

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom - Biochemiker Dirk Bebenroth

aus Celle

Tag der mündlichen Prüfung:

17.04.2007

**Über Struktur-Funktions-Beziehungen
zur Architektur
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 Prof. Dr. Andres Jäschke in der Zeit vom August 2000 bis September 2002 am Institut für Biochemie im Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie der Freien Universität Berlin, sowie von Oktober 2002 bis Januar 2007 am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie im Fachbereich Biowissenschaften der Ruprecht Karls-Universität Heidelberg angefertigt.

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

Dirk Bebenroth

Danksagung

Ich danke herzlich meinem Betreuer bei dieser Arbeit, Prof. Dr. Andres Jäschke, für die interessante Themenstellung. Durch ihn wurde für mich der Einblick in die RNA-Forschung sowie in deren Technologien und Methoden ermöglicht. Mein Interesse wurde vor allem geweckt durch die Möglichkeiten, Struktur-Funktions-Beziehungen auf verschiedenen Ebenen zu behandeln und zu diskutieren. Hierzu zählen besonders der computerunterstützte 3D-Modellbau sowie kristallographische Daten.

Ich bedanke mich ferner bei Prof. Dr. Volker A. Erdmann, in dessen Arbeitsgruppe der erste Teil meiner Arbeit angefertigt wurde, für die sehr guten Arbeitsbedingungen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Ferner bedanke ich mich bei Prof. Dr. Eric Westhof, CNRS, Strasbourg, für sein Interesse und die Entwicklung von zwei Tertiärstrukturmodellen.

Großer Dank gebührt Dr. Norman Hendrik Riedel, Alexander Nierth und Dr. Friedrich Stuhlmann für ihre Korrekturvorschläge. Frau Viola Funk danke ich für ihr Korrekturlesen der „Summary“.

Ich bedanke mich bei Dr. Friedrich Stuhlmann für die Synthese von geschütztem Anthracen-HEG-GMP-Initiatornukleotid.

Bei Sandra Suhm möchte ich mich bedanken für die Herstellung von fünf modifizierten RNA-11meren für Faltungsdynamik-Untersuchungen sowie von Anthracen-HEG-Phosphoramidit. Heiko Rudy danke ich für massenspektrometrische Bestimmungen von modifizierten Anthracenbausteinen.

Mihaela Caprioara und Dr. Roberto Fiammengo danke ich für ihre Beratung im Zusammenhang mit Nukleinsäuresynthesen und deren Aufarbeitung.

Tobias Timmermann möchte ich danken für seine Unterstützung bei Computerproblemen während der schriftlichen Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank richtet sich an Frau Viola Funk für ihre allgemeine Unterstützung, die besonders in schwierigen Lagen eine große Hilfe für mich bedeutet hat.

Natürlich richtet sich mein Dank auch an alle Kollegen und Freunde, die mich in der gesamten Zeit unterstützend begleitet haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1.: ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY	1
1.1.: Zusammenfassung	1
1.2.: Summary	3
2.: EINLEITUNG	5
2.1.: Biokatalysatoren und Ribozyme	5
2.2.: RNA-Welt-Hypothese	7
2.3.: Diels-Alder-Reaktionen und ihre Katalyse	8
2.3.1.: Natürliche Diels-Alder-Enzyme	9
2.3.2.: Artificielle Diels-Alder-Enzyme: Katalytische Antikörper und Ribozyme	10
2.3.3.: Das Diels-Alderase-Ribozym und seine Struktur	11
2.3.3.1.: Sekundärstrukturelemente	12
2.3.3.2.: Tertiärstrukturelemente	14
2.4.: Strukturelle Determinanten in Nukleinsäuren	16
2.4.1.: Nukleotidinteraktionen	16
2.4.2.: Sekundärstrukturelemente in Nukleinsäuren	17
2.4.3.: Tertiärstrukturelemente in Nukleinsäuren	18
2.5.: Dynamik der Konformation und Faltungsbildung	20
2.6.: Biochemische und chemosynthetische Techniken zur Mutagenese	21
2.6.1.: Konventionelle Mutagenese und RNA-DNA-Chimären	21
2.6.2.: Nucleotide Analog Interference Mapping (NAIM) und atomare Mutagenese	21
2.6.3.: Nucleotide Analog Interference Reversion und Suppression	23
3.: AUFGABENSTELLUNG	25
4.: MATERIALIEN UND METHODEN	26
4.1.: Synthese und Markierung von Nukleinsäuren	26
4.1.1.: T7 Transkriptionsreaktionen mit / ohne Initiator nukleotid	26
4.1.2.: Festphasensynthese und Aufarbeitung	28
4.1.3.: Radioaktive Markierung mit Phosphor-32	30
4.1.3.1.: Markierung in Transkriptionsreaktionen	30
4.1.3.2.: 5'-Markierung von RNA durch Kinasierung	30
4.1.3.3.: 3'-Markierung von RNA durch Ligation	31
4.1.3.4.: 3'-Markierung von DNA durch templatabhängige Extension	31
4.2.: Reinigung und Nachweis von Nukleinsäuren	32
4.2.1.: Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	32
4.2.2.: Reversphasen-HPLC	32
4.2.3.: Autoradiographie und Phosphorimageranalyse	34
4.2.4.: UV-Shadowing	34
4.2.5.: Elution aus Polyacrylamidgelen	35
4.2.6.: Ethanolfällung	35
4.2.7.: Elektroelution in Agarose: „Niedrigkosten- Hocheffizienz“-Eigenentwicklung	35
4.2.8.: Elution aus Agarose: das „Freeze & Squeeze“-Verfahren	37
4.3.: Konzentrations- und Mengenbestimmung von Nukleinsäuren	37
4.3.1.: Cerenkov-Messung	37
4.3.2.: Photometrische Messungen	37
4.4.: Methoden für Aktivitätstests und Kinetiken	38
4.4.1.: Gelelektrophoretischer Assay	38
4.4.2.: Fluoreszenzspektrometrischer Assay / UV-photometrischer Assay	39
4.5.: Methoden für NAIM- Experimente	40
4.5.1.: T7-Transkriptionen des 49mer-AHEG-Ribozyms, Einbau von α -Thio-NTP's	40
4.5.2.: HPLC-Trennung von A-HEG-modifizierten und unmodifizierten Ribozymen	42
4.5.3.: 3'-Markierung durch Ligation mit ^{32}P -pCp	44
4.5.4.: Umsetzung mit Biotinmaleimid bei definierter Reaktionszeit	45
4.5.5.: Trennung von Edukten und Produkten durch PAGE, Elektroelution	45
4.5.6.: Iodspaltung	47
4.5.7.: Analyse der Spaltprodukte auf Sequenziergelen	47

INHALTSVERZEICHNIS

4.5.8.: Ribonuklease T1-Leiter und limitierte alkalische Hydrolyse	47
5.: ERGEBNISSE	49
5.1.: Konventionelle Mutagenese:	49
5.1.1.: Punktmutanten und der Konservierungsgrad einzelner Nukleotide	49
5.1.2.: Validierung von Sekundärstrukturelementen: Einfache und doppelte Basensubstitutionen	50
5.1.3.: Suche nach tertiären Interaktionen: Komplementäre Doppel- und Vierfachsubstitutionen	52
5.2.: Einfache 2'-Desoxynukleotidsubstitutionen	54
5.3.: RNA/2'-OMe-RNA/DNA-Chimären	55
5.4.: Nucleotide Analog Interference Mapping (NAIM)	57
5.4.1.: Parentale Phosphorothioatinterferenzen	60
5.4.2.: Analog-Interferenzen	63
5.5.: Rationale ortsspezifische Substitutionen mit Nichtstandardnukleotiden	64
5.6.: Kinetische Auswirkung der Linkerlängen und Faltungsdynamik	68
5.7.: Suche nach kovalenten Modifikationen in möglichen Nebenreaktionen	69
5.8.: Suche nach möglichen Ribozym-Di- oder Oligomeren mit nativer PAGE	71
6.: DISKUSSION	72
6.1.: Strukturelle Elemente	72
6.2.: Aktives Zentrum mit einem zentralen Wasserstoffbrücken-Netzwerk	72
6.2.1.: Zentrales Wasserstoffbrücken-Netzwerk und Pseudoknoten A3U20-G4C19	72
6.2.1.1.: Pseudoknoten G1-C11 + G2-C10 und A3U20-G4C19	72
6.2.1.2.: Basentriple G2-C10-U17 und Basenplattform G1-C11..A16, Triple-Experiment, Wichtigkeit O2 Pos.17	75
6.2.1.3.: Kontext zum Triple: Interaktion des G9 mit U17	78
6.2.1.4.: Substratbindung via G9, NAIM: Interferenzen am G9 und Interferenz- reversionen durch 2-Aminopurin und Purin	79
6.3.: Parentale Thioatana loga: Die Rolle einzelner Magnesiumionen	80
6.4.: Zentrales Gerüstelement: Helix II, Scharfer Turn und Magnesiumionen Nr. 1+2	82
6.4.1.: Helix II	82
6.4.1.1.: RNA-DNA-2'-OMe-RNA-Chimären	82
6.4.2.: Scharfer Turn A18--C21.4	83
6.4.2.1.: Sterische Hinderungen im Bereich der Positionen A18 bis U20	83
6.4.2.2.: Reverses Hoogsteen Basenpaar U8-A18 und dU/dT8-Substitutionen	84
6.5.: Früher Modellbau: Phase I und II	88
6.6.: Molecular Modelling-Struktur (Phase III) versus Kristallstruktur (Phase IV)	89
6.7.: Hypothesen zur Faltungssequenz	93
6.8.: Hypothesen zum Reaktionsmechanismus:	
Das Diels-Alderase-Ribozym: Nur eine Entropiefalle oder ein „Thermodynamo“?	98
6.9.: Signifikanz	108
7.: LITERATUR	110
8.: ANHANG	114
A) Publikationen, Vorträge und Poster	114
B) Purin- und Pyrimidinstrukturen mit Positionsnummerierungen Zwei alternative Nummerierungsschemata für 49nt-Ribozyme	115
C) Allgemeine Ansatzvorschriften und Pufferzusammensetzungen	116
D) Software	117
E) Abkürzungen und Einheiten	118
F) Reagenzien für Oligonukleotidsynthesen	120
G) Enzyme	120
H) Geräte	120
I) Abbildungsverzeichnis	121

1.: ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY

1.1.: Zusammenfassung

Bislang war nur wenig bekannt über die Struktur und Reaktionsmechanismen künstlicher Ribozyme. Von der Arbeitsgruppe Jäschke wurde 1999 ein künstliches hergestelltes Ribozym beschrieben, das eine Diels-Alder-Cycloadditionsreaktion katalysiert ^[1]. In der vorliegenden Arbeit wurden Struktur-Funktions-Beziehungen auf verschiedenen Ebenen untersucht: Zum einen auf der Ebene der Nukleotide durch konventionelle Mutagenese, zum anderen auf der Ebene funktioneller Gruppen entweder durch atomare Mutagenese mittels ortsspezifischer Substitutionen oder durch Nucleotide Analog Interference Mapping (NAIM). Die Existenz und Lage der drei helikalen Bereiche des Ribozyms konnte durch doppelte, komplementäre Basensubstitutionen in Aktivitätswiederherstellungsversuchen gestützt und somit die zuvor angenommene Sekundärstruktur bestätigt werden. Der Annahme folgend, dass das katalytische Zentrum des Ribozyms von den einzelsträngigen Bereichen ausgebildet wird, wurden durch Substitution einzelner Basen die Konservierungsgrade aller Positionen dieser Bereiche bestimmt. Durch einzelne 2'-Desoxynukleotidsubstitutionen an denselben Positionen wurde die Rolle der 2'-Hydroxylgruppen im Ribozymmolekül untersucht. Hierbei wurde insbesondere die Wichtigkeit der 2'-Hydroxylgruppe des Nukleotides G9 als Teilnehmer im zentralen Wasserstoffbrücken-Netzwerk des aktiven Zentrums deutlich. Darüber hinaus wurde die Bedeutung verschiedener Ringstickstoffe, Aminogruppen und Carbonylgruppen in NAIM-Experimenten untersucht. Hier stand unter anderem die G9-Aminogruppe im Fokus des Interesses, da diese offenbar mit einer Carbonylgruppe des Maleimid-Substrates interagiert. Daher könnte ihr eine wichtige Funktion im Katalysemechanismus zukommen. Im Rahmen der NAIM-Experimente konnten ferner Rückschlüsse auf die Wichtigkeit einzelner Magnesiumionen zur Tertiärstrukturbildung gezogen werden. Zu diesem Zweck wurde die Rolle der nicht verbrückenden Phosphatsauerstoffe durch den Einbau von Phosphorothioatanaloga untersucht. Mit ihrer Etablierung gelang es erstmalig, die NAIM-Technik an einem nicht RNA-spaltenden Ribozym anzuwenden. Der Einbau einer zusätzlichen Anthracen-Modifikation erforderte die Lösung besonderer technischer Probleme, die durch spezielle und zum Teil selbstentwickelte Methoden gelöst werden konnten. Tertiäre Interaktionen des Pseudoknotenbasenpaares G1-C11 konnten erstmals durch eine partielle Aktivitätswiederherstellung in der Doppelmutante G1-C11 → *iso*-G1-*iso*-C11 zweifelsfrei nachgewiesen werden. In RNA/DNA/2'-OMe-RNA-Chimären war es möglich, die Anzahl der benötigten Ribonukleotide auf elf zu senken, bei weitgehender Erhaltung der Katalyseaktivität. Weiterhin gelang es,

die Aktivitätsdaten der Chimären in einen strukturellen Zusammenhang zu bringen, wobei insbesondere die Relevanz sterischer Hinderungen im Bereich der engen Schleife A18-C21.4 zu Tage trat. Auch die strukturelle Bedeutung der Helix II-Geometrie wurde in diesem Zusammenhang untersucht und diskutiert. Insgesamt konnte eine exzellente Übereinstimmung der Mutations- und Probingdaten untereinander sowie mit der kürzlich gelösten Kristallstruktur festgestellt werden. Bezüglich einer möglichen Quartärstruktur ergaben sich keine Anhaltspunkte für die Existenz von Di- oder Oligomeren, wodurch die Annahme einer monomeren Ribozymform gestützt wird. Atypisches kinetisches Verhalten legte eine partielle Inaktivierung des Ribozyms nahe. Zur Stützung dieser These wurde nach kovalenten Modifizierungen aus Nebenreaktionen gesucht; hierauf fanden sich jedoch keine Hinweise. Schließlich konnte experimentell gezeigt werden, dass auf dem Faltungsweg des Oligonukleotids die Ausbildung der Sekundärstruktur der geschwindigkeitsbestimmende und wesentlich langsamere Schritt gegenüber der Tertiärstrukturbildung ist. Durch die Integration aller Informationen aus Charakterisierungsexperimenten wurde verfeinerter computerunterstützter Modellbau der Tertiärstruktur ermöglicht. Darüber hinaus konnten Hypothesen zum Faltungsweg und zum Reaktionsmechanismus formuliert werden, die als Ausgangspunkt für zukünftige, z.B. physikochemische Experimente dienen können.

1.2.: Summary

Until now there is only little knowledge about the structure and reaction mechanisms of artificially produced ribozymes. In 1999, an artificial ribozyme catalysing a Diels-Alder-cycloaddition reaction was described by the Jäschke group ^[1]. This work focuses on structure-function-relationship on different levels: On the one hand at the level of nucleotides by conventional mutagenesis, on the other hand at the level of functional groups either by atomic mutagenesis using site-specific substitutions or by Nucleotide Analog Interference Mapping (NAIM). The existence and location of the three helical regions of the ribozyme could be supported by twofold complementary base substitutions in activity rescue experiments and therefore the previously assumed secondary structure. Following the assumption, that the catalytic center of the ribozyme is formed preferentially by the single stranded regions, the degrees of conservation concerning all positions of these regions were determined. Using single 2'-deoxynucleotide substitutions at the same positions the role of 2'-hydroxyl residues being part of the ribozyme were investigated. In particular the importance of the 2'-hydroxyl residue of nucleotide G9 as part of the central hydrogenbond-network of the active center became obvious. Additionally the role of different ring nitrogens, amino- and carbonyl groups were investigated in NAIM-experiments. In this regard among other functional groups the G9-amino group moved into the focus of interest, because it apparently interacts with a carbonyl group of the maleimide substrate and therefore could play an important role concerning the catalytic mechanism. Referring to NAIM-experiments, conclusions about the importance of single magnesium ions concerning tertiary structure formation could be drawn. For this purpose the role of non-bridging phosphate oxygens were investigated by incorporating phosphorothioate analogs. By establishing the technique successfully, NAIM was performed with a non RNA-cleaving ribozyme for the first time. The incorporation of an adding modification of anthracene caused severe technical problems, which could be solved by special and partially self-developed methods. For the first time tertiary interactions of the pseudoknot basepair G1-C11 could be undoubtedly proven by a partial activity rescue showed by the double mutant G1--C11 \rightarrow *iso*-G1--*iso*-C11. By producing chimeric RNA/DNA/2'-OMe-RNA constructs, the number of needed ribonucleotides could be reduced to eleven with only moderate loss of activity. Furthermore the activity data of chimeres could be brought into a structural context showing the relevance of sterical hindrances in the region of the sharp turn A18-C21.4. In this regard the structural role of the helix II-geometry was examined and discussed. In general an excellent agreement between the data collected by mutational analysis and other characterisation experiments, e.g. chemical probing, as well as the recently solved crystal structure could be stated.

Concerning a possible quaternary structure no indications for the existence of di- or oligomers were found, supporting the assumption of a monomeric ribozyme form. Atypical kinetic behaviour seemed to indicate partial ribozyme inactivation. In order to support this hypothesis, the search was directed to covalent modifications derived from side reactions, however no such indications were found. Finally, it could be experimentally shown, that the formation of the secondary structure is the rate limiting and much slower step in comparison to the tertiary structure formation. By integrating all information derived from characterisation experiments, refined computational modelling of the tertiary structure became possible, furthermore some hypotheses concerning the folding pathway and reaction mechanism could be formulated serving possibly as a basis for coming trials, e.g. physicochemical experiments.

2.: EINLEITUNG

2.1.: Biokatalysatoren und Ribozyme

Für lange Zeit zählten alle bekannten Biokatalysatoren zur Stoffklasse der Proteine. Dieses änderte sich mit der Entdeckung katalytischer RNA im Jahr 1982 durch T. Cech und S. Altman [2, 3]. Bis zu diesem Zeitpunkt waren lediglich folgende Funktionen der RNA bekannt: Als transfer RNA (tRNA) bildet sie ein Aminosäure-Adaptermolekül, ferner ist sie als ribosomale RNA (rRNA) ein Baustein der Ribosomen. Sowohl tRNA, als auch rRNA führen essentielle Funktionen im Rahmen der Proteinbiosynthese aus. Darüber hinaus dient RNA als Überträger genetischer Information in Form von messenger RNA (mRNA). Dasweiteren wurde RNA als Bestandteil von Ribonukleoproteinen wie dem Signal Recognition Particle (SRP) und dem Spleißosom nachgewiesen [4]. Neuere Forschungsergebnisse führten zur Beschreibung weiterer RNA-Funktionen. Ein Beispiel einer kleinen funktionalen RNA ist „small interference RNA“ (siRNA), die bei der Regulation der Genexpression auf mRNA-Ebene offenbar eine wichtige Bedeutung einnimmt [5]. Die Suche nach weiteren kleinen nichtcodierenden RNA-Molekülen hat seit der Erkennung der Breite ihrer funktionalen Möglichkeiten an Bedeutung gewonnen. Weiterhin wurde erkannt, dass RNA als Stoffklasse über die genannten Funktionen hinaus das Potential hat, chemische Reaktionen zu beschleunigen. Eines der beiden ersten beschriebenen katalytischen RNA-Moleküle, die allgemein mit dem Akronym „Ribozym“ für „RNA-Enzym“ bezeichnet werden, ist das Gruppe I selbstspaltende Intron. Es wurde gezeigt, dass rRNA aus *Tetrahymena* bei Anwesenheit von Guanosin oder Guaninnukleotiden als Cofaktoren ein Intron autokatalytisch herausspleißen und die flankierenden Exons miteinander ligieren kann [6]. Das zweite ist Ribonuklease P, ein Ribonukleoprotein, das auch bei Abwesenheit der Proteineinheiten tRNA-Vorläufer prozessiert, indem es sie in kleinere Einheiten spaltet [7]. Es sind seitdem eine Reihe weiterer natürlicher Ribozyme gefunden worden, deren Funktionen bisher auf Phosphodiester-spaltung oder -ligation beschränkt waren. Hierzu gehören das Gruppe II-Intron [8], Hairpin- [9], Hammerhead- [10], und Hepatitis Delta-Ribozym [11]. Eine besondere Bedeutung nimmt die auf Röntgenstrukturanalyse basierende Erkenntnis aus dem Jahr 2000 ein, dass die Peptidyltransferase-Aktivität der 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms durch seine rRNA bereitgestellt wird [12-15]. Für die Entdeckung der ersten Ribozyme und die damit verbundenen grundlegenden Arbeiten wurden Cech und Altman 1989 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [6, 7].

Über die natürlichen Ribozyme hinaus wurden in der Folgezeit weitere Aktivitäten künstlich hergestellter RNA-Moleküle gefunden. Die dafür entwickelten Techniken beruhen auf einer Strategie der Selektion aus kombinatorischen Nukleinsäurebibliotheken. Die Ursprünge dieser

in vitro Selektions- oder Evolutionstechnik, genannt Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX), die zunächst zur Entwicklung von spezifisch bindenden Liganden (Aptameren) diente, gehen auf die Arbeiten der Arbeitsgruppen von Gold, Szostak und Joyce um das Jahr 1990 zurück ^[16, 17]. Das Verfahren beruht auf der Bereitstellung einer Population von Molekülen mit einem randomisierten Bereich konstanter Länge und einer hohen Diversität von typischerweise ca. 10^{14} bis 10^{16} . Die Größenordnungen der Diversität werden durch die Handhabbarkeiten der Stoffmengen im Labormaßstab begrenzt. In Selektionsschritten, die auf das gewählte Selektionsziel ausgerichtet sind, können Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften isoliert und mit molekularbiologischen Methoden amplifiziert werden. Die erhaltene Fraktion kann einem zyklischen Selektions- und Amplifizierungsprozeß zugeführt werden. Das Verfahren der Selektion und Amplifikation aus einer Population von Spezies mit bestimmter Diversität entspricht den Prinzipien der Darwinschen Evolutionstheorie ^[18], mit dem Unterschied, dass Diversität nicht wie in der belebten Natur in einem dauernden Prozess durch Mutationsereignisse und folgenden Selektionsschritten evolviert wird, sondern schon am Anfang als komplexe Molekülbibliothek bereitgestellt wird. Analog zum Resultat vom „Survival of the Fittest“, d. h. der Auswahl und Vermehrung der am besten passenden Spezies bezogen auf die gegebenen, d. h. lokal vorhandenen Umweltbedingungen, werden dem Selektionsziel entsprechend aktive Moleküle isoliert und durch die Herstellung multipler Kopien angereichert. RNA als Nukleinsäure besitzt die wichtige Eigenschaft, ihre Funktion und ihren eigenen Bauplan, d.h. Phänotyp und Genotyp im selben Molekül zu vereinigen.

Zu den wichtigsten katalytischen Aktivitäten, die durch *in vitro*-Selektionstechniken gefunden wurden, gehören neben denen, die an der Ligation und Spaltung von Phosphodiester-Bindungen sowie Phosphorylierung und Transesterifizierung beteiligt sind ^[19-22], die Alkylierung ^[23], der Aminoacyltransfer ^[24, 25], die Amidbindungs-Spaltung ^[26, 27] und die Bildung N-glykosidischer Bindungen ^[28]. Es konnte darüber hinaus erstmals gezeigt werden, dass RNA Redoxreaktionen katalysieren kann ^[29]. Ferner konnte ein erstes Aldolase-Ribozym isoliert werden ^[30]. Funktionale RNA-Moleküle wie Aptamere oder Ribozyme sind potentielle Kandidaten für spätere diagnostische und therapeutische Wirkstoffe. Die Diversitäten von Nukleinsäurepopulationen können durch chemische Modifizierungen noch erhöht werden ^[31]. Beispielsweise können Phosphorothioat- ^[32] oder 2'-Modifikationen ^[33] zur Erhöhung der RNA-Stabilität gegen Nuklease-Aktivitäten führen. Ein anderer Ansatz besteht in der Herstellung von Spiegelmeren, in denen anstelle natürlicher D-Nukleotide spiegelbildliche L-Nukleotide als Monomere in Synthesen verwendet werden. L-Oligonukleotide werden von

natürlichen Nukleasen mit D-Spezifität nicht erkannt und zeigen wesentlich erhöhte Serum-Stabilitäten ^[34, 35]. Zu den künstlich gefundenen Nukleinsäure-Enzymen zählen auch einige DNA-Enzyme (DNAzyme), deren Funktionen abgesehen von einem Beispiel einer Porphyrin-Metallierung ausschließlich Phosphodiester spaltend oder ligierend sind ^[36-40]. Im Gegensatz zu Ribozymen ist bisher kein natürliches DNA-Enzym gefunden worden.

Die ersten Ribozyme, die als Katalysatoren für die Bildung von C-C-Bindungen beschrieben wurden, sind Diels-Alderase-Ribozyme ^[1, 41]. Das in dieser Arbeit untersuchte hat die besondere Eigenschaft, keine Lewis-Säuren wie Kupferionen und keine Basenmodifikationen zu benötigen ^[1]. Bisher sind gemeinsam mit der Aldolase ^[30] drei Ribozyme bekannt, die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Verknüpfungen beschleunigen. Die Knüpfung von C-C-Bindungen ist von zentraler Bedeutung in der organischen, biologischen und präbiotischen Chemie. Letztere behandelt die Fragen, wie sich in einer frühen Phase der Evolution die ersten Biomoleküle entwickelt haben könnten. Durch die RNA-Welt-Hypothese wird ein solches Szenario beschrieben.

2.2.: RNA-Welt-Hypothese

In allen Organismen werden Proteine durch Nukleinsäuren codiert, welche zur Replikation wiederum Proteinenzyme benötigen. Evolutionsmodelle, in denen die mögliche Entwicklung der ersten Biomoleküle beschrieben wird, konnten das Problem, welche der beiden Stoffklassen wahrscheinlich zuerst auftrat, lange nicht klären. Eine gleichzeitige, unabhängige Evolution von Proteinen und Nukleinsäuren erscheint sehr unwahrscheinlich. Seit der Entdeckung von Ribozymen bietet sich eine Lösung des Problems an. Ihre besondere Eigenschaft, das Tragen genetischer Information mit enzymatischer Aktivität im selben Molekül vereinigen zu können, führte zu der Vorstellung einer frühen proteinfreien, RNA-dominierten Biosphäre. So könnte sich eine selbstreplizierende RNA gebildet haben. Ein solches Molekül besäße mit den Eigenschaften, sich vervielfältigen zu können und zur Evolution fähig zu sein, bereits grundlegende Merkmale des Lebens. Für ein solches Szenario wurde der Begriff „RNA-Welt“ geprägt ^[42]. Proteine traten somit erst später in der Evolution auf, brachten eine Erweiterung des katalytischen Potentials und damit für diese einen bedeutenden Selektionsvorteil. Ribozyme wurden danach weitgehend verdrängt. DNA als stabilerer Informationsträger ersetzte RNA. Ribonukleinsäuren wurden Vermittler genetischer Information in Form von „messenger RNA“ (mRNA) und als Adaptermolekül „transfer RNA“ (tRNA). Sie wurden z.B. essentieller Bestandteil von Ribonukleoproteinen wie in „ribosomaler RNA“

(rRNA). Andere Moleküle wie die Coenzyme NADH, FADH₂ und Coenzym A als Träger von Adenosylresten könnten Relikte einer solchen frühen evolutionären Ära sein ^[43].

Die Beantwortung der Fragen, wie das hier untersuchte Ribozym die C-C-verknüpfende Diels-Alder-Reaktion katalysiert und welche strukturellen Determinanten dabei primäre Rollen spielen, sind nicht zuletzt im Rahmen probiotischer Szenarien der RNA-Welt-Hypothese von besonderem Interesse.

2.3.: Diels-Alder-Reaktionen und ihre Katalyse

Die Diels-Alder-Reaktion ist eine Cycloaddition zwischen einem (in der Regel elektronenreichen) Dien und einem (elektronenarmen) Olefin, dem Dienophil. Im Reaktionsverlauf werden zwei C-C-Bindungen konzertiert gebildet. Dabei entstehen ein neuer Sechsring und bis zu vier neue Stereozentren. Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1928 ^[44] hat die Diels-Alder-Reaktion große Bedeutung für Synthesen in der organischen Chemie erlangt, u. a. in der Naturstoffsynthese und der Herstellung physiologisch wirksamer Verbindungen. Sie stellt die wichtigste Reaktion zur Sechsringsynthese und eine der wichtigsten stereoselektiven C-C-Verknüpfungen dar. Ein Beispiel ist in Abb. 1 dargestellt.

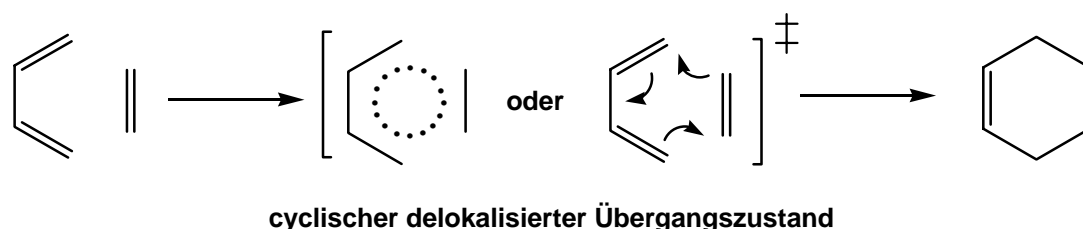


Abbildung 1: Zwei Darstellungen des Übergangszustandes einer Diels-Alder-Reaktion zwischen 1,3-Butadien und Ethen zu Cyclohexen. Adaptiert aus ^[45].

Seit langem sind Lewis-Säuren als Katalysatoren für Diels-Alder-Reaktionen bekannt. Hierzu zählen z. B. Aluminium- und Titanhalogenide, die typischerweise an Carbonylsauerstoffen von Dienophilen koordinieren, meist in Lösungsmitteln geringerer Polarität. In wässrigen Lösungen kann dieser Reaktionstyp durch hydratisierte Metallionen wie Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ oder Ni²⁺, die Lewis-Säuren darstellen, ebenfalls beschleunigt werden. Ihre Wirkung besteht in der Senkung der Elektronendichte am Dienophil und somit des Energieniveaus seines LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Dadurch wird die Energiedifferenz zum HOMO

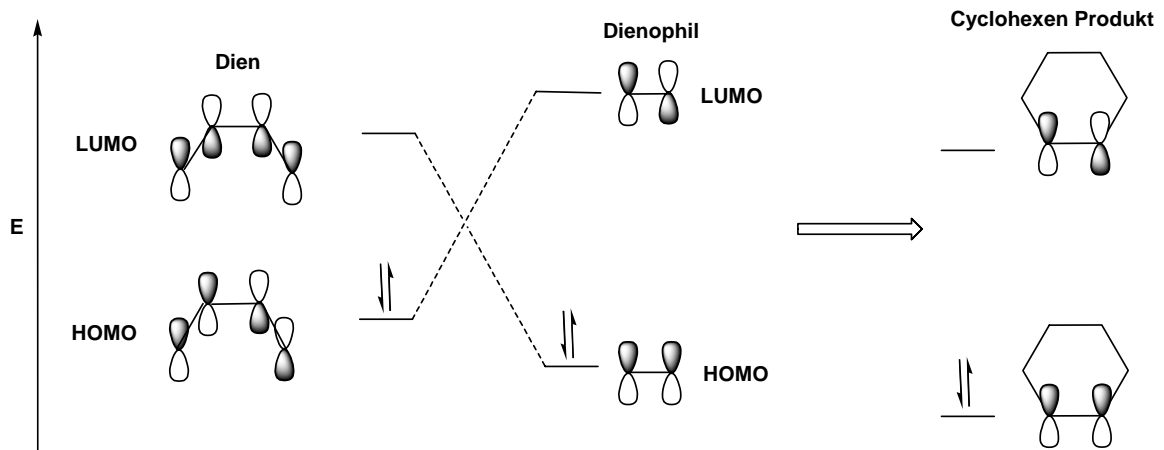


Abbildung 2: Schema für die konzertierte Überlappung der π -Orbitale von Dien und Dienophil. Adaptiert aus [46].

(Highest Occupied Molecular Orbital) des Diens und damit die Aktivierungsenergie der Diels-Alder-Reaktion verringert. In Abb. 2 ist ein Schema der beteiligten Orbitale gezeigt. Die Reaktion eines elektronendichtereichen Dienophils mit einem elektronendichtearmen Dien ist ebenfalls möglich und wird als inverse Diels-Alder-Reaktion bezeichnet.

Außer den genannten Metallionen sind weitere biologische Katalysatoren für Diels-Alder-Reaktionen in verschiedenen Stoffklassen gefunden worden. Zu ihnen zählen eine Reihe katalytischer Antikörper [47-49] und zwei Gruppen von Ribozymen [1, 41], darüber hinaus auch Cyclodextrin [50] und Rebek's Tennisball-Konstrukte [51].

2.3.1.: Natürliche Diels-Alderase-Enzyme

Die Diels-Alder-Reaktion spielt in der belebten Natur eine untergeordnete Rolle. Bei der Knüpfung von C-C-Bindungen sind z. B. Aldol-Reaktionen von größerer Bedeutung.

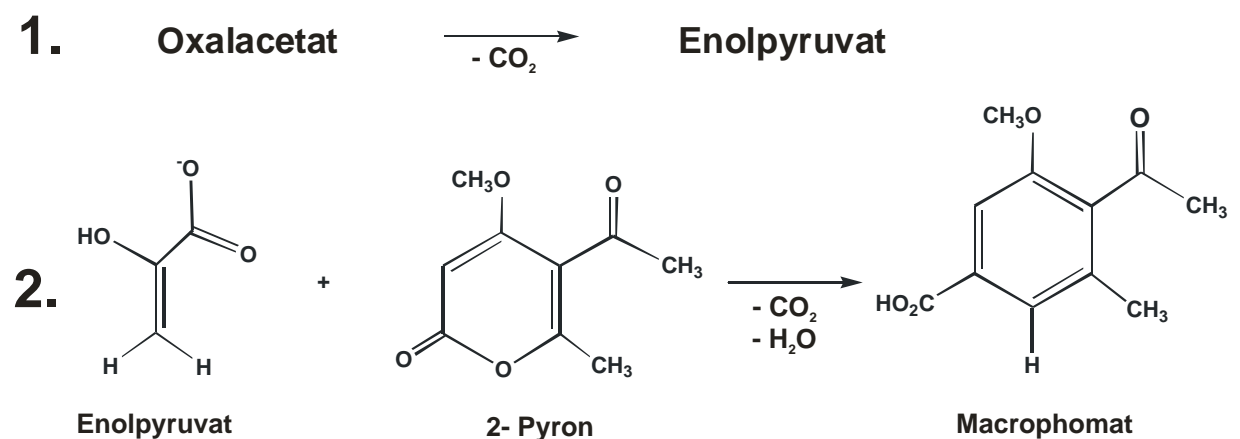


Abbildung 3.: Reaktionen, die durch die Macrophomatsynthase katalysiert werden:
 1.: Decarboxylierung von Oxalacetat, 2.: Diels-Alder-Reaktion zu Macrophomat

Bisher sind lediglich drei natürliche Diels-Alderasen gefunden worden, die beim Metabolismus von Sekundärstoffwechselprodukten eine Rolle spielen. Es handelt sich um die Solanapyron-Synthetase, Lovastatin-Nonaketid-Synthase und die Macrophomat-Synthase. Vom letzteren Enzym konnte die Kristallstruktur gelöst werden ^[52, 53]. Es katalysiert die Addition der Substrate Pyruvat in seiner Enolform mit 2-Pyron zu Macrophomat (Abb. 3, S. 9). Wie in anderen Diels-Alderase-Katalysatoren besteht sein aktives Zentrum aus einer hydrophoben Bindungstasche, an deren Oberfläche unpolare Aminosäurereste von z. B. Tryptophan, Phenylalanin oder Prolin vorherrschen.

2.3.2.: Artificielle Diels-Alderase-Enzyme: katalytische Antikörper und Ribozyme

Einer der ersten durch Hilvert *et al.* gefundenen katalytischen Antikörper 1E9 katalysiert die Diels-Alder-Reaktion von Tetrachlorthiophendioxid und N-Ethylmaleimid ^[47]. Er wurde durch die Verwendung eines Übergangszustands-Analogons als Hapten entwickelt. Eine Besonderheit der durch 1E9 katalysierten Reaktion besteht in der nichtkatalysierten Eliminierung von SO₂ mit nachfolgender Luftoxidation des Produktes. Durch diese Sekundärreaktionen wird die mögliche Hemmung eines übergangszustandsähnlichen Produktes unterdrückt; ein Grund für die Beobachtung der höchsten, bisher gemessenen Reaktionsbeschleunigung unter allen nicht-natürlichen Diels-Alderasen.

Die katalytische Aktivität beruht darauf, dass der Übergangszustand bzw. das Primärprodukt über eine essentielle Wasserstoffbrücke zwischen einem Carbonylsauerstoff des Maleimides und einem spezifischen Asparaginrest des Antikörpers besser als die Edukte stabilisiert wird, eine Beobachtung, die für die bisher bekannten Diels-Alderasen eher als Ausnahme anzusehen ist ^[54].

Ein Beispiel eines Anthracen-bindenden Proteinenzyms ist der katalytische Antikörper 10F11, dessen Kristallstruktur ebenfalls aufgeklärt werden konnte. 10F11 katalysiert eine retro-Diels-Alder-Reaktion, in der aus einem Cycloadditionsedukt Derivate eines Nitroxyl- und Anthracenmoleküles als Produkte entstehen ^[55].

Beispiele für artificielle Diels-Alderasen aus anderen Stoffklassen sind Cyclodextrin ^[50, 56] und Rebek's Tennisball-Konstrukte ^[51]. Letztere sind Dimere formkomplementärer organischer Moleküle, die geschlossene Kapselkompartimente ausbilden. Einen Überblick der genannten Reaktionen gibt Abb. 4, S. 11. Gemeinsam sind allen genannten katalytischen Makromolekülen nichtkovalente Bindungen der Substratmoleküle, die in ihren Bindungstaschen oder Kavitäten in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Mit den Bindungen der Substrate sind Vorteile in Form von Absenkungen der Entropiedifferenz verbunden, die für die Substrate

in freier Lösung zur Reaktion überwunden werden müssten. Diesen Entropiesenkungen, die gelegentlich als „Entropiefallen“ (entropic traps) bezeichnet werden, stehen in wässrigen Lösungen häufig solvophobe (hydrophobe) Effekte entgegen, die erstere kompensieren können. Grundsätzlich verläuft der Reaktionstyp unter Abnahme der Standardentropie bei starker Standardenthalpiezunahme^[54].

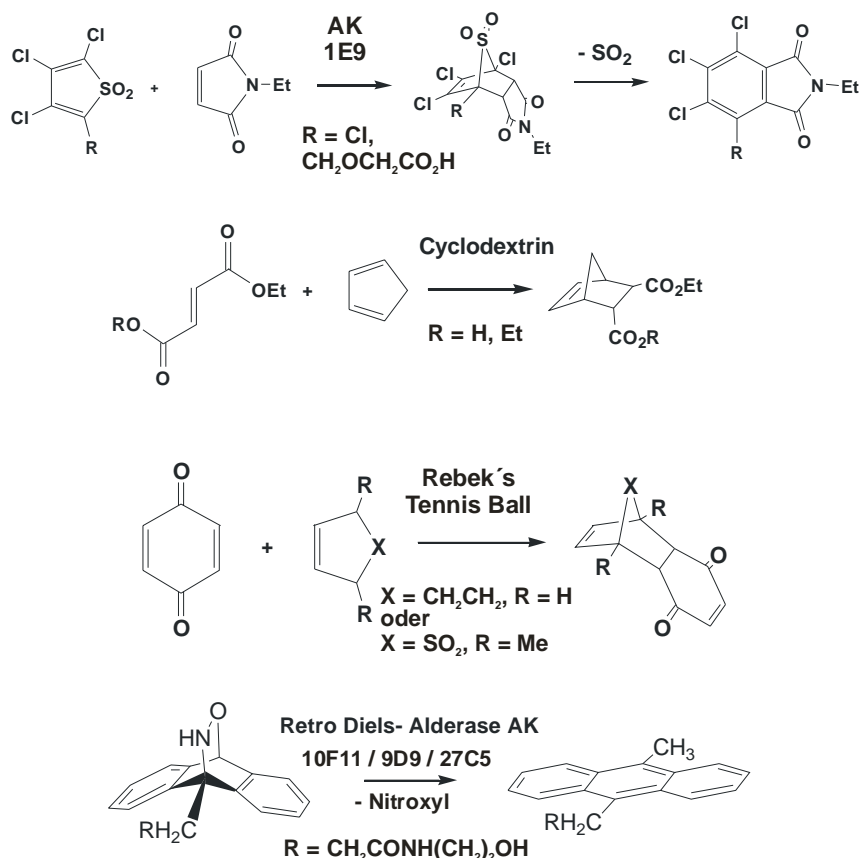


Abbildung 4: Beispiele von Reaktionen, die durch artifizielle Diels-Alderase-Katalysatoren beschleunigt werden können.

2.3.3.: Das Diels-Alderase-Ribozym und seine Struktur

Das in unserem Labor durch *in vitro*-Selektion isolierte Diels-Alderase-Ribozym katalysiert die Reaktion zwischen Anthracenderivaten als Dienen und Maleimidderivaten als Dienophilen mit bis zu 20000facher Beschleunigung (Abb. 5, S. 12). In den selektierten Sequenzen konnte ein kleines, für die Katalyse verantwortliches Minimalmotiv identifiziert werden (vgl. Abb. 6, S.12)^[1]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Diels-Alderase-Ribozyme als echte Enzyme zu multiplen Umsatz (turnover) fähig sind. Darüber hinaus verläuft die Katalyse mit hoher Enantioselektivität^[57].

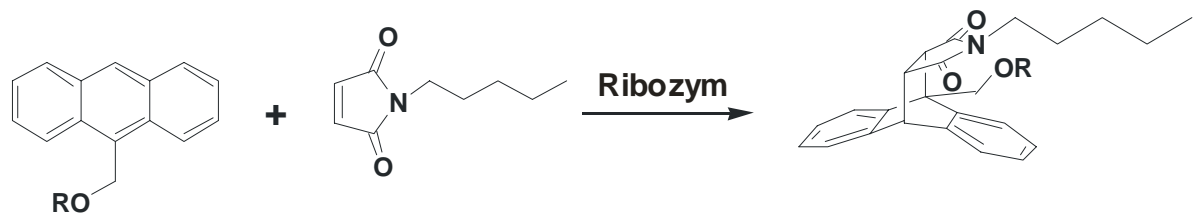


Abbildung 5: Ribozymkatalysierte Diels-Alder-Reaktion zwischen substituiertem Anthracen und *N*-Pentylmaleimid. Die Tolerierbarkeit verschiedener Substituenten „R“ zeigt die Abb. 64, S. 99.

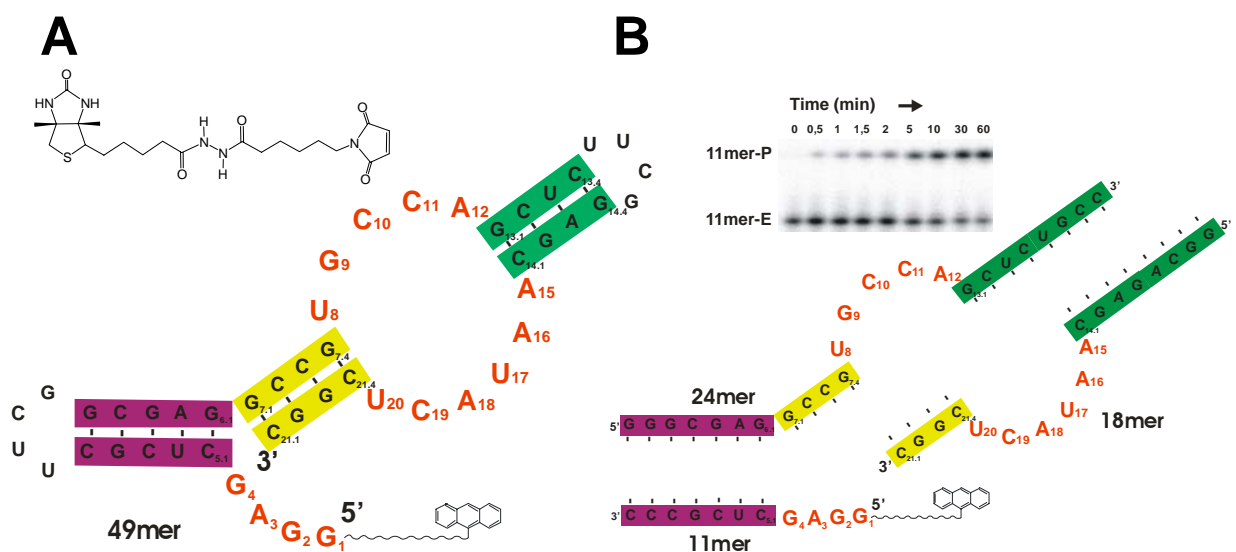


Abbildung 6: Monopartite und tripartite Versionen des Diels-Alderase-Ribozyms für „single turnover“-Reaktionen („*cis*-Rkt.“). A: 49nt-Ribozym-Minimalmotiv und Substrat Biotinmaleimid. B: 24nt + 18nt + 11nt-Anthracen-Konjugat, Gelshift-Assay mit P=Produkt und E=Edukt. Farbige unterlegt: Duplexbereiche. Magenta: Helix I. Gelb: Helix II. Grün: Helix III. UUCG-Schleife an der Helix I: Loop L1. UUCG-Schleife an der Helix III: Loop L2.

2.3.3.1.: Sekundärstrukturelemente

Das 49mer Minimalmotiv enthält drei helikale Bereiche; die Helices I und III sind in Länge und Sequenz variabel, hingegen besitzt Helix II eine konstante Länge von vier Basenpaaren. Die Sequenzen der asymmetrischen internen Ausbuchtung („bulge“) einschließlich des 5'-GGAG-Terminus sind bereits in frühen Klonsequenzanalysen nach der Selektion als konserviert erkannt worden. Die Grundelemente der Sekundärstruktur konnten eindeutig durch Wiederherstellungsexperimente nachgewiesen werden, die Bestandteile der vorliegenden Arbeit waren. Der Übergang zum Tertiärstrukturmodellbau wurde ermöglicht durch den Nachweis der Pseudoknoten-Interaktionen A3-U20 und G4-C19, der in dieser Arbeit erbracht

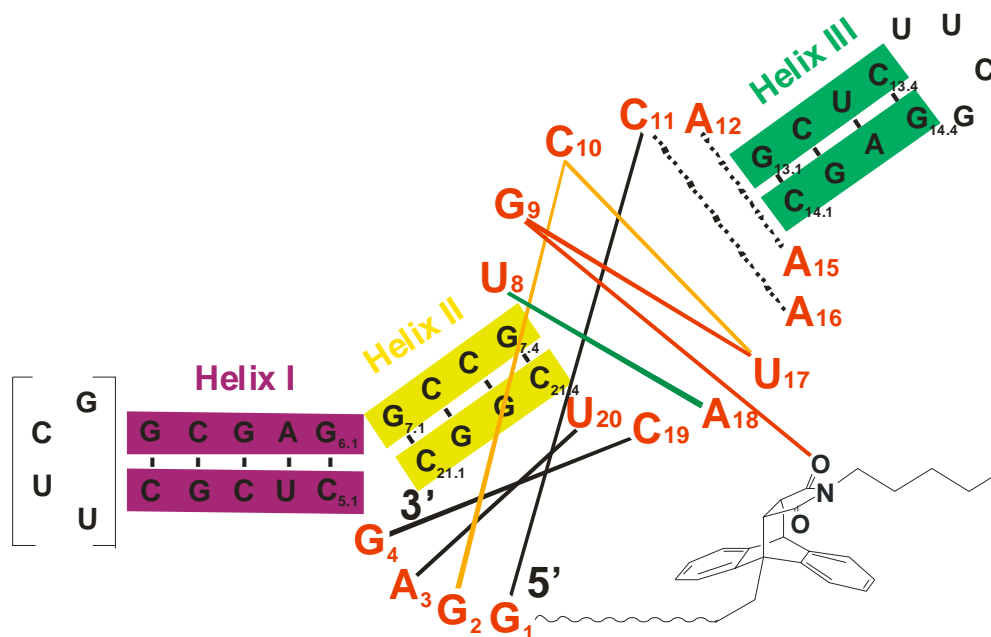


Abbildung 7: Schema der tertiären Interaktionen über Wasserstoffbrücken in der Kristallstruktur. Die zweisträngige Variante im Kristall enthält keine Helix I-verbrückende Schleife L1 (in Klammern). Orange Linien: Basentriple gebildet aus Standardbasenpaar G2C10 mit U17. Orange und rote Linien: Zentrales Wasserstoffbrücken-Netzwerk. Grüne Linie: Nichtstandard-Hoogsteen-Basenpaar U8A18. Schwarze Linien: Standardbasenpaarungen. Schwarz gestrichelt: Wahrscheinlich nicht über H-Brücken in einer Ebene angeordnete Nukleotide A15 mit A12 und A16 mit G1C11 in einer Basenplattform.

wurde. Diese experimentelle Erkenntnis wurde später durch die dann aufgeklärte Kristallstruktur bestätigt. Indirekte Hinweise auf die Existenz einer zweiten Minihelix, die aus den bereits frühzeitig postulierten Paarungen von G1C11 und G2C10 besteht, ergaben sich durch chemische und enzymatische Probing-Studien^[58]. Ein Schema der tertiären Wasserstoffbrückeninteraktionen gibt Abb. 7 wieder.

Durch formales Trennen der die Helix I abschließenden Schleife (loop) L1 und der Helix III abschließenden Schleife L2 des einsträngigen 49nt-Minimalmotives des Ribozyms konnten eine zwei- und dreisträngige Variante des Ribozyms hergestellt werden, die nur moderaten Aktivitätsverlust zeigten. Helices I und III wurden hierfür zur Erhöhung der thermodynamischen Stabilität um zwei bzw. vier Basenpaare verlängert. Es entstand neben dem 38nt + 11nt-PEG-A System ein 24nt + 18nt + 11nt- PEG-A System^[1, 58], welches im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurde (Abb. 6B, S. 12).

In der in dieser Arbeit beschriebenen Serie von NAIM-Experimenten wurde den Notwendigkeiten der Technik gemäß ausschließlich die einsträngige Variante des Ribozym-Substrat-Konjugates mit Linkern definierter Länge eingesetzt (Anthracen-Hexaethylenglykol-49nt-RNA, A-HEG-RNA, vgl. Abb. 6A, S. 12).

2.3.3.2.: Tertiärstrukturelemente

Die aus der Röntgenstrukturanalyse abgeleitete Tertiärstruktur ähnelt in der Form dem griechischen Buchstaben Lambda ^[59]. Die im Winkel von etwa 100 Grad zueinander stehenden Helices I und III werden hier als externe Gerüsthelices bezeichnet. Helix II wird hier als zentrale Gerüsthelix bezeichnet, die sich in engem Kontext mit der Bindungstasche befindet und auf der Helix III koaxial stapelt (stackt). Innerhalb der formal einzelsträngigen Bereiche sind sämtliche Nukleotide in intramolekularen tertiären Interaktionen beteiligt (vgl. Abb. 7, S. 13, und Abb. 8, S. 15). Eine Besonderheit stellt die Base G9 dar, deren 2-Aminogruppe mit einem Maleimid-Carbonylsauerstoff des Diels-Alder-Produktes interagiert. Eine entscheidende Rolle spielen die Nukleotide GGAG des 5'-Terminus, die in Watson-Crick-Paarungen beteiligt sind. Unter ihrer Beteiligung wird durch die Formation von zwei 2bp Minihelices eine verschränkte zweifache Pseudoknotenstruktur ausgebildet (s. Abb. 11, S. 19). Diese Interaktionen werden hier bildhaft als Klammern bezeichnet, die die Faltung schließen. Darüber hinaus ist die tertiäre Interaktion des U17 in der Formierung eines Basentriples mit dem Pseudoknoten-Basenpaar C10-G2 bedeutungsvoll. Durch die Triple-Brücke des U17 werden die beiden Hälften des Bulges der Sekundärstruktur überkreuzt und eine weitere Klammer gebildet, deren Verschluss zusätzlich durch Stacking-Interaktionen mit den benachbarten Basen und durch das mutmaßlich verbrückende Magnesiumion Nr. 5 stabilisiert wird. Das Triple ist ein Teil eines zentralen Wasserstoffbrücken-Netzwerkes der Bindungstasche, das sich vom Standardbasenpaar G2-C10 des Triples über das U17 zum G9 und zum Maleimidrest des Diels-Alder-Produktes ausdehnt. Dem Triple benachbart ist eine Basenplattform, die aus dem Basenpaar G1-C11 und der Nukleobase A16 gebildet wird. Ein weiteres wichtiges Strukturelement besteht aus dem Nichtstandard-Basenpaar U8-A18, das als *trans*-Watson-Crick-Hoogsteen- (oder reverses Hoogsteen-) Basenpaar vorliegt. Das Nukleotid A18 ist darüber hinaus Teil einer scharfen Schleife („sharp turn“), die aus dem Phosphodiester-Rückgrat des Bereiches A18--C21.4 gebildet wird. Diese Schleife ist mit zwei Mg²⁺-Ionen koordiniert, die ihrerseits in der großen Furche der Helix II lokalisiert sind. Der Bereich enthält darüber hinaus die zwei pseudoknotenbildenden Nukleotide C19 und U20 als Partner für G4 und A3. Das Tertiärstrukturelement, das aus Helix II, den zwei Magnesiumionen und dem Turn besteht, wird hier als „zentrales Gerüstelement“ bezeichnet. Innerhalb der Lambdastruktur bildet dieses Element gleichermaßen die hintere Ecke einer sesselartigen Form, auf der sich die spaltenförmige („wedge-shaped“) Bindungstasche aufbaut. Deren zwei Seiten bestehen aus den äußeren Gerüsthelices I und III, flankiert von den beiden Pseudoknoten-Minihelices inklusive des Basentriples.

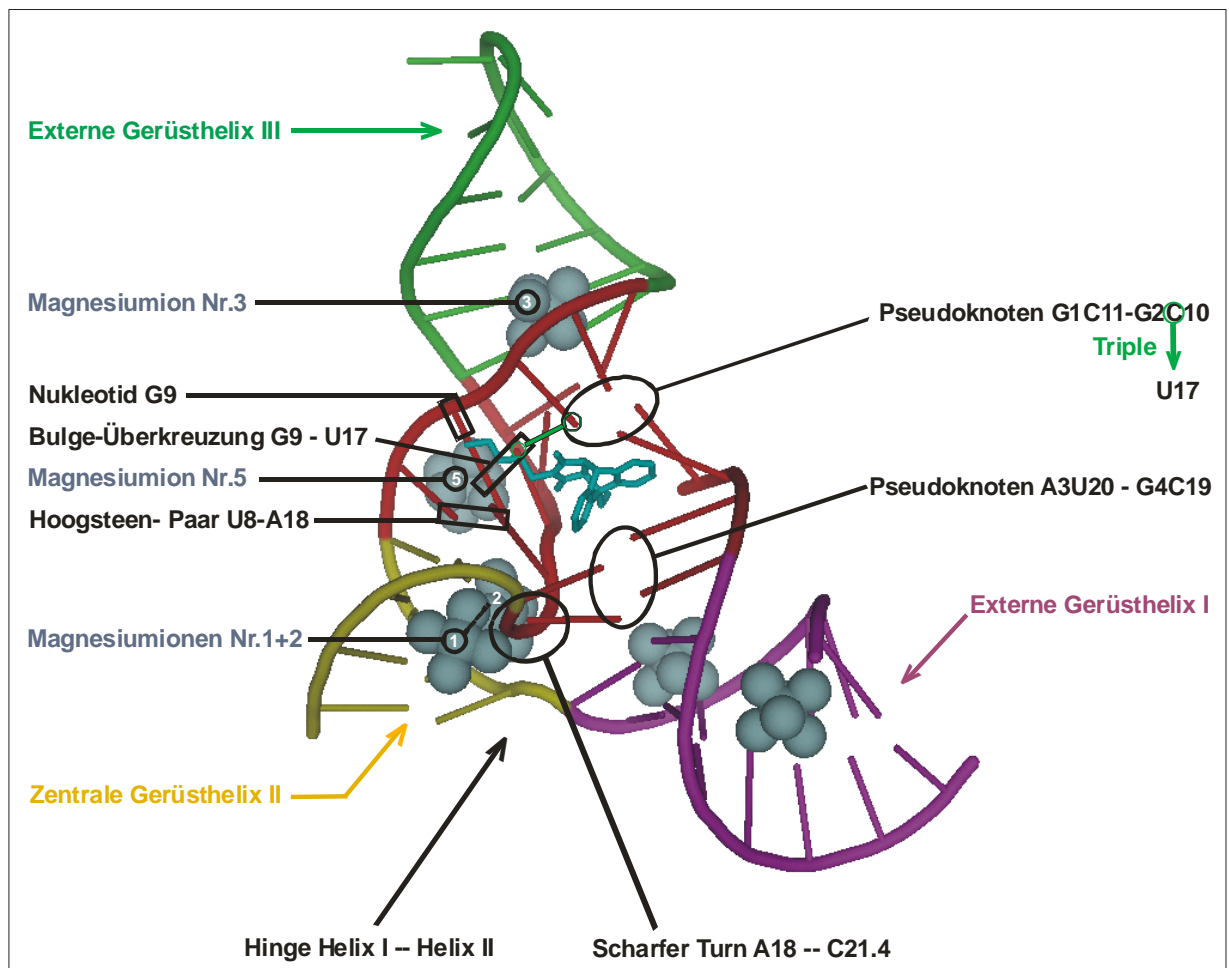


Abbildung 8: Durch Röntgenstrukturanalyse entwickeltes Tertiärstrukturmodell des Diels-Alderase-Ribozyms in der zweisträngigen (dipartiten) 38nt + 11nt-Variante. Die Beschriftung bezieht sich auf die im Text gewählte Gliederung in strukturelle Elemente des Moleküls. Hydratisierte Magnesiumionen (graue Sphären) mit erkannter Bedeutung sind durch Nummerierung hervorgehoben.

Wahrscheinlich wird die Faltung zusätzlich durch Stapel-Interaktionen (Stacking) stabilisiert. Ein Beispiel bildet der ausgedehnte Stacking-Bereich der Nucleotide G7.4-U8-G9-U17-A16-A15, der für die Ausbildung der Bulge-Überkreuzung G9-U17 mutmaßlich wichtig ist. Eine weitere offenbar wichtige Interaktion besteht zwischen den Basen A18 und C21.4, die aufeinander stapeln und im Zusammenhang mit dem scharfen Turn stehen. Auch das Nucleotid G7.4 als Partner des C21.4 in der Helix II stackt auf seinem Nachbarn U8. Da Stapel-Interaktionen unspezifisch bezüglich der Nucleobasen sind, entzieht sich diese Art der Wechselwirkung einem experimentellen Nachweis mit den hier verwendeten Methoden.

Für Ribozyme gibt es bisher nur wenige Kenntnisse über die Mechanismen, die sich von Phosphodiester spaltenden oder verknüpfenden Reaktionen unterscheiden. Die Erforschung des Katalysemechanismus und der dafür entscheidenden strukturellen Determinanten des Diels-Alderase-Ribozyms ist daher von besonderem Interesse.

2.4.: Strukturelle Determinanten für Nukleinsäureinteraktionen

2.4.1.: Nukleotidinteraktionen

Intramolekulare Interaktionen können innerhalb von RNA in vielfältiger Art auftreten. Neben Ion-Ion oder Dipol-Ionen-Wechselwirkungen, vor allem zwischen Phosphatsauerstoffen des Phosphodiester-Rückgrates und zweiwertigen Erdalkalimetallionen wie Mg^{2+} samt Hydrathülle existieren Dipol-Dipol-Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen. Es können darüber hinaus schwächere Stapelungs-Interaktionen und van der Waals-Kräfte auftreten, die als temporäre Dipol-Interaktionen im Vergleich zu elektrostatischen Interaktionen weniger spezifisch sind. Westhof *et al.* haben eine Klassifizierung von Wasserstoffbrücken-Interaktionen in Verbindung mit präziser Nomenklatur vorgeschlagen ^[60, 61]. Demnach werden drei geometrische Bereiche der Basen einschließlich des Ribosezuckers definiert: Es sind die sogenannte „Watson-Crick-Edge“ und die „Hoogsteen-Edge“ für Purine bzw. analog für Pyrimidine die „C-H-Edge“ sowie in beiden Fällen die „Sugar-Edge“ (vgl. Abb. 9). Letztere umfassen die 2'-OH-Gruppen und die Linie zwischen N-glykosidischer Bindung bis zur Watson-Crick-Seite. Weiterhin wird die Möglichkeit von doppelzweigigen („bifurcated“) Wechselwirkungen berücksichtigt. Hierbei treten doppelte Wasserstoffbrücken auf, in denen einzelne H-Brückenbindungspartner an der Ausbildung zweier Brücken beteiligt sind.

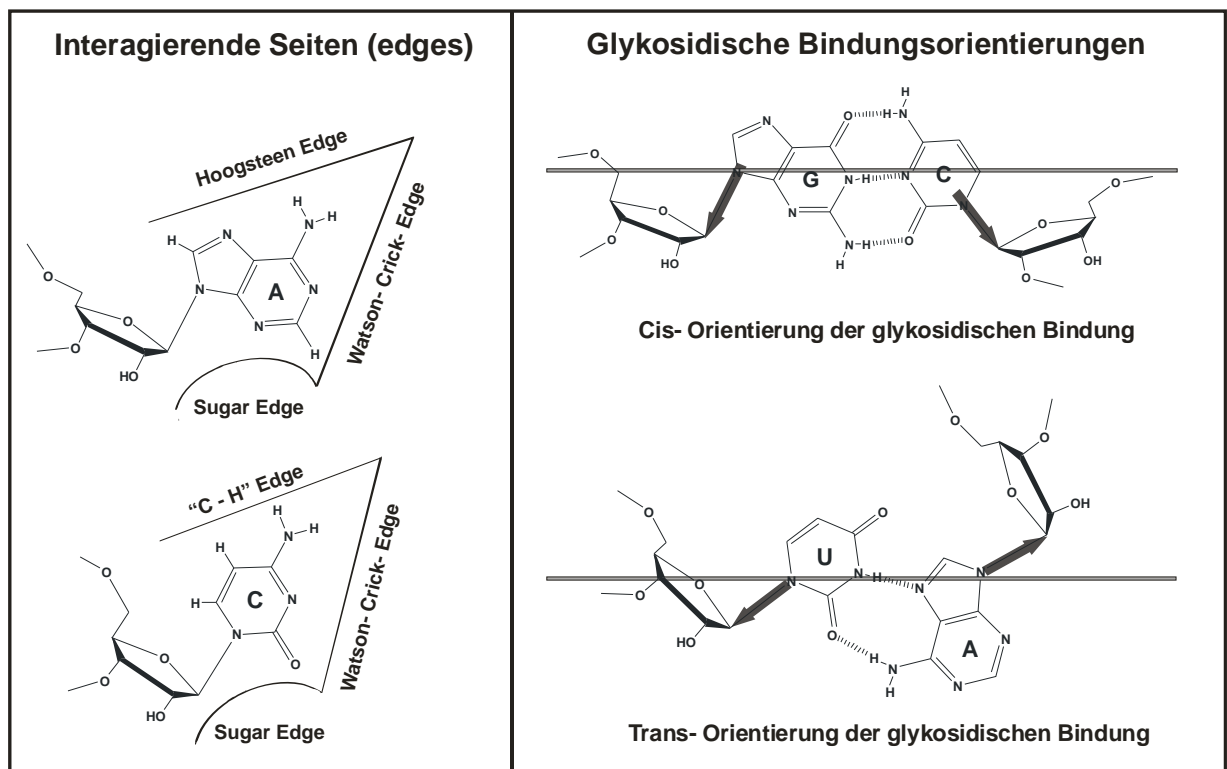


Abbildung 9: Nomenklatur von interagierenden Nukleotid-Seiten und Orientierungen der glykosidischen Bindungen. Abbildungen adaptiert aus ^[60].

Es sind zwei Orientierungen der glykosidischen Bindungen bezogen zur Basenpaarebene möglich, nämlich die „*cis*“- und „*trans*“-Orientierung (s. Abb. 9, S. 16). Analog zur stereochemischen Bezeichnung stehen die Bindungen diesseits bzw. entgegengesetzt bezüglich einer Achse in der Basenpaarebene. Basen können darüber hinaus in „*syn*“- oder der stabileren „*anti*“- Stellung zum Zucker-Ring positioniert sein. Von der Art der Basenpaarung und der Orientierung der glykosidischen Bindungen hängt die lokale Orientierung des Duplex-Stranges ab. In einem normalen DNA-Duplex sind beide komplementären Basen über ihre Watson-Crick-Seiten gepaart, die Orientierung ihrer glykosidischen Bindungen ist „*cis*“, die Strang-Orientierung ist antiparallel, wenn die stabilere „*anti*“-Orientierung der Basen besteht. Eine reverse Hoogsteen-Anordnung z.B. ist nach der neuen und präzisen Nomenklatur als „*trans*-Watson-Crick-Hoogsteen“-Paarung zu bezeichnen (vgl. Abb. 9, S. 16, rechts unten) ^[60].

2.4.2.: Sekundärstrukturelemente in Nukleinsäuren

Über die Organisationsebene der Primärstruktur von RNA hinaus, die durch die Nukleotidsequenz der codierenden DNA und den nachfolgenden posttranskriptionalen Modifikationen beschrieben werden kann, gibt es auf der Sekundärstrukturebene einige typische Motive.

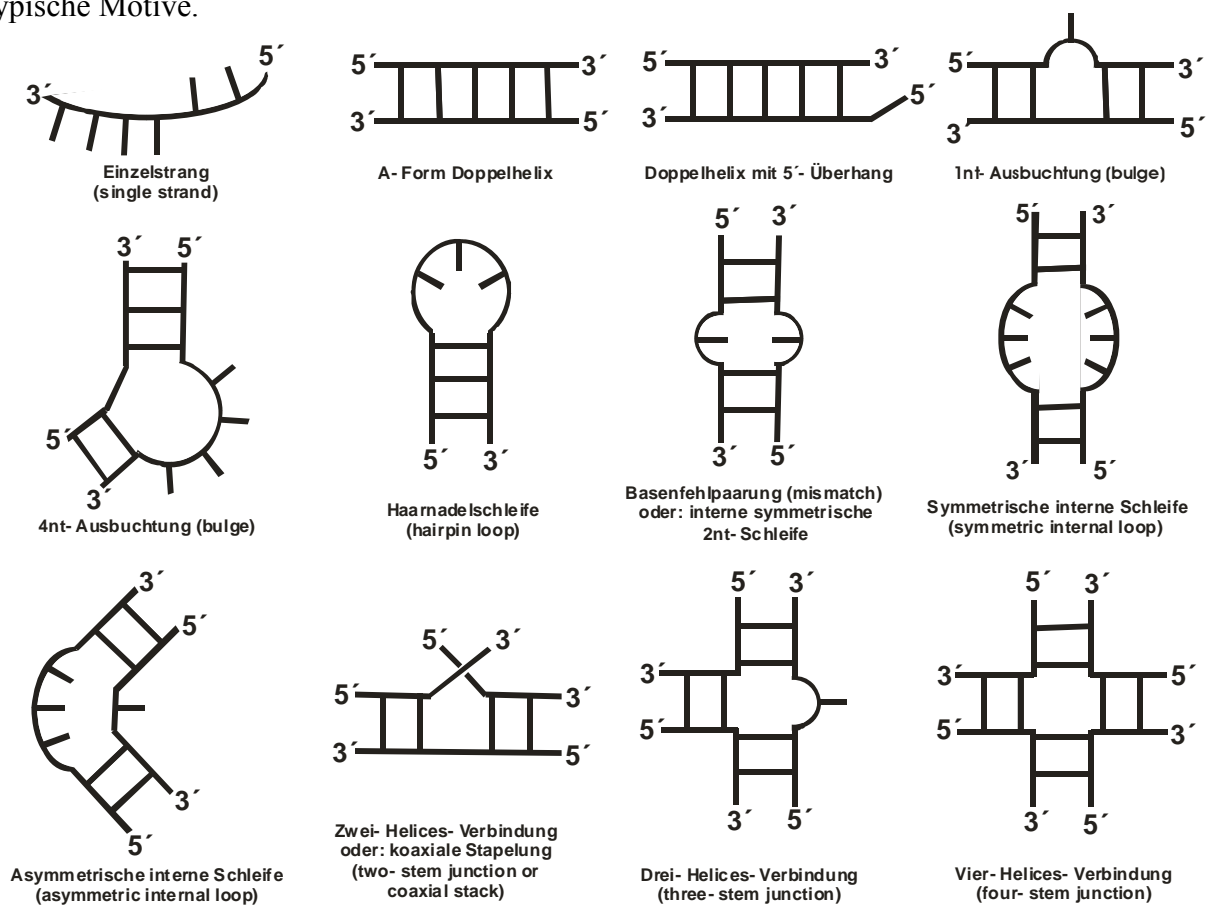


Abbildung 10: Häufig vorkommende Sekundärstrukturelemente in Ribonukleinsäuren. Abbildung adaptiert und modifiziert aus ^[62].

Es sind (1.) Einzel- und Doppelstrangbereiche; (2.) das Haarnadel-Motiv („hairpin“), bestehend aus seiner Schlaufe und seinem Stamm, (3.) die Ausstülpung („bulge“), die aus einem ungepaarten Abschnitt in einer Duplexumgebung besteht, (4.) eine doppelte gegenüberliegende Ausstülpung, die innere Schlaufe („internal loop“) genannt wird, sowie (5.) ein Übergang von einer Helix zu einer zweiten, die Verbindungsstelle („junction“) genannt wird. Einen Überblick von Sekundärstrukturelementen gibt die Abb. 10, S. 17.

2.4.3.: Tertiärstrukturelemente in Nukleinsäuren

Tertiärstrukturelemente entstehen häufig durch die Wechselwirkung von verschiedenen Sekundärstrukturelementen. In Nukleinsäuren können daran Helix- bzw. Duplexabschnitte und ungepaarte Motive in allen Kombinationen beteiligt sein. Zu den wichtigsten Duplex-Duplex-Interaktionen als erster Kategorie gehört die koaxiale Stapelung („coaxial stacking“). Es handelt sich hierbei um elektronische π - π -Wechselwirkungen zwischen gestapelten Nukleobasen, die erhebliche energetische Beiträge zur Ausbildung von stabilen Tertiärstrukturen beitragen können, wenn sie sich über größere Bereiche ausdehnen ^[63]. Zu weiteren Interaktionen der Duplex-Duplex-Kategorie zählen die sogenannte Adenosin-Plattform sowie über 2'-OH-Gruppen vermittelte Wechselwirkungen ^[64, 65]. Die zweite Kategorie umfasst Interaktionen zwischen helikalen und ungepaarten Motiven. Ein wichtiges Beispiel bilden Basentripel und Tripelhelices. Gut untersucht ist der Poly(U)-Poly(A)-Duplex, der zusammen mit einem weiteren Poly(U)-Strang, der an die große Furche des Duplexes hybridisiert, eine Tripelhelix bilden kann. Uracilbasen des dritten Stranges bilden hierbei mit ihrer Watson-Crick-Seite Wasserstoffbrücken mit der Hoogsteen-Seite der Adenine des Poly(A)-Stranges ^[66, 67]. Solche Dreifach-Helices sind jedoch in natürlicher RNA bisher nicht gefunden worden. Häufig treten dagegen einzelne Basentripel auf, welche durch Interaktionen sowohl in der großen als auch der kleinen Furche der Duplexe auftreten können ^[68-70]. Die Tripelbildung bleibt im Allgemeinen nicht beschränkt auf das im oben beschriebenen Poly(U-A-U)-Modelltriplex beschriebene Muster der Wechselwirkungen. Weitere Beispiele in dieser Kategorie bilden Tetraloop-Interaktionen mit helikalen Elementen ^[71, 72]. Die Mehrzahl dieser Tetraloops fällt in zwei Kategorien, das UNCG-Motiv und das GNRA-Motiv. Letzteres kann entweder an einen Tetralooprezeptor binden ^[73-75] oder in der kleinen Furche des RNA-Duplexes interagieren ^[76, 77]. Interaktionen mit der kleinen Furche scheinen eine Besonderheit von RNA- gegenüber DNA-Duplexen zu sein. In der A-Form der RNA-Duplexe weist die kleine Furche eine größere Breite (10-11 Å) im Vergleich zur DNA-B-Form auf (5,8 Å). In der

breiteren kleinen Furche der A-Form sind tertiäre Interaktionen begünstigt, an denen auch 2'-Hydroxyle der Riboseeinheiten teilnehmen können. Auch die großen Furchen bieten die Möglichkeit, solche Wechselwirkungen einzugehen; die kleinen Furchen scheinen jedoch in dieser Hinsicht von größerer Bedeutung zu sein ^[78]. Die erweiterten Möglichkeiten intramolekularer tertiärer Wechselwirkungen könnten damit eine Ursache für die beobachtete größere funktionale Diversität von RNA gegenüber DNA darstellen. Die dritte Kategorie umfasst Interaktionen zwischen ungepaarten Bereichen. Die wichtigste dieser Art bilden Pseudoknotenstrukturen. Ein Pseudoknoten ist ein Motiv, in dem Nukleotide einer Haarnadelschleife oder einer Ausbuchtung mit einer komplementären einzelsträngigen Sequenz eines anderen Sequenzabschnittes Basenpaare bilden ^[79] (vgl. Abb. 11).

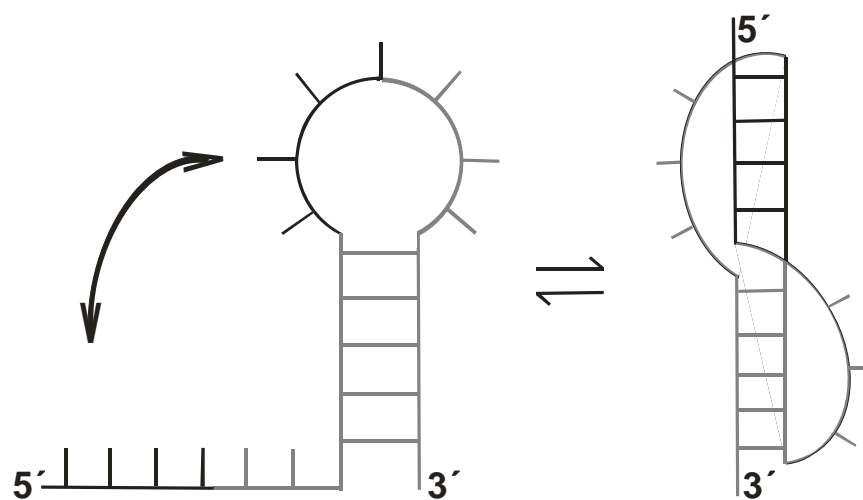


Abbildung 11: Schema einer Pseudoknoteninteraktion. Abb. adaptiert aus ^[78].

Ein Beispiel für eine doppelte Pseudoknotenstruktur stellt das HDV-Ribozym dar ^[80]. In einer doppelten Pseudoknotenstruktur sind zwei Abschnitte einer zusammenhängenden einzelsträngigen Sequenz mit zwei verschiedenen anderen Hairpin- oder Bulge-Elementen hybridisiert. Solche Strukturelemente wurden auch für das hier untersuchte Diels-Alderase-Ribozym gefunden ^[59].

Stapelungs-Interaktionen („stacking“) beschränken sich nicht nur auf koaxiale Stapelungen als Duplex-Duplex-Interaktionen (Kategorie 1),

sie treten ebenso zwischen ungepaarten Bereichen auf (Kategorie 3). Solche zum Teil ausgedehnte Interaktionen zwischen ungepaarten Abschnitten sind im Kristallstrukturmodell des Diels-Alderase-Ribozyms zu erkennen.

2.5.: Dynamik der Konformation und Faltungsbildung

Der Prozess der Proteinfaltung wird beschrieben als eine Folge von Übergängen von einer ungeordneten Struktur oder einem Zufallsknäuel („random coil“) über die Bildung von Sekundärstrukturelementen wie α -Helices und β -Faltblattstrukturen zur Tertiärstruktur. Ähnliche Vorgänge werden für Nukleinsäuren angenommen mit dem Unterschied, dass im ungefalteten Zustand ein großer Teil der Sekundärstruktur bereits vorgeformt ist. Die letztere Annahme basiert auf den Modellsystemen tRNA und *Tetrahymena*-Gruppe I-Intron, an denen thermische Denaturierungsversuche und Hydroxylradikal-Footprinting durchgeführt wurden [81-84]. Der generell als reversibel betrachtete Prozess der Faltung vollzieht sich im Wesentlichen durch die aufeinander folgenden Bildungen der tertiären Wechselwirkungen bis zur nativen RNA-Struktur. In großen Molekülen existieren häufig Bereiche, die analog zu den Domänen der Proteine verstanden werden können. Der Begriff der Domäne ist für RNA nicht streng definiert. Er beschreibt Bereiche der Sekundärstruktur, die sich unabhängig voneinander falten. Es wird angenommen, dass die Anwesenheit von divalenten Kationen wie Mg^{2+} -Ionen nicht zur Formierung der Sekundärstruktur, jedoch notwendig zur Ausbildung der nativen Tertiärstruktur ist [78].

Entsprechend der Proteinfaltung wird der Verlauf des Faltungsprozesses eines Nukleinsäuremoleküls als hierarchische Sequenz angenommen [85-87]. Das Hauptargument für eine festgelegte oder hierarchische Sequenz für die Proteinfaltung bildet das „Levinthal-Paradoxon“: Ein großes Makromolekül könnte sich nicht in kurzer Zeit zur nativen Sequenz falten, wenn alle Kombinationen von Intermediaten unabhängig voneinander während des Faltungsprozesses auftreten können [88]. Der Weg ist dabei nicht notwendigerweise auf eine einzige Möglichkeit beschränkt. Es können auch parallele Faltungssequenzen alternativ auftreten, deren Auswahl von Lösungsmittelbedingungen, Modifikationen wie Punktmutationen sowie jeweils dafür spezifischen Aktivierungsenergien für Konformationsänderungen abhängen. Eine energetisch abhängige Anordnung von alternativen Faltungswegen wird als „Faltungsenergielandschaft“ [89] oder auch als „Potentialhyperfläche“ [90] bezeichnet. Es können dabei Abwege auftreten, die „kinetische Fallen“ (folding traps) genannt werden, aus denen das unvollständig gefaltete Molekül nur durch Überwindung einer spezifischen Aktivierungsenergie für die notwendige partielle Rückfaltung zum zusammenhängenden kompletten Faltungsweg zurückkehren kann [91]. Durch die Technik des Hydroxyl-Radikal-Footprinting können Faltungsprozesse zeitaufgelöst verfolgt werden [84, 92]. Hierfür werden synchrotronerzeugte Röntgenpulse mit einer Expositionszeit von ca. 10 ms verwendet. Die Auflösung für die Verfolgung des Faltungsprozesses liegt in der Größenordnung von

ca. 1 ms^[78]. Als Beispiel sei hier die Faltungszeit zur kompletten Tertiärstruktur einer tRNA genannt, sie wird mit ca. 100 ms angegeben^[82].

2.6.: Biochemische und chemosynthetische Techniken zur Mutagenese

2.6.1.: Konventionelle Mutagenese und RNA-DNA-Chimären

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene Techniken zur Herstellung von Mutanten angewendet. So wurden die Mutanten entweder enzymatisch durch *in vitro*-Transkription oder chemosynthetisch durch automatisierte chemische Festphasensynthese hergestellt. Die Ebenen der mutierbaren Einheiten reichen von der konventionellen Mutagenese, die Basensubstitutionen umfassen, über die Darstellung von chimärischen Nucleinsäuren, die ortsspezifische 2'-Modifikationen tragen, bis zur atomaren Mutagenese, in der einzelne Atome oder funktionelle Gruppen verändert werden. Zum einen wurden hierfür im Rahmen dieser Arbeit ortsspezifisch modifizierte Nucleinsäuren vollsynthetisch durch automatisierte chemische Festphasensynthese hergestellt. Diese Oligonucleotide können entweder als optional modifizierte DNA-Template zur enzymatischen Synthese von RNA dienen (vgl. 4.1.1., S. 26), oder direkt als modifizierte RNA-Produkte aus chemischen Synthesen hervorgehen, sofern die benötigten Phosphoramiditmonomere verfügbar sind. Zum anderen wurde eine Technik verwendet, die die Möglichkeit bietet, Oligonucleotidmoleküle über ihre gesamte Länge hinsichtlich der Auswirkung atomarer Mutagenese simultan zu untersuchen. Diese hier durchgeführte Technik wird Nucleotide Analog Interference Mapping (NAIM) genannt.

2.6.2.: Nucleotide Analog Interference Mapping (NAIM) und atomare Mutagenese

Nucleotide Analog Interference Mapping (NAIM) stellt eine Technik dar, die es möglich macht, die Auswirkung atomarer Mutagenese in einer Nucleinsäure simultan im gesamten Molekül zu untersuchen (vgl. Abb. 12, S. 22). Hierfür werden Sp- α -Thio-Nucleosid-triphosphat-Analoga (vgl. Abb. 27, S. 58) mit modifizierten Nucleosiden statistisch in Transkriptionsreaktionen eingebaut.

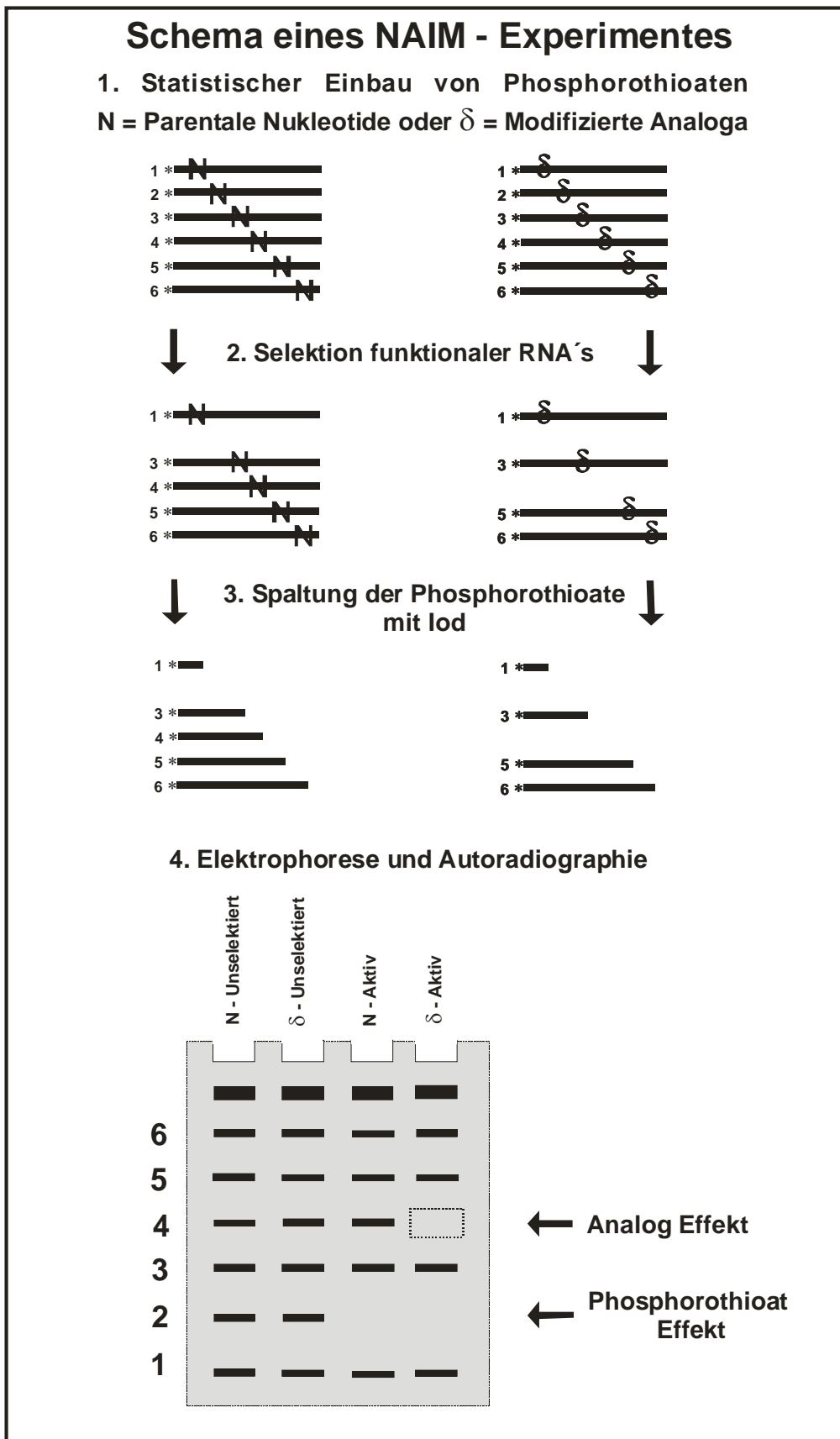


Abbildung 12: Allgemeines Schema des Nucleotide Analog Interference Mapping (NAIM). Das Zeichen „*“ symbolisiert die radioaktive Markierung mit Phosphor-32. Abbildung adaptiert aus [93].

Die Thiomodifikation, deren Konfiguration nach dem Einbau der Sp-Monomere zu Rp invertiert, liefert eine selektive Spaltstelle, die zur Lokalisierung der Modifikation dient^[94, 95]. Nach einer Trennung von Teilen der Gesamtpopulation von transkribierten Molekülen entsprechend ihrer Funktion wird nach Spaltung der modifizierten Positionen ein Satz Fragmente erhalten, die auf einem Sequenziergel analysiert werden können. Die Auswirkung von spezifischen Modifikationen an bestimmten Positionen kann anhand des Spaltungsmusters analysiert werden. Es werden Thioateffekte und Analogeffekte unterschieden. Ein Analogeffekt, d.h. ein Effekt einer zweiten Modifikation, liegt vor, wenn ein Thioateffekt an derselben Position auszuschließen ist. Ein Nachteil der Technik besteht in der begrenzten Verfügbarkeit von enzymatisch einbaubaren Analoga^[93, 96-99].

2.6.3.: Nucleotide Analog Interference Reversion und Suppression

Wird in einer Serie von NAIM-Experimenten nach der Beobachtung einer Interferenz durch den Einbau eines Analogons an einer bestimmten Position eine zweite Modifikation an derselben Position eingeführt, kann es zu einer partiellen Wiederherstellung („rescue“) der ursprünglichen Aktivität kommen. Ein solcher Effekt wird Interferenz-Reversion oder -Suppression genannt. Wird der gleiche Effekt durch eine zweite Modifikation an derselben Position erzielt, handelt es sich um eine Interferenz-Reversion, wird er durch eine Modifikation an einer anderen Position des RNA-Oligomeres erzielt, so wird er als Interferenz-Suppression bezeichnet. Die Begriffe Reversion und Suppression stehen in Verbindung zu den genetischen Termini „Revertante“ und „Suppressormutante“, in denen der Effekt einer ersten Mutation durch eine zweite gedämpft oder aufgehoben wird. Im Fall der Revertante liegt der Ort der zweiten Modifikation auf derselben mutierbaren Einheit wie die erste, im Fall der Suppressormutante liegt sie auf einem anderen genetischen Ort. Für die Interferenzsuppression wurde der Begriff „NAIS“ geprägt (Nucleotide Analog Interference Suppression)^[96]. Eine solche Beobachtung lässt auf eine Interaktion der beteiligten Orte schließen, z.B. zweier Basen. In einem NAIS-Experiment bedeutet das konkret, dass der statistische Einbau eines zweiten Analogons keinen Unterschied der Interferenzen an allen Positionen gegenüber dem Wildtyp zeigt, mit Ausnahme an derjenigen, die mit dem Ort der ersten, bereits interaktionshemmenden Modifikation im Wildtyp wechselwirkte. Eine Interferenz wäre dort unterdrückt bzw. supprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente zur Interferenzreversion und -suppression nach rationalen Erwägungen im Hinblick auf das Kristallstrukturmodell des

Diels-Alderase-Ribozyms durchgeführt. Diese Reversionsexperimente sind im Ergebnisteil in Abb. 33 und 34, S. 62 dargestellt. Der Ansatz für ein Suppressionsexperiment ist im Diskussionsteil in Abb. 55, S. 86 abgebildet.

3.: AUFGABENSTELLUNG

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, das Diels-Alderase-Ribozym mit Hilfe biochemischer Methoden auf der Ebene von Struktur-Funktions-Beziehungen zu charakterisieren. Hierfür sollten Elemente seiner angenommenen Sekundärstruktur experimentell geprüft werden. Deren Konsensus-Bereiche bestehen aus den Positionen des asymmetrischen internen Bulges sowie dem 5'-GGAG-Terminus. Der Grad ihrer Konservierung war durch die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zu ermitteln. Ziel war es, auf dieser Basis ein Aktivitätsprofil für Einzelpunktmutanten zu ermitteln. Erweiterte Mutationsstudien sollten die Rolle von 2'-Hydroxylgruppen durch die Verwendung einzelner 2'-Desoxy-nukleotidsubstitutionen in denselben Bereichen prüfen. Zweifach und mehrfach basen-substituierte Ribozymmutanten sollten zur Suche nach unbekanntem tertiären Interaktionen dienen. Ein weiterer Teil der Arbeit bestand darin, Mutationsstudien auf die Ebene von Atomen und funktionellen Gruppen auszudehnen. Hierfür war es notwendig, Nucleotide Analog Interference Mapping (NAIM) als neue Technik in unserem Labor zu etablieren und am Ribozym anzuwenden. Die Identifizierung von funktional wichtigen Gruppen über Analogeffekte und von essentiellen Interaktionen des Phosphodiesterückgrates, z. B. mit Magnesiumionen, über Thioateffekte war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Nach der Aufklärung der Kristallstruktur im Mai 2004 sollten zum Nachweis tertiärer Interaktionen ortsspezifisch modifizierte Nukleotide nach rationalem Design in Ribozymkonstrukte eingebaut und ihre Auswirkung auf die enzymatische Aktivität untersucht werden. Zur Untersuchung komplexerer tertiärer Interaktionen sollten erweiterte NAIM-Studien unter Verwendung ausgewählter Mutanten durchgeführt werden. Zum Aufbau von Tertiärstrukturmodellen der Ribozyme war es erforderlich, alle Daten der Charakterisierungsexperimente zu verknüpfen. Zu einem späteren Zeitpunkt sollten neben der Prüfung der Daten aus der zwischenzeitlich gelösten Kristallstruktur Informationen über die Substrat- und Produktbindung sowie dem Katalysemechanismus gewonnen werden. Ein weiterer Aspekt war der zeitliche Verlauf des Überganges von der Sekundär- zur Tertiärstrukturbildung. Im selben Zusammenhang steht die Frage nach einem Faltungsmechanismus und seiner Sequenz. Neben der Suche nach Strukturinformation sollte ferner durch die Verwendung von RNA-DNA-2'-OMe-RNA-Chimären in diversen Kombinationen und Substitutionsgraden bei möglichst geringem Aktivitätsverlust die Stabilität der Moleküle gegen Hydrolyse gesteigert werden. Hinsichtlich einer möglichen Quartärstruktur war die Frage von Interesse, ob es als Mono-, Di- oder Oligomer vorliegt.

4. MATERIALIEN UND METHODEN

4.1.: Synthese und Markierung von Nukleinsäuren

4.1.1.: T7 *in vitro*-Transkriptionsreaktionen mit / ohne Initiator nukleotid

Die hier durchgeführten Transkriptionsreaktionen basieren prinzipiell auf der Literaturvorschrift nach Milligan *et. al.* aus dem Jahr 1987 ^[100]. Als DNA-Matrizen wurden kommerziell erhältliche Oligonukleotide verwendet, die durch automatisierte chemische Festphasensynthese hergestellt wurden. Die zur enzymatischen Synthese verwendete DNA-abhängige T7-RNA-Polymerase benötigt zur Erkennung eine doppelsträngige, etwa 20 Basenpaare umfassende Promotorsequenz. Zwei in diesem Promotorbereich und in einem Überhang von mindestens sechs Basenpaaren komplementäre Oligonukleotid-Einzelstränge wurden äquimolar in PCR-Puffer 5 Minuten bei 90 °C inkubiert und zur Hybridisierung langsam abgekühlt. Die Ansätze wurden in den meisten Fällen durch den Einsatz von α -³²P-markiertem Nukleosidtriphosphat (hier: α -³²P-CTP) statistisch radioaktiv markiert.

Zur Reduktion von nicht templatcodierten, unspezifischen Extensionen der Transkriptionsprodukte wurden modifizierte antisense-Templates eingesetzt, die an den beiden letzten Positionen des 5'-Endes 2'-Methoxy-Substitutionen enthielten. Als besonders wichtig ist die Position 2 des Templates beschrieben worden, die die vorletzte Position des Transkriptionsproduktes codiert ^[101]. Die Reduktion der Längenheterogenität ist besonders nützlich für Oligonukleotide, die in NAIM-Experimenten zum Einsatz kamen. Weiterhin wurden im Rahmen der NAIM-Experimente Initiator nukleotide zur Einführung von 5'-Modifikationen in Transkriptionsansätzen verwendet.

Tabelle 1:

Ansatzschema für Transkriptionsreaktionen (t=3 bis 4h oder über Nacht; T=37 °C)

Gesamtvolumen 50 μL	Konzentration final	
Transkriptionspuffer 10x	5 μL	1x (1 mM Spermidin)
Spermidin 200 mM (optional)	1,5 μL bis 3 μL	4 bis 7 mM
DTT 100 mM	5 μL	10 mM
BSA 20 mg/mL	0,6 μL	2,4 mg/mL
A/C/UTP 100 mM	2/2/2 μL	4/4/4 mM
GTP 100 mM	2 μL (1 μL)	4 mM (2 mM)
DNA-ds-Templat 20 μM	2,5 μL	1 μM
Initiator AHEG-RNA 50 mM	2 μL / 1 μL (optional)	2 / 1 mM
α-³²P-CTP 3,3 μM	0,5 μL	Konz. << CTP (gesamt)
T7-RNA-Polymerase 20 U/μL	4 μL	0,8 U/μL
Wasser ad	50 μL	

Primärstrukturen und Templatsequenzen

49mer-Primärstruktur

5'- **GG**A GCU **CGC** UUC **GGC** **GAG** **GCC** **GUG** **CCA** GCU CUU **CGG** **AGC** **AAU** **ACU** **CGG** C - 3'

49mer Templat (antisense)

5'- **GCC** **GAG** **TAT** **TGC** **TCC** GAA **GAG** **CTG** **GCA** **CGG** **CCT** **CGC** **CGA** **AGC** **GAG** **CTC** C -
 -TAT AGT GAG TCG TAT TAG A - 3'

49mer Templat (sense)

5'- TCT AAT ACG ACT CAC TAT **AGG** **AGC** TC - 3'

24mer- Primärstruktur

5'- **GGG** **CGA** **GGC** **CGU** **GCC** **AGC** **UCU** **GCC** - 3'

24mer- Templat (antisense)

5'- **GGC** **AGA** **GCT** **GGC** **ACG** **GCC** **TCG** **CCC** TAT AGT GAG TCG TAT TAG A - 3'

24mer- Templat (sense)

5'- TCT AAT ACG ACT CAC TAT **AGG** **GCG** AG - 3'

18mer- Primärstruktur

5'- **GGC** **AGA** **GCA** **AUA** **CUC** **GGC** - 3'

18mer- Templat (antisense)

5'- **GCC** **GAG** **TAT** **TGC** **TCT** **GCC** TAT AGT GAG TCG TAT TAG A - 3'

18mer- Templat (sense)

5'- TCT AAT ACG ACT CAC TAT **AGG** **CAG** AG - 3'

Die Farbcodierungen entsprechen denen in anderen Abbildungen. Rot: GGAG-Terminus und Bulge-Sequenzen. Violett: Helix I. Gelb: Helix II. Grün: Helix III. Grau: Promotersequenz.

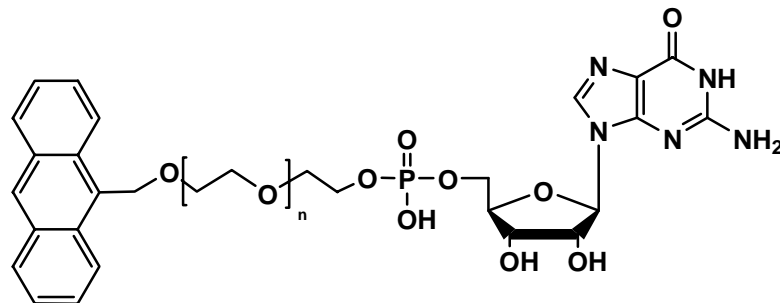


Abbildung 13: Initiator-nukleotid Anthracen-Polyethylenglykol-GMP

Die für *in vitro*-Transkriptionen eingesetzten RNA-Polymerasen besitzen eine gewisse Akzeptanz von 5'-Modifikationen in einzubauenden Nukleotidmonomeren an der Transkriptions-Startposition „+1“^[102]. Es wurde deshalb möglich, am 5'-Terminus eine Anthracenmodifikation in ein RNA-Transkript einzuführen^[103, 104]. Hierfür wurden Initiator-nukleotide chemisch synthetisiert. Sie tragen am 5'-Ende über eine Phospho-Esterbindung einen Polyethylenglykol-Linker. An diesem ist ein Anthracenderivat (Anthracenmethanol) über eine Etherbindung gebunden (vgl. Abb. 13, S. 27). Die Transkriptionen wurden ca. 3 bis 4 Stunden oder über Nacht bei 37 °C durchgeführt.

4.1.2.: Festphasensynthese und Aufarbeitung

Die Oligonukleotide wurden nach dem Phosphoramiditverfahren nach Beaucage & Caruthers hergestellt^[105-107]. Auf diese Weise hergestellte Templat-DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech oder der Firma IBA erworben. RNA und ihre Anthracenkonjugate sowie RNA-DNA-Chimären wurden mit Hilfe des Syntheseautomaten Expedite 8900 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems synthetisiert. Synthesen von RNA/DNA/2'-OMe-RNA-Chimären sowie von 8-Oxo-desoxyG modifizierter RNA wurden von der Firma IBA ausgeführt. Eigene Synthesen wurden im 1 µmol- oder gelegentlich im 0,2 µmol-Maßstab durchgeführt. Es wurde CPG-Säulenmaterial (CPG = controlled pore glass) mit einer Porengröße von 500 Å verwendet. Es wurde nach einem modifizierten Standard-Syntheseprotokoll des Geräteherstellers gearbeitet. Als Monomere wurden 5'-DMT-geschützte β-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite verwendet. Monomere für RNA-Synthesen enthielten zusätzlich 2'-TBDMS-Schutzgruppen. Zur Synthese wurden Amidite mit leicht abspaltbaren Nukleobasen-Schutzgruppen (*tert*-Butylphenoxyacetyl-, „tac“) eingesetzt, sofern sie verfügbar waren. Zur Anthracen-Modifizierung an 5'-Enden der Oligonukleotide kam Anthracenmethylenhexaethylenglykol-β-cyanoethylphosphoramidit zum Einsatz. Anstatt Tetrazol wurde als Aktivator 5-Benzylthiotetrazol eingesetzt. Kopplungszeiten wurden für Nichtstandardamidite von 2x30 s auf 2x120 s verlängert (vgl. Abb.14, S. 29, „Wait“-Zeiten im Kopplungsschritt des Syntheseprotokolles). Die Entschützung und Abspaltung des fertigen Produktes vom Trägermaterial erfolgte durch 33%-ige wäßrige Ammoniaklösung bei 55 °C für 1,5 Stunden. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das CPG-Trägermaterial noch dreimal mit je 1 mL einer Lösung aus Ethanol, Acetonitril und Wasser im Mischungsverhältnis 3:1:1 gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und nach Tiefgefrieren in flüssigem Stickstoff in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingeengt.

Function	Mode	Amount (Pulse)	Time (sec)	Description
\$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 Wash A	*/PULSE	15	0	„Flush systemwith 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	„Deblock“
0 /*Default	*/WAIT	0	20	„Default“
38 /*Diverted Wsh A	*/PULSE	60	0	„Flush systzem with Wsh A“
141 /*Trityl Mon. On/Off	*/NA	0	1	„Stop data collection“
144 /*Index Fract. Coll.	*/NA	2	0	„Event out OFF“
\$Coupling				
1 /*Wsh	*/PULSE	8	0	„Flush system with Wsh“
2 /*Act	*/PULSE	5	0	„Flush system with Act“
18 /*A + Act	*/PULSE	5	0	„Monomer+Act to column“
18 /*A + Act	*/PULSE	3	0	„Couple monomer“
0 /*Default	*/WAIT	0	30	„Default“
18 /*A + Act	*/PULSE	1	0	„A + Act“
0 /*Default	*/WAIT	0	30	„Default“
2 /*Act	*/PULSE	5	78	„Couple monomer“
1 /*Wsh	*/PULSE	2	24	„Couple monomer“
1 /*Wsh	*/PULSE	21	0	„Flush system with Wsh“
\$Capping				
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
\$Oxidizing				
15 /*Ox	*/PULSE	35	0	„Ox to column
0 /*Default	*/WAIT	0	20	„Default“
12 /*Wsh A	*/PULSE	35	0	„Flush system with Wsh A“
\$Capping				
13 /* Caps	*/PULSE	7	0	„Caps to column“
12 /*Wsh A	*/PULSE	45	0	„End of cycle wash“

Abbildung 14: Beispiel eines Syntheseprotokolles: Cycle A (Adenosin). In der Spalte „Amount (Pulse)“ entspricht ein Puls einem Volumen von 16µL.

Die Oligonukleotide wurden für 1,5 Stunden bei 65 °C in einer Lösung bestehend aus 1-Methyl-2-Pyrrolidinon, Triethylamin und Triethylamintrihydrofluorid 6:3:4 (v/v/v) inkubiert, um *tert.*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppen an 2'-OH-Gruppen zu entfernen. Es erfolgte darauf nach Zugabe von 25 µL Natriumacetatpuffer (3M, pH 5,5) Fällung in 1 mL *n*-Butanol und

Reinigung durch HPLC und PAGE. Alternativ zur Butanolfällung wurden die Lösungen mit 500 μL Isopropyltrimethylsilylether zur Entfernung von Fluoridionen versetzt und die Fällung in 1 mL Diethylether durchgeführt. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Pellets mit 200 μL Diethylether gewaschen und luftgetrocknet. Vor den Aufreinigungen durch *reverse phase*-HPLC an C_{18} -Festphasen erfolgten optional Entsalzungen durch NAP 5-Gelfiltrationen und/oder präparative Reinigung durch PAGE (gewählte Stoffmengen: 0,5-1 nmol pro Spur und Probe; Detektion durch UV-Fluoreszenzlösung s. 4.2.4., S. 34)

4.1.3.: Radioaktive Markierung mit Phosphor-32

4.1.3.1.: Markierung in Transkriptionsreaktionen

Werden Oligonukleotide durch Transkriptionsreaktionen hergestellt, können sie durch den statistischen Einbau radioaktiver Nucleosidtriphosphate markiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde α - ^{32}P -CTP verwendet. Die Markierung dient der Detektion in Gelen und zur Stoffmengenbestimmung. Angesichts der hohen Detektionsempfindlichkeit reichen relativ schwache Markierungen aus, die durch ein kleines Konzentrationsverhältnis von markiertem CTP zu unmarkiertem CTP in Transkriptionsansätzen erreicht wird.

4.1.3.2.: 5'-Markierung durch Kinasierung

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kinasierung am 5'-Terminus und dem Einbau eines radioaktiven Phosphatrestes. Hierfür wird mit Hilfe des Enzyms Polynukleotidkinase (PNK) das endständige Phosphat von γ - ^{32}P -ATP auf ein freies 5'-OH des Oligonukleotides übertragen^[108].

Tabelle 2:
Ansatzschema für 5'-Kinasierungen (t=1h; 37 °C)

Gesamtvolumen 20 μL		Konzentration final
Oligonukleotid	z.B. 10 pmol	0,5 μM
Kin.-Puffer A (forward Rkt.)	2 μL	1x
γ - ^{32}P -ATP (2 pmol/ μL)	5 μL oder weniger	0,5 μM oder geringer
T4-PNK (10 U/ μL)	1 μL	0,5 U/ μL
Wasser	ad 20 μL	

4.1.3.3.: 3'-Markierung durch Ligation

Mit Hilfe des Enzyms T4-RNA-Ligase kann eine 3'-Hydroxylgruppe einer RNA mit einer 5'-Phosphatgruppe einer anderen RNA oder eines Ribonukleotides in Gegenwart von ATP verknüpft werden ^[109]. Hier wurden die 3'-Termini von 10nt- oder 11nt-RNA-HEG-Anthracen oder in NAIM-Experimenten 49nt-RNA-HEG-Anthracen durch den Einsatz von Cytidin-3'-(5'-³²P)-bisphosphat (³²P-pCp) radioaktiv markiert ^[110]. Die Markierung diente zur Detektion und Trennung von Edukten und Diels-Alder-Produkten durch Gel-Mobilitäts-Verschiebung („gel mobility shift“).

Tabelle 3:

Ansatzschema für 3'-Markierungsansätze mit ³²P-pCp (t=2h; 16 °C)

Gesamtvolumen 10 µL	Finale Konzentration	
Oligonukleotid	5 bis 10 pmol	0,5 bis 1 µM
DMSO (optional)	1 µL	10 % (v/v)
Ligationspuffer 10x	1 µL	1x
ATP 10 mM	0,5 µL	0,5 mM
³²P-pCp 3,3 µM	3 µL	1 µM
T4-RNA-Ligase (10 U/µL)	1 µL	1 U/µL
Wasser	ad 10 µL	

4.1.3.4.: 3'-Markierung von DNA durch templatabhängige Extension

Eine Möglichkeit, DNA zu markieren, besteht in der Einführung einer 3'-Extension über eine DNA-Polymerase. Hierfür wird ein gegenüber dem 3'-Ende komplementäres Oligonukleotid mit einem kurzen Überhang zur Hybridisierung verwendet, dessen erstes überhängendes Nukleotid zum angebotenen extensionsbildenden ³²P-dNTP-Monomer komplementär sein muss. Das verwendete Enzym ist ein proteolytisch erzeugtes Fragment der DNA-Polymerase I, dem die 5'→3'-Exonukleaseaktivität fehlt und das Klenow-Fragment genannt wird ^[111].

Oligonukleotide und Puffer werden kurz erhitzt (65 °C) und zur Hybridisierung langsam abgekühlt. Als Reaktionszeit wurden 1,5 Stunden bei 28-30 °C gewählt. Die Ansätze wurden zur Beendigung der Reaktion kurz auf 70 °C erhitzt.

Tabelle 4:

Ansatzschema für 3'-Markierungen von DNA-Oligonukleotiden (t=1,5h; T=28-30 °C)

Gesamtvolumen 10 µL		Konzentration final
DNA-Oligonukleotid	z.B. 10 pmol	1 µM
DNA-Gegenstrang	z.B. 11 pmol	1,1 µM
Puffer (W'-Transkr. Puf.)	1 µL	1x
α- ³² P-dCTP (3,3 µM)	3 µL	1 µM
Klenow-Fragment 2 U/µL	1 µL = 2U	0,2 U/µL
Wasser	ad 10 µL	

4.2.: Reinigung und Nachweis von Nucleinsäuren

4.2.1.: Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

PAGE unter denaturierenden Bedingungen ist die im Rahmen dieser Arbeit vorwiegend verwendete Methode zur Trennung und Reinigung von Nucleinsäuren im analytischen und präparativen Maßstab. Der wesentliche Parameter ist das Verhältnis von Masse zu Ladung der Moleküle. Das Medium erhält denaturierende Eigenschaften durch konzentrierten Harnstoff im Gel (50 % m/v). Der Vernetzungsgrad kann durch Variation des Verhältnisses von quervernetzendem Methylenbisacrylamid zu Acrylamid bestimmt werden. Im verwendeten „Rotiphorese“-Fertigkonzentrat der Fa. Roth ist das Verhältnis auf 1:19 eingestellt. Zur Polymerisation wurden 10 % ige Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS, 0,08 % m/v final) und TEMED (0,08 % v/v final) zugefügt. In einigen Fällen wurden Elektrophoresen unter nichtdenaturierenden Bedingungen, d.h. in Gelen ohne Harnstoffgehalt durchgeführt^[112].

4.2.2.: Reversphasen Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Nucleinsäuresynthesen können im DMT-off oder -on Modus durchgeführt werden, im DMT-on Modus bleiben dabei die DMT-Schutzgruppen an 5'-Enden der Oligonukleotide erhalten. Diese Methode bietet den Vorteil einer effektiveren Reinigung über Reversphasen-HPLC. Die DMT-Gruppe als stark hydrophobe Einheit verursacht eine Retentionszeiterhöhung. DMT-Oligonukleotide können daher von allen anderen Spezies, z. B. Fehlsequenzen, die durch erfolgte Entschützungs-schritte kein DMT tragen, besser abgetrennt werden.

Tabelle 5: HPLC-Methoden:

Säulenmaterial: Maße: 250 x 4,60 mm, C18 Reversphase, 5µm Partikelgröße,

A) HPLC-Methode zur Reinigung von 49nt-RNA-Anthracen-Konjugaten

t (min)	% Puffer A	% Puffer B
0	99	1
20	70	30
30	45	55
35	15	85
37	0	100
42	0	100
45	99	1

B) HPLC-Methode zur Reinigung von 10nt-RNA (DNA)-Anthracen-Konjugaten

t (min)	% Puffer A	% Puffer B
0	99	1
5	65	35
20	62,5	37,5
23	0	100
26	0	100
28	99	1

C) HPLC-Methode zur Reinigung von 18nt und 24nt-RNA- (DNA-) Oligonukleotiden

t (min)	% Puffer A	% Puffer B
0	99	1
18	76	24
21	0	100
26	0	100
28	99	1

D) HPLC-Methode zur Reinigung von Initiator-nukleotiden

t (min)	% Puffer A	% Puffer B
0	99	1
3	60	40
63	60	40
66	0	100
71	0	100
74	99	1

Verwendete Methoden sind in Tab. 5 angegeben. Nach der HPLC-Reinigung wurde das DMT-Oligonukleotid in 2 % iger Trifluoressigsäure (TFA) für 2 min inkubiert und die endständige DMT-Schutzgruppe abgespalten.

Zur Neutralisation der TFA wurde die Lösung mit einer äquivalenten Menge Natriumhydrogencarbonat versetzt.

4.2.3.: Autoradiographie und Phosphorimageranalyse

Radioaktiv markierte Oligonukleotide auf Gelen können durch Autoradiographie lokalisiert werden. Hierfür werden Röntgenfilme im Kontakt exponiert. Die Filme dienen als Maske zum Auffinden der Banden. Alternativ können Gele mit Hilfe des Phosphorimager- Verfahrens analysiert werden. Das Verfahren bietet gegenüber der Autoradiographie den Vorteil höherer Empfindlichkeit und eines wesentlich größeren Linearitätsbereiches zwischen Strahlungsintensität und gemessener Dichte (s. Abb. 15).

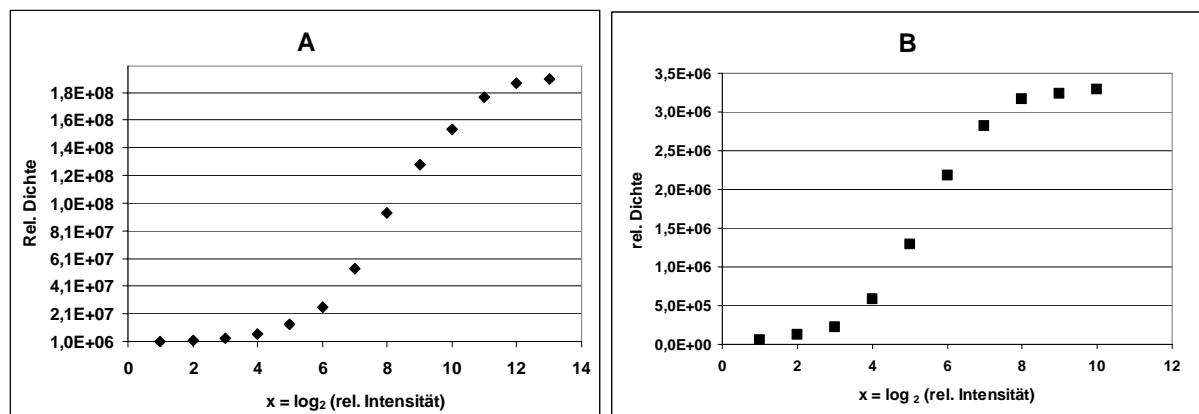


Abbildung 15: Dichte-Intensitäts-Abhängigkeiten, halblogarithmische Darstellung, Intensitäten ca. 250 bis ca. 1E+6 cpm. Verhältnisse der Intensitäten benachbarter Messpunkte=1:2. A: Phosphorimager-Scan, Expositionszeit 256min, B: Fotografischer Röntgenfilm. A: Sigmoidaler Verlauf: Schwelle im Rauschen und asymptotischer Verlauf im Sättigungsbereich. B: Sigmoidaler Verlauf: Schwelle bei geringen, Sättigung bei großen Intensitäten. Relative Dichten sind unkalibrierte Werte und wegen unterschiedlicher Messverfahren zwischen A und B nicht direkt vergleichbar. Die Dichten in B hängen sowohl von der Expositionszeit, als auch von Entwicklungsbedingungen ab (z.B. dem Redoxpotential des fotografischen Entwicklers). Angaben der vollständigen Entwicklungsbedingungen sind hier nicht möglich, und es wird daher auf die Angabe der Expositionszeit verzichtet.

4.2.4.: UV-Shadowing

Die Methode des UV-Shadowing wurde zur Visualisierung von unmarkierter RNA verwendet. Hierfür werden die Gele mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Die Banden sind durch Fluoreszenzlöschung auf einer fluoreszierenden Dünnschichtchromatographie-Platte

(TLC-Platte) zu erkennen. Die Detektion mit dieser Methode ist zwar relativ unempfindlich, sie ist jedoch im Rahmen präparativer denaturierender Oligonukleotid-Aufreinigungen in PAGelen besonders geeignet ^[111, 112].

4.2.5.: Elution aus Polyacrylamidgelen

Zur Elution wurden Gelstücke mit 0,3 M Natriumacetat-Lsg. pH 5,5 überschichtet und bei 80 °C eine Stunde oder alternativ bei 25 °C über Nacht im Thermoschüttler inkubiert. Die zuletzt genannten Bedingungen sind schonender und zur Minimierung der Nukleinsäuredegradation besser geeignet ^[111, 112]. Eine alternative Elektroelution ist in 4.2.7. beschrieben.

4.2.6.: Ethanol-fällung

Die Ethanol-fällung stellt eine einfache Methode zur Reinigung, insbesondere zur Abtrennung von Salzen, dar. Die Ansätze enthielten vor der Ethanolzugabe 0,3 M Natriumacetat pH 5,5. Es wurde das 2- bis 2,5-fache Volumen -80 °C kaltes, absolutes Ethanol zugefügt und nach gründlichem Mischen tiefgekühlt. Die Fällungen wurden über Nacht bei -20 °C durchgeführt. Die Proben wurden bei ca. 20000 g mindestens 30 min zentrifugiert. Überstände wurden abgenommen, Pellets mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, die Waschlösungen abgenommen und die Pellets ca. 3 bis 5 Minuten luftgetrocknet ^[111, 112].

4.2.7.: Elektroelution aus Polyacrylamidgelen in Agarose:

„Niedrigkosten - Hocheffizienz“- Eigenentwicklung

Im Rahmen der NAIM- Experimente traten Probleme bei der Anwendung des Standard-Elutionsprotokoll auf. Ineffektive Diffusion in Elutionspuffer führte zu hohen Materialverlusten von typischerweise mehr als 90 %. Bei der notwendigen mehrfachen Anwendung des Elutionsprotokolls waren die Gesamtverluste zu hoch, um eine erfolgreiche Durchführung des kompletten NAIM-Protokolls zu gewährleisten. Ein Ausgleich der Verluste durch Vergrößerung der Ansatzmaßstäbe schien wegen hoher Kosten der α -Thio-Nukleosidtriphosphat-Analoga ökonomisch nicht vertretbar. Es bestand daher die Notwendigkeit, die Verluste mindestens um den Faktor 100 zu senken.

Dies gelang durch den Einsatz einer elektrophoretischen Elutionsmethode. Die Methode vermeidet im Gegensatz zu kommerziell erhältlichen Hilfsmitteln den Einsatz von Membranen, eine Eigenschaft, die angesichts aufgetretener erheblicher Oberflächenadsorption von modifizierten Anthracen-49mer-Ribozymkonjugaten von Bedeutung ist. Hierfür wurden nach zunächst durchgeführter PAGE ausgeschnittene Banden in Agarosegel eingebettet und darauf

in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur im elektrischen Feld aus dem Polyacrylamidmaterial ins Agarosegel elektroeluiert (s. Tab. 6 und Abb. 16). Die Elutions-effizienz betrug typischerweise etwa 95 %. Es folgte eine spezielle Elution aus Agarosegel mit Hilfe der „Freeze & Squeeze“-Methode, die im Folgenden beschrieben wird.

Tabelle 6:

Bedingungen für Elektroelution in Agarosegel:

Agarosekonzentration	0,5 % in 0,1x TBE
Elektrophoresepuffer	0,1 x TBE
Elektrische Parameter	U=100 V, I=2 mA
Elektrophoresedauer	14 min

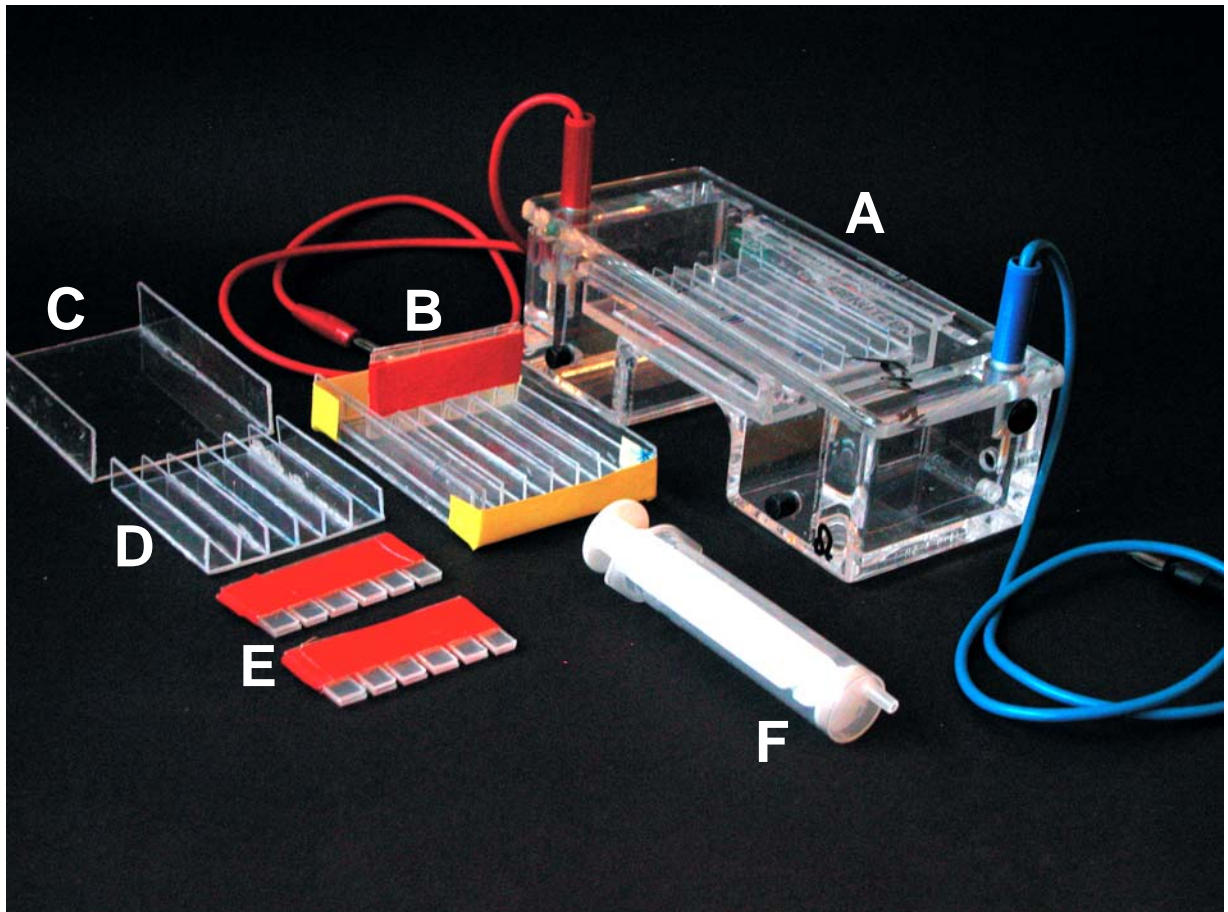


Abbildung 16: Elektroelutionsapparatur: A: Horizontale Elektrophoresekammer. B: Zum Gelgießen kompletter Einsatz für sechs Spuren bestehend aus den Teilen C, D und E. Ein gleicher Einsatz befindet sich in A ohne Kamm E und ohne Dichtungsklebeband (gelb). Die Teile C, D (Polystyrol aus defekter Disketten-Box) und E (Polypropylen aus dem Deckel einer Pipettenspitzenbox) sind selbstgebaut. F: Sterilspritze für das „Freeze & Squeeze“-Verfahren. Nach der Elektrophorese ausgeschnittene und gefrorene Agarosegelstücke wurden in den Spritzenzylinder eingeführt und nach Einsetzen des Kolbens mechanisch ausgepresst.

4.2.8.: Elution aus Agarose: das „Freeze & Squeeze“- Verfahren

Eine wirksame Methode zur Agaroseelution ist die sogenannte „Freeze & Squeeze“-Methode^[113-115]. Hierfür wird Agarose eingefroren und durch mechanisches Auspressen eluiert. Die Effizienz lag typischerweise bei ca. 95 %. Durch Kombination der oben beschriebenen Elektrophorese in die Agarose mit dieser Elutionsmethode konnten die Verluste um den Faktor 200 bis 500 gesenkt werden. Damit wurden die Voraussetzungen für die Durchführung der kompletten NAIM-Protokolle geschaffen.

4.3.: Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.3.1.: Cerenkov-Messung

Die Radioaktivitätsmessungen zur hochempfindlichen Mengenbestimmung ³²P-markierter Nukleotide wurden mit einem Szintillationszähler im Cerenkov-Modus durchgeführt. Für die Quantifizierung der RNA wurden folgende Formeln benutzt:

$$\text{Einbaurate des } \alpha\text{-}^{32}\text{P-CTP} = \frac{\text{Radioaktivität der RNA [cpm]}}{\text{eingesetzte Gesamtradioaktivität [cpm]}}$$
$$\text{RNA-Stoffmenge [nmol]} = \frac{\text{Einbaurate} * \text{Konzentration CTP [mM]} * \text{Ansatzvolumen} [\mu\text{l}]}{\text{Anzahl Cytidine im Transkript}}$$

4.3.2.: Photometrische Messungen

Nukleinsäurekonzentrationen können durch Messung bei ihrem Absorptionsmaximum von 260 nm photometrisch bestimmt werden. Dieses gilt ebenso für Anthracen bei seinem Absorptionsmaximum von 254 nm. Beide Maxima haben für eine unabhängige Messung zu geringen Abstand. Eine Messung an einem der lokalen Maxima des Anthracens stellt eine Alternative dar, z.B. bei einer Wellenlänge von 365 nm. Da der molare Extinktionskoeffizient von Anthracen bei dieser Wellenlänge etwa 24-fach kleiner ist, sinkt die Empfindlichkeit entsprechend um diesen Faktor. Da Nukleinsäuren bei 365 nm praktisch keine Absorption zeigen, sind diese Messbedingungen für RNA-Anthracenkonjugate geeignet, ausreichende Konzentrationen vorausgesetzt. Alternativ wurde eine Wellenlänge von 280 nm gewählt, bei der konjugiertes Anthracen nicht mehr signifikant absorbiert. Für die Stoffmengenbestimmung wurde entweder experimentell ein Standard erstellt oder das Verhältnis der Absorptionen zwischen 280 und 260 nm für eine unmodifizierte, reine Nukleinsäure bestimmt und als Korrekturfaktor eingesetzt.

4.4.: Methoden für Aktivitätstests und Kinetiken

4.4.1.: Gelelektrophoretischer Assay

Der gelelektrophoretische Assay eignet sich besonders für kinetische Messungen der zwei- und dreisträngigen Variante des Diels-Alderase-Ribozyms. Der Grund liegt in der Verwendung von 11mer-Anthracenkonjugaten als Edukte, die im Vergleich zum 11mer-Diels-Alder-Produkt einen relativ großen elektrophoretischen Mobilitätsunterschied („mobility shift“) zeigen. Einsträngige 49mer-Ribozymkonjugate zeigen dagegen nach der Diels-Alder-Reaktion aufgrund des kleineren relativen Massenunterschiedes nach kovalenter Bindung des Biotinmaleimides eine kleinere Mobilitätsverschiebung und sind daher weniger geeignet für Messungen dieser Art.

Der gelelektrophoretische Assay bietet den Vorteil höchster Empfindlichkeit durch den Einsatz radioaktiv markierter Oligonukleotid-Substrat-Konjugate. Der Nachteil besteht in der Beschränkung auf diskontinuierliche kinetische Messungen. Die Ansatzvorschriften sind in den Tabellen 7 und 8 dargestellt.

Einige Messreihen im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Faltungsdynamik entstanden auf modifizierte Weise (vgl. 5.6., S. 68 und 6.7., S. 93).

Tabelle 7:
Gelelektrophoretischer Assay, tripartite Ribozymversion:

18nt-RNA	1 μM
24nt-RNA	0,5 μM
11nt-RNA-HEG-Anthracen	1 nM
Tris-HCl pH 7,4	30 mM
NaCl	300 mM
MgCl₂	80 mM
Biotinmaleimid in DMSO	5 mM, DMSO final 2%

Tabelle 8:
Gelelektrophoretischer Assay, monopartite Ribozymversion:

49nt-RNA-HEG-Anthracen	1nM
Tris-HCl pH 7,4	30 mM
NaCl	300 mM
MgCl₂	80 mM
Biotinmaleimid in DMSO	5 mM, DMSO final 2%

Reaktionskinetiken wurden auf verschiedene Art durchgeführt, indem alternativ zum Standardansatz statt durch Zugabe von Biotinmaleimid die Reaktion mit Anthracen-11mer-Konjugat gestartet wurde. Die Ansätze wurden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, 25 °C, 10 °C und 5 °C. Komplettiert wurden die Experimente durch eine dritte Weise, die Kinetik zu starten, nämlich durch Zugabe von Magnesiumchlorid. Um mögliche Spuren von Magnesiumsalzen im ungestarteten Ansatz abzufangen, wurde 2 mM EDTA zugefügt. Die finale Magnesiumkonzentration von 80 mM wurde damit im Reaktionsansatz nur unwesentlich gesenkt.

4.4.2.: Fluoreszenzspektrometrischer Assay / UV-photometrischer Assay

Wie die Abnahme der UV-Absorption des Anthracens kann auch seine Fluoreszenzabnahme zur Verfolgung der Diels-Alder-Reaktion herangezogen werden. Wird Anthracen beim Absorptionsmaximum von 254 nm angeregt, kann blauviolette Fluoreszenzemission mit einem Maximum bei 419 nm beobachtet und gemessen werden. Diese Eigenschaft kann zur hochempfindlichen Messung des Reaktionsverlaufes herangezogen werden. Die Fluoreszenz des Anthracens geht bei der Reaktion zum Diels-Alder-Produkt völlig verloren. Der Grund liegt in der Zerstörung des konjugierten, über das ganze Molekül ausgedehnten π -Elektronensystems. Die Ansatzvorschrift ist in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9:
Fluoreszenzspektrometrischer Assay, Bedingungen:

Gesamtvolumen 50 μ L Konzentration final

49nt-RNA-HEG-A	0,5 μM
Tris-HCl pH 7,4	30 mM
NaCl	300 mM
MgCl₂	5 mM
Biotinmaleimid in DMSO	50 μM, DMSO final 2%

4.5.: Methoden im Rahmen der NAIM- Experimente

Schema für NAIM- Experimente:

- 4.5.1.: T7-Transkriptionen des AHEG-49mer-Ribozyms, Einbau von α -Thio-NTP's
- 4.5.2.: HPLC-Trennung von A-HEG- modifizierten und unmodifizierten Ribozymen
- 4.5.3.: 3'-Markierung durch Ligation mit pCp
- 4.5.4.: Umsetzung mit Biotinmaleimid bei definierter Reaktionszeit
- 4.5.5.: Trennung von Edukten und Produkten durch PAGE, Elektroelution
- 4.5.6.: Iodspaltung
- 4.5.7.: Analyse der Spaltprodukte auf Sequenziergelen
- 4.5.8.: T1 Leiter + limitierte alkalische Hydrolyseleiter

4.5.1.: T7-Transkriptionen des A-HEG-49mer-Ribozyms, Einbau von Thioatanaloga

Es wurde eine Serie von Transkriptionen durchgeführt, in denen zwei verschieden modifizierte Monomere gleichzeitig eingesetzt wurden. Es handelte sich als erstes um A-HEG-GMP als Initiator nukleotid und als zweites ein α -Thio-Nukleosidtriphosphat (α -Thio-NTP). Es ist eine Reihe verschieden modifizierter α -Thio-NTP's erhältlich. Zum Einsatz kamen Analoga, die als einzige eine α -Thio-Modifikation in jeweils ATP, CTP, GTP oder UTP enthielten, und parentale Thioatanaloga genannt werden. Ferner wurden Analoga eingesetzt, die neben der Thioat- eine weitere Modifikation enthielten. Die verfügbaren Thioatanaloga können zusätzlich entweder an den Basen oder den Ribosezuckern modifiziert sein. Im Rahmen der hier beschriebenen NAIM-Experimente wurden ausschließlich basenmodifizierte Analoga eingesetzt.

Für die Transkriptionsansätze wurden folgende Aspekte berücksichtigt:

A: Die Wahl einer geeigneten Initiator nukleotidkonzentration und ihr Verhältnis zur GTP-Konzentration. Hier wurde das Verhältnis $GTP : A-HEG-GMP = 2 \text{ mM} : 1 \text{ mM}$ gewählt. Initiator nukleotidüberschüsse steigern zwar die Einbaurate gegenüber GTP, sie senken aber andererseits die Gesamtausbeute der Transkription^[104].

B: Die Wahl einer geeigneten α -Thio-NTP-Konzentration und ihr Verhältnis zum entsprechenden unmodifizierten Nukleosidtriphosphat (NTP). Hierfür sind angegebene unterschiedliche Einbauraten der verschiedenen Analoga zu beachten^[97]. Ferner ist die geringe Iodspaltungseffizienz, die mit 10 bis 15 % angegeben wird, zu berücksichtigen^[98].

C: Die Wahl einer geeigneten α -Thio-NTP-Konzentration wurde der Häufigkeit der im 49mer-Ribozym vorkommenden Nukleotide angepasst. Es enthält 7 Adenosine, 16 Cytidine,

17 Guanosine und 9 Uridine. Das Verhältnis ATP : α S-ATP wurde auf 2 : 1, bezogen auf reines Sp- α S-Monomer, festgesetzt. Dies ist ein Wert, der mit Hilfe von Literaturangaben bezüglich der NAIM-Bedingungen im Fall des Gruppe I-Introns abgeschätzt wurde ^[98]. Die Konzentrationen der Analoga müssen umso mehr erhöht werden, je kürzer das untersuchte RNA-Molekül bzw. je geringer die Häufigkeit des korrespondierenden Nukleotides in der Sequenz ist. Ziel ist eine mittlere Spaltungshäufigkeit von etwa 1 pro Molekül; ein Wert, der zur Vermeidung von Artefaktbanden nicht überschritten werden sollte. Für die hier gewählten Bedingungen wird eine Spaltungseffizienz von 0,3 bis 0,5 pro Molekül abgeschätzt. Für andere Analoga als α S-ATP wird bei der Wahl der Konzentrationen sowohl ihre Einbaueffizienz, als auch die Häufigkeit im 49nt-Ribozym berücksichtigt. Zum Beispiel gilt als Konzentrationsänderungsfaktor für α S-CTP und seiner Analoga 7/16 gegenüber der Referenz α S-ATP. Die Gesamtkonzentration von (NTP + α S-NTP) wurde jeweils auf ca. 2 mM eingestellt. Lagen als Monomere racemische Rp/Sp- α -Thiotriphosphate vor, wurden deren Konzentrationen in Ansätzen verdoppelt.

Wichtige weitere geprüfte kritische Transkriptionsbedingungen sind:

- A) NTP-Gesamtkonzentration
- B) Templatkonzentration
- C) Transkriptionsreaktionszeit
- D) Wahl der Zusammensetzung des Puffers und seines pH-Wertes

A) Es wurden Versuche zur Senkung der NTP-Konzentrationen in Transkriptionsansätzen durchgeführt. Dabei sollten die Verluste der Transkriptionsausbeuten möglichst gering gehalten werden. Der Grund liegt im hohen Preis der kommerziell erhältlichen α -Thio-NTP's, die wegen der Notwendigkeit ausreichender Einbauraten in einem bestimmten Verhältnis zu Standard- NTP's eingesetzt werden müssen. Damit verbunden ist die Zielsetzung, den Stoffmengeneinsatz dieser α -Thio-NTP's so gering wie möglich zu halten. Es wurde gegenüber 4 mM in bisherigen Protokollen eine abgesenkte Standardnukleotidkonzentration von 2 mM gewählt. Eine Senkung auf 1 mM bewirkte bereits überproportionale Absenkungen der Ausbeuten, bei 0,5 mM und einem Ansatzmaßstab von 50 μ L wurden ihre Detektionsgrenzen mit UV- und Fluoreszenzdetektoren an der HPLC erreicht.

B) Es konnte gezeigt werden, dass die DNA-Templatkonzentration ein Optimum bei ca. 1 mM aufweist.

C) Die Wahl der Transkriptionszeit betrug 2 bis 4 Stunden. Längere Zeiten bringen die Gefahr der Degradation von Produkten bei gleichzeitiger fortschreitender Inaktivierung der RNA-Polymerase.

D) Es konnte ein Einfluss des Transkriptionspuffers nachgewiesen werden. Die beiden verwendeten Puffer „W*“ und „Milligan-Puffer“, welcher auf der klassischen Vorschrift beruht ^[100], unterscheiden sich durch ihre Tris-Pufferkonzentration und geringfügig in ihren pH-Werten. Letzterer enthält das Tensid Triton X-100. Die in den Puffern vorhandene Spermidinkonzentration wurde von 1 mM auf 4 bis 7 mM erhöht.

Durch die Verwendung des modifizierten „Milligan“-Puffers konnte eine signifikante Steigerung der Ausbeute etwa um den Faktor 3 erzielt werden.

4.5.2.: HPLC-Trennung von A-HEG-modifizierten und unmodifizierten Ribozymen

Systembedingt werden in Transkriptionsreaktionen sowohl Anthracen-Hexaethylenglykol-(A-HEG-) modifizierte, als auch unmodifizierte 49mer-Ribozym-Transkriptionsprodukte gebildet, da GTP-Moleküle mit Initiator nukleotiden um den Einbau am 5'-Terminus konkurrieren. Anfängliche Versuche, diese beiden Produkte durch PAGE zu trennen, schlugen aufgrund der ähnlichen gelelektrophoretischen Mobilitäten beider Produkte fehl. Eine Alternative zur elektrophoretischen Trennung stellt die HPLC dar. Eine Anthracen-Modifikation verursacht eine wesentliche Verstärkung der hydrophoben Eigenschaften und bewirkt auf einer Reversphasen-Säule eine Verlängerung der Retentionszeit gegenüber unmodifizierter RNA. Transkriptionsansätze wurden nach der Reaktion in Ethanol gefällt, zentrifugiert, und nach Resuspendierung in Wasser auf einer C₁₈-RP-Säule HPLC-gereinigt. Nach erfolgreicher Trennung konnten Anthracen tragende Moleküle mit Hilfe von UV- und Fluoreszenzdetektoren leicht identifiziert werden. Die Fraktion, die das gewünschte Voll-Längenprodukt Anthracen-HEG-49nt-RNA, enthielt, ist diejenige fluoreszierende mit der kleinsten Retentionszeit. Die Nukleotidkomponente ist als Schulter an der Anthracenspitze zu erkennen. In Abb. 17, S. 43 sind repräsentative Spektren ersichtlich.

Zur Validierung wurde das mutmaßliche Voll-Längenprodukt in einem Fluoreszenzassay geprüft. Es zeigte im Gegensatz zu verkürzten Anthracen-Oligonukleotidprodukten aus den „späten“ Fraktionen katalytische Aktivität und konnte damit sicher als Anthracen-HEG-49mer-RNA identifiziert werden (vgl. Abb. 18, S. 44).

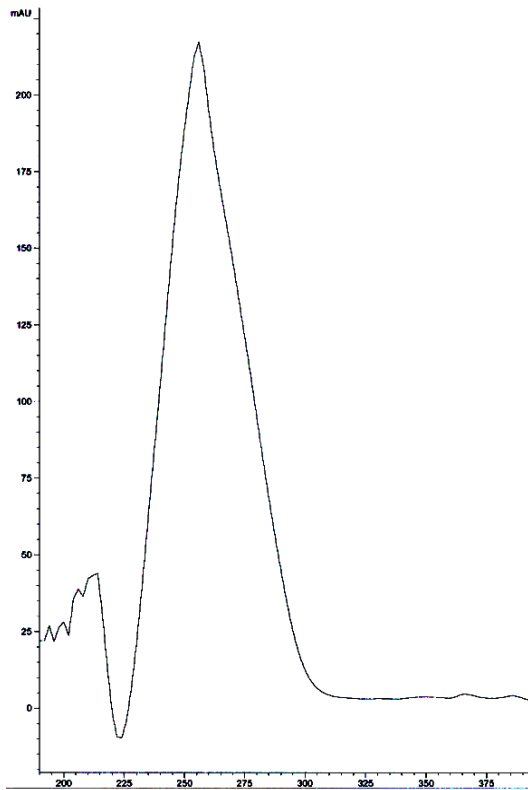
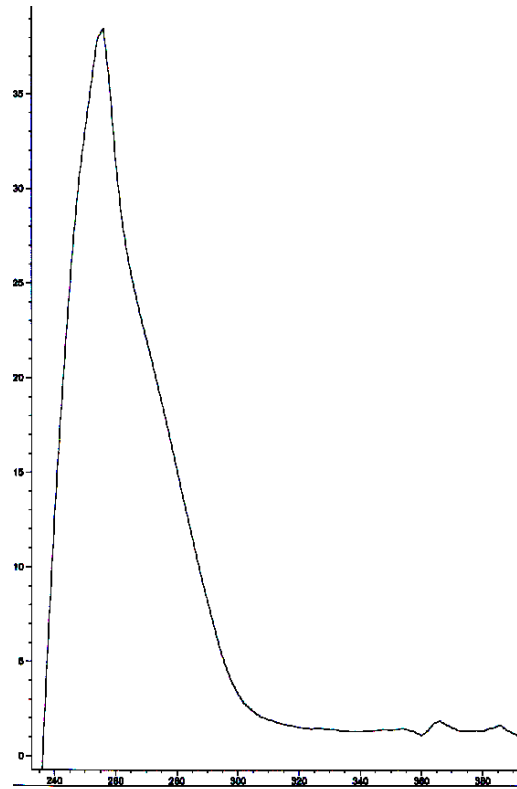
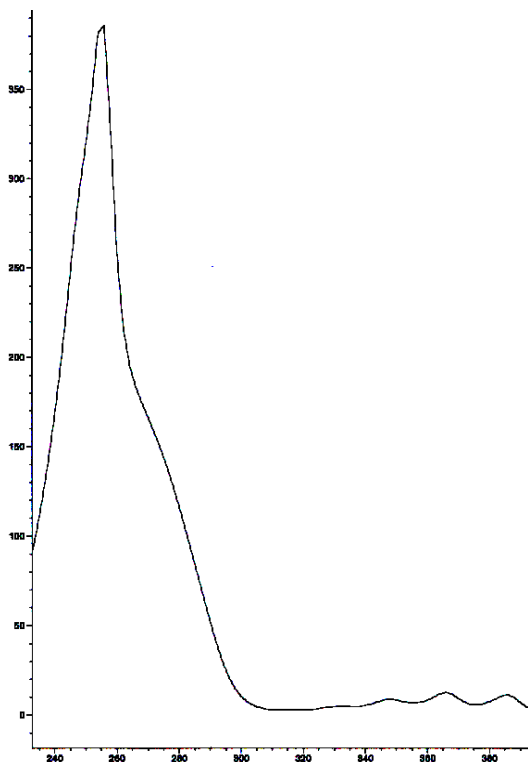
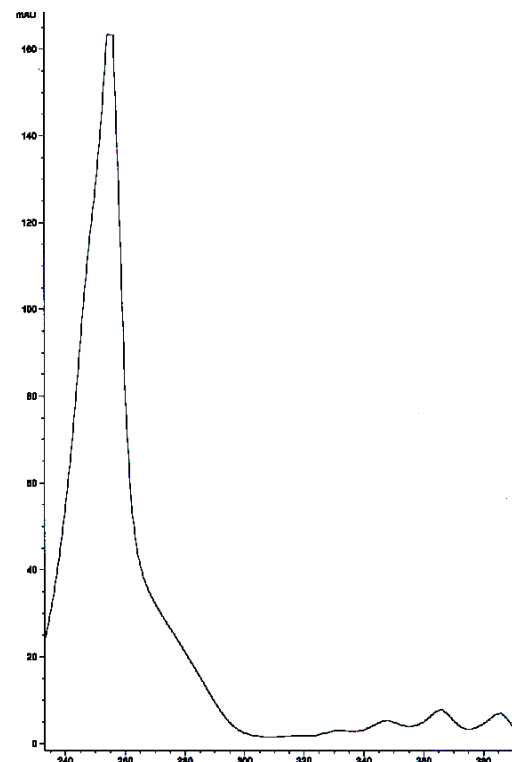
**A: 49mer-HEG-Anthracen (t=25,5 min)****B: Abortives Fragment (t=27,7 min)****C: Abortives Fragment (t=29,0 min)****D: Abortives Fragment (t=31,4 min)**

Abbildung 17: UV-Spektren von 49nt-HEG-Anthracen und abortiven Transkriptionsprodukten in HPLC-Fractionen mit angegebener Retentionszeit bei Anwendung der Methode A in Tabelle 5, S. 33. Die Einheit der Ordinaten ist „mAU“, die der Abszissen die unkalibrierte Geräteeinheit „nm“.

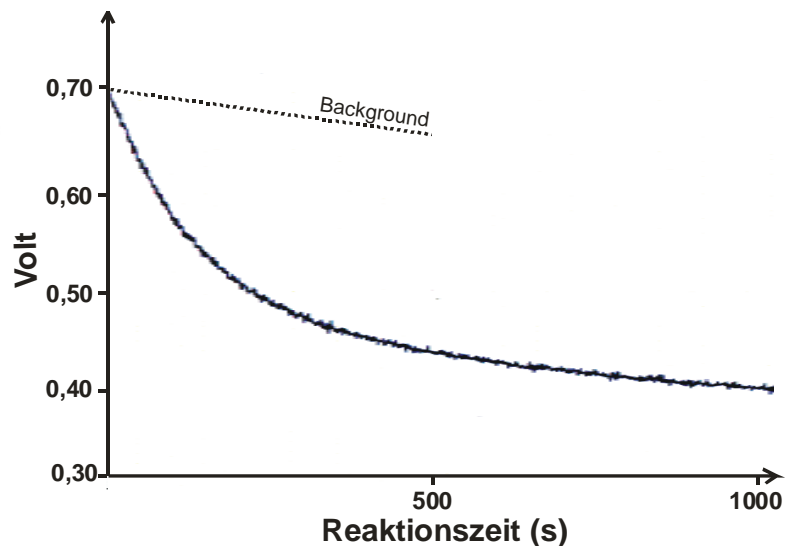


Abbildung 18: Fluoreszenzspektrometrischer Assay der HPLC-Fraktion mit dem Spektrum A, s. Abb. 15, $t=25,5$ min. Durch den Befund der Katalyse konnte das Voll-Längenprodukt 49nt-HEG-RNA identifiziert werden. Die Einheit „Volt“ als Geräteeinheit ist der Einheit „AU“ im gewählten Messbereich proportional. Background: Ungefährer Verlauf der unkatalysierten Hintergrundreaktion mit einem abortiven Fragment.

4.5.3.: 3'-Markierung durch Ligation mit ^{32}P -pCp

Die Durchführung der 3'-Markierungen entspricht dem im Abschnitt 4.1.3.3. gegebenen Protokoll. Die Ansatzmaßstäbe betragen 5 pmol, das Verhältnis Oligonukleotid zu pCp betrug 1:1. Zur Vermeidung von Verlusten wurde auf eine gelelektrophoretische Reinigung verzichtet. Stattdessen wurde der gesamte Ansatz einer Ethanol-fällung unterzogen.

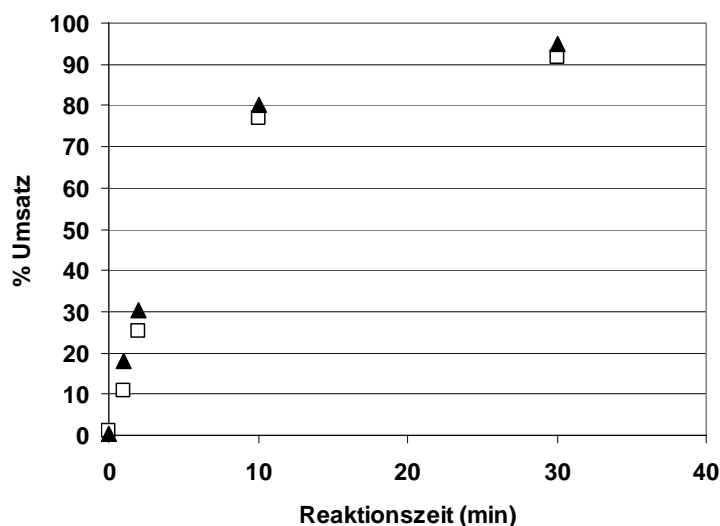


Abbildung 19: Kinetische Prüfung mit tRNA als Fällungshilfe: Kinetiken mit Anthracen-Hexaethylenglykol-49nt-RNA. Offene Quadrate: Keine Gegenwart von tRNA. Schwarze Dreiecke: tRNA als Fällungshilfe eingesetzt und im Reaktionsansatz vorhanden. Konzentrationen: tRNA: ca. 1 μM final, Ribozym: ca. 1 nM final.

Zur Unterdrückung von Verlusten durch Oberflächenadsorption und als Fällungshilfe wurden pro Reaktionsgefäß 50 bis 150 μg tRNA vor der Ethanolzugabe zugefügt. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in Wasser resuspendiert und der in Abschnitt 4.5.4. beschriebenen Umsetzung zugeführt. Eine überschüssige Zugabe von tRNA gegenüber Ribozym-RNA änderte das kinetische Verhalten nicht, wie in Abb. 19, S. 44, ersichtlich ist.

4.5.4.: Umsetzung mit Biotinmaleimid bei definierter Reaktionszeit

Jeweils eine Hälfte der Markierungsansätze wurde mit Biotinmaleimid umgesetzt. Die Ansatzprotokolle entsprechen den im Abschnitt 4.4.1. enthaltenen Angaben. Die Reaktionszeiten wurden für Umsätze von ca. 25 % bis 33 % abschätzend gewählt, dabei dienten im Falle von Punktmutanten die Daten der Mutationsanalyse als Grundlage (vgl. Abb. 21, S. 49). Für in NAIM-Experimenten verwendete Ribozyme mit Wildtypsequenz und für die Mutante A12G wurden 2 min Reaktionszeit gewählt, für die Mutante G9A 30 Minuten und für die Mutante U8C 90 Minuten. Die letztere Mutante U8C zeigte eine kleine, aber signifikante und nicht zu erwartende Aktivität, die in parallel durchgeführten Messungen am dreiteiligen Ribozym mit 1,9 % der Wildtyp-Anfangsgeschwindigkeit (nach 30 min 7,3 % Umsatz, bezogen auf den Wildtyp) ermittelt wurde. Angesichts der in frühen Mutationsstudien angegebenen strengen Konservierung muss der Befund den aktuellen Erkenntnissen gemäß korrigiert werden. Die Gründe liegen in früheren methodischen Restriktionen.

Die Konzentrationen der 49nt-Ribozymkonjugate betragen 5 nM bis 50 nM. In den NAIM-Experimenten wurden die Prioritäten auf eine Angleichung der Edukt- und Produkt-Radioaktivitäten bei der Beladung der Sequenziergele sowie auf Reaktionsumsatzwerte mit akzeptablen Toleranzen gelegt. Auf genaue Einstellungen der Ribozymkonzentrationen und der Reaktionsumsätze wurde verzichtet, da hierfür ein erheblich größerer experimenteller Aufwand notwendig gewesen wäre. Das Konzentrationsverhältnis von Anthracen- und Biotinmaleimid (BM) konnte wegen des hohen Überschusses des BM (Konzentration: 5mM) als unkritisch betrachtet werden.

4.5.5.: Trennung von Edukten und Produkten durch PAGE, Elektroelution

Nach erfolgter Umsetzung wurden Edukte und Produkte über PAGE mit Gelkonzentrationen von 15 % gereinigt. Die Banden wurden elektrophoretisch eluiert wie in Abschnitt 4.2.7. und 4.2.8. beschrieben.

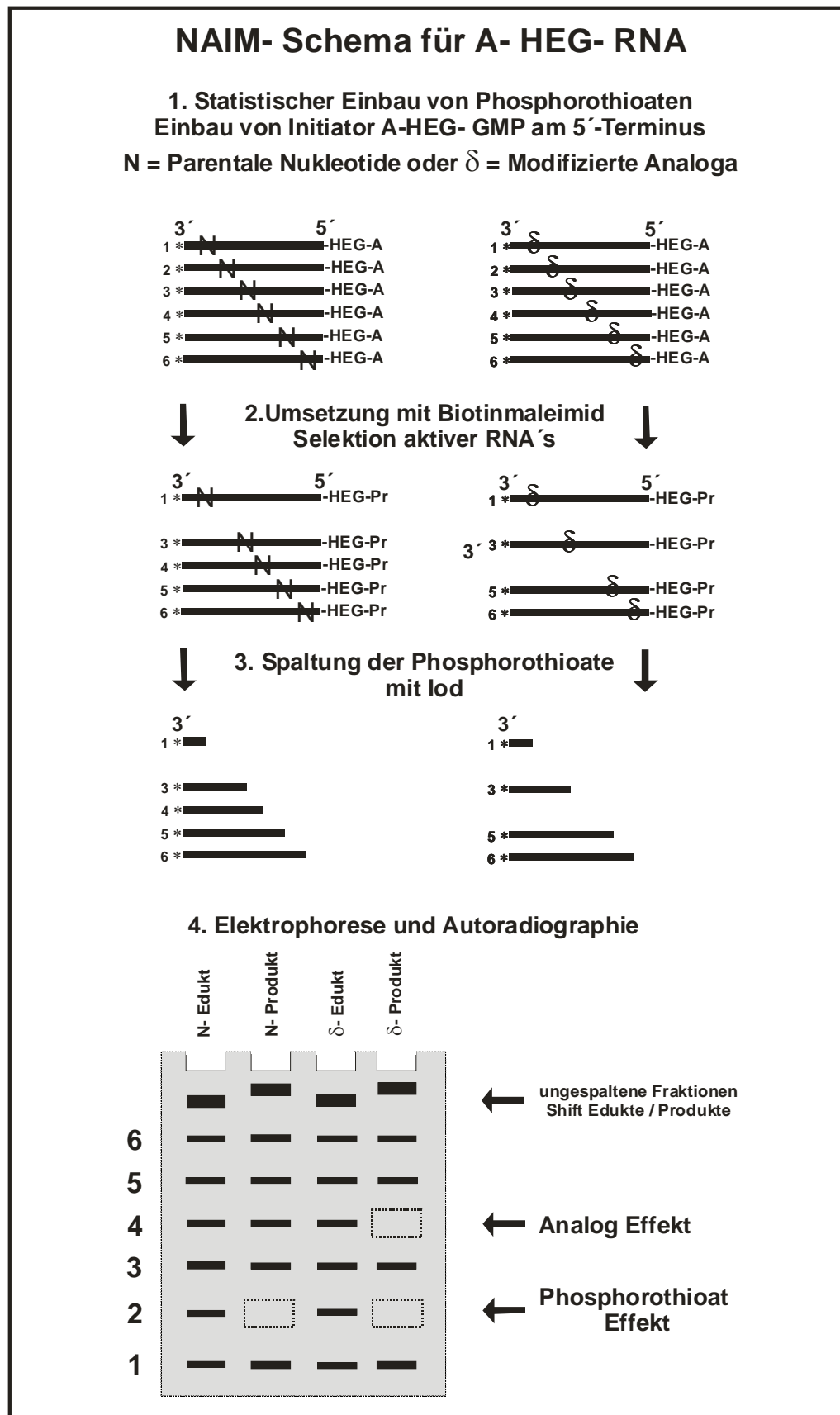


Abbildung 20: Schema für hier durchgeführte NAIM-Experimente mit 49nt-A-HEG-Ribozym-Konjugat. A=Anthracen; Pr=Diels-Alder-Produkt, *= radioaktive 3'- Markierung mit ³²P. Adaptiert und angepasst aus ^[93].

Eluaten wurde tRNA als Fällungshilfe und zur Unterdrückung der Oberflächenadsorptionen von Edukten und Produkten zugegeben und darauf eine Ethanol-fällung durchgeführt. Nach erfolgter Zentrifugation und Resuspendierung in Wasser konnten die gelösten Substanzen der Iodspaltung zugeführt werden.

4.5.6.: Iodspaltung

Zur Iodspaltung wurden die Lösungen der Edukte und Produkte jeweils mit doppelten Volumina von denaturierendem Ladepuffer (8 M Urea, 50 mM EDTA, pH 8,0) gemischt. Anschließend wurden jeweils 1/10 des Gesamtvolumens 100 mM Iodlösung in absolutem Ethanol zugefügt. Die Spaltungsreaktion verlief über 3 min bei Raumtemperatur. Zur Erhöhung der Spaltungseffizienz wurden die Proben für eine weitere Minute bei 65 °C inkubiert und darauf in Eis abgekühlt.

4.5.7.: Analyse der Spaltprodukte auf Sequenziergelen

Zur Analyse der Proben auf Sequenziergelen wurden Paare von Edukten und Produkten bezüglich ihrer Radioaktivitäten in der Menge angeglichen und dabei Stoffmengen mit Aktivitäten zwischen 7000 und 10000 cpm pro Spur eingesetzt (vgl. Abb. 20, S.46). Es wurden modifizierte Proben eingesetzt, die nicht der Iodspaltung ausgesetzt waren sowie 20%-ige denaturierende Polyacrylamidgele mit Schichtdicken von 0,4 mm verwendet. Zur Identifizierung der Nukleotidpositionen wurden „T1-Leitern“ und alkalische Hydrolyseleitern als Referenz eingesetzt (s. Abschnitt 4.5.8., S.). Weiterhin wurden als Negativkontrollen Thioat-49nt-Ribozyme ohne Thioatmodifikation jeweils mit oder ohne Iodspaltungsbedingungen verwendet.

4.5.8.: Ribonuklease T1 Leiter und limitierte alkalische Hydrolyseleiter

Als Referenzen zur Bestimmung der Iodspaltungspositionen auf Sequenziergelen wurden „T1-Leitern“ angefertigt. Das Enzym Ribonuklease T1 schneidet bevorzugt an 3'-Positionen von Guanosinen ^[116]. Es werden Bedingungen für eine Häufigkeit von durchschnittlich einer Spaltung pro Oligonukleotidstrang gewählt. Gegenüber Iodspaltungen ist zu beachten, dass letztere an 5'-Positionen stattfinden. Daher tritt bezüglich der „G“-Positionen im

Bandenmuster eine Rasterverschiebung auf, die dem Mobilitätsunterschied eines Nukleotides entspricht.

Tabelle 10:

Reaktionsbedingungen für Partiellen RNase T1-Verdau:

12,5 mM Natriumcitrat pH 4,5
0,5 mM EDTA
3,5 M Harnstoff
0,8 bis 1,0 µg/µL tRNA
0,05 U Ribonuklease T1

t= 10 bis 20 min, T= 55°C

Eine limitierte Hydrolyse wird in mildem alkalischem Milieu bei erhöhten Temperaturen erreicht. Hierbei werden Bedingungen gewählt, in denen Oligonukleotidstränge im Mittel einmal hydrolytisch gespalten werden ^[111, 112]. Die Spaltung erfolgt statistisch über die gesamte Länge des Moleküls und führt somit zu einer Bandenleiter, deren Bandenabstände jeweils der Differenz eines Nukleotides entsprechen. Die Positionen können durch Abzählen der Banden bestimmt werden.

Tabelle 11:

Reaktionsbedingungen für limitierte alkalische Hydrolysen:

33 mM Natriumhydrogencarbonat pH 9,0
0,8 bis 1,0 µg/µL tRNA

t=5 bis 10 min, T= 90°C

5.: ERGEBNISSE

5.1.: Konventionelle Mutagenese

5.1.1.: Punktmutanten und der Konservierungsgrad einzelner Nukleotide

Alle Positionen der formal einsträngigen Bereiche des Sekundärstrukturmodelles wurden gegen eines der drei anderen möglichen Standardnukleotide substituiert. Dabei kam die dreiteilige Variante des Ribozyms zum Einsatz. Diese ermöglicht die Kombination von bis zu drei Substitutionen durch Hybridisierung von einzeln substituierten Ribozymfragmenten. In ersten Versuchen wurden die Reaktionsumsätze nach einer Zeit von 30 min bestimmt. In erweiterten Messreihen wurden echte Kinetiken durchgeführt und die Anfangsgeschwindigkeit im nahezu linearen Bereich von 0 bis 15 % Umsatz bestimmt. In den generell bereits als konserviert erkannten Einzelstrangbereichen konnten signifikante positionsabhängige Unterschiede des Konservierungsgrades festgestellt werden. Dabei wurden streng konservierte, nahezu streng konservierte und geringer konservierte Nukleotide erkannt (s. Abb. 21).

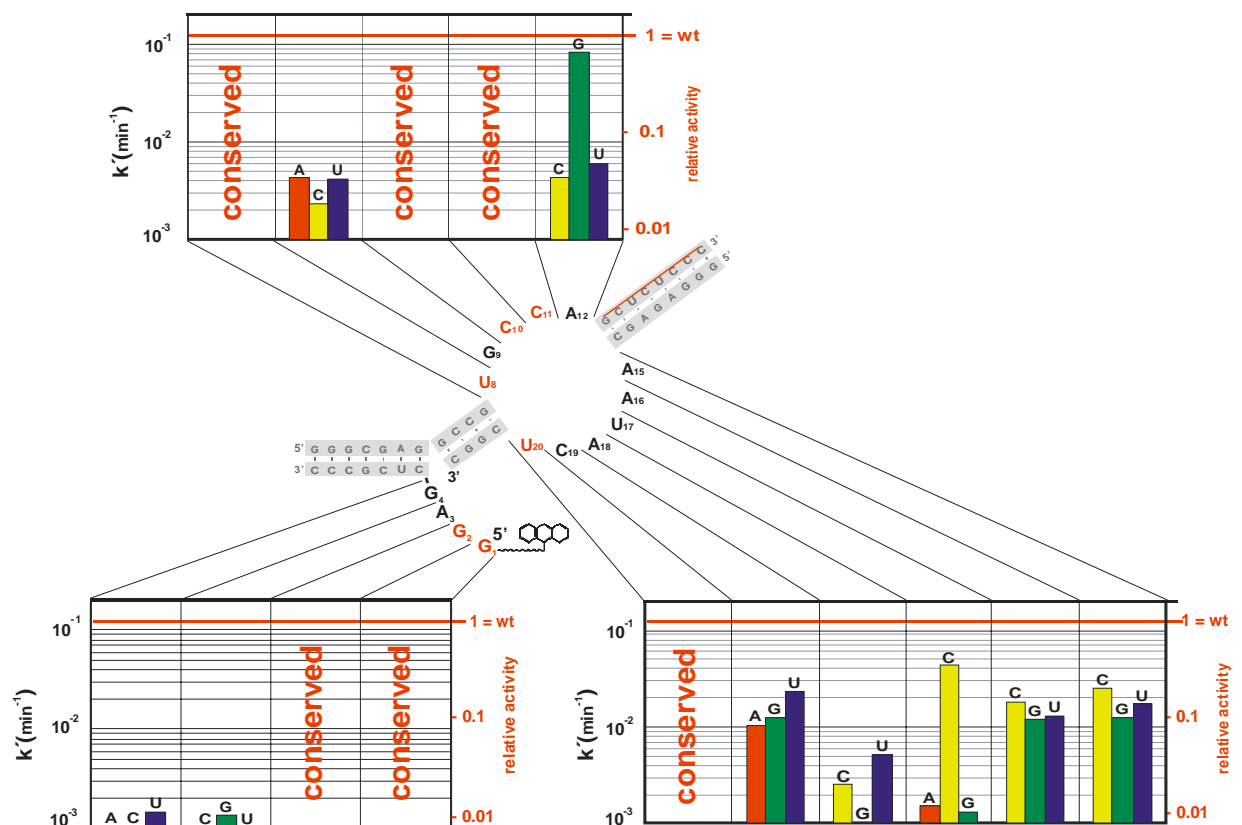


Abbildung 21: Einzelne Basensubstitutionen. Bestimmung des Konservierungsgrades der Nukleotidpositionen. Daten in logarithmischer Skala auf den linken Abszissen geben Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung an, die im Bereich 0 bis 15 % Reaktionsumsatz ermittelt wurden. Rechte Abszissen: Relative Aktivitäten als Bruchteil der Wildtyp-Aktivität ^[58].

Die Nukleotide A15, A16 und C19 sind weniger streng konserviert. Substitutionen bewirken an diesen Positionen einen Rückgang der Aktivität auf ca. 10 % bis 25 % bezogen auf Anfangsgeschwindigkeiten. An der Position 17 zeigt sich eine klare Pyrimidin-Präferenz, dagegen liegt an der Position 12 eine Purin-Präferenz vor. Die Nukleotide G9 und A18 sind nahezu streng konserviert, Substitutionen an diesen Positionen bewirken eine Aktivitätsverringerung auf ca. 3 - 4 % mit Ausnahme der A18G-Mutante, die als völlig inaktiv erkannt wurde. Die Nukleotide G1, G2, U8, C10, C11 und U20 wurden als streng konserviert erkannt. Die Nukleotide A3 und G4 werden ebenso als streng konserviert bezeichnet, obwohl noch in Einzelfällen Aktivitäten von ca. 1% auftraten. Die gesamte 5'-terminale GGAG-Sequenz erscheint damit streng konserviert ^[58]. Die Benennung des U8 als streng konserviertes Nukleotid muss korrigiert werden, da die Mutante U8C noch mit 1,9 % Aktivität bezogen auf Wildtyp-Anfangsgeschwindigkeit (v_0) in späteren Messungen eine geringe, aber signifikante Aktivität zeigte. Die Gründe für die unerkannte Aktivität liegen in experimentellen Restriktionen in frühen Mutationsstudien (vgl. Abb. 21, S. 49).

5.1.2.: Validierung von Sekundärstrukturelementen:

Einfache und doppelte Basensubstitutionen

Es wurden weiterhin die Basen beider Basenpaare substituiert, die die Ausbuchtung („bulge“) abschließen. Die Basen des abschließenden Basenpaares (closing basepair) G13.1-C14.1 sind weitgehend substituierbar ohne signifikanten Aktivitätsverlust. Eine Ausnahme bildet lediglich eine U-U-Fehlpaarung, die einen Aktivitätsverlust auf ca. 60 % bewirkt ^[58, 117].

Im Fall des closing basepairs G7.4-C21.4 konnte gezeigt werden, dass seine Purin-Pyrimidin-Orientierung konserviert ist. Das G-C des Wildtyps ist bevorzugt gegenüber einer A-U- (70%), bzw. noch stärker gegenüber einer G-U-Substitution (10%), die geringere thermodynamische Stabilitäten aufweisen. Zur Validierung der Sekundärstruktur wurden Einfach- und Doppelsubstitutionen der Helix II-Nukleotide in Wiederherstellungsexperimenten („rescues“) untersucht. Dies führte zum Ergebnis, dass neben dem schon erwähnten, die Helix II abschließenden Basenpaar an den zwei anderen, direkt benachbarten Basenpaarpositionen Fehlpaarungen („mismatches“) kaum oder überhaupt nicht toleriert werden. Komplementäre Doppelsubstitutionen konnten die Ribozymaktivität in allen Fällen partiell wiederherstellen. Dies sind klare Belege für die Existenz der Helix II (vgl. Abb. 22, S. 51).

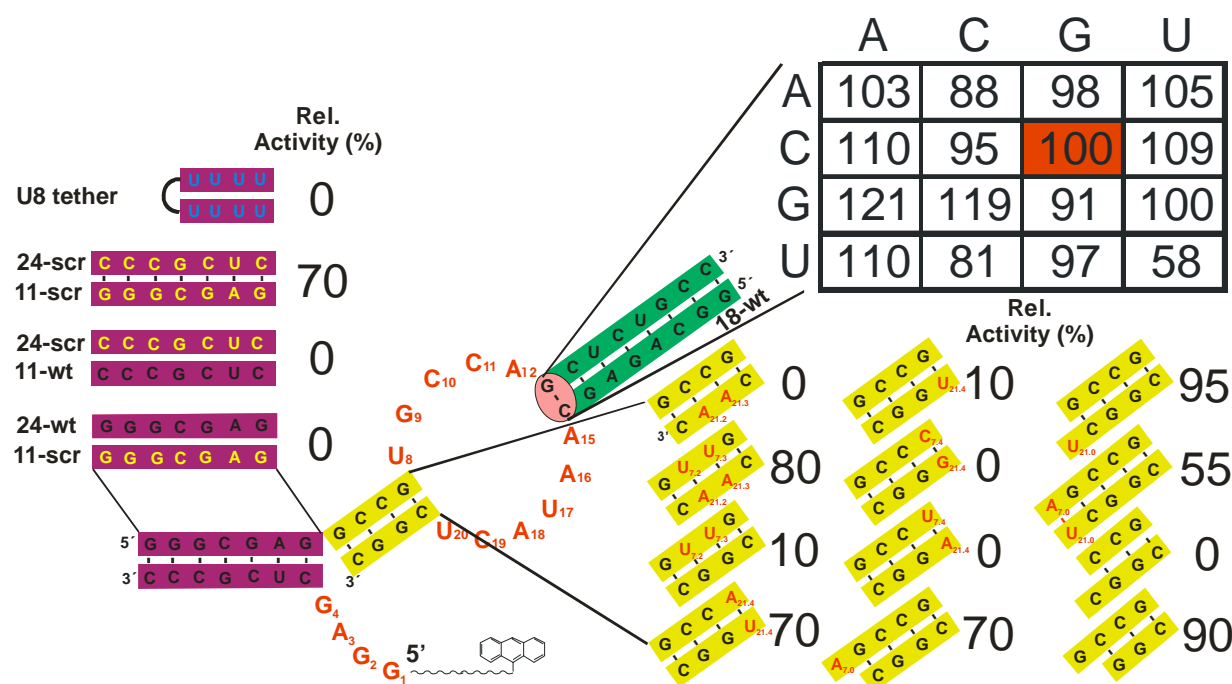


Abbildung 22: Validierung der Sekundärstruktur: Doppelte Substitutionen in Helices I und II sowie im abschließenden Basenpaar G13.1-C14.1 der Helix III. Daten geben relative Reaktionsumsätze nach t= 30 min an ^[58].

Zur Untersuchung der Helix I wurde ihre gesamte Duplex-Sequenz komplementär geändert und parallel in Kontrollen jeweils mit den Wildtypfragmenten kombiniert. Die komplementäre neue „scrambled“ Duplex-Sequenz konnte die Aktivität des Ribozyms weitgehend wiederherstellen. Fehlpaarkombinationen erzeugten dagegen völligen Aktivitätsverlust.

Zur Untersuchung, ob die gesamte Helix I als Strukturelement überhaupt notwendig ist, wurde ein Konstrukt hergestellt, das statt der Helix I einen U8-Verbinder („tether“) zwischen Nucleotid G4 des 5'-GGAG-Terminus und G7.1 der Helix II enthielt. Die Einzelstrangvariante dieses Ribozymkonstruktes zeigte im Fluoreszenzassay keine Aktivität im Gegensatz zur Positivkontrolle. Helix I ist daher notwendig zur Ausbildung der aktiven Struktur.

Eine Insertion eines Nucleotides (A7.0) wird an der Aufhängung (Hinge) zwischen Helix I und Helix II ebenso wie eine komplementäre A7.0-U21.0 Doppelinsertion, die eine 5bp-Helix II erzeugt, relativ gut toleriert. Dagegen verursacht eine Deletion des G7.1 völligen Aktivitätsverlust. Eine Insertion (Extension) oder Deletion um ein Nucleotid am 3'-Ende wird dagegen gut toleriert ^[58].

Wenn nicht anders erwähnt, handelt es sich bei Aktivitätstests um Einzelmessungen, die relative Umsätze nach einer bestimmten Reaktionszeit darstellen (s. Abb. 22).

5.1.3.: Suche nach tertiären Interaktionen:

Komplementäre Doppel- und Vierfachsubstitutionen

Zur Suche nach tertiären Interaktionen wurden die formal einzelsträngigen Bereiche des Ribozyms systematisch doppelt substituiert und jede Kombination von komplementär mutierten Ribozymen auf Aktivität getestet. Zur schnellen Überprüfung wurden an einzelnen Positionen neben den drei definierten Punktmutanten in ersten Versuchsreihen auch Gemische von solchen verwendet, wie am Beispiel U8V oder G9H verdeutlicht wird (V = alle Nukleotide außer U; H = alle Nukleotide außer G). Es konnten bis auf zwei Ausnahmen keine Interaktionen gefunden werden. Die Positionen A3-U20 und G4-C19 erwiesen sich als komplementär substituierbar. Zur genaueren Untersuchung wurden definierte einzelne Punktmutanten verwendet (s. Abb. 23). Das Paar A3-U20 tolerierte keine Fehlpaarungen, eine Invertierung zum U3-A20 wurde schlecht toleriert. Das Paar G4-C19 verhielt sich in dieser Hinsicht etwas anders.

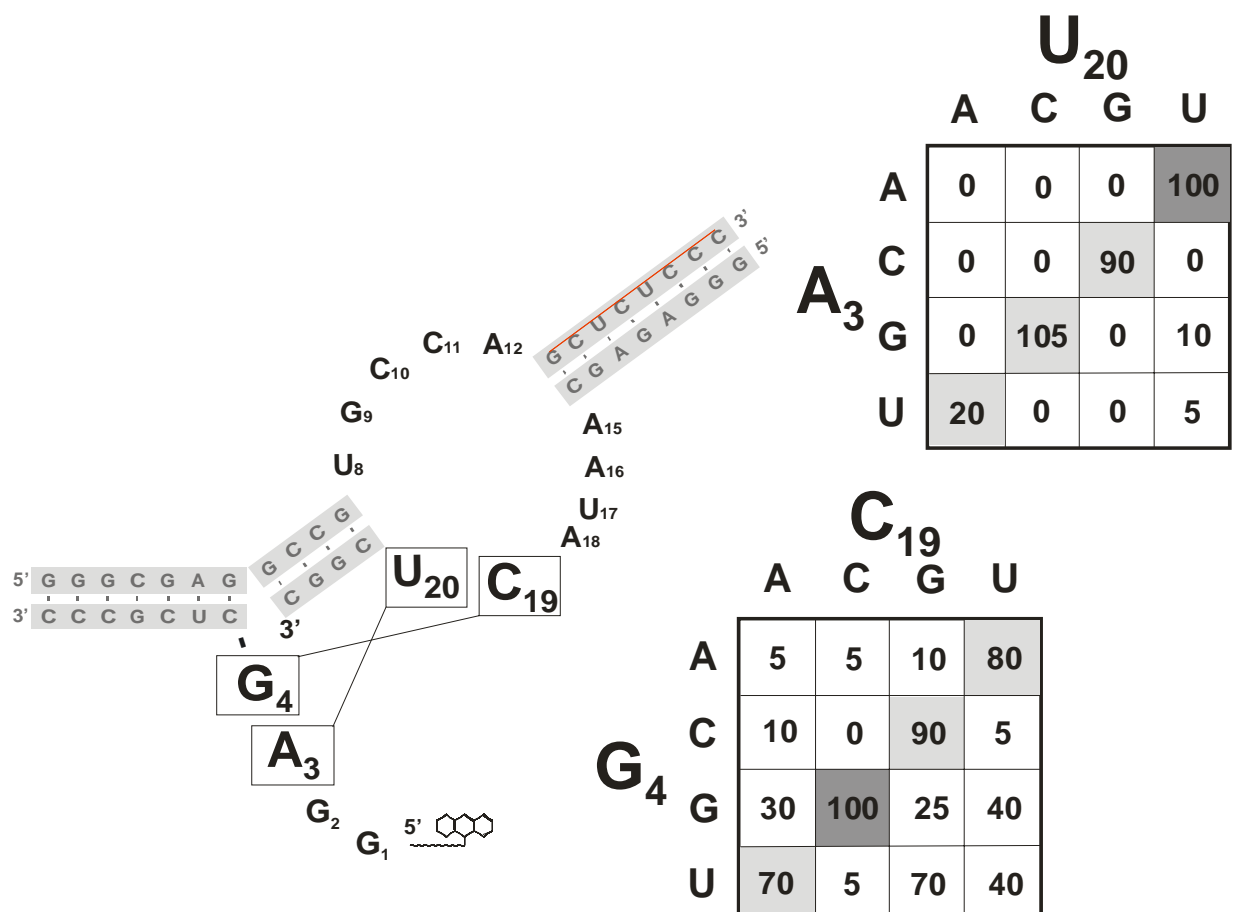


Abbildung 23: Kompensatorische Doppelsubstitutionen: Tertiäre Interaktionen zwischen Nukleotiden A3/U20 sowie G4/C19. Dunkelgraue Felder: Wildtyp. Hellgrau: Komplementäre Doppelmutanten mit signifikanten Rescues. Deutlich verringerte Aktivität der Doppelmutante U3A20. Daten geben relative Reaktionsumsätze nach t=30 min an ^[58].

Komplementäre doppelte Substitutionen zeigten gleichermaßen die stärkste Wiederherstellung („rescue“). Es wurden jedoch auch einige nichtkomplementäre Paarungen mit Aktivitätsverlust toleriert. Im Kontrast zum Basenpaar A3-U20 ist die Toleranz von Fehlpaarungen dort also größer. Diese Beobachtungen konnten weiter durch die Untersuchung von Ribozymen gestützt werden, die an denselben Positionen vierfach substituiert waren. Es wurden jeweils sechs doppelt substituierte 18nt- und 11nt-HEG-A-Ribozymfragmente hergestellt. Durch systematische Kombinationen konnten damit alle Mutanten bis auf diejenigen gebildet werden, die eine Inversion A3-U20→U3-A20 enthielten. Die letztere Mutante bewirkte einen hohen Aktivitätsverlust auf ca. 20 % Wildtypaktivität und wurde deshalb bei der Auswahl und Konstruktion von Vierfachmutanten nicht berücksichtigt (s. Abb. 24).

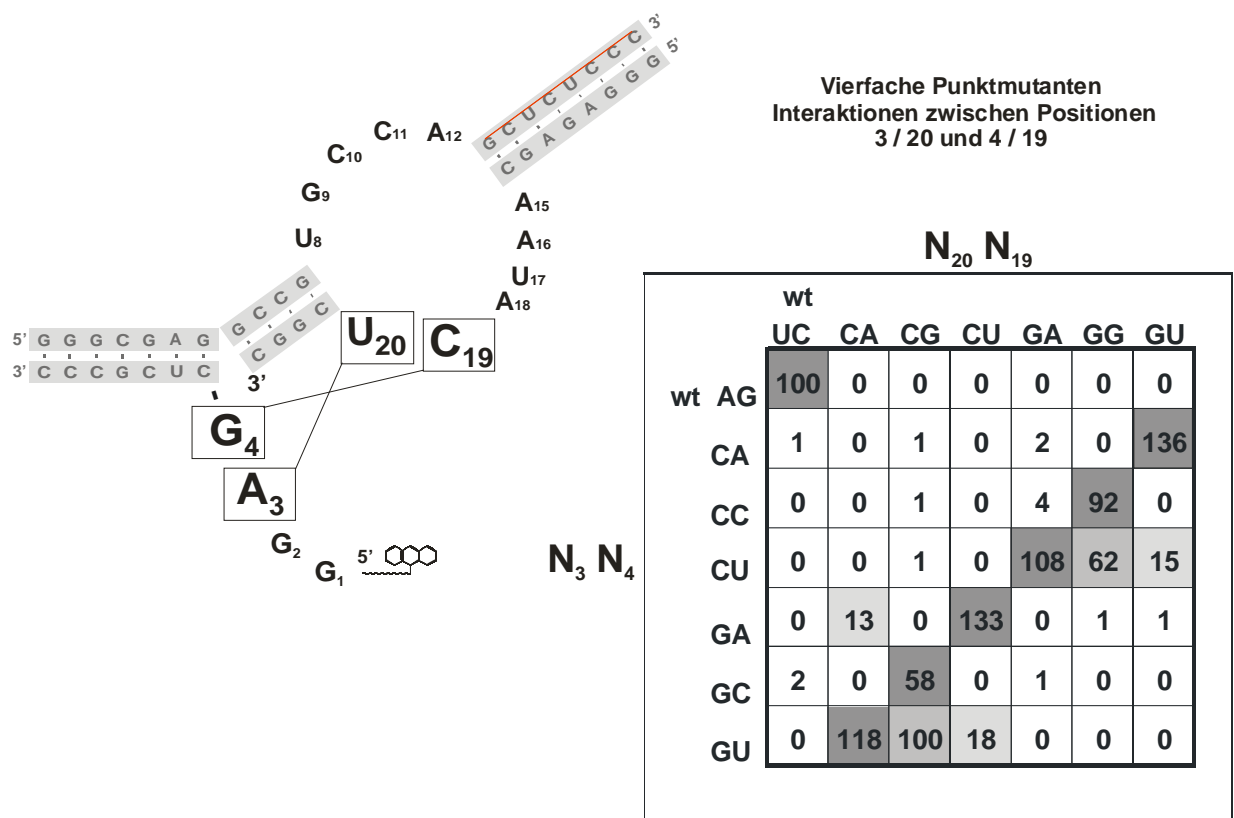


Abbildung 24: Kompensatorische Vierfachsubstitutionen. Bestätigung der Interaktionen A3U20 und G4C19. Dunkelgrau: Vollständig komplementäre Kombinationen. Mittelgrau: G-U Wobbles an Pos. 4-19. Hellgrau: Eine A-A und zwei U-U- Fehlpaarungen an Pos. 4-19. Daten geben relative Reaktionsumsätze nach t= 30 min an.

Es konnte somit gezeigt werden, dass alle komplementären Kombinationen der Mutanten die Aktivität wiederherstellten gegenüber den Kontrollen der partiellen Wildtypkombinationen, die zwei Fehlpaarungen besaßen. Dies weist eindeutig auf die Existenz zweier bisher unbekannter Interaktionen hin. Die Basenpaare A3-U20 und G4-C19 liegen offenbar als Standard-Watson-Crick-Basenpaare vor und bilden damit einen Pseudoknoten (vgl. Abb. 11, S. 19). Dieser stellt eine Hälfte der doppelten Pseudoknotenstruktur dar.

Es wurden auch einige interne doppelte Substitutionen in den 24mer und 18mer Ribozymfragmenten getestet. Es handelte sich um die Mutanten 8V9H, 8V10D, 8V11D, 8V12B, 9H10D, 9H11D, 9H12B, 10D11D, 10D12B sowie 11D12B, und damit um zweifache Mischkombinationen im kompletten 24mer-Bulge. Bei den 18mer Bulge-Mutanten handelte es sich um die Mutanten 17V18B, 17V20V und 18B20V. Die Positionen A15 und A16 wurden angesichts ihrer geringen Konservierung nicht einbezogen. Die ausgewählten Mutanten zeigten durchweg keine Aktivität. Es konnten keine Hinweise auf Wiederherstellung der Aktivität gefunden werden und daher keine Indizien für Intrastrang-Wechselwirkungen in den Bulgebereichen der 24- und 18nt-Fragmente.

5.2.: Einfache 2'-Desoxynukleotidsubstitutionen

In den formal einzelsträngigen Bereichen der Sekundärstruktur wurden an einzelnen Positionen Ribonukleotide durch Desoxynukleotide substituiert. Positionen von ribo-Uridin (rU) wurden sowohl durch Desoxyuridin (dU), als auch durch Desoxythymidin (dT) substituiert (vgl. Abb. 25, S 55). Es konnte gezeigt werden, dass bis auf wenige Ausnahmen an allen gewählten Positionen Desoxynukleotidsubstitutionen toleriert werden. In einigen Fällen sind höhere Aktivitätsmesswerte im Vergleich zum Wildtyp aufgetreten. Die einzige signifikant sensitive Position bezüglich einer 2'-Desoxynukleotidsubstitution ist das Guanosin 9. Die Mutante G9dG erreicht lediglich 32% Wildtyp-Aktivität (rel. Umsatz nach 30 min, ca. 4 % Wildtyp-Aktivität bezogen auf Anfangsgeschwindigkeiten). Die 2'-Hydroxylgruppe des G9 ist offenbar an einer essentiellen Wasserstoffbrücke beteiligt (vgl. 6.2.1.3., S.78).

Es wurde weiterhin beobachtet, dass kein größerer Unterschied zwischen dU und dT-Substitutionen an den Positionen U8 und U17 hinsichtlich der Auswirkung auf die katalytische Aktivität besteht. Ein signifikanter Unterschied ist jedoch an der Position U20 festzustellen. Eine U20dU Mutation (107 % wt-Akt.) wird ohne Aktivitätsverlust toleriert, eine U20dT Substitution bewirkt jedoch fast vollständigen Aktivitätsverlust (4 % wt-Aktivität).

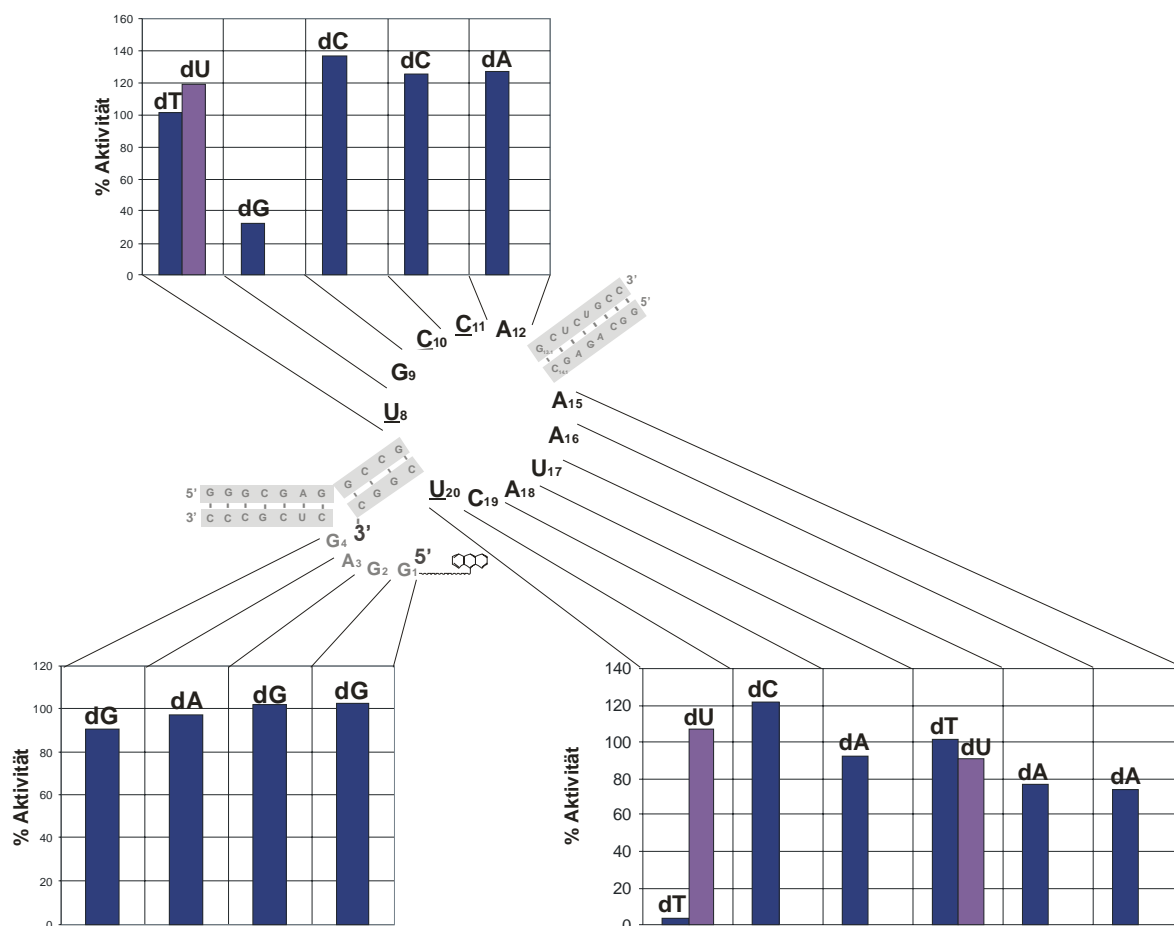


Abbildung 25: Einzelne 2'-Desoxynukleotidsubstitutionen. Effekte von G₉dG und U₂₀dT-Substitutionen. Daten geben relative Reaktionsumsätze nach t=30 min an.

5.3.: RNA-DNA-2'-OMeRNA-Chimären

Chimären wurden zunächst mit dem primären Ziel hergestellt, die Hydrolysestabilität des Ribozyms zu erhöhen (Abb. 26, S. 56). Es konnte ein Konstrukt hergestellt werden, das lediglich 11 Ribonukleotide enthält und beachtliche 61 % wt- Aktivität zeigt (Feld E8). Die Relevanz der mit ihnen gewonnenen Daten hinsichtlich der Strukturdiskussion bezieht sich auf die Helix II-Geometrie sowie sterische Hinderungen im Bereich des scharfen Turns A18...C21.4 (s. Abb. 26, S. 56, Legende). Konstrukt E5 mit einem 2'-OMe-Duplex zeigte mit 70 % eine etwas höhere Aktivität als das Konstrukt B2 (DNA-Duplex) mit 61 %, verglichen mit dem Wildtyp A1 als Referenz. Gemischte Helix II-Duplexe werden toleriert, ohne dass starke Präferenzen sichtbar sind. Der A-Geometriertyp, welcher in RNA oder 2'-OMeRNA-Duplexen bzw. seinen Mischduplexen vorliegt, scheint dem B-Geometriertyp von DNA-Duplexen gegenüber signifikant, aber nicht dramatisch bevorzugt zu sein.

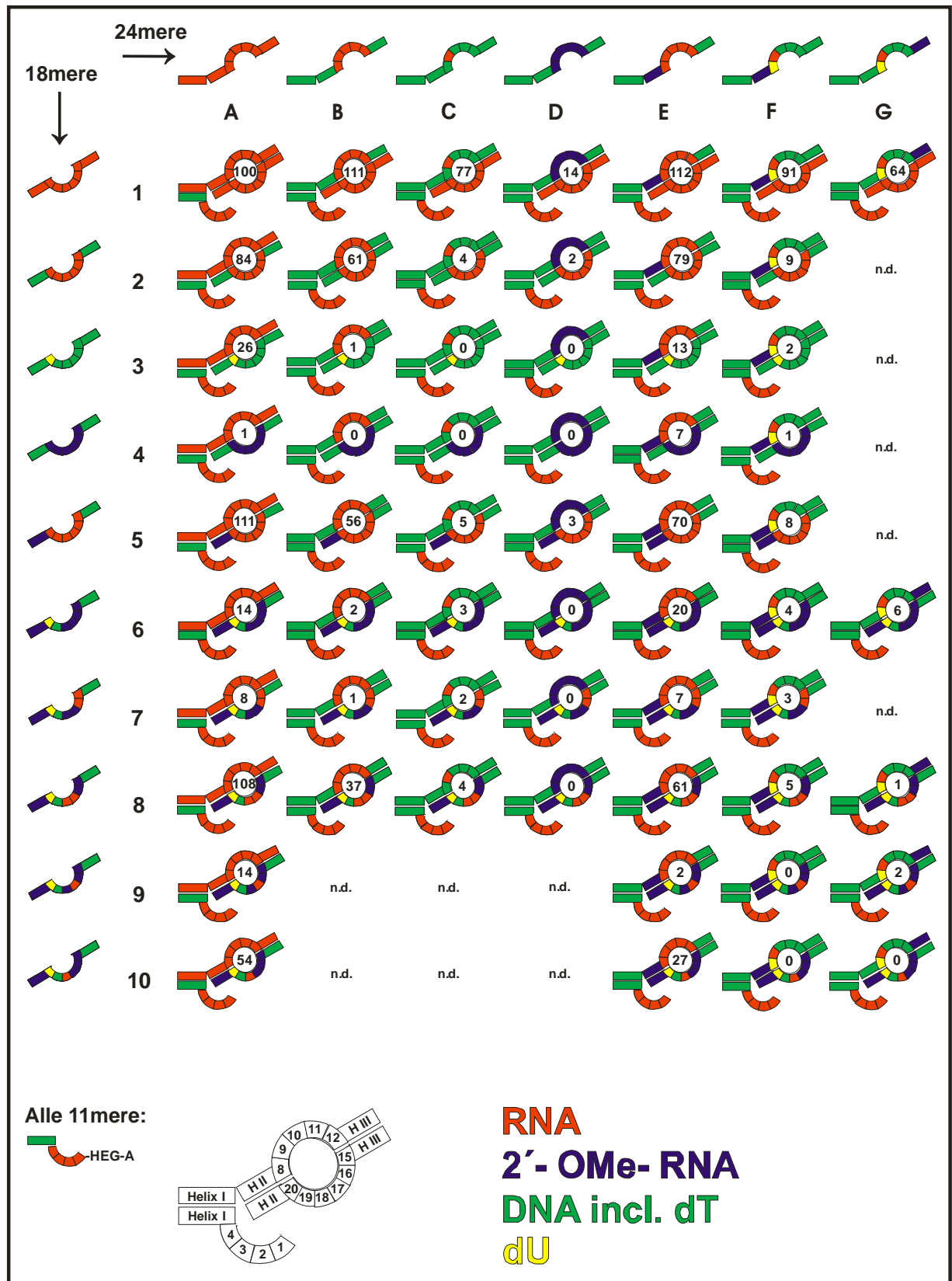


Abbildung 26: Chimärische Ribozymkonstrukte. Relevanz zum scharfen Turn A18-C21.4: Felder A/E 7 bis 10 sowie A4/5. Relevanz zur Helix II-Geometrie: Felder A1 (dsRNA), B2 (dsDNA) und E5 (ds 2'-OMe-RNA). Daten geben relative Umsätze nach einer Reaktionszeit von 30 min an.

Es konnte ein sensitiver Bereich gegenüber Methoxysubstitutionen im Bulge-Helix II-Segment A15...C21.4 eingegrenzt werden, der in strukturellen Zusammenhang mit dem scharfen Turn gebracht werden kann. Dafür geben die Messwerte der Konstrukte A7/A8, bestätigt durch E7/E8, sowie die Messwerte der Konstrukte A9/A10, bestätigt durch E9/E10, Aufschluss. Der sensitive Bereich wird stromaufwärts begrenzt durch U17, in dem eine 2'-OMe-Gruppe wesentlich besser toleriert wird als am A18. Die andere Begrenzung wird durch das Nukleotid C21.4 des abschließenden Basenpaares der Helix II gebildet, das eine Methoxysubstitution toleriert wie der Rest des Helix II-Abschnittes stromabwärts bis zum 3'-Ende. Dieser Befund zeigt sich beim Konstrukt A5. Eine komplette Methoxysubstitution der 18mer-Ausbuchtung verursacht einen vollständigen Aktivitätsverlust, wie das Konstrukt A4 zeigt.

5.4.: Nucleotide Analog Interference Mapping (NAIM)

Es wurden im Rahmen der NAIM-Experimente folgende parentale Thioatanaloga in Transkriptionsreaktionen eingesetzt:

A α S, C α S, G α S sowie U α S (A α S = alpha-Thio-Adenosintriphosphat)

Als zusätzlich basenmodifizierte Thioatanaloga wurden verwendet:

A-Analoga:

Alpha-Thio-N6-Methyl-Adenosintriphosphat (N6-MeA α S-TP)

Alpha-Thio-2-Aminopurinribosidtriphosphat (2-AP- α S-TP)

Alpha-Thio-2,6-Diaminopurinribosidtriphosphat (2,6-DAP α S-TP)

Alpha-Thio-Purinribosidtriphosphat (Pu α S-TP)

Alpha-Thio-7deazaAdenosintriphosphat (7deazaA α S-TP)

G-Analoga:

Alpha-Thio- Inosintriphosphat (Ino α S-TP)

Alpha-Thio- 7deazaGuanosintriphosphat (7deazaG α S-TP)

Die wenigen erhältlichen Pyrimidinanaloga sowie einige verfügbare 2'-OH modifizierte Thioatanaloga wurden hier nicht eingesetzt. Für den Einbau der letzteren werden spezielle RNA-Polymerase-Mutanten Y639F oder Y639F/H784A benötigt ^[118, 119].

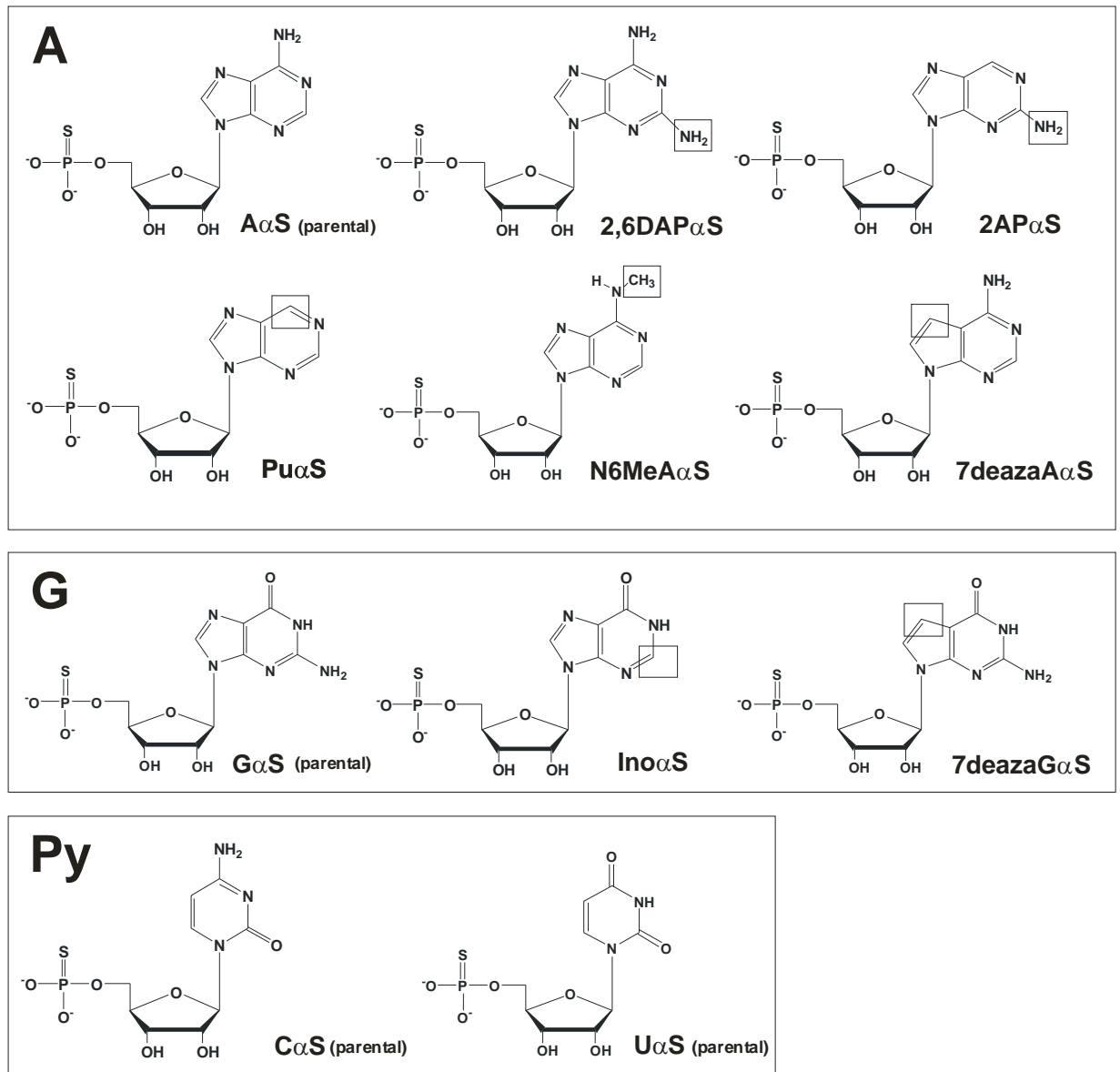


Abbildung 27: In NAIM-Experimenten eingesetzte Thioanaloge als Nukleosidmonophosphate. A: Adenosinanaloge. G: Guanosinanaloge. Py: Pyrimidinbasenanaloge.

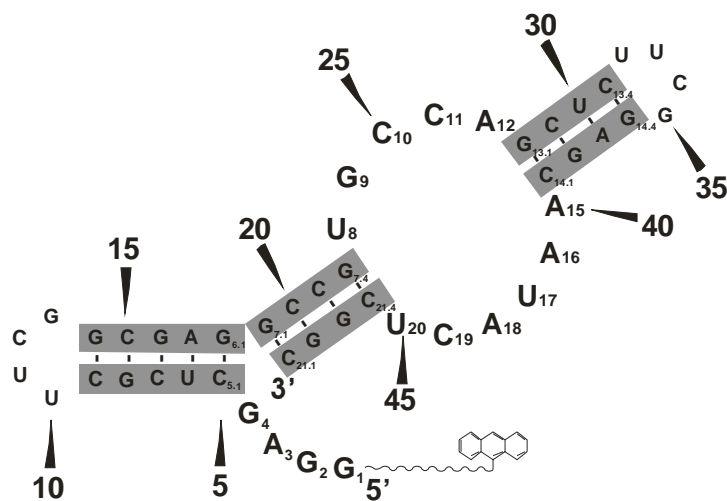


Abbildung 28: 49nt-Ribozym mit zusätzlicher fortlaufender Nummerierung im 5er-Raster.

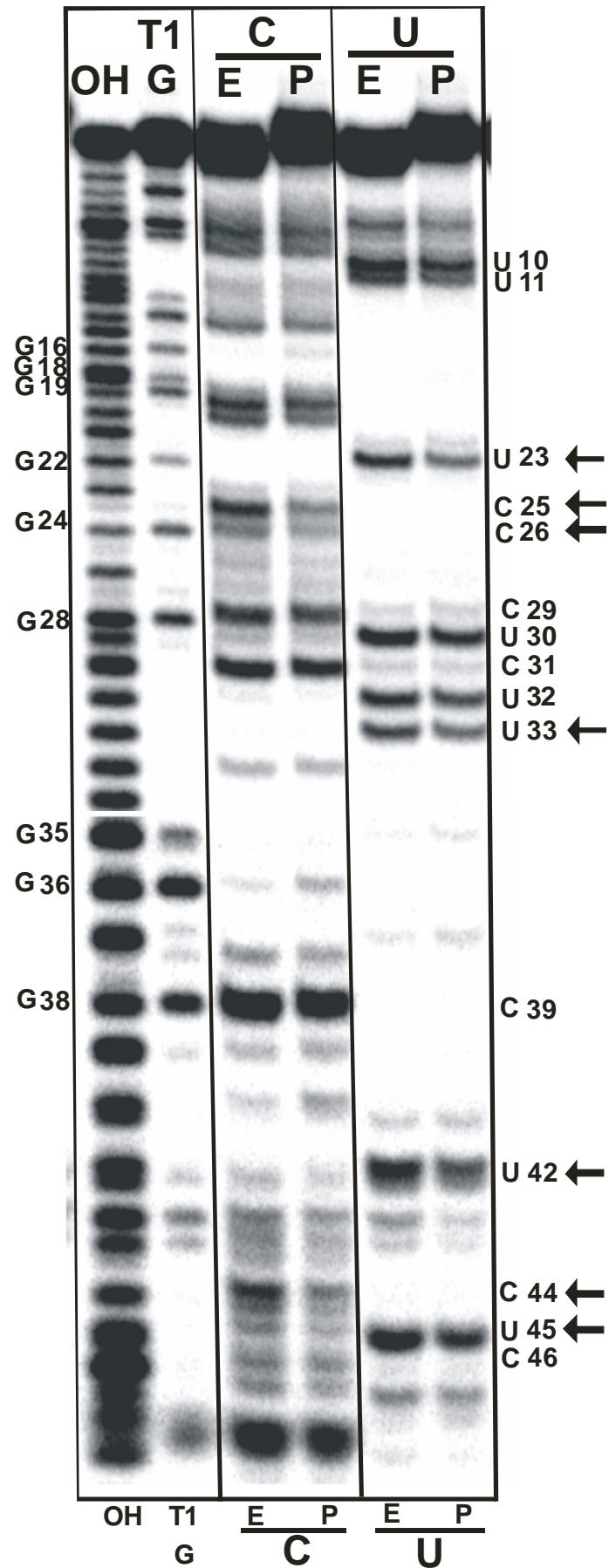


Abbildung 29: Parentale CaS und UaS Interferenzen an den C-Positionen 25, 26 und 44 (C10, 11 und 19) und an den U-Positionen 23, 42 und 45 (U8, 17 und 20), ferner an der Position 33 (U-L2.2), vgl. 5.4.1., S. 60.

Die meisten Modifikationen der letztgenannten Monomere betreffen die C5-Position und sind aufgrund der früher durchgeführten Mutationsanalyse mit 2'-Desoxynukleotidsubstitutionen, die dU→dT und damit Position 5-Methyl-Modifikationen einschließen, von geringerem Interesse. In den Abb. 27 bis 34 werden die Ergebnisse einschließlich der Monomer-Strukturformeln dargestellt. Abb. 28 zeigt die alternative fortlaufende Nummerierung der Nukleotidpositionen, die zweckmäßiger ist für NAIM-Experimente mit einsträngigen Ribozymvarianten.

5.4.1.: Parentale Phosphorothioat-Interferenzen

Die Monomere liegen je nach Verfügbarkeit entweder als Sp-Diastereoisomere oder als racemisches Sp/Rp-Gemisch vor. Es wird ausschließlich die Sp-Form während der enzymatischen Synthese akzeptiert. Beim Einbau invertiert die Konfiguration zu Rp.

Es wurden Thioat-Interferenzen mit abnehmender Stärke beobachtet an den Positionen C19, C11 und C10 (Pos. 44, 26 und 25) sowie U8, U20 und U17, (Pos. 23, 45 und 43), vgl. Abb. 29, S. 59.

Nach der Trennung auf Sequenziergelen und der Identifizierung ihrer Positionen wurden die Dichten der Edukt- und Produktbanden gemessen. Die Reaktionsumsätze der statistisch modifizierten Gesamtpopulationen von Edukten und Produkten vor den Iodspaltungsschritten wurden ebenfalls durch Dichtemessungen bestimmt. Unter Berücksichtigung dieser Messwerte konnten die Aktivitätsmesswerte nach Umrechnung wie für ortsspezifisch modifizierte Ribozyme angegeben werden (s. Abb. 30). Die erhaltenen Werte können somit mit den Daten aus früheren Mutationsstudien verglichen werden und erhalten größere Aussagekraft.

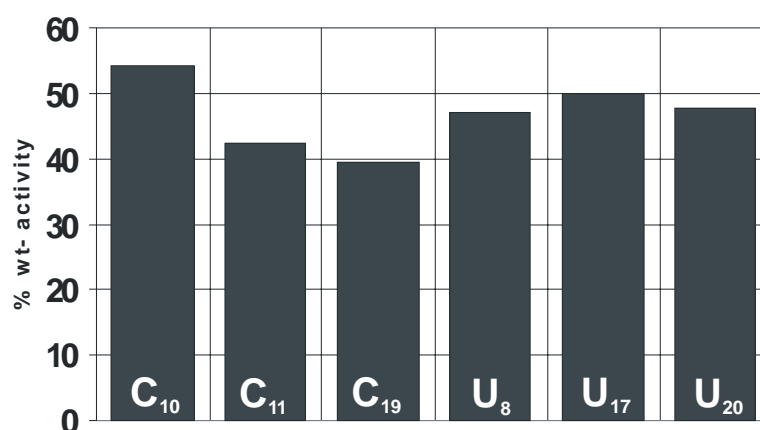


Abbildung 30: NAIM-Experimente: Parentale Thioatinterferenzen. Daten wurden aus den Dichten der Spaltungsmusterbanden von Edukten und Produkten unter Berücksichtigung der Umsatzwerte bestimmt, die vor dem Selektionsschritt von Edukt- und Produktfraktionen stattfanden.

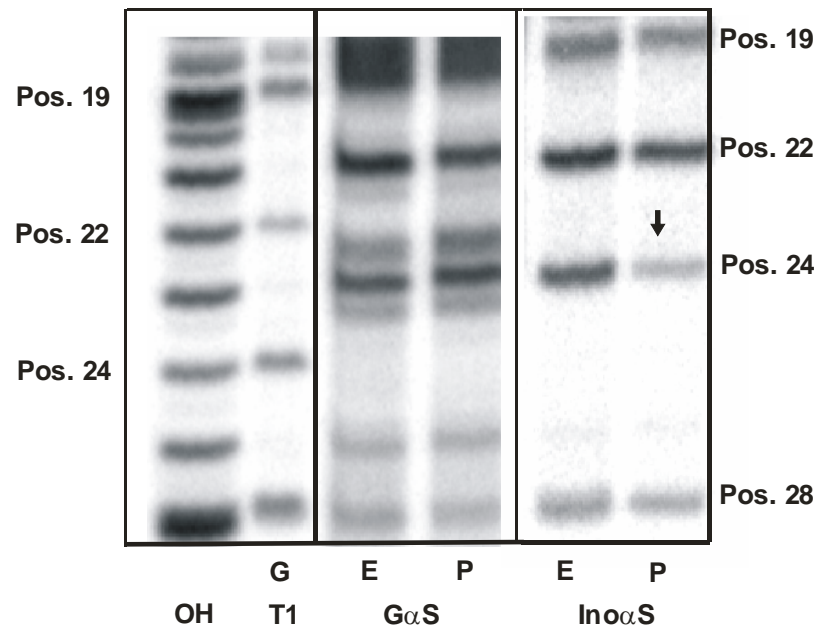


Abbildung 31: NAIM: Inosin-Interferenz an der Position G24 (G9). Links: OH- und T1-Leiter. Mitte: Parentales $G\alpha S$, etwa gleiche Dichten von Edukt- und Produktbande. Rechts: $Ino\alpha S$ -Interferenz, geringere Produktbandendichte (Pfeil).

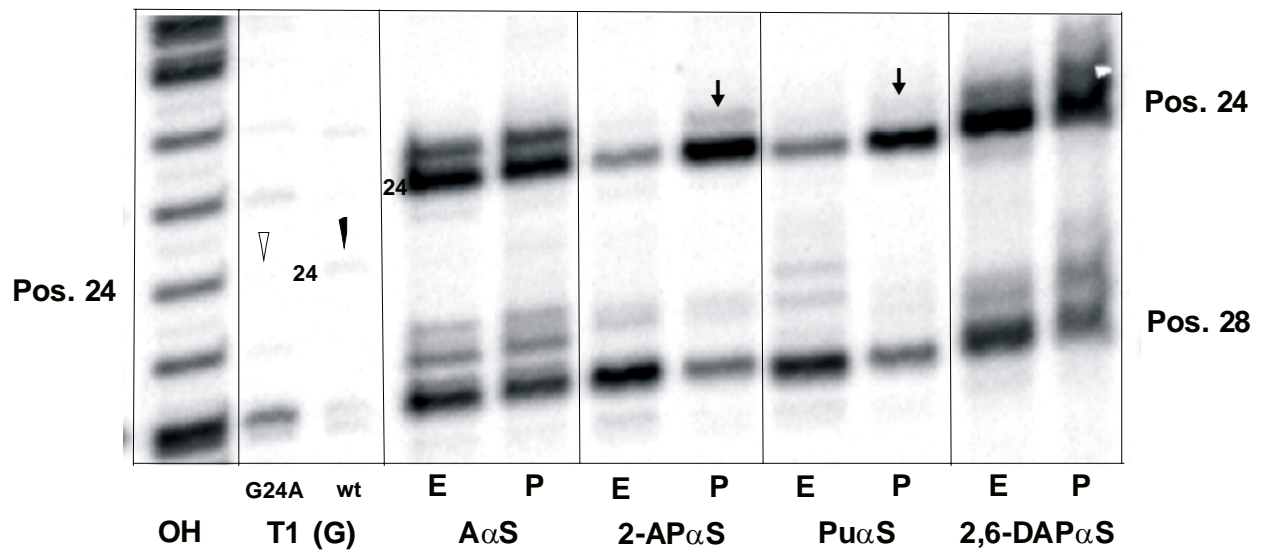


Abbildung 32: NAIM: Interferenzreversion an der Position 24 (G9). Zweite Spalte von links: T1-Leitern, die Mutante G9A zeigt keine Bande (offener Dreieckspfeil) im Gegensatz zum Wildtyp an der Pos. 24 (schwarzer Dreieckspfeil). $A\alpha S$: Parentales Analogon als Referenz, etwa gleiche Bandendichten von Edukt und Produkt. $2-AP\alpha S$ und $Pu\alpha S$: Größere Produktbandendichten (Pfeile). $2,6-DAP\alpha S$ verhält sich nahezu neutral. Interferenzen von $2-AP\alpha S$, $Pu\alpha S$ und $2,6-DAP\alpha S$ an der Position 28 (A12).

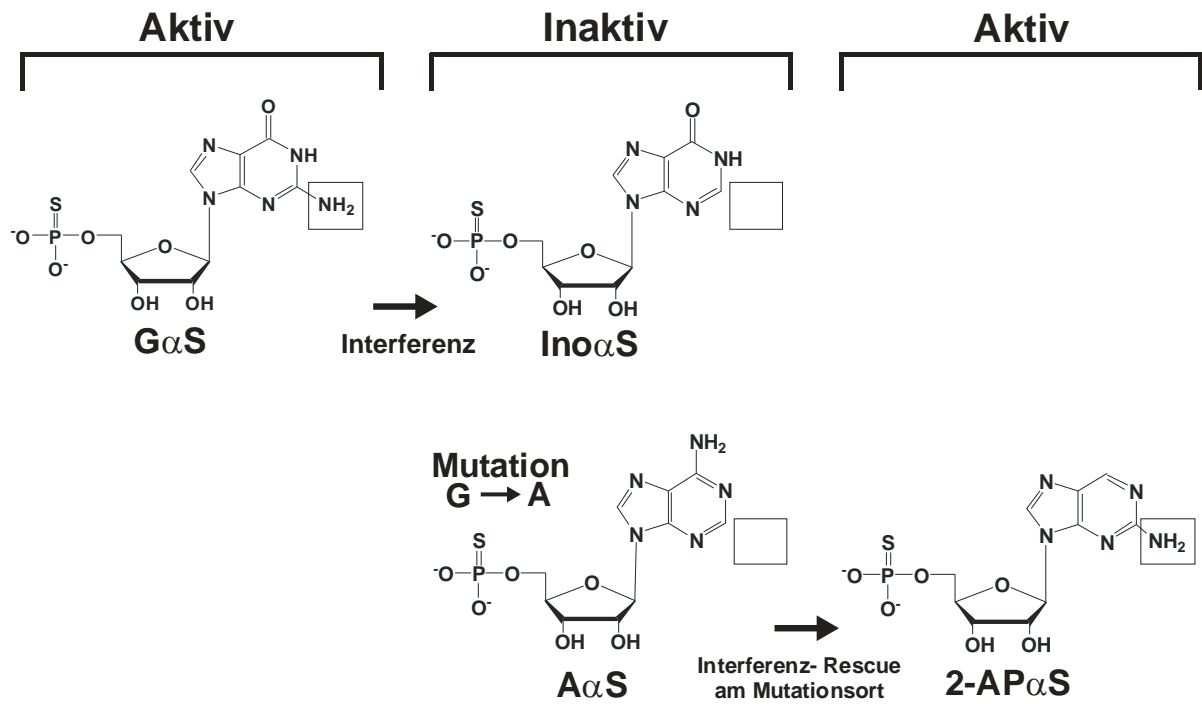


Abbildung 33: NAIM-Interferenz und Interferenzreversion. Oben: Inosin-Interferenz durch Deletion einer funktional wichtigen 2-Aminogruppe im Guanosin nach Einbau des G-Analogs Inosin- αS -Triphosphat. Unten: Interferenzreversion. Partielle Wiederherstellung der funktionalen Eigenschaften nach Einbau des A-Analogs 2-Aminopurin- αS -Triphosphat in eine ortsspezifische G \rightarrow A-Mutante. Adaptiert aus ^[96].

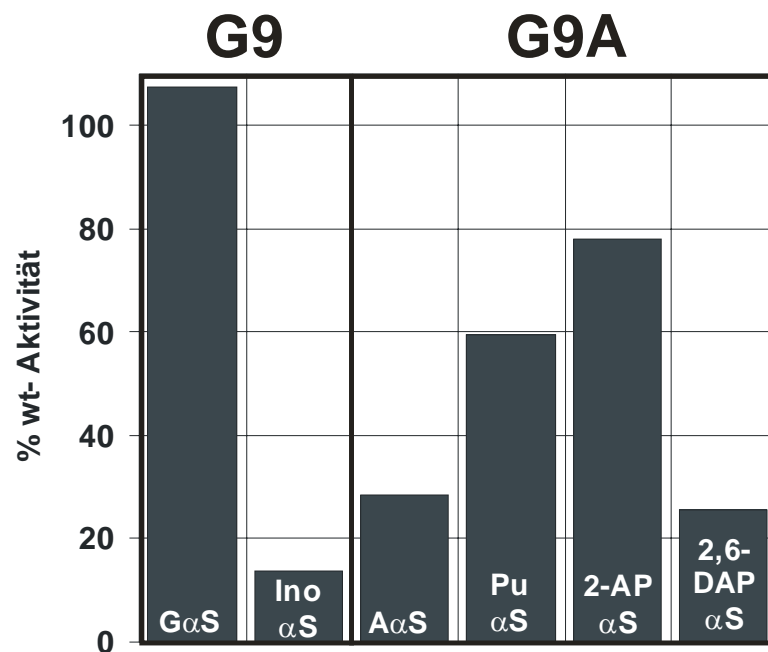


Abbildung 34: NAIM-Experimente: Inosin-Interferenz an der Position G9 (links). Interferenz-Reversionen durch die Substitutionen des G9 durch A-analoge Purin und 2-Aminopurin-Substitutionen in der Mutante G9A (rechts). 2,6-Diaminopurin verhält sich nahezu neutral gegenüber dem parentalen A αS . Die Werte wurden berechnet aus den Dichten der Spaltungsmusterbanden unter Berücksichtigung des Reaktionsumsatzes vor der funktionalen Trennung von Edukt- und Produktfraktionen.

5.4.2.: Analog-Interferenzen

5.4.2.1.: A α S- Analoga:

An der Position A18 (43) wurden folgende Interferenzen beobachtet: 7deazaA α S, 2-AP α S (AP=Aminopurin), Pu α S (Pu=Purin), weniger starke Interferenzen nach Einbau von N6-MeA α S (N6MeA= N6-Methyladenosin) und 2,6-DAP α S (DAP=Diaminopurin)

Die Beobachtungen sind ein Hinweis auf die Beteiligung der Hoogsteen-Seite des Adenin 18 an Interaktionen. Der Befund wird bestätigt durch die Kristallstruktur, sie zeigt U8-A18 als trans Watson-Crick-Hoogsteen Basenpaar, in dem das Nukleotid A18 mit seiner Hoogsteen-Seite an seinen Partner U8 über Wasserstoffbrücken gebunden ist. An der Position A12 (27) zeigten sich Interferenzen durch die Analoga 7deazaA α S, 2-AP α S und Pu α S, die mit Hilfe des Kristallstrukturmodelles nicht interpretierbar sind und vielleicht mit essentiellen temporären Konformationsänderungen zusammenhängen.

5.4.2.2.: G α S-Analoga:

An der Position G9 wurde eine signifikante Inosin- α S-Interferenz beobachtet (s. Abb. 31, S. 61 und 34, S. 62). Darüber hinaus konnte eine Interferenz-Reversion an der Position G9 beobachtet werden. Nach einer G9A-Mutation wurden deutliche positive Interferenzen beobachtet mit den Analoga 2-Aminopurinribosid-TP- α S und Purinribosid-TP- α S; eine Substitution mit 2,6-Diaminopurinribosid-TP- α S verhielt sich nahezu neutral (s. Abb. 32 und 34, S. 61/62). Als Befund einer positiven Interferenz für eine Reversion wird hier das Auftreten einer im Vergleich zur Eduktbande stärkeren Produktbande bezeichnet. Die durch eine Inosin-Substitution bewirkte Deletion der 2-Aminogruppe führt zu einer geringeren Aktivität. Letztere ist nicht essentiell, wie besonders durch die Reversion mit Purinribosid-TP- α S gezeigt wurde. Die durch eine 2-Aminopurin-Substitution bewirkte Deletion der 6-Oxo-Funktion im G9 scheint sich kaum nachteilig auszuwirken. Die Deletion der 6-Aminogruppe des Adenins durch eine Purin-Substitution scheint dagegen die Aktivität des Ribozyms zu begünstigen, wie die Reversionen durch 2-Aminopurinribosid-TP- α S und Purinribosid-TP- α S zeigen.

5.5.: Rationale ortsspezifische Substitutionen mit Nichtstandardnukleotiden

Es wurden eine Reihe Ribozymfragmente mit ortsspezifischen Substitutionen versehen, um in Aktivitätswiederherstellungsexperimenten („Rescues“) Interaktionen nachzuweisen. Es handelt sich bei den behandelten strukturellen Elementen um

1.: U8-A18 reverses Hoogsteen Basenpaar

Die verwendeten Nukleotidanaloga sind:

U8C/U8iC, A18G/A18-7deazaG

U8C/U8iC/A18-8OXOdeoxyG

2.: Basenpaare des Pseudoknotens G1-C11 und G2-C10

Die verwendeten Nukleotidanaloga sind:

G1iG/G2iG/(G1iG+G2iG)

in komplementärer Kombination mit C10iC/C11iC/C10iC+C11iC

3.: Basentriple G2-C10 mit U17 bzw. H-Brücke C10/4-NH2 mit U17/2-O

Die verwendeten Nukleotidanaloga sind:

Wie in 2., jedoch G2iG/ C10iC in Kombination mit U17iC

4.: Wasserstoffbrückenbindung zwischen U17/N3 mit G9/2'-OH

Verwendete Nukleotidanaloga:

U17C/ G9deoxyG / 2'-OMeG9

Es wurden keine Rescues bei Verwendung von komplementären Doppelmutanten beobachtet, die eine 7deazaG18-Substitution enthielten. Eine einzelne *iso*-C Substitution (iC) in der Mutante U8iC mit 0,8% wt- v_0 -Aktivität wird noch schlechter als eine U8C-Substitution toleriert (1,9% wt- v_0 -Aktivität). Am Pyrimidin der Nukleotidposition 8 wird offenbar eine 2-Amino-Substitution besonders schlecht toleriert (vgl. Abb. 35, S. 65).

Ebenso wurden bei Verwendung der komplementären Doppelmutanten A18-8Oxo-dG--U8iC konnten keine Rescues gefunden (vgl. Abb. 36, S. 65). In Hoogsteen-Anordnung könnten das 2-O und H-N7 des A18-8OXOdG mit jeweils dem 2-NH2 und N3 des U8*iso*-C (U8iC) über Wasserstoffbrücken paaren (vgl. Abb. 54F, S. 86). Alle Einzel- und Doppelmutanten mit einer U8iC-Substitution zeigten deutlich geringere Aktivität im Vergleich zu U8C-Mutanten. Bemerkenswert ist die relativ hohe Aktivität der Einzelmutante A18-8-Oxo-dG, die signifikant höher als die völlig inaktive A18G-Mutante liegt (vgl. Abb. 21, S.49 und Abb. 36, S. 65). Eine Desoxy-Substitution wird an dieser Position toleriert, wie in Abb. 25, S. 55 ersichtlich ist. Eine Erklärung für diesen Befund steht bislang noch aus.

		24mer		
		wt	8C	8iC
18mer	wt	100	7	3
	18G	0	0	0
	18-7deazaG	0	0	0

Abbildung 35: Mutationen an den Positionen 8 und 18: Es sind keine Rescues bei komplementären Doppelmutanten zu beobachten. Die geringen Aktivitätsmesswerte der Mutanten U8C und U8iC deuten auf Interaktionen unter Beteiligung der Watson-Crick-Seite des U8 hin, das in der Kristallstruktur als Partner mit seiner Watson-Crick-Seite und der Hoogsteen-Seite des A18 als Nichtstandard-Basenpaar erkannt wurde. Messwerte sind relative Umsätze nach 30 min Reaktionszeit. Für die Mutante U8C entsprechen 7% (30 min rxn) dem Wert von 1,9% wt-v₀- bzw. für U8iC 3% (30min rxn) dem Wert von 0,8%-wt-v₀-Anfangsgeschwindigkeit.

Es wurde ein geringer, aber signifikanter Rescue in der Doppelmutante G1iG--C11iC (11 % wt- Aktivität) gegenüber der Einzelmutante C11iC (1 % wt- Aktivität) beobachtet. Die Einzelmutanten G1iG sowie G2iG zeigen mit 86 % bzw. 20 % bemerkenswerte Aktivitäten. Die komplementäre Doppelmutante G2iG-C10iC und komplementäre Vierfachmutante G1iG,G2iG → C11iC,C10iC zeigten keinen Rescue und blieben inaktiv (vgl. Abb. 37, S. 66).

t rxn (min)	24mer	18mer	% yield
30	wt	wt	64,8
1122	wt	wt	79,5
30	wt	wt	65,4
1122	wt	wt	79,4
30	wt	18- 8OXOdG	8,5
1122	wt	18- 8OXOdG	38,8
30	8iC	wt	2,1
1122	8iC	wt	19,6
30	8iC	18- 8OXOdG	0,8
1122	8iC	18- 8OXOdG	6,2
30	8C	18- 8OXOdG	9,2
1122	8C	18- 8OXOdG	44,1

Abbildung 36: Mutationen an den Positionen 8 und 18: Auch bei Verwendung der Mutante A18-8Oxo-dG zeigen sich keine Rescues in komplementären Doppelmutanten. Oben. Zwei Paare mit Wildtypkinetiken als Kontrollen. Messwerte (% yield) sind relative Umsätze nach 30 min und 1122 min (ca. 18,5 h) Reaktionszeit.

		24mer			
		wt	10iC	11iC	10iC11iC
11mer	wt	100	3	1	0
	1iG	86	3	11	1
	2iG	20	1	0	0
	1iG2iG	3	0	0	0

$t_{rn} = 30 \text{ min}$ % wt- Aktivität

Abbildung 37: Doppel- und Vierfachmutationen der Positionen 1 + 2 sowie 10 + 11: Hohe Aktivität der Mutante G1iG, beachtlich aktive Mutante G2iG, signifikanter Rescue G1iG-C11iC, damit ein Hinweis auf antiparallele Anordnung der Pseudoknotenbasenpaare. G1C11 und G2C10 bilden Pseudoknotenbasenpaare. Durch Kombinationen mit U17iC und U17C als Kontrolle wurde ein Nachweis des Basentriples versucht, alle U17iC enthaltende Mehrfachmutanten wurden jedoch als vollständig inaktiv erkannt. Die Daten geben relative Umsätze nach 30 min Reaktionszeit an.

		24mer
		wt
18mer	wt	1
	17C	3
	17iC	1780

v_0 decrease factor

Abbildung 38: Mutationen an der Position 17: Die Wichtigkeit der Existenz des 2-O im U17 oder C17 für die Triple-Brücke und dessen Bedeutung spiegeln sich im Messwert der total inaktiven Mutante U17iC wider, in der das 2-O des U17 gegen eine Aminogruppe substituiert ist. Die Brücke N3 (U17) – 2'-OH (G9) ist in Abb. 43, S. 73 gezeigt. Im U17C kann das unprotonierte Akzeptor-N3 wahrscheinlich mit dem 2'-OH-Proton als alternativem Donor eine Brücke zum C17-G9 bilden. v_0 -decrease factor: Faktor der Aktivitätsabnahme bezogen auf Anfangsgeschwindigkeiten.

Die mutierten Basen sind Teil des Basentriples bzw. der Basenplattform (vgl. Abb. 44, S. 73). Zum Nachweis des Triples wurden diese 24/11mer Doppelmутanten mit der bezüglich den G2iG-C10iC-Substitutionen mutmaßlich passenden 18mer Mutante U17iC kombiniert und zur Kontrolle als 18mer die Mutante U17C eingesetzt. Jedoch zeigte keine Mutante Aktivität, die U17iC substituiert war; die Messwerte sind daher in der Abb. 37, S. 66, nicht gezeigt. Die Mutante U17iC zeigt im Gegensatz zum U17C völligen Aktivitätsverlust. Dies unterstreicht die Bedeutung der triplebildenden Wasserstoffbrücke und ihrem 2-O am U(C)17 als Akzeptorpartner des 4-NH2 am C10 im Kontext des Basentriples U17--C10--G2.

Eine U17C--2'-OMeG9 Doppelsubstitution bewirkt ca. 10-fach höheren Aktivitätsverlust im Vergleich zum Produkt der Verluste beider Einzelmutanten (vgl. Abb. 39). Die Gegenüberstellung zweier Akzeptoren wird an diesem Element des zentralen H-Brücken-Netzwerkes nicht toleriert. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem 2'-OH des G9 und dem H-N3 des U17 ist offenbar von ähnlicher herausragender Bedeutung für die aktive Struktur wie die oben erwähnte Triplebindung (vgl. Abb. 43 und 44, S. 73).

		24mer		
		wt	dG9	2'- OMeG9
18mer	wt	1	26	67
	U17C	3	67	1260

v₀-decrease factor

Abbildung 39: Mutationen an den Positionen 9 und 17. Die Wichtigkeit der Wasserstoffbrücke N3 (U17) – 2'-OH (G9) spiegelt der Messwert der Doppelmутante U17C-2'-OMeG9 mit völligem Aktivitätsverlust wider. Die Daten sind Aktivitätsabnahmefaktoren bezogen auf Anfangsgeschwindigkeiten.

5.6.: Kinetische Auswirkung der Linkerlängen und Faltungsdynamik

Es wurden unter Verwendung der zweisträngigen Ribozymvariante Kinetikexperimente durchgeführt, in denen verschieden modifizierte Substrat-11nt-Fragmente verwendet wurden. Dabei wurden zwei verschieden lange Polyethylenglykol-Linker eingesetzt, nämlich neben einem Hexaethylen- ein Dodecaethylenglykol-Linker. Außerdem wurden am 5'-Ende eines Anthracen-Dodecaethylenglykol-11mer Konjugates eine einzelne sowie eine zweifache Adenosin-Extension eingeführt. Die Versuche behandelten die Fragestellung, ob solche Extensionen unterschiedliche kinetische Eigenschaften der Konstrukte zur Folge haben. Die Möglichkeit eines Zugangs des Anthracensubstrates durch die „Vorder-“ oder „Hintertür“ des Ribozyms ^[120] und damit eine „Head“- oder „Tail“-first-Bindung wird durch die Linkerlänge bestimmt. Dieses konnte experimentell gezeigt werden und wird in der Kristallstruktur plausibel. Ein am Hexaethylenglykol gebundenes Anthracen könnte aus sterischen Gründen bedingt durch die Linkerlänge ausschließlich durch die „Hintertür“ ins aktive Zentrum gelangen. Ein Anthracen, das über einen längeren Dodecaethylenglykol-Linker gebunden ist, hätte jedoch beide Möglichkeiten. Eine der beiden Orientierungen besäße möglicherweise eine unterschiedliche Bindungskonstante für das Substrat mit der wahrscheinlichen Folge eines unterschiedlichen kinetischen Verhaltens.

Es konnte durch eine erste Serie von Kinetiken gezeigt werden, dass beide unterschiedliche Linkerlängen, Hexa- oder Dodecaethylenglykol, keine signifikanten Auswirkungen auf den kinetischen Verlauf der Reaktion haben. Eine einzelne A-Extension am 5'-Ende bewirkte eine deutliche Senkung der Reaktionsgeschwindigkeit, eine AA-Extension dagegen zeigte einen geringeren Effekt. Die beiden letzten Beobachtungen können nicht ohne weiteres interpretiert werden.

Im Fall des Reaktionsstartes mit Anthracen-11mer-Konjugat wurde ein sigmoidaler Verlauf als Initiationsphase bis ca. 100 s beobachtet. Der Effekt wurde noch signifikanter bei Abnahme der Inkubationstemperatur. Ein Start mit Magnesiumchlorid zeigte wie die Standardkinetik einen nichtsigmoidalen Verlauf. Die Magnesiumzugabe erfolgte so kurz wie möglich nach der Maleimidzugabe, um den Einfluß einer beginnenden Reaktion möglichst klein zu halten, welche auch bei Magnesiumsalz-Abwesenheit in messbarer Geschwindigkeit stattfindet. Bei einer Verzögerung von etwa 30 bis 40 Sekunden konnten jedoch keine signifikanten Umsätze gemessen werden (vgl. Abb. 40 und 41, S. 69)

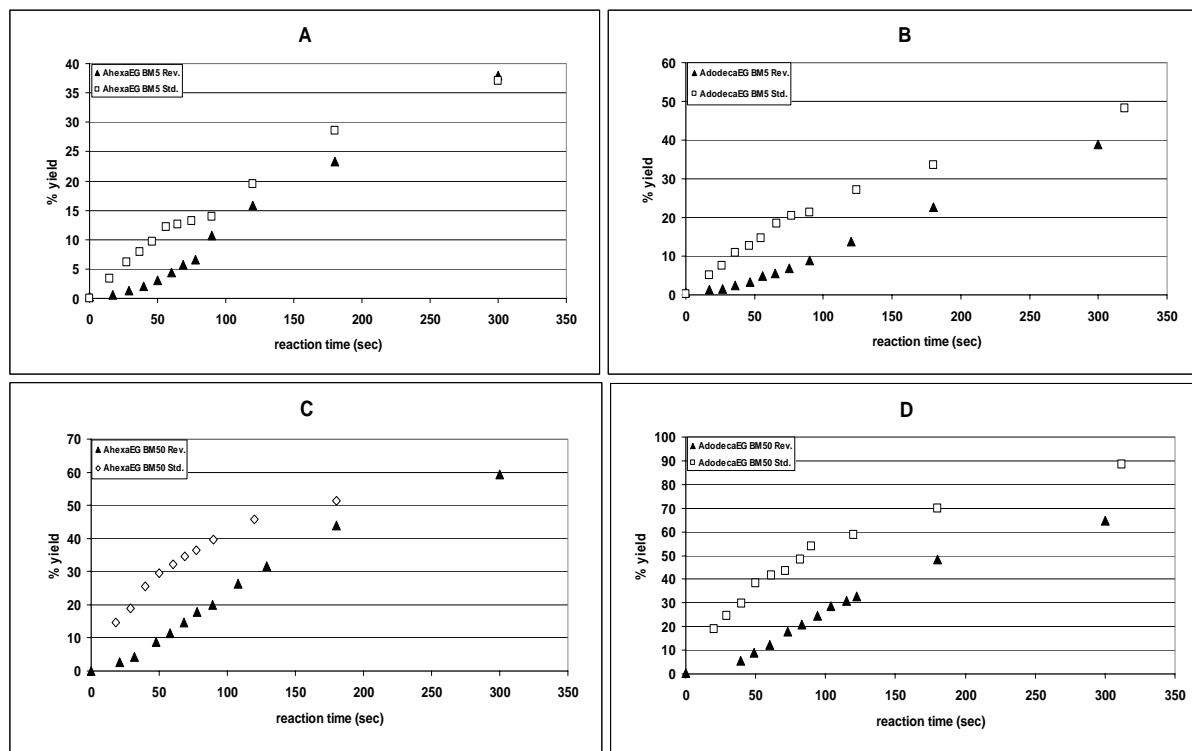


Abbildung 40: Alternativer Startmodus von Kinetiken. Offene Quadrate: Standardstart mit Biotinmaleimid. Dreiecke: Alternativer Start mit Anthracen-11mer-RNA-Konjugat. Zwei verschiedene Linkerlängen: Hexaethylglykol (Diagramme A und C), Dodecaethylglykol (Diagramme B und D). Zwei Biotinmaleimidkonzentrationen: 5 mM (A und B) sowie 50 mM (C und D). Sigmoidale Verläufe bei alternativem Start. T = 5°C.

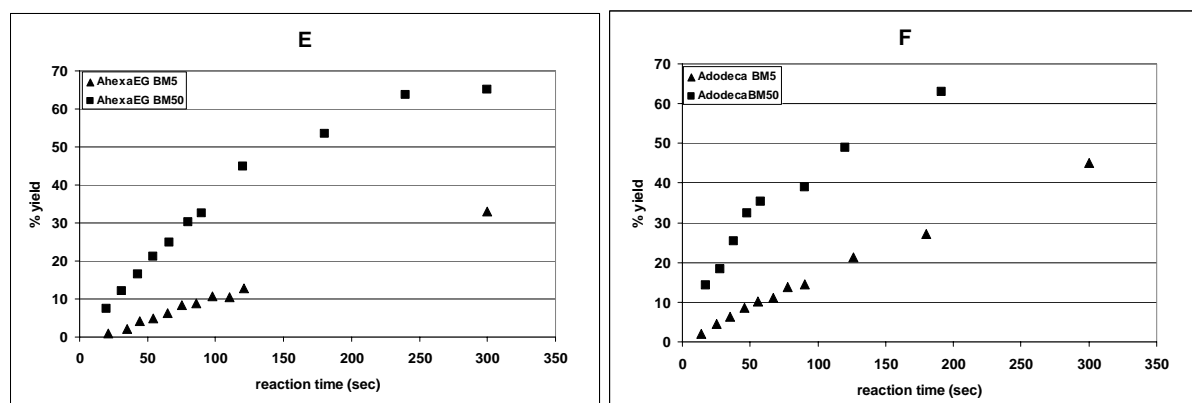


Abbildung 41: Zweiter alternativer Startmodus: Start der katalysierten Reaktion mit Magnesiumchlorid, 2mM EDTA im ungestarteten Ansatz. E: Substrat Anthracenhexaethylglykol-11mer RNA (AhexaEG), F: Substrat Anthracendodecaethylglykol (AdodecaEG). Dreiecke: 5 mM Biotinmaleimid, Quadrate: 50mM Biotinmaleimid. Keine sigmoidalen Verläufe. T = 5° C.

5.7.: Suche nach kovalenten Modifikationen durch mögliche Nebenreaktionen

Das Ribozym zeigt in Kinetiken untypisches Verhalten. Es fällt auf, dass die Umsatzplateaus zum Teil weit unterhalb von 100 % liegen. Die Fluoreszenzabnahme scheint im kinetischen

Assay biphasisch zu verlaufen. Zur Erklärung dieser Phänomene wurde als Arbeitshypothese angenommen, dass das Ribozym in einer konkurrierenden Nebenreaktion kovalent modifiziert werden könnte, z. B. durch eine Michael-Addition eines Nukleophils an Maleimid. Die Produkte solcher Reaktionen sollten isolierbar und identifizierbar sein, sofern sie stabil wären. Es wurden Versuchsreihen durchgeführt, um solche Nebenprodukte zu finden. Hierzu wurden die Fragmente der dreisträngigen Ribozymversion radioaktiv 5'-markiert, neben 5'-markiertem unmodifizierten 11mer wurde parallel auch 3'-markiertes 11mer-Anthracen-Konjugat als normales Substrat eingesetzt. In Aktivitätstests wurde alternativ das 18mer oder das 24mer als markiertes Fragment eingesetzt. Als Kontrollen dienten Ansätze, in denen statt des 11mer-Anthracen-Konjugates unmodifiziertes 11mer eingesetzt wurde.

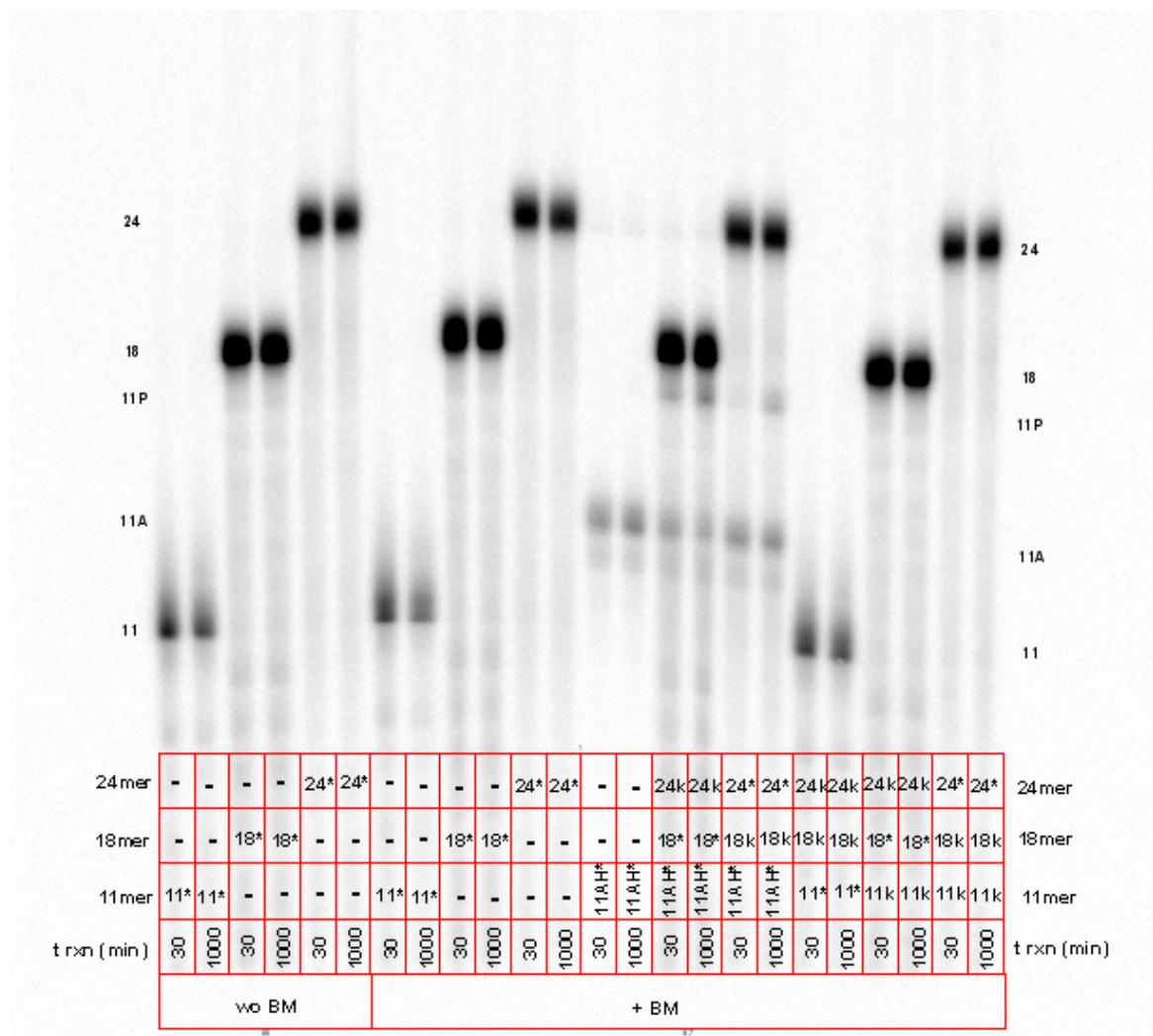


Abbildung 42: Suche nach kovalenten Modifikationen. Oligonukleotide mit * gekennzeichnet: 5'-radioaktiv markiert (außer 11A#), k: „kalte“ unmarkierte RNA-Fragmente. 11A#: 3'-markierte 11mer-Anthracen-HEG-Konjugate. 11* und 11k: Nichtkonjugierte 11mer-RNA-Oligos. BM: Biotinmaleimid. Ohne BM-Zugabe: wo BM. 11A und 11P: 11mer-Edukte und Produkte. Reaktionszeit: t rxn. Es sind keine Banden zuerkennen, die auf kovalente Modifizierungen hinweisen.

Weiterhin wurde in Kontrollansätzen jeweils ein einziges der drei Fragmente einschließlich dem unmodifizierten 11mer entweder mit, oder ohne Biotinmaleimid (BM) eingesetzt. Das 11mer- Anthracen-Konjugat wurde mit BM in einem weiteren Kontrollansatz eingesetzt (s. Abb. 42, S. 70)

Die Experimente geben keinen Hinweis auf kovalente stabile Nebenreaktionsprodukte, die eine geringere elektrophoretische Mobilität im Vergleich zum unmodifizierten Produkt zeigen müßten.

Eine Erklärung für das oben erwähnte atypische kinetische Verhalten gibt es weiterhin nicht

5.8.: Suche nach möglichen Ribozym-Di- oder Oligomeren mit nativer PAGE

49nt-Ribozym wurde im nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel einer Elektrophorese unterzogen (PAGE). Hierbei wurde als Elektrophoresepuffer ein modifizierter Reaktionspuffer verwendet, der statt $MgCl_2$ Magnesiumsulfat in derselben Konzentration zur Verhinderung von elektrolytisch bedingter Chlorgasentwicklung enthielt. Es wurde durch 5'-Kinasierung radioaktiv markiertes Ribozym in verschiedenen Anteilen zugesetzt, um die Unterscheidung von möglichen Artefaktbanden zu ermöglichen. Es wurden keine Banden mit geringerer Mobilität beobachtet, die auf Dimere oder Multimere unter nativen Bedingungen hindeuten. Das Ribozym liegt daher offenbar als Monomer vor.

6.: DISKUSSION

6.1.: Strukturelle Elemente

Die folgende Diskussion ist gegliedert nach strukturellen Elementen aus der Kristallstruktur des Ribozyms. Die wichtigsten Elemente bestehen in den hier als externe Gerüsthelices bezeichneten Helices I und III, den zwei Minihelices des verschränkten doppelten Pseudoknotens, der hier zentrale Gerüsthelix genannten Helix II und dem mit ihr über zwei Magnesiumionen verbundenen scharfen Turn. Einige dieser Elemente sind im aktiven Zentrum Teilnehmer eines zentrales Wasserstoffbrücken-Netzwerkes, das sich von einem Basentriple über das Nukleotid G9 zum Maleimidrest des Produktes ausdehnt. Ein Pseudoknoten-Paar ist in einer Basenplattform angeordnet. Eine Besonderheit stellt das Nichtstandard-Basenpaar U8-A18 des Ribozyms dar, das zum Hoogsteen-Typ zählt. Das in einer Ebene befindliche Paar A12-A15 könnte zwar ebenfalls als Nichtstandardbasenpaar betrachtet werden. Es ist aber fraglich, ob dieses überhaupt als echtes Basenpaar gelten kann, da es wahrscheinlich nicht über Wasserstoffbrücken interagiert (vgl. 6.2.1.2.).

Anmerkung: Im Rahmen der Strukturdiskussion, insbesondere bei der Behandlung von Wasserstoffbrücken-Interaktionen, wird vorausgesetzt, dass die Tautomeriegleichgewichte für Nukleobasen weit auf den Keto- und Amino-Seiten liegen. Präzise Angaben von atomaren Abständen in der Diskussion sind zu relativieren angesichts einer mäßigen Auflösung der Kristallstruktur von ca. 3 bis 3,5 Å. Wenn nicht anders erwähnt, beziehen sich die Angaben auf Abstände zwischen zwei atomaren Zentren.

6.2.: Aktives Zentrum mit einem zentralen Wasserstoffbrücken-Netzwerk

6.2.1.: Zentrales Wasserstoffbrücken-Netzwerk und Pseudoknoten A3U20-G4C19

6.2.1.1.: Pseudoknoten G1-C11 + G2-C10 und A3U20-G4C19

Die Nukleotide GGAG des 5'-Terminus wurden im Rahmen der Mutationsstudien als streng konserviert erkannt. Alle vier Positionen sind nach den Daten der Kristallstruktur in Interaktionen involviert, sie sind im Kontext der Ribozymfaltung von besonderer Bedeutung. Ihre Partner sind die drei streng konservierten Nukleotide C10, C11 und U20 sowie das geringer konservierte C19 (s. Abb. 43 und 44, S. 73). Die Nukleotide A3 und G4 sind Bestandteil einer Minihelix mit ihren Partnern U20 und C19, ihre Interaktionen konnten durch komplementäre Substitutionen eindeutig nachgewiesen werden (s. Abb. 23 und 24, S. 52 und 53). Diese Minihelix bildet eine Hälfte des im Kristallstrukturmodell beobachteten doppelten Pseudoknotens. Der Fokus wurde darüber hinaus auf die Nukleotide G1 und G2 gerichtet, deren Interaktionen mit C10 und C11 als Standardbasenpaare in einer Minihelix den zweiten

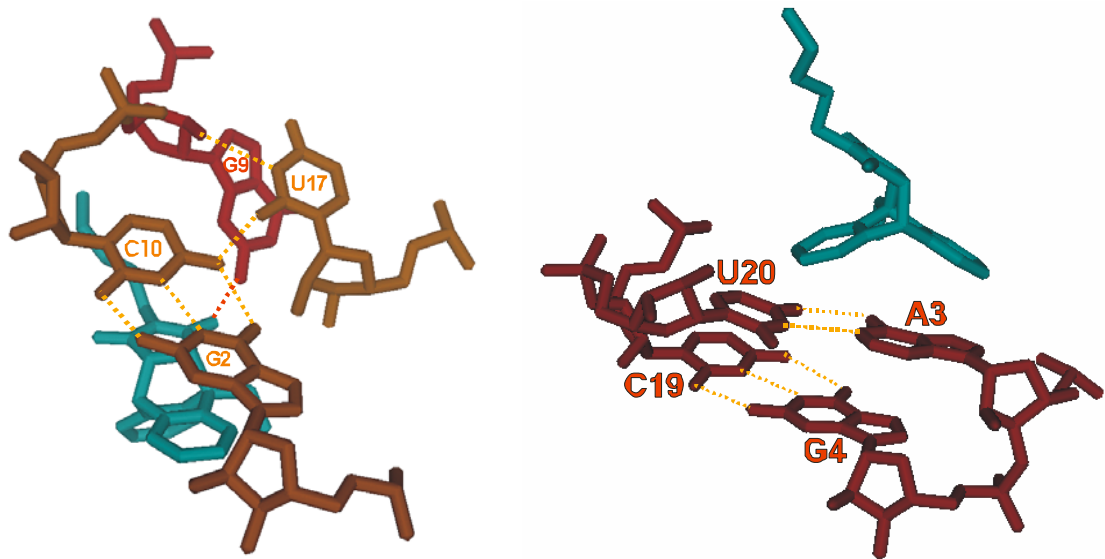


Abbildung 43: Links: Zentrales Wasserstoffbrücken-Netzwerk. Basentriple G2-C10 mit U17 (orange). Brücken U17-G9 (orange) und G9-Maleimid-Carbonylsauerstoff (rot) des Diels-Alder-Produktes (blau). Rechts: Pseudoknoten bestehend aus den Basenpaaren A3U20 und G4C19 gestützt durch kompensatorische Doppel- und Vierfach-Substitutionsexperimente.

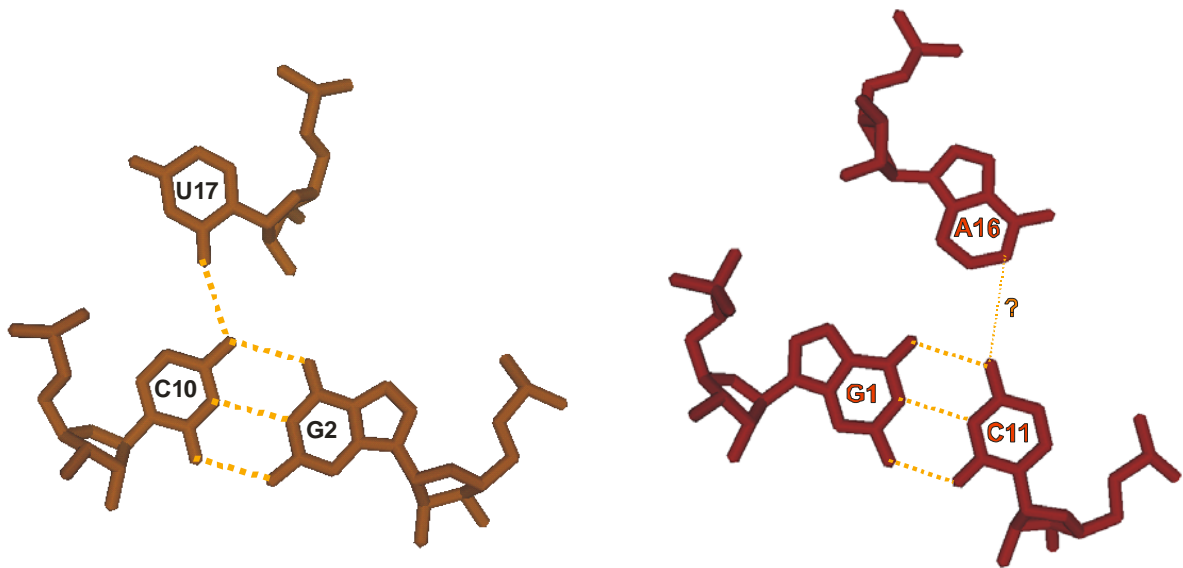


Abbildung 44: Links: Basentriple G2-C10-U17. Rechts: Basenplattform Basenpaar G1-C11 und in derselben Ebene liegendes Nucleotid A16. Eine Triplebildung über Wasserstoffbrückenbindungen erscheint unwahrscheinlich.

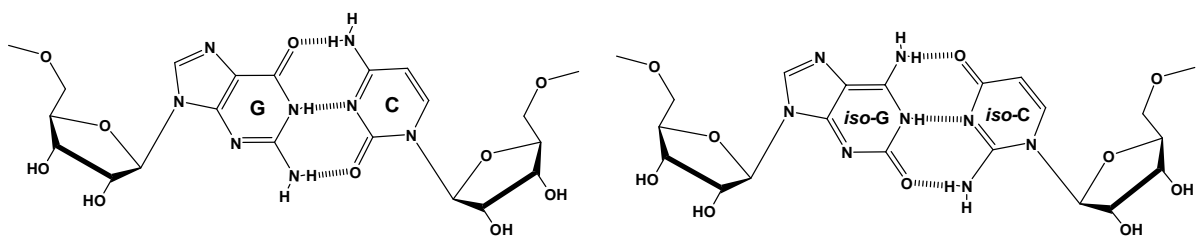


Abbildung 45: Standardbasenpaar G-C und isosterisches Nichtstandardbasenpaar *iso-G*---*iso-C*.

Pseudoknoten bilden und zudem Teil jeweils eines Basentriples und einer Basenplattform sind. Die Isomere *iso*-Cytosin- (*iso*-C, iC) und *iso*-Guaninnukleotide (*iso*-G, iG) sind zueinander komplementär und zur Basenpaarung fähig. *iso*-C-*iso*-G-Paare sind in der Literatur als ähnlich thermodynamisch stabil und als isosterisch zu G-C-Basenpaaren beschrieben ^[121]. Ihre Verwendung in Punktmutanten bietet die Möglichkeit, durch Wiederherstellungsexperimente Interaktionen zwischen den genannten Positionen zu prüfen. Beim ortsspezifischen Einbau der Nukleotidanaloga *iso*-Cytidin (iC) und *iso*-Guanosin (iG) konnte ein geringer Rescue bei der Untersuchung der Doppelmutante G1iG - C11iC (11% wt-Aktivität) gegenüber der Einzelmutante C11iC (1 %) und damit ein Hinweis auf deren Interaktion als Standard-Watson-Crick-Basenpaar gezeigt werden. Die Einzelmutante G1iG zeigte mit 86 % überraschend hohe Aktivität, die Mutante G2iG geringere Aktivität mit 20 % gegenüber dem Wildtyp. Die Befunde sind bemerkenswert, da es die ersten Modifikationen sind, die an diesen, bisher als streng konserviert geltenden Positionen toleriert wurden. Eine Erklärung bietet eine Konformationsänderung in der Größenordnung einer Bindungslänge in der Basenpaarebene, die für iG1 oder iG2 zwei alternative Wasserstoffbrücken zu ihren nur partiell komplementären Cytidin-Partnern C11 und C10, nämlich Amino-6 (iG) -- N3 (C) sowie HN1 (iG) -- O2 (C), ermöglichen würden (vgl. Abb. 46). Der thermodynamische Verlust gegenüber dem Wildtyp würde formal jeweils lediglich der Differenz an freier Energie einer H-Brücke entsprechen. Insbesondere am G1, das sich im Gegensatz zum G2 in einer Ebene außerhalb der Bindungstasche befindet, könnte eine gewisse Flexibilität der Konformation vorliegen, da es sich am 5'-Terminus befindet und der sich dort fortsetzende HEG-Linker offenbar nicht an spezifischen Interaktionen mit dem Ribozym teilnimmt.

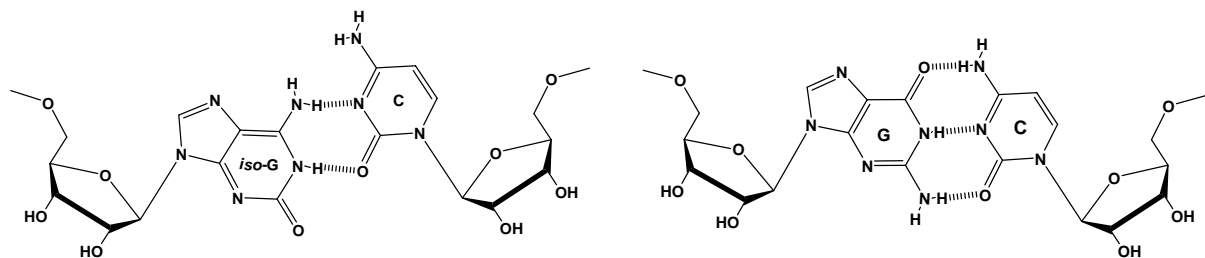


Abbildung 46: Links: Mögliches *iso*-G-C-Paar in den partiell aktiven Mutanten G1iG und G2iG, die gegenüber dem Wildtyp-G-C eine Konformationsänderung als Verschiebung der Basen um ca. 1,5 Å in ihrer Ebene voraussetzt. Rechts: G-C-Standardbasenpaar.

Die relativ hohe Aktivität der Mutante G1iG würde einer solchen strukturellen Eigenschaft entsprechen. Eine analoge Anordnung im G2iG würde zwar die Stabilität des G2-C10-Paares schwächen, nicht jedoch notwendigerweise die essentielle Triplebindung zwischen C10 und U17 beeinflussen. Im Einklang mit dieser Interpretation ist auch der Messwert von 20% wt-Aktivität der Mutante G2iG.

6.2.1.2.: Basentriple G2-C10-U17 und Basenplattform G1-C11-A16

Triple-Experiment und die Wichtigkeit des O2 an der Position 17

Versuche, in denen ortsspezifische *iso*-C- und *iso*-G-Substitutionen verwendet wurden, richteten sich auf den Nachweis des in der Kristallstruktur vorhandenen Basentriples G2-C10-U17. Darin ist das O2 des U17 mit der 4-Aminogruppe des C10 über eine Wasserstoffbrücke gebunden. Das C10 seinerseits ist Partner des Watson-Crick-Basenpaares C10-G2. Eine mögliche alternative und vollständig komplementäre Triple-Substitution besteht in der Kombination U17iC-C10iC-G2iG (vgl. Abb. 47, S. 76). In einer U17iC-Mutation ist die Position 2-O gegen eine Aminogruppe substituiert, ferner liegt der Ringstickstoff N3 deprotoniert vor. Die 2-Aminogruppe des 17iC könnte mit dem 4-O des 10iC interagieren. Das Standardbasenpaar C10-G2 wäre durch ein iC10-iG2 Paar substituiert, das als isosterisch und ähnlich thermodynamisch stabil beschrieben wurde ^[121]. In dieser Konstellation wäre ein komplementäres Akzeptor-Donor-Muster im alternativen Triple vorhanden. Veränderungen funktioneller Gruppen an den Positionen 3 (HN→N) und 4 (O→NH₂) im U17 werden toleriert, wie bei der Verwendung der Einzelmutter U17C gezeigt werden konnte. Aktivitätstests mit allen Mutanten einschließlich U17iC-C10iC-G2iG, die eine U17iC Substitution enthielten, zeigten jedoch völligen Aktivitätsverlust, ebenso die Doppelmutter G2iG-C10iC sowie die nahezu inaktiven Mutanten C10iC mit 3 % und C11iC mit 1 % wt- Aktivität. Die Wasserstoffbrücke gebildet zwischen U17 2-O und C10 4-NH₂ kann somit als essentiell betrachtet werden. Das Akzeptor-Donor-Paar ist hierbei nicht invertierbar. Eine mögliche Erklärung liegt in der Bindungsgeometrie im Triple, wie es im Kristall vorliegt. In einer invertierten H-Brücke 2-Amino (17iC) -- 4-O (10iC) läge der NH-Donor nicht mehr wie im Wildtyp kollinear zu seinem Akzeptor-O vor, wie es für eine optimale Interaktion notwendig wäre (vgl. Abb. 47, S. 76). Eine solche Geometrieänderung, die eine Invertierung des Akzeptor-Donor-Paares bewirkt, wird an diesem Strukturelement offenbar nicht toleriert.

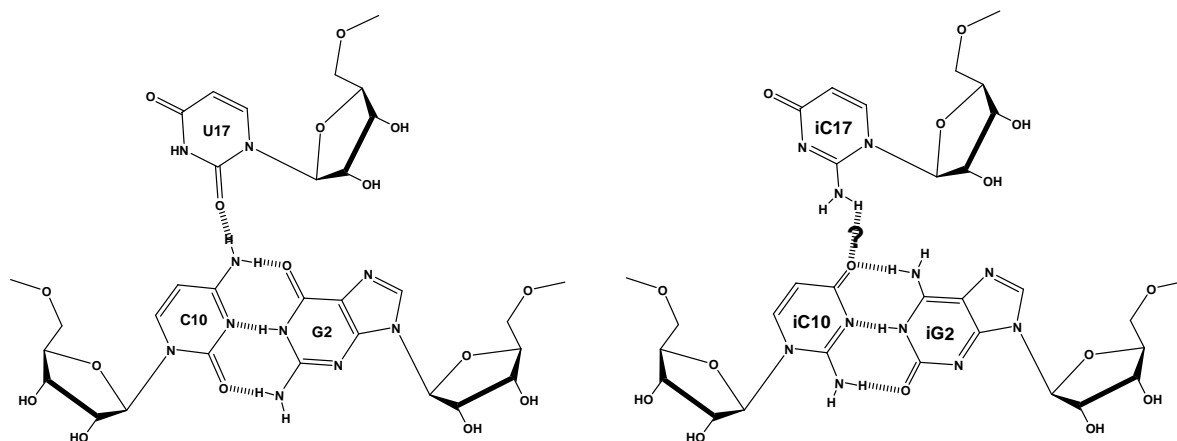


Abbildung 47: Basentriple: Wildtyp-Triple G2-C10-U17 (links). Alternatives Triple iG2-iC10-iC17 (rechts) bei gleicher Anordnung und komplementärem alternativen Akzeptor-Donor-Muster. 2-NH₂ (17iC) -- 4O (10iC) Brücke ist nicht kollinear angeordnet. Das wt-Triple ist offenbar ohne Änderung des strukturellen Kontextes nicht substituierbar. Die Änderung des HN3 (U17)-Donors zum N3-Akzeptor im iC wird noch gut toleriert, wie durch Aktivitätstests der Mutante U17C gezeigt wurde.

Dessen Bedeutung beruht wahrscheinlich darauf, dass es sich um einen Kreuzungspunkt der beiden asymmetrischen Bulgesegmente in der Tertiärstruktur handelt, der für die gesamte Faltung des aktiven Ribozyms essentiell ist. Der Grund für die bereits früher festgestellte Pyrimidin-Präferenz an der Position 17 (vgl. Abb. 21, S. 49) wird am Kristallstrukturmodell sofort deutlich. Ein Purin wäre aus geometrischen und sterischen Gründen nicht in der Lage, im Gesamtkontext der Faltung ein solches Triple zu bilden und wäre an der dort existierenden Oberfläche der Bindungstasche zu sperrig ^[58, 59]. Darüber hinaus wird aus dem Akzeptor-Donor-Interaktionsmuster des Tripels deutlich, warum eine Inversion des G2-C10-Basenpaares im Gesamtkontext der Faltung nicht toleriert wird.

Ansätze, eine mögliche Interaktion des A16 mit seinen Nachbarn C11-G1 im Zusammenhang mit deren Anordnung in einer Basenplattform nachzuweisen, wurden verworfen, da bei Untersuchung der Kristallstruktur keine passenden Akzeptor-Donor-Partner für A16 in einer für H-Brücken ausreichenden Entfernung zu erkennen sind. Die Nukleobase A16 befindet sich in einer Nische, in der es wahrscheinlich nicht über H-Brücken, sondern durch Stacking-Wechselwirkungen mit seinen koplanar angeordneten Nachbarn A15 und U17 im Zusammenhang mit dem ausgedehnten Stacking-Bereich G7.4--A15 stabilisiert ist (Abb. 49, S. 77). Passende doppelte Substitutionen der Plattform-Nukleotide und Rescue-Experimente bieten sich nicht an. Eine spezifische, für die Ribozymaktivität essentielle polare Interaktion der Adenin-16 Base mit seinen Nachbarn erscheint auch unwahrscheinlich, weil im Rahmen der

Mutationsanalyse gezeigt werden konnte, dass einzelne Basensubstitutionen mit C, G oder U gleichermaßen an dieser Position relativ gut toleriert werden (vgl. Abb. 21, S. 49). Eine ähnliche Situation wie oben beschrieben betrifft die in einer Ebene über ihre Watson-Crick-Seiten angeordneten Nukleotide A12 und A15 (s. Abb. 48, die für die Mutante A12G gilt).

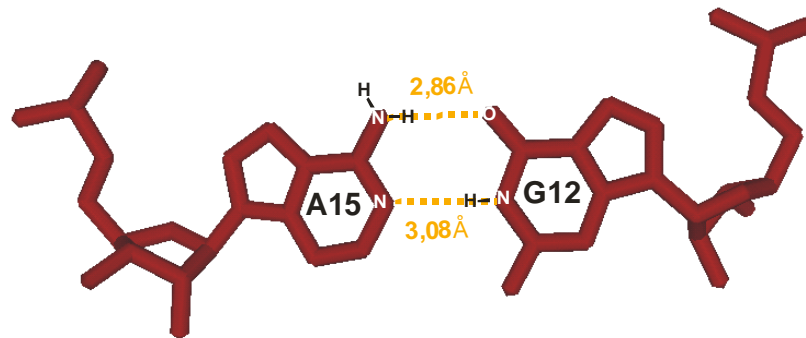


Abbildung 48: Nichtstandardbasenpaar G12-A15 in *cis*-Watson-Crick-Watson-Crick-Anordnung, das in der Mutante A12G der Kristallstruktur vorliegt. Im Gegensatz zum Wildtyp-A12-A15 erscheint eine Basenpaarung in dieser Anordnung über Wasserstoffbrücken möglich. Mutationsanalysen zeigten eine relativ geringe Konservierung des A15 und eine Purin-Präferenz an der Position 12 (vgl. 5.1.1., S. 49). Spezifische Interaktionen über H-Brücken, die für die aktive Faltung entscheidend sind, erscheinen daher unwahrscheinlich. Beide Nukleobasen sind in möglicherweise wichtigere Stacking-Interaktionen mit ihren Nachbarn eingebunden.

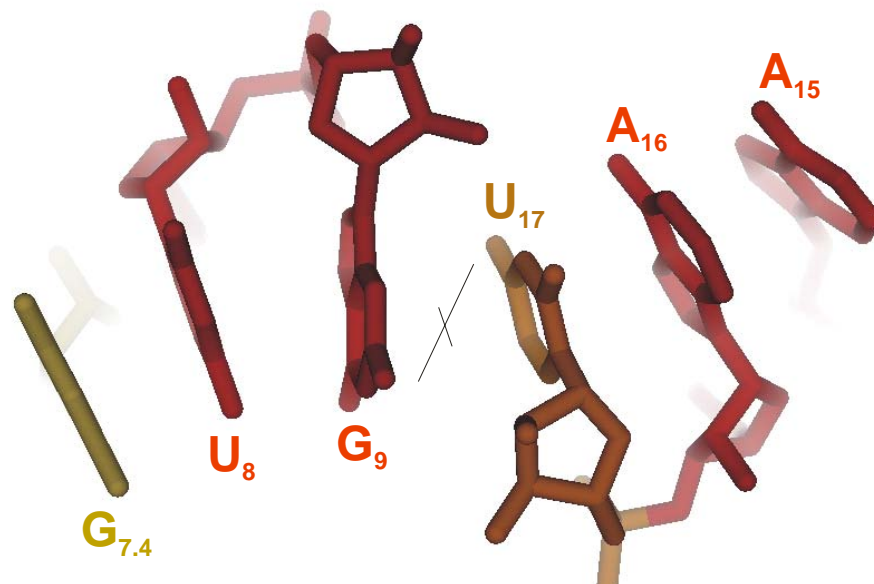


Abbildung 49: Stacking-Bereich G7.4–A15. Die Anordnung der sechs Basen ist nahezu koaxial. Die Bulge-Überkreuzung zwischen den Nukleotiden G9 und U17 wird durch „X“ symbolisiert.

Es lassen sich keine Akzeptor-Donor-Partner für spezifische polare Interaktionen erkennen. Auf kompensatorische Substitutionsexperimente wurde daher verzichtet. Beide Basen scheinen im Wesentlichen in Stacking-Interaktionen involviert zu sein, A15 mit seinem Nachbarn A16 und den weiteren Teilnehmern im ausgedehnten Stacking-Bereich G7.4--A15 (Abb. 49, S. 77) sowie A12 partiell mit C11 als Teil der Dreibasen-Plattform. Das Nukleotid A15 wurde wie A16 als nicht streng konserviert erkannt; an der Position 12 wurde eine Purin-Präferenz festgestellt, wahrscheinlich wegen besserer Stacking-Interaktion mit benachbarten Nukleobasen. Wie im Fall des A16 erscheint eine spezifische dipolare Interaktion, die für die Ribozymaktivität bedeutend wäre, unwahrscheinlich.

6.2.1.3.: Kontext zum Triple: Interaktion des G9 mit U17

Als Bestandteile des zentralen Wasserstoffbrücken-Netzwerkes wurden ferner die Nukleotide G9 und U17 modifiziert. Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang die Brücke 2'-OH (G9) - HN3 (U17) (Ringstickstoff). Zur Untersuchung dieser Bindung wurde die Modifikation 2'-OMeG an der Position G9 in Kombination mit U17C eingesetzt. Im Cytidin 17 der Mutante U17C ist der Ringstickstoff N3 unprotoniert, der damit vom Donor (HN) zum H-Brückenakzeptor wird. Der Partner 2'-OH des G9 kann sowohl als Akzeptor, als auch als Donor fungieren, eine H-Brücke zum G9 bleibt daher in der U17C-Mutante wahrscheinlich erhalten. Die Beobachtung, dass die Aktivität dieser Mutante relativ wenig (Faktor 2,7 bezogen auf Anfangsgeschwindigkeiten) gegenüber dem Wildtyp absinkt, entspricht dieser Annahme. Eine 2'-OMe-Modifikation dagegen könnte ausschließlich als Akzeptor fungieren. Die Doppelmutante 2'-OMeG9---U17C sollte also keine H-Brücke an dieser Position zulassen, da sich zwei Akzeptoren gegenüberstünden. Tatsächlich wird diese Annahme gestützt durch die Beobachtung eines praktisch vollständigen Aktivitätsverlustes auf ca. 1/1700 wt-Aktivität dieser Doppelmutante. Dagegen sinken die Aktivitäten der Einzelmutanten U17C lediglich um den Faktor 2,7 und 2'-OMeG9 um den Faktor 67 bezogen auf Anfangsgeschwindigkeiten (vgl. Abb. 39, S. 67). Der Aktivitätsverlust der Doppelmutante ist etwa um den Faktor 10 höher als das Produkt aus beiden Messwerten der Einzelmutanten. Die relativ geringe Aktivität der Einzelmutante 2'-OMeG9 kann möglicherweise durch eine sterische Hinderung der Methylgruppe oder eine Abschirmung der negativen Partialladung des Akzeptor-Sauerstoffes durch den Methylrest erklärt werden.

6.2.1.4.: Substratbindung via G9

NAIM: Interferenzen am G9 und Interferenzreversionen durch 2-Aminopurin und Purin

Die Kristallstruktur legt nur wenige Wasserstoffbrückenbindungen mit den Substraten nahe. Eine dieser Bindungen könnte für den Katalysemechanismus wichtig sein und wurde hier im Rahmen der NAIM-Studien näher untersucht. Ein Partner in dieser H-Brücke ist die 2-Aminogruppe des G9, das mit dem Maleimid-Carbonylsauerstoff des Produktes interagiert. Es wurde eine deutliche Inosin-Interferenz an der Position G9 beobachtet. Die durch eine Inosin-Substitution bewirkte Deletion der 2-Aminogruppe am Guanosin führt zu einer geringeren Aktivität (ca. 13 %). Neben einer Inosin-Interferenz (vgl. Abb. 31/34, S. 61/ 62) konnte eine partielle Wiederherstellung der Ribozymaktivität (Interferenzreversion) durch den Einbau von 2-Aminopurin bzw. Purin in die Mutante G9A erreicht werden. Die durch eine 2-Aminopurin-Substitution bewirkte Deletion der 6-Oxo-Funktion im G9 wirkt sich somit kaum nachteilig aus. Die durch eine Purin-Substitution bewirkte Deletion der 6-Aminogruppe des Adenins, die in der geringer aktiven Mutante G9A auftritt, scheint dagegen die Aktivität zu begünstigen, wie die Interferenzreversionen durch 2-Aminopurin und Purin zeigen. Die Wiederherstellung ist im Falle des 2-Aminopurin deutlich ausgeprägter gegenüber Purin. Ein gemessener Umsatz der 2-Aminopurin-Mutante von ca. 80 % nach 30 min kommt dem des Wildtyps (ca. 90-95 %) bereits sehr nahe. Im Falle der Purinmutante betrug er ca. 60 %. Ein Einbau von 2,6-Diaminopurin (DAP) verhielt sich nahezu neutral (vgl. Abb. 34, S. 62). Im Kristall scheint die 2-Aminogruppe des G9 mit dem Carbonyl-Sauerstoff des Maleimides im Diels-Alder-Produktmolekül über eine Wasserstoffbrücke gebunden zu sein. Der Abstand zwischen den atomaren Zentren beträgt 3,20 Å. Eine damit verbundene verbesserte Bindung und Orientierung des Maleimides zum Anthracen im produktähnlichen Übergangszustand erscheint daher plausibel. In Übereinstimmung mit früheren Mutationsstudien, in denen G9 als nahezu, aber nicht absolut konserviert erkannt wurde, ist die 2-Aminogruppe jedoch nicht essentiell, wie die Tolerierung von Purin an dieser Position zeigt. Das legt die Schlußfolgerung nahe, dass über die Guanin-Base G9 kein für die Katalyse essentieller, wie z. B. ein elektronenziehender Effekt, am Dienophil Maleimid wirkt. Der beobachtete, nachteilige Effekt einer 6-Aminogruppe steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer verschlechterten Koordinierung an der Peripherie des Ribozyms. In unmittelbarer Umgebung befindet sich ein Mg^{2+} -Ion (Nr. 5) samt Hydrathülle. Eine 6-Amino-Gruppe könnte im Gegensatz zum 6-O mit peripheren Hydrathüllen-Protonen schlechter in polaren Wechselwirkungen interagieren. Das

Magnesiumion Nr. 5 spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Bulge-Überkreuzung G9-U17 (vgl. Abb. 50).

6.3.: Parentale Thioatanaloga: Die Rolle einzelner Magnesiumionen

Es wurden Interferenzen durch parentale Thioatanaloga an den Bulge-Positionen C10, C11, und C19, sowie an den Positionen U17 und U20 beobachtet. Diese konnten im Hinblick auf die

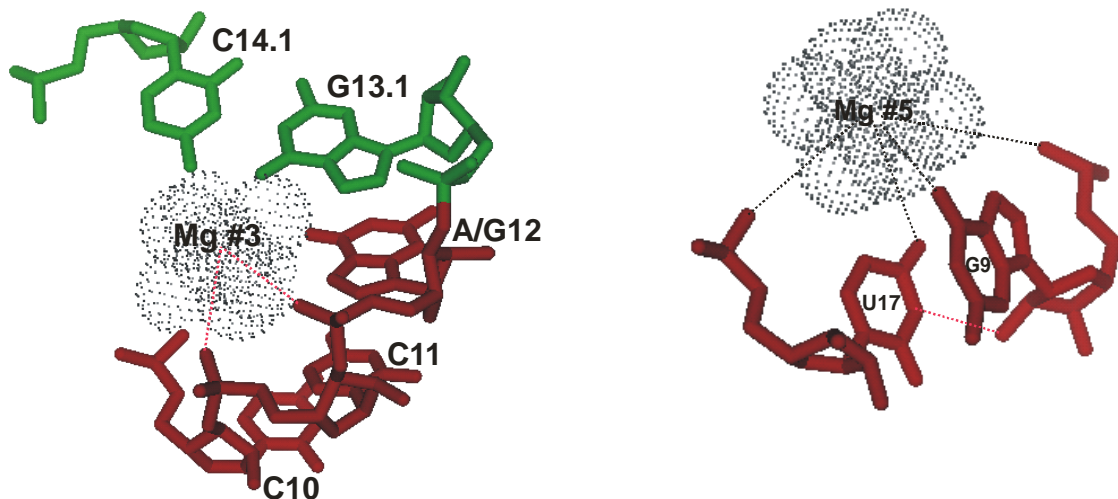


Abbildung 50: Interaktionen des Magnesiumions Nr. 3 (links) mit den Pseudoknoten-Nucleotiden C10 und C11. Mögliche, nicht spezifische Interaktionen mit A/G12 und dem Helix III-Basenpaar G13.1-C14.1. Interaktionen des Magnesiumions Nr. 5 (rechts) mit G9 und U17, die den Ort der Bulge-Überkreuzung bilden.

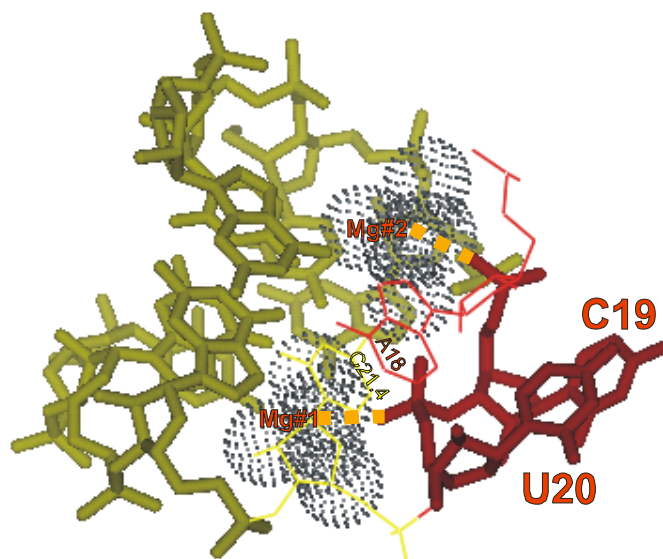


Abbildung 51: Interaktionen der Magnesiumionen Nr. 1 und 2 im Kontext der großen Furche der Helix II (gelb) und scharfem Turn (rot) mit den Nucleotiden C19 und U20. Koordination mit Phosphatsauerstoffen (orange), pro-Rp (C19), pro-Sp (U20). Der Pro-Rp-Sauerstoff des U20 ist zwischen beiden Ionen positioniert. Aufeinander stackende Nucleotide A18 und C21.4 in Liniendarstellung zur besseren Anschaulichkeit der dahinter liegenden Objekte.

Kristallstruktur entweder durch eine geschwächte Wechselwirkung des Schwefels mit essentiellen Mg^{2+} -Ionen in der Nachbarschaft, oder mit sterischer Hinderung im Ribozym bzw. durch die Kombination beider Effekte erklärt werden. Tatsächlich würden in diesen Fällen α -Thio-Atome in Rp-Konfiguration, wie sie in Nukleinsäuren nach enzymatischem Einbau von Sp- α S-Nukleosidtriphosphat-Monomeren vorliegen, die sterischen Bedingungen für die obige Erklärung erfüllen. Im Fall des C19 wurde eine deutliche Interferenz beobachtet, der Befund steht im Einklang mit den Kristallstrukturdaten (vgl. Abb. 34, S. 62). Der Sauerstoff des C19-Phosphates in pro-Rp-Konfiguration ist direkt (inner shell) mit dem räumlich nächsten Mg^{2+} -Ion Nr. 1 koordiniert. Eine α -Thio-Substitution verschlechtert die Interaktion mit dem Ion und wäre außerdem noch sterisch gehindert. Im Falle des Nukleotides U20 befindet sich sein 5'-pro-Rp-Sauerstoff in ähnlicher Entfernung (4 bis 4,5 Å) zu beiden Hydrathüllen der Mg-Ionen Nr. 1 und 2, es liegt eine „outer-shell“-Wechselwirkung vor im Gegensatz zu seinem pro-Sp-Sauerstoff mit „inner shell“-Koordination (vgl. Abb. 51, S. 80). Eine schwächere Interferenz im Vergleich zum 5'-Rp- α S des C19 mit „inner shell“-Koordination erscheint plausibel. Die beobachteten Interferenzen an den Positionen C10 und C11 können ebenfalls in einen strukturellen Zusammenhang gebracht werden. In der Nähe der 5'-positionierten pro-Rp-Sauerstoffatome dieser Nukleotide ist ein Mg^{2+} -Ion (Nr. 3) lokalisiert. Vom C10 ist das Zentrum des 5'-pro-Rp-Phosphat-Sauerstoffes zum Zentrum des Ions 3,6 Å, und das vom C11 4,1 Å entfernt, und damit im Bereich von „outer shell“-Wechselwirkungen. Rp-Alpha-Thio-Substitutionen verschlechtern die Interaktion mit dem Ion und könnten durch die größeren Radien auch sterisch gehindert sein. Das Magnesiumion ist im Kristall mit dem Phosphodiester-Rückgrat der Nukleotide C10, C11 und A/G12 sowie mit dem Cytosin des abschließenden Basenpaares G13.1-C14.1 der Helix III koordiniert, das einen Turn zeigt, der sich am Übergang von der zentralen Bindungstaschenregion zur äußeren Gerüsthelix III befindet (s. Abb. 50, S. 80). Darüber hinaus wird die Orientierung der Nukleotide C10 und C11, die als Partner für eine der beiden Pseudoknoten-Minihelices in Verbindung zum Basentriple und zur Basenplattform von herausragender Bedeutung sind, durch die Koordination des Magnesiumions auf ihrer Rückseite sehr wahrscheinlich stabilisiert. Das Magnesiumion Nr. 3 spielt damit möglicherweise eine wichtige Rolle für die Stabilität der Tertiärstruktur. Die beobachteten Interferenzen sind in diesem Zusammenhang plausibel. Ebenso scheint das Magnesiumion Nr. 5 für die Stabilisierung der Bulge-Überkreuzung G9-U17 von Bedeutung zu sein (vgl. Abb. 50, S.80 und Abb. 8, S. 15). Es ist offenbar sowohl mit einem Phosphatsauerstoff des U17, als auch mit dem 6-O des G9 koordiniert. Zusammen mit

den Ergebnissen der NAIM-Experimente um das Nukleotid G9 ist die beobachtete Interferenz durch das parentale α -Thio-U17 konform mit dieser Annahme.

6.4.: Zentrales Gerüstelement: Helix II, Scharfer Turn und Magnesiumionen Nr. 1+2

6.4.1.: Helix II

6.4.1.1.: RNA-DNA-2'-OMeRNA- Chimären

Die Aktivitäten von RNA-DNA-2'-OMeRNA-Chimären wurden zunächst mit dem Ziel gemessen, hydrolyseunempfindlichere Konstrukte des Ribozyms zu untersuchen. Im Zusammenhang mit der Strukturdiskussion lassen sich folgende Aussagen treffen: Die als äußere Gerüstelemente bezeichneten Helices I und III können durch DNA-Duplexe ersetzt werden, ohne dass die Aktivität stark abfällt. In der Helix II werden homogene RNA- oder 2'-OMe-RNA-Duplexe sowie heterogene DNA enthaltende Duplexe besser als reine DNA-Duplexe toleriert. Offenbar ist diese Beobachtung auf die Geometrie der Helix zurückzuführen. Die A-Form-Geometrie, wie sie in Duplex-RNA und auch angenähert in gemischten Duplexen und in doppelsträngiger 2'-OMe-RNA vorliegt, ist zwar nicht essentiell, wird aber deutlich besser als die DNA B-Form in der Helix II toleriert. Die A-Form unterscheidet sich von der B-Form topologisch durch eine schmalere und tiefere große Furche sowie eine etwas breitere und flachere kleine Furche ^[122, 123]. Anhand der Kristallstruktur kann der obige Befund folgendermaßen erklärt werden: Die Helix II als Bestandteil des zentralen Gerüstelementes durch zwei Mg^{2+} -Ionen (Nr.1 und 2) stabilisiert, die im Zentrum der großen Furche angeordnet sind und gleichzeitig mit dem gegenüberliegenden Phosphodiesterückgrat der Nukleotide C19 und U20 koordiniert sind (vgl. Abb. 51, S. 80); die A-Geometrie der Helix ist wahrscheinlich entscheidend für die korrekte Koordination der Ionen in der großen Furche im Gesamtkontext des Moleküls. Die Nukleotide C19 und U20 sind in einen scharfen Turn des Rückgrates involviert und darüber hinaus beide Teil der essentiellen Pseudoknoten-Interaktion mit G4 und A3. Die Stabilisierung dieses Strukturelementes erscheint als besonders wichtig für die Faltung. Die beobachteten Thioatinterferenzen, eine starke am C19 und eine etwas schwächere am U20, sind in Einklang mit dieser Interpretation. Der pro-Rp-Sauerstoff des C19-Phosphates ist 2,2 Å vom Zentrum des nächsten Magnesiumions Nr. 2 entfernt und damit direkt („inner shell“) koordiniert; der des U20- Phosphates ist ca. 4 Å bis 4,5 Å von den Zentren beider Mg^{2+} -Ionen entfernt und wahrscheinlich mit Protonen beider Hydrathüllen koordiniert. Alpha-Thio-Substitutionen verschlechtern die Interaktion mit Mg^{2+} -Ionen und können durch die größeren Radien sterisch gehindert sein.

6.4.2.: Scharfer Turn A18 -- C21.4

6.4.2.1. : Sterische Hinderungen im Bereich der Positionen A18 bis U20

Der ortsspezifische Einbau von 2'-OMe-Ribonukleotiden in Chimären bewirkte signifikante positionsabhängige Unterschiede der Ribozymaktivitäten. Eine doppelte 2'-OMe-Substitution an den Positionen U17-A18 wird wesentlich schlechter toleriert im Vergleich zu den Positionen A15-A16. Einzelne Substitutionen am U17 und A18 zeigten weiterhin einen größeren Unterschied zueinander: Eine 2'-OMe-Substitution am A18 führt im Gegensatz zum U17 zu fast vollständigem Aktivitätsverlust. Die Beobachtung steht im Einklang mit den Kristallstrukturdaten. Das Nukleotid A18 steht strukturell in Verbindung mit einem scharfen Turn gebildet aus den Nukleotiden A18--C21.4 (s. Abb. 52).

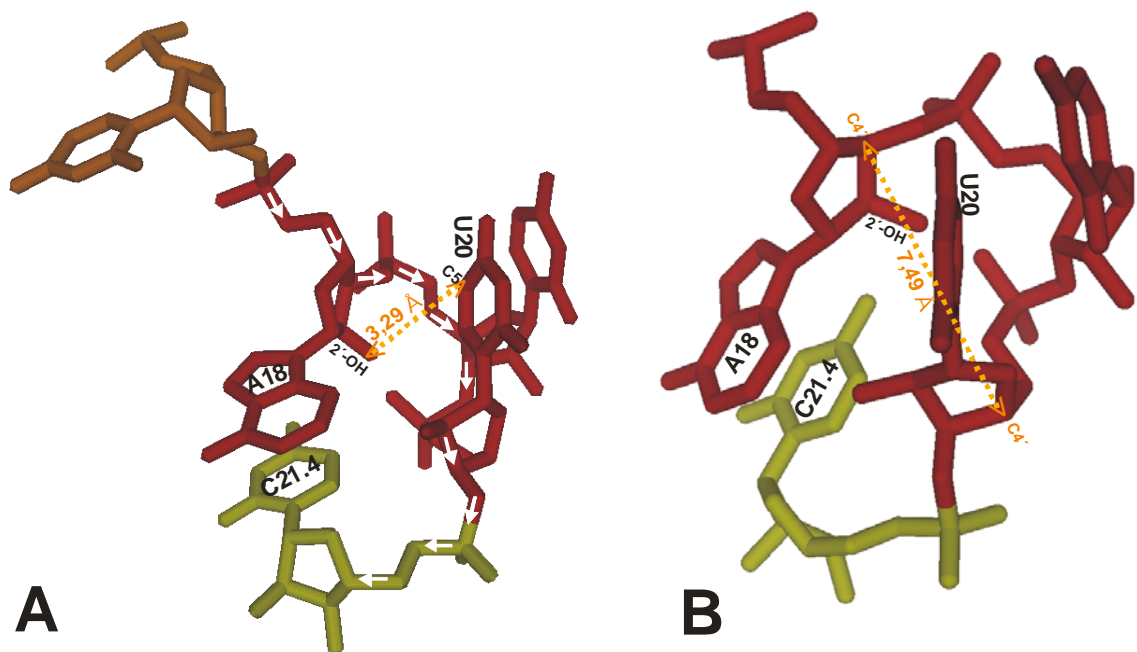


Abbildung 52: Scharfer Turn. A: Distanz C5(U20) -- 2'-OH(A18). Sterische Hinderungen einer 5-Methyl- und einer 2'-Methoxysubstitution in nahezu demselben Kompartiment. Weiße Pfeile: Phosphodiester-Rückgrat in 5'-3'-Richtung. B: Scharfer Turn (ca. 5,5 - 10 Å Innenmaß). Die C4'-Distanz vom A18 zum C4' des U20 (7,49 Å) gibt ein repräsentatives Beispiel. Die Nukleotide A18 und C21.4 stapeln aufeinander und umschließen einen Winkel von etwa 360° der 4nt-Sequenz.

Sein 2'-OH ist von mehreren Nachbarn im Abstand von 2,5 bis 4 Å umgeben. Eine Methoxy-Gruppe ist dort offenbar sterisch gehindert, hingegen ist die 2'-Position des U17 an der Peripherie des Ribozyms angeordnet, an der sterische Restriktionen offenbar geringer sind. Die Mutante U20dT zeigt im Gegensatz zum U20dU fast vollständigen Aktivitätsverlust. Eine 5-Methyl-Substitution wird daher am U20 nicht toleriert. Interessanterweise stehen das 2'-OH des A18 und das C5 des U20 durch den Turn in räumlicher Nähe (3.3 Å) zueinander, im Raum

des durch ihn umschlossenen Kompartimentes ist ein 5-Methyl am U20 offenbar gleichermaßen sterisch gehindert wie ein A18-2'-Methoxy-Rest (s. Abb. 50A). Beide Beobachtungen erscheinen damit im Rahmen der Strukturdiskussion konsistent. Durch Mutationsanalyse wurde an der Position U17 eine Tolerierung einer Substitution durch Desoxy-U sowie Desoxy-T festgestellt (vgl. Abb. 25, S. 55). Die Kristallstruktur zeigt eine Interaktion zwischen dem 2'-OH (U17) und einem Ethersauerstoff des PEG- Linkers, wenn er in der „tail-first“-Orientierung^[124] angeordnet ist. Wie im Falle einer 2'-Methoxy- beeinflusst eine 2'-Desoxy-Substitution die Aktivität des Ribozyms kaum. Die Wasserstoffbrücke scheint daher nicht essentiell zu sein. Die Tolerierung einer 5-Methylgruppe im U17dT steht in Übereinstimmung mit der Kristallstruktur. An wichtigen Interaktionen sind die Positionen 2 und 3 des Uracil 17 beteiligt. Die 4-Position sowie die „C-H-edge“ einschließlich des C5 der Base liegen dagegen an der freiliegenden Peripherie des Moleküls; die Tolerierung von Modifikationen erscheint dort daher plausibel. Von besonderem Interesse war das strukturelle Merkmal der reversen Hoogsteen-Basenpaarung U8-A18 („*trans*-Watson-Crick-Hoogsteen“-Paarung nach Westhof *et al.*). Als einziges Nichtstandardbasenpaar in der Kristallstruktur ist es ein wesentliches, aber auch schwer nachzuweisendes Strukturelement, welches im Rahmen des vorausgegangenen Modellbaues noch unbekannt war. Im Rahmen der NAIM-Experimente konnten Interferenzen an der Position A18 beobachtet werden.

6.4.2.2.: Reverses Hoogsteen Basenpaar U8-A18 und dU/dT8-Substitutionen

Im Gegensatz zu den Positionen A15 und A16 führen Substitutionen am A18 durch 7deazaA, 2-Aminopurin und Purin zu deutlichem Aktivitätsverlust. Diese Befunde deuten auf eine Beteiligung der Hoogsteen-Seite des A18 in Interaktionen hin, in denen seine 6-Aminogruppe sowie sein N7 beteiligt sind (vgl. Probing-Daten, Abb. 61, S. 92)^[58]. Konsistent mit diesen Daten ist die frühere Beobachtung, dass eine A18G-Mutation nicht toleriert wird, sogar noch schlechter als Pyrimidin-Substitutionen. In einer dem Hoogsteen-Paar entsprechenden Anordnung wären das 2-O des U8 und das 6-O des G18 der Mutante einander gegenüber lokalisiert, wahrscheinlich mit der Folge einer elektrostatischen Abstoßung ihrer negativen Partialladungen über den Verlust der Wasserstoffbrücke hinaus (vgl. Abb. 54B, S. 86). In einem weiteren Experiment wurden Interferenzen der Mutante U8C, die im monopartiten Ribozym noch geringe Aktivität zeigte, untersucht.

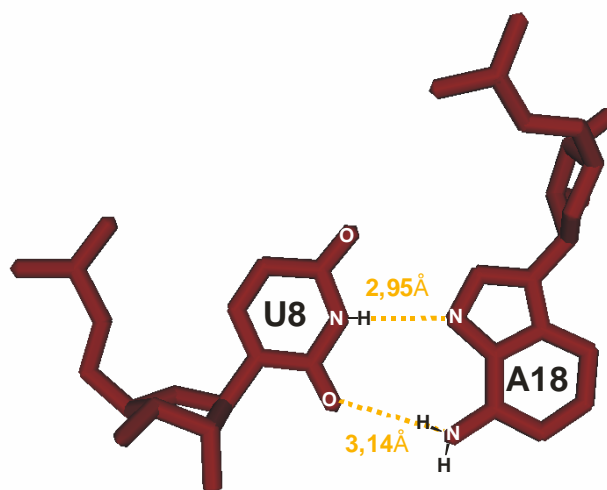


Abbildung 53: U8-A18 *trans*-Watson-Crick-Hoogsteen-Basenpaar (reverses Hoogsteen-Paar).

Ein genaueres Augenmerk wurde auf eine mögliche Änderung bezüglich einer 7deazaA18-Interferenz gerichtet. In einer U8C-Substitution liegt der 3-Ringstickstoff des Pyrimidin-Ringes unprotoniert vor, damit wird diese Position vom Donor (N-H) zum Akzeptor (N). Eine folgende 7deazaA18-Substitution sollte keinen Aktivitätsverlust bewirken, da gemäß der Kristallstruktur im Wildtyp das N7 des A18 mit dem N3-Proton des U8 über eine Wasserstoffbrücke interagiert und in der Doppelmutante U8C--7deazaA18 eine Akzeptor-Donor-Änderung des zweiten Bindungspartners vom N7 im Wildtyp zum HC7 im 7deazaA18 keine weiteren negativen Auswirkungen zeigen sollte (vgl. Abb. 54C/D, S. 86). In der Terminologie der NAIM-Technik wird ein solcher Effekt Interferenz-Suppression genannt. Durch den Einbau eines 7deazaA würde dem Akzeptor-N3 im U8C sogar ein, wenn auch sehr schwacher, C-H-Donor angeboten. Das Experiment zeigt jedoch wie im Wildtyp eine 7deazaA18-Interferenz. Eine Erklärung könnte in einer möglichen Konformationsänderung verbunden mit alternativen Akzeptor-Donor-Paarungen liegen, die durch die U8C-Mutation verursacht werden. Damit wären die Bedingungen für eine erwartete Suppression verändert. Eine weitere Hypothese im Rahmen einer möglichen Faltungsdynamik könnte in einer für die Funktion essentiellen alternativen Basenpaarung des U-A liegen. Zur Untersuchung des reversen Hoogsteen-Basenpaares U8-A18 wurden weitere Versuche mit ortsspezifisch modifizierten Ribozymen unternommen. Zur Verwendung kamen die Mutanten U8iC in Kombination mit 7deazaG18 sowie 8-Oxo-dG18 (vgl. Abb. 54E und F, S. 86). In einer dem Hoogsteen-Basenpaar U8-A18 analogen Anordnung könnte die 2-Aminogruppe des *iso*-C8 mit dem 6-Sauerstoff eines 7deazaG18 sowie das N3 des iC8 mit dem H-C7 des 7deazaG18 in Wasserstoffbrücken interagieren (vgl. Abb. 54E, S. 86). Eine C7-H -- N3-Interaktion in der Doppelmutante wäre weniger stabil als eine N7 -- HN3- Interaktion im Wildtyp, da ein C7-H nur einen sehr schwachen Donor darstellt.

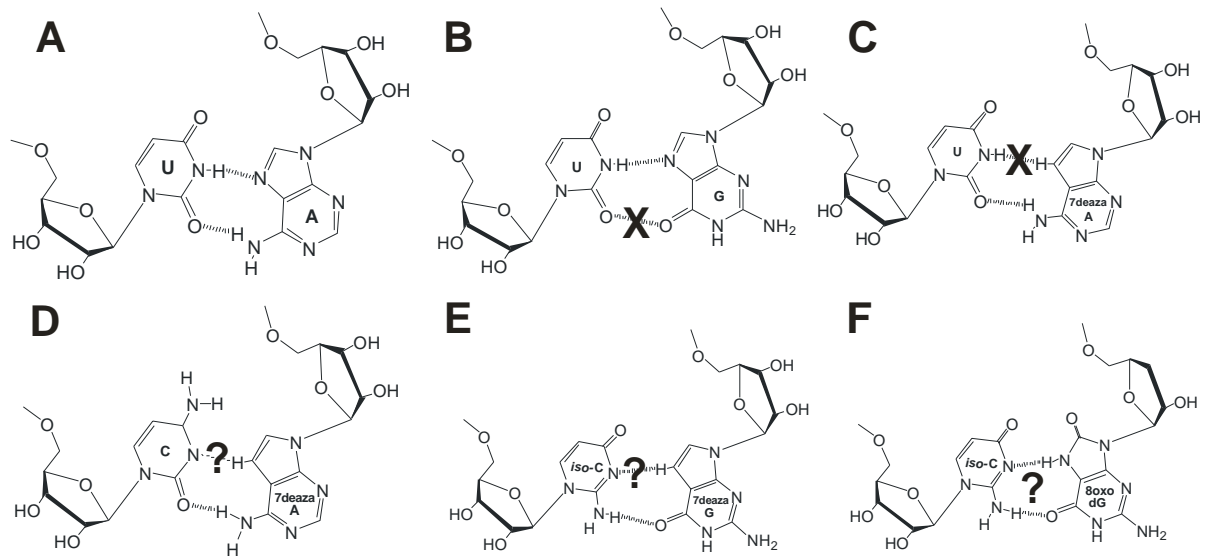


Abbildung 54: Trans-Watson-Crick-Hoogsteen-Kombinationen an der Position 8-18. A: U8-A18 Wildtyp-Paar, B: U8-G18 (inaktiv), C: U8-7deazaA18 (NAIM: Interferenz), D: C8-7deazaA18 (NAIM: keine Suppression), E: isoC8-7deazaG18 (kein Rescue), F: *iso*-C8-8OXOdG18 (kein Rescue). Anmerkung: Ein 8-Oxo-riboG-Phosphoramidit-Monomer war zur Synthese nicht verfügbar.

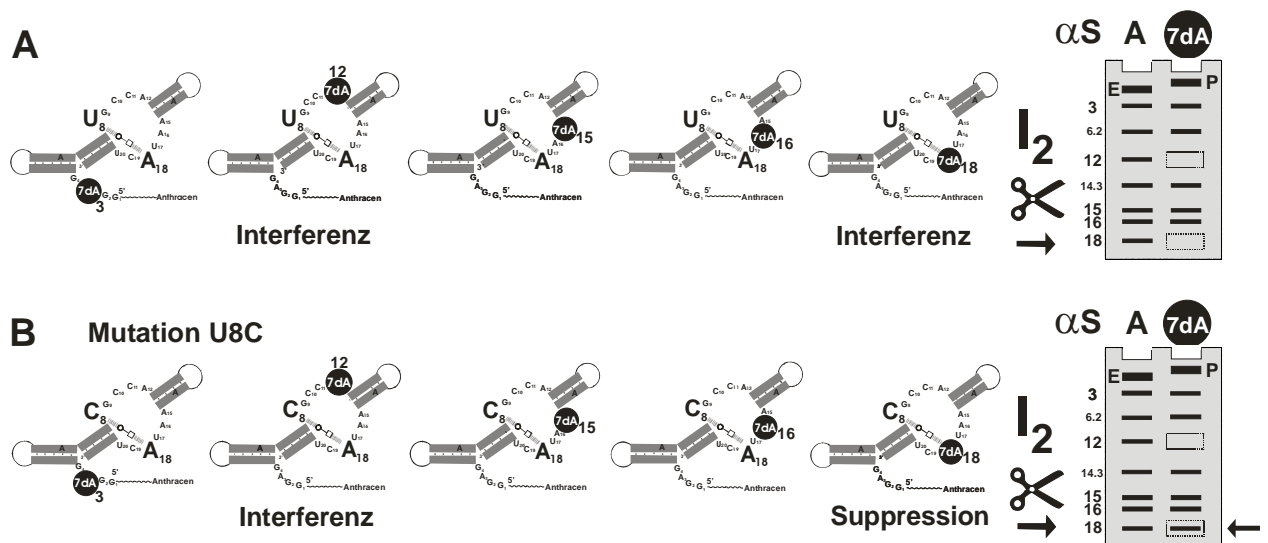


Abbildung 55: NAIM-Experimente: Schema von Interferenzen und Interferenz-Suppression (NAIS) am Beispiel des 49mer-Ribozym und seines Hoogsteen-Paares U8A18. A: Beobachtete 7deazaA-Interferenzen an der Position 18 und 12, letztere konnte nicht strukturell interpretiert werden. B: Versuchtes Suppressionsexperiment zum Nachweis der Hoogsteen-Interaktion des A18 mit U8 unter Verwendung der Mutante U8C. Rechts: Schematische Abbildung des erwarteten Spaltungsmusters: Pfeil rechts außen: Erwartete Dämpfung der Interferenz. Mobilitäts-Shift von Edukten (E) und Produkten (P), der nach Iodspaltungen im Bandenmuster verschwindet. U-7deazaA- und C-7deazaA-Paarungen sind in Abb. 54 (oben) unter C und D, das Wildtyp-Basenpaar U8-A18 ist in Bild A abgebildet. Nukleotide A6.2 und A14.3 der Helix I und III sind zur besseren Übersichtlichkeit teilweise nicht ins Schema einbezogen. Zur Vereinfachung sind weiterhin lediglich Produktbänder („aktive Fraktionen“) ohne die Eduktreferenzen in den Gelschemata gezeigt.

In einem 8-Oxo-dG wäre sein N7 protoniert und könnte als Donor für ein unprotoniertes Akzeptor-N3 des Partners iC8 fungieren (vgl. Abb. 54F, S. 86). Die durchgeführten Experimente zeigten jedoch, dass alle eingesetzten Doppelmutanten vollständig inaktiv waren. Es traten keine Rescues auf (vgl. Abb. 36, S. 65). Erklärt werden könnten diese Befunde, wie oben bereits erwähnt, durch mutationsbedingte Konformationsänderungen an dieser Position mit aktivitätssenkender Wirkung oder eine alternative temporäre Basenpaarung des untersuchten U8-A18 im Rahmen einer Faltungsdynamik, die für die Aktivität des Ribozyms oder die Auswahl seines korrekten Faltungsweges essentiell wäre. Amino-Substitutionen des O-4 bzw. O-2 am Nukleotid U8, die in den Mutanten U8C bzw. U8iC vorliegen und in denen darüber hinaus im Gegensatz zum Wildtyp-U der N3-Ringstickstoff unprotoniert ist, führen zu fast vollständigem Aktivitätsverlust. Dieser Befund, verbunden mit der Änderung von jeweils zwei potentiellen Akzeptor- / Donor-Partnern in beiden Mutanten, deutet auf eine Beteiligung der Watson-Crick-Seite des U8 an Interaktionen hin, die im reversen Hoogsteen Basenpaar U8-A18 der Kristallstruktur tatsächlich vorliegen. Somit gibt es zwar indirekte Hinweise auf die Beteiligung beider Basen an einer solchen Interaktion, jedoch bisher keinen direkten Nachweis durch ein Rescue- oder Interferenz-Suppressionsexperiment. Eine mögliche Erklärung für den Aktivitätsverlust könnte in der Einbeziehung dieser Nukleotide in essentielle intermediäre Konformationsänderungen des Ribozyms liegen, die nur die Wildtypsequenz erlaubt.

Eine hypothetische Möglichkeit wäre z. B. ein Umschalten („switch“) von einer Hoogsteen- zu einer Watson-Crick-Anordnung dieses U8-A18-Paares. Keine Doppelsubstitution würde eine solche alternative Paarung ermöglichen. Diese interessante Frage wäre durch weitere Experimente über die Dynamik der Faltung und den Katalysemechanismus des Ribozyms zu klären. Die Existenz des reversen Hoogsteen-Basenpaares, das offenbar eine wichtige Rolle im Gesamtkontext spielt, erklärt die nahezu strenge Konservierung beider Nukleotide U8 und A18, wie im Rahmen der Mutationsanalyse gezeigt werden konnte (s. Abb. 21, S. 49). An der Position U8 wurden im Rahmen der 2'-Desoxynukleotid-Substitutionen die Mutanten U8dU sowie U8dT untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Aktivitäten dieser Mutanten festgestellt werden. Sowohl das C5 des Uracil 8, als auch das 2'-OH der U8-Ribose sind zur freien Peripherie des Ribozymmoleküls orientiert. Eine sterische Hinderung eines 5-Methyls ist in dieser Orientierung unwahrscheinlich. Der Abstand zu einem benachbarten Mg^{2+} ist mit 5-6 Å groß genug, um nicht mit der ihm zugehörigen Hydrathülle zu interferieren. Sein 2'-OH ist scheinbar nicht an spezifischen Interaktionen beteiligt, die Substitution gegen H sowie der Übergang von einer 3'-endo- zur 2'-endo-Konformation des

Zuckers wird damit offenbar toleriert. Die Messwerte stehen somit im Einklang mit der Interpretation der Kristallstrukturdaten.

6.5.: Früher Modellbau: Phase I und II

Erste Versuche des Modellbaues (Phase I) begannen im Jahr 2001, nachdem eine der beiden Pseudoknoteninteraktionen sicher experimentell belegt werden konnte. Als plausible Hypothese wurde eine koaxiale Stacking-Interaktion der Helices I und II angenommen. Beim fortgeschrittenen Modellbau (Phase II und III), der in Kooperation mit Prof. Eric Westhof, Straßburg, durchgeführt wurde, konnte diese Annahme ebenso wie in der Kristallstruktur (Phase IV) nicht verifiziert werden.

Eine zentrale Frage im frühen Stadium der Strukturentwicklung bestand darin, ob die gefundene Pseudoknoteninteraktion, d. h. unter den durch das angenommene koaxiale Stacking gegebenen Voraussetzungen, die Anordnung der Basenpaare A3-U20 und G4-C19 entlang der Helix II-Achse sterisch überhaupt möglich ist. Geometrische Abschätzungen der zueinander angeordneten Elemente ergaben keine Widersprüche, ein Basenpaar mit einer Ausdehnung von

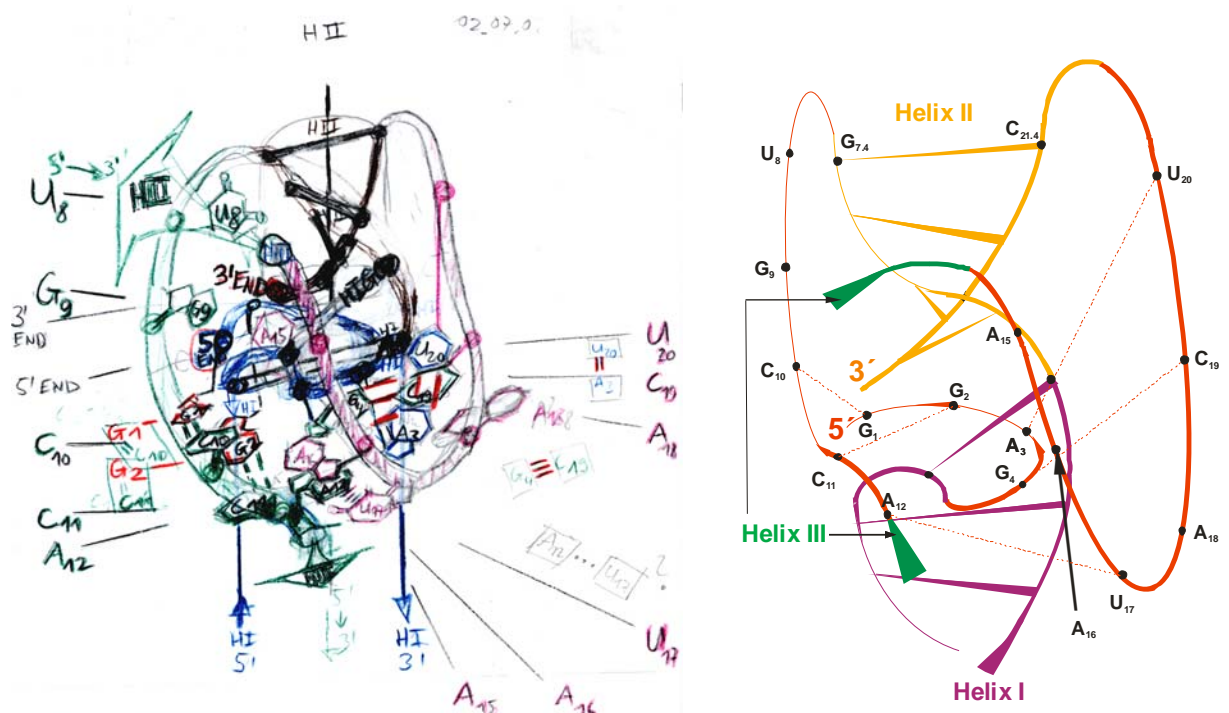


Abbildung 56: Früher Modellbau (Phase I): Schematische Zeichnungen entstanden aus einem „Ball and Stick“-Modell. Anordnungsmöglichkeit der experimentell bereits sicher gestützten Pseudoknotenbasenpaare A3-U20 und G4-C19 in Standardanordnung. Postulierung einer parallelen Anordnung G1C10 / G2C11 und mögliche Paarung von A12-U17 mit jeweils erkannter Purin-Pyrimidin-Präferenz. Annahme eines koaxialen Stackings von Helix I und II (Achse in der Papierebene, Helix I ist in der rechten Abb. nur partiell mit 3 Basenpaaren abgebildet). Helix III (grün, zur besseren Übersichtlichkeit nicht gezeigt) baut senkrecht auf der Papierebene auf, ihre Achse ist nach unten beweglich, sie öffnet und schließt das innen liegende Kompartiment, das als Bindungstasche angenommen wurde.

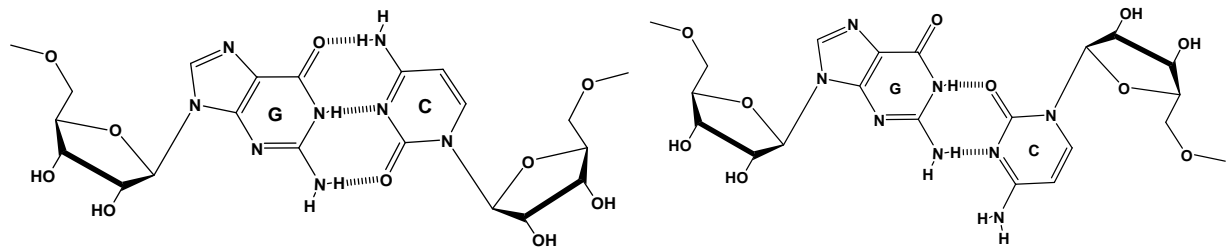


Abbildung 57: Links: Cis-Watson-Crick-Watson-Crick-G-C Standardbasenpaar. Rechts: Trans-Watson-Crick-Watson-Crick-G-C Paar im parallel angeordneten Duplex, wie er in den frühen Modellen (Phase I und II) vorgeschlagen wurde. Diese Anordnung wurde im späten Modell (Phase III) geändert und in der Kristallstruktur (Phase IV) nicht bestätigt.

etwa 20 Å in seiner Ebene ist in der Lage, eine 4bp-Helix wie die Helix II mit einer Achsenlänge von ca. 11 Å zu überspannen. Die aus „Ball and Stick“-Elementen modellierte Struktur (Phase I) konnte diese Erwägungen bereits stützen (vgl. Abb. 56). Es zeigte darüber hinaus sterische Hinderung einer C5-Methylsubstitution am Nukleotid U20, die mit den bereits durchgeführten Mutationsstudien bezüglich der 2'-Desoxysubstitutionen übereinstimmte. Dieser Befund muss angesichts der starken Veränderungen der Struktur im späteren fortgeschrittenen Modellbau und im Kristallstrukturmodell als Zufall bewertet werden.

Eine Anordnung der Nukleotide G1 und G2 als Partner des früh postulierten Pseudoknotens wurde in diesem Modell ermöglicht, allerdings in paralleler Anordnung mit den Nukleotiden C10 und C11. Diese Konstellation der Nukleotide wird als *trans*-Watson-Crick-Watson-Crick-Paarung nach dem Nomenklaturvorschlag von Westhof *et al.* bezeichnet ^[60, 61], in denen lediglich zwei statt drei Wasserstoffbrücken zwischen den Hybridisierungspartnern auftreten (s. Abb. 57). Eine solche Anordnung wurde zunächst auch beim computerunterstützten Modellbau (Phase II) angenommen. Das finale Modell (Phase III) zeigt jedoch wie im Kristall (Phase IV) antiparallele Orientierungen der hybridisierten Stränge.

6.6.: Molecular Modelling-Struktur (Phase III) versus Kristallstruktur (Phase IV)

Im Folgenden sollen die wesentlichen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der durch computerunterstützten Modellbau (Molecular Modelling) im Zeitraum 2003 bis 2004 entstandenen Struktur und der im Jahr 2005 veröffentlichten Kristallstruktur aufgezeigt werden. Der computerunterstützte Modellbau wurde limitiert durch die Anzahl an strukturelevanten Informationen und deren Verlässlichkeit.

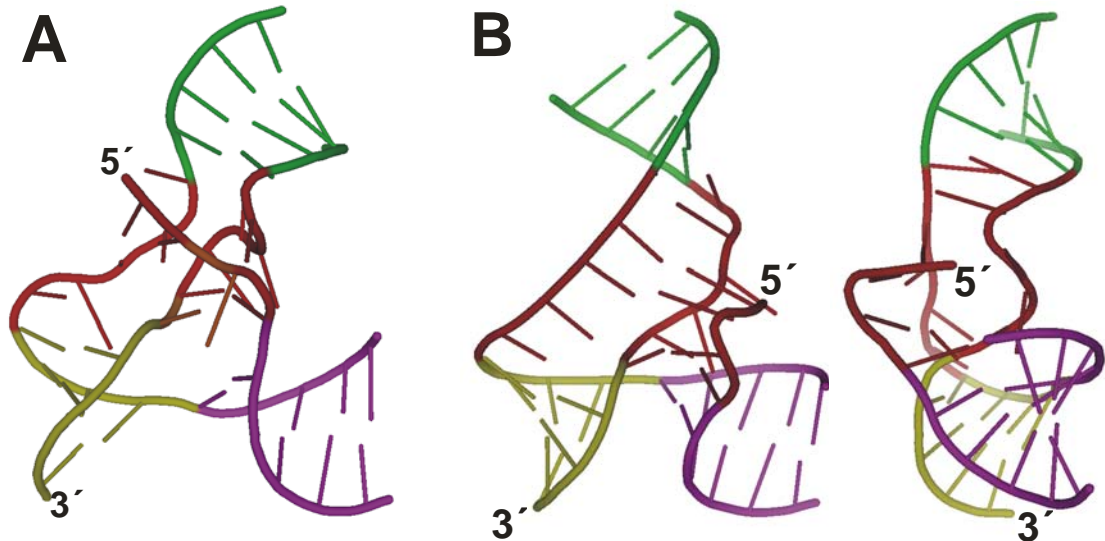


Abbildung 58: Computerunterstützter Modellbau. A: Phase II: Parallele Anordnung G1C10, G2C11. Experimentell gestütztes Standardpaar G4C19. Trans-Watson-Crick-Hoogsteen-Anordnung A3-U20 (orange) im Widerspruch zu bereits gesicherten biochemischen Daten. Postulierte Bindungstasche zwischen 5'-Terminus (rot, vorn) und den Ausbuchtungen (rot, hinten). B: Phase III: Antiparallele G1C11, G2C10-Hybridisierung in Standardbasenpaaren. Standardpaarungen A3U20 und G4C19 konform mit experimentellen Daten. Postulat einer A12-A15-A16 Plattform. Links: Seitenansicht. Rechts: Blick in die postulierte Bindungstasche im Zentrum ^[58].

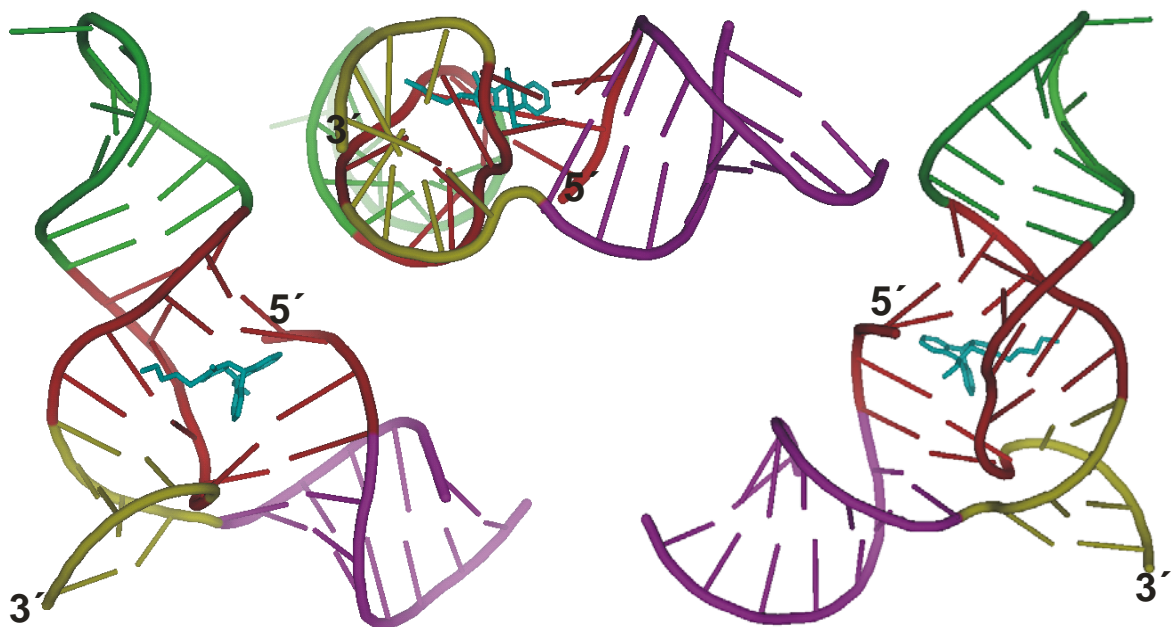


Abbildung 59: Phase IV: Drei „Cartoon“-Ansichten des Kristallstrukturmodelles mit Produkt (blau), PDB Code 1YLS ^[59]: Links: Seitenansicht, Blick in die Bindungstasche (DA-Produkt blau). Rechts: Rückseitenansicht mit „Hintereingang“. Mitte oben: Blick durch koaxial angeordnete Helix II und III-Achsen. Die Farbgebung entspricht in allen Ansichten den Sekundärstrukturabbildungen.

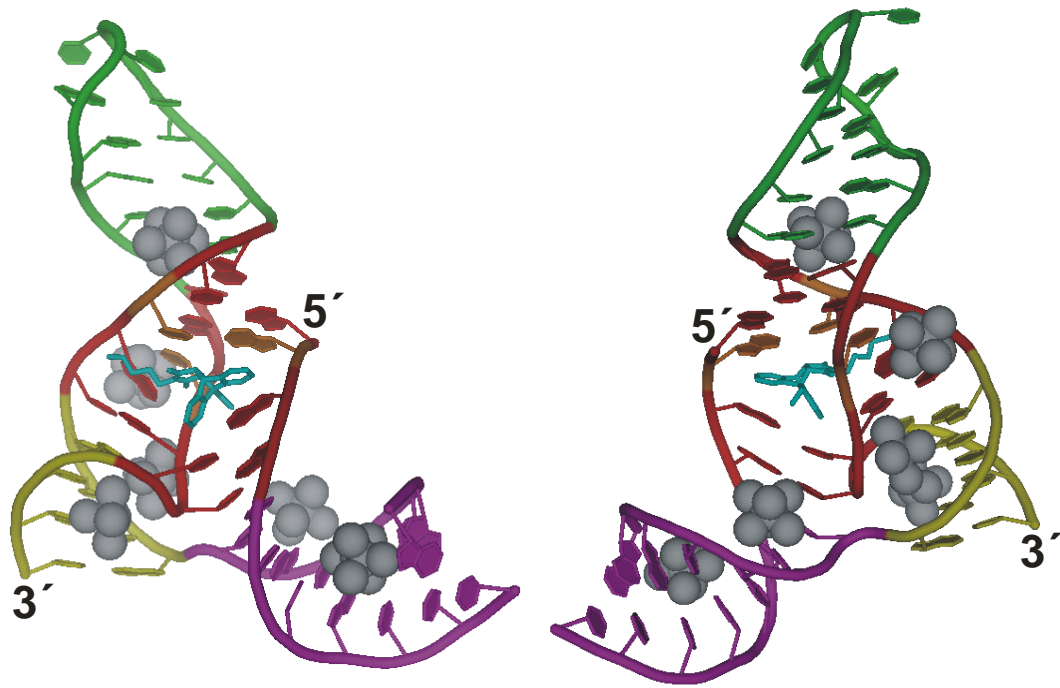


Abbildung 60: Phase IV ^[59]: Kristallstrukturmodell (PDB-Code: 1YLS) mit stilisierten Basen und hydratisierten Magnesiumionen. Linke Abbildung: Experimentell gestützte Wichtigkeit der vier Mg^{2+} -Ionen Nr 1, 2, 5 und 3 ganz links von unten nach oben. Rot: Ausbuchtungen und 5'-Terminus. Orange: Basentripel G2-C10-U17, darüberliegende drei rote Basen bilden die Plattform G1-C11-A16. Linke Abbildung: Rotes Basenpaar zwischen Mg^{2+} - Ion Nr. 2 und 5 ist das Hoogsteen- Paar U8A18.

Die am besten experimentell gestützten Strukturelemente bestanden aus der bereits frühzeitig postulierten Sekundärstruktur mit ihren drei Helices und einem der beiden Pseudoknoten A3U20-G4C19. Beide Modelle zeigen eine doppelte Pseudoknotenstruktur, die durch zwei 2bp-Minihelices gebildet wird. Die Hybridisierungen ihrer Nukleobasen sind vom Standard-Watson-Crick-Typ, die Stranganordnung ist antiparallel. Gemeinsam ist beiden Modellen eine globale Lambda- oder Y-förmige Struktur, mit einer spaltenförmigen Bindungstasche im Zentrum (vgl. Abb. 58 und 59, S. 90 sowie Abb. 60) In beiden Strukturen wird eine partielle Stapelung (Stacking) des Anthracens zwischen Basenpaaren der Pseudoknoten angenommen. Die Modellbau-Struktur schlägt ein Stacking zwischen den zueinander gespreizten G4-C19 und A3-U20-Paaren vor im Gegensatz zur Kristallstruktur, in der eine Spreizung zwischen A3-U20 und G2-C10 ausgebildet wird. Die einfließenden Daten aus chemischem Probing konnten weniger sicher interpretiert werden. Dieses betrifft eine postulierte Anordnung der Nukleotide A12, A15 und A16 in einer gemeinsamen Ebene mit einer *trans*-Hoogsteen-sugar edge-Anordnung zwischen den Nukleotiden A15 und A12. Die Kristallstruktur zeigt dagegen eine A12-A15-Anordnung über ihre Watson-Crick-Seiten und das Nukleotid A16 ist dort Teil einer Tripleplattform, gemeinsam mit dem Paar G1-C11. Ebenso wurden über Probing-Experimente

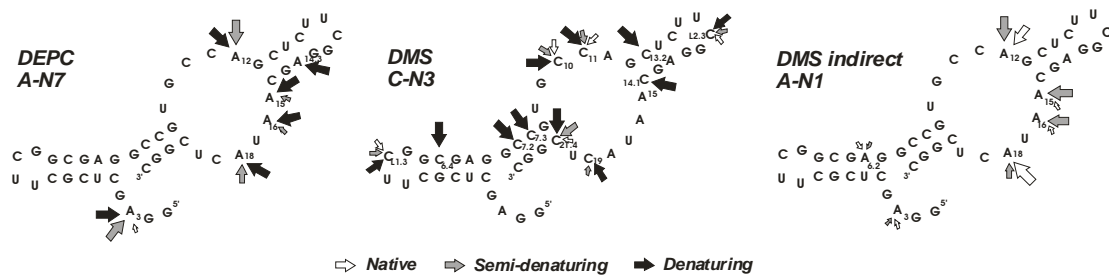


Abbildung 61: Chemisches Probing mit DEPC und DMS (direkt und indirekt) unter nativen, semidenaturierenden und denaturierenden Bedingungen. Die Experimente wurden von Sonja Keiper durchgeführt ^[58].

Hinweise, aber keine sicheren Belege für die Existenz des zweiten Pseudoknotens G1C11-G2C10 gefunden. Darüber hinaus wiesen ¹H-NMR-Messungen auf die Beteiligung der Guanin-Nukleotide des GGAG-Terminus in tertiären Interaktionen hin. N1-Iminoprotonenspektren lassen auf einen verringerten Austausch mit Wassermolekül-Protonen, und damit auf mögliche tertiäre Interaktionen schließen ^[125]. Eine Paarung des G1 mit C11, und damit ein Hinweis auf eine antiparallele Orientierung im bereits frühzeitig postulierten Duplex, konnte später durch Wiederherstellungsexperimente mit der Doppelmutante iso-G1-iso-C11 gestützt werden. Im Kristall wurden diese Hinweise bestätigt.

Nur wenige Daten waren für die im Phase III-Modell formal ungepaarten Nukleotide U8, G9, U17 und A18 verfügbar. Ein indirekter Hinweis auf eine Hoogsteen-Seiten-Interaktion des A18 ergab sich über chemisches Probing. Dieser Befund konnte später durch NAIM-Experimente bestätigt werden. Direktes Probing mit DEPC zeigte, dass das N7 der A18-Hoogsteen-Seite unter nativen im Gegensatz zu denaturierenden Bedingungen geschützt ist. Indirektes Probing zeigte unter nativen Bedingungen eine stärkere Modifizierung des Watson-Crick-Seiten-N1 im A18 (Probingexperimente wurden in unserer Arbeitsgruppe von Sonja Keiper durchgeführt, s. Abb. 61). Seine Interaktion in einer Basenpaarung konnte jedoch durch doppelte Substitutionsexperimente nicht nachgewiesen werden, da Nichtstandardbasenpaare im Allgemeinen nicht isosterisch und daher nicht ohne strukturelle Auswirkungen substituierbar sind. Für eine Beteiligung des U8 an dieser Interaktion existierten zum Zeitpunkt des Modellbaues keine experimentellen Indizien und sie konnte nicht vorhergesagt werden, obwohl U-A-Paare des Hoogsteen-Typs nicht extrem ungewöhnlich sind. Spätere Experimente gaben indirekte Hinweise auf Interaktionen der Watson-Crick-Seite des U8 durch vergleichende Messungen mit den Mutanten U8C und U8_{iso}-C. Der Nachweis eines Basentriples, wie es im Kristall unter Beteiligung des U17 vorliegt, und komplexer weiterer tertiärer Interaktionen sowie von Basenstapelungen oder der Bestimmung von Orientierungen der Helix-Achsen

wurde durch die verfügbaren Methoden limitiert. Dennoch kann festgestellt werden, dass die durch computerunterstützten Modellbau entstandene Ribozymstruktur viele Aspekte der später aufgeklärten Kristallstruktur bereits zeigen konnte.

6.7.: Hypothesen zur Faltungssequenz

Die Hypothesen über die Faltungssequenz beruhen auf folgenden Annahmen:

- (1.) Der Faltungsprozess verläuft in einer koordinierten und gerichteten Sequenz.
- (2.) Er ist kooperativ.

Zur Begründung der Richtung einer postulierten Faltungssequenz dient die Interpretation eines Messergebnisses aus Doppelmutationsstudien. Die Mutante A3U20 → U3A20 zeigt nur etwa 20 % Wildtyp-Aktivität (s. Abb. 23, S. 52) bezogen auf 30 min Reaktionszeit (entspricht 3,6% wt-Aktivität bezogen auf Anfangsgeschwindigkeiten). Bisher kann hierfür als einzige plausible Interpretation folgende Aussage getroffen werden: Eine zum U3A20 alternative Paarung U8A20 wäre möglich; die Basen der letzteren Kombination sind direkte Nachbarn des „closing basepairs“ G7.4--C21.4 der Helix II und damit gute Paarungskandidaten im Verlauf einer gerichteten kooperativen Hybridisierung während einer noch unkompletten Tertiärstrukturbildung. Die Bildung eines der beiden Pseudoknoten wäre gestört und damit ein entscheidender Schritt zur korrekten Gesamtfaltung. Die schlechte Tolerierung der A3U20→U3A20 Doppelsubstitution beruht nicht auf weiteren spezifischen tertiären Wechselwirkungen, in die das Wildtyp-Basenpaar A3U20 eingebunden sein könnte. Zur Begründung dienen folgende Beobachtungen: Im Rahmen von Basenpaarsubstitutionsexperimenten werden die Doppelmutanten A3U20 → G3C20 bzw. A3U20 → C3G20 ohne Aktivitätseinbuße toleriert ^[58] (vgl. Abb. 23 und 24, S. 52 und 53). Die letztere besitzt als Doppel-Transversionsmutante sogar eine gegenüber dem Wildtyp invertierte Purin-Pyrimidin-Orientierung. Essentielle, sterisch streng definierte Dipol- oder Stacking-Interaktionen der Nukleotide A3U20 im Wildtyp erscheinen daher unwahrscheinlich. Es entfällt damit ein Grund für die schlechte U3A20-Tolerierung und damit ebenso der für eine andere Interpretation, als die oben dargelegte bezüglich der geringeren Aktivität dieser Mutante. Es kann folgendes Postulat aufgestellt werden: Eine alternative Basenpaarung U8A20 erfolgt in einem frühen Stadium eines gerichteten Faltungsprozesses. Unter der Annahme einer unveränderten Faltungssequenz gälte dieses gleichermaßen für die Hybridisierung des Paares A3-U20 im Wildtyp.

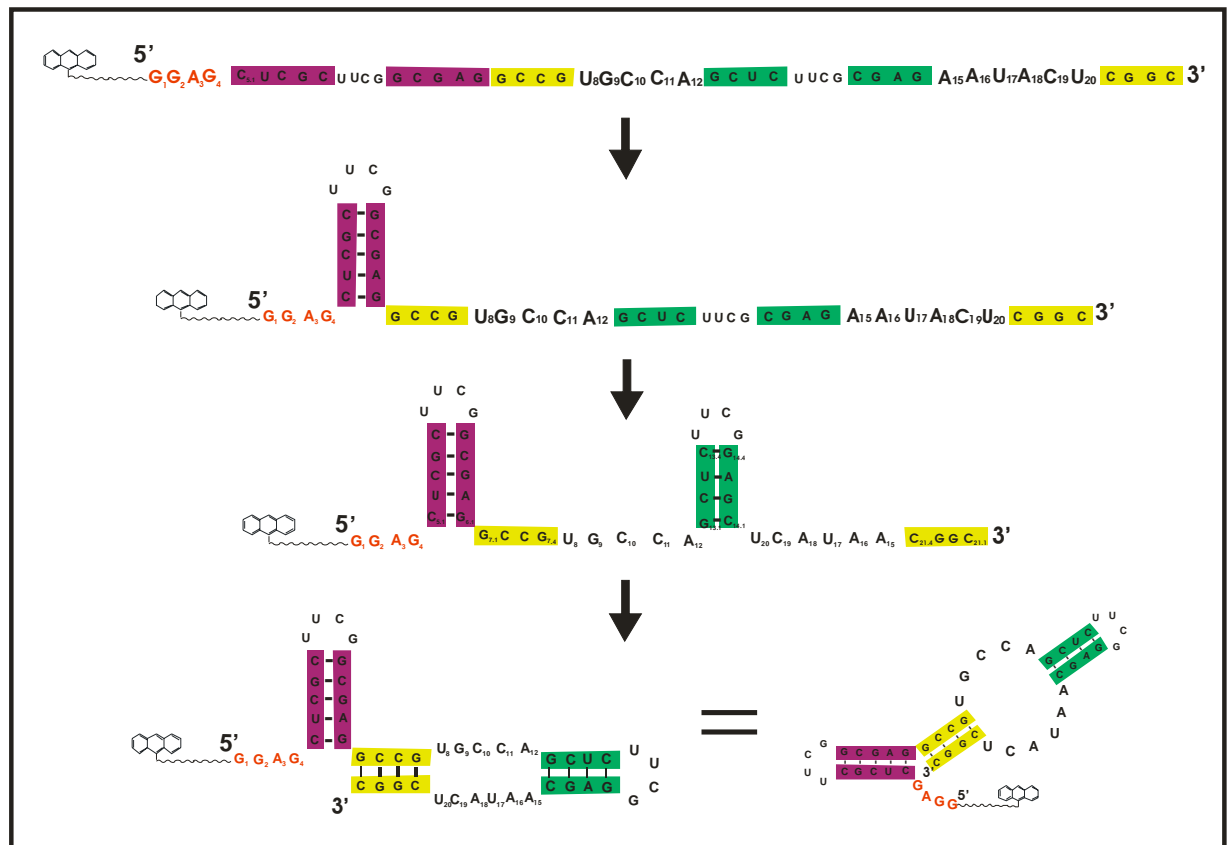


Abbildung 62: Hypothetische Faltungssequenz zur Sekundärstruktur, deren Ausbildung der experimentell gestützte geschwindigkeitbestimmende (langsamere) Schritt im Vergleich zur Tertiärstrukturbildung ist.

In einer späten Phase wäre die gesamte Faltung über zusätzliche multiple Wechselwirkungen stabilisiert. Die sterischen Bedingungen wären wesentlich geändert zu Ungunsten einer alternativen Basenpaarung U8-A20. Der notwendige thermodynamische Aufwand wäre relativ groß, viele der in der Spätphase gebildeten Wechselwirkungen der kompletten Faltungssequenz zu lösen, um die Voraussetzungen für diese alternative Basenpaarung zu schaffen. Eine solche alternative Basenpaarung würde eine Gleichgewichtsverschiebung zwischen den Faltungsintermediaten mit sukzessiver Konzentrationsverringerung der aktiven Faltung bewirken und die geringeren Aktivitätsmesswerte erklären. Die Ausbildung der Sekundärstruktur würde gerichtet nach thermodynamischen Erwägungen erfolgen: Die Bildung der Helix I mit dem längsten Hybridisierungsbereich sowie der Helix III erfolgte zuerst. Die Länge der Helix III im Minimalmotiv beträgt zwar nur vier Basenpaare, ihre komplementären Bereiche werden aber lediglich durch den UUCG-Tetraloop getrennt, der helixstabilisierend wirkt. Die Helices I und III wären am stabilsten; Helix II als kleine 4bp Helix würde vor den beiden 2bp Pseudoknoten-Minihelices folgen.

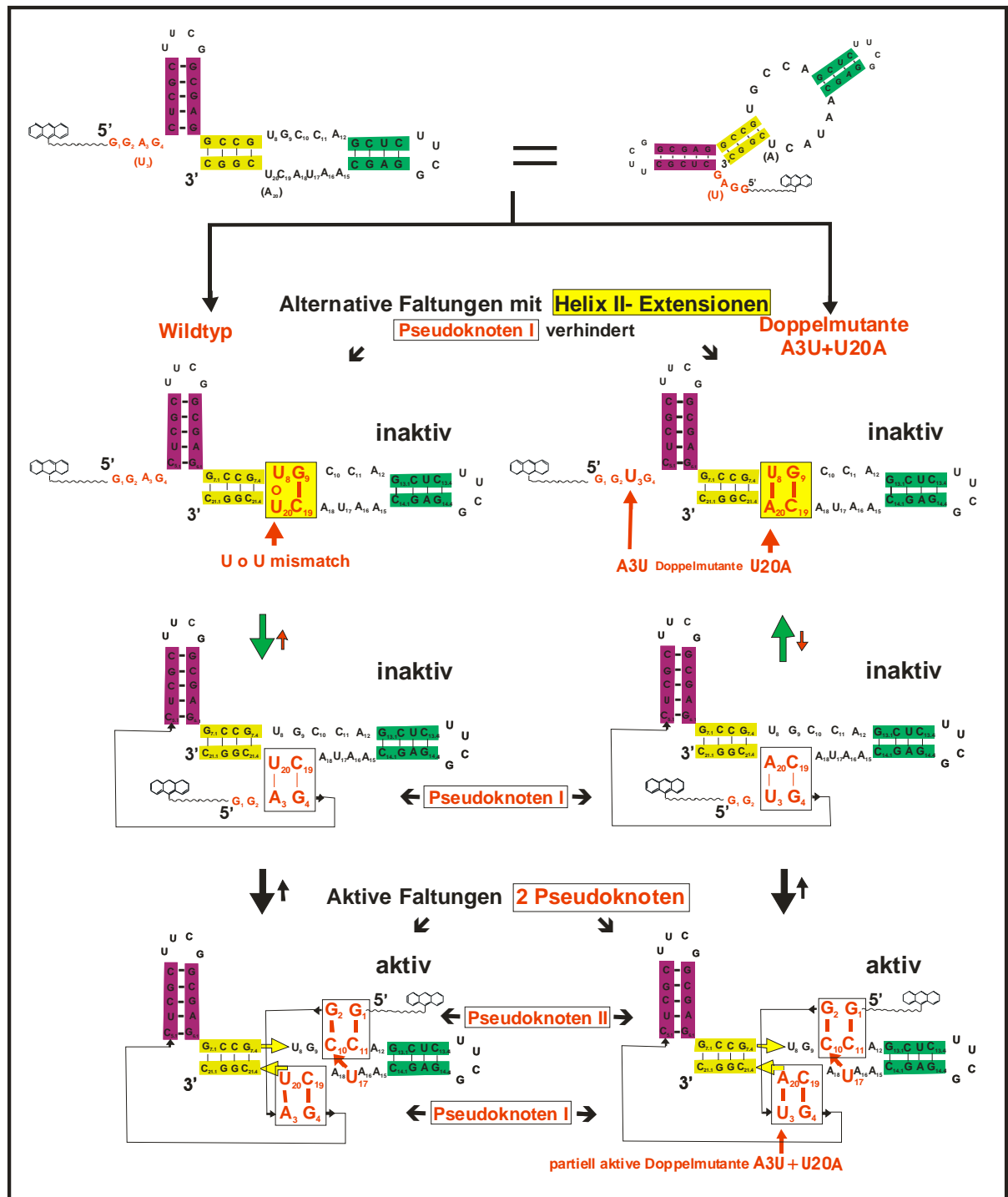


Abbildung 63: Hypothetische Faltungssequenz zur Tertiärstruktur einschließlich der Annahme einer Faltungsfalle („Folding Trap“, oben). Unten: Aktive Faltungen. Die Unterschiede der Gleichgewichte sind zu beachten.

Die Ausbildung der Sekundärstruktur verläuft offenbar wesentlich langsamer im Vergleich zur Tertiärstrukturbildung, wie die Daten in Abb. 40 und 41, S. 69 zeigen: Ein sigmoidaler Verlauf der Kinetik, der zudem als temperaturabhängig erkannt wurde, konnte beim alternativen Reaktionsstart mit Anthracen-HEG-1 Int-RNA beobachtet werden. Dagegen zeigten Kinetiken mit beiden anderen Reaktionsstart-Modi nichtsigmoidale Verläufe. Die Bildung der

Helixduplexe ist offenbar der geschwindigkeitsbestimmende, langsamste Schritt bei der Formation der aktiven Struktur. Experimentell gestützt wird diese These für die Bildung des Helix I-Duplex, der die 11nt-Sequenz des Substrat-Oligonukleotides enthält (vgl. Abb. 40/41, S. 69) Die Größenordnung hierfür beträgt ca. 10 bis 100 s. Nach der Bildung der Helices I, III und II erfolgt die weitere Hybridisierung gerichtet und reißverschlußähnlich vom Helix II-Closing Basepair G7.4--C21.4 über den Bulge in Richtung der Helix III. Die Pseudoknotenhälfte A3U20-G4C19 würde gemäß obiger Argumentation anschließend hybridisieren. Die entgegengesetzte Richtung Helix III → Helix II erscheint auch deshalb unwahrscheinlich, weil die Nukleotide A12, A15 und A16, die dem Helix III-Closing Basepair benachbart sind, offenbar in eher unspezifische Stacking-Wechselwirkungen eingebunden sind. Weiterhin werden sämtliche Fehlpaarungen am Helix III-Closing Basepair bis auf eine Ausnahme ohne Aktivitätsverlust toleriert ^[58]. Damit wären die Bedingungen für eine kooperative Hybridisierung während der Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur in dieser entgegengesetzten Richtung wesentlich ungünstiger. Gestützt durch die oben genannten Argumente folgt die Bildung des ersten Pseudoknotens G4C19 / A3U20 zeitlich nach den Helices I, III und II noch in einer relativ frühen Phase der Faltung. Die nächsten unmittelbar benachbarten ungepaarten Nukleotide in der angenommenen Richtung sind U8 und A18. Ein A/U-Paar ist in der Lage, sowohl ein Standard Watson-Crick-Paar, als auch beispielsweise ein reverses Hoogsteen-Paar zu bilden, wie es im U8--A18- Paar in der Kristallstruktur sichtbar ist. Die Annahme einer für einen gerichteten Faltungsprozess wichtigen alternativen Basenpaarung, wie sie oben diskutiert wurde, könnte die Beobachtungen erklären, dass keine doppelten Basensubstitutionen des U8-A18-Paares toleriert wurden und auch kein NAIM-Interferenz-Suppressionsexperiment erfolgreich war. Sollte dieses Paar in einen essentiellen „Konformations-Switch“ involviert sein, wäre es höchstwahrscheinlich durch kein anderes Basenpaar substituierbar, auch wären die Bedingungen für eine Interferenz-Suppression in NAIM-Experimenten nicht mehr gegeben. Das Basenpaar U8-A18 würde somit eine besondere Rolle in einer Faltungssequenz spielen und innerhalb eines temporären Faltungsintermediates als ein alternativ angeordnetes Paar vorliegen.

Der nächste Faltungsschritt bestünde in der Ausbildung des zweiten Pseudoknotens, der aus den Paaren C10G2 und C11G1 gebildet wird. Anschließend bildet sich das Triple mit U17 und die Tripleplattform G1C11-A16 und der scharfe Turn A18...bis...C21.4. Es könnte ein Übergang von einer postulierten alternativen Anordnung stattfinden, die durch sterische Restriktionen der komplexeren späten Faltung bedingt wäre, zu der in der Kristallstruktur beobachteten trans-Watson-Crick-Hoogsteen-Anordnung des U8-A18 Paares. Vermutlich

entstehen nahezu zeitgleich die meisten weiteren multiplen stabilisierenden Wechselwirkungen wie Stacking-Interaktionen. Konsistent mit der oben erwähnten Annahme sterischer Restriktionen ist das beobachtete Auftreten von sterischen Hinderungen in der Umgebung des Paares U8-A18. Diese existieren experimentell gut gestützt offenbar im Bereich des scharfen Turns des Phosphodiesterückgrates, in dem auch das Nukleotid A18 involviert ist (vgl. Abb. 52, S. 83). Das Rückgrat dieses Bereiches wäre gemäß der postulierten Faltungssequenz zunächst durch die Ausbildung des ersten Pseudoknotens A3U20/G4C19 an einem Ende fixiert. In der Folge wird durch die die Bulges überkreuzende Fixierung des U17 im Triple der scharfe Turn über die Fixierung seines anderen Endes ausgebildet. Die Folge wären sterische Restriktionen im Kompartiment, das von ihm umgrenzt wird. Auf der Basis dieser Annahmen erscheint es plausibel, dass das U8-A18-Paar aufgrund dieser Restriktionen in die reverse Hoogsteen-Anordnung der Kristallstruktur sterisch „gezwungen“ wird. Die Möglichkeit seiner Selektion aufgrund seiner möglichen funktionalen Bedeutung im Rahmen der Faltungsbildung oder des Katalysemechanismus erscheint jedoch ebenfalls plausibel. Die Ausbildung des scharfen Turns einschließlich seiner Koordinierung zur großen Furche der Helix II in einer frühen Phase des Faltungsprozesses erscheint unwahrscheinlich. Die Erzeugung sterischer Restriktionen, wie sie im fertig gefalteten Molekül vorliegen, in einer solchen frühen Phase erforderte wahrscheinlich die simultane Verdrängung zahlreicher Hydratwassermoleküle. Ein solcher Prozess würde ohne die Wirkung weiterer komplexer Interaktionen wahrscheinlich nicht spontan ablaufen.

Für die Eduktbindungen im *trans*-Assay insbesondere des Anthracens mit wesentlich kleinerem K_m -Wert (370 μM für Anthracen-HEG) im Vergleich zum Maleimid (8 mM für Maleimidocaprinsäure, MACA; für BM und NPM existieren bisher keine K_m -Werte)^[57] kann im Zusammenhang mit den obigen Hypothesen vorgeschlagen werden, dass durch eine Öffnung des Pseudoknotens G1C11 - G2C10, d. h. die reversible Umkehr des postulierten letzten Faltungsschrittes und einer damit verbundenen Trennung des Triples mit U17 und der Bulge-Überkreuzung G9/U17 eine partielle Öffnung der Faltung in einem größeren Kontext einhergeht, die für die Orientierung („tail“- oder „head“-first)^[124] des Substrates eine wichtige Rolle spielen könnte. Der Aspekt wäre besonders für die *cis*-Reaktion relevant, bei der das Substrat am Ribozym über den PEG-Linker kovalent gebunden ist, dessen Orientierung als längenabhängig erkannt wurde^[120]. Eine „tail-first“-Bindung ist unter diesen Bedingungen ohne Öffnung der Faltung schwer vorstellbar, da der postulierte Hintereingang eine Öffnung von ca. 6 Å aufweist und damit zu schmal ist für ein breitseitig eintretendes Anthracen mit einem Maß von ca. 10 Å. Für eine „head-first“- Bindung wäre zwar keine Öffnung der Faltung

bzw. Bindung in einer unvollständigen Faltungsphase, aber eine enge Schleifenbildung des PEG-Linkers vom 5'-Terminus zur Bindungstasche erforderlich, die möglicherweise ebenfalls sterisch aufwendig wäre. In kinetischen Untersuchungen wurden keine größeren Unterschiede der Geschwindigkeitskonstanten zwischen beiden Varianten bezüglich der Eduktbindung festgestellt, die sich in den beiden verschiedenen Produktenantimern widerspiegelt. Keiner der beiden postulierten Eduktbindungsmodi scheint daher kinetisch signifikant bevorzugt zu sein (vgl. Daten S. 69, Abb. 40 und 41) bzw. unterschiedliche K_m -Werte für Anthracen zur Folge zu haben.

6.8.: Hypothesen zum Reaktionsmechanismus:

Das Diels-Alderase-Ribozym: Nur eine Entropiefalle oder ein „Thermodynamo“?

Es sind im gegenwärtigen Stadium keine gesicherten Aussagen über Substratbindung und Katalysemechanismus möglich. Obwohl es bisher keine Indizien dafür gibt, können temporäre strukturelle Änderungen der Ribozymfaltung in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden. Im Folgenden sollen einige Aspekte und Ansätze zu den gestellten Fragen aufgezeigt und diskutiert werden.

Hinsichtlich des Kristallstrukturmodelles ist grundsätzlich anzumerken, dass die Ribozymstruktur in Lösung geändert vorliegen kann. Die Summe an bisher gewonnenen Daten spricht jedoch für keine wesentlichen globalen Änderungen der Gesamtfaltung. Damit wäre eine temporäre, nichtglobale Konformationsänderung jedoch nicht ausgeschlossen. Unter dieser Annahme könnte das Kristallstrukturmodell eine Momentaufnahme widerspiegeln. Existierten solche strukturellen Änderungen, ergäben sich neue Bindungsmöglichkeiten für Anthracen. Frühere vergleichende $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zwischen Ribozym-Produkt-Komplex und freiem Ribozym (zweisträngige Varianten 38+11mer-Edukt bzw. 38+11mer-Produkt) deuteten bereits auf eine teilweise Umstrukturierung des Ribozyms beim Ablauf der Reaktion hin ^[125]. Die Kristallstrukturen des Ribozyms sowohl ohne, als auch mit gebundenem Produkt sind sehr ähnlich, die Bindungstasche erscheint daher präformiert.

Bisher ist es nicht gelungen, die Kristallstruktur eines Ribozym-Anthracen-Komplexes zu erhalten. Es besteht die Frage, ob bei Bindung des Anthracen-Substrates ein „induced fit“, d. h. eine (temporäre) Konformationsänderung der Ribozymfaltung stattfinden könnte. Dies wäre ein Befund, der häufig am Beispiel von Enzymen beschrieben wurde. Eine Stacking-Interaktion, wie sie für dieses Substrat angenommen wird, scheint in der bisher bekannten Bindungstasche nicht in optimaler Weise möglich zu sein. Denkbar wäre ein temporäres

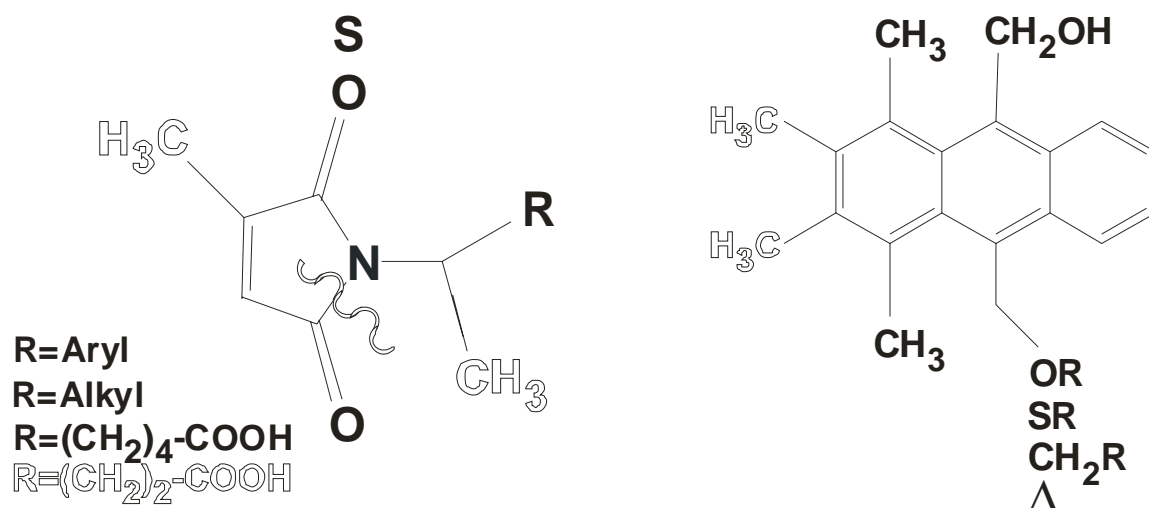


Abbildung 64 : Substituierbare (schwarz) und nichtsubstituierbare (linienumrahmt) Positionen der Substrate. Die angegebenen Reste „R“ gelten für das Dienophil ^[124].

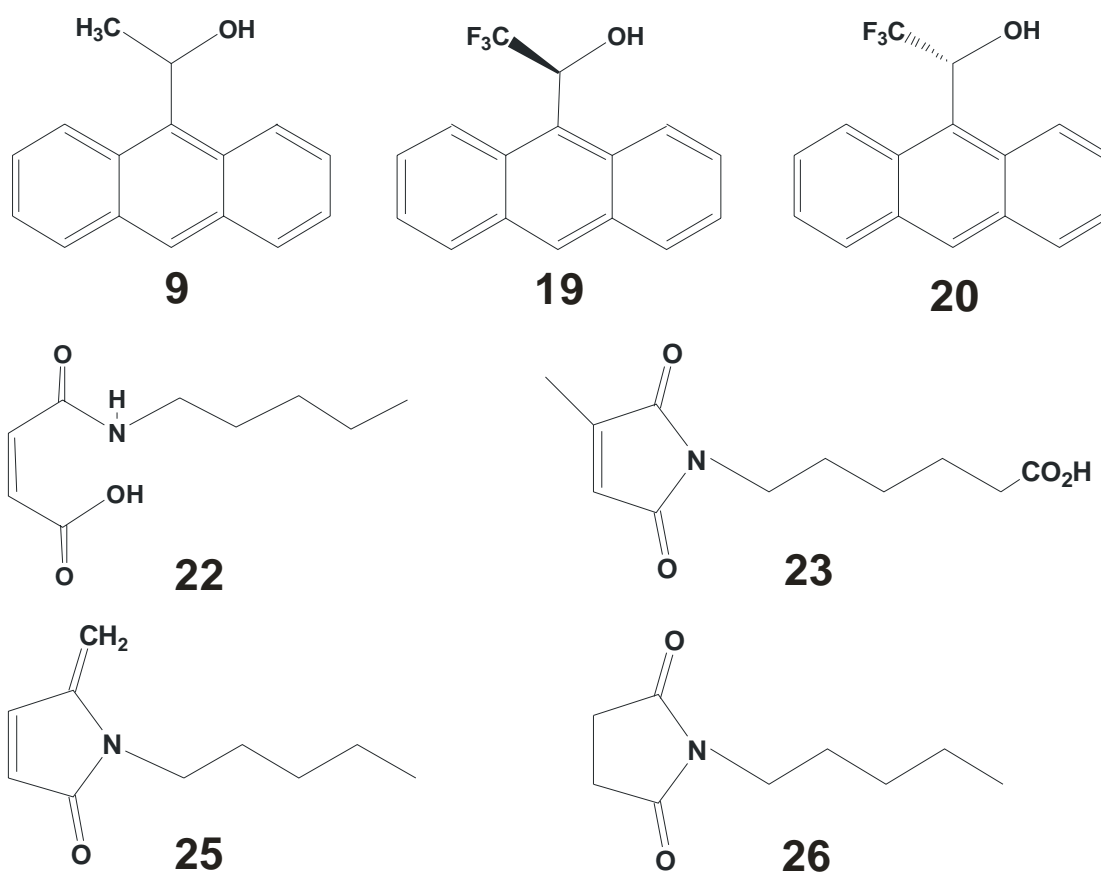


Abbildung 65: Spezielle Anthracen- und Maleimidanaloga. Die Nummerierung entspricht der Literaturstelle ^[124].

Schließen der Bindungstasche bei der Substratbindung, bei der sich möglicherweise der offene Spalt zwischen den Pseudoknotenbasenpaaren A3U20 und G2C10 schließen könnte. In einer „Sandwich“-artigen Anordnung zwischen zwei Basenpaaren wäre eine partielle Interkalation des Anthracens für eine intensive Stacking-Interaktion gut vorstellbar. Dies wäre wahrscheinlich eine temporäre Konformationsänderung in größerem Kontext, also mit einem „induced fit“, verbunden.

Der K_m -Wert des Anthracens (A-HEG) ist mit 370 μM um mehr als eine Größenordnung kleiner als der des Maleimides (MACA) mit 8 mM^[57]. Die entscheidende Rolle bei der Bindung und ggf. Bildung eines „aktivierten“ Komplexes sollte demnach dem Anthracen-Substrat zukommen. Indizien für solche Konformationsänderungen können in Substratspezifitätsuntersuchungen gefunden werden. Solche Hinweise ergeben sich aus Beobachtungen, dass enantiomere Anthracenanaloga mit 9'-Verzweigungen unterschiedlich akzeptiert werden in Abhängigkeit ihrer stereochemischen Konfiguration. Bei den Eduktenantiomeren handelt es sich um die R- und S-Stereoisomere der Pirkle- Alkohole 19 und 20 (vgl. Abb. 64, S.99)^[124]. Es wird in der folgenden Argumentation als Voraussetzung angenommen, dass eine „tail-first“-Anordnung dieser verzweigten Analoga sterisch stark benachteiligt ist gegenüber einer „head-first“-Anordnung, in der die räumlich anspruchsvollen Substituenten zur freien Peripherie des Ribozyms orientiert sind. Die Daten sprächen daher für sterische Restriktionen in der Nachbarschaft für diese Reste auch bei „head-first“-Anordnung der Anthracenanaloga. Die signifikante Unterscheidung der Enantiomere in Kinetiken spricht für kritische sterische Bedingungen. Solche sterischen Restriktionen scheinen jedoch für die gemäß der Kristallstruktur bekannte Produktbindungstasche bei „head-first“-Anordnungen nicht zu existieren, die Daten wären unter diesen Bedingungen plausibel nur mit einer partiellen Schließung der Tasche zu erklären. Bezüglich der Maleimidanaloga konnte experimentell gezeigt werden, dass die Analoga 22, 25 (keine Reaktionsbeschleunigung) und 26 (unreaktiv) entweder nicht als Substrate akzeptiert, oder nicht erkannt werden (vgl. Abb. 64, S. 99)^[124]. Dem Substratanalogon 22 fehlt der geschlossene Fünfring; Verbindung Nr. 25, das nicht als Dienophil bekannt ist, trägt statt eines Carbonylsauerstoffes eine Methylengruppe und Nr. 26, *N*-Pentylsuccinimid, trägt keine Doppelbindung. Ferner wurde gezeigt, dass alle drei Analoga die Katalyse der Reaktion zwischen A-HEG und NPM nicht inhibieren. Es konnte die Schlussfolgerung getroffen werden, dass die isolierten strukturellen Determinanten jeweils eines Ringes oder einer Doppelbindung offenbar für die Bindung des Maleimidsubstrates bzw. die inhibierende Bindung seiner Analoga nicht hinreichend sind. Die Existenz der aliphatischen Seitenkette ist zwar zur Substratbindung notwendig, sie scheint jedoch keine

dominierende Rolle spielen ^[124]. Über die Annahme eines partiellen Stackings in einer Orientierung zwischen den Nukleotiden G2 und A4 hinaus, könnte die Bindung des Anthracens auch auf alternative Weise stattfinden. Das Strukturelement des scharfen Turns könnte dabei eine besondere Rolle spielen. Es fällt auf, dass seine Geometrie ungefähr einen halben C-Sechsring in ähnlicher Symmetrie umspannt (vgl. Abb. 52, S. 83). Im Kristallstrukturmodell ist allerdings als „Eingang“ nur ein kleiner Spalt mit ca. 0,5 - 1 Å Breite in Richtung der Schleifeninnenseite zu erkennen, dessen Zugang zum Kompartiment durch das Nukleotid A18 partiell versperrt wird (vgl. Abb. 66).

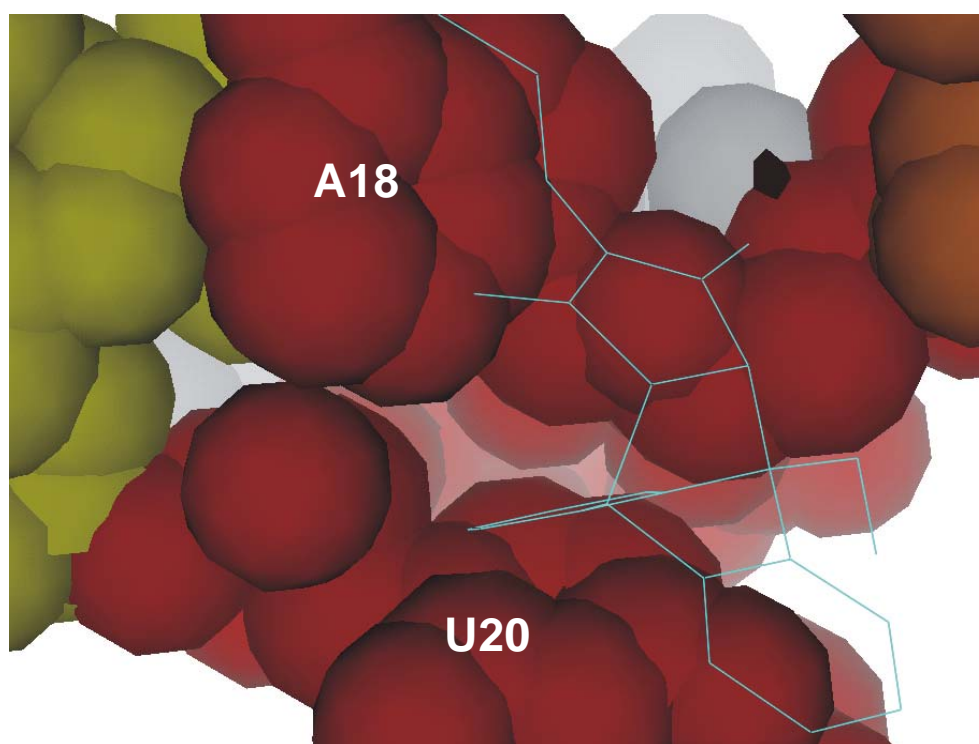


Abbildung 66: Spaltenförmige Öffnung im scharfen Schleifen-Kompartiment. Rot: Nukleotide A18, C19 und U20. Orange: U17. Gelb: Teil der Helix II. Blau: Produktmolekül in Liniendarstellung.

Experimente deuten auf sterische Hinderungen in diesem Bereich hin (vgl. Daten Abb. 26, S. 56). Dieses Schleifenkompartiment ist sehr wahrscheinlich hydrophober als die stärker hydratisierte Umgebung, zumal sich keine Ladungsträger wie Phosphatsauerstoffe an seiner Innenseite befinden. Die Hydrophobizität wäre ein Argument für eine mögliche Bindung des Anthracens an diesem Ort, die durch hydrophobe oder solvophobe Effekte durch umgebende Wassermoleküle angetrieben werden könnte. Der Einfluss solcher solvophoben Effekte wird für Diels-Alder-Reaktionen in polaren Lösungsmitteln wie Wasser allgemein angenommen ^[54]. Eine solche Bindung wäre durch eine partielle Öffnung des Schleifenelementes möglich. Ein angeregter Konformationszustand könnte z.B. durch Rotation der externen Gerüst-

helices I und III verursacht werden. In diesem Zusammenhang könnte die sterische Konstellation zwischen scharfem Turn und der Aufhängung (Hinge), die Helix I und II verbrückt, eine Rolle spielen. Diese Aufhängung ist ähnlich dem scharfen Turn in einer engen Schleife angeordnet. Diese beiden Schleifen stehen in einem Abstand von $3,2 \text{ \AA}$ bis ca. $4,5 \text{ \AA}$ mit entgegengesetzten Krümmungen fast rechtwinklig zueinander. Diese Elemente könnten ähnlich einem Druck-Zug-Element eine gemeinsame Verankerung darstellen.

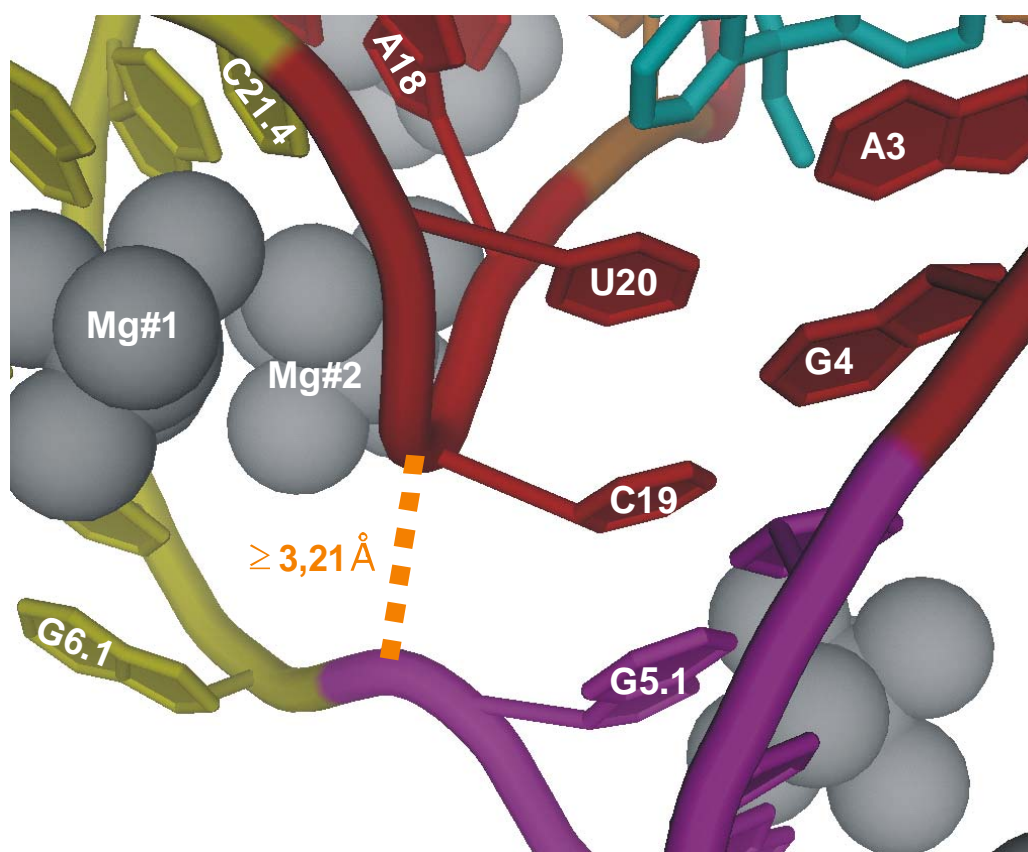


Abbildung 67: Abstand (orange) des Scharfen Turns (rot) zur „Aufhängung“ (Hinge, gelb/violett) zwischen Helix I und Helix II. Mögliches Druck-Zug-Element mit funktionaler Bedeutung einer „Verankerung“.

Diese Konstellation unterstützt möglicherweise die Öffnung des Turns bei Rotationen der externen Gerüsthelices I und III. Das Element aus scharfem Turn und Hinge ist in Abb. 67, abgebildet. Das Substrat Anthracen könnte zunächst beim konformationalen Grundzustand des Ribozyms auf dem Pseudoknotenbasenpaar A3-U20 durch einseitiges Stacking „schwimmend“ zwischen Turn-Region und G2/A3 begrenzt binden. Nach thermischer konformationaler Anregung der RNA könnte Anthracen ins öffnende Schleifenkompartiment solvophob gedrängt werden. Konkurrenz durch Diffusion von Wasser ins öffnende Kompartiment wäre minimiert wegen des bereits in unmittelbarer Nähe angeordneten Anthracenmoleküles. Durch die Bindung im Schleifenkompartiment könnte ein elektronischer Druck (strain) verursacht

durch die angeregte Ribozym-Konformation partiell auf das Anthracenmolekül wirken. Anthracen besitzt ein relativ leicht polarisierbares delokalisiertes π -Elektronensystem. Delokalisierte π -Elektronen könnten auf den äußeren Stimulus reagieren, indem deren Aufenthaltswahrscheinlichkeit auf der „freien Außenseite“ des tricyklischen Ringsystems steigt. Die Folge wäre die Bildung eines Dipols mit der elektronenärmeren Seite in der Schleifenregion und der elektronenreicheren Seite auf der offenen Bindungstaschenseite. Die positive Partialladung könnte stabilisiert (oder verursacht) werden durch die angrenzenden negativen Ladungen an der Außenseite der Schleifenregion, die durch die Rückgrat-Phosphat-sauerstoffe bereitgestellt werden (vgl. Abb. 68, S. 104). Einen weiteren Einfluss könnte das Nukleotid G2 ausüben, das durch partielles Schließen der spaltenförmigen Tasche die Geometrie des Anthracens in Richtung des angeregten nichtplanaren Zustandes durch sterischen und elektronischen Druck („strain“) verändern oder sterisch begrenzend wirken könnte. Eine Polarisierung mit der Folge einer höheren Aufenthaltswahrscheinlichkeit negativer Ladung am Dien in Verbindung mit einer Destabilisierung des planaren Zustandes durch sterische Faktoren könnte eine Erhöhung des Dien-HOMO bewirken. Ein temporäres Schließen der Bindungstasche durch das Guanin 2 wäre konform mit dem Befund, dass an den Anthracenpositionen 2 und 3 der „schmalen“ Seite keine Substituenten toleriert werden (vgl. Abb. 64, S. 99) ^[124]. Im oben beschriebenen Zustand wäre die negative Partialladung mit höherer Aufenthaltswahrscheinlichkeit an den zentralen Anthracenpositionen 9 und 10 in Richtung der vom „tragenden“ Basenpaar A3U20 abgewandten Seite lokalisiert. Diese Konstellation entspräche einer Grundzustandsdestabilisierung des Anthracens. Ein partielles Schließen der Bindungstasche durch das Nukleotid G2 könnte einhergehen mit einer Änderung der Interaktion des G1, das die Basenplattform mit C11 und A16 verlässt und den Platz des G2 im Triple einnimmt. Wegen der offenbar fehlenden spezifischen Interaktionen zum dritten Partner A16 wäre eine Konformationsänderung des G1 wahrscheinlich tolerabel. In einem invertierten Plattformbasenpaar C1-G11 (das nicht toleriert wird) wäre ein Positionstausch G2 gegen G1 nicht mehr möglich. Für das Maleimid wird angenommen, dass kein individuelles Atom oder Strukturmerkmal bei der Erkennung dominiert. Stattdessen ist der gesamte fünfgliedrige Ring mit seinen Heteroatomen und seiner konjugierten π -Elektronendichte an den korrekten Positionen wichtig ^[124].

Nach der Bindung eines Anthracenmoleküls in der postulierten Weise würde damit für das Maleimidsubstrat ein formkomplementäres Kompartiment zur Bindung existieren. Solvophobe Effekte könnten seine aliphatische Seitenkette in den rillenförmigen Raum an der Ribozymperipherie drängen. Entsprechend der NAIM-Resultate könnte der Hetero-Fünfring in

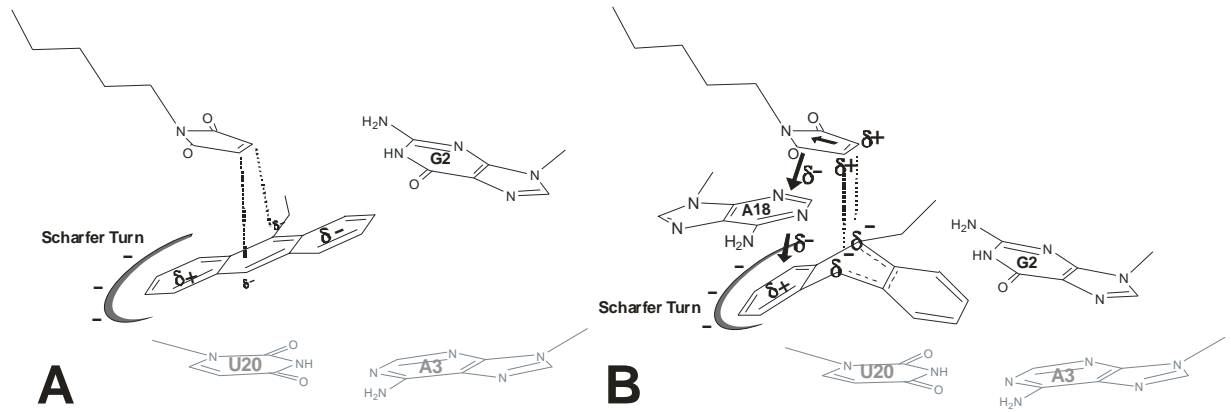


Abbildung 68: Hypothesen zum Reaktionsmechanismus. A: Aktivierung des Anthracens. B: Gekoppelte Aktivierung des Diens und Dienophils möglicherweise unter Beteiligung der Nukleotide A18 und G2.

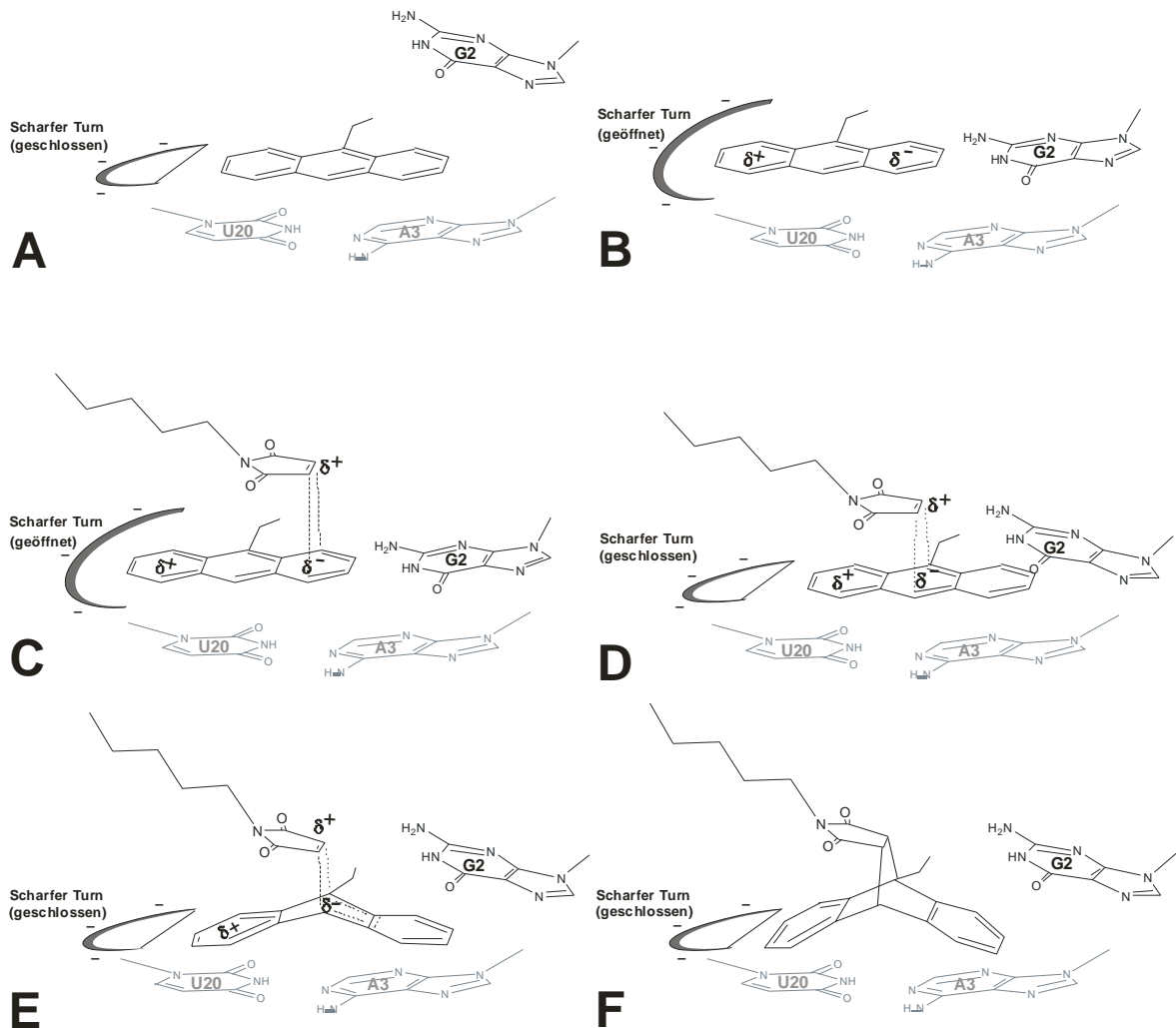


Abbildung 69: Alternative Hypothese zum Reaktionsmechanismus: A: Einseitiges „Stacking“ des Anthracens auf Basenpaar A3-U20. B: Öffnung des Scharfen Turns, solvophob getriebenes Eindringen des Diens, Dipolbildung und Begrenzung durch G2 in alternativer Konformation. C: Bindung des Dienophils und positive Polarisierung seiner Doppelbindung. D: ES-Komplex, negative Partiaalladungen am Dien-C9 und -C10 stabilisiert durch positive Partiaalladung am Dienophil. E: TS-Komplex. F: Produkt.

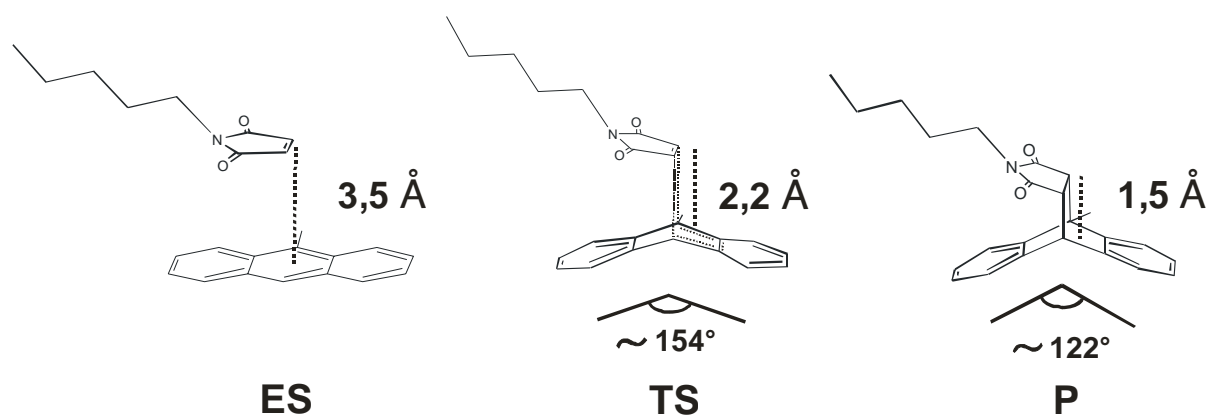


Abbildung 70: Produkt (P) und postulierte Modelle für den koplanaren ES-Komplex und dem Übergangszustand (TS). ES-Komplex modelliert im Kontext der Kristallstruktur. TS-Komplex berechnet mit Hilfe von MOPAC. Produkt aus der kristallographischen Struktur. Abbildung adaptiert aus ^[59].

korrekte Position gebracht werden durch die offenbar existierenden G9-Amino-Maleimidcarbonyl-Wechselwirkungen über eine zwar nichtessentielle, aber dennoch scheinbar wichtige Wasserstoffbrücke (vgl. Abb.34, S. 62 und Abb.43, S. 73). Fände die Maleimidbindung vor einer Aktivierung des gebundenen, noch planaren Anthracens statt, wäre seine Anordnung koplanar. Eine solche Konstellation ist im Rahmen einer alternativen Hypothese des Reaktionsmechanismus in Abb. 69, S. 104, dargestellt. In B) fände eine Polarisierung der Anthracen-Elektronendichte statt, die von der Maleimidbindung gefolgt würde. Hierbei wäre die Position des Maleimides in seiner Bindungstasche fixiert. Seine Doppelbindung würde durch die benachbarte negative Partialladung des Diens positiv polarisiert werden. Es wird angenommen, dass die partielle Bindung des Anthracens in der Schleife temporär wäre und die Bindungsdauer durch seine Diffusionsgeschwindigkeit begrenzt wäre. Die Lebensdauer des hypothetischen Dipoles wird als kurz angenommen. Eine durch ihn verursachte Polarisierung der Maleimid-Doppelbindung hätte möglicherweise eine wesentlich verlängerte Lebensdauer, stabilisiert durch polare Wechselwirkungen über Carbonylsauerstoffe durch Hydratwassermoleküle oder die G9-Aminofunktion des Ribozyms. Hierbei könnte diese positive Partialladung am Dienophil die Anordnung der negativen Partialladung am Dien während seiner Verschiebung „führen“. Eine solche Konstellation wird in Abb. 69, S. 104, von C) zu D) erreicht. In Abb. 70 sind zum Vergleich sterische Parameter vom ES- und TS-Komplex sowie vom Produkt P dargestellt ^[59].

Es ist beim derzeitigen Stand der Kenntnis ungeklärt, ob zur Katalyse der Reaktion die Aktivierung eines oder beider Reaktanden, d. h. deren Grundzustandsdestabilisierung oder die Stabilisierung des (gemeinsamen) Übergangszustandes notwendig ist, oder ob lediglich

spezifische Bindung und ortsspezifische Proximität beider Substrate, die durch solvophobe Effekte in eine Entropiefalle getrieben wurden, ausreicht.

Das hier untersuchte Diels-Alderase-Ribozym benötigt offenbar keine Lewis-Säuren zur Stimulation der Katalyse. Magnesiumionen sind zwar als schwache Lewis-Säuren anzusehen, deren notwendige Anwesenheit beruht jedoch ausschließlich auf deren strukturierender Wirkung. Eine Senkung des LUMO des Dienophils kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dieses geschähe jedoch offenbar nicht durch Lewis-Säuren (Stuhlmann, F., unpubliziert). Ein weiteres denkbare Szenario wäre die simultane Senkung des Dienophil-LUMO und Erhöhung des Dien-HOMO, möglicherweise in einem gekoppelten Prozess. Ein modellhaftes Szenario bestünde in einer Anordnung ähnlich einem Ladungsrelais. In einer Erweiterung der oben dargestellten Hypothese zur Anthracenbindung und -aktivierung könnte ein Elektronendichteabzug vom Dienophil Maleimid mit einer Dipolbildung am Anthracenmolekül gekoppelt sein. Als möglicher Vermittler bei der Konformationsänderung käme das Nukleotid A18 als Teilnehmer in Betracht. Die Voraussetzung wäre wahrscheinlich die Existenz von interaktionsfähigen π -Elektronen in einer koplanaren Anordnung der drei Partner. Die vermittelnde Wirkung könnte auch ähnlich der Stacking-Interaktionen als temporäre induzierte Dipolbildung stattfinden (vgl. Abb. 68, S. 104). Eine für den Katalysemechanismus wichtige Rolle des A18 würde Erklärungen bieten für die fehlende Substituierbarkeit des U8-A18-Nichtstandardbasenpaares und für das fehlgeschlagene Suppressionsexperiment. Eine Senkung des Dienophil-LUMO in Kombination mit einer Dien-HOMO-Erhöhung bei gleichzeitiger Erhaltung einer geeigneten sterischen Konstellation der Reaktanden bedeuteten wegen des simultan ablaufenden Prozesses optimale Katalysebedingungen. Ein solcher Mechanismus würde die gleichzeitige Bindung, Aktivierung und Reaktion des Maleimides beinhalten. Dieses Szenario würde die fehlenden Inhibitoreigenschaften der Substratanaloga 22, 25 und 26 (vgl. Abb. 65, S. 99) erklären. Ein präziserer und detaillierter Mechanismus kann hier aufgrund offener Fragestellungen nicht vorgeschlagen werden. Die dargestellten Vorschläge für den Katalysemechanismus entsprechen einem als wahrscheinlich geltenden konzertierten Reaktionstyp, in dem beide neuen σ -Bindungen des Diels-Alder-Produktes in einem gemeinsamen Schritt gebildet werden. Die Veri- bzw. Falsifizierung der dargestellten Hypothesen, die sich im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen befinden, stellt eine interessante Aufgabe für die Zukunft dar. Die oben genannten Szenarien stellen Modellvorstellungen dar und sollen zur Erweiterung der Diskussionsbasis dienen, da es bisher außer dem Modell einer durch solvophobe Effekte unterstützten Entropiefalle keine weiteren alternativen Vorstellungen über den Katalysemechanismus des Diels-Alderase-Ribozyms gibt.

Die Vorstellung einer Umwandlung von potentieller Energie, die durch einen thermisch angeregten Konformationszustand des Ribozyms bereitgestellt wird, in eine Ladungstrennung, wie sie im postulierten Dipol im Dien vorläge, entspräche dem Bild eines durch solvophobe und elektrostatische Effekte unterstützten, thermisch angetriebenen, molekularen Dynamos. Hierfür wird der Begriff „Thermodynamo“ vorgeschlagen.

6.9.: Signifikanz

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen bildeten einen wichtigen Teil der Grundlage zur Entwicklung von Tertiärstrukturmodellen mit Hilfe computerunterstützter Techniken. Daten der Mutationsanalyse dienten darüber hinaus bei der kristallographischen Aufklärung der Struktur. Insbesondere waren die Untersuchungen zur Rolle von 2'-Hydroxylgruppen zur Auswahl von Selen-Markerpositionen im Molekül bei der Lösung des Phasenproblems bei der Röntgenstrukturanalyse von Nutzen. Die gewählte Mutante A12G, die hierfür kristallisiert wurde, ist im Rahmen der frühen Mutationsanalyse als voll aktiv erkannt worden ^[58]. Die gesicherte Erkennung von einem der beiden Pseudoknoten durch biochemische Charakterisierung beschleunigte im Rahmen der Röntgenstrukturanalyse die Interpretation der berechneten Elektronendichteverteilung beim Bau eines Molekülmodelles, insbesondere angesichts der erzielten relativ geringen Auflösung von $\geq 3\text{\AA}$. Die Befunde stehen insgesamt sehr gut im Einklang mit den Kristallstrukturdaten und den Daten aus weiteren, zum jetzigen Zeitpunkt durchgeführten Charakterisierungsexperimenten ^[58, 124] sowie der frühen Klon-Sequenzanalysen, die am Ende der Ribozymselektion durchgeführt wurden ^[1].

Auf der Basis dieser Daten konnten Strukturelemente des Ribozyms klassifiziert und funktionell zugeordnet werden. Darüber hinaus wurde es möglich, die Bedeutung einzelner Wasserstoffbrückenbindungen sowie mehrerer Mg^{2+} -Ionen für die Stabilität und katalytische Funktion des Ribozyms aufzuklären. Die herausragende Bedeutung eines zentralen Wasserstoffbrücken-Netzwerkes wurde durch die experimentellen Daten eindrucksvoll belegt. Ferner wurden Aussagen über die Bedeutung einer mutmaßlich wichtigen Interaktion zwischen Amino-G9 und dem Maleimid-Carbonylsauerstoff des Diels-Alder-Produktes für den Katalysemechanismus ermöglicht. Offenbar findet kein signifikanter katalysestimulierender elektronenziehender Effekt auf das elektronenarme Dienophil Maleimid unter der Beteiligung des 2-NH₂ des G9 statt, ein Befund, der konsistent zu der bereits früher festgestellten, nicht absolut strengen Konservierung dieses Nukleotides bzw. seiner Aminogruppe. Generell verursacht der Verlust nur einer einzigen Wasserstoffbrücke an der Oberfläche der Bindungstasche in fast allen Fällen praktischen vollständigen Aktivitätsverlust. Neben der Bildung aller Gerüstelemente und beider Pseudoknoten scheint die Basentriplebildung des Pseudoknotenbasenpaares G2C10 mit der Base U17, insbesondere die nicht invertierbare Akzeptor-Donor-Paarung 2O-U17 und 4NH₂-C10 eine herausragende Bedeutung für die aktive Tertiärstruktur einzunehmen. Diese Wasserstoffbrücke innerhalb der Triple-Anordnung stellt einen Kreuzungsort beider Bulgehälften und offenbar eine entscheidende Klammer zur Bildung der aktiven Faltung dar. Weitere Untersuchungen stehen an zu der Frage, warum das

Basenpaar U8-A18, das im Kristall in einer reversen Hoogsteen-Anordnung vorliegt, ohne Aktivitätsverlust nicht substituierbar ist und warum kein Interferenz-Suppressionsexperiment in NAIM-Experimenten erfolgreich war. Eine mögliche Erklärung wäre eine Konformationsänderung während des Faltungsprozesses, verbunden mit einer alternativen Basenpaarung in einem temporären essentiellen Faltungsintermediat mit der Folge einer Gleichgewichtsverschiebung und Konzentrationsverringern der aktiven Faltung. Auf der Basis von thermodynamischen Erwägungen, experimentellen Daten und Postulaten bezüglich der Richtung und Kooperativität der Hybridisierung von Sekundärstrukturelementen kann eine Faltungssequenz zur kompletten Tertiärstruktur vorgeschlagen werden.

Die erhaltenen Daten dienen weiterhin als Grundlage für die Konstruktion modifizierter Diels-Alderase-Ribozyme. Hierzu gehören z. B. farbstoffmarkierte Konstrukte für FRET-Messungen im Zusammenhang mit der Ribozymfaltungssequenz und ihrer Dynamik. Weiterhin wurden in unserer Arbeitsgruppe allosterische Ribozymkonstrukte hergestellt, deren Aktivität über spezifische kleine organische Moleküle, wie z. B. Theophyllin ^[126], oder auch spezifische mRNA-Sonden geschaltet werden ^[127]. Darüber hinaus können die gewonnenen Informationen als Basis für das Design von verfeinerten NMR-Untersuchungen dienen.

7.: LITERATUR

- [1] B. Seelig, A. Jaschke, *Chem Biol* **1999**, *6*, 167.
- [2] T. R. Cech, A. J. Zaug, P. J. Grabowski, *Cell* **1981**, *27*, 487.
- [3] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, *35*, 849.
- [4] H. D. Madhani, C. Guthrie, *Cell* **1992**, *71*, 803.
- [5] T. Tuschl, *Chembiochem* **2001**, *2*, 239.
- [6] T. R. Cech, *Biosci Rep* **1990**, *10*, 239.
- [7] S. Altman, *Biosci Rep* **1990**, *10*, 317.
- [8] F. Michel, J. L. Ferat, *Annu Rev Biochem* **1995**, *64*, 435.
- [9] A. Hampel, R. Tritz, M. Hicks, P. Cruz, *Nucleic Acids Res* **1990**, *18*, 299.
- [10] J. M. Buzayan, W. L. Gerlach, G. Bruening, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 8859.
- [11] M. Y. Kuo, L. Sharmeen, G. Dinter-Gottlieb, J. Taylor, *J Virol* **1988**, *62*, 4439.
- [12] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, M. Capel, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Nature* **1999**, *400*, 841.
- [13] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 905.
- [14] P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 920.
- [15] T. A. Steitz, P. B. Moore, *Trends Biochem Sci* **2003**, *28*, 411.
- [16] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505.
- [17] D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu Rev Biochem* **1999**, *68*, 611.
- [18] C. Darwin, *On the Origin of Species* **1859**.
- [19] K. B. Chapman, J. W. Szostak, *Chem Biol* **1995**, *2*, 325.
- [20] E. H. Ekland, J. W. Szostak, D. P. Bartel, *Science* **1995**, *269*, 364.
- [21] A. J. Hager, J. W. Szostak, *Chem Biol* **1997**, *4*, 607.
- [22] J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Nature* **1994**, *371*, 31.
- [23] C. Wilson, J. W. Szostak, *Nature* **1995**, *374*, 777.
- [24] M. Illangasekare, G. Sanchez, T. Nickles, M. Yarus, *Science* **1995**, *267*, 643.
- [25] P. A. Lohse, J. W. Szostak, *Nature* **1996**, *381*, 442.
- [26] X. Dai, A. De Mesmaeker, G. F. Joyce, *Science* **1995**, *267*, 237.
- [27] G. F. Joyce, X. Dai, A. De Mesmaeker, *Science* **1996**, *272*, 18.
- [28] P. J. Unrau, D. P. Bartel, *Nature* **1998**, *395*, 260.
- [29] S. Tsukiji, S. B. Pattnaik, H. Suga, *Nat Struct Biol* **2003**, *10*, 713.
- [30] S. Fusz, A. Eisenfuhr, S. G. Srivatsan, A. Heckel, M. Famulok, *Chem Biol* **2005**, *12*, 941.
- [31] S. Verma, F. Eckstein, *Annu Rev Biochem* **1998**, *67*, 99.
- [32] F. Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **2000**, *10*, 117.
- [33] B. S. Sproat, *J Biotechnol* **1995**, *41*, 221.
- [34] S. Leva, A. Lichte, J. Burmeister, P. Muhn, B. Jahnke, D. Fesser, J. Erfurth, P. Burgstaller, S. Klussmann, *Chem Biol* **2002**, *9*, 351.
- [35] B. Wlotzka, S. Leva, B. Eschgfäller, J. Burmeister, F. Kleinjung, C. Kaduk, P. Muhn, H. Hess-Stumpp, S. Klussmann, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 8898.
- [36] R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem Biol* **1994**, *1*, 223.
- [37] R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem Biol* **1995**, *2*, 655.
- [38] B. Cuenoud, J. W. Szostak, *Nature* **1995**, *375*, 611.
- [39] Y. Li, D. Sen, *Nat Struct Biol* **1996**, *3*, 743.
- [40] S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 4262.
- [41] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, *Nature* **1997**, *389*, 54.
- [42] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618.
- [43] S. A. Benner, Burgstaller, P., Battersby, T.R., Jurczyk, S., in: *The RNA World, Second Edition (Gesteland, R.F., Cech, T.R., Atkins, J.F., Eds.)* **1999**, 164.
- [44] O. Diels, Alder, K., *Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98.

- [45] K. P. C. Vollhard, Schore, N. E., *Organische Chemie, Lehrbuch, 4. Auflage* **2003**.
- [46] T. M. Tarasow, B. E. Eaton, *Cellular and Molecular Life Sciences* **1999**, *55*, 1463.
- [47] D. Hilvert, *Ciba Found Symp* **1991**, *159*, 174.
- [48] C. J. Suckling, W. H. Stimson, G. R. Proctor, L. H. Bence, L. Brooks, A. L. Khalaf, C. M. Tedford, S. Linaza, I. McGilp, R. Maguire, et al., *Biochem Soc Trans* **1993**, *21*, 1099.
- [49] C. J. Suckling, C. M. Tedford, G. R. Proctor, A. I. Khalaf, L. M. Bence, W. H. Stimson, *Ciba Found Symp* **1991**, *159*, 201.
- [50] K. Takahashi, *Chem Rev* **1998**, *98*, 2013.
- [51] J. Kang, J. Rebek, Jr., *Nature* **1996**, *382*, 239.
- [52] T. Ose, K. Watanabe, T. Mie, M. Honma, H. Watanabe, M. Yao, H. Oikawa, I. Tanaka, *Nature* **2003**, *422*, 185.
- [53] T. Ose, K. Watanabe, M. Yao, M. Honma, H. Oikawa, I. Tanaka, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 1187.
- [54] S. P. Kim, A. G. Leach, K. N. Houk, *J Org Chem* **2002**, *67*, 4250.
- [55] M. Hugot, N. Bense, M. Vogel, M. T. Reymond, B. Stadler, J. L. Reymond, U. Baumann, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 9674.
- [56] R. Breslow, *Chem Biol* **1998**, *5*, R27.
- [57] B. Seelig, S. Keiper, F. Stuhlmann, A. Jaschke, *Angew Chem Int Ed Engl* **2000**, *39*, 4576.
- [58] S. Keiper, D. Bebenroth, B. Seelig, E. Westhof, A. Jaschke, *Chem Biol* **2004**, *11*, 1217.
- [59] A. Serganov, S. Keiper, L. Malinina, V. Tereshko, E. Skripkin, C. Hobartner, A. Polonskaia, A. T. Phan, R. Wombacher, R. Micura, Z. Dauter, A. Jaschke, D. J. Patel, *Nat Struct Mol Biol* **2005**, *12*, 218.
- [60] N. B. Leontis, J. Stombaugh, E. Westhof, *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, 3497.
- [61] N. B. Leontis, E. Westhof, *Rna* **2001**, *7*, 499.
- [62] M. E. Burkard, Turner, D.H., Tinoco, I., Jr., in: *The RNA World, Second Edition (Gesteland, R.F., Cech, T.R., Atkins, J.F., Eds.)* **1999**, 683.
- [63] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure, Springer, New York* **1984**.
- [64] J. H. Cate, A. R. Gooding, E. Podell, K. Zhou, B. L. Golden, A. A. Szewczak, C. E. Kundrot, T. R. Cech, J. A. Doudna, *Science* **1996**, *273*, 1696.
- [65] J. H. Cate, A. R. Gooding, E. Podell, K. Zhou, B. L. Golden, C. E. Kundrot, T. R. Cech, J. A. Doudna, *Science* **1996**, *273*, 1678.
- [66] J. Massoulié, *Eur J Biochem* **1968**, *3*, 439.
- [67] R. D. Blake, J. Massoulié, J. R. Fresco, *J Mol Biol* **1967**, *30*, 291.
- [68] J. D. Robertus, J. E. Ladner, J. T. Finch, D. Rhodes, R. S. Brown, B. F. Clark, A. Klug, *Nature* **1974**, *250*, 546.
- [69] S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. H. Wang, N. C. Seeman, A. Rich, *Science* **1974**, *185*, 435.
- [70] A. Jack, J. E. Ladner, A. Klug, *J Mol Biol* **1976**, *108*, 619.
- [71] C. Tuerk, P. Gauss, C. Thermes, D. R. Groebe, M. Gayle, N. Guild, G. Stormo, Y. d'Aubenton-Carafa, O. C. Uhlenbeck, I. Tinoco, Jr., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 1364.
- [72] C. R. Woese, S. Winker, R. R. Gutell, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87*, 8467.
- [73] M. Costa, F. Michel, *Embo J* **1995**, *14*, 1276.
- [74] F. L. Murphy, T. R. Cech, *J Mol Biol* **1994**, *236*, 49.
- [75] L. Jaeger, F. Michel, E. Westhof, *J Mol Biol* **1994**, *236*, 1271.
- [76] H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature* **1994**, *372*, 111.
- [77] H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature* **1994**, *372*, 68.
- [78] R. T. Batey, R. P. Rambo, J. A. Doudna, *Angew Chem Int Ed Engl* **1999**, *38*, 2326.
- [79] J. D. Puglisi, J. R. Wyatt, I. Tinoco, Jr., *J Mol Biol* **1990**, *214*, 437.
- [80] A. R. Ferre-D'Amare, K. Zhou, J. A. Doudna, *Nature* **1998**, *395*, 567.

- [81] A. R. Banerjee, J. A. Jaeger, D. H. Turner, *Biochemistry* **1993**, *32*, 153.
- [82] D. M. Crothers, P. E. Cole, C. W. Hilbers, R. G. Shulman, *J Mol Biol* **1974**, *87*, 63.
- [83] D. E. Draper, *Trends Biochem Sci* **1996**, *21*, 145.
- [84] B. Sclavi, M. Sullivan, M. R. Chance, M. Brenowitz, S. A. Woodson, *Science* **1998**, *279*, 1940.
- [85] P. E. Cole, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1972**, *11*, 4368.
- [86] E. R. Hawkins, S. H. Chang, W. L. Mattice, *Biopolymers* **1977**, *16*, 1557.
- [87] C. W. Hilbers, G. T. Robillard, R. G. Shulman, R. D. Blake, P. K. Webb, R. Fresco, D. Riesner, *Biochemistry* **1976**, *15*, 1874.
- [88] K. A. Dill, H. S. Chan, *Nat Struct Biol* **1997**, *4*, 10.
- [89] K. A. Dill, A. T. Phillips, J. B. Rosen, *J Comput Biol* **1997**, *4*, 227.
- [90] N. H. Riedel, *Persönliche Kommunikation*.
- [91] M. S. Rook, D. K. Treiber, J. R. Williamson, *J Mol Biol* **1998**, *281*, 609.
- [92] B. Sclavi, S. Woodson, M. Sullivan, M. R. Chance, M. Brenowitz, *J Mol Biol* **1997**, *266*, 144.
- [93] Glenresearch, *Glen Report 11 (2)*, 6-8 **1998**.
- [94] G. Gish, F. Eckstein, *Nucleic Acids Symp Ser* **1987**, 253.
- [95] G. Gish, F. Eckstein, *Science* **1988**, *240*, 1520.
- [96] S. A. Strobel, *Biopolymers* **1998**, *48*, 65.
- [97] S. P. Ryder, S. A. Strobel, *Methods* **1999**, *18*, 38.
- [98] S. P. Ryder, L. Ortoleva-Donnelly, A. B. Kosek, S. A. Strobel, *Methods Enzymol* **2000**, *317*, 92.
- [99] L. C. Vortler, F. Eckstein, *Methods Enzymol* **2000**, *317*, 74.
- [100] J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res* **1987**, *15*, 8783.
- [101] C. Kao, M. Zheng, S. Rudisser, *Rna* **1999**, *5*, 1268.
- [102] C. Pitulle, R. G. Kleinedam, B. Sproat, G. Krupp, *Gene* **1992**, *112*, 101.
- [103] B. Seelig, J.äschke, A., *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 7729.
- [104] B. Seelig, A. Jaschke, *Bioconjug Chem* **1999**, *10*, 371.
- [105] M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J. Y. Tang, *Methods Enzymol* **1987**, *154*, 287.
- [106] M. H. Caruthers, S. L. Beaucage, C. Becker, J. W. Efcavitch, E. F. Fisher, G. Galluppi, R. Goldman, P. deHaseh, M. Matteucci, L. McBride, et al., *Gene Amplif Anal* **1983**, *3*, 1.
- [107] M. H. Caruthers, S. L. Beaucage, J. W. Efcavitch, E. F. Fisher, M. D. Matteucci, Y. Stabinsky, *Nucleic Acids Symp Ser* **1980**, 215.
- [108] K. L. Berkner, W. R. Folk, *J Biol Chem* **1977**, *252*, 3176.
- [109] R. I. Gumpert, O. C. Uhlenbeck, *Gene Amplif Anal* **1981**, *2*, 313.
- [110] T. E. England, O. C. Uhlenbeck, *Nature* **1978**, *275*, 560.
- [111] F. M. Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology* **1994-2005**, Vol. 1.
- [112] J. Sambrook, Russell, D. W., *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York* **2001**.
- [113] *Laborjournal*, **2004**, *6*, 70.
- [114] D. Tautz, M. Renz, *Anal Biochem* **1983**, *132*, 14.
- [115] R. W. Thuring, J. P. Sanders, P. Borst, *Anal Biochem* **1975**, *66*, 213.
- [116] K. Takahashi, Moore, S., *The Enzymes*, V, (Boyer, P. D., Ed.), *Academic Press, New York, third edition, vol. 15* **1982**, 435-468.
- [117] D. Bebenroth, *Diplomarbeit* **2000**.
- [118] R. Padilla, R. Sousa, *Nucleic Acids Res* **1999**, *27*, 1561.
- [119] R. Padilla, R. Sousa, *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, e138.
- [120] R. Wombacher, S. Keiper, S. Suhm, A. Serganov, D. J. Patel, A. Jaschke, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 2469.

- [121] X. Chen, R. Kierzek, D. H. Turner, *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 1267.
- [122] R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini, M. L. Kopka, *Science* **1982**, *216*, 475.
- [123] H. R. Drew, S. Samson, R. E. Dickerson, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1982**, *79*, 4040.
- [124] F. Stuhlmann, A. Jaschke, *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 3238.
- [125] S. Keiper, *Dissertation* **2003**.
- [126] M. Helm, M. Petermeier, B. Ge, R. Fiammengo, A. Jaschke, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 10492.
- [127] S. Amontov, A. Jaschke, *Nucleic Acids Res* **2006**, *34*, 5032.
- [128] W. Stiege, *Persönliche Kommunikation*.
- [129] Fermentas, *Life Sciences Molecular biology Catalog & Product Application Guide* **2006**, 208.
- [130] Roth, *Laborbedarf, Katalog* **2006**, 773.

8.: ANHANG

A) Publikationen, Poster und Vorträge

Publikationen

Andres Jäschke, Friedrich Stuhlmann, Dirk Bebenroth, Sonja Keiper, Richard Wombacher:
Ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation
Biochem. Soc. Transact. **2002** (30) 1137-1140

Sonja Keiper, Dirk Bebenroth, Friedrich Stuhlmann, Andres Jäschke,
RNA as a catalyst: The Diels-Alderase-Ribozyme
In: Schmuck, C. and Wennemers, H. (Eds.)
Highlights in Bioorganic Chemistry: Methods and Applications
Wiley VCH **2004** 422-433

Sonja Keiper, Dirk Bebenroth, Burckhard Seelig, Eric Westhof, Andres Jäschke:
Architecture of a Diels-Alder ribozyme with a preformed catalytic pocket
Chem. Biol. **2004** (11) 1217-1227

Dirk Bebenroth, Andres Jäschke:
Dissecting structure and function of an RNA active site by atomic mutagenesis
Manuskript in Vorbereitung

Dirk Bebenroth, Andres Jäschke:
Do multiple access pathways to a catalytic center have different kinetics?
Manuskript in Vorbereitung

Dirk Bebenroth, Andres Jäschke:
Modified RNA's used for NAIM: Advanced preparation techniques
Manuskript in Vorbereitung

Poster

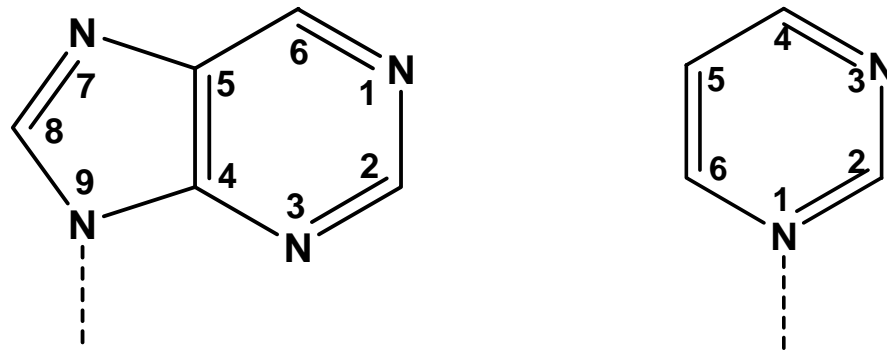
Sonja Keiper, Dirk Bebenroth, Friedrich Stuhlmann, Richard Wombacher, Andres Jäschke:
Structural investigations of Diels-Alderase ribozymes.
8th Annual meeting of the RNA society, Wien, 1.-6. Juli 2003

Richard Wombacher, Friedrich Stuhlmann, Sonja Keiper, Dirk Bebenroth, Andres Jäschke:
Structure-function relationships in RNA-catalyzed Diels-Alder reactions
Heidelberg Forum of Molecular Catalysis, 27. Juni 2003

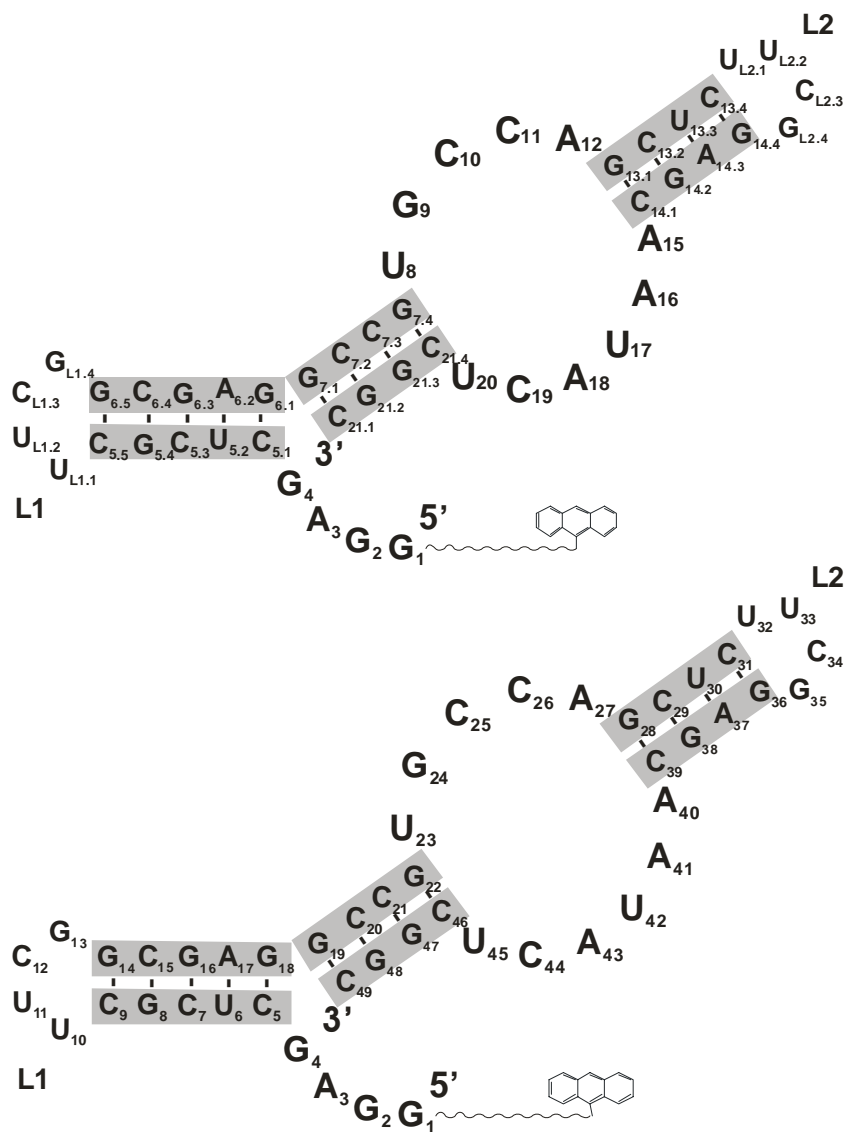
Vorträge

Dirk Bebenroth, Friedrich Stuhlmann, Sonja Keiper, Richard Wombacher, Andres Jäschke:
Ribozyme Catalysis of Carbon-Carbon bond formation
1st Meeting of the GBM Study Section RNA-Biochemistry and Workshop „RNA and disease“,
Blaubeuren, 30.7-2.8.2002

B) Purin- und Pyrimidinstrukturen mit Positionsnummerierungen



Positionsnummerierungen des Purins (links) und Pyrimidins (rechts)
 Gestrichelt: Positionen der N-glykosidischen Bindung



49nt-Minimalmotive mit zwei verschiedenen Nummerierungsschemata. Oben: Vorwiegend verwendete, nicht fortlaufende Nummerierung. Unten: Fortlaufende Nummerierung, die im Rahmen der NAIM-Experimente verwendet wurde.

C) Allgemeine Ansatzvorschriften und Pufferzusammensetzungen**Standardansatz für ds-DNA-Template für Transkriptionen**

Gesamtvolumen 100µL

Oligonukleotid A (antisense) 100 µM	20 µL
Oligonukleotid B (sense) 100 µM	20µL
PCR-Puffer 10x	10 µL
Wasser ad	100 µL

PCR-Puffer 10x

Tris-HCl, pH 7,5	200 mM
KCl	500 mM

Transkriptionspuffer**„Milligan“-Puffer 10x** ^[100]

Tris-HCl pH 8,0	400 mM
MgCl ₂	219 mM
Spermidin	10 mM
Triton-X 100	0,1 %

„W“-Puffer 10x ^[128]

Tris-HCl pH 7,5	800 mM
MgCl ₂	220 mM
Spermidin	10 mM

„W“-Puffer 10x

Tris-HEPES pH 7.5	800 mM
MgCl ₂	220 mM
Spermidin	10 mM

Kinasierungspuffer ^[129]

(„forward“) 10x

Tris-HCl pH 7,6	500mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	50 mM
Spermidin	1 mM
EDTA	1 mM

Ligationspuffer 10x ^[129]

Tris-HCl	400 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP pH 7,8	5 mM

Elektrophoresepuffer^[130]**10x TBE pH 7,5**

Tris-Borat	1 M
EDTA	20 mM

Probenpuffer (PAGE)

Xylencyanol FF	0,5 %
Bromphenolblau	0,05 %
Formamid	50 %

Probenpuffer, nativ

Xylencyanol FF	0,5 %
Bromphenolblau	0,05 %
Glycerol	30 %

HPLC-Puffer**Puffer A**

TEAAc pH 7,0	0,1 M
--------------	-------

Puffer B

TEAAc pH 7,0	0,1 M
Acetonitril	80 %

DA-Reaktions-Stop-Mix

EDTA	20 mM
β -Mercaptoethanol	100 mM
Formamid	80 %

D) Software (für die schriftliche Fertigstellung dieser Arbeit)

MS-Word, MS-Excel, EndNote 9, ChemDraw Ultra 9.0, CorelDraw 11,
PyMOL v0.99 (DeLano Scientific)

E) Abkürzungen und Einheiten

7dA(G)	7deaza-A (G)
A	Adenosin, Ampere, Anthracen
Å	Ångström
A-HEG	Anthracen-Hexaethylenglykol
AK	Antikörper
AP	Aminopurin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorption-Units
BM	Biotinmaleimid
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BTT	5-Benzylmercaptotetrazol
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
iC, <i>iso</i> -C	<i>Iso</i> -Cytidin
Ci	Curie, 1Ci = 37 MBq
cpm	Zählpulse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CPG	Controlled Pore Glass
CTP	Cytidintriphosphat
d	Desoxy-
ds	double stranded, doppelsträngig
DA-	Diels-Alder-
DAP	Diaminopurin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMS	Dimethylsulfat
DMT-	Dimethoxytrityl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dr.	Doktor
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Ethylenglykol
ES-Komplex	Enzym-Substrat-Komplex
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
G	Guanosin
iG, <i>iso</i> -G	<i>Iso</i> -Guanosin
GMP, GTP	Guanosinmonophosphat, -triphosphat
h	Stunde
HEG	Hexaethylenglycol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HDV	Hepatitis Delta Virus
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (high performance)
Ino	Inosin
K _m	Michaelis-Konstante
L	Liter
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
λ	Wellenlänge
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Meter, Milli (10 ⁻³)
M	mol/l, molar

MACA	Maleimidocapronsäure
Me	Methyl
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
n	Nano (10^{-9})
NAIM	Nucleotide Analog Interference Mapping
NAIS	Nucleotide Analog Interference Suppression
NPM	N-Pentylmaleimid
nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTP- α S	Alpha-Thio-Nukleosidtriphosphat
OMe-	Methoxy-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pCp	Cytidin-3'-5'-bisphosphat
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PNK	Polynukleotidkinase
Prof.	Professor
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
r	Ribo-
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit
siRNA	Small Interference RNA
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SRP	Signal Recognition Particle
t	Zeit
T	Temperatur
T	Thymidin
TBDMS-	<i>Tert</i> butyl-dimethylsilyl-
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEA	Triethylamin
TEAAc	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TLC	Thin-Layer-Chromatography (Dünnschichtchromatographie)
TP	Triphosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TS	Transition-State
U	Units, Uridin
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
v_0	Anfangsgeschwindigkeit
v/v	<i>volume per volume</i>
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>

F) Reagenzien für Oligonukleotidsynthese

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
Activator BTT	Synthetisiert
RNA-Amidite	Proligo (Tac), Cruachem, Chemgenes
Alpha-Thio-NTP's	Glen Research
NTP's	MBI Fermentas
³² -P-markierte Nukleotide	Amersham
BSA	MBI Fermentas
DTT	Roth
Spermidin	Sigma-Aldrich

G) Enzyme

DNA-Polymerase I, Klenow-Fragm. (<i>e.coli</i>)	MBI Fermentas
T7-RNA-Polymerase	MBI Fermentas
T4-RNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
RNase T1	Industrial Research Ltd.

H) Geräte

DNA/RNA Synthesizer	Expedite 8909 Applied Biosystems
Elektrophoresekammern	S2, Gibco-BRL; A. Baack, Labortechnik
Expositionskassetten	Kodak X-Omatic
Fluoreszenzspektrometer	Jasco FP 6500
Fluoreszenzküvette	Quarzglas SUPRASIL, HELIMA
Geldokumentationsanlage	Alphaimager 2200, Alphainnotec
HPLC-Anlage	Agilent Technologies, Serie 1100
HPLC-Säulen	Luna 80 C ₁₈ , 5µm, 250x4.6 mm, Phenomenex
Ölpumpe	Heraeus, DS1
pH-Meter	Knick, Calimatic 761
Phosphorimager	Typhoon 9400, Molecular Dynamics
Pipetten	Abimed P2, P20, P200, P1000
Reaktionsgefäße, silikonisiert	Biozym, Sörensen
Reinstwasseranlage	Milli-Q, Millipore
Röntgenfilme	Fuji, Medical X-ray Film RXOG (Safety)
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein
Spannungsgeber	Pharmacia, ECPS 3000/150 und 500/400
Sterilfiltrationsanlage	Schleicher & Schuell; Steriflip Millipore
Szintillationszähler	Beckman LS 6500
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer 5436
UV-Küvetten	Quarzglas SUPRASIL, HELIMA
Vakuumzentrifuge	Savant, Speed Vac Concentrator
Waagen	Mettler AE 163 und AC 88
Wasserbäder	Thermo Haake; Heidolph HBR 2
Zentrifugen	Hettich Mikro 120, Eppendorf 5804R

I) Abbildungsverzeichnis

Abb. Nr.	Beschreibung	Seite
1	Diels-Alder-Reaktion, Beispiel	8
2	Orbitalschema für DA-Reaktion	9
3	Natürliche Diels-Alderase-Enzyme: Macrophomatsynthese-Reaktion	9
4	Artifizielle Diels-Alderasen, Reaktions-Beispiele	11
5	Ribozymkatalysierte DA-Reaktion	12
6	Mono- und tripartite Versionen des Diels-Alder-Ribozyms, Sekundärstrukturen	12
7	Schema der tertiären Interaktionen	13
8	Tertiärstrukturelemente der Kristallstruktur	15
9	Orientierungen von glykosidischen Bindungen und Nukleotid-Interaktionen, Nomenklatorschema	16
10	Sekundärstrukturelemente in Ribonukleinsäuren	17
11	Pseudoknoten-Schema	19
12	NAIM-Schema, allgemein	22
13	Initiatornukleotid Anthracen-Polyethylenglykol-GMP (Strukturformel)	27
14	Festphasen-Syntheseprotokoll	29
15	Dichte-Intensitätsabhängigkeiten, Phosphorimager und Röntgenfilm	34
16	Elektroelutionsapparatur (Photo)	36
17	UV-Spektren von 49nt-HEG-Anthracen und abortiven Transkriptionsprodukten	43
18	Fluoreszenzspektrometrischer Aktivitätstest	44
19	Kinetische Prüfung mit Fällungshilfe tRNA	44
20	NAIM-Schema für 49nt-RNA-HEG-A	46
21	Mutationsanalyse: Einzelne Basensubstitutionen	49
22	Mutationsanalyse: Validierung der Sekundärstruktur	51
23	Mutationsanalyse: Kompensatorische Doppelsubstitutionen	52
24	Mutationsanalyse: Kompensatorische Vierfachsubstitutionen	53
25	Mutationsanalyse: Einzelne 2'-Desoxynukleotid-Substitutionen	55
26	Chimärische Ribozymkonstrukte	56
27	NAIM: Eingesetzte Thioatanaloga	58
28	Nummerierungsschema des 49nt-Ribozyms	58
29	NAIM: Gel-Scan für parentale Thioatinterferenzen	59
30	NAIM: Auswertung für parentale Thioatinterferenzen	60
31	NAIM: Gel-Scan für Inosininterferenz am Nukleotid G9	61
32	NAIM: Gel-Scan für Interferenzreversionen am Nukleotid G9	62
33	NAIM: Schema für Interferenzreversion	62
34	NAIM: Auswertung für Interferenzreversionen am Nukleotid G9	62
35	Aktivitätstests mit U8iC und 7deazaG18	65
36	Aktivitätstests mit U8iC und 8-Oxo-deoxyG18	65
37	Triple-Experiment: Aktivitätstests mit <i>iso</i> -C- und <i>iso</i> -G-Substitutionen an den Positionen 1,2 und 10,11	66
38	Triple-Experiment: Aktivitätstests mit U17 <i>iso</i> -C	66
39	Aktivitätstests mit 2'-OMeG9, G9dG und U17C	67
40	Alternativer Reaktionsstart, Nr.1	69
41	Alternativer Reaktionsstart, Nr.2	69
42	Gelscan: Suche nach kovalenten Modifikationen	70
43	Zentrales Wasserstoffbrücken-Netzwerk, Pseudoknoten A3U20-G4C19	73
44	Basentriple G2-C10-U17, Basenplattform G1-C11-A16	73
45	Basenpaare G-C und <i>iso</i> -G- <i>iso</i> -C	73
46	Mögliche <i>iso</i> -G-C-Paarung	74
47	Alternatives Basentriple <i>iso</i> -G2- <i>iso</i> -C10- <i>iso</i> -C17	76
48	Nichtstandardbasenpaar G12-A15	77
49	Stacking-Bereich G7.4--A15	77
50	Interaktionen mit den Magnesiumionen Nr. 3 und Nr.5	80
51	Interaktionen mit den Magnesiumionen Nr. 1 und Nr.2	80
52	Scharfer Turn A18-C21.4	83
53	Reverses Hoogsteen-Paar U8-A18	85
54	Trans-Watson-Crick-Hoogsteen-Kombinationen an der Position 8-18.	86
55	NAIM: Schema für Interferenzsuppressions-Experiment	86
56	Modellbau: Phase I	88
57	G-C- <i>Trans</i> -Watson-Crick-Watson-Crick-Anordnung im parallelen Duplex	89
58	Modellbau. Phase II und III	90
59	Kristallstrukturmodell (Phase IV)	90
60	Kristallstrukturmodell (Phase IV), alternative Darstellung mit Magnesiumionen	91
61	Chemische Probing-Experimente	92
62	Hypothetische Faltungssequenz zur Sekundärstruktur	94
63	Hypothetische Faltungssequenz zur Tertiärstruktur	95
64	Substratspezifität I	99
65	Substratspezifität II	99
66	Öffnungs-Spalt im scharfen Turn-Kompartiment	101
67	Scharfer Turn-Hinge Helix I/II	102
68	Hypothesen zum Reaktionsmechanismus I	104
69	Hypothesen zum Reaktionsmechanismus II	104
70	Geometrie von ES- und TS-Komplexen sowie vom DA-Produkt	105