



Herstellung fluoreszenter DNA für die Bildgebung in biologischen Zellen mithilfe postsynthetischer "Click"-Chemie



Abschlussbericht der Kooperationsphase 2018/19

Durchgeführt am Institut für Organische Chemie (IOC) und am Institut für Toxikologie und Gentechnik (ITG), Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter Betreuung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht, Dr. Franziska Rönicke, Larissa Doll und Fabian Lang.

Svenja Frey freysv@hector-seminar.de Pia Steveling stevelpi@hector-seminar.de

Inhaltsverzeichnis

Abstract	4
1. Einleitung	5
2. Material und Methoden	6
2.1 Synthese	6
2.1.1 DNA-Festphasensynthese	6
2.1.2 Postsynthetische Modifikation der DNA	10
2.2 Analytik	12
2.2.1 Lyophilisierung	12
2.2.2 HPLC	12
2.2.3 Maldi-TOF	13
2.2.4 Nanodrop	13
2.2.5 Spektroskopie	14
2.2.6 Schmelzpunktbestimmung	14
2.2 Zellexperimente	15
2.3.1 Zellkultur	15
2.3.2 Transfektion	15
2.3.3 Fixierung	16
2.3.4 Permeabilisierung	16
2.3.5 Anfärben	16
2.3.6 Konfokalmikroskopie	17
3. Ergebnisse und Diskussion	18
3.1 Synthese	18
3.2 Analytik	19
3.2.1 HPLC	19
3.2.2 Maldi-TOF	19
3.2.3 NanoDrop	21
3.2.4 Spektroskopie	21
3.2.5 Schmelzpunktbestimmung	23
3.3 Zellexperimente	23
3.3.1 Transfektion	23
3.3.2 Anfärben	24
4. Fazit und Ausblick	
5. Danksagung	30
6. Quellen	31

7.	Abkürzungsverzeichnis	33
8.	Selbstständigkeitserklärung	34
9.	Anhang	35
	9.1 Tritylmonitore	35
	9.2 HPLC	36
	9.3 Maldi-TOF	38
	9.4 NanoDrop	40
	9.5 Schmelzpunkte	41
	9.6 Zellexperimente in lebenden Zellen	42
	9.7 Zellexperimente in fixierten Zellen	43

Abstract

Every year more and more people worldwide are diagnosed with cancer. In 2014, every forth death was caused by cancer, making it the second common cause of death. Therefore, the demand for innovative possibilities of early stage identification and treatment is increasing. In 1993, R. C. Lee first described miRNAs (micro - ribonucleic acids) – short, single-stranded RNA-sequences – which he identified in cells. Nowadays, we know that they are noncoding, take on important regulatory functions inside the cell and are usually made up of 21 - 22 nucleotides. They can suppress genetic activity and thus control fundamental biological processes, such as development, cell differentiation or apoptosis.

The goal of this project was to mark specific miRNAs with fluorescent dyes and visualize them in cells under the confocal microscope. Therefore, DNA-strand complementary to miRNA-21 and miRNA-31 were, through the utility of the post-synthetic click-chemistry in form of a copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, marked with a fluorescent dye. Subsequently, these DNA-strands are introduced into cancer cells (HeLa-line) for then to hybridize with the miRNAs inside the cells. Using this technique, the miRNAs can be localized under the microscope. It is still unclear what types of miRNA are present in different types of cancer cells. Based on previous scientific research, miRNA-21 and miRNA-31 were selected for our study as well as two different fluorophores (green and red fluorophore) produced by the scientific work group of Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht at the Institute of Organic Chemistry (IOC), Karlsruhe Institute for Technology (KIT).

1. Einleitung

Krebserkrankungen zählen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen zur häufigsten Todesursache in Deutschland.¹ Ursache einer Krebserkrankung sind nicht wie bei Infektionskrankheiten Viren oder Bakterien, sondern körpereigene, mutierte Zellen. Krebszellen sind Zellen, bei denen jegliche Abwehr- und Kontrollmechanismen des Körpers versagt haben und die sich daher ungehindert vermehren können. Ihr Erbgut ist insoweit verändert, dass es die Zellteilung unterstützt und den programmierten Zelltod (Apoptose) ausschaltet. Die entstandenen Tumorzellen entwickeln sich zu malignen Tumoren, die sich weiter teilen, im Körper streuen und Metastasen bilden können.

1993 wurden die sogenannten miRNAs erstmals von R. C. Lee² beschrieben. Die kurzen, einzelsträngigen RNA-Sequenzen tragen maßgeblich zur Genexpression bei und beeinflussen somit Zellvorgänge wie Apoptose, Differenzierung und Entwicklung. Infolgedessen spielen sie auch in der Krebsentstehung eine bedeutende Rolle. Aus diesem Grund werden in der Forschung bereits verschiedene miRNAs hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der Entstehung von Krebs erforscht. Für diese Arbeit wurden miRNA-21 und miRNA-31 zur Untersuchung ausgewählt. MiRNA-21 kommt in Tumorzellen vieler Krebsarten vermehrt vor. Es ist bekannt, dass sie verantwortlich für die negative Regulation von Apoptose-Genen ist. Sie wird daher als onkogene miRNA bezeichnet.³ MiRNA-31 kann, abhängig von der Krebsart, sowohl die Tumorentstehung unterstützen, als auch die Tumorgenese verhindern und den Zelltod veranlassen.⁴

Im Experiment werden zu miRNA-21 und miRNA-31 komplementäre DNA-Sequenzen synthetisiert, welche mit einem 2'-*O*-Propargyluridin-Baustein modifiziert werden. Dieser wird mit Hilfe der postsynthetischen "Click"-Chemie (copper(I)-catalyzed azidealkyne cycloaddition) mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Es werden zwei verschiedene Cyanin-Styryl-Farbstoffe (grüner Farbstoff und roter Farbstoff) der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht am Institut für Organische Chemie (IOC), Karlsruhe Institut für Technologie (KIT) benutzt. Abschließend werden die DNA-Sonden in Krebszellen der HeLa-Linie eingeführt. Die an miRNAs hybridisierten DNA-Stränge können mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. So sollen in Zukunft potenzielle Tumorzellen frühzeitig erkannt und Krebs diagnostiziert werden.

https://www.nature.com/articles/onc200872 [14.08.19]

¹ Thorsten Schaff: So häufig kommt Krebs in Deutschland vor

https://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/krebs/article/980439/fallzahlen-haeufig-kommt-krebs-deutschland.html [14.08.19]

² R.C.Lee, R.L.Feinbaum, and V.Ambros: The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75 (1993) 843-854 [15.08.19]

³ Z. Lu, M. Liu, V. Stribinskis, C. M. Klinge, K. S. Ramos, N. H. Colburn & Y. Li: MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene

⁴ Yu T., Ma P., Wu D., Shu Y., Gao W.: Functions and mechanisms of microRNA-31 in human cancers

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30372817/ [14.08.19]

2. Material und Methoden

2.1 Synthese

2.1.1 DNA-Festphasensynthese

Mit der Phosphoramidit-Festphasensynthese werden Oligonukleotide synthetisiert. Sie können mit DNA-Synthesizern (Abb. 1) automatisch hergestellt werden. Dazu wird an einem festen Träger, dem CPG, das erste Nukleotid immobilisiert. Die folgenden Nukleotide werden an dieses gekoppelt, bis die Länge der gewünschten DNA-Sequenz erreicht ist (hier 21 bzw. 22 Nukleotide). Diese Reaktionen folgen einem repetitiven Protokoll:

Entschützung – Kupplung – Capping – Oxidation

Nach der Synthese wird der DNA-Strang von dem festen Träger durch Ammoniak gelöst (Abb. 2).



Abb. 1 DNA-Synthesizer



Abb. 2 DNA von der Festphase mit Ammoniak lösen

Neben den bekannten Basen wie Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, können auch modifizierte Bausteine (hier 2`-*O*-Propargyluridin) eingebaut werden. An diese können später, postsynthetisch, unter anderem durch die hier verwendete CuAAC-Reaktion, Farbstoffe gekoppelt werden (s. Kapitel 2.1.2 Postsynthetische Modifikation der DNA). Im Projekt werden vier DNA-Sequenzen hergestellt, modifiziert und untersucht, wobei jeweils zwei Proben zu den Sequenzen der folgenden miRNAs komplementär sind:

DNA-Strang komplementär zu miRNA-21: 5' -T-C-A-A-C-A-T-C-A-G-<mark>cU</mark>-C-T-G-A-T-A-A-G-C-T-A- 3'

DNA-Strang komplementär zu miRNA-31: 5' -A-G-C-T-A-T-G-C-C-A-G-C-A-cU-C-T-T-G-C-C-T- 3'



Da aktuell noch keine modifizierten Thymin-Bausteine käuflich zu erwerben sind, wird für die Modifikation ein cU-Baustein (2`-*O*-Propargyluridin) verwendet (Abb. 3). Der Baustein wird jeweils an einer Stelle in die synthetisierten DNA-Stränge eingesetzt.

Abb. 3 cU-Baustein

Die Reaktion verläuft über vier Teilschritte A-D⁵:

A. Entschützung:



Mittels 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan wird die 4,4-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe abgespalten. Das abgespaltene Dimethoxytrityl-Kation ist orange gefärbt und dient als Detektor zur qualitativen Kontrolle. Färbt sich die Lösung während der Synthese orange, wurde das Molekül abgespalten und die Entschützung war erfolgreich. An den so entschützten Zucker wird im Folgenden die nächste Base über die Phosphor-Gruppe gekuppelt.

⁵ https://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis [18.12.18]

B. Kupplung:



Dazu wird die neu hinzukommende Base durch einen Tetrazol-Katalysator am Phosphor aktiviert. Anschließend bindet die entschützte Hydroxyl-Gruppe der voranstehenden Base nukleophil an den aktivierten Phosphor.

C. Capping:



Beim Capping soll sichergestellt werden, dass an Stränge, bei denen die Kupplung nicht erfolgreich war, keine weiteren Nukleoside binden können. Dies verhindert, dass DNA-Stränge mit unterschiedlicher Basensequenz gebildet werden. Die entstandenen Abbruchstränge sind verkürzt und können während der HPLC leicht von den Volllängen-Strängen getrennt werden. Für das Capping wird ein Cap A Mix aus 10 % Essigsäureanhydrid, 10 % Pyridin und 80 % Tetrahydofuran induziert. Der darauffolgende Cap B Mix enthält 16 % 1-Methylimidazol und 84 % Tetrahydrofuran.

D. Oxidation:



Um die weitere Synthese vorzubereiten, wird Phosphor (III) mit Iod-Lösung (in 2 % Wasser – 20 % Pyridin – 78 % Tetrahydrofuran-Lösung) zu stabilerem Phosphor (V) oxidiert. Die 2-Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphor bleibt erhalten.

Abspaltung und Entschützung:



Am Ende der Synthese werden mit Hilfe 25 %iger NH₄OH-Lösung (in Wasser) sowohl die Schutzgruppen der einzelnen Basen als auch der fertige DNA-Einzelstrang von der festen Phase (Ester-Hydrolyse) abgespalten.

Schutzgruppen:



Benzoyl-Schutzgruppe für Adenin und Cytosin; Isobutyryl- oder Dimethylformamidyl-Schutzgruppe für Guanin; Keine Schutzgruppe notwendig für Thymin

2.1.2 Postsynthetische Modifikation der DNA

Durch die postsynthetische Modifikation der DNA ist es möglich, den DNA-Strang beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. So können biologische Prozesse in Zellen unter dem Konfokalmikroskop sichtbar gemacht werden (s. Kapitel 3.3. Zellexperimente).

Durch die CuAAC-Reaktion können später Farbstoffe an den synthetisierten DNA-Strang gebunden ("geclickt") werden. Von den vier synthetisierten DNA-Strängen wird je Probe jeweils ein Farbstoff geclickt. Es werden so insgesamt vier modifizierte Stränge hergestellt, die wie folgt benannt sind:

Tab. 1 Probenb	ezeichnungen	
	Grüner Farbstoff	

	Grüner Farbstoff	Roter Farbstoff
miRNA-21	PS1	SF1
miRNA-31	PS2	SF2

Die synthetisierte DNA wird in Wasser gelöst und 75 µl Farbstoff (10 mM in DMSO/tBuOH 3:1) hinzugegeben. 17 µl Cu(I)-Katalysator-Lösung (100mM in DMSO/tBuOH 3:1) werden mit 34 µl TBTA-Ligand (100 mM in



Abb. 4 Modifizierte DNA (grüner / roter Farbstoff)

DMSO/tBuOH 3:1) gemischt und zur DNA gegeben. TBTA-Liganden stabilisieren den Katalysator. Es kann dennoch vorkommen, dass Cu(I) zu Cu(II) oxidiert, was durch die Zugabe von 25 µl Natriumascorbat (400 mM in H₂O) als Reduktionsmittel vermieden werden kann. Die DNA wird zwei Stunden lang bei 60 °C geclickt (Abb. 5) und vier Mal mit dem Vortexer vermischt. Zum Ausfällen der DNA werden 450 µL Natriumacetat-Lösung (300 mM in H₂O) sowie 150 µL EDTA-Lösung (50 mM in H₂O) hinzugegeben und mit kaltem, reinem Ethanol aufgefüllt. Während EDTA mit Cu(II) einen Komplex bildet, gleicht Natriumacetat die negative Ladung der DNA aus, sodass die Löslichkeit sinkt. Zudem ist die DNA in Ethanol unlöslich, weshalb das geclickte Produkt ausfällt und von der Lösung abgetrennt werden kann.



Abb. 5 Modifizierter DNA-Strang mit Click-U-Baustein und Farbstoff





Das nachfolgende Schema fasst die Vorgänge noch einmal schematisch zusammen.

Phosphoramidit-Methode und Modifikation durch die CuAAC mit einem Fluoreszenzfarbstoff:



2.2 Analytik

Das Untersuchen von chemischen Stoffen auf ihre Bestandteile nennt man Analyse. Mit verschiedenen Methoden wird unser Produkt nachgewiesen und auf seine Eigenschaften untersucht.

2.2.1 Lyophilisierung

Die Lyophilisierung, auch als Gefriertrocknung bekannt, beschreibt eine Methode zur schonenden Trocknung von Flüssigkeiten. Zunächst wird die Probe z. B. in flüssigem Stickstoff eingefroren (Abb. 6). Im Lyophilisator (Abb. 7) befindet sich ein Vakuum, welches dazu führt, dass das Eis in der Probe durch Sublimation umgehend entzogen wird. Die Molekülstruktur der Probe bleibt weitestgehend erhalten und der Wassergehalt beträgt nur noch 1 - 5 %⁶.



Abb. 6, 7, 8 Einbringen der Probe in flüssigen Stickstoff; Probe im Lyophilisator; Durchmischung der Probe im Voatexer

2.2.2 HPLC

Mittels HPLC werden chemische Substanzen voneinander getrennt. Die Probe wird in der mobilen Phase, dem Laufmittel, gelöst und zu der Trennsäule, der stationären Phase, gepumpt.

Die zu trennenden Substanzen unterscheiden sich häufig in ihrer Polarität. Dies führt dazu, dass sie sich einerseits unterschiedlich gut in der mobilen Phase lösen und andererseits verschieden gut mit der stationären Phase wechselwirken. Das Stoffgemisch, bestehend aus Abbruchsträngen, geclickten Strängen und Abbruchsträngen, kann somit über die Polarität in die einzelnen Bestandteile getrennt werden.

Aufgrund der Wechselwirkungen mit der stationären Phase verlassen die verschiedenen Bestandteile des Probengemisches zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Apparatur. Wenn die Probe stark mit der stationären Phase wechselwirkt, verbleibt sie länger in der Trennsäule, während sie bei schwachen Wechselwirkungen die Trennsäule

⁶ Lyopharm. Die Lyophilisierung: Unsere Stärke. https://www.lyopharm.it/de/prozess-lyophilisierung. htm [06.08.19]

früher verlässt. An einem angeschlossenen Detektor, in diesem Fall an einem UV/Vis-Detektor, werden die einzelnen Bestandteile des Gemisches auf Grund ihres unterschiedlichen Absorptionsverhaltens identifiziert. So kann die geclickte DNA-Probe von Abbruchsträngen und den Fluoreszenzfarbstoffen unterschieden und getrennt werden.

Das lyophilisierte (s. Kapitel 2.1.1. Lyophilisierung) DNA-Pellet wird mit 300 μ l Wasser aufgenommen, wobei zunächst 150 μ l, dann 100 μ l und 50 μ l Wasser zugegeben werden. Zwischen den Arbeitsschritten werden sie jeweils mit dem Vortexer gemischt (Abb. 8), zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Die Proben werden mit Hilfe der HPLC über 45 Minuten bei 40 °getrennt. PS1 und PS2 werden bei einer Absorption von λ = 260 nm (DNA) und bei λ = 462 nm (grüner Farbstoff) detektiert. SF1 und SF2 werden bei λ = 260 nm (DNA) und bei λ = 550 nm (roter Farbstoff) detektiert. Die geclickte DNA kann somit isoliert werden.

2.2.3 Maldi-TOF

Mit der Maldi-TOF-Methode wird die Masse der aufgereinigten modifizierten DNA-Stränge bestimmt. Es werden jeweils 0,5 µl von PS1, PS2, SF1 und SF2 auf vier Positionen pipettiert, mit 0,3 µl Matrix (3-Hydroxypicolinsäure) vermischt (Abb. 9) und getrocknet, wobei das Gemisch auskristallisiert. Die Proben werden anschließend durch Laserbeschuss ionisiert. Durch die Flugzeitanalyse kann ihre Masse bestimmt werden. Alle Fraktionen derselben Masse werden vereinigt und lyophilisiert.



Abb. 9 Tüpfeln der Probe

2.2.4 Nanodrop

Zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen wird das Nano-Drop ND-1000 Spectrophotometer der Firma NanoDrop verwendet (Abb. 10). Die Messungen erfolgten im Modus "Nucleic Acid" bei λ = 260 nm (d = 1 cm). Dafür werden, bei offenem Arm, 1 µl der Probe auf den Sockel gegeben. Durch Schließen des Apparats formt sich aufgrund der Oberflächenspannung der Flüssigkeit eine Probensäule zwischen dem Sockel und der Spitze des Arms. Der Absorptionswert der Probe kann so photometrisch bestimmt werden. Aus den erhaltenen Messwerten berechnet das Gerät unter Verwendung des Lambert-Beer'sche-Gesetzes (E = $\varepsilon \times c \times d$) die Konzentration in µmol/L.



Abb. 10 NanoDrop

2.2.5 Spektroskopie

Die Absorption der fluoreszenz-markierten DNA-Proben wird mit dem Cary 100 UV-Vis-Spektralphotometer (Abb. 12) ermittelt. Die Emission wird anhand des FluoroMax-3 Fluoreszenzspektrometers der Firma Horiba (Abb. 11) gemessen.

Absorption und Emission bestimmen, bei welchen Wellenlängen die in die Zellen eingebrachten fluoreszenzmarkierten Proben angeregt werden müssen (Absorption), bzw. in welchem Bereich sie Licht aussenden (Emission). Um die Prozesse auf die Zelle übertragen zu können, werden die Untersuchungen zusätzlich auch mit Doppelsträngen durchgeführt. Dafür werden Teile der DNA-Proben mit den komplementären miRNAs zusammengeführt, wodurch diese zu DNA-miRNA-Strängen hybridisieren. Es wird mit einer Konzentration von 2,5 µM DNA bzw. miRNA gearbeitet. Es werden 250 mM NaCl und 10 mM Natriumphosphatpuffer für einen pH-Wert von 7 verwendet. Das Gesamtvolumen der Lösung beträgt 1 ml.



Abb. 11 Fluoreszenzspektrometer

Abb. 12 UV/VIS-Spektralphotometer

2.2.6 Schmelzpunktbestimmung

Der Schmelzpunkt der Probe gibt darüber Auskunft, bei welcher Temperatur der Hybridstrang, bestehend aus miRNA und dem modifizierten DNA-Einzelstrang, zu 50 % in die Einzelstränge denaturiert ist.

Diese Information ist bedeutend für die Zellexperimente, da somit bekannt ist welche Temperatur nicht überschritten werden darf, damit der modifizierte DNA-Strang und die miRNAs in der Zelle noch hybridisieren.

Die Probe wird dazu langsam erhitzt, wobei die Wasserstoffbrücken zwischen den Einzelsträngen getrennt werden. Das Schmelzen der DNA wird durch eine charakteristische Absorptionszunahme bei λ = 260 nm charakterisiert.

2.2 Zellexperimente

2.3.1 Zellkultur

Die HeLa-Zellen werden in DMEM-Medium unter Zusatz von 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C kultiviert (Abb. 13). Bei 70 % Konfluenz werden die Zellen passagiert. Hierzu wird zuerst mit DPBS gewaschen, der Zellrasen anschließend mit 1 mL einer 0,25 %igen Trypsinlösung/EDTA benetzt und bei Raumtemperatur bis zum Ablösen der Zellen gewartet. Der Vorgang wird durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt. Die Zellen werden durchmischt und in frischem Medium in Kulturflaschen ausgesät. Zur Bestimmung der Zellzahl werden Neubauer-Zählkammern verwendet (Abb. 14). Dafür wird die Zellzahl in einem Volumen von 0,1 µl ausgezählt und auf 1 ml hochgerechnet.



Abb. 13 HeLa-Zellen mit DMEM-Medium; Abb. 14 Mikroskopansicht der HeLa-Zellen in Neubauer-Zählkammer

2.3.2 Transfektion

Die Transfektion beschreibt das Einbringen von fremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. In die HeLa-Zellen wird die modifizierte DNA eingebracht, sodass diese an die komplementären miRNA-Moleküle binden kann (Abb. 16). Dabei liegt die Herausforderung darin, die negativ geladene DNA über die ebenfalls negativ geladene Zellmembran zu transportieren. HeLa-Zellen werden mit Hilfe von kationischen Lipiden (Screenfect)



Abb. 15 Aufbringen der DNA-Proben auf die Zellen

transfiziert. Im Cytosol können die DNA Stränge dann an die komplementären miRNA-Sequenzen binden.

Um die Transfektion zu ermöglichen, wird eine Screenfect siRNA-Verdünnung mit 1,35 µl Screenfect und 88,65 µl Dilution Buffer (Screenfect) angesetzt.

Die DNA-Verdünnung setzt man mit 0,8 µl DNA-Probe und 19,2 µl Puffer an. Pro Transfektionsansatz werden 20 µl der DNA-Verdünnung mit 20 µl SF-Verdünnung durchmischt und für 20 Minuten inkubiert.

In der Zwischenzeit werden die HeLa-Zellen trypsiniert und eine Zellsuspension mit 4 $\times 10^4$ Zellen/ml hergestellt.

Das Enzym Trypsin baut Proteine ab, die die Zellanheftung bewirken. Es spaltet spezifisch die Peptidbindungen nach den Aminosäuren Lysin und Arginin.

In dieser Zeit bilden sich die sogenannten Lipoplexe (Anheftung der negativ geladenen DNA an die kationischen Lipide), mit Hilfe derer die DNA über die Zellmembran in das Zytoplasma transportiert werden.



Abb. 16 HeLa-Zelle mit Zellkern und miRNA, sowie extrazellulär die einzubringende komplementäre DNA-Sonde

180 μ l der Zellsuspension werden schließlich zur Lipoplexlösung pipettiert und die 200 μ l/Well in IBIDI Slides überführt. Die Zellen werden anschließend für 24 Stunden transfiziert.

2.3.3 Fixierung

Für die Fixierung der Zellen werden diese mit DPBS gewaschen und anschließend mit je 200 µl einer 4 %igen PFA-Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Durch Zugabe des verwendeten Formaldehyds findet eine Vernetzung zwischen Proteinen (und auch DNA) statt, wobei ihre Strukturen stabilisiert und möglichst vollständig erhalten bleiben.

2.3.4 Permeabilisierung

Die fixierten Zellen werden mit DPBS gewaschen und die Permeabilisierung mittels 200 µl einer 1 %igen Triton X-100-Lösung (Detergenz) für 5 Minuten bei Raumtemperatur induziert. Durch diese Behandlung wird die Zellmembran teilweise aufgelöst und ist somit für die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Sonden durchlässig.

2.3.5 Anfärben

Die fixierten Zellen nehmen die mit Floureszenzfarbstoff markierten DNA-Sonden direkt (ohne Endozytose) auf (Abb.15), da die Zellmembran durch die Permeabilisierung durchlässig für große Moleküle, wie die verwendeten Proben ist. Um zu untersuchen, in wie fern die Konzentration der eingesetzten DNA-Sonden das Ergebnis beeinflusst, wurden je 200 μ l von 0,2 / 0,1 / 0,02 / 0,01 / 0,002 molarer DNA-Probenlösung (in DPBS) auf die Zellen gegeben.

Als Kontrolle werden unbehandelte Zellen sowie eine Negativprobe⁷ und eine Positivprobe⁸ auf die gleiche Weise am Fluoreszenzmikroskop vermessen und mit den miRNA-Sonden verglichen. Dabei diente eine "scrambled sequence", die nicht komplementär zur Ziel RNA ist, als Negativkontrolle. Die damit behandelten Zellen sollten somit keine Fluoreszenz zeigen. Als Positivprobe wird eine zur U6 snRNA komplementäre Sequenz, markiert mit AlexaFluor488, verwendet. Folglich sollten die Bereiche, in welchen sich die U6 snRNA aufhält, fluoreszent markiert werden. Die behandelten Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen mit DPBS gewaschen und die Zellkerne mit einer Hoechst-DPBS-Lösung (1:5000) angefärbt.

2.3.6 Konfokalmikroskopie

Für die Visualisierung der HeLa-Zellen wird das inverse Konfokalmikroskop TCS SPE (DMI4000) mit der Leica Application Suite (LAS-AF) Software und einem ACS APO 40x/1.15 Öl Objektiv (Abb.17) verwendet. Der Laser wird beim grünen Farbstoff bei einer Wellenlänge von λ = 488 nm und beim roten Farbstoff bei einer Wellenlänge von λ = 532 nm verwendet. Die Fluoreszenz-

Emission wird für den roten Farbstoff bei



Abb. 17 Untersuchung der Probe mit dem Konfokalmikroskop

 λ = 568 – 634 nm und für den grünen Farbstoff bei λ = 498 nm - 565 nm gemessen (s. Kapitel 2.2.5 Spektroskopie).

⁸ https://www.qiagen.com/fr/products/discovery-and-translational-research/detection/ish-and-northernblotting/mirna-detection/mircury-lna-mirna-detection-probes/?catno=YD00699002#geneglobe [14.08.19]

⁷ https://www.qiagen.com/fr/products/discovery-and-translational-research/detection/ish-and-northernblotting/mirna-detection/mircury-lna-mirna-detection-probes/?catno=YD00699004#geneglobe [14.08.19]

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese

Mit Hilfe der Tritylmonitore kann die Qualität der Synthese, bzw. die qualitative Kopplungsausbeute, nachgewiesen werden. Während der Entschützung (s. Kapitel 2.1.1. DNA-Festphasensynthese) wird die 4,4-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe abgespalten und mit einer 3 %igen Dichloressigsäure in Dichlormethan versetzt. Dabei wird das DMT-Kation abgespalten, welches eine intensive orangene Färbung aufweist (Abb. 19). Dessen Konzenration kann photometrisch bestimmt werden und



Abb. 18 DMT - Kation

dient somit als qualitativer Nachweis für die erfolgreiche Entschützung. Anhand der Prozentzahl der Gesamtausbeute (*Tot. yield*) kann abgelesen werden, wie gut die Synthese insgesamt verlief. Der *step to step yield* gibt die Qualität der einzelnen Syntheseschritte bei der Verknüpfung der Nukleotide an. Je größer der Wert, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass die Synthese vollständig und erfolgreich abgelaufen ist.

Tab. 2 Syntheseausbeute PS2, SF1, SF2

	Total yield	Step to step yield
PS1	100 %	100 %
PS2	91 %	99,5 %
SF1	97 %	99,9 %
SF2	91 %	99,5 %



Abb.19 Exemplarisch Tritylmonitore von PS1 Weitere Messungen s. Anhang Kapitel 9.1 Abb. 39 – 41

Die Synthese der DNA-Stränge verlief insgesamt sehr gut. Der *total yield* von PS2 und SF2 liegt mit 91 % deutlich unter dem von PS1 und SF1 (100 % bzw. 97%) (Abb. 19, Tab. 2), was sich auf den höheren Guaningehalt bei PS2 und SF2 zurückführen lässt. Guanin lässt sich vergleichsweise schlecht in die Synthese einbauen. Ein Grund dafür wäre, dass es ein größeres Molekül als die anderen Basen ist. Des Weiteren könnte die Base sterisch anspruchsvoller sein.

3.2 Analytik

3.2.1 HPLC

In den bei der Synthese erhaltenen Produkten sind neben den gewünschten DNA-Sonden noch Abbruchstränge der DNA, ungeclickte DNA und Farbstoffreste vorhanden. Das Gemisch wird mittels HPLC getrennt und die Bestandteile über Absorption detektiert.

Das aufgeführte Chromatogramm (Abb. 20) zeigt für die Probe PS1 bei λ = 260 nm zwei charakteristische Absorptionsmaxima (24 – 29 min und 30 – 33 min). Diese sind auf ungeclickte DNA (ohne Farbstoff, 24 – 29 min) bzw. modifizierte DNA (30 – 33 min; vgl. Absorption des grünen Farbstoffs bei λ = 462 nm Abb. 20 unten) zurückzuführen. Die kleinen Peaks (46 – 48) deuten auf Abbruchstränge der DNA hin.





Weitere Chromatogramme siehe Anhang Kapitel 9.2 HPLC Abb. 42 - 44

3.2.2 Maldi-TOF

Die Masse der Proben wird experimentell über Maldi-TOF bestimmt (Abb. 21) und mit den erwarteten Werten, die über die Molekülmasse ermittelt werden, verglichen (Tab. 3).



Abb. 21 Experimentelle Bestimmung der Molekülmasse von PS1 über Maldi-TOF Weitere Messungen siehe Anhang Kapitel 9.3 Maldi-TOF Abb. 45 – 47

Tab. 3 Berechnung der Molekülasse von PS1 Weitere Berechnungen siehe Anhang Kapitel 9.3 Maldi-TOF Tab. 6 – 8

monoisotopic	с	н	N	o	Р	s	Br	monoisotopic n	monoisotopic masses of the building blocks			
masses of the atoms	12	1	14	16	31	32	79	building				
Number for dA	10	12	5	5	1	0	0	dA	313,0576	8		
Number for dC	9	12	3	6	1	0	0	dC	289,0464	5		
Number for dG	10	12	5	6	1	0	0	dG	329,0525	3		
Number for dT	10	13	2	7	1	0	0	dT	304,0460	5		
Number for dU	9	11	2	7	1	0	0	dU	290,0304	0		
								cU-Donor	662,2100	1		
								cU-Akzeptor	788,2600	0		
										0		
										0		
Number for cU	12	13	2	8	1	0	0			0		
										0		
										0		
										0		
										0		
Korrektur	0	1	0	-2	-1	0	0			0		
										0		
molecular formula	C205	H258	N80	0121	P20	SO	Br0	Korrektur	-61,9558			
								DNA Mass	7057,3		22-mer	DMT-off

Die Abweichung zwischen den experimentellen und den erwarteten Ergebnissen ist vergleichsweise groß. Sie lässt sich vermutlich auf die relativ schlechte Kalibrierung des Maldi-TOF-Gerätes zurückführen. Außerdem nimmt die Abweichung der Ergebnisse mit den Massen der Proben zu. Die Proben PS1 und SF1 haben erwartungsgemäß eine größere Masse als PS2 bzw. SF2, da diese Stränge ein Nukleotid mehr besitzen.

Tab. 4 Massenvergleich der Proben

	Maldi-TOF [u.]	Molekülmasse [u.]
PS1	7058,47	7057,3
PS2	6716,50	6712,2
SF1	7190,22	7183,4
SF2	6844,31	6838,3

3.2.3 NanoDrop

Über die Absorptionswerte aus dem NanoDrop kann die DNA-Konzentration der Probe bestimmt werden.

Tab. 4 Tabelle zur Berechnung der Konzentration am Beispiel von PS1 (unter Anwendung des Lambert-Beer'sche-Gesetzes)

Programm: Nucleic Acids Umrechnungsfaktor: 1													
Name	V _{Stamm} [µL]	V _{entnommen} [µL]	V _{wasser} [μL]	Verdünnung	۶ [L/molcm]	A ₂₆₀	A _{raw}	A _{Summe}	c _{Probe} [μmol/L]	c _{Stamm} [µmol/L]	c _{MW} [µmol/L]	Stabw(c _{MW}) [µmol/L]	n _{ges} [nmol]
		350	0			63,163	0,625	63,788	262,2	262,2			
PS1	350			1,00	243250	62 <i>,</i> 955	0,583	63 <i>,</i> 538	261,2	261,2	262,0	±0,5	91,7
						63,161	0,677	63 <i>,</i> 838	262,4	262,4	•	•	•

Weitere Tabellen siehe Anhang Kapitel 9.4 NanoDrop Tab. 9

3.2.4 Spektroskopie

Anhand der vorliegenden Spektren (Abb. 22 – 28) ist das Absorptions- und Emissionsverhalten der DNA-Sonden, der Fluoreszenzfarbstoffe und der hybridisierten DNAmiRNA-Stränge erkennbar.

In den Absorptionsspektren sind im Bereich von λ = 200 - 300 nm die DNA-Sonden zu verorten, mit einem für DNA charakteristischen Absorptionsmaximum bei λ = 260 nm (Abb. 22 und 23). Die Absorption ist für doppelsträngige Moleküle höher, weil diese durch mehr Nukleotide mehr Licht dieser Wellenlänge absorbieren.



Abb. 22 Absorptionsspektren DNA/miRNA-21

Abb. 23 Absorptionsspektren DNA/miRNA-31

Im Bereich von λ = 350 - 650 nm (Abb. 25 und 26) ist die Absorption der Farbstoffe zu erkennen. Diese zeigen, wie erwartet, jeweils ein Maximum bei λ = 472 nm (grüner Farbstoff) und bei λ = 550 nm (roter Farbstoff). Dabei zeigt sich kein Unterschied zwischen den Einzel- und Doppelsträngen. Zudem macht es keinen Unterschied, ob die Fluoreszenzfarbstoffe an Sonden komplementär zu miRNA-21 oder miRNA-31 sind.



Die Emissionsspektren (Abb. 27 und 28) zeigen die typischen Maxima für den grünen und roten Farbstoff bei λ = 500 – 600 nm bzw. λ = 550 – 650 nm.



Abb. 27 Emission der Farbstoffe zu miRNA-21 (Anregung rot λ = 472 nm, grün λ = 550 nm)



Abb. 28 Emission der Farbstoffe zu miRNA-31 (Anregung rot λ = 472 nm, grün λ = 550 nm)

Das Emissionsspektrum zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Einzel- und Doppelsträngen. Beide Fluoreszenzfarbstoffe an DNA-Sonden komplementär zu miRNA-21 emittieren im Doppelstrang weniger Licht, als im Einzelstrang (Abb. 27). Die Hybridisierung wirkt sich also negativ auf die Intensität der Farbstoffemission aus. Im Vergleich dazu geben die Farbstoffe an DNA-Sonden komplementär zu miRNA-31 mehr Licht im Doppelstrang ab (Abb. 28). Dieser Unterschied lässt sich auf die spezielle Molekülbeschaffenheit und den Wechselwirklungen zwischen DNA-Sonden und Fluoreszenzfarbstoffen zurückführen.

3.2.5 Schmelzpunktbestimmung

Mit Hilfe der Schmelzpunkte kann darauf geschlossen werden, wie gut der modifizierte DNA-Strang mit der komplementären miRNA hybridisiert ist. Je höher der Schmelzpunkt, desto mehr Wasserstoffbrücken konnten sich beim Hybridisieren zwischen den komplementären Strängen bilden und desto stabiler ist der Doppelstrang.

Die Schmelztemperaturen von PS1 und SF1 bzw. PS2 und SF2 ähneln sich sehr (vgl. Tab. 5). Das lässt sich darauf zurückführen, dass sie jeweils zur gleichen miRNA komplementär sind. Der Unterschied zwischen PS1 und SF1 bzw. PS2 und SF2 lässt sich auf die unterschiedlichen Farbstoffe zurückführen, die sterisch unterschiedlich sind.

SF2 und PS2 sind komplementär zu miRNA-21, die einen höheren GC-Anteil aufweist. Da das Basenpaar Guanin-Cytosin drei Wasserstoffbrücken besitzt, während sich zwischen Adenin und Thymin nur zwei Wasserstoffbrücken ausbilden, haben SF2 und PS2 einen höheren Schmelzpunkt.



Tab. 5 Schmelztemperatur PS1, PS2, SF1, SF2

	Schmelztemperatur
PS1	62 °C
PS2	74 °C
SF1	60 °C
SF2	75 °C

Abb. 29 Schmelzpunktkurve von PS1 Weitere Diagramme siehe Anhang Kapitel 9.5 Schmelzpunkte, Abb. 50 und 51

3.3 Zellexperimente

3.3.1 Transfektion

Die durch fluoreszente Farbstoffe markierten DNA-Sonden werden in lebende Krebszellen (HeLa-Linie) transfiziert.

Lebende Zellen nehmen Feststoffe oder Flüssigkeiten durch Endosomen auf, die sich aus der Zellmembran während der Endozytose abschnüren. Die DNA-Sonden (Abb. 30) werden, wenn auch nicht auf natürliche Weise, über denselben Mechanismus aufgenommen. Die DNA-Sonden sind somit durch die Doppellipidschicht "verpackt" (Abb. 31) und können nicht mehr an die, im Zytoplasma vorliegenden, komplementären miRNAs binden. Unter dem Konfokalmikroskop können sie jedoch aufgrund des Fluoreszenzfarbstoffes identifiziert werden (Abb. 32 rot markierte Stellen). Dabei fällt auf, dass sich die Endosomen meist in der Nähe des Zellkerns befinden. Während der Teilung lagern sie sich an den gegenüberliegenden Seiten des Zellkerns an und liegen nach der Teilung rechts bzw. links der Tochterkerne vor (vgl. Abb. 32).



Abb. 30 Endozytose: Abschnürung von Endosomen mit DNA-Sonden

Abb. 31 Endozytose einer DNA-Sonde

Durch bestimmte Chemikalien können die Endosomen entleert und somit die DNA-Sonden freigegeben werden (*endosomal escape*). Diese sind jedoch sehr toxisch und wurden aus diesem Grund nicht verwendet.

Da unter diesen Bedingungen eine Hybridisierung zwischen der DNA-Sonde und der komplementären miRNA im Zytoplasma nicht möglich ist, werden anstelle der lebenden Zellen tote, fixierte Zellen eingesetzt, die keine Endosome abschnüren (s. Kapitel 3.3.2. Anfärben).



Abb. 32 SF2 (rot) in lebenden HeLa-Zellen, Zellkerne mit Hoechst (blau) angefärbt; Ex.: 532 nm; Em.: 568 – 634 nm

3.3.2 Anfärben

In einer ersten Versuchsreihe werden über die fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden die komplementären miRNAs angefärbt. Dabei werden der grüne und rote Farbstoff sowie miRNA-21 und miRNA-31 für eine Probenkonzentration von c = 0,2 M miteinander verglichen (Abb. 33 und Abb. 34). Die Ergebnisse zeigen, sowohl bei den Farbstoffen an sich, als auch bei der Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs, keine nennenswerten Unterschiede auf.



Abb. 33 Fixierte Zellen mit PS1 bzw. PS2 (grün; c = 0,2 M)

Der Fluoreszenzfarbstoff ist fast überall in der Zelle zu erkennen. Auffällig ist, dass er wenig im Randbereich der Zelle und stattdessen gehäuft in der Nähe des Zellkerns vorkommt. Da dies in allen Aufnahmen der Zellen der Fall ist, lässt sich daraus annehmen, dass sowohl miRNA-21 als auch miRNA-31 nahe dem Zellkern zu finden sind. Bei genauem Betrachten fällt auf, dass es kleine Anhäufungen an Fluoreszenzfarbstoff außerhalb der Zelle (bspw. Abb. 33 PS2_1) gibt. Diese kleinen Punkte lassen vermuten, dass trotz mehrmaligen Waschen Probenreste außerhalb der Zellen zurückgeblieben sind. Der nichtgebundene Farbstoff verursacht eine geringe Hintergrundfluoreszenz. Die Wahrscheinlichkeit ist groß, dass aufgrund der hohen Konzentration die modifizierten DNA-Stränge nicht nur an die komplementären miRNAs gebunden haben, sondern auch an andere Zellstrukturen.

Um dies zu überprüfen wird eine weitere Versuchsreihe mit niedrigeren Konzentrationen an DNA-Sonden (c = 0,1 M / 0,02 M / 0,01 M / 0,002 M) für miRNA-31 durchgeführt und diese häufiger gewaschen. Die niedrigeren Konzentrationen wurden erst in einem zweiten Versuchsdurchlauf untersucht, weshalb nicht mehr genügend PS2 und SF2 zur Verfügung stand. Aus diesem Grund liegen nur für miRNA-21 diesbezüglich Ergebnisse vor.



Abb. 35 Fixierte Zellen mit SF1 (rot; c = 0,1 M) Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; SF2 (rot); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex. : 532 nm; Em : 568 – 634 nm



Abb. 36 Fixierte Zellen mit SF1 (rot; c = 0,02 M)

Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; SF2 (rot); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex.: 532 nm; Em.: 568 – 634 nm



Abb. 37 Fixierte Zellen mit SF1 (rot; c = 0,01 M) Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; SF2 (rot); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex.: 532 nm; Em.: 568 – 634 nm



Abb. 38 Fixierte Zellen mit SF1 (rot; c = 0,002 M)

Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; SF2 (rot); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex.: 532 nm; Em.: 568 – 634 nm

Innerhalb dieser Versuchsreihe fällt auf, dass der rote Fluoreszenzfarbstoff von SF1 bei niedrigen Konzentrationen besser unter dem Mikroskop zu erkennen ist als vergleichsweise PS1 (grüner Farbstoff) (s. Anhang Kapitel 9.7 Zellexperimente in fixierten Zellen Abb. 55 und 56). Erwartungsgemäß ist die Färbung im mikroskopischen Bild umso schwächer, je niedriger die eingesetzte Farbstoff-Konzentration in den Proben ist. Bei Zellen, die mit dem grünen Farbstoff (PS1) angefärbt sind, ist es bei niedrigerer Konzentration (ab c = 0,01 M) nicht mehr möglich, das Bild zu fokussieren, was die Auswertung erschwert. Die mit Hoechst angefärbten Zellkerne sind in allen Ansätzen gut erkennbar (Abb. 35 - 38).

Auf Grund der Ergebnisse erscheint für den Nachweis von miRNA-21 in fixierten Zellen der Einsatz von mit rotem Farbstoff markierten DNA-Sonden in einer Probenkonzentration von c = 0,002 M (Abb. 38) empfehlenswert. Bei dieser Konzentration ist zu erkennen, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff ausschließlich in der Nähe des Zellkerns befindet.

Auffällig sind die intensiv gefärbten Punkte, die auf eine Anhäufung der DNA-Sonden hinweisen (s. grüne Markierung Abb. 39). Möglicherweise handelt es sich hierbei um die hybridisierten Stränge aus modifizierten DNA und der nachzuweisenden miRNA.



Abb. 39 Fixierte Zellen mit SF2 (rot; c = 0,1 M) Von links nach rechts: SF2 (rot); Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Überlagerung der zwei rechten Bilder mit Hellfeld; Ex.: 532 nm; Em.: 568 – 634 nm

Um genaue Aussagen darüber zu treffen, bei welchen markierten Strukturen es sich um die hybridisierten Stränge handelt, wird eine Negativ- bzw. Positivkontrolle durchgeführt (vgl. Kapitel 2.3.5 Anfärben). Die Negativkontrolle sollte keine Floreszenz zeigen, während die Positivkontrolle spezifisch markierte Bereiche nachweisen sollte. Da die intensiv gefärbten Punkte (vgl. Abb. 39)



Abb. 40 Fixierte Zellen Negativkontolle (links) und Positivkontrolle (rechts; jeweils c = 0,1 M); Ex.: 494 nm; Em.: 517 nm

nicht auf der Positivkontrolle zu sehen waren, ist nicht bestätigt, dass hier die hybridisierten Stränge vorliegen. Die Fluoreszenz, die in der Negativkontrolle zu beobachten ist, weist darauf hin, dass es Strukturen in den Zellen gibt, an die DNA-Sequenzen binden können. Dennoch sind in den Zellaufnahmen (s. Abb. 39) intensive Punkte die in den Kontrollen nicht zu sehen sind. Aus diesem Grund lässt sich vermuten, dass es sich bei diesen um hybridisierte Stränge aus modifizierten DNA und der nachzuweisenden miRNA handelt.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Beobachtungen schließen, dass sich miRNA-21 in Krebszellen der HeLa-Linie wahrscheinlich vor allem in der Nähe des Zellkerns befinden. Außerdem eignet sich der rote Farbstoff besser als der grüne Farbstoff um *in vivo* Experimente aller Art durchzuführen, da sich dieser auch bei niedrigen Konzentrationen unter dem Mikroskop fokussieren lässt.

In wie fern sich die Ergebnisse auf miRNA-31 übertragen lassen, ist auf Basis dieser Ergebnisse noch offen. Aussagen über die Menge der vorhandenen miRNAs lassen sich nicht treffen, da die Anzahl an hybridisierten miRNA-DNA-Strängen von der Anzahl der eingebrachten DNA-Sonden abhängen.

4. Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das gewählte Verfahren zur Herstellung fluoreszenter DNA mit Hilfe postsynthetischer "Click"-Chemie, durchweg gute Ausbeuten liefert, wie die Ergebnisse der analytischen Untersuchungen (HPLC, Maldi-TOF, Spektroskopie, Schmelztemperatur, NanoDrop) belegen. Eine Übertragung auf die Synthese weiterer zu miRNA komplementärer DNA-Sequenzen erscheint daher sinnvoll.

Fixierte Zellen konnten die DNA-Proben direkt ins Zellplasma aufnehmen, so dass die Probe an die komplementäre miRNA binden konnte. Bei lebenden Zellen erfolgte die Aufnahme über Endosomen; eine Hybridisierung der so "verpackten" DNA-Sonden an komplementäre miRNA war daher nicht möglich.

Im Experiment wurden unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe (grüner / roter Farbstoff) eingesetzt und die Konzentration der DNA-Probe variiert. Beide Farbstoffe lieferten gute Ergebnisse, wobei die besten Resultate bei geringen DNA-Konzentrationen und dem roten Farbstoff erzielt wurden. Hier konnte die DNA-Sonde spezifischer in der Zelle binden und komplementäre miRNA im mikroskopischen Bild identifiziert werden.

In zukünftigen Experimenten könnten verschiedene Faktoren variiert werden. So könnte der Einsatz weiterer Farbstoffe untersucht werden. Diese müssen chemisch stabil sein und ein spezifisches Absorptions- und Emissionsspektrum aufweisen. Sie sollten eine möglichst hohe Fluoreszenzintensität besitzen, was zu einer besseren Bildgebung unter dem Fluoreszenzmikroskop beitragen könnte. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Entwicklung eines Farbstoffs, der erst nach dem Hybridisieren mit der miRNA fluoresziert.

Ebenfalls könnte der Einfluss der Probenkonzentration der DNA-Sonden näher betrachtet werden. Mit kleineren Differenzen zwischen den untersuchten Konzentrationen und einer diesbezüglich breiteren Versuchsreihe könnte die optimale Konzentration der DNA-Proben für den jeweiligen Ansatz ermittelt und untersucht werden, ob dieser auf andere Beispiele übertragen werden kann. Ähnlich könnte mit der Einwirkzeit verfahren werden. Durch eine breite Versuchsreihe, in der verschiedene Einwirkzeiten untersucht werden, könnte auch hier der optimale Wert ermittelt werden.

Für den miRNA-Nachweis in lebenden Zellen könnten Verfahren eingesetzt werden, die die sogenannte *endosomal escape*, die Freisetzung von DNA-Sonden aus den Endosomen, auslösen. Mögliche Ansatzpunkte hierzu sind der Einsatz von tertiären Aminen, *proton sponge* oder sogenannte Photosensitizer.¹⁰

Ein anderer Ansatz zum Nachweis von Tumorzellen über miRNAs könnte die Detektion außerhalb der Zelle, beispielsweise in Blut sein. Es ist bereits bekannt, dass miRNA-21 und miRNA-31 Zellen durch Sekretion verlassen können. Somit bestünde

¹⁰ K. Mellert, M. Lamla, K. Scheffzek, R. Wittig, D. Kaufmann

Enhancing Endosomal Escape of Transduced Proteins by Photochemical Internalisation https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3528648/ [14.08.19]

die Möglichkeit, diese auch extrazellulär, z. B. im Serum, mit postsynthetisch modifizierten fluoreszenten DNA-Sonden nachzuweisen. So könnten Tumorzellen bereits im frühen Stadium bei Blutuntersuchungen mit Hilfe bildgebender Verfahren nachgewiesen und bestimmte Krebsarten frühzeitig diagnostiziert werden. Bei einer Krankheit, an der jährlich über 200.000 Bundesbürger sterben, Tendenz steigend, ist dies ein wichtiger Schritt in die richtige Richtung.

5. Danksagung

Wir möchten uns bei allen bedanken, die unsere Arbeit am Projekt unterstützt haben.

In erster Linie gilt unser Dank Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Organische Chemie (IOC), Karlsruher Institut für Technologie, die uns dieses Projekt und damit einzigartige Erfahrungen ermöglicht haben. Insbesondere möchten wir uns bei Fabian Lang und Larissa Doll für ihre Unterstützung bei der Synthese und Analytik der DNA-Proben bedanken, sowie Dr. Franziska Rönicke für die Betreuung während der Zellexperimente. Daneben gilt unser Dank dem Graduiertenkolleg 2039, das die Mittel für die Chemikalien und Verbrauchsmaterialien finanzierte.

Dr. Hans-Werner und Josephine Hector danken wir für die langjährige Förderung im Hector Seminar und die Möglichkeit, wissenschaftliche Arbeit hautnah zu erleben.

Schlussendlich möchten wir uns bei unseren Kursleitern Anke Richert und Dietmar Gruber bedanken, die uns jederzeit bei Fragen und insbesondere beim Überarbeiten der Dokumentation beratend zur Seite standen.

6. Quellen

Literaturverzeichnis:

M. L. Abba et al.: MicroRNAs as novel targets and tools in cancer therapy. Cancer Letters 387 (2017) 84 – 94

Schwechheimer, Christian: Struktur-Reaktivitätsbeziehung von Cyanin-Styryl-Farbstoffen und deren Anwendung in der fluoreszenten Bioanalytik lebender Zellen. Hochschulschrift, 2019

Schwechheimer, C., Doll, L., Wagenknecht, H.-A.: Synthesis of dye-modified oligonucleotides via copper(I)-catalyzed alkyne azide cycloaddition using on- and off-bead approaches. Current Protocols of Nucleic Acid Chemistry 72 (2018) 4.80.1 – 4.80.13

Wagenknecht, H.-A. et al.: Copper-Free Postsynthetic Labeling of Nucleic Acids by Means of Bioorthogonal Reactions. ChemBiochem 2015, 16, 1541 – 1553

Internetquellen:

R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros: The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75 (1993) 843-854 https://www.nature.com/articles/onc200872 [06.08.2019]

K. Mellert, M. Lamla, K. Scheffzek, R. Wittig, D. Kaufmann:

Enhancing Endosomal Escape of Transduced Proteins by Photochemical Internalisation

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3528648/ [06.08.2019]

Prof. Reiner Salzer, Dr. Steffen Thiele, Dr. Astrid Zuern, Cordelia Zimmerer: "Chromatografie – kompakt"

http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/chromakompakt.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/chromakompakt/hplc/hplcprinz0104.vscml.html [11.07.19]

Schaff, T.: So häufig kommt Krebs in Deutschland vor https://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/krebs/article/980439/fallzahlenhaeufig-kommt-krebs-deutschland.html [Stand: 06.08.2019]

Andrea Schroedel, 2009 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim: https://www.deepdyve.com/lp/wiley/trypsinierung-von-zellkulturzellen-r2Okza0Cgi [12.07.19]

Yu T., Ma P., Wu D., Shu Y., Gao W.: Functions and mechanisms of microRNA-31 in human cancers [06.08.2019]

Z. Lu, M. Liu, V. Stribinskis, C. M. Klinge, K. S. Ramos, N. H. Colburn & Y. Li: MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4

gene

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30372817/ [06.08.2019]

Copyright 2001 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/fixierung/4216 [06.08.2019]

https://www.qiagen.com/fr/products/discovery-and-translationalresearch/detection /ish-and-northern-blotting/mirna-detection/mircury-lna-mirna-detectionprobes/?catno=YD00699004#geneglobe [06.08.2019]

https://www.qiagen.com/fr/products/discovery-and-translational-research/detection/ish-and-northern-blotting/mirna-detection/mircury-lna-mirna-detection-probes/?catno=YD00699002#geneglobe [06.08.2019]

Bildquellen:

Alle Abbildungen ohne Quellen sind eigene Bilder bzw. eigene Ergebnisse.

7. Abkürzungsverzeichnis

С

CPG	controlled pore glass
cU	click Uridin (2'-O-Propargyluridin)
Cu(I)	Kupfer (I)
Cu(II)	Kupfer (II)
CuAAC	copper(I)-catalyzed azide-alkyne
	cycloaddition

D

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxia
DMT	Dimethoxytrityl-Kation
DNA	deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

Ε

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	
FCS	Fetal Calf Serum
Н	
	l la prietta l a alva

HeLaHenrietta LacksHPLChigh performance liquid chromatography

М

Maldi-TOF miRNA	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization time-of-flight micro-ribonucleic acid
Ρ	
PFA	Paraformaldehyd-Lösung in DPBS
S	
siRNA	Small interfering RNA
Τ	
ТВТА	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-
tBuOH	tert-Butanol
U	
UV	Ultraviolettstrahlung
V	
Vis	visible light

8. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichern wir, dass wir diese Arbeit unter der Beratung durch Larissa Doll, Fabian Lang, Dr. Franziska Rönicke und Anke Richert selbstständig verfasst haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden, sowie Zitate kenntlich gemacht wurden.

Karlsruhe, den

	•••••
Svenja Frey	Pia Steveling

9. Anhang

9.1 Tritylmonitore



Abb. 39 Tritylmonitor SF1



Abb. 40 Tritylmonitor SF2



Abb. 41 Tritylmonitor PS2

9.2 HPLC





Abb. 43 HPLC-Lauf SF1



Abb. 44 HPLC-Lauf SF2

9.3 Maldi-TOF



Abb. 45 Massenanalyse PS2







Abb. 47 Massenanalyse SF2

Massenberechnung für Maldi-TOF:

Tab. 6 Massenberechnung PS2

				·								
monoisotopic	с	н	N	ο	Ρ	s	Br	monoisotopic n	asses of the	Numbor		
masses of the atoms	12	1	14	16	31	32	79	building l	building blocks			
Number for dA	10	12	5	5	1	0	0	dA	313,0576	4		
Number for dC	9	12	3	6	1	0	0	dC	289,0464	7		
Number for dG	10	12	5	6	1	0	0	dG	329,0525	4		
Number for dT	10	13	2	7	1	0	0	dT	304,0460	5		
Number for dU	9	11	2	7	1	0	0	dU	290,0304	0		
								cU-Donor	662,2100	1		
								cU-Akzeptor	788,2600	0		
										0		
										0		
Number for cU	12	13	2	8	1	0	0			0		
										0		
										0		
										0		
										0		
Korrektur	0	1	0	-2	-1	0	0			0		
										0		
molecular formula	C193	H246	N71	0119	P19	SO	Br0	Korrektur	-61,9558			
								DNA Mass	6712,2		21-mer	DMT-off

Tab. 7 Massenberechnung SF1

monoisotopic	с	н	N	0	Р	s	Br
masses of the atoms	12	1	14	16	31	32	79
Number for dA	10	12	5	5	1	0	0
Number for dC	9	12	3	6	1	0	0
Number for dG	10	12	5	6	1	0	0
Number for dT	10	13	2	7	1	0	0
Number for dU	9	11	2	7	1	0	0
Number for cU	12	13	2	8	1	0	0
Korrektur	0	1	0	-2	-1	0	0
molecular formula	C205	H258	N80	0121	P20	SO	Br0

monoisotopic m building b	asses of the locks	Number		
dA	313,0576	8		
dC	289,0464	5		
dG	329,0525	3		
dT	304,0460	5		
dU	290,0304	0		
cU-Donor	662,2100	0		
cU-Akzeptor	788,2600	1		
		0		
		0		
		0		
		0		
		0		
		0		
		0		
		0		
		0		
Korrektur	-61,9558			
DNA Mass	7183.4		22-mer	DMT-off

Tab. 8 Massenberechnung SF2

monoisotopic	с	н	N	o	Р	s	Br	
masses of the atoms	12	1	14	16	31	32	79	
Number for dA	10	12	5	5	1	0	0	
Number for dC	9	12	3	6	1	0	0	
Number for dG	10	12	5	6	1	0	0	
Number for dT	10	13	2	7	1	0	0	
Number for dU	9	11	2	7	1	0	0	
Number for cU	12	13	2	8	1	0	0	
Korrektur	0	1	0	-2	-1	0	0	
molecular formula	C193	H246	N71	0119	P19	SO	Br0	

monoisotopic ma building bl	asses of the locks	Number		
dA	313,0576	4		
dC	289,0464	7		
dG	329,0525	4		
dT	304,0460	5		
dU	290,0304	0		
cU-Donor	662,2100	0		
cU-Akzeptor	788,2600	1		
		0		
		0		
		0		
		0		
		0		
		0		
		0		
		0		
		0		
Korrektur	-61,9558			
DNA Mass	6838,3		21-mer	DMT-off

9.4 NanoDrop

Name	V _{Stamm} [µL]	V _{entnommen} [µL]	V _{wasser} [μL]	Verdünnung	۶ [L/molcm]	A ₂₆₀	A _{raw}	A _{Summe}	c _{Probe} [μmol/L]	c _{Stamm} [µmol/L]	с _{мw} [µmol/L]	Stabw(c _{MW}) [μmol/L]	n _{ges} [nmol]
PS2n	100	100	0	1,00	211480	52,835 53,091 52,961	0,853 0,862 0,816	53,688 53,953 53,777	253,9 255,1 254,3	253,9 255,1 254,3	254,4	±0,5	25,4
Name	V _{Stamm} [µL]	V _{entnommen} [µL]	V _{wasser} [μL]	Verdünnung	۶ [L/molcm]	A ₂₆₀	A _{raw}	A _{Summe}	c _{Probe} [μmol/L]	c _{stamm} [μmol/L]	с _{мw} [µmol/L]	Stabw(c _{Mw}) [µmol/L]	n _{ges} [nmol]
SF1n	100	100	0	1,00	246170	32,741 32,791 32,527	1,223 1,225 1,312	33,964 34,016 33,839	138,0 138,2 137,5	138,0 138,2 137,5	137,9	±0,3	13,8
Name	V _{Stamm} [µL]	V _{entnommen} [µL]	V _{wasser} [μL]	Verdünnung	۶ [L/molcm]	A ₂₆₀	A _{raw}	A _{Summe}	c _{Probe} [µmol/L]	c _{stamm} [µmol/L]	с _{мw} [µmol/L]	Stabw(c _{Mw}) [µmol/L]	n _{ges} [nmol]
SF2	300	300	0	1,00	214400	57,555 57,824 57,962	2,543 2,494 2,528	60,098 60,318 60,490	280,3 281,3 282,1	280,3 281,3 282,1	281,3	±0,7	84,4
Name	V _{Stamm} [µL]	V _{entnommen} [µL]	V _{wasser} [µL]	Verdünnung	۶ [L/molcm]	A ₂₆₀	A _{raw}	A _{Summe}	c _{Probe} [µmol/L]	c _{stamm} [µmol/L]	c _{MW} [μmol/L]	Stabw(c _{MW}) [μmol/L]	n _{ges} [nmol]
miRNA 21	550	550	0	1,00	218880	24,458 24,415 24,498	0,142 0,137 0,208	24,600 24,552 24,706	112,4 112,2 112,9	112,4 112,2 112,9	112,5	±0,3	61,9
Name	V _{Stamm} [µL]	V _{entnommen} [µL]	V _{wasser} [µL]	Verdünnung	۶ [L/molcm]	A ₂₆₀	A _{raw}	A _{Summe}	c _{Probe} [μmol/L]	c _{stamm} [μmol/L]	c _{MW} [μmol/L]	Stabw(c _{MW}) [µmol/L]	n _{ges} [nmol]
miRNA 31	550	550	0	1,00	214830	23,031 23,149 23,024	-0,019 0,008 -0,029	23,012 23,157 22,995	107,1 107,8 107,0	107,1 107,8 107,0	107,3	±0,3	59,0

Tab. 9 Berechnung der Konzentrationen der Proben für NanoDrop

9.5 Schmelzpunkte





Abb. 49 Schmelzpunktkurve SF1 und SF2



9.6 Zellexperimente in lebenden Zellen

Abb. 50 Lebende Zellen mit SF1 (rot; c = 0,2 M)

Transfektion mit ScreenFect[®] --> live cell imaging Mikroskop: Leica TCS-SPE



Abb. 51 Lebende Zellen mit PS1 bzw. PS2 (blau; c = 0,2 M); Ex.: 488 nm; Em.: 498 - 565 nm

9.7 Zellexperimente in fixierten Zellen



Abb. 52 Fixierte Zellen mit SF1 (rot; c = 0,1 M) Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; SF2 (rot); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex.: 532 nm; Em.: 568 – 634 nm



Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; SF2 (rot); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex.: 532 nm; Em.: 568 – 634 nm



Abb. 54 Fixierte Zellen mit SF1 (rot; c = 0,002 M) Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; SF2 (rot); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex.: 532 nm; Em.: 568 – 634 nm



Abb. 55 Fixierte Zellen mit PS1 (grün; c = 0,1 M) Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; PS1 (grün); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex.: 488 nm; Em.: 498 - 565 nm



Abb. 56 Fixierte Zellen mit PS1 (grün; c = 0,02 M) Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; PS1 (grün); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex.: 488 nm; Em.: 498 - 565 nm



Abb. 57 Fixierte Zellen mit Negativkontrolle (grün; c = 0,1 M) Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; Negativkontrolle (grün); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex.: 494 nm; Em.: 517 nm



Abb. 58 Fixierte Zellen mit Positivkontrolle (grün; c = 0,1 M) Von links nach rechts: Überlagerung der drei rechten Bilder; Positivkontrolle (grün); Zellstrukturen; Zellkerne (blau mit Hoechst angefärbt); Ex.: 494 nm; Em.: 517 nm