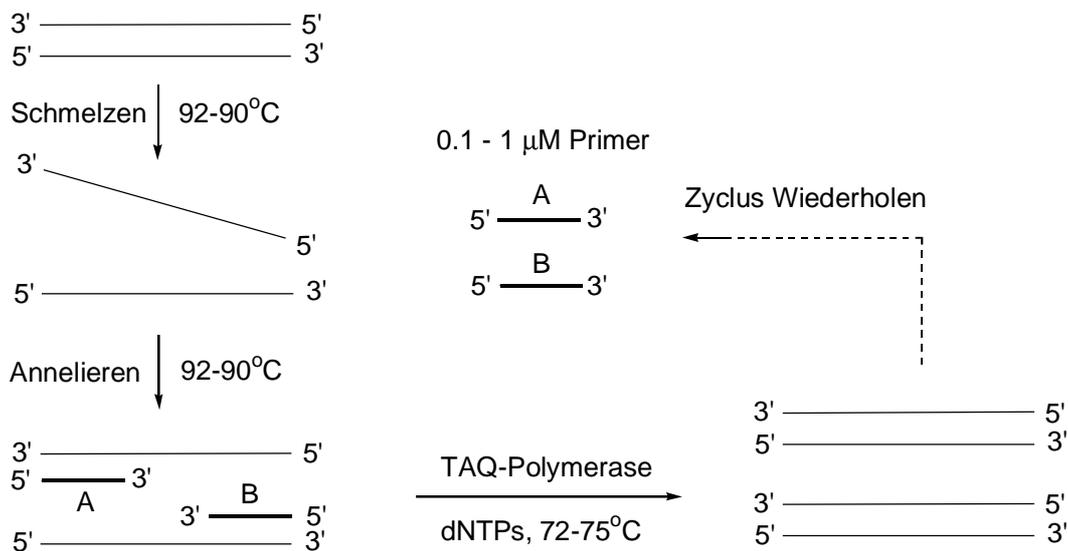


3. Moderne Methoden

3.1 Die Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist wohl die wichtigste neue molekularbiologische Methode der letzten 10 Jahre. Heute ist die PCR eine fundamentale Technik mit ständig neuen Anwendungen. Zentral für die PCR ist die Wechselwirkung von Polymerasen mit DNA. Die Details dieser Wechselwirkung, vor allem deren Abhängigkeiten von: Puffer, Temperatur oder Primersequenz sind leider bis heute nur unvollständig verstanden. Die Ausarbeitung der richtigen Reaktionsbedingungen ist daher schwierig und mit viel *trial and error* verbunden.



Im PCR Protokoll wird zunächst ein Doppelstrang aufgeschmolzen. In Gegenwart einer großen Menge an passenden Primersträngen wird die Reaktionslösung langsam abgekühlt. Bedingt durch die sehr hohe Primärkonzentration wird eine Annelierung der DNA-Stränge mit den Primersträngen erreicht. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf ca. 72°C erhitzt. Das ist die optimale Arbeitstemperatur für die thermostabilen Polymerasen (TAQ-Polymerase). Die Primerstränge werden von der Polymerase mit Hilfe der Triphosphate verlängert. Man hat so die Menge an DNA verdoppelt. Der Zyklus beginnt nun von vorne. Insgesamt wird so ein exponentielles Wachstum (Vermehrung) der DNA erreicht. Die replizierte DNA nennt man Amplikon.

In die PCR kann auch eine Mischung verschiedener DNA-Stränge eingesetzt werden. Durch die Wahl der Primärsequenzen kann so aus einem solchen DNA-Mix die gewünschte Sequenz herausvervielfältigt werden. Die Basis die die hochselektive Vermehrung der von den Primersträngen erkannten DNA-Stränge.

Eine Vermehrung ist bis maximal ca. 10-100 nM möglich, ab dann tritt oft Zersetzung der Polymerase ein, die ständig zwischen den verschiedenen z.T. hohen Temperaturen rezykliert wird. Gleichzeitig nimmt die Primärkonzentration ab, so dass die Konkurrenzreaktion, nämlich die Bildung von Doppelsträngen stärker in den Vordergrund tritt.

Was kann heute mit PCR erreicht werden:

1. Mit PCR können sehr kleine DNA-Mengen (1 Molekül reicht) gereinigt und vermehrt werden
2. Für die Vermehrung ist nur ein partielles Wissen der Gesamtsequenz notwendig.
3. Die Technik ist sehr schnelle. Thermostabile Polymerasen und Temperaturzykler sind kommerziell erhältlich.
4. Die Anwendung der PCR auf cDNA Bibliotheken ermöglicht Genexpressionstudien. Reverse Transkription und PCR lassen sich miteinander koppeln. Die gelingt z. B. mit Polymerasen die auch RT-Aktivität besitzen.
5. Mit PCR lässt sich die Menge einer bestimmten mRNA im Cytoplasma ermitteln. Hierzu ist es notwendig die sogenannte *copy number* zu bestimmen. Das ist die Zahl der durchgeführten Amplifikationsschritte.

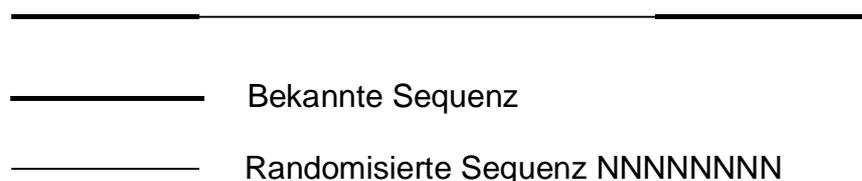
3.2 Anwendung der PCR in der *in vitro random selection*

Das Design von Biomolekülen mit definierten Strukturen und Funktionen ist bis heute ein unerreichtes Ziel. Wir verstehen weder die Proteinfaltung noch die katalytischen Funktionen vieler Biomoleküle. Statt eines rationalen Design wurden in den letzten Jahren vor allem evolutive Methoden in die Chemie eingeführt. Diese Methoden erlauben die Herstellung einer großen Zahl unterschiedlicher Moleküle auf einen Streich. Aus diesem Molekülpool, man spricht auch von einer Molekülbibliothek, werden dann die Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften durch gezielte Vermehrung herausisoliert. Moleküle konkurrieren also miteinander. Diejenigen, die

die Aufgabe am Besten erfüllen werden herausvermehrt, d.h. selektioniert. Die besten Moleküle werden vermehrt und erneut einer Selektion, jetzt unter verschärften Bedingungen unterzogen. Nur die besten werden erneut gezielt vermehrt. Dieser evolutive Prozess wird z. T. bis zu 10 mal wiederholt. Am Ende werden maßgeschneiderte Moleküle erhalten. Evolutive Methoden gelingen natürlich nur mit Molekülen wie DNA oder RNA, die mit Hilfe der PCR vermehrbar sind.

Seit der Entdeckung katalytisch aktiver RNA, also von RNA, die in spezifische dreidimensionale Formen faltet und ähnlich einem Protein Reaktionen katalysieren kann, ist vor allem die Selektion neuer Enzyme auf RNA und DNA Basis, sogenannte Robozyme in den Fordergrund der Forschung gerückt. DNA und RNA Moleküle können auch, ähnlich Antikörpern hochspezifisch kleine Moleküle oder Proteine molekular binden. Ein zweites Ziel der evolutiven Methoden ist die Erzeugung hochspezifischer Rezeptoren auf DNA oder RNA Basis, die zum Beispiel medizinisch relevante Proteine (*Targets*) binden können. Diese Rezeptoren nennt man Aptamere. Das Verfahren der Aptamerentwicklung nennt sich SELEX = *systematic evolution of ligands by experimental enrichment*.

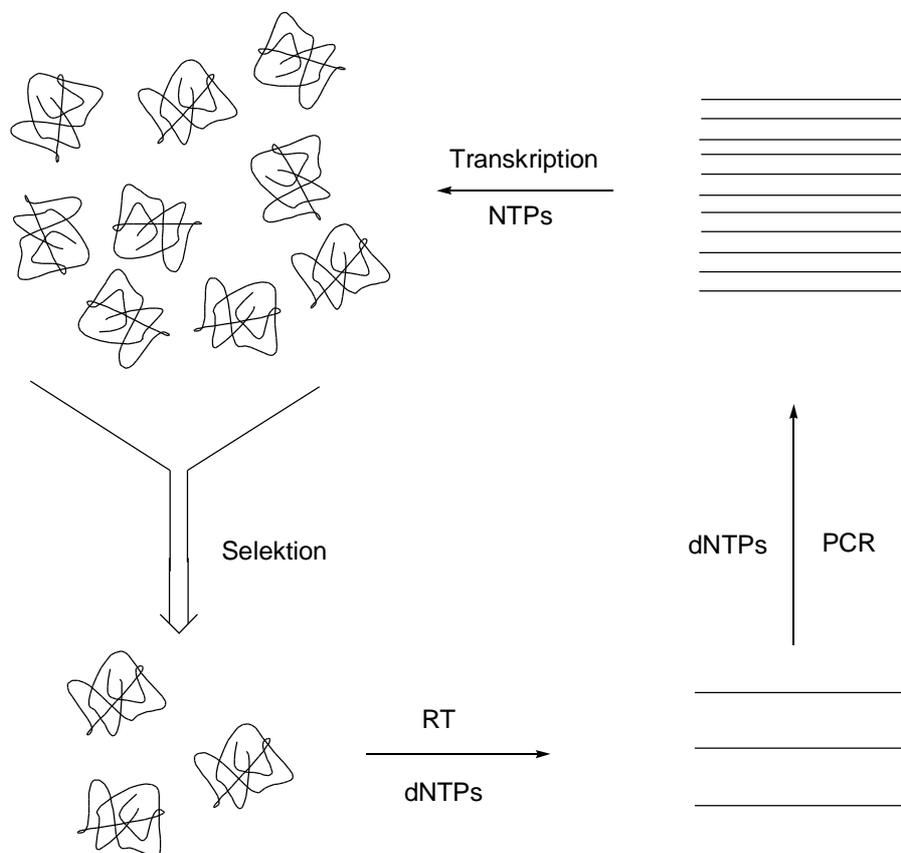
Der erste Schritt beinhaltet die Erzeugung einer Bibliothek, hierzu wird ein DNA-Synthesizer angewiesen nicht ein Nukleotid zu kuppeln, sondern eine Mischung aus allen vier Phosphoramiditbausteinen. Die randomisierte Sequenz wird in der Mitte zwischen bekannten Sequenzen hergestellt, die für die Primererkennung notwendig sind.



Anschließend wird die Mischung aus bis zu 10^{15} – 10^{16} „Individuen“ z. B. auf eine Affinitätssäule gegeben. (Eine Säule die mit einem Material gefüllt ist, an das kovalent das zu bindende Molekül angeknüpft ist) Die Mischung läuft durch die Säule. Die Moleküle, die die angeknüpfte Substanz binden, werden leicht zurückgehalten. Die letzten Rest, der von der Säule gespült wird, wird aufgefangen und durch PCR vermehrt. Man erhält einen ersten angereicherten Pool an Substanzen. Dieser Pool wird erneut über die Affinitätssäule einer Selektion

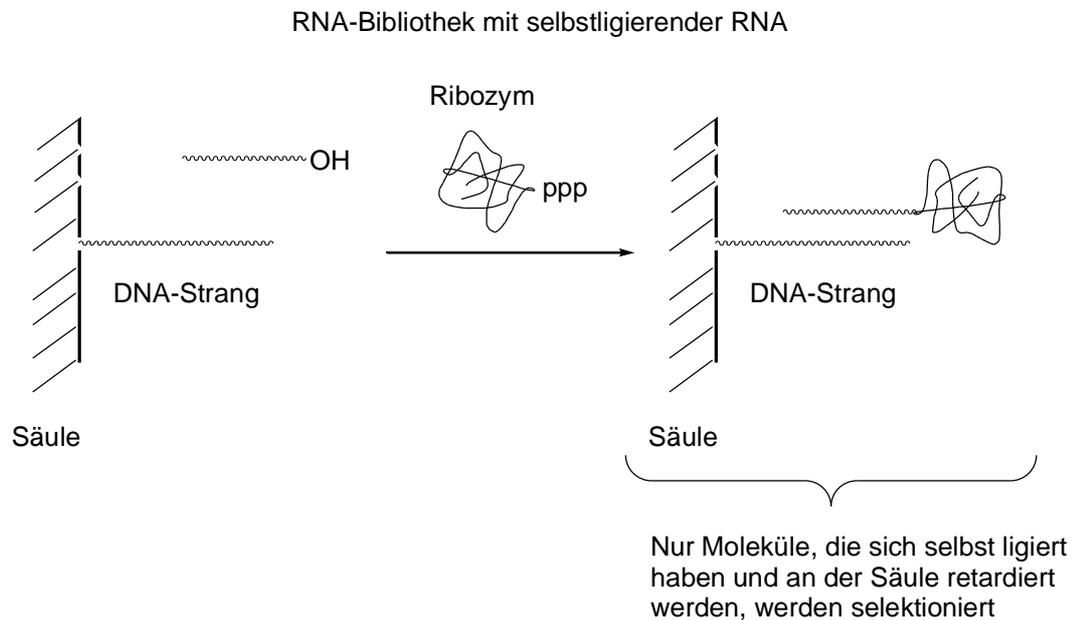
unterzogen. Hierbei können die Selektionskriterien verschärft werden, in dem z. B. der Lösung mehr Salz zugesetzt wird, was die Bindung schwächt. Nur die stärksten, aktivsten DNA oder RNA Moleküle werden so isoliert und gezielt vermehrt.

Verwendet man RNA, so muss diese Natürlich vor der Vermehrung in DNA umgeschrieben werden. Hierzu sind die Reversen Transkriptasen notwendig. Ganz am Ende, wenn keine weitere Aktivitätssteigerung mehr erreicht wird, wird die RNA in eine cDNA umgeschrieben und sequenziert. Erst dann ist die Sequenz des Gewinners bekannt.



Neben der Selektion von DNA oder RNA Molekülen, die kleine organische Moleküle oder Proteine binden, können auch Oligonukleotide generiert werden, die katalytische Funktionen besitzen. Unten z. B. ein Selektionsschema, das es gestattet Oligonukleotide mit selbstmodifizierenden Eigenschaften zu generieren. Im unteren Beispiel werden aus einer RNA-Bibliothek nur die Moleküle herausgefiltert, die schaffen sich mit dem in Lösung angebotenen komplementären DNA, oder RNA

Strang zu ligieren. Diese RNA Moleküle werden mit dem an der Säule befindlichen Oligonukleotid hybridisieren und so zurückgehalten.



In diesem Beispiel wurden schon nach nur 3 Runden aktive RNA Moleküle isoliert.

Ein besonderer Trick ist es, die Oligonukleotide, die in den Runden isoliert werden während der Amplifikation erneut leicht zu verändern. So kann der Pool an aktiven Verbindungen nachrandomisiert werden. Das gelingt mit Hilfe der mutagenen PCR. Hier werden die PCR Bedingungen so eingestellt, dass die Polymerase während des Kopiervorganges Fehler macht. Die Fehlerrate z. B. 1 pro 20 Basenpaare kann durch die Wahl der Bedingungen eingestellt werden. Im obigen Beispiel wurde nach jeder Runde der Selektionsdruck, durch Verkürzung der Ligationszeiten erhöht.

Was bringt die Nachrandomisierung?

Die komplette Randomisierung eines 220meren Oligonukleotid würde 10^{132} Varianten (4^{220}) ergeben. Diese Zahl ist nicht realisierbar, da man Tonnen an RNA bräuchte um von jeder möglichen Variante eine Spezies vorliegen zu haben. Man kann „nur“ 10^{15} „Individuen“ produzieren. Aus diesem limitierten Pool werden die aktivsten isoliert, dann werden die aktivsten durch mutagene PCR erneut leicht verändert. Man sagt, der Pool evolviert oder man sucht dann in einem lokal begrenzten Sequenzraum.

Diese Art der Auffindung aktiver Oligonukleotide ist vor allem bei Forschern, die sich für Präbiotische Chemie interessieren auf großen Interesse gestoßen. Man geht

heute davon aus, dass die ersten Lebensformen auf der Erde kleine selbstreplizierende RNA-Sequenzen waren. Mit der Methode gelingt es nun möglicherweise solche RNA-Moleküle zu erzeugen um sie dann studieren zu können. Evolution im Reagenzglas könnte uns helfen die Entwicklung des Lebens auf der Erde nachzustellen, so der Traum einiger Forschergruppen.

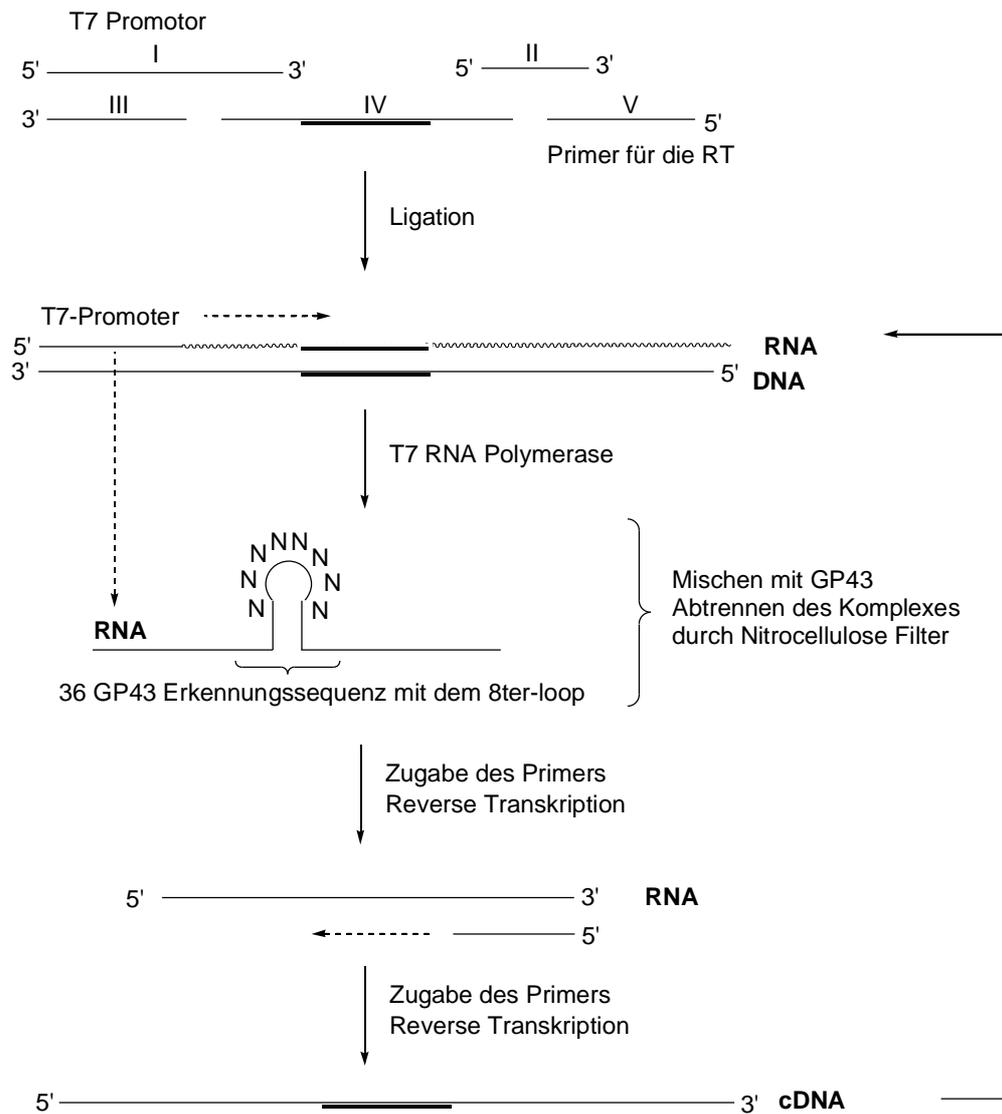
3.2.1 Ein komplizierteres SELEX Beispiel

Isoliert wurde ein Protein mit dem Namen GP43. Es handelt sich um eine T4-DNA Polymerase, die eine *m*-RNA mit einer Haarnadelstruktur erkennt und dann bindet. Durch diese Bindung wird die Translation am Ribosom gestört. Der Prozess ist eine Autoregulation. Die Bindung der Polymerase an einen 36-Teilbereich der *m*-RNA mit dem 8 Nukleotid enthaltenden Loop ist allerdings nur relativ schwach. Ziel der Forschungsarbeiten ist es ein Motiv zu finden, an das die Polymerase wesentlich stärker bindet. Hierzu sollten evolutive Methoden verwendet werden.

Zuerst wird ein 110mer langes DNA Templat durch Ligation dreier Fragmente (III, IV und V) erzeugt. Das Fragment IV enthält eine randomisierte 8-ter Sequenz innerhalb des 36-mers, das für die Bindung benötigt wird. Das heißt, es wurde eine relativ kleine Bibliothek aus $4^8 = 65'536$ Molekülen erzeugt. Das für die Ligation benötigte Oligonukleotid I enthält den T7-Promotor. Nach der Ligation, wird mit Hilfe des Oligos I und der T7 RNA Polymerase ein 92-mer RNA Stück erzeugt. Nach dem Mischen der Bibliothek mit dem Protein GP43, werden die gebundenen RNAs durch Filtration durch Nitrocellulose abgetrennt (der Komplex bleibt haften). Umschreiben der RNA in cDNA, gelingt nach Zusatz von Oligo V, welches als Primer für die Reverse Transkriptase dient. Dann folgt PCR, umschreiben der cDNA in RNA und erneute Selektion. Schon nach vier Runden wurde eine RNA isoliert die mit $K_d = 5 \times 10^{-9}$ an das Protein bindet. Die Sequenz dieser erzeugten RNA wird nach umschreiben in cDNA durch Dideoxysequenzierung ermittelt (s. u).

Wildtyp: 5'-CAAG-AGCCUAAUAACUCGGGCU-AUAACUAAGGAAU-3'

Variante: 5'-CAAG-AGCCUAGCAACCUGGGCU-AUAACUAAGGAAU-3'



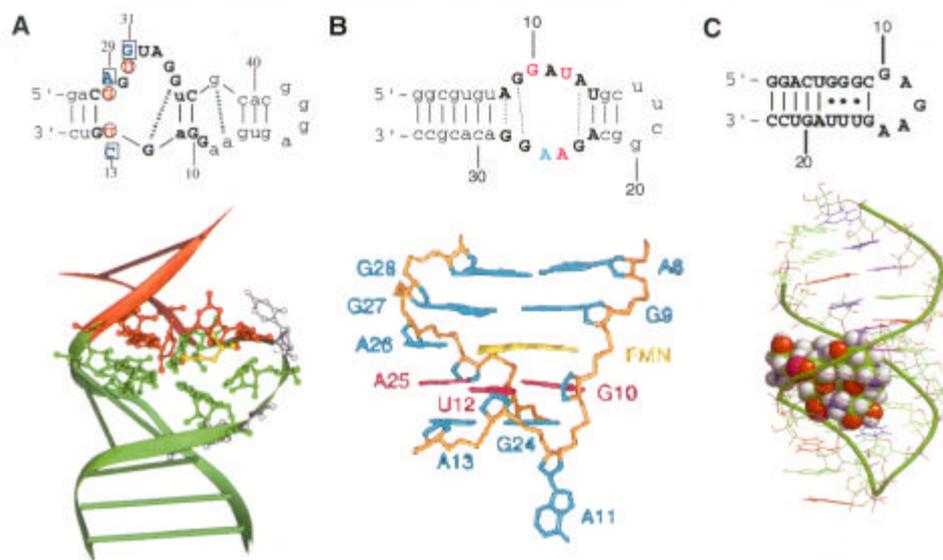
3.3 Aptamere und Intramere

RNA und auch DNA kann ähnlich wie ein Protein in eine definierte dreidimensionale Struktur falten. Im Unteren Bild sind Aptamere dargestellt, die durch das SELEX Verfahren entwickelt wurde. Diese Aptamere erkennen hochspezifisch kleine organische Moleküle wie A: Citrullin, B: Flavinmononucleotid und C: Neomycin B. Die Strukturen der RNAs wurden mit Hilfe der NMR Spektroskopie (B und C) bestimmt.

Heute lassen sich mit Hilfe der SELEX Prozedur RNA-Moleküle generieren, die jedes beliebige Molekül molekular erkennen und hochspezifisch binden. Hierbei wird nicht nur ein RNA Molekül generiert sondern eine ganze Vielzahl. Durch vergleichen der „aktiven“ RNAs erhält man Motive, die für die selektive Bindung verantwortlich sind.

Z. B. das Citrullin bindende Aptamer in Abbildung A. Die großgeschriebenen Buchstaben zeigen Positionen an, die hochkonserviert in allen aktiven, selektierten RNAs gefunden wurden. Variable Positionen werden durch kleingeschriebene Buchstaben repräsentiert. Durch „Mutationsstudien, können die für die Selektivität Arginin vs. Citrullin verantwortlichen Bausteine ermittelt werden. Es sind die roten, eingezirkelten Positionen.

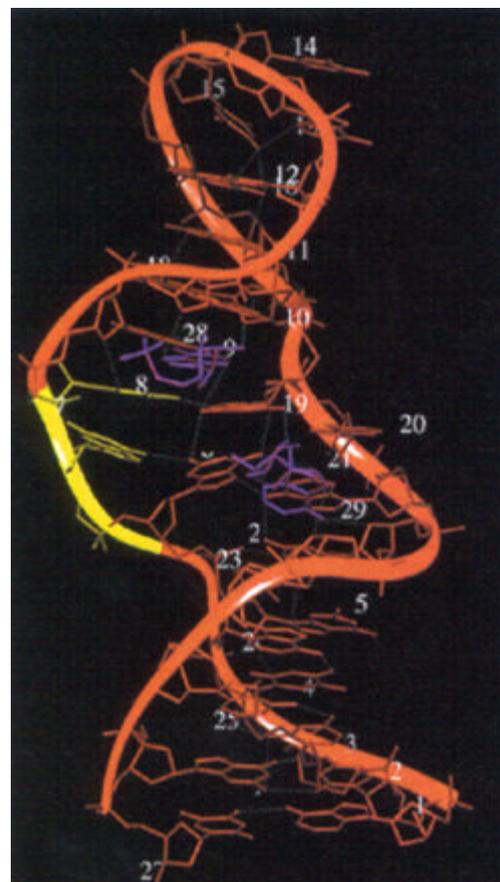
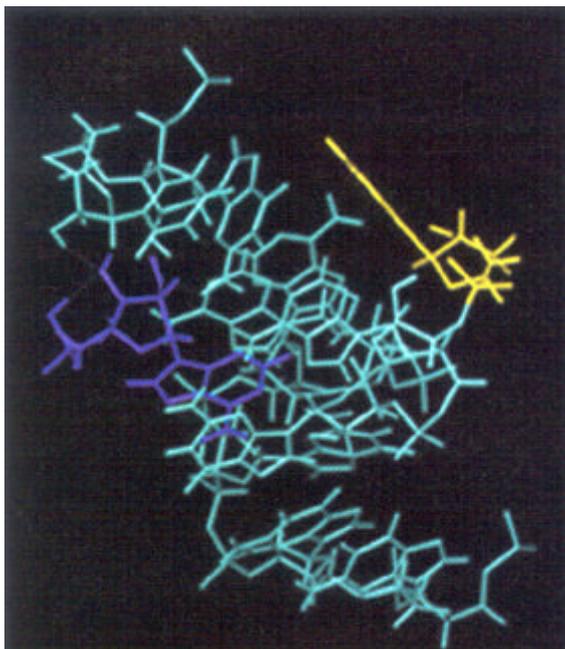
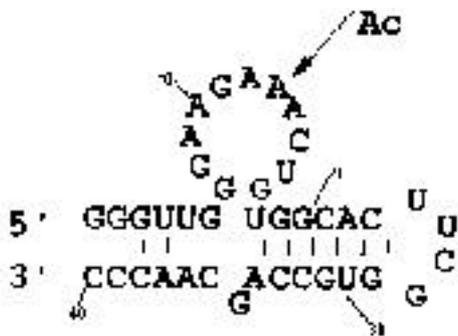
Die Fähigkeit Aptamere zu erzeugen, die hochspezifisch bestimmte Moleküle erkennen können, stößt zunehmend in der Diagnostik auf Interesse. Alle RNA-Moleküle scheinen Ihre Substrate mit Hilfe eines *induced fit* Mechanismus zu binden.



Zur Zeit werden vor allem Aptamere selektiert, die ein bestimmtes Protein selektiv binden und dessen Funktion inhibieren. Nach der Bestimmung der bindenden Domänen, können weitere RNA-Sequenzen eingebaut werden die den zellulären Abbau der RNAs in der Zelle behindern. Das ganze RNA Konstrukt wurde anschließend in cDNA umgeschrieben und in eine Zelle transportiert. In der Zelle wird die DNA abgelesen und in die RNA umgeschrieben. Man hat nun die aktive RNA in der Zelle vorliegen. Findet diese ihr Target und bindet, so lässt sich studieren, welche Funktion ein Protein in der lebenden Zelle wirklich hat. Solche in der Zelle aktiven Aptamere nennt man neuerdings Intramere (M. Famulok).

Für den Einsatz von Aptameren in der Diagnostik wird zur Zeit versucht, die bindenden Aptamere mit Fluoreszenzsonden auszustatten. Diese Moleküle fluoreszieren nach der Lichtanregung. Es wird versucht, RNA-Moleküle zu

entwickeln, die nach der Bindung des Substrates eine Veränderung der Fluoreszenz erzeugen. Die Gruppe von A. D. Ellington, hat kürzlich (JACS, 2000, 122, 2469-2473) ein Adenosin bindendes Aptamer mit mehreren verschiedenen Fluoreszenzsonden an verschiedenen Stellen ausgerüstet und die Fluoreszenz vor und nach der Bindung von Adenosin studiert. Tatsächlich zeigte ein RNA-Derivat (APTR-R-Ac13) eine starke Verstärkung der Fluoreszenz nach der Substratbindung. Die Abbildung zeigt die durch NMR ermittelte Struktur des Adenosin-bindenden Aptamers. Das Nukleotid in der blau gekennzeichneten Position wurde durch die Ellington Gruppe durch ein Acridin ersetzt (APTR-R-Ac13).



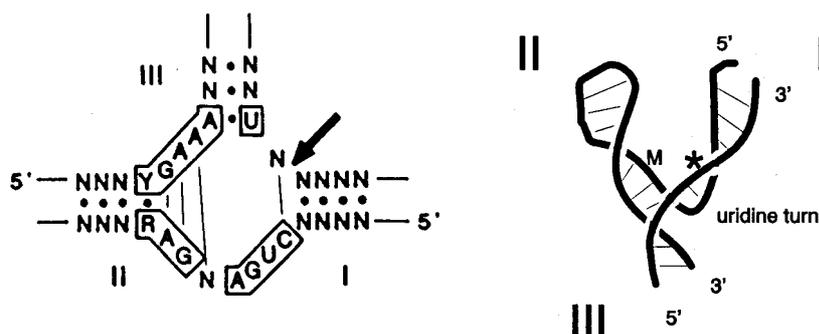
Die an Position 13 Acridin-modifizierte RNA zeigte nach Zugabe von ATP eine Fluoreszenzzunahme von 80%. GTP führt nicht zur Verstärkung der Fluoreszenz (Selektivität). Die Fluoreszenzzunahme im Fall von ATP ist abhängig von der Konzentration an ATP (JACS 2000, 122, 2469).

Die Bindung des ATP an das Aptamer, verändert demnach dessen Struktur (*induced fit*). Da die Fluoreszenz des Acridins stark von dessen Umgebung abhängt, lässt sich diese Strukturänderung als Änderung des Fluoreszenzverhaltens detektieren. Es ist entscheidend, dass der Fluorophor so angebracht wird, dass er die Bindung nicht stört und dennoch maximal von der konformativen Änderung des Aptamers beeinflusst wird.

3.4 Aptamere und Ribozyme

Als Ribozyme wird eine Klasse von RNA-Molekülen bezeichnet, die in der Lage ist die Phosphordiesterbindung in RNA zu spalten. Es handelt sich entweder um ein Intron, das sich selber aus der prä-mRNA herauspleißt oder um freie RNA Moleküle, die RNA-Stränge schneiden. Ein bekanntes Beispiel für ein Ribozym ist das Hammerhead-Ribozym. Beim Hammerhead Ribozym greift die 2'OH-Gruppe die Phosphordiester-Bindung an unter Bildung eines pentakoordinierten Phosphors. Dann findet die Spaltung statt.

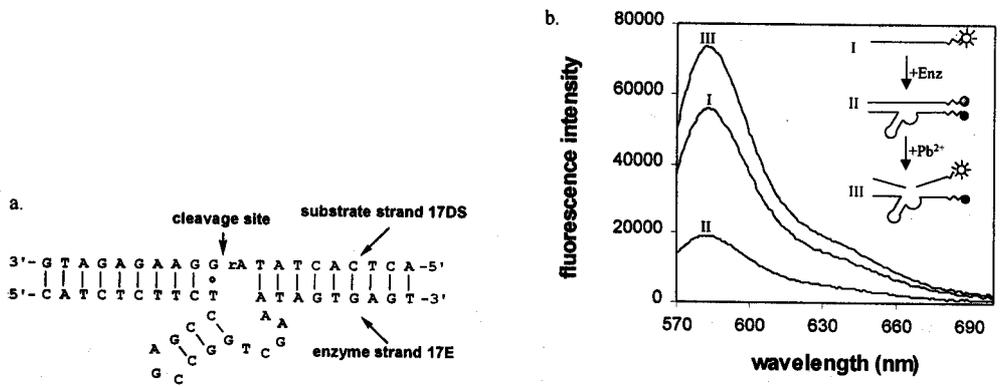
Die Hammerhead-Ribozyme sind in der Regel relativ kleine Y-förmige RNA-Moleküle. Die Basen sind involviert in zum Teil nicht-Watson-Crick artigen H-Brücken. Die Abbildung zeigt ein Hammerhead Ribozym. Indiziert sind die für die katalytische Aktivität essentiellen Positionen. Die Linien in der Abbildung repräsentieren die H-Brücken.



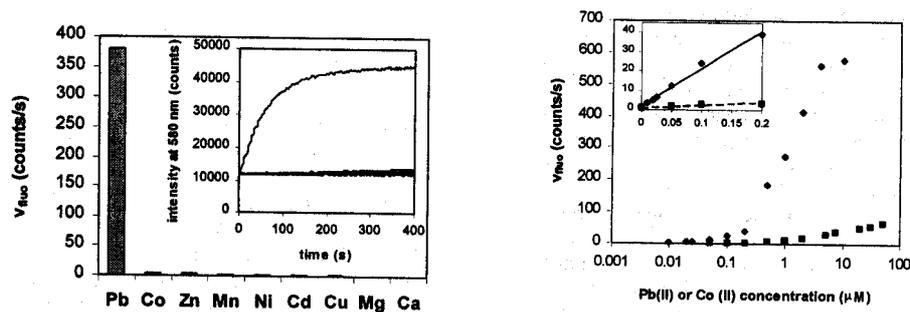
Eine neue Entwicklung ist die Kombination eines Aptamers, das eine kleine Verbindung erkennt mit einem Hammerhead Ribozym. Durch die Konformationsänderung des Aptamers soll die katalytische Funktion des Ribozyms geschaltet werden. Kleine Moleküle modulieren die katalytische Funktion. Das nennt man allosterische Regulation. Das Fernziel ist die Entwicklung von allosterisch geschalteten Intrameren. Man hätte dann zelluläre Schalter mit denen je nach Zellstatus (An- oder Abwesenheit eines bestimmten kleinen Moleküls, die Funktion des Intramers geschaltet werden könnte (Stichwort: Conditionale Mutagenese).

Weitere moderne Entwicklungen:

1. Durch den Einbau unnatürlicher Bausteine in die RNA sollen Verbindungen mit größerer Stabilität erzeugt werden.
2. Ribozyme werden selektioniert, deren katalytische Aktivität durch Metallionen gesteuert wird. Derartige Verbindungen wären Sensoren für z. B. Ca^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} . Ein sehr schönes Beispiel für derartige Arbeiten wurde kürzlich publiziert JACS 2000, 122 (42) 10467.



Es handelt sich um ein DNA-Ribozym, welches sich aus zwei Strängen zusammensetzt. Der erste Strang enthält einen Fluorophor (TAMRA) und einen einzigen RNAs-Baustein, der eine Spaltung erlaubt. Der zweite Strang enthält einen Fluoreszenzlöscher (DABCYL). Liegen beide Stränge im Komplex vor, so wird die Fluoreszenz des TAMRA gelöscht. In Gegenwart von Pb^{2+} , wird die spaltende Aktivität des Ribozyms entfaltet. Der TAMRA enthaltende Strang wird gespalten. Das TAMRA Bruchstück wird freigesetzt. Der Fluorophor beginnt zu fluoreszieren (580 nm). Hochselektiv wird Pb^{2+} von diesem Ribozym erkannt. Das Detektionslimit beträgt ca. 10 nM.

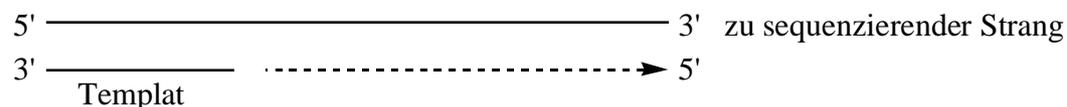


Die erste Abbildung zeigt wie spezifisch das DNA-Aptamer das Pb²⁺ im Vergleich zu anderen Metallionen erkennt. Die zweite Grafik zeigt die Response-Kurve. Zunehmende Konzentrationen an Pb²⁺ führen zu einer stärkeren Fluoreszenz über die Zeit. Deutlich wird vor allem das niedrige Detektionslimit.

Exkurs: Didesoxysequenzierung

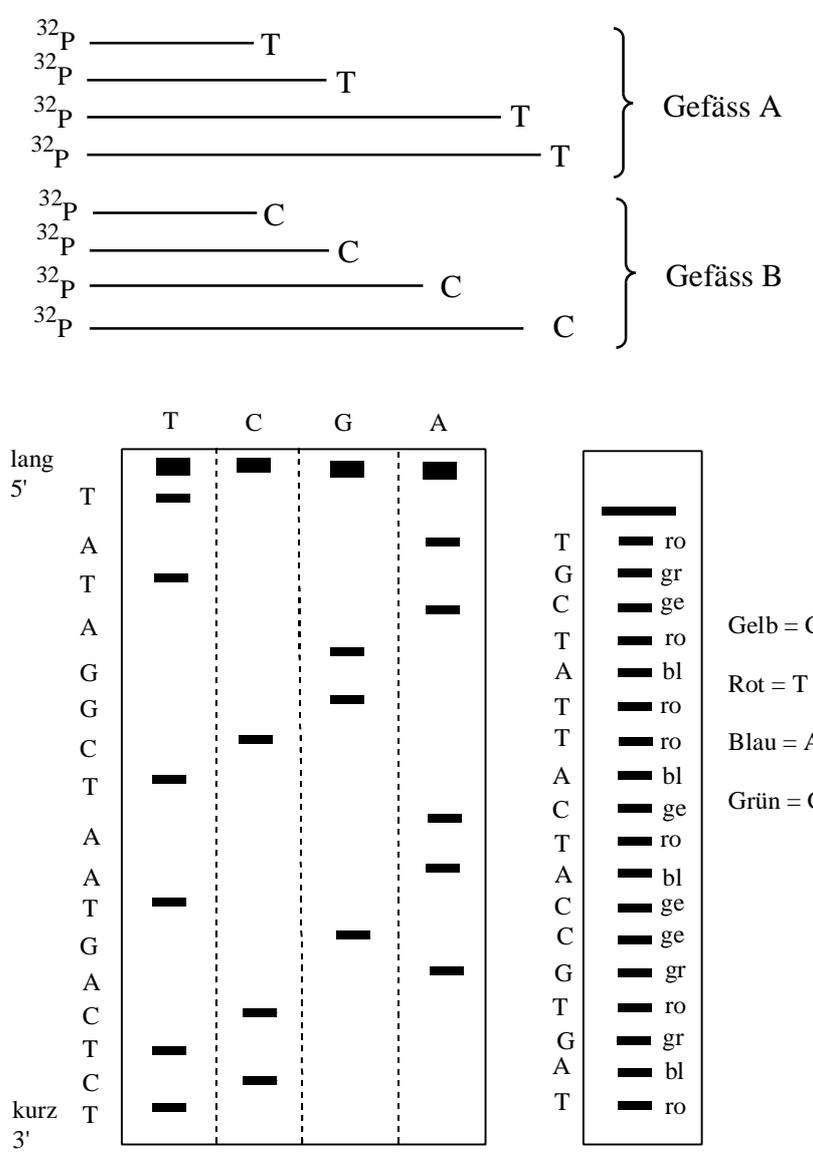
Der Erhalt von DNA oder RNA Sequenzinformationen gehört zu den wichtigsten molekularbiologischen Arbeiten. Heute sind bereits die kompletten Gensequenzen einer Reihe ganzer Organismen (z. Z. 40) bekannt. Hierzu gehören viel Bakterien wie *E. coli* oder *Methanobakterium thermoautotrophikum*. Aber auch das komplette Genom der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* ist bald komplett bekannt. Das menschliche Genom wurde von der Firma Celera, die Craig Venter gehört, zu ca. 97% aufgeklärt.

Heute wird eigentlich nur noch mit Hilfe von Polymerasen und Didesoxynucleotiden sequenziert.



Der zu sequenzierende Strang wird zunächst, wenn nötig mit Hilfe der PCR, vermehrt. Abschließend wird die Menge an DNA auf vier Reaktionsgefäße verteilt. In jedes Gefäß wird der radioaktiv markierte (³²P) Templatstrang zugegeben. Es wird kurz erhitzt und dann abgekühlt um das Annelieren zu ermöglichen. In jedes Reaktionsgefäß wird anschließend eine Mischung der vier dNTP Bausteine gegeben. Dann wird je eine sehr kleine Menge eines 2', 3'-Didesoxybausteins zugegeben. Also

entweder Didesoxythymidin-5'-triphosphat, Didesoxycytidin-5'-triphosphat, Didesoxyadenosin-5'-triphosphat oder Didesoxyguanidin-5'-triphosphat. In jedem Reaktionsgefäß wird nach Zugabe der Polymerase enzymatisch der zu analysierende Strang transkribiert. In jedem Reaktionsgefäß entstehen nun Kopien des Stranges. Immer dann, wenn die Polymerase zufällig einen Didesoxybaustein einbaut, entsteht jedoch eine kürzere Abbruchsequenz, da der Strang nicht verlängert werden kann. Im Reaktionsgefäß 1 kann das nur an den Positionen erfolgen in denen sich ein T befindet, im Gefäß 2 nur an jeder Position mit einem C etc.. Anschließend werden die Oligonukleotide durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Man erhält vier sogenannte Oligonukleotideleitern.

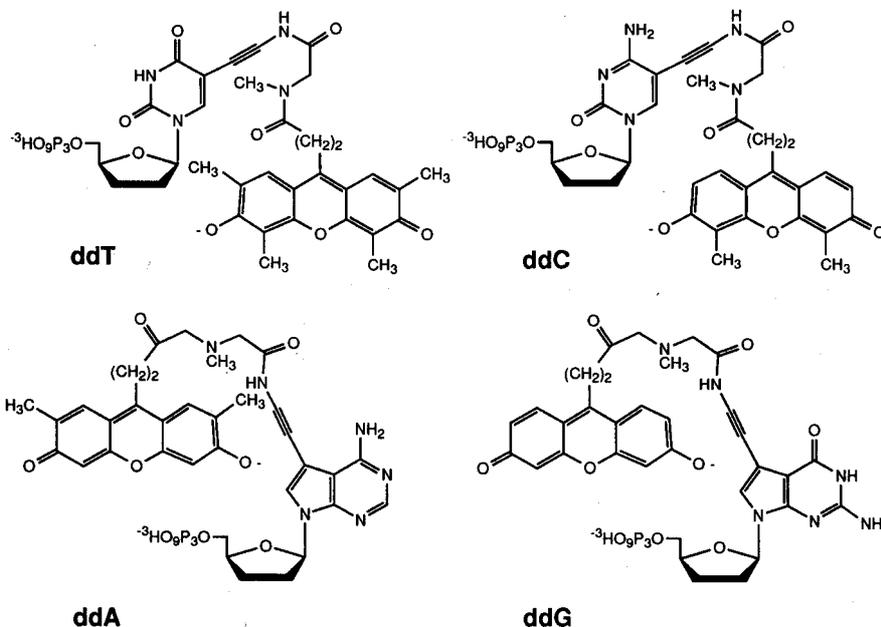


Auf der linken Seite ist ein Beispiel für ein Sequenzigel schematisch dargestellt. In jeder Spur finden sich die jeweiligen Abbruchsequenzen. Ganz oben läuft der unverkürzte Strang. Geht man von unten nach oben durch das Gel und hüpft dabei die „Balkenleiter“ nach oben, so ergibt sich die Sequenz.

Heute werden kaum noch radioaktiv markierte Stränge für die Sequenzierung eingesetzt. Zeitaufwendig ist in dieser Methode nämlich vor allem die Notwendigkeit jede Sequenzierung viermal durchführen zu müssen. Ökonomischer ist die Verwendung von fluoreszierenden Didesoxynukleotiden. Wird jedes Didesoxynukleotid mit einem anderen Fluorophor ausgestattet, so reicht eine einzelne Sequenzierreaktion mit jeweils allen vier ddNTP's für die vollständige Analyse aus. Man erhält dann nicht mehr einfarbige Spots und einfarbige Gele sondern ein vierfarbiges Bild. Eine Spur enthält durch die Farbdimension nun alle Informationen.

Zur Auftrennung lässt sich dann auch die Kapillarzonenoelektrophorese verwenden. Hier erhält man ein richtiges Chromatogramm mit Peaks in vier verschiedenen Farben. Jede Farbe steht für eines der vier Nukleotide.

Häufig verwendet werden die Bausteine die unten gezeigt werden.



Exkurs: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Die FRET Methode erlaubt es Distanzen in Biomolekülen zu bestimmen. Hierzu müssen in die Biomoleküle zwei Sonden eingeführt werden. Entweder wird die Distanz zwischen den Sondenmolekülen in einem Biomolekül gemessen und so der Abstand z. B. zwischen den Enden bestimmt, oder es wird die Distanz zwischen zwei Molekülen gemessen. Dann muss jedes Molekül mit einer Sonde ausgestattet werden. Damit lässt sich die Methode vor allem in der Assay-Entwicklung einsetzen. Wird ein Molekül während eines Prozesses durchgeschnitten und enthält es an jedem Ende, so kann der Schneidprozess zum Teil sogar in Echtzeit verfolgt werden. Die FRET Methode wird oft als molecular ruler bezeichnet und wird zur Zeit sehr intensiv überall angewendet.

Die FRET Method eignet sich vor allem zum Ausloten großer Abstände. Sie ist relativ ungenau und ermöglicht keine hochpräzisen Distanzaussagen. Der Fehler liegt je nach System bei $\pm 5\text{\AA}$.

In einem typischen FRET Experiment werden die interessierenden Stellen mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren verknüpft. Ein Fluorophor wird als Donor, der andere als Akzeptor bezeichnet. Die Absorption des Donors (z. B. 350 nm) erfolgt bei höherer Frequenz als die des Akzeptors (z. B. 450 nm). FRET bedeutet nun, dass die Singulett-Singulett Übergänge in Resonanz stehen. Gekoppelt sind die Absorptions-Übergangsdipolmomente des Donors und die Emissions Übergangsdipolmomente des Akzeptors. Die Anregungsenergie wird so nach einem walki-talki-Mechanismus vom Donor auf den Akzeptor übertragen. Wird die Anregungsenergie des Donor normalerweise über Fluoreszenz abgeben so erfolgt nun die Übertragung der Energie auf den Akzeptor. Die Fluoreszenz des Donor ist trotz gleich starker Anregung deutlich schwächer, man sagt sie ist gelöscht oder gequenscht. Die Löschung ist umso stärker je besser der Energietransfer ist. Die Energie führt zur elektronischen Anregung des Akzeptor. Fluoresziert dieser nicht, so, wird die Energie über andere akzeptortypische Kanäle wie z. B. einen Singulett-Triplett Übergang oder einfach *internal conversion* verloren. Gibt der Akzeptor seine Anregungsenergie in Form von Fluoreszenzlicht ab, so beginnt die Verbindung nach dem FRET zu fluoreszieren.

Die Effizienz des Energietransfers E_{FRET} wird durch die Formel unten beschrieben:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

R ist der Abstand zwischen den Fluorophoren. R_0 ist der sogenannte Förster Radius. Dieser Parameter ist Abhängig von der Wahl der Fluorophore. Der Förster Radius ergibt sich aus der Formel

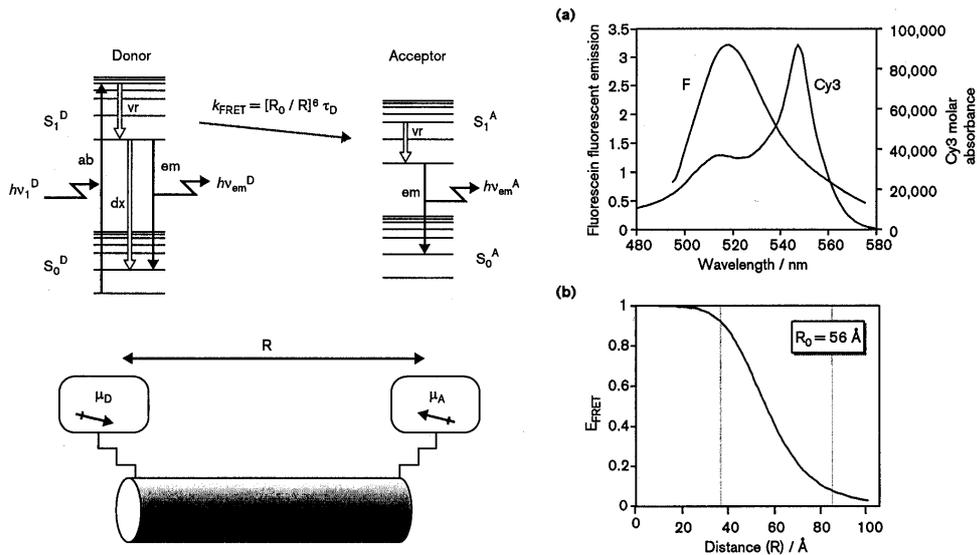
$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-23} \Phi_D \kappa^2 \eta^{-4} J(\lambda)$$

Φ_D ist die Fluoreszenzquantenausbeute (Beschreibt wieviel Anregungsenergie über Fluoreszenz abgegeben wird).

κ ist ein Orientierungsparameter, der die Anordnung der Übergangsdipolmomente beschreibt. Im Fall frei rotierender Fluorophore wird angenommen dass $\kappa = 2/3$ ist. κ kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen.

η ist der Refraktionsindex und beschreibt wie das Medium zwischen den Fluorophoren den Energietransfer beeinflusst. Hier wird für Wasser der Wert 1.33 bestimmt. Sind die Fluorophore z. B. in die DNA interkaliert so ändert sich der Wert auf 1.75.

$J(\lambda)$ beschreibt den spektralen Überlapp zwischen der Fluoreszenz des Donors und der Absorption des Akzeptors. Besonders gut ist der Energietransfer, wenn die das Fluoreszenzspektrum des Donors total mit der langwelligsten Bande des Absorptionsspektrums des Akzeptors übereinstimmt. Die Abbildung zeigt schematisch den FRET Vorgang. Die Abbildung rechts beschreibt die Situation des Überlappintegrals für ein typisches Donor Akzeptor Paar (Fluorescein/Cyanin3).



FRET Experimente werden am einfachsten mit Hilfe eines normalen Fluoreszenzspektrometers durchgeführt. Man beobachtet die Fluoreszenzintensität des Donors oder wenn möglich auch die Fluoreszenzintensität des Akzeptors. Komplizierter aber aussagekräftiger ist das Messen der Fluoreszenzabklingzeit. Hier erhält man eine Kurve die exponentiell gefittet werden kann. Monoexponentialität zeigt dann Energietransfer aus einer Konformation heraus. Multiexponentielles Fitten ermöglicht die Bestimmung aus wie vielen unterschiedlichen Konformationen heraus ein Energietransfer erfolgt. Natürlich wird auch der Fluorophor mit dem Biomolekül in Wechselwirkung treten und z. B. in die DNA interkalieren. Das hat dramatische Effekte. Wichtig ist also wo und wie der Fluorophor angeknüpft wird.

Für das Paar Fluorescein-Cyanin3 wurde die Energietransfereffizienz für jeden Abstand berechnet. Die Kurve ist oben (b) abgebildet. Aus dieser Kurve ergibt sich ein R_0 -Wert von 56 Å. Geht man davon aus, dass gute Messungen der Fluoreszenz im Messbereich 0.1% Fluoreszenz – 0.9% Fluoreszenz durchgeführt werden können, so ergeben sich Distanzen zwischen 35 Å - 85 Å die gut mit diesem speziellen Paar vermessen werden können.

Am einfachsten sind immer sogenannte steady state Experimente in denen eine kleine Familie ähnlicher Verbindungen studiert werden. Diskutiert wird dann nur der Effekt innerhalb der Familie. Hier ist die Umgebung der Fluorophore jeweils identisch. Viel komplizierter sind Experimente in denen das nicht gegeben ist. Die Fluoreszenzintensität ändert sich nämlich auch mit der Umgebung, so dass

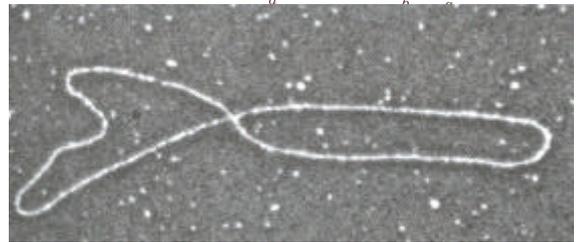
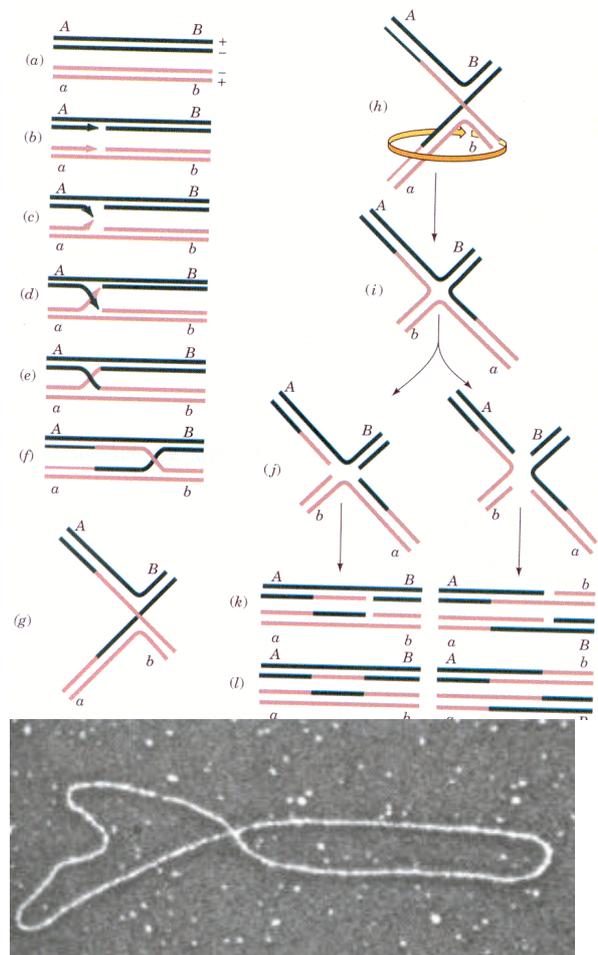
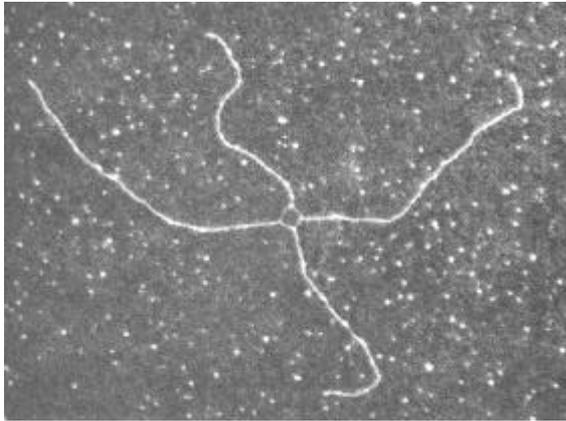
Ergebnisse durch derartige Einflüsse sehr ungenau werden können. Verschiedene Fluorophore verhalten sich hier sehr unterschiedlich. Manche kleben richtig am Biomolekül.

3.5 Struktur-Untersuchungen mittels FRET-Studien

Chromosomen sind nicht nur einfach die Speicher für die genetische Erbinformation. Unsere Erbsubstanz muss als ein in Bewegung befindlicher Informationsspeicher angesehen werden. Zwischen den einzelnen Chromosomen findet z. B. ein Austausch genetischer Information statt. Informationen auf einem Chromosom können in ein zweites integriert werden. Das ist besonders wichtig, wenn Doppelstrangschäden aufgetreten sind, die zu einem Informationsverlust an einer Chromosomenstelle geführt haben. In einem solchen Fall hilft es Organismen eine doppelten Chromosomensatz zu besitzen. Ist die Information auf einem Chromosom verloren gegangen, so gibt es noch eine Kopie auf dem zweiten, homologen Chromosom. Doch wie gelangt nun die noch intakte Information auf Chromosom A in das geschädigte Chromosom B?. Notwendig ist offensichtlich ein DNA Austausch zwischen den Chromosomen. Diesen Prozess nennt man Homologe Rekombination.

Genetisches Material wird über Holliday-Junctions (Robin Holliday 1964) zwischen Genabschnitten ausgetauscht. Der Prozess ist schematisch unten gezeigt. Zuerst wird jeweils ein Strang der homologen Partner geschnitten. Die geschnittenen Stränge führen anschließend einen *cross-over* durch und paaren dann mit dem komplementären Strang im Nachbar-Gen. Nach der Bildung der Heteroduplexe, werden die Stränge ligiert. Der gebildete *cross-over* point kann dann wandern. Man nennt das branch-migration. Durch nachfolgende Umlagerung der Stränge am *cross-over* point, erneutes schneiden und ligieren, lassen sich DNA-Stücke zwischen Chromosomen austauschen. Die Untersuchungen der mit diesem Prozess verbundenen konformationellen Umlagerungen ließ sich hervorragend mit er Fret

Methode durchführen. Hierzu wurden Fluoreszenzsonden an den Enden der DNA-Stränge befestigt. Anschließend wurde durch Zugabe von Zellextrakten oder aufgereinigten Proteinen der Rekombinationsprozess gestartet.



Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang das Protein RecA (352 Aminosäuren). Es ist ein in E.coli für die homologe Rekombination essentielles Protein. RecA bildet mit einzelsträngiger DNA ein Filament indem sich viele RecA Proteine wie Perlen um den DNA-Strang winden. Trifft ein homologer DNA-Doppelstrang auf das Filament so wird ein Strangaustausch unter Hydrolyse von ATP ermöglicht (RecA ist deshalb eine ATPase). Ein schneiden und ligieren der DNA ist hier nicht nötig.

Zur Untersuchung des RecA unterstützten Prozesses wurden Oligonukleotide hergestellt, die mit Fluorescein (Donor) und Hexachlorfluorescein (Akzeptor) ausgestattet wurden (Biochemistry 1998, 37 (33), 11692):

5'-GCACCAGATTCAGCAATTAAGCTCTAAGCC-F-3'

3'-CGTGGTCTAAGTCGTTAATTCGAGATTCGG-H-5'

Die Fluoreszenz des F-Donor wird durch die Nachbarschaft zum H-Akzeptor stark gelöscht.

Anschließend wurde ein homologes 50-mer hergestellt und mit RecA vor-inkubiert.

Es bildet sich dann das Filament. Zu diesem wurde der obige Doppelstrang gegeben. Findet Stranginvasion des 50-meren in den 30-er Doppelstrang statt, so werden der Donor und der Akzeptor getrennt. Man beobachtet dann zunehmende F-Fluoreszenz.

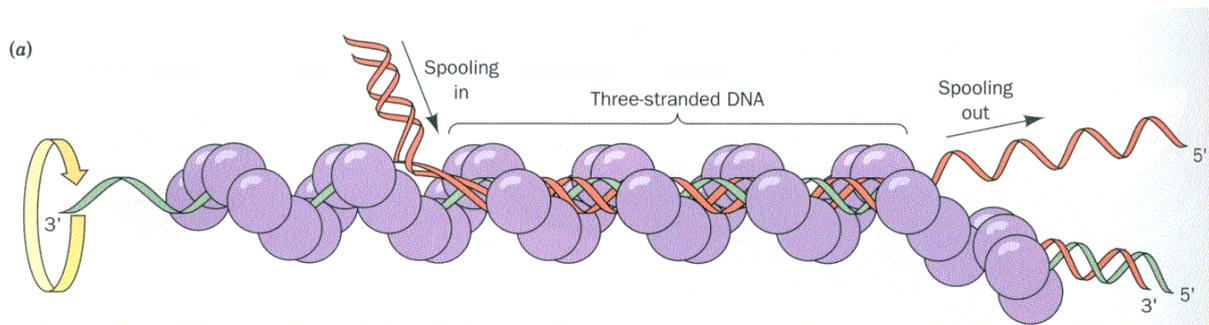
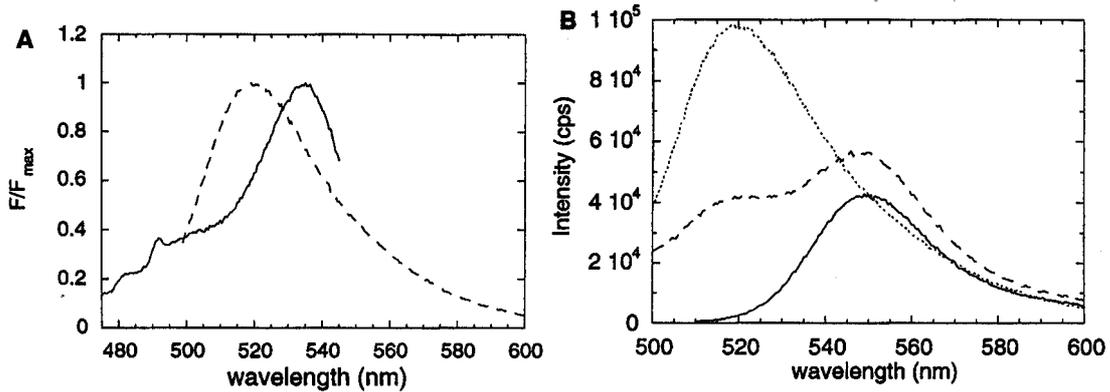
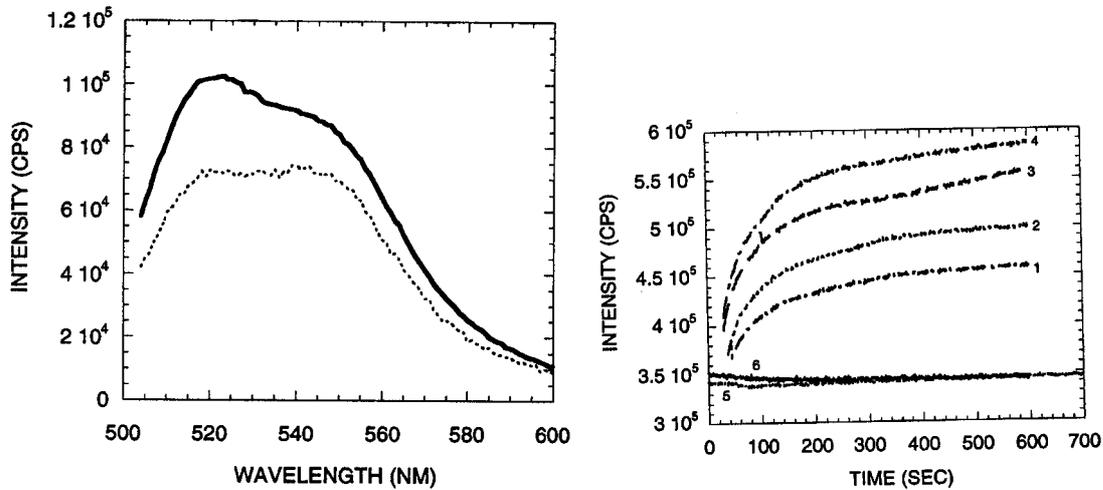


Abbildung A zeigt das Emissionsspektrum des Donors F (gestrichelte Linien, Anregung bei 492 nm) und das Absorptionsspektrum des Akzeptors H (durchgezogene Linie). Deutlich zu sehen ist die gute Überlappung beider BANDEN; die einen effizienten Energietransfer erwarten lässt. Abbildung B zeigt das Emissionsspektrum des Doppelstranges mit jeweils nur dem Donor (dotted, F) und dem Akzeptor (solid, H). Das 30-mer mit beiden Sondenmolekülen liefert das gestrichelte Spektrum. Deutlich zu sehen ist die gelöschte Donorfluoreszenz und die leicht gestiegene Akzeptorfluoreszenz.

11696 *Biochemistry*, Vol. 37, No. 33, 1998



Betrachtet man das Emissionsspektrum des 30-mer Doppelstranges alleine und nach Zugabe des 50-mer RecA Filaments so ergeben sich die Spektren der unten links gezeigten Abbildung. Gepunktet, vor der Zugabe, durchgezogen nach der Zugabe. Deutlich zu sehen ist die leichte Zunahme der Donorfluoreszenz. Das ist der FRET Effekt. Wenn auch schwach in diesem Fall, so lässt sich die Stranginvasion doch gut beobachten. Unten rechts sind Spektren gezeigt, die nach Zugabe von steigenden Mengen des 50-mer Filamentes zum 30-mer Doppelstrang erhalten wurden.



1 μM 30-mer, 50-mer Filament: 0.1 μM , 0.25 μM , 0.3 μM und 0.5 μM). Die unteren Kurven zeigen Kontrollmessungen mit poly(dT). $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$.

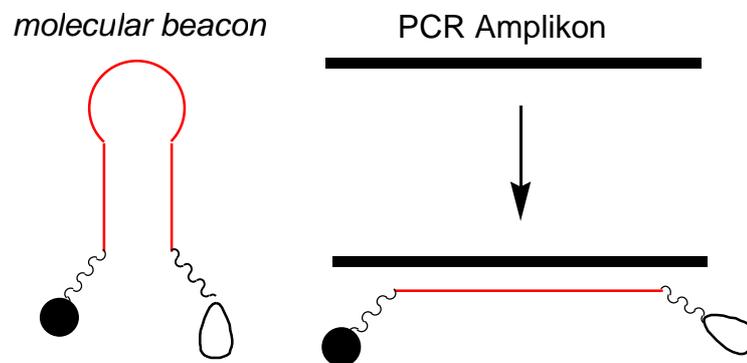
3.6 Genomanalysen mit Hilfe von FRET-Sonden

Nach der nahezu kompletten Entschlüsselung des menschlichen Genoms ist es zukünftig von besonderem Interesse schnelle Methoden zur Hand zu haben mit denen einzelne Personen auf Genvariationen hin untersucht werden können.

Individuelle genetische Varianzen, bei denen es sich oft nur um den Austausch einer einzelnen Base handelt müssen detektierbar werden, da diese Genvarianzen für Krankheitsdispositionen verantwortlich gemacht werden. Man spricht von *single nucleotide polymorphisms* (SNP). Gewünscht ist eine schnelle detektion einzelner SNP's im Genom der Patienten. SNP Detektion könnte der Beginn einer individualisierten Therapie im Krankheitsfall sein, so die hochfliegenden Hoffnungen. Neueste Entwicklungen schlagen zur Lösung des Analytikproblems die sogenannte Spektrale Genotypierung (*spectral genotyping*) vor.

Bei dieser Method wird Patienten-DNA in Gegenwart fluoreszierender Analyse DNA durch PCR amplifiziert. Der Trick bei der SNP Detektion während der Vervielfältigung besteht im Design einer kleinen Analyse-DNA-Sequenz sogenannter molekularer Leuchtsignale (*molecular beacons*). Ziel es, die Anwesenheit bestimmter DNA-Sequenzen durch ein Fluoreszenzsignal detektierbar zu machen. Diese molecular beacons sind Haarnadel-artige DNA-Strukturen. Haarnadel-förmige DNA besteht aus einem selbtskomplementären Stamm und einer Loop-Region. In Lösung faltet sich der DNA-Strang auf Grund der selbstkomplementären Stammsequenz zu einer Haarnadelstruktur auf. Bei den *molecular beacons* handelt es sich um Haarnadel-förmige DNA, welche an ihren Enden jeweils zwei Fluorophore trägt. Der eine ist ein fluoreszierender Baustein, der wenn er in die Nähe des zweiten Chromophors kommt, seine Anregungsenergie durch FRET an den zweiten Chromophor abgibt. Die derzeit gebräuchlichsten *molecular beacons* werden zum einen mit Fluorescein, oder Tetramethylrhodamin als Donor und mit Dabcyl als Akzeptor ausgestattet. Dabcyl fluoresziert selber nicht, so dass der Akzeptor in diesem Fall als Fluoreszenzlöcher fungiert (Die Löschung der Fluoreszenz beruht wohl auf einem Elektronentransfer zwischen dem Fluorophor und dem Dabcyl). In der Haarnadelstruktur sind die beiden Chromophore eng benachbart angeordnet. Die Fluoreszenz des Donor ist vollständig gelöscht. Entsteht nun während der PCR ein DNA-Strang, der vollständig komplementär zur Haarnadel-DNA ist, so wird die Haarnadelstruktur aufgefaltet und es bildet sich der Doppelstrang, in dem nun auch die Basen der Haarnadel-Schleife Basenpaarungen eingehen können. Dadurch werden die beiden Chromophore voneinander getrennt. Die Fluoreszenzlöschung wird aufgehoben. Der Fluorophor beginnt zu fluoreszieren, was dem Experimentator anzeigt, dass sich die gewünschte komplementäre DNA des Patienten vorhanden ist.

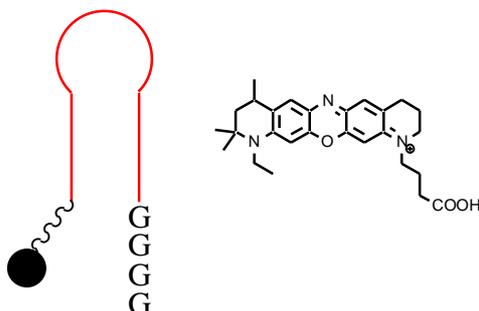
Die Paarungseigenschaften der molecular beacons können so eingestellt werden, dass bereits eine einzelne Fehlpaarung nicht zur Öffnung der Haarnadelstruktur führt. Auf diese Art-und-Weise lassen sich sogar einzelne Basenunterschiede detektieren.



Alternativ zur zweifachen Modifizierung des Hairpins können auch Donorfarbstoffe verwendet werden, die in Anwesenheit von G-Basen nicht mehr fluoreszieren. Die Basis dieser Fluoreszenzlöschung ist ein Elektronentransfer vom G (unter Bildung des G-Radikalkations) auf den lichtangeregten Fluorophor, der zum Fluorophor-Radikalanion reagiert und als solcher nicht mehr fluoresziert. Viele heute bekannten Farbstoffe reagieren selektiv mit dem G, da es sich um die Base mit dem niedrigsten Oxidationspotential handelt.

Ein solcher zur Löschung der Fluoreszenz führender Elektronentransfer ist natürlich nur möglich, wenn der Fluorophor in Nachbarschaft zu den G's zu liegen kommt.

molecular beacon

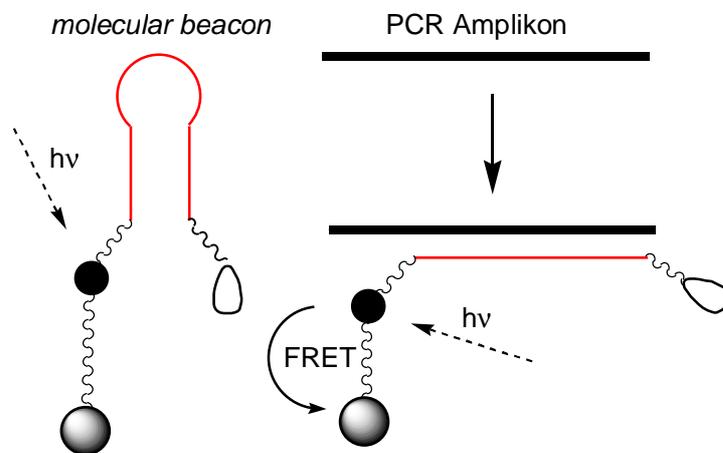


Das ist im Haipin der Fall. In der aufgefalteten Konformation, also wenn dieser molecular beacon mit dem vollständig komplementären DNA-Strang in der PCR-Reaktion reagiert, vergrößert sich der Anstand so sehr, dass ein

Elektronentransfer von den G's nicht mehr erfolgen kann. Nun erst beginnt der Chromophor zu fluoreszieren.

Problematisch bei dieser Analysemethode ist die sogenannte Hintergrund-Fluoreszenz. Auch wenn die Fluoreszenz nahezu vollständig gelöscht,so besteht doch ein Resfluoreszenz, die den Nachweis vor allem kleiner Mengen an Proben-

DNA sehr erschwert. Kürzlich wurden, zur Lösung dieses Problems die sogenannten wellenlängenverschobenen *molecular beacons* entwickelt.



Im Hairpin wird die Anregungsenergie auf den Löscher übertragen, der die Energie in Wärme umsetzt. In der offenen Form, wird die Energie nicht mehr auf den Löscher sondern einen zweiten Fluorophor übertragen, der dann nach dem FRET

fluoresziert. Experimenta haben gezeigt, dass in solchen molecular beacon, die Nachweisgrenze wesentlich verbessert werden kann, da die Restfluoreszenz bei der Wellenlänge des FRET Akzeptors deutlich geringer ist.

Ein Beispiel für ein derartiges Sonden-Oligonukleotid: Als Quencher wird, wie oft, Dabcyl verwendet. Als Lichtabsorber fungiert Fluorescein. Als Emitter kann dann Tetramethylrhodamin ($\lambda_{\max,em} = 575 \text{ nm}$), 6-Carboxyrhodamin ($\lambda_{\max,em} = 556 \text{ nm}$) oder Texas Rot ($\lambda_{\max,em} = 609 \text{ nm}$) verwendet werden. Um einen hocheffizienten Energietransfer zwischen beiden zu gewährleisten, müssen beide Fluorophore durch ein paar Nukleotide getrennt werden. Hier hat sich ein sieben Nukleotid langer Abstand als optimal herausgestellt. Anregungswellenlänge für das Fluorescein ist 488 nm (das liegt auch im Bereich des blauen Argonionenlaser oder Blaulicht emittierenden Leuchtdioden, an am häufigsten verwendeten Lichtquellen).

Ein Beispiel für die Bestimmung von Genotypen

Das menschliche Gen, das für den Chemokine Rezeptor 5 kodiert besitzt an Position 627 entweder ein T oder ein C. Auch an Position 630 befindet sich entweder ein C oder ein T. Daraus folgen vier Haplotypen --627--630--, nämlich -T-C--, --C-C--, --T-T-- und -C-T--. Jede Person hat zwei Chromosomen, so dass 10 unterschiedlich Basen Kombinationen möglich sind. Ziel ist es in jedem Individuum die jeweilig vorliegende Genkombination zu bestimmen.

Zur Unterscheidung werden 4 Allel-diskriminierende *molecular beacons* konstruiert. Jedes kann nur mit einem Haplotyp hybridisieren und jedes hat einen anderen

Fluoreszenzemitter. es wurden verwendet: 2 normale molecular beacons mit Fluorescein und Tetrachlorfluorescein und 2 FRET molecular beacons mit Fluorescein als Sammelchromophor und Tetramethylrhodamin bzw. Texas Rot als Emitter Fluorophore.

Nun wird die DNA von verschiedenen Individuen per multiplex DNA in Gegenwart der *molecular beacons* vervielfältigt. Nur einer der beacons fluoresziert im Fall des Vorliegens eines der vier homozygoten Genotyps. Im Fall des vorliegend von einem der sechs heterozygoten Fälle sind zwei der vier *beacons* am fluoreszieren.

Mit dieser Methode gelingt die Detektion von bis zu 10 unterschiedlichen Genotyps in einem einzelnen Multiplex Assay.

Genotyp	Fluorescein	Tetrachloro-fluorescein	Tetramethyl-rhodamin	Texas Rot	Number of human DNA samples matching this pattern
--T-C--/--T-C-	0.95	0	0.05	0	6
--C-T--/--C-T-	0	1.00	0	0	0
--C-C--/--C-C-	0	0	1.00	0	4
--T-T--/--T-T-	0	0	0	1.00	0
--T-C--/--C-T-	0.51	0.49	0	0	0
--T-C--/--C-C-	0.77	0	0.23	0	11
--T-C--/--T-T-	0.73	0	0	0.27	1
--C-T--/--C-C-	0	0.68	0.32	0	0
--C-T--/--T-T-	0	0.56	0	0.44	0
--C-C--/--T-T-	0	0	0.45	0.55	2

Aus Fred Russell Kramer *Nature Biotechnol.* **2000**, 18, 1191-1196.

Weitere Anwendungen: Nachweis einer homozygoten 32-Nukleotid langen Deletion im β -Chemokin Rezeptor 5 Gen (*CCR5*), welches für eine gewisse HIV Resistenz verantwortlich ist. Die schnelle Nachweismöglichkeit des *CCR5D32* Allels erlaubt das schnelle testen auch grosser Populationen.

Messung der Verteilung des *CCR2-64I* Allels welches eine G nach A Substitution aufweist. Benötigt wird lediglich ein PCR Gerät, das auch Fluoreszenz beobachten kann. (F. R.Kramer, *Science*, **1998**, 279, 1228-1229)

Nimmt man eine einzelstängiges 7 Basenpaar langes Oligonukleotid, welches z.B. mit einem Fluoreszenzlabel versehen ist, so kommt es zur selektiven Markierung nur des komplett komplementären DNA-Gegenstücks in einem z. B. bis zu 10 kBp langen DNA Fragment (C. Lieber, *Nature Biotechnol.* **2000**, 18, 760-763).

3.7 DNA Chips

In der Zeit nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms ist das vordringliche Ziel die Nutzbarmachung der Information. Hierzu müssen, wie oben beschrieben, Techniken entwickelt werden mit denen Gensequenzen schnell und zuverlässig entschlüsselt werden können.

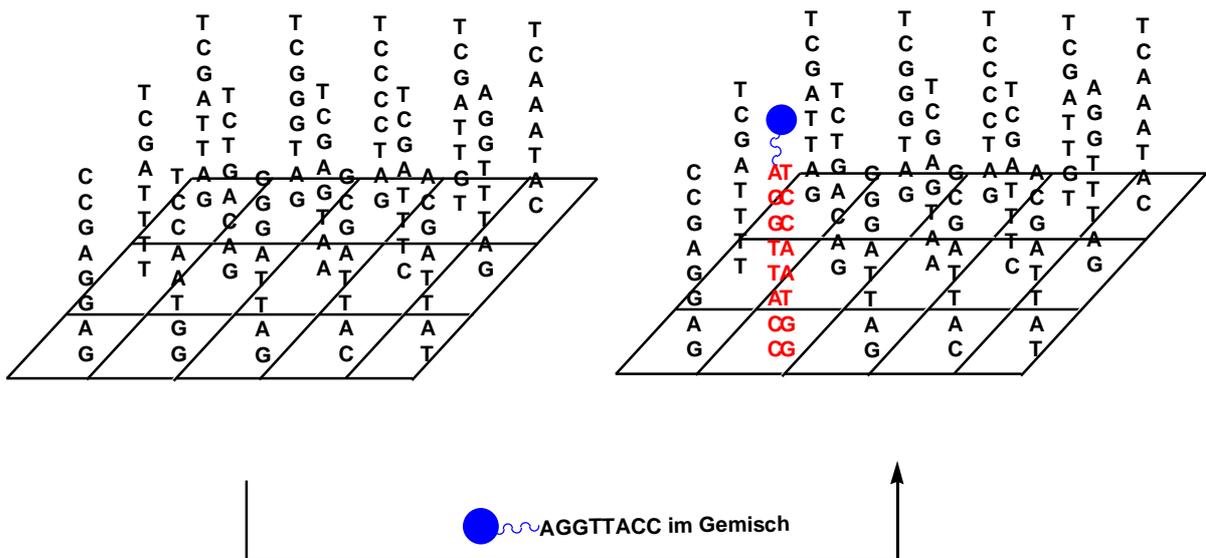
- Ein Ziel ist die schnelle Entschlüsselung bestimmter Genombereiche eines jeden Individuums. Hierzu ist es notwendig sehr viele Genomabschnitte auf einmal analysieren zu können. Das Ziel wird nur mit massiv parallel arbeitenden Techniken zur Genomanalyse zu erreichen sein.

- Ein zweites Ziel ist es den Genstatus von Zellen zu ermitteln. Durch Vergleich des Genstatus von gesunden Zellen mit dem von kranken Zellen sollen Unterschiede ermittelt werden, die es zukünftig gestatten sollen neue kausal agierende Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Nur durch den direkten Vergleich z. B. gesunder Nervenzellen mit Nervenzellen von Alzheimer Patienten kann es gelingen derartig komplexe Krankheiten zu verstehen. Das ist aber die Basis für die Entwicklung der angestrebten neuartigen Therapien. Zur Ermittlung des Genstatus muss die gesamte in der Zelle vorhandene RNA in DNA umgeschrieben werden. Anschliessend muss von jedem cDNA-Stück die Menge ermittelt werden. Auch dieses Problem ist nur mit massiv parallel arbeitenden Techniken zur Genomanalyse zu bewerkstelligen.

Vor einigen Jahren wurde zur massiven parallelen Bestimmung von Gensequenzen die DNA-Chiptechnik entwickelt. Glasplättchen werden hierzu in Segmente eingeteilt. In jedem Segment wird eine bestimmte Oligonukleotidsequenz an die Oberfläche angeknüpft. Auf einem kleinen vielleicht 2.5 x 2.5 cm grossen Glassplättchen werden bis zu 50'000 unterschiedliche Oligonukleotid-Sequenzen abgelegt. Diese Glasplättchen nennt man DNA-Chips.

Die DNA die analysiert werden soll, wird mit Hilfe der PCR vermehrt und anschliessend durch die Einwirkung von hydrolytisch aktiven Enzymen in kleine Fragmente geschnitten. An diese Fragmente wird mit Hilfe einer Ligase, z. B. der RNA-Ligase, die sehr unspezifisch ist, eine Fluorophor angeknüpft. Die so präparierte Analyse DNA wird anschliessend auf den Chip gegeben. Findet einer der fluoreszenzmarkierten Analyse-DNA Sequenzen das passende Gegenstück auf dem Chip so kommt es zur Hybridisierung, d.h. zur Ausbildung eines Doppelstranges. Die Bedingungen der Analyse werden so eingestellt, dass nur total komplementäre Stränge gebildet werden. Schon eine Fehlpaarung (mismatch) führt zum Ausbleiben der Doppelstrangbildung.

Bildet sich der Doppelstrang aus, so ist das entsprechende Segment auf dem Chip durch fluoreszierende Moleküle markiert. Ein entsprechendes Gerät bestimmt nun die Menge Fluoreszenz auf jedem Segment. Auf die Art-und-Weise können in einem einzelnen Experiment bis zu 50'000 unterschiedliche Gensequenzen überprüft werden.



Die Kunst bei der Herstellung der Chips ist die Belegung der Chips. Wie schafft man es 50'000 unterschiedliche Oligos in definierte Segmente auf den Chip zu bekommen. Zur Lösung des Problems gibt es derzeit zwei Wege:

- A) Synthese von 50'000 Oligo, die mittels eines Tintenstrahldrucker auf dem Chip positioniert werden.
- B) Photolithographische Synthese von Oligonukleotiden auf den Glasplättchen.

3.7.1 Moderne Medikamentenentwicklung

DNA-Chips oder DNA-Microarrays sind auf dem besten Weg unverzichtbare Hilfsmittel in der Pharmaforschung zu werden. Das Problem in der Pharmaforschung ist heute vor allem die Identifikation von Proteinen, die auf Grund eines Krankheitsstatus einer Zelle fehlen, oder stark vermehrt gebildet werden. Derartige Proteine sind für die Pharmaindustrie potentiell relevante Targets, deren Funktion man im Rahmen medizinisch-chemischer Projekte durch Wechselwirkung mit kleinen organischen Verbindungen -als neue Medikamente- gezielt beeinflussen möchte.

Heute ist die Targetsuche, das heisst das Auffinden krankheitsrelevanter Proteine, eines der strategisch wichtigsten Gebiete in der Pharmaforschung. Neben der Targetsuche kommt natürlich nachfolgend vor allem der Targetvalidierung besonderes Gewicht zu. Es muss geprüft werden, ob die Wechselwirkung mit einem mutmasslich krankheitsrelevantem Protein tatsächlich günstige Behandlungschancen eröffnet. Zur Targetvalidierung bedient man sich heute gerne der *knock-out* Maus Technologie. Hier wird eine transgene Maus erzeugt, der das Gen für das zuvor als krankheitsrelevant eingestufte Protein fehlt. Durch die Untersuchung dieser transgenen Maus lässt sich ermitteln welchen Effekt ein Medikament hätte, deren Ziel es wäre durch Wechselwirkung mit dem Protein dessen Funktion zu blockieren.

Die Medikamentenentwicklung von Morgen könnte also wie folgt aussehen. Zunächst wird durch ein Vergleich den Genstatus einer gesunden mit einer kranken Zelle krankheitsrelevante Proteine identifiziert, die in der kranken Zelle signifikant über- oder unterexprimiert vorliegen. Es werden Mäuse erzeugt, die das Krankheitsbild simulieren sogenannte Krankheitsmodelle. Von diesen werden *knock-out* Mäuse

erzeugt, denen die identifizierten Proteine fehlen, oder die die Proteine in jeder Zelle in grosser Menge produzieren. Durch das Studium dieser *knock-out* Mäuse werden die neuen Targets validiert. Zeigt sich, dass z .B. das Ausschalten eines der identifizierten Proteine sich günstig auf das Krankheitsbild auswirkt, so kann bereits das Gen für das Protein zusammen mit der Relevanz für die Krankheit patentiert werden. Erst dann beginnt die Untersuchung der Frage um was für ein Protein es sich eigentlich handelt, denn alle diese Studien sind ohne die genaue Kenntnis des relevanten Proteins durchführbar. Bei dieser Frage hilft die Bioinformatik weiter. Die Gensequenz wird hier mit Gensequenzen bekannter Proteine verglichen. Basierend auf einer starken Sequenzhomologie schlägt der Computer vor, um was für ein Protein es sich handelt (Protease, Rezeptor etc). Erst jetzt beginnt die medizinisch-chemische Arbeit. Das Protein wird isoliert, charakterisiert und kristallisiert. Ein Assay (*high throughput* wenn möglich) wird aufgebaut. Erst jetzt werden Verbindungen getestet. Neue Verbindungen werden z. T. unter Zuhilfenahme von Computermodell-Studien synthetisiert und anschliessend getestet.

Dieses Beispiel zeigt, wie sehr heute die Biologie die moderne Medikamentenforschung beeinflusst. Die Synthese von Verbindungen ist in diesem Konzert der Disziplinen nur ein sehr kleiner Teil. Für die Verbindungen ist vor allem die Toxikologie entscheidend. Sobald eine Verbindung im Assay aktiv ist entscheidet die Toxikologie ob die Verbindung ein Kandidat für die Weiterentwicklung ist oder nicht. Eine hochaktive Substanz mit „guten Toxikologischen“ Eigenschaften (das muss auch für Metaboliten gelten) wird dann in den drei klinischen Phasen (I, II und III) bis zu ihrer Wirksamkeit am Menschen gründlich geprüft. Insgesamt kostet heute die Entwicklung eines neuen Medikaments bis zu 800 Mio DM. Hier wird deutlich, dass nur die grössten und stärksten Firmen sich derartige Investitionen leisten können. Schliesslich handelt es sich um sehr stark risikobehaftete Investitionen. Ein neues Medikament kann jeder Zeit, manchmal sogar erst nach der Markteinführung, Nebenwirkungen offenbaren, die das schnelle Aus bedeuten. Hohes Risiko bedeutet immer auch eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das Geld verloren geht. Hier liegt der Grund für die vielen Firmenzusammenschlüsse.

Natürlich brauchen wir die gründliche und damit sehr teure Prüfung jedes neuen Arzneistoffes. Leider gibt es aber auch eine Schattenseite. Medikamente müssen

heute nach rein marktwirtschaftlichen Gesichtspunkten entwickelt werden. Bei den Planungen in der Pharmaindustrie spielen die Zivilisationserkrankungen in den reichen Industrieländern entsprechend die Hauptrolle. Viagra lohnt sich. Ein neues Malaria-Medikament leider nicht, obwohl hier die Neuinfektionsrate (vor allem Kinder) bei 300 Mio pro Jahr liegt und ca. 3 Mio. Menschen (vor allem Kinder) jährlich an Malaria sterben. Malariamedikamente werden daher kaum entwickelt.