## **INAUGURAL - DISSERTATION**

zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Sonja Keiper aus Berlin

Tag der mündlichen Prüfung:

# Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von Ribozymen für eine Diels-Alder-Reaktion

Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. A. Jäschke in der Zeit von Februar 2000 bis September 2002 am Institut für Biochemie im Fachbereich Chemie der Freien Universität Berlin, sowie von Oktober 2002 bis Juli 2003 am Institut für Pharmazie und molekulare Biotechnologie im Fachbereich 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.

Sonja Keiper

# Danksagung

Mein größter Dank gebührt meinem Betreuer bei dieser Arbeit, Prof. Dr. Andres Jäschke, für die spannende Themenstellung. Er hat mir durch seine Förderung ermöglicht, mich mit der RNA-Forschung sowie verschiedenen experimentellen Methoden zu beschäftigen, und damit mein großes Interesse für dieses Gebiet geweckt.

Ich möchte mich ferner bei Prof. Dr. V. A. Erdmann bedanken, in dessen Arbeitskreis der überwiegende Teil dieser Arbeit angefertigt wurde, für die freundliche Unterstützung.

Natürlich ein herzliches Dankeschön an alle Kollegen, die mich in der gesamten Zeit begleitet und unterstützt haben. Zusammen mit Barbara-S. Weigand, Jörg Schlatterer, Andreas Zerressen, Dirk Bebenroth, Richard Wombacher und Dr. Mark Helm habe ich viele schöne und lustige Stunden innerhalb und außerhalb des Labors verlebt. Besonders bei Mark möchte ich mich bedanken für die vielen nützlichen Hinweise, sowohl experimenteller Art, als auch beim Anfertigen dieser Schrift. Allen ehemaligen und gegenwärtigen Labormitgliedern danke ich für wichtige wissenschaftliche Gespräche und Ratschläge. Dr. Friedrich Stuhlmann danke ich herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung vieler Syntheseprodukte.

Zu größtem Dank bin ich Prof. Dr. Dinshaw J. Patel verpflichtet, für die freundliche Aufnahme als Gast in seinem Labor am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York und die stete Unterstützung und Anteilnahme an diesem Projekt. Hier möchte ich besonders die Kooperation mit Dr. Anh-Tuan Phan bei den NMR-Untersuchungen hervorheben. Die Kristalluntersuchungen wurden erst durch die enge Zusammenarbeit mit Dr. Eugene Skripkin und Dr. Alexander Serganov ermöglicht.

Großen Dank schulde ich auch Prof. Dr. Eric Westhof, CNRS, Strasbourg, für sein entgegengebrachtes Interesse und die Entwicklung des Strukturmodells.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Christian bedanken, für seine unermüdliche Hilfe und Geduld, die mich immer bestärkt haben.

# Inhalt

1	Einleitung	7
1.1	Ribozyme	7
1.2	in vitro Selektion	8
1.3	Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden	12
1.4	Diels-Alderasen	15
2	Aufgabenstellung	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Oligoribonucleotide	23
3.2	Oligodesoxyribonucleotide	26
3.3	Standardmethoden und Reagenzsysteme	27
3.4	Enzymatische Synthese von Ribonucleinsäuren durch T7-Transkription	27
3.4.	1 T7-Transkription mit Initiatornucleotid	29
3.5	Chemische Synthese von Nucleinsäuren	30
3.5.	1 Standardprozedur mit dem Phosphoramiditverfahren	30
3.5.	2 Synthese von Anthracenmethylenhexaethylenglycol-β-cyanoethyl-	
	phosphoramidit	32
3.5.	3 Herstellung 5'-konjugierter Oligoribonucleotide	33
3.6	Radioaktive Markierung von Oligonucleotiden	33
3.6.	1 5'-Markierung durch Phosphorylierung	33
3.6.	2 3'-Markierung durch Ligation	34
3.7	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	35
3.7.	1 Reversed phase-HPLC zur Reinigung von Oligonucleotiden	35
3.7.	2 HPLC an chiralen Festphasen	36
3.8	Aktivitätsmessung von Ribozymen	37
3.8.	1 Gelelektrophoretischer Assay	37
3.8.	2 UV-spektrometrischer Assay	38
3.8.	3 Fluoreszenzspektrometrischer Assay	38

3.9	Bestimmung von Strukturelementen durch enzymatisches und che	emisches	
	probing	39	
3.9	.1 Spaltungen mit RNasen	40	
3.9	2 Modifizierung und Spaltung mit chemischen Sonden	41	
3.9	.3 Spaltungen mit Blei(II)-acetat	43	
3.9	.4 Identifizierung der Spaltstellen	43	
3.1	0 NMR-Spektroskopie von Nucleinsäuren	44	
3.1	1 Kristallisation von Nucleinsäuren	44	
4	Ergebnisse	46	
4.1	Kinetische Analyse	46	
4.2	Untersuchungen zur Enantioselektivität	51	
4.3	Strukturelle Untersuchungen mit biochemischen Methoden	58	
4.3	.1 Enzymatisches <i>probing</i>	59	
4.3	2 Chemisches <i>probing</i>	62	
4.3	.3 <i>Probing</i> mit Pb <sup>2+</sup> -Ionen	65	
4.4	Strukturelle Untersuchungen mit biophysikalischen Methoden	68	
4.4	1 Chemische Synthese von RNA-Konjugaten	68	
4.4	2 <sup>1</sup> H-NMR-spektroskopische Untersuchungen	71	
4.4	.3 Kristallisation	78	
5	Diskussion	91	
5.1	5.1 Kinetische Daten 91		
5.2	Untersuchungen zur Stereoselektivität	94	
5.3	5.3 Strukturelle Untersuchungen 96		
5.3	1 Enzymatisches und chemisches <i>probing</i>	96	
5.3	.2 NMR-Untersuchungen	101	
5.3	3 Kristallisation von Ribonucleinsäuren	103	
6	Zusammenfassung	106	
7	Summary	108	
8	Anhang	110	
0		110	
9	Literaturverzeicnnis	116	

## 1 Einleitung

### 1.1 Ribozyme

Ribozyme werden solche Ribonucleinsäuren genannt, welche katalytische Eigenschaften aufweisen, die denen von Enzymen vergleichbar sind. Die katalytischen Eigenschaften von RNA wurden erstmals in den Jahren 1982-83 durch zwei wichtige Entdeckungen nachgewiesen. Cech und Mitarbeiter konnten zeigen, dass dem posttranskriptionalen Spleißen des Gruppe I-Introns aus Tetrahymena thermophila ein Selbstspaltungsmechanismus zugrunde liegt [Kruger et al. 1982]. In einem 2-Schritt-Mechanismus werden dabei das Intron ausgeschnitten und die beiden benachbarten Exons ligiert. Bakterielle Ribonuclease P (RNase P), die aus RNA- und Protein-Untereinheiten besteht, spaltet Vorläufersequenzen vom 5'-Ende von prä-tRNA-Molekülen ab und formt so reife tRNAs. Altman und Mitarbeiter fanden heraus, dass die katalytische Aktivität der RNase P ausschließlich in deren RNA-Untereinheit angesiedelt ist [Guerrier-Takada et al. 1983].

In dem sich nun rasch entwickelnden Forschungsgebiet katalytischer RNAs wurden weitere kleine selbstspaltende Ribozyme gefunden. Man klassifiziert danach 7 Typen natürlich vorkommender Ribozyme: Hammerhead (aus einigen Pflanzenviroiden) [Prody et al. 1986], Hairpin (aus Tabak-Ringspot-Virus Satellit) [Feldstein et al. 1990; Hampel et al. 1990], Hepatitis Delta Virus Ribozym [Kuo et al. 1988], *Neurospora* Varkud Satellit Ribozym [Guo & Collins 1995], Gruppe I-Intron (aus verschiedenen Mikroorganismen), Gruppe II-Intron (in mitochondrialen Genen von Pflanzen, Pilzen, Hefe und anderen niederen Eukaryoten) [Michel & Ferat 1995] und RNase P. Diese katalysieren die Spaltung oder Ligation des RNA-Rückgrates durch Hydrolyse bzw. Umesterung von Phosphatgruppen, d.h. im allgemeinen nucleophile Substitutionen am Phosphoratom [Doudna & Cech 2002].

Da RNA aus hauptsächlich 4 Bausteinen zusammengesetzt ist, hat sie im Gegensatz zu Proteinen, denen mindestens 20 Aminosäuren zur Verfügung stehen, nur eingeschränkte Möglichkeiten der Strukturbildung. Dennoch können von ihr eine große Zahl von Faltungsmustern realisiert werden, wie doppelsträngige Bereiche,

Haarnadelschleifen und innere Schlaufen (loops), Ausstülpungen (bulges), Kreuzungsstellen (3 way/4 way-junctions) und Pseudoknoten (pseudoknots) [Batey et al. 1999]. Sie ist außerdem in der Lage, komplexe Tertiärstrukturen auszubilden und verfügt über Mechanismen zu deren Stabilisierung. RNA kann auf diese Weise Bindungstaschen und katalytische Zentren ausbilden, sowie mit einer Vielzahl von Molekülen wechselwirken. Um den Zusammenhang zwischen dreidimensionaler Struktur und Funktion zu verdeutlichen, sei auf ein relativ neues Experiment verwiesen, bei dem die Genexpression in lebenden Zellen durch spezifische Wechselwirkungen zwischen mRNA und kleinen Molekülen, welche eine Strukturveränderung der mRNA zur Folge hatten, kontrolliert werden konnte [Werstuck & Green 1998].

In jüngster Zeit ist durch Röntgenkristallstrukturuntersuchungen gezeigt worden, dass die vom Ribosom vermittelte Peptidsynthese durch ein Ribozym katalysiert wird, da das katalytische Zentrum der Peptidyltransferase ausschließlich durch RNA ausgeprägt wird und sich die Proteinuntereinheiten in größerem Abstand dazu befinden [Ban et al. 1999; Nissen et al. 2000].

Aufgrund dieses katalytischen Potentials sind Ribozyme interessante Kandidaten für die Wirkstoffforschung. In der Therapie von Krebs oder Virusinfektionen (z.B. HIV) wird die Anwendbarkeit von Ribozymen, besonders des Hammerhead und des Hairpin, untersucht [Rossi 1999]. Daneben befinden sich auch andere Wirkstoffe auf der Basis von Nucleinsäuren in vorklinischen und klinischen Studien [Sullenger & Gilboa 2002].

### 1.2 in vitro Selektion

Das Spektrum der chemischen Reaktionen, die durch RNA katalysiert werden können, wurde erweitert, indem Ribozyme aus kombinatorischen Nucleinsäurebibliotheken mit der Methode der *in vitro* Selektion isoliert wurden. Diese Methode wurde zu Beginn der 1990er Jahre in den Arbeitsgruppen von Szostak, Joyce und Gold [Ellington & Szostak 1990; Robertson & Joyce 1990; Tuerk & Gold 1990] parallel entwickelt und diente zunächst der Generierung von Nucleinsäuremolekülen mit spezifischem Bindungsvermögen an Zielmoleküle wie niedermolekulare Verbindungen oder Peptide [Burgstaller & Famulok 1994]. Sie beruht, wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, auf der wiederholten Selektion aktiver Spezies aus Nucleinsäurebibliotheken, die bis zu 10<sup>16</sup> verschiedene Oligonucleotide enthalten können, durch Abtrennung von unreaktiven Molekülen und der enzymatischen Amplifikation der auf diese Weise angereicherten Bibliothek. Wegen dieser beiden Schlüsselschritte wird das Verfahren auch als SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) bezeichnet.



Abbildung 1. Allgemeines Schema der in vitro Selektion. Ausgehend von einer chemisch synthetisierten DNA-Bibliothek gewinnt man durch Transkription eine RNA-Bibliothek. Damit erfolgt der Selektionsschritt, bei dem nach einem geeigneten Selektionskriterium die aktiven Species von den inaktiven Species abgetrennt werden. Die resultierende RNA-Bibliothek ist mit den aktiven Species angereichert und wird im Amplifikationsschritt vervielfältigt. Dieser Zyklus wird mehrfach durchlaufen, bis die aktiven Moleküle die Bibliothek dominieren. Sie werden dann vereinzelt, ihre Sequenz bestimmt und hinsichtlich ihrer Aktivität und Struktur charakterisiert.

Bei der *in vitro* Selektion können prinzipiell zwei Ziele verfolgt werden: a) die Selektion von Molekülen mit spezifischen Bindungseigenschaften (Aptamere), wie sie in Abbildung 1 bereits gezeigt wurde, oder b) die Selektion von Molekülen mit neuartigen katalytischen Funktionen (Ribozyme). Für letzteres existieren wiederum zwei verschiedene Herangehensweisen. Zum einen gibt es die Möglichkeit, bei der Suche nach einem Katalysator den Übergangszustand der betreffenden Reaktion zu modellieren und somit ein chemisches Übergangszustandsanalogon als Zielmolekül einer Selektion einzusetzen. Die gegen das Übergangszustandsanalogon selektierten Aptamere sollten dann auch als Katalysatoren der gewünschten Reaktion wirken können. Dieses Konzept wird sehr erfolgreich auf dem Gebiet der katalytischen Antikörper angewendet, wobei das Immunsystem eines tierischen Organismus als selbstoptimierende, kombinatorische Bibliothek ausgenutzt wird. Es gibt jedoch bisher nur wenige Beispiele, in denen erfolgreich mit einem Übergangszustandsanalogon Ribozyme aufgefunden werden konnten. Es handelt sich dabei um Ribozyme mit Biphenylisomerase- [Prudent et al. 1995], Cholesterinesterase- [Chun et al. 1999] und Porphyrinmetallierungsaktivität [Conn et al. 1996; Li & Sen 1996].

Die andere Möglichkeit zur Selektion von Nucleinsäuren mit katalytischer Aktivität ist die direkte Selektion, bei der beide Reaktionspartner als Edukte für die zu katalysierende Reaktion im Experiment vorliegen. Dabei ist der eine Reaktionspartner stets die RNA selbst, während der andere Reaktionspartner (oder das Spaltprodukt) mit einer Ankergruppe versehen ist, mittels der das entstandene Reaktionsprodukt über Affinitätschromatographie selektiert werden kann. Alle hierbei aufgefundenen Ribozyme unterliegen allerdings immer Selbstmodifizierungsreaktionen (*in cis*) und katalysieren nicht zwangsläufig die Reaktion zwischen freien Reaktanden (*in trans*) [Sengle et al. 2001].

In der folgenden Tabelle 1 sind Beispiele für selektierte Ribozyme zusammen mit der jeweils katalysierten Reaktion aufgelistet.

Katalysierte Reaktion	Reaktionsbeschleunigun	Referenz
	g	
Phosphodiesterspaltung	n.d.	[Santoro & Joyce 1997]
RNA-Ligation	700	[Ekland & Bartel 1995]
RNA-Polymerisation	n.d.	[Johnston et al. 2001]
RNA-Phosphorylierung	100 000	[Lorsch & Szostak 1994]
RNA-Aminoacylierung	>100 000	[Illangasekare et al. 1995]
Aminoacyl-Transfer	>2 000	[Lohse & Szostak 1996]
tRNA-Aminoacylierung	n.d.	[Lee et al. 2000]
Amidbindungsknüpfung	1 000 000	[Zhang & Cech 1997]
	10 000	[Wiegand et al. 1997]
Thioalkylierung	2 420	[Wecker et al. 1996]
Diels-Alder-Reaktion	800	[Tarasow et al. 1997]
	20 000	[Seelig & Jäschke 1999a]
Michael-Reaktion	5000	[Sengle et al. 2001]
glycosidische	1 000 000	[Unrau & Bartel 1998]
Bindungsknüpfung		
Biphenyl-Isomerisierung	88	[Prudent et al. 1995]
Porphyrin-Metallierung	460	[Conn et al. 1996]
	1 400	[Li & Sen 1996]

Tabelle1.Beispielefür durchRibozymekatalysierteReaktionenundderenReaktionsbeschleunigung.(adaptiert nach [Jäschke et al. 1999])

Im Gegensatz zu katalytischer RNA wurde katalytische DNA in der Natur bisher nicht aufgefunden. DNA unterscheidet sich von RNA durch das Fehlen der 2'-Hydroxylgruppe in der Riboseeinheit der Nucleotidbausteine. Obwohl damit potentiell eine funktionelle Gruppe weniger für die Koordination zwischen Substraten und aktiven Zentren oder die Ausbildung höherer räumlicher Strukturen zur Verfügung steht, war es möglich durch *in vitro* Selektion Desoxyribozyme aufzufinden [Breaker 1997]. Stellvertretend sollen hier Desoxyribozyme zur RNA- und DNA-Spaltung [Carmi & Breaker 2001; Li et al. 2000], Phosphorylierung und Ligation [Li & Breaker 2001], sowie Porphyrinmetallierung [Li & Sen 1996] genannt werden.

Eine weitere Strategie zur erfolgreichen Selektion ist die erweiterte Funktionalisierung von RNA. Sie könnte die Katalyse der Zielreaktion erleichtern, da sie die kleine Auswahl an Funktionalitäten in RNA oder DNA grundsätzlich vergrößert. Die Funktionalisierung kann an der 5-Position der Pyrimidine, der 8-Position der Purine oder der 2'-Position erfolgen. Die dazu notwendige Kompatibilität der funktionalisierten Nucleotide mit den im Selektionszyklus erforderlichen enzymatischen Transkriptions- und Amplifizierungsschritten konnte bereits erfolgreich gezeigt werden [Kujau & Wölfl 1998; Vaish et al. 2000].

### 1.3 Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden

Eine Weiterentwicklung der direkten Selektion besteht darin, den Reaktanden über ein langes, chemisch inertes, flexibles Verbindungsstück (einen sogenannten Linker) an jedes Molekül der RNA-Bibliothek zu heften. Diese Methode heißt direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden und wurde in den Labors von Eaton und Jäschke entwickelt [Seelig & Jäschke 1999a; Tarasow et al. 1997; Wiegand et al. 1997]. Als Linker werden dabei hauptsächlich chemisch funktionalisierte Polyethylenglycolketten eingesetzt. Durch die flexible Kopplung des einen Reaktanden an die RNA sollte es damit prinzipiell möglich sein, Ribozyme für beliebige bimolekulare Reaktionen zu selektieren, wenn es danach gelingt, die Reaktion zwischen abgekoppelten freien Reaktanden zu katalysieren. Das folgende Schema gibt die Prozedur wieder, die für die Selektion von Ribozymen für die Diels-Alder-Reaktion im Labor von A. Jäschke angewandt wurde [Seelig & Jäschke 1999a].



Abbildung 2. Selektionsschema zur Gewinnung von Ribozymen für die Diels-Alder-Reaktion von Anthracen mit Maleimid. Zu Beginn jeder Runde der Selektion wird der Reaktand Anthracen bei der Transkription über einen langen flexiblen Linker aus Polyethylenglycol an die individuellen Moleküle der RNA-Bibliothek kovalent konjugiert. Die Umsetzung erfolgt mit Biotinmaleimid, wobei die Biotinuntereinheit als Ankergruppe für die Affinitätschromatographie an einer mit Streptavidin derivatisierten Festphase fungiert. Nach Abtrennung der inaktiven Species wird die angereicherte RNA-Bibliothek in einer reversen Transkription in DNA umgeschrieben und diese durch Polymerasekettenreaktion vervielfacht.

Im ersten Schritt des Selektionszyklus wird die als DNA vorliegende kombinatorische Bibliothek in einer Transkription in eine RNA-Bibliothek umgeschrieben. Dabei wird gleichzeitig an jedes RNA-Molekül über einen Linker der erste der Reaktanden (hier Anthracen) kovalent gekoppelt. Im nächsten Schritt werden die Bibliothek und der zweite Reaktand (hier Biotinmaleimid) in einem geeigneten Puffersystem inkubiert, wobei diverse Cofaktoren, wie Metallionen u. Aminosäuren, hinzugesetzt werden, die potentielle Katalysatoren nutzen könnten. Die Temperatur und Reaktionszeit können in den aufeinander folgenden Selektionsrunden jeweils verändert werden, um so den Selektionsdruck zu erhöhen. Nach erfolgter Reaktion haben die katalytisch wirksamen Mitglieder der Bibliothek durch kovalente Bindungsknüpfung die Ankergruppe erworben und können durch Affinitätschromatographie an einer mit Streptavidin modifizierten Festphase von den übrigen abgetrennt werden. Die RNA-Moleküle werden in einer reversen Transkription (RT) in DNA umgeschrieben und mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. So ergibt sich eine an katalytisch wirksamen Sequenzen angereicherte Bibliothek.

Für die Kopplung des Reaktanden an ein RNA-Molekül kommen prinzipiell zwei Möglichkeiten in Betracht: Kopplung am 5'-Terminus oder am 3'-Terminus. Da bekannt ist, dass die T7-RNA-Polymerase derivatisiertes Guanosin bei der Transkriptionsinitiation toleriert, lässt sich die 5'-Modifizierung durch Zugabe des mit dem entsprechenden Reaktanden versehenen Initiator-Nucleotides erreichen [Pitulle et al. 1992]. Dieser Weg wurde auch in der oben gezeigten Abbildung 2 verwirklicht. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Guanosinmonothiophosphat als Initiator-Nucleotid und dessen postranskriptionale Derivatisierung mit dem gewünschten Reaktanden [Gaur et al. 1997; Gaur & Krupp 1997]. Analog kann für die Modifikation am 3'-Ende derivatisiertes 5'-P-Cytosin als Substrat für die T4-RNA-Ligase eingesetzt werden [England et al. 1980;England & Uhlenbeck 1978].

Die Einführung des Linkers in das Selektionsschema hat noch einen weiteren Vorteil. Bei der Selektion werden alle RNA-Moleküle angereichert, die die Ankergruppe des zweiten Reaktanden erworben haben. Dies kann aber auch dadurch geschehen, dass die Verknüpfung gar nicht dem gewünschen kovalente an Reaktionsort (am linkergekoppelten Reaktanden) geschieht, sondern an der RNA selbst. Wird nun in den Linker eine Bruchstelle eingeführt, die nach dem Selektionschritt gespalten wird, so können die gewünschten RNAs von den unerwünscht modifizierten getrennt werden. So kann während der Selektion die Regioselektivität der Reaktion kontrolliert werden. Als Spaltstelle kann ein orthoNitrobenzyl-Baustein verwendet werden, welcher photochemisch gespalten werden kann und bereits erfolgreich in Selektionen eingesetzt werden konnte [Hausch & Jäschke 1998; Sengle et al. 2001]. Auch Disulfid-Gruppen wurden beschrieben, um Funktionalitäten über einen entsprechenden Linker reversibel in RNA-Moleküle einzuführen [Sengle et al. 2000].

Die *in vitro* Selektion ist aus zwei Gründen von besonderem Interesse. Zum einen haben die auf diesem Wege gefundenen Aptamere und Ribozyme großes Potential für die Weiterentwicklung zu Wirkstoffen und Therapeutika in der Medizin, z.B. in der Krebstherapie. Durch Einsatz von chemisch modifizierten Nucleotiden, wie beispielsweise Phosphorothioaten [Eckstein 2000] oder 2'-Modifikationen [Sproat 1995], konnte außerdem die Stabilität der Kandidaten gegenüber Nucleasen *in vivo* gesteigert werden. In diesem Zusammenhang ist auch die Technologie der Spiegelmere zu nennen, bei der anstelle der natürlichen D-Nucleotide die spiegelbildlichen L-Nucleotide in der Oligonucleotidsynthese eingesetzt werden und deren Stabilität im Serum nachgewiesen ist [Leva et al. 2002; Wlotzka et al. 2002].

Zum anderen können sie eine Interpretation für die molekulare Evolution liefern. Sie können die Hypothese stützen, dass zeitlich vor unserer heutigen, von Proteinenzymen dominierten Biologie, in welcher DNA lediglich als stabiler Speicher der genetischen Information dient, eine sogenannte RNA-Welt existiert hat, in welcher RNA sowohl die Speicherung der genetischen Information, als auch die Katalyse der biochemischen Prozesse bewerkstelligt hat [Gesteland et al. 1999]. Die Tatsache, dass durch *in vitro* Selektion bereits Ribozyme gefunden wurden, die glycosidische Bindungsknüpfung, Polymerisation, Ligation, Phosphorylierung, Aminoacylierung und Peptidbindungsknüpfung katalysieren können, zeigt, dass RNA prinzipiell in der Lage ist, alle diese Prozesse auszuführen und es mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch in der Evolutionsgeschichte getan haben könnte [Bartel & Unrau 1999; Yarus 1999].

#### 1.4 Diels-Alderasen

Die nach ihren Entdeckern benannte Diels-Alder-Reaktion ist die wichtigste Cycloaddition in der organisch chemischen Synthese. Bei der Diels-Alder-Reaktion bildet sich durch Addition eines Alkens an ein konjugiertes Dien ein Cyclohexen [Diels & Alder 1928]. Sie wird als [4+2]-Cycloaddition bezeichnet, weil vier  $\pi$ -Elektronen des zwei π-Elektronen Alkens (Dienophil Diens und des genannt) an den Bindungsänderungen beteiligt sind. Mechanistisch handelt es sich dabei um einen konzertierten, jedoch nicht unbedingt synchronen Prozess, für den die WoodwardHoffmann-Regeln von der Erhaltung der Orbitalsymmetrie gelten [Sauer & Sustmann 1980]. Die Diels-Alder-Reaktion kann im allgemeinen durch Zugabe von Lewis-Säuren katalysiert werden.

In dem oben gezeigten Selektionsschema wurde die Reaktion von Anthracen als sehr hydrophobem Dien mit dem elektronenarmen Biotinmaleimid untersucht (Diels-Alder-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf). Abbildung 3 gibt die allgemeine Reaktionsgleichung der Diels-Alder-Reaktion zwischen substituierten Anthracen und Maleimid wieder.



Abbildung 3. Reaktionsschema der Diels-Alder-Reaktion von Anthracen und Maleimid. Der mittlere Ring von Anthracen fungiert in der Diels-Alder-Reaktion als Dien. Die Doppelbindung von Maleimid ist die dienophile Komponente. Bei der Reaktion entsteht aus zwei planaren Ausgangsmolekülen ein dreidimensionales, starres Reaktionsprodukt.

Aus diesem Reaktionsschema wird schon ersichtlich, dass zwei planare Eduktmoleküle unter Umwandlung zweier  $\pi$ -Bindungen zu einem Produkt mit einem starren dreidimensionalen Gerüst mit zwei neuen  $\sigma$ -Bindungen reagieren. Die Reaktion verläuft über eine stark negative Aktivierungsentropie unter großem Enthalpiegewinn.

Obwohl die Diels-Alder-Reaktion als C-C-Bindungsknüpfungsreaktion auch industriell bei der Wirkstoffproduktion von großer synthetischer Bedeutung ist, war lange kein Beispiel für ihr Vorkommen in der Natur bekannt. Erst in jüngster Zeit ist gewiss geworden, dass in der Biosynthese der Solanapyrone A und D [Katayama et al. 1998] sowie von Lovastatin [Auclair et al. 2000] die Diels-Alder-Reaktion ein Schlüsselschritt ist und enzymatisch katalysiert wird. Die entsprechenden Enzyme werden auch als Diels-Alderasen bezeichnet. Kürzlich wurde die erste Kristallstruktur einer mutmaßlichen natürlichen Diels-Alderase, von Macrophomat-Synthase, publiziert [Ose et al. 2003; Watanabe et al. 2000].

Jedoch wurden bereits früher in mehreren Forschergruppen katalytische Antikörper für Diels-Alder-Reaktionen generiert. An diesen Antikörpern wurden ausgedehnte Untersuchungen zu Struktur, Kinetik, Mechanismus und Stereoselektivität vorgenommen [Gouverneur et al. 1993; Hilvert et al. 1989; Romesberg et al. 1998].

Es gab bereits Versuche, Ribozyme durch Selektion gegen Übergangszustandsanaloga der Diels-Alder-Reaktion zu erhalten. Obwohl erfolgreich bindende RNA-Moleküle angereichert wurden, konnten keine Katalysatoren daraus evolviert werden [Morris et al. 1994].

Auf der anderen Seite gelang es Tarasow und Eaton, Ribozyme für eine Diels-Alder-Reaktion mit einem aliphatischen Dien zu selektieren [Tarasow et al. 1997]. Dabei war die RNA-Bibliothek durch Einführen von Pyridylresten in Uridin erweitert funktionalisiert worden. Diese Substitutionen wie auch die Anwesenheit von Kupfer-Ionen sind für die katalytische Wirkung unerlässlich [Tarasow et al. 1999].

Für die Diels-Alder-Reaktion zwischen Anthracen und Maleimid wurde das in Abbildung 2 gezeigte Selektionsschema in der Arbeitsgruppe Jäschke entworfen und die Selektion durchgeführt. Dabei wurde Anthracen als Dien über einen Polyethylenglycollinker an das 5'-Ende der RNA-Bibliothek mit 2\*10<sup>14</sup> Molekülen, die 120 randomisierte Nucleotide enthielt, kovalent gebunden. Das Dienophil Maleimid ist mit einem Biotinylrest als Ankergruppe versehen. So konnten alle Spezies, die im Verlaufe der Reaktion diese Ankergruppe durch Bindungsknüpfung erwarben, mittels Affinitätschromatographie an einer Streptavidin-Festphase immobilisiert werden. Nach zehn Selektionsrunden war die Reaktivität der angereicherten Bibliothek um das 10000-fache erhöht gegenüber der Ausgangsbibliothek. Nach Klonierung und Sequenzierung konnten 13 verschiedene Sequenzfamilien identifiziert werden, von denen die Besten die Reaktion 20000-fach beschleunigten. Es konnte ein kleines Motiv ermittelt werden, das in 90% aller aktiven Sequenzen vorhanden war und in Abbildung 4 schematisch dargestellt ist [Seelig & Jäschke 1999a].



Abbildung 4. Vorgeschlagenes katalytisch aktives Minimalmotiv des Diels-Alder-Ribozyms mit einem allgemeinen Nummerierungsschema. Die beiden Teile der asymmetrischen internen Schlaufe werden hier als Bulge 1 und Bulge 2 bezeichnet. Helix I und Helix III werden von zwei Schlaufen (Loop 1, Loop 2) variabler Länge geschlossen. Am formal ungepaarten 5'-Terminus ist Anthracen über einen Polyethylenglycollinker kovalent gebunden. (Abbildung adaptiert aus [Seelig & Jäschke 1999a])

Dieses Motiv besteht nach Sekundärstrukturanalyse aus drei Helices und drei formal einzelsträngigen Bereichen. Davon formen zwei eine innere Schlaufe (hier als *bulge* bezeichnet), die vermutlich das katalytische Zentrum darstellt. Die vier ungepaarten Nucleotide am 5'-Terminus dienen möglicherweise der Positionierung des Reaktanden im katalytischen Zentrum.

Dieses Minimalmotiv ist äußerst variabel. Durch formales Auftrennen erst des einen und dann des zweiten Tetraloops konnten die sogenannten bi- bzw. trimolekularen Varianten des Ribozyms erzeugt werden, die somit als echte Katalysatoren die Diels-Alder-Reaktion von kurzen Anthracen-Oligonucleotiden mit mehrfachem Turnover beschleunigen. Sie sind in der folgenden Abbildung 5 schematisch dargestellt.



Abbildung 5. Schematische Darstellung der zwei- und dreisträngigen Varianten des Diels-Alder-Ribozyms. Links: Die zweisträngige Variante besteht aus einem Ribozymstrang (38-mer), der mit einem Substratstrang (11 Nucleotide) hybridisiert. Rechts: Bei der dreisträngigen Variante hybridisieren zwei Stränge (24-mer und 18-mer) zur Ribozymdomäne; der Substratstrang wird aus 11 Nucleotiden gebildet. Die kurzen Oligonucleotide, aus denen sich die Konstrukte zusammensetzen, sind durch chemische Synthese leicht zugänglich. Diese Varianten eignen sich daher gut für funktionelle Untersuchungen des Ribozyms.

An diesen Systemen wurden umfangreiche Mutationsanalysen vorgenommen. Diese ergaben, dass in der vermutlich katalytisch aktiven internen Schlaufe nur vier Nucleotide hochkonserviert sind. Es sind jedoch auch alle vier Nucleotide des 5'-Terminus (GGAG) zu nahezu 100% konserviert. Weiterhin ist es möglich, die Helices vollständig durch DNA zu ersetzen. Sogar in der Region der Schlaufe und im GGAG-Terminus können einzelne Nucleotide durch Desoxynucleotide ersetzt werden. Der Polyethylenglycollinker, der durchschnittlich 13 Polyethylenglycoleinheiten lang war, liess sich auf sechs Einheiten (Hexaethylenglycol) verkürzen.

Die einzelsträngige Ribozymvariante, das 49-mer-Minimalmotiv, ist tatsächlich in der Lage, die Reaktion zwischen freien Reaktanden zu katalysieren [Huang et al. 1998; Seelig et al. 2000]. Die Reaktion zwischen Anthracen-Hexaethylenglycol und Biotinmaleimid lässt sich UV-spektrometrisch sehr gut verfolgen. Da bei der Diels-Alder-Reaktion das ausgedehnte konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem unterbrochen wird, lässt sich der Verlauf der Reaktion als Abnahme der typischen langwelligen Absorption des Anthracens bei 365 nm messen. In der Tabelle 2 ist eine Auswahl von Substratvarianten, die v. Ribozym umgesetzt werden, mit ihren zugehörigen relativen Reaktionsgeschwindigkeiten aufgelistet [Stuhlmann & Jäschke 2002].



*Tabelle 2.* Verschiedene Anthracen- und Maleimidderivate, die als Substrate vom 49-mer Diels-Alder-Ribozym mit den angegebenen relativen Reaktionsgeschwindigkeiten umgesetzt werden.

Wie ebenfalls aus dieser Tabelle ersichtlich wird, reagieren sogar kleinere Reaktanden wie 9-Hydroxymethylanthracen und andere Derivate. Auf der Seite des Dienophils lassen sich dsgl. ausgiebige Verkürzungen des Substratmoleküls vornehmen. Der Biotinylrest ist nicht für die Erkennung durch das Ribozym verantwortlich. Maleimid lässt sich bis zum N-Ethylmaleimid verkleinern, welches immer noch deutlich schneller als in der Hintergrundreaktion umgesetzt wird. Besonders gute Substrate sind N-Pentylmaleimid, &-Maleimidocapronsäure und deren Methylester. Bei derartigen Reaktivitätsstudien liegt ein Problem in der Löslichkeit der Reaktanden. Unpolare Reaktanden machen oft den Zusatz organischer Lösungsmittel erforderlich. Aus der Selektion ist ein Ribozym hervorgegangen, das in wässeriger Pufferlösung bei pH 7,4 und einer Magnesiumkonzentration von mindestens 5 mM seine optimale katalytische Aktivität erreicht. Bei Zugabe organischer Solventien wie Ethanol, Dimethylsulfoxid oder Acetonitril bis zu einer Konzentration von 10% bleibt die katalytische Aktivität dennoch erhalten, wenn auch in geringerem Maße.

Damit ist dieses Ribozym der erste Vertreter, der in der Lage ist, C-C-Bindungsknüpfungsreaktionen von kleinen freien organischen Reaktanden zu katalysieren. In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen vorgestellt, die zur weiteren Aufklärung der katalytischen Funktion und struktureller Charakteristika dieser Diels-Alderase-Ribozyme durchgeführt worden sind.

# 2 Aufgabenstellung

In der Einleitung wurde ein kleines Ribozym beschrieben, das in der Lage ist, die Diels-Alder-Reaktion zwischen kovalent an die RNA gebundenem Anthracen und mit Biotin derivatisiertem Maleimid zu katalysieren. Dieses Ribozym mit Diels-Alderase-Aktivität wurde von Seelig und Jäschke im Jahre 1999 publiziert. Die in der *in vitro* Selektion angereicherten langen katalytischen RNAs ließen sich zu einer minimalen katalytischen Einheit aus 49 Nucleotiden verkürzen. Dieses Minimalribozym war weiterhin in der Lage, die Diels-Alder-Reaktion zwischen frei in Lösung befindlichen Reaktanden zu katalysieren.

Bis zu diesem Zeitpunkt existierten jedoch nur wenige experimentelle Untersuchungen zur Funktionsweise der Katalyse dieses Minimalmotivs sowie keine Informationen über den dreidimensionalen Aufbau, durch den die katalytische Funktion des Ribozyms verursacht wird.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der funktionellen Grundlagen der Katalyse der Diels-Alder-Reaktion durch RNA. Dabei sollten zunächst die kinetischen Parameter der RNA-Katalysatoren bestimmt werden, wofür sich UV- und Fluoreszenz-spektroskopische Techniken eignen sollten. Desweiteren sollten mittels Chromatographie die stereochemischen Aspekte der katalysierten Diels-Alder-Reaktion untersucht werden. Schließlich sollten Beiträge zur Aufklärung von Sekundär- und Tertiärstruktur der Ribozyme geleistet werden. Dafür konnten verschiedene experimentelle biochemische und biophysikalische Techniken genutzt werden, wie der Sonden, Einsatz enzymatischer und chemischer NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie. Diese Untersuchungen sollten der Aufklärung der katalytischen Eigenschaften dienen und Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktionsweise von Diels-Alderase-Ribozymen ermöglichen.

# 3 Material und Methoden

# 3.1 Oligoribonucleotide

Alle Sequenzen sind in der Richtung 5'  $\rightarrow$  3' angegeben. Die Oligoribonucleotide wurden als Produkte aus chemischer Festphasensynthese entweder käuflich erworben (Fa. Dharmacon Inc. [Scaringe et al. 1998]) oder selbst synthetisiert bzw. durch *in vitro* Transkription mit geeigneten DNA-Templaten hergestellt.

49-mer Ribozym: GGAGCUCGCUUCGGCGAGGCCGUGCCAGCUCUUCGGAGCAAU ACUCGGC

38-mer: GGGCGAGGCCGUGCCAGCUCUUCGGAGCAAUACUCGGC

11-mer: GGAGCUCGCCC

Klonsequenzen

#8:

#10:

GGAGCUCAGCCUUCACUGCACUUUCAUGGAACUUGCGAGCUGGCUAGAGGCCAUGC CACCUCCCACGGAGUAAUACUUGGCGACAAAUUGGAUUUAAUGUGCAUCUAAGUGC GUUUCCAGCACUUCCACAUAGGCACCACGGUCGGAUCCAC #13:

GGAGCTCAGCCTTCACTGCAAGAGCTTAAGATGACGCGATTTCGCCATCGCAAGGTGC ATCGGGCTTCAGGTAATGTCGTCACAGCTTGCGGCATCACTCTTGCTCTTAGTCCTTCT ATACGAATCCTGGTCTGTATGTGGCACCACGGTCGGATCCAC #17:

GGAGCUCAGCCUUCACUGCUGAGGGCGUGCCAAUUUCAGGUGAUUGCGAUACCAUC CCUGCACGCAAAUAUUCCUGAUUUAAUACUCGUUACCCAGUGGUAGUUAUACAUGAC CUAACCACAGACCACCUCGACCGGCACCACGGUCGGAUCCAC #22:

GGAGCUCAGCCUUCACUGCCUUUUGCCGGAAACUUUCUCGGAACCAAAUAUCCGUC GAAGACUGAGACCGUGCCAAUAAGACGUCUAUGCGCCGUAAUGCCAAUGUCUUUUA AUACUCGGAACCCGGAACCGGCACCACGGUCGGAUCCAC #23:

GGAGCUCAGCCUUCACUGCUGGCUGAGUCCGUGCCAGCUAACCGUCCCUUCGACG GUAGAAAUACUCGGAAUUAUUCUUUUUUGGGUUACACCCUGGAUCUCCUUUUUUAU GACUUUACGUCGUAACACGGGCACCACGGUCGGAUCCAC #28:

GGAGCUCAGCCUUCACUGCUUUGAGGGGCCCUUCCUAAGCACCUAAGCCCUAGCAAC ACAGUGUUCGGCUGGGGACGUGCCAAGUCCCUAAAUAUCUUUAGAAGACUAAUACU CGUCACGGGAAUGUCUGGCACCACGGUCGGAUCCAC #32:

GGAGCUCAGCCUUCACUGCAUUCGCUAUAGGGACUGGGGCUGUGCCGCCCGGCCC GCUAUAUGAAUAAAACUGACGCUAUGGCCGGGAAUACUCAGCACUACGGAUCGACC GUCAUAUUCCUCUCGGCACCACGGUCGGAUCCAC #36:

GGAGCUCAGCCUUCACUGCGAGUCCGUGCCAGCUAUCAAUAGCAAUACUCGGAGAC GCCGGCCUGGUACCUUGCAAGAUAGACAUCUUCUGUCAGGCGUUAAAACAUCGCCA UCGCAUGUAGAAUGGGCACCACGGUCGGAUCCAC

#40:

GGAGCUCAGCCUUCACUGCACCUCGUAGCUAGAGCAUACUGGGGAUUGUGAGGGUA UGAGGGCGUGCCACGCCAGCACGGAACCAUGGAAUAGUUAUGGUUGAGUGUCGGC GAAUACUCGCCACGGGUUAGUCCGGCACCACGGUCGGAUCCAC #50:

GGAGCUCAGCCUUCACUGCUGAGGCAGUGCCGCCCGCGAUUAGCUGACGGGAACAC UCUGCUGCUAUGUUAUUUAGGGUUCCUCCGUAACACGGGUCCAAUGCCUCGUCCCU UUCGCCUAGGACCCACAUUGGCACCACGGUCGGAUCCAC 10-mer: GGAGCUCGCC 9-mer: GGAGCUCGC

8-mer: GGAGCUCG

24-2: GGGCGAGGCCGUGCCAGCUGCC

24-3: GGGCGAGGCCGUGCCAGCUCC

24-4: GGGCGAGGCCGUGCCAGUCC

18-2: GGCAGCAAUACUCGGC

18-3: GGAGCAAUACUCGGC

18-4: GGACAAUACUCGGC

24 SE (*sticky ends*): UGCCGGGCGAGGCCGUGCCAGCUC

18-mer: GGCAGAGCAAUACUCGGC

U1A-HI (55-mer):

GGAGCUCCCAUUGCACUCCGGGAGGCCGUGCCAGCUCUUCGGAGCAAUACUCGGC

U1A-HIII (57-mer):

GGAGCUCGCUUCGGCGAGGCCGUGCCAGCUCCAUUGCACUCCGGAGCAAUACUCG GC

# 3.2 Oligodesoxyribonucleotide

Alle Sequenzen sind in der Richtung 5'  $\rightarrow$  3' angegeben. Die Oligodesoxyribonucleotide wurden als Produkte aus chemischer Festphasensynthese käuflich erworben (Fa. IBA; Fa. MWG).

Template für 49-mer 23 sense: TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTC 23M49: GCCGAGTATTGCTCCGAAGAGCTGGCACGGCCTCGCCGAAGCGAGCTC CTATAGTGAGTCGTATTAGA

Template für 11-mer:

23 sense: TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTC M49tr7b: GGGCGAGCTCCTATAGTGAGTCGTATTAGA

Template für 10-mer:

23 sense: TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTC M49tr6b: GGCGAGCTCCTATAGTGAGTCGTATTAGA

Template für 9-mer:

23 sense: TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTC M49tr5: GCGAGCTCCTATAGTGAGTCGTATTAGA

Template für 8-mer:

23 sense: TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTC M49tr4: CGAGCTCCTATAGTGAGTCGTATTAGA

### 3.3 Standardmethoden und Reagenzsysteme

Folgende Standardmethoden wurden entsprechend den angegebenen Literaturstellen [Pingoud & Urbanke 1997;Sambrook et al. 1989] oder nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ethanol- und Isopropanolfällungen, Polyacrylamidgelelektrophorese (Rothiphorese DNA Sequenziersystem, Roth), Agarosegelelektrophorese, NAP 5 - Gelfiltration, photometrische Mengenbestimmung von Nucleinsäuren, Cerenkov-Messung, Elution von Nucleinsäuren aus Gelen, Anfärben von Gelen mit SYBRGold<sup>TM</sup>, UV-Shadowing. Alle Feinchemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Acros, Merck, Roth, Riedel-de Haën und Baker in der größtmöglichen Reinheit bezogen.

# 3.4 Enzymatische Synthese von Ribonucleinsäuren durch T7-Transkription

Mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 lässt sich *in vitro* eine DNA-Sequenz in eine komplementäre RNA umschreiben, sofern sie an ihrem 3'-Ende einen 17 Basenpaare langen doppelsträngigen Erkennungsbereich (T7-Promotor) besitzt [Milligan et al. 1987; Milligan & Uhlenbeck 1989]. Die eingebauten Basen werden in Form von Nucleosidtriphosphaten (NTPs) benötigt. Durch Einsetzen von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-NTP oder auch  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-GTP läßt sich die hergestellte RNA radioaktiv markieren. Die RNA-Synthese beginnt im Anschluss an die Promotorregion stets mit einem Guanosinnucleotid, wobei sich die Ausbeuten der Transkription deutlich erhöhen, wenn die RNA mit zwei oder mehreren Guanosinnucleotiden beginnt.

Als DNA-Matrizen wurden hybridisierte synthetische Oligonucleotide eingesetzt. Sie wurden durch Erhitzen der äquimolaren Mischung der beiden DNA-Stränge auf 95°C für 3 Minuten und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur über einen Zeitraum von mehr als 1 h präpariert. Es wurden so die DNA-Matrizen für das 49-mer Ribozym und für die Substrat-RNA-Konjugate (8-mer bis 11-mer) aus entsprechenden synthetischen Oligonucleotiden hybridisiert.

#### Standardansatz für Hybridisierung:

20 µl	DNA-sense-Strang mit Promotorbereich (100 $\mu$ M)
20 µl	DNA-antisense-Strang (100 μM)
10 µl	10x PCR-Puffer (Gibco-BRL)
ad 100 μl	Wasser

#### Standardansatz für Transkription:

10 µl	dsDNA-Matrizen mit Promotorbereich (z.B. 20 $\mu$ M)
10 μl	10x Transkriptionspuffer
10 µl	Dithiothreitol (0,1 м, Gibco-BRL)
1,2 μl	Rinderserumalbumin (20 mg/ml, Boehringer Mannheim)
5 μl	lpha- <sup>32</sup> P-CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham)
je 4 μl	NTPs (je 100 mм, Roche)
4 μl	T7-Polymerase (50 U/μl, Stratagene)
ad 100 μl	Wasser

10x Transkriptionspuffer:

800 mM	HEPES, pH 7,5
220 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	Spermidin

In der Regel wurde zur radioaktiven Markierung  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP benutzt. Der Transkriptionsansatz wurde für 2-4 Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurde ein Aliquot (2 µl) zur radioaktiven Bestimmung der hergestellten Menge an RNA abgenommen und der Reaktionsansatz direkt durch denaturierende PAGE gereinigt. Die Produktbanden wurden über Autoradiographie detektiert, aus dem Gel ausgeschnitten, mit 0,3 M Natriumacetat pH 5,5 2x ca. 45 min bei 70 °C eluiert und mit Ethanol präzipitiert. Die erhaltene RNA und das Aliquot wurden am Cerenkov-Zähler

vermessen und daraus die Ausbeute bestimmt. Für die Quantifizierung der RNA wurden folgende Formeln benutzt:

Einbaurate des alpha - 32P - CTP = Radioaktivität der RNA [cpm] \* 100% eingesetzte Gesamtradioaktivität [cpm]

RNA - Stoffmenge = <u>Einbaurate \* Konzentration CTP \* Ansatzvolumen</u> <u>Anzahl der im Transkript vorkommenden Cytidine</u>

#### 3.4.1 T7-Transkription mit Initiatornucleotid

Das Enzym T7-RNA-Polymerase toleriert manche chemische Modifikationen im Initiationsschritt [Pitulle et al. 1992]. Während der Initiation der Transkription setzt das Enzym Guanosinmonophosphat oder 5'-Konjugate von Guanosinmonophosphat um und baut diese am 5'-Ende der RNA-Transkripte ein, jedoch nicht während der Elongationsschritte.

Zur Erzeugung von 5'-Anthracen-Hexaethylenglycol-modifizierter RNA wurde das Initiatornucleotid Anthracenmethylen-hexaethylenglycol-guanosin in Konzentrationen von 1-4 mM den Transkriptionsansätzen zugegeben, wobei die GTP-Konzentration dabei teilweise erniedrigt wurde [Seelig & Jäschke 1997; Seelig & Jäschke 1999b]. Die Durchführung der Reaktion und Aufreinigung erfolgte analog zur Transkription ohne Initiatornucleotid, wobei sich hier das Anthracen-RNA-Konjugat aufgrund seiner geringeren elektrophoretischen Mobilität von den unmodifizierten Transkripten abtrennen ließ.

Standardansatz:

30 µl	dsDNA-Matrizen mit Promotorbereich (z.B. 20 $\mu$ M)
10 µl	10x Transkriptionspuffer
10 µl	Dithiothreitol (0,1 M, Gibco-BRL)
1,2 μl	Rinderserumalbumin (20 mg/ml, Boehringer Mannheim)
10 µl	lpha- <sup>32</sup> P-CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham)

je 4 μl	ATP, CTP, UTP (je 100 mM, Roche)
2 µl	GTP (100 mm, Roche)
75 OD	Anthracen-HEG-Guanosin
4 μl	T7-Polymerase (50 U/μl, Stratagene)
ad 100 μl	Wasser

### 3.5 Chemische Synthese von Nucleinsäuren

#### 3.5.1 Standardprozedur mit dem Phosphoramiditverfahren

Für die durchgeführten RNA-Synthesen wurde der Syntheseautomat EXPEDITE 8909 der Firma Applied Biosystems verwendet. Er arbeitet nach dem Phosphoramidit-Verfahren nach Beaucage & Caruthers [Caruthers et al. 1987]. Dazu wurden Standard-Synthesechemikalien der Firmen Proligo und Cruachem, sowie Acetonitril der Firma Roth (Wassergehalt ≤10 ppm) eingesetzt.

Es wurde mit  $\beta$ -Cyanoethylphosphoramiditen gearbeitet, deren exocyclische Aminogruppen mit den üblichen Schutzgruppen geschützt waren: *iso*Butyryl-G, Benzoyl-A und Benzoyl-C. Die 2'-Hydroxylgruppe der Ribophosphoramidite war als *tert*Butyldimethylsilylether geschützt.

Die Synthesen wurden im 0,2 oder 1 µmol-Maßstab durchgeführt. Dazu kam CPG-Säulenmaterial (*controlled pore glass*) mit einer Porengröße von 500 Å zum Einsatz. Die Standardsyntheseprotokolle des Geräteherstellers wurden optimiert: Waschschritte erfolgten mit der 1,5- bis 2-fachen Zahl an Pulsen und der Oxidationsschritt wurde mit der 2- bis 3-fachen Menge an Oxidationsreagenz durchgeführt. Für DNA-Synthesen wurde Dicyanoimidazol als Aktivator benutzt. Durch die Verwendung von 0,2 M Benzylthiotetrazol als Aktivator bei RNA-Synthesen konnte der Amiditverbrauch auf zwei Drittel der ursprünglichen Menge gesenkt und außerdem die Kopplungszeit von ca. 10 auf 4 Minuten verkürzt werden [Welz & Müller 2002]. Die Amidite wurden in Konzentrationen von 0,1 M als Lösungen in Acetonitril eingesetzt. Im Folgenden ist ein typisches Syntheseprotokoll für eine RNA-Synthese im 1 µmol-Maßstab im Expedite-Format wiedergegeben:

-	
н	unction
	anouon

Mode

de Amount Time(sec) Description

\$De	\$Deblocking				
144 /*Index Fract. Coll. */ NA 1 0 "Event out ON"					
0	/*Default	*/ WAIT	0	1.5 "Wait"	
141	/*Trityl Mon. On/Off	*/ NA	1	1 "START data collection"	
38	/*Diverted Wsh A	*/ PULSE	15	0 "Flush system with Wsh A"	
16	/*Dblk	*/ PULSE	20	0 "Dblk to column"	
0	/*Default	*/ WAIT	0	20 "Default"	
16	/*Dblk	*/ PULSE	20	0 "Deblock"	
0	/*Default	*/ WAIT	0	20 "Default"	
16	/*Dblk	*/ PULSE	20	0 "Dblk"	
0	/*Default	*/ WAIT	0	20 "Default"	
38	/*Diverted Wsh A	*/ PULSE	60	0 "Flush system with Wsh A"	
141	/*Trityl Mon. On/Off	*/ NA	0	1 "STOP data collection"	
144	/*Index Fract. Coll.	*/ NA	2	0 "Event out OFF"	
\$Cc	oupling				
1	/*Wsh	*/ PULSE	8	0 "Flush system with Wsh"	
2	/*Act	*/ PULSE	5	0 "Flush system with Act"	
18	/*A + Act	*/ PULSE	6	0 "Monomer + Act to column"	
18	/*A + Act	*/ PULSE	2	0 "Couple monomer"	
0	/*Default	*/ WAIT	0	80 "Default"	
18	/*A + Act	*/ PULSE	2	0 "A + Act"	
0	/*Default	*/ WAIT	0	80 "Default"	
2	/*Act	*/ PULSE	5	78 "Couple monomer"	
1	/*Wsh	*/ PULSE	2	24 "Couple monomer"	
1	/*Wsh	*/ PULSE	21	0 "Flush system with Wsh"	
\$Ca	ipping				
12	/*Wsh A	*/ PULSE	30	0 "Flush system with Wsh A"	
13	/*Caps	*/ PULSE	7	0 "Caps to column"	
13	/*Caps	*/ PULSE	6	15 "Cap"	
12	/*Wsh A	*/ PULSE	9	23 "Cap"	
12	/*Wsh A	*/ PULSE	21	0 "Flush system with Wsh A"	
\$Ox	kidizing	*/ 5/ 1/ 65	-0		
15	/*Ox	*/ PULSE	50	0 "Ox to column"	
0	/*Default	*/ WAII	0	20 "Default"	
12	/*Wsh A	*/ PULSE	35	0 "Flush system with Wsh A"	
\$Ca	ipping	*/ 0111 05	-	0.00	
13		*/ PULSE	1	U "Caps to column"	
12	/^VVSh A	7/ PULSE	45	U "End of cycle wash".	

Die Abspaltung des synthetisierten Oligonucleotides vom Trägermaterial und Basenentschützung erfolgte mit 0,5-2 ml 40%-iger wässeriger Methylaminlösung bei 65°C für 10-20 min im Wasserbad [Wincott et al. 1995]. Die überstehende Lösung wurde dann abgenommen und das CPG-Trägermaterial noch 3x mit je 1 ml einer Lösung aus Ethanol, Acetonitril und Wasser im Mischungsverhältnis 3:1:1 gewaschen. Diese Filtrate wurden vereinigt und nach vorheriger Kühlung in flüssigem Stickstoff im Vakuum zur Trockne eingeengt. Die Abspaltung der Silylschutzgruppen durch Flusssäure erfolgte mit 250  $\mu$ l einer Mischung aus N-Methylpyrrolidinon, Triethylamin und Triethylamin\*Trihydrofluorid im Verhältnis 3:1,5:2 für 90 min bei 65°C [Westman & Strömberg 1994]. Um das Rohprodukt durch *reversed phase*-HPLC aufreinigen zu können, mussten die Fluoridionen entfernt werden. Dies geschah durch Schütteln mit 500  $\mu$ l Isopropyltrimethylsilylether und nachfolgende Fällung des Rohproduktes mit 1 ml Diethylether bei Raumtemperatur.

Die RNA wurde anschließend durch *reversed phase*-HPLC an einer C<sub>18</sub>-Festphase aufgereinigt. Die Detektion erfolgte über die UV-Absorption bei 260 nm. Die Peaks wurden fraktioniert und anschließend im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die gereinigten Oligoribonucleotide wurden danach noch durch NAP 5-Gelfiltration und Ethanolfällung entsalzt.

# 3.5.2 Synthese von Anthracenmethylenhexaethylenglycol-β-cyanoethylphosphoramidit

Lichtausschluss 250 (0,53)mmol) Unter wurden mg Anthracenmethylenhexaethylenglycol in einem Schlenkgefäss über Nacht im Ölpumpenvakuum getrocknet und mit Argon begast. Dazu wurden mit einer Spritze 5 ml wasserfreies Dichlormethan (SureSeal, Fluka) gegeben und mit einem Magnetrührer eine klare Lösung hergestellt. Mit einer Spritze wurden dazu 1,06 mmol wasserfreies Diisopropylethylamin (über CaH<sub>2</sub> getrocknet) gegeben, woraufhin die gelbe Lösung ihre Farbe vertieft. 0,7 mmol N,N-Diisopropyl-β-cyanoethyl-chlorophosphan (farblose Flüssigkeit, Lancaster) wurden mit einer Spritze langsam zugetropft. Die Lösung färbt sich braun und wird bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss 45 min gerührt, bis im etwa Dünnschichtchromatogramm kein Edukt mehr detektiert wird (Laufmittel: Ethylacetat/Triethylamin 100:1, R<sub>f, Edukt</sub> 0,15; R<sub>f, Produkt</sub> 0,6). Das Lösungsmittel wird dann am Rotationsverdampfer entfernt und das feste gelbe Öl im Ölpumpenvakuum mindestens 2 h lang getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt war rein genug, um direkt in der Synthese modifizierter Oligoribonucleotide eingesetzt werden zu können. <sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 148,7 ppm

#### 3.5.3 Herstellung 5'-konjugierter Oligoribonucleotide

Für die Synthese der Anthracenmethylenhexaethylenglycol-RNA-Konjugate wurde im Prinzip genauso verfahren, wie bei der Herstellung unmodifizierter Oligonucleotide. Der letzte Kopplungsschritt wurde mit einer 0,075-0,1 M Lösung des Anthracenmethylenhexaethylenglycol- $\beta$ -cyanoethylphosphoramidites in Acetonitril ausgeführt. Dabei wurden die doppelte Menge Aktivatorreagenz eingesetzt, die Kopplungszeit auf 2 x 15 min ausgedehnt und die letzte saure Dimethoxytritylabspaltung unterlassen.

### 3.6 Radioaktive Markierung von Oligonucleotiden

#### 3.6.1 5'-Markierung durch Phosphorylierung

Der freie 5'-Terminus von Oligonucleotiden läßt sich mit dem Enzym Polynucleotid-Kinase (PNK) aus dem Phagen T4 phosphorylieren. Dabei wird das  $\gamma$ -Phosphat eines ATP auf die 5'-Hydroxylgruppe des Oligonucleotides übertragen. Benutzt man  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, wird somit eine radioaktive Markierung ermöglicht.

Standardansatz:

а

1 μl	RNA aus chemischer Synthese (z.B. 10 pmol)
	3 min 65°C, dann 10 min auf Eis
1,5 μl	10x Kinasierungspuffer (MBI Fermentas)
3 μl	γ- <sup>32</sup> P-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham)
4 μl	T4-Polynucleotidkinase (10 U/μl, MBI Fermentas)
d 15 μl	Wasser

Nach Inkubation bei 37°C für 1,5-2 Stunden wurde der Ansatz durch 15% PAGE (Sequenziergelapparatur) aufgereinigt, autoradiographiert, ausgeschnitten und das Oligonucleotid mit je 150 µl Maxam & Gilbert-Elutionslösung (0,5 M NH<sub>4</sub>OAc; pH 5,5; 10mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 0,1% SDS) 3x30 min bei 37 °C eluiert. Als

Fällungshilfe wurden 20 µg 5',3'-Adenosindiphosphat (pAp) zugegeben und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 30 µl Wasser gelöst und durch Gelfiltration (Sephadex G-25) entsalzt.

#### 3.6.2 3'-Markierung durch Ligation

Mit dem Enzym T4-RNA-Ligase kann die 3'-Hydroxylgruppe einer RNA mit der 5'-Phosphatgruppe eines weiteren RNA-Moleküls in Gegenwart von ATP verestert werden. Bei Verwendung von beispielsweise Cytidin-3'-(5'-<sup>32</sup>P)-diphosphat (pCp) erlaubt diese Reaktion die radioaktive Markierung des 3'-Terminus von RNA [England et al. 1980].

Standardansatz:

1 μl	RNA aus chemischer Synthese (z.B. 10 pmol)			
	3 min 65°C, dann 10 min auf Eis			
1,5 μl	10x Ligationspuffer (MBI Fermentas)			
1,5 μl	1 тм АТР			
3 μl	lpha- <sup>32</sup> P-pCp (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham)			
2 µl	T4-RNA-Ligase (20 U/μl, MBI Fermentas)			
ad 15 µl	Wasser			

Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde der Ansatz durch 15% PAGE (Sequenziergelapparatur) aufgereinigt, autoradiographiert, ausgeschnitten und das Oligonucleotid mit je 150 µl Maxam & Gilbert-Elutionslösung (0,5 M NH4OAc; pH 5,5; 10mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 0,1% SDS) 3x30 min bei 37 °C eluiert. Als Fällungshilfe wurden 20 µg 5',3'-Adenosindiphosphat (pAp) zugegeben und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 30 µl Wasser gelöst und durch Gelfiltration (Sephadex G-25) entsalzt.

## 3.7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

# 3.7.1 Reversed phase-HPLC zur Reinigung von Oligonucleotiden

HPLC ist eine Säulenchromatographie, bei der durch Verwendung von sehr feinkörnigem Trägermaterial für die stationäre Phase (5 bis 10 µm) eine sehr geringe Trennstufenhöhe und damit verbunden eine große Trennleistung erreicht wird. Zur Trennung von Nucleinsäuren wird eine unpolare Umkehrphase (*reversed phase*) als stationäre Phase eingesetzt. Dafür werden die polaren Silanolgruppen von Kieselgel mit Alkylsilanen umgesetzt. Hier wurden C<sub>18</sub>-Säulen mit 18 Kohlenstoffatomen in der modifizierenden Alkylkette verwendet (Ultrasphere ODS C18, 5µm, 80 Å Porengröße, 250 x 4,6 mm bzw. "LUNA" der Firmen Beckmann und Phenomenex). Die mobile Phase war ein binärer Gradient aus Puffer A (0,1 M TEAAc, pH 7,0) und Puffer B (0,1 M TEAAc, pH 7,0 in 80% Acetonitril). Die chromatographische Trennung wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min und einer Säulentemperatur von 45°C durchgeführt. Es wurden die Gerätekonfigurationen System Gold der Firma Beckmann und ChemStation von Hewlett-Packard verwendet. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei einer oder mehreren durch die Methode bestimmten Wellenlängen.

HPLC-Methode zur Reinigung von kurzen Oligonucleotiden:

0-30 min	1-40 % Puffer B
30-33 min	40-100 % Puffer B
33-38 min	100 % Puffer B
38-43 min	100-1 % Puffer B

HPLC-Methode zur Reinigung von Anthracenmethylenhexaethylenglycol-11-mer-RNA-Konjugat:

0-5 min	1-35 % Puffer B
5-15 min	35-40 % Puffer B
15-20 min	40-100 % Puffer B
20-25 min	100 % Puffer B
25-28 min	100-1 % Puffer B

0-15 min	1-45 % Puffer B
15-20 min	45-55 % Puffer B
20-25 min	55-90 % Puffer B
25-26 min	90-100 % Puffer B
26-31 min	100 % Puffer B
31-33 min	100-1% Puffer B

HPLC-Methode zur Reinigung von Inhibitor-11-mer-RNA-Konjugat:

### 3.7.2 HPLC an chiralen Festphasen

Für die Untersuchungen zur Enantioselektivität wurden sowohl eine chiral derivatisierte Normalphase [Tokioka et al. 1997], als auch eine chiral derivatisierte *reversed phase* genutzt.

Die Trennung der enantiomeren Produkte der Diels-Alder-Reaktion mit 9-Hydroxymethylanthracen und Anthracenmethylenmonoethylenglycol als Dien erfolgte auf einer normalen stationären Phase, die mit (R)-Phenylglycin als chiraler Gruppe derivatisiert war.

Säule: Chirex (R)-PGLY & DNB (Phenomenex), 250 x 4,00 mm Flussrate: 1,0 ml min<sup>-1</sup> Temperatur: 23°C UV-Detektion: 230 nm Gradient: *n*-Hexan/1,2-Dichlorethan/Ethanol 77:20:3 isokratisch.

Die Trennung der enantiomeren Produkte der Diels-Alder-Reaktion mit Anthracenmethylenhexaethylenglycol als Dien erfolgte auf einer Umkehrphase, die mit (R)-α-Naphthylethylamin als chiraler Gruppe derivatisiert war. Säule: YMC Chiral NEA (R) (YMC Europe), 250 x 4,6 mm, S-5µm, 300 Å Flussrate: 0,8 ml min<sup>-1</sup> Temperatur: 46°C UV-Detektion: 210 nm

Gradient: Wasser/Ethanol 65:35 isokratisch.
# 3.8 Aktivitätsmessung von Ribozymen

#### 3.8.1 Gelelektrophoretischer Assay

Die Experimente zur intermolekularen Katalyse im zwei- bzw. dreisträngigen Ribozymsystem wurden mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Nach erfolgter Reaktion mit Biotinmaleimid lassen sich die Reaktionsprodukte durch ihre geringere elektrophoretische Mobilität von den unumgesetzten Anthracenmethylen-hexaethylenglycol-Oligonucleotiden trennen.

Unter enzymgesättigten Bedingungen (einfacher Turnover), bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit von Konzentrationsänderungen des Enzyms innerhalb einer Zehnerpotenz unbeeinflußt ist, wurden die durch chemische Festphasensynthese hergestellten Anthracenmethylenhexaethylenglycol-Oligonucleotide vor dem Assay noch am 3'-Ende radioaktiv markiert . Diese wurden in einer Konzentration von 1 nM mit 0.5 µM Enzymstrang (38-mer RNA) in Anwesenheit von 300 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 7.4 und 80 mM MgCl<sub>2</sub> mit 5 µM Biotinmaleimid umgesetzt.

Nach der Inkubation wurden Aliquots entnommen und die Reaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Stop-Mix (20 mM EDTA, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 80% Formamid) abgebrochen. Die Proben wurden auf ein 18%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend mit dem Phosphorimager analysiert.

Zur Untersuchung eines multiplen Turnovers wurden analoge Experimente, jedoch unter substratgesättigten Bedingungen (0.5 µM Enzymstrang; 10 µM Anthracenmethylenhexaethylenglycol-Oligonucleotid) und mit 50 µM Biotinmaleimid durchgeführt. Aufgrund der höheren Konzentration des Substratstranges war die Anfärbung mit SYBRGold<sup>TM</sup> und Detektion mit dem Fluorimager zum Nachweis des Reaktionsproduktes ausreichend, sodass keine zusätzliche radioaktive 3'-Markierung erforderlich war.

#### 3.8.2 UV-spektrometrischer Assay

Anthracen und seine Derivate weisen ein typisches UV-Spektrum auf mit einem besonders großen Absorptionsmaximum bei 254 nm und drei längerwelligen kleinen Absorptionsmaxima bei 345, 365 und 385 nm ("Anthracenfinger"). Durch die Reaktion mit dem Maleimid in der Diels-Alder-Reaktion wird jedoch das dreigliedrige aromatische Ringsystem zerstört und die längerwelligen Absorptionsmaxima verschwinden.

Auf diese Weise konnten relative Reaktionsgeschwindigkeiten durch UV/Vis-Spektroskopie bestimmt werden. Die Absorption der jeweiligen Anthracenderivate bei einer Wellenlänge von 365 nm wurde für 5 bis 15 min bei Raumtemperatur verfolgt. Die Reaktionen wurden in 30 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4), 300 mM NaCl und 80 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt, wobei je nach Löslichkeit der Komponenten ein Anteil von bis zu 12% organischem Lösungsmittel zugesetzt wurde. Die katalysierten Reaktionen wurden mit 7 µM Ribozym durchgeführt. Die Reaktionen wurden in einer Mikroküvette in einem Volumen von 7 µl verfolgt (Hellma, 1mm bzw. 1 cm Schichtdicke). Die Konzentration der Diene wurde von 50 bis 400 µM variiert und die der Dienophile von 0,5 bis 4 mM. Die Messungen wurden durchgeführt, indem die organischen Substrate in ihrem jeweiligen Lösungsmittel nacheinander zur wässerigen Lösung der RNA in Puffer gegeben wurden. Anfangsgeschwindigkeiten wurden bestimmt durch Verfolgen der UV-Absorption über die ersten 5% Umsatz.

#### 3.8.3 Fluoreszenzspektrometrischer Assay

Anthracen ist ein Fluorophor, das bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 253 nm eine typische blauviolette Fluoreszenz bei 419 nm zeigt. Durch die Reaktion mit dem Maleimid in der Diels-Alder-Reaktion wird jedoch das dreigliedrige aromatische Ringsystem zerstört und die Fähigkeit zu der beschriebenen Fluoreszenz geht verloren. Analog zur UV-spektrometrischen Messung erfolgt also hier die Messung der Abnahme der Fluoreszenz.

Die Messungen wurden am Spektrometer MOS-250 der Firma BioLogic bei den oben angegebenen Wellenlängen durchgeführt. Dazu wurde in einer MikroFluoreszenzküvette (Volumen 30 µl, Hellma) das Anthracen-RNA-Konjugat in einer Konzentration von 0.5 µM eingesetzt und die Reaktion durch Zugabe der Maleimidkomponente (Endkonzentration 50 µM) gestartet. Das entsprach einem 100-fachen Überschuss über Anthracen-RNA-Konjugat. Danach wurde die Abnahme der Anthracenfluoreszenz spektrometrisch über mindestens 300 Sekunden verfolgt.

# 3.9 Bestimmung von Strukturelementen durch enzymatisches und chemisches *probing*

Die strukturelle Kartierung (engl. structural probing) von Oligonucleotiden basiert auf der sterischen Zugänglichkeit eines Makromoleküls für verschiedene Sonden. Es besteht eine Korrelation zwischen der Zugänglichkeit von spezifischen Positionen eines Oligonucleotides für enzymatische oder chemische Agenzien und der Spaltung an diesen Stellen [Giege et al. 1999]. Daher kann für die experimentelle Erarbeitung eines Sekundärstrukturmodells die RNA einer limitierten RNase-Hydrolyse oder chemischen Modifizierung unterworfen werden. Die enzymatischen Spaltungen oder chemischen Modifikationen werden statistisch durchgeführt, d.h. so, dass weniger als eine Spaltung pro Molekül auftritt [Brunel & Romby 2000]. Parallel dazu werden Kontrollen unter denselben Bedingungen inkubiert, jedoch in Abwesenheit der Sonde. Zwei verschiedene Methoden werden zur Identifizierung der RNase-Spaltungen oder modifizierten Nucleotide benutzt. Beide Methoden leiten sich von der Gelsequenzierung von Nucleinsäuren ab. Zum einen können endständig markierte RNA-Moleküle mit weniger als 200 Nucleotiden untersucht werden. Dabei werden allerdings nur Strangbrüche des RNA-Rückgrates detektiert. Die andere Methode macht sich den Abbruch der reversen Transkription an modifizierten oder gespaltenen Nucleotiden zunutze. Damit können große RNA-Moleküle untersucht werden, aber auch kleine, wenn chemische Modifizierungen an Watson-Crick-Positionen kartiert werden sollen, die nicht durch Strangbruch zugänglich sind.

Hier wurden ausschließlich Spaltungen an endständig markierter RNA untersucht. Dabei kam sowohl am 5'- als auch am 3'-Terminus mit <sup>32</sup>P radioaktiv markierte RNA zum Einsatz. Die markierte RNA wurde dem Angriff der Sonde in Gegenwart von tRNA als Carrier unterworfen, um so das Verhältnis Sonde zu RNA einstellen zu können. Nach der Aufarbeitung wurden die erzeugten RNA-Fragmente auf einem Sequenziergel aufgetrennt und autoradiographiert. Die Zuordnung der Fragmente erfolgte mittels alkalischer Hydrolyse und einer Sequenzierreaktion mit RNase T1, die unter denaturierenden Bedingungen die Positionen der Guanosinreste angibt.

#### 3.9.1 Spaltungen mit RNasen

Im folgenden werden die Charakteristika der Nucleasen aufgeführt, mit denen Experimente durchgeführt wurden [Ehresmann et al. 1987].

**RN**ase T1 Aspergillus (MW 11000 Da) spezifisch aus orizae spaltet Phosphodiesterbindungen benachbart 3'-Phosphat zum von ungepaarten Guanosinresten in RNA. Bei der Hydrolyse entstehen Fragmente mit einem 3'-Phosphat.

RNase T2 aus *Aspergillus orizae* (MW 36000 Da) ist eine Einzelstrang-spezifische Endonuclease mit Präferenz für Adenosinreste. Bei der Hydrolyse entstehen Fragmente mit einem 3'-Phosphat.

Nuclease S1 aus *Aspergillus orizae* (MW 32000 Da) ist eine Einzelstrang-spezifische Endonuclease, die die Anwesenheit von Zn<sup>2+</sup> erfordert. Sie zesetzt sowohl RNA als auch DNA und erzeugt Fragmente mit einem 5'-Phosphat. Nuclease S1 wird verbreitet zur Erkennung ungepaarter RNA-Regionen genutzt. Zur Durchführung der Hydrolyse bei neutralem pH sind hohe Konzentrationen erforderlich.

RNase U2 aus *Ustilago sphaerogena* (MW 12490 Da) spaltet bevorzugt 3'-5'-Phosphodiesterbindungen von ungepaarten Adeninen in RNA.

RNase V1 ist eine Endonuclease aus dem Kobra *Naja naja oxiana* Venom (MW 15900 Da) und spaltet bevorzugt doppelsträngige oder strukturierte Regionen in RNA ohne Basenspezifität. Dabei entstehen Fragmente mit einer 5'-Phosphatgruppe. RNase V1 spaltet auch einzelsträngige Regionen, die in einer gestapelten Konformation vorliegen.

Durchführung:

Die <sup>32</sup>P-markierte RNA (50.000 cpm/Ansatz) wurde mit tRNA zu einer finalen Konzentration von 0,15  $\mu$ g/ $\mu$ l in Wasser gelöst und durch Erwärmen auf 65°C für 3 min und Abkühlen auf Raumtemperatur während 20 min renaturiert. Limitierte Hydrolysen mit den Nucleasen S1, T2, T1, U2 und V1 wurden in 20 µl 40 mM Tris-HCl (pH 7,5), 40 mM NaCl und 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Für die Reaktion mit RNase S1 wurde ZnCl<sub>2</sub> in einer finalen Konzentration von 1 mM zugegeben. Die Reaktionsansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur mit 30 U Nuclease S1, 0,1 U RNase T2, 0,05 U RNase T1, 2,5 U RNase U2 und 0,2 U RNase V1 inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 20 µl 0,6 M Natriumacetat, 3 mM EDTA und  $0,1 \ \mu g/\mu l$  tRNA und anschließende Extraktion mit 40  $\mu l$  Phenol gestoppt. Die RNA wurde mit dem zehnfachen Volumen (400 µl) 2% LiClO<sub>4</sub> in Aceton präzipitiert, das Pellet mit 350 µl Aceton gewaschen und 5 min an Luft getrocknet. Die Proben wurden dann mit einer Lösung aus 7 M Harnstoff, 20 mM EDTA, Bromphenolblau und Xylencyanol versetzt und auf die gleiche Konzentration an cpm gebracht. Gleich große Probenvolumina wurden dann auf ein 15%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 1500 Volt für 3 h durchgeführt und die Banden mittels Phosphorimager analysiert.

## 3.9.2 Modifizierung und Spaltung mit chemischen Sonden

Das N7-Atom von Adenosin ist besonders zugänglich für die Carboethoxylierung durch Diethylpyrocarbonat (MW 174). Die Modifikation zerstört die Resonanz des heterocyclischen Ringes und der Imidazolring öffnet sich zwischen den Atomen N7 und C8. Dadurch wird eine Stelle für die Strangspaltung durch Anilin erzeugt. Die Reaktion mit DEPC untersucht die Einbindung des N7-A in tertiäre Wechselwirkungen oder Hoogsteen- bzw. reverse Hoogsteen-Basenwechselwirkung. DEPC ist empfindlich gegen Basenstapelung, d.h. Adenin in Helices ist nicht reaktiv.

Dimethylsulfat (MW 126) reagiert mit N7-G, N1-A sowie N3-C. Hier wurde die Cytosin-Reaktion durchgeführt. Dabei wird ungepaartes Cytosin an der Position N3

methyliert. Das resultierende 3-Methylcytosin wird mit Hydrazin behandelt und ist danach zugänglich für die Strangspaltung mit Anilin. [Ehresmann et al. 1987]

#### Durchführung:

Für die chemische Modifizierung von Adeninresten mit DEPC und Cytosinresten mit DMS wurde die 32P-markierte RNA mit tRNA zu einer finalen Konzentration von 0,03 µg/µl in Wasser gelöst und durch Erwärmen auf 65°C für 3 min und Abkühlen auf Raumtemperatur während 20 min renaturiert. Puffer wurde zu einer finalen Konzentration von 50 mM Natriumkakodylat (pH 7,5), 300 mM KCl und 10 mM MgCl<sub>2</sub> für native Bedingungen oder 50 mM Natriumkakodylat (pH 7,5) und 1 mM EDTA für semidenaturierende und denaturierende Bedingungen in 100 µl hinzugegeben. Für Modifizierungsexperimente unter nativen und semidenaturierenden Bedingungen wurden 5 vol% DEPC (5 µl) als reine Substanz zugegeben und die Reaktionsansätze für 50 min bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt, bzw. 5 vol% einer Lösung von 10% DMS in Ethanol (5 µl) wurden zugegeben und die Reaktionsansätze für 9 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionen unter denaturierenden Bedingungen wurden bei 80°C für 2 min in beiden Fällen durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Natriumacetat bis zu einer finalen Konzentration von 0,3 M und zweimalige Ethanolfällung gestoppt. Das Pellet der Reaktion mit DMS wurde in 20 µl einer 10%-igen Lösung von Hydrazin in Wasser aufgenommen, bei 0°C für 10 min inkubiert und nachfolgend zweimalig mit Ethanol gefällt. Die Pellets der Reaktionen mit DEPC und DMS wurden dann in 15 µl eines Puffers aus 9% Anilin-Acetat (pH 4,5) gelöst und bei 60°C für 10 min im Dunkeln inkubiert. Nach Ethanolfällung wurde die RNA in 7 M Harnstoff gelöst und auf die gleiche Konzentration an cpm gebracht. Gleich große Probenvolumina wurden dann auf ein 15%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 1500 Volt für 3 h durchgeführt und die Banden mittels Phosphorimager analysiert.

#### 3.9.3 Spaltungen mit Blei(II)-acetat

Unter bestimmten Bedingungen können auch divalente Metallionen die Spaltung von RNA begünstigen. Vor allem Pb<sup>2+</sup>-Ionen werden als chemische Nucleasen zur strukturellen Sondierung herangezogen. Dabei können zwei Arten von Spaltung unterschieden werden: starke Spaltung, die von einer starken Bindungsstelle für zweiwertige Metallionen mit richtiger stereochemischer Orientierung des gespaltenen Phosphodiesters herrührt, oder schwache Spaltung an verschiedenen Stellen in flexiblen Regionen, meist Schlaufen oder Ausstülpungen.

#### Durchführung:

Für die Spaltungsreaktion mit Pb<sup>2+</sup> wurde die <sup>32</sup>P-markierte RNA (50.000 cpm/Ansatz) mit tRNA zu einer finalen Konzentration von 0,125 µg/µl in 10 µl Wasser gelöst und durch Erwärmen auf 65°C für 3 min und Abkühlen auf Raumtemperatur während 20 min renaturiert. 20 µl Puffer wurde zu einer finalen Konzentration von 40 mM Tris-HCl (pH 7,5), 40 mM NaCl und 10 mM MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von frisch bereiteter Blei(II)-acetatlösung (finale Konzentration 0,75 mM) gestartet. Nach 15, 30 und 45 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Mischen mit einer Lösung aus 7 M Harnstoff, 20 mM EDTA, Bromphenolblau und Xylencyanol gestoppt. Die Proben wurden auf die gleiche Konzentration an cpm gebracht. Gleich große Probenvolumina wurden dann auf ein 15%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 1500 Volt für 3 h durchgeführt und die Banden mittels Phosphorimager analysiert.

### 3.9.4 Identifizierung der Spaltstellen

Die RNA-Spaltprodukte wurden zugeordnet, indem bei der Gelelektrophorese parallel Produkte aus alkalischer RNA-Hydrolyse und limitierter Spaltung mit RNase T1 der gleichen RNA aufgetragen wurden. Alkalische Hydrolyseleitern wurden erzeugt, indem die RNA-Lösung mit tRNA (0,15  $\mu$ g/ $\mu$ l) in 10  $\mu$ l 50 mM Natriumhydrogencarbonat (pH 9,0) bei 90°C für 8 min inkubiert wurde. Partieller Verdau mit RNase T1 erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (12,5 mM Natriumcitrat pH 4,5, 0,5 mM EDTA, 3,5 M Harnstoff) mit 0,05 U des Enzyms bei 55°C für 10 min.

# 3.10 NMR-Spektroskopie von Nucleinsäuren

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen verschiedener Ribozymvarianten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Anh-Tuan Phan im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dinshaw J. Patel, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, durchgeführt. Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden bei 10°C auf Varian Inova Spektrometern bei einer Arbeitsfrequenz von 800 MHz aufgenommen. Die RNA wurde in Konzentrationen von 0,2 bzw. 0,5 mM in Probenvolumina von 300 µl gelöst. In einem typischen Ansatz befanden sich 5 mM Puffer (Tris-d<sub>11</sub> oder Natriumphosphat), 30 mM NaCl, 20 µl D<sub>2</sub>O und wechselnde Konzentrationen an MgCl<sub>2</sub>.

# 3.11 Kristallisation von Nucleinsäuren

Kristalle biologischer Makromoleküle entstehen aus wässerigen Lösungen durch Übersättigung. Die strenge Anordnung der Moleküle im Kristallgitter führt zur Beugung und Interferenz einfallender Röntgenstrahlen. Aus dem resultierenden Diffraktionsmuster lassen sich bei der Röntgenstrukturanalyse die asymmetrische Einheit, die Parameter der Elementarzelle, die Raumgruppe und der vollständige dreidimensionale Aufbau des Makromoleküls berechnen [Wedekind & McKay 2000].

Die Versuche zur Kristallisation erfolgten mit der Methode des hängenden Tropfens (*hanging drop*). Bei dieser Kristallisationsmethode sind die RNA-Lösung im Tropfen und die Reservoirlösung durch eine Dampfphase räumlich voneinander getrennt. Aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen des Fällungsmittels im Tropfen und im Reservoir baut sich ein Konzentrationsgradient auf, der durch Dampfdiffusion einen Gleichgewichtszustand anstrebt. Indem das Lösungsmittel Wasser aus dem vergleichsweise kleinen Tropfenvolumen (1,5-4 µl) diffundiert, wird die RNA-Lösung langsam aufkonzentriert und die Probe überschreitet die Sättigungsgrenze.

Für die Kristallisation fanden Linbro®-Schalen mit 4 x 6 zylindrischen Vertiefungen Verwendung. 1 µl der zu kristallisierenden Probe wurde mit 1 µl Kristallisationslösung (auch Mutterlösung) auf einem siliconisierten Deckgläschen (Durchmesser 22 mm) gemischt. In die Vertiefung wurden 700 µl Reservoirlösung gefüllt und das Deckgläschen luftdicht umgekehrt darüber befestigt. Die Mutterlösungen variierten hinsichtlich Puffer, pH-Wert, mono- und divalenter Kationen, Fällungsmittel und Polyaminen. Im ersten Ansatz wurden kommerziell erhältliche Screens der Firma Hampton Research benutzt, die jeweils eine unvollständige Matrix (*sparse matrix*) an Bedingungen enthalten (Crystal Screen I und II<sup>TM</sup>, Natrix<sup>TM</sup>, PEG/Ion<sup>TM</sup>). Die Inkubation wurde bei verschiedenen Temperaturen (4°C, 17°C, 30°C, 40°C) vorgenommen. Das Kristallwachstum wurde mittels Stereomikroskop, Kamera und Dokumentationseinrichtung verfolgt.

Die Aufnahme der Diffraktogramme durch Röntgenbeugung erfolgte in Zusammenarbeit den mit Kollaborationspartnern im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dinshaw J. Patel, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York. Als Strahlungsquelle kamen sowohl das dortige hauseigene Diffraktometer als auch Synchrotronstrahlung zum Einsatz. Dort wurden auch die theoretischen Berechnungen im Rahmen der Röntgenstrukturanalyse durchgeführt.

# 4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit bestand darin, Ribozyme, die mittels der in Das vitro Selektionstechnik zur Katalyse der Diels-Alder-Reaktion gewonnen worden sind, hinsichtlich ihrer Funktionsweise zu charakterisieren und Beiträge zur Aufklärung ihrer Struktur zu liefern. Für die Bearbeitung dieser Fragestellungen konnte eine Vielzahl von experimentellen Techniken genutzt werden, wie Festphasensynthese von Oligonucleotiden, UV-Spektroskopie, HPLC an chiralen Festphasen, biochemische Methoden zur strukturellen Sondierung Nucleinsäuren. sowie deren von biophysikalische Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie Röntgenund kristallographie.

# 4.1 Kinetische Analyse

Bei der *in vitro* Selektion musste ein Reaktand, in diesem Falle war es Anthracen, kovalent mit der RNA verbunden sein. Auf diese Weise wurden Ribozyme isoliert, die sich selbst modifizieren und damit keinen katalytischen Turnover besitzen. Das gemeinsame katalytische Motiv aller selektierten Sequenzen konnte zu einem Minimalmotiv bestehend aus 49 Nucleotiden kondensiert werden, das eine 18500-fache Reaktionsbeschleunigung gegenüber der thermischen Hintergrundreaktion aufwies. Mit der Entwicklung eines UV-spektroskopischen kinetischen Assays konnte für dieses Minimalmotiv gezeigt werden, dass auch freie, d.h. nicht an die RNA gebundene Reaktanden umgesetzt werden. Dafür musste die Konzentration des Anthracens im Assay der lokalen Konzentration des linkergekoppelten Anthracens angepasst werden, was das Arbeiten in Mikroküvetten erforderlich machte.

In Abbildung 6 ist die Abnahme der UV-Absorption bei 365 nm von frei in Lösung befindlichem 9-Hydroxymethylanthracen bei der Umsetzung mit N-Pentylmaleimid in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an 49-mer Ribozym zu erkennen. Die Anfangsgeschwindigkeit der katalysierten Reaktion ist danach proportional zur Konzentration des Ribozyms.



Abbildung 6. Proportionalität der Anfangsgeschwindigkeit der ribozymkatalysierten Reaktion zur Ribozymkonzentration. Reaktionsbedingungen: 49-mer Ribozym in den angegebenen Konzentrationen, 100 μM 9-Hydroxymethylanthracen, 500 μM N-Pentylmaleimid, 300 mM NaCl, 80 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10% EtOH.

Die kinetischen Parameter der ribozymkatalysierten Reaktion wurden nun durch Messung der Anfangsgeschwindigkeiten der katalysierten und der unkatalysierten Reaktion aus deren Differenz bestimmt. Aus Gründen der Wasserlöslichkeit wurden für diese Messungen das Anthracenmethylenhexaethylenglycol und ε-Maleimidocapronsäure verwendet. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden aus der Abnahme der Absorption des Anthracens bei einer Wellenlänge von 365 nm über die ersten 5 % des Umsatzes durch nichtlineare Regression bestimmt. Bezüglich beider Substrate konnte eine Sättigungskinetik festgestellt werden. Das wird in der Abbildung 7 oben für die Variation der Dienophilkonzentration erkennbar. Eine analoge Auftragung wurde für die Variation der Dienkonzentration bei konstant gehaltenen Dienophilkonzentrationen durchgeführt, in Abbildung 7 unten dargestellt.



*Abbildung* 7. Anfangsgeschwindigkeiten der ribozymkatalysierten Reaktion von Anthracenmethylenhexaethylenglycol mit ε-Maleimidocapronsäure. Oben: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Dienophils bei konstanten Konzentrationen des Diens von ● 55, ○ 99, ▼ 190, ∇ 415 µM. Unten: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

von der Konzentration des Diens bei konstanten Konzentrationen des Dienophils von • 0,5, O 1,  $\checkmark$  2,  $\bigtriangledown$  4 mM. Reaktionsbedingungen: 7  $\mu$ M 49-mer Ribozym, 300 mM NaCl, 80 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2% DMSO. Die Anfangsgeschwindigkeiten V<sub>ini</sub> wurden aus der Abnahme der UV-Absorption während der ersten 5% Umsatz durch nichtlineare Regression der Kurve errechnet. Die scheinbare maximale Geschwindigkeit V<sub>max(app)</sub> wurde als Schnittpunkt mit der Ordinate aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (1/V<sub>ini</sub> gegen 1/[Dienophil]) erhalten.

Die doppelt reziproke Auftragung dieser Werte  $1/V_{ini}$  gegen 1/[Dienophil] bzw. 1/[Dien]) ergibt zwei Lineweaver-Burk-Diagramme mit jeweils vier Geraden, deren Schnittpunkte mit der y-Achse die scheinbaren maximalen Geschwindigkeiten  $V_{max(app)}$ angeben. Diese Werte wurden in einer Sekundärauftragung wiederum reziprok gegen die reziproken Substratkonzentrationen aufgetragen, was in der Abbildung 8 gezeigt ist.



Abbildung 8. Sekundärauftragung der ribozymkatalysierten Reaktion von Anthracenmethylenhexaethylenglycol mit  $\varepsilon$ -Maleimidocapronsäure. Auftragung der scheinbaren maximalen Geschwindigkeit gegen die Konzentration des konstant gehaltenen Substrats ( $\bullet$  Dien, O Dienophil), um die tatsächlichen V<sub>max</sub>-Werte als Schnittpunkte mit der Ordinate und die Michaelis-Konstanten (K<sub>m</sub>) als Schnittpunkte mit der negativen Abszisse zu erhalten. Geradengleichungen:  $\bullet$  Dien y=2,4309x+0,0066; O Dienophil y=54,539x+0,0066. [Seelig et al. 2000]

Aus der doppelt reziproken Sekundärauftragung ergeben sich die Werte für die Maximalgeschwindigkeit (1/Schnittpunkt mit Ordinate) und die Michaelis-Konstanten (-Anstieg/Schnittpunkt mit Ordinate). Daraus wurden als Michaelis-Konstanten 370  $\mu$ M für das Dien und 8 mM für das Dienophil errechnet. Die berechnete Maximalgeschwindigkeit beträgt 150  $\mu$ M min<sup>-1</sup>, was bei einer Ribozymkonzentration von 7  $\mu$ M einem k<sub>cat</sub> von 21 min<sup>-1</sup> entspricht. Die Gleichungen für die Geraden der Sekundärauftragung lauten für das Dien y=2,4309x+0,0066 (R<sup>2</sup>=0,903) und für das Dienophil y=54,539x+0,0066 (R<sup>2</sup>=0,990). Die Standardabweichungen für den Schnittpunkt mit der y-Achse waren trotz der recht guten Regressionskoeffizienten von der gleichen Größenordnung wie die Messwerte (±0,0060 bzw. ±0,0045), womit die Korrektheit der Werte für V<sub>max</sub> (1/Schnittpunkt mit Ordinate) und K<sub>m</sub>

Korrektheit der Werte für  $V_{max}$  (I/Schnittpunkt mit Ordinate) und K<sub>m</sub> (- Anstieg/Schnittpunkt mit Ordinate) unsicher wird. Deshalb wurde zur rechnerischen Überprüfung der erhaltenen kinetischen Konstanten zusätzlich eine direkte nichtlineare Regression der Daten aus Abbildung 7 mit der Software SigmaPlot nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt. Hierfür wurde die Katalyse als vollkommen zufälliges Zweireaktandensystem (Random Bi-Uni-Mechanismus) betrachtet. Diese Methode ergab für V<sub>max</sub> 140±25 µM min<sup>-1</sup>, für K<sub>m, Dien</sub> 200±35 µM und für K<sub>m, Dienophil</sub> 5,2±1,3 mM mit einem Korrelationskoeffizienten von R<sup>2</sup>=0,980.

Unter nicht gesättigten Bedingungen von 415 µM Dien und 4 mM Dienophil lag die größte direkt gemessene Anfangsgeschwindigkeit bei 43 µM min-1, was sechs Umsetzungen pro Molekül Katalysator und Minute entspricht. Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die Hintergrundreaktion kuncat beträgt 3,2 M-1min-1. Das Ribozym arbeitet demnach als echtes Enzym mit schnellem mehrfachem Turnover. Eine Rückreaktion konnte nicht detektiert werden. Die Zugabe des Diels-Alder-Produktes hemmt jedoch die Hinreaktion mit einer IC<sub>50</sub> von 11 µM und deutet so auf eine Konkurrenz des Produktes mit den Substraten um dieselben Bindungsstellen hin.

# 4.2 Untersuchungen zur Enantioselektivität

Die Diels-Alder-Reaktion ist eine Reaktion zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen. Dabei können prinzipiell auf einmal bis zu vier Stereozentren aufgebaut werden. Im Falle der Reaktion eines symmetrisch substituierten Maleimides mit einem einseitig derivatisierten Anthracen, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurden, können zwei Produktenatiomere gebildet werden. Diese Spiegelbildisomere sind in Abbildung 9 veranschaulicht.



Abbildung 9. Spiegelbildisomerie der Reaktionsprodukte der Diels-Alder-Reaktion von  $R_1$ -substituiertem Anthracen mit  $R_2$ - substituiertem Maleimid.

RNA ist ein homochirales Biopolymer und sollte deshalb nicht nur die Reaktion beschleunigen, sondern auch die Enantiomerenverteilung der Produkte beinflussen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die Reaktionsprodukte mittels HPLC an chiralen stationären Phasen analysiert. Dazu musste erst eine geeignete chirale Phase für dieses Trennproblem gefunden werden.

#### Katalyse durch das 49-mer Ribozym

Zunächst wurde die Enantiomerenverteilung der Reaktion von 9-Hydroxymethylanthracen mit ε-Maleimidocapronsäuremethylester bei Katalyse durch das 49-mer Minimalribozym bestimmt. Für diese Trennung eignete sich die Normalphasen-HPLC, bei der die stationäre Phase mit hydrophilen Gruppen (z.B. 3,5-Dinitrobenzoesäureamid) derivatisiert ist und die mobile Phase aus organischen Lösungsmitteln gebildet wird. Die Analyten werden hierbei in der Reihenfolge steigender Hydrophilie eluiert. Die Basislinientrennung der enantiomeren Reaktionsprodukte wurde durch die Derivatisierung der Festphase mit (R)-Phenylglycin ermöglicht. Die Reaktionsprodukte wurden außerdem chemisch als Racemat synthetisiert, und so konnten durch Vergleich der Retentionszeiten die Produkte der ribozymkatalysierten Reaktion zugeordnet werden.

In Abbildung 10 sind Ausschnitte aus den Chromatogrammen gezeigt. Die zwei Peaks, die den beiden Produktenantiomeren entsprechen, sind durch einen Unterschied in den Retentionszeiten von etwa 1 min voneinander getrennt. Die Veränderung des Verhältnisses der Peakflächen von unkatalysierter zu katalysierter Reaktion ist deutlich zu erkennen.



*Abbildung 10.* Chromatogramme der Diels-Alder-Reaktion von 9-Hydroxymethylanthracen mit ε-Maleimidocapronsäuremethylester. Oben: unkatalysierte Hintergrundreaktion, bei der das Verhältnis der Peakflächen 50:50 beträgt. Unten: durch 49-mer Ribozym katalysierte Reaktion, bei der das Verhältnis der Peakflächen 42:58 beträgt. Die Chromatogramme sind hinsichtlich der Peakhöhe normiert dargestellt, d.h. die absoluten Peakflächen lassen sich nicht quantitativ vergleichen. Elutionsbedingungen: Chirex (R)-PGLY & DNB (Phenomenex), 250 x 4,00 mm, n-Hexan/1,2-Dichlorethan/Ethanol 77:20:3 isokratisch, 1 ml min<sup>-1</sup>, 23°C, UV-Detektion bei 230 nm.

Nach Subtraktion der unkatalysierten Hintergrundreaktion beträgt bei einem Enantiomerenverhältnis von 42 : 58 der Enantiomerenüberschuss *ee (enantiomeric excess)* dieser ribozymkatalysierten Reaktion 16 %.

#### Katalyse durch längere RNA-Sequenzen

Im folgenden wurde untersucht, inwiefern die RNA-Sequenzen aus der *in vitro* Selektion die Produktverteilung beeinflussen. Es ist anzunehmen, dass diese bedeutend längeren RNA-Moleküle (160-mere) eine veränderte dreidimensionale Struktur des katalytischen Umfeldes bewirken und dadurch das Enantiomerenverhältnis ändern könnten. Jeweils ein Vertreter von 12 Sequenzfamilien aus der *in vitro* Selektion, die alle das katalytische Minimalmotiv enthalten, und zwei Einzelsequenzen (Klone 16, 50) wurden hinsichtlich ihrer Enantioselektivität untersucht [Seelig & Jäschke 1999a]. Die Produktverhältnisse und Enantiomerenüberschüsse aus den ribozymkatalysierten Reaktionen von 9-Hydroxymethylanthracen mit ε-Maleimidocapronsäuremethylester sind in Tabelle 3 zusammengefasst.



Bezeichnung der Sequenz	Verhältnis der Enantiomere	Enantiomerenüberschuss ee
#8	36 : 64	28 %
#10	32:68	36 %
#13	38:62	24 %
#17	37:63	26 %
#22	33:67	34 %
#23	39:61	22 %
#28	43 : 57	14 %
#32	34:66	32 %

Bezeichnung der Sequenz	Verhältnis der Enantiomere	Enantiomerenüberschuss ee
#36	30:70	40 %
#39	34 : 66	32 %
#40	41 : 59	18 %
#52	36 : 64	28 %
#16	72:28	44% -
#50	34 : 66	32 %

*Tabelle 3.* Enantiomerenüberschüsse bei Katalyse durch Ribozyme der *in vitro* Selektion. Die Sequenzen sind etwa 160 Nucleotide lang und enthalten bis auf #16 und #50 alle das katalytische Minimalmotiv. Die Nummerierung ist entsprechend [Seelig & Jäschke 1999a]. Elutionsbedingungen: Chirex (R)-PGLY & DNB (Phenomenex), 250 x 4,00 mm, n-Hexan/1,2-Dichlorethan/Ethanol 77:20:3 isokratisch, 1 ml min<sup>-1</sup>, 23°C, UV-Detektion bei 230 nm.

Es konnten demnach Enantiomerenüberschüsse zwischen 14 und 40 % gemessen werden. 12 der 14 Messwerte liegen deutlich über dem Wert von 16 % ee, der mit dem katalytischen Minimalmotiv allein (49-mer) erzielt wurde. Tatsächlich scheint sich also die Gegenwart von ungefähr 110 weiteren Nucleotiden in den Klonsequenzen, die nicht unmittelbar an der Ausbildung des katalytischen Minimalmotivs beteiligt sind, auf die dreidimensionale Ausprägung der katalytischen Tasche auszuwirken. Es ist vorstellbar, dass sie den Zugang zum katalytischen Zentrum von einer Seite erschweren, und dadurch den Enantiomerenüberschuss erhöhen. Interessant ist weiterhin, dass die RNA-Sequenz 16 eine Umkehrung des Enantiomerenverhältnisses bewirkt. Diese Sequenz gehört, wie auch #50, zu keiner der Sequenzfamilien und enthält daher auch nicht das katalytische Minimalmotiv. Dies lässt die Vermutung zu, dass hier der Katalyse ein völlig anderer Mechanismus zugrunde liegt. Dessen Untersuchung wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vertieft.

## Untersuchung verschiedener Substrate

Für die Untersuchung verschiedener Substrate wurde wiederum mit dem 49-mer Minimalribozym gearbeitet. Da sehr hydrophile Substituenten am Anthracen, wie Polyethylenglycolreste, aufgrund ihrer starken Wechselwirkung mit der stationären Phase die Elution verhindern, mussten einige Untersuchungen alternativ mittels *reversed phase*-HPLC (RP-HPLC) durchgeführt werden, bei der die stationäre Phase mit hydrophoben Gruppen (z.B. Polymethacrylat) derivatisiert ist und die mobile Phase aus wässerigen Lösungsmitteln besteht. Bei dieser Methode werden die Analyten mit zunehmender Hydrophobizität stärker retardiert. Die Trennung der enantiomeren Produkte wurde durch Derivatisierung der stationären Phase mit (R)- $\alpha$ -Naphthylethylamin ermöglicht. Die Enantiomerenüberschüsse für verschiedene Substratkombinationen sind in der folgenden Tabelle 4 dargestellt.



*Tabelle 4.* Enantiomerenüberschüsse für verschiedene Substratkombinationen bei Katalyse durch das 49-mer Ribozym. Die Kombinationen mit Anthracenmethylenhexaethylenglycol in der dritten Spalte wurden durch RP-HPLC ermittelt. Elutionsbedingungen RP-HPLC: YMC Chiral NEA (R) (YMC Europe), 250 x 4,6 mm, S-5µm, 300 Å, Wasser/Ethanol 65:35 bzw. 61:39 isokratisch, 0,8 ml min<sup>-1</sup>, 46°C, UV-Detektion bei 210 nm. Elutionsbedingungen Normalphasen-HPLC: Chirex (R)-PGLY & DNB (Phenomenex), 250 x 4,00 mm, n-Hexan/1,2-Dichlorethan/Ethanol 77:20:3 isokratisch, 1 ml min<sup>-1</sup>, 23°C, UV-Detektion bei 230 nm.

Nach der Korrektur der Peakflächen um die unkatalysierte Hintergrundreaktion erhält man für die Reaktionen von Anthracenmethylenhexaethylenglycol mit ε-Maleimidocapronsäuremethylester bzw. N-Pentylmaleimid einen *ee*-Wert von über 95% [Seelig et al. 2000]. Der Substituent in der 9-Position des Diens beeinflusst entscheidend die Enantioselektivität der ribozymkatalysierten Reaktion. Das wird besonders deutlich beim Betrachten der Reihe mit dem Dienophil Maleimidocapronsäuremethylester. Wenn der Rest an der 9-Position des Anthracens auf eine Ethylenglycoleinheit verkürzt wird, sinkt der *ee* auf 33%, und die Produkte der Reaktion mit 9-Hydroxymethylanthracen werden mit lediglich 16 % *ee* erhalten. Variationen des Substituenten am Maleimid rufen dagegen weniger starke Änderungen der Enantioselektivität hervor.

#### Katalyse durch das 49-Spiegelmer Ribozym

Wenn ein homochiraler Katalysator eine Bindungsknüpfung enantioselektiv beschleunigt, sollte nach den Gesetzen der Stereochemie entsprechend das andere Enantiomer des Katalysatormoleküls die entgegengesetzte Enantioselektivität zeigen. Natürliche RNA ist ausschließlich aus Nucleotiden mit D-Riboseeinheiten aufgebaut. Sie ist aufgrunddessen zugänglich für natürliche Nucleasen und RNasen, die Oligonucleotide rasch hydrolysieren und abbauen können. Dies begrenzt stark ihren Einsatz als Wirkstoffe in vivo. 1998 wurde durch Fürste und Mitarbeiter die Spiegelmer-Technologie entwickelt [Klußmann et al. 1996; Nolte et al. 1996]. Dabei werden Oligoribonucleotide aus chemisch synthetisierten Nucleotiden mit L-Riboseeinheiten aufgebaut. Sie sind damit die Spiegelbilder der natürlichen RNAs aus D-Nucleotiden, weil alle Chiralitätszentren in einem Molekül umgekehrt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Spiegelmere in Bezug auf ebenfalls gespiegelte Zielmoleküle erwartungsgemäß nicht verändern. Sie besitzen jedoch gegenüber natürlicher RNA den großen Vorteil, vollkommen resistent gegen natürlich vorkommende Nucleasen zu sein, was diese Technologie zu einem erfolgversprechenden Ansatz macht.

Um zu überprüfen, wie sich das Diels-Alder-Ribozym als chiraler Katalysator bei Umkehrung seiner Konfiguration verhält, wurde ein synthetisches 49-mer, das ausschließlich aus Nucleotiden mit L-Riboseeinheiten aufgebaut ist, also das Spiegelbild des Ribozyms, hinsichtlich der Verteilung der enantiomeren Produkte untersucht. In Abbildung 11 sind die zugehörigen Chromatogramme wiedergegeben.



*Abbildung* 11. Chromatogramme der Diels-Alder-Reaktion von Anthracenmethylenhexaethylenglycol mit ε-Maleimidocapronsäuremethylester. Oben: Katalyse durch das unnatürliche 49-mer L-Ribozym, das Verhältnis der Peakflächen beträgt 2:98. Mitte: Katalyse durch natürliches 49-mer D-Ribozym, das Verhältnis der Peakflächen ist umgekehrt und beträgt 98:2. Unten: unkatalysierte Hintergrundreaktion. Reaktionsbedingungen: 1mM Anthracenmethylenhexaethylenglycol, 1,5 mM Maleimidocapronsäuremethylester, 80 μM Ribozym, 5 min, 20°C. Elutionsbedingungen RP-HPLC: YMC Chiral NEA (R) (YMC Europe), 250 x 4,6 mm, S-5μm, 300 Å, Wasser/Ethanol 65:35 bzw. 61:39 isokratisch, 0,8 ml min<sup>-1</sup>, 46°C, UV-Detektion bei 210 nm. [Seelig et al. 2000]

Abbildung 11 zeigt, dass die Verwendung des 49-Spiegelmers zur bevorzugten Bildung des spiegelbildisomeren Reaktionsproduktes führt, was einer Umkehrung des Verhältnisses der enantiomeren Produkte entspricht. Der Enantiomerenüberschuss hat den gleichen Betrag von über 95% bei der Reaktion von Anthracenmethylenhexaethylenglycol mit N-Pentylmaleimid oder ε-Maleimidocapronsäuremethylester. Damit wurde erstmalig die katalytische Aktivität eines L-Ribozyms gezeigt, welches zwei niedermolekulare Substrate mit hoher Enantioselektivität effizient umsetzt.

Die beschriebenen Untersuchungen zur Enantioselektivität zeigen, dass die Diels-Alder-Reaktion zwischen Derivaten von Anthracen und Maleimid mit hoher Enantioselektivität ausgeführt werden kann. Dabei hängt der *ee* hauptsächlich von der Substitution des Anthracens ab. Durch den Einsatz des Spiegelmers als Katalysator ist es prinzipiell möglich, die Reaktion zum Produkt mit der gewünschten stereochemischen Konfiguration zu führen.

# 4.3 Strukturelle Untersuchungen mit biochemischen Methoden

Der Einsatz von Enzymen und chemischen Reagenzien zur Strukturuntersuchung von RNA-Molekülen ist eine etablierte Methode. Er basiert auf dem Konzept, dass die Struktur der **RNA** das Ausmaß beeinflusst. in dem ihre Teile. z.B. Nucleotiduntereinheiten, von einer chemischen Verbindung modifiziert oder von einem Enzym angegriffen werden können. Wenn die Spezifität des Agens bekannt ist, können daraus mit einer geeigneten Detektionsmethode strukturelle Charakteristika der RNA abgeleitet werden. Die chemisch modifizierten Nucleotide werden als strukturell unbeteiligt betrachtet, wohingegen unmodifizierte Nucleotide vor dem Angriff des Reagenz durch Wasserstoffbrückenbindung oder andere sterische Hinderung geschützt sind. Ganz ähnlich liefern bevorzugte Spaltungen durch Nucleasen Informationen über zugängliche Bereiche der RNA [Giege et al. 1999]. Die Zugänglichkeit verändert sich wiederum beim Übergang von der Sekundär- zur Tertiärstruktur. Die chemischen sowohl unter semidenaturierenden Modifizierungsexperimente werden deshalb Bedingungen, unter denen die RNA ihre Sekundärstruktur einnimmt, aber wegen der Abwesenheit von Magnesiumionen keine tertiäre Faltung möglich ist, als auch unter nativen Bedingungen, d.h. in Gegenwart von Magnesiumionen, durchgeführt. Die verringerte Zugänglichkeit von Positionen beim Übergang von semidenaturierenden zu nativen Bedingungen wird durch die Beteiligung dieser Nucleotide an tertiären Wechselwirkungen verursacht [Brunel & Romby 2000].

## 4.3.1 Enzymatisches probing

Die Strukturuntersuchung mit Enzymen, die Nucleaseaktivität besitzen, ist eine geeignete Methode, um Informationen über einzel- und doppelsträngige Bereiche zu liefern. Anhand der Struktur von Hefe-tRNA<sup>phe</sup> wurde gezeigt, dass die experimentell bestimmbaren Reaktivitäten gegenüber Nucleasen mit der räumlichen Zugänglichkeit der Reste im Molekül korrelieren [Giege et al. 1999]. Die Methode erlaubt so, Sekundärstrukturelemente von RNA zu lokalisieren. Zu diesem Zweck werden üblicherweise die RNasen T1, U2, T2 und S1 benutzt, die Spaltungen in ungepaarten Bereichen hervorrufen. Im Gegensatz dazu ist die RNase V1 aus dem Gift der Kobra die einzige Sonde, die Aufschlüsse über helicale Strukturen geben kann, jedoch auch einzelsträngige Bereiche angreift, wenn diese in einer gestapelten Konformation vorliegen.

Für alle Sonden, die RNA direkt spalten, kann prinzipiell das Problem von Sekundärspaltungen auftreten, d.h. nach Spaltung der RNA durch eine Nuclease entstehen zwei Fragmente, die nicht notwendigerweise die gleiche Struktur wie in der intakten RNA einnehmen müssen und so nach einer weiteren Spaltung ein Signal hervorrufen, das nicht die intakte Struktur der RNA wiedergibt. Um derartige sekundäre Fragmente zu identifizieren, wurden die Spaltungsmuster sowohl von 5'- als auch von 3'-markierter RNA untersucht. Nur Spaltungen, die in beiden Experimenten auftreten, sind primären Ursprungs. Die Experimente wurden mit dem 49-mer Ribozym durchgeführt, das entweder unmodifiziert vorlag, kovalent an das Ribozym gebundenes Anthracen enthielt, oder dem Substrat- oder Produktanaloga frei in Lösung zugesetzt wurden.

In Abbildung 12 sind die Spaltstellen im 49-mer Ribozym, die mit den Enzymen S1, T2, V1, T1 und U2 beobachtet wurden, schematisch dargestellt.



Abbildung 12. Schematische Darstellung der RNase-Spaltstellen im 49-mer Ribozym.

Die Spaltung mit der Nuclease S1 liefert ein generelles Bild der Sekundärstruktur des 49-mer Ribozyms, wie es auch theoretisch vorhergesagt wurde. Die beiden stabilen Tetraloops werden an den Positionen U<sub>10</sub>, U<sub>11</sub>, C<sub>12</sub> sowie U<sub>32</sub>, U<sub>33</sub>, C<sub>34</sub> gespalten. Auffällig ist, dass die Spaltungen der internen Schlaufe an ihrem 3'-Ende stark ausgeprägt sind, wohingegen der einzelsträngige Bereich, der dem 5'-Ende näherliegt, nur schwach durch Nuclease S1 gespalten wird. Das heißt, dass die Nucleotide A<sub>40</sub>, A<sub>41</sub>, U<sub>42</sub>, A<sub>43</sub>, C<sub>44</sub>, U<sub>45</sub> sterisch zugänglich sind, im Gegensatz zu den fünf Nucleotiden U<sub>23</sub>, G<sub>24</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub>, A<sub>27</sub> auf der gegenüberliegenden Seite der asymmetrischen internen Schlaufe, die gegen den Angriff des Enzyms abgeschirmt sind. Am 5'-Terminus sind die ersten drei Nucleotide G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> anfällig gegen RNase S1-Verdau. Das Muster der durch RNase T2 hervorgerufenen Spaltungen ist dem der S1-Hydrolyse sehr ähnlich. Die beiden Tetraloops können wiederum erkannt werden und die Reaktivität der Hexanucleotidsequenz der asymmetrischen internen Schlaufe ist ebenfalls bedeutend höher als die der fünf Nucleotide auf der gegenüberliegenden Seite. Die Spaltung der 5'-terminalen ersten vier Nucleotide befindet sich auch in Übereinstimmung mit den Resultaten aus den Experimenten mit Nuclease S1.

Die Reaktion des 49-mer Ribozyms mit RNase T1 unter nativen Bedingungen, unter denen ausschließlich an Guanosinresten gespalten wird, resultiert in einem Spaltungsmuster, das mit den Ergebnissen übereinstimmt, welche mit den einzelstrangspezifischen RNasen S1 und T2 erhalten worden sind. Da auf der längeren Seite der internen Schlaufe kein Guanosinrest enthalten ist, kann in diesem Bereich keine Spaltung beobachtet werden. G<sub>24</sub> als einziger Guanosinrest der internen Schlaufe wird mit relativ geringer Intensität gespalten. Nur G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> und G<sub>4</sub> scheinen reaktiv zu sein. Alle übrigen Guanosinreste befinden sich in Helices oder stabilen Tetraloops und sind deshalb für die Spaltung durch RNase T1 nicht zugänglich.

Im Gegensatz zur Verteilung ungepaarter Guanosinreste, die auf die vier Nucleotide am 5'-Ende konzentriert sind, befinden sich vier Adenosinreste in der internen asymmetrischen Schlaufe des 49-mer Diels-Alder-Ribozyms. Unter nativen Bedingungen ist nur A<sub>41</sub> reaktiv gegenüber dem Verdau mit RNase U2. Eine weitere Spaltung wird an A<sub>3</sub> beobachtet.

In Gegenwart der RNase V1 sind alle drei vorhergesagten Helices teilweise reaktiv. Beachtenswert ist der Übergang der Spaltungen von Helix III zu den ersten Nucleotiden auf beiden Seiten der internen Schlaufe A<sub>27</sub> und A<sub>40</sub>, A<sub>41</sub>, was möglicherweise eine gestapelte Konformation der Adenosinreste in diesem Bereich anzeigt. G<sub>4</sub> ist ebenfalls anfällig gegen RNase V1-Verdau, was im Gegensatz zu den Beobachtungen mit den einzelstrangspezifischen Nucleasen T2 und T1 steht.

Aus allen diesen Beobachtungen kann die Sekundärstruktur des 49-mer Minimalribozyms zwanglos abgeleitet werden. Es besteht aus einer reaktiven vier-Nucleotid-Sequenz am 5'-Ende, die von der doppelsträngigen Helix I gefolgt wird. Helix I endet in einem stabilen Tetraloop. Folgt man dem RNA-Rückgrat, so setzt sich Helix I zu Helix II fort, die mit dem 3'-Ende des 49-mer Ribozyms verbunden ist. Helix II und Helix III werden von einer asymmetrischen internen Schlaufe unterbrochen, die aus fünf abgeschirmten Nucleotiden auf der 5'-Seite und sechs zugänglichen Nucleotiden nahe dem 3'-Ende besteht. Diese Ergebnisse bestätigen die Sekundärstrukturvorhersage aus Computeranalysen.

Wegen der großen Ausdehnung enzymatischer Sonden von über 100 Å verglichen mit dem relativ kleinen Oligoribonucleotid sind die Enzyme in der Lage, Konformationsänderungen der RNA zu induzieren, was sekundäre Spaltungen zur Folge hätte. Deshalb muss die Interpretation einzelner Spaltstellen, besonders an den Extremitäten, wie den ersten vier Nucleotiden am 5'-Ende G1, G2, A3 und G4, mit einiger Zurückhaltung erfolgen und die genaue Konfiguration dieser Region kann nicht aus den enzymatischen Spaltungen abgeleitet werden.

# 4.3.2 Chemisches probing

Die zwei chemischen Agenzien Diethylpyrocarbonat (DEPC) und Dimethylsulfat (DMS) können genutzt werden, um direkt endständig markierte Oligoribonucleotide zu sondieren. DEPC modifiziert die Position N7 von Adenin und zerstört so die Aromatizität des Imidazolringes. DMS alkyliert das C3-Atom von Cytosin, wodurch nach nucleophilem Angriff mit Hydrazin das aromatische System des Pyrimidinringes zerstört wird. In beiden Fällen kommt es durch nachfolgende Behandlung mit Anilin zum Strangbruch [Ehresmann et al. 1987]. Um die Beteiligung von Adenin- und Cytosinbasen an sekundären und tertiären Wechselwirkungen zu untersuchen, wurden die chemischen Modifizierungsexperimente unter denaturierenden (1 mM EDTA, 80°C), semi-denaturierenden (1 mM EDTA, 25°C) und nativen Bedingungen (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25°C) durchgeführt. Unter nativen Bedingungen kann aufgrund der semidenaturierenden Anwesenheit von Magnesiumionen, im Gegensatz zu Bedingungen, die RNA ihre vollständig gefaltete Tertiärstruktur einnehmen und einzelne Positionen sind dann für den Angriff der chemischen Agenzien nicht mehr zugänglich. Abbildung 13 zeigt die durch Diethylpyrocarbonat und Dimethylsulfat hervorgerufenen Modifizierungsmuster des 49-mer Ribozyms unter denaturierenden, semidenaturierenden und nativen Bedingungen.



Abbildung 13. Schematische Darstellung der Modifizierungsmuster des 49-mer Ribozyms nach Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) und Dimethylsulfat (DMS). Nucleotide in Quadraten symbolisieren Reaktivität ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen. Nucleotide in schattierten Kreisen sind unter semidenaturierenden Bedingungen reaktiver als unter nativen, aber weniger reaktiv als unter denaturierenden Bedingungen.

Unter denaturierenden Bedingungen (1 mM EDTA, 80°C) werden sechs der sieben Adenosinreste an ihren N7-Atomen durch DEPC carboethoxyliert und das Zuckerphosphatrückgrat des 49-mer Ribozyms an diesen Stellen gespalten. A<sub>37</sub>, das sich in der Helix III befindet, ist ausschließlich unter diesen Bedingungen reaktiv. Dagegen wird A<sub>17</sub> unter denaturierenden Bedingungen nicht gespalten, was darauf hindeutet, dass die Helix I unter den Reaktionsbedingungen bei 80°C noch nicht denaturiert vorliegt. Obwohl die Position N7 von Adenosin nicht an der Ausbildung konventioneller Watson-Crick-Basenpaare beteiligt ist, ist seine Reaktivität gegenüber DEPC empfindlich gegen Basenstapelung. Die einzige Adeninbase, die in der kürzeren Sequenz der asymmetrischen internen Schlaufe vorkommt, A<sub>27</sub>, wird ebenfalls fast nur unter denaturierenden Bedingungen gespalten. Dies ist ein Hinweis auf seine Beteiligung an starken sekundären und tertiären Wechselwirkungen.

Unter semidenaturierenden Bedingungen (1 mM EDTA, 25°C) ist die Reaktivität der drei Adenosinreste innerhalb der längeren Sequenz der asymmetrischen internen Schlaufe, A<sub>40</sub>, A<sub>41</sub> und A<sub>43</sub>, gegenüber DEPC verringert. Da unter diesen Bedingungen die Sekundärstruktur der RNA ausgebildet wird, jedoch aufgrund der Abwesenheit von Magnesiumionen die Bildung von tertiären Wechselwirkungen nicht ausgeprägt ist, kann die reduzierte Reaktivität mit der Stapelung dieser Basen erklärt werden.

Die DEPC-Modifizierungsexperimente wurden auch unter nativen Bedingungen in Anwesenheit von 10 mM MgCl<sub>2</sub> bei Umgebungstemperatur durchgeführt. Unter diesen Bedingungen nahm die Spaltungsintensität an den Positionen A<sub>40</sub>, A<sub>41</sub> und A<sub>43</sub> weiter ab, was die Annahme unterstützt, dass diese Basen am 3'-Ende der internen Schlaufe an tertiären Interaktionen beteiligt sind. Dies steht allerdings im Gegensatz zu den Befunden aus den RNase S1- und T2-Spaltungsmustern, in denen dieser Bereich des 49-mer Ribozyms die höchste Reaktivität zeigt. Wie in diesem Zusammenhang bereits erwähnt, beeinflusst die Gegenwart der Enzyme wahrscheinlich die Tertiärstruktur des Oligonucleotides. In dieser Hinsicht sind kleine Moleküle viel genauere chemische Sonden für das Auffinden empfindlicher tertiärer Interaktionen. Andererseits befindet sich das Spaltungsmuster der RNase V1-Hydrolyse in guter Übereinstimmung mit den Befunden aus den DEPC-Modifizierungsmustern.

Die Reaktivität von A<sub>3</sub> gegenüber DEPC wird in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> leicht herabgesetzt im Vergleich zu semidenaturierenden Bedingungen. Demzufolge scheint auch diese Base an tertiären Wechselwirkungen innerhalb der Struktur des Diels-Alder-Ribozyms beteiligt zu sein.

Bei der Durchführung von DMS-Modifizierungsexperimenten unter denaturierenden Bedingungen (1 mM EDTA, 80°C) wird die Spaltung von elf der sechzehn Cytosinreste beobachtet. Die Watson-Crick-Position N3 der Cytosinreste C15, C20, C21, C29 und C39, welche sich alle in Helices befinden, sind nur unter diesen Bedingungen gegenüber Methylierung reaktiv. C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub> und C<sub>9</sub> werden allerdings nicht angegriffen. Dies steht in Ubereinstimmung die Helix Ι mit der Beobachtung, dass unter den Reaktionsbedingungen bei 80°C noch nicht denaturiert vorliegt, wie sie auch schon bei den Modifizierungsexperimenten mit DEPC gemacht wurde. C34, und in geringerem Ausmaß C<sub>12</sub>, die beide in den zwei UUCG-Tetraloops enthalten sind, werden ebenfalls nur unter denaturierenden Bedingungen modifiziert, was darauf hinweist, dass sie für DMS nicht zugänglich sind, obwohl sie nicht direkt an Wasserstoffbrücken beteiligt sind.

Unter semidenaturierenden Bedingungen (1 mM EDTA, 25 °C), bei denen das Ribozym seine Sekundärstruktur einnehmen kann, aber die Tertiärstruktur aufgrund des Fehlens von Magnesiumionen nicht ausgebildet werden kann, werden die Reste C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>46</sub> und in geringerem Ausmaß auch C<sub>44</sub> mit geringerer Intensität modifiziert. Dieser Befund lässt vermuten, dass die N3-Positionen aller dieser Cytosinreste an Wasserstoffbrücken beteiligt sind.

In Anwesenheit von Magnesiumionen, d.h. unter nativen Reaktionsbedingungen, bei denen RNA ihre Tertiärstruktur einnimmt, sind die Nucleotide in der asymmetrischen internen Schlaufe C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub> und C<sub>44</sub> effektiv gegen Methylierung durch DMS geschützt. Diese Beobachtungen weisen auf die Beteiligung besonders der Nucleotide C<sub>25</sub> und C<sub>26</sub> an Basenpaarungen hin.

# 4.3.3 *Probing* mit Pb<sup>2+</sup>-Ionen

Diverse zwei- und dreiwertige Metallionen, darunter auch Mg<sup>2+</sup>, sind grundsätzlich in der Lage, die Hydrolyse des RNA-Rückgrates zu vermitteln. Dabei greift ähnlich wie bei der autokatalytischen Spaltung kleiner Ribozyme die 2'-Hydroxylgruppe der Ribose die 3'-Phosphatgruppe an. Es wird angenommen, dass unter bestimmten Bedingungen, und wie Temperatur pH-Wert, Pb<sup>2+</sup>-induzierte Spaltstellen potentielle Metallionenbindungsplätze in strukturierter RNA repräsentieren [Giege et al. 1999]. In Untersuchungen an Hefe-tRNA<sup>Phe</sup> wurde gezeigt, dass durch Bleiionen hervorgerufene Spaltungen mit starken Bindungsplätzen für Magnesiumionen zusammenfallen. Desweiteren sind Nucleotide in Schlaufen oder einzelsträngigen Bereichen anfälliger gegen Spaltungen durch Bleiionen, als doppelsträngige Bereiche.

Dieses allgemeine Muster wird teilweise auch beim 49-mer Ribozym beobachtet. In Abbildung 14 sind die Spaltstellen, die aufgrund von Pb<sup>2+</sup>-vermittelter Hydrolyse im 49-mer Ribozym beobachtet werden, schematisch dargestellt.



Abbildung 14. Schematische Darstellung der Pb<sup>2+</sup>-induzierten Spaltstellen im 49-mer **Ribozym.** Die Größe der Pfeile entspricht verschiedenen Spaltungsintensitäten.

Die Experimente wurden unter nativen Bedingungen in Gegenwart von 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt und zeigten Spaltungen an den Positionen C<sub>12</sub> und C<sub>34</sub> der beiden Tetraloops. Bemerkenswert ist, dass die Spaltung der Hexanucleotidsequenz AAUACU nahe dem 3'-Ende der asymmetrischen internen Schlaufe bedeutend stärker ausfällt, als auf der gegenüberliegenden Seite der Schlaufe. Innerhalb dieser Region ist die Pb<sup>2+</sup>induzierte Hydrolyse an den Nucleotiden U<sub>42</sub> und C<sub>44</sub> besonders intensiv, was auf die mögliche Koordination von Magnesiumionen an diese zwei Nucleotide hinweist.

Um diese Möglichkeit weiter zu untersuchen, wurden Pb<sup>2+</sup>-Spaltungsexperimente bei steigenden Konzentrationen von Mg<sup>2+</sup>-Ionen durchgeführt. In Abbildung 15 ist das Ergebnis der gelelektrophoretischen Trennung der Spaltungsfragmente zu sehen.



Abbildung 15. Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente aus Spaltung von 49-mer **Ribozym mit Pb<sup>2+</sup>.** Die RNA wurde mit <sup>32</sup>P radioaktiv markiert. a: alkalische Hydrolyseleiter; g: Spaltung mit RNase T1 (G-spezifisch) unter denaturierenden Bedingungen; c: Kontrolle (Inkubation ohne Pb(OAc)<sub>2</sub>). Nach 15% denat. PAGE erfolgte die Detektion der Banden mittels Phosphorimager.

Die durch Pb<sup>2+</sup> vermittelten Spaltungen wurden durch steigende Konzentrationen von Magnesiumionen inhibiert, was das Zusammentreffen mit Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstellen an diesen zwei Positionen wahrscheinlich macht. Auch die Beobachtung, dass für die katalytische Aktivität des Ribozyms Magnesiumionen essentiell sind, lässt sich mit dem experimentellen Befund in Übereinstimmung bringen.

In Kombination mit den Ergebnissen der chemischen Modifizierungsexperimente, die, wie oben beschrieben, die starke Beteiligung von Nucleotiden auf beiden Seiten der asymmetrischen internen Schlaufe an tertiären Wechselwirkungen nahelegen, ist das Auftreten von eng gebundenen Magnesiumionen in diesem Bereich wahrscheinlich. Diese Ergebnisse sind in die Konstruktion eines dreidimensionalen Modells des katalytischen Minimalmotivs eingeflossen, wobei die bereits oben erwähnte Korrelation zwischen Reaktivität und räumlicher Zugänglichkeit bestimmter Bereiche der RNA ausgenutzt wurde.

# Vergleichende Untersuchungen mit Anthracen-RNA-Konjugat und freien Substraten

Alle beschriebenen Experimente zur Strukturuntersuchung wurden weiterhin mit 49-mer RNA durchgeführt, an welche Anthracenmethylenhexaethylenglycol am 5'-Terminus kovalent gebunden war (vgl. Abbildung 15). Dies stellt das 1 : 1-Verhältnis zwischen Katalysator und Substrat sicher. Dennoch konnten in keinem Falle Veränderungen in den Spaltungs- und Modifizierungsmustern festgestellt werden. Auch bei Zugabe von Anthracen- und Maleimidderivaten sowie von Diels-Alder-Addukten konnten mit Enzymen und Bleiionen keine Unterschiede zu den Spaltungsmustern, die mit der freien RNA beobachtet wurden, detektiert werden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die strukturellen Veränderungen bei der Bindung von Substrat- oder Produktmolekülen zu gering sind, um sie durch *probing*-Experimente zu erfassen, was an einer niedrigen Bindungsaffinität liegen könnte. Andererseits sind die hier angewendeten biochemischen Methoden möglicherweise nicht empfindlich genug, um die erwarteten strukturellen Veränderungen detektieren zu können.

# 4.4 Strukturelle Untersuchungen mit biophysikalischen Methoden

### 4.4.1 Chemische Synthese von RNA-Konjugaten

Für die bisherigen chemischen und biochemischen Methoden der Strukturaufklärung wurde das 49-mer Minimalribozym verwendet, wobei das Substrat Anthracen entweder kovalent an die RNA konjugiert war oder frei in Lösung hinzugefügt wurde. Die nachfolgenden Untersuchungen zur Struktur wurden vorwiegend mit kovalent an die RNA konjugierten Substraten bzw. Produkten ausgeführt. Neben der einzelsträngigen Ribozymvariante kamen hier auch die in der Einleitung beschriebenen zwei- bzw. dreisträngigen Systeme zum Einsatz. Diesen ist gemeinsam, dass ein kurzer Substratstrang, typischerweise ein 11-mer mit der Sequenz 5'-GGAGCUCGCCC-3', über einen Hexaethylenglycol-Linker an seinem 5'-Phosphat kovalent mit den zu untersuchenden niedermolekularen Verbindungen derivatisiert ist.

#### Konjugate mit Anthracen

Das Substrat Anthracen wurde hierfür im letzten Kopplungsschritt der chemischen Oligonucleotidsynthese eingeführt. Dabei wurde Anthracenmethylenaus hexaethylenglycol β-Cyanoethylphosphoramidit das entsprechende chemisch synthetisiert. Nach der Kopplung des letzten Monomers bei der automatisierten Festphasensynthese, also am 5'-Terminus, wurde das Anthracenphosphoramidit mit dem gleichen Synthesezyklus gekoppelt, jedoch mit einer verlängerten Kopplungszeit von 2 x 15 min. Die Kopplungsausbeute betrug zwischen 50 und 85 %. Dieses RNA-Konjugat ließ sich unproblematisch durch reversed phase-HPLC an einer C18-Säule reinigen, da aufgrund des Anthracenrestes das Konjugat eine deutlich höhere Hydrophobizität aufweist und einfach von so sehr den unkonjugierten Abbruchprodukten abgetrennt werden kann. In Abbildung 16 ist das MALDI-TOF-Spektrum des Substratoligonucleotides AnthracenmethylenhexaethylenglycolpGGAGCUCGCCC-OH wiedergegeben. Im Rahmen der Messgenauigkeit von ±4 m/z-Einheiten stimmt die gemessene Masse für den Molpeak [M+H]+ von 4012,3 mit den berechneten 4015,6 überein.



Abbildung 16. MALDI-TOF Spektrum von Anthracenmethylenhexaethylenglycol-11-mer-RNA-Konjugat. Der Molekülionenpeak bei 4012,3 entspricht im Rahmen der Messgenauigkeit von ±4 der berechneten Masse von 4015,6. Der Fragmentpeak bei 3822,5 entsteht vermutlich durch Abspaltung des Anthracenmethylen-Restes.

Der Fragmentpeak mit der Masse 3822,5 entsteht vermutlich durch die Abspaltung des UV-aktiven Anthracenmethylen-Restes bei der Ionisation der Probe mit Laserlicht.

#### Konjugate mit Diels-Alder Produkt

Es war nun sehr interessant, auch eine Konjugation der RNA mit einem Inhibitormolekül vorzunehmen. Der Übergangszustand der Diels-Alder-Reaktion ist in seiner Geometrie sehr produktähnlich, und durch Untersuchung der Wechselwirkung des Ribozyms mit dem Reaktionsprodukt wären Rückschlüsse auf die aktive Konformation des Ribozyms möglich. Da wie bereits beschrieben bei der Reaktion zwei enantiomere Produkte gebildet werden, ist es notwendig, für die Strukturaufklärung die RNA mit demjenigen Enantiomer zu konjugieren, das hauptsächlich entsteht. Die Konjugation mit diesem Produktenantiomer musste also ribozymkatalysiert erfolgen. Hierfür wurde mit der zweisträngigen Ribozymvariante der 11-mer RNA-Anthracen-Konjugat, dessen Synthese Substratstrang, ein im vorangegangenen Abschnitt erläutert wurde, mit N-Pentylmaleimid in Gegenwart des Ribozymstranges, 38-mer RNA, in einer 1:2-Stöchiometrie umgesetzt. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur für eine kurze Reaktionszeit von 5 min. Dabei läuft die unkatalysierte Hintergrundreaktion nur zu einem sehr geringen Anteil ab und das Produkt entsteht mit einem hohen Enantiomerenüberschuss. Die Abtrennung von unumgestztem Substratstrang und vom Ribozymstrang erfolgte wiederum über reversed phase-HPLC, wodurch gleichzeitig die Edukte wiedergewonnen werden konnten. Die Abbildung 17 zeigt das MALDI-TOF-Spektrum des Inhibitoroligonucleotides. Im Rahmen der Messgenauigkeit von  $\pm 4 \text{ m/z-Einheiten}$  stimmt die gemessene Masse für den Molpeak [M+H]<sup>+</sup> von 4179,7 mit den berechneten 4182,8 überein.



*Abbildung* **17. MALDI-TOF Spektrum von Diels-Alder-Produkt-11-mer-RNA-Konjugat.** Der Molekülionenpeak bei 4179,7 entspricht im Rahmen der Messgenauigkeit von ±4 der berechneten Masse von 4182,8.

Diese Konstrukte wurden mittels NMR-Experimenten untersucht und in Versuchen zur Kristallisation des Ribozyms eingesetzt.

# 4.4.2 <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchungen

Die NMR-Spektroskopie ist eine Methode, mit deren Hilfe die Struktur und Dynamik von RNA-Molekülen in Lösung studiert werden kann. Mit homonuclearen NMR-Techniken können Proteine und Nucleinsäuren bis zu einer Größe von ungefähr 10 kDa (ca. 100 Aminosäuren oder 30 Nucleotide) untersucht werden, wohingegen größere Proteine oder Nucleinsäuren (bis zu 40 kDa) heteronucleare (<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C) mehrdimensionale NMR-Experimente erfordern [Zheng & Tinoco 2000]. Auch wenn keine vollständige dreidimensionale Struktur zugänglich ist, kann NMR eine Fülle von Informationen über Struktur und Dynamik geben. Die dynamische Natur des katalytischen Zentrums von kleinen Ribozymen könnte ein bedeutender Faktor für ihre katalytische Aktivität sein. Deshalb ist die NMR-Spektroskopie in Lösung besonders geeignet, um kleine Ribozyme zu untersuchen.

Die Iminoprotonen von G und U (N1 bzw. N3) können sehr schnell mit den Protonen von Wassermolekülen ausgetauscht werden (10<sup>4</sup> min<sup>-1</sup>) und sind im NMR-Spektrum

deshalb nicht sichtbar. Das ändert sich jedoch, wenn sie Wasserstoffbrücken ausbilden oder auf andere Art für das Lösungsmittel unzugänglich sind [Wüthrich 1986]. Die Signale dieser Iminoprotonen sind im NMR-Spektrum deutlich von denen der nichtaustauschbaren Resonanzen abgesetzt und zeigen einen Peak für jedes AU- und GC-Basenpaar. Jedes GU-Basenpaar bringt zwei charakteristische Peaks hervor.

Die NMR-Spektren wurden von Lösungen (Puffer: Tris-HCl, Natriumphosphat) des Ribozyms bei Konzentrationen von 0,2 und 0,5 mM in Wasser (zu 8% deuteriert) im Bereich der Iminoprotonenresonanz von 9-15 ppm aufgenommen. Die Messtemperatur betrug 10°C und es wurden Variationen des pH-Wertes zwischen 6 und 7,5 sowie der Ionenkonzentration vorgenommen.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchungen an verschiedenen Varianten des Diels-Alder-Ribozyms beschrieben.

#### Untersuchungen an der zweisträngigen Ribozymvariante

In Abbildung 18 sind die zweisträngigen Ribozymvarianten dargestellt, die mittels NMR-Spektroskopie untersucht wurden. Es handelt sich dabei jeweils um ein 38-mer Oligoribonucleotid als Ribozymstrang, der mit unterschiedlichen Substratsträngen kombiniert wurde. Als Substratstränge kamen die im vorangegangenen Abschnitt 4.4.1 beschriebenen 11-mer RNA-Konjugate mit Anthracenmethylenhexaethylenglycol sowie mit dem Inhibitormolekül zum Einsatz, sowie ein 7-mer Fragment, das um die ersten vier Nucleotide am 5'-Ende verkürzt wurde.



Abbildung 18. Zweisträngige Ribozymkonstrukte und zugehörige Bezeichnungen, mit denen NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt wurden.
Abbildung 19 zeigt die Iminoprotonenspektren zweier Ribozymkonstrukte, von denen das untere die zweisträngige Ribozymvariante aus 38- und An-11-mer darstellt. Das obere Spektrum wurde hingegen mit einem Substratstrang aufgenommen, dem am 5'-Terminus die hochkonservierte Nucleotidsequenz GGAG fehlt, woraus ein 7-mer resultiert.



Abbildung 19. <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der zweisträngigen Ribozymvarianten mit 38-mer Ribozymstrang und 7-mer (oben) bzw. An-11-mer (unten) Substratstrang. Bedingungen: 0,2 mM RNA, pH 7,2; 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Deutlich zu erkennen ist das Signal des Iminoprotons von G im Tetraloop bei 9,7 ppm, das in einer Wasserstoffbrückenbindung mit O2 des gegenüberliegenden U vorliegt. Die Anwesenheit der GGAG-Sequenz am 5'-Terminus erzeugt drei deutliche Signale bei 13,6; 13,9 und 14,5 ppm (in Abbildung 19 unten mit \* markiert). Sie treten nicht auf, wenn die Helix I zwar gebildet wird, aber die Nucleotide G<sub>1</sub> bis G<sub>4</sub> fehlen (Abbildung 19 oben). Die Signale befinden sich in einem Bereich der chemischen Verschiebung, in dem normalerweise AU-Basenpaare beobachtet werden.

Diese drei zusätzlichen Signale, die vom 11-mer verursacht werden, werden auch beobachtet, wenn die Magnesiumionenkonzentration erhöht wird. In Abbildung 20 links sind die Iminoprotonenspektren der zweisträngigen Ribozymvariante aus 38-mer Substratstrang bei verschiedenen Konzentrationen und 11-mer zweiwertiger Metallionen dargestellt. Dort wird sichtbar, wie die Erhöhung der

Magnesiumionenkonzentration von 0 mM über 1 mM auf 5 mM mit dem Anwachsen der drei Signale bei 13,6; 13,9 und 14,5 ppm korreliert (mit \* gekennzeichnet). Diese Signale treten auch auf, wenn anstelle von Magnesiumionen Calciumionen in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt werden (Abbildung 20 rechts oben, mit ▼ gekennzeichnet). Unter diesen Bedingungen sind die Peaks allerdings nur sehr schwach ausgeprägt.

Eine weitere Eigenschaft der drei beobachteten Peaks ist ihre Abhängigkeit vom pH-20 sind Wert der Lösung. In Abbildung auf der rechten Seite die Iminoprotonenspektren der zweisträngigen Ribozymvariante in Gegenwart von 5 mM Magnesiumionen, jedoch bei zwei verschiedenen pH-Werten wiedergegeben. Bei einem pH-Wert von 6,2 waren die Signale bei 13,6; 13,9 und 14,5 ppm von sehr geringer Intensität (Abbildung 20 rechts Mitte). Wurde der pH-Wert um eine Einheit auf 7,2 erhöht, konnten die entsprechenden Peaks deutlich reproduziert werden (Abbildung 20 rechts unten).



Abbildung 20. <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der zweisträngigen Ribozymvariante aus 38-mer Ribozymstrang und Anthracenmethylenhexaethylenglycol-11-mer Substratstrang. Links: Veränderung der Konzentration an Magnesiumionen. Bedingungen: 0,2 mM RNA, pH 7,2. Rechts: Spektren in Gegenwart von Calciumionen (oben, Bed. wie links) bzw. bei Veränderung des pH-Wertes um eine Einheit. Bedingungen: 0,5 mM RNA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Die beobachteten Veränderungen in der Iminoprotonenregion korrelieren mit der katalytischen Aktivität des Ribozyms.

Es werden also zwei Formen des Ribozyms beobachtet, die sich auf einer Zeitskala von 10 - 100 ms in langsamem Austausch befinden. Das Auftreten der einen Form korreliert mit der Erhöhung der Magnesiumionen- und Calciumionenkonzentration sowie des pH-Wertes. Diese Beobachtungen sind wiederum in Übereinstimmung mit der katalytischen Aktivität des Diels-Alder-Ribozyms. Dieses arbeitet am effektivsten in Gegenwart von mindestens 5 mM Magnesiumionen bei einem pH-Wert von 7,4. Werden die Magnesiumionen durch Calciumionen in gleicher Konzentration ersetzt, so nimmt die katalytische Aktivität des Ribozyms auf etwa ein Drittel ab. Diese "aktive" Form, die in den NMR-Spektren beobachtet wurde, enthält anscheinend drei zusätzliche Basenpaare, die durch die Wechselwirkung zwischen Bulge und 5'-GGAG-Terminus verursacht werden, wie aus dem Vergleich mit dem 7-mer ersichtlich ist.

In Abbildung 21 sind die Iminoprotonenspektren der zweisträngigen Ribozymvarianten mit 38-mer und 11-mer-Anthracen bzw. 11-mer-Produkt dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass das Produktmolekül ebenfalls einen Effekt in der Iminoprotonenregion zeigt. Die Spektren sind nicht identisch; es treten Veränderungen in den chemischen Verschiebungen der Signale zwischen 11,5 und 14,2 ppm auf. Zwei deutlich veränderte Peaks sind in Abbildung 21 mit \* gekennzeichnet. Dies lässt den Schluss zu, das beim Ablauf der Reaktion eine teilweise Umstrukturierung des Ribozyms erfolgt, die notwendig wäre, um den produktähnlichen Ubergangszustand zu stabilisieren.



Abbildung 21. <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von zweisträngigen Ribozymvarianten aus 38-mer Ribozymstrang und Diels-Alder-Produkt-11-mer-RNA-Konjugat (oben) bzw. Anthracenmethylenhexaethylenglycol-11-mer-RNA-Konjugat (unten). Bedingungen: 0,2 mM RNA, pH 7,2; 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

#### Untersuchungen mit dem 49-mer Ribozym

In Abbildung 22 sind die einzelsträngigen Ribozymvarianten dargestellt, die mittels NMR-Spektroskopie untersucht wurden. Es handelt sich jeweils um das 49-mer Minimalribozym, welches einzeln, als kovalentes Konjugat mit Anthracenmethylen-hexaethylenglycol und in Gegenwart eines Inhibitormoleküls analysiert wurde.



Abbildung 22. Einzelsträngige Ribozymkonstrukte und zugehörige Bezeichnungen, mit denen NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt wurden.

In Abbildung 23 sind zum Vergleich die Iminoprotonenspektren der drei Varianten mit dem einzelsträngigen 49-mer Diels-Alder-Ribozym dargestellt: oben das 49-mer mit kovalent gebundenem Anthracen (49-mer-Anthracen-Konjugat), in der Mitte das 49-mer allein und unten das 49-mer unter Zugabe des Diels-Alder-Produktes aus Anthracen und ε-Maleimidocapronsäure.



**Abbildung 23.** <sup>1</sup>**H-NMR-Spektren von verschiedenen Varianten des 49-mer Ribozyms.** Oben: Anthracenmethylenhexaethylenglycol-49-mer-RNA-Konjugat. Mitte: 49-mer Minimalribozym. Unten: 49-mer Minimalribozym nach Zugabe von 4 Moläquivalenten (0,8 mM) Diels-Alder-Produkt aus Anthracen und ε-Maleimidocapronsäure. Bedingungen: 0,2 mM RNA, pH 7,2; 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Signale bei 13,6; 13,9 und 14,5 ppm sind hier wieder mit \* hervorgehoben. In der Region von 10 ppm treten jetzt zwei Peaks in Erscheinung, da in der einzelsträngigen Ribozymvariante zwei UUCG-Tetraloops vorhanden sind. Das Spektrum des 49-mer Ribozyms unterscheidet sich kaum von dem des 49-mer-Anthracen-Konjugates. Damit ist auch nachgewiesen, dass die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Signale bei 13,6; 13,9 und 14,5 ppm nicht durch eine Wechselwirkung mit dem Anthracenmolekül verursacht werden können, sondern tatsächlich auf die Anwesenheit der GGAG-Sequenz am 5'-Terminus zurückzuführen sind. Dagegen bewirkt die Anwesenheit des Reaktionsproduktes in der Lösung das Auftreten zwei neuer Signale im Spektrum bei 12,3 und 12,8 ppm, die in Abbildung 23 unten mit ▼ gekennzeichnet sind.

Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch in folgendem Experiment gemacht (nicht abgebildet). Eine Lösung, die die zweisträngige Ribozymvariante aus 38-mer als Ribozymstrang und Anthracenmethylenhexaethylenglycol-11-mer als Substratstrang in Gegenwart von 5 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt, wurde mit N-Pentylmaleimid versetzt und der Verlauf der Reaktion innerhalb von zehn Minuten durch Aufnahme der Iminoprotonenspektren verfolgt. Dabei konnte die Entstehung von zwei Signalen bei 12,3 und 12,7 ppm verfolgt werden. Dieser Befund stimmt also mit zwei anderen, in unabhängigen Experimenten gefundenen Beobachtungen überein, die in den Abbildungen 21 und 23 dargestellt wurden. Danach hat das Reaktionsprodukt der Diels-Alder-Reaktion einen Einfluss auf die Struktur des Ribozyms, der in Veränderungen in der Iminoprotonenregion der NMR-Spektren sichtbar wird. Im Gegensatz dazu hat die Gegenwart des Substratmoleküls Anthracen keine deutlich erkennbaren Auswirkungen auf die Iminoprotonenregion.

#### 4.4.3 Kristallisation

Die Röntgenkristallographie bietet einen guten Zugang zur vollständigen Struktur großer Ribozyme (wie Gruppe I- und II-Intron Ribozyme und RNase P Ribozym mit mehreren hundert Nucleotiden), weil der Kristallpackungszwang eine weniger starke Rolle spielt als in kleinen Ribozymen. Aber auch die Kristallisation von kleinen Ribozymen wie dem Hammerhead-, Hairpin- und Hepatitis Delta Virus-Ribozym konnte einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Strukturen und der katalytischen Mechanismen bilden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche unternommen, das Diels-Alderase-Minimalmotiv im Komplex mit seinem Substrat oder Produkt zu kristallisieren. [Wedekind & McKay 2000]

Sämtliche RNA-Konstrukte, die für Kristallisationsversuche verwendet wurden, sind durch chemische Festphasensynthese im Mikromol-Maßstab hergestellt worden. Dabei wurden die Ribozymkonstrukte, welche kovalent gebundenes Anthracen als Substratmolekül enthalten, wie bereits im Abschnitt 4.4.1 beschrieben, im letzten Kopplungsschritt an ihrem 5'-Terminus mit dem entsprechenden Phosphoramiditreagenz modifiziert. Die Rohprodukte der chemischen Synthesen wurden über *reversed phase*-HPLC an einer C<sub>18</sub>-Festphase von den kürzeren Abbruchprodukten abgetrennt. Die so gereinigten Oligoribonucleotide wurden danach durch NAP 5-Gelfiltration entsalzt und mit Ethanol gefällt. Auf diese Weise wurden Milligramm-Mengen RNA gewonnen, die für die NMR-Untersuchungen und Kristallisationsversuche mit ihren hohen Anforderungen an Substanzmenge und Reinheit eingesetzt wurden.

Die vergleichsweise hochkonzentrierten Lösungen aus den im vorangegangenen Abschnitt 4.4.2 beschriebenen NMR-Untersuchungen konnten auch für Kristallisationsversuche genutzt werden. Dafür wurde die Methode des hängenden Tropfens (hanging drop) angewendet, bei der die zu kristallisierende Probe des Makromoleküls im Gemisch mit Vorratslösung als Tropfen durch Adhäsion an einem Abdeckglas haften bleibt und mit der Mutterlösung in einem Vorratsgefäß, über dem der Tropfen hängt, in ein Dampfdiffusionsgleichgewicht tritt. Da der hängende Tropfen im Vergleich zur Vorratslösung verdünnt ist, wird die flüchtige Komponente aus dem Tropfen herausdiffundieren und dieser so langsam aufkonzentriert, wobei durch Überschreiten der Sättigungsgrenze die Kristallisation des Makromoleküls erfolgen kann. Jede Vorratslösung besteht aus verschiedenen Komponenten in unterschiedlicher Zusammensetzung. Dabei handelt es sich um Puffersubstanzen, die einen bestimmten pH-Wert gewährleisten, anorganische und organische Salze, verschiedene Additive wie Alkohole, organische Lösungsmittel oder Polyamine und als Hauptbestandteil den Präzipitanten. Das sind in der Regel organische Verbindungen Polyethylenglycole 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD), wie oder aber auch hochkonzentrierte Lithiumsulfatlösungen. Diese Fällungsmittel sind recht schwer flüchtig und können so das langsame Kristallwachstum bewirken. Für die Zusammensetzung der Vorratslösungen wurden kommerziell erhältliche Screens der Firma Hampton Research benutzt, welche als unvollständige Matrices (sparse matrix screens) Bedingungen enthalten, die sich für die Kristallisation von Makromolekülen

(Crystal Screen I und II<sup>TM</sup>) oder speziell Nucleinsäuren (Natrix<sup>TM</sup>) als geeignet erwiesen haben.

## Erste Kristallisationsbedingungen und deren Optimierung

In Abbildung 24 sind die Varianten des Ribozym-Minimalmotivs mit ihren Kurzbezeichnungen dargestellt, die solchen Kristallisationsversuchen unterworfen wurden.



Abbildung 24. Ribozymkonstrukte, die in Kristallisationsversuchen eingesetzt wurden.

Die bisher erfolgreichsten Bedingungen, mit denen diese Konstrukte kristallisiert wurden, sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Dabei gibt die Größe Auflösung im Diffraktogramm an, bis zu welcher Entfernung voneinander getrennte Signale sichtbar sind.

Probe	Bedingung	Temperatur	Zeit	Auflösung
49-mer + DA	50 mM NaKakodylat, pH 6,5			
(1:4)	80 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>	20°C	1 Woche	7 Å
	30% w/v PEG 4000			
An-49	0,1 м Tris-HCl, pH 8,5			
	0 <b>,2</b> м NaOAc*3H <sub>2</sub> O	20°C	1 Woche	~10 Å
	30% w/v PEG 4000			
38 + An-11	50 mM NaKakodylat, pH 6,5			
	80 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>	20°C +	8 Monate +	~8 Å
	30% w/v PEG 400	30°C	4 Wochen	
38 + DA-11	100 mM Na-HEPES, pH 7,5			
	0,2 м MgCl <sub>2</sub>	20°C	7 Monate	3,3 Å
	30% PEG 400			

*Tabelle 5.* Erfolgreiche Kristallisationsbedingungen aus *sparse matrix screens*. Diese Bedingungen dienten als Ausgangspunkte für weitere Optimierungen.

Die Probe 38 + DA-11 ergab nach einer sehr langen Inkubationszeit von 7 Monaten Kristalle mit einer recht guten Auflösung von 3,3 Å. Durch Zugabe verschiedener Hilfsstoffe konnte das Kristallwachstum stark beschleunigt werden. In Abbildung 25 sind einige Kristalle dieser Probe abgebildet, die unter den Bedingungen in Tabelle 5 bei Zusatz verschiedener Additive gezüchtet werden konnten.

#### 4 Ergebnisse



*Abbildung* 25. Kristallisation des zweisträngigen Ribozymkonstrukts 38-mer + DA-11-mer. Die Additive wurden zu den Bedingungen aus Tabelle 5 zugesetzt. Die Auflösung der besten Kristalle bewegt sich immer im Bereich ab 3 Å. Das Kristallwachstum ist damit sehr gut reproduzierbar.

Für die rechnerische Bestimmung der Struktur kann es erforderlich werden, Schweratome isomorph in das Kristallgitter einzubauen, wo beispielsweise zweiwertige Sie Schwermetallionen Bindungsplätze von Magnesiumionen besetzen können. besitzen aufgrund ihrer hohen Anzahl an Elektronen einen hohen Streufaktor für Röntgenstrahlen und ermöglichen die Zuordnung der Phase zu den Signalen und damit die Lösung der Kristallstruktur. Deshalb wurde weiterhin die Möglichkeit untersucht, unter den gefundenen Kristallisationbedingungen Schwermetallionen zu inkorporieren. Es wurden Variationen der Konzentration Art und von zweiwertigen Schwermetallionen bei verschiedenen Inkubationstemperaturen vorgenommen, die in Tabelle 6 aufgelistet sind.

Probe	Schwermetallsalz	Konzentrationsbereich	Temperatur	Zusatzstoff
38 + DA-11	BaCl <sub>2</sub>	0-90 mM	4;17;30;40°C	0,5 % Ethylacetat
	CdCl <sub>2</sub>	0-13 mM	4;17;30;40°C	0,5 % Ethylacetat
	SrCl <sub>2</sub>	0-90 mM	4;17;30°C	0,5 % Ethylacetat
	MnCl <sub>2</sub>	0-90 mM	4;17;30°C	0,5 % Ethylacetat
38 + An-11	SrCl <sub>2</sub>	0-40 mM	4;17;30°C	
	CdCl <sub>2</sub>	0-16 mM	4;17;30°C	

*Tabelle 6.* Kristallisationsversuche mit Zusatz von Schwermetallionen. Die Schwermetallsalze und Additive wurden zu den Bedingungen aus Tabelle 5 zugesetzt.

Der Zusatz der Schwermetallionen Sr<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Ba<sup>2+</sup> führte auch zur erfolgreichen Kristallisation unter den optimalen Pufferbedingungen.

Zur Aufnahme des Beugungsmusters der Röntgenstrahlen am Kristallgitter (Diffraktogramm) wurden die Kristalle in einer geeigneten Lösung von Frostschutzmittel (*cryoprotectant*) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Röntgendiffraktometer bei einer Temperatur von 100 K untersucht. Abbildung 26 zeigt einige der besten Kristalle mit ihren Diffraktionsmustern.



**Abbildung 26.** Fotografien und Diffraktionsmuster einiger der besten Kristalle. Die Kristalle wurden jeweils um 90° gedreht für die zweite Aufnahme des Diffraktionsmusters. Oben: 38 + DA-11; 100 mM Na-HEPES, pH 7,5; 0,2 M MgCl<sub>2</sub>; 35% PEG 400; 5% MPD; KCl; SrCl<sub>2</sub>; 4°C; max. Auflösung 3,5 Å. Mitte: 38 + DA-11; 100 mM Na-HEPES, pH 7,5; 0,2 M MgCl<sub>2</sub>; 35% PEG 400; 10% MPD; NaCl; 4°C; max. Auflösung 3,4 Å. Unten: Mutante 38(G12) + DA-11; 100 mM Na-HEPES, pH 7,5; 0,2 M MgCl<sub>2</sub>; 35% PEG 400; 10% MPD; NaCl; 4°C; max. Auflösung 3,4 Å.

Aus diesen Beugungsmustern lassen sich die Symmetrie der Elementarzelle und ihre geometrischen Parameter bestimmen. Als Raumgruppe wurde P21 bestimmt, d.h. es handelt sich um ein monoklines Gitter. Die Kristalle der Konstrukte 38 + DA-11 enthalten drei dieser asymmetrischen Einheiten in ihrer Elementarzelle. Diese hat die Seitenlängen a=78 Å, b=44 Å und c=80 Å mit den zugehörigen Winkeln  $\alpha$ =90°,  $\beta$ =106° und  $\gamma$ =90°. Die Kristalle der Konstrukte 38 + An-11 enthalten sechs dieser asymmetrischen Einheiten in ihrer Elementarzelle, die demnach doppelt so lang ist, wie

die Elementarzelle der Konstrukte mit DA-11. Aus den aufgenommenen Datensätzen

wurde neben der maximalen Auflösung auch die Mosaizität  $\Delta \theta$  der Kristalle bestimmt.

Diese liegt zwischen 1,5-2° und zum Teil noch höher und bezeichnet den Winkel, um

den die Gitterebenen im Kristall teilweise gegeneinander verkippt sind, was das

Die Mutante 38(G12), bei der ein einzelner Adenosinrest in der internen Schlaufe

gegen Guanosin ausgetauscht wurde, ergab mit DA-11 unter anderem eine neue

Kristallisationsbedingung mit Polyethylenglycol 8000 als Präzipitanten, unter der

Kristalle von hexagonaler Form entstehen, die in Abbildung 27 dargestellt sind.

Weiterverarbeiten der Daten sehr problematisch gestaltet.

*Abbildung* 27. Fotografie und Diffraktionsmuster eines Kristalls mit hexagonaler Form. Mutante 38(G12) + DA-11 18% PEG 8000; 3% MPD; Zn(OAc)<sub>2</sub>; 4°C; max. Auflösung 18-22 Å

### Optimierung von Ribozymkonstrukten für die Kristallisation

Um Kristalle von noch höherer Qualität erzeugen zu können, sollten veränderte Konstrukte den Kristallisationsversuchen unterworfen werden. Dazu mussten diese verschiedenen Ribozymkonstrukte zuerst hergestellt und auf ihre katalytische Aktivität hin getestet werden.

Zum einen wurden Variationen des Substratstranges und des dreisträngigen Ribozymkonstruktes vorgenommen. In Abbildung 28 sind die Varianten dargestellt, die hierfür synthetisiert wurden. Hier wurden die kurzen Substratstränge, welche an ihrem 5'-Ende kovalent gebundenes Anthracenmethylenhexaethylenglycol enthalten, durch enzymatische Transkription hergestellt, wohingegen die Ribozymstränge (38-mer bzw. Varianten von 24-mer + 18-mer) durch chemische Festphasensynthese zugänglich waren.



**Abbildung 28. Verschiedene Ribozymkonstrukte für Kristallisationsversuche.** Es wurden die beiden abschließenden Helices um bis zu vier Basenpaare verkürzt. Die Variante (24+18)SE besitzt an beiden Seiten überhängende Enden.

Diese Varianten dienten dazu, den Einfluss, den die Verkürzung der Helices auf das Kristallwachstum ausübt, zu untersuchen. Die Veränderung der Länge von Helices kann möglicherweise die bessere Packung der Moleküleinheiten im Kristall ermöglichen. Ähnlich können auch an beiden Seiten überhängende Enden, die komplementäre Sequenzen haben, durch Hybridisierung eine bessere Packung im Kristallgitter bewirken.

In Abbildung 29 ist das Ergebnis der gelektrophoretischen Untersuchung der Aktivität der konstruierten Ribozymvarianten abgebildet.



Abbildung 29. Gelelektrophoretischer Assay zur Überprüfung der katalytischen Aktivität der Konstrukte aus Abbildung 28. 1) 38 + An-11, linke Spur Hintergrundreaktion. 2) 38 + An-10, linke Spur Hintergrundreaktion. 3) 38 + An-9, linke Spur Hintergrundreaktion. 4) 38 + An-8, linke Spur Hintergrundreaktion. 5) (24+18)-2 + An-11. 6) (24+18)-3 + An-11. 7) (24+18)-4 + An-11. 8) (24+18)SE + An-11 linke Spur Hintergrundreaktion. 9) An-9 + (24+18)-2; -3; -4. Reaktionsbedingungen: 0,5 μM 38-mer, 1 nM Substratstrang, 5 μM Biotinmaleimid, bzw. 0,5 μM 24-mer-Variante, 1 μM 18-mer-Variante, 1 nM Substratstrang, 5 μM Biotinmaleimid in 30 mM Tris-HCl pH 7,4; 300 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2% DMSO, 30 min, 25°C, 18% denat. PAGE.

Dabei waren die Substratstränge in der jeweils unteren Reihe radioaktiv markiert und wurden nach Hybridisierung mit den jeweiligen Ribozymsträngen mit Biotinmaleimid inkubiert. Die Reaktion bewirkt, dass der entstehende Produktstrang eine geringere elektrophoretische Mobilität aufweist und so in der oberen Reihe sichtbar wird. Helix I lässt sich danach ohne Aktivitätsverlust auf fünf Basenpaare verkürzen (Abbildung 29, 1 – 4). Desgleichen kann Helix III auf bis zu vier Basenpaare verkürzt werden (Abbildung 29, 5 – 7). Auch die gleichzeitige Verkürzung dieser beiden Helices ist möglich (Abbildung 29, 9). Das Ribozymkonstrukt (24+18)SE (SE steht für *sticky ends*) ist ebenfalls in der Lage, ohne Aktivitätsverlust die Diels-Alder-Reaktion am Substratstrang zu katalysieren (Abbildung 29, 8).

Diese Konstrukte wurden wiederum in Kristallisationsversuchen mit *sparse matrix screens* eingesetzt. Sie lieferten Kristalle, die aber hinsichtlich Auflösung und Mosaizität keine Verbesserung aufwiesen.

#### Cokristallisation mit U1A-Protein

Ein weiterer Ansatz bestand darin, ein geeignetes RNA-Konstrukt mit einem Protein zu cokristallisieren. Das kleine nucleäre Ribonucleoprotein (small nuclear ribonucleoprotein, snRNP) U1A bindet hochaffin an eine mindestens 10 Nucleotide lange Akzeptorschleife am Ende einer Helix. Dieser Komplex ist strukturell sehr gut charakterisiert und seine Kristallstruktur wurde mit 1,92 Å Auflösung aufgeklärt [Oubridge et al. 1994]. Die Kristallisation des Komplexes aus RNA und U1A-Protein resultierte bereits beim Hepatitis Delta Virus-Ribozym und beim Hairpin-Ribozym in besser geordneten Kristallen und höherer Auflösung [Doudna & Cech 2002; Ferre-D'Amare et al. 1998]. Dabei wird in die zu kristallisierende RNA über eine Helix, die die katalytische Aktivität nicht beeinflussen sollte, die Bindungsdomäne für das U1A-Protein eingeführt. Die Strukturlösung könnte dann mit der Strategie des molekularen Ersatzes (molecular replacement) erfolgen, da die Koordinaten der Untereinheit aus Protein und Akzeptorschleife bekannt sind. In Abbildung 30 sind die beiden Konstrukte dargestellt, die für das 49-mer Diels-Alder-Ribozym synthetisiert wurden.



Abbildung 30. Konstrukte für die Cokristallisation mit U1A-Protein. Links: Die Bindungsdomäne für das U1A-Protein (grau) ist über die Helix I in das 49-mer Ribozym eingeführt worden. Rechts: Die Bindungsdomäne für das U1A-Protein (grau) ist über die Helix III in das 49-mer Ribozym eingeführt worden.

Die Akzeptorschleife wurde über die Helices I oder III in die RNA integriert. Die Sekundärstrukturvorhersage Mfold mit der Software ergab für beide Oligoribonucleotide das katalytische Minimalmotiv als bevorzugte Konformation. Die katalytische Aktivität dieser beiden RNA-Konstrukte wurde im UV-spektrometrischen Assay überprüft. Sowohl die Konstrukte allein, als auch in Gegenwart von äquimolaren Mengen U1A-Protein, zeigten eine deutlich auf 20-30% verringerte Reaktivität in Gegenwart der Substrate Anthracenmethylenhexaethylenglycol und E-Maleimidocapronsäure. Dieser Befund stimmt überein mit den Beobachtungen aus der Titration des Helix III-Konstruktes mit U1A-Protein, die in Abbildung 31 dargestellt ist.



Abbildung 31. Titration des U1A-HIII-Konstruktes mit U1A-Protein. 1) 0 mol% U1A, nicht renaturiert, 2) 0 mol% U1A, 3) 10 mol% U1A, 4) 25 mol% U1A, 5) 55 mol% U1A, 6) 80 mol% U1A, 7) 100 mol% U1A, 8) 120 mol% U1A, 9) 150 mol% U1A, 10) 175 mol% U1A, 11) 200 mol% U1A. Reaktionsbedingungen: 2,5  $\mu$ M RNA, 1 mM Natriumkakodylat pH 6,5, 100 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 min, 25°C; 10% native PAGE. Die Verdunkelung im rechten Teil der Abbildung ist auf ungleichmäßigen Lichteinfall zurückzuführen.

Wird die RNA allein, ohne Renaturierungsprozess, auf ein natives Gel aufgetragen, so zeigen sich vier Konformere mit unterschiedlichem Laufverhalten, die in Spur 1 zu sehen sind. Nach einer Denaturierungsprozedur für 5 min bei 90°C gefolgt von langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur bleiben noch zwei stabile Konformere, wie in Spur 2 sichtbar wird. Bei der Titration mit U1A-Protein wird das Konformer in der unteren Reihe zuerst komplexiert (Spur 6). Ein großer Anteil der zweiten Struktur ist an diesem Punkt jedoch noch nicht komplexiert, sodass selbst bei einem formalen Überschuss von 200% des Proteins (Spur 11) die RNA nicht vollständig komplexiert vorliegt. Ähnlich verhält sich auch das Helix I-Konstrukt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich nicht mit Sicherheit bestimmen, dass eine einzelne Vorzugskonformation von dem Komplex aus RNA und Protein eingenommen wird. Sie lassen daher diese zwei synthetisierten RNA-Konstrukte für die Cokristallisation mit U1A-Protein als ungeeignet erscheinen.

# 5 Diskussion

Die Untersuchung der katalytischen Funktion von RNA ist ein relativ junges Forschungsfeld, welches in den Jahren einen aber letzten bedeutenden Kenntniszuwachs erfahren hat. Besonders im Hinblick auf die RNA-katalysierte Proteinbiosynthese wird klar, wie wichtig die Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen katalytischer RNA neben denen von Proteinenzymen ist Moore & Steitz 2002]. Auch für die Nutzung des katalytischen Potentials von RNA für synthetische Zwecke ist die Kenntnis über Zusammenhänge zwischen räumlicher Struktur und Funktionsmechanismus des Katalysators von Vorteil. Dadurch sollte es möglich sein, Strukturinformationen, die aus selektierten Ribozymen gewonnen wurden, zur Generierung maßgeschneiderter Ribozyme zu nutzen, indem durch weitere Evolutionsund Selektionsschritte Katalysatoren erzeugt werden, die auf die jeweilige Reaktion optimal abgestimmt sind. Ebenso könnten vorhandene Ribozyme hinsichtlich ihrer Substratspezifität oder Stereoselektivität optimiert werden. Das in dieser Arbeit untersuchte katalytische Diels-Alder-Ribozym stellt das erste Beispiel überhaupt für ein Ribozym dar, das die Fähigkeit besitzt, die C-C-Bindungsknüpfung zwischen zwei kleinen, organischen, nicht an die RNA gebundenen Molekülen zu katalysieren. Daher können seine Eigenschaften nicht direkt mit denen anderer bekannter Ribozyme verglichen werden. Entsprechend wichtig sind Erkenntnisse, die über die Funktionsweise, den katalytischen Mechanismus und die räumliche Struktur dieses bisher einzigartigen Ribozyms gewonnen werden.

# 5.1 Kinetische Daten

Die kinetischen Parameter der ribozymkatalysierten Diels-Alder-Reaktion wurden in einem UV-spektroskopischen Verfahren bestimmt [Seelig et al. 2000]. Dabei wurden die wasserlöslichen Substrate Anthracenmethylenhexaethylenglycol und ɛ-Maleimidocapronsäure in einem geeigneten Puffer in einer Quartzküvette umgesetzt und die Abnahme der Absorption bei 365 nm in Abwesenheit und Gegenwart des 49-mer Ribozyms verfolgt. Nach Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeiten über die ersten 5%

ergab Umsatz sich für die unkatalysierte Hintergrundreaktion eine Geschwindigkeitskonstante von 0,053 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, wohingegen die katalysierte Reaktion eine Geschwindigkeitskonstante von 0,35 s-1 aufweist. Die Michaelis-Menten-Konstanten ergaben sich für das Dien zu 370 µM und für das Dienophil zu 8 mM. Das Verhältnis k<sub>cat</sub>/k<sub>uncat</sub> beträgt damit 6,6 M. Dieser Wert gibt eine Abschätzung für die katalytische Effizienz und wird auch als effektive Molarität bezeichnet. Das Verhältnis gibt die Konzentration eines Reaktanden an, die benötigt wird, um die spontane bimolekulare Reaktion in einen Prozess pseudo-erster Ordnung umzuwandeln mit einer Geschwindigkeit, die der entspricht, die in einem trimolekularen Komplex mit dem Katalysator erreicht wird. Es wird deshalb interpretiert als entropischer Vorteil einer unimolekularen gegenüber einer bimolekularen Reaktion [Bisswanger 2000].

Bimolekulare Cycloadditionen, zu denen die Diels-Alder-Reaktion zählt, haben typischerweise hohe Aktivierungsentropien im Bereich von -30 bis -40 cal K<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>, was die geringe Wahrscheinlichkeit widerspiegelt, zwei Substrate in einer für die Reaktion optimalen Orientierung zueinander anzuordnen [Sauer & Sustmann 1980]. Im Rahmen einer Untersuchung zu Molekülmechanik und -dynamik stellen Houk und Mitarbeiter in einem ausführlichen Artikel aus dem Jahre 2002 sämtliche bekannten nichtkovalenten Katalysatoren für intermolekulare Diels-Alder-Reaktionen zusammen [Kim et al. 2002]. Bei diesen Katalysatoren handelt es sich neben RNAs um Antikörper, Cyclodextrine und selbstorganisierende Kapseln (Rebeks Tennisball). Jeder dieser Katalysatoren zeigt Michaelis-Menten-Kinetik, wofür die Werte k<sub>cat</sub>, K<sub>m</sub>, <sub>Dien</sub> und K<sub>m</sub>, <sub>Dienophil</sub> bestimmt worden sind. In allen Fällen liegen die K<sub>m</sub>-Werte im Bereich um 10<sup>-3</sup> M, wie es für jede normale organische Wirt-Gast-Komplexierung in Wasser erwartet wird. Abbildung 32 enthält eine graphische Zusammenfassung der Werte für k<sub>cat</sub>, k<sub>uncat</sub> und k<sub>cat</sub>/K<sub>m,Dien</sub>K<sub>m,Dienophil</sub> für die besprochenen Katalysatoren.



Abbildung 32. Vergleich der katalytischen Parameter verschiedener biopolymerer Katalysatoren für Diels-Alder-Reaktionen. Alle Werte sind normalisiert auf die jeweilige  $k_{uncat}$ :  $\circ k_{uncat}/k_{uncat}$ . =  $k_{cat}/k_{uncat}$ ; •  $k_{cat}/K_{m,Dien}K_{m,Dienophil}k_{uncat}$ . (Abbildung adaptiert aus [Kim et al. 2002])

Hier symbolisiert die senkrechte Linie zwischen  $k_{cat}/k_{uncat}$  und  $k_{uncat}/k_{uncat}$  (**n**) das Ausmaß der Katalyse unter Bedingungen mit hoher Substratkonzentration, d.h. [S]>K<sub>m</sub>. Dies korrespondiert mit der Fähigkeit des Katalysators, den Übergangszustand der Reaktion zu stabilisieren. Der vertikale Abstand zu  $k_{cat}/K_{m,Dien}K_{m,Dienophilkuncat}$  (**•**) gibt die Reaktionsbeschleunigung unter Bedingungen mit niedriger Substratkonzentration wieder. Das bedeutet, dass alle hier abgebildeten Systeme katalytische Aktivität bei niedriger Substrat- und hoher Katalysatorkonzentration.

Im Gegensatz zu Enzymen, deren hohe Spezifität auf der starken Stabilisierung des Übergangszustandes der Reaktion beruht [Bruice & Benkovic 2000], binden alle untersuchten nichtkovalenten Katalysatorsysteme den jeweiligen Übergangszustand in Ausmaß wie die ungefähr demselben Substrate. Anhand einer Molekülmodellierungsstudie stellen die Autoren das Hauptphänomen der nichtkovalenten Katalyse dar. Demnach liefert die Vorab-Bindung der Substrate einen entropischen Vorteil. Die Entropie, die aufgebracht werden muss, um die Substrate in einen reaktiven Übergangszustand zu bringen, wurde zum großen Teil schon während des Bindungsprozesses bereitgestellt, dessen Ursache der hydrophobe Effekt bildet. Die Beschleunigung beruht also hauptsächlich auf der Umwandlung einer Reaktion zweiter Ordnung von Dien und Dienophil in eine Reaktion erster Ordnung eines trimolekularen Komplexes aus Katalysator, Dien und Dienophil. Auch die kinetischen Parameter eines Antikörpers, der eine 1,3-dipolare Cycloaddition katalysiert, sind vergleichbar mit den Werten, die oben für Diels-Alder-Reaktionen diskutiert wurden [Toker et al. 2000].

### 5.2 Untersuchungen zur Stereoselektivität

Die Cycloaddition von Anthracen und Maleimid ist eine Diels-Alder-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf, bei der das highest occupied molecular orbital (HOMO) eines elektronenreichen Diens mit dem lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) eines elektronenarmen Dienophils wechselwirkt. Es gelten die Woodward-Hoffmann-Regeln für pericyclische Reaktionen. Die zwei möglichen enantiomeren Produkte der Diels-Alder-Reaktion eines an der 9-Position substituierten Anthracens mit einem Maleimid entstehen zu unterschiedlichen Anteilen bei der symmetrischen Produktverhältnisses ribozymkatalysierten Reaktion. Diese Verschiebung des zugunsten eines Enantiomers wird durch die Anwesenheit der RNA als einem chiralen Molekül verursacht. Durch Bindung der Substrate in einer reaktiven Anordnung durch den homochiralen Katalysator entstehen diastereomere Übergangszustände von unterschiedlichem Energieinhalt auf der Reaktionskoordinate, wo dem aus niederenergetischeren Zustand das überschüssige Produktenantiomer hervorgeht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Größe des Substituenten der 9-Position des Anthracens entscheidenden Einfluss auf die an Enantiomerenverteilung bei der Diels-Alder-Reaktion hat [Seelig et al. 2000]. Ausgehend von einer Hydroxymethyleinheit über deren Verlängerung um eine Ethylenglycoleinheit schließlich zum Hexaethylenglycolmethylen-Substituenten steigt der Enantiomerenüberschuss der Reaktionsprodukte von 16 über 33 bis >95%, was praktisch der Bildung nur eines Enantiomers entspricht. Der Substituent am Stickstoffatom des Maleimides bewirkt keine signifikante Veränderung des Vergleich Enantiomerenverhältnisses, wie exemplarisch aus dem von N-Pentylmaleimid, ɛ-Maleimidocapronsäuremethylester und Pentylmaleimidocapronsäurehydrazid hervorgeht. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen aus Untersuchungen zur Substrat- und Produktspezifität des 49-mer-Ribozyms, die parallel in unserem Labor durchgeführt wurden [Stuhlmann & Jäschke 2002]. Danach stellt das Ribozym bestimmte Anforderungen an strukturelle Ausprägungen beider Substrate. In Abbildung 33 sind schematisch die Substituenten dargestellt, die vom Ribozym toleriert bzw. nicht umgesetzt werden können.



Abbildung 33. Substratvariationen, die vom Diels-Alder-Ribozym toleriert werden können (volle Schrift) bzw. nicht umgesetzt werden (leere Schrift).

Beide Reaktanden werden durch hydrophobe Wechselwirkungen spezifisch vom Katalysator erkannt, wobei prinzipiell das Dien als Anthracen und als Dienophil Maleimid vorliegen müssen, wie sie auch in der in vitro Selektion verwendet worden sind. Allerdings sind zahlreiche Substitutionen möglich. Für die Erkennung des Diens ist kein Heteroatom erforderlich. was Wasserstoffbrückenbindung und Metallionenkoordination zur Bindung des Anthracens unwahrscheinlich macht. Die Größe der Bindungstasche ist auf etwa 10 Å beschränkt, was drei annellierten Ringen entspricht, bei denen Substitutionen an den 2- und 3-Positionen (entlang der Längsachse) nicht toleriert werden. Dass große Substituenten an der 9-Position akzeptiert werden, welche allerdings an ihrer  $\alpha$ -Position unverzweigt vorliegen müssen, weist auf eine schmale Öffnung auf dieser Seite der Bindungstasche hin. Dennoch bietet die Bindungsstelle auch an der gegenüberliegenden Seite Platz für kleinere Substituenten an der 10- und 4-Position. Aus diesen Befunden wird klar, weshalb die Enantioselektivität der Reaktion bei Anthracen mit kleinen Substituenten so gering ausfällt und stark mit deren Vergrößerung korreliert.

Aufgrund des allgemeinen Mechanismus der Diels-Alder-Reaktion muss das Dienophil in coplanarer Anordnung zur Ebene des Anthracens in der katalytischen Bindungsstelle vorliegen. Für die Bindung des Maleimides ist eine hydrophobe Seitenkette am Stickstoffatom besonders wichtig, die jedoch recht unspezifisch erkannt wird, wie aus der Unempfindlichkeit der Enantiomerenverteilung gegen diesen Substituenten geschlussfolgert werden kann.

Ein wichtiges Ergebnis der Untersuchungen zur Enantioselektivität ist der Nachweis des ersten katalytisch aktiven L-Ribozyms. Indem das andere Enantiomer des Katalysators eingesetzt wird, kann die Diels-Alder-Reaktion zwischen Anthracen- und Maleimidderivaten zum umgekehrten Enantiomerenverhältnis der Produkte geführt werden, was prinzipiell für die Entwicklung maßgeschneiderter Ribozyme eine Erweiterung ihres katalytischen Potentials darstellt.

### 5.3 Strukturelle Untersuchungen

#### 5.3.1 Enzymatisches und chemisches probing

Die strukturelle Sondierung in Lösung basiert auf der Reaktivität und Zugänglichkeit von freien oder mit Liganden komplexierten RNA-Molekülen gegenüber Enzymen oder Reagenzien, die einen spezifischen Angriffspunkt auf der RNA haben [Giege et al. 1999]. Durch Kombination chemischer und gelelektrophoretischer Verfahren können die angegriffenen Stellen geortet werden. Anhand dieser Daten können Aussagen über bestimmte strukturelle Anordnungen der betreffenden Nucleotide gewonnen werden. Im Falle der Bindung eines Liganden an das RNA-Molekül kann auf diesem durch Vergleich mit unkomplexierter RNA die Region bestimmt werden, in der Ligand mit dem Makromolekül wechselwirkt (*footprinting*). Die experimentelle Untersuchung der Sekundärstruktur des 49-mer Diels-Alder-Ribozyms mit den RNasen S1, T2, V1, T1 und U2 wurde unter nativen Pufferbedingungen vorgenommen und bestätigte weitgehend den Strukturvorschlag, der durch vergleichende Sequenzanalyse und Algorithmen zur Sekundärstrukturvorhersage (Mfold, RNAdraw) gewonnen wurde [Seelig & Jäschke 1999a]. Auf einen ungepaarten Bereich aus drei bis vier Nucleotiden am 5'-Ende des Ribozyms folgen zwei scheinbar durchgehende Helices. An deren Ende befindet sich eine relativ große, asymmetrische interne Schlaufe, die auf der 5'-Seite aus fünf, auf der 3'-Seite aus sechs einzelsträngigen Nucleotiden aufgebaut ist. Diese Blase wird wiederum von einer regelmäßigen Helix gefolgt. Die Anordnung dieser Sekundärstrukturelemente lässt vermuten, dass die interne Schlaufe die katalytische Umgebung für die Reaktanden bildet. Dies wird auch durch die Ergebnisse aus Mutationsstudien mit Punktmutanten gestützt, die in diesem Arbeitskreis von D. Bebenroth durchgeführt worden sind und in Abbildung 34 wiedergegeben werden [Keiper et al., im Druck ].



*Abbildung* 34. Punktmutationsstudien an der dreisträngigen Ribozymvariante. Das Nummerierungsschema weicht von dem des 49-mer-Ribozyms ab.

Danach befinden sich vier der acht nahezu vollständig konservierten Nucleotide in der internen Schlaufe. Die übrigen vier hochkonservierten Reste bilden den 5'-Terminus des Ribozyms, an dem in der Selektion ein Reaktand kovalent befestigt war. Das wichtigste Charakteristikum des 49-mer Diels-Alder-Ribozyms besteht in dem großen Unterschied in der Reaktivität der beiden gegenüberliegenden Seiten der asymmetrischen internen Schlaufe. Während in der Sequenz A40 A41 U42 A43 C44 U45 starke Spaltstellen bei enzymatischen Verdauexperimenten beobachtet werden, weist die Sequenz U23 G24 C25 C26 A27 Spaltungen von geringer Intensität auf, was die Darstellung einfache schematische der Sekundärstruktur des katalytischen Minimalmotivs nicht wiedergeben kann. Dieser Unterschied könnte seine Ursache in einer beschränkten Zugänglichkeit der kürzeren Seite der Schlaufe haben und lässt eine Exposition der längeren Seite nach außen hin vermuten.

Die Ergebnisse aus den Modifizierungs- bzw. Spaltungsreaktionen mit Dimethylsulfat (DMS), Diethylpyrocarbonat (DEPC) und Bleiionen zeichnen weiter ein interessantes Bild. DMS methyliert das Stickstoffatom N3 von Cytosin und ist somit unter anderem eine Sonde für dessen Watson-Crick-Basenpaarung. Unter nativen Pufferbedingungen, d.h. wenn in Anwesenheit von Magnesiumionen die RNA in ihrer tertiären Faltung vorliegt, sind die Cytosinreste in der Schlaufe C<sub>25</sub> und C<sub>26</sub> für die Methylierung durch DMS nicht zugänglich. Das ist ein starker Hinweis auf die Beteiligung dieser beiden benachbarten Nucleotide an Basenpaarungen z.B. nach dem Watson-Crick-Muster oder auch anderen, an denen N3 von Cytosin beteiligt ist. DEPC modifiziert das Stickstoffatom N7 von Adenosin und ist dadurch unter anderem auch eine Sonde für Interaktionen vom Hoogsteen-Typ. Wiederum sind die Adenosinreste in der internen Schlaufe unter nativen Pufferbedingungen von der Modifizierungsreaktion nicht betroffen, was ein starker Hinweis für ihre Beteiligung an tertiären Interaktionen mit anderen Teilen der RNA ist.

Die hydrolytische Spaltung des RNA-Rückgrates durch Bleiionen wird ebenfalls genutzt, um die Tertiärstruktur von RNA und Ribozymen zu sondieren [Ciesiolka et al. 1998]. Außerdem haben kristallographische Studien anhand von Hefe-tRNA<sup>Phe</sup> gezeigt, dass eine starke Bindungsstelle für Mg<sup>2+</sup>-Ionen mit einer starken Spaltstelle durch Pb<sup>2+</sup>-Ionen zusammenfällt. Daraus wird abgeleitet, dass bleiioneninduzierte Spaltstellen

allgemein potentielle Metallionenbindungsstellen in RNA darstellen. Bei den Ergebnissen der Pb2+-Spaltungsexperimente am Diels-Alder-Ribozym fällt auf, dass von den zwei gegenüberliegenden einzelsträngigen Bereichen der internen Schlaufe nur einer gegen Hydrolyse stark anfällig ist (A40 A41 U42 A43 C44 U45), wohingegen die andere Seite kaum gespalten wird (U23 G24 C25 C26 A27). Die Analyse der Spaltstellen in Gegenwart verschiedener Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen ergibt, dass eine besonders intensive Spaltung am U<sub>45</sub> stattfndet, was dort auf eine starke Magnesiumbindungstelle hindeutet. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Ergebnisse zweier Doppelmutationsstudien (D. Bebenroth, persönliche Mitteilung), wonach die Nucleotide C44 und U45 mit G4 bzw. A3 in Basenpaarungen interagieren, so ist eine starke Metallionenbindungsstelle an diesem Knotenpunkt äußerst schlüssig.

Alle beschriebenen Experimente wurden auch mit Ribozym durchgeführt, bei dem der Reaktand Anthracen über ein Hexaethylenglycol-Verbindungsstück kovalent an die RNA gebunden vorlag. Es konnten jedoch keine Veränderungen in den Spaltungsmustern gegenüber freiem Ribozym festgestellt werden. Auch die Durchführung der Experimente in Gegenwart von Substrat- und Produktmolekülen lieferte keine anderen Aussagen. Der Grund hierfür liegt offenbar in der niedrigen Affinität der Substrate und Produkte für das Ribozym, die in der Größenordnung der Michaelis-Konstanten von 370 µM für Anthracen und 8 mM für Maleimid liegen sollten.

Die Ergebnisse aus den enzymatischen und chemischen Studien zur Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstruktur sind in die computergestützte Konstruktion eines dreidimensionalen Modells des 49-mer Diels-Alder-Ribozyms eingeflossen. Durch Kombination mit den Befunden der Mutationsstudien konnte in Kooperation mit Prof. Dr. Eric Westhof, CNRS, Strasbourg, unter Verwendung der Software MANIP und DRAWNA ein Strukturvorschlag entwickelt werden, der alle experimentellen Vorhersagen berücksichtigt. Er ist in Abbildung 35 wiedergegeben.



Abbildung 35. Dreidimensionales Modell der Struktur des katalytischen Minimalmotivs des Diels-Alder-Ribozyms. Purpur: Helix I, gelb: Helix II, grün: Helix III, blau: 5'-GGAG-Terminus. Hochkonservierte Reste (vgl. Abbildung 34) sind als Kugeln dargestellt, die übrigen Basen der internen Schlaufe als Stabmodelle.

Das zentrale Element dieses Strukturmodells ist erwartungsgemäß die große interne Schlaufe. Ihre beiden gegenüberliegenden Seiten werden praktisch zusammengeklammert von den formal ungepaarten Nucleotiden des 5'-Terminus durch die Interaktionspaare C25G1, C26G2, C44G4 und U45A3. Für die Paare C25G1 und C<sub>26</sub>G<sub>2</sub> wurden jeweils Basenpaarungen vom Typ paralleles Watson-Crick-Basenpaar vorgeschlagen, bei dem die Ribosephosphatreste der beiden beteiligten Nucleotide trans-ständig zueinander orientiert sind und das Iminoproton von Guanin mit O2 von Cytosin, sowie die Aminogruppe von Guanin mit N3 von Cytosin, welche unter semidenaturierenden Bedingungen für Methylierung durch DMS nicht mehr zugänglich waren, zwei Wasserstoffbrücken ausbildet. Ein solches nichtkanonisches Basenpaar wird auch in der Kristallstruktur von Hefe-tRNA<sup>Phe</sup> beobachtet [Westhof et al. 1988]. Das Paar C<sub>44</sub>G<sub>4</sub> kann als kanonisches *cis*-Watson-Crick-Basenpaar angesehen werden, wohingegen für U45A3 ein reverses Hoogsteenpaar postuliert werden kann. Dabei bilden das Iminoproton von Uracil mit N7 von Adenin und die Aminogruppe von Adenin mit O2 von Uracil zwei Wasserstoffbrücken aus.

Die beiden äußeren Helices I und III, die jeweils durch einen stabilen Tetraloop abgeschlossen sind, sind versetzt zueinander angeordnet und die mittlere, auf eine Länge von mindestens vier Basenpaaren festgelegte Helix II, beschreibt einen Bogen, der der gesamten Anordnung eine kompakte globuläre Struktur verleiht. Verdeutlicht man sich die Positionen der hochkonservierten Nucleotide innerhalb dieses Strukturmodells, so ergibt sich die interessante Beobachtung, dass diese alle auf einer Seite des zentralen Hohlraumes versammelt sind. Dort kann demnach die Bindungstasche für die coplanare reaktive Anordnung der Substrate vermutet werden.

## 5.3.2 NMR-Untersuchungen

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren etwa fünf vollständige Strukturen von kleinen RNAs oder Ribozymen in Lösung, die durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt worden sind, nämlich Leadzyme, Hammerhead-, Hairpin-, HDV-Ribozym und Teile der Gruppe I-Introns [Zheng & Tinoco 2000]. Dabei bietet die NMR-Spektroskopie im Vergleich zur Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie den Vorteil, die Konformation der Oligonucleotide unter Bedingungen zu erfassen, die denen eher entsprechen, unter welchen Aktivität beobachtet wird. Das ist besonders bei kleineren Molekülen bis etwa 10 kDa wichtig, weil man annimmt, dass bei ihnen Packungseffekte im Kristall die aktive Konformation beeinflussen könnten. Dennoch ist das hier untersuchte Diels-Alder-Ribozym mit fast 50 Nucleotiden immer noch recht groß und seine Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie nicht trivial. Die in Abschnitt 4.4.2 abgebildeten Iminoprotonenspektren weisen recht breite Signale auf, was für eine sehr flexible Struktur spricht. Die fehlende Fixierung wird auch beim Vergleichen der Spektren von 49-mer mit 49-mer-Anthracen-Konjugat deutlich, und wurde auch in den beschriebenen Experimenten mit chemischen und enzymatischen Sonden beobachtet. Die Signale bei 9,8 ppm und 9,95 ppm können den thermodynamisch stabilen UUCG-Tetraloops zugeordnet werden. Die NMR-Struktur dieses Tetraloops wurde 1995 im Labor von Varani aufgeklärt [Allain & Varani 1995]. Desweiteren können den Spektren, die man als vorläufige Ergebnisse interpretieren muss, gewisse Aussagen entnommen werden. Demnach liegen zwei Formen des Ribozyms vor, die sich in langsamem Austausch befinden, und deren charakteristische Signale bei 13,6; 13,9 und 14,5 ppm unter bestimmten Bedingungen des pH-Wertes, der Magnesium- und Calciumionenkonzentration hervortreten. Das Auftreten dieser Peaks bei pH 7,2; 5 mM Mg<sup>2+</sup> oder 1 mM Ca<sup>2+</sup> korreliert mit dem Anwachsen der katalytischen Aktivität des Ribozyms unter diesen Bedingungen. Drei Basenpaare formieren sich in Gegenwart der vier einzelsträngigen Nucleotide am 5'-Terminus, welche in Abwesenheit dieser vier Nucleotide nicht beobachtet wurden. Die Signale dieser drei Wasserstoffbrücken treten im Tieffeldbereich auf, wo im allgemeinen AU-Basenpaare beobachtet werden. Eines davon kann durch die Wechselwirkung A<sub>3</sub>U<sub>45</sub> zwischen dem 5'-Ende und der internen Schlaufe erklärt werden, die durch Mutationsanalyse gefunden wurde. Die anderen beiden Signale können in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DMS-Modifizierungsexperimente und dem daraus entwickelten Strukturmodell gebracht werden. In Abschnitt 5.3.1 wurden die zwei *trans*-Watson-Crick-Basenpaare C<sub>25</sub>G<sub>1</sub> und C<sub>26</sub>G<sub>2</sub> vorgeschlagen, bei denen die Iminoprotonen von G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub> jeweils mit O2 von C<sub>25</sub> bzw. C<sub>26</sub> Wasserstoffbrücken ausbilden. Zwei der Signale im Tieffeldbereich könnten danach durch die stärkere Entschirmung der Iminoprotonen durch Sauerstoffatome als Akzeptor in Wasserstoffbrücken interpretiert werden.

Die Gegenwart des Reaktionsproduktes, welches die Katalyse durch das Ribozym hemmt, hat Auswirkungen auf den Iminoprotonenbereich. Das konnte in drei unabhängigen Experimenten gezeigt werden: 49-mer-Ribozym unter Zugabe von Diels-Alder-Produkt aus Anthracen und  $\varepsilon$ -Maleimidocapronsäure, zweisträngige Ribozymvariante mit Anthracen-RNA-Konjugat bei Zugabe von N-Pentylmaleimid sowie Vergleich mit der zweisträngigen Ribozymvariante mit Diels-Alder-Produkt-RNA-Konjugat. Zwei Signale im Bereich von 12 – 13 ppm verändern sich jeweils, was eine Veränderung der Struktur des Ribozyms indiziert, die sich auf die Stabilisierung des Übergangszustandes positiv auswirken könnte.

Eine Zuordnung der Signale kann mit diesen Untersuchungen noch nicht durchgeführt werden. Dazu müssten als nächstes ausführliche zweidimensionale Messungen mit isotopenmarkierten Oligonucleotiden durchgeführt werden und die eindeutige Zuordnung der Signale bleibt dann bei einem solch komplexen System immer noch ein kompliziertes Unterfangen [Cromsigt et al. 2001].

### 5.3.3 Kristallisation von Ribonucleinsäuren

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von dreidimensionalen RNA-Strukturen durch Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt worden [Egli & Minasov 2000]. Besonders hervorzuheben ist dabei die Aufklärung der Struktur der großen Untereinheit des bakteriellen Ribosoms im Jahre 2000 im Labor von Steitz, welche eindrucksvoll gezeigt hat, dass die Knüpfung der Peptidbindung bei der Translation durch ribosomale RNA katalysiert wird [Nissen et al. 2000]. Zu derartigen Fortschritten hat entscheidend die Entwicklung von Methoden zur Züchtung geeigneter Kristalle beigetragen. Inzwischen sind *sparse matrix screens* für die Kristallisation von Nucleinsäuren kommerziell erhältlich. Mit deren Anwendung gelang auch die Kristallisation von verschiedenen Varianten des Diels-Alder-Ribozyms. Dieses Ribozym ist in der Lage, die chemische Reaktion zwischen zwei kleinen nicht-RNA-Molekülen zu katalysieren. Unter den bekannten Aptamer- und Ribozymstrukturen, welche durch Röntgenkristallographie aufgeklärt wurden, befinden sich bis heute keine vergleichbaren RNA-Moleküle. Deshalb ist die Struktur des Diels-Alder-Ribozyms von besonderem Interesse.

Kristalle wuchsen bei 4°C, bei 20°C und bei 30°C in Kakodylat- oder HEPES-Puffer bei den pH-Werten 6,5 bzw. 7,5. Die Auflösung verbesserte sich von 7 Å auf 3 Å. Kristalle von gleicher Qualität konnten auch durch Cokristallisation mit den Schwermetallionen Mn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> und Ba<sup>2+</sup> erhalten werden. Datensätze wurden aufgenommen und mit der Software DENZO/SCALEPACK prozessiert. Ein Problem bei allen Kristallen wird schon morphologisch in ihrer flächigen Form sichtbar. Offensichtlich führt das schichtweise Wachstum unter den bisherigen Bedingungen zu polykristallinem Material, bei dem die Ebenen der einzelnen Mikrokristalle leicht gegeneinander verkippt sind. Diese sogenannte Mosaizität hat Schwierigkeiten bei der Prozessierung und Auswertung der Datensätze zur Folge. Erste Versuche einer Strukturlösung mit der Methode des molekularen Ersatzes mit der Struktur des UUCG-Tetraloops [Ennifar et al. 2000] führten trotz der akzeptablen Auflösung aufgrund der hohen Mosaizität bisher nicht zum Erfolg.

Die Betrachtung der dreidimensionalen Strukturen der Komplexe von Aptameren für hydrophobe planare Moleküle ist recht instruktiv. Theophyllin wird von seinem hochaffinen Aptamer mit 33 Nucleotiden durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und Basenstapelungen regelrecht eingeschlossen [Zimmerman et al. 1997]. Zwei interne Schlaufen der RNA wechselwirken und bilden einen Sandwich aus drei Basentripeln als Bindungsstelle. Das Strukturmotiv einer Adenosinplattform taucht auch hier auf. Ein wichtiger Befund beim Theophyllin-Aptamer ist, dass viele der konservierten Reste an mehrfach überlappenden tertiären Wechselwirkungen beteiligt sind.

Die Kristallstruktur eines hochaffinen Aptamers für ein Analogon von Malachitgrün, Tetramethylrosamin, weist an der Bindungsstelle des Liganden ebenfalls mehrere Lagen gestapelter Nucleotide auf, die in Paaren, Tripeln und als Basenquadrupel angeordnet sind [Baugh et al. 2000]. Spezifische stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen kommen hier nicht vor, was die starke Diskriminierung strukturverwandter Liganden keineswegs beeinträchtigt. Diese RNA besteht aus 38 Nucleotiden, welche eine adenosinreiche asymmetrische interne Ausbuchtung formen, die von zwei Helices flankiert wird. Bei diesen auffälligen strukturellen Ähnlichkeiten besteht doch der große Unterschied zum 49-mer Minimalmotiv in der Stärke, mit der der Ligand bzw. das Substrat von der RNA gebunden werden.

Auch die Isoalloxazin-Einheit von Flavinmononucleotid wird von seinem 35 Nucleotide langen Aptamer zwischen einem mismatch-Basenpaar und einem Basentripel intercaliert [Patel et al. 1997]. Wiederum erfolgt die Bindung in einer asymmetrischen purinreichen internen Schlaufe mit mehreren stabilisierenden Stapelwechselwirkungen. Zwei intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen tragen zur Spezifität der Bindung bei.

Die diskutierten Strukturen geben Anhaltspunkte dafür, wie in RNA-Molekülen hydrophobe Bindungstaschen ausgeprägt werden können. Wie schon im Abschnitt 5.2 beschrieben wurde, werden beim Diels-Alder-Ribozym beide Substrate durch hydrophobe Wechselwirkungen erkannt, welche wiederum die im Abschnitt 5.1 erläuterten kinetischen Eigenschaften des Ribozyms zur Folge haben. Jedoch ist hier eine Bindung des Anthracens durch Intercalation unwahrscheinlich, da so keine reaktive coplanare Anordnung mit dem Maleimid möglich wäre.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Kristalle erzeugt werden, deren Auflösung bis etwa 3 Å reicht. Jüngst wurde die Kristallstruktur eines 40-mer RNA-Aptamers in Komplex mit seinem Liganden Streptomycin gelöst [Tereshko et al. 2003]. Die Kristalle diffraktierten bis zu einer Auflösung von 2,9 Å, was ausreichend war, um Informationen über die Struktur auf atomarer Ebene zu liefern. Von den Kristallen aus Konstrukten des Diels-Alder-Ribozyms wurden Datensätze aufgenommen, welche gegenwärtig ausgewertet werden. Damit sind wichtige Voraussetzungen zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Diels-Alder-Ribozyms geschaffen worden. Die enzymatischen und chemischen Experimente zur Aufklärung von Elementen der Sekundär- und Tertiärstruktur sind in die Konstruktion eines dreidimensionalen Modelles des katalytischen Minimalmotivs eingeflossen. Dieses Modell bildet außerdem eine gute Basis für die Auswertung der Daten aus den NMR-Untersuchungen und derzeit Kristallisationsversuchen, woran noch intensiv mit den zusammen Kollaborationspartnern gearbeitet wird.

# 6 Zusammenfassung

Das Forschungsgebiet der katalytischen Ribonucleinsäuren hat sich in den zwanzig Jahren seit seiner Entstehung rasant entwickelt. Es beschäftigt sich einerseits mit der Erforschung natürlich vorkommender Ribozyme, wie deren Funktionsweise und Mechanismen. Hier ist die bakterielle Proteinbiosynthese im Ribosom ein herausragendes Beispiel für die Fortschritte in diesem Feld und die tiefen Einsichten, die in die Biochemie des Lebens gewonnen werden konnten. Auf der anderen Seite sind neuartige Technologien entwickelt worden, mittels derer katalytische Nucleinsäuren zielgerichtet erzeugt werden oder sie zu potentiellen Wirkstoffen weiterentwickelt werden können. Die bedeutendste Methode zur Gewinnung artifizieller Ribozyme ist SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Mit ihrer Weiterentwicklung, der direkten Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden, gelang die Generierung von RNA-Katalysatoren, welche die Diels-Alder-Reaktion von Anthracen- und Maleimidderivaten in wässerigem Reaktionsmedium beschleunigen können. In der vorliegenden Arbeit wurden diese bisher einzigartigen Diels-Alderase-Ribozyme hinsichtlich ihrer Funktionsweise und räumlichen Struktur untersucht. Die kinetischen Parameter der katalysierten Reaktion wurden durch UV-Spektroskopie bestimmt. Ein katalytisches Minimalmotiv folgt den Gesetzen der Enzymkinetik, d.h. es zeigt Sättigungsverhalten hinsichtlich beider Substrate der bimolekularen Reaktion und es zeigt echten katalytischen Turnover mit einem Wert für k<sub>cat</sub> von 21 min<sup>-1</sup>. Bei der Diels-Alder-Reaktion werden zwei enantiomere Produkte gebildet. Der Einfluss des homochiralen RNA-Katalysators auf die Produktverteilung wurde mittels HPLC an chiralen Festphasen untersucht. Abhängig vom sterischen Anspruch des Substituenten am Anthracen sind die Ribozyme in der Lage, einen Enantiomerenüberschuss von >95% zu erzeugen. Damit wurde erstmalig gezeigt, dass die Stereoselektivität von Ribozymen mit der von Enzymen vergleichbar sein kann. Ein künstliches Oligoribonucleotid, welches das Spiegelbild eines D-Ribozyms darstellt, führt zur genau umgekehrten Enantiomerenverteilung und ist das erste Beispiel für ein katalytisches Spiegelmer.

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur und von Elementen der Tertiärstruktur des katalytischen Minimalmotivs wurden Spaltungs- und Modifizierungsexperimente mit enzymatischen und chemischen Nucleasen durchgeführt. Dadurch konnte experimentell gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur dieses 49 Nucleotide umfassenden Motivs aus drei Helices aufgebaut ist, von denen zwei um eine asymmetrische interne Schlaufe aus zwei einzelsträngigen Bereichen angeordnet sind. Diese innere Ausbuchtung enthält eine Reihe von Nucleotiden, die an tertiären Wechselwirkungen beteiligt sind und eine starke Metallionenbindungsstelle. NMRspektroskopische Untersuchungen lieferten Hinweise für die Bedeutung der ersten vier Nucleotide am 5'-Terminus für die Ausprägung des katalytischen Zentrums. Es gelang die Kristallisation von Ribozymvarianten im Komplex mit Reaktionsprodukt oder Substratmolekül. Kristalle diffraktieren bis zu einer Auflösung von etwa 3 Å und es konnten Schwermetallionen durch Cokristallisation eingebaut werden. Datensätze dieser Kristalle wurden aufgenommen und werden gegenwärtig ausgewertet.

# 7 Summary

Since its discovery twenty years ago, the research field of catalytic ribonucleic acids has developed rapidly. It is concerned on the one hand with the investigation of naturally ocurring ribozymes, their functional features and mechanisms. In this context the bacterial biosynthesis of proteins in the ribosome is an outstanding example of the progress made in this field and the deep insights into the biochemistry of life. On the other hand, new technologies have been developed, that allow the specific generation of catalytic nucleic acids and their optimisation to potential drug candidates. The most important method to generate artificial ribozymes is SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). With its further development to the selection with linker-coupled reactants, the generation of RNA catalysts which accelerate the Diels-Alder reaction between derivatives of anthracene and maleimide in aqueous solution was successful. In this thesis, these yet unique Diels-Alderase ribozymes were investigated with respect to their functional features and spatial structure. The kinetics of the catalysed reaction was determined by uv spectroscopy. A catalytic minimal motif behaves according to the principles of enzyme kinetics, i.e., it obeys saturation kinetics with respect to both substrates of the bimolecular reaction, and it displays true catalytic turnover with a value  $k_{cat} = 21 \text{ min}^{-1}$ . In the Diels-Alder reaction two enantiomeric products are formed. The influence of the homochiral RNA catalyst on the product distribution was investigated by means of HPLC on chiral stationary phases. Depending on the steric demand of the substituents at the anthracene the ribozymes are able to induce an enantiomeric excess of >95%. This was the first demonstration, that the stereoselectivity of ribozymes is comparable to those of enzymes. An artificial oligonucleotide, which is the mirror image of a D-ribozyme, causes the inverted ratio of enantiomeric products being the first example of a catalytic spiegelmer.

To investigate the secondary structure and elements of the tertiary structure of the catalytic minimal motif, cleavage and modification experiments with enzymatic and chemical nucleases were performed. The experimental data supported the proposed secondary structure of the 49 nt motif. It is composed of three helices, two of which enclose an asymmetric internal loop. This internal loop contains a number of
nucleotides which are involved in tertiary interactions and a metal ion binding site. NMR spectroscopic measurements gave evidence for the importance of the first four 5'-terminal nucleotides for the assembly of the catalytic site. The crystallisation of ribozyme constructs in complex with the reaction product or substrate molecule was successful. The crystals diffracted with a resolution of about 3 Å and heavy metal ions could be co-crystallised. The data sets that were measured are currently being analysed.

# 8 Anhang

# Abkürzungen und Einheiten

А	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
С	Cytidin
Ci	Curie, 1Ci = 37 MBq
cpm	Zählimpulse pro Minute (counts per minute)
СТР	Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanosin
GMP, GTP	Guanosinmonophosphat, -triphosphat
h	Stunde
HEG	Hexaethylenglycol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (high performance liquid
	chromatography)
iBu	Isobutyryl
iPr	Isopropyl
1	Liter
λ	Wellenlänge
μ	Mikro (10-6)
m	Meter, Milli (10-3)
М	mol/l, molar
MALDI	
	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
min	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Minute
min MW	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Minute Molekulargewicht (molecular weight)
min MW n	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Minute Molekulargewicht (molecular weight) Nano (10-9)
min MW n NMR	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Minute Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> ) Nano (10 <sup>-9</sup> ) Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
min MW n NMR nt	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Minute Molekulargewicht (molecular weight) Nano (10 <sup>-9</sup> ) Kernmagnetische Resonanzspektroskopie Nucleotid
min MW n NMR nt NTP	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Minute Molekulargewicht (molecular weight) Nano (10 <sup>-9</sup> ) Kernmagnetische Resonanzspektroskopie Nucleotid Nucleosidtriphosphat
min MW n NMR nt NTP PAGE	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Minute Molekulargewicht (molecular weight) Nano (10 <sup>-9</sup> ) Kernmagnetische Resonanzspektroskopie Nucleotid Nucleotid Nucleosidtriphosphat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Reverse Transkription
S	Sekunde
t	Zeit
Т	Thymidin
TEAAc	Triethylammoniumacetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Units, Uridin
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
w/v	weight per volume

### Geräte

DNA/RNA Synthesizer Expedite 8909 Applied Biosystems Elektrophoresekammern S2, Gibco-BRL Eigenbau für PAGE Expositionskassetten Kodak X-Omatic Fluoreszenzspektrometer BioLogic Fluoreszenzküvette Quarzglas SUPRASIL, HELLMA Fluoreszenzimager BioRad Geldokumentationsanlage HPLC-Anlage Beckman, System Gold HPLC-Anlage Agilent Technologies, Serie 1100 HPLC-Säulen Beckman Ölpumpe Heraeus, DS1 PCR-Geräte MJ Research PTC 100 pH-Meter Knick, Calimatic 761 Phosphorimager Pipetten Reaktionsgefäße, silikonisiert Biozym Milli-Q, Millipore Reinstwasseranlage Büchi, Rotavapor R Rotationsverdampfer Röntgenfilme Schüttler Vortex Genie, Bender & Hobein

Storm 840, Typhoon 9400, Molecular Dynamics Ultrasphere ODS C18, 5 µm, 250x4.6 mm, Luna 80 C18, 5µm, 250x4.6 mm, Phenomenex Storm 840, Typhoon 9400, Molecular Dynamics Gilson, Pipetman P2, P20, P200, P1000 Fuji, Medical X-ray Film RXOG (Safety)

Spannungsgeber	Pharmacia, ECPS 3000/150 und 500/400
Stereomikroskop	Nikon SMZ 1500
Sterilfiltrationsanlage	Schleicher & Schuell
Szintillationszähler	Beckman LS 6000 SC
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer 5436
UV-Küvetten	Quarzglas SUPRASIL, HELLMA
UV-Spektrometer	Shimadzu, UV-160A
Vakuumzentrifuge	Savant, Speed Vac Concentrator
Videosystem	Mitsubishi, CS I mit Videoprozessor
Waagen	Mettler AE 163 und AC 88; Sartorius
Wasserbäder	Julabo, U3; Heidolph HBR 2
Zentrifugen	Hettich Mikro 120, Eppendorf 5804R

## Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in der höchstmöglichen Reinheitsstufe verwendet (in der Regel p.a.).

Aceton	Merck
Acetonitril	J. T. Baker
[y- <sup>32</sup> P]-Adenosin-5'-triphosphat	ICN Pharmaceuticals
5', 3'-Adenosindiphosphat (pAp)	Sigma
Ammoniak-Lösung 33 %	Riedel de Haën
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Argon	Messer
Anilin	Sigma
Bariumchlorid Dihydrat	Aldrich
Biotinmaleimid	Sigma
Blei(II)-acetat Tetrahydrat	Sigma
Borsäure, reinst kristallisiert	Riedel de Haën
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Calciumhydrid	Aldrich
Citronensäure	Sigma
[α- <sup>32</sup> P]-Cytidin-5'-triphosphat	Amersham Biosciences
1,2-Dichlorethan	Acros
Dichlormethan	J. T. Baker
Diethylether	Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Acros
Diisopropylethylamin	Aldrich
Dimethylsulfat (DMS)	Sigma

Dimethylsulfoxid (DMSO) Dithiothreitol (DTT) Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs) Essigsäure Ethanol Ethidiumbromid Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Formamid Glycerol Glycogen Harnstoff Hexaethylenglycol *n*-Hexan Hydrazin N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) Kakodylsäure Magnesiumchlorid-6-Hydrat Mangan(II)-chlorid β-Mercaptoethanol Methanol Methylamin 40% N-Methylpyrrolidinon Natriumacetat Natriumchlorid Natriumhydrogencarbonat Natriumhydroxid Natriumsulfat Nucleosidtriphosphate (NTPs) Phenol z. RNA-Extraktion Phosphorigsäure(2-cyanoethylester)diisopropylamidchlorid Phosphorpentoxid Pyridin Rinderserumalbumin (BSA) Röntgenentwickler Röntgenfixierer Rothiphorese DNA Sequenziersystem Salzsäure 37% SYBRGold<sup>TM</sup> N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Toluol Triethylamin Triethylamin\*Trihydrofluorid

Fluka Sigma **MBI** Fermentas J. T. Baker Roth Fluka J. T. Baker Merck Merck Boehringer Mannheim Merck Fluka Roth Sigma **GERBU** Sigma Riedel de Haën Merck Sigma Aldrich Aldrich Aldrich Riedel de Haën Merck Merck Merck Merck Boehringer Mannheim Sigma Lancaster Fluka Aldrich Boehringer Mannheim AGFA-Gevaert G150 AGFA-Gevaert G334 Roth Riedel de Haën Molecular Probes Fluka Merck Fluka Aldrich

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), enzyme grade AppliChem tRNA aus Hefe Xylencyanol FF Zink(II)-chlorid Merck

Boehringer Mannheim Eastman Kodak & Co

## Reagenzien für Oligonucleotidsynthese

CPG (500, 1000 Å)	Proligo (Tac)
Wsh, Ox, Cap A, Cap B, Act	Proligo
Wsh A (Acetonitril, Wassergehalt ≤10 ppm)	Roth
Deblock (TCA in Dichlormethan)	Roth
DNA-Amidite	Proligo (Tac), Roth
RNA-Amidite	Proligo (Tac), Cruachem

## Enzyme

T4-RNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-Polynucleotidkinase	MBI Fermentas
T7-RNA-Polymerase	Stratagene
RNase T1	Industrial Research Ltd.
RNase U2	Industrial Research Ltd.
Nuclease S1	Promega
RNase T2	Gibco-BRL
RNase V1	Pierce Perbio

#### Publikationen

Keiper, Sonja; Bebenroth, Dirk; Westhof, Eric; Jäschke, Andres: Structural probing and modelling of a Diels-Alderase ribozyme. Manuskript in Vorbereitung

Keiper, Sonja; Bebenroth, Dirk; Stuhlmann, Friedrich; Jäschke, Andres: RNA as a catalyst: The Diels-Alderase-Ribozyme. in Highlights in Bioorganic Chemistry: Methods and Applications, Ed.: H. Wennemers and C. Schmuck, Wiley-VCH, im Druck

Jäschke, Andres.; Stuhlmann, Friedrich.; Bebenroth, Dirk.; Keiper, Sonja.; Wombacher, Richard (2002) Ribozyme-catalysed carbon-carbon bond formation. *Biochem. Soc. Trans.* **30**(6), 137-1140.

Seelig, Burckhard; Keiper, Sonja; Stuhlmann, Friedrich; Jäschke, Andres (2000) Enantioselective ribozyme catalysis of a bimolecular cycloaddition reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**(24), 4576-4579.

Schuppan, Julia; Wehlan, Hermut; Keiper, Sonja; Koert, Ulrich (2001) Synthesis of apoptolidinone. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**(11), 2063-2066.

#### Poster

Keiper, Sonja; Bebenroth, Dirk; Stuhlmann, Friedrich; Wombacher, Richard; Jäschke, Andres: Structural investigations of Diels-Alderase ribozymes. 8<sup>th</sup> Annual meeting of the RNA society, Wien, 1.-6. Juli 2003.

### Vorträge

Keiper, Sonja: Enantioselektive Ribozymkatalyse einer bimolekularen Cycloaddition.9. Nachwuchswissenschaftler-Symposium Bioorganische Chemie, Heidelberg, 18.-20.September 2000.

### 9 Literaturverzeichnis

Allain, F. H. T. and Varani, G. (1995) Structure of the P1 helix from group I self-splicing introns. *J. Mol. Biol.* **250**, 333-353.

Auclair, K., Sutherland, A., Kennedy, J., Witter, D. J., Van den Heever, J. P., Hutchinson, C. R. and Vederas, J. C. (2000) Lovastatin Nonaketide Synthase Catalyzes an Intramolecular Diels-Alder Reaction of a Substrate Analogue. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 11519-11520.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5 A-resolution map of the 50S ribosomal subunit [see comments]. *Nature* **400**, 841-847.

Bartel, D. P. and Unrau, P. J. (1999) Constructing an RNA world. Trends Biochem. Sci. 24, M9-M13.

Batey, R. T., Rambo, R. P. and Doudna, J. A. (1999) Tertiary motifs in RNA structure and folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **38**, 2327-2343.

Baugh, C., Grate, D. and Wilson, C. (2000) 2.8 A crystal structure of the malachite green aptamer. *J. Mol. Biol.* **301**, 117-128.

Bisswanger, H. (2000) Enzymkinetik. Theorie und Methoden. Wiley-VCH.

Breaker, R. R. (1997) DNA aptamers and DNA enzymes. Curr. Opin. Chem. Biol. 1, 26-31.

Bruice, T. C. and Benkovic, S. J. (2000) Chemical basis for enzyme catalysis. Biochemistry 39, 6267-6274.

Brunel, C. and Romby, P. (2000) Probing RNA structure and RNA-ligand complexes with chemical probes. *Methods Enzymol.* **318**, 3-21.

Burgstaller, P. and Famulok, M. (1994) Isolation of RNA aptamers for biological cofactors by in vitro selection. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 1084-1087.

Carmi, N. and Breaker, R. R. (2001) Characterization of a DNA-cleaving deoxyribozyme. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 2589-2600.

Caruthers, M. H., Barone, A. D., Beaucage, S. L., Dodds, D. R., Fisher, E. F., McBride, L. J., Matteucci, M., Stabinsky, Z. and Tang, J. Y. (1987) Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. *Methods Enzymol.* **154**, 287-313.

Chun, S.-M., Jeong, S., Kim, J.-M., Chong, B.-O., Park, Y.-K., Park, H. and Yu, J. (1999) Cholesterol esterase activity by in vitro selection of RNA against a phosphate transition-state analogue. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 10844-10845.

Ciesiolka, J., Michalowski, D., Wrzesinski, J., Krajewski, J. and Krzyzosiak, W. J. (1998) Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs. *J. Mol. Biol.* **275**, 211-220.

Conn, M. M., Prudent, J. R. and Schultz, P. G. (1996) Porphyrin metalation catalyzed by a small RNA molecule. J. Am. Chem. Soc. 118, 7012-7013.

Cromsigt, J., van Buuren, B., Schleucher, J. and Wijmenga, S. (2001) Resonance assignment and structure determination for RNA. *Methods Enzymol.* **338**, 371-399.

Diels, O. and Alder, K. (1928) Synthesen in der hydroaromatischen Reihe-Anlagerungen von "Di-en"-Kohlenwasserstoffen. *Liebigs Ann. Chem.* **460**, 98-122.

Doudna, J. A. and Cech, T. R. (2002) The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **418**, 222-228.

Eckstein, F. (2000) Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **10**, 117-121.

Egli, M. and Minasov, G. (2000) Recent Advances in RNA Crystallography. in *Ribozyme Biochemistry and Biotechnology*. Ed. G. Krupp and R. K. Gaur, Eaton Publishing, Natick, MA.

Ehresmann, C., Baudin, F., Mougel, M., Romby, P., Ebel, J. P. and Ehresmann, B. (1987) Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Research* **15**, 9109-9128.

Ekland, E. H. and Bartel, D. P. (1995) The secondary structure and sequence optimization of an RNA ligase ribozyme. *Nucleic Acids* Res 23, 3231-3238.

Ellington, A. D. and Szostak, J. W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-822.

England, T. E., Bruce, A. G. and Uhlenbeck, O. C. (1980) Specific labeling of 3' termini of RNA with T4 RNA ligase. *Methods Enzymol.* **65**, 65-74.

England, T. E. and Uhlenbeck, O. C. (1978) 3'-terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase. *Nature* 275, 560-561.

Ennifar, E., Nikulin, A., Tishchenko, S., Serganov, A., Nevskaya, N., Garber, M., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Nikonov, S. and Dumas, P. (2000) The Crystal Structure of UUCG Tetraloop. *J. Mol. Biol.* **304**, 35-42.

Feldstein, P. A., Buzayan, J. M., van Tol, H., deBear, J., Gough, G. R., Gilham, P. T. and Bruening, G. (1990) Specific association between an endoribonucleolytic sequence from a satellite RNA and a substrate analogue containing a 2'-5' phosphodiester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2623-2627.

Ferre-D'Amare, A. R., Zhou, K. and Doudna, J. A. (1998) Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature* **395**, 567-574.

Gaur, R. K., Conrad, F. and Krupp, G. (1997) Applications of modified transcripts. *Meth. Mol. Biol.* 74, 111-120.

Gaur, R. K. and Krupp, G. (1997) Chemical and enzymatic approaches to construct modified RNAs. *Meth. Mol. Biol.* **74**, 99-110.

Giege, R., Helm, M. and Florentz, C. (1999) Chemical and enzymatic probing of RNA structure. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*. **6**, 63-80.

Gouverneur, V. E., Houk, K. N., de Pascual-Teresa, B., Beno, B., Janda, K. D. and Lerner, R. A. (1993) Control of the exo and endo pathways of the Diels-Alder reaction by antibody catalysis. *Science* **262**, 204-208.

Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849-857.

Guo, H. C. and Collins, R. A. (1995) Efficient trans-cleavage of a stem-loop RNA substrate by a ribozyme derived from neurospora VS RNA. *Embo J.* **14**, 368-376.

Hampel, A., Tritz, R., Hicks, M. and Cruz, P. (1990) 'Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucleic Acids Res.* 18, 299-304.

Hausch, F. and Jäschke, A. (1998) A novel carboxy-functionalized photocleavable dinucleotide analog for the selection of RNA catalysts. *Tetrahedron Lett.* **39**, 6157-6158.

Hilvert, D., Hill, K. W., Nared, K. D. and Auditor, M.-T. M. (1989) Antibody catalysis of a Diels-Alder reaction. J. Am. Chem. Soc. 111, 9261-9262.

Huang, F., Yang, Z. and Yarus, M. (1998) RNA enzymes with two small-molecule substrates. *Chem. Biol.* 5, 669-678.

Illangasekare, M., Sanchez, G., Nickles, T. and Yarus, M. (1995) Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science* 267, 643-647.

Jäschke, A., Frauendorf, C. and Hausch, F. (1999) In vitro selected oligonucleotides as tools in organic chemistry. *Synlett* No.6, 825-833.

Johnston, W. K., Unrau, P. J., Lawrence, M. S., Glasner, M. E. and Bartel, D. P. (2001) RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**, 1319-1325.

Katayama, K., Kobayashi, T., Oikawa, H., Honma, M. and Ichihara, A. (1998) Enzymatic activity and partial purification of solanapyrone synthase: first enzyme catalyzing Diels-Alder reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1384**, 387-395.

Keiper, S., Bebenroth, D., Stuhlmann, F. and Jäschke, A. (2003) RNA as a catalyst: The Diels-Alderase-Ribozyme. in *Highlights in Bioorganic Chemistry: Methods and Applications*. Ed. C. Schmuck and H. Wennemers, Wiley-VCH, in press.

Kim, S. P., Leach, A. G. and Houk, K. N. (2002) The Origins of Noncovalent Catalysis of Intermolecular Diels-Alder Reactions by Cyclodextrins, Self-Assembling Capsules, Antibodies, and RNAses. J. Org. Chem. 67, 4250-4260.

Klußmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V. A. and Fürste, J. P. (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nature Biotechnol.* 14, 1112-1115.

Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. and Cech, T. R. (1982) Selfsplicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**, 147-157.

Kujau, M. J. and Wölfl, S. (1998) Intramolecular derivatization of 2'-amino-pyrimidine modified RNA with functional groups that is compatible with re-amplification. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1851-1853.

Kuo, M. Y.-P., Sharmeen, L., Dinter-Gottlieb, G. and Taylor, J. (1988) Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* **62**, 4439-4444.

Lee, N., Bessho, Y., Wei, K., Szostak, J. W. and Suga, H. (2000) Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation. *Nature Struct. Biol.* **7**, 28-33.

Leva, S., Lichte, A., Burmeister, J., Muhn, P., Jahnke, B., Fesser, D., Erfurth, J., Burgstaller, P. and Klussmann, S. (2002) GnRH binding RNA and DNA Spiegelmers: a novel approach toward GnRH antagonism. *Chem. Biol.* **9**, 351-359.

Li, J., Zheng, W., Kwon, A. H. and Lu, Y. (2000) In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn(II)-dependent RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res.* **28**, 481-488.

Li, Y. and Breaker, R. R. (2001) In vitro selection of kinase and ligase deoxyribozymes. *Methods* 23, 179-190.

Li, Y. and Sen, D. (1996) A catalytic DNA for porphyrin metallation. Nature Struct. Biol. 3, 743-747.

Lohse, P. A. and Szostak, J. W. (1996) Ribozyme-catalysed amino-acid transfer reactions. *Nature* **381**, 442-444.

Lorsch, J. R. and Szostak, J. W. (1994) In vitro evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity. *Nature* **371**, 31-36.

Michel, F. and Ferat, J. L. (1995) Structure and activities of group II introns. Annu. Rev. Biochem. 64, 435-461.

Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, G. W. and Uhlenbeck, O. C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8783-8798.

Milligan, J. F. and Uhlenbeck, O. C. (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* **180**, 51-62.

Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2002) The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* **418**, 229-235.

Morris, K. N., Tarasow, T. M., Julin, C. M., Simons, S. L., Hilvert, D. and Gold, L. (1994) Enrichment for RNA molecules that bind a Diels-Alder transition state analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 13028-13032.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920-930.

Nolte, A., Klußmann, S., Bald, R., Erdmann, V. A. and Fürste, J. P. (1996) Mirror-design of Loligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nature Biotechnol.* 14, 1116-1119.

Ose, T., Watanabe, K., Mie, T., Honma, M., Watanabe, H., Yao, M., Oikawa, H. and Tanaka, I. (2003) Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase. *Nature* **422**, 185-189.

Oubridge, C., Ito, N., Evans, P. R., Teo, C. H. and Nagai, K. (1994) Crystal structure at 1.92 A resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature* **372**, 432-438.

Patel, D. J., Suri, A. K., Jiang, F., Jiang, L., Fan, P., Kumar, R. A. and Nonin, S. (1997) Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *J. Mol. Biol.* 272, 645-664.

Pingoud, A. and Urbanke, C. (1997) Arbeitsmethoden der Biochemie. Walter de Gruyter; Berlin, New York.

Pitulle, C., Kleineidam, R. G., Sproat, B. and Krupp, G. (1992) Initiator oligonucleotides for the combination of chemical and enzymatic RNA synthesis. *Gene* **112**, 101-105.

Prody, G. A., Bakos, J. T., Buzayan, I. R., Schneider, I. R. and Bruening, G. (1986) Autolytic processing of dimeric plant virus satelite RNA. *Science* 231, 1577-1580.

Prudent, J. R., Staunton, J. and Schultz, P. G. (1995) Probing the structural determinants of a catalytic RNA with isomerase activity. J. Am. Chem. Soc. 117, 10145-10146.

Robertson, D. L. and Joyce, G. F. (1990) Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single- stranded DNA. *Nature* **344**, 467-468.

Romesberg, F. E., Spiller, B., Schultz, P. G. and Stevens, R. C. (1998) Immunological origins of binding and catalysis in a Diels-Alderase antibody. *Science* 279, 1929-1933.

Rossi, J. J. (1999) Ribozymes, genomics and therapeutics. Chem. Biol. 6, R33-37.

Sambrook, J., E.F., F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santoro, S. W. and Joyce, G. F. (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4262-4266.

Sauer, J. and Sustmann, R. (1980) Mechanistische Aspekte der Diels-Alder-Reaktion: Ein kritischer Rückblick. *Angew. Chem.* 92, 773-801.

Scaringe, S. A., Wincott, F. E. and Caruthers, M. H. (1998) Novel RNA synthesis method using 5'-O-Silyl-2'-O-orthoester protecting groups. J. Am. Chem. Soc. 120, 11820-11821.

Seelig, B. and Jäschke, A. (1997) Site-specific modification of enzymatically synthesized RNA: transcription initiation and Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Lett.* **38**, 7729-7732.

Seelig, B. and Jäschke, A. (1999a) A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity. *Chem. Biol.* **6**, 167-176.

Seelig, B. and Jäschke, A. (1999b) Ternary conjugates of guanosine monophosphate as initiator nucleotides for the enzymatic synthesis of 5'-modified RNAs. *Bioconjugate Chem.* **10**, 371-378.

Seelig, B., Keiper, S., Stuhlmann, F. and Jäschke, A. (2000) Enantioselective ribozyme catalysis of a bimolecular cycloaddition reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**, 4576-4579.

Sengle, G., Eisenfuhr, A., Arora, P. S., Nowick, J. S. and Famulok, M. (2001) Novel RNA catalysts for the Michael reaction. *Chem. Biol.* **8**, 459-473.

Sengle, G., Jenne, A., Arora, P. S., Seelig, B., Nowick, J. S., Jaschke, A. and Famulok, M. (2000) Synthesis, incorporation efficiency, and stability of disulfide bridged functional groups at RNA 5'-ends. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 1317-1329.

Sproat, B. S. (1995) Chemistry and applications of oligonucleotide analogues. J. Biotechnol. 41, 221-238.

Stuhlmann, F. and Jäschke, A. (2002) Characterization of an RNA Active Site: Interactions between a Diels-Alderase Ribozyme and Its Substrates and Products. J. Am. Chem. Soc. **124**, 3238-3244.

Sullenger, B. A. and Gilboa, E. (2002) Emerging clinical applications of RNA. Nature 418, 252-258.

Tarasow, T. M., Tarasow, S. L. and Eaton, B. E. (1997) RNA-catalysed carbon-carbon bond formation. *Nature* **389**, 54-57.

Tarasow, T. M., Tarasow, S. L., Tu, C., Kellogg, E. and Eaton, B. E. (1999) Characteristics of an RNA Diels-Alderase active site. J. Am. Chem. Soc. 121, 3614-3617.

Tereshko, V., Skripkin, E. and Patel, D. J. (2003) Encapsulating Streptomycin within a Small 40-mer RNA. *Chem. Biol.* **10**, 175-187.

Toker, J. D., Wentworth, P., Jr., Hu, Y., Houk, K. N. and Janda, K. D. (2000) Antibody-Catalysis of a Bimolecular Asymmetric 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3244-3245.

Tokioka, K., Masuda, S., Fujii, T., Hata, Y. and Yamamoto, Y. (1997) Asymmetric cycloaddition of anthrone with N-substituted maleimides with C2-chiral pyrrolidines. *Tetrahedron: Asymmetry* **8**, 101-107.

Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505-510.

Unrau, P. J. and Bartel, D. P. (1998) RNA-catalysed nucleotide synthesis. Nature 395, 260-263.

Vaish, N. K., Fraley, A. W., Szostak, J. W. and McLaughlin, L. W. (2000) Expanding the structural and functional diversity of RNA: analog uridine triphosphates as candidates for in vitro selection of nucleic acids. *Nucleic Acids* Res. **28**, 3316-3322.

Watanabe, K., Mie, T., Ichihara, A., Oikawa, H. and Honma, M. (2000) Detailed reaction mechanism of macrophomate synthase: extraordinary enzyme catalyzing five-step transformation from 2-pyrones to benzoates. *J. Biol. Chem.* **275**, 38393-38401.

Wecker, M., Smith, D. and Gold, L. (1996) In vitro selection of a novel catalytic RNA: characterization of a sulfur alkylation reaction and interaction with a small peptide. *RNA* **2**, 982-994.

Wedekind, J. E. and McKay, D. B. (2000) Purification, crystallization, and X-ray diffraction analysis of small ribozymes *Methods Enzymol.* **317**, 149-168.

Welz, R. and Müller, S. (2002) 5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazole as activator for 2'-O-TBDMS phosphoramidite building blocks in RNA synthesis. *Tetrahedron Letters* **43**, 795-797.

Werstuck, G. and Green, M. R. (1998) Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science* **282**, 296-298.

Westhof, E., Dumas, P. and Moras, D. (1988) Restrained refinement of two crystalline forms of yeast aspartic acid and phenylalanine transfer RNA crystals. *Acta Crystallogr. A* **44(Pt2)**, 112-123.

Westman, E. and Strömberg, R. (1994) Removal of t-butyldimethylsilyl protection in RNA synthesis. Triethylamine trihydrofluoride (TEA, 3HF) is a more reliable alternative to tetrabutylammonium fluoride (TBAF). *Nucleic Acids* Res. **22**, 2430-2431.

Wiegand, T. W., Janssen, R. C. and Eaton, B. E. (1997) Selection of RNA amide synthases. *Chem. Biol.* 4, 675-683.

Wincott, F., DiRenzo, A., Shaffer, C., Grimm, S., Tracz, D., Workman, C., Sweedler, D., Gonzalez, C., Scaringe, S. and Usman, N. (1995) Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2677-2684.

Wlotzka, B., Leva, S., Eschgfaller, B., Burmeister, J., Kleinjung, F., Kaduk, C., Muhn, P., Hess-Stumpp, H. and Klussmann, S. (2002) In vivo properties of an anti-GnRH Spiegelmer: an example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8898-8902.

Wüthrich (1986) NMR of proteins and nucleic acids. Wiley-Interscience.

Yarus, M. (1999) Boundaries for an RNA world. Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 260-267.

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

Zheng, M. and Tinoco, I. (2000) High Resolution NMR Spectroscopy of Ribozymes. in *Ribozyme Biochemistry and Biotechnology*. Ed. G. Krupp and R. K. Gaur, Eaton Publishing, Natick, MA.

Zimmerman, G. R., Jenison, R. D., Wick, C. L., Simorre, J.-P. and Pardi, A. (1997) Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophilline-binding RNA. *Nature Struct. Biol.* **4**, 644-649.