comtes rendus de l'Académie de Science Paris* **1861**, *53*, 145.

[8] N. W. Gabel, C. Ponnamperuma, *Nature* **1967**, *216*, 453.

[9] J. Oró, *Nature* **1961**, *191*, 1193.

[10] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol*. **1972**, *67*, 25.

[11] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Science* **1971**, *171*, 490.

[12] G. Schlesinger, S. L. Miller, *J. Mol. Evol*. **1983**, *19*, 376; ibid. 383;
S. L. Miller, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **1987**, *52*, 17.

[13] H. Hartman, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1998**, *28*, 515.

[14] G. Wächtershäuser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1990**, *87*, 200.

[15] J. Oró, *Nature* **1961**, *190*, 389;
C. F. Chyba, P. J. Thomas, L. Brookshaw, C. Sagan, *Science* **1990**, *249*, 366.

[16] H. Kuhn, J. Waser, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 495;
S. L. Miller, L. E. Orgel, *The Origins Of Life On Earth* **1974**, Prentice Hall, Engelwood Cliffs, New York.

[17] T. Cech, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 745;
S. Altman, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 735.

[18] G. F. Joyce, *Nature* **1989**, *338*, 217;
R. F. Geseland, J. F. Atkins, *The RNA World* **1993**, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[19] L. E. Orgel, *J. Theor. Biol.* **1986**, *123*, 127;
M. Eigen, *Stufen zum Leben* **1992**, 2. Aufl., Pieper, München.

[20] D. R. Mills, R. L. Peterson, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1967**, *58*, 217;
R. Levisohn, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1968**, *60*, 866.

[21] T. R. Cech, A. J. Zaug, P. J. Grabowski, *Cell* **1981**, *27*, 487;
A. J. Zaug, T. R. Cech, *Science* **1986**, *231*, 470.

[22] T. R. Cech, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 745;
T. R. Cech, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng*. **1990**, *29*, 716;
C. Carola, F. Eckstein, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 274;
B. Zhang, T. R. Cech, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 539.

[23] B. Cuenoud, J. W. Szostak, *Nature* **1995**, *375*, 611;
J. Burmeister, G. von Kiedrowski, A. D. Ellington, *Angew. Chem*. **1997**, *109*, 1379;
S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4262;
N. Sugimoto, Y. Okumoto, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *42*, 281.

[24] N. Paul, G. F. Joyce, *PNAS* **2002**, *99*, 12733.

[25] S. A. Benner, A. D. Ellington, A. Tauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7054;
S. A. Benner, A. D. Ellington, *Bioorg. Chem. Front.* **1990**, *1*, 1.

[26] G. von Kiedrowski, J. Helbing, B. Wlotzka, S. Jordan, M. Matzen, T. Achilles, D. Sievers, A. Terfort, B. C. Kahrs, *Nachr. Chem. Techn. Lab.* **1992**, *40*, 578.
[27] G. Schramm, H. Grötsch, W. Pollmann, *Angew. Chem*. **1962**, *74*, 53.
[28] R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry* **1966**, *5*, 2722.
[29] L. E. Orgel, R. Lohrmann, *Acc. Chem. Res.* **1974**, *7*, 368.
[30] H. L. Sleeper, R. Lohrmann, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol*. **1979**, *13*, 203;
R. Lohrmann, P.K. Bridson, L.E. Orgel, *Science* **1980**, *208*, 1464.
[31] T. Inoue, L. E. Orgel, *Science* **1983**, *219*, 859.
[32] T. Inoue, G. F. Joyce, K. Grzeskowiak, L. E. Orgel, J. M. Brown, C. B. Reese, *J. Mol. Biol.* **1984**, *178*, 669.
[33] G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 932; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng*. **1986**, *25*, 932.
[34] G. von Kiedrowski, *40 Jahre Fonds der Chemischen Industrie 1950-1990* **1990**, VCI, Frankfurt.
[35] W. S. Zielinski, L.E. Orgel, *Nature* **1987**, *327*, 346.
[36] a) G. von Kiedrowski, B. Wlotzka, J. Helbing, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1259; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1989**, *28*, 1235;
b) G. von Kiedrowski, B. Wlotzka, J. Helbing, M. Matzen, S. Jordan, *Angew. Chem*. **1991**, *103*, 456; ibid. 1066; *Angew. Chem. Int Ed. Eng.* **1991**, *30*, 423.
[37] T. Achilles, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1993,** *105*, 1225.
[38] B. Wlotzka, J. S. McCaskill, *Chem. & Biol.* **1997**, *4*, 25.
[39] E. Szathmáry, I. Gladkih, *J. theor. Biol.* **1989**, *138*, 55;
E. Szathmáry, *Trends Ecol. Evol.* **1991**, *6*, 366;
J. M. Smith, E. Szatmáry, *Nature*, **1995**, *374*, 227.
[40] D. Sievers, G. von Kiedrowski, *Nature* **1994**, *369*, 221;
D. Sievers, G. von Kiedrowski, *Chem. Eur. J.* **1998**, 629.
[41] T. Li, K. C. Nicolaou, *Nature* **1994**, *369*, 218.
[42] J. P. Ferris, A. R. Hill Jr., R. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1996**, *381*, 59.
[43] G. Wächtershäuser, *Microbiol. Rev*. **1988**, *52*, 452;
G. Wächtershäuser, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1992**, *58*, 85.
[44] H. J. Kuhn, J. Waser, *Angew. Chem*. **1981**, *93*, 495.
[45] L. D. Bernal, *The physical basis of life* **1951**, Routledge & Kegan Paul, London.
[46] G. Cairns-Smith, *Genetic takeover and the mineral origins of life* **1982**, Cambridge University Press, New York.
[47] E. Szathmáry, J. M. Smith, *The major transitions in evolution* **1995**, Freeman, Oxford.
[48] G. von Kiedrowski, *Nature* **1996**, *381*, 20.
[49] A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature* **1998**, *396*, 245.
[50] D. Albagli, R. van Atta, P. Cheng, B. Huan, M. L. Wood, *J. Am. Chem. Soc*. **1999**, *121*, 6954.
[51] M. Scheffler, A. Dorenbeck, S. Jordan, M. Wüstefeld, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3311.
[52] L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Rein, M. Schweitzer, N. Windhab, G. von Kiedrowski, *Nature* **2002**, *420*, 286.
[53] H. Schöneborn, J. Bülle, G. von Kiedrowski, *Chembiochem.* **2001**, *12*, 922.
[54] T. Tjivikua, P. Ballester, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1249.
[55] F. M. Menger, A. V. Eliseev, N. A. Khanjin, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3613;
F. M. Menger, A. V. Eliseev, N. A. Khanjin, M. J. Sherrod, *J. Org. Chem*. **1995**, *60*, 2870;
E. A. Winter, B. Tsao, J. Rebek Jr., *J. Org. Chem*. **1995**, *60*, 7997.

[56] J. S. Nowick, Q. Feng, T. Tjivikua, P. Ballester, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8831.

[57] D. N. Reinhoudt, D. M. Rudkevich, F. de Jong, *J. Am. Chem. Soc*. **1996**, *118*, 6880.

[58] A. Terfort, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem*. **1992**, *104*, 626.

[59] B. Wang, I. O. Sutherland, *Chem. Commun*. **1997**, 1495.

[60] S. Kauffman, *Nature* **1996**, *382*, 496.

[61] D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, *382*, 525;
K. Severin, D. H. Lee, J. A. Martinez, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J*. **1997**, *3*, 1017.

[62] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewsi, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.

[63] D. H. Lee, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Current Opinion in Molecular Biology* **1997**, *1*, 491;
D. H. Lee, K. Severin, Y. Yokobayashi, M. Ghadiri, *Nature* **1997**, *390*, 591;
D. H. Lee, K. Severin, Y. Yokobayashi, M. Ghadiri, *Nature* **1998**, *394*, 101;
K. Severin, D. H. Lee, J. A. Martinez, M. Vieth, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 133.

[64] S. Yao, I. Ghosh, Reena Zutshi, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc*. **1997**, *119*, 10559;
S. Yao, I. Gosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *Angew. Chem*. **1998**, *110*, 489;
S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *Nature* **1998**, *396*, 447.

[65] R. Isaac, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6808.

[66] L. H. A. Monteiro, J. R. C. Piqueira, *J. theor. Biol.* **1998**, *191*, 237.

[67] L. E. Orgel, *Nature* **1992**, *358*, 203.

[68] T. Inoue, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1982**, *162*, 201;
T. Inoue, G. F. Joyce, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1984**, *176*, 279;
T. Haertle, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1986**, *188*, 77;
G. F. Joyce, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1986**, *188*, 433;
O. L. Acevedo, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1987**, *197*, 187;
T. Haertle, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1986**, *23*, 112;
K-m. E. NG, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1989**, *29*, 101;
G. F. Joyce, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1988**, *202*, 677.

[69] C. B. Chen, T. Inoue, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1985**, *181*, 271.

[70] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nucl. Acids Res.* **1985**, *13*, 2469.

[71] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1989**, *29*, 369.

[72] S. A. Kauffman, *The Origins Of Order* **1993**, Oxford University Press, New York.

[73] N. G. Dolinnaya, N. I. Sokolova, O. I. Gryaznova, Z. A. Shabarova, *Nucl. Acids Res.* **1988**, *9*, 3721;
N. G. Dolinnaya, N. I. Sokolova, D. T. Ashirbekova, Z. A. Shabarova, *Nucl. Acids Res.* **1991**, *19(11)*, 3067;
N. G. Dolinnaya, A. V. Tsytovich, V. N. Sergeev, T. S. Oretskaya, Z. A. Shabarova, *Nucl. Acids Res.* **1991**, *19(11)*, 3073;
N. G. Dolinnaya, M. Blumenfeld, I, N, Merenkova, T. S. Oretskaya, N. F. Krynetskaya, M. G. Ivanoskaya, M. Vasseur, Z. A. Shabarova, *Nucl. Acids Res.* **1993**, *21*, 5403.

[74] B. Wlotzka, Dissertation **1992**, Göttingen.

[75] Z. A. Shabarova, A. Bogdanov, *Advanced organic chemistry of nucleic acids* **1994**, VCH, Weinheim.

[76] D.H. Rammler, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3112.

[77] Y. Lapidot, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3857.

[78] J. F. M. de Rooji, G. Wille-Haezeleger, P.H. Van Deursen, J. Serdijn, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1979**, *98*, 537.

[79] J. Stawinski, T. Hozumi, S. A. Narang, C. P. Bahl, R. Wu, *Nucl. Acids Res.* **1977**, *4*, 353.
[80] C. B. Reese, *Tetrahedron* **1978**, *34,* 3143.
[81] V. A. Efimov, O. G. Chakhmakcheva, Y. A. Oychinnikov, *Nucl. Acids Res.* **1985**, *13*, 3651.
[82] R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3655.
[83] B. P. Melnick, J. Finnan, R. L. Letsinger, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2715.
[84] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3243.
[85] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3185.
[86] L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 245.
[87] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223.
[88] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1925.
[89] V. A. Efimov, O. G. Chakhmakhcheva, Y. A. Ovchinnikov, *Nucl. Acids Res.* **1985**, *13*, 3651.
[90] H. G. Khorana, A. F. Turner, J. P. Vizsolyi, *J. Am. Chem. Soc*. **1961**, *83*, 686;
R. K. Ralph, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc*. **1961**, *83*, 2926.
[91] J. C. Schulhoff, D. Molko, R. Teoule, *Nucl. Acids Res*. **1987**, *15*, 397-416.
[92] C. B. Reese, P. A. Skone, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1984**, 1263.
[93] M. V. Rao, C. B. Reese, *Nucl. Acids Res.* **1989**, *15*, 8221.
[94] Y. Hayakawa, M. Uchiyama, H. Kato, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *90*, 6505.
[95] Y. Hayakawa, H. Kato, M. Uchiyama, H. Kajione, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1986**, *5*, 2400.
[96] Y. Hayakawa, S. Wakabayaschi, H. Kato, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1691.
[97] K. P. Stengele, W. Pfleiderer, *Nucl. Acid Res. Symp. Ser.* **1989**, *21*, 101.
[98] K. P. Stengele, W. Pfleiderer, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2549.
[99] P. S. Miller, D. M. Cheng, N. Dreon, K. Jamarama, L. S. Kann, E. E. Leutzinger, *Biochemistry* **1980**, *19*, 4688.
[100] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801.
[101] R. B. Merrifield, *Science* **1986**, *232*, 341.
[102] R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heavner, W. B. Lunsford, *J. Am .Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278.
[103] J. Engels, *Nachr. Chem. Techn. Lab.* **1991**, *19*, 1250.
[104] H. Seliger, K. C. Gupta, *Nucleosides Nucleotides* **1985**, *4*, 249.
[105] O. Dahl, J. Nielson, B. H. Dahl, *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 1727.
[106] S. M. Gryaznov, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc*. **1991**, *113*, 5876.
[107] S. M. Gryaznov, R. L. Letsinger, *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*, 1879.
[108] W. T. Markiewicz, T. K. Wyrzykiewicz, *Nucl. Acids Res*. **1989**, *17*, 7149-7158.
[109] G. S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316.
[110] I. Yamamoto, M. Sekine, T. Hata, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1980**, 306.
[111] H. Staudinger, F. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635.
[112] M. V. Rao, C. B. Reese, V. Schehlmann, P. S. Yu, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 43.
[113] J. Helbing, Dissertation **1990**, Göttingen.
[114] M. Scheffler, Diplomarbeit **1994**, Freiburg.
[115] W. A. Denny, W. Leupin, D. R. Kerns, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 2372.
[116] S. Jordan, Diplomarbeit **1990**, Göttingen.
[117] S. A. Narang, O. S. Bhanot, J. Goodchild, H. Wightman, S. K. Dheer, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6183;
H. Wightman, S. A. Narang, K. Ikatura, *Can. J. Chem.* **1972**, *50*, 456;

E. Felder, R. Schwyzer, R. Charubala, W. Pfleiderer, B. Schulz, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3967.
[118] Visualisierung mit *Weblabviewer* der Firma *Accelrys Inc.*
[119] T. Achilles, Diplomarbeit **1991**, Göttingen.
[120] H. Sawai, *Origins of Life* **1989**, *19*, 320.
[121] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 1699.
[122] M. Matzen, Diplomarbeit **1990**, Göttingen.
[123] J. P. Ferris, G. Ertem, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1992**, *22*, 369.
[124] J. P. Ferris, K. Uddin, G. Ertem, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1990**, *20*, 279.
[125] K. Kawamura, F. Okamoto, *Viva Origino* **2001**, *29*, 162.
[126] A. Sinclair, D. Alkema, R. A. Bell, J. M. Coddington, D. W. Hughes, T. Neilson, P. J. Romaniuk, *Biochemistry* **1984**, *23*, 2656.
[127] J. SantaLucia Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 1460.
[128] A. Williams, I. T. Ibrahim, *J. C. S. Chem. Comm.* **1980**, 25;
A. Williams, I. T. Ibrahim, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7090.
[129] P. T. Talbert, F. M. Huennekens, *Am. Soc.* **1956**, *78*, 4671.
[130] T. Achilles, Dissertation **1995**, Göttingen.
[131] W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1517.
[132] M. Mag, J. W. Engels, *Nucl. Acids Res.* **1988**, *17*, 5973.
[133] G. von Kiedrowski, *Bioorganic Chemistry Frontiers* **1993**, *3*, 113.
[134] J. Bülle, Dissertation **2000**, Bochum.
[135] S. M. Freier, D. Alkema, A. Sinclair, T. Neilson, D. H. Turner, *Biochemistry* **1985**, *24*, 4533.
[136] S. M. Freier, N. Sudimoto, A. Sinclair, D. Alkema, T. Neilson, R. Kierzek, M. H. Caruthers, D. H. Turner, *Biochemistry* **1986**, *25*, 3214.
[137] K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, P. L. Paris, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8182.
[138] S. Bommarito, N. Peyret, J. SantaLucia Jr., *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28*, 1929.
[139] A. Kanavarioti, C. F. Bernasconi, E. E.Baird, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8575.
[140] V. A. Vasiliskov, D. V. Prokopenko, A. D. Mirzabekov, *Nucl. Acids Res.* **2001**, *29*, 2303.
[141] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry* **1999**, J. Wiley & Sons, New York.
[142] T. Xia, J. SantaLucia Jr., M. E. Burkard, R. Kierzek, S. J. Schröder, X. Jiao, C. Cox, D. H. Turner, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14719.
[143] N. Sugimoto, A. Matsumura, M. Katoh, M. Sasaki, *Nucl. Acids Symp. Ser.* **1992**, *27*, 139.
[144] T. A. Early, J. Olmsted, D. R. Kearns, A. G. Lezius, *Nucl. Acids Res.* **1978** , *5*, 1955.
[145] Y. Wang, G. A. Thomas, W. L. Peticolas, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989** , *6*, 1177.
[146] P. S. Ho, C. A. Frederick, G. J. Quigley, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H. Wang, A. Rich, *EMBO* **1985** , *4*, 3617.
[147] M. Eigen, W. Gardiner, P. Schuster, R. Winkler-Oswatitsch, *Scientific Am.* **1981**, *244*, 78;
K. Ikehara, *Viva Origino* **2001**, *29*, 66.
[148] T. Miura, G. J. Thomas Jr., *Biochemistry* **1994**, *33*, 7848.
[149] C. R. Newton, A. R. Green, G. R. Heathclife, T. C. Atkinson, D. Holland, A. Markham, M. D. Edge, *Anal. Biochem.* **1983**, *129*, 22;
M. B. Arghavani, L. J. Romano, *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 201.
[150] M. W. Germann, R. T. Pon, J. H. van de Sande, *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 399.

[151] Die Resource Q Säule wurde freundlicherweise von Dr. Kiltz (Lehrstuhl für Biochemie der Ruhr-Universität Bochum, Prof. Dr. Heumann) zur Verfügung gestellt.
[152] M. V. Cubellis, G. Marino, *J. of Chromat.* **1985**, *329*, 406.
[153] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1989**, *29*, 281.
[154] E. Bubienko, P. Cruz, J. F. Thompson, P. N. Borer, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1983**, *30*, 41.
[155] H.-O, Bertrand, T. Ha-Duong, S. Fermandjian, B. Hartmann, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 1261.
[156] R. E. Dickerson, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 1906.
[157] H.-L. Ng, M. L. Kopka, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2035;
R. E. Dickerson, H.-L. Ng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6986.
[158] M. Popenda, E. Biala, J. Milecki, R. W. Adamiak, *Nucl. Acids Res.* **1997**, *25*, 4589.
[159] A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel, A. Rich, *Nature* **1979**, *282*, 680;
H. Drew, T. Takano, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature* **1980**, *286*, 567;
R. V. Gessner, C. A. Frederick, G. J. Quigley, A Rich, A. H. Wang, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7921;
V. D. Kumar, R. W. Harrison, L. C. Andrews, I. T. Weber, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1541.
[160] F. Quadrifoglio, G. Manzini, M. Vasser, K. Dinkelspiel, R. Crea, *Nucl. Acids Res.* **1981**, *9*, 2195.
[161] S. S. Birke, M. Moses, B. Kagalovsky, D. Jano, M. Gulotta, M. Diem, *Biophysical Journal* **1993**, *65*, 1262.
[162] D. J. Patel, *Biopolymers* **1976**, *15*, 533;
D. J. Patel, *Biopolymers* **1977**, *16*, 1635;
D. J. Patel, *Biopolymers* **1979**, *18*, 553.
[163] S. E. Rokita, L. Romero-Fredes, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9674.
[164] H. Qiu, J. C. Dewan, N. C. Seeman, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 881.
[165] A. E. Walter, D. H. Turner, J. Kim, M. H. Lyttle, P. Müller, D. H. Mathews, M. Zucker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9218;
[166] D. Sievers, Dissertation **1994**, Göttingen.
[167] G. von Kiedrowski., SimFit-Version vom 01.11.2001, Bochum.
[168] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part III*, **1980**, Freeman, San Francisco, Kap. 22 u. 23;
D. Pörschke, O. C. Uhlenbeck, F. H. Martin, *Biopolymers* **1973**, *12*, 1313.
[169] I. Huc, R. J. Pieters, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10296.
[170] J. W. Szostak, A. D. Ellington, in: R. F. Geseland, J. F. Atkins, *The RNA World* **1993**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 511.
[171] J. L. Bada, A. Lazcano, *Science* **2002**, *296*, 1982.
[172] P.-L. Biochemicals, INC, Firmenschrift, Circular No. OR-10
[173] Die Substanz wurde freundlicherweise von H. Schöneborn zur Verfügung gestellt.

Danksagungen

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Kiedrowski für ihre gute Kooperation und interdisziplinäre Zusammenarbeit, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt Dr. Jan Bülle, Dr. Maik Kindermann, Dr. Michael Rein und Dr. Holger Schöneborn für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und die hervorragende Zusammenarbeit, sowie für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit.

Den Wissenschaftlern Dr. Alexander Azzawi, Dr. Braja Gopal Bag, Thomas und Romana Brandsch, Dr. Axel Dorenbeck, Dr. Aloys Hüttermann, Prof. Dr. Kai Johnson, Dr. Hans-Werner Lennartz, Dr. Karl Christian Lenssen, Dr. Anatol Luther, Kai Naumann, Dr. Matthias Pankau, Dr. Matthias Scheffler, Insa Stahl, Dr. Marion Starzmann, Dr. Claus Weigand, Dr. Martin Wilming, Dr. Marcel Wollenweber und den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kiedrowski danke ich für die gute Laborgemeinschaft bei ausgezeichnetem Arbeitsklima und für viele humoristisch wertvolle Momente.

Für das Korrekturlesen des Manuskripts danke ich ganz besonders und herzlich Dr. Jan Bülle, Dr. Maik Kindermann, Malte Reimold und Dr. Marcel Wollenweber.

Den Mitarbeitern Rainer Döring, Johannes Jäger, Carsten Lodwig und Beate Materne sei für die tatkräftige Hilfe gedankt. Besonderer Dank gilt Rolf Breuckmann und Margot Bock für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft in allen technischen und verwaltungsbezogenen Angelegenheiten und für ihre moralische Unterstützung. Michael Wüstefeld sei für seine Unterstützung am DNA-Synthesizer gedankt, Klaus Körner für seine Hilfe bei chromatografischen Fragestellungen. Dr. Hans-Hermann Kiltz danke ich für die gute interdisziplinäre biochemische Kooperation. Der analytischen Abteilung der Universität Bochum sei für die Aufnahme der NMR-Spektren gedankt.

Ganz besonders danke ich Maren Hölscher für ihre moralische Unterstützung, ihre Geduld und all die Liebe.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Oliver Thoennessen
Geboren	29.10.1970 in Düsseldorf
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1977 – 1981	Haferfeld-Grundschule in Essen
1981 – 1990	Carl-Humann-Gymnasium in Essen
Mai 1990	Abitur

Grundwehrdienst

Juli 1990 – Juni 1991	3. Fernmeldebattalion 3 in Buxtehude

Studium

Oktober 1991 – Oktober 1993	Grundstudium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum Vordiplomprüfung Chemie
Oktober 1993 – Mai 1996	Hauptstudium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum Diplomprüfung Chemie
November 1995 - Mai 1996	Diplomarbeit am Lehrstuhl für physikalisch organische Chemie OC 1 der Ruhr-Universität Bochum unter der Leitung von Prof. Dr. W. R. Roth über das Thema "*Van der Waals-Komplexe unsymmetrischer Radikalpaare: Thermolyse des (+)-trans-1,2,3-Trimethyl-1-(3-phenyl-allyl)-1H-inden*".
Juni 1996 – April 2003	Promotion am Lehrstuhl für bioorganische Chemie OC 1 der Ruhr-Universität Bochum unter der Leitung von Prof. Dr. G. von Kiedrowski über das Thema "*Replikationsexperimente an offenen Systemen: Oligomerisierung von 5'-Amino-3'-phosphat-Oligodeoxynucleotidderivaten mit alternierenden Pyrimidin-Purin-Sequenzen*".