INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Apotheker Markus Johannes Petermeier

aus Soest

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2008

Allosterisch regulierte Diels-Alder Ribozyme als maßgeschneiderte Werkzeuge in der Arzneistoffanalytik

Gutachter: **Prof. Dr. Andres Jäschke**
Prof. Dr. Stefan Wölfl

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andres Jäschke in der Zeit von Juli 2003 bis März 2008 am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB), Abteilung Chemie der Fakultät für Biowissenschaften der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg angefertigt.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe, sowie wörtliche oder inhaltliche Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Markus Johannes Petermeier

Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen, die mir diese Dissertation ermöglicht haben und mich dabei unterstützt haben.

Zu aller erst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Andres Jäschke für die geduldige Betreuung meiner Arbeit, das interessante Thema, die exzellenten Arbeitsbedingungen am Institut und das gute Arbeitsklima bedanken. Prof. Dr. Stefan Wölfl danke ich für die Begutachtung meiner Doktorarbeit.

Den guten Seelen des 5. OG, Karin Weiß und Viola Funk danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft in organisatorischen Dingen. Heike Einberger, Heiko Rudy, Sandra Suhm und Tobias Timmermann danke ich für Ihre hervorragende technische Assistenz.

Allen derzeitigen und ehemaligen Laborkollegen gilt großer Dank für das prima Arbeitsklima und die tolle Zeit. „Den Jungs“ des Arbeitskreises danke ich für Ihren Humor und Ihre Lebensfreude: Salifu Seidu-Larry, Ayan Samanta, Pierre Fournier, Alexander Nierth, Marco Singer, Benajmin Strauß und Martin Hengesbach. Dr. Stephanie Pfander und Anna Wiesmayr danke ich für den Zusammenhalt unter Apothekern. Der Mannheimer Fraktion: Dr. Barbara-Sylvia Weigand, Dr. Mihaela Caprioara, Dr. Razvan Buda und Dr. Richard Wombacher samt Familie danke ich für die gemeinsamen Heimfahrten mit der Bahn und die schönen Stunden in Mannheim. Dres. Andrea und Tim Kersebohm samt Familie für das Lektorat und die Unterstützung.

Meinem Kumpel Uwe danke ich für seine langjährige Freundschaft und seiner analytischen Kompetenz bei wissenschaftlichen Ferndiagnosen, Doro für Ihre Freundschaft und aufmunternden Worte.

Einen großen Dank möchte ich vor allem an meine Familie, besonders an meine Eltern richten, die mir diese Chance erst ermöglicht haben.

Auch Familie Kloke aus Essen gebührt ein großer Dank für ihre Anteilnahme, Offenherzigkeit und stetes Willkommensein in Ihrem Zuhause.

Meinen „Neusser Freunden“, allen voran Michael Arns, der mich während der ganzen letzten Jahre begleitet hat, gebührt ein ganz besonderer Dank. Ebenso den Petermeiers aus Erwitte: Birgit, Gerrit, Philip, Ruth und zu guter letzt auch meinem Bruder Siegfried: ohne Euch wäre vieles anders gelaufen!

Zusammenfassung

Petermeier, Markus; Apotheker, 16.12.2008

Titel: Allosterisch regulierte Diels-Alder Ribozyme in der Arzneistoffanalytik

1. Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke
2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wölfl

Biosensoren, die auf einer katalytischen Reaktion basieren, spielen in unserem täglichen Leben eine große Rolle. Ein wichtiges Beispiel ist das Enzym Glucose-Oxidase, welches in Form von Teststreifen täglich weltweit die Blutzuckerbestimmung von Millionen Diabetikern sehr erleichtert.
In der vorliegenden Arbeit wurden die Struktur- und Funktionszusammenhänge des Phänomens Allosterie für katalytisch aktive RNA-Moleküle am Beispiel des Diels-Alder-Ribozyms untersucht. Dazu wurden molekulare Schalter (Biosensoren) auf Basis eines Diels-Alderase-Ribozyms in Kombination mit einem Theophyllin-Aptamer entwickelt und charakterisiert. Diese Konstrukte sind in der Lage, die Bindung des Arzneistoffes Theophyllin in ein katalytisches Ereignis umzuwandeln und somit ein Signal zu generieren.
Dazu wurden in einem ersten Schritt acht verschiedene Klone, die aus einer vorausgegangenen allosterischen Selektion stammten, mittels Fluoreszenz- und UV-Spektrometrie, sowie per HPLC-Chromatographie, auf deren allosterisches Verhalten gegenüber Theophyllin charakterisiert. Bei der Fluoreszenzspektrometrie wurde die Reaktion mit linker-gekoppelten Reaktanden (*cis*-Reaktion), bei der UV-Spektrometrie und HPLC-Chromatographie die Reaktion mit freien Reaktanden (*trans*-Reaktion) angewandt. Der am stärksten allosterisch regulierte molekulare Schalter, MH23, wies maximal eine ca. 70-fache Aktivierung durch Theophyllin für die Reaktion mit linker-gekoppelten Reaktanden auf. Für die echte katalytische Reaktion mit freien Reaktanden wurde eine 3- bis zu 5-fache Aktivierung beobachtet.
Im nächsten Schritt wurden zwei allosterische Selektionen auf Basis der SELEX-Technologie (**S**ystematic **E**nrichment of **L**igands by **E**xponential Enrichment) mit zwei unterschiedlich konstruierten RNA-Bibliotheken, Helix 1 und Helix 3, durchgeführt. Bei den beiden RNA-Bibliotheken handelte es sich jeweils um Diels-Alderase-Ribozyme, an denen das Theophyllin-Aptamer entweder an Helix 1 oder an Helix 3 über einen randomisierten, doppelsträngigen Abschnitt verknüpft war. Während für die RNA-Bibliothek H-I ein kontinuierlicher Anstieg an immobilisierten RNA-Spezies über insgesamt sieben Runden beobachtet werden konnte, war für die RNA-Bibliothek H-III innerhalb von sechs Runden kein Anstieg zu verzeichnen. Ein interessanter Nebenbefund waren drei in der Sequenz unterschiedliche Klone aus der RNA-Bibliothek H-I, die alle eine höhere katalytische Aktivität im Fluoreszenzspektrometrischen Assay als das ursprüngliche Diels-Alderase-Ribzoym zeigten. Die Aktivität der Klone war allerdings unabhängig von der Theophyllin-Konzentration.
Eine detaillierte Analyse der Sequenzen aller isolierten Klone der letzten beiden Selektionsrunden aus beiden Bibliotheken zeigte, dass kein isolierter Klon über ein für die Bindung von Theophyllin intaktes Aptamer verfügte, was die nicht vorhandene Aktivierung durch Theophyllin der meisten Klone erklären könnte.
Im abschließenden Projekt wurde mittels rationalen Designs und Fluoreszenzspektrometrischen Assay allosterisch regulierte Diels-Alderase-Ribozyme entwickelt. Das am stärksten durch Theophyllin aktivierte Konstrukt zeigte in der linker-gekoppelten Reak

tanden eine ca. 50-fache Aktivierung. Unter den Bedingungen echter Katalyse mitfreien Reaktanden konnte eine 9- bis 15-fache Aktivierung in Anwesenheit von Theophyllin beobachtet werden.
Zusammenfassend konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass es möglich ist, molekulare Schalter auf Basis des Diels-Alderase-Ribozyms zu entwickeln. Ferner wird die Vielseitigkeit des Diels-Alderase-Ribozyms und von RNA im Allgemeinen durch die Tatsache unterstrichen, dass an zwei räumlich unterschiedlichen Stellen ein Bindungsereignis in ein katalytisches Ereignis umgewandelt werden konnte. Die erhaltenen Schaltfaktoren waren in der Reaktion mit linker-gekoppelten Reaktanden jeweils höher als für die echte katalytische Reaktion mit freien Reaktanden.

Summary

Petermeier, Markus; Apotheker, 16.12.2008

Title: Allosterically regulated Diels-Alder ribozymes in drug analytics

1. Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke
2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wölfl

Biosensors, based on catalytic reactions do find applications also in our daily life. For example, monitoring the human blood glucose level by commercially available control strips is used by many million people every day. On these strips, an enzyme called glucose-oxidase is immobilized and transforms the amount of glucose present in the blood sample on into a corresponding signal. The signal is indicated afterwards in figures and displays the actual amount of glucose in the sample being applied.

The aim of this work was to investigate the realionship between structure and function of the phenomenon allostery for catalytic RNA molecules, exemplified for the Diels-Alderase-ribozyme. Therefore, molecular switches, based on the Diels-Alderase-ribozyme in combination with a theophyllin-aptamer were constructed and characterised. These constructs were able to translate the binding of the widely used drug theopyhlline into a catalytic event and therefore to generate a signal for readout purpose.

In a first step, eight different clones that originated from a previous allosteric selection were characterised by two different reaction formats concerning their allosteric behaviour towards theophylline. RNA covalently bound to one of the reactands, was analysed by fluorescence-assay (*cis*-reaction). RNA with both reactands free in solution was analysed either by UV-spectroscopy or HPLC-chromatography (*trans*-reaction). A clone called MH23 was found to be activated 70-fold by theophylline for the reaction with one reactand being covalently bound. For the true catalytic reaction with free reactands, MH23 showed a 3- to 5-fold activation by theophylline.

In the following step, two allosteric selections, based on the SELEX technology (**S**ystematic **E**nrichment of **L**igands by **E**xponential Enrichment) with two different constructed RNA-libraries, named H-I and H-III, were conducted. For both libraries, a Diels-Alderase-ribozyme was connected to a theophylline-aptamer via Helix 1 (H-I) or via Helix 3 (H-III). The stem connecting the two domains was a double-stranded stretch of nucleotides for both libraries. In the selection procedure, a continuous increase over seven continuous rounds was found for library H-I, whereas for library H-III no increase over six rounds was found, measured by immobilised RNA species on streptavidin-agarose. Surprinsingly, three isolated clones from RNA library H-I, different in sequence, showed a higher catalytic activity compared to the wild type Diels-Alderase motif for the reaction with covalently bound reactands. But, the activity measured for these sequences was found to be independent from the theophylline concentration applied.

A detailed sequence-analysis of all clones isolated from the last two rounds of the allosteric selection revealed that none of them carried a theophylline-aptamer being able to bind theophylline. This could be a possible explanation that almost all clones isolated did no show allosteric behaviour towards theophylline.

In the last project, allosterically regulated Diels-Alderase-ribozymes were developed by rational means in the reaction format with one reactand covalently bound to the RNA. The sequence being regulated most by theophylline showed a 50-fold activation for the

reaction with covalently bound reactands and a 9- to 15-fold activation for the reaction with free reactands.
In summary, it could be demonstrated that one could develop allosteric molecular switches based on the Diels-Alderase-Ribozyme. The molecular switches were able to translate a binding event into a catalytic event at two different positions of the ribozyme. This emphasises the versatility of the Diels-Alderase-ribozyme and RNA, in general. The obtained switch factors each were higher for the reaction with covalently-bound reactands than for the reaction with free reactants.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 19
1.1 Natürliche Ribozyme 22
1.2 *in vitro* Selektion 24
1.2.1 Direkte Selektion 25
1.2.2 Direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden 26
1.3 Künstliche Ribozyme 27
1.4 Aptamere 28
1.5 Allosterisch regulierte Ribozyme 33
1.5.1 Künstliche allosterische Ribozyme 33
1.5.2 Riboswitches 36
1.6 Diels-Alderase Ribozyme 38
1.7 Allosterisch regulierte Diels-Alder Ribozyme 43
2 Ziel der Arbeit 45
3 Material und Methoden 47
3.1 Oligoribonukleotide 47
3.2 Oligodesoxynukleotide 47
3.3 Aufarbeitung und Charakterisierung von Nukleinsäuren 54
3.3.1 Gelelektrophorese 54
3.3.1.1 Denaturierende Polyacylamidgelektrophorese (PAGE) 54
3.3.1.2 Agarosegelelektrophorese 55
3.3.2 Nachweis von Nukleinsäuren 55
3.3.2.1 Autoradiographie 55
3.3.2.2 Färbung mit Ethidiumbromid 56
3.3.2.3 UV-Shadowing 56
3.3.3 Elution und Fällung von Nukleinsäuren aus Gelen 56
3.3.4 Ethanolfällung 57
3.3.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) 57
3.4 Konzentrations- und Mengenbestimmungen von Nukleinsäuren 58
3.4.1 Photometrische Messung 58
3.4.2 Cerenkov-Messung 59
3.5 Molekularbiologische Methoden 60
3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 60
3.5.2 PCR-Auffüllreaktion 61
3.5.3 T7-Transkriptionsreaktion 62
3.5.4 T7-Transkriptionsreaktion mit Initiatornukleotid 63
3.5.5 Reverse Transkription 64
3.5.6 Klonierung 65
3.5.7 LB-Übernachtkulturen und Insertkontrolle 67
3.5.8 Plasmidaufreinigung 68
3.5.9 Sequenzierung 68
3.6 Durchführung der allosterischen *in vitro* Selektion 68
3.7 Aktivitätsmessungen von Ribozymen 72
3.7.1 Fluoreszenzspektrometrischer Assay 72
3.7.2 UV-Spektrometrischer Assay 74
3.7.3 HPLC-Assay 75

4 Ergebnisse 77
4.1 Charakterisierung allosterischer Schalter aus einer vorangegangen *in vitro* Selektion 77
4.1.1 Untersuchung des allosterischen Verhaltens gegenüber Theophyllin 77
4.1.2 Liganden-Abhängigkeit von MH23 80
4.1.3 Temperaturabhängigkeit von MH23 83
4.1.4 Zusammensetzung der Reaktion mit freien Reaktanden 85
4.1.5 UV-Spektrometrische Aktivität von MH23 86
4.1.6 HPLC-Assay von MH23 88
4.2 *In vitro* Selektion allosterischer Diels-Alderase-Ribozyme 94
4.2.1 Basis und Entwicklung der Selektion 94
4.2.2 Die RNA-Bibliotheken H-I und H-III 94
4.2.3 Fluoreszenzmessung der RNA-Bibliotheken vor allosterischer Selektion 96
4.2.4 Selektionsschema Negativselektion 99
4.2.5 Selektionsschema Positivselektion 100
4.2.6 Immobilisierungsprofil der Selektion 101
4.2.7 Fluoreszenzmessung der RNA-Bibliotheken nach allosterischer Selektion 104
4.2.8 Immobilisierungs-Assay nach Fluoreszenzmessung 107
4.2.9 Kontrollexperimente Immobilisierung im Reaktionsgefäss für H-I 109
4.3 Klonierung und Charakterisierung 112
4.4 Rationales Design allosterischer Diels-Alderase-Ribozyme 121
4.4.1 Ausgangspunkt und Entwicklungsstrategie 122
4.4.2 Allgemeiner Aufbau und Design 122
4.4.3 Die Verknüpfung zwischen Aptamer und Ribozym 124
4.4.4 Evaluierung der Stabilität von Helix 3 und Helix C 128
4.4.5 Verlängerung von Helix 3 zur Verlängerung von Helix D in der inaktiven Konformation 130
4.4.6 Insertion von Guanosinen in Helix 3 zur Verlängerung von Helix D in der inaktiven Konformation 132
4.4.7 Verlängerung der Interaktion zwischen 5'- und 3'-Ende in der inaktiven Konformation (Helix A) 134
4.4.8 Verlängerung von Helix B in der inaktiven Konformation 136
4.4.9 Reaktionsraten und Schaltfaktoren 139
4.4.10 Optimierte Messparameter des Fluoreszenz-Assay 140
4.4.11 Reaktion mit freien Reaktanden für Theo 19 144
4.4.12 UV-Spektrometrische Aktivität von Theo 19 144
4.4.13 HPLC-Assay von Theo 19 146
5 Diskussion 149
5.1 Charakterisierung von MH23 150
5.2 Allosterische *in vitro* Selektion der Bibliotheken H-I und H-III 154
5.3 Rationales Design allosterischer Diels-Alderase Ribozyme 157
6 Ausblick 161
7 Anhang 165
7.1 Abkürzungen 165
7.2 Geräte 167
7.3 Puffer 168

7.4 Enzyme 169
7.5 Sonstige Materialien 169
7.6 Fluoreszenzspektrometrische Kurven 170
7.6.1 Sequenzen aus vorangegangener allosterischer Selektion 170
7.6.2 RNA-Bibliotheken vor allosterischer Selektion 171
7.6.3 RNA-Bibliotheken nach allosterischer Selektion 171
7.6.4 Klone nach allosterischer Selektion aus RNA-Bibliothek H-I 171
7.6.5 Klone nach allosterischer Selektion aus RNA-Bibliothek H-III 175
7.6.6 Rationales Design 177
7.7 UV-spektrometrische Kurven 181
7.7.1 MH23 181
7.7.2 49mer 181
7.7.3 Rationales Konstrukt Theo 19 181
8 Publikationen und Poster 183
9 Literatur 185

1 Einleitung

Die Regulation biologischer Vorgänge ist eine inhärente Eigenschaft aller Organismen. Dieses Phänomen wird auch als Selbstregulation oder Homöostase bezeichnet. Der Begriff Homöostase (gr. *homo*, gleich, identisch und *histemi*, gestellt, angehalten) wurde erstmals 1860 von dem französischen Physiologen Claude Bernard beschrieben und in den 1930er Jahren durch den amerikanischen Physiologen Walter Cannon wissenschaftlich geprägt[1].

Bei der Homöostase geht es um die Fähigkeit eines offenen oder geschlossenen Systems, sich durch Rückkopplungsmechanismen innerhalb gewisser Grenzen selbständig zu regeln. Angestrebt wird dabei stets ein stabiler, konstanter Zustand. Möglich ist dies durch die Verknüpfung von mindestens drei kommunizierenden Instanzen: Sensor, Informationsverarbeitung und Effektor (siehe **Abbildung 1.1**). Der Sensor oder Rezeptor besitzt die Fähigkeit, die Reize und Signale seiner Umwelt wahrzunehmen. Er überträgt die Daten an die Informationsverarbeitung, welche die eintreffenden Werte verarbeitet und eine entsprechende Antwort an den Effektor weiterleitet. Der Effektor wiederum sorgt für eine Änderung des in erster Instanz gemessenen Wertes. Diese Änderung kann dabei entweder zu einer Erhöhung oder zu einer Erniedrigung des wahrgenommenen Signals führen. Im ersten Fall spricht man von einer positiven, im zweiten Fall von einer negativen Rückkopplung.

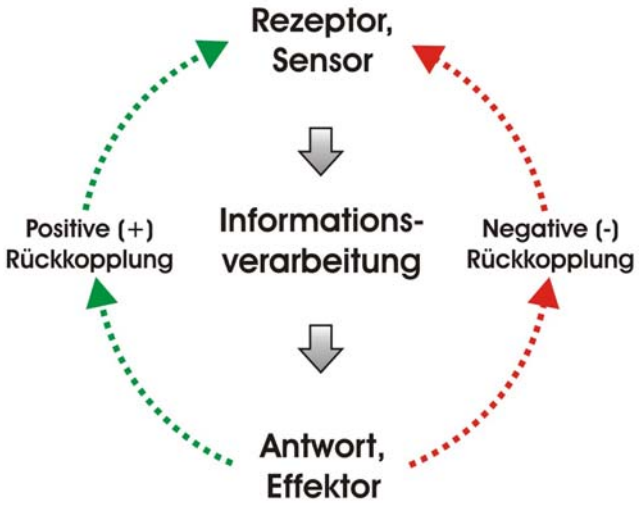


Abbildung 1.1: *Rückkopplungsmechanismen eines homöostatischen Regelkreises*

Der zunehmende Erkenntnisgewinn im Verlauf des 20. Jahrhunderts, vor allem auf dem Gebiet der Naturwissenschaften, führte zur Entdeckung dieses allgemeinen Prinzips auch auf molekularer Ebene. Die Regulation von Stoffwechselprozessen auf molekularer Ebene ist dabei in den meisten Fällen mit der Aktivität von Enzymen assoziiert. Durch die sich aus ihrer polymeren Struktur ergebenden immensen Variationsmöglichkeiten sind Enzyme in der Lage, hochkomplexe, vielfältige dreidimensionale Strukturen auszubilden und damit spezifisch ein sehr breites Spektrum von Molekülen zu binden. Dieses spezifische, physikalische Binden ist die Voraussetzung für das Knüpfen und Lösen chemischer Bindungen. Deshalb werden Enzyme auch als die Katalysatoren biologischer Systeme bezeichnet. Ihnen kommt damit eine Schlüsselfunktion bei der Regulation von Stoffwechselvorgängen zu. Ihre Aktivität darf aber nicht ungebremst und permanent zum Tragen kommen, sondern muss häufig sehr fein reguliert werden, damit sie ihre Funktion räumlich und zeitlich korrekt ausführen können. Nur aufgrund dieser Regulationsfähigkeit ist es den Enzymen möglich, solch ein breites Spektrum an biologischen Prozessen zu koordinieren, wie es in Organismen stattfindet. Man unterscheidet bei der Enzymregulation auf molekularer Ebene fünf verschiedene Mechanismen:

1. Allosterische Regulation,
2. Verschiedene Enzymformen,
3. Reversible kovalente Modifikation,
4. Proteolytische Aktivierung,
5. Regulation der vorhandenen Enzymmenge.

Der allosterischen Regulation kommt im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine besondere Bedeutung zu. Man versteht darunter die Änderung der Aktivität eines Enzyms als Reaktion auf Signalmoleküle. Ein allosterisch reguliertes Enzym kann somit auch als Informationsschaltstelle bezeichnet werden. Mit dem Begriff Allosterie (gr. *allos,* anders und *stereos*, Ort) ist ein Phänomen gemeint, welches „an einem anderen Ort“ stattfindet. Und in der Tat weisen allosterisch regulierte Enzyme unterschiedliche Bindungsstellen auf, die zwar räumlich voneinander getrennt sind, funktionell aber miteinander interagieren. Man unterscheidet dabei zwischen dem katalytischen und dem allosterischen Zentrum. Das allosterische Zentrum ist in der Lage, einen Liganden zu binden und dieses Bindungsereignis in eine Veränderung der Raumstruktur umzusetzen, welche wiederum einen Einfluss auf das aktive Zentrum und damit auf die katalytische Ak-

tivität des Enzyms ausübt. Das Signalmolekül, welches an die allosterische Bindungsstelle bindet, wird auch als allosterischer Ligand bezeichnet. Unterschieden wird ferner zwischen homotropen (das Signalmolekül ist gleichzeitig auch das Substrat des Enzyms) und heterotropen Liganden (das Signalmolekül ist ein Nicht-Substrat). Das Binden des allosterischen Liganden kann sowohl eine Aktivierung (positive Kooperativität) als auch eine Inhibierung der Enzymaktivität zur Folge haben (negative Kooperativität[2]).

Allosterisch regulierte Enzyme vereinen somit ebenfalls die drei grundlegenden Komponenten der Selbstregulation: Sensor, Informationsverarbeitung und Effektor. Lange war man der Meinung, dass diese Form der Selbstregulation auf molekularer Ebene alleine den Proteinen vorbehalten war. Diese Annahme wurde das erste Mal Anfang der 1980er Jahre durch Cech und Altman in Frage gestellt. Sie entdeckten unabhängig voneinander, dass RNA jenseits seiner Funktion als Träger von Erbinformation auch katalytische Aktivität zeigt. Diese Erkenntnis revolutionierte das Verständnis der Aufgaben und Funktionen der Nukleinsäuren, speziell der RNA. Für ihre Arbeiten wurden Cech und Altman gemeinsam im Jahre 1989 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet[3, 4]. Solche RNA-Moleküle mit katalytischer Aktivität werden in Anlehnung an die Begriffe **Ribo**nukleinsäure und En**zym** auch als Ribozyme bezeichnet. Unter Zuhilfenahme der *in vitro*-Transkription, der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der reversen Transkription (RT) wurde 1990 parallel in den Arbeitsgruppen von Szostak, Gold und Joyce eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, RNA-Moleküle zu generieren, die in der Lage sind, einen Liganden spezifisch und mit hoher Affinität zu binden oder eine gewünschte Reaktion zu katalysieren[5-7]. Ellington und Szostak nannten die RNA-Moleküle in Anlehnung an das lateinische Wort *aptus* (passend, geeignet) Aptamere, wohingegen Tuerck und Gold die zugrunde liegende Methode als SELEX (**S**ystematic **E**volution of **L**igands by **EX**ponential enrichment) beschrieben.

Die erste biologische Anwendung zur Regulation biologischer Vorgänge mittels künstlich selektierter RNA konnte im Jahr 1998 durch Werstuck et al. realisiert werden. Dabei wurde ein künstliches RNA-Aptamer in die 5'-untranslatierte Region einer mRNA aus Säugetierzellen eingefügt, wodurch die Genexpression in Abhängigkeit des Liganden kontrolliert werden konnte[8]. Die grundlegende Frage, die sich nach diesen Erkenntnissen stellte, war, ob molekulare, auf RNA-Molekülen basierende Selbstregulati-

onsmechanismen bereits in der Natur vorhanden sind[9, 10]. Im Jahre 1993 wurde von Lee *et al.* das erste Mal RNA-Moleküle beschrieben, welche an der Herunterregulation der Genexpression beteiligt sind[11]. Der Name miRNA (micro RNA) wurde erst 2001 nach weiteren Publikationen gewählt[12]. Wenig später, im Jahre 2002 konnte experimentell mit dem Auffinden eines so genannten Riboswitches eine weitere RNA-Spezies gefunden werden, die in die Mechanismen der Genregulation eingreift. Der Riboswitch befindet sich dabei in der 5'-untranslatierten Region einer mRNA und ist in die Regulation seines eigenen codierenden Gens involviert[13-16].

1.1 Natürliche Ribozyme

Cech und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass dem posttranskriptionalen Spleißen des Gruppe I-Introns aus Tetrahymena thermophila ein Selbstspaltungsmechanismus zugrunde liegt, das Ribozym somit selbstmodifizierend aktiv ist[17, 18]. Altmans Forschungsinteressen galten zur gleichen Zeit der bakteriellen Ribonuklease P (RNase P). Diese besteht aus RNA- und Proteinuntereinheiten, spaltet Vorläufersequenzen vom 5'-Ende der prä-tRNA ab und formt somit reife tRNAs. Altman und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die katalytische Aktivität der RNase P ausschließlich in deren RNA-Untereinheit angesiedelt ist[19, 20].

Die beiden grundlegenden Entdeckungen von Cech und Altman sorgten dafür, dass auf dem neu entstandenen Forschungsgebiet der Ribozyme eine Vielzahl weiterer Ribozyme natürlichen Ursprungs gefunden werden konnte (siehe **Tabelle 1.1**).

Ribozym	Aktivität (Reaktionsprodukt)
Hammerhead[21, 22] Hepatitis Delta Virus[23-25] Hairpin[26] Varkud Satellit Ribozym[27] glmS Riboswitch[28]	Selbstspaltung durch Umesterung (2', 3' zyklisches Phosphat)
Gruppe I-Intron[17, 18] Gruppe II-Intron[29, 30]	Selbstsplicing durch Umesterung (3'-OH)
Ribonuklease P[19, 20]	Prozessieren primärer tRNA durch Umesterung (3'-OH)
Spliceosom[31] (U2 + U6 snRNAs)	RNA Splicing durch Umesterung (3'-OH)
Ribosom[32-35] (23S RNA)	Peptidyltransfer (Amid)

Tabelle 1.1 *Natürlich vorkommende Ribozyme und Ribonukleoprotein-Enzyme[36]*

Eine weitere Reaktion, die ebenfalls durch RNA-Moleküle katalysiert wird, wurde im Jahr 2000 entdeckt. Ban *et al[32, 33]*. konnten dabei erstmals die Kristallstruktur einer ribosomalen 50S-Untereinheit eines Bakteriums lösen. Das Ribosom, beim Bakterium wie auch beim Menschen jeweils aus einem Protein- und RNA-Anteil bestehend, ist der Ort, an dem die Peptidsynthese stattfindet. Die Ergebnisse von Ban zeigten, dass im Peptidyltransferasezentrum des Ribosoms kein Protein zu finden ist und somit der RNA-Anteil sehr wahrscheinlich für die Knüpfung der Peptidbindung verantwortlich ist. Das Ribosom gehört somit ebenfalls zur Klasse der Ribozyme[32-35].

Alle oben aufgeführten Ribozyme haben mit Ausnahme der Peptidyltransferase-Aktivität der ribosomalen RNA die gemeinsame Eigenschaft, dass sich ihre katalytische Aktivität auf die Spaltung oder Ligation des RNA-Rückgrates beschränkt. Der Mechanismus erfolgt über eine nukleophile Substitution am Phosphoratom, was zur Hydrolyse bzw. Umesterung von Phosphatgruppen führt[36]. Diese Limitierung des katalytischen Repertoires wurde durch die Etablierung der *in vitro*-Selektion Anfang der 1990er Jahre weitgehend aufgehoben.

1.2 *in vitro* Selektion

RNA besteht im Vergleich zu Proteinen nur aus den 4 Monomeren Adenin, Guanin, Cytidin und Uracil, wohingegen Proteine mindestens 20 Monomere in Form von Aminosäuren der Strukturbildung zur Verfügung stehen. Dennoch sind RNA-Moleküle ebenfalls in der Lage, hochaffine und spezifische Bindungsstellen für verschiedenste Liganden zur Verfügung stellen. Die oben erwähnten Beispiele der natürlich vorkommenden Ribozyme unterstreichen dies.

Die bereits oben angesprochene SELEX-Methode, oder auch *in vitro*-Selektion genannt, basiert auf der wiederholten Isolation aktiver Moleküle aus einer künstlich hergestellten Nukleinäurebibliothek und deren anschließender Amplifikation. Laut Sol Spiegelman's Definition der Darwinistischen Evolution aus den späten 1960er Jahren sind auch bei dieser Methode die drei grundlegenden Prinzipien enthalten: Vervielfältigung, Mutation und Selektion[37]. Grundlage der *in vitro*-Selektion ist, neben enzymatisch-molekularbiologischen Techniken, die kombinatorische Chemie und damit die Möglichkeit, eine Nukleinsäurebibliothek mittels Festphasensynthese zu herzustellen[38-40]. Diese besteht aus einem randomisierten Bereich mit einer Anzahl von N Nukleotiden, welcher von zwei konstanten Primerbindungsstellen, die sich jeweils am 3'- und am 5'-Ende befinden, flankiert ist. Ausgehend von den vier verschiedenen Bausteinen ergibt sich damit bei einer gegebenen Länge von N Nukleotiden eine Diversität von 4^N verschiedenen Sequenzen für die Bibliothek. Praktisch synthetisierbar sind auf diese Art 10^{13} -10^{16} verschiedene Moleküle, was verglichen mit der theoretisch möglichen Anzahl nur einen Bruchteil darstellt[41-43].

Die nun vorhandene, einzelsträngige DNA-Bibliothek kann entweder direkt oder nach Umschreiben in die komplementäre RNA-Bibliothek mit dem immobilisierten Zielmolekül inkubiert werden. Die dabei gebundenen Nukleinsäuren werden dann nach einer definierten Zeitspanne im eigentlichen Selektionsschritt von den nicht gebundenen abgetrennt. Dies geschieht in den meisten Fällen mittels Affinitätschromatographie an einer inerten Matrix. Die nun isolierten Spezies werden dann, bei Vorliegen von RNA-Molekülen, erst revers transkribiert und abschließend mittels PCR amplifiziert. Die resultierende, angereicherte, doppelsträngige Nukleinsäurebibliothek stellt nun die Basis für einen weiteren Zyklus dar. Dieser wird, je nach Diversität der Nukleinsäurebibliothek, 3-15-mal durchlaufen. Nach erfolgreicher Anreicherung der gewünschten Nuk-

leinsäure-Spezies werden diese erst kloniert und dann sequenziert[44] (siehe **Abbildung 1.2**).

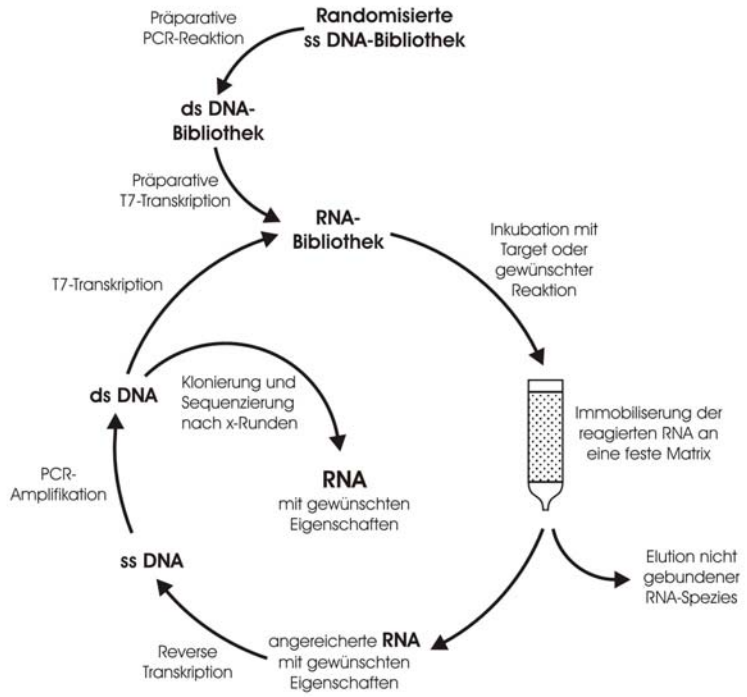


Abbildung 1.2: *Schematischer Ablauf einer in vitro Selektion für Nukleinsäuren*

1.2.1 Direkte Selektion

Durch die Methode der *in vitro*-Selektion wurden zunächst nur Aptamere isoliert. Ein weiterer Entwicklungsschritt machte es möglich, auch Nukleinsäuren mit katalytischer Aktivität zu selektieren[42]. Bei dieser Art der Selektion, der direkten Selektion, liegen beide Reaktionspartner als Edukte für die zu katalysierende Reaktion vor. Die RNA trägt dabei eines der beiden Edukte, ist somit Katalysator und Substrat in einem. Das andere Edukt ist mit einer Ankergruppe versehen, die es ermöglicht, das entstandene Reaktionsprodukt nach erfolgter Reaktion mittels Affinitätschromatographie zu isolieren. Bei den ablaufenden Reaktionen handelt es sich im Allgemeinen um Selbstmodifizierungsreaktionen der RNA. Diese Methode eignet sich somit nicht, um auf eine echte bimolekulare Reaktion zwischen freien Reaktanden (in trans) zu selektieren. Dennoch wurde das katalytische Spektrum der Nukleinsäuren durch die Anwendung dieser Weiterentwicklung um ein Vielfaches erweitert.

1.2.2 Direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden

Der Nachteil der oben beschriebenen Methode liegt in der Tatsache begründet, dass die Nukleinsäure und das damit kovalent verbundene Edukt nicht ausreichend räumlich getrennt sind. Einen Ausweg aus diesem offensichtlichen Nachteil wurde durch die Etablierung der direkten Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden durch die Arbeitsgruppen von Eaton und Jäschke erreicht[45-47]. Bei diesem System ist die RNA durch einen chemisch inerten, vor allem aber flexiblen Linker mit einem Reaktionspartner kovalent verbunden. Es kommt somit zu keiner sterischen Hinderung der RNA mit den zu reagierenden Edukten (siehe **Abbildung 1.3**). Die Durchführung und die Isolierung der aktiven Spezies nach erfolgter Selektion wird analog der oben beschriebenen direkten Selektion durchgeführt.

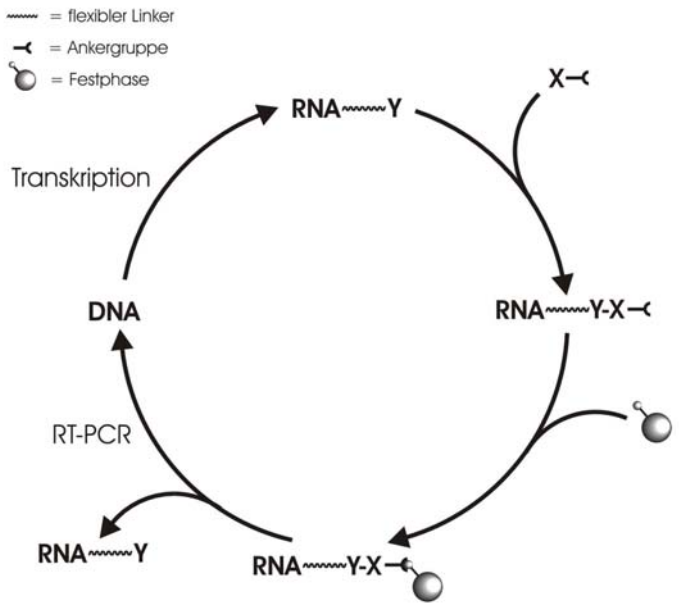
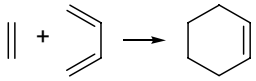
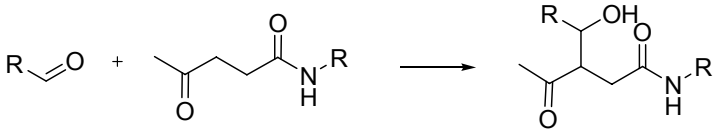
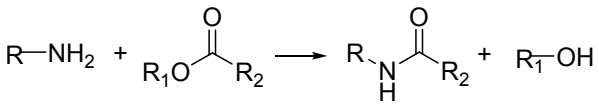
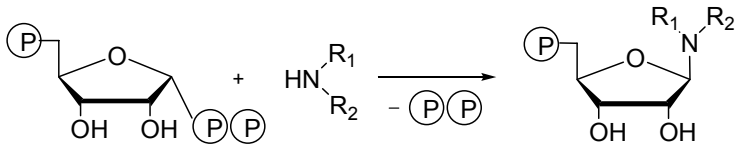
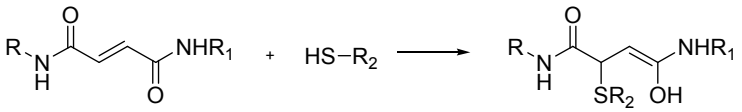
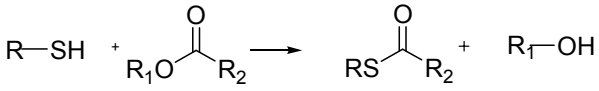


Abbildung 1.3: *Reaktionsschema einer in vitro Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden*

1.3 Künstliche Ribozyme

Basierend auf der direkten *in vitro*-Selektion konnten Ribozyme selektiert werden, deren katalytisches Potential das der natürlichen Ribozyme bei weitem überstieg. Es war möglich, eine Vielzahl chemischer Reaktionen durch RNA-Moleküle katalysieren zu lassen[48] (siehe **Tabelle 1.2**).

Reaktionstyp	Katalysierte Reaktion
C-C Bindungsknüpfung	
Diels-Alder Reaktion[46, 49]	
Aldolreaktion[50]	
C-N Bindungsknüpfung	
Amidbindungsknüpfung[45, 51, 52]	
N-Glykosidische Bindungsknüpfung[53, 54]	
C-S Bindungsknüpfung	
S-Michael Reaktion[55]	
S-Acylierung[56]	
C-O Bindungsknüpfung	

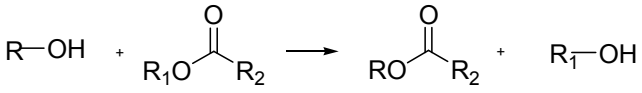
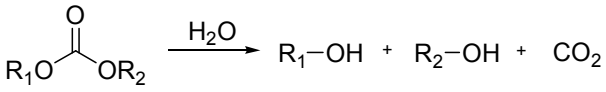
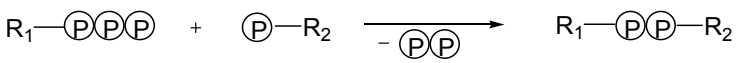
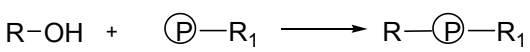
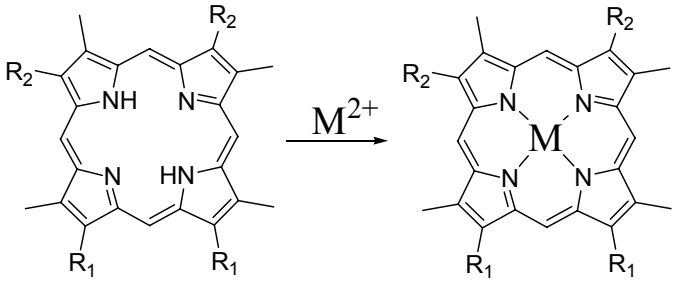
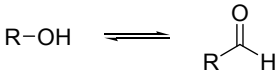
Umesterung[57-60]	
Carbonathydrolyse[61]	
P-O Bindungsknüpfung	
Phosphoranhydridbildung[62, 63]	
RNA Ligation[64-67]	
C-Metall	
Bindungsknüpfung	
Porphyrin Metallkomplexierung[68]	
Redox Reaktionen	
Oxidation und Reduktion[69, 70]	

Tabelle 1.2: *Beispiele für durch Ribozyme katalysierte Reaktionen. Reste, die Nukleinsäuren beinhalten, sind mit* R *gekennzeichnet. Reste, die keine Nukleinsäuren enthalten, sind mit R_1 bzw. R_2 und Phosphatgruppen als eingekreistes P dargestellt. (Tabelle entnommen aus „Aptamers, Ribozymes and Deoxyribozymes“, Wiley VCH[48])*

1.4 Aptamere

Aptamere (lat. *aptus*, passen und gr. *meros*, Gebiet) sind Nukleinsäure- oder Proteinmoleküle, die in der Lage sind, ein bestimmtes Zielmolekül spezifisch und mit hoher Affinität zu binden. Die Bindung des Liganden folgt dabei dem so genannten Schlüssel-

Schloss-Prinzip, welches 1984 das erste Mal von Emil Fischer am Beispiel der Bindung zwischen Enzym und Substrat beschrieben wurde[71].

Im folgenden Abschnitt liegt der Fokus auf den Nukleinsäure-Aptameren, welche mittels *in vitro*-Selektion im Labormaßstab routinemäßig zugänglich sind. Das erste RNA-Aptamer wurde im Jahre 1990 von Ellington und Szostak beschrieben[5]. Es folgten eine Vielzahl weiterer RNA- und auch DNA-Aptamere, die in der Lage sind, nahezu das gesamte Spektrum biologisch relevanter Moleküle zu binden. **Tabelle 1.3** liefert einen Überblick über die verschiedenen Stoffklassen und die relevanten Aptamere (modifiziert nach[48]).

Stoffklasse	Aptamere
Nukleoside, Nukleotide und Nukleobasen	Xanthin und Guanin[72], ATP[73], cAMP[74]
Kofaktoren	SAM[75], SAH[76], Coenzym A[77, 78], Cyanocobalamin[79], FAD[80], Biotin[81]
Aminosäuren	L-Arginin[82], L-Citrullin[83, 84], L-Valin[85], L-Isoleucin[86], Dopamin[87, 88]
Kohlenhydrate (DNA-Aptamere)	Cellulose[89], Sialyllactose[90], Sephadex G-100[91], Streptavidin[92]
Alkaloide	Theophyllin[93-96], Kokain[97]
Organische Farbstoffe	Malachitgrün[98, 99], Sulforhodamin B[100]
Antibiotika	Streptomycin[101], Neomycin[102], Tobramycin[103, 104], Viomycin[105], Chloramphenicol[106], Tetracyclin[107]
Proteine	Interferon-γ[108], VEGF[109], NF κB[110], α-Thrombin[111], Immunglobulin E[112], PSA[113], Komplementfaktor C5[114], Prion Protein[115], Ghrelin[116]
Anorganisch	Zink2+-Ionen[117]

Tabelle 1.3: *Beispiele für durch in vitro Selektion erhaltenen Aptamere (entnommen aus und modifiziert nach „The Aptamer Handbook“, Wiley VCH[48])*

Am Beispiel des Theophyllin-Aptamer sei nun exemplarisch der Weg, ausgehend von der Selektion, bis zur Aufklärung der Ligand-Aptamer-Interaktionen und der dreidimensionalen Struktur dargestellt. Das Theophyllin-Aptamer wurde 1994 von Jenison *et*

al.[93] publiziert. Bei der Selektion wurde ein Theophyllin an Position N3 mit einem flexiblen Linker modifiziert und über diesen kovalent an eine inerte Matrix gebunden. Die der Selektion zugrunde liegende RNA-Bibliothek bestand aus 10^{14} verschiedenen Sequenzen und wurde nach Inkubation mit der Matrix durch Theophyllin und auch Coffein im Sinne einer Gegenselektion eluiert. Die Elution mit Coffein hatte den Zweck, für eine ausreichende Diskriminierung des Theophyllin-Aptamer gegenüber Coffein zu sorgen. Die isolierten RNA-Aptamere und das enthaltene Minimalmotiv gaben der Strategie Recht: das Theophyllin-Aptamer bindet das strukturell nur durch eine Methylgruppe an Position N7 unterschiedliche Coffein um den Faktor 10.000 geringer. Die Dissoziationskonstanten für Theophyllin und Coffein liegen bei 0,32 µM und 3500 µM.

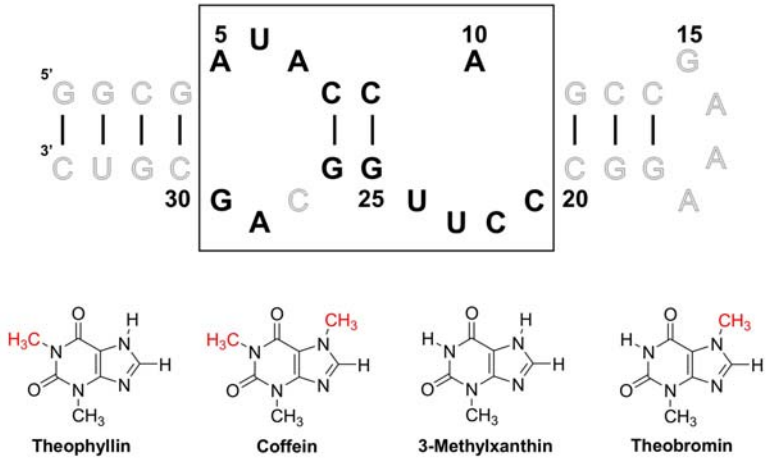


Abbildung 1.4: *Sekundärstruktur des Theophyllin-Aptamer[118] mit den strukturell verwandten LigandenTheophyllin, Coffein, 3-Methylxanthin und Theobromin*

1997 lösten Zimmermann und Pardi die dreidimensionale Struktur des Theophyllin-Aptamer mittels NMR-Spektroskopie. Von den insgesamt 33 Nukleotiden stellten sich 15 als essentiell für die Bindung und Erkennung von Theophyllin heraus, wie aus **Abbildung 1.4** hervorgeht. Die nicht-konservierten Nukleotide sind durch andere helikale Bereiche austauschbar und in der Länge variabel. Die Bindungstasche verfügt über ein ausgefeiltes Netzwerk aus Stapel-Wechselwirkungen (base-stacking) und Wasserstoffbrücken, welche das Theophyllinmolekül fest umschließen. Für die Erkennung des Theophyllins und der Diskriminierung gegenüber Coffein sind Wasserstoffbrücken zwischen dem N7 des Theophyllins und dem C22 des Aptamers verantwortlich. Die im

Gegensatz zum Theophyllin beim Coffein vorhandene Methylgruppe an Position N7 sorgt für eine sterische Hinderung eben dieser Bindungen und damit für eine Reduktion der Affinität um den Faktor 10.000 (s.o.)[48, 118, 119]. In **Abbildung 1.5** ist die dreidimensionale Struktur des Theophyllin-Aptamer mit Theophyllin in der Bindungstasche dargestellt.

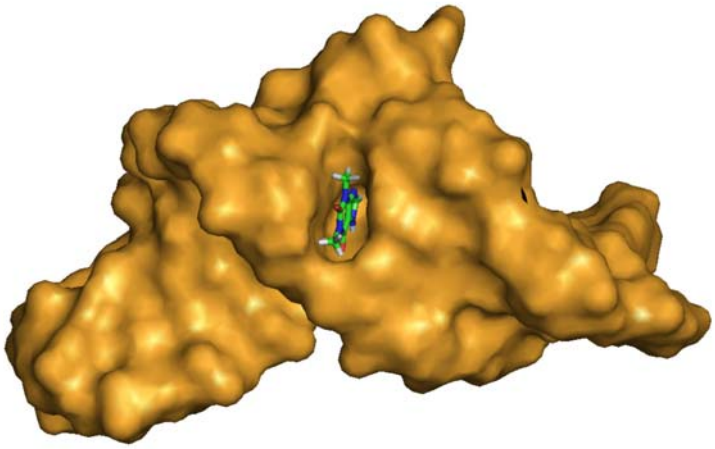


Abbildung 1.5: *Dreidimensionale Struktur des Theophyllin-Aptamer mit Ligand in Bindungstasche[119]*

Ein Vergleich mit den ebenfalls aromatische Liganden bindenden Aptameren für FMN und ATP offenbart, dass hier ähnliche Wechselwirkungen zwischen Ligand und Aptamer vorliegen: Die Affinität wird in erster Linie durch intensive Stapel-Wechselwirkungen zwischen Ligand und Bindungstasche sichergestellt, wohingegen für die Spezifität die Ausbildung tertiärer Interaktionen, idealer Weise Wasserstoffbrückenbindungen, verantwortlich ist[120-123].

Auffällig bei der Erkennung und Bindung eines Liganden ist die relativ unstrukturierte Form des Aptamers in Abwesenheit des Liganden und die Ausbildung einer strukturierten Form durch Bindung des Liganden unter Zuhilfenahme zusätzlicher tertiärer Interaktionen. Dieses Phänomen wird als induzierte Passform (induced fit) bezeichnet und findet sich auch bei Liganden-bindenden Proteinen[124-127].

Anderson und Mecozzi konnten 2005 zeigen, dass es möglich ist, das Theophyllin-Aptamer von 33 auf 13 Nukleotide ohne nennenswerten Verlust von Affinität oder Spezifität zu kürzen. Der dabei verfolgte Ansatz vereint iteratives, computergestütztes Ent-

fernen nicht-konservierter Nukleotide außerhalb der Bindungstasche mit anschließender Prüfung auf Ligandenbindung mittels molekular-dynamischer Simulation[96].

Nach über 15 Jahren Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Aptamere sind mittlerweile eine große Anzahl sowohl analytischer als auch therapeutischer Anwendungen etabliert[48, 128].

Auf dem Gebiet der Analytik werden die Aptamere oftmals mit bereits etablierten Analysemethoden kombiniert, um deren Einssatzspektrum zu erweitern oder deren Spezifität zu erhöhen. Drei prominente Beispiele sind die Anwendung in der Proteomik als Intramere[129-131], der Einsatz bei MALDI Massenspektroskopie[132] und Kapillarelektrophorese[133, 134].

Die Schnittstelle zwischen Analytik und therapeutischer Anwendung stellt das *in vivo*-Imaging dar, bei dem ein Aptamer gegen ein Biomolekül kovalent mit einer signalgebenden Komponente verbunden wird[135]. Die signalgebende Komponente können dabei zum Beispiel PET-[136, 137] oder SPECT-[138, 139]Isotope sein.

Ein weiterer interessanter und vielversprechender Ansatz ist die Spiegelmer-Technologie. Spiegelmere bestehen aus L-Nukleinsäuren und binden hochaffin ein beliebig gewähltes Zielmolekül, für welches ein Enantiomer existiert. Mittels *in vitro*-Selektion gegen das Enantiomer des Liganden erhält man ein Aptamer, bestehend aus D-Nukleinsäuren. Dieses Aptamer wird im Anschluss chemisch-synthetisch aus L-Nukleinsäuren hergestellt und bindet das gewünschte Zielmolekül mit gleicher Affinität und Spezifität. Der Vorteil dieser aufwendigen Technologie liegt in der höheren Stabilität gegenüber körpereigenen Nukleasen, der Nicht-Immunogenität und der geringen Toxizität, was das Einsatzspektrum dieser Aptamere als *in vivo*-Therapeutika ungemein erhöht. Zusätzlich kann das erhaltene Spiegelmer chemisch modifiziert werden[140-144].

Im Dezember 2004 wurde das erste Aptamer zu einer klinischen Studie zugelassen. Das Aptamer, Pegaptanib (Macugen®), ist pegyliert (kovalent mit Polyethylenglykol-Einheiten verbunden) und bindet hochaffin und spezifisch an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF). Dieses Aptamer wird bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) eingesetzt[145-148]. Im gleichen Jahr konnte Rusconi *et al.* zeigen, dass es möglich ist, ein Aptamer gegen Thrombin *in vivo* durch einen komplemen-

tären Oligonukleotidstrang in dessen blutverdünnender Wirkung zu antagonisieren[149, 150].

1.5 Allosterisch regulierte Ribozyme

Durch die Kombination der katalytischen Eigenschaften von Ribozymen und der Liganden-bindenden Eigenschaften von Aptameren ist es möglich, allosterisch regulierte Ribozyme, so genannte „Aptazyme“ zu kreieren. Analog zu den allosterisch regulierten Proteinen sind solche Nukleinsäuren ebenfalls in der Lage, die aus der Bindung eines Liganden resultierende Konformationsänderung in eine veränderte katalytische Aktivität umzusetzen. Der Vorteil im Design solcher Systeme liegt dabei in der relativ einfachen Zusammensetzung und Zugänglichkeit der Nukleinsäuren gegenüber den Proteinen.

1.5.1 Künstliche allosterische Ribozyme

Das erste künstlich generierte allosterische Ribozym wurde von Porta und Lizardi 1995 beschrieben und baute auf dem natürlich vorkommenden Hammerhead-Ribozym auf. Dieses Ribozym wurde dahingehend modifiziert, dass seine katalytische Aktivität in Abwesenheit des passenden DNA-Oligonukleotidstranges nicht ausreichte, um sich selbst zu spalten, also katalytisch aktiv zu sein[151]. Im Laufe der folgenden Jahre konnte das Prinzip, ein natürlich vorkommendes Ribozym durch einen Oligonukleotidstrang allosterisch zu regulieren, an weiteren Systemen demonstriert werden[64, 152-154].

Bei der Entwicklung allosterischer Ribozyme wurden unterschiedliche Grundstrategien verfolgt: Rationales Design, *in vitro*-Selektion oder eine Kombination aus beiden. Tang und Breaker 1997[155], sowie Araki *et al.* 1998[156] konnten am Hammerhead-Ribozym das rationale Design allosterischer Ribozyme erfolgreich unter Beweis stellen, indem sie verschiedene künstliche Aptamere für kleine Moleküle, wie ATP, Theophyllin und FMN mit diesem kombinierten. Bei dieser Strategie werden zuerst entsprechende Systeme konstruiert und anschließend auf katalytische Aktivität in Abhängigkeit des jeweiligen Liganden überprüft. Nachteilig an diesem Ansatz ist, dass der Durchsatz an

Konstrukten limitiert ist und die Bindung des Liganden bevorzugt eine Abnahme der katalytischen Aktivität durch Störung der aktiven Struktur zur Folge hat. Andererseits können mit dieser Strategie grundlegende Regulationsmechanismen über die jeweilige Kombination aus Ribozym und Aptamer untersucht werden.

Eine Weiterentwicklung des rationalen Designs ist die Anwendung der *in vitro*-Selektion zum Design allosterischer Ribozyme. Auch hierbei ergeben sich zwei verschiedene Herangehensweisen, was die Konstruktion und die damit verbundene Komplexität der RNA-Bibliotheken anbetrifft. Soukup und Breaker konstruierten ein modulares System, das aus 3 Teilen besteht: ein Aptamer und Ribozym mit bekannter Sequenz, verbunden über eine randomisierte, doppelsträngige Nukleotidsequenz, dem so genannten Kommunikationsmodul[157, 158]. Robertson und Ellington hingegen konstruierten eine RNA-Bibliothek, deren Komplexität sehr viel größer war und aus einem völlig randomisierten Bereich für Aptamer und Kommunikationsmodul bestand[159, 160]. Die eigentliche Durchführung der Selektion ist bei beiden Systemen identisch. Der eigentliche Unterscheid besteht darin, ob ein Ribozym durch den Liganden aktiviert oder inaktiviert werden soll. In beiden Fällen müssen in einem ersten Schritt zuerst die konstitutiv aktiven und damit liganden-unabhängigen Spezies aus der RNA-Bibliothek entfernt werden, um dann in einem zweiten Schritt die ligandenabhängigen Moleküle anzureichern und zu vervielfältigen. Je nachdem, ob das Ribozym durch den Liganden aktiviert oder inaktiviert werden soll, geschieht dies in Ab- oder Anwesenheit des Liganden. Dieses Prinzip stellt eine Weiterentwicklung der Gegenselektion für Aptamere von Jension *et al.[93]* dar und wird auch als Negativ- und Positivselektion bezeichnet. In **Abbildung 1.6** ist das Reaktionsschema einer allosterischen, linkergekoppelten Selektion dargestellt.

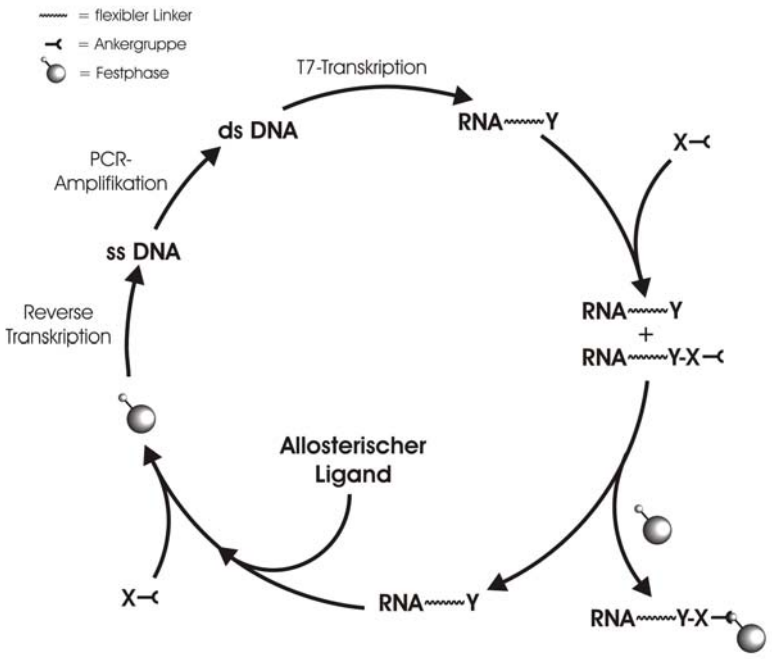


Abbildung 1.6: *Reaktionsschema einer allosterischen, linkergekoppelten Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden*

Durch die Isolierung weiterer künstlicher allosterischer Ribozyme und deren intensive Erforschung konnten detaillierte Einblicke in die Mechanismen und Prinzipien dieser Spezies gewonnen werden. Limitierend für die Leistungsfähigkeit eines allosterischen Systems sind dabei immer auch die Leistungsfähigkeit des Ursprungsribozyms und -aptamers. So wird die katalytische Aktivität eines Ribozyms an dessen Potential gemessen, eine gegebene Reaktion im Vergleich zur unkatalysierten in Abwesenheit des Ribozyms zu beschleunigen. Die Leistungsfähigkeit eines Aptamers ergibt sich aus der Affinität des jeweiligen Liganden zum Aptamer, quantifizierbar durch die Dissoziationskonstante. Ein ideales allosterisches Ribozym zeigt dabei in Abwesenheit des Liganden eine möglichst geringe und in Anwesenheit des Liganden eine möglichst hohe katalytische Aktivität. Dieser liganden-abhängige Bereich wird auch als dynamischer Bereich bezeichnet. Der Schaltfaktor eines allosterischen Ribozyms ergibt sich aus dem Verhältnis der Umsatzraten in An- und Abwesenheit des Liganden[161].

Strukturell ist ein solches System dabei stets durch die folgenden drei Komponenten gekennzeichnet: Aptamer, Linker-Bereich (auch Kommunikationsmodul genannt) und Ribozym. Der Linker-Bereich zwischen Aptamer und Ribozym ist das strukturell verantwortliche Element, welches die Liganden-vermittelte Faltung in die aktive oder inak-

tive Konformation an die benachbarte Ribozymdomäne übermittelt. Araki *et al.* konnten 1998 bei einem rational konstruierten Hammerhead-Ribozym aufgrund von Probing-Experimenten eine Konformationsänderung im Linker-Bereich unter Einfluss des Liganden FMN mit allosterischem Verhalten in Beziehung bringen[156].

Die Arbeitsgruppe um Kertsburg *et al.* publizierte 2002 ein universelles Kommunikationsmodul, welches durch allosterische Selektion an einem HDV-Ribozym isoliert wurde und erfolgreich zwischen weiteren verschiedenen Aptameren und Ribozymen installiert werden konnte. Das Kommunikationsmodul besteht aus 9 kanonischen und nichtkanonischen, sowie einem ungepaarten Nukleotid, und ermöglichte jedoch nur mäßige allosterische Effekte[162].

Allosterische Ribozyme als Biosensoren bieten sich zur Anwendung in der Biotechnologie und Bioanalytik oder auch als Therapeutika *in vivo* an, da maßgeschneidert und synthetisch leicht zugänglich[163-165]. Besonders die Aptamer-Komponente weist grundlegende Vorteile gegenüber Antikörpern als Liganden-bindendem Element auf:

1. Die Isolierung kann unter den Bedingungen der Anwendung (pH-Wert, Salzkonzentrationen, u.a.) im Reagenzglas durchgeführt werden - eine aufwendige Zellkultur ist nicht nötig.
2. Die Herstellung der Aptamere erfolgt durch chemische Synthese, und bei Bedarf können noch Modifikationen angefügt werden (Erhöhung der Stabilität, Halbwertszeit im Körper, u.a.).
3. Aptamere weisen gegenüber Antikörpern ein geringeres Molekulargewicht auf, was bei der Anwendung als Therapeutika *in vivo* von Vorteil ist.

Die breite Palette an bereits vorhandenen Aptameren und Ribozymen für eine Vielzahl von unterschiedlichen Molekülen und katalytischen Reaktionen wirft einen Blick auf die Möglichkeiten der potentiellen Anwendung. Bereits vorhandene Anwendungen sind Biochip-Systeme durch Immobilisierung[166, 167], Molekulare Logische Steuerelemente[168-173] und Genetische Schalter (Maxizyme)[130, 174-176].

1.5.2 Riboswitches

Beispiele natürlicher, allosterisch regulierter RNA-Moleküle sind die bereits erwähnten Riboswitches. Ein Riboswitch ist ein Teil einer mRNA, welcher durch Binden eines Liganden die Genaktivität der eigenen mRNA regulieren kann. Der Ligand ist dabei

meistens das Stoffwechselprodukt des Proteins, welches auf der mRNA kodiert ist. Je nach Vorhandensein und Konzentration des Liganden kommt es somit zur Herauf- oder Herunterregelung der Genaktivität. Bisher wurden Riboswitches allerdings nur in nicht-codierenden, 5'-untranslatierten Regionen gefunden.

Einige der metabolischen Stoffwechselwege in Bakterien, in denen bekannte Riboswitches eingebunden sind, werden bereits seit Jahrzehnten intensiv untersucht[177-179]. Verblüffenderweise wiesen die nicht-codierenden Abschnitte, involviert in unterschiedliche Genregulationen, hohe Sequenzhomologien auf. Ferner konnten bei den Untersuchungen zur Aufklärung der Genregulation keine zusätzlichen Proteine identifiziert werden, so dass daraus geschlossen wurde, dass die RNA dies auch allein bewerkstelligen könne[180-182]. Im Jahre 2002 fanden mehrere Forschungsgruppen kurz nacheinander schließlich die ersten Beweise für diese Art der Genregulation[13-16]. In den darauffolgenden Jahren wurden weitere Riboswitches für eine Vielzahl von Liganden identifiziert[183-188]. Zusätzlich erleichterten bioinformatische Ansätze das weitere Auffinden von Riboswitches[28, 189-191]. Bis dato sind 10 verschiedene Riboswitch-Klassen identifiziert und charakterisiert worden[48], wobei die Einteilung nach den jeweiligen Liganden, resp. Metaboliten erfolgt:

Riboswitch Klasse	Kontrolliertes Gen / Operon	Aptamergröße (nt)	KD (nmol/L)
Coenzym B12	E. coli btuB	202	300
TPP	E. coli thiM	78	30
Glycin	V. cholera gcvT	220	30.000
FMN	B. subtilis ribD	121	5
SAM I	B. subtilis yitJ	118	4
SAM II	A. tumefaciens met A	55	1.000
Guanin	B. subtilis xpt	66	5
Adenin	B. subtilis ydhL	64	300
Lysin	B. subtilis lysC	169	1.000
GlcN6P	B. subtilis glmS	150	200.000

Tabelle 1.4: *Vergleich von in vitro selektierten RNA Aptamere mit natürlich vorkommenden RNA Aptameren in Riboswitches, nach [48]*

Ein Riboswitch besteht aus zwei Einheiten, die miteinander in Wechselwirkung stehen: einem Aptamer, welches den Liganden bindet und der Expressionsplattform, die das

Gen reguliert. Auch hier finden sich wieder die drei grundlegenden Prinzipien der Selbstregulation, analog der allosterischen Proteine und der Ribozyme. Das Aptamer bindet in einem ersten Schritt den jeweiligen Liganden und erfährt dabei eine Konformationsänderung. Dieses Bindungsereignis wird an die Expressionsplattform weitergeleitet, welche dann mit der Transkriptions-, Translations- oder Post-Transkriptions-RNA-Modifizierungs-Maschinerie interferiert und dadurch die Genregulation beeinflusst[192]. In den meisten Fällen wird das betreffende Gen abgeschaltet, in wenigen Fällen angeschaltet. Folgende Mechanismen sind bisher beobachtet worden:

1. Ausbildung einer Haarnadelstruktur mit sich selbst und damit Abbruch der mRNA Transkription,
2. Abbruch der Translation durch Blockade der Ribosomen-Bindungsstelle,
3. Selbstspaltung durch ein eingebautes Ribozym,
4. Beeinträchtigung des Spleißens der pre-mRNA durch Ausbildung einer bestimmten Struktur.

1.6 Diels-Alderase Ribozyme

Eine wichtige und leistungsfähige Reaktion zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen ist die Diels-Alder-Reaktion[193, 194]. Sie ist nach Ihren Entdeckern Otto Diels und Kurt Alder benannt[195]. Bei der Reaktion reagiert ein Dien mit einem Dienophil im Sinne einer [4+2]-Cycloaddition unter Ausbildung eines neuen, sechsgliedrigen Systems. Hierbei werden aus drei C-C-π-Bindungen zwei neue σ-Bindungen unter Ausbildung von maximal vier Stereozentren gebildet. Der zugrunde liegende Mechanismus der Reaktion ist konzertiert und mit einem cyclischen Übergangszustand gemäß den Woodward-Hoffmann-Regeln assoziiert[196, 197]. Bei unkatalysierten [4+2]-Cycloadditionen müssen meistens recht drastische Bedingungen angewandt werden. Eine Verbesserung brachten Lewis-Säuren als Katalysatoren, die es auch ermöglichten, empfindliche Substanzen miteinander reagieren zu lassen[198]. Eine durch Biomoleküle katalysierte Diels-Alder Reaktion konnte im Jahre 1989 die Arbeitsgruppe um Hilvert mittels Antikörpern demonstrieren[199]. Diese katalytischen Antikörper werden üblicherweise gegen ein Überstandsanalogon der zu katalysierenden Reaktion gewonnen.

Die erste Ribozym-katalysierte Diels-Alder-Reaktion konnten Tarasow und Eaton im Jahre 1997 publizieren[47]. Nachteilig an diesem System war, dass die RNA-Bibliothek durch Einführen von Pyridylresten in Uridin funktional erweitert werden musste und für die Katalyse ebenfalls die Anwesenheit von Kupfer-Ionen essentiell war. Zusätzlich war das Ribozym nur selbstmodifizierend aktiv und somit kein echter Katalysator[49].
Im Jahre 1999 gelang es Seelig und Jäschke, ein RNA-Motiv zu selektieren, was ebenfalls in der Lage ist, eine Diels-Alder Reaktion zwischen zwei organisch-chemischen Substraten zu katalysieren[46]. Die der direkten, linkergekoppelten Selektion zugrunde liegende RNA-Bibliothek umfasste einen randomisierten Bereich von 120 Nukleotiden und enthielt insgesamt $2 \cdot 10^{14}$ Molekülen. Als Reaktanden wurden als Dien ein Anthracen kovalent über einen Polyethylenglykol-Linker mit dem 5`-Ende der RNA verbunden und als Dienophil ein Maleimid, verlinkt mit Biotin, eingesetzt. Die aktiven RNA-Spezies wurden nach erfolgter Reaktion zwischen Anthracen und Maleimid über Biotin als Ankergruppe an einer Streptavidin-Festphase immobilisiert, von dieser revers transkribiert und anschließend wiederum amplifiziert. Die RNA-Bibliothek erfuhr nach 10 Selektionsrunden eine 10.000-fach erhöhte Reaktivität gegenüber der Ausgangsbibliothek. Über die anschließende Klonierung und Sequenzierung konnte ein 49 Nukleotide langes Motiv gefunden werden, das in 90% aller klonierten Sequenzen präsent war und die Reaktion zwischen dem kovalent an die RNA gebundenen Anthracen und Maleimid um das 18.500-fache beschleunigt. Interessanterweise katalysiert das isolierte Ribozym aber auch die Reaktion mit freien Reaktanden im Sinne einer „echten Katalyse“. Begrifflich der Biologie entstammend, bezeichnet man diese Fähigkeit bei Ribozymen als *trans* (intermolekular), wohingegen eine Reaktion unter Selbstmodifikation als *cis* (intramolekular) klassifiziert wird. Bei der Ribozym-katalysierten *trans*-Reaktion kommt es ferner zur enantioselektiven Bildung des *R,R*-Stereoisomers aus den beiden Substraten, während aus der unkatalysierten Hintergrundreaktion ein razemisches Gemisch zweier Produktenantiomere hervorgeht[200].

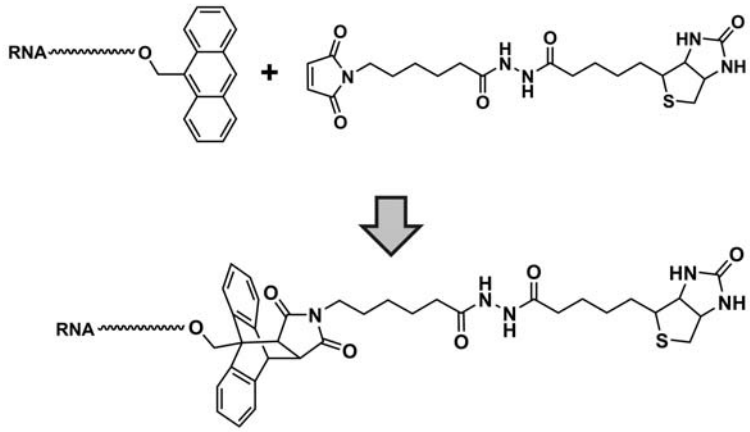


Abbildung 1.7: *Reaktionsschema der Diels-Alder Reaktion zwischen den linkergekoppelten Reaktanden Anthracen (Dien) und Biotin-Maleimid (Dienophil)*

Erste detaillierte Analysen der Sekundärstruktur offenbarten drei wichtige Charakteristika des Diels-Alderase Minimalmotivs:

1. drei doppelsträngige, helikale Bereiche (Helix 1-3),
2. eine asymmetrische interne Schlaufe, bestehend aus einem Pentanukleotid (bulge 1) und einem Hexanukleotid (bulge 2), sowie
3. ein formal einzelsträngiges Tetranukleotid (GGAG) am 5'-Ende.

Durch Mutations- und Probingstudien konnten tertiäre Wechselwirkungen zwischen einem Adenin und einem Guanin des Tetranukleotids und einem Uridin und Cytidin aus bulge 2 identifiziert werden[201].

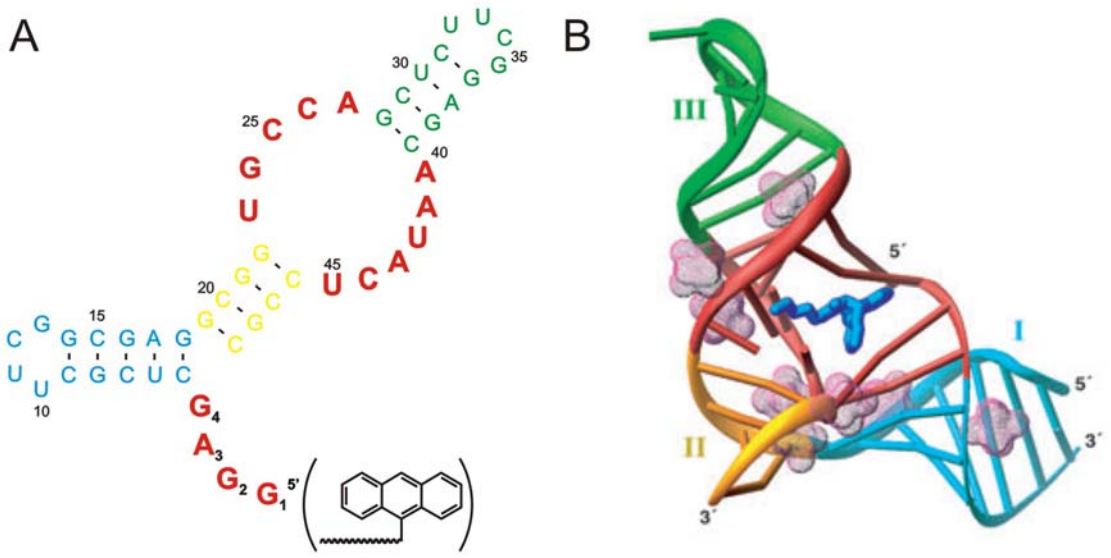


Abbildung 1.8: *(**A**) Sekundärstruktur des Diels-Alderase Minimalmotivs mit durchlaufender Nummerierung. (**B**) Tertiärstruktur des Produkt-Ribozym-Komplexes mit Magnesium-Ionen (rosa). Die helikalen Bereiche I bis III sind jeweils farbig dargestellt (blau, gelb und grün). Für die Katalyse essentielle Nukleotide weisen eine rote Farbe auf.*

Im Jahre 2005 konnte die Kristallstruktur des Diels-Alderase-Ribozyms mit kovalent verbundenem Reaktionsprodukt (Anthracenhexaethylenglykol und N-Pentyl-Maleimid) durch 2'-Selenium-Modifikationen an sechs Uridinen und Cytidinen gelöst werden[202]. Die dreidimensionale Struktur bestätigt die bereits im Jahre 2004 postulierte Anordnung in Form eines Pseudoknotens. Grundsätzlich ähnelt die Struktur dabei dem Zeichen Lambda (λ). Die beiden gegenüberliegenden internen Schlaufen (bulge 1 und 2) sind von dem Tetranukleotid am 5'-Ende durch Standard-Watson-Crick-Basenpaarungen eingeklemmt und erfahren keine grundlegenden strukturellen Änderungen durch Substrat- oder Produktbindung. Die vorgeformte, hydrophobe Bindungstasche ist durch ausgeprägte Stapel-Wechselwirkungen stabilisiert und weist eine keilförmige Gestalt auf. Ferner verfügt die Tasche über zwei unterschiedliche Zugänge: eine größere „Vordertür" und eine kleinere „Hintertür". In der Kristallstruktur ist in der Tasche eine Furche zu sehen, in welche die Seitenkette des Maleimids passt und dem *S*,*S*-Reaktionsprodukt eine eindeutige Orientierung gibt[203].

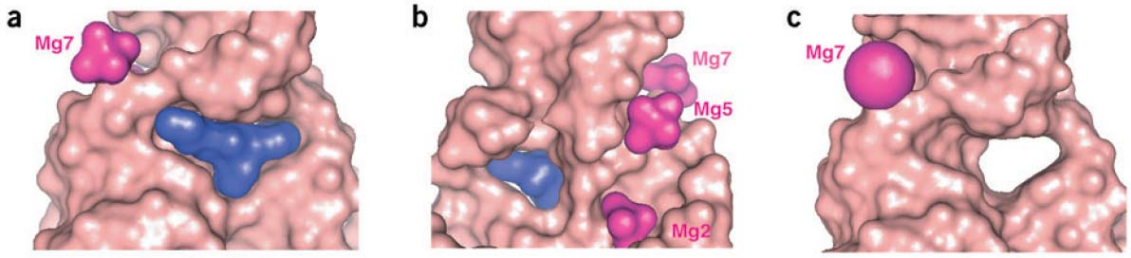


Abbildung 1.9: *Oberflächenrepräsentation der katalytischen Tasche des Diels-Alderase-Ribozyms[203]. (**a**, **b**): Vor- (**a**) und Rückansicht (**b**) der katalytischen Tasche des Produkt-Ribozym-Komplexes und (**c**) des freien Ribozyms. Das Reaktionsprodukt ist blau und die Magnesium Ionen lila dargestellt.*

Eine Erklärung für die unterschiedliche Enantioselektivität zwischen der Reaktion mit freien Reaktanden und der linkergekoppelten Reaktion (*S*,*S*) wurde 2006 durch Wombacher *et al.* gefunden. Dabei wurde der Einfluss der Linkerlänge des Anthracensubstrates auf den Enantiomerenüberschuß (*ee*) des gebildeten Produktes für die unkatalysierte Hintergrundreaktion und die beiden oben erwähnten katalysierten Reaktion mittels chiraler HPLC untersucht. Dabei ließen sich drei Prinzipien für den Mechanismus der Stereoselektivität festhalten:

1. Bei der Reaktion mit freien Reaktanden betritt das Anthracen die Bindungstasche durch die größere und daher sterisch weniger gehinderte Vordertür, was zur Bildung des (*R*,*R*)-Enantiomers führt.
2. Bei der linkergekoppelten Reaktion mit kurzen Linkern (6 Å) kommt es zur Bildung des (*S*,*S*)-Enantiomers, da das Anthracen die Bindungstasche nur durch die kleinere Hintertür betreten kann. Die Frage, wie das Anthracen dies macht, ist dabei noch ungeklärt.
3. Bei längeren Linkern (35 Å) kann das Anthracen um das Ribozym herumreichen, somit durch die größere Vordertür die Bindungstasche betreten, und das (*R*,*R*)-Enantiomers wird gebildet[204].

1.7 Allosterisch regulierte Diels-Alder Ribozyme

Zu Beginn dieser Arbeit waren ausschliesslich allosterische Ribozyme bekannt, die in der Lage waren, Nukleinsäuren zu prozessieren (siehe auch Kapitel 1.5.1 dieser Arbeit: Allosterisch regulierte Ribozyme).

Bereits seit 2001 liefen im Arbeitskreis Jäschke Untersuchungen zur Entwicklung allosterisch regulierter Ribozyme auf Basis des Diels-Alderase-Ribozyms. Die erste allosterische *in vitro*-Selektion auf Basis der SELEX-Technologie wurde durch Dr. Mark Helm durchgeführt. Die dabei zugrunde liegende RNA-Bibliothek setzte sich aus den beiden Domänen Diels-Alderase-Ribozym und Theophyllin-Aptamer zusammen. Verbunden wurden diese beiden Domänen über Helix 3 des Diels-Alderase-Ribozyms durch einen randomisierten, doppelsträngigen Bereich. Das Design der RNA-Bibliothek orientierte sich dabei an vorangegangenen allosterischen Selektionen[205]. Die aus der Selektion isolierten Klone wurden im Anschluss im Rahmen dieser Arbeit auf deren Verhalten gegenüber Theophyllin und anderer, verwandter Xanthinderivate sowohl im Reaktionsformat mit linkergekoppelten Reaktanden, als auch mit freien Reaktanden umfassend charakterisiert[206].

Parallel dazu wurde durch Amontov und Jäschke eine rationale Designstrategie entwickelt, die es ermöglicht, allosterisch regulierte Diels-Alderase-Ribozyme quasi auf dem Reißbrett zu entwerfen und deren Verhalten gegenüber verschiedenen Liganden anschliessend experimentell zu überprüfen[207]. Dabei werden nicht-konservierte Nukleotide in Aptamer und Ribozym ausgetauscht, um alternative, inaktive Sekundärstrukturen in Abwesenheit des jeweiligen Liganden ausbilden. Das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Konformation wurde abhängig von der An- oder Abwesenheit des Liganden somit allosterisch reguliert. Das am stärksten allosterisch aktivierte Ribozym erfuhr für die Reaktion mit linkergekoppelten Reaktanden maximal eine 2100-fache Reaktionsbeschleunigung. Eine Reaktion mit freien Reaktanden wurde nicht beschrieben. Diese Technologie wurde im vierten Teil dieser Arbeit ebenfalls aufgegriffen und weiterentwickelt.

2 Ziel der Arbeit

Aus der Vielzahl und Verschiedenartigkeit an vorhandenen Arzneistoffen und deren Metabolite ergibt sich ein grosser Bedarf an einer spezifischen, vor allem aber maßgeschneiderten Analytik. Die klassischen Analysemethoden, wie z.B. HPLC-Chromatographie stossen dabei zum Teil an die Grenzen der Machbarkeit. Speziell RNA-Aptamere sind in der Lage, ein definiertes Molekül hochaffin und hochspezifisch zu binden. Die unkomplizierte Herstellung eines solchen RNA-Aptamers durch die Methode der *in-vitro* Selektion macht es möglich, für beinahe jedes Molekül ein passendes RNA-Aptamer zu erhalten. Durch die Kombination eines RNA-Aptamer mit einer katalytisch aktiven Ribozym kann ein das Bindungsereignis des Liganden an das Aptamer in ein katalytisches Ereignis umgewandelt werden. Dieses allosterisch regulierte Ribozym stellt somit ein ideales Werkzeug zur Analytik definierter Moleküle dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung von allosterisch regulierten Diels-Alder Ribozymen als maßgeschneiderte Biosensoren zur potentiellen Anwendung in der Arzneistoffanalytik. Der Vorteil des Diels-Alderase-Ribozyms im Gegensatz zu anderen allosterisch regulierten Ribozymen liegt darin begründet, dass durch die photometrischen Eigenschaften des Substrates Anthracen eine Änderung der katalytischen Aktivität zeitnah verfolgt werden kann. Die bisher bekannten allosterisch regulierten Ribozyme katalysieren hauptsächlich Umesterungsreaktion von Phosphodiesterbindungen, deren Aktivität umständlich über elektrophoretische oder chromatographische Analysenmethoden detektiert werden muss.

Bereits seit 2001 liefen im Arbeitskreis Jäschke Untersuchungen zur Entwicklung allosterisch regulierter Diels-Alderase-Ribozyme. Die vorliegende Arbeit gliedert sich in die folgenden Abschnitte:

- In einem ersten Arbeitsabschnitt sollten acht zur Verfügung gestellte Klone aus einer vorangegangenen *in vitro*-Selektion auf deren allosterisches Verhalten gegenüber dem Liganden Theophyllin und verwandter Xanthin-Derivate charakterisier werden. Die dabei verwendeten und weiterzuentwickelnden Analysemethoden schlossen die Reaktion mit linkergekoppelten, sowie freien Reaktanden ein.

- Die dabei erhaltenen Ergebnisse und Erkenntnisse sollten anschliessend zur Konstruktion von zwei neuen RNA-Bibliotheken verwendet werden. Die Durchführung der allosterischen in-vitro Selektionen und anschliessende Charakterisierung anhand der zuvor etablierten Analysemethoden schloss sich an.
- Im finalen Arbeitsabschnitt sollte die zuvor im Arbeitskreis Jäschke entwickelte Methode des rationalen Designs allosterischer Diels-Alderase-Ribozyme aufgegriffen und erweitert werden. Auch hier sollten die entwickelten allosterischen Ribozyme anhand der zuvor etablierten Analysemethoden umfassend charakterisiert werden.

Durch die insgesamt drei verschiedenen Ansatzpunkte zur Entwicklung und Charakterisierung allosterisch regulierter Diels-Alderase-Ribozyme sollte zusätzlich die Robustheit und Vielseitigkeit des Diels-Alderase-Ribozyms, sowie RNA im Allgemeinen untersucht und unter Beweis gestellt werden.

3 Material und Methoden

Sämtliche verwendeten Geräte, Puffer und Reagenzien sind detailliert im Anhang (Kapitel 7) aufgeführt.

3.1 Oligoribonukleotide

Sämtliche verwendeten Oligoribonukleotide wurden enzymatisch unter Zuhilfenahme der DNA-abhängigen T7-RNA Polymerase hergestellt. Mehr dazu unter Kapitel 8.3, „Enzymatische Synthese von Oligoribonukleotiden durch T7-Transkription".

3.2 Oligodesoxynukleotide

Alle Sequenzen sind in der Richtung 5' → 3' angegeben. Die genannten Oligoribonukleotide wurden mittels Festphasensynthese von den Firmen IBA, Göttingen; NOXXON, Berlin oder SIGMA ALDRICH, Taufkirchen hergestellt und kommerziell erworben.

Klone aus allosterischer Selektion an RNA-Bibliothek TheoComm:

MH20 sense (IBA):
TTATGCTGAGTGATATCCTCGAGCGAAGCCGCTCCGGCACGGTCTACTTAT
GGTCGGCTTTCCGGGAACCGTCCAACAGTTATGAGCCGCTGCGTCG

MH21 sense (IBA):
TTATGCTGAGTGATATCCTCGAGCGAAGCCGCTCAGGCACGGTCTACTGTA
TGGTCGGCTTTTCGGGAACCGTCCAACAGTTATGAGCCG

MH23 sense (IBA):
TTATGCTGAGTGATATCCTCGAGCGAAGCCGCTCCGGCACGGTCTAGAATA
TGGTCGGCTTTCCGGGAACCGTCTAGAAGTTATGAGCCG

MH47 sense (IBA):
TTATGCTGAGTGATATCCTCGAGCGAAGCCGCTCCGGCACGGTCTACTGTA
TGGTCGGCTTTCCGGGAACCGTCCAACAG-TTATGAGCCG

MH48 sense (IBA):
TTATGCTGAGTGATATCCTCGAGCGAAGCCGCTCCAGCACGGTCTACTGTA
TGGTCGGCTTTTCGGGAACCGTCCAACAGTTATGAGCCGCTGCGTCG

MH49 sense (IBA):
TTATGCTGAGTGATATCCTCGAGCGAAGCCGCTCCGGCACGGTCTAGAATA
TGGTCGGCTTTCCGGGAACCGTCTAGAAGTTATGAGCCGCTGCGTCG

MH50 sense (IBA):
TTATGCTGAGTGATATCCTCGAGCGAAGCCGCTCCGGCACGGTCTAGAATA
TGGTCGGCTTTCCGGGAACCTTCTAGAAGTTATGAGCCGCTGCGTCG

MH51 sense (IBA):
TTATGCTGAGTGATATCCTCGAGCGAAGCCGCTCCGGCACGGTCTAGAATA
TGGTCGGCTTTCCGGGAACCTTCTAGAAGTTATGAGCCG

DNA-Bibliotheken für allosterische Selektion:

Helix 1 Pool (NOXXON):
GGAGGGATGATACCAGCCGAAAGGCCCTTN(8-10)GCCGTGCCAGCTCTTCG
GAGCAATACTCGGC

Helix 3 Pool (NOXXON):
GGAGCTCGCTTCGGCGAGGCCGTGCCN(5-7)TACCAGCCGAAAGGCCCTTGG
CAN(5-7)ATACTCGGCGACGCAGCT

Primer für allosterische Selektionen:

Primer 5'-allo DAslxn (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCG

Primer 3'-Theoselect (IBA):
GCTGCGTCGCCGGTATTG

Primer 5'-Helix 1 (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGGGAT

Primer 3'-Helix 3 (IBA):
AGCTGCGTCGCCGAGTA

Primer 3'-Helix 1 Theoclone (IBA):
GCCGAGTATTGCTCCGAAGAGCTGGCA

Primer zum Verdau mit Restriktionsenzymen:

BamHI-Primer (IBA):
ATAGGATCCTCTAATACGACTCACTATA

EcoRI-Primer (IBA):
ATAGAATTCAGCTGCGTCGCCGAGTAT

Primer zur Sequenzierung von Plasmid-DNA:

M13 Fwd -20 (IBA):
GTAAAACGACGGCCAG

M13 Rev (IBA):
AACAGCTATGACCATG

Rationale allosterische Konstrukte:

Theo 1 sense (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCGATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGC
GGCGGTGCCAGGAGGCTTCTCCAATACTCCGC

Theo 2 sense (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGTGATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGC
AGCGGTGCCAGGAGGCTTCTCCAATACTCCGC

Theo 3 sense (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGGCGATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAG
CGCGCGGTGCCAGGAGGCTTCTCCAATACTCCGC

Primer 5'-Theo 1 (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCGATACCAGCCGA

Primer 5'-Theo 2 (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGTGATACCAGCCGA

Primer 5'-Theo 3 (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGGCGATACCAGCCG

Primer 3'-Theo 1-3 (IBA):
GCGGAGTATTGGAGAAGCCTCCTGGCA

Theo 4 sense (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGGGATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGC
CGCGGTGCCAGGAGGCTTCTCCAATACTCCGC

Theo 5 sense (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGAGGCTTCTCCAATACTCCGC

Theo 6 sense (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAG
GAGGCGGTGCCAGGAGGCTTCTCCAATACTCCGC

Theo 7 sense (IBA):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCGATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGC
GGCGGTACCAAGAGGCTTCTCCAATACTCCGC

Primer 3'-Theo 1-3 (IBA):
GCGGAGTATTGGAGAAGCCTCCTGGCA

Primer 3'-Theo 7 (IBA):
GCGGAGTATTGGAGAAGCCTCTTGGCA

Theo 8 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGGGGCTTCCCCATACTCCGC

Theo 9 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGGAGCTTTCCCAATACTCCGC

Theo 10 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGGAAGCTTTTCCCAATACTCCGC

Theo 11 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGGAGGCTTCTCCCAATACTCCGC

Primer 3'-Theo 8 (SIGMA ALDRICH):
GCGGAGTATTGGGGAAGCCCCCTGGCA

Primer 3'-Theo 9 (SIGMA ALDRICH):
GCGGAGTATTGGGAAAGCTCCCTGGCA

Primer 3'-Theo 10 (SIGMA ALDRICH):
GCGGAGTATTGGGAAAAGCTTCCCTGGCA

Primer 3'-Theo 11 (SIGMA ALDRICH):
GCGGAGTATTGGGAGAAGCCTCCCTGGCA

Theo 12 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGGAAGGCTTCTTCCCAATACTCCGC

Theo 13 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGGAAAGCTTTTTCCCAATACTCCGC

Theo 14 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGGGAAGCTTTTCCCCAATACTCCGC

Primer 3'-Theo 12 (SIGMA ALDRICH):
GCGGAGTATTGGGAAGAAGCCTTCCCTGGCA

Primer 3'-Theo 13 (SIGMA ALDRICH):
GCGGAGTATTGGGAAAAAGCTTTCCCTGGCA

Primer 3'-Theo 14 (SIGMA ALDRICH):
GCGGAGTATTGGGGAAAAGCTTCCCCTGGCA

Theo 15 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGTCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
AGCGGTGCCAGGGAAGCTTTTCCCAATACTCCGC

Theo 16 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGTAATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGT
AGCGGTGCCAGGGAAGCTTTTCCCAATACTCCGC

Primer 3'-Theo 15-16 (SIGMA ALDRICH):
GCGGAGTATTGGGAAAAGCTTCCCTGGCA

Theo 17 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAACTGGCCCTTGGCA
GGGGCGGTGCCAGGGAAGCTTTTCCCAATACTCCGC

Theo 18 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGGGAAGCTTTTCCCAATACTCCGC

Theo 19 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGGGGAAGCTTTTCCCAATACTCCGC

Theo 20 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCCCTTGGCAGG
GGCGGTGCCAGGGGGGAAGCTTTTCCCAATACTCCGC

Primer 3'-Theo 17-20 (SIGMA ALDRICH):
GCGGAGTATTGGGAAAAGCTT

Theo 21 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGCTGGCCCTTGGC
AGGGGCGGTGCCAGGGAAGCTTTTCCCAATACTCCGC

Theo 22 sense (SIGMA ALDRICH):
TCTAATACGACTCACTATAGGAGCCATACCAGCCGAAAGGCTGGCCCTTGG
CAGGGGCGGTGCCAGGGAAGCTTTTCCCAATACTCCGC

Primer 3'-Theo 10 (SIGMA ALDRICH):
GCGGAGTATTGGGAAAAGCTTCCCTGGCA

3.3 Aufarbeitung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

3.3.1 Gelelektrophorese

3.3.1.1 Denaturierende Polyacylamidgelektrophorese (PAGE)

Die denaturierende Polyacrylamidgelektrophorese, kurz PAGE genannt, ist eine sehr häufig verwendete Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, sowie Proteinen. Für die Auftrennung von Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge wurden Polyacrylamidgele in verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen verwendet. Das hierfür verwendete Rotiphorese Sequenziersystem der Firma Roth wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Für ein 12 %-iges Gel beispielsweise wurden 48 ml Konzentrat, 10 ml Pufferkonzentrat (10x) und 32 ml Verdünner verwendet. Die Polymerisation dieser Mischung

wurde durch Zugabe von 50 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 500 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet. Die fertigen Gele enthielten jeweils 1 x TBE-Puffer und 8.3 M Harnstoff zwecks Denaturierung der Proben. Nach Auftragen der Proben wurde das Gel bei 500 V und 100 mA ca. 2 Stunden laufen lassen.

3.3.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelektrophorese dient hauptsächlich der Auftrennung von DNA- oder RNA-Strängen nach deren Grösse im Vergleich mit Strängen bekannter Grösse durch Auftragen einer separaten Basenpaarleiter. Als Trägermatrix wird Agarose in unterschiedlichen Konzentrationen, üblicherweise 2-4 %-ige (w/v), verwendet.
Für ein 2 %-iges Gel wurde 1 g Agarose in 50 ml 0.5 x TBE-Puffer gegeben, in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt und unter Schwenken gelöst. Nach Erkalten der Lösung auf ca. 50°C wurden 5 µl einer Ethidiumbromidlösung hinzugegeben und die noch flüssige Gellösung in eine horizontale Gel-Apparatur gegossen. Die Entwicklung erfolgte unter Anlegen von 200 V und 180 mA für 30 Minuten mit einer passenden Basenpaarleiter der Firma Fermentas als Vergleich.

3.3.2 Nachweis von Nukleinsäuren

3.3.2.1 Autoradiographie

Unter Autoradiographie versteht man die Sichtbarmachung einer chemischen Komponente mittels radioaktiver Isotope. Die Sichbtbarmachung erfolgte ursprünglich durch die Schwarzfärbung fotographischer Filme, neuerdings auch mittels der Phosphorimager-Technologie. Bei der chemischen Komponente handelt es sich um ^{32}P-markierte Nukleinsäuren.
Zur Detektion wurde das radioaktive Gel in einer Kodak X-Omatic Kassette mit einem Fuji Medical X-Ray RXOG (Safety) Film exponiert und anschliessend in einem Agfa Curix 60 Entwicklungsautomaten entwickelt. Alternativ wurden die radioaktiven Gele

auf einem Phosphorimager Typhoon 9400 des Herstellers Molecular Dynamics nach Exposition auf entsprechenden screens eingescannt.

3.3.2.2 Färbung mit Ethidiumbromid

Ethidiumbromid ist ein roter Phenanthridin-Farbstoff, der zum Nachweis von Nukleinsäuren in Agarosegelen benutzt wird. Ursprünglich als Wirkstoff gegen Trypanosomen-Erkrankungen im Jahre 1938 synthetisiert, entdeckte man 1965 erstmals, dass Ethidiumbromid in der Lage ist an DNA zu binden und sein Absorptionsspektrum zu verändern. Dabei kommt es zu Interkalation des Ethidiumbromids in Nukleinsäuren, was eine Zunahme der Fluoreszenz-Emission im ultravioletten Licht zur Folge hat. Die zu messende Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden Nukleinsäurelänge und -konzentration. Die Dokumentation erfolgte unter Zuhilfenahme einer Geldokumentationsanlage der Firma BioRad bei einer Einstrahlungswellenlänge von 305 nm.

3.3.2.3 UV-Shadowing

Eine nicht-invasive Methode des Nachweises von Nukleinsäuren in Agarose und Polyacrylamid-Gelen ist das UV-Shadowing. Bei dieser Methode macht man sich die Eigenschaft der Nukleinsäuren zu Nutze, dass aufgrund der vorhandenen Nukleobasen das Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm absorbiert wird. Dazu legt man das zu untersuchende Gel auf eine Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator, der bei 254 nm fluoresziert. Nach Einstrahlen von Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm sieht man deutlich eine Löschung der Fluoreszenz durch die Nukleinsäurebanden des darüberliegenden Gels. Nach Markierung der Banden können diese ausgeschnitten werden. Aufgrund der geringen Empfindlichkeit wird diese Methode überwiegend bei präparative Gelen angewendet.

3.3.3 Elution und Fällung von Nukleinsäuren aus Gelen

Nach Visualisierung, Aus- und Zurechtschneiden der Banden auf ca. 2 x 2 mm große Stücke erfolgte die Elution der Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen in 500 µl Natri-

umacetatlösung (0.3 M, pH 5.5). Dazu wurden die Proben entweder für 1 Stunde bei 80°C oder über Nacht bei 25°C in einem Thermomixer comfort der Firma Eppendorf unter kräftigem Schütteln inkubiert.
Die Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurden nach Visualisierung und Ausschneiden unter Zuhilfenahme eines Ultrafree DA Zentrifugenfilter der Firma Millipore eluiert und anschliessend nach der oben beschriebenen Methode gefällt.

3.3.4 Ethanolfällung

Zu Fällung wurden 400 µl des Überstandes aus der Elution zwecks Abtrennung kleiner Gelstücke durch einen Nanosep MF Zentrifugenfilter (0.45 µM Porenweite) der Firma Pall filtriert. Das dabei erhaltene Filtrat wurde in einem anderen Reaktionsgefäß mit 1 ml -80°C kalten absoluten Ethanol zur Fällung angesetzt. Die Fällung wurde bei -4°C und 11.000 Umdrehungen pro Minute in einer Hettich Mikro 200R Mikroliterzentrifüge durchgeführt. Das nach Abnehmen des ethanolischen Überstandes erhaltene Pellet wurde nochmals mit 70%-igen Ethanol zweimal gewaschen und in einem Concentrator 5301 der Firma Eppendorf vom restlichen Ethanol befreit. Abschliessend wurde das erhaltene Pellet wurde in einer definierten Menge Millipore Wasser gelöst.

3.3.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochdruckflüssigchromatographie ist ein Flüssigchromatographieverfahren, das zur Auftrennung und Detektion von Substanzen benutzt wird. Die Auftrennung der zu untersuchenden Substanzen findet dabei auf der stationären Phase (Säule) unter Einfluss der mobilen Phase (Laufmittel) bei hohem Druck statt. Als HPLC-Gerät wurde ausschliesslich die 1100 Serie der Firma Agilent benutzt. Als Detektoren wurden VWD/DAD- und Fluoreszenz Detektoren der Firma Agilent oder ein Radioflow Detektor LB 509 der Firma Berthold eingesetzt.
Als stationäre Phasen wurden ausschliesslich Säulen mit Umkehrphase (reversed phase, RP) vom Typ Luna 80 (C 18, 5 µM, 250 x 4.6 mm) der Firma Phenomenex benutzt. Umkehrphase bedeutet, dass das die polaren Silanolgruppen des in der Säule vorhande-

nen Kieselgels (5 µM Partikeldurchmesser) mit 18 C-Atomen langen Alkylsilanen derivatisiert sind.

Als mobile Phase wurde eine binäre Gradientenelution, bestehend entweder aus Acetonitril und Wasser oder aus Puffer A (0.1 M Triethyl-Ammoniumacetat, pH 7.0) und Puffer B (0.1 M Triethyl-Ammoniumacetat, pH 7.0 in 80% Acetonitril) verwendet. Die Trennung wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute und einer Säulentemperatur von 45°C durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption bei diversen Wellenlängen. Zur Auswertung der Chromatogramme wurde die jeweilige Gerätekonfiguration des Gerätes benutzt.

HPLC-Methode zur Bestimmung der Inkorporation eines Initiatornukleotids in RNA:

Zeit (min)	0	35	40	45	50	55
Puffer A (%)	85	50	0	0	100	85
Puffer B (%)	15	50	100	100	0	15

3.4 Konzentrations- und Mengenbestimmungen von Nukleinsäuren

3.4.1 Photometrische Messung

Wie bereits unter Kapitel 0 - „UV-Shadowing“ erwähnt, weisen Nukleinsäuren durch Ihre Nukleobasen ein Absorptionsmaximum bei ca. 260 nm auf. Unter Zuhilfenahme der UV-Spektrometrie lässt sich diese spezifische Absorption nutzen, um Nukleinsäuren zu quantifizieren. Bei klaren und verdünnten Lösungen von Nukleinsäuren kann man das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde legen:

$$A = \varepsilon * c * d$$

Dabei ist die Absorption (A) bei gegebener Wellenlänge dem Absorptionskoeffizienten (ε in $l*mol^{-1}*cm^{-1}$), sowie der Konzentration des gelösten Stoffes (c in mol/l) und der Schichtdicke der Küvette (d in cm) proportional. Der Absorptionskoeffizient der jeweiligen Nukleinsäure ist dabei von deren Länge und Sequenz stark abhängig.

Alternativ ist die Konzentration einer Nukleinsäurelösung auch über die Optische Dichte, kurz OD bestimmen. Definitionsgemäß entspricht eine OD_{260} der Menge des absor-

bierenden Stoffes, der in 1 ml gelöst, im UV-Spektrometer in einer Küvette der Schichtdicke von 1 cm bei 260 nm eine Absorption von 1 erzeugt. Als weitere Näherungen bezüglich der Art der Nukleinsäure sind zu beachten: 1 OD_{260} entspricht 33 µg einer einzelsträngigen DNA, sowie 40 µg einer einzelsträngigen RNA und 50 µg einer doppelsträngigen DNA. Daraus ergibt sich für die Stoffmenge einer DNA folgende Gleichung:

$$\text{Stoffmenge DNA (µmol)} = \frac{\text{Gesamt}\,OD_{260}}{(10 * \text{Gesamtzahl der Nukleobasen})}$$

Um näherungsweise die Masse einer gegebenen Nukleinsäure zu berechnen, kann man ferner auf die folgende Formel zurückgreifen:

$$\text{Masse der DNA (µg)} = \frac{(\text{pmol} * \text{Basenzahl} * 325)}{1000000}$$

Eine Möglichkeit, die Molmasse einer gegebenen DNA näherungsweise zu ermitteln, lässt sich durch folgende Formel erreichen:

$$\text{DNA in g/mol} = (dA*312{,}2) + (dC*288{,}2) + (dG*328{,}2) + (dT*303{,}2)$$

3.4.2 Cerenkov-Messung

Die durch radioaktive Markierung mit $^{32-}$P erhaltenen, modifizierten Nukleinsäuren wandeln unter Beta-Minus-Zerfall im Kern ein Neutron in ein Proton um emittieren ein hochenergetisches Elektron sowie ein Elektron-Antineutrino. Die emittierte Beta-Strahlung wurde in einem Szintillationszähler, Modell LS 6500 der Firma Beckmann gemessen. Bei der Detektion durch de Szintillationszähler werden die die Eigenschaften verschiedener Materialien ausgenutzt, die beim Durchtritt ionisierender Teilchen erzeugte Anregung in Licht umzuwandeln. Das damit erzeugte Licht ist abhängig von der vom Teilchen abgegebenen Energie und wird mit Hilfe einer Photozelle und nachgeschalteten Sekundärelektronenvervielfacher registriert und zur Quantifizierung der ra-

dioaktiv markierten Nukleinsäure benutzt. Die Proben wurden ohne Zugabe von Szintillationsflüssigkeit vermessen. Die Quantifizierung der aufgereinigten RNA erfolgte gemäss folgender Formel:

$$\text{Einbaurate des } \alpha\text{-}^{32}\text{P-CTP} = \frac{\text{Radioaktivität der RNA [cpm]}}{\text{eingesetzte Gesamtradioaktivität [cpm]}}$$

$$\text{RNA-Stoffmenge} = \frac{\text{Einbaurate} \bullet \text{Endkonzentration CTP} \bullet \text{Ansatzvolumen}}{\text{Anzahl der Cytidine im Transkript}}$$

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction, kurz PCR, ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA. Ausgangspunkt ist ein einzel- oder doppelsträngiges DNA-Molekül[208]. Dazu benötigt werden Primer, Desoxynukleotidtriphosphate, sowie eine DNA-Polymerase in einer gepufferten Lösung mit Magnesium-Ionen.

Die Primer sind Oligonukleotide, welche 20-30 Nukleotide lang sind und jeweils komplementär zum 3'- und 5'-Ende des zu vervielfältigenden DNA-Moleküls sind. Als DNA-Polymerase wurde eine hitzestabile *Taq*-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet.

Die PCR kann in drei grundlegende Schritte unterteilt werden: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Bei der Denaturierung werden durch kurzzeitiges Erhitzen auf ca. 90-96°C eventuelle doppelsträngige Bereiche der ausgehenden DNA getrennt, Wasserstoffbrückenbindungen werden aufgebrochen. Während der anschliessenden Primerhybridisierung wird die Temperatur auf ca. 50-65°C gesenkt, damit es zur Anlagerung der komplementären Primer and die DNA kommt. Die Anlagerungstemperatur ist dabei spezifisch für die jeweilige DNA-Primer Kombination. Im abschliessenden Schritt der Elongation füllt schliesslich die DNA-Polymerase bei konstant 72°C die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf. Die Reaktion beginnt am 3'-Ende der DNA und verläuft dabei vom 5'- zum 3'-Ende. Im Verlaufe der PCR-Reaktion kommt es zur wie-

derholten Abfolge der eben beschriebenen Schritte, welches in einem exponentiellen Anstieg der DNA resultiert.

Komponente	Menge/Konzentration
DNA-Matrize	x µl
10x PCR Puffer, ohne MgCl2 (Gibco)	10 µl
5' primer (100 µM)	4 µl
3' primer (100 µM)	4 µl
MgCl2 (50 mM)	8 µl
dNTP-Mix (10 mM)	5 µl
Taq-Polymerase 5U/µl Rapidozym Gentherm Polymerase	2 µl
Wasser	ad 100 µl

Tabelle 3.1: *Zusammensetzung einer PCR-Reaktion unter Standardbedingungen*

Schritt	Zeit (min)	Temperatur
1	2:00	92°C
2	1:00	57°C
3	1:00	72°C
4	1:00	92°C
Wiederholung der Schritte 2-4 über 20 Zyklen		

Tabelle 3.2: *Zusammensetzung des PCR-Programms für eine PCR-Auffüllreaktion und eine PCR-Reaktion unter Standardbedingungen*

3.5.2 PCR-Auffüllreaktion

Bei der sogenannten PCR-Auffüllreaktion geht man ausschliesslich von einzelsträngiger DNA aus, welche mittels eines Primers vom 3'-Ende her aufgefüllt wird. Das Verhältnis von zu vervielfältigender DNA und Primer ist dabei gleich. Der Einfachheit halber wurde das gleiche PCR-Programm wie bei der klassischen PCR verwendet.

Komponente	Menge/Konzentration
DNA-Matrize (100 µM)	10 µl
10x PCR Puffer, ohne MgCl2 (Gibco)	10 µl
5' primer (100 µM)	10 µl
MgCl2 (50 mM)	8 µl
dNTP-Mix (10 mM)	5 µl
Taq-Polymerase 5U/µl Rapidozym Gentherm Polymerase	2 µl
Wasser	ad 100 µl

Tabelle 3.3: *Zusammensetzung einer PCR-Auffüllreaktion*

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Peltier-Thermocycler PTC-200 der Firma MJ Research durchgeführt.

3.5.3 T7-Transkriptionsreaktion

In vitro, also im Reagenzglas, lässt sich RNA durch Transkription einer komplementären DNA-Sequenz erzeugen. Die Transkription erfolgt in Anwesenheit der zu transkribierenden DNA-Sequenz, welche am 3'-Ende einen doppelsträngigen Erkennungsbereich (Promoter) benötigt, sowie von Nukleosidtriphosphaten (NTP) und der DNA-abhängigen RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 in 5'→3'-Richtung. Durch den Einsatz eines α-^{32}P markierten NTP lässt sich die hergestellte RNA radioaktiv markieren. Die Transkription beginnt stets mit einem Guanosin. Zusätzlich lässt sich die Ausbeute steigern, wenn die RNA mit mehreren Guanosinen anfängt. Die Transkriptionen wurden wie in der Literatur beschrieben, durchgeführt[209].

Komponente	Menge/Konzentration
dsDNA-Matrize	1/10 Volumen einer PCR-Auffüllreaktion oder Standard PCR-Reaktion
10x W'-Transkriptionspuffer	5 µl
Dithiothreitol (0.1 M)	5 µl
BSA (1 mg/ml)	2 µl
NTP-Mix (4 mM pro NTP)	8 µl
α-32P-CTP (20 µCi/µl)	1 µl
T7 RNA Polymerase (200 U/µl)	2.5 µl
Wasser	ad 50 µl

Tabelle 3.4: *Zusammensetzung einer T7-Transkriptionsreaktion ohne Initiatornukleotid*

3.5.4 T7-Transkriptionsreaktion mit Initiatornukleotid

Das verwendete Enzym T7-RNA-Polymerase toleriert gewisse chemische Modifikationen in der Initiationsphase der Transkription. Während der Initiation wird Guanosinmonophosphat oder 5'-Derivate davon umgesetzt und am 5'-Ende eingebaut. Dies findet jedoch nicht während der Elongationsphase statt, was eine gute Möglichkeit zur Einführung von 5'-modifizierten Guanosinmonophosphaten ausschliesslich am 5'Ende des RNA-Moleküls bietet.

Auf diese Weise kann 5'-Anthracen-Decaethylenglycol-modifizierte RNA durch Zugabe des Decaethylenglycol-Anthracen-Initiatornukleotids (ADEG) in Konzentrationen von 1-4 mM zum Transkriptionsansatz erhalten werden. Bei gleichzeitiger Erniedrigung der GTP-Konzentration lässt sich die Ausbeute auf bis zu 95% steigern[210].

Komponente	Menge/Konzentration
dsDNA-Matrize	1/10 Volumen einer PCR-Auffüllreaktion oder Standard PCR-Reaktion
10x W' Puffer	5 µl
Dithiothreitol (0.1 M)	5 µl
BSA (1 mg/ml)	2 µl
NTP-Mix (4 mM pro NTP)	8 µl
α-32P-CTP (20 µCi/µl)	1 µl
ADEG (50 mM)	4 µl
T7 RNA Polymerase (200 U/µl)	2.5 µl
Wasser	ad 50 µl

Tabelle 3.5: *Zusammensetzung einer T7-Transkriptionsreaktion mit Initiatornukleotid*

Die Aufreinigung der so erhaltenen RNA-Moleküle erfolgte analog derer, die keine Modifikation am 5'-Ende trugen. Generell betrug die Reaktionszeit 3-4 Stunden bei 37°C.

3.5.5 Reverse Transkription

Nach jeder Selektionsrunde musste die auf der Festphase über das 5'-Ende gebundene RNA wieder in DNA umgeschrieben und anschliessend auch amplifiziert werden. Das Umschreiben von geschah durch reverse Transkription. Dabei macht man sich die Eigenschaft zur Nütze, dass die RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) mit einem zum 3'-Ende komplementären Primer einzelsträngiger RNA in dessen komplementäre DNA umschreiben kann. Die Synthese erfolgt dabei als Elongation des Primers in 5' → 3'-Richtung. In der Selektion wurde die reverse Transkription ausschliesslich direkt auf der Streptavivin-Agarose Festphase mit der SuperScript II RNase H- reverse Transkriptase der Firma Invitrogen, die eine RNase H-Deletion aufweist durchgeführt.

Dem eigentlichen Elongationsschritt durch die reverse Transkriptase geht dabei der wichtige Hybridisierungsschritt des Primers an die RNA zuvor. Dazu wird die RNA zusammen mit dem Primer in ausschliesslich wässriger Lösung für 10 Minuten bei

85°C inkubiert und anschliessenden für 4 Minuten auf Eis gelagert. Nach Zusatz des Puffers und der Desoxynukleotide wird die gesamte Lösung für 2 Minuten bei 55°C inkubiert, anschliessend das Enzym hinzugefügt. Die eigentliche Reverse Transkription wird nun für 60 Minuten bei 55°C durchgeführt. Es schliesst sich in der Regel eine PCR-Reaktion an, mit derer die vorliegende, einzelsträngige DNA amplifiziert wird.

Komponente	Menge/Konzentration
RNA (immobilisiert auf Streptavidin-Agarose)	ca. 50 µl
3'-Primer (100 µM)	6µl
10 min bei 85°C, dann 4 min auf Eis	
5x 1st Strand Puffer (Gibco)	20 µl
BSA (1 mg/ml)	5 µl
DTT (0.1 M)	5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	5 µl
Wasser	ad 95 µl
2 min bei 55°C	
Reverse Transkriptase (200U/µl), Superscript II RNAse H-	5 µl
60 min bei 55°C	

Tabelle 3.6: *Zusammensetzung einer Reversen Transkriptions-Reaktion während der in vitro-Selektion*

3.5.6 Klonierung

Nach Durchführung der allosterischen Selektion wurde die DNA nach der letzten Selektionsrunde, Runde 7 für Bibliothek Helix 1 und Runde 6 für Bibliothek Helix 3, revers transkribiert und wie in den Runden zuvor mittels PCR amplifiziert. Im Anschluss an den letzten Amplifikationsschritt wurde die DNA nochmals bei 72°C für 10 Minuten inkubiert, um eine Adenylierung der 3'-Enden zu gewährleisten.

Die anschliessende Klonierung wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Die erste Klonierung erfolgte mit einem PCR Cloning^{Plus} Kit der Firma Qiagen. Dieses Kit enthält alle zur Klonierung notwendigen Reagenzien. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. In einem ersten Schritt wurde die doppelsträngige DNA aus der Selektion in einen pDrive Cloning Vektor mit 3'-überhängenden Uridinresten ligiert. Dieser

Vektor wurde dann in die mitgelieferten kompetenten *E.coli*-Zellen transformiert. Nach der Transformation erfolgte die Ausplattierung auf LB-Platten über Nacht bei 37°C. Die LB-Platten enthielten Ampicillin als Selektionsmarker, sowie X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid) und IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) zwecks Sichtbarmachung eines Inserts im Plasmid. Die Zellen, in die ein Plasmid transformiert wurde, können mittels der Plasmid-vermittelten Antibiotika-Resistenz auf LB-Platten wachsen.

Bei der zweiten Klonierung wurden die doppelsträngigen DNA-Bibliotheken nach erfolgter Selektion in einem ersten Schritt mit den spezifischen Primern BamHI und EcoRI am 3'- und 5'-Ende um neun Nukleotide lange Schnittstellen für die Restriktionsendonuleasen BamHI und EcoRI verlängert. Der anschliessende Verdau der beiden Bibliotheken, wie auch des pBluescript II Phagemid Vektors der Firma Stratagene, erfolgten sequentiell: nach erfolgtem ersten Verdau mit BamHI wurde der Reaktionsansatz mit Phenol/Ether extrahiert, anschliessend unter Standardbedingungen gefällt und zentrifugiert. Mit dem erhaltenen DNA-Pellet wurde dann der zweite Verdau mit EcoRI durchgeführt.

Komponente	Menge/Konzentration
dsDNA-Matrize	10 µl (ca. 30 µg)
BSA (10x)	1 µl
Restriktionsendonukleasenpuffer (10x)	10 µl
Restriktionsendonuklease (20U/µl)	10 µl
Wasser	ad 100 µl

Tabelle 3.7: *Zusammensetzung der Reaktion zwischen doppelsträngiger DNA und Restriktionsendonukleasen*

Die doppelt-verdauten DNA-Bibliotheken wurde nun mit dem geschnittenen Vektor in einem Verhältnis von 1:10 über Nacht bei 16°C ligiert und anschliessend in DH5α-Zellen der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben transformiert. Es folgten Ausplattierung auf LB-Platten und Inkubation über Nacht bei 37°C.

Komponente	Menge/Konzentration
pBluescript Phagemid Vektor	0.05 pmol
dsDNA Insert	0.5 pmol
Fermentas Ligationspuffer (10x)	2 µl
Fermentas T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	1 µl
Wasser	ad 20 µl

Tabelle 3.8: *Zusammensetzung der Ligations-Reaktion zwischen einem durch Restriktionsendonukleasen verdauten Vektor und der zu ligierenden DNA*

3.5.7 LB-Übernachtkulturen und Insertkontrolle

Nach erfolgter Inkubation der jeweiligen Transformationen wurden die auf den LB-Platten gewachsenen Klone isoliert und in 5 ml LB-Medium, ebenfalls mit Ampicillin als Selektionsmarker, über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Untersuchung der isolierten Klone auf Inserte wurden 20 µl Aliquots aus den LB-Kulturen entnommen und in zwei verschiedenen PCR-Reaktion mit den folgenden Primerpaaren unter Standardbedingungen inkubiert:

(1) Selektionsprimer 5'-allo DAslxn und 3'-Theoclone (Hybridisierung mit den Enden der Inserte in den Plasmiden - kürzere PCR-Produkte, ohne 3'-Überhang)

(2) Primer M13 fwd und M13 rev (Hybridisierung mit dem Plasmid - längere PCR-Produkte)

Die Auswertung erfolgte auf einem 2%-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid-Färbung. Dieser Schritt diente der Amplifizierung der Plasmid-DNA zwecks anschliessender Sequenzierung.

3.5.8 Plasmidaufreinigung

Die Aufarbeitung der Übernachtkulturen aus LB-Medium wurde der Klone, welche nach Detektion mittels PCR ein Insert enthielten, wurde unter Herstellerangaben mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit durchgeführt. Eluiert wurde dabei mit Millipore-Wasser. Eine photometrische Quantifizierung mit dem NanoDrop UV-Spektrometer schloss sich an.

3.5.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Didesoxymethode von Sanger et al.[211] durch die Firma Seqlab durchgeführt. Dazu wurde die Plasmid-DNA nach genauer Anweisung durch Zugabe von spezifischen Primern, M13 Fwd (-20) und M13 Rev, vorbereitet und eingeschickt. Die Auswertung der Sequenzen wurde mit dem Programmpaket Multialin durchgeführt[212].

3.6 Durchführung der allosterischen *in vitro* Selektion

Die beiden einzelsträngigen DNA-Bibliotheken der Firma NOXXON mussten in einem ersten Schritt in die jeweiligen doppelsträngigen Bibliotheken umgeschrieben werden. Dazu wurde mittels spezifischer Primer eine PCR-Reaktion durchgeführt. Das anschliessend erhaltene doppelsträngige Templat wurde durch eine anschliessende T7-Transkription in die RNA-Bibliothek (Verhältnis ADEG : GTP = 4 : 1) in Gegenwart von α-^{32}P-CTP mittels radioaktiver Markierung umgeschrieben. Eine unmittelbare Aufreinigung über ein 12%-iges PAGE-Gel mit autoradiographischer Detektion der Pro-

dukte schloss sich an. Die Produktbanden wurden wie unter 3.5.3 und 3.5.4 erst ausgeschnitten, dann eluiert und gefällt.

Um eine gleichmässige und reproduzierbare Faltung der RNA-Spezies während der gesamten Selektion zu gewährleisten, wurde das aufgereinigte RNA-Pellet zuerst immer in 31 µl Wasser gelöst, in ein PCR-Gefäss transferiert und für 10 Minuten bei 60°C im Thermocycler temperiert. Im Anschluss wurden 8 µl eines 5-fach konzentrierten DA-Puffers hinzugefügt und für weitere 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Ein Temperaturprogramm mit einer konstanten Abkühlrate von 1°C pro Minute auf 25°C beendete die Prozedur. Die nun erhaltene RNA in gepufferter Lösung wurde wiederum in ein Reaktionsgefäss überführt, in dem sämtliche Diels-Alder Reaktionen stattfanden.

Komponente	Temperatur	Zeit
RNA-Anthracen plus Wasser	60°C	10 min
5x-DA-Puffer	60°C	10 min
Herunterkühlen auf 25°C bei 1°C pro Minute		

Tabelle 3.9: *Temperaturprogramm zur De- und Renaturierung von einzelsträngiger RNA zur Reaktion in der allosterischen in vitro-Selektion oder im Fluoreszenz-Assay*

In einer ersten Gegenselektion in Abwesenheit von Theophyllin wurde die RNA-Bibliothek direkt mit Biotin-Maleimid inkubiert. Die Reaktion wurde nach 60 Minuten mit einer Mercaptoethanol-Lösung gestoppt.

Selektionsbedingungen Gegenselektion mit Biotin-Maleimid ohne Theophyllin:

Komponente	Menge
RNA-Anthracen	200-400 pmol
Wasser	31 µl
5x-DA-Puffer	8 µl
Biotin-Maleimid (2mM in DMSO)	1 µl

Tabelle 3.10: *Reaktionsbedingungen der Gegenselektion zwischen RNA und Biotin-Maleimid ohne Theophyllin*

Die gesamte obige Reaktion wurde in einem weiteren Schritt über eine NAP-5 Gelfiltrationssäule der Firma Amersham aufgereinigt. Dazu musste die Säule zuerst mit drei Säulenvolumen Immobilisierungspuffer (Immopuffer: 1 M NaCl, 5 mM EDTA und 10 mM HEPES, pH 7.2) equilibriert werden. Anschliessend wurde die Reaktion in einem Gesamtprobenvolumen von 500 µl auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit insgesamt 1 ml an Immopuffer. Das Eluat von wurde in ca. 10-12 Reaktionsgefässe fraktioniert gesammelt. Die Radioaktivität der gesammelten Fraktionen wurde im Szintillationszähler ermittelt, die ca. 2-3 schwächsten Fraktionen verworfen und sämtliche andere Fraktionen vereinigt.

Parallel dazu wurde eine Festphase, Streptavidin-Agarose der Firma Pierce, zwecks Immobilisierung und Entfernen der mit einer Ankergruppe (Biotin-Maleimid) versehenen RNA-Spezies vorbereitet. Dazu wurden 150 µl einer Suspension der Festphase in einen Mobicol Zentrifugalfilter (10 µM Porengrösse) der Firma Mobitec überführt. Der wässrige Überstand konnte mittels Zentrifugation in einer Standard-Tischzentrifuge bei 2.400 Umdrehungen pro Minute entfernt werden. Anschliessend wurde die Festphase zweimal mit Immopuffer gewaschen und wieder abzentrifugiert. Um unspezifische Bindungsphänomene zu reduzieren, wurde die Festphase mit einer Lösung von 2 mg/ml tRNA (aus E.coli MRE 600, Roche) in Immopuffer bei 25°C, kräftigem Schütteln für 10 Minuten inkubiert und anschliessend nochmals gewaschen.

Auf dieser vorbereiteten Streptavidin-Agarose wurde nun die gesamte aufgereinigte Reaktion in einem Gesamtvolumen von 600-800 µl bei 25°C, kräftigem Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde das Filtrat gesammelt und die Festphase noch zweimal mit 150 µl Immopuffer nachgewaschen. Das Filtrat wurde wie unter Ka-

pitel 3.3.4 beschrieben, gefällt. Die Festphase wurde dann abwechselnd mit jeweils 350 µl Waschpuffer (8 M Harnstoff und 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4) und Wasser gewaschen, bis die die gemessene Radioaktivität der Waschfraktionen im Szintillationszähler auf Hintergrundniveau war. Wenn die Festphase mehr als 1% an immobilisierten RNA-Spezies aufwies, wurde der gesamte Vorgang der Gegenselektion nochmals wiederholt. Wenn letztendlich weniger als 1% an RNA-Spezies nach den ersten Runden Gegenselektion immobilisiert und aus der RNA-Bibliothek dadurch entfernt wurden, fand eine weitere Gegenselektion in Anwesenheit von N-Pentyl-Maleimid statt. Die Reaktion wurde ebenfalls bei 25°C über 60 Minuten durchgeführt.

Selektionsbedingungen Gegenselektion mit NPM ohne Theophyllin:

Komponente	Menge
RNA-Anthracen	50-150 pmol
Wasser	31 µl
5x-DA-Puffer	8 µl
N-Pentyl-Maleimid (2 mM in DMSO)	1 µl

Tabelle 3.11: *Reaktionsbedingungen der Gegenselektion zwischen RNA und N-Pentyl-Maleimid ohne Theophyllin*

Die Reaktion wurde durch dreimalige Extraktion des überschüssigen N-Pentyl-Maleimid mit einem 10-fachen Volumenüberschuss an Diethylether (gesättigt mit 1x-DA Puffer) gestoppt. Der restliche Diethylether wurde in einem Vakuumconcentrator der Firma Eppendorf entfernt und das Reaktionsvolumen mit 1x-DA Puffer auf 39 µl eingestellt. Es folgte die Zugabe einer Theophyllin-Lösung und Equilibrierung bei 25°C für 10 Minuten. Nach 60 Minuten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von Mercaptoethanol gestoppt.

Selektionsbedingungen Positivselektion mit Biotin-Maleimid und Theophyllin:

Komponente	Menge
RNA-Anthracen	50-150 pmol
5x-DA-Puffer	8 µl
Theophyllin (5mM in 1x-DA Puffer)	10 µl
Biotin-Maleimid (2.5 mM in DMSO)	1 µl
Wasser	ad 50 µl
Mercaptoethanol (0.1 M in 1x-DA Puffer)	10 µl

Tabelle 3.12: *Reaktionsbedingungen der Positivselektion zwischen RNA und Biotin-Maleimid in Gegenwart von Theophyllin*

Im Anschluss an die Reaktion wurde die Lösung wie oben beschrieben erst aufgereinigt und dann auf einer Streptavidin-Agarose Festphase immobilisiert. Die immobilisierten RNA-Spezies wurden danach erst revers transkribiert und dann mittels PCR amplifiziert, um in die nächste Runde der Selektion zu gelangen.

3.7 Aktivitätsmessungen von Ribozymen

3.7.1 Fluoreszenzspektrometrischer Assay

Beim Fluoreszenz-Assay macht man sich die Fluoreszenz-Aktivität des Anthracens zu Nutze. Anthracen zeigt bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von 365 nm eine klassisch blauviolette Fluoreszenz mit 419 nm Emissionswellenlänge. Das Anthracen ist dabei am 5'-Ende mit der entsprechenden RNA konjugiert und die Abnahme der Fluoreszenz bei 419 nm wurde über die Zeit nach Zugabe von Biotin-Maleimid (BM) verfolgt. Als Initiatornukleotid wurde Anthracendecaethylen-Glykol (ADEG) verwendet. Diese linkergekoppelte Reaktion wird auch als *cis*-Assay bezeichnet.
Vor der eigentlichen Durchführung der Fluoreszenz-Messung wurde die RNA im PCR-Gefäss in Wasser auf 60°C erhitzt und nach anschliessender Pufferzugabe auf Raum-

temperatur heruntergekühlt (zur genauen Durchführung siehe Kapitel 3.6 und **Tabelle 3.9**).

Die Messungen wurden ausschliesslich bei konstanter Temperatur auf einem FP-6500 Fluoreszenzspektrometer der Firma Jasco durchgeführt. Die Temperierung erfolgte primär durch einen Peltier Temperature Controller ETC-273T der Firma Jasco, welcher zusätzlich durch einem Kälte-Umwälz Thermostat F25 MB der Firma Julabo extern heruntergekühlt werden konnte. Die Messungen erfolgten in einer Mikro-Fluoreszenz Küvette (Volumen 30 µl), Quarzglas SUPRASIL der Firma Hellma. Die Einstellungen des Flureszenz-Spektrometers variierten dabei. Generell wurde zwei unterschiedliche Einstellungen verwendet, die in **Tabelle 3.13** aufgeführt sind.

Messparameter (alte Einstellungen)	
Parameter	Setting
Start	0 sec
Data pitch	0.5 sec
Start Mode	Shutter Open
Band width(Ex)	3 nm
Band width(Em)	3 nm
Response	0.1 sec
Sensitivity	High
Excitation Wavelength	365 nm
Emission Wavelength	419 nm

Messparameter (neue Einstellungen)	
Parameter	Setting
Start	0 sec
Data pitch	1 sec
Start Mode	Shutter Open
Band width(Ex)	1 nm
Band width(Em)	5 nm
Response	1 sec
Sensitivity	High
Excitation Wavelength	365 nm
Emission Wavelength	419 nm

Tabelle 3.13: *Alte und neue Einstellungen für das Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer*

Die Zusammensetzung des Fluoreszenz-Assay ist in **Tabelle 3.** aufgeführt.

Komponente	**Menge/Konzentration**
RNA-Anthracen (80-90% RNA-A)	2.5 µM
5x-DA-Puffer	3 µl
Theophyllin (+ / -)	(100 µM / 0 µM)
Biotin-Maleimid	25 oder 50 µM
Wasser	ad 15 µl

Tabelle 3.14: *Zusammensetzung des Fluoreszenz-Assay zwischen RNA und Biotin-Maleimid in An- und Abwesenheit von Theophyllin*

Wie oben beschrieben, wurde die Abnahme der Fluoreszenz-Aktivität des kovalent gebundenen Anthracens durch Zugabe von Biotin-Maleimid über die Zeit jeweils in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin vermessen. Die erhaltenen Kurven wurden anschliessend willkürlich mittels Standard PC-Anwendersoftware auf 100 Fluoreszenz-Einheiten normalisiert. Zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten wurde jeweils die Zeit in Sekunden nach 10% Produktabnahme auf der Zeitachse abgelesen. Dieser Wert entsprach somit einer definiert umgesetzten Stoffmenge pro Zeiteinheit, gemessen nM pro Minute. Durch Teilen dieses Wertes für die Reaktion in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin konnte der jeweilige Schaltfaktor der RNA-Sequenz errechnet werden.

3.7.2 UV-Spektrometrischer Assay

Beim UV-Assay wird die Abnahme der Absorption des Anthracens bei 365 nm in Anwesenheit eines Maleimid-Derivates, in diesem Fall N-Pentyl-Maleimid (NPM), über die Zeit aufgenommen. Die Reaktanden RNA, Anthracen-Hexaethylenglykol (AHEG) und NPM liegen dabei frei in Lösung vor. Terminologisch handelt es sich um die *trans*-Reaktion. Als Gerät wurde durchgehend ein Cary 50 UV-Vis Spektrophotometer der Firma Varian mit Mikrokuvettenhalter verwendet. Als Küvetten wurden Ultramikro Küvetten Quarzglas SUPRASIL der Firma Hellma eingesetzt.
Die aufgenommen Kurven wurden anschliessend auf 1 Absorptionseinheit normalisiert und aus den ersten 10% Produktabnahme die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten in pmol pro Minute errechnet.

Komponente	Menge/Konzentration
RNA	7 oder 21 µM
5x-DA-Puffer	2 µl
AHEG	100 µM
Theophyllin (+ / -)	(100 µM / 0 µM)
N-Pentyl-Maleimid (in Ethanol)	500 µM
Wasser	ad 10 µl

Tabelle 3.15: *Zusammensetzung des UV-Assay zwischen RNA, AHEG und N-Pentyl-Maleimid in An- und Abwesenheit von Theophyllin*

3.7.3 HPLC-Assay

Beim HPLC-Assay handelt es sich ebenfalls um ein *trans*-Assay. Dabei wird das entstandene Produkt im Reaktionsgemisch per HPLC aufgetrennt und detektiert. Als Reaktanden wurden AHEG und NPM, als Katalysator RNA verwendet. Die Reaktionen wurden ausschliesslich bei Raumtemperatur durchgeführt und nach den entsprechenden Zeitpunkten mit einer 1%-igen Lösung von ß-Mercaptoethanol in gleichen Volumenteilen Acetonitril und Wasser gestoppt. Diese Mischung wurde in HPLC-Probengefässe transferiert, das Reaktionsgefäss mit 10 µl absolutem Ethanol gewaschen und ebenfalls in das HPLC-Probengefäss überführt. Aus dieser Mischung wurden 80 µl auf die Säule injiziert.

Zur Produktquantifizierung der einzelnen Reaktionen wurde eine Kalibrierkurve mittels isokratischer Elution aus 52 Volumenteilen Acetonitril und 48 Volumenanteilen Wasser eines synthetisch hergestellten Diels-Alder Produkt zwischen AHEG und NPM angefertigt. Die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden durch Anpassung der Reaktionszeit auf jeweils 10% des Gesamtumsatzes, gemessen durch Produktbildung ermittelt.

Komponente	Menge/Konzentratio
RNA	7 oder 21 µM
5x-DA-Puffer	14 µl
AHEG	100 µM
Theophyllin	100 µM
N-Pentyl-Maleimid (in DMSO)	500 µM
Wasser	ad 70 µl
Mercaptoethanol (in MeCN/Wasser)	10 µl

Tabelle 3.16: *Zusammensetzung des HPLC-Assay zwischen RNA, AHEG und N-Pentyl-Maleimid in An- und Abwesenheit von Theophyllin*

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung allosterischer Schalter aus einer vorangegangen *in vitro* Selektion

Das Ziel der Arbeit bestand darin, allosterisch regulierte Biosensoren massgeschneidert auf Basis des Diels-Alderase-Ribozyms zu entwickeln und zu charakterisieren. Dazu wurden in einem ersten Schritt acht verschiedene Klone aus einer vorangegangen *in-vitro* Selektion auf deren allosterisches Verhalten gegenüber Theophyllin und verwandter Xanthin-Derivate untersucht.

4.1.1 Untersuchung des allosterischen Verhaltens gegenüber Theophyllin

Die den acht isolierten Klonen zugrunde liegende RNA-Bibliothek bestand aus einem Diels-Alderase Minimalmotiv, welches an Helix 3 mit einem Theophyllin-Aptamer über einen fünf Nukleotide langen doppelsträngigen, randomisierten Bereich verknüpft war. Generell unterschieden sich die acht isolierten Klone in den drei folgenden Strukturmerkmalen:

1. Der Sequenz des Kommunikationsmoduls, welches eine Einteilung in zwei Gruppen zur Folge hatte,
2. Dem Vorliegen von Mutationen im Bereich von Helix 2 des Diels-Alderase-Ribozyms und im Theophyllin-Aptamer, sowie
3. Eines Überhanges von acht Nukleotiden am 3'-Ende der RNA, welcher für die reverse Transkription und anschliessende Amplifizierung mittels PCR während der vorangegangenen allosterischen *in-vitro* Selektion essentiell war.

In **Abbildung 4.1** ist die angenommene Sekundärstruktur der allosterischen *in-vitro* Selektion zugrunde liegenden RNA-Bibliothek dargestellt. Es ist anzumerken, dass es sich bei der Sekundärstruktur in **Abbildung 4.1** um eine angenommene, d.h. experimentell nicht bewiesene Struktur handelt. Die Struktur lehnt sich dabei an die Struktur des Theophyllin-Aptamer und des Diels-Alderase Minimalmotivs an.

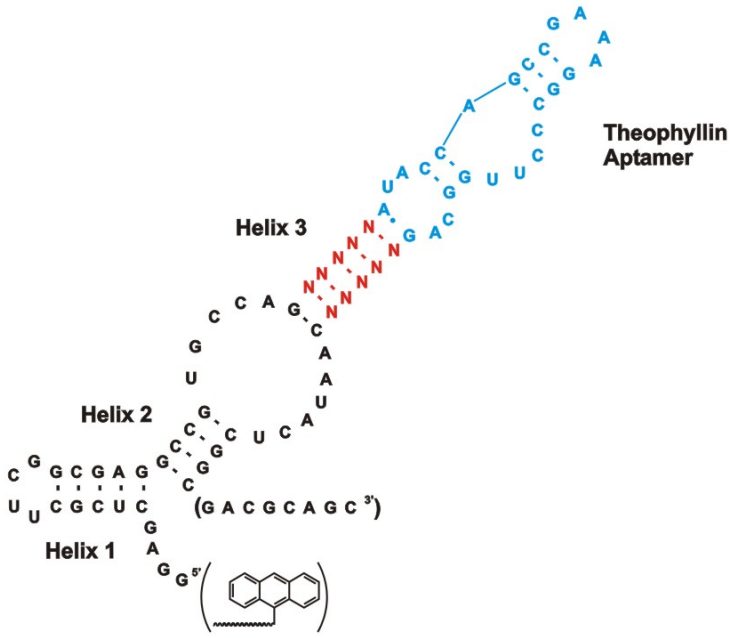


Abbildung 4.1: *Vermeintliche Sekundärstruktur der RNA-Bibliothek nach Helm et al. vor allosterischer Selektion (entnommen aus [206]). Das Theophyllin-Aptamer ist blau, das Kommunikationsmodul rot dargestellt. Der flexible Linker mit kovalent gebundenem Anthracen, sowie der Überhang von acht Nukleotiden am 3'-Ende sind in Klammern angegeben.*

Um herauszufinden, welches der drei oben erwähnten Strukturmerkmale (Kommunikationsmodul, Mutationen oder 3'-Überhang) einen Einfluss auf das allosterische Verhalten gegenüber Theophyllin ausübte, wurden insgesamt acht verschiedene RNA-Sequenzen mittels Fluoreszenz Assay vermessen. **Abbildung 4.2** gibt einen Überblick über die acht verschiedenen Sequenzen. Die erste Gruppe an Sequenzen mit identischem Kommunikationsmodul (MH20, 21, 47 und 48) wies zwei verschiedene Stellen für Mutationen auf: in Helix 2 und im Theophyllin-Aptamer, wobei die Mutationen in Helix 2 Sustitutionen eines Guanosins an Postion 19 durch ein Uridin (MH21) oder die Substitution eines Cytosins durch ein Uridin in Position 20 (MH48) sind. Die Mutationen im Theophyllin-Aptamer sind jeweils identisch und substituieren das Guanosin in Position 47 durch ein Adenosin (MH21 und MH48). Bei der zweiten Gruppe an Sequenzen mit identischem Kommunikationsmodul (MH23, 49, 50 und 51) war bei MH 50 und MH51 jeweils ein Cytosin in Position 56 durch ein Adenosin substituiert. Die entsprechenden Fluoreszenzkurven sind im Anhang (Kapitel 7.6.1) aufgeführt.

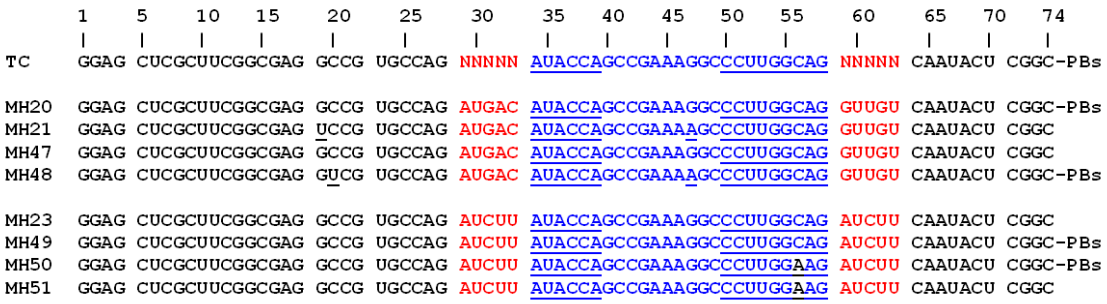


Abbildung 4.2: *Übersicht über die Sequenzunterschiede der Klone aus der allosterischen in-vitro Selektion nach Helm et al. im Vergleich mit der Ursprungsbibliothek (TC = TheoComm). Der Bereich des Kommunikationsmodules ist rot, der Bereich des Theophyllin-Aptamer blau dargestellt. Konservierte Nukleotide im Bereich des Theophyllin-Aptamer sind unterstrichen. PBS = Primer-Binding-Site, respektive 3'-Überhang (8 Nukleotide).*

In **Tabelle 4.1** sind die ermittelten Reaktionsraten und Schaltfaktoren für die acht verschiedenen Sequenzen aufgeführt. Die „Winner-Sequenzen" sind MH48 und MH23 mit Schaltfaktoren von 28 und 24. Die anderen sechs Klone weisen, bis auf MH47 mit einem Schaltfaktor von 9, Schaltfaktoren von unter 5 auf.

Versucht man, den Einfluß des 3'-Überhanges von acht Nukleotiden auf das allosterische Verhalten gegenüber Theophyllin zu erklären, so fällt auf, dass bei den Sequenzen ohne Mutationen diejenigen ohne Überhang allosterisch stärker durch Theophyllin aktiviert werden (MH47 und MH20 vs. MH23 und MH 49). Für die Sequenzen mit Mutationen ist das Umgekehrte der Fall (MH48 vs. MH21 und MH MH50 vs. MH51).

Konstrukt	Reaktionsrate mit Theophyllin (nM/min)	Reaktionsrate ohne Theophyllin (nM/min)	Schaltfaktor
MH20	333	83	**4**
MH21	25	17	**2**
MH47	150	17	**9**
MH48	600	21	**28**
MH23	242	10	**24**
MH49	1500	395	**4**
MH50	20	8	**3**
MH51	4	3	**1**

Tabelle 4.1: *Reaktionsraten und Schaltfaktoren, ermittelt im Fluoreszenz-Assay für oben erwähnte Klone aus der allosterischen Selektion nach Helm et al.*

Ein genauerer Vergleich von MH48 und MH23 zeigt, dass beide erstens unterschiedliche Kommunikationsmodule besitzen, sowie MH48 einen 3'-Überhang und Mutationen im Bereich von Helix 2 und des Theophyllin-Aptamer. MH23 hingegen verfügt über kein 3'-Überhang und keine Mutationen. Ein Blick auf die Reaktionsraten der beiden Sequenzen zeigt, dass in Abwesenheit von Theophyllin MH23 eine ca. 2-fach geringere Reaktionsrate als MH48 aufweist. Im Gegensatz dazu besitzt MH48 in Anwesenheit von Theophyllin eine ca. 2,5-fach höhere Reaktionsrate als MH23.
Die Frage stellte sich nun, welche der beiden Sequenzen ausgewählt werden sollte, um damit weitere Untersuchungen durchzuführen. Auch wenn der Schaltfaktor von MH48 mit 28 insgesamt höher als für MH23 mit 24 war, wurde MH23 für die folgenden Experimente ausgewählt. Dies hatte primär drei Gründe:

- erstens wies MH23 keinen 3'-Überhang auf, der nur für die reverse Transkription und anschliessende PCR-Reaktion während der Selektion notwendig war und
- zweitens besaß MH23 keine Mutationen,
- Ferner ist die Reaktionsrate in Abwesenheit von Theophyllin bei MH23 im Vergleich zu MH48 um den Faktor zwei langsamer, was prinzipiell zu bevorzugen ist.

4.1.2 Liganden-Abhängigkeit von MH23

Nachdem MH23 als Sequenz ausgewählt wurde, die weiter charakterisiert werden sollte, wurde erstmals das Verhalten gegenüber variierenden Liganden-Konzentrationen im Fluoreszenz-Assay mit linkergekoppelten Reaktanden untersucht. Es wurden Konzentrationen im Bereich von 0 µM bis maximal 1000 µM (Theophyllin-Konzentration während der vorangegangenen allosterischen *in-vitro* Selektion) eingesetzt. Die dabei ermittelten Reaktionsraten und Schaltfaktoren sind in **Tabelle 4.2** dargestellt. Die Daten zeigen eindeutig, dass sich die Reaktionsraten und Schaltfaktoren von MH23 mit zunehmender Theophyllin-Konzentration erhöhen. Eine graphische Auftragung der Reaktionsraten gegenüber der Ligandenkonzentration ist in **Abbildung 4.3** zu sehen. Es ist eindeutig ein Sättigungsverhalten zu erkennen (grüne Quadrate).

Theophyllin Konzentration (µM)	Reaktionsrate (nM/min)	Schaltfaktor
-	10	**0**
25	121	**12**
50	107	**11**
100	234	**24**
200	300	**30**
500	357	**36**
1000	714	**72**

Tabelle 4.2: *Reaktionsraten und Schaltfaktoren für Klon MH23 in Gegenwart von variierenden Konzentrationen des Liganden Theophyllin im Fluoreszenz-Assay*

Die in **Tabelle 4.3** aufgeführten Reaktionsraten und Schaltfaktoren resultieren aus der analogen Reaktion von MH23 im Fluoreszenz-Assay mit linkergekoppelten Reaktanden, allerdings mit Coffein als Ligand in Konzentrationen von 0 µM bis maximal 1000 µM. Die Reaktionsraten und Schaltfaktoren befinden sich hier über den gesamten Konzentrationsbereich auf dem Niveau der Reaktion in Gegenwart von 0 µM Theophyllin. Auch hier sind die Daten in **Abbildung 4.3** graphisch dargestellt (braune Dreiecke). Die Ausgleichsgerade verläuft hierbei parallel zur X-Achse.

Coffein-Konzentration (µM)	Reaktionsrate (nM/min)	Schaltfaktor
-	9,8	**1**
25	10,5	**1**
50	10,2	**1**
100	9,7	**1**
200	9,8	**1**
500	10,3	**1**
1000	10,1	**1**

Tabelle 4.3: *Reaktionsraten und Schaltfaktoren des Klons MH23 in Gegenwart von variierenden Konzentrationen des Liganden Coffein im Fluoreszenz-Assay*

Zusammenfassend lässt sich für die Reaktion mit linkergekoppelten Reaktanden von MH23 mit den beiden strukturell verwandten Xanthin-Derivaten Theophyllin und Coffein festhalten, dass MH23 vergleichbar dem Theophyllin-Aptamer in der Lage ist, zwi-

schen beiden Liganden zu diskriminieren. Graphisch ist dies an der unterschiedlichen Steigung der Ausgleichsgeraden in **Abbildung 4.3** zu sehen.

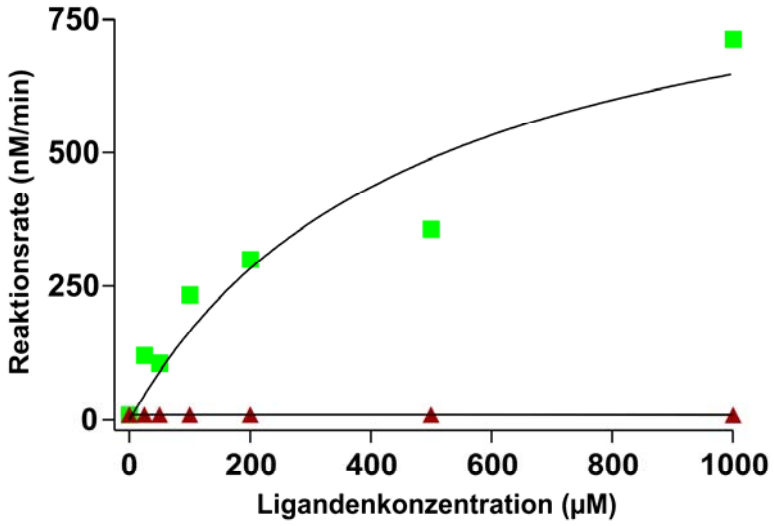


Abbildung 4.3: *Graphische Darstellung der Reaktionsraten von MH23 in Gegenwart von variierenden Konzentrationen von Theophyllin und Coffein als Liganden im Fluoreszenz-Assay(grüne Quadrate: Theophyllin, braune Dreiecke: Coffein)*

4.2 Temperaturabhängigkeit von MH23

Als Nebenbefund konnte im Fluoreszenz-Assay herausgefunden werden, dass die Reaktionsraten von MH23 in Anwesenheit von 100 µM Theophyllin von der Temperatur abhängig sind, wohingegen die Reaktion in Abwesenheit von Theophyllin auf konstantem Niveau verbleibt und MH23 somit inaktiv ist. Die über den Temperaturbereich von 15 bis 35°C ermittelten Daten sind in **Tabelle 4.4** aufgeführt.

Temperatur (°C)	Reaktionsrate mit Theophyllin (nM/min)	Reaktionsrate ohne Theophyllin (nM/min)	Schaltfaktor
15	221	9	23
20	273	10	28
25	231	9	25
30	118	9	13
35	85	9	9

Tabelle 4.4: *Reaktionsraten (nM/min) und Schaltfaktoren von MH23 in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin als Ligand unter variierenden Temperaturen im Fluoreszenz-Assay*

Es fällt auf, dass in Anwesenheit von 100 µM Theophyllin die Reaktionsrate besonders ab 30°C um die Hälfte einbricht, was somit auch den daraus resultierenden Schaltfaktor halbiert. Die graphische Auftragung der Daten aus **Tabelle 4.4** ist in **Abbildung 4.4** zu sehen. Die Reaktion in Anwesenheit von Theophyllin ist dabei durch die grünen Quadrate und die Reaktion in Abwesenheit von Theophyllin durch die braunen Dreiecke symbolisiert.

Eine Hypothese für dieses Verhalten könnte lauten, dass die Reaktionsraten in Anwesenheit von 100 µM Theophyllin im Temperaturbereich von 15 bis 25 °C deswegen höher sind, da die allosterische *in-vitro* Selektion bei diesen Temperaturen durchgeführt wurde und daher katalytisch gegenüber höheren Temperaturen bevorzugt sind.

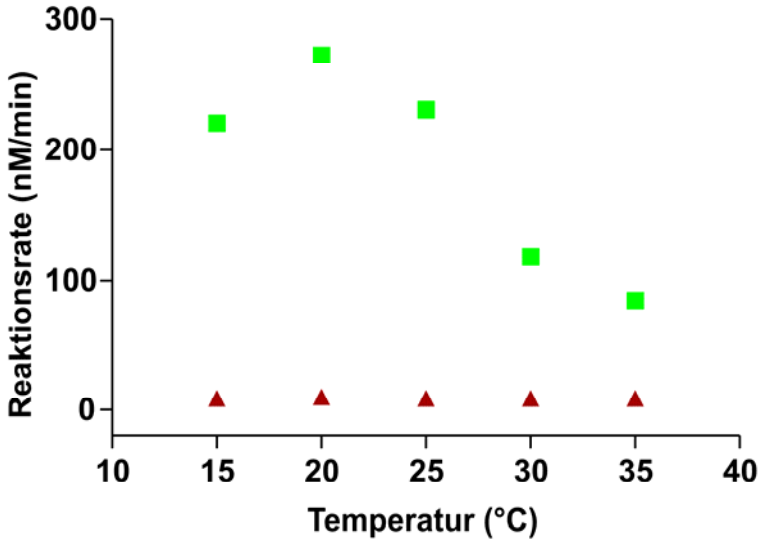


Abbildung 4.4: *Graphische Darstellung der Reaktionsraten (nM/min) von MH23 in Gegenwart von 100 µM Ligand bei variierenden Temperaturen im Fluoreszenz-Assay (grüne Quadrate: Theophyllin, braune Dreiecke: kein Theophyllin)*

4.2.1 Zusammensetzung der Reaktion mit freien Reaktanden

Nachdem MH23 im Fluoreszenz-Assay unter den Bedingungen mit linkergekoppelten Reaktanden (selbstmodifizierend) intensivst untersucht wurde, musste im Anschluss die Frage geklärt werden, ob MH23 auch in der Lage ist, eine echte Katalysereaktion mit freien Reaktanden zu vollziehen. Bei dieser Reaktion wird ein Substratüberschuss über das Ribozym eingesetzt, wie in **Tabelle 4.5** zu sehen ist.

Die Konzentrationen orientieren sich dabei für MH23 an den vorher evaluierten Bedingungen für das Diels-Alderase Minimalmotiv[200]. Es stellte sich in den ersten Experimenten heraus (nicht publiziert), dass für MH23 eine dreifach höhere Konzentration als für das Diels-Alderase Minimalmotiv gewählt werden musste, da die ansonsten erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten und/oder gebildeten Produktmengen zu gering sind. Als Analysemethoden wurden für die zeitnahe Beobachtung der Anthracenabnahme ein UV-Spektrometer (UV-Assay) oder für die Messung der gebildeten Produktmenge aus Anthracen- und Maleimid-Derivaten eine HPLC (HPLC-Assay) verwendet.

Reaktion	RNA (µM)	Theophyllin (µM)	AHEG (µM)	N-Pentyl-Maleimid (µM)
Hintergrund	0	0	100	500
Hintergrund Theophyllin	0	100	100	500
MH23	21	0	100	500
MH23 Theophyllin	21	100	100	500
49mer	7	0	100	500

Tabelle 4.5: *Zusammensetzung des HPLC-Assay zwischen RNA, AHEG, N-Pentyl-Maleimid in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin als Liganden für die Hintergrundreaktion, die Reaktion für MH23 und das 49mer Diels-Alderase Minimalmotiv*

4.2.2 UV-Spektrometrische Aktivität von MH23

Die zeitnahe Verfolgung der Anthracenabnahme in einer Ultramikroküvette (10 µl) in einem UV-Spektrometer erfolgte bei 365 nm über einen Zeitraum von 60 Minuten. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Kapitel 3.7.2 aufgeführt. Sowohl das Diels-Alderase Minimalmotiv, wie auch MH23 wurde unter identischen Bedingungen vermessen. Die in **Abbildung 4.5** dargestellten Kurven repräsentieren die folgenden Reaktionen:

(1) die Hintergrundreaktion/Negativkontrolle zwischen AHEG und N-Pentyl-Maleimid ohne Theophyllin (schwarze Kurve),

(2) die Hintergrundreaktion/Negativkontrolle zwischen AHEG, N-Pentyl-Maleimid in Anwesenheit von Theophyllin (orange Kurve),

(3) die katalysierte Reaktion/Positivkontrolle durch das Diels-Alderase Minimalmotiv zwischen AHEG und N-Pentyl-Maleimid ohne Theophyllin (blaue Kurve)

Für das Diels-Alderase Minimalmotiv konnte nach 60 Minuten eine Abnahme der Absorption von über 50 % ermittelt werden. Die Absorptionsabnahme für die Hintergrundreaktion betrug 5,37 % ohne und 6,49 % mit Theophyllin.

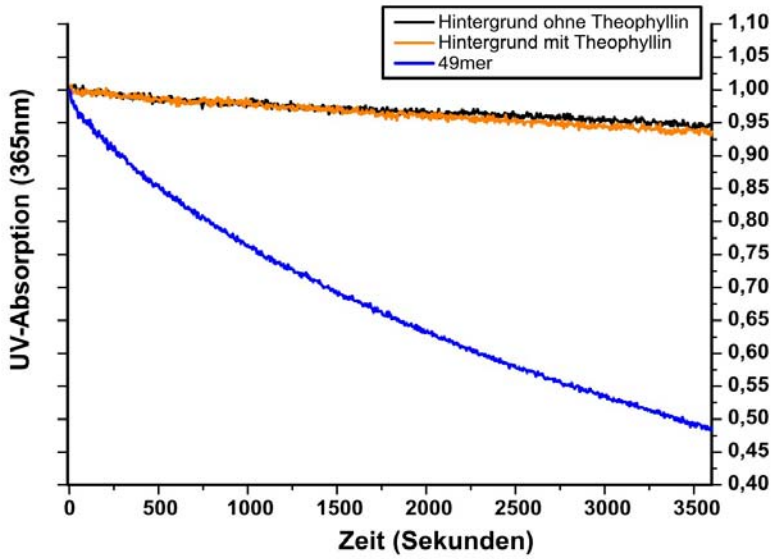


Abbildung 4.5: *Abnahme der UV-Absorption von AHEG in Gegenwart von N-Pentyl-Maleimid bei 365 nm über 60 Minuten in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin, sowie des Diels-Alderase Diels-Alderase Minimalmotivs*

In **Abbildung 4.6** sind die UV-spektrometrische Kurven von MH23 jeweils in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin, sowie zusätzlich die entsprechenden Hintergrundreaktionen ohne RNA dargestellt. Die Theophyllin-Konzentration betrug 100 µM. In Abwesenheit von Theophyllin nimmt die Absorption um 8,68 % unter MH23 ab, in Anwesenheit von Theophyllin um 23,66 %. Die Umsatzraten für die Hintergrundreaktionen liegen mit 5,37 % in Ab- und 6,49 % in Anwesenheit von Theophyllin auf gleichem Niveau wie oben gemessen.

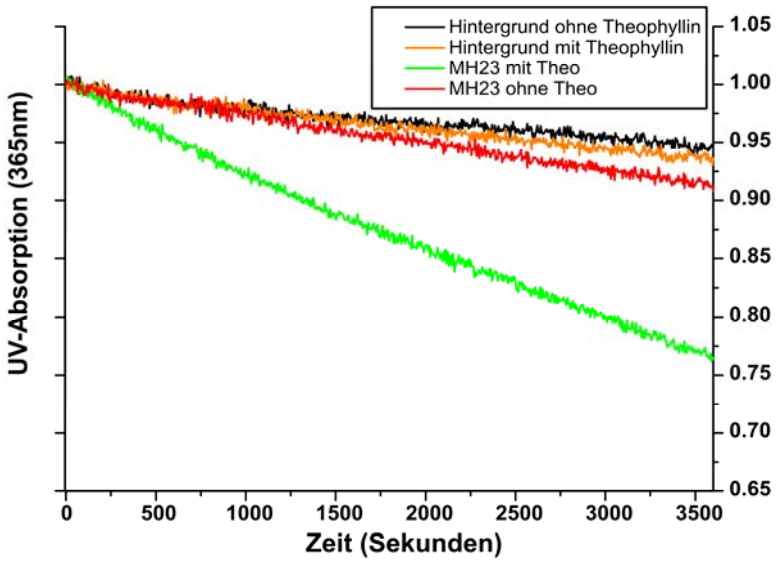


Abbildung 4.6: *Abnahme der UV-Absorption von AHEG in Gegenwart von N-Pentyl-Maleimid bei 365 nm über 60 Minuten in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin, sowie von MH23 in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin*

Die anschliessende Auswertung der oben aufgeführten Kurven zeigt, dass die absolute Aktivität von MH23 in Anwesenheit von Theophyllin um mehr als die Hälfte geringer als für das Diels-Alderase Minimalmotiv ist. Ferner liegt die Reaktion von MH23 in Abwesenheit von Theophyllin leicht über der Hintergrundreaktion/Negativkontrolle ohne Ribozym. Schon aus den Rohdaten für MH23 ergibt sich ein Schaltfaktor von über 2,5. Nach Korrektur um die unkatalysierten Hintergrundreaktionen/Negativkontrollen in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin erhöht sich dieser auf mehr als 5. Die Rohdaten, sowie der korrigierte Schaltfaktor sind in **Tabelle 4.6** aufgeführt.

Reaktion	Absorptions-abnahme (%)	Reaktionsrate (nM/min)	Schaltfaktor (korrigiert)
Hintergrund	5,4	90	---
Hintergrund Theophyllin	6,5	108	---
MH23	8,7	145	**5**
MH23 Theophyllin	23,7	395	
49mer	51,5	858	---

Tabelle 4.6: *Tabellarische Auflistung der Abnahme der UV-Absorption von AHEG in Gegenwart von N-Pentyl-Maleimid bei 365 nm über 60 Minuten in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin, sowie des Diels-Alderase Diels-Alderase Minimalmotivs und von MH23 in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin. Aus den Absorptionsabnahmen über 60 Minuten konnten die Reaktionsraten in pmol/min ermittelt werden. Der Schaltfaktor für MH23 wurde nach Subtraktion der Hintergrundreaktion in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin ermittelt*

Es konnte im UV-Spektrometrischen Assay (UV-Assay) gezeigt werden, dass erstens MH23 auch unter den Bedingungen der echten Katalyse, also mit freien Reaktanden aktiv ist. Zusätzlich wies MH23 eine unterschiedliche Aktivität in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin auf, zeigte somit eindeutig allosterisches Verhalten. Der sich daraus ergebende Schaltfaktor lag nach Korrektur um die unkatalysierten Hintergrundreaktionen bei 5.

4.2.3 HPLC-Assay von MH23

Wie bereits unter Kapitel 4.2.1 aufgeführt, ist es auch möglich, die Produktbildung zwischen Anthracen und Maleimid, katalysiert durch das Diels-Alderase Minimalmotiv, zu detektieren. Hierbei werden sämtliche Substrate im Überschuss gegenüber dem Katalysator RNA in einem Reaktionsgefäss über einen definierten Zeitraum inkubiert. Nach Zerstören des Überschusses an Maleimidsubstrates durch Mercaptoethanol wird die Reaktionsmischung per HPLC-Chromatographie aufgetrennt und die Produktbildung quantifiziert. Die genaue Durchführung des Experiments ist Kapitel 3.7.3 zu finden.
Bevor jedoch die Experimente mit dem Diels-Alderase Minimalmotiv und auch MH23 durchgeführt werden konnten, musste eine Kalibrierkurve des chemisch synthetisierten

Diels-Alder Produktes zwischen AHEG und N-Pentyl-Maleimid erstellt werden. Die dabei ermittelten Peakflächen nach Integration sind in **Abbildung 4.7** dargestellt. Das Produkt wurde mittels organischer Synthese gewonnen, aufgereinigt und in Stoffmengen von 12,5 bis 4800 pmol auf die HPLC injiziert. Die dabei ermittelten Peakflächen wurden in zu einer Kalibriergerade aufgetragen, welche der Produktquantifizierung in den nachfolgenden Experimenten diente.

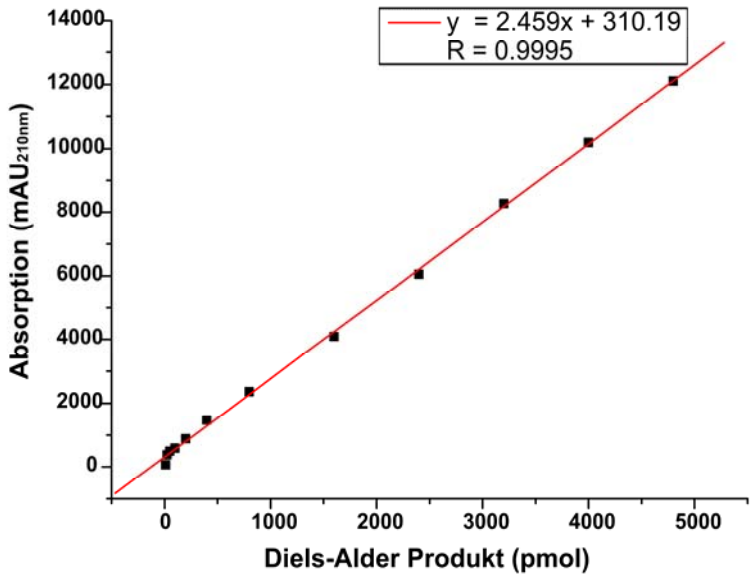


Abbildung 4.7: *Kalibriergerade, dargestellt für das chemisch-synthetisch hergestellte Diels-Alder Produkt zwischen AHEG und N-Pentyl-Maleimid mit variierenden Stoffmengen von 12,5 bis 4800 pmol und Detektion bei 210nm in mAU. Die Regressionsgerade ist in rot dargestellt (Geradengleichung: y = 2,459x + 310,19)*

In **Abbildung 4.8** ist ein HPLC-Chromatogramm von einer oben beschriebenen Reaktion des Diels-Alderase Minimalmotives samt korrespondierender Hintergrundreaktionen/Negativkontrolle dargestellt. Der Produktpeak der drei Reaktionen ist jeweils mit einem farbigen Punkt gekennzeichnet und wurde standardmässig nach 18 Minuten Elutionszeit bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert. Wie beim vorangegangenen UV-Assay erkennt man auch hier die geringe Aktivität der unkatalysierten Hintergrundreaktion, verglichen mit dem Diels-Alderase Minimalmotiv.

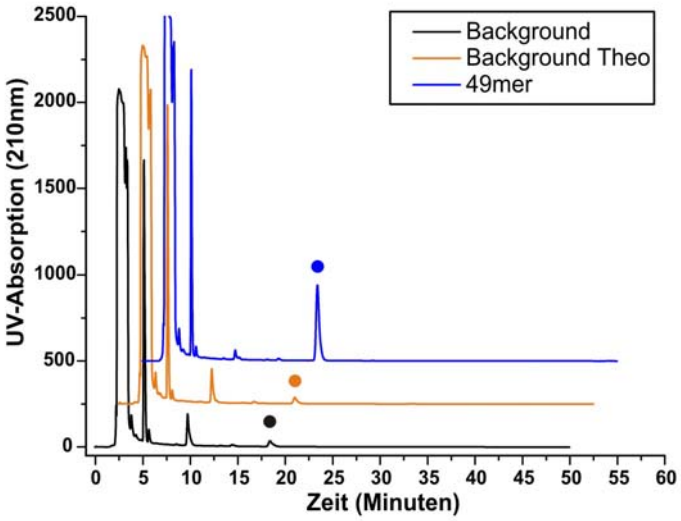


Abbildung 4.8: *HPLC-Chromatogramm zur Detektion des bei der Reaktion zwischen AHEG und N-Pentyl-Maleimid in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin und dem 49mer Diels-Alderase Minimalmotiv nach 60 Minuten Reaktionszeit gebildeten Produktes bei 210 nm. Der Produktpeak ist durch einen farbigen Punkt markiert.*

Die entsprechenden Reaktionen für MH23 samt Hintergrundreaktionen sind in **Abbildung 4.** aufgeführt. Auch hier sind die Produktpeaks mit farbigen Punkten gekennzeichnet. Ein erster Blick auf die Peakfläche zeigt, dass sich MH23 auch unter diesen Reaktionsbedingungen recht ähnlich wie im UV-Assay verhält: die Reaktion von MH23 in Abwesenheit von Theophyllin weist eine grössere Peakfläche als die beiden unkatalysierten Hintergrundreaktion auf. Für die Reaktion von MH23 in Anwesenheit von Theophyllin ist wiederum eine noch grössere Peakfläche zu beobachten.

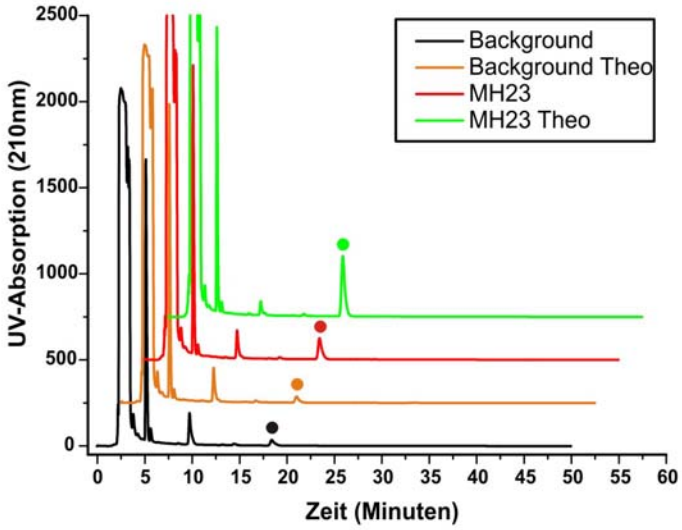


Abbildung 4.9: *HPLC-Chromatogramm zur Detektion des bei der Reaktion zwischen AHEG und N-Pentyl-Maleimid in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin und Klon MH23 in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin nach 60 Minuten Reaktionszeit gebildeten Produktes bei 210 nm. Der Produktpeak ist durch einen farbigen Punkt markiert.*

In **Tabelle 4.7** sind die Produkt-Peakflächen aus den oben beschriebenen HPLC-Assay Reaktionen (mAU bei 210 nm Wellenlänge) nach 60 Minuten Reaktionszeit und anschliessender Auswertung durch die Standardsoftware der Agilent ChemStation aufgeführt (siehe dritte Spalte). Anhand der Kalibriergleichung (y = 2,459x + 310,19) aus **Abbildung 4.7** konnten diese Daten in die entsprechenden Produktmengen an Diels-Alder Produkt in pmol (siehe vierte Spalte), sowie die entsprechenden Reaktionsraten in nM/min (siehe fünfte Spalte) umgerechnet werden. Als Schaltfaktor für MH23 ergab sich aus der einfachen Division der Reaktionsraten in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin ein Schaltfaktor von über 2,5. Nach Korrektur der Reaktionsraten von MH23 in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin durch die korrespondierenden Werte für die unkatalysierten Hintergrundreaktionen ergab sich ein Schaltfaktor von 3 nach 60 Minuten Reaktionszeit (siehe Spalte sechs).

Reaktion	Reaktionszeit (min)	mAU (210 nm)	Diels-Alder Produkt (pmol)	Reaktionsrate (nM/min)	Schaltfaktor (korrigiert)
Hintergrund	60	974	270	64	---
Hintergrund Theophyllin	60	983	273	65	---
MH23	60	3534	1311	312	**3**
MH23 Theophyllin	60	8871	3481	829	
49mer	60	10547	4163	991	---

Tabelle 4.7: *Reaktionsraten (nM/min) und Schaltfaktoren nach 60 Minuten für MH23, ermittelt nach Auftrennung des Produktpeaks und Auswertung der Produktmenge mittels Kalibrierkurve und Regressionsgrade*

In **Tabelle 4.8** sind Peakflächen (mAU bei 210 nm) für die ersten 5 % des Gesamt-Produktumsatzes der oben bereits erwähnten Reaktionen aufgeführt (siehe Spalte zwei). Auch hier erfolgte die Umrechnung der Peakflächen anhand der Kalibriergerade aus **Abbildung 4.7** in die korrespondierenden Diels-Alder Produktmengen in pmol (siehe Spalte zwei). Die für die unterschiedlichen Reaktionen gemessenen Reaktionszeiten für die ersten 5 % des Gesamt-Produktumsatzes sind in Spalte vier dargestellt. Die daraus ermittelten Reaktionsraten in nM/min sind in Spalte fünf aufgeführt. Der Schaltfaktor für MH23 aus den Rohdaten lag bei 6,5. Die Korrektur um die jeweiligen Hintergrund-reaktionen ergab einen Schaltfaktor von 8 für die ersten 5 % des Gesamt-Produktumsatzes.

Reaktion	mAU (210 nm)	Diels-Alder Produkt (pmol / %)	Reaktionszeit (std:min:sec)	Reaktionsrate (nM/min)	Schaltfaktor (korrigiert)
Hintergrund	1216	352 / 5,3	01:13:01	69	---
Hintergrund Theophyllin	1216	352 / 5,3	01:12:42	69	---
MH23	1252	375 / 5,6	00:16:43	320	**8**
MH23 Theophyllin	1201	363 / 5,4	00:02:31	2063	
49mer	1313	392 / 5,8	00:00:45	7466	---

Tabelle 4.8: *Reaktionsraten und Schaltfaktoren der ersten 5% Umsatz für MH23, ermittelt nach Auftrennung des Produktpeaks und Auswertung der Produktmenge mittels Kalibrierkurve und Regressionsgrade*

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass MH23 unter den Bedingungen der selbstmodifizierenden, linkergekoppelten Reaktion und unter echter Katalyse mit freien Reaktanden katalytisch aktiv ist. In beiden Reaktionsformaten konnte für MH23 ein allosterisches Verhalten gegenüber Theophyllin gezeigt werden. Eine Diskriminierung gegenüber dem strukturell verwandten Xanthin-Derivat Coffein ist bei der linkergekoppelten Reaktion beobachtet worden, für die Reaktion mit freien Reaktanden wurde dies experimentell nicht untersucht. Generell waren die erhaltenen Schaltfaktoren von MH23 für die linkergekoppelte Reaktion höher als für die echte katalytische Reaktion mit freien Reaktanden. Die katalytische und allosterische Aktivität von MH23 konnte insgesamt durch drei verschiedene analytische Methoden demonstriert werden.

4.3 *In vitro* Selektion allosterischer Diels-Alderase-Ribozyme

4.3.1 Basis und Entwicklung der Selektion

Die erste *in-vitro* Selektion auf allosterisch regulierte Diels-Alderase-Ribozyme wurde im Arbeitskreis Jäschke durch Dr. Mark Helm durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Selektion, sowie die umfassende Charakterisierung der daraus stammenden „Winner-Sequenz“ MH23 gegenüber dem Liganden Theophyllin in zwei verschiedenen Reaktionsformaten wurde im Jahre 2005 publiziert[206].
Obwohl MH23 sowohl für die linkergekoppelte Reaktion, wie auch für die Reaktion mit freien Reaktanden allosterisches Verhalten aufweist, ist die Reaktion in Abwesenheit von Theophyllin verglichen mit der unkatalysierten Hintergrundreaktion relativ hoch. Erklären könnte man dies damit, dass während der Selektion nicht genug konstitutiv aktive Spezies aus der RNA-Bibliothek entfernt werden konnten, deren katalytische Aktivität unabhängig von Theophyllin ist. Aus diesem Grund sollte ein verbessertes Selektionsschema eine umfangreiche Gegenselektion beinhalten, die RNA-Spezies mit einer Diels-Alderase Aktivität unabhängig von Theophyllin entfernen kann.
Basierend auf dieser Annahme konnten insgesamt zwei Bibliotheken entworfen werden, bei denen das Theophyllin-Aptamer jeweils mit Helix 1 oder mit Helix 3 eines Diels-Alderase Ribozyms verknüpft war. Die Bibliotheken wurden von der Firma NOXXON per Festphasensynthese hergestellt entschützt ausgeliefert.

4.3.2 Die RNA-Bibliotheken H-I und H-III

In **Abbildung 4.10** ist die erste neu konstruierte RNA-Bibliothek, H-I dargestellt. Bei dieser Bibliothek wurde das Theophyllin-Aptamer im Gegensatz zu der Bibliothek von Dr. Mark Helm über Helix 1 mit dem Diels-Alderase Ribozym der verknüpft. Die doppelsträngige Helix, die beide Domänen verbindet, besteht vom 5’-Ende aus gesehen aus einem Tetranukleotid ”GGAG” der Diels-Alderase, gefolgt von den fünf Basen ”GGAUG”. Die Basenfolge ”GGAUG”ist dem universellen Kommunikationsmodul von Kertsburg *et al.*[162] entnommen. Es schliesst sich das Theophyllin-Aptamer mit

den für die Bindung des Liganden essentiellen Nukleotiden ”AUACCA” an. Diesem Basen-Sextett in Helix 1 liegen in der RNA-Bibliothek randomisierte Nukleotide gegenüber und ersetzen somit die im Theophyllin-Aptamer ursprünglich vorhandene Basenfolge ”GGCAG”, welche ebenfalls für die Bindung essentiell ist[93, 118, 119, 213]. Der randomisierte Bereich ist insgesamt 8-10 Nukleotide lang, zieht sich somit über die gesamte Länge der ursprünglichen Helix 1 und schliesst, wie oben beschrieben, essentielle Nukleotide des Aptamers mit ein. Der Grund, dass wir den randomisierten Bereich auf die Aptamerkomponente ausgedehnt haben, lag in der Tatsache begründet, dass wir RNA-Spezies in der ursprünglichen Bibliothek haben wollten, die in Abwesenheit von Theophyllin keinerlei Diels-Alderase Aktivität aufweisen. Die Komplexität der Bibliothek umfasste insgesamt über 1 Million verschiedene Sequenzen. Es ist zu erwähnen, dass die Sekundärstruktur in **Abbildung 4.10** experimentell nicht bewiesen ist und von uns auf Basis der verifizierten Strukturen des Diels-Alderase Ribozyms und des Theophyllin-Aptamer angenommen wurde.

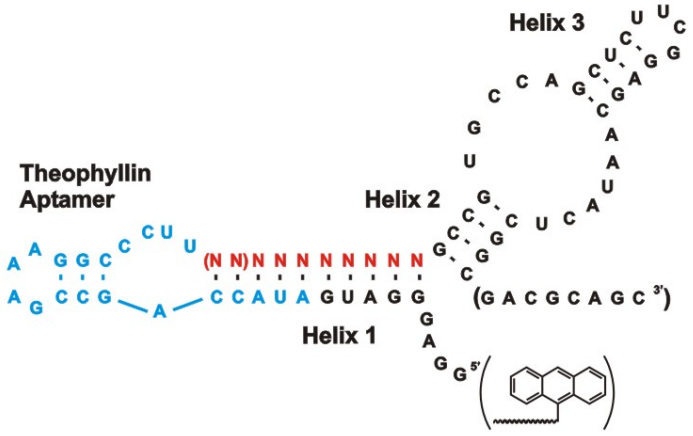


Abbildung 4.10: *Vermeintliche Sekundärstruktur der RNA-Bibliothek H-I. Die Nukleotide des Theophyllin-Aptamer sind blau, des Kommunikationsmodules rot dargestellt. Der flexible Linker mit kovalent verbundenem Anthracen, sowie der Überhang von acht Nukleotiden am 3’-Ende sind in Klammern dargestellt.*

In **Abbildung 4.11** ist die zwite RNA-Bibliothek, H-III aufgeführt. Strukturell ähnelt diese Bibliothek der zuvor von Dr. Mark Helm selektierten, da auch hier das Theophyllin-Aptamer über Helix 3 an das Diels-Alderase Ribozym über einen doppelsträngigen, randomisierten helikalen Bereich verknüpft ist. Ähnlich zu Bibliothek H-I haben wir den randomisierten Bereich hier auch auf die Aptamer-Komponente

ausgeweitet, um RNA-Spezies zu generieren, die in Abwesenheit des Liganden Theophyllin keine Diels-Alderase Aktivität aufweisen. Zusätzlich wurden auch noch in die beiden internen Schlaufen (Bulge 1 und 2) Ribozym-Komponente mit in den randomisierte Bereich eingeschlossen. Die Komplexität dieser Bibliothek umfasste insgesamt $2{,}68*10^8$ verschiedene Sequenzen. Auch hier gilt: die Sekundärstruktur der RNA-Bibliothek in **Abbildung 4.11** ist experimentell nicht bewiesen worden und stellt lediglich eine Vermutung aufgrund der bekannten Sekundärstrukturen von Ribozym- und Aptamer-Komponente dar.

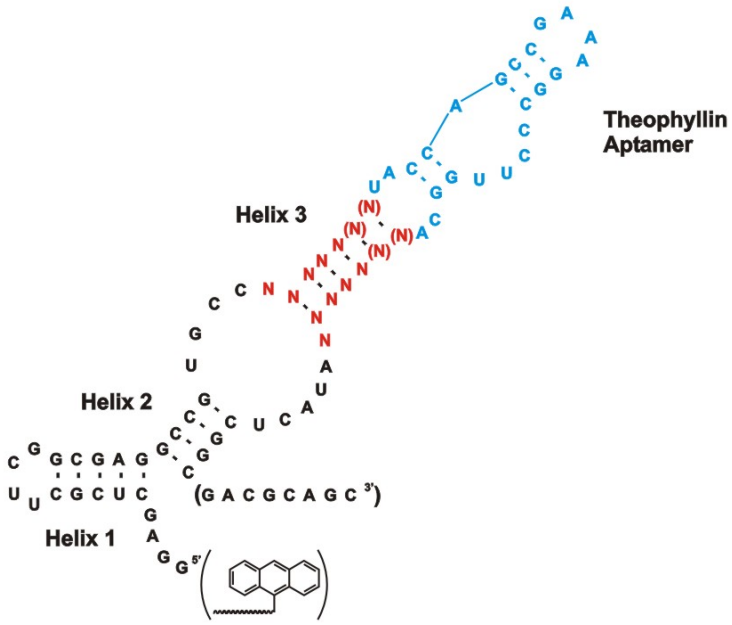


Abbildung 4.11: *Vermeintliche Sekundärstruktur der RNA-Bibliothek H-II. Die Nukleotide des Theophyllin-Aptamer sind blau, des Kommunikationsmodules rot dargestellt. Der flexible Linker mit kovalent verbundenem Anthracen, sowie der Überhang von acht Nukleotiden am 3'-Ende sind in Klammern dargestellt.*

4.3.3 Fluoreszenzmessung der RNA-Bibliotheken vor allosterischer Selektion

Bevor die beiden neu konstruierten RNA-Bibliotheken einer allosterischen *in-vitro* Selektion unterzogen wurden, bot es sich an, das Verhalten dieser Ursprungsbibliotheken gegenüber dem Liganden Theophyllin mittels Fluoreszenz-Assay unter selbstmodifizierenden Bedingungen zu charakterisieren. Die dabei verwendeten Reaktionsbedingungen waren identisch zur Charakterisierung von MH23 mit einer Ribozymkonzentration von

2,5 µM, 5x-DA Puffer, 100 µM Theophyllin und 25 µM Biotin-Maleimid, gemessen über einen Zeitraum von 60 Minuten. Die genauen Messbedingungen sind unter Kapitel 3.7.1 aufgeführt. Die linke Kurve in **Abbildung 4.12** zeigt eine Fluoreszenzkurve von RNA-Bibliothek H-I vor der eigentlichen allosterischen *in-vitro* Selektion. Es fällt auf, dass die Anwesenheit von Theophyllin keinen Einfluss auf die Fluoreszenzaktivität hat. Die Kurvenverläufe sind in Ab- und Anwesenheit des Liganden nahezu deckungsgleich. Auch ist keine drastische Abnahme der Fluoreszenz zu sehen. Der Gesamtumsatz, gemessen in Fluoreszenzabnahme liegt nach 60 Minuten bei rund 25 %. Dies bedeutet, dass die Ursprungsbibliothek eine definierte Diels-Alderase Aktivität aufweist. Eine Hauptaufgabe der folgenden Selektion ist es somit, diese konstitutiv aktiven, aber Theophyllin-unabhängigen RNA-Spezies schrittweise aus der Bibliothek zu entfernen und Theophyllin-abhängige Spezies anzureichern. Schaut man sich den Umsatz von Bibliothek H-I über die ersten 500 Sekunden in der rechten Kurve an, so fällt auf, dass nach dieser Zeit bereits mehr als 10 % an Produkt umgesetzt worden sind. Nach ca. 350 Sekunden werden genau die ersten 10 % verzeichnet, was einer Reaktionsrate von 43 nM/min entspricht.

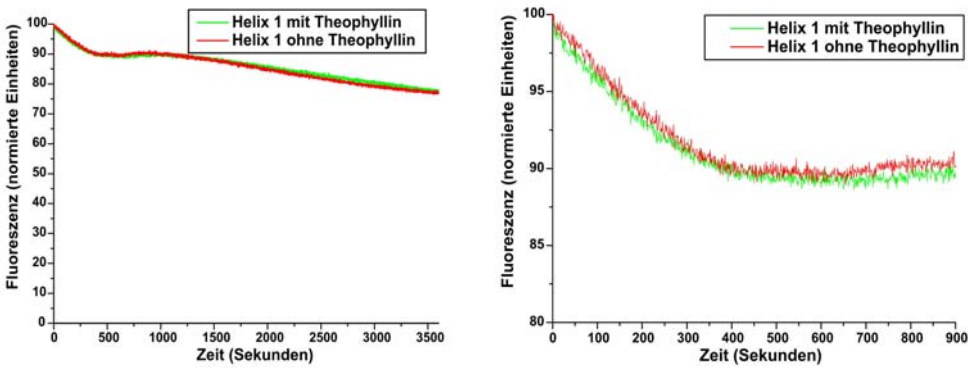


Abbildung 4.12: *Fluoreszenzkurve der RNA-Bibliothek Helix 1 vor allosterischer Selektion in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin. Linke Kurve: 60 Minuten, rechte Kurve: 900 Sekunden.*

Ein identisches Experiment wurde ebenfalls mit der zweiten RNA-Bibliothek, H-III vor der eigentlichen Selektion durchgeführt. Die linke Kurve in **Abbildung 4.13** zeigt den Verlauf dieser Fluoreszenzmessung über einen Zeitraum von 60 Minuten bei ebenfalls identischen Reaktionsbedingungen. Auch hier ist wie bei RNA-Bibliothek H-I kein Unterschied in Ab- oder Anwesenheit von Theophyllin zu erkennen, die Kurven sind auch hier nahezu deckungsgleich. Nach 60 Minuten Reaktionszeit war eine Fluoreszenzabnahme von 20 % zu verzeichnen, was daraufhin deutet, dass auch diese Bibliothek im „unselektierten" Zustand RNA-Spezies enthält, die zwar konstitutiv aktiv sind, aber Theophyllin-unabhängig. Auch hier sollte das primäre Ziel der Selektion sein, diese Sequenzen aus der Bibliothek zu entfernen und in einem zweiten Schritt die Theophyllin-abhängigen anzureichern.
Ein detaillierter Blick auf die ersten 500 Sekunden in der rechten Kurve obiger Reaktion zeigt, dass auch hier wie bei Bibliothek H-I die ersten 10 % des Gesamtumsatzes bereits nach 350 Sekunden erreicht sind. Die Reaktionsrate liegt hier ebenfalls bei 43 nM/min.

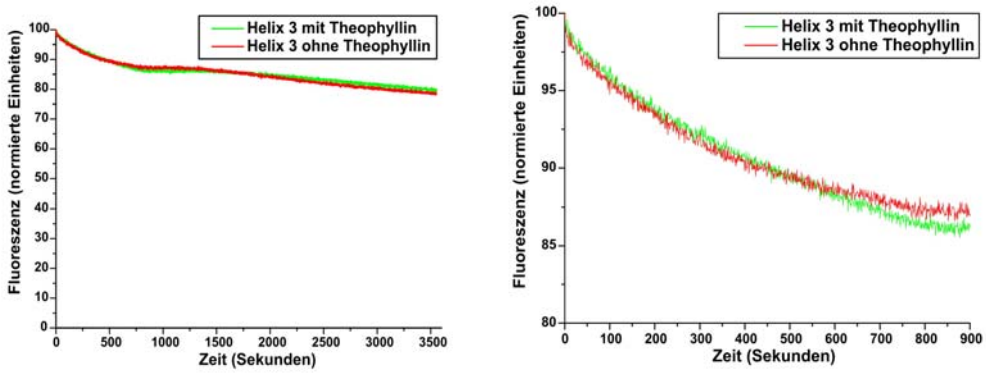


Abbildung 4.13: *Fluoreszenzkurve der RNA-Bibliothek H-III vor allosterischer Selektion in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin. Linke Kurve: 60 Minuten, rechte Kurve: 900 Sekunden.*

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die beiden neu konstruierten RNA-Bibliotheken, H-I und H-III jeweils eine konstitutiv vorhandene Diels-Alderase Aktivität haben, die allerdings in beiden Fällen Theophyllin-unabhängig ist. Ziel für die folgende Selektion beider Bibliotheken sollte somit sein, diese RNA-Spezies zuerst aus der Bibliothek zu entfernen und in einem zweiten Schritt die Theophyllin-abhängigen Spezies anzureichern.

4.3.4 Selektionsschema Negativselektion

Die allosterische *in-vitro* Selektion, durchgeführt von Dr. Mark Helm gliedert sich in zwei aufeinander folgende Schritte: eine Negativselektion und eine anschliessende Positivselektion. Die Negativselektion hat die Aufgabe, quantitativ möglichst alle konstitutiv aktiven RNA-Spezies zu entfernen. Da dieser Schritt in Abwesenheit von Theophyllin erfolgt, sollten somit alle Theophyllin-unabhängigen Spezies entfernt werden. Bei der anschliessenden Positivselektion werden in Gegenwart von Theophyllin alle reagierenden Spezies mit einer Ankergruppe versehen, über welche Sie anschliessend isoliert werden können.

In **Abbildung 4.14** ist die Durchführung der Negativselektion dargestellt. Die nach Umschreiben aus der einzel- und doppelsträngigen DNA-Bibliothek erhaltene einzelsträngige, mit Anthracen versehene RNA-Bibliothek wird in einem ersten Schritt in Abwesenheit von Theophyllin direkt mit Biotin-Maleimid inkubiert. Die dabei aktiven und somit Theophyllin-unabhängigen RNA-Spezies werden in einem anschliessenden Immobilisierungsschritt auf Streptavidin-Agarose aus der RNA-Bibliothek entfernt. Die dabei nicht reagierten RNA-Spezies verbleiben in der RNA-Bibliothek und durch Fällung mit Ethanol, anschliessender Fällung und Renaturierung wieder einer weiteren Runde Negativselektion unterworfen. Diese Schritte wiederholen sich, bis der immobilisierte Anteil unter 1 % liegt. Dann werden die verbliebenen RNA-Spezies in den zweiten Schritt, der sogenannten Positivselektion überführt. Eine detaillierte Durchführung dieses Selektionsschrittes ist in Kapitel 3.6 vorhanden.

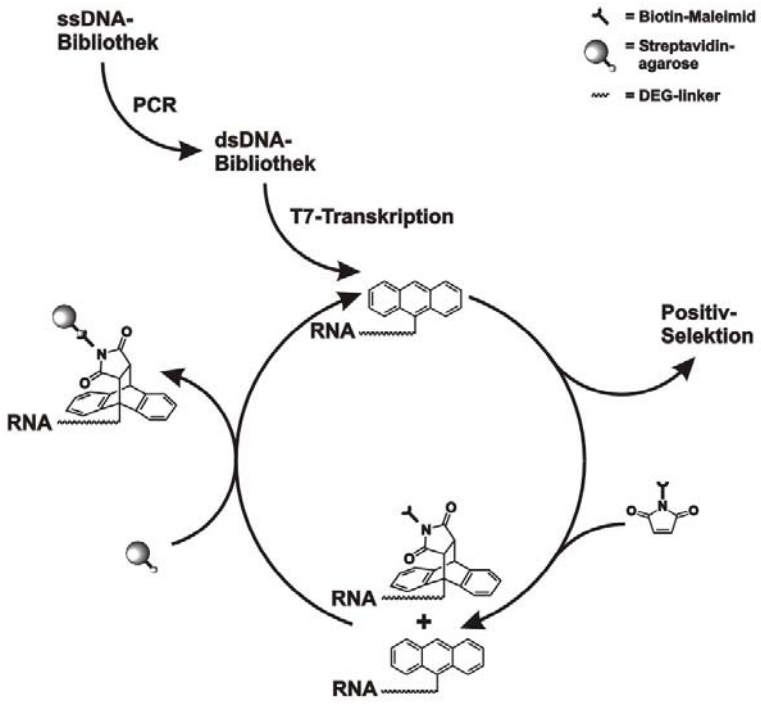


Abbildung 4.14: *Reaktionsschema für die Negativselektion. Nach Umschreiben der einzelsträngigen DNA-Bibliothek in die komplementäre RNA-Bibliothek werden in Abwesenheit von Theophyllin reagierende Spezies durch Inkubation mit Biotin-Maleimid und anschliessende Immobilisierung auf Streptavidin-Agarose aus der Bibliothek entfernt. Die Reaktion wird wiederholt, bis weniger als 1% aktive Spezies vorhanden sind. Die verbliebenen Spezies werden einer Positivselektion unterworfen.*

4.3.5 Selektionsschema Positivselektion

Bei der in **Abbildung 4.15** dargestellten Positivselektion werden die nicht aus der Bibliothek entfernten RNA-Spezies zuerst noch einmal in Abwesenheit von Theophyllin mit einem Maleimid-Derivat inkubiert. In diesem Fall handelt es sich um N-Pentyl-Maleimid, welches keine Ankergruppe trägt. Nach Entfernen des Überschusses an N-Pentyl-Maleimid aus dem Reaktionsgemisch mittels Ether-Extraktion wird nun in Anwesenheit von 1 mM Theophyllin wiederum mit Biotin-Maleimid inkubiert. Eine anschliessende Immobilisierung und Amplifikation der gebunden RNA-Spezies mittels RT-PCR schliesst sich an. Auch hierfür findet sich eine detaillierte Versuchsdurchführung unter Kapitel 3.6.

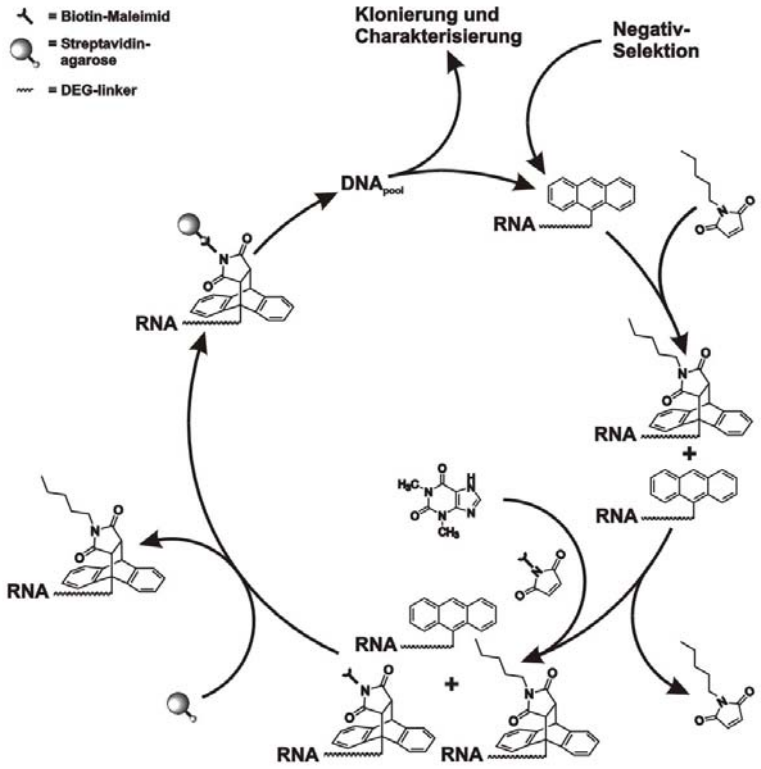


Abbildung 4.15: *Reaktionsschema für die Positivselektion. Die RNA-Spezies der Negativselektion werden in Abwesenheit von Theophyllin mit N-Pentyl-Maleimid inkubiert und anschliessend in Anwesenheit von Theophyllin mit Biotin-Maleimid inkubiert und auf Streptavidin-Agarose immobilisiert. Eine Reverse Transkription und Amplifizierung schliesst sich an.*

4.3.6 Immobilisierungsprofil der Selektion

Um die Menge an immobilisierten Spezies während der gesamten Selektion verfolgen zu können, wurden die beiden RNA-Bibliotheken jeweils am Beginn jeder Selektionsrunde radioaktiv markiert (T7-Transkription in Gegenwart von ^{32}P-CTP). Dadurch konnten die Menge an RNA-Spezies, die während der Negativ- und Positivselektion mit der Ankergruppe Biotin-Maleimid versehenen wurden, anschliessend auf Streptavidin-Agarose immobilisiert wurden durch deren relativen Anteil an der jeweiligen Gesamtradioaktivität prozentual quantifiziert werden. Die Menge an immobilisierten RNA-Spezies, sowohl in der Negativ- wie auch in der Positivselektion kann somit als ein Marker für den Selektionsverlauf angesehen werden.

Das daraus resultierende Immobilisierungsprofil ist für die RNA-Bibliothek H-I in **Abbildung 4.16** dargestellt. Die rot dargestellten Balken, welche sich unterhalb der X-

Achse befinden, stellen die immobilisierte RNA-Menge dar, welche durch die Negativselektion in Abwesenheit von Theophyllin aus der Bibliothek entfernt wurde. Diese Werte repräsentieren somit das Maß an Abreicherung der RNA-Bibliothek an konstitutiv aktiven RNA-Spezies

Die grünen Balken oberhalb der X-Achse markieren die immobilisierte RNA-Menge während der Positivselektion, welche in Anwesenheit von Theophyllin auf der Streptavidin-Agarose immobilisiert werden konnte. Diese Werte können somit als ein Maß für die Anreicherung an Theophyllin-abhängigen RNA-Spezies in der Bibliothek gesehen werden. Die sich nach diesem Schritt auf der Streptavidin-Agarose befindenden RNA-Spezies wurden anschliessend revers transkribiert, amplifiziert, in die korrespondierende RNA umgeschrieben und betraten die nächste Selektionsrunde.

Die Selektion dieser Bibliothek vollzog sich insgesamt über sieben Runden (Anzahl grüner Balken oberhalb der X-Achse), wobei der Anteil an immobilierten Spezies in der Negativselektion jeweils vom ersten bis zum letzten Schritt in jeder einzelnen Runde abnimmt. Für Runde eins zum Beispiel wurden im ersten Schritt 5 %, im zweiten knapp über 1% und schliesslich unter 1 % immobilisiert. Ein ähnliches Profil der Negativselektion ist auch für die Runden zwei bis sieben zu verzeichnen. Für in die der Positivselektion immobilisierten RNA-Spezies ist über die ersten sechs Selektionsrunden kein sprunghafter Anstieg zu verzeichnen. Die Menge nimmt im Gegenzug kontinuierlich von anfangs unter 1 % für die ersten beiden Runden auf bis zu über 6,5 % in Runde sieben zu. In der letzten Runde ist sogar noch ein Abfall trotz identischer Selektionsbedingungen zu verzeichnen. Das Profil dieser Selektion ist verglichen mit bekannten *in-vitro* Selektion eher untypisch, da man idealerweise einen sprunghaften Anstieg nach mehreren Runden erwarten würde. Dennoch zeigt das Selektionsprofil, dass es zu einer Anreicherung an RNA-Spezies gekommen ist, die unter dem Einfluss von Theophyllin immobilisiert wurden.

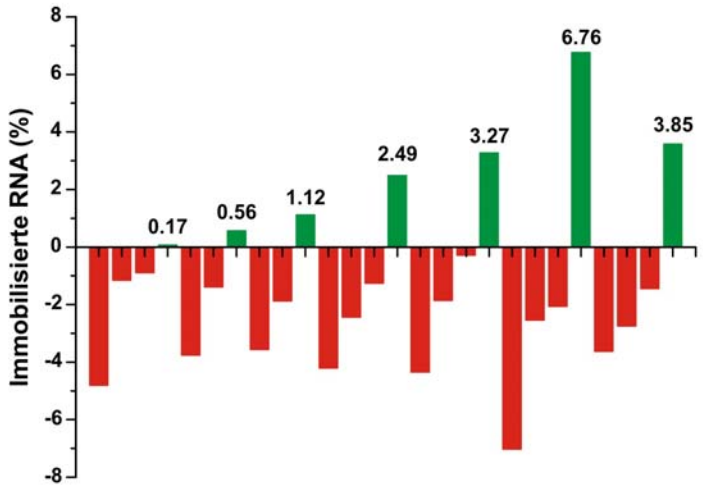


Abbildung 4.16: *Selektionsprofil der RNA-Bibliothek H-I über sieben Selektionsrunden*

Für die RNA-Bibliothek H-III wurde das identische Selektionsprotokoll wie für Bibliothek H-I angewendet. Der Verlauf der Selektion ist in **Abbildung 4.17** dargestellt. Auch hier repräsentieren die roten Balken die Menge an aus der RNA-Bibliothek entfernten Spezies und die grünen Balken die Menge an Spezies, welche in der Bibliothek angereichert wurden. Die Selektion wurde über insgesamt sechs Runden durchgeführt, wobei für die Negativselektion eine Abnahme der immobilisierten RNA-Spezies für jeden einzelnen Schritt pro Selektionsrunde zu sehen ist. Vergleicht man die Selektionsrunden untereinander, so fällt auf, dass die absolute Menge an immobilisierten Spezies für den jeweils ersten Negativselektionschritt kontinuierlich zunimmt. In Runde eins lag dieser Anteil bei ca. 1 %, steigerte sich über knapp 4 % für Runde zwei bis schliesslich auf über 6 % für Runde fünf. In Runde sechs schliesslich nahm auch dieser Anteil leicht wieder ab.

Im Gegensatz dazu weist die Positivselektion ein konstantes Profil auf, dass von 0,2 % für Runde eins bis maximal 1 % für Runde vier variiert. Auffällig ist hingegen, dass das Selektionsprofil von Bibliothek H-I überhaupt keinen Anstieg an immobilisierten RNA-Spezies zu verzeichnen hat.

Dies bedeutet, dass im Rahmen der Selektion von H-III tendenziell eher die RNA-Spezies während der Negativselektion angereichert wurden, als die Theophyllin-abhängigen Spezies in der Positivselektion.

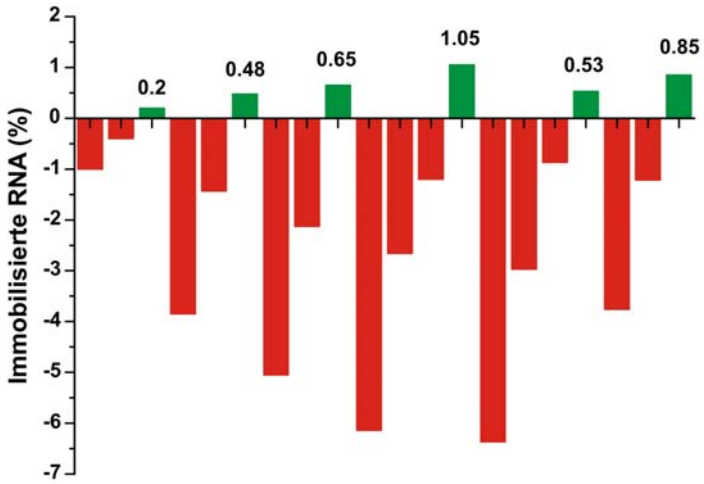


Abbildung 4.17: *Selektionsprofil der RNA-Bibliothek H-III über sechs Selektionsrunden*

Fasst man die Ergebnisse der Selektionsprofile beider RNA-Bibliotheken zusammen, so konnte nur für Bibliothek H-I eine Anreicherung an RNA-Spezies in der Positivselektion verzeichnet werden, und dies auch nur kontinuierlich und nicht, wie erwartet, sprunghaft. Bezogen auf die Abreicherung von RNA-Spezies in der Negativselektion lässt sich festhalten, dass der Anteil bei Bibliothek H-I nahezu konstant über alle Selektionsrunden war. Bei Bibliothek H-III konnte sogar ein Anstieg der RNA-Spezies über sechs Selektionsrunden beobachtet werden, die in der Negativselektion in Abwesenheit von Theophyllin aus der Bibliothek entfernt wurden.

4.3.7 Fluoreszenzmessung der RNA-Bibliotheken nach allosterischer Selektion

Um eine Aussage über das allosterische Verhalten der beiden selektierten RNA-Bibliotheken nach erfolgter Selektion machen zu können, bot es sich an, die Bibliotheken anhand des bereits etablierten Fluoreszenz-Assay zu charakterisieren. Die Messbedingungen waren analog zu den durchgeführten Messungen vor der Selektion.
In **Abbildung 4.18** ist die entsprechende Fluoreszenzkurve für RNA-Bibliothek H-I über einen Zeitraum von 60 Minuten, sowie ein vergrösserter Ausschnitt daraus dargestellt. Die Reaktion in Anwesenheit von Theophyllin ist grün, in Abwesenheit von Theophyllin rot dargestellt.

Der Verlauf der Kurve zeigt, dass ebenso wie vor der durchgeführten Selektion, dass Theophyllin keinen nennenswerten Einfluss auf die Abnahme der Fluoreszenzaktivität hat (die beiden Kurven sind nahezu deckungsgleich). Ein Vergleich des Gesamtumsatzes, gemessen an Fluoreszenzabnahme über den Messzeitraum von 60 Minuten zeigt, dass dieser mit unter 5 % sogar geringer als vor durchgeführter Selektion ist (25 %). Ein detaillierter Blick auf die ersten 10 % des Gesamtumsatzes für RNA-Bibliothek H-I nach erfolgter Selektion zeigt, dass diese auch nach 60 Minuten nicht erreicht werden (siehe auch rechte, vergrösserte Kurve).

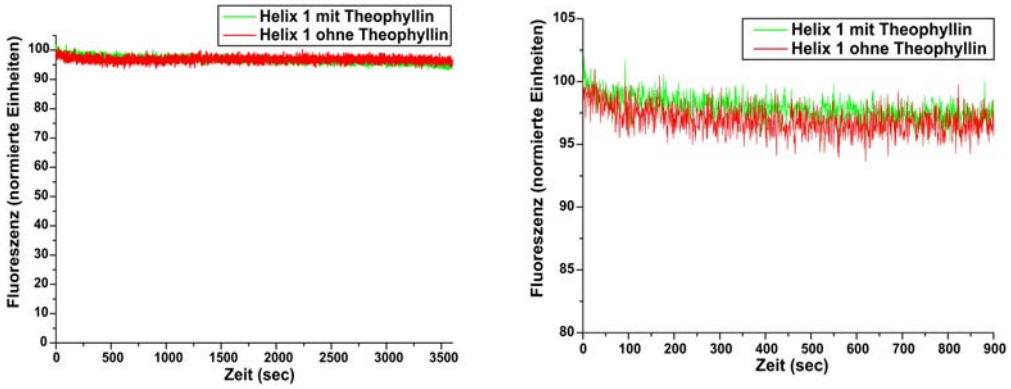


Abbildung 4.18: *Fluoreszenzkurve der RNA-Bibliothek Helix-I nach allosterischer Selektion in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin über 60 Minuten (links) und über de ersten 15 Minuten (rechts)*

In **Abbildung 4.19** ist die Fluoreszenzkurve für RNA-Bibliothek H-III nach erfolgter Selektion zu sehen. Auch hier beläuft sich der Gesamtumsatz nach 60 Minuten Reaktionszeit auf unter 5 % der anfänglichen Fluoreszenzaktivität (linke Kurve und vergrösserte, rechte Kurve), was ebenfalls weniger als vor der durchgeführten Selektion ist.

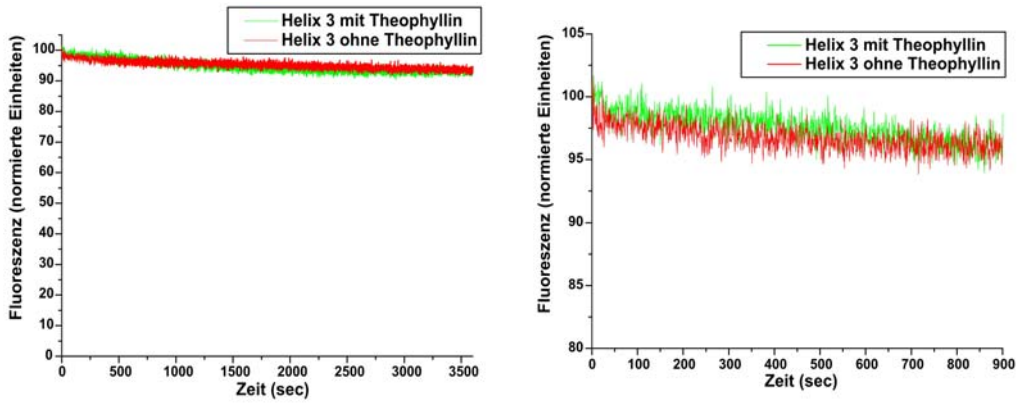


Abbildung 4.19: *Fluoreszenzkurve der RNA-Bibliothek Helix-II1 nach allosterischer Selektion in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin über 60 Minuten (links) und über de ersten 15 Minuten (rechts)*

Zusammenfassend lässt sich für beide RNA-Bibliotheken nach erfolgter Selektion und Messung der Aktivitäten im Fluoreszenz-Assay in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin sagen, dass erstens kein allosterisches Verhalten sichtbar ist - die Kurven sind nahezu deckungsgleich für die Reaktion in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin. Ferner zeigen die Fluoreszenzkurven, dass der Gesamtumsatz für beide Bibliotheken nach 60 Minuten Reaktionszeit und erfolgter Selektion geringer ist als vor durchgeführter Selektion. Für Bibliothek H-I liegt die Abnahme an katalytischer Aktivität im Vergleich vor der Selektion bei ca. 20 %, für Bibliothek H-III bei ca. 15 %. Die Reaktionsgeschwindigkeiten für die ersten 10 % des Gesamtumsatzes konnten nach Selektion im Fluoreszenz-Assay nicht bestimmt werden, da insgesamt nach 60 Minuten jeweils nur 5 % umgesetzt wurden.

Die Daten demonstrieren somit eindeutig, dass eine Abreicherung an RNA-Spezies mit konstitutiver Diels-Alderase Aktivität durch die Selektion stattgefunden hat. Leider konnte keine Anreicherung an RNA-Spezies mit Theophyllin-abhängiger Diels-Alderase Aktivität verzeichnet werden, die ein allosterisches Verhalten gegenüber dem Liganden aufweisen.

4.3.8 Immobilisierungs-Assay nach Fluoreszenzmessung

Wie oben bereits dargestellt, konnte für beide RNA-Bibliotheken nach erfolgter Selektion im Fluoreszenz-Assay kein allosterisches Verhalten gegenüber Theophyllin festgestellt werden. Für die RNA-Bibliothek H-III ist dieses Ergebnis nicht unerwartet, da während der Selektion kein Anstieg in der Positivselektion (Anwesenheit von Theophyllin) zu verzeichnen war. Etwas überraschend sind die Ergebnisse hingegen für RNA-Bibliothek H-I, da hier ein kontinuierlicher Anstieg an immobilisierten RNA-Spezies während der Selektion in der Theophyllin-abhängigen Positivselektion vorgefunden werden konnte.

Da die erhaltenen Ergebnisse für den während der Selektion durchgeführten Immobilisierungsschritt in Gegenwart von Theophyllin (Positivselektion) für Bibliothek H-I nicht mit den Ergebnissen des Fluoreszenz-Assay nach erfolgter Selektion übereinstimmen, musste dieser Widerspruch experimentell zunächst aufgeklärt werden. Es bot sich an, einem durchgeführten Fluoreszenz-Assay den Immobilisierungsschritt auf Streptavidin-Agarose folgen zu lassen. Dazu musste der Maßstab dieser Reaktion auf das während der Selektion verwandte von 50 µl erhöht werden. Die Reaktion wurden über einen Zeitraum von 60 Minuten durchgeführt und der Überschuss an Biotin-Maleimid mit ß-Mercaptoethanol gestoppt. Anschliessend wurde der komplette Inhalt aus der Fluoreszenzkuvette in ein Reaktionsgefäß überführt und die reagierten RNA-Spezies anhand des Immobilisierungs-Assay aus der erfolgten Selektion analysiert (genaue Beschreibung siehe Kapitel 3.6).

Um die dabei ermittelten Werte für beide Bibliotheken einordnen zu können, wurde das identische Experiment zunächst mit MH23 durchgeführt. In **Abbildung 4.** ist die dabei aufgenomme Fluoreszenzkurve im 50µl-Maßstab von MH23 dargestellt. Sowohl über einen Messzeitraum von 60 Minuten, wie auch über die ersten 900 Sekunden lässt sich eindeutig ein allosterisches Verhalten von MH23 gegenüber Theophyllin erkennen.

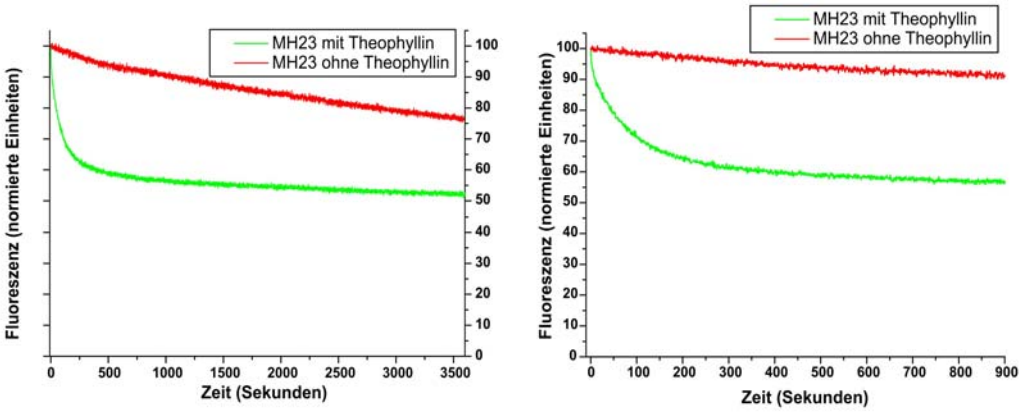


Abbildung 4.20: *Fluoreszenzkurve von MH23 in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin vor der Immobilisierung auf Streptavidin-Agarose im 50µl-Maßstab (linke Kurve: 60 Minuten, rechte Kurve: 900 Sekunden)*

Die identischen Reaktionen, ebenfalls im 50µl-Maßstab, wurden für die oben erwähnten RNA-Bibliotheken H-I und H-III nach erfolgter Selektion durchgeführt. Die dabei ermittelten Kurven wurden bereits oben in **Abbildung 4.18** dargestellt. Die Durchführung des Immobilisierungs-Assay erfolgte analog zu MH23. **Tabelle 4.9** zeigt die Ergebnisse und Reaktionsbedingungen und Ergebnisse des Immobilisierungs-Assay nach vorherigen Fluoreszenz-Assay für MH23 und die beiden RNA-Bibliotheken jeweils in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Immobilisierungsrate von MH23 in Abwesenheit von Theophyllin niedriger und in Anwesenheit von Theophyllin höher als für beide RNA-Bibliotheken ist. Der Schaltfaktor von MH23 weist demnach einen Schaltfaktor von knapp 3 auf. Interessant ist hingegen die Tatsache, dass die Immobilisierungsraten der beiden RNA-Bibliotheken H-I und H-III sehr wohl in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin unterscheiden und ein Schaltfaktor von 2,5 und 3,3 bestimmt werden konnte.

Reaktion	Reaktios-zeit (min)	RNA-A (pmol)	N-Pentyl-Maleimid (µM)	Theophyl-lin (µM)	Biotin-Maleimid (µM)	Immobilis-ierung (%)
MH23	60	50	0	0	50	**4,4**
MH23 Theophyl-lin	60	50	0	1000	50	**12,2**
Helix 1	60	50	0	0	50	**3,2**
Helix 1 Theophyl-lin	60	50	0	1000	50	**8,0**
Helix 3	60	50	0	0	50	**2,7**
Helix 3 Theophyl-lin	60	50	0	1000	50	**8,9**

Tabelle 4.9: *Reaktionsbedingungen des Immobilisierungs-Assay nach 60 Minuten Fluoreszenzmessung*

Es lässt sich festhalten, dass für MH23 sowohl im Fluoreszenz-, als auch im Immobilisierungs-Assay ein signifikanter Unterschied für die Reaktion in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin ermittelt wurde. Für die beiden RNA-Bibliotheken konnte im Fluoreszenz-Assay kein allosterisches Verhalten festegestellt werden, dafür aber im anschliessenden Immobilisierungs-Assay.

Dies bedeutet, dass das Fluoreszenz-Assay für beide RNA-Bibliotheken nicht mit der im Immobilisierungs-Assay vorhandenen allosterischen Aktivität korreliert. Eine mögliche Erklärung mag darin liegen, dass es sich im Vergleich zu MH23 bei den beiden Bibliotheken um eine Mischung aus unterschiedlichen Sequenzen handelt.

4.3.9 Kontrollexperimente Immobilisierung im Reaktionsgefäss für H-I

Um die oben dargestellten Ergebnisse zu verifizieren und weiter zu verstehen, wurde RNA-Bibliotheken H-I nochmals ohne vorangehendes Fluoreszenz-Assay im Immobilisierungs-Assay allein auf deren allosterisches Verhalten gegenüber Theophyllin überprüft. Insgesamt wurden drei unterschiedliche Experimente durchgeführt. Es wurden die

Negativselektion und Positivreaktion jeweils separat, wie auch ein Experiment mit Negativselektion und anschliessender Positivselektion durchgeführt. Die dabei zugrunde liegende RNA wurde aus der siebten und damit letzten Selektionsrunde der RNA-Bibliothek H-I entnommen. Die genauen Ergebnisse und Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 4.10** dargestellt.

Die prozentuale Immobilisierung in Ab- wie in Anwesenheit von Theophyllin zeigte im Vergleich zur Reaktion mit vorgeschaltetem Fluoreszenz-Assay leicht höhere Werte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei diesem Experiment kein Material während des Transfers der RNA aus der Fluoreszenz-Kuvette in ein Reaktionsgefäß verloren geht. Der insgesamt daraus resultierende Schaltfaktor lag bei 2,7.

Reaktion	RNA-A (pmol)	N-Pentyl-Maleimid (µM)	Theophyllin (µM)	Biotin-Maleimid (µM)	Reaktions-zeit (min)	Immobilisierung (%)
Helix 1	50	0	0	50	60	**3,8**
Helix 1 Theophyllin	50	0	1000	50	60	**10,3**
Helix 1 Theophyllin	50	50	1000	50	60	**8,3**

Tabelle 4.10: *Direkte Immobilisierung unter Selektionsbedingungen Negativ- und Positivselektion) ohne vorherige Fluoreszenzmessung von RNA-Bibliothek H-I in Ab und Anwesenheit von 1 mM Theophyllin*

Um sicherzustellen, dass es sich bei den immobilisierten RNA-Spezies auch um die mit der Biotin-Ankergruppe über das kovalent gebundene Anthracen und nicht über unspezifische Bindungen zwischen RNA und Streptavidin-Agarose handelt, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Dabei wurde exemplarisch die RNA-Bibliothek H-I zuerst in Abwesenheit des Initiatornukleotids (ADEG) transkribiert und anschliessend in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin unter den oben bereits verwendeten Bedingungen des Immobilisierungs-Assay nach Reaktion auf Streptavidin-Agarose inkubiert.

Die genauen Ergebnisse und Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 4.11** aufgeführt. Die dabei ermittelte Immobilisierungsrate (%) liegt dabei sowohl für die Reaktion in

Ab-, wie auch in Anwesenheit von Theophyllin auf Hintergrundniveau. Dies zeigt, dass das Immobilisierungs-Assay wirklich spezifisch für die kovalent mit Anthracen gebundenen RNA-Spezies ist.

Reaktion	RNA (pmol)	Theophyllin (µM)	Biotin-Maleimid (µM)	Reaktionszeit (min)	Immobilisierung (%)
Helix 1	50	0	50	60	**0,2**
Helix 1 Theophyllin	50	1000	50	60	**0,3**

Tabelle 4.11: *Reaktionsbedingungen des Immobilisierungs-Assay(ohne vorherige Fluoreszenzmessung mit RNA ohne kovalent gebundenes Anthracen (ADEG) in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Theophyllin*

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden RNA-Bibliotheken H-I und H-III nach erfolgter Selektion zwar im Fluoreszenz-Assay kein, hingegen im Immobilisierungs-Assay sehr wohl ein allosterisches Verhalten aufweisen. Sowohl die Durchführung von Fluoreszenz- mit anschliessendem Immobilisierungs-Assay, als auch das Immobilisierungs-Assay allein konnten dies bestätigen. Die dabei erzielten Schaltfaktoren liegen für beide RNA-Bibliotheken bei knapp unter 3 im Immobilisierungs-Assay.
Durch das Kontrollexperiment von RNA ohne kovalent gebundenes Anthracen mit der Ankergruppe Biotin-Maleimid und anschliessender Immobilisierung auf Streptavidin-Agarose konnte gezeigt werden, dass das Immobilisierungs-Assay insgesamt spezifisch ist. Für die Referenzexperimente mit MH23 war keine Diskrepanz zwischen Fluoreszenz- und Immobilisierungs-Assay zu beobachten.
Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen Fluoreszenz- und Immobilisierungs-Assay der beiden RNA-Bibliotheken könnte sein, dass es bei der RNA-Komponente verglichen mit MH23 mehrere unterschiedliche Sequenzen parallel vorliegen.

4.4 Klonierung und Charakterisierung

Da nach erfolgter Selektion die RNA-Bibliotheken H-I und H-III nicht eine definierte Sequenz, sondern vielmehr in Anzahl und Menge verschiedene Sequenzen aufweisen, mussten diese in einem ersten Schritt erst voneinander getrennt werden. Erst danach konnten definierte Einzelsequenzen auf deren allosterisches Verhalten untersucht werden. Dies geschah mit Hilfe der Klonierung.

Dabei wurde in einem ersten Schritt die RNA-Bibliotheken H-I und H-III nach den Selektionsrunden sieben und sechs unter Zuhilfenahme eines PCR Cloning Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Das Kit stellte alle benötigten Reagenzien bereit (siehe Kapitel 3.5.6) und es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Die Ausplattierung auf LB-Platten ließ für beide Bibliotheken ausreichend Kolonien wachsen. Von beiden Bibliotheken wurden insgesamt 50 Klone isoliert und separat in LB-Medium amplifiziert. Die Auswertung der LB-Kulturen mittels PCR-Amplifikation und zwei verschiedener Primerpaare (siehe Kapitel 3.5.7) ergab, dass nur ca. 30 % der Klone aus Bibliothek H-I überhaupt ein Insert, sprich die RNA-Bibliothek trugen. Bei Bibliothek H-III trugen sogar nur 14 % ein Insert. Insgesamt wurden die LB-Kulturen von 15 Klonen aus Bibliothek H-I und 7 Klonen aus H-III mit einem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen aufgearbeitet und sequenziert. Die anschliessende Auswertung erfolgte mit Hilfe des Clustalw Cluster Alignment-Algoritmus im Multialin-Programm[212].

Die dabei erhaltenen Ergebnisse waren jedoch insofern nicht zufriedenstellend, als das die isolierten Klone im Vergleich zu den beiden Ursprungs-Bibliotheken starke Deletionen und Insertionen aufwiesen. Auch durch mehrmaliges Klonieren mit dem identischem Kit und anschliessender Sequenzierung konnte keine Verbesserung der Ergebnisse verzeichnet werden. Aus diesem Grund wurde eine weitere Methode zur Klonierung herangezogen.

Bei dieser spezifischeren Methode wurden beide DNA-Bibliotheken erst um Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI verlängert und dann mittels der passenden Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI sequentiell verdaut. Parallel dazu wurde ein pBluescript II Phagemid Vektor der Firma Stratagene ebenfalls durch die identischen Restriktionsendonukleasen sequentiell verdaut und anschliessend

mit den Bibliotheken unter Standardbedingungen ligiert (siehe Kapitel 3.5.6). Die anschliessende Transformation und Ausplattierung ließ ausreichend Kolonien wachsen. Es wurden hierbei insgesamt ca. 100 Klone aus beiden Bibliotheken auf vorhandene Inserte der Bibliotheken mittels PCR-Amplifikation überprüft (siehe Kapitel 3.5.7). Die Auswertung ergab, dass 54 Klone aus Bibliothek H-I und 17 Klone aus Helix 3 ein Insert (DNA-Bibliothek) aufwiesen. Die Klone wurden sequenziert und ebenfalls mit dem Clustalw Cluster Alignment-Algoritmus im Multialin-Programm[212] zwecks Übereinstimmung mit der Ursprungssequenz analysiert. Von den 54 Klonen aus Bibliothek H-I konnten 17 Sequenzen mit der Ursprungssequenz in Übereinstimmung gebracht werden. Aus den 17 Klonen aus Bibliothek H-III konnten acht Sequenzen mit der Ursprungssequenz in Übereinstimmung gebracht werden. Die Sequenzen der restlichen Klone wiesen ebenfalls wieder grosse Deletionen auf, die einen Vergleich mit der Ursprungssequenz unmöglich machten.

In **Abbildung 4.21** sind die Sequenzen der 17 Klone aus Bibliothek H-I im Vergleich zur Ursprungssequenz (ganz oben in der Liste, Name: Helix1) dargestellt. Auffällig sind in erster Linie Mutationen im Bereich von Helix 2 und Helix 3, des Theophyllin-Aptamer und der kleinen internen Schlaufe (Bulge 1). Deletionen und Insertionen finden sich im Bereich des Theophyllin-Aptamer.

```
          1    5     10   15   20    25    30   35    40    45    50     55   60    65    70
          |    |     |    |    |     |     |    |     |     |     |      |    |     |     |
Helix1    GGAG GGAUG AUACCAGCCGAAA-GGCCCUU NNNNNNNNNN GCCG UGCCA GCUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
25.1      GGAG GGAUG AUACCAGCCGAAA-GGCCCUU GGAACCCUCU GCCG UGCCA GCUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
25.2      GGAG GGAUG AUACCAGCCGAAA-GGCCCUU GGAACCCUCU GCCG UGCCA GCUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
24.1      GGAG GGAUG AUACCAGCCGAAA-GGCCCUU GGAACCCUCA GCCG UACCA GCUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
7         GGAG GGAUG AUACCAGCCUAAA-GGCCCUU GGCACCCUCC GCCG UGCCA ACUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
8         GGAG GGAUG AUACCAGCCGAAA-GGCCCUU GGCAUCCUCC GCUG UGCCA GCUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
9         GGAG GGAUG AUACCAGCCGUAA-GGCCCUU GGCAUCCUCC GCUG UGCCA GCUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
6         GGAG GGAUG AUACCAGCCGAUA-GGCCCUU GGAAUCCUUC GCUG UGCCA GCUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
34        GGAG GGAUG AUACCAGCCGCAA-GGCCCUU GGCAUCCUUC GUCG UACCA GCUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
41        GGAG GGAUG AUACCAGCCGAAA-GGCCCUU GGCAUCUCUC GCCG UGCCG ACUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
11.1      GGAG GGAU- AUACCAGCCGAAA-GGCCCUU GGCACCCUCU GCCG UGCCA GCUCU--UCGGAGU AAUACU CGGC
21        GGAG GGAUG AUACCAGCCGAAAAGGCCCUU GGAACCCUCC GCCG UGCCA GUUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
48        GGAG GGAUG AUACCAGCCGAAAAGGCCCUU UCUCUCAUCA GCCG UACCA GUUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
22        GGAG GGAUG AUACCAGCCGAAA-GGCCCUU GGAACCCUCU GCCG UGCCA GCUCUCUUCGGAGC AAUACU CG-C
4         GGAG GGAUG AUACCAGCAC-----GCCCUU CGUGUCAUCU GCCG UACCA ACUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
20        GGAG GGAUG AUACCAGCCC-----GCCCUU CGUGUCAUCU GCCG UACCA ACUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
27        GGAG GGAUG AUACCAGCAC-----GCCCUU CGUGUCAUCU GUCG UACCA GCUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
40        GGAG GGAUG AUACCAGCCGAAAGG----UU GUUACCCUCU GCCG UGCCA GUUCU--UCGGAGC AAUACU CGGC
```

Abbildung 4.21: *Isolierte Klone aus Bibliothek H-I nach erfolgter Selektion. Der Aptamer-Bereich ist in blau, der Bereich des Kommunikationsmodules in rot dargestellt.*

Die Mutationen im Theophyllin-Aptamer befinden sich alle im Bereich der nichtkonservierten Nukleotide, welche in der Ursprungssequenz unterstrichen dargestellt sind und somit keinen Effekt auf die Bindung des Liganden haben sollten (Klon 4, 6, 7,

9, 27, 34). Der Bereich der konservierten und für die Bindung des Liganden Theophyllin essentiellen Nukleotide ist im Kommunikationsmodul von Position 30 bis 34 enthalten. Bei den Mutationen in Helix 2 ist jeweils ein Cytosin gegen ein Uracil ausgetauscht, was zu einer C:U Basenfehlpaarung führt (Klon 6, 8, 9, 27, 34). Bei den Mutationen in Helix 3 ist in Klon 21 und 50 ein Cytosin durch ein Uracil ausgetauscht, was zur Formierung eines G:U Wobble-Paares führt. Ferner ist in den Klonen 4, 7, 20 und 41 das Guanosin in Position 49 durch ein Adenosin ausgetauscht. Dies führt zu einer Basenfehlpaarung mit dem paarenden Cytosin (A:C) an der Schnittstelle zwischen den beiden internen Schlaufen (Bulge 1 und 2) und Helix 3. Die Folge ist sehr wahrscheinlich eine Erweiterung der internen Schleife (Bulge 1 und 2) um diese 2 Nukleotide. Im Bereich der kleinen Schleife (Bulge 1) ist jeweils ein Guanosin in Position 45 durch ein Adenosin ausgetauscht (Klon 24.1, 34, 48, 4, 20, 27). Deletionen von fünf Nukleotiden (Position 20 bis 24) im nicht-konservierten Bereich des Theophyllin-Aptamer finden sich bei den Klonen 4, 20 und 27. Deletionen, die auch den konservierten Bereich mit einschliessen (Position 24 bis 27) finden sich bei Klon 40. Insertionen von einem Adenosin (zwischen Position 22 und 23) liegen bei Klon 21 und 48 vor.

Das Kommunikationsmodul lag in der Ursprungsbibliothek H-I in einer variablen Länge von acht bis zehn Nukleotiden vor. Aus der in **Abbildung 4.10** dargestellten Sekundärstruktur von Bibliothek H-I geht hervor, dass zehn Nukleotide bevorzugt sind. In **Abbildung 4.21** ist die Ursprungsbibliothek H-I mit zehn Nukleotiden im Bereich des Kommunikationsmodules dargestellt, da alle isolierten und in Übereinstimmung gebrachten Klone ebenfalls zehn Nukleotide in diesem Bereich aufweisen.

Der randomisierte Bereich des Kommunikationsmodules bezog in der Ursprungsbibliothek für H-I auch die für die Bindung des Liganden essentiellen Nukleotide „GGCAG“ (Position 30 bis 34) mit ein. Die Auswertung der Zusammensetzung der Kommunikationsmodule der isolierten Klone in diesem Bereicht zeigt, dass sechs von insgesamt 17 Klonen die Basenfolge „GGCA“ (Position 30 bis 33) besitzen. Kein isolierter Klon weist hingegen die Basenfolge „GGCAG“ des Theophyllin-Aptamer in diesem Bereich auf.

Eine Aufteilung der Kommunikationsmodule nach identischen Basenfolgen und deren Hybridisierung mit dem gegenüberliegenden Strang in Helix 1 ist in **Abbildung 4.22** dargestellt. Es konnten sieben verschiedene Klassen an Kommunikationsmodulen auf-

gestellt werden, die alle 17 Klone beinhalten. Es finden sich bei 12 von 17 Klonen an den Positionen 30 und 31 zwei aufeinanderfolgende Guanosine „GG“, sowie an den Positionen 35 und 36 zwei aufeinanderfolgende Cytosine „CC“. Es fällt auf, dass mit durchschnittlich sechs bis sieben Watson-Crick Basenpaarungen von insgesamt zehn ein hohes Maß an Stabilität in Helix 1 vorliegt. Als Vergleich dazu ist das „universelle“ Kommunikationsmodul von Kertsburg *et al.[162]* in **Abbildung 4.22** aufgeführt.

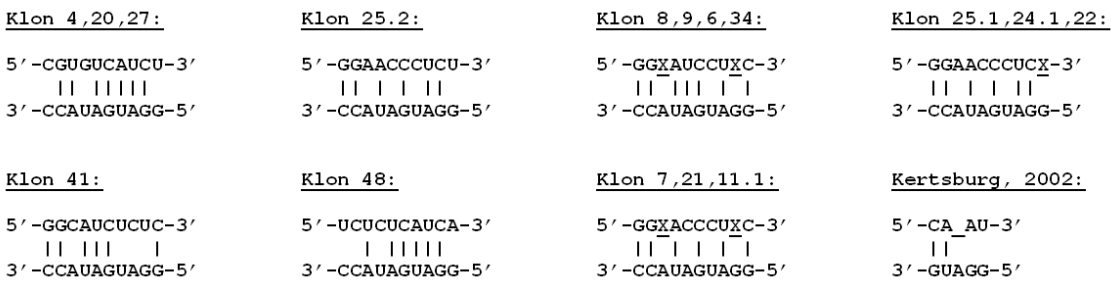


Abbildung 4.22: *Zusammensetzung der Kommunikationsmodule der Klone aus H-I. Watson-Crick Basenpaarungen sind durch ein | symbolisiert, variable Basen durch ein X.*

Einen Sonderfall stellen die Klone 4, 20 und 27 dar: sie sind im Bereich des Kommunikationsmodules komplett sequenzidentisch. Das Kommunikationsmodul hat dabei die folgende Sequenz: „CGUGUCAUCU“ und ist somit nur an Position 31 mit dem Theophyllin-Aptamer identisch. Ferner ist bei Klon 4 und 20 ein Guanosin an Position 45 und 48 durch ein Adenosin ausgetauscht.

Interessant ist bei den Klonen 4, 20 noch folgende Besonderheit: Das Guanosin, welches die beiden internen Schlaufen (bulge 1 und bulge 2) durch Ausbildung eines GC-Basenpaares schliesst, ist durch ein Adenosin ausgetauscht. Diese Basenfehlpaarung führt sehr wahrscheinlich zu einer Erweiterung der internen Schlaufe. Bereits Seelig und Schlatterer haben in Ihren Dissertationen Sequenzen beschrieben, die Sie aus *in vitro*-Selektionen für Diels-Alder Selektion isolierten, die an der gleichen Stelle eine Basenfehlpaarung aufweisen und deren katalytische Aktivität ebenfalls über der des Diels-Alderase Minimalmotivs liegt.

Nachdem die Sequenzen der 17 isolierten Klone aus Bibliothek H-I soweit untersucht und verstanden waren, wurden diese anschliessend im bereits bekannten Fluoreszenz-Assay charakterisiert. Unter Standardbedingungen erfolgte zuerst eine PCR-Amplifikation direkt vom Plasmid mit den Primern 5’-allo DAslxn und 3’-Theoclone

(siehe Kapitel 3.5.1 und 3.5.2). Das daraus resultierende Templat wies die acht während der Selektion vorhandenen Nukleotide am 3'-Ende nicht auf und wurde anschliessend in Gegenwart eines Initiatornukleotids (ADEG) transkribiert. Der Aufreinigung unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.5.4 und 3.3) folgte die Inkubation im Thermocycler zwecks De- und Renaturierung der RNA (siehe Kapitel 3.6). Die Messung der Fluoreszenzaktivität erfolgte in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.7.1). Die entsprechenden Fluoreszenzkurven sind im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 7.6.4). **Tabelle 4.12** gibt einen Überblick über die dabei ermittelten Reaktionsraten und Schaltfaktoren der einzelnen Klone aus Bibliothek H-I.

Klon H-I	Reaktionsrate mit Theophyllin (nM/min)	Reaktionsrate ohne Theophyllin (nM/min)	Schaltfaktor
25.1	17	17	**1**
25.2	750	250	**3**
24.1	17	17	**1**
7	577	577	**1**
8	1154	1154	**1**
9	882	652	**1**
6	857	577	**1**
34	750	750	**1**
41	100	21	**5**
11.1	214	214	**1**
21	17	17	**1**
48	231	231	**1**
22	75	75	**1**
4	2308	2308	**1**
20	2308	2308	**1**
27	2308	2143	**1**
40	17	17	**1**

Tabelle 4.12: *Reaktionsraten und Schaltfaktoren für Klone aus Bibliothek H-I nach erfolgter Selektion, Klonierung im Fluoreszenz-Assay in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Theophyllin.*

Es fällt auf, dass nur zwei Klone, 25.2 und 41 überhaupt einen Schaltfaktor mit 3 und 5 aufweisen. Bei den restlichen 15 Klonen sind die Reaktionsraten in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin jeweils identisch. Die absoluten Werte der Reaktionsraten variie-

ren in erheblichem Masse für alle gemessenen Klone aus Bibliothek H-I. So zeigt Klon 25.1 in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin eine Reaktionsrate von 17 nM/min, wohingegen die Klone 4, 20 und 27 Reaktionsraten von über 2300 nM/min aufweisen.

Die nach der Isolierung, Klonierung und Sequenzierung erhaltenen acht Sequenzen aus RNA-Bibliothek H-III sind in **Abbildung 4.23** dargestellt. Die Ursprungssequenz ist als erste in der Abbildung gelistet (Helix 3). Ähnlich wie bei den isolierten Sequenzen aus Bibliothek H-I waren auch hier Mutationen im Bereich des Theophyllin-Aptamer, wie auch in der kleinen Schleife (Bulge 1) vorhanden. Der Großteil der Mutationen im Theophyllin-Aptamer befindet sich im nicht-konservierten Bereich. Nur Klon 29 und 28 weisen eine Mutation im konservierten Bereich an Position 33 (Uracil gegen Adenosin) und 54 (Cytosin gegen Uracil) auf. Zusätzlich konnten auch Deletionen von drei Basen (Klon 15, 29 und 48), sowie sechs Basen (Klon 28) im Bereich des Aptamers vorgefunden werden. Klon 15, 29 und 28 weisen jeweils ein zusätzliches Guanosin zwischen Position 61 und 62 auf. Die Mutationen in der kleinen Schlaufe (Bulge 1) beschränken sich, analog zu den Mutationen in Bibliothek Helix 1, auf den Austausch eines Guanosins durch ein Adenosin, hier in Position 24.

Der in der Ursprungsbibliothek H-III randomisierte Bereich des Kommunikationsmodules unterscheidet sich insofern von Bibliothek H-I, dass beide Nukleotidstränge randomisiert vorlagen. Daraus ergeben sich insgesamt vier Verknüpfungsstellen zwischen Aptamer und Ribozym:

1. Übergang Ribozym (kleine Schlaufe, Bulge 1) mit Kommunikationsmodul,
2. Übergang Kommunikationsmodul mit Theophyllin-Aptamer,
3. Übergang Aptamer mit Kommunikationsmodul,
4. Übergang Kommunikationsmodul mit Ribozym (große Schlaufe, Bulge 2).

Die involvierten Nukleotide an diesen Verknüpfungsstellen beider Domänen sind essentiell für die katalytische Aktivität des Ribozyms und auch der Bindungsaffinität des Liganden zum Theophyllin-Aptamer. Ein detaillierter Blick auf die acht Sequenzen in **Abbildung 4.23** zeigt, dass im Bereich der vier Schnittstellen zwischen Ribozym und Theophyllin-Aptamer allein Klon 44 an drei von vier Stellen die für die Katalyse und Bindung des Liganden essentiellen Nukleotide besitzt.

```
          1    5    10   15   20   25   30     35   40   45   50   55        60   65   70
          |    |    |    |    |    |    |      |    |    |    |    |         |    |    |
Helix3    GGAG CUCGCUUCGGCGAG GCCG UGCC NNNNN(NN) UACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCA (NN)NNNNN AUACU CGGC
8         GGAG CUCGCUCGGGGAGU GCCG UGCC UGUGCG   UACCAGUCGAAAGACCCUUGGCA   AACGCC AUACU CGGC
7         GGAG CUCGCUUCGGCGAG GUCG UGCC GUCGGG   UACCAGCUGAAAAGCCCUUGGCA   ACCGGA AUACU CGGC
41        GGAG CUCGCUUCGGCGAG GCUG UGCC GCCUGG   UACCAGCCCAAAAGCCCUUGGCA   ACAGGA AUACU CGGC
44        GGAG CUCGCUUCGGCGAG GCCG UGCC AUCGAA   UACCAGUCGAAAGACCCUUGGCA   GUUGAG AUACU CGGC
15        GGAG CUCGCUUCGGCGAG CCCG UGCC AGUCAU   UACCAGCCGAAAGGC   UGGCA   AUGUACG AUACU CGGC
29        GGAG CUCGCUUCGGCGAG GCCG UACC ACUCAU   AACCAACCGAAAGG    UUGGCA   CUAGGGG AUACU CGGC
48        GGAG CUCGCUUCGGCGAG GCCG UGCC GUGUCA   UACCAACCGAAAGC    UUGGCA   UAGACC AUACU CGGC
28        GGAG CUCGCUUCGGCGAG GCCG UACC AUACCU   UACCAA       GGCUCUUGGUA   ACUGGUG AUACU CGGC
```

Abbildung 4.23: *Isolierte Klone aus Bibliothek H-III nach erfolgter Selektion. Der Aptamer-Bereich ist in blau, der Bereich des Kommunikationsmodules in rot dargestellt.*

In **Abbildung 4.24** sind die einzelnen Kommunikationsmodule der acht isolierten Klone dargestellt. Der randomisierte Bereich des Kommunikationsmodules in der Ursprungsbibliothek H-III wies eine Variation von fünf bis sieben Nukleotiden in der Länge auf. Im Bereich des Kommunikationsmodules, der sich der kleinen internen Schlaufe (Bulge 1) anschliesst, und an Stelle von Helix 3 des Diels-Alderase Ribozym vorhanden ist, besitzen alle acht Klone eine Länge von sechs Nukleotiden. Die komplementäre Seite des Kommunikationsmodules offenbart für Klon 15, 28 und 29 sieben Nukleotide, für die restlichen fünf Klone ebenfalls sechs Nukleotide in diesem Bereich. Die Anzahl an Watson-Crick Basenpaaren zeigt, dass durchschnittlich nur zwei bis drei von sechs Nukleotiden komplementäre Basen im Kommunikationsmodul ausbilden. In Klon 28 ist sogar nur ein Watson-Crick Basenpaar vorhanden. Wie bereits bei MH23 festgestellt, ist auch hier im Bereich der Helix 3 des Diels-Alderase Ribozym ein stabiler Watson-Crick Duplex für die komplette katalytische Aktivität notwendig.

```
Klon 8:          Klon 41:         Klon 15:         Klon 48:

5′-UGUGCG-3′     5′-GCCUGG-3′     5′-AGUCAU-3′     5′-GUGUCA-3′
    | |              | ||             ||             |    |
3′-CCGCAA-5′     3′-AGGACA-5′     3′-GCAUGUA -5′    3′-CCAGAU -5′

Klon 7:          Klon 44:         Klon 29:         Klon 28:

5′-GUCGGG-3′     5′-AUCGAA-3′     5′-ACUCAU-3′     5′-AUACCU-3′
     |||             || |            | |              |
3′-AGGCCA-5′     3′-GAGUUG-5′     3′-GGGGAUC -5′    3′-GUGGUCA-5′
```

Abbildung 4.24: *Zusammensetzung der Kommunikationsmodule der Klone aus H-III. Watson-Crick Basenpaarungen sind durch ein | symbolisiert.*

Die für die acht Sequenzen aus RNA-Bibliothek H-III im Fluoreszenz-Assay ermittelten Reaktionsraten und Schaltfaktoren sind in **Tabelle 4.13** aufgeführt. Die entsprechenden Fluoreszenzkurven sind im Anhang (Kapitel 7.6.5) aufgeführt. Ähnlich zu den isolierten Klonen aus Bibliothek H-I hat auch hier hat die Ab- und Anwesenheit von Theophyllin keinen Einfluß auf das katalytische Verhalten. Allein Klon 8 und 41 weisen einen Schaltfaktor von 2 auf. Die absoluten Reaktionsraten liegen in einem Bereich von 17 nM/min (Klon 15) bis 600 nM/min (Klon 41 in Anwesenheit von Theophyllin) und damit durchaus niedriger als für die Klone aus Bibliothek H-I (4, 20 und 27).

Klon H-III	Reaktionsrate mit Theophyllin (nM/min)	Reaktionsrate ohne Theophyllin (nM/min)	Schaltfaktor
8	200	100	**2**
7	136	136	**1**
41	600	254	**2**
44	231	231	**1**
15	17	17	**1**
29	231	231	**1**
48	250	250	**1**
28	300	300	**1**

Tabelle 4.13: *Reaktionsraten und Schaltfaktoren für Klone aus Bibliothek H-III nach erfolgter Selektion, Klonierung im Fluoreszenz-Assay in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Theophyllin.*

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die isolierten Sequenzen aus beiden Bibliotheken zu einem Grossteil Mutationen und Deletionen sowohl im Bereich der Ribozym-, als auch der Aptamer-Komponente aufweisen. Verglichen mit den aus der Selektion von Dr. Mark Helm isolierten Klonen weisen die Bibliotheken H-I und H-III jedoch mehr Mutationen und vor allem auch Deletionen an für die katalytische Aktivität und Bindungsfähigkeit essentiellen Stellen auf. Bei allen drei allosterischen Selektionen lässt sich nur schwer feststellen, woher diese Modifikationen eigentlich kommen. Eine mögliche Erklärung könnte darin begründet liegen, dass durch das Ausmass der Gegenselektion und dem damit jeweils verbundenen De- und Renaturierungprogramm (Erhitzen der RNA in Anwesenheit von Magnesium-Ionen bis 60°C) die Spaltung einzelner RNA-Moleküle begünstigt war. Diese während der Selektion generierten Sequenzen

wurden könnten dann im Anschluss in die jeweils nächste Selektionsrunde weitergetragen worden sein. Es wurden allerdings keine weiteren Untersuchen durchgeführt, um dieses Phänomen zu erklären.

Ein detaillierter Blick auf die einzelnen Sequenzen zeigt, dass die 17 isolierten Klone aus Bibliothek H-I im Bereich des Kommunikationsmodules zum Grossteil Standard Watson-Crick Basenpaare besitzen, was die Verbindung zwischen Aptamer- und Ribozym-Komponente sehr unflexibel werden lässt. Da allosterisches Verhalten mit einer relativen Instabilität der entprechenden Helix zwischen Aptamer und Ribozym einhergeht[156], wie bei MH23 eindeutig vorhanden, ist das nicht vorhandene allosterische Verhalten der aus Bibliothek H-I isolierten Klone verständlich. Für die drei Klone 4, 20 und 27 konnte zusätzlich noch festgestellt werden, dass die katalytischen Aktivitäten weitaus höher als für das Diels-Alderase Minimalmotiv des Diels-Alderase Ribozyms liegen. Interessanterweise wiesen genau diese drei Sequenzen im Bereich des Kommunikationsmodules die Stabilste Helix 1 auf.

Für die aus Bibliothek H-III isolierten Sequenzen ist ebenfalls kein allosterisches Verhalten zu beobachten. Hierbei liegen hingegen im Bereich des Kommunikationsmodules in Helix 3 verglichen mit den Sequenzen aus Bibliothek H-I weitaus weniger Watson-Crick Basenpaare vor. Insgesamt ist dieser Bereich weitaus instabiler, als es das Diels-Alderase Ribozym für katalytische Aktivität notwendig ist.

4.5 Rationales Design allosterischer Diels-Alderase-Ribozyme

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, liessen sich allosterische regulierte Ribozyme mittels rationalen Designs konstruieren. Tang und Breaker[155] verknüpften beispielsweise ein Hammerhead Ribozym wahlweise mit einem ATP- oder Theophyllin-Aptamer. Die so erhaltenen Konstrukte wurden dabei durch die entsprechenden Liganden entweder aktiviert oder inhibiert. Der Austausch an Nukleobasen erfolgte dabei hauptsächlich im helikalen Bereich zwischen Aptamer und Ribozym, dem Kommunikationsmodul. Araki *et al.*[156] konnten ein Hammerhead Ribozym mit einem FMN-Aptamer verknüpfen, welches eine Aktivierung durch den Liganden erfuhr. Die diesem gemeinsamen Ansatz zugrunde liegenden Prinzipien basieren einzig auf der Variation einer Helix im Hammerhead Ribozym, welche die Aptamer- mit der Ribozym-Komponente verbindet. Ein alternatives Konzept des rationalen Designs allosterisch regulierter Ribozyme wurde im Arbeitskreis Jäschke entwickelt[207]. Amontov und Jäschke konnten dabei durch systematisches Ausprobieren (trial-and-error) an Konstrukten, bestehend aus dem Diels-Alderase Minimalmotiv, verknüpft mit verschiedenen Aptamer-Komponenten zeigen, dass schwach konservierte Bereiche der Aptamer- und Ribozym-Komponente in Abwesenheit des Liganden alternative, katalytisch inaktive Konformation ausbilden können. Die Interaktion der involvierten Bereiche beider Komponenten erfolgt dabei durch Hybridisierung der entsprechenden Nukleobasen. Das Gleichgewicht zwischen der katalytisch aktiven und inaktiven Struktur wird dabei durch die Anwesenheit und Bindung des Liganden an das Aptamer unmittelbar beeinflusst. Im Detail wurden Konstrukte, bestehend aus einem Theophyllin-, Tobramycin- und Bcr/Abl mRNA-Aptamer, verknüpft mit Helix 3 des Diels-Alderase Minimalmotivs konstruiert, die um den Faktor 50-2100 durch den entsprechenden Liganden aktiviert wurden[207].

4.5.1 Ausgangspunkt und Entwicklungsstrategie

Nachdem oben beschriebenen Prinzip konnten durch systematisches Ausprobieren allosterische Diels-Alderase-Ribozyme erfolgreich konstruiert werden. Es stellte sich hingegen die Frage, ob dies auch mit einem an Helix 1 verknüpften Aptamer realisiert werden konnte. Helix 1 ist dabei insofern von besonderem Interesse, da Mutationen in diesem Bereich des Diels-Alderase Motivs dafür bekannt sind, einen grösseren Einfluß auf die katalytische Aktivität zu haben, als an Helix 3, da näher an der katalytischen Tasche des Ribozyms.
Da sich die allosterische Regulation des Diels-Alderase Motivs, verknüpft mit einem Theophyllin-Aptamer in den bisherigen Untersuchungen bewährt hat, schien es angebracht, dies auch mit den kommenden rational zugänglichen Konstrukten an Helix 1 fortzuführen. Desweiteren sollte eine Voraussetzung für kommende logische Schaltungen (logic gates)[168-170, 172, 214] erkundet werden, bei denen die Diels-Alderase an Helix 1 und Helix 3 mit zwei identischen oder unterschiedlichen Aptamere versehen ist.

4.5.2 Allgemeiner Aufbau und Design

Die in der Folge in den Abbildungen dargestellten Sekundärstrukturen der allosterisch regulierten Diels-Alderase Ribozyme basieren einzig auf den bekannten Sekundärstrukturen des Theophyllin-Aptamer und Diels-Alderase Ribozyms. Es wurde für keine der 21 Sequenzen ein Nachweis der Sekundärstruktur durch enzymatisches Probing oder ähnliches erbracht.
In **Abbildung 4.25** ist das Prinzip des Gleichgewichtes zwischen der aktiven (links, mit Ligand) und inaktiven (rechts, ohne Ligand) Konformation der rational konstruierten, allosterisch regulierten Diels-Alderase-Ribozyme schematisch dargestellt. Wie oben bereits erwähnt, ist das Theophyllin-Aptamer mit Helix 1 des Diels-Alderase Minimalmotivs verknüpft. Die farbig markierten Bereiche in den jeweiligen Abbildungen der Sekundärstrukturen repräsentieren dabei die schwach konservierte Nukleobasen, welche in der Länge wie Zusammensetzung modifiziert werden, um in Abwesenheit des Liganden miteinander zu interagieren und alternative Konformationen auszubilden. In der aktiven Struktur weist die Konformation die klassischen drei Diels-Alderase Helices

(Helix 1 bis 3) und die zwei internen Schlaufen (bulge 1 und bulge 2) auf. Die in **Abbildung 4.25**, wie auch für die folgenden 21 rationalen Konstrukte (Theo 1 bis Theo 21) dargestellte Konformation in Abwesenheit des Liganden samt vermeintlicher Sekundärstruktur stellt lediglich eine hypothetische Annahme dar (s.o.). Allgemein nehmen wir dabei an, dass es zu folgenden Interaktionen zwischen schwach konservierten Basen in Abwesenheit des Liganden kommt:

1. das 3'-Ende der Ribozym-Komponente an Helix 2 (CUCC) interagiert mit dem 5'-Ende (GGAG) unter Ausbildung von Helix A (grau dargestellt).
2. Bereiche innerhalb des Theophyllin-Aptamer hybridisieren unter Ausbildung von Helix B (blau dargestellt).
3. die Basensequenz der kleinen internen Schleife (bulge 1, UGCCA) paart mit der im Aptamer komplementären Sequenz (UGGCA) unter Ausbildung von Helix C (gelb darggestellt).
4. die in Helix 3 teilweise gegenüberliegenden Basen treten in Wechselwirkung unter Ausbildung von Helix D (rot dargestellt).

Die katalytischen Aktivitäten der rationalen Konstrukte in An- und Abwesenheit von Theophyllin wurden mittels Fluoreszenz-Assay unter Standardbedingungen ermittelt (siehe 3.7.1). Nukleotide, die im Vergleich zur vorausgegangenen Sekundärstruktur verändert wurden, sind in gelb mit schwarzem Rand dargestellt. Sämtliche Reaktionsraten der Konstrukte Theo 1 bis Theo 21 sind in **Tabelle 4.14** aufgeführt. Die korrespondierenden Fluoreszenzkurven finden sich in Kapitel 0.

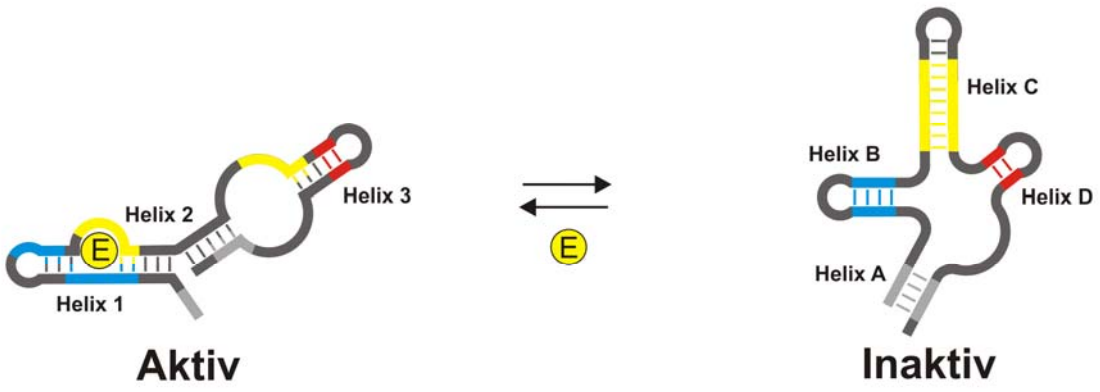


Abbildung 4.25: *Gleichgewicht zwischen der aktiven und inaktiven Konformation allosterisch regulierter Diels-Alderase-Ribozyme*

4.5.3 Die Verknüpfung zwischen Aptamer und Ribozym

In einem ersten Schritt galt es herauszufinden, wie das Theophyllin-Aptamer über Helix 1 am Besten mit dem Diels-Alderase Ribozym verknüpft werden sollte. Bei dem rationalen Konstrukt, welches zuvor im Arbeitskreis Jäschke mit der höchsten allosterischen Aktivierung durch den Liganden Theophyllin bestimmt werden konnte (Theo 5), waren die Aptamer- und Ribozym-Komponente im Bereich von Helix 3 über zwei G-C Basenpaare miteinander verbunden*[207]*. Dies schien somit ein guter Ausgangspunkt für die Verknüpfung zwischen Theophyllin-Aptamer und Ribozym an Helix 1.
In **Abbildung 4.26** ist die von uns angenommene Sekundärstruktur von Theo 1 dargestellt. Die beiden oben erwähnten beiden G-C Basenpaare sind in der Abbildung in gelb mit schwarzem Rand dargestellt. Die Reaktionsraten für dieses Konstrukt in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin lagen bei 83 und 429 nM/min, was eine 5-fache Aktivierung durch Theophyllin bedeutete.

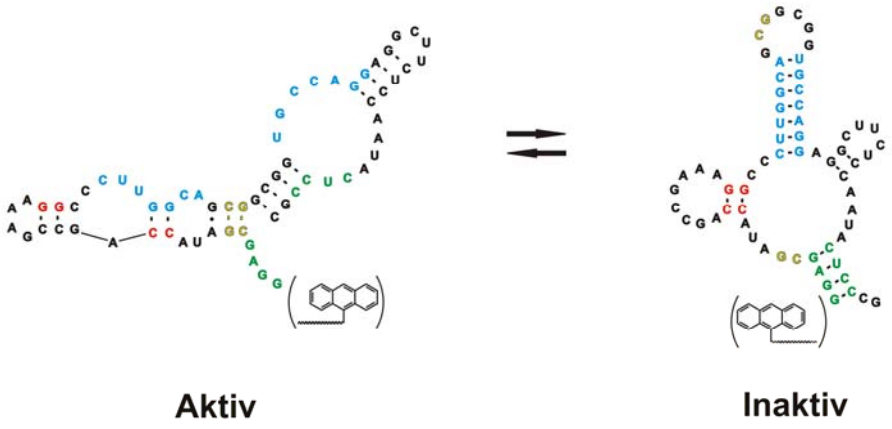


Abbildung 4.26: *Sekundärstruktur von Theo 1*

Abbildung 4.27 zeigt das Konstrukt Theo 2, bei dem Aptamer und Ribozym über drei Nukleotide miteinander verbunden sind. Die Reaktionsrate in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin lagen beide mit 150 nM/min auf identischem Niveau, was einen Schaltfaktor von eins zur Folge hatte. Der Schaltfaktor lag damit deutlich unter denen von Theo 1.

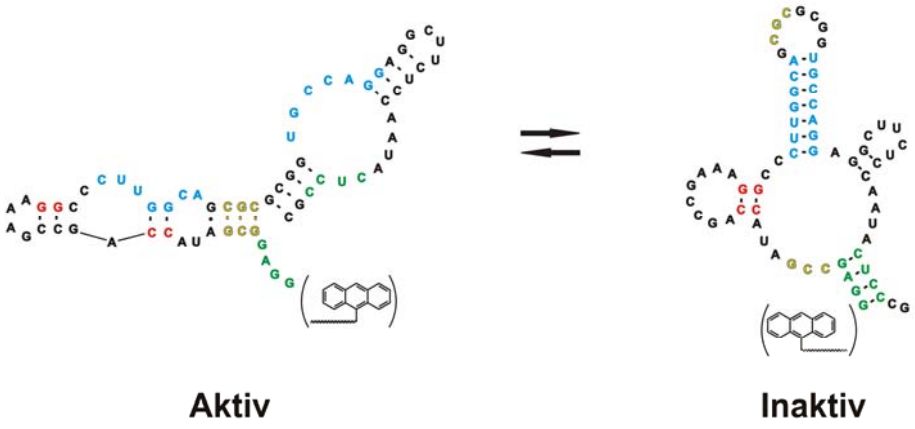


Abbildung 4.27: *Sekundärstruktur von Theo 2*

Das Konstrukt Theo 3 in **Abbildung 4.28** weist ebenfalls drei Nukleotide auf, verglichen mit Theo 2 allerdings in unterschiedlicher Zusammensetzung zwischen Aptamer und Ribozym. Die sich daraus ergebenen Sekundärstrukturen sind identisch zu Theo 2, die Reaktionsraten allerdings um einiges höher: 571 nM/min in Gegenwart und 857 nM/min in Abwesenheit von Theophyllin. Der sich daraus ergebende Schaltfaktor von 0,7 liegt somit unter Theo 2.

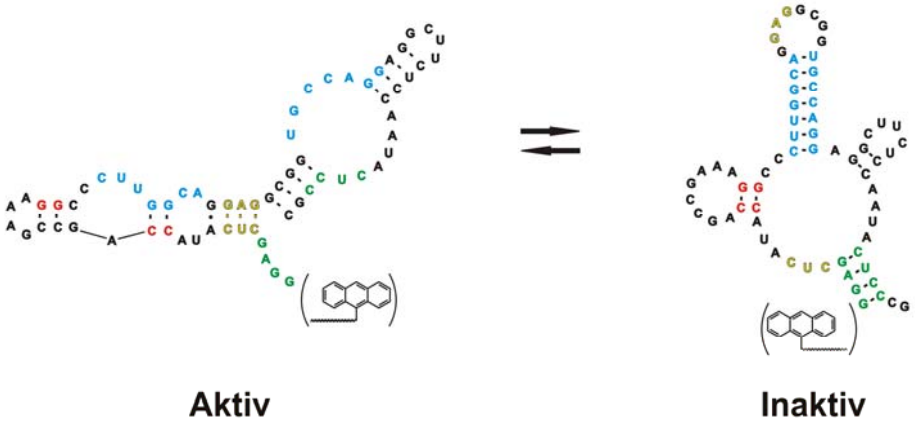


Abbildung 4.28: *Sekundärstruktur von Theo 3*

Die für die Konstrukte Theo 1 bis Theo 3 ermittelten Schaltfaktoren weisen Theo 2 mit zwei Nukleotiden als Verbindung zwischen Aptamer und Ribozym als das am stärksten allosterisch aktivierte Konstrukt auf (Schaltfaktor von 5 gegenüber 1 und 0,7). Zwei Nukleotide scheinen somit das Optimum darzustellen. Im nächsten Schritt stellte sich

die Frage nach der Nukleobasen-Zusammensetzung dieser Verbindung. Mit den Konstrukten Theo 4, Theo 5 und Theo 6 wurden verschiedene Basenpaarungen mit jeweils zwei Nukleotiden Länge auf deren allosterisches Verhalten gegenüber Theophyllin untersucht. In **Abbildung 4.29** ist das Konstrukt Theo 4 dargestellt, bei dem im Vergleich zu Theo 1 ein C-G gegen ein U-A Basenpaar ausgetauscht wurde. Theo 4 wies eine Aktivierung um den Faktor 3 durch Theophyllin auf (188 und 60 nM/min in An- und Abwesenheit des Liganden).

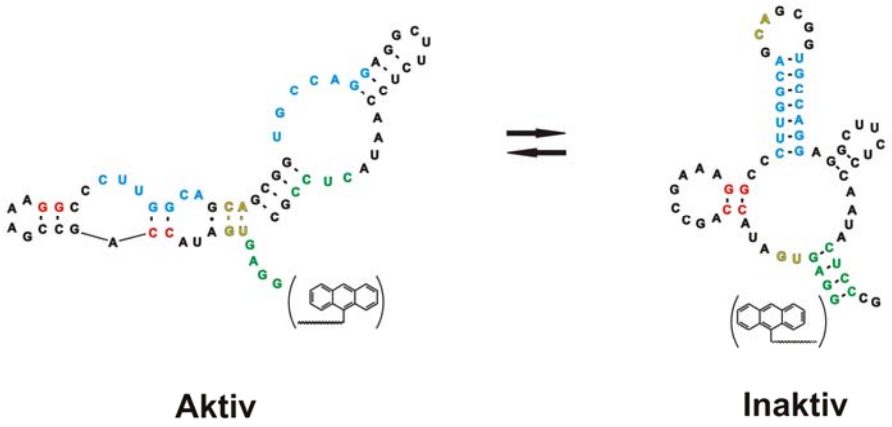


Abbildung 4.29: *Sekundärstruktur von Theo 4*

Bei Theo 5 in **Abbildung 4.30** besteht die Verbindung zwischen Aptamer und Ribozym-Komponente wieder aus zwei G-C Basenpaaren, allerdings in anderer Reihenfolge (GG statt CG). Theo 5 wurde durch Theophyllin um den Faktor 0,7 aktiviert (100 und 136 nM/min in Ab- und Anwesenheit des Liganden).

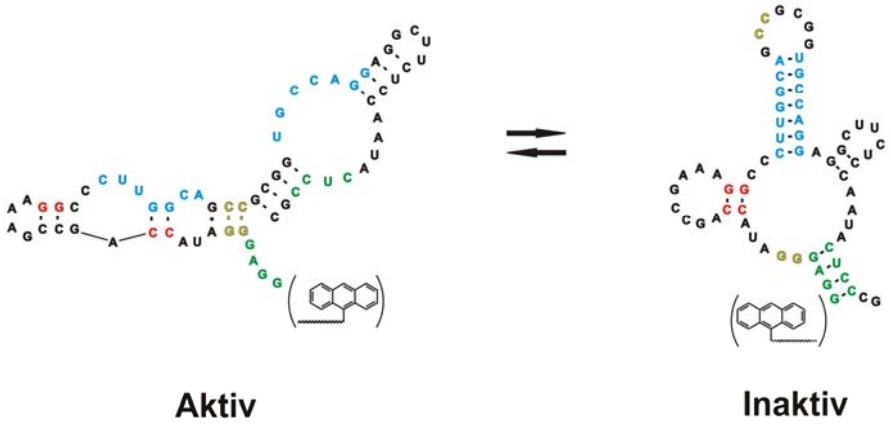


Abbildung 4.30: *Sekundärstruktur von Theo 5*

Die letzte Variation der beiden Nukleotide, die das Aptamer mit dem Ribozym verbinden, ist für Theo 6 in **Abbildung 4.31** dargestellt. Hier besteht die Verbindung wiederum nur aus G-C Basenpaaren, allerdings beide in umgekehrter Reihenfolge: CC:GG. Die daraus resultierende Aktivierung durch Theophyllin um den Faktor acht (556 und 71 nM/min in Ab- und Anwesenheit des Liganden) stellte somit das bisher beste Konstrukt dar.

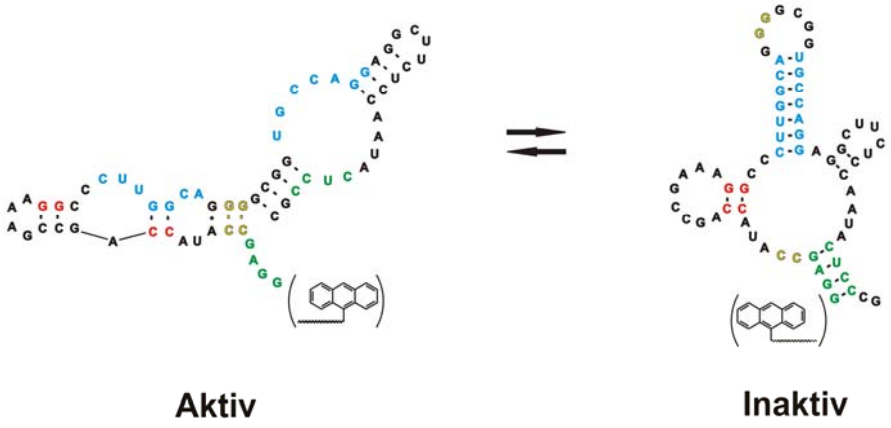


Abbildung 4.31: *Sekundärstruktur von Theo 6*

Zusammenfassend lässt sich für die Optimierung der Verbindung zwischen Aptamer- und Ribozym-Komponente festhalten, dass zwei G-C Basenpaare optimal sind. Den besten Schaltfaktor wies Theo 6 mit acht auf, welcher die Grundlage der weiteren Optimierung darstellte.

4.5.4 Evaluierung der Stabilität von Helix 3 und Helix C

Wir gingen davon aus, dass Teile von Helix 3 in Abwesenheit des Liganden zur Bildung von Helix C befähigt sein sollten (symbolisiert durch blaue Nukleotide). Bei Theo 7 wurde die Zusammensetzung von Helix 3 so verändert, dass dies wiederum einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Länge von Helix C haben sollte (**Abbildung 4.32**). Helix 3 hatte in den Konstrukten Theo 1 bis Theo 6 eine Länge von vier, Helix C eine Länge von sieben Basenpaaren. Bei Konstrukt Theo 7 wurde im Vergleich zu Theo 6 ein A-U Basenpaar in Helix 3 gegen ein weiteres G-C Basenpaar ausgetauscht, so dass Helix C in Abwesenheit von Theophyllin nun aus acht Basenpaaren bestehen sollte. Helix D besteht dabei wahrscheinlich nur aus einem Basenpaar. Die Reaktionsraten von Theo 7 in Abwesenheit von Theophyllin unterstrichen dieses Konzept: 41 nM/min im Vergleich zu 71 nM/min wurden für Theo 6 beobachtet. Es resultierte insgesamt ein Schaltfaktor von 3 (125 nM/min in Anwesenheit von Theophyllin).

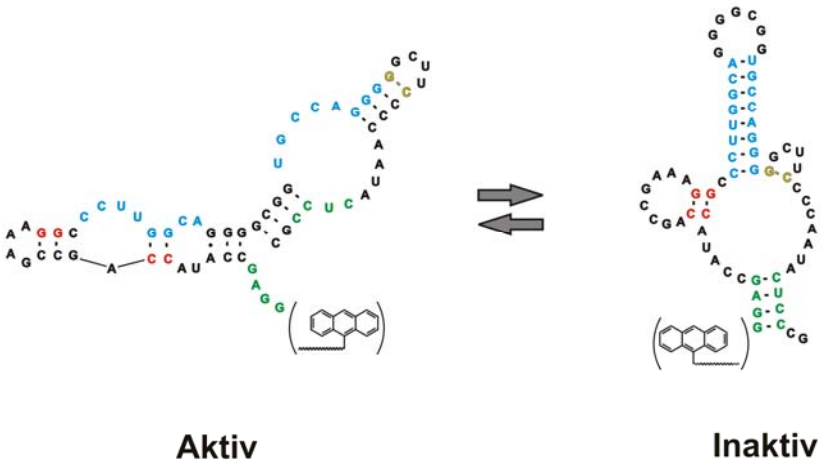


Abbildung 4.32: *Sekundärstruktur von Theo 7*

Eine weitere Modifikation von Helix 3 wurde in Theo 8 realisiert (siehe **Abbildung 4.33**). Bei Theo 8 weist Helix 3 im Vergleich zu Theo 7 wieder ein A-U Basenpaar bei identischer Länge auf. Das A-U Basenpaar befindet sich jedoch am Ende von Helix 3, so dass Helix D aus einem A-U Basenpaar und nicht wie in Theo 7 aus einem G-C Basenpaar besteht. Die Zusammensetzung von Helix C ist somit identisch mit Theo 7. Der Schaltfaktor liegt mit 9 leicht über Theo 9 (600 und 67 nM/min in Ab- und Anwesenheit des Liganden).

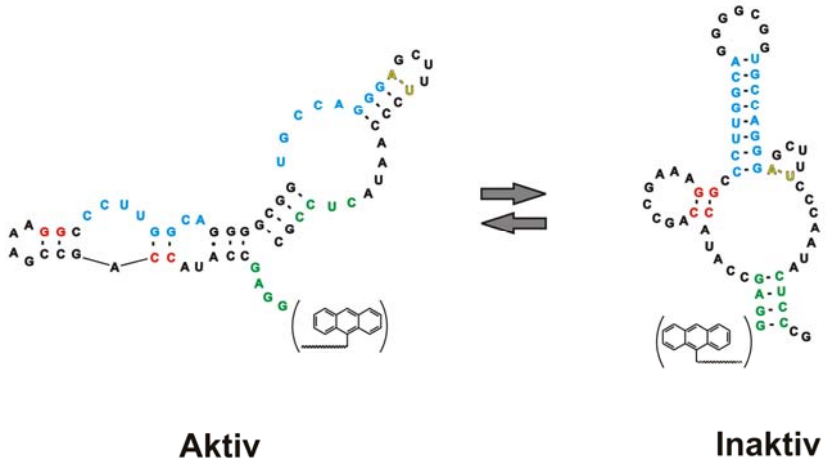


Abbildung 4.33: *Sekundärstruktur von Theo 8*

In Konstrukt Theo 9 wurde Helix 3 um ein weiteres G-C Basenpaar an deren Ende verlängert (siehe **Abbildung 4.34**). Dies hatte zur Folge, dass bei gleicher Länge und Zusammensetzung von Helix C Helix D um ebendieses G-C Basenpaar verlängert wurde. Damit konnte die Konformation in Abwesenheit des Liganden weiter an Stabilität gewinnen. Die ermittelten Reaktionsraten unterstützen diese Annahme: 682 nM/min in Anwesenheit und 64 nM/min in Abwesenheit von Theophyllin, was einen Schaltfaktor von 10 ergibt.

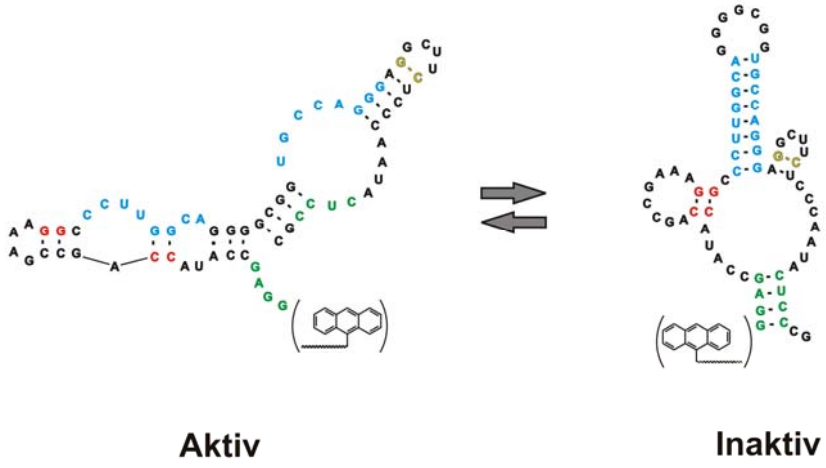


Abbildung 4.34: *Sekundärstruktur von Theo 9*

Bei Konstrukt Theo 10, dargestellt in **Abbildung 4.35**, ist das oben erwähnte zusätzliche G-C Basenpaar durch ein A-U Basenpaar ersetzt. Die Konformation in Abwesen-

heit des Liganden sollte ebenfalls identisch mit Theo 9 sein: Helix C, bestehend aus acht Basenpaaren und Helix D bestehend aus zwei Basenpaaren (AU und AU). Der Schaltfaktor nahm bei diesem Konstrukt nochmals zu und lag jetzt schon bei 12 (1000 und 86 nM/min in An- und Abwesenheit des Liganden).

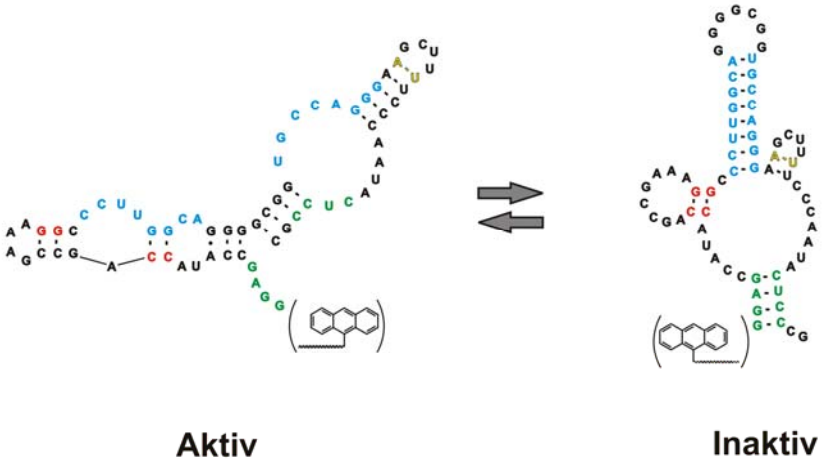


Abbildung 4.35: *Sekundärstruktur von Theo 10*

Es lässt sich festhalten, dass unter Beibehaltung der Verbindung zwischen Aptamer und Ribozym Helix 3 weiterhin eine wichtige Rolle in der allosterischen Regulation spielt. Sowohl die Zusammensetzung, als auch die Länge stellen die Basis für alternative Konformationen in Abwesenheit des Liganden Theophyllin dar. Das durch Optimierung in den ersten beiden Etappen des rationalen Designs erzielte Konstrukt, Theo 10, wird durch Theophyllin um den Faktor 12 aktiviert.

4.5.5 Verlängerung von Helix 3 zur Verlängerung von Helix D in der inaktiven Konformation

Bei den folgenden drei Konstrukten (Theo 11 bis Theo 13) wurde Helix 3 nochmals um ein weiteres Basenpaar verlängert, so dass Helix D um ebendieses Basenpaar auf insgesamt drei verlängert wurde. Helix C bestand auch hier bei allen Konstrukten aus acht Nukleotiden. In **Abbildung 4.36** ist die vermeintliche Sekundärstruktur von Theo 11 zu sehen. Die zusätzlichen Nukleotide in Helix 3 sind hier ein G-C Basenpaar. Der Schaltfaktor lag bei 7 (833 und 125 nM/min in An- und Abwesenheit des Liganden).

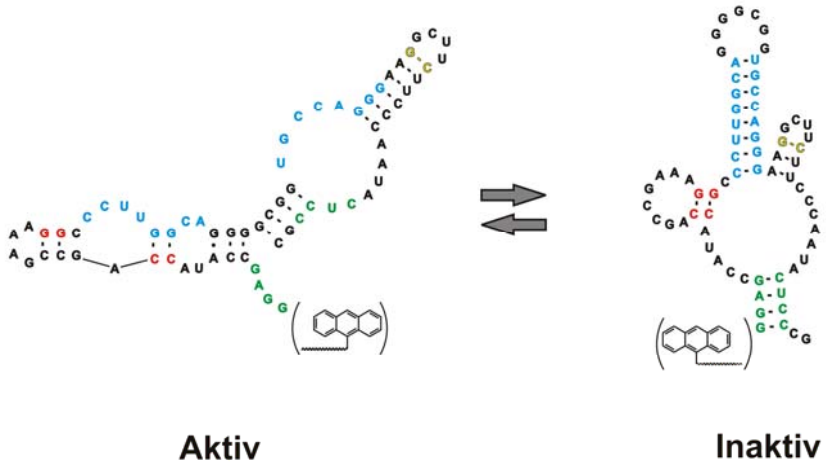


Abbildung 4.36: *Sekundärstruktur von Theo 11*

Bei Konstrukt Theo 12 in **Abbildung 4.37** ist Helix 3 zu gleichen Teilen aus G-C und A-U Basenpaaren zusammengesetzt. Helix D in Abwesenheit des Liganden besteht aus drei A-U Basenpaaren. Theo 12 wurde in Anwesenheit von Theophyllin um 714 nM/min aktiviert und in Abwesenheit von Theophyllin um 125 nM/min, was einen Schaltfaktor von 6 zur Folge hat.

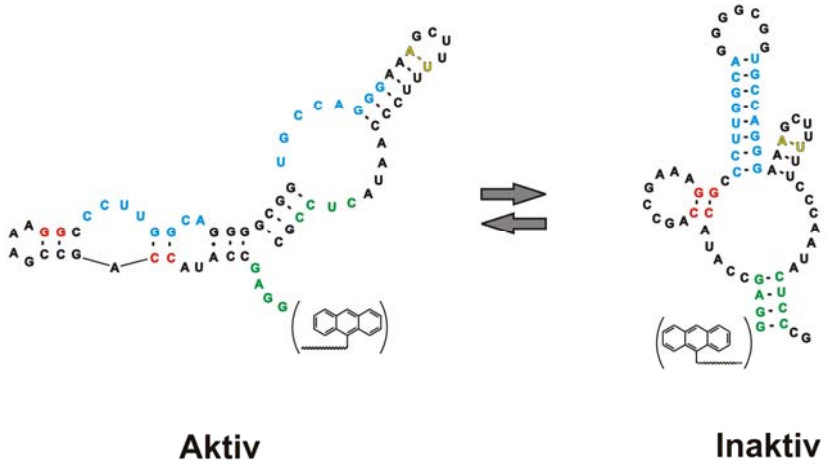


Abbildung 4.37: *Sekundärstruktur von Theo 12*

Helix 3 von Theo 13, dargestellt in **Abbildung 4.38** besteht aus vier aufeinanderfolgenden G-C Basenpaaren und zwei A-U Basenpaaren. Helix D ist in der Länge mit Theo 11 und Theo 12 identisch, beginnt aber mit einem G-C Basenpaar. Der Schaltfaktor liegt bei 5 (750 und 139 nM/min in An- und Abwesenheit des Liganden).

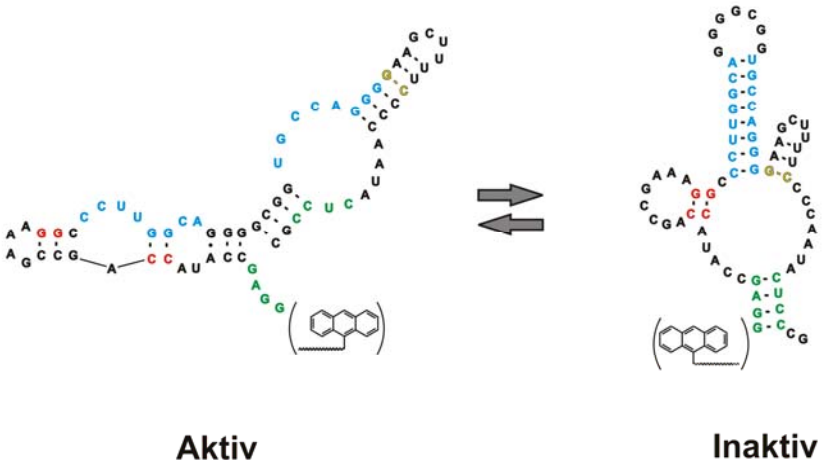


Abbildung 4.38: *Sekundärstruktur von Theo 13*

Die bei den Konstrukten Theo 11 bis Theo 13 vorgenommenen zusätzlichen Modifikationen von Helix 3 in Länge und Zusammensetzung konnten zu keiner Verbesserung des allosterischen Verhaltens führen. Bestes Konstrukt bleibt bis zu diesem Entwicklungsschritt Theo 12.

4.5.6 Insertion von Guanosinen in Helix 3 zur Verlängerung von Helix D in der inaktiven Konformation

Da sich bei den Konstrukten Theo 7 bis Theo 10 die Kombination aus Helix 3 und Helix D in Abwesenheit des Liganden als interessante Komponente zur Beeinflussung des allosterischen Verhaltens herausgestellt hat, wurde dieser Ansatz auch weiter verfolgt. Ziel war es bei den folgenden Konstrukten, die Länge und Stabilität von Helix D zu verstärken. Dazu wurden zusätzlich einzelne Guanosine in Helix 3 eingefügt. Das erste dabei realisierte Konstrukt ist Theo 14 (**Abbildung 4.39**). Bei diesem Konstrukt wurde in Helix 3 ein zusätzliches Guanosin eingefügt, was zu einer Länge von sechs Basenpaaren führte. In Abwesenheit verfügt Helix D über drei Basenpaare. In Anwesenheit von Theophyllin erfährt Theo 14 eine Aktivierung von 375 nM/min, in Abwesenheit von Theophyllin 71 nM/min, was in einem Schaltfaktor von 5 resultiert.

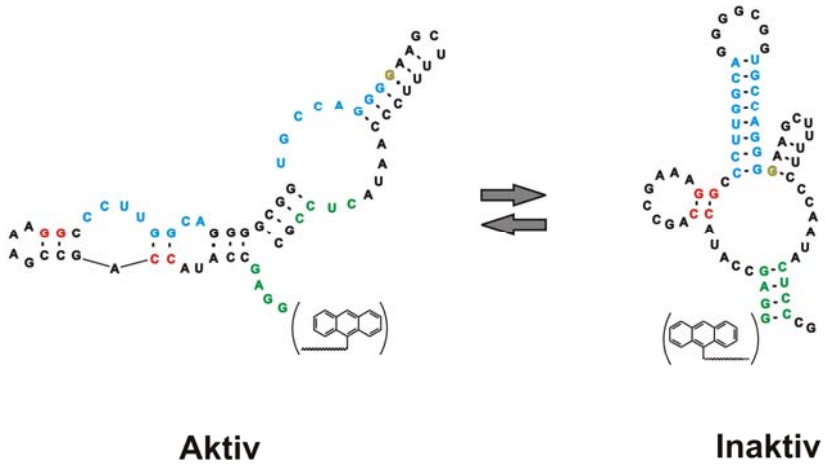


Abbildung 4.39: *Sekundärstruktur von Theo 14*

Mit Theo 15 wurde ein weiteres Konstrukt realisiert, bei dem zwei zusätzliche Guanosine in Helix 3 eingefügt wurden (**Abbildung 4.40**). Bei diesem Konstrukt ist Helix 3 ebenfalls sechs Basenpaare lang, Helix D in der inaktiven Konformation mit vier Basenpaaren eins länger als Theo 14. Der Schaltfaktor für Theo 15 lag bei 7 (667 und 90 nM/min in An- und Abwesenheit des Liganden).

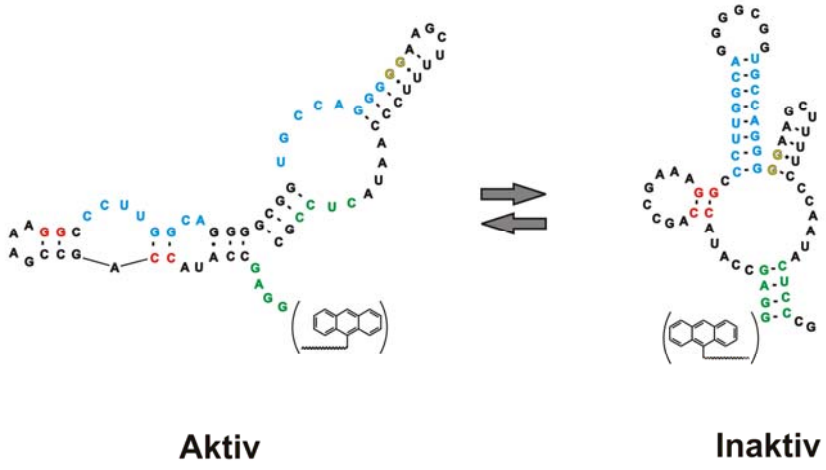


Abbildung 4.40: *Sekundärstruktur von Theo 15*

Konstrukt Theo 16, in **Abbildung 4.41** dargestellt, verfügt über drei zusätzliche Guanosine in Helix 3. Durch die möglichen Basenpaarungen in Helix 3 verlängert sich diese um ein weiteres Basenpaar auf insgesamt sieben. In Abwesenheit des Liganden weist Helix D weiterhin vier Basenpaarungen auf, allerdings mit unterschiedlicher Zusam-

mensetzung. Der Schaltfaktor liegt bei 4 (300 und 83 nM/min in An- und Abwesenheit des Liganden).

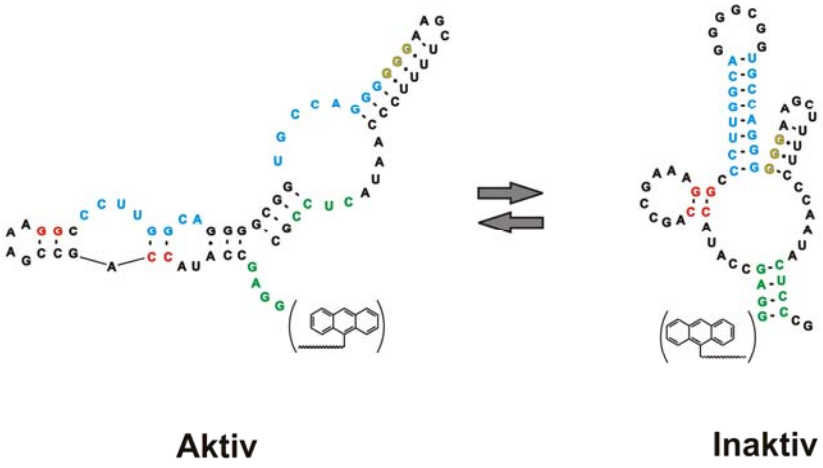


Abbildung 4.41: *Sekundärstruktur von Theo 16*

Es bleibt festzuhalten, dass die Konstrukte Theo 14 bis Theo 16 keine grösseren Schaltfaktoren als Theo 12 aufweisen. Das bei diesen Konstrukten verfolgte Konzept zeigte nicht die erwarteten Ergebnisse.

4.5.7 Verlängerung der Interaktion zwischen 5'- und 3'-Ende in der inaktiven Konformation (Helix A)

Nachdem die sechs vorangegangenen Modifikationen an Helix 3 und damit auch von Helix D in Länge und Zusammensetzung (Konstrukte Theo 11 bis Theo 16) keine Verbesserung bezogen auf Theo 12 (Schaltfaktor von 12) zeigten, wurde versucht, Helix A in der inaktiven Konformation zu stabilisieren. Wir nehmen an, dass eine Interaktion zwischen dem 3'-Ende der Ribozym-Komponente an Helix 2 (CUCC) mit dem 5'-Ende (GGAG) in Abwesenheit des Liganden vorliegt und nennen diese Helix A. Aus den Sekundärstrukturen aller bisher dargestellten Konstrukte geht hervor, dass Helix A immer in Abwesenheit des Liganden vorliegen sollte. Um das Ribozym in Abwesenheit des Liganden weiter zu inaktivieren, wählten wir ebendiese Helix A aus. Zu diesem Zweck wurde bei Theo 17 in **Abbildung 4.42** ein G-C Basenpaar der Verbindung zwischen Aptamer und Ribozym durch ein A-U Basenpaar ersetzt. Das Cytosin, welches

dabei durch ein Uracil ersetzt wurde, konnte nun mit einem gegenüberliegenden Adenosin in der inaktiven Konformation zur Verlängerung von Helix A beitragen. Wir nahmen an, dass Helix A nun eine Länge von fünf Nukleotiden aufwies. Das Konzept ging leider nicht wie erwartet auf: die Reaktionsrate in Abwesenheit von Theophyllin lag bei 66 nM/min, was keine grundlegende Verbesserung gegenüber Theo 14 bis Theo 16, vor allem aber gegenüber Theo 10 mit 88 nM/min darstellte. Der Schaltfaktor lag für Theo 17 bei 2 (Aktivierung durch Theophyllin: 115 nM/min).

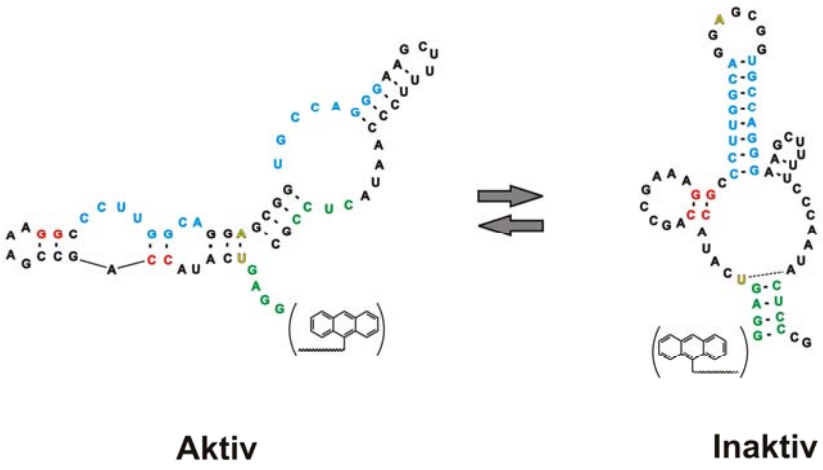


Abbildung 4.42: *Sekundärstruktur von Theo 17*

Abbildung 4.43 zeigt die Sekundärstruktur von Theo 18. Bei Konstrukt Theo 18 wurde zusätzlich das zweite Basenpaar der Verbindung zwischen Aptamer und Ribozym durch ein U-A Basenpaar ersetzt. Dies ermöglichte eine Verlängerung von Helix A durch eine weitere A-U Basenpaarung auf sechs Basenpaarungen in Abwesenheit des Liganden. Der Schaltfaktor war leicht höher als bei Theo 17 mit 4 (115 und 30 nM/min in An- und Abwesenheit des Liganden).

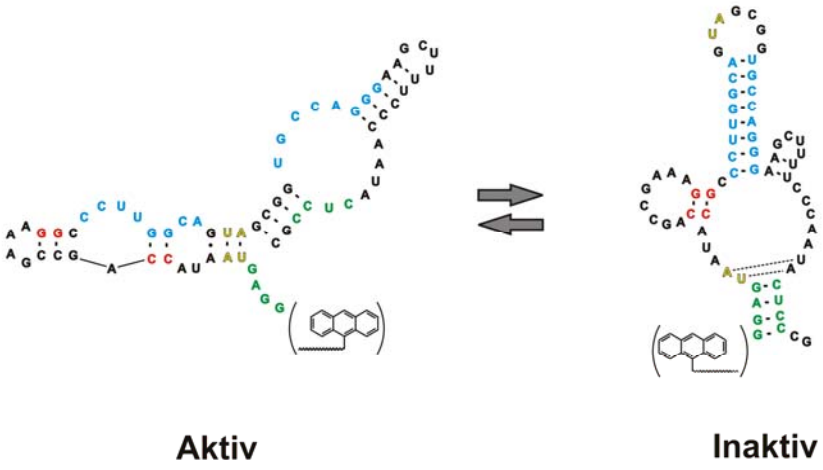


Abbildung 4.43: *Sekundärstruktur von Theo 18*

Ein Blick auf die Schaltfaktoren von Theo 17 und Theo 18 zeigt, dass die Strategie der Verlängerung von Helix A nicht zu dem erwünschten Erfolg geführt hat.

4.5.8 Verlängerung von Helix B in der inaktiven Konformation

Nachdem die Helices A, C und D soweit optimiert wurden, blieb noch Helix B übrig. Bei allen vorangegangenen Konstrukten wies Helix B in Abwesenheit des Liganden jeweils eine Länge von zwei Basenpaaren auf. Eine Verlängerung auf vier Basenpaare konnte durch Einfügen von zwei zusätzlichen Basen (Cytosin und Uracil) im nicht-konservierten Bereich des Aptamers erreicht werden, wie in **Abbildung 4.44** für Theo 19 zu sehen ist. Die Reaktionsrate in Anwesenheit von Theophyllin betrug 750 nM/min und in Abwesenheit von Theophyllin 43 nM/min, was in einem Schaltfaktor von 18 resultierte - dem höchsten bisher erreichten.

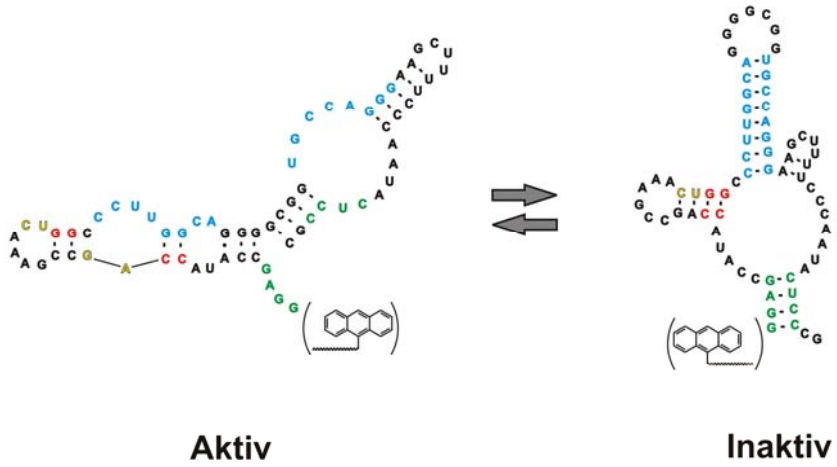


Abbildung 4.44: *Sekundärstruktur von Theo 19*

Abbildung 4.45 zeigt die Sekundärstruktur von Theo 20, bei dem zusätzlich zum Cytosin und Uracil noch ein Guanosin im Aptamer-Bereich eingefügt wurde. In Abwesenheit des Liganden bestand die daraus resultierende Helix B somit aus fünf Basenpaaren. Der sich daraus ergebene Schaltfaktor lag bei 3 (50 und 17 nM/min in An- und Abwesenheit des Liganden) und stellte somit eine erhebliche Verschlechterung im Vergleich zu Theo 19 dar.

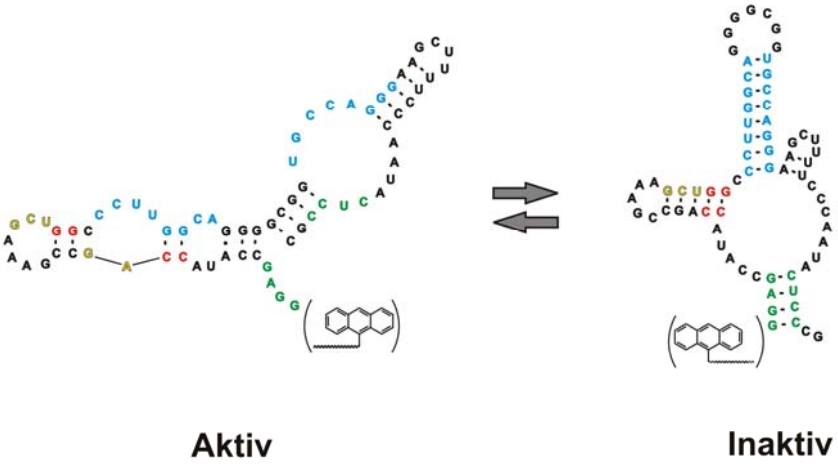


Abbildung 4.45: *Sekundärstruktur von Theo 20*

Ein weiteres Guanosin im Aptamer-Bereich, resultierend in einer Länge von sechs Basenpaaren für Helix B hatte eine weitere Reduktion des Schaltfaktors zur Folge: sowohl in An- und Abwesenheit von Theophyllin lag die Reaktionsrate für Theo 21 bei 17

nM/min (Schaltfaktor von 1). Abbildung 4.46 zeigt die Sekundärstruktur des Konstruktes Theo 21.

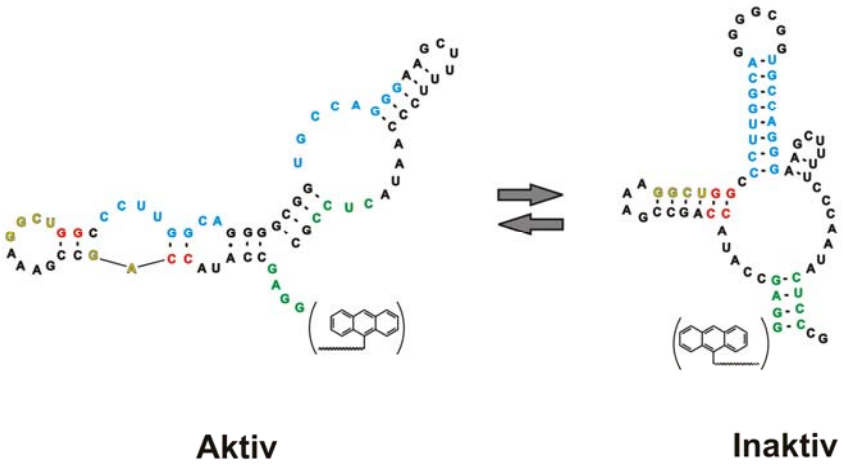


Abbildung 4.46: Sekundärstruktur von Theo 21

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Theo 19 mit einem Schaltfaktor von 18 das Konstrukt darstellt, welches durch Theophyllin am Stärksten aktiviert wurde. Theo 19 vereint dabei Optimierungsstrategien, die an allen Helices in Abwesenheit des Liganden durchgeführt wurden. Es bot sich nun an, Theo 19 ähnlich wie MH23 umfassend anhand der bereits etablierten analytischen Methoden zu charakterisieren.

4.5.9 Reaktionsraten und Schaltfaktoren

In **Tabelle 4.14** sind sämtliche Reaktionsraten und Schaltfaktoren aller rationalen Konstrukte von Theo 1 bis Theo 21 aufgeführt. Es bleibt festzuhalten, dass Theo 19 durch Theophyllin insgesamt um den Faktor 18 aktiviert wurde und somit das Beste Konstrukt darstellt. Eine weitere Charakterisierung, sowohl mit linkergekoppelten Reaktanden im Fluoreszenz-Assay, als auch mit freien Reaktanden im HPLC- und UV-Assay schloss sich an.

Konstrukt	Reaktionsrate mit Theophyllin (nM/min)	Reaktionsrate ohne Theophyllin (nM/min)	Schaltfaktor
Theo 1	429	83	**5**
Theo 2	150	150	**1**
Theo 3	571	857	**0.7**
Theo 4	188	60	**3**
Theo 5	100	136	**0.7**
Theo 6	556	71	**8**
Theo 7	125	41	**3**
Theo 8	600	67	**9**
Theo 9	682	64	**10**
Theo 10	1000	86	**12**
Theo 11	833	125	**7**
Theo 12	714	125	**6**
Theo 13	750	139	**5**
Theo 14	375	71	**5**
Theo 15	667	90	**7**
Theo 16	300	83	**4**
Theo 17	115	66	**2**
Theo 18	115	30	**4**
Theo 19	750	43	**18**
Theo 20	50	17	**3**
Theo 21	17	17	**1**

Tabelle 4.14: *Reaktionsraten (nM/min) und Schaltfaktoren der rationalen Konstrukte Theo 1 bis Theo 21*

4.5.10 Optimierte Messparameter des Fluoreszenz-Assay

Nachdem Theo 19 als das Konstrukt mit der grössten Aktivierung durch Theophyllin identifiziert werden konnte, stellte sich heraus, dass die Einstellungen am Fluoreszenz-Spektrometer während der vorangegangenen Messungen nicht ideal waren. Nach Messungen der Fluoreszenzabnahme des Derivates Anthracendecaethylenglykol ohne RNA und Maleimid-Derivat konnte bereits eine nicht unerhebliche Abnahme der Fluoreszenzaktivität über einen Messzeitraum von 900 Sekunden beobachtet werden. Daraus konnte auf photochemische und/oder photophysikalische Nebenreaktionen geschlossen werden, welche das Chromophor Anthracen inaktivieren. Aus diesem Grund wurden die Einstellungen des Fluoreszenz-Spektrometers neu evaluiert und auf die Reaktion mit einem allosterischen Ribozym optimiert.

In **Abbildung 4.47** sind Fluoreszenzkurven des rationalen Konstruktes Theo 19 im Fluoreszenz-Assay mit zwei unterschiedlichen Einstellungen des Fluoreszenz-Spektrometers zu sehen. Die Kurven wurden jeweils in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin aufgenommen und sind mit „Neu“ und „Alt“ gekennzeichnet, womit die unterschiedlichen Einstellungen gemeint sind. Die Reaktionsraten in Anwesenheit von Theophyllin weisen für die ersten 10 % des Gesamtumsatzes kaum Unterschiede bezüglich der beiden Messsparameter auf. In Abwesenheit des Liganden hingegen sind die Reaktionsraten für die Messparameter „Neu“ ca. um den Faktor 3 niedriger liegen, was letztlich in einem 3-fach höheren Schaltfaktor resultiert.

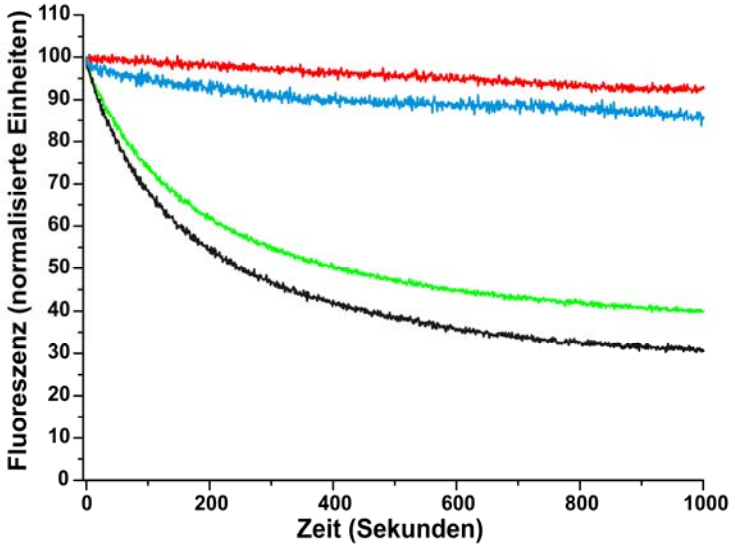


Abbildung 4.47: *Fluoreszenzkurven von Theo 19 in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin mit alten und neuen Messparametern. (schwarz: mit Theophyllin, alte Parameter; grün: mit Theophyllin, neue Parameter; blau: ohne Theophyllin, alte Parameter; rot: ohne Theophyllin, neue Parameter)*

Eine detaillierte Auflistung der beiden verwendeten Einstellungen des Fluoreszenz-Spektrometers (Alt und Neu) sind in Kapitel 3.7.1 aufgeführt.

4.5.11 Ligandenabhängigkeit von Theo 19

Nachdem die Einstellungen am Fluoreszenz-Spektrometer soweit optimiert waren, dass Nebenreaktionen nicht mehr beobachten wurden, konnte mit der eigentlichen Charakterisierung von Theo 19 begonnen werden. In **Tabelle 4.15** sind die Reaktionsraten und Schaltfaktoren von Theo 19 bei Theophyllin-Konzentrationen im Bereicht von 0 µM bis 1000 µM dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass Reaktionsrate und Schaltfaktor mit zunehmender Theophyllin-Konzentration ansteigen. Oberhalb von 500 µM ist hingegen kein nennenswerter Anstieg der Reaktionsrate mehr zu beobachten. Aus den Daten in **Tabelle 4.15** allein ist schon zu erkennen, dass Theo 19 ähnlich zu MH23 ein Sättigungsverhalten gegen über dem Liganden zeigt.

Theophyllin Konzentration (µM)	Reaktionsrate (nM/min)	Schaltfaktor
-	10	**0**
5	59	**6**
10	96	**9**
25	169	**16**
50	224	**21**
100	349	**33**
200	429	**41**
500	536	**51**
1000	517	**49**

Tabelle 4.15: *Reaktionsraten (nM/min) und Schaltfaktoren, ermittelt im Fluoreszenz-Assay für Theo 19 mit variierender Theophyllin-Konzentration (in µM)*

Zusätzlich wurde das Verhalten von Theo 19 gegenüber dem strukturell verwandten Xanthin-Derivat Coffein untersucht. Die dabei ermittelten Daten sind in **Tabelle 4.16** aufgeführt. Ähnlich zu MH23 kommt es hier ebenfalls zu keiner nennenswerten Aktivierung, sowohl in Ab-, als auch in Anwesenheit des Liganden. Theo 19 ist somit ebenfalls in der Lage, zwischen den beiden strukturell verwandten Xanthin-Derivaten Theophyllin und Coffein zu unterscheiden.

Coffein Konzentration (µM)	Reaktionsrate (nM/min)	Schaltfaktor
-	10,5	**1**
25	10.2	**1**
50	9,8	**1**
100	9,7	**1**
200	10,2	**1**
500	9,6	**1**
1000	9,9	**1**

Tabelle 4.16: *Reaktionsraten (nM/min) und Schaltfaktoren, ermittelt im Fluoreszenz-Assay für Theo 19 mit variierender Coffein-Konzentration (in µM)*

Die tabellarisch aufgeführten Werte der obigen Messungen sind in **Abbildung 4.48** nochmals anschaulich graphisch dargestellt. Die gegen die Theophyllin Konzentration

aufgetragenen Reaktionsraten zeigen die Form einer Sättigungskurve, während unter Coffein keine Reaktion zu verzeichnen ist. Theo 19 ist somit in der Lage, zwischen den beiden verwandten Xanthin-Derivaten zu diskriminieren. Allerdings liegt auch hier der Wert der Diskriminierung weit unter dem des Theophyllin-Aptamer alleine.

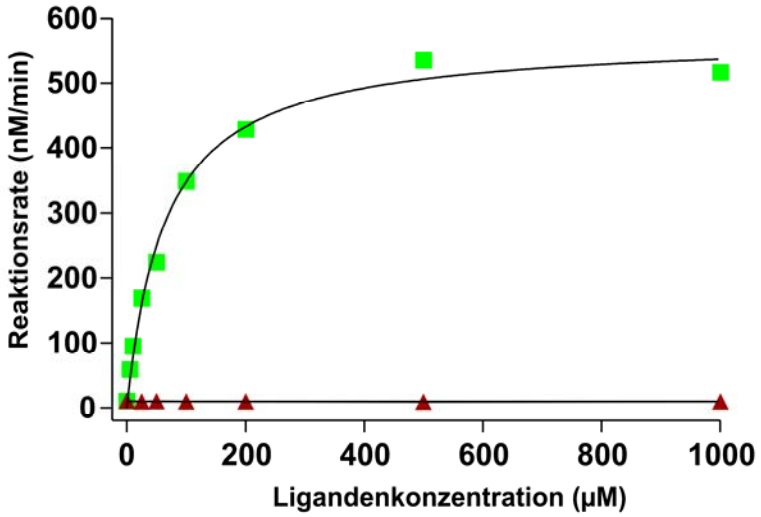


Abbildung 4.48: *Graphische Darstellung der Abhängigkeit von Reaktionsraten (nM/min) gegenüber der Ligandenkonzentration (in µM) von Theo 19 im Fluoreszenz-Assay (grüne Quadrate: Theophyllin, braune Dreiecke: Coffein)*

4.5.11 Reaktion mit freien Reaktanden für Theo 19

Als nächstes musste, ähnlich wie für MH23, die Frage beantwortet werden, ob Theo 19 auch unter Bedingungen echter Katalyse, also mit freien Reaktanden katalytisch aktiv ist und zwischen den beiden verwandten Xanthin-Derivaten unterscheiden kann. Die dem HPLC- und UV-Assay zugrunde liegenden Konzentrationen, Volumina und Durchführung gleichen dabei denen in **Tabelle 4.5** unter Kapitel 4.2.1 und unter Kapitel 3.7 aufgeführten Werten.

4.5.12 UV-Spektrometrische Aktivität von Theo 19

Als erstes wurde die Aktivität von Theo 19 im UV-Assay gemessen. **Abbildung 4.49** zeigt die dabei ermittelten Kurven für Theo 19 in Ab- und Anwesenheit des Liganden Theophyllin, sowie die unkatalysierten Hintergrundreaktionen ohne Ribozym. Auch hier wurde die Abnahme der Absorption des Anthracen-Eduktes über 60 Minuten verfolgt. Man kann auch hier sehr schön die allosterische Aktivierung von Theo 19 durch Theophyllin sehen. Ferner ist die Reaktion von Theo 19 in Abwesenheit des Liganden nahezu auf dem Niveau der unkatalysierten Hintergrundreaktion.

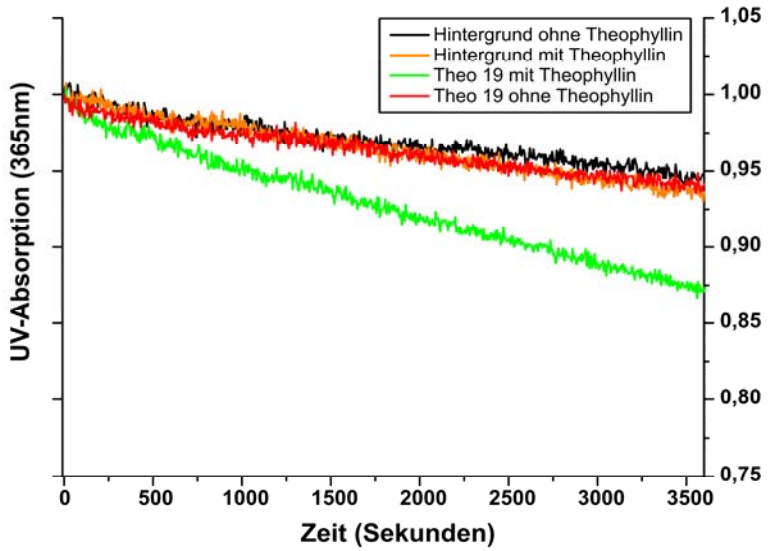


Abbildung 4.49: *UV-Spektrometrischer Assay von Theo 19 bei 365 nm über 60 Minuten (schwarz: Hintergrund ohne Theophyllin, orange: Hintergrund mit Theophyllin, rot: Theo 19 ohne Theophyllin, grün: Theo 19 mit Theophyllin)*

Tabelle 4. zeig die ermittelten Werte, gemessen in Absorptionsabnahme (in %) und der korrespondierenden Reaktionsraten in nM/min. Aus den Rohdaten konnte für Theo 19 ein Schaltfaktor von zwei ermittelt werden. Die zusätzliche Korrektur um die unkatalysierte Hintergrundreaktion ohne RNA ergab letztlich einen Schaltfaktor von fast neun nach 60 Minuten.

Reaktion	Reaktionszeit (min)	Absorptions-abnahme (%)	Reaktionsrate (nM/min)	Schaltfaktor (korrigiert)
Hintergrund	60	5,37	90	---
Hintergrund Theophyllin	60	6,49	108	---
Theo 19	60	6,11	102	**9**
Theo 19 Theophyllin	60	12,83	214	
49mer	60	51,49	858	---

Tabelle 4.17: *Tabellarische Auflistung der Abnahme der UV-Absorption von AHEG in Gegenwart von N-Pentyl-Maleimid bei 365 nm über 60 Minuten in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin, sowie des Diels-Alderase Diels-Alderase Minimalmotivs und Theo 19 in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin. Aus den Absorptionsabnahmen über 60 Minuten konnten die Reaktionsraten in pmol/min ermittelt werden. Der Schaltfaktor für Theo 19 wurde nach Subtraktion der Hintergrundreaktion in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin ermittelt*

4.5.13 HPLC-Assay von Theo 19

In **Abbildung 4.** sind die Chromatogramme nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten für Theo 19 in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin, sowie für die korrespondierenden unkatalysierten Hintergrundreaktionen ohne RNA aufgeführt. Der Produktpeak ist auch hier bei ca. 18 Minuten jeweils durch einen farbigen Punkt markiert. Auf den ersten Blick erkennt man auch hier bereits, dass Theo 19 eindeutig allosterisches Verhalten gegenüber dem Liganden Theophyllin zeigt und die Reaktion von Theo 19 ohne Ligand auf dem gleichen Niveau wie die unkatalysierte Reaktion liegt.

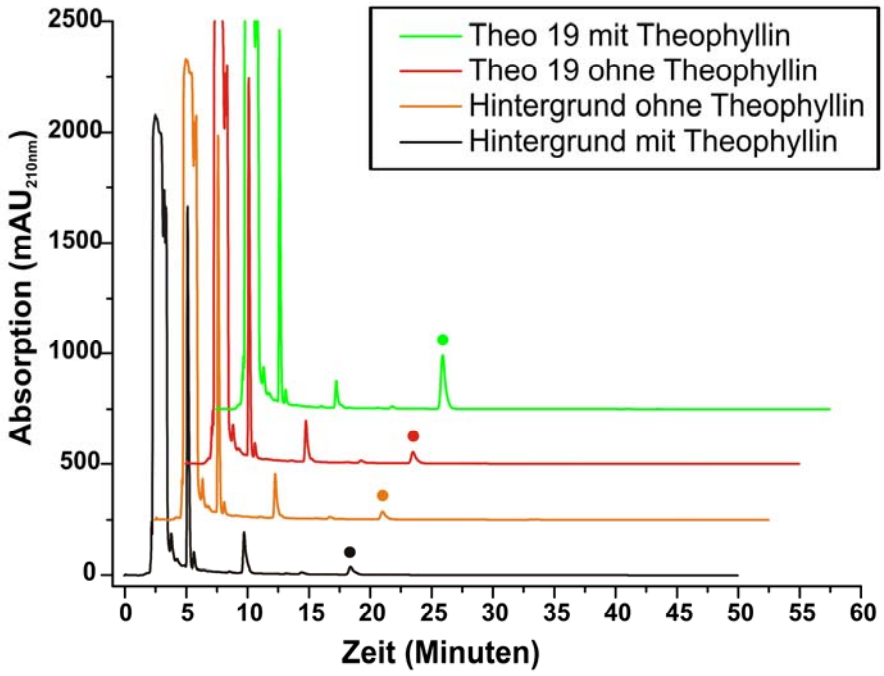


Abbildung 4.50: *HPLC-Chromatogramm zur Detektion des bei der Reaktion zwischen AHEG und N-Pentyl-Maleimid in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin und Theo 19 in Ab- und Anwesenheit von 100 µM Theophyllin nach 60 Minuten Reaktionszeit gebildeten Produktes bei 210 nm. Der Produktpeak ist durch einen farbigen Punkt markiert*

Die Umrechnung der Produktpeaks obiger Reaktionen durch die in **Abbildung 4.7** dargestellte Geradengleichung (seihe Kapitel 4.2.3) lieferte die korrespondierenden Stoffmengen und Reaktionsraten nach jeweils 60 Minuten Reaktionszeit. Die ermittelten Werte sind in **Tabelle 4.18** aufgeführt. Aus den Rohdaten konnte bereits ein Schaltfak-

tor von knapp unter fünf berechnet werden. Nach Korrektur um die unkatalysierten Hintergrundreaktionen ohne RNA ergab sich für Theo 19 ein Schaltfaktor von 15.

Reaktion	Reaktionszeit (min)	mAU (210 nm)	Diels-Alder Produkt (pmol)	Reaktionsrate (nM/min)	Schaltfaktor (korrigiert)
Hintergrund	60	974	270	64	---
Hintergrund Theophyllin	60	983	273	65	---
Theo 19	60	1323	396	94	**15**
Theo 19 Theophyllin	60	6345	2449	583	
49mer	60	10547	4163	991	---

Tabelle 4.18: *Reaktionsraten (nM/min) und Schaltfaktoren nach 60 Minuten für Theo 19 und 49mer, ermittelt nach Auftrennung des Produktpeaks und Auswertung der Produktmenge mittels Kalibrierkurve und Regressionsgrade*

Wie bei MH23, wurden auch für Theo 19 zusätzlich im HPLC-Assay die Anfangsgeschwindigkeiten für die ersten 5 % des Gesamt-Produktumsatzes bestimmt. Die dabei ermittelten Werte sind in **Tabelle 4.19** aufgeführt. Die Umrechnung der Peakflächen wurde auch hier anhand der Geradengleichung aus Kapitel 4.2.3 berechnet. Aus den Daten wird ersichtlich, dass die Reaktionsrate von Theo 19, ähnlich dem UV-Assay nur unwesentlich schneller als die korrespondierenden unkatalysierten Hintergrundreaktionen ist. Die Rohdaten weisen für Theo 19 einen Schaltfaktor von knapp unter sechs auf. Nach Korrektur um die unkatalysierten Hintergrundreaktionen konnte ein Schaltfaktor von 14 ermittelt werden.

Reaktion	mAU (210 nm)	Diels-Alder Produkt (pmol / %)	Reaktionszeit (std:min:sec)	Reaktionsrate (nM/min)	Schaltfaktor (korrigiert)
Hintergrund	1216	352 / 5,3	01:13:01	69	---
Hintergrund Theophyllin	1216	352 / 5,3	01:12:42	69	---
Theo 19	1252	367 / 5,5	00:49:25	106	14
Theo 19 Theophyllin	1201	346 / 5,2	00:08:15	600	
49mer	1313	492 / 5,8	00:00:45	7466	---

Tabelle 4.19: *Reaktionsraten und Schaltfaktoren der ersten 5% Umsatz für Theo 19 und 49mer, ermittelt nach Auftrennung des Produktpeaks und Auswertung der Produktmenge mittels Kalibrierkurve und Regressionsgrade*

Zusammenfassend lässt sich bezüglich des allosterischen Verhaltens von Theo 19 sagen, dass unter den Reaktionsbedingungen mit linkergekoppelten Reaktanden im Fluoreszenz-Assay ein Schaltfaktor von bis zu 50 beobachtet werden konnte. Ferner konnte Theo 19 zwischen den beiden strukturell verwandten Xanthin-Derivaten Theophyllin und Coffein diskriminieren.

Unter den Bedingungen echter Katalyse, also mit freien Reaktanden waren die Reaktionsraten und Schaltfaktoren unter Substratüberschuss nicht so hoch wie für die selbstmodifizierende Reaktion. Dies lässt sich, ähnlich wie für MH23 durch die lokal höhere Konzentration von Substrat gegenüber Ribozym für die linkergekoppelte Reaktion erklären. Dennoch konnte auch unter den Bedingungen echter Katalyse allosterisches Verhalten von Theo 19 gegenüber Theophyllin beobachtet werden.

5 Diskussion

Das Ziel der Arbeit, die Entwicklung und Charakterisierung von allosterisch regulierten Diels-Alder Ribozymen als maßgeschneiderte Biosensoren wurde im Ergebnisteil dieser Arbeit bereits ausführlich dargestellt. Im Detail wurde dabei ein Konstrukt aus einer vorangegangenen allosterischen *in-vitro* Selektion einer RNA-Bibliothek, MH23, in zwei unterschiedlichen Reaktionsformaten anhand von drei verschiedenen analytischen Methoden umfassend charakterisiert. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden in die Konstruktion zwei weiterer RNA-Bibliotheken transferiert. Bei der anschliessenden Selektion und Isolierung der Klone aus dieser konnte leider kein Konstrukt mit allosterischem Verhalten gefunden werden. Im letzten Projekt wurde eine im Arbeitskreis Jäschke vorher entwickelte Methode des rationalen Designs von allosterisch regulierten Diels-Alderase Ribozymen aufgegriffen und weiterentwickelt. Von den insgesamt 21 im Rahmen dieses Projektes generierten Konstrukten wurde der am Stärksten durch Theophyllin aktivierte ebenfalls in den zwei unterschiedlichen Reaktionsformaten und drei verschiedenen analytischen Methoden umfassend charakterisiert.

Allgemein sind auf dem Forschungsfeld der allosterisch regulierten Ribozymen in den letzten 15 Jahren nach Einführung der SELEX-Technologie grosse Fortschritte erzielt wurden. Eine Vielzahl von allosterisch regulierten Ribozymen für unterschiedlichste Liganden konnten realisiert werden. Als Ribozym-Komponente wurde dabei hauptsächlich das Hammerhead-, Hepatitis Delta- oder Ligase-Ribozym verwendet. Die Analytik des dabei generierten Signals beschränkt sich hingegen in meisten Fällen auf einen gelelektrophoretischen Assay.

Die Diels-Alderase katalysiert die Reaktion zwischen einem Anthracen- und Maleimid-Derivat wie oben bereits erwähnt in zwei unterschiedlichen Formaten: sowohl linkergekoppelt, als auch unter Bedingungen echter Katalyse mit freien Reaktanden. Das dabei verwendete Anthracenderivat bietet sich als Fluorophor ausgezeichnet an, um die Reaktion zu verfolgen. Insgesamt stehen dabei drei verschiedene analytische Methoden zur Verfügung: um die Reaktion in Echtzeit zu verfolgen, kann man entweder die Fluoreszenz- oder die UV-Spektrometrie verwenden. Zusätzlich lässt sich die Produktbildung

per HPLC-Chromatographie beobachten. Diese drei grundlegenden analytischen Unterschiede zu den oben erwähnten bisher bekannten allosterisch regulierten Ribozymen machen das Diels-Alder Ribozym zu einem sehr interessanten Untersuchungsobjekt. Dabei konnten sowohl allosterische Regulationsprinzipien des Diels-Alderase Ribozyms im Speziellen, wie auch von Nukleinsäuren im Allgemeinen untersucht werden.

5.1 Charakterisierung von MH23

Die der vorangegangenen allosterischen Selektion von Dr. Mark Helm zugrunde liegende RNA-Bibliothek war nach einem modularen Prinzipien aufgebaut und bestand aus einem Theophyllin-Aptamer- und dem Diels-Alderase Ribozym, welche über einen randomisierten, insgesamt zehn Nukleotide umfassenden Bereich miteinander verbunden waren. Die beiden aus der Selektion isolierten Klone wiesen jeweils ein unterschiedliches Kommunikationsmodul auf. Unter diesen beiden Klonen wurden jeweils noch Mutationen an unterschiedlichen Stellen sowohl im Theophyllin-Aptamer, als auch im Diels-Alderase Ribozym nach der Klonierung vorgefunden. Darüber hinaus verfügte die RNA-Bibliothek während der Selektion über acht zusätzliche Nukleotide am 3'-Ende, die für die Amplifizierung mittels PCR in der Selektion notwendig waren. Ob dieser Überhang einen Einfluss auf das allosterische Verhalten ausübte, galt es zu verstehen. Daraus ergab sich insgesamt eine Kombination von acht verschiedenen RNA-Konstrukten, welche anhand Ihres allosterischen Verhaltens gegenüber Theophyllin im Fluoreszenz-Assay charakterisiert wurden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Sequenzen ohne Mutationen aber mit 3'-Überhanges stärker allosterisch aktiviert wurden als diejenigen ohne Überhang. Für die Sequenzen mit Mutationen ist dies genau umgekehrt.

Obwohl MH48 (mit Mutationen und 3'-Überhang) einen höheren Schaltfaktor als MH23 aufwies, wurde MH23 zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Dies hatte drei Gründe: fehlender 3'-Überhang von acht Nukleotiden, kein Vorhandensein von Mutationen und vor allem aufgrund der niedrigen Reaktionsrate in Abwesenheit von Theophyllin. Letztendlich konnte hingegen die Frage, warum MH48 aufgrund oder trotz des 3'-Überhangs und dem Vorhandensein von Mutationen einen Schaltfaktor von 28 aufweist, nicht eindeutig beantwortet werden.

Die den beiden Sequenzen MH49 und MH23 zugrunde liegenden unterschiedlichen Kommunikationsmodule, sowie das „versatile communication module“ von Kertsburg[162] sind nochmals in **Abbildung 5.1** aufgeführt. Das Kommunikationsmodul von MH23 verfügt über zwei randständige Watson-Crick Basenpaarung zwischen einem Adenosin und Uracil. Bei den 3 zentral gelegenen Nukleotiden liegen Basenfehlpaarungen zwischen jeweils identischen Basen (UCU) vor. Insgesamt ist die Sequenz des Kommmunikationsmoduls als palindromisch zu bezeichnen. Das Kommunikationsmodul von MH48 weist ebenfalls endständige Watson-Crick Basenpaarungen auf. Zusätzlich liegen ein weiteres Watson-Crick Basenpaar, sowie zwei Wobble-Basenpaarungen im zentralen Bereich vor.

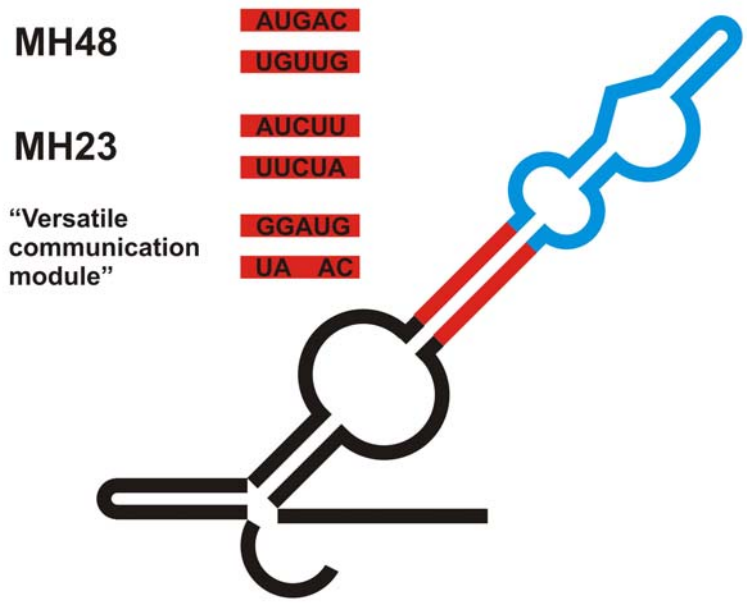


Abbildung 5.1: *Schematische Darstellung der RNA-Bibliothek “TheoComm“ nach erfolgter Selektion[215]*

Vergleicht man die unterschiedliche Struktur der beiden Kommunikationsmodule, so fällt auf, dass bezüglich der Ausbildung von Watson-Crick und Wobble-Basenpaarungen Klon 9 eine wesentlich stabilere Sekundärstruktur gegenüber Klon 5 ausbilden kann.

Bei der allosterischen Regulation von Nukleinsäuren wird die Information, die aus der Bindung des Liganden an das Aptamer resultiert, über das Kommunikationsmodul an

die Ribozym-Komponente übertragen[161, 163, 205]. Dabei kann es entweder zu einer Aktivierung oder Inhibierung der Ribozym-Komponente kommen. Ferner liegt die Aptamer-Komponente in Abwesenheit des Liganden relativ unstrukturiert vor und erfährt erst durch Binden des Liganden ihre endgültige Passform (induced fit)[124-127].

Überträgt man diese Erkenntnisse auf die Diels-Alderase, speziell auf MH23 (Klon 5), dann wird ersichtlich, dass in Abwesenheit des Liganden ein unstrukturiertes Aptamer vorliegt, welches zusätzlich über den relativ instabilen Bereich des Kommunikationsmodules (zentrale Basenfehlpaarungen) mit der Ribozym-Komponente verbunden ist. Diese Unstrukturiertheit im Bereich von Helix 3 könnte die relativ niedrige Reaktionsrate in Abwesenheit des Liganden erklären, da für die Diels-Alderase Aktivität an dieser Stelle des Ribozyms ein Duplex, idealerweise bestehend aus Watson-Crick Basenpaarungen vorhanden sein sollte. Seetharaman *et al.* [166] publizierten 2001 mehrere allosterische Ribozyme, erhalten durch *in-vitro* Selektion, die vergleichbar instabile Kommunikationsmodule enthielten und analog zu MH23 durch Binden des Liganden aktiviert werden. Die von Araki *et al.*[156] mittels rationalem Design konstruierten allosterischen Ribozyme unterstützen ebenfalls diese Hypothese, da diese Ribozyme erst in Anwesenheit des Liganden einen Voll-Duplex im Bereich des Kommunikationsmodules ausbilden und somit aktiv werden. Auch über allosterische *in-vitro* Selektion konnte ein vergleichbares Prinzip gefunden werden. So konnten Soukup *et al.* durch Flavinmononukleotid (FMN) allosterisch regulierte Hammerhead-Ribozyme isolieren, die im Bereich des Kommunikationsmodules einen sogenannten „slip-structure"-Mechanismus aufwiesen[157]. Dabei ist das Kommunikationsmodul zwischen Aptamer und Ribozym von G-U Wobble-Basenpaaren flankiert und nur ca. die Hälfte der zentralen Basenpaare formt Watson-Crick Basenpaare. In Ab- und Anwesenheit des Liganden verschieben sich die beiden gegenüberliegenden Nukleotidstränge des Kommunikationsmodules um jeweils ein Nukleotid und bilden alternative Strukturen aus, wobei die stabilste Konformation jeweils in der Lage ist, das Bindungsereignis durch den Liganden an das Ribozym zu transferieren.

Die anschliessende Charakterisierung von MH23 gegenüber dem Liganden Theophyllin im Fluoreszenz-Assay, sowie im HPLC- und UV-Assay weist grosse Ähnlichkeiten zu anderen allosterisch aktivierten Ribozymen auf[161, 163, 205]. Generell sind dabei die gemessenen Reaktionsraten wie Schaltfaktoren für die linkergekoppelte Reaktion höher

als für die Reaktion mit freien Reaktanden. Im Fluoreszenz-Assay konnte unter selbstmodifizierenden Bedingungen ein Schaltfaktor von maximal 70 verzeichnet werden. In den beiden Reaktionsformaten mit freien Reaktanden konnte nach Korrektur um die unkatalysierten Hintergrundreaktionen für das UV-Assay ein Schaltfaktor von 5 beobachtet werden. Im HPLC-Assay konnte jeweils nach Korrektur um die unkatalysierten Hintergrundreaktionen nach 60 Minuten ein Schaltfaktor von 3 und für die ersten 5 % des Gesamt-Produktumsatzes ein Schaltfaktor von 8 verzeichnet werden.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass im Fluoreszenz-Assay zwar die absolute Konzentration an Substrat (Anthracen) um ein Vielfaches geringer ist (Faktor 50), das lokale Verhältnis zwischen Katalysator (RNA) und Substrat Anthracen aber um einiges höher liegt, da beide kovalent miteinander verbunden sind.

Ferner konnte noch für die linkergekoppelte Reaktion beobachtet werden, dass für MH23 die Reaktionsraten von der Temperatur abhängig sind. So liegen in Abwesenheit von Theophyllin die Reaktionsraten konstant auf gleichem Niveau über den gesamten untersuchten Temperaturbereich von 15 bis 35°C. In Anwesenheit von Theophyllin bricht die Reaktionsrate hingegen oberhalb von 30°C um ca. die Hälfte ein. Bisher sind noch keine Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Temperatur auf allosterisch regulierte Ribozyme bekannt. Erklären lässt sich dieses Phänomen am wahrscheinlichsten durch die Tatsache, dass die *in-vitro* Selektion, aus der MH23 isoliert wurde, im Temperaturbereich von 20 bis 25 °C durchgeführt wurde und das Ribozym somit in diesem Temperaturbereich sein Optimum hat.

MH 23 ist in der Lage, zwischen den beiden strukturell verwandten Xanthin-Derivaten, Theophyllin und Coffein, im Fluoreszenz-Assay um den Faktor 70 zu diskriminieren. Das Theophyllin-Aptamer allein ist in der Lage bis zu 10.000-fach zwischen beiden strukturell verwandten Liganden zu unterscheiden. Dieser grosse Unterschied findet sich auch bei anderen allosterischen Ribozymen mit Theophyllin-Aptamer[161]. Der Grund für den grossen Unterschied lässt sich leicht dadurch erklären, dass bei MH23 nicht primär die Bindungsaffinität des Liganden am Aptamer selber, sondern deren Einfluss auf die katalytische Aktivität des ganzen Systems gemessen wird.

Ein direkter Vergleich von MH23 mit den bisher publizierten allosterischen Ribozyme, die durch Theophyllin aktiviert wurden, zeigt, dass die absoluten Schaltfaktoren und damit Aktivierungen durch den Liganden mit maximal 70 geringer ausfallen[155, 157].

5.2 Allosterische *in vitro* Selektion der Bibliotheken H-I und H-III

Der Aufbau der ersten allosterischen Diels-Alderase Bibliothek, welche durch Dr. Mark Helm im Arbeitskreis Jäschke selektiert wurde, ist in der Literatur als Kommunikationsmodul-Bibliothek beschrieben[157, 216]. Bei der im Anschluss an die Selektion durchgeführten Charakterisierung der aus dieser Bibliothek isolierten Sequenz, MH23, konnte gezeigt werden, dass für die Reaktion mit linkergekoppelten Reaktanden (ebenfalls während der Selektion angewandt)

1) die Reaktionsraten in Abwesenheit von Theophyllin bezogen auf die unkatalysierte Reaktion ohne RNA relativ hoch sind und
2) die Reaktionsraten in Anwesenheit von Theophyllin verglichen mit dem Diels-Alderase Minimalmotiv relativ gering sind.

Ein möglicher Grund für die erste Annahme mag im Vorhandensein des G-C Watson-Crick Basenpaares liegen, welches die beiden internen Schlaufen (Bulge 1 und 2) an Helix 3 schliesst. Es ist bekannt, dass eine geschlossene interne Schlaufe für die katalytische Aktivität des Diels-Alderase Ribozym essentiell ist. Dadurch liesse sich die relativ hohe Reatkionsrate in Abwesenheit von Theophyllin erklären.

Den beiden im Rahmen dieser Arbeit neu konstruierten RNA-Bibliotheken H-I und H-III lag das allgemeine Prinzip zugrunde, dass der Bereich des Kommunikationsmodules bei beiden Bibliotheken bis in den konservierten Bereich von Aptamer- und Ribozym-Komponente erweitert wurde. Dies führt dazu, dass die Ursprungsbibliothek eine grössere Komplexität aufweist und Aptamer und Ribozym nicht in der gesamten Bibliothek voll funktionsfähig vorliegen. Für Bibliothek H-III bedeutete dies konkret, dass oben beschriebenes G-C Watson-Crick Basenpaar innerhalb des randomisierten Bereiches lag. Zusätzlich zu der von Dr. Mark Helm durchgeführten Selektion wurde eine stringentere Negativselektion bei jeder Selektionsrunde durchgeführt, was die konstitutiv aktiven und Theophyllin-unabhängigen RNA-Spezies aus der Bibliothek entfernen sollte.

Bei der Fluoreszenz-Messung in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin vor der allosterischen Selektion konnte festgestellt werden, dass beide Bibliotheken jeweils eine relativ hohe konstitutiv vorhandene Diels-Alderase Aktivität haben. Ein allosterisches Ver-

halten gegenüber dem Liganden war hingegen für beide Bibliotheken nicht vorhanden. Ziel der Selektion sollte somit sein, die konstitutiv aktiven, aber Theophyllin-unabahängigen RNA-Spezies aus der Bibliothek zu entfernen und im gleichen Atemzug die Theophyllin-abhängigen anzureichern.

Die eigentliche Durchführung der Selektion wurde insgesamt über sieben Runden für Bibliothek H-I und sechs Runden für Bibliothek H-III durchgeführt. Anhand des dabei erhaltenen Selektionsprofils konnte nur für Bibliothek H-I eine Anreicherung von Theophyllin-abhängigen RNA-Spezies in der Positivselektion verzeichnet werden, und dies auch nur kontinuierlich über die durchgeführten Runden. Der Anteil der während der Negativselektion immobilisierten RNA-Spezies blieb nahezu konstant über alle Selektionsrunden. Diese Art des Anstieges ist für eine Selektion eher untypisch, da es idealerweise zu einer exponentiellen Anreicherung kommen sollte - wie auch im Fall der Selektion des Diels-Alderase-Ribozyms[46].

Das Selektionsprofil von Bibliothek H-III wies keinen Anstieg an Theophyllin-abhängigen RNA-Spezies während der Positivselektion auf. Ferner konnte sogar ein Anstieg der Theophyllin-unabhängigen RNA-Spezies in der Negativselektion über sechs Selektionsrunden beobachtet werden. Somit wurden die konstitutiv aktiven RNA-Spezies in Bibliothek H-III tendenziell eher angereichert.

Bei der Messung der katalytischen Aktivitäten beider Bibliotheken nach erfolgter Selektion im Fluoreszenz- und Immobilisierungs-Assay, jeweils in Ab- und Anwesenheit des Liganden konnte zwar im Immobilisierungs-, nicht aber im Fluoreszenz-Assay allosterisches Verhalten festgestellt werden. Der Widerspruch zwischen beiden analytischen Methoden konnte auch nach Durchführung von Kontrollexperimenten nicht plausibel erklärt werden. Eine mögliche Erklärung dafür mag sein, dass es sich bei der vermessenen RNA um Bibliotheken, also eine Sammlung von unterschiedlichen Sequenzen handelt. Zusätzlich lag der Gesamtumsatz im Fluoreszenz-Assay für Bibliothek H-I um ca. 20 %, für Bibliothek H-III um ca. 15 % niedriger als vor der Selektion. Es fand somit für beide Bibliotheken eine Abreicherung an Theophyllin-unabhängigen RNA-Spezies mit konstitutiver Diels-Alderase Aktivität durch die Selektion statt.

Die bei der anschliessenden Klonierung und Sequenzierung isolierten RNA-Spezies der beiden Bibliotheken H-I und H-III wurden Mutationen und zusätzlich auch Deletionen gefunden. Das Ausmaß und die Menge war dabei weitaus grösser als bei den acht aus

der Selektion von Dr. Mark Helm isolierten Sequenzen. Bei der Untersuchung der Sequenzen aus den Bibliotheken H-I und H-III konnte wie für die Bibliotheken selber kein allosterisches Verhalten im Fluoreszenz-Assay festgestellt werden.

Fasst man die Ergebnisse beider Selektionen zusammen, so fällt auf, dass die einzelnen Sequenzen zwar kein allosterisches Verhalten aufweisen, aber durchaus über signifikante Diels-Alderase Aktivität verfügen. Desweiteren war die Gesamtaktivität beider Bibliotheken nach erfolgter Selektion geringer als vorher. Es konnte durch das veränderte Selektionsschema somit gewährleistet werden, dass konstitutiv aktive RNA-Spezies aus den Bibliotheken entfernt wurden. Beiden Bibliotheken beinhalteten im Vergleich zu der Bibliothek von Dr. Mark Helm nur zu einem Teil Sequenzen, die in der Lage waren, Theophyllin zu binden. Da die Negativselektion nur zwischen Sequenzen unterscheiden kann, die über eine Diels-Aderase Aktivität oder nicht verfügen, ist es gut möglich, dass auch die Sequenzen, die in der Lage waren, Theophyllin zu binden, aus der Bibliothek entfernt wurden. Bei der Selektion von Dr. Mark Helm hätte dieses grosse Ausmass der Gegenselektion keine Rolle gespielt, da alle Sequenzen prinzipiell in der Lage waren, Theophyllin zu binden. Als mögliche Erklärung für das nicht vorhandene allosterische Verhalten der Sequenzen aus beiden Bibliotheken lässt sich somit die Kombination au dem Design der Bibliotheken zusammen mit dem grossen Ausmass an Negativselektion anführen, welches zur Elimination der Sequenzen führte, die den Liganden binden können.

5.3 Rationales Design allosterischer Diels-Alderase Ribozyme

Seit ca. 2003 liefen im Arbeitskreis Jäschke Untersuchungen, allosterisch regulierte Diels-Alderase Ribozyme mittels rationalen Designs zu generieren. Im Jahre 2006 konnten mehrere Konstrukte generiert werden, die durch unterschiedliche Aptamer-Komponenten bis zu 2100-fach durch den entsprechenden Liganden aktiviert wurden[207]. Das dabei aufgegriffene Konzept unterscheidet sich grundlegend von den bisher bekannten Ansätzen des rationalen Designs, da prinzipiell alle Bereiche des Aptamer-Ribozym Konstruktes involviert sind, welche aufgrund schwacher Konservierung für Modifikationen zugänglich sind. Wie schon in der Einleitung ausführlich dargestellt, wurden die ersten rational konstruierten allosterischen Ribozyme ab 1995 durch Porta[151], Breaker[155] und Araki[156] hauptsächlich an Hammerhead Ribozymen realisiert. Dass dabei zugrunde liegende rationale Design beschränkte sich einzig auf Variationen in der Länge und Zusammensetzung einer Helix, dem Kommunikationsmodul zwischen Aptamer- und Ribozym-Komponente. Durch systematisches trial and error konnten so Schaltfaktoren von 10 bis 180 erreicht werden [155, 156]. Dieser grundlegende strukturelle Aufbau eines allosterischen Ribozyms, bestehend aus den drei Teilen: Aptamer, Kommunikationsmodul und Ribozym wurde danach auch in RNA-Bibliotheken zum Einsatz in allosterischen *in-vitro* Selektionen erfolgreich verwendet[157].

Das im Arbeitskreis Jäschke realisierte Konzept des rationalen Designs macht sich die Tatsache zu Nutze, dass schwach konservierte Nukleotide sowohl in der Aptamer- als auch der Ribozym-Komponenten ausgetauscht werden können, um in Abwesenheit des Liganden inaktive Sekundärstrukturen durch alternative Basenpaarungen auszubilden. Die aktive und inaktive Konformation unterliegen dabei einer Gleichgewichtsreaktion, welche durch die Ab- oder Anwesenheit des Liganden unmittelbar beeinflusst wird. Bei den ersten Konstrukten wurde das Diels-Alderase Ribozym mit verschiedenen Aptamer-Komponenten über Helix 3 kovalent verbunden. Durch den gezielten Austausch von schwach konservierten Bereichen in der Aptamer- und Ribozym-Komponente konnten unterschiedliche Konstrukte generiert werden, die anschliessend im Fluoreszenz-Assay

auf deren allosterisches Verhalten gegenüber den jeweiligen Liganden getestet wurden[207].

Dieses Prinzip wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgegriffen und weiterentwickelt. Bei den dabei generierten Konstrukten wurde das Diels-Alderase-Ribozym im Gegensatz zu obigem Ansatz über Helix 1 mit einem Theophyllin-Aptamer verknüpft. Diese Strategie bot sich aufgrund der räumlichen Nähe von Helix 1 zur Bindungstasche und deren Einfluss auf die katalytische Aktivität an.

Durch systematisches Austauschen und Einfügen von Nukleotiden an der

1. Verknüpfung zwischen Aptamer und Ribozym (über Helix 1),
2. der Länge und Zusammensetzung von Helix 3 des Diels-Alderase Ribozyms,
3. sowie durch Einfügen von Nukleotiden in das Theophyllin-Aptamer

konnten insgesamt 21 Konstrukte realisiert und im Fluoreszenz-Assay auf deren allosterisches Verhalten gegenüber Theophyllin untersucht werden. In dem durch „trial and error“ gekennzeichneten Prozess konnte letztlich ein Konstrukt, Theo 19, beschrieben werden, welches in Anwesenheit von Theophyllin bis um den Faktor 50 aktiviert wurde. Die anschliessende umfassende Charakterisierung für Theo 19 wurde, ähnlich wie für MH23, für die Reaktion mit linkergekoppelten Reaktanden, als auch mit freien Reaktanden durchgeführt. In beiden Reaktionsformaten war Theo 19 katalytisch aktiv und zeigte eindeutig allosterisches Verhalten gegenüber Theophyllin. Die erhaltenen Schaltfaktoren waren wie für MH23 in der Reaktion mit linkergekoppelten Reaktanden höher als in der Reaktion mit freien Reaktanden. So wurde für Theo 19 im Fluoreszenz-Assay ein maximaler Schaltfaktor von 50 durch Theophyllin beobachtet. Das UV-Assay zeigte nach Korrektur um die unkatalysierten Hintergrundreaktionen ein Schaltfaktor von 9. Im HPLC-Assay wurde ebenfalls nach Korrektur um die Hintergrundreaktionen ein Schaltfaktor von 15 über 60 Minuten Reaktionszeit und ein Schaltfaktor von 14 für die ersten 5 % des Gesamt-Produktumsatzes verzeichnet. Ferner konnte Theo 19 ebenfalls zwischen den beiden strukturell verwandten Xanthin-Derivaten, Theophyllin und Coffein unterscheiden.

Ein unmittelbarer Vergleich der Aktivitäten für die Reaktion mit linkergekoppelten Reaktanden zeigt, dass Theo 19 mit den bisher rational generierten Hammerhead-Konstrukten bei gleicher Liganden-Konzentration weitaus niedrigere Schaltfaktoren aufweist[155]. Für die Reaktion mit einem Überschuss an freien Reaktanden gegenüber

Ribozym weist Theo 19 higegen vergleichbare Schaltfaktoren auf[156]. Es bleibt bei diesen Vergleichen hingegen anzumerken, dass alle bisherigen allosterischen Ribozyme entweder Hammerhead- oder Ligase-Ribozyme sind. Die damit verbundenen prinzipiellen Unterschiede zum Diels-Alderase Ribozym ergeben sich daraus, dass diese Ribozyme allein Phosphodiesterbindungen spalten oder knüpfen.

Vergleicht man das rationale Design mit der Methode der *in-vitro* Selektion zur Generierung allosterischer Diels-Alderase Ribozyme, so stellt das rationale Design bezogen auf den Material- und Zeitaufwand die elegantere und effektivere Methode dar. Interessant ist hingegen, dass die erhaltenen Schaltfaktoren in der Reaktion mit freien Reaktanden für Theo 19 um den Faktor 3 höher sind als für MH23. Eine Erklärung dafür mag darin liegen, dass bei Theo 19 das Theophyllin-Aptamer über Helix 1 mit der Ribozym-Komponente verknüpft ist und diese einen grösseren Einfluss auf die katalytische Aktivität des Ribozyms hat. Im Gegensatz dazu weist Theo 19 für die linkergekoppelte Reaktion einen niedrigeren Schaltfaktor als MH23 auf.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Methode des rationalen Designs eine sehr vielseitige Methode darstellt und es ermöglicht, in einem überschaubareren Zeitrahmen allosterische Diels-Alderase Ribozyme zu generieren. Das dieser Methode zu Grunde liegende Prinzip ist dabei gänzlich anders als für bisher beschriebene, rational generierte allosterische Ribozyme und durchaus konkurrenzfähig.

6 Ausblick

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung von allosterisch regulierten Diels-Alder Ribozymen als maßgeschneiderte Biosensoren zur potentiellen Anwendung in der Arzneistoffanalytik.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es generell möglich ist, allosterisch regulierte Diels-Alderase-Ribozyme zu generieren. Die allosterische Aktivierung konnte strukturell sowohl über Helix 1, wie auch über Helix 3 des Diels-Alderase Ribozyms erreicht werden. Die dabei eingesetzten Methoden der allosterischen *in vitro*-Selektion und des im Arbeitskreis Jäschke entwickelten rationalen Designs lassen dabei weitere Variationen der Aptamer-Komponente an beiden Helices ohne weiteres zu. Die beiden im Rahmen dieser Arbeit generierten „Winner-Sequenzen“ MH23 und Theo19 zeigten allosterisches Verhalten sowohl unter selbstmodifizierenden Bedingungen mit linkergekoppelten Reaktanden, wie auch unter Bedingungen echter Katalyse mit freien Reaktanden. Die dabei erhaltenen Schaltfaktoren für beide Sequenzen waren hingegen jeweils grösser für die selbstmodifizierende Reaktion mit linkergekoppelten Reaktanden.

Rein formal betrachtet sollte die Methode der allosterischen *in-vitro* Selektion dem rationalen Design aufgrund der grösseren Anzahl an potentiell vorhandenen Sequenzen in der ursprünglichen RNA-Bibliothek überlegen sein. Vergleicht man hingegen die beiden eingesetzten Methoden anhand der katalytischen Eigenschaften der dabei generierten „Winner-Sequenzen“, so steht das rationale Design der Methode der *in-vitro* Selektion keinesfalls nach. Vielmehr ist die Methode des rationalen Designs in kürzerer Zeit, wie unter geringerem experimentellen Aufwand durchzuführen.

Zusätzlich bleibt festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit unter den modifizierten Selektionsbedingungen kein ausreichend allosterisch reguliertes Diels-Alder Ribozym isoliert werden konnte. Der Grund dafür mag in der Stringenz der Gegenselektion liegen. Zu dieser Hypothese würde passen, dass letztendlich wenige Sequenzen isoliert wurden, die zwar eine sehr hohe Diels-Alderase Aktivität aufweisen, allosterisch hingegen weitestgehend inaktiv sind. Eine weitere Alternative unter Beibehaltung der ange-

wandten Selektionstrategie könnte folgendermassen aussehen: Konstruktion einer RNA-Bibliothek auf Basis eines katalytisch intakten Diels-Alder Ribozyms mit einem ca. 40-50 Nukleotide grossen randomisierten Bereich, der wahlweise über Helix 1 oder Helix 3 verknüpft ist. Der strukturelle Aufbau würde Aptamer und Kommunikationsmodul im randomisierten Bereich beidermassen einschliessen. Der Aufbau der RNA-Bibliothek wäre somit grundlegend verschieden zur bisherigen, bei der der randomisierte Bereich aus einem randomisierten Kommunikationsmodul zwischen beiden Domänen besteht. Diese Vorgehensweise ist nicht neu, das Design lehnt sich an die Vorgehensweise von Robertson *et al.* an[159], die auf diese Weise erfolgreich allosterisch regulierte Ligase-Ribozyme isolieren konnten. Die dabei isolierten allosterischen Ribozyme wiesen in Abwesenheit des Liganden sehr geringe katalytische Aktivität auf. Ein weiterer Vorteil der Variante liegt in der Tatsache begründet, dass man bei der Wahl der Aptamer-Komponente in keinerlei Weise beschränkt ist, da das Aptamer gleichzeitig mit-selektiert wird.

Ein weiterer Aspekt wäre die Konstruktion von sogenannten Doppelschaltern auf Basis der bisher bekannten allosterisch regulierten Diels-Alderase Ribozyme. Doppelschalter bestehen per Definition aus einer Ribozym- und mindestens zwei Aptamer-Komponenten, die auch unterschiedliche Liganden binden können. Diese Konstrukte wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben[168, 169, 172, 214, 217]. Beinhalten diese Schalter zwei verschiedene Aptamer-Komponenten, so sind Sie in der Lage, die beiden Liganden unabhängig voneinander zu detektieren. Eine potentielle Anwendung dafür ergäbe sich in Form von logischen Schaltungen, welche logische Verknüpfungen durchführen können.

Übertragen auf die Diels-Alderase bedeutet dies, dass zwei Aptamere über Helix 1 und Helix 3 mit einem Diels-Alderase Ribozym verbunden wären. Helix 3 bietet bereits mit MH23 eine Möglichkeit, die Diels-Alderase durch Theophyllin allosterisch zu aktivieren, ohne dabei auf andere Bereiche des Ribozyms zurückgreifen zu müssen. An Helix 1 konnte die Diels-Alderase bisher nur durch rationales Design allosterisch aktiviert werden, was nicht-konservierte Nukleotide in Helix 3 involviert. Voraussetzung für einen Doppelschalter wäre somit zuerst eine erfolgreiche allosterische Selektion an Helix 1, um eine unabhängige Kontrolle beider Helices in einem Molekül zu realisieren.

Eine Erweiterung des Leistungsspektrums könnte man durch Immobilisierung eines allosterischen Diels-Alderase Ribozyms auf eine inerte Agarose Matrix über das 3'-Ende realisieren[218]. Hierzu würde sich Theo 19 mit einer 15-fachen Aktivierung durch den Analyten Theophyllin besonders anbieten, da es sich dabei um die Reaktion mit freien Reaktanden (Anthracen und Maleimid) handelt und die Auswertung anhand der Produktbildung erfolgt.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

ε	molarer Extinktionskoeffizient
A	Adenosin
abs.	absolut
ADEG	Anthracendecaethylenglycol-Guanosin
APEG	Anthracenpolyethylenglycol-Guanosin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Biotin-Maleimid
BSA	Rinderserumalbumin
BTT	Benzylthiotetrazol
c	Konzentration
C	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA
cend	Endkonzentration
Ci	Curie, 1Ci = 37 MBq
cm	Zentimeter
cpm	Zählimpulse pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
d	Schichtdicke (der Küvette)
DC	Dünnschichtchromatographie
DEG	Decaethylenglycol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eq	Äquivalent
g	Gramm
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropylthio-β,D-galactopyranosid
kapp	scheinbare Geschwindigkeitskonstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Meter

M	mol/l, molar
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute
mJ	Millijoule
NaOAc	Natriumacetatlösung
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
NPM	N-Pentyl-Maleimid
ns	Nanosekunde
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD260	optische Dichte bei $\lambda = 260$ nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP-HPLC	reversed-phase HPLC
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
ssDNA/RNA	einzelsträngige DNA/RNA
t	Zeit
T	Thymidin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris Borat EDTA-(Puffer)
TEA	Triethylamin
TEAAc	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	Transfer-RNA
U	Units, Uridin
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
vini	Anfangsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β,D-galactopyranosid

7.2 Geräte

Autoklav	Sterico AG
Elektrophoresekammern	Bio-Rad, MINI SUB™ DNA CELL, Eigenbau für PAGE
Expositionskassetten	Kodak X-Omatic
Fluoreszenzspektrometer	Jasco FP 6500
Fluoreszenzküvetten	Quarzglas SUPRASIL, HELLMA
Geldokumentationsanlage	Alphaimager 2200, Alphainnotec
HPLC-Anlage	Agilent Technologies, Serie 1100
HPLC-Säulen	- Luna 80 C18, 5µm, 250x4.6 mm, Phenomenex - TSKgel G3000 SWXL, 5mm, 300 x 7.8mm Tosohaas
HPLC-Radioflowdetektor	Berthold LB 509
MALDI-Massenspektrometer	Bruker Reflex
Mikrozentrifugenfilter	Pall Nanosep MF, Ø 0,45 µM
NMR-Spektrometer	Bruker A250, Bruker AMX500
PCR-Geräte	MJ Research PTC 100, PTC 200
pH-Meter	MP 220 Mettler Toledo
Phosphorimager	Typhoon 9400, Molecular Dynamics
Pipetten	Abimed P2, P20, P200, P1000
Reaktionsgefäße, silikonisiert	Biozym, Carl-Roth
Reinstwasseranlage	Milli-Q, Millipore
Röntgenfilme	Fuji, Medical X-ray Film RXOG (Safety)
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein
Spannungsgeber	Pharmacia, ECPS 3000/150 und 500/400
Sterilfiltrationsanlage	Steriflip Millipore
Szintillationszähler	Beckman LS 6500
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer 5436
UV-Küvetten	Quarzglas SUPRASIL, HELLMA
UV-Lampe	254 nm, 300 × 200 mm Carl Roth
UV/Vis-Spektrometer	Ultrospac 2100 pro, Nanodrop ND-1000, Varian Cary 50, Varian Cary 100
Vakuumzentrifuge	Speed Vac Concentrator
Waagen	Mettler AE 163 und AC 88; Sartorius
Wasserbäder	Thermo Haake; Heidolph HBR 2
Zentrifugen	Hettich Mikro 120, Eppendorf 5804R

7.3 Puffer

HPLC-Puffer A
0.1 M TEAAc pH 7.0

HPLC-Puffer B
0.1 M TEAAc pH 7.0
80 % Acetonitril

10x *Taq*-Puffer
200 mM Tris-HCl pH 8.4
500 mM KCl

10x W'-Transkriptionspuffer
800 mM HEPES, pH 7.5
220 mM MgCl2
10 mM Spermidin

5x DA-Puffer
30 mM Tris-HCl pH 7.4
300 mM NaCl
20 mM MgCl2
mit HCl eingestellt

5x-First Strand Buffer (RT)
250 mM Tris-HCl pH 8.3
375 mM KCl
15 mM MgCl2

TBE-Puffer
89 mM Tris-HCl, pH 7.5
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

Ligase-Puffer (10x)
500 mM HEPES-NaOH pH 8.3
100 mM MgCl2
1 mM ATP

Probenpuffer, nativ (Agarosegel)
0.25 % Xylencyanol FF
0.25 % Bromphenolblau
30 % Glycerol

PAGE-Ladepuffer (denaturierend)
90 % Formamid
10 % 1x TBE
je eine Spatepspitze Xylencyanol und Bromphenolblau

Immobilisierungspuffer
1 M NaCl
5 mM EDTA
10 mM HEPES pH 7.2
mit HCl eingestellt

Waschpuffer
8 M Harnstoff
0.1 M Tris-HCl pH 7.4

LB-Medium
20 g LB-Broth
ad 1 l Wasser, autoklavieren, bei 4 °C lagern, vor Benutzung:
100 µg/ml Ampicillin

LB-Agarplatten
17.5 g LB-Agar (Lennox-Agar)
ad 500 ml Wasser, autoklavieren, bei ca. 55 °C:
100 µg/ml Ampicillin
50 µM IPTG
80 µg/ml X-gal
- in sterile Petrischalen gießen, bei 4 °C lagern

7.4 Enzyme

SuperScript™ II RNase H- RT	Invitrogen
Taq-Polymerase	Rapidozym
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T7-RNA-Polymerase	MBI Fermentas

7.5 Sonstige Materialien

100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas
Ultra Low Range Leiter	MBI Fermentas
Kieselgel-DC-Platten	Carl-Roth
NAP5-Säulen	Amersham
PCR Cloning Kit	Qiagen
TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Ultrafree®-DA Filter	Millipore

7.6 Fluoreszenzspektrometrische Kurven

7.6.1 Sequenzen aus vorangegangener allosterischer Selektion

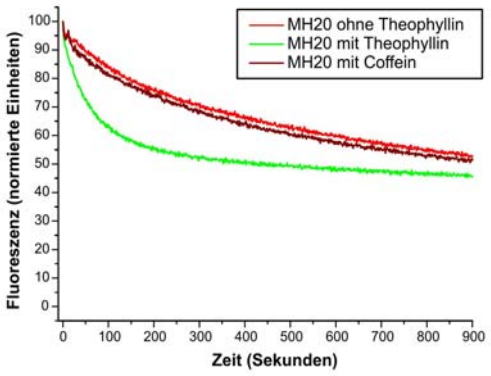


Abbildung 7.1: *Fluoreszenzkurve von MH20*

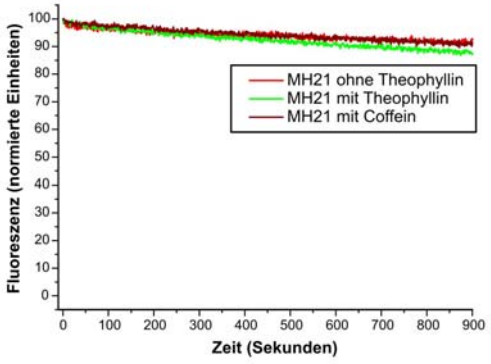


Abbildung 7.2: *Fluoreszenzkurve von MH21*

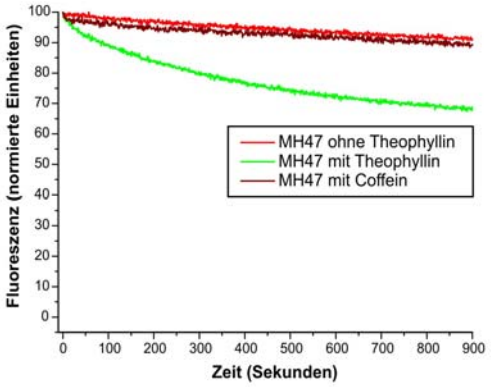


Abbildung 7.3: *Fluoreszenzkurve von MH47*

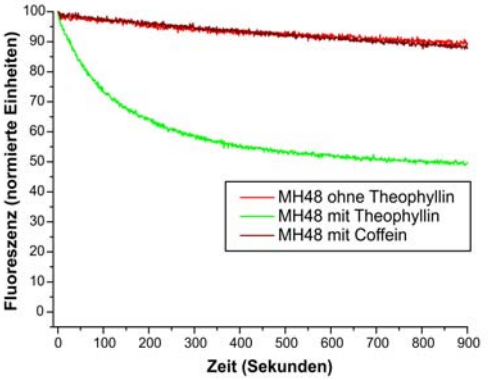


Abbildung 7.4: *Fluoreszenzkurve von MH48*

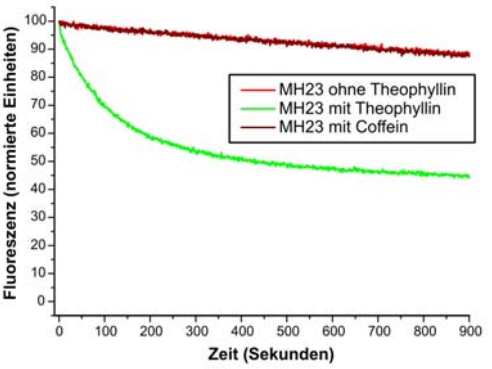


Abbildung 7.5:*Fluoreszenzkurve von MH23*

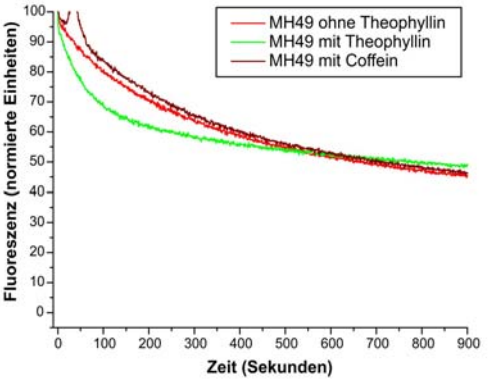


Abbildung 7.6: *Fluoreszenzkurve von MH49*

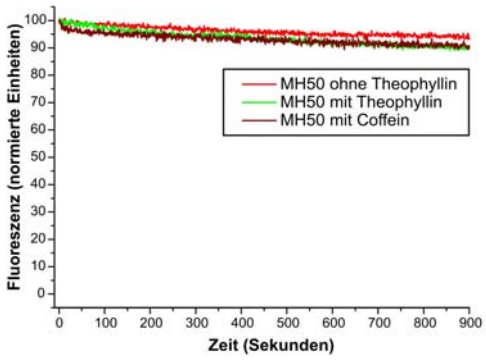


Abbildung 7.7: *Fluoreszenzkurve von MH50*

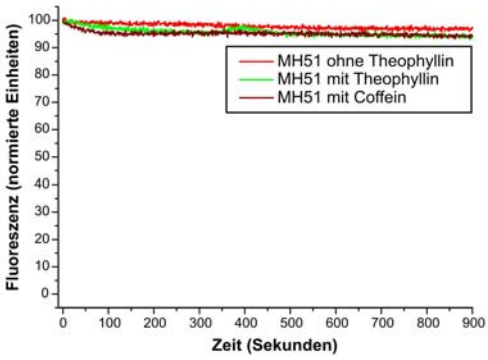


Abbildung 7.8: *Fluoreszenzkurve von MH51*

7.6.2 RNA-Bibliotheken vor allosterischer Selektion

Die Kurven sind im Kapitel Ergebnisse bereits komplett dargestellt.

7.6.3 RNA-Bibliotheken nach allosterischer Selektion

Die Kurven sind im Kapitel Ergebnisse bereits komplett dargestellt.

7.6.4 Klone nach allosterischer Selektion aus RNA-Bibliothek H-I

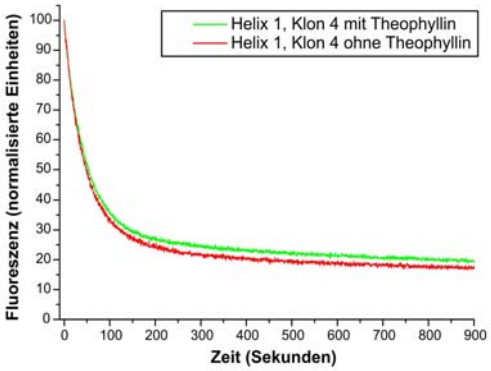


Abbildung 7.9: *Fluoreszenzkurve von Klon 4 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

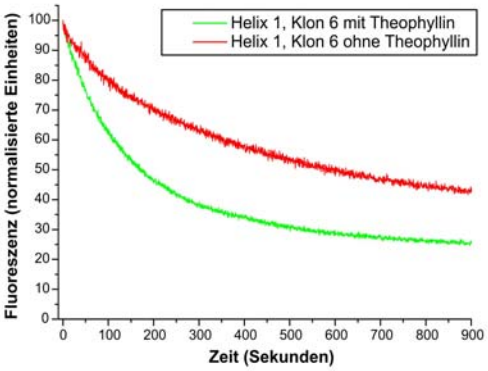


Abbildung 7.10: *Fluoreszenzkurve von Klon 6 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

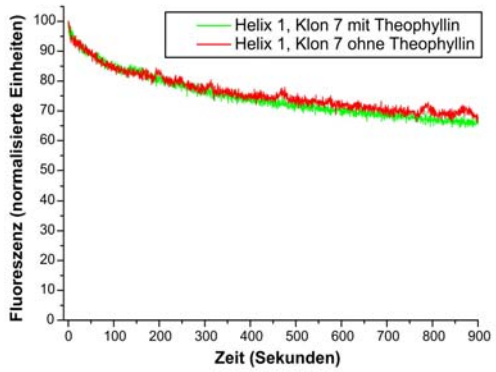


Abbildung 7.11: *Fluoreszenzkurve von Klon 7 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

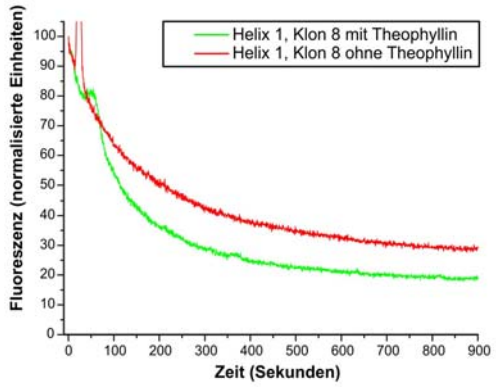


Abbildung 7.12: *Fluoreszenzkurve von Klon 8 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

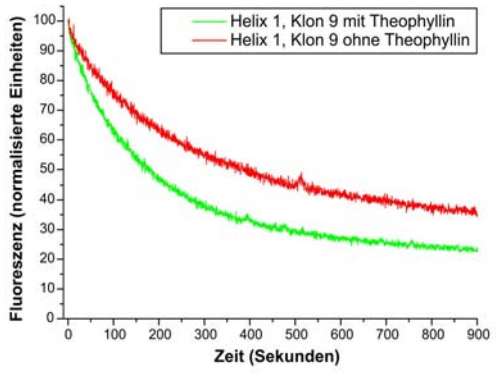


Abbildung 7.13: *Fluoreszenzkurve von Klon 9 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

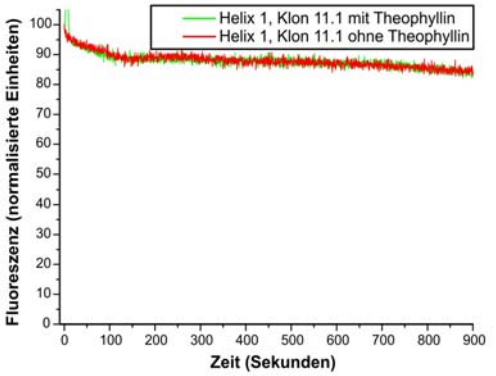


Abbildung 7.14: *Fluoreszenzkurve von Klon 11.1 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

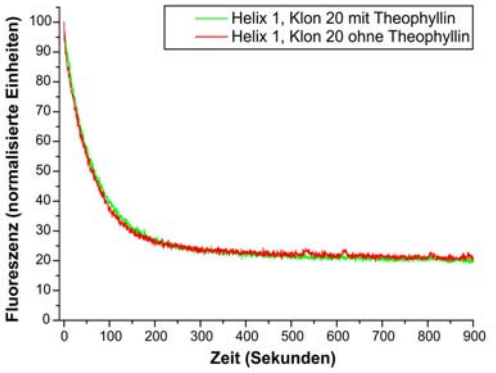


Abbildung 7.15: *Fluoreszenzkurve von Klon 20 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

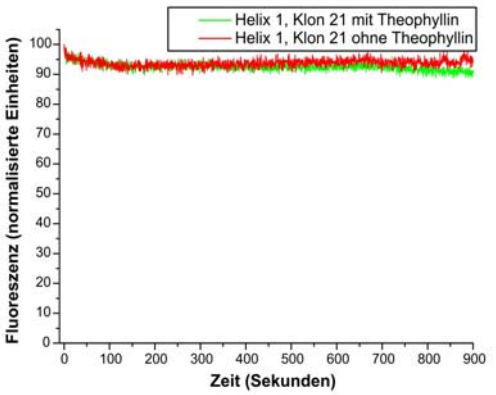


Abbildung 7.16: *Fluoreszenzkurve von Klon 21 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

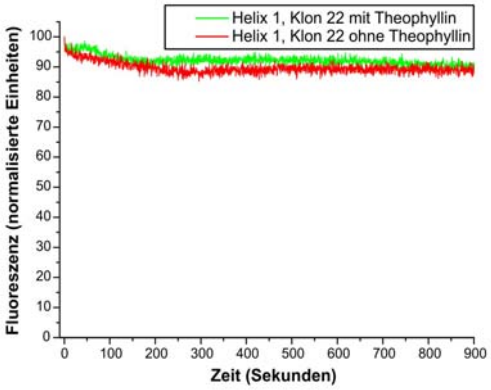


Abbildung 7.17: *Fluoreszenzkurve von Klon 22 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

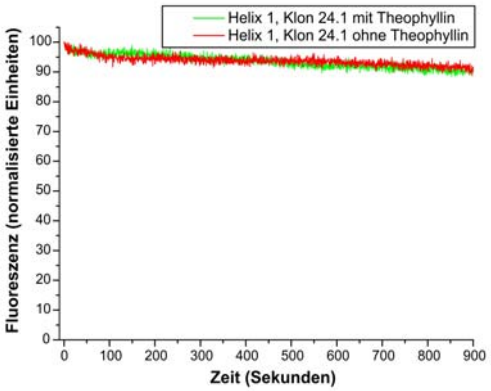


Abbildung 7.18: *Fluoreszenzkurve von Klon 24.1 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

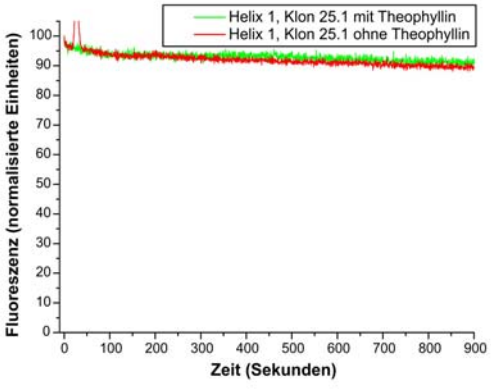


Abbildung 7.19: *Fluoreszenzkurve von Klon 25.1 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

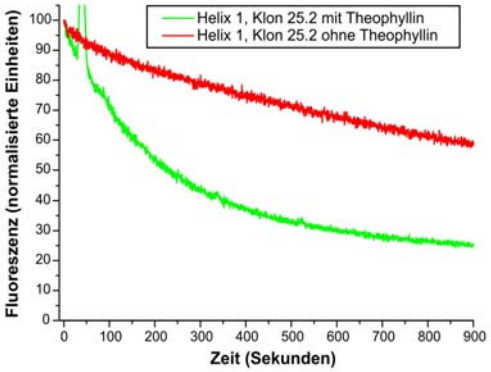


Abbildung 7.20: *Fluoreszenzkurve von Klon 25.2 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

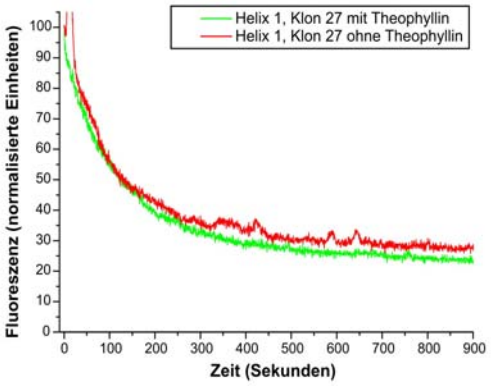


Abbildung 7.21: *Fluoreszenzkurve von Klon 27 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

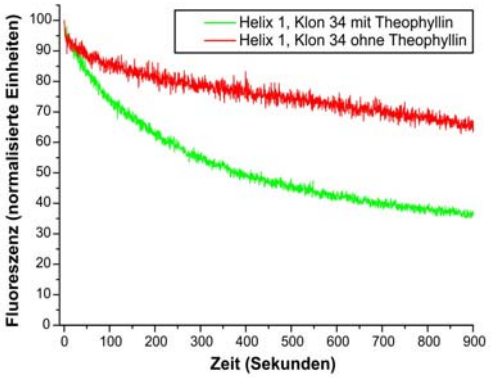


Abbildung 7.22: *Fluoreszenzkurve von Klon 34 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

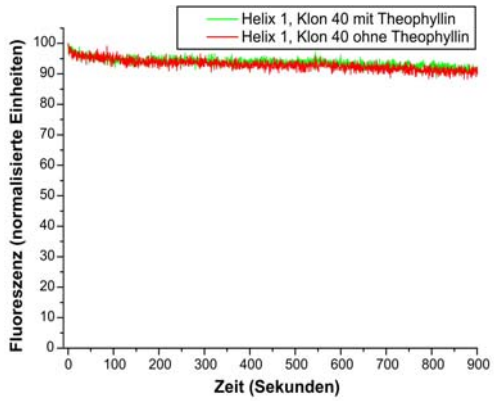


Abbildung 7.23: *Fluoreszenzkurve von Klon 40 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

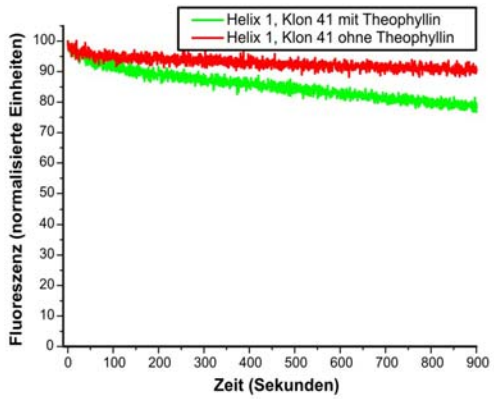


Abbildung 7.24: *Fluoreszenzkurve von Klon 41 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

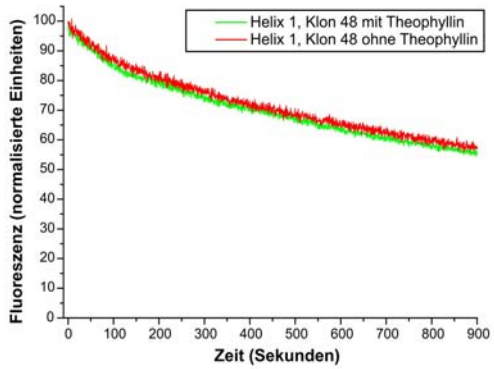


Abbildung 7.25: *Fluoreszenzkurve von Klon 48 aus RNA-Bibliothek Helix 1*

7.6.5 Klone nach allosterischer Selektion aus RNA-Bibliothek H-III

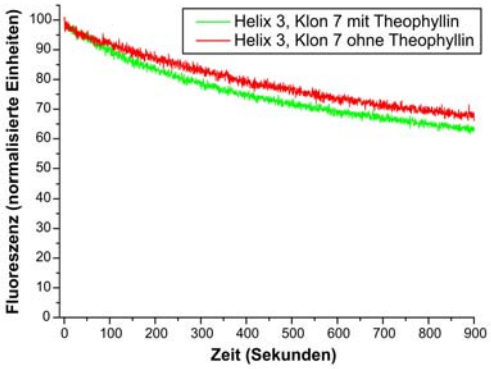


Abbildung 7.26: *Fluoreszenzkurve von Klon 7 aus RNA-Bibliothek Helix 3*

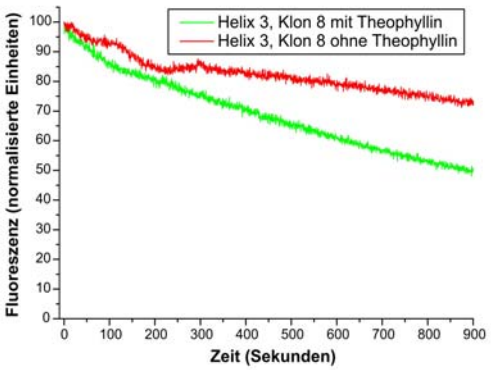


Abbildung 7.27: *Fluoreszenzkurve von Klon 8 aus RNA-Bibliothek Helix 3*

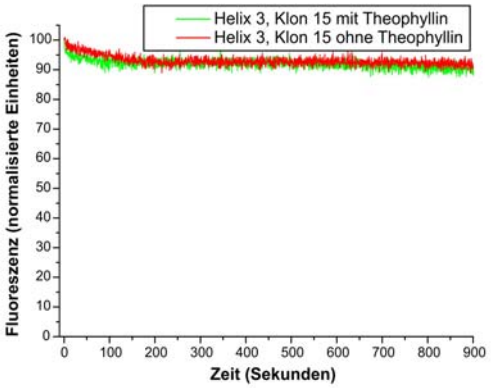


Abbildung 7.28: *Fluoreszenzkurve von Klon 15 aus RNA-Bibliothek Helix 3*

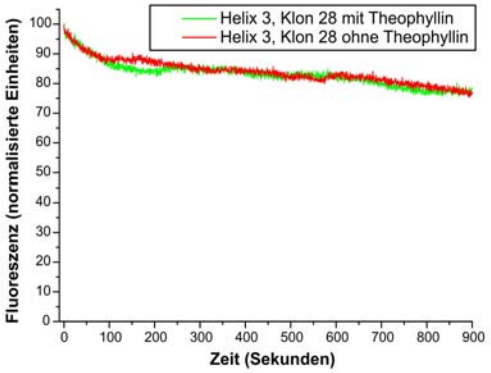


Abbildung 7.29: *Fluoreszenzkurve von Klon 28 aus RNA-Bibliothek Helix 3*

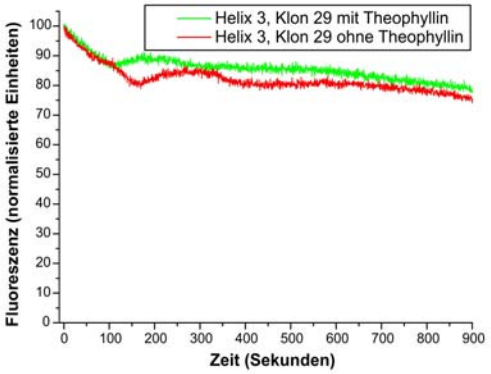


Abbildung 7.30: *Fluoreszenzkurve von Klon 29 aus RNA-Bibliothek Helix 3*

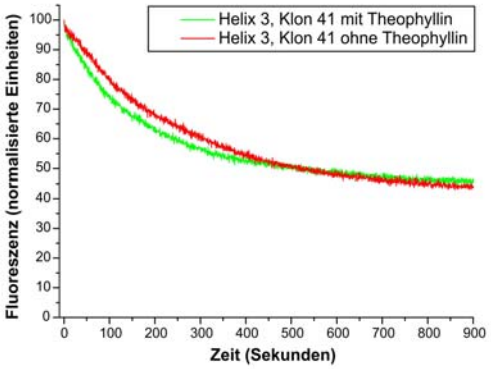


Abbildung 7.31: *Fluoreszenzkurve von Klon 41 aus RNA-Bibliothek Helix 3*

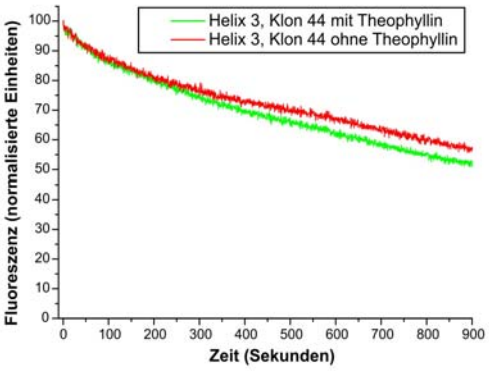


Abbildung 7.32: *Fluoreszenzkurve von Klon 44 aus RNA-Bibliothek Helix 3*

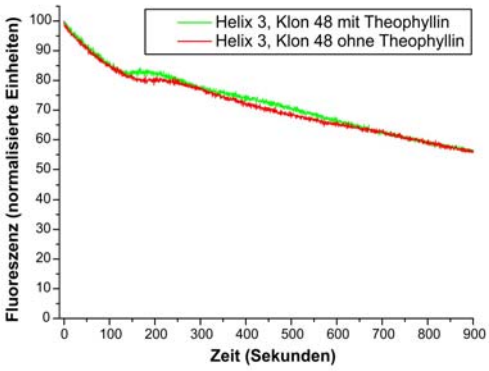


Abbildung 7.33: *Fluoreszenzkurve von Klon 48 aus RNA-Bibliothek Helix 3*

7.6.6 Rationales Design

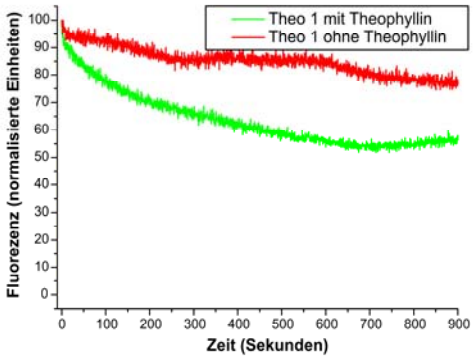


Abbildung 7.34: *Fluoreszenzkurve von Theo1*

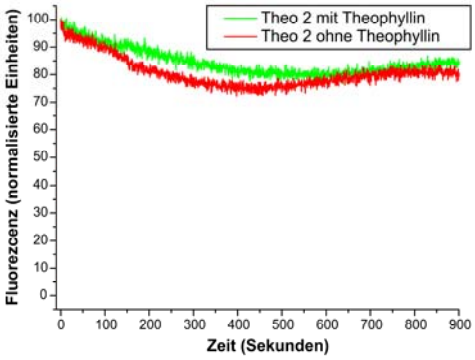


Abbildung 7.35: *Fluoreszenzkurve von Theo 2*

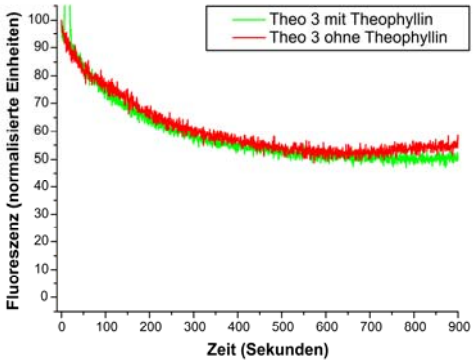


Abbildung 7.36: *Fluoreszenzkurve von Theo 3*

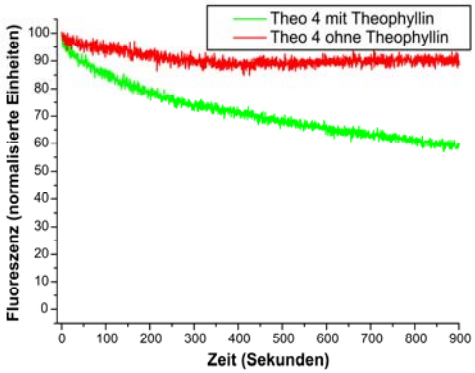


Abbildung 7.37: Fluoreszenzkurve von Theo 4

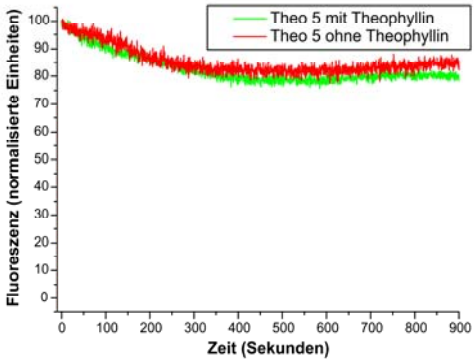


Abbildung 7.38: *Fluoreszenzkurve von Theo 5*

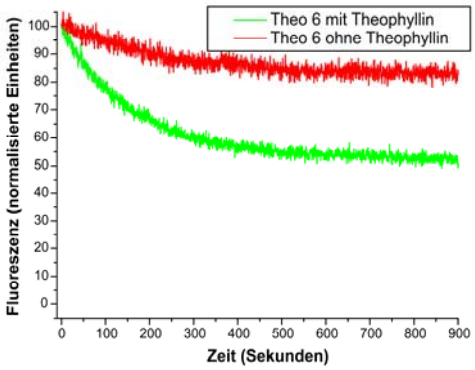


Abbildung 7.39: *Fluoreszenzkurve von Theo 6*

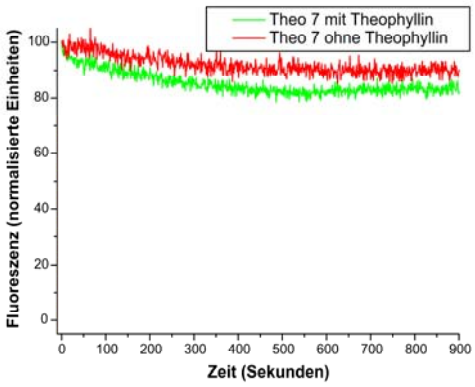


Abbildung 7.40: *Fluoreszenzkurve von Theo 7*

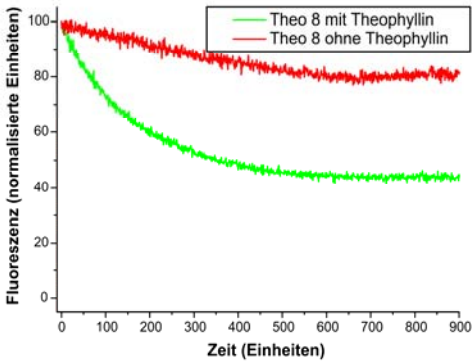


Abbildung 7.41: *Fluoreszenzkurve von Theo 8*

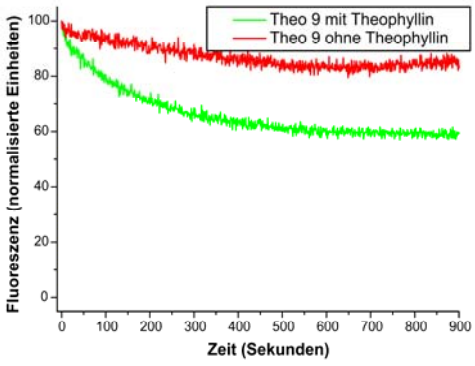


Abbildung 7.42: *Fluoreszenzkurve von Theo 9*

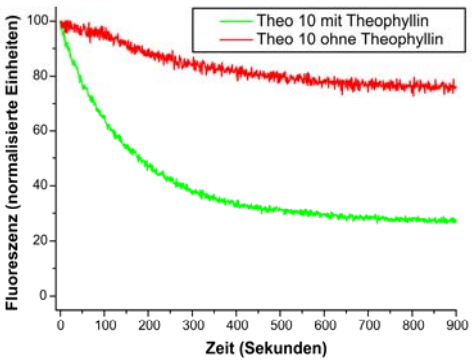


Abbildung 7.43: *Fluoreszenzkurve von Theo 10*

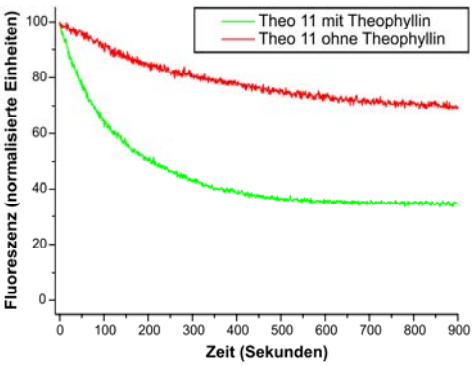


Abbildung 7.44: *Fluoreszenzkurve von Theo 11*

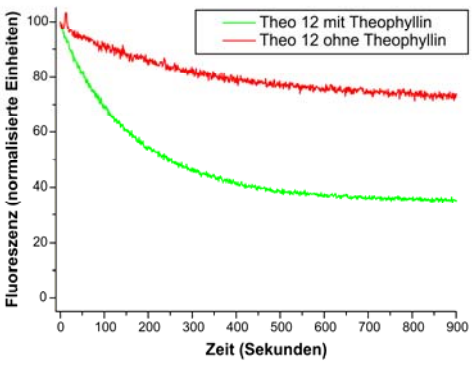


Abbildung 7.45: *Fluoreszenzkurve von Theo 12*

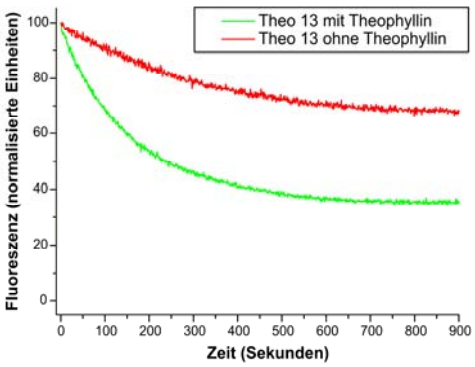


Abbildung 7.46: *Fluoreszenzkurve von Theo 13*

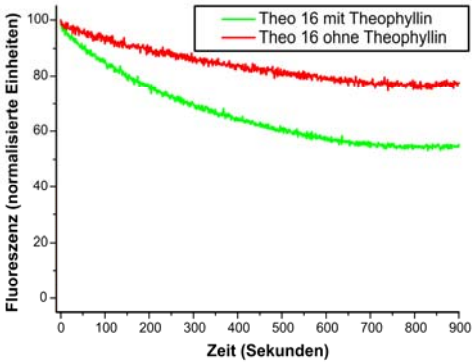


Abbildung 7.49: *Fluoreszenzkurve von Theo 16*

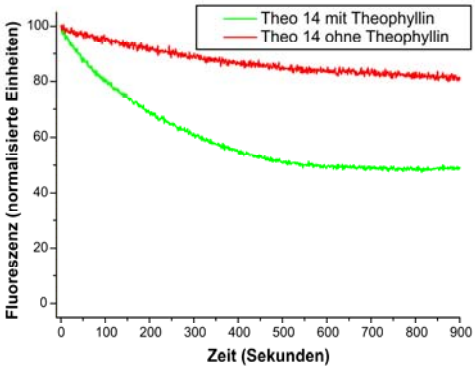


Abbildung 7.47: *Fluoreszenzkurve von Theo 14*

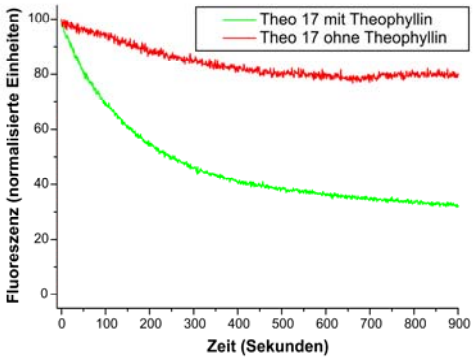


Abbildung 7.50: *Fluoreszenzkurve von Theo 17*

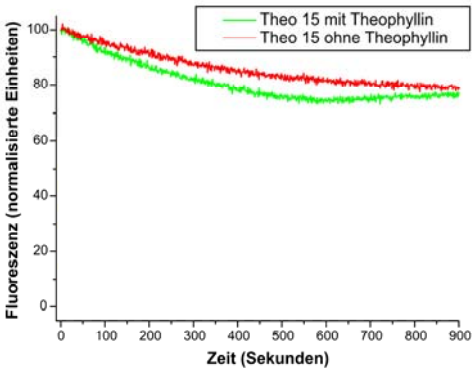


Abbildung 7.48: *Fluoreszenzkurve von Theo 15*

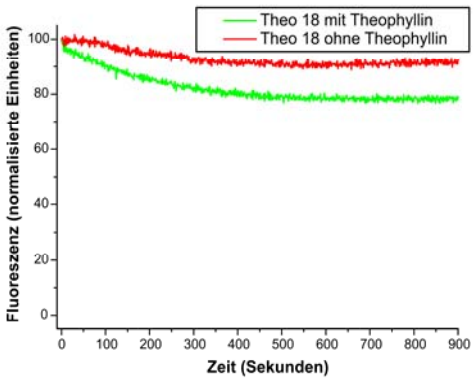


Abbildung 7.51: *Fluoreszenzkurve von Theo 18*

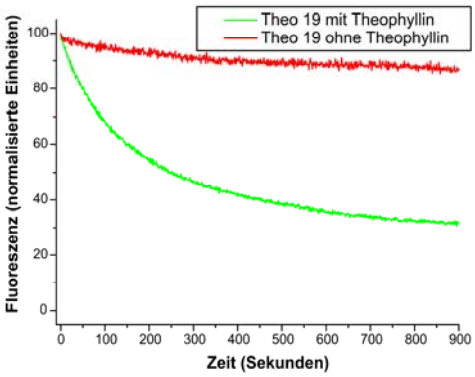


Abbildung 7.52: Fluoreszenzkurve von Theo 19

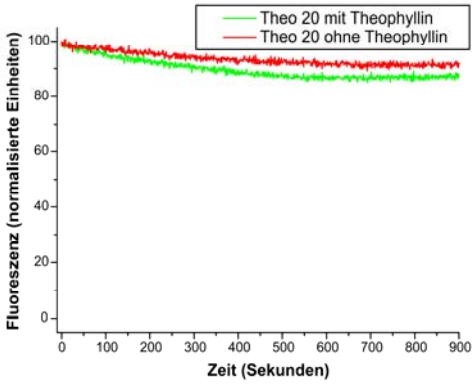


Abbildung 7.53: *Fluoreszenzkurve von Theo 20*

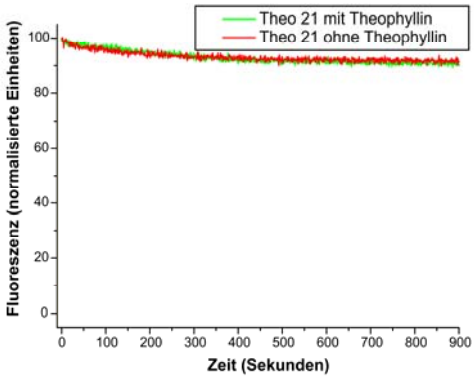


Abbildung 7.54: *Fluoreszenzkurve von Theo 2*

7.7 UV-spektrometrische Kurven

7.7.1 MH23

Die Kurven sind bereits unter Kapitel 4.2.2 aufgeführt.

7.7.2 49mer

Die Kurven sind bereits unter Kapitel 4.2.2 aufgeführt.

7.7.3 Rationales Konstrukt Theo 19

Die Kurven sind bereits unter Kapitel 4.5.12 aufgeführt.

8 Publikationen und Poster

Petermeier, M., Jäschke, A., New theophylline-activated Diels-Alderase ribozymes by molecular engineering, Organic and Biomolecular Chemistry, angenommen im Oktober 2008

Helm, M., Petermeier, M., Ge, B., Fiammengo, R. & Jäschke, A. (2005), Allosterically Activated Diels-Alder Catalysis by a Ribozyme J. Am. Chem. Soc. (127) 10492-10493.

Poster:

Helm, M.., Petermeier, M., Ge, B., Fiammengo, R. & Jäschke, A., "Allosterically Activated Diels-Alder Catalysis by a Ribozyme", präsentiert Juni 2005 bei der "2nd Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School" in Odense, Dänemark

Poster:

Helm, M., Petermeier, M., Ge, B., Fiammengo, R. & Jäschke, A., "Allosterically Activated Diels-Alder Catalysis by a Ribozyme", präsentiert Oktober 2005 beim Jährlichen Treffen der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) in Mainz, Deutschland

9 Literatur

1. Holmes, F.L., *Claude Bernard, the milieu interieur, and regulatory physiology.* Hist Philos Life Sci, 1986. **8**(1): p. 3-25.

2. Jeremy M. Berg (Autor), L.S.A., John L. Tymoczko (Autor) *Biochemie.* Verlag: Spektrum Akademischer Verlag; Auflage: 6. A. (Juni 2007), 2007.

3. Cech, T.R., *Nobel lecture. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from Tetrahymena.* Biosci Rep, 1990. **10**(3): p. 239-61.

4. Altman, S., *Nobel lecture. Enzymatic cleavage of RNA by RNA.* Biosci Rep, 1990. **10**(4): p. 317-37.

5. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands.* Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.

6. Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase.* Science, 1990. **249**(4968): p. 505-10.

7. Robertson, D.L. and G.F. Joyce, *Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA.* Nature, 1990. **344**(6265): p. 467-8.

8. Werstuck, G. and M.R. Green, *Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions.* Science, 1998. **282**(5387): p. 296-8.

9. Piganeau, N. and R. Schroeder, *Aptamer structures: a preview into regulatory pathways?* Chem Biol, 2003. **10**(2): p. 103-4.

10. Vitreschak, A.G., et al., *Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression?* Trends Genet, 2004. **20**(1): p. 44-50.

11. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.* Cell, 1993. **75**(5): p. 843-854.

12. Ruvkun, G., *MOLECULAR BIOLOGY: Glimpses of a Tiny RNA World*. 2001. p. 797-799.

13. Nahvi, A., et al., *Genetic control by a metabolite binding mRNA.* Chem Biol, 2002. **9**(9): p. 1043.

14. Mironov, A.S., et al., *Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria.* Cell, 2002. **111**(5): p. 747-56.

15. Winkler, W., A. Nahvi, and R.R. Breaker, *Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression.* Nature, 2002. **419**(6910): p. 952-6.

16. Winkler, W.C., S. Cohen-Chalamish, and R.R. Breaker, *An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 15908-13.

17. Cech, T.R., A.J. Zaug, and P.J. Grabowski, *In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence.* Cell, 1981. **27**(3 Pt 2): p. 487-96.

18. Kruger, K., et al., *Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena.* Cell, 1982. **31**(1): p. 147-57.

19. Guerrier-Takada, C. and S. Altman, *Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro.* Science, 1984. **223**(4633): p. 285-6.

20. Guerrier-Takada, C., et al., *The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme.* Cell, 1983. **35**(3 Pt 2): p. 849-57.

21. Buzayan, J.M., W.L. Gerlach, and G. Bruening, *Nonenzymic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA.* Nature (London, United Kingdom), 1986. **323**(6086): p. 349-53.

22. Prody, G.A., et al., *Autolytic Processing of Dimeric Plant Virus Satellite RNA.* Science, 1986. **231**(4745): p. 1577-1580.

23. Kuo, M.Y., et al., *Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus.* J Virol, 1988. **62**(12): p. 4439-44.

24. Been, M.D., *Cis- and trans-acting ribozymes from a human pathogen, hepatitis delta virus.* Trends Biochem Sci, 1994. **19**(6): p. 251-6.

25. Sharmeen, L., et al., *Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage.* J Virol, 1988. **62**(8): p. 2674-9.

26. Hampel, A., et al., *'Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA.* Nucleic Acids Res, 1990. **18**(2): p. 299-304.

27. Guo, H.C. and R.A. Collins, *Efficient trans-cleavage of a stem-loop RNA substrate by a ribozyme derived from neurospora VS RNA.* Embo J, 1995. **14**(2): p. 368-76.

28. Winkler, W.C., et al., *Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme.* Nature, 2004. **428**(6980): p. 281-6.

29. Ferat, J.L. and F. Michel, *Group II self-splicing introns in bacteria.* Nature, 1993. **364**(6435): p. 358-61.

30. Michel, F. and J.L. Ferat, *Structure and activities of group II introns.* Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 435-61.

31. Valadkhan, S. and J.L. Manley, *Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs.* Nature, 2001. **413**(6857): p. 701-7.

32. Ban, N., et al., *Placement of protein and RNA structures into a 5 A-resolution map of the 50S ribosomal subunit.* Nature, 1999. **400**(6747): p. 841-7.

33. Ban, N., et al., *The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 A resolution.* Science, 2000. **289**(5481): p. 905-20.

34. Nissen, P., et al., *The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis.* Science, 2000. **289**(5481): p. 920-30.

35. Steitz, T.A. and P.B. Moore, *RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme.* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(8): p. 411-8.

36. Doudna, J.A. and T.R. Cech, *The chemical repertoire of natural ribozymes.* Nature, 2002. **418**(6894): p. 222-8.

37. Mills, D.R., R.L. Peterson, and S. Spiegelman, *An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(1): p. 217-24.

38. Caruthers, M.H., et al., *Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method.* Methods Enzymol, 1987. **154**: p. 287-313.

39. Khorana, H.G., A.F. Turner, and J.P. Vizsolyi, *Studies on Polynucleotides. IX. 1 Experiments on the Polymerization of Mononucleotides. Certain Protected De-*

rivatives of Deoxycytidine-5'Phosphate and the Synthesis of Deoxycytidine Polynucleotides2. Journal of the American Chemical Society, 1961. **83**(3): p. 686-698.

40. Ralph, R.K. and H.G. Khorana, *Studies on Polynucleotides. XI. 1 Chemical Polymerization of Mononucleotides. The Synthesis and Characterization of Deoxyadenosine Polynucleotides2.* Journal of the American Chemical Society, 1961. **83**(13): p. 2926-2934.

41. Wedel, A.B., *Fishing the best pool for novel ribozymes.* Trends Biotechnol, 1996. **14**(12): p. 459-65.

42. Bartel, D.P. and J.W. Szostak, *Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment].* Science, 1993. **261**(5127): p. 1411-8.

43. Wilson, D.S. and J.W. Szostak, *In vitro selection of functional nucleic acids.* Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 611-47.

44. Osborne, S.E. and A.D. Ellington, *Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry.* Chemical Reviews (Washington, D. C.), 1997. **97**(2): p. 349-370.

45. Wiegand, T.W., R.C. Janssen, and B.E. Eaton, *Selection of RNA amide synthases.* Chem Biol, 1997. **4**(9): p. 675-83.

46. Seelig, B. and A. Jaschke, *A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity.* Chem Biol, 1999. **6**(3): p. 167-76.

47. Tarasow, T.M., S.L. Tarasow, and B.E. Eaton, *RNA-catalysed carbon-carbon bond formation.* Nature, 1997. **389**(6646): p. 54-7.

48. Klussmann, S., *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*. 2006: Wiley-VCH.

49. Tarasow, T.M. and B.E. Eaton, *The Diels-Alder reaction and biopolymer catalysis.* Cellular and Molecular Life Sciences, 1999. **55**(11): p. 1463-1472.

50. Fusz, S., et al., *A ribozyme for the aldol reaction.* Chem Biol, 2005. **12**(8): p. 941-50.

51. Zhang, B. and T.R. Cech, *Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes.* Nature, 1997. **390**(6655): p. 96-100.

52. Baskerville, S. and D.P. Bartel, *A ribozyme that ligates RNA to protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9154-9.

53. Unrau, P.J. and D.P. Bartel, *RNA-catalysed nucleotide synthesis.* Nature, 1998. **395**(6699): p. 260-3.

54. Chapple, K.E., D.P. Bartel, and P.J. Unrau, *Combinatorial minimization and secondary structure determination of a nucleotide synthase ribozyme.* Rna, 2003. **9**(10): p. 1208-20.

55. Sengle, G., et al., *Novel RNA catalysts for the Michael reaction.* Chem Biol, 2001. **8**(5): p. 459-73.

56. Jadhav, V.R. and M. Yarus, *Acyl-CoAs from coenzyme ribozymes.* Biochemistry, 2002. **41**(3): p. 723-9.

57. Illangasekare, M., et al., *Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA.* Science, 1995. **267**(5198): p. 643-7.

58. Illangasekare, M. and M. Yarus, *A tiny RNA that catalyzes both aminoacyl-RNA and peptidyl-RNA synthesis.* Rna, 1999. **5**(11): p. 1482-9.

59. Lohse, P.A. and J.W. Szostak, *Ribozyme-catalysed amino-acid transfer reactions.* Nature, 1996. **381**(6581): p. 442-4.

60. Jenne, A. and M. Famulok, *A novel ribozyme with ester transferase activity.* Chem Biol, 1998. **5**(1): p. 23-34.

61. Chun, S.-M., et al., *Cholesterol Esterase Activity by in Vitro Selection of RNA against a Phosphate Transition-State Analogue.* Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(46): p. 10844-10845.

62. Li, Y. and R.R. Breaker, *Phosphorylating DNA with DNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2746-51.

63. Li, Y., Y. Liu, and R.R. Breaker, *Capping DNA with DNA.* Biochemistry, 2000. **39**(11): p. 3106-14.

64. Ekland, E.H., J.W. Szostak, and D.P. Bartel, *Structurally complex and highly active RNA ligases derived from random RNA sequences.* Science, 1995. **269**(5222): p. 364-70.

65. Johnston, W.K., et al., *RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension.* Science, 2001. **292**(5520): p. 1319-25.

66. McGinness, K.E. and G.F. Joyce, *RNA-catalyzed RNA ligation on an external RNA template.* Chem Biol, 2002. **9**(3): p. 297-307.

67. Rogers, J. and G.F. Joyce, *A ribozyme that lacks cytidine.* Nature, 1999. **402**(6759): p. 323-5.

68. Conn, M.M., J.R. Prudent, and P.G. Schultz, *Porphyrin Metalation Catalyzed by a Small RNA Molecule.* Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(29): p. 7012-7013.

69. Tsukiji, S., S.B. Pattnaik, and H. Suga, *An alcohol dehydrogenase ribozyme.* Nat Struct Biol, 2003. **10**(9): p. 713-7.

70. Tsukiji, S., S.B. Pattnaik, and H. Suga, *Reduction of an aldehyde by a NADH/Zn2+ -dependent redox active ribozyme.* J Am Chem Soc, 2004. **126**(16): p. 5044-5.

71. Fischer, E., *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme.* Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1894. **27**: p. 2985.

72. Kiga, D., et al., *An RNA aptamer to the xanthine/guanine base with a distinctive mode of purine recognition.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(7): p. 1755-60.

73. Sazani, P.L., R. Larralde, and J.W. Szostak, *A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP.* J Am Chem Soc, 2004. **126**(27): p. 8370-1.

74. Koizumi, M. and R.R. Breaker, *Molecular recognition of cAMP by an RNA aptamer.* Biochemistry, 2000. **39**(30): p. 8983-92.

75. Burke, D.H. and L. Gold, *RNA aptamers to the adenosine moiety of S-adenosyl methionine: structural inferences from variations on a theme and the reproducibility of SELEX.* Nucleic Acids Res, 1997. **25**(10): p. 2020-4.

76. Gebhardt, K., et al., *RNA aptamers to S-adenosylhomocysteine: kinetic properties, divalent cation dependency, and comparison with anti-S-adenosylhomocysteine antibody.* Biochemistry, 2000. **39**(24): p. 7255-65.

77. Burke, D.H. and D.C. Hoffman, *A novel acidophilic RNA motif that recognizes coenzyme A.* Biochemistry, 1998. **37**(13): p. 4653-63.

78. Saran, D., J. Frank, and D.H. Burke, *The tyranny of adenosine recognition among RNA aptamers to coenzyme A.* BMC Evol Biol, 2003. **3**: p. 26.

79. Lorsch, J.R. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin.* Biochemistry, 1994. **33**(4): p. 973-82.

80. Roychowdhury-Saha, M., et al., *Flavin recognition by an RNA aptamer targeted toward FAD.* Biochemistry, 2002. **41**(8): p. 2492-9.

81. Wilson, C. and J.W. Szostak, *In vitro evolution of a self-alkylating ribozyme.* Nature, 1995. **374**(6525): p. 777-82.

82. Connell, G.J., M. Illangesekare, and M. Yarus, *Three small ribooligonucleotides with specific arginine sites.* Biochemistry, 1993. **32**(21): p. 5497-502.

83. Famulok, M., *Molecular Recognition of Amino Acids by RNA-Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder.* Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(5): p. 1698-1706.

84. Burgstaller, P., M. Kochoyan, and M. Famulok, *Structural probing and damage selection of citrulline- and arginine-specific RNA aptamers identify base positions required for binding.* Nucleic Acids Res, 1995. **23**(23): p. 4769-76.

85. Majerfeld, I. and M. Yarus, *An RNA pocket for an aliphatic hydrophobe.* Nat Struct Biol, 1994. **1**(5): p. 287-92.

86. Majerfeld, I. and M. Yarus, *Isoleucine:RNA sites with associated coding sequences.* RNA, 1998. **4**(4): p. 471-8.

87. Mannironi, C., et al., *In vitro selection of dopamine RNA ligands.* Biochemistry, 1997. **36**(32): p. 9726-34.

88. Mannironi, C., et al., *Molecular recognition of amino acids by RNA aptamers: the evolution into an L-tyrosine binder of a dopamine-binding RNA motif.* RNA, 2000. **6**(4): p. 520-7.

89. Yang, Q., et al., *DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5462-7.

90. Masud, M.M., et al., *Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX.* Bioorg Med Chem, 2004. **12**(5): p. 1111-20.

91. Srisawat, C., I.J. Goldstein, and D.R. Engelke, *Sephadex-binding RNA ligands: rapid affinity purification of RNA from complex RNA mixtures.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(2): p. E4.

92. Tahiri-Alaoui, A., et al., *High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands.* Nucleic Acids Res, 2002. **30**(10): p. e45.

93. Jenison, R.D., et al., *High-resolution molecular discrimination by RNA.* Science, 1994. **263**(5152): p. 1425-9.

94. Zimmerman, G.R., et al., *Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophilline-binding RNA.* Nat. Struct. Biol., 1997. **4**(8): p. 644-649.

95. Anderson, P.C. and S. Mecozzi, *Identification of a 14mer RNA that recognizes and binds flavin mononucleotide with high affinity.* Nucleic Acids Res, 2005. **33**(22): p. 6992-9.

96. Anderson, P.C. and S. Mecozzi, *Unusually short RNA sequences: design of a 13-mer RNA that selectively binds and recognizes theophylline.* J Am Chem Soc, 2005. **127**(15): p. 5290-1.

97. Stojanovic, M.N., P. de Prada, and D.W. Landry, *Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine.* J Am Chem Soc, 2001. **123**(21): p. 4928-31.

98. Baugh, C., D. Grate, and C. Wilson, *2.8 L crystal structure of the malachite green aptamer.* Journal of Molecular Biology, 2000. **301**(1): p. 117-128.

99. Flinders, J., et al., *Recognition of Planar and Nonplanar Ligands in the Malachite Green–RNA Aptamer Complex.* Chembiochem, 2004. **5**(1): p. 62-72.

100. Holeman, L.A., et al., *Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers.* Folding and Design, 1998. **3**(6): p. 423-431.

101. Wallace, S.T. and R. Schroeder, *In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: Recognition discrimination between antibiotics.* Rna, 1998. **4**(01): p. 112-123.

102. Wallis, M.G., et al., *A novel RNA motif for neomycin recognition.* Chemistry & Biology, 1995. **2**(8): p. 543-552.

103. Jiang, L. and D.J. Patel, *Solution structure of the tobramycin- RNA aptamer complex.* Nature Structural Biology, 1998. **5**: p. 769-774.

104. Hamasaki, K., et al., *Minimal RNA constructs that specifically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities.* Biochemistry, 1998. **37**(2): p. 656-63.

105. Wallis, M.G., et al., *In vitro selection of a viomycin-binding RNA pseudoknot.* Chemistry & Biology, 1997. **4**(5): p. 357-366.

106. Burke, D.H., et al., *RNA aptamers to the peptidyl transferase inhibitor chloramphenicol.* Chemistry & Biology, 1997. **4**(11): p. 833-843.

107. Berens, C., A. Thain, and R. Schroeder, *A tetracycline-binding RNA aptamer.* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001. **9**(10): p. 2549-2556.

108. Kubik, M.F., *Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro-/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding.* The Journal of Immunology, 1997. **159**(1): p. 259-267.

109. Ruckman, J., et al., *2'-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165).* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(32): p. 20556-20567.

110. Lebruska, L.L. and L.J. Maher Iii, *Selection and characterization of an RNA decoy for transcription factor NF-kB.* Biochemistry, 1999. **38**(10): p. 3168-3174.

111. White, R., et al., *Generation of Species Cross-reactive Aptamers Using "Toggle" SELEX.* Molecular Therapy, 2001. **4**(6): p. 567-573.

112. Wiegand, T.W., *High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I.* The Journal of Immunology, 1996. **157**(1): p. 221-230.

113. Lupold, S.E., et al., *Identification and Characterization of Nuclease-stabilized RNA Molecules That Bind Human Prostate Cancer Cells via the Prostate-specific Membrane Antigen 1*. 2002, Cancer Research. p. 4029-4033.

114. Biesecker, G., et al., *Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5.* Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): p. 219-230.

115. Proske, D., et al., *Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation.* Chembiochem, 2002. **3**(8): p. 717-25.

116. Helmling, S., et al., *Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(36): p. 13174.

117. Kawakami, J., et al., *In vitro selection of aptamers that act with Zn2+.* J Inorg Biochem, 2000. **82**(1-4): p. 197-206.

118. Zimmermann, G.R., et al., *A semiconserved residue inhibits complex formation by stabilizing interactions in the free state of a theophylline-binding RNA.* Biochemistry, 1998. **37**(25): p. 9186-92.

119. Zimmermann, G.R., et al., *Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA.* Nat Struct Biol, 1997. **4**(8): p. 644-9.

120. Burgstaller, P. and M. Famulok, *Isolation of RNA Aptamers for Biological Cofactors by In Vitro Selection.* Angewandte Chemie International Edition in English, 1994. **33**(10): p. 1084-1087.

121. Sassanfar, M. and J.W. Szostak, *An RNA motif that binds ATP.* Nature, 1993. **364**(6437): p. 550-3.

122. Schneider, C. and J. Sühnel, *A Molecular Dynamics Simulation of the Flavin Mononucleotide–RNA Aptamer Complex.* Biopolymers, 1999. **50**: p. 287-302.

123. Dieckmann, T., et al., *Mutant ATP-binding RNA aptamers reveal the structural basis for ligand binding.* J Mol Biol, 1997. **273**(2): p. 467-78.

124. Patel, D.J., et al., *Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes.* J Mol Biol, 1997. **272**(5): p. 645-64.

125. Hermann, T. and D.J. Patel, *Stitching together RNA tertiary architectures.* J Mol Biol, 1999. **294**(4): p. 829-49.

126. Hermann, T. and D.J. Patel, *Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers.* Science, 2000. **287**(5454): p. 820.

127. Patel, D.J. and A.K. Suri, *Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics.* Reviews in Molecular Biotechnology, 2000. **74**(1): p. 39-60.

128. Mukhopadhyay, R., *Aptamers are ready for the spotlight.* Analytical chemistry, 2005. **77**(5): p. 114-118.

129. Famulok, M., M. Blind, and G. Mayer, *Intramers as promising new tools in functional proteomics.* Chem Biol, 2001. **8**(10): p. 931-9.

130. Famulok, M. and S. Verma, *In vivo-applied functional RNAs as tools in proteomics and genomics research.* Trends Biotechnol, 2002. **20**(11): p. 462-6.

131. Famulok, M. and G. Mayer, *Intramers and aptamers: applications in protein-function analyses and potential for drug screening.* Chembiochem, 2005. **6**(1): p. 19-26.

132. Dick Jr, L.W. and L.B. McGown, *Aptamer-enhanced laser desorption/ionization for affinity mass spectrometry.* Anal. Chem, 2004. **76**(11): p. 3037-3041.

133. Connor, A.C. and L.B. McGown, *Aptamer stationary phase for protein capture in affinity capillary chromatography.* Journal of Chromatography A, 2006. **1111**(2): p. 115-119.

134. Clark, S.L. and V.T. Remcho, *Electrochromatographic retention studies on a flavin-binding RNA aptamer sorbent.* Anal. Chem, 2003. **75**(21): p. 5692-5696.

135. Borkowski, S. and L.M. Dinkelborg, *Aptamers for In Vivo Imaging.* The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications, 2006. **16**: p. 1.

136. Boisgard, R., et al., *In vivo biodistribution and pharmacokinetics of 18F-labelled Spiegelmers: a new class of oligonucleotidic radiopharmaceuticals.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005. **32**(4): p. 470-7.

137. Rohren, E.M., T.G. Turkington, and R.E. Coleman, *Clinical Applications of PET in Oncology.* Radiology, 2004: p. 2312021185.

138. Hilger, C.S., et al., *Synthesis of Tc-99m-labeled, modified RNA.* Tetrahedron Letters, 1998. **39**(51): p. 9403-9406.

139. Hjelstuen, O.K., et al., *3'-99mTc-labeling and biodistribution of a CAPL antisense oligodeoxynucleotide.* Nuclear Medicine and Biology, 1998. **25**(7): p. 651-657.

140. Klussmann, S., et al., *Mirror-image RNA that binds D-adenosine.* Nat Biotechnol, 1996. **14**(9): p. 1112-5.

141. Nolte, A., et al., *Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine.* Nat Biotechnol, 1996. **14**(9): p. 1116-9.

142. Eulberg, D. and S. Klussmann, *Spiegelmers: biostable aptamers.* Chembiochem, 2003. **4**(10): p. 979-83.

143. Faulhammer, D., et al., *Biostable aptamers with antagonistic properties to the neuropeptide nociceptin/orphanin FQ.* RNA, 2004. **10**(3): p. 516-27.

144. Purschke, W.G., et al., *An L-RNA-based aquaretic agent that inhibits vasopressin in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5173-8.

145. Ng, E.W., et al., *Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease.* Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(2): p. 123-32.

146. Gragoudas, E.S., et al., *Pegaptanib for Neovascular Age-Related Macular Degeneration.* New England Journal of Medicine, 2004. **351**(27): p. 2805.

147. D'Amico, D.J., *Pegaptanib Sodium for Neovascular Age-Related Macular Degeneration Two-Year Safety Results of the Two Prospective, Multicenter, Controlled Clinical Trials.* Ophthalmology, 2006. **113**(6): p. 1001-1001.

148. Vinores, S.A., *Technology evaluation: pegaptanib, Eyetech/Pfizer.* Curr Opin Mol Ther, 2003. **5**(6): p. 673-9.

149. Rusconi, C.P., et al., *RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa.* Nature, 2002. **419**(6902): p. 90-4.

150. Rusconi, C.P., et al., *Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo.* Nat Biotechnol, 2004. **22**(11): p. 1423-1428.

151. Porta, H. and P.M. Lizardi, *An allosteric hammerhead ribozyme.* Biotechnology (N Y), 1995. **13**(2): p. 161-4.

152. Robertson, M.P. and A.D. Ellington, *In vitro selection of an allosteric ribozyme that transduces analytes to amplicons.* Nat Biotechnol, 1999. **17**(1): p. 62-6.

153. Cao, Y. and S.A. Woodson, *Destabilizing effect of an rRNA stem-loop on an attenuator hairpin in the 5' exon of the Tetrahymena pre-rRNA.* RNA, 1998. **4**(8): p. 901-14.

154. Chadalavada, D.M., et al., *A role for upstream RNA structure in facilitating the catalytic fold of the genomic hepatitis delta virus ribozyme.* J Mol Biol, 2000. **301**(2): p. 349-67.

155. Tang, J. and R.R. Breaker, *Rational design of allosteric ribozymes.* Chem Biol, 1997. **4**(6): p. 453-9.

156. Araki, M., et al., *Allosteric regulation of a ribozyme activity through ligand-induced conformational change.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(14): p. 3379-84.

157. Soukup, G.A. and R.R. Breaker, *Engineering precision RNA molecular switches.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3584-9.

158. Robertson, M.P. and A.D. Ellington, *Design and optimization of effector-activated ribozyme ligases.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(8): p. 1751-9.

159. Robertson, M.P. and A.D. Ellington, *In vitro selection of nucleoprotein enzymes.* Nat Biotechnol, 2001. **19**(7): p. 650-5.

160. Robertson, M.P., S.M. Knudsen, and A.D. Ellington, *In vitro selection of ribozymes dependent on peptides for activity.* RNA, 2004. **10**(1): p. 114-27.

161. Breaker, R.R., *Engineered allosteric ribozymes as biosensor components.* Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(1): p. 31-9.

162. Kertsburg, A. and G.A. Soukup, *A versatile communication module for controlling RNA folding and catalysis.* Nucleic Acids Res, 2002. **30**(21): p. 4599-606.

163. Kuwabara, T., M. Warashina, and K. Taira, *Allosterically controllable ribozymes with biosensor functions.* Curr Opin Chem Biol, 2000. **4**(6): p. 669-77.

164. Hesselberth, J., et al., *In vitro selection of nucleic acids for diagnostic applications.* Reviews in Molecular Biotechnology, 2000. **74**(1): p. 15-25.

165. Lee, J.F., et al., *Aptamer Database.* Nucleic Acids Research, 2004. **32**(Database Issue): p. D95.

166. Seetharaman, S., et al., *Immobilized RNA switches for the analysis of complex chemical and biological mixtures.* Nature Biotechnology, 2001. **19**: p. 336-341.

167. Knudsen, S.M., et al., *Ribozyme-mediated signal augmentation on a mass-sensitive biosensor.* J Am Chem Soc, 2006. **128**(50): p. 15936-7.

168. Stojanovic, M.N., T.E. Mitchell, and D. Stefanovic, *Deoxyribozyme-based logic gates.* J Am Chem Soc, 2002. **124**(14): p. 3555-61.

169. Stojanovic, M.N. and D. Stefanovic, *A deoxyribozyme-based molecular automaton.* Nat Biotechnol, 2003. **21**(9): p. 1069-74.

170. Kolpashchikov, D.M. and M.N. Stojanovic, *Boolean control of aptamer binding states.* J Am Chem Soc, 2005. **127**(32): p. 11348-51.

171. Margolin, A.A. and M.N. Stojanovic, *Boolean calculations made easy (for ribozymes).* Nat Biotechnol, 2005. **23**(11): p. 1374-6.

172. Stojanovic, M.N., et al., *Deoxyribozyme-based ligase logic gates and their initial circuits.* J Am Chem Soc, 2005. **127**(19): p. 6914-5.

173. Lederman, H., et al., *Deoxyribozyme-based three-input logic gates and construction of a molecular full adder.* Biochemistry, 2006. **45**(4): p. 1194-9.

174. Kuwabara, T., et al., *Formation of a catalytically active dimer by tRNAVal-driven short ribozymes.* Bio/Technology, 1998. **16**(10): p. 961-965.

175. Kuwabara, T., et al., *A Novel Allosterically trans-Activated Ribozyme, the Maxizyme, with Exceptional Specificity In Vitro and In Vivo.* Molecular Cell, 1998. **2**(5): p. 617-627.

176. Kuwabara, T., M. Warashina, and K. Taira, *Allosterically controllable maxizymes cleave mRNA with high efficiency and specificity.* Trends in Biotechnology, 2000. **18**(11): p. 462-468.

177. Wei, B.Y., C. Bradbeer, and R.J. Kadner, *Conserved structural and regulatory regions in the Salmonella typhimurium btuB gene for the outer membrane vitamin B12 transport protein.* Res Microbiol, 1992. **143**(5): p. 459-66.

178. Miranda-Rios, J., M. Navarro, and M. Soberon, *A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9736-41.

179. Kreneva, R.A. and D.A. Perumov, *Genetic mapping of regulatory mutations of Bacillus subtilis riboflavin operon.* Mol Gen Genet, 1990. **222**(2-3): p. 467-9.

180. Gelfand, M.S., et al., *A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes.* Trends Genet, 1999. **15**(11): p. 439-42.

181. Nou, X. and R.J. Kadner, *Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to btuB RNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7190-5.

182. Stormo, G.D. and Y. Ji, *Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9465-7.

183. Epshtein, V., A.S. Mironov, and E. Nudler, *The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5052-6.

184. McDaniel, B.A., et al., *Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3083-8.

185. Winkler, W.C., et al., *An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine.* Nat Struct Biol, 2003. **10**(9): p. 701-7.

186. Mandal, M., et al., *Riboswitches control fundamental biochemical pathways in Bacillus subtilis and other bacteria.* Cell, 2003. **113**(5): p. 577-86.

187. Grundy, F.J., S.C. Lehman, and T.M. Henkin, *The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12057-62.

188. Sudarsan, N., et al., *An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine.* Genes Dev, 2003. **17**(21): p. 2688-97.

189. Barrick, J.E., et al., *New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6421-6.

190. Mandal, M., et al., *A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression.* Science, 2004. **306**(5694): p. 275-9.

191. Corbino, K.A., et al., *Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria.* Genome Biol, 2005. **6**(8): p. R70.

192. Edwards, T.E., D.J. Klein, and A.R. Ferré-D'Amaré, *Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs.* Current Opinion in Structural Biology, 2007. **17**(3): p. 273-279.

193. Corey, E.J., *Catalytic enantioselective Diels-Alder reactions: Methods, mechanistic fundamentals, pathways, and applications.* Angewandte Chemie, International Edition, 2002. **41**(10): p. 1650-1667.

194. Corey, E.J. and A. Guzman-Perez, *The catalytic enantioselective construction of molecules with quaternary carbon stereocenters.* Angewandte Chemie, International Edition, 1998. **37**(4): p. 389-401.

195. Diels, O. and K. Alder, *Syntheses in the hydroaromatic series. I. Addition of \"diene\" hydrocarbons.* Ann., 1928. **460**: p. 98-122.

196. Woodward, R.B. and R. Hoffmann, *Stereochemistry of electrocyclic reactions.* Journal of the American Chemical Society, 1965. **87**(2): p. 395-7.

197. Sauer, J. and R. Sustmann, *Mechanistic aspects of the Diels-Alder reaction: a critical review.* Angewandte Chemie, 1980. **92**(10): p. 773-801.

198. Yates, P. and P. Eaton, *Acceleration of the Diels-Alder Reaction by Aluminium Chloride.* J. Am. Chem Soc., 1960. **82**: p. 4436-4437.

199. Hilvert, D., et al., *Antibody catalysis of the Diels-Alder reaction.* Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(26): p. 9261-2.

200. Seelig, B., et al., *Enantioselective Ribozyme Catalysis of a Bimolecular Cycloaddition Reaction.* Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2000. **39**(24): p. 4576-4579.

201. Keiper, S., et al., *Architecture of a Diels-Alderase ribozyme with a preformed catalytic pocket.* Chem. Biol., 2004. **11**(9): p. 1217-27.

202. Hobartner, C. and R. Micura, *Chemical synthesis of selenium-modified oligoribonucleotides and their enzymatic ligation leading to an U6 SnRNA stem-loop segment.* J Am Chem Soc, 2004. **126**(4): p. 1141-9.

203. Serganov, A., et al., *Structural basis for Diels-Alder ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation.* Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(3): p. 218-24.

204. Wombacher, R., et al., *Control of stereoselectivity in an enzymatic reaction by backdoor access.* Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(15): p. 2469-72.

205. Soukup, G.A. and R.R. Breaker, *Allosteric nucleic acid catalysts.* Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(3): p. 318-25.

206. Helm, M., et al., *Allosterically Activated Diels-Alder Catalysis by a Ribozyme.* J. Am. Chem. Soc. FIELD Full Journal Title:Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(30): p. 10492-10493.

207. Amontov, S. and A. Jaschke, *Controlling the rate of organic reactions: rational design of allosteric Diels-Alderase ribozymes.* Nucleic Acids Res, 2006. **34**(18): p. 5032-8.

208. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.* Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.

209. Milligan, J.F., et al., *Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates.* Nucleic Acids Res., 1987. **15**(21): p. 8783-98.

210. Fiammengo, R., K. Musilek, and A. Jaschke, *Efficient Preparation of Organic Substrate-RNA Conjugates via in Vitro Transcription.* J Am Chem Soc, 2005. **127**(25): p. 9271-6.

211. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.

212. Corpet, F., *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.* Nucleic Acids Res, 1988. **16**(22): p. 10881-10890.

213. Zimmermann, G.R., et al., *Molecular interactions and metal binding in the theophylline-binding core of an RNA aptamer.* Rna, 2000. **6**(5): p. 659-67.

214. Stojanovic, M.N., P. de Prada, and D.W. Landry, *Catalytic molecular beacons.* Chembiochem, 2001. **2**(6): p. 411-5.

215. Helm, M., et al., *Allosterically activated Diels-Alder catalysis by a ribozyme.* J Am Chem Soc, 2005. **127**(30): p. 10492-3.

216. Koizumi, M., et al., *Allosteric selection of ribozymes that respond to the second messengers cGMP and cAMP.* Nat Struct Biol, 1999. **6**(11): p. 1062-71.

217. Stojanovic, M.N. and D.W. Landry, *Aptamer-based colorimetric probe for cocaine.* J Am Chem Soc, 2002. **124**(33): p. 9678-9.

218. Schlatterer, J.C., F. Stuhlmann, and A. Jaschke, *Stereoselective synthesis using immobilized Diels-Alderase ribozymes.* Chembiochem, 2003. **4**(10): p. 1089-92.