

Synthese und Analytik therapeutischer Oligonukleotide

verfasst zur Lehrveranstaltung
VU Klonieren und cDNA-Banken

Universität Salzburg

Alexander Fuchs

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	3
2. Synthese von Oligonukleotiden	3
2.1 Historische Methoden.....	3
2.2 Phosphoramidit-Methode.....	5
3. Antisense-Wirkmechanismus	9
3.1 Aktivierung der RNase H.....	9
3.2 Alternative Wirkmechanismen.....	10
4. Chemische Modifikationen	11
4.1 Grundlagen.....	11
4.2 Backbone-Modifikationen.....	11
4.3 Modifikationen der Zuckerstruktur.....	12
4.4 Modifikation der Nukleinbasen.....	12
5. Analytik	12
5.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	12
5.1.1 Grundlagen der HPLC.....	14
5.1.2 Pumpen.....	14
5.1.3 Trennsäulen und Trennmechanismen.....	15
5.1.4 Detektoren.....	17
5.1.5 Flüssigchromatographie von Oligonukleotiden.....	17
5.2. Massenspektrometrie (MS).....	19
5.2.1 Grundlagen der MS.....	19
5.2.2 Ionisierungstechniken.....	19
5.2.3 Analysatoren.....	21
5.2.4 Analyse von Oligonukleotiden mittels LC-MS.....	22
5.3 Kapillargelelektrophorese (CGE).....	23
5.3.1 Grundlagen.....	23
5.3.2 CGE von Oligonukleotiden.....	24
5.4 Induktiv gekoppeltes Plasma (ICP).....	24
6. Diskussion	26
Literaturverzeichnis.....	27
Verzeichnis der Abbildungen.....	28

1. Einleitung

Oligonukleotide (ON) sind kurze RNA oder DNA-Stücke, die aus rund 10 bis 100 Nukleotideinheiten aufgebaut sind. In der Molekularbiologie werden synthetische Oligonukleotide als vielseitige Werkzeuge eingesetzt, unter anderem als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), in der DNA-Sequenzierung, als markierte Sonden oder auch auf DNA-Chips.

Antisense-Oligonukleotide sind in ihrer Basensequenz einer Ziel-mRNA entgegengesetzt und behindern die Biosynthese von Proteinen. Therapeutische Antisense-ON werden chemisch modifiziert, um ihre Stabilität und Bioverfügbarkeit zu verbessern. Ihr Einsatz als Arzneimittel zur Geninhibition soll durch die hohe Spezifität Nebenwirkungen, wie sie z.B. bei Wirkstoffen, die Rezeptoren oder katalytische Zentren blockieren, auftreten, weitgehend ausschließen.

1998 wurde von der US Food and Drug Administration FDA der erste auf einem Antisense-Oligonukleotid basierende Arzneistoff zugelassen. Vitravene™ (Wirkstoff: Fomivirsen), ein Virostatikum, wird bei Infektionen mit dem Cytomegalievirus angewandt.

McGinnis, Chen & Bartlett (2012) listen in ihrer Publikation rund 60 therapeutische ON auf, die sich gegenwärtig in verschiedenen Phasen klinischer Tests befinden. Diese sollen als Medikamente gegen eine Vielzahl von Krankheiten eingesetzt werden, darunter Krebs, neurodegenerative Erkrankungen, Hämophilie, Grüner Star, Asthma, HIV und Hepatitis C.

Um während der Entwicklung und in den klinischen Tests die Aufnahme, Pharmakokinetik, Verteilung in den Zielorganen und Metabolisierung dieser Wirkstoffe in unterschiedlichen Matrices wie Plasma, Gewebe oder Urin verfolgen zu können, müssen schnelle, empfindliche und präzise analytische Methoden angewandt werden.

2. Synthese von Oligonukleotiden

2.1 Historische Methoden

Bereits in den 50er Jahren, kurz nach Entdeckung der DNA-Doppelhelix durch Watson & Crick, wurden erste Versuche unternommen, Nukleotide zu kurzen Fragmenten definierter Sequenz zusammenzufügen.

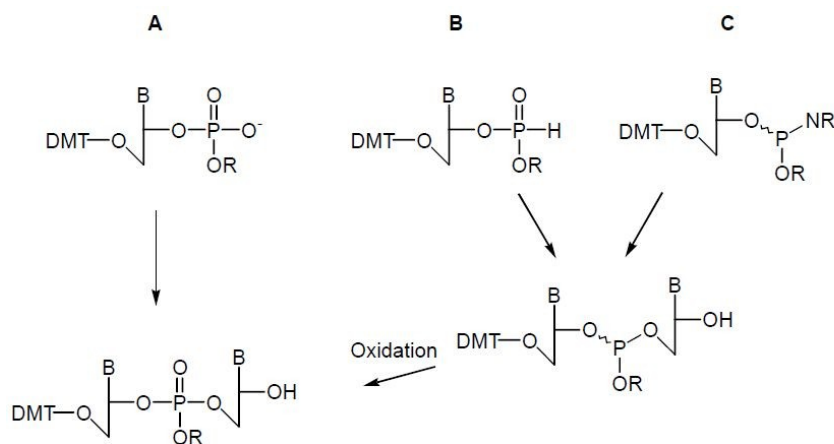


Abbildung 1. Methoden der Oligonukleotidsynthese (Winkler, 2006, S. 10)

Sowohl die von Khorana Ende der 50er Jahre entwickelte Phosphodiester- (R=H) als auch die von Letsinger 1969 publizierte Phosphotriestermethode beruhen auf der direkten Synthese eines Phosphats (Abbildung 1, A).

Die Phosphotriester-Synthese (Abbildung 2) wurde anfangs in Lösung durchgeführt, später konnte das erste Nucleosid an der 3'-OH-Gruppe an eine Festphase (Polystyrolharz) basisch abspaltbar gekoppelt werden. Als Linker zwischen Festphase und Nucleosid dient Succinat (Bernsteinsäureester).

Die 5'-OH-Gruppen der Kopplungsnucleosidphosphate werden mit DMTr oder MMTr (Di- bzw. Mono-p-methoxytritylchlorid) sauer abspaltbar geschützt, die exocyclischen Aminogruppen der Nucleobasen sind (meist) mit einer Benzoylgruppe geschützt.

Die Reaktion eines zu koppelnden Nucleosidphosphats mit DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) oder TsCl (para-Toluolsulfonsäurechlorid) führt zu einem Säureanhydrid (Abbildung 2, Molekül 6), welches an die 5'-Hydroxygruppe am Oligonucleotidstrang koppelt und als Produkt einen Phosphotriester erzeugt (Abbildung 2, Molekül 7).

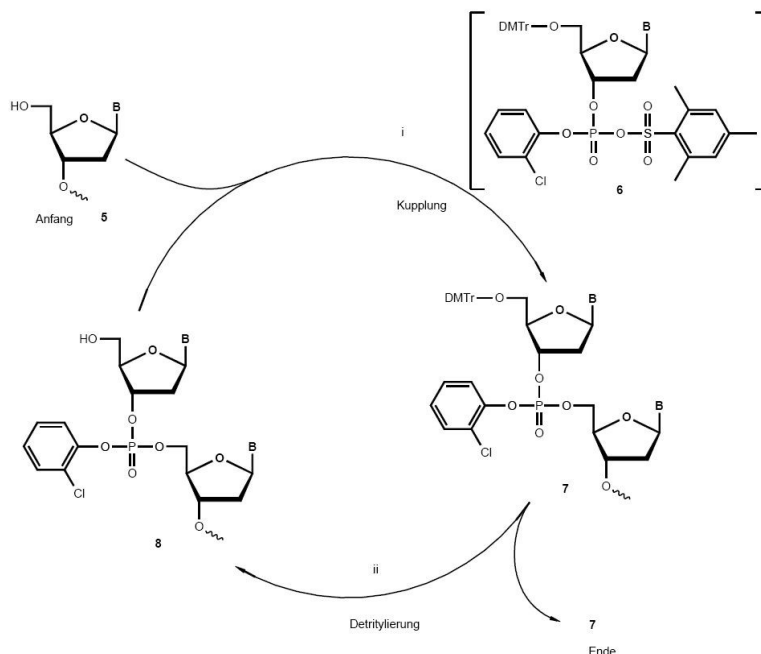


Abbildung 2. Phosphotriestermethode (Schliepe, 1999, S. 8)

Die Abspaltung der 5'-OH-Trityl-Schutzgruppe (Detritylierung, Abbildung 2, Molekül 8) zur weiteren Kopplung erfolgt in saurem Milieu durch Zugabe von Dichloressigsäure in Chloroform. Nach vollständiger Synthese des Oligonucleotids werden sowohl die Chlorphenyl-Schutzgruppen am Phosphat als auch die Acyl-Schutzgruppen der Basen durch NaOH basisch abgespalten (vgl. Schliepe, 1999, S. 9).

Die H-Phosphonatmethode (Abbildung 1, B sowie Abbildung 3) beruht ebenso wie die Phosphittriestermethode (Abbildung 1, C) auf der Synthese eines Phosphittriesters, der anschließend zu einem Phosphat oxidiert wird.

In der H-Phosphonatmethode erfolgt die Oxidation von P(III) zu P(V) jedoch erst nach vollständiger Synthese des Oligonucleotids, während sie in der Phosphittriestermethode ein Syntheseschritt ist, d.h. pro Verlängerung um ein Nucleotid durchgeführt werden muss. Die H-Phosphonatmethode erfordert daher keinen Schutz der Phosphatgruppe.

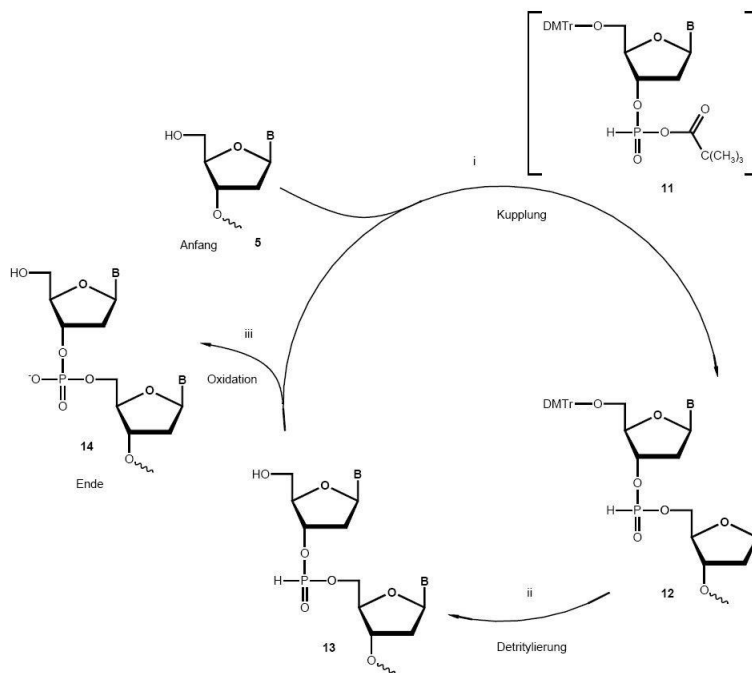


Abbildung 3. H-Phosphonat-Verfahren (Schliepe, 1999, S. 10)

Als Bausteine des H-Phosphonat-Verfahrens dienen ebenso wie in der Phosphotriestermethode Nucleoside mit geschützten Nucleobasen und Trityl-geschützter 5'-OH-Gruppe, jedoch ungeschützter Phosphonatgruppe.

Die Phosphonatgruppe wird mit Pivaloylchlorid aktiviert und bildet ein gemischtes Säureanhydrid (Abbildung 3, Molekül 11), welches analog zum Phosphotriesterverfahren an die 5'-Hydroxygruppe am Oligonucleotidstrang koppelt, und einen Phosphondiester bildet (Abbildung 3, Molekül 12). Detritylierung (Abbildung 3, Molekül 13) und Gesamtentschützung geschehen ebenfalls wie in der Phosphotriestermethode, die zusätzlich erforderliche Oxidation des Phosphors erfolgt durch eine wässrige Iodlösung (Abbildung 3, Molekül 14) und Zugabe einer schwachen Base (meist Pyridin) (vgl. Schliepe, 1999, S. 10). Die Base neutralisiert das entstehende HI.

2.2 Phosphoramidit-Methode

Die ebenfalls von Letsinger in der Mitte der 70er Jahre entwickelte Phosphitriestermethode brachte einen deutlichen Zeitgewinn bei der Synthese und ist in vielerlei Hinsicht der direkte Vorläufer der heute angewandten Phosphoramidit-Methode. Der zusätzliche Syntheseschritt (Oxidation zum Phosphor(V) natürlicher Oligonucleotide) verkürzte die für die Kopplung benötigte Zeit erheblich, und eröffnete auch die Möglichkeiten zur Modifikation des Backbones. Der gravierendste Nachteil dieser Methode lag jedoch in den verwendeten Synthesebausteinen, die reaktiven Nucleosidphosphormonochloridite waren sehr feuchtigkeitsempfindlich und mussten vor jeder Kopplung frisch synthetisiert werden.

Als Lösung dieses Problems wurden von Caruthers 1981 Phosphoramidite als Bausteine der ON-Festphasensynthese entwickelt, es sind stabile, lagerfähige und mit Schutzgruppen versehene Derivate natürlicher oder synthetischer Nucleotide. Das 5'-Ende der Pentose wird wiederum mit säurelabilem DMTr (Di-p-methoxytritylchlorid bzw. 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl), das Phosphat an der 3'-Position mit basenlabilem Cyanoethyl und die Base meist mit einer Aminogruppe geschützt.

Die Synthese von Oligonukleotiden (ON) an Festphasen mittels kommerzieller Synthesizer nach der Phosphoramidit-Methode ist Stand der Technik. Das erste Nukleotid wird an seiner 3'-OH-Gruppe an einen Linker der Festphase geknüpft. Meist dient CPG (Controlled Pore Glass) oder Polystyrolharz (MPPS – macroporous polystyrene) als Trägermaterial. Die Synthese des ON erfolgt, wie in Abbildung 4 dargestellt, ein Nukleotid nach dem anderen, stufenweise in vier Schritten (Entschützung, Kopplung, Capping und Oxidation) durch Anlagerung an der 5'-OH-Position bis die gewünschte Sequenz synthetisiert ist.

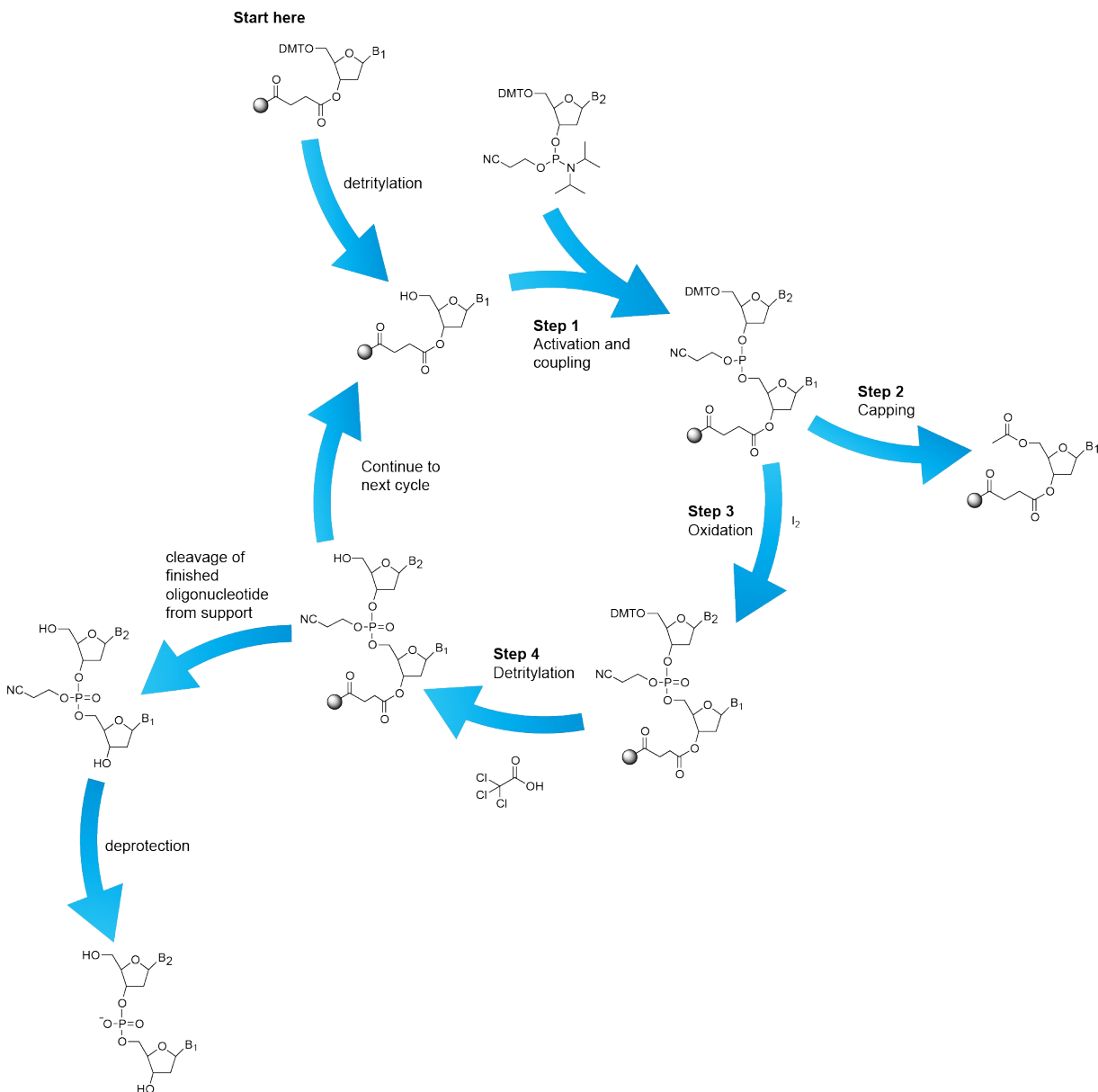


Abbildung 4. Standard-Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode (ATD Bio, 2012)

Nach Bindung des ersten Phosphoramidits an die Festphase ist dessen 5'-Position durch DMTr geschützt. Die Entschützung (Detritylierung) erfolgt unter sauren Bedingungen, üblicherweise durch eine Lösung von 2 bis 3% Dichlor- oder Trichloressigsäure in Dichlormethan oder Toluol (Abbildung 5). Durch die orange Farbe des Tritylkations kann dessen Menge photometrisch bestimmt und die durchschnittliche Kopplungsausbeute berechnet werden.

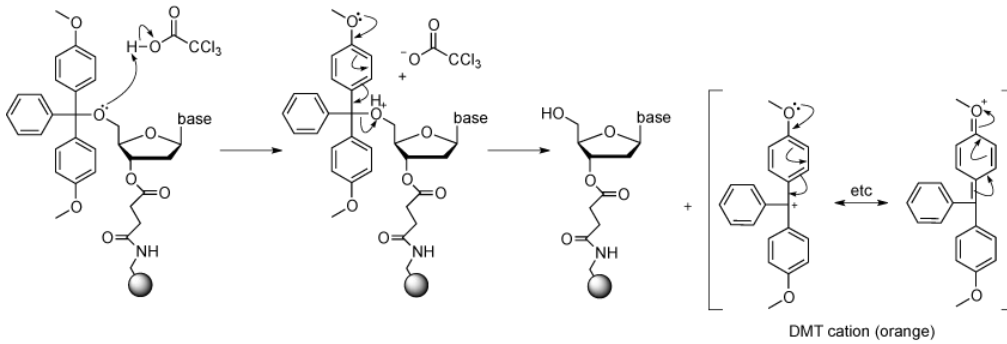


Abbildung 5. Entschützung (ATD Bio, 2012)

An die nun vorliegende 5'-OH-Gruppe wird das nächste Phosphoramidit gekoppelt (Schritt 1). Das in Acetonitril gelöste Nukleotid wird durch die schwache Säure 1H-Tetrazol aktiviert, welche das Stickstoffatom der Diisopropylaminogruppe protoniert. Die protonierte Aminogruppe des Phosphoramidits ist eine gute Abgangsgruppe, es bildet sich an der nucleophilen freien 5'-OH-Gruppe am Kettenende eine Phosphittriesterbinding (Abbildung 6).

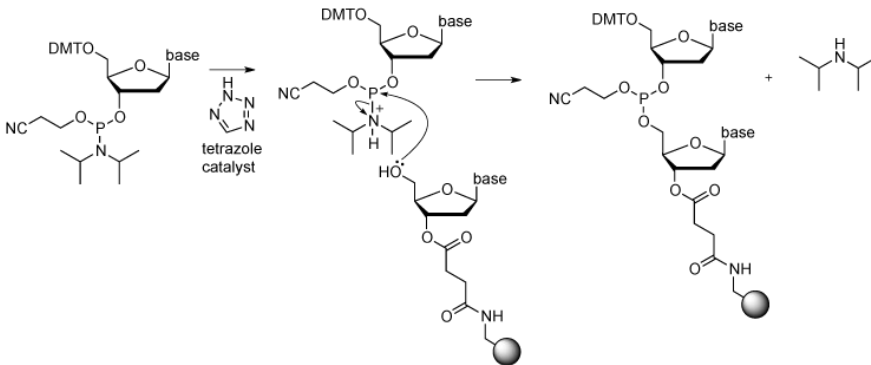


Abbildung 6. Kopplung (ATD Bio, 2012)

Da die Kopplungsrate zwar über 99% liegt, aber niemals alle 5'-OH-Gruppen reagieren, müssen diese dauerhaft geblockt werden. Bei der weiteren Strangverlängerung würden sonst (N-1)mere entstehen, die im Rahmen der Reinigung nur schwer abzutrennen sind (vgl. Winkler, 2006, S. 11). Zur Acetylierung der noch freien 5'-OH-Gruppen (Capping, Schritt 2) dient eine Mischung aus Acetanhydrid und N-Methylimidazol in Tetrahydrofuran (Abbildung 7).

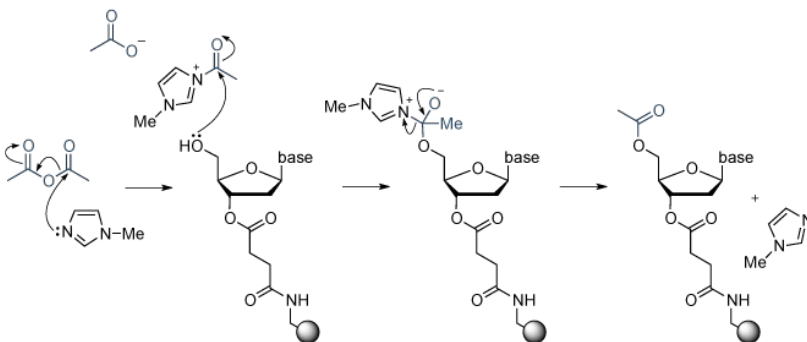


Abbildung 7. Capping (ATD Bio, 2012)

Der dreiwertige Phosphor im Phosphittriestern (Phosphorsäuretriestern) ist unter den Synthesebedingungen nicht stabil, das freie Elektronenpaar kann elektrophil angegriffen werden. Er wird daher wie im H-Phosphonatverfahren durch eine Iod/Pyridin-Lösung oxidiert (Schritt 3) (Abbildung 8).

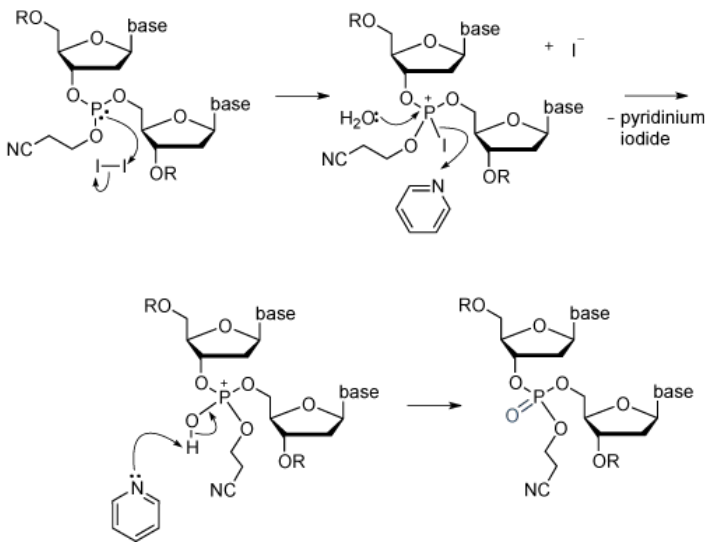


Abbildung 8. Oxidation (ATD Bio, 2012)

Der Synthesekreislauf wird mit der Entschützung des neuen Baustein bei Schritt 1 fortgesetzt, oder es erfolgt nach vollständiger Synthese des ON die Abspaltung und Gesamtentschützung. Nach Entfernung der DMT- Schutzgruppe analog Schritt 1 werden die ON von der Festphase durch basische Reagenzien wie Ammoniak oder Methylamin gelöst (Abbildung 9), simultan entfernt diese Behandlung die Cyanoethylschutzgruppen am Phosphat durch β -Eliminierung sowie die Schutzgruppen der Nukleinbasen (Abbildung 10). Diese Reaktion wird durch die elektronenanziehende Cyano-Gruppe begünstigt, welche die H-Atome acidifiziert.

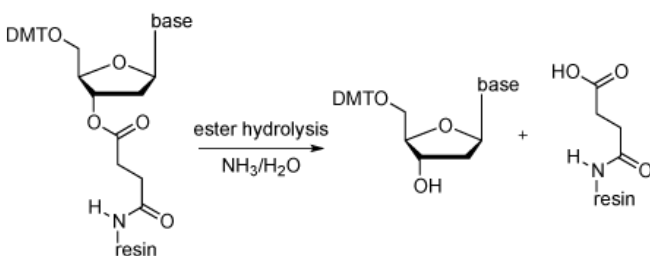


Abbildung 9. Abspaltung von der Festphase (ATD Bio, 2012)

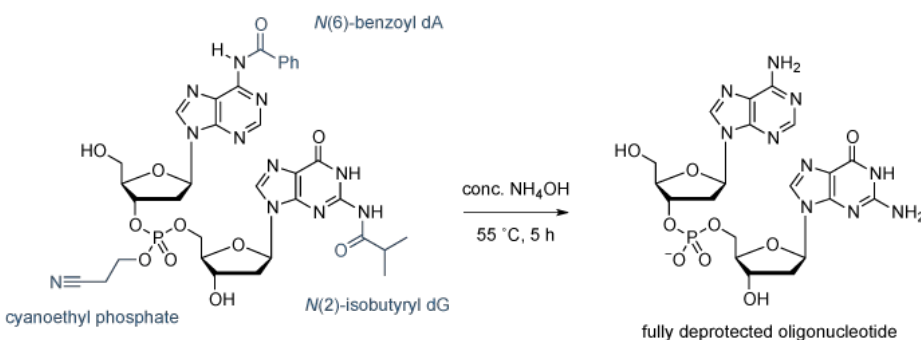


Abbildung 10. Entschützung (ATD Bio, 2012)

Die Synthese von RNA erfolgt nach der Phosphoramidit-Methode analog zu der von DNA, durch die zusätzliche 2'-Hydroxygruppe an der Ribose (statt einer 2'-Deoxyribose der DNA) muß diese Gruppe jedoch unabhängig von den anderen Schutzgruppen entschützbar sein. Die 2'-OH-Schutzgruppe soll beständig gegen alle in den vier Syntheseschritten eingesetzten Chemikalien sein, sich jedoch am Ende der Synthese vollständig entfernen lassen, und keine Migration von 2' zu 3'-OH aufweisen. Darüber hinaus darf die Schutzgruppe nicht zu groß sein, um die Kopplung an der 3'-Gruppe sterisch nicht zu behindern.

Silylester haben sich als geeignete Schutzgruppe erwiesen. t-Butyldimethylsilylester (TBS) ist sowohl gegen Säuren als auch Basen stabil, wird jedoch durch Fluoridionen aus Reagenzien wie z.B. Tetrabutylammoniumfluorid abgespalten (vgl. Winkler, 2006, S. 14).

3. Antisense-Wirkmechanismus

3.1 Aktivierung der RNase H

Antisense-Oligonukleotide werden synthetisiert, um den Transfer der genetischen Information der DNA zu einem Protein zu unterbinden oder zu modulieren, sie beeinflussen also die Proteinbiosynthese. Wie in Abbildung 11 dargestellt, gibt es mehrere Möglichkeiten die Transkription und Translation zu unterdrücken. Die angeführten Angriffspunkte sind jedoch größtenteils theoretischer Natur, nur wenige Wirkmechanismen von Antisense-ON sind gut charakterisiert. Eine erste offensichtliche Möglichkeit zur Hemmung liegt in der Transkription, also der Synthese der eukaryotischen prä-mRNA an der DNA. Um die prä-mRNA in mRNA umzuwandeln und aus dem Zellkern auszuschleusen, muß sie prozessiert werden, die Prozessierung bietet verschiedene Eingriffsmöglichkeiten für Antisense-Mechanismen. Auch der Transport der reifen mRNA zu den Ribosomen ermöglicht eine Hemmung, ebenso kann die Translation selbst sterisch behindert werden. Der wichtigste und effektivste Wirkmechanismus ist jedoch die Aktivierung von RNase H, die RNA-DNA-Heteroduplexe erkennt und den RNA-Strang hydrolytisch spaltet.

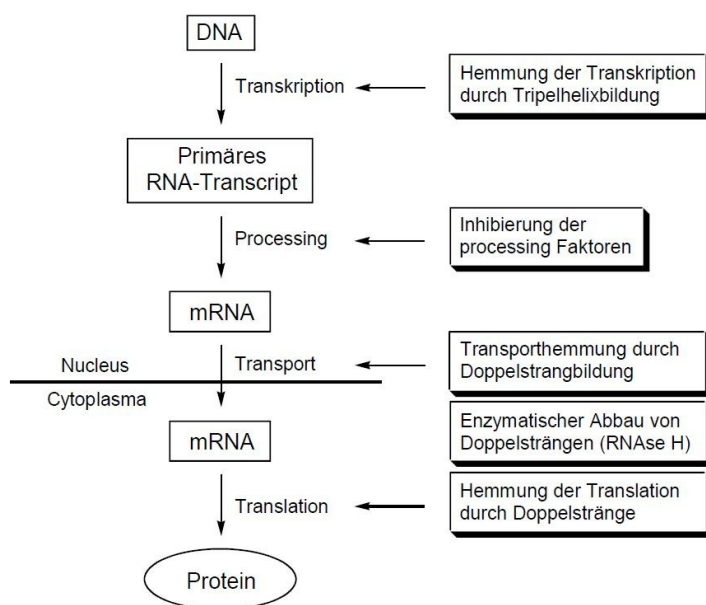


Abbildung 11. Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese und mögliche Angriffspunkte von Antisense Oligonukleotiden (Winkler, 2006, S. 4)

RNase H ist eine unspezifische Endoribonuklease, die sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma vorkommt. Der Abbau des RNA-Strangs eines Duplexes aus RNA und DNA durch RNase H ist z.B. bei der DNA-Replikation essentiell, da der angelagerte RNA-Primer abgespalten wird. Synthetische DNA-Oligonukleotide bleiben somit intakt und können an die nächste mRNA hybridisieren, die wiederum von RNase H hydrolysiert wird. Da ein ON somit viele mRNA-Stränge dem Abbau zuführt, handelt es sich um einen äußerst effektiven Mechanismus, der die Proteinexpression um 80 bis 95% senken kann. Darüber hinaus können ON, welche RNase H aktivieren, beliebige Sequenzteile der mRNA als Target nutzen, während sterische Hemmung nur am Startcodon wirksam ist (vgl. Dias und Stein, 2002, p. 350).

3.2 Alternative Wirkmechanismen

Die Transkription eines Gens kann durch Oligonukleotide, die an DNA binden, verhindert werden. Diese TFOs (triplex-forming oligonucleotides) lagern sich in der großen Furche der Doppelhelix an und bilden eine stabile Triplex-DNA, die durch RNA-Polymerase nicht entspiralisiert werden kann. Die Anwendbarkeit von TFOs ist dadurch eingeschränkt, dass sie über Hoogsten-Bindungen an A:T und G:C Basenpaaren zu T-A:T und C-G:C Triplexen werden, also nur an Purin-Pyrimidin-Abschnitten der dsDNA andocken können. Ihre Wirksamkeit wurde jedoch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt (vgl. Integrated DNA Technologies, 2011, p. 6).

Die Prozessierung der prä-mRNA (Capping, Polyadenylierung, Splicing) zur reifen mRNA bietet mehrere Angriffspunkte. Im Splicing von prä-mRNA werden nicht kodierende Genabschnitte (Introns) herausgeschnitten, Antisense-Oligonukleotide können 5' und 3'-Splicing Junctions blockieren und Spliceosomen behindern (vgl. Dias & Stein, 2002, p. 350). Die Polyadenylierung ist ein wichtiger Schritt in der Prozessierung von mRNA, hierbei werden durch Poly(A)-Polymerase bei Säugetieren rund 200 bis 300 Adenin-Nukleotide am 3'-Ende der prä-mRNA angehängt. Dieser Poly(A)-Schwanz ist Voraussetzung für die Translation, die Hybridisierung eines Oligonukleotids an das 3'-Ende blockiert sie. Auf die gleiche Weise kann am 5'-Ende das Capping unterbunden werden, welches ansonsten die mRNA vor Verdauung durch Exonukleasen schützt.

Die Hemmung der Translation ist durch die Bildung von mRNA-Doppelsträngen möglich, welche entweder die Initiation und Bildung des mRNA-tRNA-Ribosom Komplexes verhindern, oder später die Verlängerung der Polypeptidkette durch Blockierung eines Abschnittes der mRNA unterbrechen.

Die Synthese spezifischer Proteine kann auch durch Inhibition einzelner Gene mittels doppelsträngiger RNA erreicht werden. Diese rund 20 Basenpaare lange siRNA (small interfering RNA) wird als antisense-Strang zur Ziel-mRNA in RISC (RNA-induced silencing complex) eingebracht. RISC ist ein Komplex aus RNA und Proteinen, dessen Nuklease die erkannte Ziel-mRNA abbaut, und somit bestimmte Genprodukte verringert (Gen-Knockdown) oder ausschaltet (Gen-Knockout). Dieser Mechanismus dient ursprünglich der Verteidigung gegen Viren.

4. Chemische Modifikationen

4.1 Grundlagen

Synthetische, nicht modifizierte ON sind als therapeutische Wirkstoffe ungeeignet, da sie von zellulären Nukleasen rapide abgebaut werden. Um die therapeutischen Nukleinsäuren vor Nukleasen zu schützen, und weitere wünschenswerte Eigenschaften wie z.B. höhere Bioverfügbarkeit, bessere Löslichkeit, niedrigere Cytotoxizität und stärkere Antisense-Wirkung zu erhalten, wurden diverse chemische Modifikationen vorgenommen. Wie in Abbildung 12 skizziert, bieten sowohl RNA- als auch DNA-Oligonukleotide drei grundsätzliche Möglichkeiten für Veränderungen: am Backbone, der Base und dem Zucker.

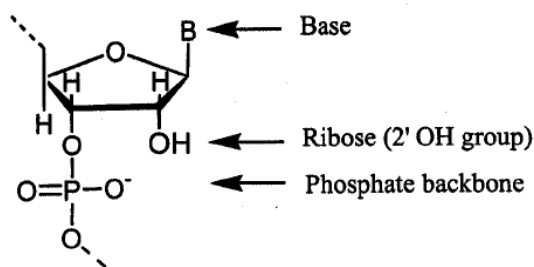


Abbildung 12. Modifikationsmöglichkeiten von RNA/DNA-Nukleotiden (Integrated DNA Technologies, 2011, p. 2)

4.2 Backbone-Modifikationen

In den späten 60er Jahren wurde durch Austausch des einfach gebundenen, nicht verlinkten Sauerstoffatoms des Phosphats die erste Generation modifizierter synthetischer Oligonukleotide hergestellt.

Der Ersatz von Sauerstoff durch eine Methylgruppe bildet ein Methylphosphonat. Diese ungeladenen Oligomere sind äußerst stabil gegen Nukleasen, durch das Fehlen von Ladung jedoch schlecht löslich, besitzen eine geringe Hybridisierungsaffinität und können vor allem RNAse H nicht aktivieren.

Die Einführung von Schwefel anstelle des Sauerstoffs erhält die Fähigkeit des ON zur Aktivierung von RNAse H. Die so gebildeten Phosphorthioate zeichnen sich darüber hinaus durch einfache Synthese, gute Löslichkeit und starke Antisense-Wirksamkeit aus. Sie sind hinreichend beständig gegen Nukleasen, während z.B. ein unmodifiziertes Oligonukleotid im menschlichen Serum eine Halbwertszeit von einer Stunde hat, erhöht sich die Halbwertszeit für ein Phosphorthioat derselben Sequenz auf zehn Stunden (vgl. Integrated DNA Technologies, 2011, p. 3).

Die chemisch relativ einfache Einführung des Schwefels am Phosphor wirkt sich nachteilig aus, da sie nicht stereoselektiv ist, das heißt es bilden sich Chiralitätszentren und Stereoisomere. In der Mischung aus Diastereomeren ist nur das Sp Phosphorthioat vor Nukleasen geschützt. Ebenfalls problematisch ist, dass Phosphorthioate abhängig von ihrer Länge die Fähigkeit besitzen, sich unspezifisch an Polypeptide wie den Fibroblast growth factor (FGF) oder Vascular endothelial growth factor (VEGF) zu binden, was in hohen Konzentrationen cytotoxisch wirkt.

4.3 Modifikationen der Zuckerstruktur

Die zweite Generation synthetischer modifizierter ON wurde entwickelt, um ohne die Nachteile der ersten Generation gegen Nukleasen widerstandsfähige Oligonukleotide mit hoher Hybridisierungsaffinität zu erhalten.

Die erfolgreichste Modifikation wurde durch Ersatz des Wasserstoffs an der 2'-Position der Ribose mit O-Alkylgruppen geschaffen. Die beiden wichtigsten Substituenten sind 2'-O-Methyl (OMe) und 2'-O-Methoxyethyl (MOE). Diese ON hybridisieren spezifisch mit ihrer Ziel-mRNA, sind stabil gegen Nukleaseabbau und weniger toxisch als Phosphorthioate. In der Alkylreihe „sinkt die Hybridisierungsaffinität mit zunehmender Kettenlänge, während die Nukleasestabilität steigt“ (Winkler, 2006, S. 7). Die Antisense-Wirkung dieser ON der zweiten Generation beruht jedoch nicht auf dem stärksten Mechanismus, der Aktivierung der RNase H, sondern auf der Hemmung der Translation durch Bildung von Doppelsträngen.

4.4 Modifikation der Nukleinbasen

Abgesehen von diversen an den Nukleinbasen eingeführten funktionellen Gruppen wurden diese auch vollständig ersetzt, u.a. Thymidin durch 5-Propinyl-desoxyuridin oder 2-Thiothymidin. Diese Modifikationen verstärken die hydrophoben Pi-Pi-Wechselwirkungen zwischen den Basen (base stacking) und erhöhen die Affinität zum Komplementärstrang, ebenso wie der Ersatz der Hydroxylgruppe an Position 2 des Adenosins durch eine Aminogruppe (vgl. Winkler, 2006, S. 6).

5. Analytik

Analysenmethoden und -detektoren sind in den seltensten Fällen selektiv, das heißt sie können üblicherweise den Analyten von Interesse nicht in einer Mischung (Matrix) mit anderen Komponenten ohne Störung identifizieren und quantifizieren. Meist ist daher eine Aufreinigung und Abtrennung der Probenmoleküle nötig. Die am häufigsten angewandte Trennmethode ist die Chromatographie (Pkt. 5.1), elektrophoretische Methoden werden insbesondere in den Biowissenschaften ebenfalls häufig angewandt (Kapillargelelektrophorese Pkt 5.3). Massenspektrometrie (Pkt. 5.2) stellt hingegen eine spezifische und beinahe universelle Analysentechnik dar, ebenso wie ICP (induktiv gekoppeltes Plasma, Pkt. 5.4) im Bereich der Elementanalytik.

5.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Das Grundprinzip der Chromatographie beruht auf der Verteilung der Probenkomponenten zwischen einer stationären und einer mobilen Phase, welche im chromatographischen Bett die stationäre Phase durchströmt oder an ihr vorbeiströmt. Komponenten, die von der stationären Phase nur wenig zurückgehalten werden (geringe Retention), bewegen sich mit der mobilen Phase schnell weiter (Abbildung 13). Durch die unterschiedlichen Mobilitäten „trennen sich die Probenkomponenten in diskrete Banden auf, die sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert werden können“ (Skoog & Leary, 1996, S. 623).

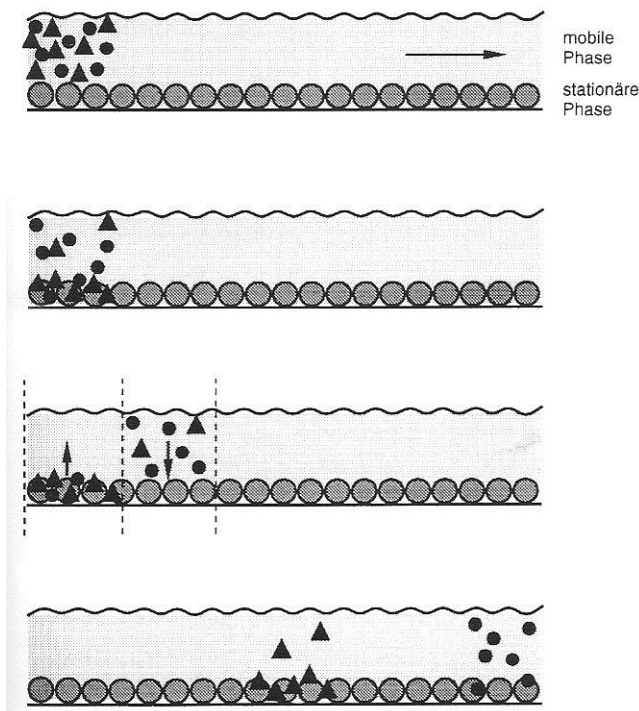


Abbildung 13. Verlauf einer chromatographischen Trennung (Meyer, 2009, S. 19)

Bei der mobilen Phase handelt es sich um ein Gas oder eine Flüssigkeit, die stationäre Phase kann ein Feststoff, ein Gel oder eine Flüssigkeit sein.

In der Gaschromatographie (GC) dient ein Gas als mobile Phase, üblicherweise werden Inertgase wie Stickstoff oder Helium verwendet, Wasserstoff wird manchmal ebenfalls eingesetzt. Als stationäre Phasen finden beinahe ausschließlich mit Polyimid beschichtete Quarzglas kapillaren Verwendung, an deren Innenseite die eigentliche flüssige stationäre Phase immobilisiert ist. Voraussetzung für die GC-Analytik ist, dass die zu analysierenden Stoffe flüchtig sind und sich bei hohen Temperaturen unzerstört verdampfen lassen. Dies trifft auf die thermolabilen, wasserlöslichen und polaren Oligonukleotide nicht zu, ebenso wenig auf die meisten Biomoleküle, auch wenn sich von manchen flüchtige Derivate herstellen lassen (z.B. FAME – fatty acid methyl esters, Methylester der Fettsäuren).

Die bioanalytische chromatographische Methode der Wahl ist daher die Flüssigchromatographie (LC). Einzige Voraussetzung ist, dass sich die Probe in der mobilen Phase löst. Aufgrund der großen Auswahl an mobilen Phasen (je nach Trennsäule von apolar bis polar, siehe Pkt 5.1.3) sind praktisch alle Biomoleküle einer Flüssigchromatographie zuführbar.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine Form der Säulenchromatographie. Bei säulenchromatographischen Verfahren befindet sich die stationäre Phase in einem zylindrischen Rohr („Trennsäule“), im Gegensatz z.B. zur Dünnschichtchromatographie, in der die stationäre Phase auf Glasplatten aufgebracht ist. Die Verwendung gepackter Stahlsäulen mit Teilchen kleiner Partikelgröße (rund 2 bis 5 µm Durchmesser) und hohen Fließgeschwindigkeiten stellt u.a. bzgl. Druck und Reproduzierbarkeit eine große gerätetechnische Herausforderung dar, welche die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie von der Flüssigchromatographie in Glas- oder Polymersäulen unterscheidet.

5.1.1 Grundlagen der HPLC

Eine HPLC-Apparatur ist mindestens aus den folgenden Teilen aufgebaut (Abbildung 14): einem Reservoir an mobiler Phase (Eluent) (1), einer Pumpe (3), einem Injektor zum Einbringen der Probe (4), einer Trennsäule (5) und einem Detektor (6).

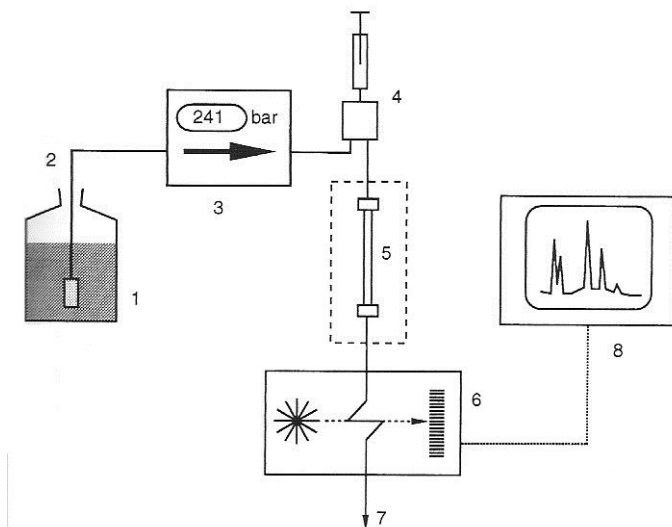


Abbildung 14. Schema einer HPLC-Apparatur (Meyer, 2009, S. 11)

Moderne HPLC-Geräte sind jedoch aufwändiger ausgestattet, das Pumpenmodul besteht üblicherweise aus mindestens zwei mechanisch voneinander unabhängigen Pumpeneinheiten, welche es erlauben, während einer Analyse die Zusammensetzung der mobilen Phase durch Mischung der Eluenten schrittweise oder kontinuierlich zu ändern. Diese sogenannte Gradientenelution ermöglicht es im Gegensatz zur isokratischen Elution (ein Lösungsmittel konstanter Zusammensetzung), Eigenschaften der mobilen Phase wie die Polarität, den pH-Wert oder die Ionenstärke während eines Laufs zu ändern, wodurch sich u.a. die Trennzeit deutlich verkürzen lässt.

Um reproduzierbare Ergebnisse und Bedingungen zu gewährleisten, wird die Trennsäule in einem thermostatisierten Säulenofen fixiert. Die Datenerfassung des Detektors erfolgt mit einem PC, der ebenfalls die Datenauswertung sowie die Steuerung der gesamten HPLC-Anlage übernimmt.

5.1.2 Pumpen

HPLC-Pumpen müssen verschiedenen, sich teilweise widersprechenden hohen Anforderungen genügen. Die Pumpen müssen robust sein und sehr hohe Drücke bis über 1000 bar erzeugen sowie Fließgeschwindigkeiten zwischen 0,1 und 10 ml/min ermöglichen, andererseits bei jeder Förderrate und sogar von variablem Gegendruck unabhängig einen kontrollierten, pulsationsfreien und reproduzierbaren Fluss aufweisen (vgl. Meyer, 2009, S. 56).

Für sehr geringe Flüsse kann eine Verdrängungspumpe eingesetzt werden, diese funktioniert wie eine große Injektionspritze mit Kolben und Reservoir. Jedoch sind fast alle kommerziell erhältlichen HPLC-Geräte mit Hubkolbenpumpen ausgestattet. In Hubkolbenpumpen fördert das Vor- und Zurückbewegen eines Kolbens die mobile Phase, wobei zwei Kugelventile den Ein- und Ausfluss steuern. Der Kolben ist oft durch ein Stahldiaphragma vom Lösungsmittel isoliert und wird durch eine Nockenwelle bewegt, welche durch ihre unregelmäßige Form im Zusammenspiel mit dem Antriebsmotor einen möglichst gleichmäßigen Fluss erzeugt und den Füllhub verkürzt (Abbildung 15).

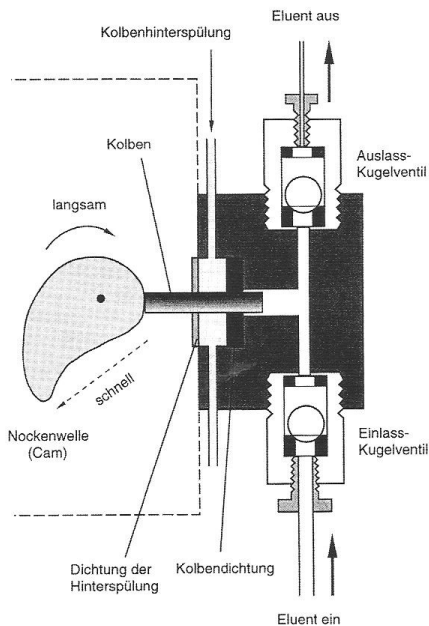


Abbildung 15. Bauprinzip einer Kurzhub-Kolbenpumpe (Meyer, 2009, S. 58)

5.1.3 Trennsäulen und Trennmechanismen

Stationäre Phasen in der HPLC werden fast ausschließlich aus Kieselgel (Silicagel) oder modifiziertem Kieselgel hergestellt. Kieselgel besteht aus miteinander durch Sauerstoffatome dreidimensional vernetzten Siliziumatomen, das an der Oberfläche mit chemisch reaktiven Silanolgruppen (SiOH) gesättigt ist (Abbildung 16). Dieser Feststoff wird in Form von porösen Teilchen wohldefinierter Größe, Porenweite, Dichte und spezifischer Oberfläche in Trennsäulen gepackt.

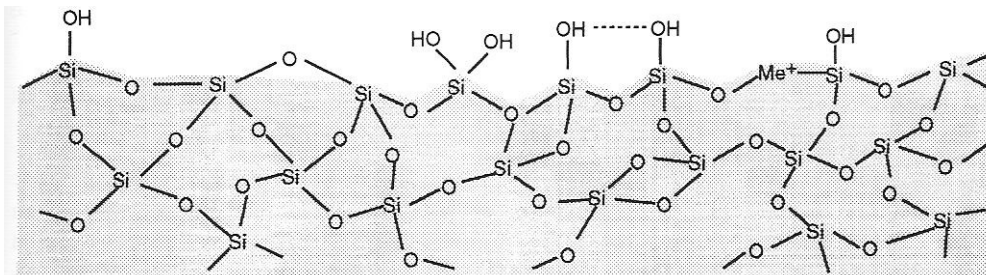


Abbildung 16. Chemischer Aufbau von Silicagel (Meyer, 2009, S. 119)

Als mobile Phasen für die polaren stationären Silanolgruppen oder andere polare funktionelle Gruppen müssen, um eine Trennung zu erreichen, unpolare Lösungsmittel wie z.B. aliphatische Kohlenwasserstoffe verwendet werden. Diese Art der Chromatographie bezeichnet man als Normalphasenchromatographie (NP). Aus den bereits in Punkt 5.1 bzgl. Gaschromatographie erwähnten Gründen (Polarität und Wasserlöslichkeit der Analyten) spielt NP-Chromatographie in den Biowissenschaften praktisch keine Rolle.

Silicagele, bei denen die Silanolgruppen durch Reaktion mit Organochlorsilanen modifiziert werden (Abbildung 17) bezeichnet man als Umkehrphasen (RP), wenn die gebundene Schicht apolar ist. Meist handelt es sich um Octadecylsilan (ODS), in dem R eine C18 (n-Octadecyl)-Kette ist.

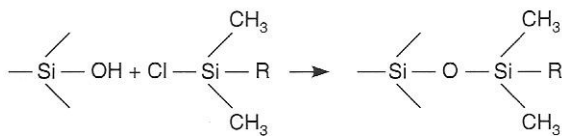


Abbildung 17. Modifikation von Silicagel mit Organochlorsilanen (Skoog & Leary, 1996, S. 692)

Die mobile Phase in der Umkehrphasenchromatographie ist polar, typische Eluenten sind Wasser, Methanol und Acetonitril.

Silicagele lassen sich auch mit funktionellen Gruppen zum Ionenaustausch modifizieren. Die Grundlage des Trennmechanismus ist die Konkurrenz des Analyten mit Salzionen um die Ladungen der stationären Phase. Sowohl Kationen als auch Anionen können mit schwachen oder starken (behalten ihre Ladung über einen weiten pH-Bereich) Ionentauschern getrennt werden, als Kationentauscher werden u.a. Sulfomethylgruppen (stark) und Carboxymethylgruppen (schwach), als Anionentauscher quaternäre Trimethylaminoethylgruppen (stark) und Diethylaminoethylgruppen (schwach) verwendet (vgl. Kellner, 2006, S. 222).

Während vor 15 Jahren noch Säulen mit Partikelgrößen von 5 µm Standard waren, haben sich mittlerweile sub-2-µm (meist 1,8 µm) Phasen etabliert. Eine Halbierung der Teilchengröße verdoppelt die Trennleistung, bzw. kann bei gleicher Trennleistung die Säulenlänge und damit der Lösungsmittelverbrauch sowie die Analysezeit halbiert werden. Eine Halbierung der Teilchengröße verdoppelt jedoch auch den Gegendruck, die noch vor zehn Jahren üblichen 400 bar HPLC-Pumpen wurden mittlerweile durch Geräte abgelöst, die über 1000 bar erzeugen können und dementsprechend teurer, empfindlicher und wartungsintensiver sind. Diese Anlagen werden als „Rapid Resolution“, „Ultra Performance LC“ o.ä. vermarktet, Beispiele sind die Agilent 1290 oder Waters Acquity Serie.

5.1.4 Detektoren

Ein Detektor muss Änderungen in der Zusammensetzung der mobilen Phase erkennen, und das Ausmaß dieser Änderungen (Konzentration bzw. Menge) an von der Säule eluierter Substanz in Abhängigkeit von der Zeit messen. Ein idealer Detektor besitzt ein geringes Rauschen, eine hohe Messempfindlichkeit bzw. eine niedrige Nachweisgrenze, einen großen linearen Bereich (Proportionalität von Konzentration zu Signal), ist gegenüber Gradientenelution unempfindlich und trägt durch seine Messzelle nicht zur Peakverbreiterung bei.

Universelle Detektoren messen eine physikalische Eigenschaft der Lösung, welche die Messzelle durchströmt. Dies kann z.B. der Brechungsindex, die Wärmeleitfähigkeit oder die elektrische Leitfähigkeit sein. Universelle Detektoren sind daher nur in sehr einfachen Probenmatrizes bzw. nach intensiver Probenaufarbeitung und -reinigung einsetzbar, und registrieren auch Schwankungen des HPLC-Systems im Fluss oder der Temperatur.

Selektive Detektoren sprechen auf einzelne Komponenten element- oder struktursensitiv (z.B. aromatischer Ring, Doppelbindung) an. UV-Detektoren, die bei einer bestimmten Wellenlänge messen, sind selektiv da nur wenige Stoffe bei der gewählten Wellenlänge UV-Strahlung absorbieren. Hochselektive Detektoren wie z.B. Tandem-Massenspektrometer können Analyten mit einer derart geringen Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses bestimmen, dass man sie spezifisch nennt.

Die häufigsten Detektoren in der HPLC sind der UV-Detektor, oft als Diodenarraydetektor (DAD) ausgeführt, und der Fluoreszenzdetektor (FLD). UV-Detektoren sind ausreichend empfindlich, besitzen einen großen linearen Bereich und können auch bei Gradientenelution verwendet werden (vgl. Meyer, 2009, S. 91). In der Ausführung als DAD wird nicht eine bestimmte Wellenlänge, sondern Gesamtlicht durch die Messzelle geführt, und nach Abschwächung durch die Probe spektral zerlegt. Am Diodenarray sind kontinuierlich Dioden angebracht, die den jeweiligen Wellenlängen entsprechen. Der DAD kann daher Spektraldaten gewinnen.

FLDs sind um bis zu drei Zehnerpotenzen empfindlicher als UV-Detektoren, Voraussetzung ist jedoch, dass der gesuchte Analyt fluoresziert bzw. ein fluoreszierendes Derivat hergestellt werden kann.

5.1.5 Flüssigchromatographie von Oligonukleotiden

Umkehrphasenflüssigchromatographie (RP-HPLC) ist eine der wichtigsten analytischen Techniken zur Bestimmung von Oligonukleotiden. Die in der RP-HPLC verwendeten Eluenten, üblicherweise Wasser bzw. wässrige Puffer, Methanol oder Acetonitril, erlauben sowohl die Verwendung eines UV-Detektors als auch die Kopplung mit Massenspektrometrie (MS). Watson-Crick-Basen absorbieren aufgrund ihrer aromatischen Struktur im UV-Bereich, das Absorptionsmaximum liegt je nach Base zwischen 250 und 280 nm, üblicherweise wird mittels UV-Detektor bei 260 nm gemessen.

Fluoreszierende Oligonukleotide werden zu wissenschaftlichen Zwecken synthetisiert, in dem z.B. die Standardbasen gegen fluoreszierende 2-Aminopurine oder trizyklische Cytosinderivate getauscht werden. In pharmazeutische ON werden keine Fluorophore eingeführt, daher findet auch der Fluoreszenzdetektor keine Verwendung.

Die Trennung von Oligonukleotiden mit der Länge N und N-1 erweist sich als um so schwieriger, je größer N ist, da die relativen Unterschiede in Länge und Ladung abnehmen. Die Diffusion von Teilchen in das poröse Säulenmaterial der stationären Phase führt zu einer Peakverbreiterung und erschwert eine Baselinientrennung, die beste Auflösung wird deshalb mit nichtporösen Partikeln erreicht. Bei Verwendung von nichtporösen Phasen können jedoch nur geringe Mengen an Probe injiziert werden, daher werden meist Core-Shell-Partikel (fester Kern mit poröser Schale) oder poröse Phasen geringer Teilchengröße eingesetzt, um die Diffusion zu begrenzen. Partikel kleiner als 1,8 µm sind in der Analytik von ON jedoch kontraproduktiv, da große Moleküle an kleineren Teilchen zunehmend durch Scherkräfte fragmentiert werden. Die Trennung von N und N-1 ist zur Zeit bis zu einem 60mer-Oligonukleotid möglich (vgl. Cramer, Finn & Herzberg, 2011, p. 9).

Der Trennmechanismus in der klassischen RP-HPLC beruht ausschließlich auf der Hydrophobizität/apolaren Wechselwirkung, durch die Verwendung von Ionen-Paar-Reagenzien (IP) lässt sich die Auftrennung von Oligonukleotiden deutlich verbessern. Die Retention von ON in der IP-HPLC hängt von mehreren Faktoren ab, darunter der Kettenlänge des Ionenpaarreagens (je länger die Kohlenwasserstoffkette, desto mehr Retention), der Ladung des ON (je weniger Ladungen, desto geringere Retention), dem organischen Anteil im Eluenten (je höher, desto weniger Retention), der Sekundärstruktur des Analyten und der Hydrophobizität der einzelnen Basen. Die Trennung von ON gleicher Länge scheint sich aus der Summe der Hydrophobizitäten der einzelnen Basen zu ergeben (vgl. McGinnis, Chen & Bartlett, 2012, p. 86).

In der Analytik von ON haben sich insbesondere TEAA (Triethylammoniumacetat) und HFIP-TEA (Hexafluorisopropanol in Kombination mit Triethylamin) als Ionenpaarbildner bewährt. TEAA wurde ursprünglich eingesetzt, um PCR-Produkte zu reinigen, da es sich durch Verdampfen aus dem Produkt entfernen lässt. Als IP-Reagens ist es sowohl bei der Trennung von DNA als auch RNA effektiv und ermöglicht UV-Detektion. Die Kopplung von TEAA-IP-HPLC mit ESI-MS (siehe Pkt. 5.2.2) wirkt sich nachteilig auf die Ionisation und damit Signalstärke im MS aus. TEA hat einen um rund 30 °C niedrigeren Siedepunkt als Essigsäure, verdampft daher in der Ionenquelle schneller und die zurückbleibende Essigsäure erniedrigt den pH-Wert und die Ionisationseffizienz (vgl. McGinnis, Chen & Bartlett, 2012, p. 89).

HFIP-TEA ist besonders zur Kopplung von IP-HPLC mit MS geeignet, da HFIP einen sehr niedrigen Siedepunkt von unter 60 °C hat und keine Ionensuppression verursacht. HFIP-TEA trennt vor allem aufgrund ionischer Wechselwirkungen, Phosphorthioate lassen sich mit diesem System gut analysieren, da die Enantiomere unterschiedlicher Hydrophobizität nicht zur Peakverbreiterung beitragen.

In Oligonukleotiden ermöglichen die negativ geladenen Phosphordiesterbindungen zur Ribose die Analytik mittels Ionentausch-HPLC. Eine positiv geladene stationäre Phase tritt mit den ON in Wechselwirkung und tauscht diese gegen einen zunehmenden Gradienten von Anionen der mobilen Phase. Die Anionentausch-Flüssigchromatographie (AEX-HPLC) trennt ON nach Länge, da die negative Ladung proportional zur Länge zunimmt. Die Toleranz dieser Trenntechnik gegenüber hohen Salzkonzentrationen ermöglicht es, auf zeitraubende Reinigungsschritte zu verzichten. Typische mobile Phasen enthalten rund 100-200 mM Lithiumperchlorat oder bis zu 900 mM Natriumchlorid. Ein hoher pH-Wert der mobilen Phase erhöht zwar die Retentionszeiten, denaturiert jedoch die ON, die somit als linearer Strang vorliegen und keine unerwünschten Wechselwirkungen eingehen können.

Gong & McCullagh (2011) konnten mittels HILIC (hydrophilic interaction chromatography) ein 20mer ON mit einer Auflösung von einem Nukleotid trennen. Als Abwandlung der Normalphasenchromatographie haben die bei HILIC verwendeten Eluenten einen hohen Anteil an volatilen organischen Lösungsmitteln, was diese Methode besonders zur Kopplung mit MS geeignet macht. Auch der Verzicht auf Ionenpaarbildner und die Verwendung von Ammoniumacetat als Puffer erhöht die Effektivität der Ionisation in einer Elektrosprayionisationsquelle.

5.2. Massenspektrometrie (MS)

5.2.1 Grundlagen der MS

In Massenspektrometern werden Ionen in der Gasphase nach ihrem Masse-zu-Ladung (m/z) Verhältnis räumlich oder zeitlich getrennt und detektiert. Ein Massenspektrometer besteht daher aus vier Komponenten: einer Möglichkeit, die Probe in das Gerät einzubringen, einer Ionenquelle zur Ionisierung der Analyten, einem Analysator zur Ionentrennung sowie einem Detektor. Je nach Einsatzgebiet, benötigter Auflösung, Nachweisgrenze, Genauigkeit, linearem Bereich und der Kopplung mit anderen analytischen Methoden werden Komponenten unterschiedlicher Funktionsweise eingesetzt.

5.2.2 Ionisierungstechniken

Die Ionenquelle dient dazu, die Analyten zu ionisieren, damit sie durch ein elektrisches oder magnetisches Feld in den Analysator überführt werden können.

Die Elektronenstoßionisationsquelle (EI) erzeugt energiereiche Elektronen (üblicherweise 70 eV), um sie mit den Probemolekülen kollidieren zu lassen. Analyten absorbieren diese Energie, im einfachsten Fall wird dadurch ein weiteres Elektron abgespalten, wodurch ein Radikalkation ("Molekülion") entsteht, dessen m/z -Verhältnis der molekularen Masse entspricht. Die restliche überschüssige Energie fragmentiert den Analyten, wodurch charakteristische Bruchstücke entstehen.

Eine sanftere Ionisationsmethode stellt die chemische Ionisation (CI) dar. Sie wurde entwickelt, um Molekülionen während der Ionisationen möglichst wenig zu fragmentieren, da sie eine wichtige analytische Information darstellen. In der CI wird im deutlichen Überschuss zur Probe (1000:1) ein Reaktionsgas wie z.B. Methan oder Ammoniak zugeführt, welches wie in der EI ionisiert wird. Erst die aus dem Reaktionsgas gebildeten Ionen ionisieren in Folge den Analyten. Durch Adduktbildung zeigt das m/z -Verhältnis für das Molekülion einen zu hohen Wert, im Fall von Ammoniak z.B. um 18 Einheiten.

Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisation (MALDI) nützt eine im großen Überschuss vorhandene Matrix wie z.B. Nikotinsäure, um durch gepulste Laserbestrahlung bei geeigneter Wellenlänge die absorbierte Energie auf die in ihr kokristallisierten Analyten zu übertragen. Diese Methode ist besonders für große, labile Biomoleküle bis zu einer Masse von 500 kDa geeignet. Da durch die Laserpulse schubweise Matrix und Analyt verdampft werden, ist nicht jeder Analysator mit dieser Ionenquelle kombinierbar. Gut geeignet sind time-of-flight Analysatoren, welche auch die hohen m/z -Verhältnisse massereicher Moleküle bestimmen können.

Sprühmethoden wie Elektrospray-Ionisation (ESI) oder chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization - APCI), bei denen die Analyten in einer Lösung in die Ionenquelle eingebracht werden, eignen sich besonders zur Kopplung mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.

In der APCI-Quelle wird die Probenlösung durch Hitze und ein Sprühgas in kleine Tröpfchen verteilt und verdampft. Mittels einer unter Hochspannung stehenden Koronanadel (corona discharge needle) werden die Analyten in einem der chemischen Ionisation ähnlichen Mechanismus ionisiert. APCI ist am besten für kleine (max. 2 kDa), wenig polare Analyten geeignet und erlaubt hohe Flussraten bis zu 2 ml/min.

Die Charakteristika der Elektrospray-Ionisationsquelle komplementieren die Möglichkeiten der APCI, ESI ist das am meisten eingesetzte LC-MS Interface. In der ESI-Quelle wird das Eluat durch eine geladene Kapillare geleitet und versprüht, die Tröpfchen werden durch Verdampfung kleiner, was durch Konzentrierung der geladenen Teilchen zu einer Coulomb-Explosion, also der elektrostatischen Abstossung der Ionen führt. Am Ende liegen die „trockenen“ Analyten in der Gasphase vor, und beschleunigen zur Gegenelektrode, an der sich der Einlass zum Analysator befindet (Abbildung 18).

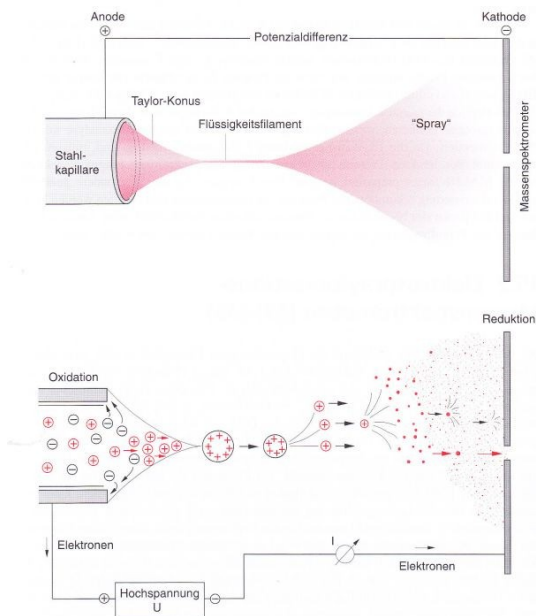


Abbildung 18. Schematische Darstellung des makroskopischen (oben) und mikroskopischen ESI-Prozesses (unten)
(Meyer & Warscheid, 2006, S. 352)

Da im Gegensatz zur APCI die Ionisation vor dem Verdampfen erfolgt, bieten sich dem Analytiker durch Auswahl des Lösungsmittels (Viskosität, Oberflächenspannung, Polarität) mehrere Möglichkeiten, den Ionisationsprozess zu beeinflussen (vgl. Ardrey, 2003, p. 105). Niedrige pH-Werte wirken sich bei positiver Ionisierungspolarität vorteilhaft auf die Ionenausbeute aus und begünstigen die Anlagerung von Protonen (M+H) oder anderen kationischen Addukten, wie z.B. Ammonium.

ESI ist zur Analytik mittel bis stark polarer Moleküle geeignet und deckt einen großen Massenbereich ab, nicht zuletzt aufgrund mehrfacher Ionisierung der Analyten. Dies verkleinert die effektive m/z-Zahl bzw. erhöht den Massenbereich, so wird ein fünffach ionisiertes 10.000 kDa Protein im Detektor bei 2.000 m/z (kDa) registriert.

Andere Ionisierungstechniken wie Feldionisationsmethoden, Teilchenbeschussmethoden oder Photoionisationsmethoden (abgesehen von MALDI) sind in der Praxis von wenig Relevanz.

5.2.3 Analysatoren

Der Analysator dient dazu, Ionen nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis m/z zu trennen. Als Kernmodul typisiert die Art des Analysators das gesamte Massenspektrometer.

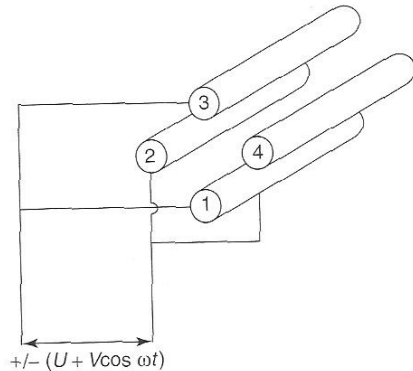


Abbildung 19. Schema eines Quadrupol-Massenanalysators (Ardrey, 2003, p. 42)

Die gebräuchlichsten Massenspektrometer sind mit einem Quadrupol-Analysator („Quad“) ausgestattet. Es handelt sich um vier parallele Stäbelektroden, wobei die jeweils gegenüberliegenden elektrisch verbunden sind. Eine durch hochfrequente Wechselspannung überlagerte Gleichspannung wird angelegt, an den benachbarten Stäben ist die Wechselspannung um 180° phasenverschoben (Abbildung 19). Bei bestimmten Spannungen ergibt sich nur für genau ein m/z -Verhältnis eine stabile, sinusförmige Bahn durch den Quadrupol, bzw. kann durch systematisch variierte Ansteuerung ein Massenscan erfolgen. Quads sind auch bei vergleichsweise schlechtem Vakuum einsatzfähig, und eignen sich insbesondere für quantitative Bestimmungen. Ihre Scangeschwindigkeit ist jedoch niedrig und der Massenbereich mit ca. 4.000 m/z eingeschränkt.

Ionenfallen-Massenspektrometer (Ion-Trap) fangen und speichern Ionen durch elektromagnetische Felder. Es gibt verschiedene Typen von Ionenfallen, der einfachste ist eine Quadrupol-Ionenfalle. Es handelt sich um einen dreidimensionalen Quadrupol, in dem die linearen Stäbe eines Quadrupols zu einem geschlossenen Ring gebogen sind, und über und unter der Ringelektrode sogenannte End-Cap-Elektroden angebracht werden. Die gefangenen Ionen bewegen sich auf stabilen Lissajous-Bahnen, können manipuliert und selektiv zum Detektor geleitet werden. Ion-Trap-Quads unterscheiden sich von linearen Quads vor allem durch ihre niedrigen Nachweisgrenzen.

Ein Analysator der theoretisch beliebig große Massen messen kann ist das Flugzeitmassenspektrometer (Time of Flight, ToF). Alle in der Ionenquelle produzierten Ionen erhalten dieselbe kinetische Energie, durch die unterschiedlichen Massen ergeben sich unterschiedliche Geschwindigkeiten (indirekt proportional zur Wurzel ihrer Masse). Der prinzipielle Aufbau eines ToF ist daher simpel, die verschieden schnellen Analyten fliegen durch ein feldfreies Rohr zum Detektor, wobei die leichten Moleküle zuerst, die schweren später auftreffen.

Voraussetzung ist eine instantane, diskontinuierliche Überführung aller Ionen aus der Quelle in den Analysator. Kontinuierliche Einbringung würde es unmöglich machen, die Flugzeit und damit das m/z -Verhältnis der Ionen zu bestimmen. ToF-MS eignen sich daher besonders zur Kopplung mit MALDI-Quellen, welche ebenfalls gepulst desorbieren.

In der Praxis können Flugzeitmassenspektrometer einen Massenbereich über 300.000 m/z messen, und diesen im Vergleich zu Quads schnell scannen.

5.2.4 Analyse von Oligonukleotiden mittels LC-MS

Die am häufigsten eingesetzte LC-MS Methode zur Analytik von Oligonukleotiden beruht auf dem Elektrospray-Interface (ESI), da es im Gegensatz zu MALDI den Eluentenfluss kontinuierlich in das Massenspektrometer einbringen kann. Weil die Phosphatgruppen negativ geladen sind, werden ON mittels ESI-, also im negativen Polaritätsmodus, bestimmt. Die Ionisierung von ON führt aufgrund der Hydroxylgruppen der Phosphodiester oder der Thiolgruppen (R-SH) bei Phosphorthioaten zu mehrfach geladenen Molekülen. Dies erlaubt, wie bereits erläutert, die Messung sehr massereicher Moleküle bei niedrigen m/z -Verhältnissen, führt jedoch zu komplexen Massenspektren, da dasselbe Molekül in verschiedenen Ladungszuständen vorliegt. Die rechnerische Rückführung dieser Signale auf das ungeladene Oligonukleotid wird durch Deconvolution-Software bewerkstelligt.

Je nach Auflösung des Massenspektrometers erhält man durch Deconvolution eine durchschnittliche oder eine monoisotopische Masse, wobei sich die durchschnittliche Masse aus den gewichteten Massen der natürlichen Isotope für jedes Element im Analyt ergibt, während die monoisotopische Masse aus den Hauptisotopen errechnet wird (vgl. Pourshahian & McCarthy, 2011, p. 149). Die Massenbestimmung von Oligonukleotiden ist eine einfache, aber wichtige Anwendung der LC-MS, da sie Fehlsequenzen, Nebenprodukte und Metaboliten identifizieren kann. Die Sequenz synthetischer Oligonukleotide ist bekannt, die erwartete Masse kann mittels LC-MS schnell mit der vorliegenden Masse verglichen werden. Oligonukleotide mit Fehlsequenzen aufgrund von Vertauschung einzelner Nukleotidbausteine sind jedoch isobarisch und daher in der Analyse des (unverdauten) ON nicht unterscheidbar.

Nach dem Verdau eines Oligonukleotids in seine Nukleoside kann die Massenbestimmung auch dazu dienen, das Vorhandensein von Modifikationen zu bestätigen. Eine Sequenzierung kleinerer ON mittels LC-MS nach Verdau durch 3' oder 5'-spezifische Nukleasen ist ebenfalls möglich, auf diese Weise wurden Oligonukleotide mit bis zu 50 Basenpaaren sequenziert (vgl. McGinnis, Chen & Bartlett, 2012, p. 88).

Eine quantitative Analyse von Oligonukleotiden und etwaigen Nebenprodukten mittels LC-MS erfolgt unter der Annahme, dass alle Analyten gleich effektiv ionisiert werden, also dasselbe Verhältnis von Response (Detektorsignal) zu Konzentration haben. Da diese Annahme nur sehr eingeschränkt richtig sein kann, müssten für eine exakte Bestimmung mittels LC-MS alle Analyten in Reinform vorliegen, um Kalibrierlösungen herstellen zu können. Quantifizierung mittels UV-Detektion ist daher vorzuziehen.

5.3 Kapillargelelektrophorese (CGE)

5.3.1 Grundlagen

Der Begriff Kapillarelektrophorese (CE) umfasst verschiedene Trenntechniken in Kapillaren, die alle auf der Elektrophorese beruhen, also der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Die verwendeten Quarzkapillaren ähneln den Trennsäulen der Gaschromatographie und sind üblicherweise bei einem Innendurchmesser von 0,02 bis 0,1 mm rund 20 bis 100 cm lang. Die Enden der Kapillare tauchen in Puffergefäße, zwischen denen eine Gleichstrom-Hochspannung von 20 bis 30 kV angelegt wird (Abbildung 20). Am anodischen, positiven Ende der Kapillare werden einige nL Probe aufgegeben, positiv geladene Analyten wandern, je nach Ladung und Größe unterschiedlich schnell, aufgrund des elektrischen Feldes zur negativen Elektrode (Kathode), wo sie detektiert werden. Als Detektoren sind die auch für die HPLC geeigneten Prinzipien im Einsatz.

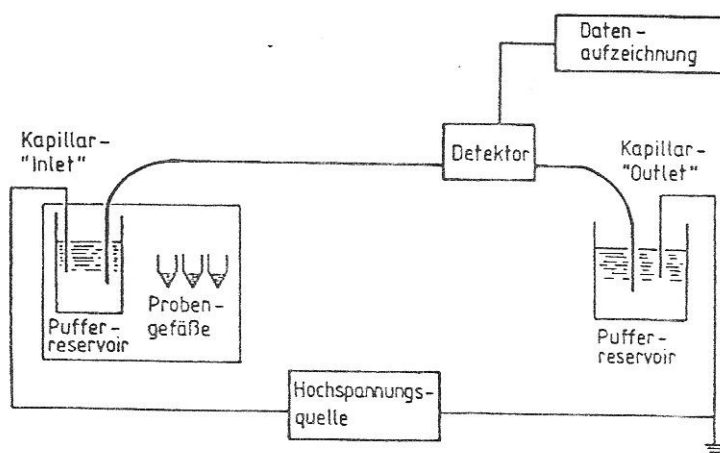


Abbildung 20. Aufbau einer CE-Apparatur (Engelhardt, Beck & Schmitt, 1994, S. 5)

Durch die dissoziierten Silanolgruppen an der Oberfläche der Quarzkapillare bilden sich stationäre negative Ladungen, die bewegliche positive Ladungen im Elektrolyt in Wandnähe induzieren. Das elektrische Feld zieht diese Gegenionen und damit die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare Richtung Kathode. Dieser elektroosmotische Fluß (EOF) kann durch den pH-Wert und die Ionenstärke gesteuert werden und ermöglicht es, auch negativ geladene Moleküle (Anionen) zum Detektor wandern zu lassen, sofern der EOF stärker als ihre elektrophoretische Beweglichkeit ist. In der Kapillaronenelektrophorese (CZE) ist die Kapillare mit Elektrolyt gefüllt, und die Trennung beruht auf den unterschiedlichen Nettomobilitätsdifferenzen der Analyten.

Zur Trennung ungeladener Moleküle ist die CZE ungeeignet, werden dem Puffer jedoch Detergentien wie z.B. SDS (Natriumdodecylsulfat) zugesetzt, bilden sich Mizellen. Je nach ihrer Hydrophobizität verteilen sich die Probenbestandteile im Puffer oder den Mizellen und werden entweder mit dem EOF oder (bei anionischen Mizellenbildnern) gegen den EOF mit den Mizellen transportiert. Dieser Verteilungsprozeß macht die mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) zu einem echten chromatographischen Verfahren.

5.3.2 CGE von Oligonukleotiden

Biopolymere wie Oligonukleotide liegen unabhängig von ihrer Länge mit demselben Oberfläche/Ladungsverhältnis vor, d.h. ein Molekül aus 5 Nukleotiden besitzt dasselbe Verhältnis von Ladung zu Masse wie eines aus 50 Nukleotiden (vgl. Carmody & Noll, 2011, p. 246). Die elektrophoretische Mobilität von ON ist also unabhängig von ihrer Masse ident, und eine Trennung mittels CZE nicht möglich. Um die Migration von Makromolekülen zu behindern wird daher die Kapillare mit einem Gel oder einer Polymerlösung gefüllt. Die Kapillargelelektrophorese (CGE) nutzt Polymersiebe oder Gele, um Biomoleküle selektiv nach ihrer Größe zu trennen.

Die meisten modifizierten und alle unmodifizierten Oligonukleotide tragen bei neutralem pH-Wert pro Phosphatgruppe eine negative Ladung, und wandern daher zur Anode. Deshalb wird in der ON-Analytik die CE-Apparatur im "reverse polarity mode" betrieben, also mit kathodenseitiger Probenaufgabe und Detektion an der Anode. Da der EOF Richtung Kathode die Analyse verhindern oder zumindest verlängern würde, werden zur Bestimmung von ON Kapillaren mit neutraler Oberfläche eingesetzt, die eine Ausbildung des EOF unterbinden.

Als Polymergel zur Trennung von ON dient meist Polyacrylamid, entweder quervernetzt oder als lineares Gel. Quervernetzte Polyacrylamidgele zeigen eine hervorragende Trennleistung, polymerisieren jedoch in der Kapillare und binden an die Glaswand, sie sind daher nicht austauschbar. Lineare Gele sind austauschbare, viskose Gellösungen (vgl. Schwer, 2006, S. 287).

Um die Bildung von Sekundärstrukturen, die eine Trennung erschweren würden, zu verhindern werden dem Gel und Puffer denaturierende Chemikalien wie Harnstoff, Formamid (FA) oder DMSO (Dimethylsulfoxid) zugegeben. Höhere Temperaturen unterdrücken ebenfalls die Bildung von Sekundärstrukturen und verbessern die Selektivität, jedoch sind sowohl FA als auch Harnstoff thermisch instabil. Die optimale Temperatur liegt zwischen 60 und 70 °C. (vgl. Carmody & Noll, 2011, p. 249).

5.4 Induktiv gekoppeltes Plasma (ICP)

Induktiv gekoppeltes Plasma (inductively coupled plasma, ICP) ist eine energiereiche Atomisierungsquelle, die mit optischer Emissionsspektroskopie (OES) oder Massenspektrometrie (MS) zur Bestimmung von Metallen und einigen Nichtmetallen gekoppelt werden kann. Der Plasmagenerator besteht aus drei konzentrischen Quarzröhren, die in einer wassergekühlten Induktionsspule enden. Zwischen den beiden äußeren Röhren fließt ein Argongasstrom, in der Mitte wird die Probe als Aerosol oder Dampf in Argongas eingebracht. Durch den Funken einer Tesla-Spule erfolgt die Initial-Ionisierung, welche im Gasstrom freie Elektronen erzeugt. Die Induktionsspule liefert ein hochfrequentes, fluktuierendes Magnetfeld mit 30 bis 40 Millionen Zyklen pro Sekunde (30-40 MHz), wodurch die Elektronen auf geschlossene kreisförmige Bahnen beschleunigt werden und durch Kollision mit dem Argongas weitere Elektronen freisetzen ($\text{Ar} \rightarrow \text{Ar}^+ + e^-$). Der Prozess setzt sich fort bis sich ein Gleichgewicht zwischen abgespaltenen und wieder aufgenommenen Elektronen einstellt. Die erzwungene Kreisbahn der Argonkationen und Elektronen führt zu ohmscher Aufheizung mit Temperaturen bis zu 10.000 K. Die leitfähige Mischung aus Atomen, Molekülen, Kationen und freien Elektronen im Gleichgewicht bezeichnet man als Plasma.

Die in das heiße Plasma eingebrachte Probe verdampft und wird in Atome zerlegt, welche (abhängig von der Ionisierungsenergie) zum Großteil einfach ionisiert werden, also das am schwächsten gebundene Elektron verlieren. Die charakteristischen Emissionswellenlängen jeder Ionenspezies können nun, nach Aufspaltung der elektromagnetischen Strahlung an einem Gitter, simultan in einem Photodetektorarray gemessen werden (ICP-OES).

Eine Alternative mit deutlich niedrigeren Nachweisgrenzen stellt die Kopplung mit einem Massenspektrometer (Quadrupol) dar. Das Interface zwischen ICP und MS besteht aus einer Serie von Konen, zwischen denen die Analyten einerseits auf Raumtemperatur gebracht, und andererseits von Normaldruck in ein Hochvakuum überführt werden. Im Interface wird mittels einer Vorvakuumpumpe der Großteil des ungeladenen Argons abgepumpt, während die ionischen Analyten durch magnetische Linsen fokussiert werden.

Die Ultrapurenanalytik von Metallen in therapeutischen Oligonukleotiden mittels ICP-MS ist behördlich notwendig, aber auch biochemisch erforderlich, da Metalle den Abbau von ON katalysieren können. Bei pharmazeutischer Verwendung erfordert dies eine teure und aufwändige Untersuchung und toxikologische Charakterisierung der Abbauprodukte.

Manche Metalle werden bewusst zugesetzt, z.B. Cäsium aus der Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation oder Natrium als Gegenion im ON. In der Produktion können Spuren von Metallen aus offensichtlichen Quellen wie dem eingesetzten Wasser oder der Verpackung stammen, jedoch ist auch zu bedenken, dass z.B. jeder Kontakt mit Stahl die Probe mit Eisen, Kupfer, Chrom, Nickel,... kontaminiert, und Glasgefäße Aluminium, Strontium, Bor, Silizium,.. abgeben.

Die Probenaufarbeitung von ON erfolgt üblicherweise durch Verdünnung in 0,1 M Salpetersäure, falls nötig kann der Abbau durch leichtes Erwärmen beschleunigt werden. Auch im Labor sind Metallkontaminationen zu vermeiden, Glasgefäße sollten generell vermieden, und Polymerbehältnisse erst nach gründlichem Spülen mit verdünnter Salpetersäure verwendet werden (vgl. Murphy, 2011, p. 454).

6. Diskussion

Die Phosphoramidit-Methode zur Synthese von Oligonukleotiden an Festphasen ist seit mittlerweile rund 30 Jahren gebräuchlich und unübertroffen. Obwohl sich die grundlegenden Reaktionsschritte nicht geändert haben, werden Details weiterhin optimiert, um eine noch höhere Ausbeute der gewünschten Oligonukleotide zu erhalten. Durch die sich wiederholenden Syntheseschritte wirken sich auch kleinste Verbesserungen der Kopplungsausbeute in der Menge des Produkts stark aus, bei einem ON aus 60 Nukleotiden sind z.B. bei einer Ausbeute pro Schritt von 99,5% am Ende 74% full-length Oligonukleotid vorhanden, eine Steigerung auf 99,9% führt zu 94% an gewünschtem Endprodukt.

Chemische Modifikationen an therapeutischen ON sind immer noch ein äußerst lebendiges Feld der Forschung, da sie die primäre Möglichkeit zur Verbesserung der Wirksamkeit, Biostabilität, Spezifität und zur Minderung von Nebeneffekten und Senkung der Cytotoxizität darstellen. Die größte Schwierigkeit beim Einsatz therapeutischer Antisense-Oligonukleotide besteht noch immer darin, sie in wirksamer Dosis, selektiv und mit ausreichender Halbwertszeit im Zielorgan zum Einsatz zu bringen.

Dem Analytiker steht eine Vielzahl an Methoden zur Trennung, Charakterisierung und Quantifizierung von Wirkstoffen und Metaboliten zur Verfügung. Eine Herausforderung der Zukunft wird sein, die Probenvorbereitung von ON und deren Analytik mittels LC-MS zu optimieren, insbesondere was die Salztoleranz und die Senkung der Nachweisgrenzen betrifft.

Der zugrunde liegende einfache aber universelle Mechanismus, beliebige Ziel-RNA spezifisch zu blockieren, sowie die volle Pipeline an therapeutischen Oligonukleotiden in verschiedenen Phasen klinischer Studien lassen erwarten, dass der Einsatz dieser Arzneimittel stark ausgeweitet wird.

LITERATURVERZEICHNIS

Ardrey, B. (2003). *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

Atdbio (2012). Solid-Phase Oligonucleotid Synthesis. URL: <http://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis> (abgerufen am 26. März 2012).

Carmody, J. & Noll, B. (2011). Purity and Content Analysis of Oligonucleotides by Capillary Gel Electrophoresis. In: Bonilla, J. V. & Srivatsa, G. S. (Eds.), *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products* (p. 243-264). Boca Raton: CRC Press.

Cramer, H., Finn, K. J. & Herzberg, E. (2011). Purity Analysis and Impurities Determination by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. In: Bonilla, J. V. & Srivatsa, G. S. (Eds.), *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products* (p. 1-46). Boca Raton: CRC Press.

Dias, N. & Stein, C. A. (2002). Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, 347-355.

Engelhardt, H., Beck, W. & Schmitt, T. (1994). *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten*. Braunschweig/Wiesbaden: Vieweg & Sohn.

Gong, L. & McCullagh, J. S. O. (2011). Analysis of oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to negative ion electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5480-5486.

Integrated DNA Technologies (2011). Antisense Technologies. URL: <http://eu.idtdna.com/Pages/docs/educational-resources/antisense-technologies.pdf> (abgerufen am 23. März 2012).

Kellner, R. (2006). Chromatographische Trennmethode. In: Lottspeich, F. & Engels, J. W. (Hrsg.), *Bioanalytik* (S. 215-233). München: Elsevier GmbH.

McGinnis, A. C., Chen, B. & Bartlett, M. G. (2012). Chromatographic methods for the determination of therapeutic oligonucleotides. *Journal of Chromatography B*, 883-884, 76-94.

Meyer, H. E. & Warscheid, B. (2006). Massenspektrometrie. In: Lottspeich, F. & Engels, J. W. (Hrsg.), *Bioanalytik* (S. 329-372). München: Elsevier GmbH.

Meyer, V. R. (2009). *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. Weinheim: WILEY-VCH.

Murphy, P. M. (2011). Analysis of Metals in Oligonucleotides. In: Bonilla, J. V. & Srivatsa, G. S. (Eds.), *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products* (p. 453-464). Boca Raton: CRC Press.

Pourshahaian, S. & McCarthy, S. M. (2011). Analysis of Oligonucleotides by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. In: Bonilla, J. V. & Srivatsa, G. S. (Eds.), *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products* (p. 137-166). Boca Raton: CRC Press.

Schliepe, J. (1999). *Synthese von metallmodifizierten Oligonucleotiden mit genregulatorischen Eigenschaften*. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin. URL: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/chemie/schliepe-juergen/PDF/Schliepe.pdf> (abgerufen am 11. Juni 2012).

Schwer, C. (2006). Kapillarelektrophorese. In: Lottspeich, F. & Engels, J. W. (Hrsg.), *Bioanalytik* (S. 269-297). München: Elsevier GmbH.

Skoog, D. A. & Leary, J. J. (1996). *Instrumentelle Analytik*. Berlin: Springer.

Winkler, J. (2006). *Arzneimittelentwicklung und Wirkstoffentwicklung Oligonukleotide*. URL: <http://homepage.univie.ac.at/johannes.winkler/Oligonukleotide.pdf> (abgerufen am 23. März 2012).

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 1. Methoden der Oligonukleotidsynthese (Winkler, 2006, S. 10).....	3
Abbildung 2. Phosphotriestermethode (Schliepe, 1999, S. 8).....	4
Abbildung 3. H-Phosphonat-Verfahren (Schliepe, 1999, S. 10).....	5
Abbildung 4. Standard-Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode (ATD Bio, 2012).....	6
Abbildung 5. Entschützung (ATD Bio, 2012).....	7
Abbildung 6. Kopplung (ATD Bio, 2012).....	7
Abbildung 7. Capping (ATD Bio, 2012).....	7
Abbildung 8. Oxidation (ATD Bio, 2012).....	8
Abbildung 9. Abspaltung von der Festphase (ATD Bio, 2012).....	8
Abbildung 10. Entschützung (ATD Bio, 2012).....	8
Abbildung 11. Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese und mögliche Angriffspunkte von Antisense Oligonukleotiden (Winkler, 2006, S. 4).....	9
Abbildung 12. Modifikationsmöglichkeiten von RNA/DNA-Nukleotiden (Integrated DNA Technologies, 2011, p. 2).....	11
Abbildung 13. Verlauf einer chromatographischen Trennung (Meyer, 2009, S. 19).....	13
Abbildung 14. Schema einer HPLC-Apparatur (Meyer, 2009, S. 11).....	14
Abbildung 15. Bauprinzip einer Kurzhub-Kolbenpumpe (Meyer, 2009, S. 58).....	15
Abbildung 16. Chemischer Aufbau von Silicagel (Meyer, 2009, S. 119).....	15
Abbildung 17. Modifikation von Silicagel mit Organochlorsilanen (Skoog & Leary, 1996, S. 692).....	16
Abbildung 18. Schematische Darstellung des makroskopischen (oben) und mikroskopischen ESI-Prozesses (unten) (Meyer & Warscheid, 2006, S. 352).....	20
Abbildung 19. Schema eines Quadrupol-Massenanalysators (Ardrey, 2003, p. 42).....	21
Abbildung 20. Aufbau einer CE-Apparatur (Engelhardt, Beck & Schmitt, 1994, S. 5).....	23