

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Benjamin Strauß

aus Mainz am Rhein

Heidelberg 2011

Tag der mündlichen Prüfung:

Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse

Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke

Prof. Dr. Mark Helm

Die Wissenschaft soll nicht sein ein Ruhebett für den von Neugier geplagten Geist oder ein Spaziergang zum Vergnügen oder ein hoher Turm, von dem man verächtlich herabblickt, oder eine Burg und Schanze für Streit und Hader oder eine Werkstatt für die Gewinnsucht und den Wucher, sondern ein reicher Warenbehälter, eine Schatzkammer zur Ehre des Werkmeisters aller Dinge und zum Nutzen der Menschheit.

Ludwig Feuerbach, (1804 - 1872), »Geschichte der neuern Philosophie von Bacon von Verulam bis Benedikt Spinoza«, Ansbach: **1833**

Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Jäschke, 2. Gutachter: Prof. Dr. M. Helm

Die Entdeckung von RNA-Sequenzen, die in der Lage sind, die Konzentration eines Metaboliten zu messen und abhängig davon die Genexpression zu regulieren hat Metaboliten-bindende RNAs in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Bisher existiert jedoch ein Mangel an experimentellen Methoden, um solche Sequenzen, die Riboswitches genannt werden, zu identifizieren.

In dieser Arbeit wird mit der affinitätsbasierten chemischen Transkriptomanalyse (ABC Transkriptomanalyse) ein neuartiger, experimenteller Ansatz zur Isolierung und Identifikation unbekannter Metaboliten-bindender RNA-Sequenzen vorgestellt. Diese Methode beruht auf der Verwendung von Photoaffinitätssonden. Diese Sonden enthalten ein Metabolitanalogon, dessen spezifische Affinität zu bestimmten RNA-Aptameren eine photoreaktive Gruppe in die Nachbarschaft dieser Sequenzen dirigiert. Daraufhin können durch Bestrahlung mit UV-Licht spezifische Crosslinks erzeugt werden. Die entsprechenden Oligonukleotide können anschließend in einer Probe mit Total-RNA über eine Affinitätschromatographie angereichert werden.

Für die Entwicklung von Photoaffinitätssonden, die an den bekannten Lysin-Riboswitch binden, wurde die Größe der Bindungstasche mit Hilfe säuremodifizierter Lysinanaloga sondiert. So konnte nach der Synthese dieser Moleküle und dem molekularbiologischen Nachweis ihrer Bindung an den Riboswitch das gängige Bindungsmodell erweitert werden. Für Lysinanaloga, welche durch Derivatisierung keine negative Ladung der Säurefunktion aufweisen, bleibt die Affinität zum Riboswitch erhalten, so lange der Substituent eine gewisse Größe nicht übersteigt.

Mit Hilfe dieser Erkenntnisse und den Literaturdaten wurden im Folgenden drei Lysin-Photoaffinitätssonden synthetisiert, die sich bei identischer photoreaktiver Gruppe in ihrer Verknüpfung mit dem Metaboliten und ihrer Anreicherungsfunktion unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass die Sonden spezifisch an das Aptamer des Riboswitches binden und bei Bestrahlung mit UV-Licht einen spezifischen Crosslink ausbilden.

Um mehr Erkenntnisse über Photoaffinitäts-Crosslinking zu erhalten, wurde das künstliche cAMP-Aptamer studiert. Bei diesem konnte mit cAMP-Photoaffinitätssonden ein hochspezifischer Crosslink generiert werden. Dadurch kann die Sequenz des Aptamers um das bis zu 33fache angereichert werden gegenüber einer Probe, in der die spezifische Bindung kompetitiv inhibiert wurde. Dieser Anreicherungsfaktor war auch in Proben mit Gesamt-RNA hinreichend stabil, so dass im Anschluss an ein Adapter-Ligations-Protokoll zur Einführung von Primer-Bindestellen mittels qPCR der Funktionsbeweis der ABC Transkriptomanalyse erbracht werden konnte. Mit dieser Methode wurde die Basis zur Isolierung und Identifikation neuer Metaboliten-bindender RNA-Motive gelegt.

In einem weiteren Abschnitt der Arbeit wird eine neue Methode zur RNA-Strukturanalyse durch fluoreszentes In-Line Probing gezeigt. Die Methode ermöglicht zum einen den Ersatz radioaktiver Markierungen durch Fluoreszenzfarbstoffe in In-Line Probing-Bindungsstudien an Riboswitch-Aptameren. Zum zweiten konnte gezeigt werden, dass hochmodifizierte, kleine RNAs, wie sie häufig in FRET- oder analogen biophysikalischen Studien verwendet werden, mit dieser Methode in einer Einzelnukleotidauflösung studiert werden können. Dadurch kann unter Ausnutzung der beiden bereits im Molekül befindlichen fluoreszenten Markierungen (terminal und intern) deren und der Einfluss weiterer Modifikationen auf die Struktur des Ribozyms direkt untersucht werden.

Affinity-based Chemical Transcriptome Analysis

1. Referee: Prof. Dr. A. Jäschke, 2. Referee: Prof. Dr. M. Helm

The discovery of riboswitches has placed natural small-molecule-binding RNAs into the focus of scientific interest. Riboswitches regulate gene expression by sensing the concentration of a specific metabolite. However, experimental methods for the identification of new riboswitches are still lacking.

In this thesis, a novel experimental approach for the isolation and identification of unknown metabolite-binding RNA sequences is presented: affinity-based chemical transcriptome analysis (ABC transcriptome analysis). The method is based on the application of photoaffinity probes. These probes contain a metabolite analog that exhibits specific affinity to an aptamer, thereby directing a photoreactive moiety into proximity of the RNA. Upon irradiation, specific crosslinks are formed and the respective oligonucleotides can be enriched from a natural RNA sample *via* affinity chromatography.

For development of photoaffinity probes that bind to the well-known lysine riboswitch, the size of the binding pocket was probed with help of acid-modified lysine analogs. First, these analogs, which lack the negative charge at the acid functionality, were synthesized. Then, their affinity to the lysine riboswitch was tested in molecular biological experiments. Finally, the established binding model could thus be extended in such a way, that small substituents on the lysine acid functionality are tolerated by the riboswitch. In contrast to earlier reports, the negatively charged acid is not essential.

Taking into account these insights and data from literature, three lysine-based photoaffinity probes with identical photoreactive groups but a different purification tag and linkage to the metabolite were synthesized. It was shown that these probes specifically bind to the riboswitch aptamer and form specific crosslinks upon irradiation with UV light.

To gain better knowledge about photoaffinity crosslinking, a second system was studied using an artificial cAMP aptamer. A highly specific crosslink was generated by irradiation of an artificial cAMP aptamer in presence of cAMP photoaffinity probes. The respective sequence was enriched up to 33-fold in comparison to a sample in which the specific binding of the probes to the aptamer was competitively inhibited. This enrichment factor was sufficiently stable even in samples containing total RNA. The proof of principle for the ABC transcriptome analysis was then carried out using qPCR subsequent to an adapter ligation protocol for the introduction of primer binding sites. This method provides a base for the isolation and identification of new metabolite-binding RNA motifs.

Another part of the thesis introduces a new method for RNA structure analysis by fluorescent in-line probing. This method enables the exchange of radioactive labels for fluorescent dyes in binding studies for riboswitches carried out by in-line probing. In addition, it was shown that highly modified, small RNAs, which are commonly used in FRET or similar biophysical studies, can be studied with a single-nucleotide resolution using this method. Thus, the influence of the dyes (terminal as well as internal) and other modifications on the RNA structure could directly be studied by exploiting the already present fluorescent labels.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Kenntnisstand	1
1.1 Aktivitäts- / Affinitätsbasierte Protein Profilerstellung	2
1.2 Untersuchung von RNA-Strukturen und –Interaktionen durch Photocrosslinking	4
1.3 Prozessierung von RNA zur Sequenzaufklärung in Hochdurchsatz-Sequenzierungsexperimenten	7
1.4 Reverse Transkription und quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)	7
1.5 Riboswitches	9
1.5.1 In-Line Probing	11
1.5.2 Transkriptions-Stop-Assay	12
1.5.3 Reportergen-Assay	13
1.6 Lysin-Riboswitch	13
1.7 cAMP-Aptamer	15
1.8 Diels-Alderase-Ribozym	16
1.9 Fluoreszenzmodifikationen und photospaltbare Schutzgruppen zur Strukturuntersuchung von RNA	16
2 Zielsetzung	18
3 Ergebnisse und Diskussion	20
3.1 Design von Photoaffinitätssonden	20
3.1.1 Zentrales Gerüst	20
3.1.2 Anreicherungsfunktion	21
3.1.3 Photoreaktive Gruppe	22
3.1.4 Metabolitanalogon	24
3.2 Der Lysin-Riboswitch als Modellsystem für Photoaffinitäts-Crosslinking mit RNA	25
3.3 Sondierung der Taschengröße und Bindungseigenschaften des Lysin-Riboswitches	27
3.3.1 Synthese der Lysinanaloga	28
3.3.2 Bindungsanalyse mittels In-Line Probing	31
3.3.3 Transkriptions-Stop-Assay mit dem Lysin-Riboswitch	37

3.3.4 Reportergeren-Assay mit dem Lysin-Riboswitch	41
3.4 Synthese von Lysin-Photoaffinitätssonden	43
3.4.1 Synthese einer biotinylierten Photoaffinitätssonde auf Homoargininbasis	44
3.4.2 Synthese einer konvertierbaren Photoaffinitätssonde auf Homoargininbasis	48
3.4.3 Synthese einer konvertierbaren Photoaffinitätssonde auf Lysinesterbasis	49
3.4.4 Diskussion der Synthesen	50
3.5 In-Line Probing der Photoaffinitätssonden	51
3.6 Photocrosslinking der Photoaffinitätssonden mit dem Lysin-Riboswitch-Aptamer	54
3.7 Photoaffinitäts-Crosslinking mit cAMP-Photoaffinitätssonden	58
3.7.1 Photocrosslinking der cAMP-Photoaffinitätssonden mit dem cAMP-Aptamer	60
3.7.2 Spezifität des Crosslinks	63
3.7.3 Photoaffinitäts-Crosslinking mit einem Überschuss an nicht-bindender RNA	67
3.7.4 Spezifisches Photocrosslinking eines cAMP-Aptamers in <i>E. coli</i> Total-RNA	69
3.8 Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse	70
3.8.1 Vorüberlegungen zur Sequenzanalyse und Entwicklung eines geeigneten Protokolls	70
3.8.2 Funktionsbeweis des Crosslink-Adapter-Ligations-Protokolls	72
3.8.3 Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse eines <i>E. coli</i> -Transkriptoms mit Zusatz einer Positivkontrolle	75
3.8.4 Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse eines Maus-Transkriptoms mit Zusatz einer Positivkontrolle	78
3.9 Direkte Strukturanalyse modifizierter RNA mit fluoreszentem In-Line Probing [191]	80
3.9.1 Austausch endständiger ³² P-Markierungen in einfachen Probing-Experimenten	81
3.9.2 Fluoreszentes Probing mit stark modifizierten, strukturierten kleinen Ribozymen	83
3.9.3 In-Line Probing von fluoreszenzmarkierten aktivierbaren Oligonukleotiden	91
4 Fazit und Ausblick	95
4.1 Erkenntnisse über die Bindungstasche des Lysin-Riboswitches	95
4.2 Lysin-Photoaffinitätssonden: Bindungsstudien und Photocrosslinking	97
4.3 cAMP-Photoaffinitätssonden: Crosslinking und ABC Transkriptomanalyse	98

4.4 Fluoreszentes In-Line Probing	101
5. Material und Methoden	103
5.1 Chemischer Teil	103
5.1.1 Allgemeine Bemerkungen	103
5.1.2 Synthese der säuremodifizierten Lysinanaloga	105
5.1.3 Synthese der biotinylierten Lysin-Photoaffinitätssonde	118
5.1.4 Synthese der konvertierbaren Lysin-Photoaffinitätssonde auf Homoargininbasis	127
5.1.5 Synthese der konvertierbaren Lysin-Photoaffinitätssonde auf Esterbasis	130
5.2 Molekularbiologische Methoden	133
5.2.1 Standardmethoden und Reagenzien	133
5.2.2 Liste der verwendeten Sequenzen	135
5.2.3 Lysin-Riboswitch	136
5.2.4 Analyse der Zersetzung der Lysinanaloga	142
5.2.5 cAMP-Aptamer	144
5.2.6 Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse	145
5.2.7 Quantitative PCR	151
5.2.8 Fluoreszentes In-Line Probing	153
6 Literaturverzeichnis	155
7 Anhang	166
7.1 Abkürzungsverzeichnis	166
7.2 Geräteverzeichnis	168
7.3 Reagenzienanhang	169

1 Einleitung und Kenntnisstand

Mit der ersten vollständigen Sequenzierung eines Genoms im Jahr 1995 (*Haemophilus influenzae*) hat ein neuer Abschnitt für die Naturwissenschaft begonnen [1]. Zum einen ist seither die Zahl der vollständig sequenzierten Genome schnell angestiegen¹. Zum anderen wurde recht schnell deutlich, dass die bloße Kenntnis der Basenabfolge in einem Genom zum Verständnis der Funktionsweise eines Lebewesens bei weitem nicht ausreicht [2]. Hieraus begründet haben sich zwei weitere Forschungsgebiete entwickelt: Während in der „Transkriptomik“ oder „RNomik“ die Expression der RNA² in einer Zelle oder einem Organismus studiert wird, untersucht die „Proteomik“³ die Gesamtheit der Proteine [4].

Auch wenn derzeit eine engagierte Debatte über das Ausmaß und die Natur der Transkripte in eukaryotischen Zellen geführt wird [5-7], so ist es doch unstrittig, dass beim Menschen große Teile der DNA (Schätzungen zufolge bis zu 93 % [6]) zwar transkribiert werden, jedoch nur ca. 2 % für Proteine kodieren [8-11]. Dieses Verhältnis steht im Gegensatz zu dem Jahrzehnte lang gültigen Paradigma, dass die DNA (ausschließlich) für Proteine kodiert [12-15]. Schon in den 70er und 80er Jahren kam es zu Kontroversen, ob die nicht-kodierenden Transkripte nur „junk“ [16] oder archaische Artefakte der Evolution („*selfish DNA*“; eigensinnige DNA [17]) sind oder zumindest teilweise irgendeine Funktion haben [18]. Das zentrale Dogma, dass RNA hauptsächlich die Rolle des „Übersetzers“ zwischen DNA und Proteinen übernimmt, ließ sich nicht mehr halten, als fast jährlich neue Arten funktioneller RNA-Sequenzen gefunden wurden, die wichtige Rollen in der Steuerung der Genexpression, dem Differenzieren von Zellen in bestimmte Typen sowie viele andere Aufgaben übernehmen [19-23]. Dies ist nicht zuletzt modernen Sequenzierungstechniken zu verdanken, die einen weitaus größeren Durchsatz an Proben bei gleichzeitiger Zunahme der Genauigkeit ermöglichen. Es ist aber nach wie vor schwierig, einem nicht-kodierenden Transkript, das in einem Sequenzierungsexperiment gefunden wurde, eine Funktion zuzuordnen.

¹ Derzeit liegen 10776 vollständig sequenzierte Genome vor, davon 2205 eukaryotische [GOLD, Genomes OnLine Database, v 3.0, Sequencing Status Distribution, Abruf: 10.08.2011].

² In der vorliegenden Arbeit werden, so weit möglich, englische Fachausdrücke in die deutsche Sprache übersetzt. Einige Begriffe, wie zum Beispiel RNA, Crosslinking, Riboswitch und Probing, werden aber als *termini technici* stehen gelassen, da sie sich entweder in der deutschen Literatur eingebürgert haben oder eine adäquate Übersetzung nicht möglich erscheint.

³ Ein Begriff der ungefähr zur Zeit der Sequenzierung der ersten Genome geprägt wurde [3].

Auf dem Gebiet der Proteomik wurde für eine ähnliche Fragestellung eine Lösung entwickelt, mit Hilfe derer es möglich ist, die Komplexität einer Probe (Gewebeprobe, Zelle, isolierte Proteine) zu reduzieren. Bei einer „aktivitätsbasierten Protein-Profilierung“ (*activity-based protein profiling*, ABPP) werden mit Hilfe kleiner, organisch-chemischer Sonden funktionelle Proteine zielspezifisch abgetrennt [24-26]. Dadurch ist es möglich, die „aktiven“ Bestandteile einer komplexen Probe anzureichern und anschließend in Kenntnis ihrer Funktion zu analysieren. Interessanterweise ist eine analoge Technik zur Erforschung von Nukleinsäuren, die mit Metaboliten interagieren, noch nicht bekannt. Einzig über die Isolierung bekannter G-Quadruplex-DNA-Sequenzen mit Hilfe von Affinitätschromatographie wurde im Jahr 2010 berichtet [27]. Mit dieser Methode ist es jedoch nicht möglich, unbekannte Sequenzen zu identifizieren. Mit der Entdeckung von „Riboswitches“ („Riboschalter“) [28] sind Fragen nach der Art und Verbreitung der Interaktion von kleinen Metabolitmolekülen mit natürlichen regulatorischen RNA-Sequenzen sowie das Auffinden derselben von großer wissenschaftlicher Aktualität und Bedeutung [29].

1.1 Aktivitäts- / Affinitätsbasierte Protein Profilerstellung

Proteine lassen sich über ihre Eigenschaften klassifizieren, zum Beispiel der Katalyse einer bestimmten Reaktion oder der Bindung eines Metaboliten. Die Anreicherung von Proteinen mit definierten Eigenschaften aus komplexen Proben kann erreicht werden, indem man die aktiven Proteine kovalent mit einer Funktion verknüpft, die eine Isolierung über Affinitätschromatographie ermöglicht (Abbildung 1A). Üblicherweise handelt es sich hierbei um Biotin, dessen starke Bindung an Streptavidin in vielen Fällen zur Reinigung, Anreicherung oder Immobilisierung von Proteinen und anderen Makromolekülen verwendet wird [30,31]. Die so isolierten Bestandteile der Probe können nach einem Verdau mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden (Abbildung 1A). Ein Molekül, welches die Verknüpfung der Proteine mit Biotin in selektiver Weise ermöglicht, wird Sonde (engl. *probe*) genannt. Diese Sonden sind im Falle eines aktivitätsbasierten Mechanismus aus zwei Bausteinen aufgebaut (siehe Abbildung 1B) [32]. Die eine Komponente entspricht einer reaktiven Funktion, welche in der Art eines irreversiblen Inhibitors im aktiven Zentrum eines Enzyms kovalent bindet. Sie sollte spezifisch für Enzyme einer bestimmten Klasse sein (z.B. Serin-Hydrolasen, Cystein-Proteasen), während die Aktivität gegenüber anderen Enzymklassen möglichst vernachlässigbar sein sollte [33,34]. Der andere Baustein ist die bereits erwähnte Anreicherungsfunktion (Biotin), mit der die reaktiven Spezies über eine Affinitätschromatographie angereichert werden.

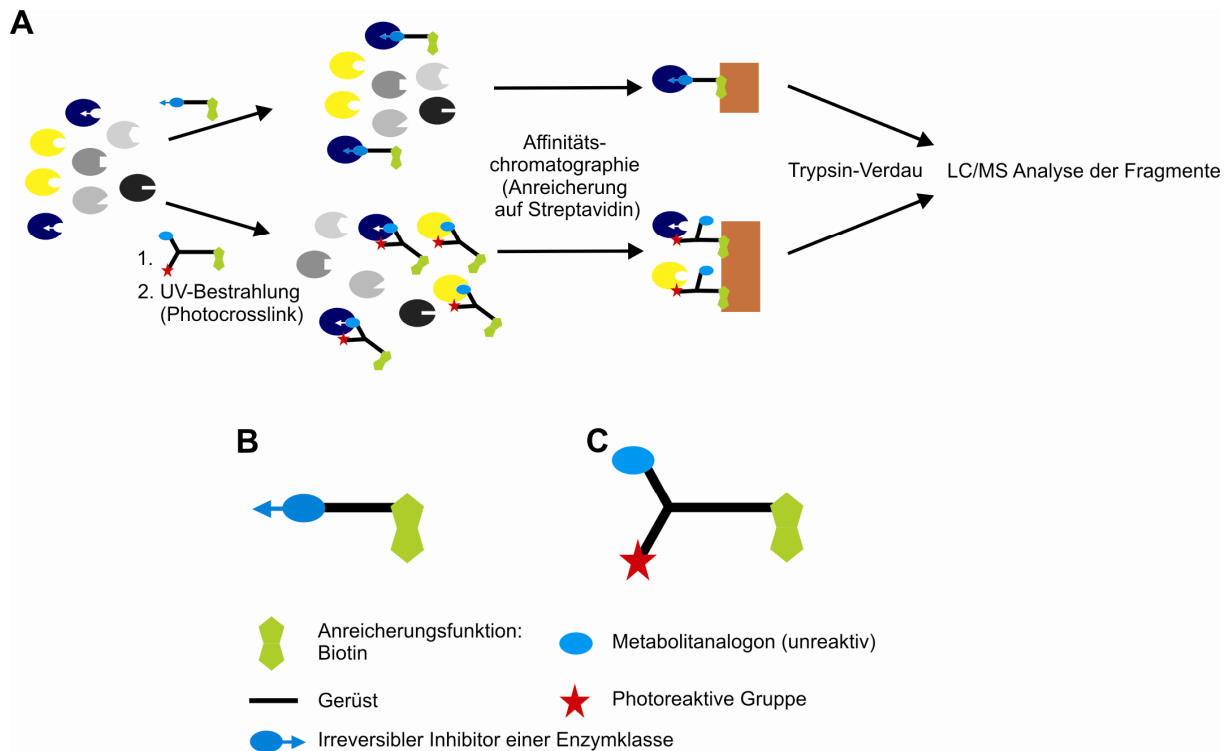


Abbildung 1: **A:** Schematischer Ablauf eines ABPP/AfBPP-Experimentes, im oberen Teil aktivitätsbasiert, im unteren affinitätsbasiert. **B:** Aktivitätsbasierte Sonde. **C:** Photoaffinitäts-Sonde.

Für den Fall, dass kein irreversibler Inhibitor existiert oder die experimentelle Fragestellung es aus einem anderen Grund nicht erlaubt, die Proteine direkt kovalent zu modifizieren, wird die reaktive Funktion ersetzt⁴. An ihre Stelle treten zwei Funktionalitäten (Abbildung 1C) [35,36]. Die eine ist meist ein Metabolitanalogon oder ein kompetitiver Inhibitor einer bestimmten Enzymklasse. Sie muss (wie die reaktive Funktion im ABPP) ausreichend promiskuitiv sein, damit sie mit mehreren ähnlichen Proteinen interagieren kann und gleichzeitig selektiv genug, um unerwünschte unspezifische Bindung zu minimieren. Diese Funktionalität ist aber im Gegensatz zur reaktiven Funktion der ABPP nicht in der Lage, eine kovalente Bindung zum Zielprotein aufzubauen. Hierfür wird zusätzlich die „photoreaktive Gruppe“ benötigt. Dies ist eine Moleküleinheit, die durch Bestrahlung mit UV-Licht aktiviert wird und kovalente Bindungen zu Proteinen ausbilden kann. Üblicherweise handelt es sich hierbei um Benzophenon-Derivate (1), Diazirine (2) oder aromatische Azide (3) (Abbildung 2A) [35,37-39].

⁴ Das Ziel des Versuchs könnte beispielsweise sein, alle Lysin-bindenden Proteine zu isolieren, nicht nur solche, die Reaktionen des Lysins katalysieren.

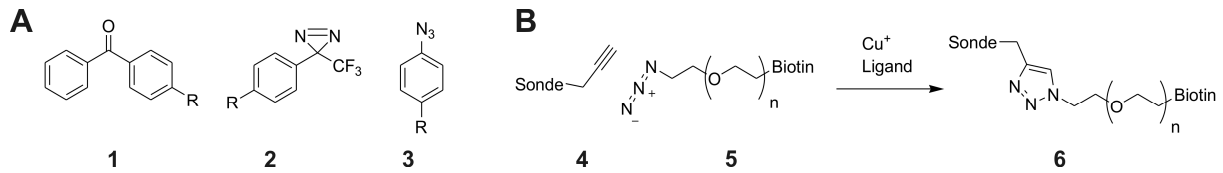


Abbildung 2: A: Struktur von üblichen photoreaktiven Gruppen: **1** Benzophenon, **2** Diazirin, **3** Phenylazid. B: Schema einer Kupfer-katalysierten „Click“-Reaktion zwischen einer konvertierbaren Sonde (**4**) mit Biotinazid (**5**) zur Bildung der vollständigen Sonde mit Anreicherungsfunktion (**6**).

Diese trifunktionalen Sonden nennt man „Photoaffinitätssonden“ (*photoaffinity probes*). Ein Experiment, in dem diese Sonden verwendet werden, heißt „affinitätsbasierte Protein Profilerstellung“ (*affinity-based protein profiling*, AfBPP [40]) oder „Photoaffinitäts-Markierung“ (*photoaffinity labeling*).

Durch die Bindung dirigiert das Metabolitanalogon die Sonde in die räumliche Nähe von Proteinen einer bestimmten Klasse, so dass die photoreaktive Gruppe bevorzugt mit den Zielproteinen reagiert. Auf diese Weise wird das Protein über eine kovalente Bindung mit der Anreicherungsfunktion verbunden. Durch diese Modifikation ist es möglich, die Zielspezies gegenüber den übrigen Bestandteilen der Probe anzureichern. Da unspezifische Reaktionen nie vollständig unterdrückt werden können, ist eine vollständige Separation nicht möglich. Alternativ lässt sich bei einer konvertierbaren Sonde die Anreicherungsfunktion auch im Anschluss an die Photoreaktion in das Molekül einführen [41,42]. Hierfür eignet sich im Besonderen die Kupfer-katalysierte 2,3-dipolare Cycloaddition zwischen terminalen Alkinen und Aziden, die als „Click-Chemie“ bekannt ist (Abbildung 2B) [43,44].

1.2 Untersuchung von RNA-Strukturen und –Interaktionen durch Photocrosslinking

Ein zentraler Bestandteil der affinitätsbasierten Profilerstellung ist, unabhängig von der Natur der biologischen Zielstruktur (Protein oder Nukleinsäure), die Verknüpfung des Biomoleküls mit der Anreicherungsfunktion der Sonde mittels „Photocrosslinkings“ (lichtinduzierte, kovalente Quervernetzung). Wie im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, findet Photocrosslinking von Proteinen und kleinen Molekülen bereits breite Anwendung. Auf dem Gebiet der Nukleinsäuren ist die spezifische, bimolekulare Photoreaktion mit kleinen Molekülen jedoch nicht bekannt. Andererseits wird Photocrosslinking mit Biomolekülen vielfach zur Vernetzung von Nukleinsäuren genutzt, um deren Bindungspartner oder Struktur zu untersuchen. So ist es beispielsweise möglich, durch den Einbau von Arylaziden

Ferninteraktionen in Nukleinsäurestrukturen aufzuklären (*long-range interactions*) [45,46]. In einem Fall ist es in dieser Gruppe durch R. Wombacher gelungen, die Interaktion eines RNA-Enzyms (Kapitel 1.8 Diels-Alderase-Ribozym) mit seinem Reaktionsprodukt mittels Photoaffinitäts-Crosslinkings zu charakterisieren [47]. Wohlgedacht ist in diesem Fall die photoreaktive Gruppe über eine Alkylkette kovalent mit der RNA verbunden. Hierdurch wird die lokale Konzentration stark erhöht und es handelt sich de facto um eine intramolekulare Photoreaktion.

Die Hybridisierung zweier komplementärer Stränge ist eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der lokalen Konzentration zweier Reaktionspartner, um ein Interstrang-Crosslinking zu bewirken. Dies ist das gängige Prinzip aller grundlegenden Photocrosslinking-Studien mit Nukleinsäuren.

Der zweite Bereich in dem Photocrosslinking von Nukleinsäuren Anwendung findet, ist das Aufklären von Interaktionen der RNA mit anderen Biomolekülen (RNA-RNA, RNA-Protein). Bei diesen Methoden wird allerdings keine photoreaktive Gruppe eingesetzt, vielmehr werden die Nukleobasen selbst photoaktiviert. Die unter dem Namen CLIP (*crosslinking and immunoprecipitation*) zusammengefassten Techniken geben Einblicke in die Wechselwirkung von RNA mit Proteinen, indem die Eigenschaft der Nukleobasen (insbesondere Uracil) ausgenutzt wird, bei einer Bestrahlung mit UV-Licht von 254 nm Wellenlänge photoinduzierte Quervernetzungen einzugehen (Abbildung 3) [48-50]. Die dabei geknüpften kovalenten Bindungen zu RNA-bindenden Proteinen (RBPs), ermöglichen eine zielspezifische Immunopräzipitation. Die isolierten Produkte können dann revers transkribiert und sequenziert werden.

Zwei wichtige Weiterentwicklungen dieser Technologie wurden im Jahr 2010 von den Arbeitsgruppen von Ule und Tuschl beschrieben: Die eine Verbesserung ermöglicht die genaue Identifikation der Crosslink-Stelle, da hier die reverse Transkription aufgrund der sterischen Blockade häufig abbricht (iCLIP) [51]. Die zweite Entwicklung erhöht die Effizienz der Methode dadurch stark, dass *in vivo* 4-Thiouracil statistisch in die RNA eingebaut wird, welches bei größeren Wellenlängen (365 nm) und mit besseren Ausbeuten (im Vergleich zu Uracil) reagiert (PAR-CLIP) [52]. Auch in diesem Fall ist eine direkte Identifikation der Crosslink-Position möglich, da es zu einem T-C Austausch in der cDNA an der Stelle der Reaktion kommt.

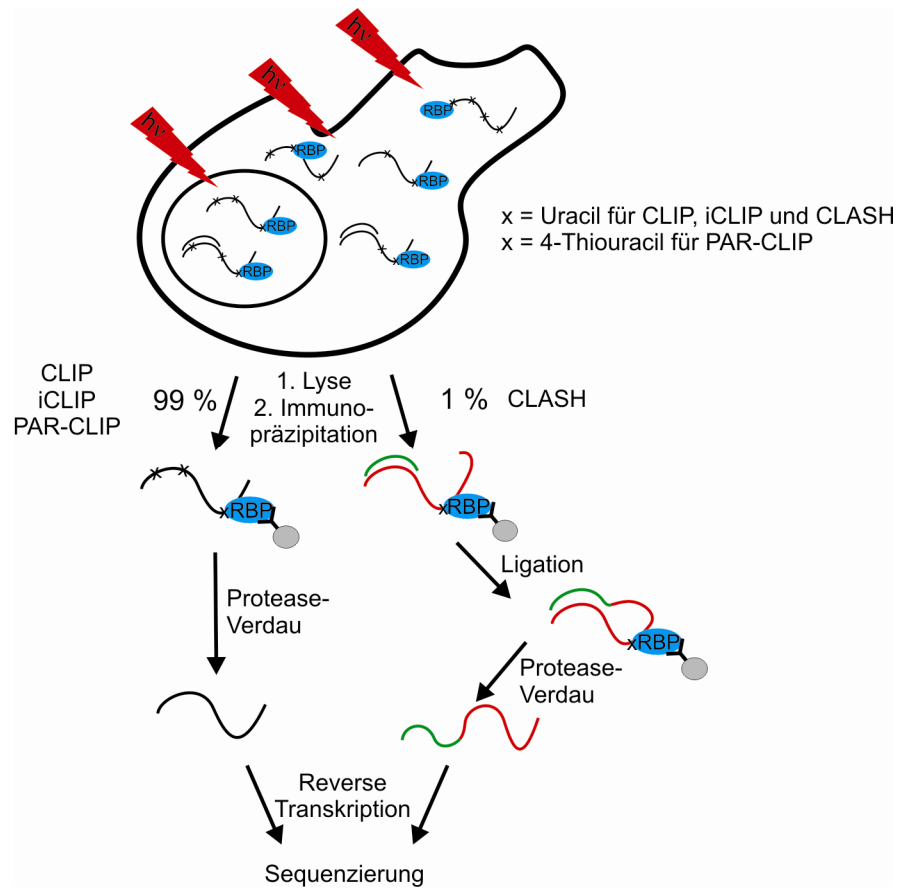


Abbildung 3: Schematischer Ablauf von CLIP- und CLASH-Protokollen. „RBP“ stellt ein RNA-bindendes Protein dar, „ $h\nu$ “ die Einstrahlung mit UV oder Vis-Licht (PAR-CLIP) und „x“ die Gruppe des Oligomers, welche die Photoreaktion eingehen kann.

RNA-RNA-Interaktionen wurden mit Hilfe von Photocrosslinking in diesem Jahr von Kudla *et al.* untersucht. Bei der CLASH (*Crosslinking, Ligation and Sequencing of Hybrids*) genannten Technik werden analog zu der CLIP-Methode RNA-Protein Crosslinks induziert (Abbildung 3) [53]. Im Zuge der Immunopräzipitation des bekannten Proteins werden RNA-RNA-Duplexe intakt gelassen. Diese komplementären Stränge werden im nächsten Schritt aneinander ligiert, so dass nach der reversen Transkription eine chimäre cDNA vorliegt. Die Chimären lassen sich nach einer Hochdurchsatz-Sequenzierung identifizieren und bestimmten Abschnitten auf dem Genom zuordnen. Bedingt durch das Anreicherungsprotokoll ist diese Methode allerdings darauf beschränkt, RNA-RNA-Interaktionen zu studieren, die gleichzeitig mit einer bekannten RNA-Protein-Interaktion auftreten.

1.3 Prozessierung von RNA zur Sequenzaufklärung in Hochdurchsatz-Sequenzierungsexperimenten

Nachdem eine RNA-Spezies aus einer komplexen Probe isoliert wurde, ist die Bestimmung ihrer Sequenz-Identität entscheidend. Die unmittelbare Aufklärung der Sequenz einer unbekannten RNA ist derzeit noch ein aufwändiges Unterfangen, da die direkte Sequenzierung eines RNA-Oligomers eine vergleichsweise ungewöhnliche Aufgabe darstellt, welche die kommerziell erschwingliche Nutzung noch nicht erreicht hat [54]. Während Protein-Fragmente mittels LC-MS gut analysiert werden können, ist dies für RNA keine probate Technik (siehe auch Abbildung 1A). Für dieses Problem wurden im Zusammenhang mit der Suche nach kleinen regulatorischen RNA-Sequenzen zwei generelle Ansätze entwickelt. Zum einen ist es möglich Microarrays zu nutzen [55]. Auf ihnen sind die Genome ganzer Organismen in kleinen Abschnitten immobilisiert. Mit dieser Technologie können die unbekannten RNAs direkt im Anschluss an einen Hybridisierungsschritt über ihre Position identifiziert werden. Zum anderen werden Hochdurchsatz-Sequenzierungsverfahren genutzt (RNA-Seq) [56,57]. Hierfür ist es nötig, alle RNA-Oligomere in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Da aber die Sequenzen unbekannt sind, muss am 3'-Terminus jedes Oligonukleotids zuerst eine Bindestelle für den Primer der reversen Transkriptase geschaffen werden. Dies kann beispielsweise durch das Anhängen mehrerer Cytosin-Nukleotide mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase oder durch Ligation eines 3'-Adapters bekannter Sequenz mittels T4-RNA-Ligase erreicht werden [58]. Üblicherweise werden die Ergebnisse mittels reverser Transkription und quantitativer Echtzeit-PCR (*quantitative real time PCR*, qPCR) validiert [59].

1.4 Reverse Transkription und quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)⁵

Schon wenige Jahre nach der Entdeckung der PCR [61] wurde die Reaktion zur Quantifizierung von DNA [62] und RNA [63,64] über die Endpunktbestimmung der Produkte genutzt. Ohne die Möglichkeit der Echtzeitdetektion der Produktbildung hätte die Methode aber wahrscheinlich nicht die Resonanz erfahren, die sie heute hat. Vor allem in der Kombination mit der reversen Transkription wird sie als RT-qPCR häufig zur Quantifizierung

⁵ Durch die doppelte Verwendung RT-qPCR für „*real time*“ bzw. reverse Transkription in Zusammenhang mit quantitativer PCR existiert eine gewisse Verwirrung bei den Begrifflichkeiten. In dieser Arbeit wird RT-qPCR ausschließlich in Bezug auf reverse Transkription mit anschließender quantitativer PCR verwendet, entsprechend der Empfehlungen der aktuellen Literatur [60]. Alle durchgeführten qPCR-Versuche sind „*real time*“ qPCRs.

des Ausmaßes der Transkription verschiedener RNA-Spezies verwendet [59,65]. Für die Validierung von Hochdurchsatz-Sequenzierungsdaten und Daten aus Microarrays hat sich die RT-qPCR zum unverzichtbaren Standard entwickelt [66].

Für die Detektion der Produkte der Amplifikation in Echtzeit werden Fluoreszenzsignale verwendet. Diese können auf unterschiedliche Weise generiert werden. Die einfachste Möglichkeit ist die Verwendung einer Substanz, in den meisten Fällen SYBR-Green, die in DNA-Doppelstränge interkaliert und daraufhin zur Fluoreszenz angeregt werden kann [59]. Mit zunehmender PCR-Zyklenzahl nimmt das Fluoreszenzsignal, welches nach Beendigung jedes Zyklus gemessen wird, proportional zur Produktmenge zu (Abbildung 4). Diese Detektionsmethode wird in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Ein anderer Ansatz wird bei der Verwendung von FRET-Sonden verfolgt, bei denen ein Fluoreszenzfarbstoff zusammen mit einem dazugehörigen *Quencher* (fluoreszenzlöschende Substanz) vorliegt [59]. Die Fluoreszenz wird als Folge der Hybridisierung der FRET-Sonde mit einer Zielsequenz verstärkt. Durch die Sequenzspezifität erlauben solche Sonden die zeitgleiche Detektion mehrerer Zielsequenzen in derselben Probe (*multiplexing*).

Zur Analyse der Daten wird meistens eine relative Quantifizierung vorgenommen [67]. Entscheidend für die Berechnung ist hierbei die Zyklenzahl, bei der ein bestimmter Grenzwert der Fluoreszenz überschritten wird (*cycle of threshold*, C_T). Die relative Quantifizierung bezieht sich dann auf die Differenz der C_T -Werte einer Probe, die unter den zu untersuchenden Bedingungen inkubiert wurde, und einer unbehandelten Kontrolle. Auf Unterschiede beim Ansetzen der Proben wird mit Hilfe eines oder mehrerer Referenzgene, die eine stabile Expression bei vielen Bedingungen haben, intern korrigiert (Abbildung 4) [68,69].

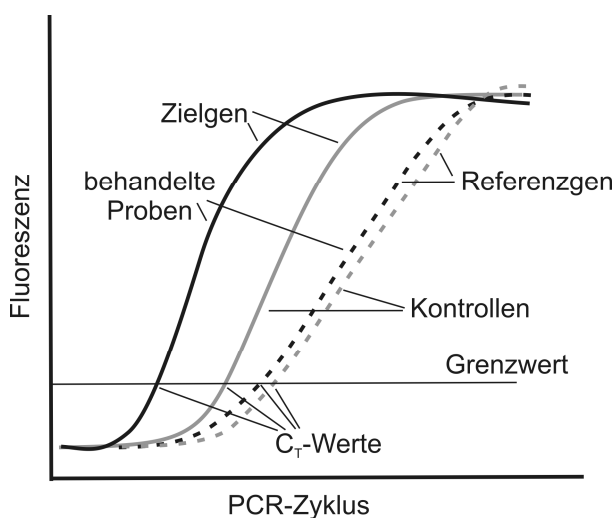


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines qPCR-Experimentes zur Berechnung der relativen Genexpression. Die Fluoreszenzstärke der Proben des Zielgens ist mit durchgehenden Linien, die des Referenzgens mit gestrichelten Linien dargestellt. Proben, die entsprechend der experimentellen Fragestellung behandelt wurden, sind schwarz, unbehandelte Kontrollproben grau dargestellt (Abbildung nach [59]).

Nachdem bisher die Methoden vorgestellt wurden, aus denen sich die affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse (ABC Transkriptomanalyse) zusammensetzt oder die mit ihr verwandt sind, sollen im Folgenden die Modellsysteme beschrieben werden, die für die Entwicklung dieser Analysetechnik in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

1.5 Riboswitches

Seit dem Jahr 2001 ist bekannt, dass Metaboliten in einer Zelle nicht nur von Proteinen, sondern auch von bestimmten RNA-Molekülen spezifisch gebunden werden können [28,70]. Diese RNAs werden „Riboswitches“ genannt [71]. Sie regulieren die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der Biosynthese, der Aufnahme oder dem Abbau des Metaboliten stehen, den sie binden. Zu den bislang gefundenen Metaboliten zählen Nukleobasen wie Guanin und Adenin, Cofaktoren wie S-Adenosylmethionin und Thiaminpyrophosphat, sowie Aminosäuren wie Glycin und Lysin oder sogar Magnesiumionen [72,73]. In *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ist derzeit von mindestens 4 % der Gene bekannt, dass sie über Riboswitches reguliert werden [74].

Bis auf wenige Ausnahmen wurden Riboswitches bisher nur im 5'-untranslatierten Bereich (5'-*untranslated region*, 5'-UTR) prokaryotischer mRNA gefunden⁶. Wie in Abbildung 5 gezeigt, lassen sich Riboswitches in zwei funktionale Untereinheiten einteilen: Zuerst wird das phylogenetisch hochkonservierte Aptamer transkribiert, welches den Metaboliten erkennt und ihn mit hoher Selektivität bindet.

Im Anschluss erfolgt die Transkription der Expressionsplattform. Diese erfährt als Reaktion auf die Bindung des Metaboliten eine strukturelle Modulation, die wiederum Einfluss auf die Expression des nachfolgenden Gens hat [78].

⁶ Es existieren seltene Fälle von eukaryotischen Riboswitches, wobei es sich ausschließlich um Thiamin-Pyrophosphat-(TPP)-Riboswitches aus Pflanzen handelt [75-77]. Diese Sequenzen befinden sich nicht ausschließlich in den 5'-UTRs und üben die Genregulation teilweise über alternative Mechanismen aus.

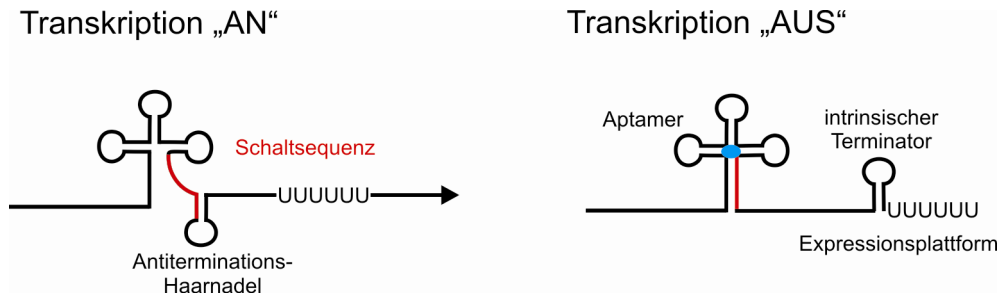


Abbildung 5: Schematische Repräsentation eines transkriptionell gesteuerten Riboswitches. In Abwesenheit des Metaboliten bildet sich eine Antiterminations-Haarnadel und das nachfolgende Gen wird abgelesen (links). Rechts bindet der Metabolit an das Aptamer, wodurch der intrinsische Terminator gebildet wird und die Transkription abbricht.

Die Expression wird auf zwei möglichen Wegen reguliert⁷: In dem in Abbildung 5 beschriebenen Fall, bei einem transkriptionell gesteuerten Riboswitch, ist die Erkennung des Metaboliten mit der Bildung (oder Auflösung, je nachdem, ob es sich um einen „Ein-“ oder „Aus-Schalter“ handelt) eines intrinsischen Terminators (*terminator hairpin*) gekoppelt. Durch die Bindung an das kleine Molekül ändert sich die Struktur des Riboswitches, so dass eine GC-reiche Haarnadel gebildet werden kann, auf die sechs bis sieben Uracil-Nukleotide folgen. Solche Strukturen sind dafür bekannt, dass sie zu einem Abbruch der Transkription führen, da die RNA-Polymerase an ihnen nicht stark genug binden kann und daher abfällt [79,80].

Die zweite Möglichkeit ist eine translationale Kontrolle, bei der die Bindung des Metaboliten dazu führt, dass die Ribosomenbindungsstelle je nach Mechanismus entweder verborgen oder freigelegt wird [81]. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand sind Riboswitches, welche die nachfolgenden Gene bei der Bindung des Metaboliten „ausschalten“, bei weitem häufiger als „Ein-Schalter“.

Bisher beruhte die Entdeckung neuer Riboswitches auf zwei methodischen Ansätzen: Eine Methode besteht darin, biochemische Synthesewege auf unbekannte Regulatoren zu untersuchen. In einigen Fällen wurden die Regulatoren als Riboswitches identifiziert [28,71,82]. Die andere Möglichkeit ist, die starke Konservierung der Aptamer-Region innerhalb eines Genoms und im Vergleich verschiedener Spezies zu nutzen, um untranslatierte Bereiche bioinformatisch miteinander zu vergleichen [83-86]. Kann man in

⁷ Es existieren noch weitere Mechanismen der Genregulation, die durch Riboswitches unterstützt werden. Sie sind aber sehr viel seltener, weshalb in dieser Arbeit nicht auf sie eingegangen werden soll.

diesen Regionen zusätzlich zu dem hohen Grad an Sequenzkonservierung eine mögliche (komplexe) Struktur vorhersagen und sind sie ungewöhnlich lang, so liegt ein Kandidat für einen Riboswitch vor.

Die Existenz und biologische Relevanz des vermeintlichen Riboswitches als Element der genetischen Kontrolle muss in nachfolgenden biochemischen Experimenten untermauert werden, die in den folgenden drei Abschnitten erläutert werden.

In einem ersten Schritt wird *in vitro* die Bindung des Metaboliten an das Aptamer des Riboswitches mittels In-Line Probing nachgewiesen (Kapitel 1.5.1). Gelingt dies, so wird im folgenden Versuch gezeigt, dass der Metabolit *in vitro* in der Lage ist, im Zusammenspiel mit dem Riboswitch den Abbruch der Transkription zu beeinflussen. Dadurch wird die Existenz eines *funktionellen* Riboswitches bewiesen (Kapitel 1.5.2). Schließlich muss die biologische Relevanz der RNA-Sequenz untersucht werden. Dies wird üblicherweise mit einem *in vivo* Reporter-Gen-Assay gemacht, bei dem die Expression eines bestimmten signalgebenden Proteins unter die Kontrolle des entsprechenden Riboswitches gestellt wird (Kapitel 1.5.3). Mit diesem Dreischritt aus Bindung, Funktion und biologischer Relevanz wird der Beweis für das Vorliegen eines Riboswitches erbracht.

1.5.1 In-Line Probing [87,88]

Der erste Schritt, die Untersuchung der Bindung des Metaboliten an das Aptamer, wird *in vitro* mittels In-Line Probing, einer Form des chemischen Sondierens der RNA-Struktur, durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Flexibilität einzelner Phosphodiester-Bindungen mit der Neigung dieser Bindungen korreliert, im leicht alkalischen Medium spontan zu degradieren. Die Spaltungsrate ist direkt abhängig vom Ladungszustand des 2'-OHs, dem Abstand zwischen 2'-OH und Phosphoratom und der korrekten, linearen Anordnung (*in-line conformation*) von angreifendem Nukleophil, elektrophilem Zentrum und der Abgangsgruppe (Abbildung 6).

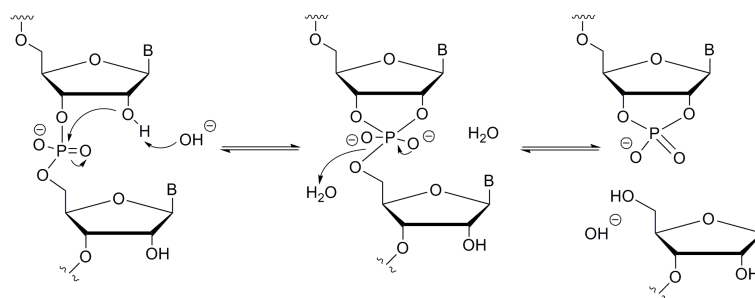


Abbildung 6: Mechanismus der RNA-Spaltung im Verlauf des In-Line-Probing (Abbildung aus [87]).

In regulären Helices kann die lineare Anordnung nicht eingenommen werden, weshalb in diesen Bereichen keine Spaltung stattfindet. Im Gegensatz dazu führen ausgedehnte unstrukturierte Bereiche ohne Einbindung in sekundäre oder tertiäre Strukturelemente zu einer gleichmäßigen leiterartigen Spaltung, da sie einen hohen Grad an struktureller Flexibilität aufweisen und statistisch häufiger eine lineare Konformation einnehmen. Starke Spaltung wird dann detektiert, wenn die Phosphodiesterbindung in einer optimalen linearen Konformation fixiert ist. Die untersuchte RNA ist üblicherweise terminal radioaktiv markiert. Durch eine gelelektrophoretische Trennung der Fragmente erhält man ein Spaltungsmuster, das anhand der Radioaktivität densitometrisch auf den Grad der Strukturierung hin analysiert werden kann.

Die Bindung eines Metaboliten an das Aptamer induziert strukturelle Modulationen des Oligonukleotids, die sich auf das Spaltungsmuster auswirken, das im In-Line Probing generiert wird. Da diese Auswirkungen abhängig von der Konzentration des Metaboliten sind, kann ein Titrationsexperiment durchgeführt werden, um Bindungskonstanten zu ermitteln. Basierend hierauf sind schlussendlich auch mechanistische Rückschlüsse möglich [89].

1.5.2 Transkriptions-Stop-Assay [90,91]

Kann mit Hilfe des In-Line Probings die Bindung eines Metaboliten an das Aptamer nachgewiesen werden, so wird im nächsten Schritt die Funktionstüchtigkeit des Riboswitches als Schalter untersucht. Im Transkriptions-Stop-Assay wird ein DNA-Templat mit einem starken Promoter für die *Escherichia coli* (*E. coli*) RNA-Polymerase versehen. Es kodiert für den vollständigen Riboswitch bestehend aus dem Aptamer und der Expressionsplattform (üblicherweise einem intrinsischen Terminator). Um *in vitro* Abbruchprodukte von vollständig transkribierten Produkten unterscheiden zu können, wird das Templat um 30-50 Nukleotide erweitert (vergleiche Abbildung 7). Ist die Bildung des intrinsischen Terminators abhängig von der Konzentration des Metaboliten, so verändern sich die Verhältnisse der beiden Produkte zueinander. Meist wird dieser Assay so durchgeführt, dass die Transkription des Templates nur ein Mal initiiert wird (*single round*) [92].

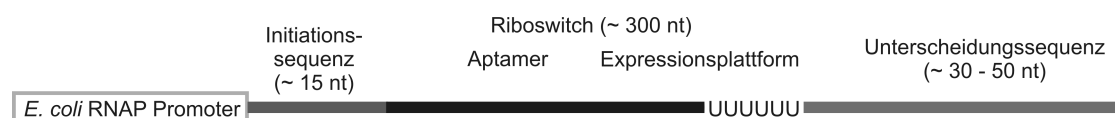


Abbildung 7: Aufbau eines Templates für einen *single round* Transkriptions-Stop-Assay (RNAP = RNA Polymerase) (Abbildung nach [90]).

In diesem Fall wird der Sequenz-Aufbau derart gestaltet, dass mindestens die ersten 15 Nukleotide nur aus drei der vier Basen bestehen (Initiationssequenz in Abbildung 7). Durch die Vorenthaltung der vierten Base entsteht ein ternärer Komplex, in dem die Polymerase die Transkription nicht fortsetzen kann („pausierender Komplex“)⁸. Dadurch wird die RNA vorübergehend nicht verlängert. Mit der anschließenden Zugabe des fehlenden Nukleosid-Triphosphates wird außerdem ein Inhibitor zur Reinitiation der Transkription (Heparin oder Rifampicin) hinzugegeben, so dass jede Polymerase nur ein Transkript synthetisieren kann. Diese Vorgehensweise minimiert Effekte, die einzig auf der unterschiedlichen Länge der Produkte und damit der Dauer der Transkription beruhen. Die Durchführung des Versuches als *multi round* Assay entspricht einer „normalen“ Transkription mit Zugabe aller Nukleosid-Triphosphate und ohne Inhibierung der Reinitiation [90].

1.5.3 Reporter-gen-Assay [93-95]

Im dritten Schritt erfolgt der Nachweis der biologischen Relevanz des Schalters mit Hilfe eines *in vivo* Reporter-gen-Assays. Mit Hilfe eines geeigneten Plasmids wird eine Kopie des Riboswitches, welche vor einem β -Galactosidase-, Luciferase- oder GFP-Gen liegt (andere Reporter sind auch möglich), in einen Bakterienstamm eingebracht, der auxotroph in Bezug auf den untersuchten Metaboliten ist. So kann *in vivo* die Expression des Gens in Gegenwart und Abwesenheit des Effekormetaboliten studiert werden. Die Ergebnisse, die in den *in vitro* Versuchen erzielt wurden, sollten mit diesem Experiment bestätigt werden.

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten Riboswitches im Allgemeinen sowie Methoden zu ihrer Entdeckung und Analyse besprochen wurden, soll im folgenden Abschnitt der *LysC* Lysin-Riboswitch aus *B. subtilis* im Speziellen vorgestellt werden, der in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem für Riboswitches dient.

1.6 Lysin-Riboswitch

Der Lysin-Riboswitch ist in der 5'-UTR des *LysC*-Gens von *B. subtilis* zu finden [82,96,97]. Dieses Gen kodiert für die Expression der Aspartokinase II, die einen frühen Schritt im Biosyntheseweg von Lysin, Threonin und Methionin katalysiert. Außerdem wird in *B. subtilis* das Gen eines Lysin-Transporters (*yvsH*) von einem Lysin-Riboswitch reguliert. Das Aptamer des *LysC* Lysin-Riboswitches, dargestellt in Abbildung 8A, ist in Abwesenheit von Lysin

⁸ Der ternäre, pausierende Komplex besteht aus dem DNA-Templat, dem entstehenden RNA-Strang und der Polymerase, an welche die beiden Nukleinsäuren gebunden sind.

vorgeformt und mit 179 Nukleotiden Länge das zweitgrößte bekannte, natürliche Riboswitch-Motiv.

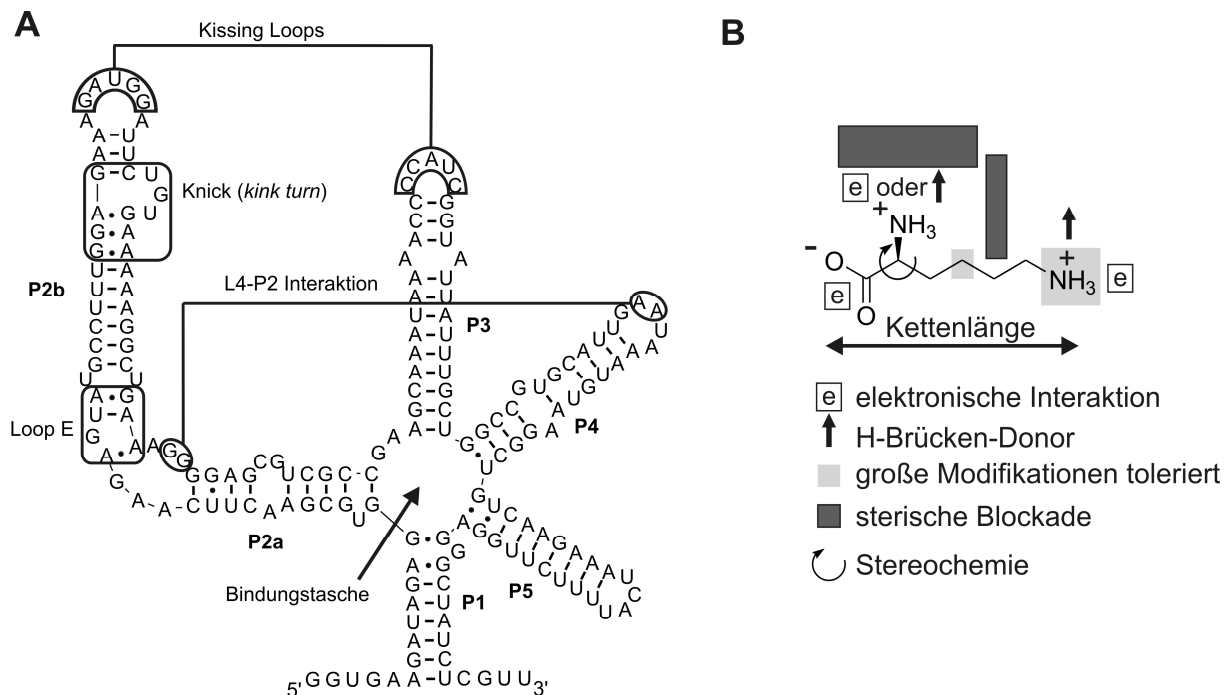


Abbildung 8: **A:** Aptamer des LysC Lysin-Riboswitches. **B:** Schematische Darstellung der Voraussetzungen für eine Metabolitenerkennung durch den Riboswitch nach Blount *et al.* [98].

Das Aptamer ist aus fünf Haarnadelstrukturen (*stemloops*) aufgebaut, die um einen zentralen Kern angeordnet sind, in dem Lysin gebunden wird [99-101]. Die Haarnadeln P2 und P3 bilden durch Interaktion ihrer endständigen Schleifen „Kissing Loops“. Zudem wird die Struktur des Aptamers durch ein „Loop E“-Motiv und einen Knick („kink turn“) in der Haarnadel P2 geprägt, welche die Ausbildung der *Kissing Loops* ermöglicht [102]. Lysin wird durch Wasserstoffbrückenbindungen mit allen drei Funktionalitäten im Zentrum der Struktur in einer vorgeformten Bindungstasche gebunden [96,98]. Besonders hervorzuheben ist, dass sowohl die Länge der Seitenkette als auch die Stereochemie des α -Kohlenstoffatoms entscheidend für die Erkennung der Aminosäure sind (Abbildung 8B). Des Weiteren wurde beschrieben, dass in der Seitenkette einzig das Kohlenstoffatom in Position 3 modifiziert werden kann, wie beispielsweise im bekannten antibiotisch wirksamen Lysinanalogen Aminoethylcystein (AEC), welches durch den Riboswitch erkannt wird [96,98]. Das endständige Amin der Seitenkette kann ebenfalls derivatisiert werden, so lange die Eigenschaft als Wasserstoffbrückendonator erhalten bleibt (Abbildung 8B). Andere Veränderungen der Struktur führen zu einem Verlust der Affinität zum Aptamer.

1.7 cAMP-Aptamer

Neben den natürlichen Aptameren, wie dem oben beschriebenen Lysin-Riboswitch, sind eine Fülle von künstlichen Sequenzen bekannt, die eine Affinität zu kleinen Molekülen aufweisen. Der überwiegende Teil der artifiziellen Aptamere wurde mit Hilfe der SELEX-Methode⁹ identifiziert und aufgrund ihrer Bindungseigenschaften mittels Affinitätschromatographie aus einem Pool zufälliger Sequenzen ausgewählt [103-105]. Im Vergleich zu den meisten natürlichen Aptameren sind sie relativ kurz [106]. Außerdem weisen sie in ihrer Diskriminierung gegenüber nahe verwandten Substanzen häufig eine vorhersehbare Lücke auf. Diese resultiert daraus, dass der Ligand über ein bestimmtes Atom mit der Festphase verbunden war, um die aktiven Sequenzen im Rahmen der SELEX anzureichern. Dementsprechend werden auch sperrige Derivatisierungen in dieser Position häufig vom Aptamer akzeptiert. Diese beiden Eigenschaften bieten gute Voraussetzungen, um erfolgreiche Testsysteme für eine affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse zu entwickeln.

Für die vorliegende Arbeit wurde als zweites Modellsystem neben dem Lysin-Riboswitch ein kleines, 31 Nukleotide langes cAMP-Aptamer ausgewählt (Abbildung 9A). Das Aptamer wurde im Jahre 2000 von Koizumi und Breaker mit Hilfe 3'-5'-cAMP selektiert, welches über die Position 8 des Adenins mit einer Agarose-Festphase verbunden war (Abbildung 9B) [107]. Dadurch werden Analoga des cAMPs, die in Position 8 modifiziert sind, weiterhin vom Aptamer gebunden. Um aktiv zu sein, ist eine 5'-Phosphorylierung der RNA-Sequenz notwendig.

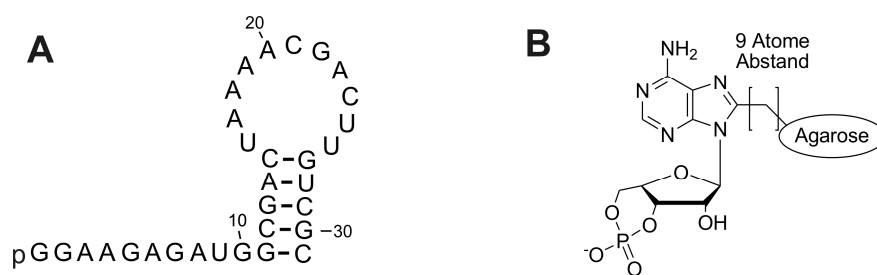


Abbildung 9: **A:** Wahrscheinliche Sekundärstruktur des cAMP-Aptamers. „p“ steht für ein 5'-terminales Phosphat. **B:** C8-immobilisiertes cAMP, mit dem die Selektion des Aptamers durchgeführt wurde (Abbildung aus [107]).

⁹ SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*; systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) ist ein Verfahren zur evolutionären Entwicklung funktioneller Nukleinsäuresequenzen, bei der ein Pool aus Nukleinsäuren mit randomisierter Sequenz eingesetzt wird und auf eine bestimmte Fähigkeit hin entwickelt (selektiert) wird.

Über die Struktur und den Erkennungsmechanismus dieses Aptamers ist wenig bekannt. Die Sequenz lässt eine einfache Haarnadelstruktur mit einer ausgedehnten Schleife und einigen ungepaarten Nukleotiden am 5'-Terminus vermuten (Abbildung 9A).

1.8 Diels-Alderase-Ribozym

Die Fähigkeiten von RNA-Oligonukleotiden beschränken sich nicht allein auf die Bindung von kleinen Molekülen. In den vergangenen Jahren wurden auch Sequenzen mit enzymatischen Eigenschaften entdeckt, die in der Lage sind, Reaktionen von organischen Molekülen zu katalysieren. Ein Beispiel hierfür ist das von B. Seelig in diesem Labor selektierte Diels-Alderase (Dase) Ribozym [108]. Dieses 49 Nukleotide lange, kompakte und hochstrukturierte Ribozym ist in der Lage, eine Cycloaddition zwischen Anthracen und einem Maleimid zu katalysieren (Diels-Alder Reaktion). Aufgrund einer Vielzahl von Untersuchungen, wie NMR [109], Mutagenese, enzymatischem und chemischem Probing [110,111] sowie Photoaffinitäts- [47], Photoaktivierungs- [112] und FRET-Studien [113,114] liegt in Kombination mit der Kristallstruktur des Ribozyms [115] und bioinformatischen Berechnungen [116] ein detailliertes Bild der chemischen Eigenschaften dieser Sequenz vor.

Die dreidimensionale Struktur ist geprägt von drei Helices, einem verschränkten Pseudoknoten, der durch seine Interaktionen mit der zentralen asymmetrischen Ausbuchtung (*bulge*) das katalytische Zentrum formt, und weiteren komplexen Strukturelementen [115]. Aufgrund der hohen strukturellen Dichte auf kleinem Raum und der Fülle an verfügbaren Informationen über Struktur und Faltung der Sequenz eignet sich das Dase Ribozym als Modellsystem für eine kompakte, hochstrukturierte RNA, wie sie in Riboswitch-Aptameren üblicherweise zu finden ist.

1.9 Fluoreszenzmodifikationen und photospaltbare Schutzgruppen zur Strukturuntersuchung von RNA

In den vergangenen Jahren hat sich die Modifikation von RNA mit Fluoreszenzfarbstoffen für strukturdynamische Untersuchungen im biologischen Kontext zu einem wichtigen Forschungszweig entwickelt. So wurden fluoreszenzmarkierte RNA-Moleküle in Einzelmolekül-FRET-Faltungsstudien [113,117-119], Ribozym-Aktivitäts-Assays [120,121] oder in hochauflösender Mikroskopie [122] eingesetzt. Auch Riboswitches wurden in diesen

Arbeiten insbesondere im Zusammenhang mit ihrer Rolle in der Genregulation studiert [117,118]. Über fluoreszente Farbstoffe hinaus wurde eine Vielzahl von Modifikationen entwickelt, welche die Eigenschaften von RNA modulieren und erweitern. Ein Beispiel mit Relevanz für diese Arbeit sind photospaltbare Schutzgruppen, die an spezifischen Positionen in RNA-Sequenzen eingeführt wurden, um Faltungsprozesse aufzuklären oder zwischen zwei funktionellen Zuständen zu wechseln (Abbildung 10) [112,123,124].

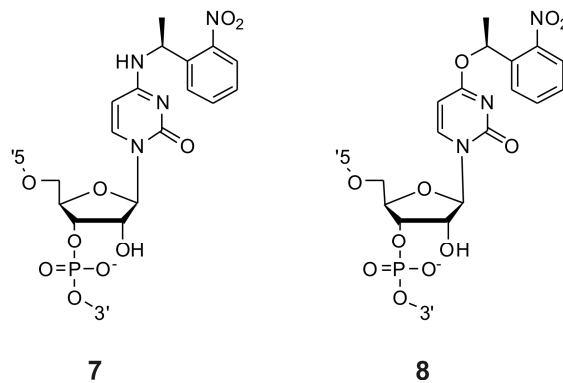


Abbildung 10: Chemische Struktur der beiden mit photospaltbaren Schutzgruppen versehenen Nukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden (Cytosin **7** und Uracil **8**).

Häufig wird jedoch schlicht angenommen, dass in modifizierter RNA weiterhin die strukturellen Charakteristika der unmodifizierten Stammsequenz erhalten bleiben. Derzeit gibt es keine geeignete Technik, um diese Vermutung zu verifizieren. Die Messung der FRET-Effizienz erlaubt zwar, den Abstand zwischen zwei Punkten zu beobachten, jedoch lassen sich lokale Störungen der Struktur nicht oder nur unzureichend auflösen. Diese können aber einen entscheidenden Einfluss darauf haben, ob eine bestimmte modifizierte RNA weiterhin funktional ist.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Protokoll entwickelt und getestet werden, mit dem es möglich ist, natürliche RNA-Sequenzen zu isolieren und zu identifizieren, die in der Lage sind, mit bestimmten Metaboliten spezifisch zu interagieren. Dieser Nachweis soll auf experimentellem Wege mit Hilfe von Photoaffinitätssonden in Crosslinking-Experimenten erbracht werden.

Zu diesem Zweck soll zu Beginn der Arbeit das Design und der Aufbau eines Sondenmoleküls geschildert werden, welches in Anlehnung an die literaturbekannten AfBPP-Sonden zur Isolation funktioneller Proteine geplant wird. Wichtige Bestandteile der Sonde sollen besprochen und mögliche chemische Funktionalitäten im Hinblick auf ihre Tauglichkeit im Zusammenhang mit RNA diskutiert werden.

Ein Ziel ist es, dass die Photoaffinitätssonden eine Affinität zum bekannten Lysin-Riboswitch aus *B. subtilis* aufweisen, der als Modellsequenz für den Funktionsbeweis dienen soll. Um dies zu gewährleisten, sollen sowohl Daten über den Bindungsmechanismus aus der Literatur herangezogen als auch eigene Daten generiert werden. Mit deren Hilfe können dann zuverlässige Vorhersagen getroffen werden, ob eine bestimmte Sonde an den Riboswitch binden kann. Die dafür benötigten homologen Reihen der Lysinanaloga sollen synthetisiert und auf ihre Affinität zum Riboswitch getestet werden.

Auf Basis aller dann verfügbaren Daten kann im Folgenden die Synthese mehrerer Lysin-Photoaffinitätssonden durchgeführt werden. Die Sonden sollen auf ihre Bindungsfähigkeit hin untersucht und schließlich in Photoaffinitäts-Crosslinking-Experimenten eingesetzt werden.

Parallel dazu soll mit dem artifiziellen cAMP-Aptamer eine zweite RNA-Sequenz zum Funktionsbeweis eingesetzt werden. Diese ermöglicht es, einige Nachteile des Lysin-Riboswitch-Systems zu umgehen. Mit Hilfe von kommerziell erhältlichen cAMP-Photoaffinitätssonden kann zuerst der Photocrosslink mit RNA untersucht und optimiert werden, bevor Versuche in Gegenwart hoher Anteile an zellulärer RNA durchgeführt werden. Diese sollen schließlich in einer affinitätsbasierten chemischen Transkriptomanalyse (ABC Transkriptomanalyse) münden. Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Transkriptome sind mögliche Proben für die Analyse.

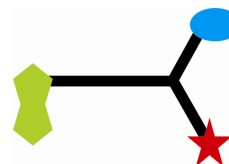
In einem weiteren Teilgebiet dieser Arbeit soll untersucht werden, ob es möglich ist, radioaktive Markierungen in Probing-Experimenten zur Strukturaufklärung von RNA-Sequenzen durch Fluoreszenzfarbstoffe zu ersetzen. Außerdem ist es ein Ziel dieses Abschnittes zu überprüfen, ob Fluoreszenzfarbstoffe, die bereits in einer RNA-Sequenz vorhanden sind, genutzt werden können, um strukturelle Aussagen über die entsprechenden Oligonukleotide machen zu können.

Die chemische Untersuchung von Transkriptomen ist derzeit eines der Schwerpunktforschungsgebiete im Arbeitskreis Jäschke. Im Verlauf meiner Doktorarbeit haben fünf Mitarbeiter mit teilweise überlappenden Fragestellungen an diesem Thema gearbeitet. Aus diesem Grund ist es an einigen Stellen für das Verständnis meiner eigenen Ergebnisse nötig, die Arbeiten meiner Kollegen zu erwähnen und skizzenhaft zu erläutern.

3 Ergebnisse und Diskussion

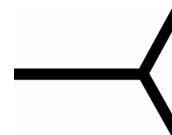
3.1 Design von Photoaffinitätssonden

Die zentrale Voraussetzung für den Erfolg einer affinitätsbasierten chemischen Transkriptomanalyse ist genau wie bei ABPP und AfBPP die Bindung der Sonde an die Zielsequenzen beziehungsweise -proteine. Entscheidend ist also die Wahl der drei Komponenten der Photoaffinitätssonde (Metabolitanalogon, photoreaktive Gruppe und Anreicherungsfunktion) sowie deren Verknüpfung. Diese sollen im Folgenden der Reihe nach vorgestellt werden.



3.1.1 Zentrales Gerüst

Die drei funktionellen Einheiten der Photoaffinitätssonde werden über ein Gerüstmolekül (*linker*) verbunden, welches den Abstand und die Orientierung der drei Gruppen zueinander bestimmt. Vor allem der Abstand des Metabolitanalogons zur photoreaktiven Gruppe ist entscheidend für die Selektivität und die Effizienz des Crosslinks.



Als Gerüstmolekül wurde *L*-Lysin (**9**) gewählt, da es über drei funktionelle Gruppen verfügt, die mit den drei Einheiten der Sonde verbunden werden können (siehe Abbildung 11). Außerdem ist es kommerziell in verschiedenen, orthogonal geschützten Varianten erhältlich, was die Synthese der Sonden vereinfacht.

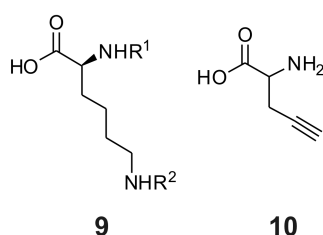


Abbildung 11: Darstellung der beiden in dieser Arbeit verwendeten Gerüstmoleküle *L*-Lysin (**9**) und Propargylglycin (**10**). R^1 und R^2 stellen je nach Synthesestrategie orthogonale Schutzgruppen oder Wasserstoffatome dar.

Wie bereits in meiner Diplomarbeit diskutiert, gibt es zwei weitere Gründe, Lysin als zentrales Gerüstmolekül einzusetzen [125]. Zum einen lassen sich durch das Vorhandensein zweier Aminfunktionen im Lysin, unter Verwendung derselben chemischen Reaktionen, zwei der Komponenten durch Veränderungen im Ablauf der Synthesepipeline miteinander vertauschen. Dadurch wird die räumliche Anordnung der Sonde verändert und möglicherweise unterschiedliche Interaktionspartner erschlossen. Zum anderen sind orthogonal geschützte Homologe des Lysins mit kürzeren und längeren Seitenketten

kommerziell erhältlich, so dass die Synthese von Sonden möglich ist, bei denen der Abstand der Komponenten zueinander weiter variiert werden kann.

Im Fall von nachträglich konvertierbaren Sonden, wie sie in Zusammenarbeit mit A. Samanta synthetisiert wurden, wurde Propargylglycin (**10**) als zentraler Baustein gewählt (siehe Abbildung 11). Dadurch verkürzt sich die Synthese und die Sonden tragen ein terminales Alkin als latente Anreicherungsfunktion (vergleiche **4** in Abbildung 12B). Terminale Alkine können mittels Kupfer-katalysierter „Click“-Chemie eine Reaktion mit Biotinazid (**5**) eingehen und so zur „vollwertigen“ Sonde (**6**) umgesetzt werden [41,42]. Diese Reaktion wird üblicherweise erst im Anschluss an den Photocrosslink vorgenommen. Ein solches Vorgehen ist bei ABPP-Protokollen üblich, die für eine *in vivo* Anwendung entwickelt wurden, da biotinylierte Moleküle häufig problematisch im Hinblick auf die intrazelluläre Verfügbarkeit sind.

3.1.2 Anreicherungsfunktion

Als Alternative zu der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen latenten Anreicherungsfunktion des terminalen Alkins kann Biotin (**11**) direkt in die Sonden eingeführt werden (Abbildung 12A). Die freie Säurefunktion des Biotins kann mit Hilfe einer NHS-Ester-Kopplung mit Lysin verbunden werden [126].

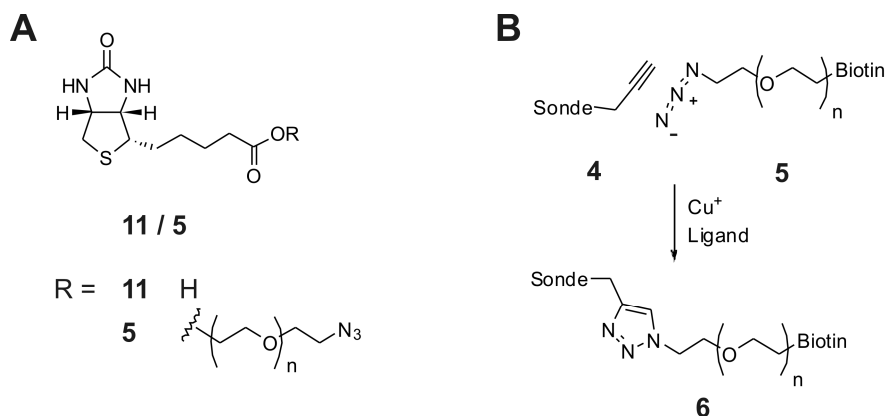


Abbildung 12: **A:** Biotin (**11**) und Biotinazid (**5**). **B:** Schema einer Kupfer-katalysierten „Click“-Reaktion zwischen einer konvertierbaren Sonde (**4**) mit Biotinazid (**5**) zur Bildung der vollständigen Sonde mit Anreicherungsfunktion (**6**).

Biotin (**11**) erhielt den Vorzug vor anderen möglichen Anreicherungsfunktionen (wie zum Beispiel „His-Tags“), weil es verhältnismäßig klein ist, in den analogen ABPP-Sonden üblicherweise eingesetzt wird und die Interaktion mit Streptavidin hochselektiv und von außergewöhnlicher Stärke ist [127].

3.1.3 Photoreaktive Gruppe

Wie in der Einleitung beschrieben, werden in AfBPP-Sonden drei Arten photoreaktiver Gruppen verwendet (Benzophenone (**1**), Diazirine (**2**) und Arylazide (**3**); siehe auch Abbildung 2A). Interessanterweise gibt es in der Literatur im Zusammenhang mit Photocrosslinks an Nukleinsäuren nur Berichte von Arylaziden (**3**) [47,128] und einer weiteren Gruppe, den Psoralenen (**12**) (Abbildung 13A) [129-131].

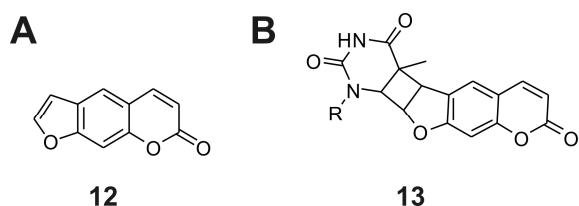


Abbildung 13: **A:** Psoralen (**12**). **B:** Mit einer Thymidinbase verknüpftes Psoralen (**13**) nach einer Photoreaktion [132].

Psoralene besitzen die Fähigkeit zur Interkalation und gehen, wie in Abbildung 13B dargestellt, relativ spezifisch [2+2]-Cycloadditionen mit Thymidin- und Uracilbasen ein [132,133].

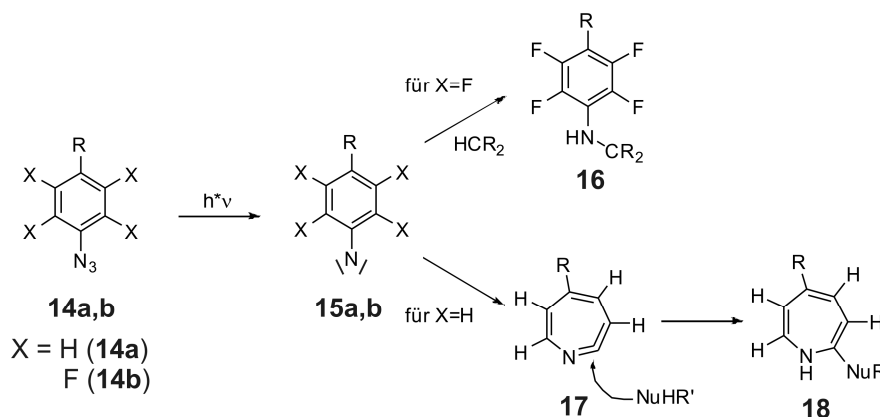
Wichtig für die Wahl der photoreaktiven Gruppe war, abgesehen von einer guten Datengrundlage in der Literatur, dass sie mit Licht einer Wellenlänge oberhalb von 300 nm aktivierbar ist und in ein hochreaktives, möglichst unspezifisch reagierendes Intermediat überführt wird¹⁰. Gleichzeitig soll sie vor der Bestrahlung chemisch so stabil sein, dass die Synthese der Sonde keinen zu großen Einschränkungen unterliegt. Nach der Abwägung dieser Anforderungen waren Arylazide (**3**) die erste Wahl für die photoreaktive Gruppe.

Sie zeigen im Gegensatz zu Diazirinen (**2**) eine ausgezeichnete chemische Stabilität und ihre Reaktivität nach der Aktivierung lässt sich über die Substitution des Phenylrings steuern. Unsubstituierte Arylazide (**14a**) gehen bei Lichteinstrahlung unter Abspaltung von Distickstoff in ein hochreaktives aber kurzlebiges Nitren¹¹ (**15a**) über (Schema 1), welches sich innerhalb von Nanosekunden in einen ungesättigten Siebenring umlagert (Azaheptatrien, **17**) [128,134]. Dieser reagiert unspezifisch mit Nukleophilen aller

¹⁰ Mit „unspezifisch“ ist in diesem Fall die Abwesenheit einer Spezifität für die Reaktion der photoreaktiven Gruppe mit einer bestimmten chemischen Funktion gemeint. Dies ist abgegrenzt von der Spezifität der Sonde für bestimmte Biomoleküle, welche nicht von der photoreaktiven Gruppe, sondern vom Metabolitanalogon ausgeht und in den Betrachtungen, die in diesem Abschnitt angestellt werden, keine Rolle spielt.

¹¹ Ein Nitren ist das Stickstoffanalogon des Carbens. Es handelt sich um eine elektronisch neutrale 6-Elektronen-Spezies, die leicht radikalische Reaktionen eingeht, um den stabilen 8-Elektronen-Zustand wieder herzustellen.

Art (**18** in Schema 1) und Reaktionen mit Nukleinsäuren wurden bereits mehrfach gezeigt (auch von dieser Gruppe) [47,135]. Perfluorierte Arylazide (**14b**) gehen diese Umlagerung sehr viel langsamer ein. Daher wird ihr Reaktionsspektrum weitaus stärker vom Nitren-Zustand (**15b**) bestimmt (siehe CH-Insertion zur Bildung von **16** in Schema 1) [136].



Schema 1: Mechanismus der Photoaktivierung und des vorwiegenden Crosslinking-Prozesses von Arylaziden und Perfluorophenylazid.

Bei Benzophenon (**1**) ist bekannt, dass es eine hohe Selektivität bezüglich der Geometrie des Crosslinks besitzt [137,138]. Andererseits ist die Aktivierung der Benzophenonderivate anders als bei Arylaziden reversibel, was sich positiv auf die Ausbeuten der Crosslink-Reaktion auswirken sollte [139]. Da im Zusammenhang mit Nukleinsäuren aber keine Literaturdaten vorhanden sind, ist es nicht möglich, diese photoreaktive Gruppe abschließend zu bewerten.

Psoralene (**12**) wurden bisher nicht in Photoaffinitätssonden eingesetzt. Sie bergen das Risiko, hohe Anteile an unspezifischen Crosslinks zu produzieren, da sie die Fähigkeit zur Interkalation besitzen. Dies konkurriert möglicherweise mit der spezifischen Affinität des Metabolitanalogons.

Die bisher beschriebenen Komponenten stellen den universell einsetzbaren Teil der Sonde dar. Dieser wird allein zur Verknüpfung der Sonde mit dem Biomolekül und zur anschließenden Isolation der Crosslink-Produkte benötigt. Von ihm soll keine Affinität zu Biomolekülen ausgehen, die das Ergebnis des Photoaffinitäts-Crosslinkings verfälschen würde. Bevor im folgenden Abschnitt näher auf die Wahl eines Metabolitanalogons (der Teil der Sonde, der die spezifische Bindung induziert) eingegangen wird, sollen die Ergebnisse kurz zusammengefasst werden.

Die drei Komponenten der Sonde (Anreicherungsfunktion, photoreaktive Gruppe und Metabolitanalogon) sind über ein zentrales Gerüstmolekül miteinander verbunden. Dies entspricht dem klassischen Aufbau einer AfBPP-Sonde [24]. Die Wahl für ein optimales Gerüstmolekül fiel auf *L*-Lysin (**9**). Dieses enthält, wenn es orthogonal geschützt wird, drei unabhängig voneinander adressierbare Funktionalitäten, die sich mit Methoden der Peptidsynthese derivatisieren lassen. Außerdem ist es durch die große Zahl an analogen Verbindungen möglich, die Abstände und Orientierungen der einzelnen Komponenten durch den Einsatz anderer kommerziell erhältlicher, basischer Aminosäuren zu modulieren (zum Beispiel Ornithin (**23**) oder *D*-Lysin).

Als Anreicherungsfunktion ist Biotin (**11**) mit seiner starken Affinität zu Streptavidin nahezu ohne Alternative. Die extrem starke Biotin-Streptavidin-Bindung wird in einer Vielzahl von Disziplinen zur Immobilisierung von Stoffen an Oberflächen genutzt [31,140-142]. Auch in ABPP-Sonden ist Biotin die übliche Anreicherungsfunktion [32].

Im Vergleich hierzu sind die Wahlmöglichkeiten für die photoreaktive Gruppe größer. Die Auswahl wird dadurch erschwert, dass es nicht möglich ist vorherzusagen, welche Art von photoreaktiver Funktion die besten Ergebnisse liefert. Vieles hängt von der direkten Umgebung der reaktiven Zwischenstufe während der Bindung der Sonde an die RNA ab. Darüber hinaus ist zu den Reaktionen von RNA mit Benzophenonen (**1**) und Diazirinen (**2**) sehr wenig literaturbekannt. Crosslinks mit Phenylaziden (**3**) und mit Psoralenen (**12**) wurden dagegen häufiger beschrieben. Aufgrund der größeren Erfahrungen mit Phenylaziden und ihres im Vergleich zu Psoralen breiteren Reaktionsspektrums wurden sie schließlich als photoreaktive Komponente der Sonden ausgewählt. Für sie spricht außerdem ihre chemische Stabilität und gute synthetische Zugänglichkeit. Um das Spektrum der photoreaktiven Gruppen zu erweitern, sollten aber in zukünftigen Versuchen auch andere Funktionalitäten (Benzophenon, Psoralen) in Betracht gezogen werden.

3.1.4 Metabolitanalogon

Das Metabolitanalogon ist die entscheidende Komponente für die Bindung der Sonde an ein bestimmtes Biomolekül. Es muss so gewählt sein, dass es eine  möglichst gute Bindungsstärke aufweist, unkompliziert mit der Sonde zu verbinden ist und eine ausgewogene Spezifität besitzt. Ein Substrat, das so spezifisch ist, dass es nur von einem Biomolekül erkannt wird, ist genauso ungeeignet wie eine Substanz, die viele unspezifische Crosslinks eingeht und deshalb kein Abbild einer definierten Affinität erzeugt. Vielversprechende Sonden enthalten Liganden, die möglichst analog zum natürlichen Interaktionspartner gestaltet sind.

Prinzipiell wäre es möglich, einen beliebigen Metaboliten in eine Photoaffinitätssonde zu überführen. Da es aber Ziel dieser Arbeit war, einen Funktionsbeweis der affinitätsbasierten chemischen RNomik zu erbringen, diente nicht der Metabolit, sondern die RNA als Ausgangspunkt für die Auswahl eines geeigneten Modellsystems. Stellvertretend für metabolitbindende RNA-Sequenzen wurde somit ein bekannter Riboswitch gesucht, um mit Hilfe dessen die Methode auf ihre Anwendbarkeit hin zu überprüfen.

Voraussetzung für die Auswahl war, dass ausreichend viele biochemische Daten über den Mechanismus und die Grenzen der Erkennung des Metaboliten verfügbar waren. So konnte eine qualifizierte Entscheidung getroffen werden, wie dieser derivatisiert werden muss, um die Bindungsfähigkeit der Photoaffinitätssonde weiterhin zu gewährleisten. Im Idealfall liegt sogar eine Röntgenstrukturanalyse vor. Weiterhin sollte die Umwandlung des Metaboliten in eine Sonde mit wenigen unkomplizierten Syntheseschritten durchführbar sein.

3.2 Der Lysin-Riboswitch als Modellsystem für Photoaffinitäts-Crosslinking mit RNA

Die Wahl fiel auf den Lysin-Riboswitch als Modellsystem für Photoaffinitäts-Crosslinking mit RNA. Zu diesem lagen aus zwei Publikationen bereits biochemische Daten über die Erkennung verschiedener Lysinanaloga vor [96,98]. Daraus entstand ein Bindungsmodell für Lysin, bei dem deutlich wurde, dass die Kopfgruppe der Aminosäure (bestehend aus Carboxyl- und α -Aminofunktion) unverändert bleiben muss, während in der Seitenkette durchaus Modifikationen eingeführt werden können, ohne die Bindung zu stark zu beeinträchtigen (siehe auch Abbildung 8B). Besonders interessant war in diesem Zusammenhang die Bindung von Homoarginin (**24**, Abbildung 16C) an den Riboswitch [98]. Homoarginin hat dieselbe Seitenkettenlänge wie Lysin und unterscheidet sich von diesem nur dadurch, dass die terminale Aminfunktion durch ein Guanidin ersetzt ist. Chemisch ist es in einer zweistufigen Synthese möglich, ein primäres Amin in ein bisalkyliertes Guanidin zu überführen (siehe auch Kapitel 3.4). Die zweite Alkylgruppe stellt im Fall einer Photoaffinitätssonde das Gerüst mit der photoreaktiven Gruppe und der Anreicherungsfunktion dar. Dieser Ansatz wurde für die Synthese einer Photoaffinitätssonde auf der Basis von Lysin genutzt.

Im Jahr 2008 wurde die Kristallstruktur des Riboswitches mit und ohne Ligand gelöst, wodurch es weitere Einblicke in dessen Erkennungsmechanismus gab [99,100]. Die Analyse der Struktur unterstützte die Theorie einer Bindungskonservierung für bisalkylierte

Guanidine, da sich am Ende der Seitenkette eine Öffnung in der Bindungstasche ausmachen ließ (Abbildung 14).

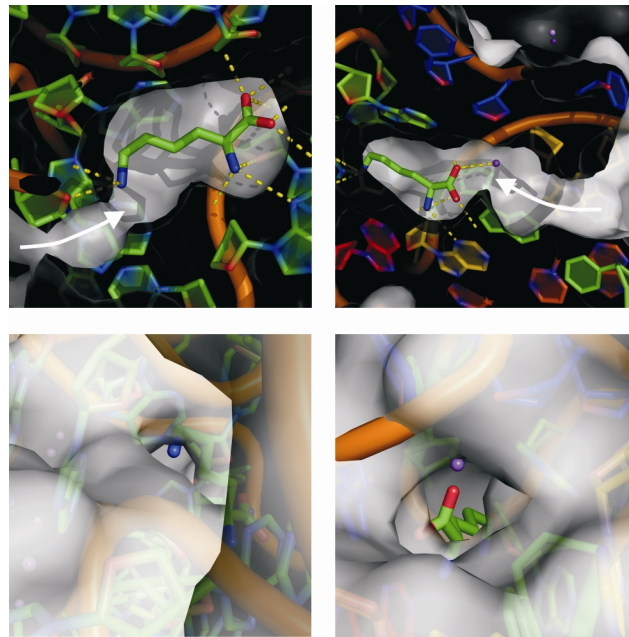


Abbildung 14: Ausschnitt aus der Kristallstruktur des Lysin-Riboswitch-Aptamers (PDB ID: 3DIL aus [100]). Obere Reihe: Schnitte durch das Aptamer, welche die Position des *L*-Lysins in der Bindungstasche sowie die Öffnungen (weiße Pfeile) in Nachbarschaft zur Seitenkette (links) und zur Säure (rechts) zeigen. Kohlenstoffatome sind in grün, Stickstoffatome in blau und Sauerstoffatome in rot dargestellt. Das essentielle Kaliumion ist als lila Kugel gezeigt. Die gelb gestrichelten Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar, die der Metabolit in der Bindungstasche eingeht. Untere Reihe: Außenansicht der Öffnungen von der Seitenkette (links) beziehungsweise von der Säure (rechts) her gesehen.

Des Weiteren wurde eine zweite Öffnung in Nachbarschaft zur Carboxylfunktion des Lysins sichtbar (Abbildung 14). Durch diese Öffnung könnten Erweiterungen der Carboxylfunktion beispielsweise als Ester zu einer Derivatisierung in eine Photoaffinitätssonde genutzt werden. Säuremodifizierte Lysinanaloga wurden in der Literatur zwar schon diskutiert, es liegen aber noch keine experimentellen Befunde vor [101]. Bei der Bindung eines Lysinesters an das Aptamer müsste ein Kaliumion aus der Bindungstasche verdrängt werden. Dessen Rolle bei der Bindung des Lysins ist aber nicht geklärt [100].

Diese zweite Öffnung war für den Verlauf der Arbeit von großem Interesse. Zum einen ist es wünschenswert, sich bei einem Funktionsbeweis auf mehrere Sonden zu stützen, die möglichst auf unterschiedlichen Derivatisierungsmodi des Metaboliten beruhen. Diese

Möglichkeit würde durch eine Photoaffinitäts-sonde auf Basis eines Lysinesters oder -amids erschlossen (zusätzlich zum bisalkylierten Guanidin). Zum anderen wurde in der Kristallstruktur die Öffnung in Nachbarschaft zur Carboxylgruppe als größer beschrieben, als diejenige am Ende der Seitenkette, welche die Sonde auf Homoargininbasis aufnehmen muss. Die Synthese einer Lysinester-Sonde ist außerdem vergleichsweise einfach mit klassischen Methoden zu bewerkstelligen.

Die Literaturdaten bezüglich säuremodifizierter Lysinanaloge sind aber spärlich. Aus diesem Grund sollten vor der Synthese einer solchen Photoaffinitäts-sonde zusätzliche biochemische Daten über die Möglichkeiten und Grenzen der Erkennung von Lysinestern und -amiden gesammelt werden. Mit deren Hilfe ist es dann möglich abzuschätzen, welche Bedingungen eine Lysinester-Sonde erfüllen muss, um weiterhin vom Riboswitch gebunden zu werden.

3.3 Sondierung der Taschengröße und Bindungseigenschaften des Lysin-Riboswitches

In Anbetracht dessen, dass der Lysin-Riboswitch in Zusammenhang mit neuen antibiotischen Strategien gebracht wird [98,143] und bereits einige verwandte Substanzen auf ihre Bindungsfähigkeit hin untersucht wurden [96,98], ist es verwunderlich, dass bisher nur ein Analogon getestet wurde, bei dem die Säurefunktion des Lysins (**19a**) modifiziert ist (Abbildung 15). Vom Lysinhydroxamat (**20d**) ist bekannt, dass die Bindung an das Aptamer in In-Line Probing-Versuchen nachgewiesen werden konnte, auch wenn diese Aussage rein qualitativ ist und keine Dissoziationskonstante bestimmt wurde [96]. Andere Ester oder Amide des Lysins wurden bisher nicht auf ihre Bindungsfähigkeit getestet.

Um eine bessere Grundlage für die Planung und Synthese einer Ester-basierten Photoaffinitäts-sonde zu haben, wurde eine Reihe von säuremodifizierten Lysinanaloge synthetisiert. Mit Hilfe dieser Analoga sollte die Größe der Bindungstasche ausgelotet werden. Um ein möglichst genaues Bild zu bekommen, wurden die Ester in Bezug auf zwei Eigenschaften moduliert. Einerseits wurde die Alkylkette der Ester sukzessive vom Methylester bis zum *n*-Propylester des Lysins verlängert (Abbildung 15; **19b-d**). Zum anderen wurde der sterische Anspruch verändert. Während die unverzweigten Ester relativ wenig Raum einnehmen und flexibel sind, sind verzweigte Ester deutlich raumfüllender. Dies reicht vom Isopropylester (**19e**) über den sekundär-Butylester (*sek*-Butyl, **19f**), die beide in der α -Position direkt am Beginn der Esterkette verzweigt sind, bis zum tertiär-Butylester (*tert*-Butyl, **19g**), der einen sehr hohen sterischen Anspruch hat. Beim Isobutylester (**19h**) ist

die Verzweigung der Kette weiter vom Metaboliten entfernt, so dass sie bereits aus der Bindungstasche herausragen könnte. Ähnliches gilt für den Benzylester (**19i**), bei dem zusätzlich die Möglichkeit besteht, dass Stapelwechselwirkungen (*stacking interactions*) mit benachbarten Nukleobasen die Bindung unterstützen.

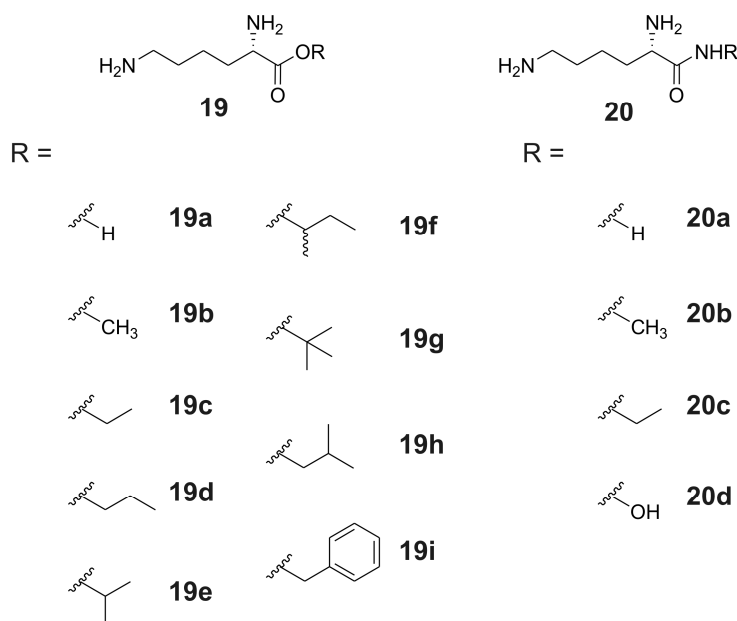


Abbildung 15: Struktur der verwendeten Lysinanaloga.: L-Lysin (**19a**) und Lysinester (**19b-i**); Lysinamide (**20a-c**) und Lysinhydroxamat (**20d**).

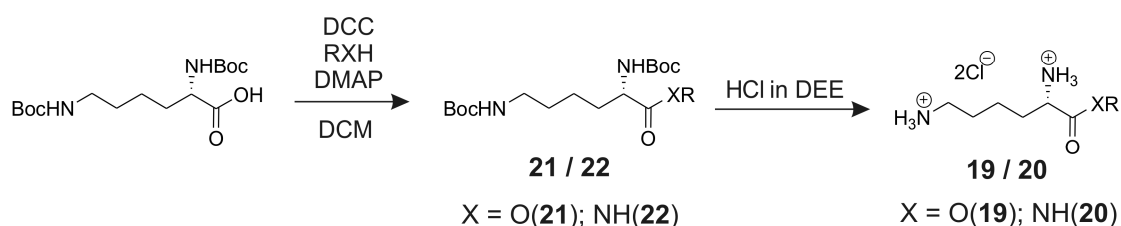
Zusätzlich zu den räumlichen Grenzen des Aptamers sollten die elektronischen Eigenschaften der Bindungstasche untersucht werden. So wurde das Lysinamid (**20a**), welches bei gleichem sterischen Anspruch eine vollkommen andere Polarität als der natürliche Ligand aufweist, auf seine Bindungsfähigkeit hin getestet. Außerdem wurden das Methyl- (**20b**) und Ethylamid (**20c**) des Lysins synthetisiert, um einen direkten Vergleich mit den analogen Ester ziehen zu können.

3.3.1 Synthese der Lysinanaloga

Die meisten Lysinester¹² sind in einer zweistufigen Synthese aus einem Di-Boc-geschützten L-Lysin und dem entsprechenden Alkohol zugänglich. Im ersten Schritt wurde eine Veresterung mit DCC-Aktivierung unter DMAP-Zusatz vorgenommen, deren Produkt (**21**)

¹² Diese Ester sind: Ethyl-, *n*-Propyl-, Isopropyl-, *sek*-Butyl-, Isobutyl- und Benzylester (**19c, d, e, f, h, i**). **19b** wurde käuflich erworben. Die Synthese des *tert*-Butylesters (**19g**) wird im weiteren Verlauf der Arbeit beschrieben.

sich problemlos säulenchromatographisch reinigen ließ (Schema 2). Dies entspricht dem Steglich-Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren [144].



Schema 2: Synthese der Lysinester und –amide.

Anschließend erfolgte die Entschützung zum Lysinester-Dihydrochlorid (**19**) in einer Lösung von HCl in Diethylether (DEE). Diese Entschützungsvariante hat den Vorteil, dass die Produkte im Verlauf der Reaktion als weißes Pulver ausfallen, da sie im verwendeten Lösemittel (DEE) unlöslich sind [145]. Nach Beendigung der Reaktion können sie abfiltriert und ohne zusätzliche Aufreinigungsschritte in molekularbiologischen Versuchen eingesetzt werden.

Tabelle 1: Ausbeuten der Synthese der Lysinanaloga sowie Ergebnisse der Reinheitsbestimmung mittels LC-MS.

Lysinanalogon	Ausbeute der Veresterung	Ausbeute der Entschützung	Reinheit
Lysin-Methylester (19b)	n.a.	n.a.	98,2 %
Lysin-Ethylester (19c)	89 %	77 %	99,2 %
Lysin- <i>n</i> -Propylester (19d)	50 %	68 %	98,8 %
Lysin-Isopropylester (19e)	100 %	95 %	99,0 %
Lysin- <i>sek</i> -Butylester (19f)	93 %	53 %	98,9 %
Lysin- <i>tert</i> -Butylester (19g)	n.a.	98 %	98,1 %
Lysin-Isobutylester (19h)	100 %	90 %	99,1 %
Lysin-Benzylester (19i)	33 %	89 %	97,9 %
Lysinamid (20a)	n.a.	n.a.	99,0 %
Lysin-Methylamid (20b)	46 %	97 %	>99,2 % ^a
Lysin-Ethylamid (20c)	56 %	98 %	>99,2 % ^a

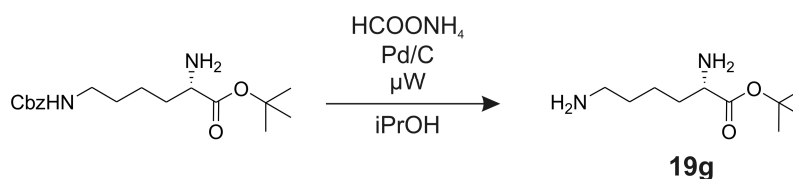
^aDie Detektionsgrenze zur Bestimmung der Reinheit lag bei 0,8 %. Aus diesem Grund wird die Reinheit von Substanzen, bei denen kein Lysin detektiert werden konnte, mit >99,2 % angegeben.

Die Reinheit dieser Substanzen konnte, wie in Tabelle 1 zu sehen ist, mittels LC-MS auf ≥97,9 % bestimmt werden, was für die anschließenden biochemischen Experimente

ausreichend ist. Die Ausbeuten dieser Synthese liegen je nach verwendetem Alkohol zwischen 29 % und 95 % über beide Schritte.

Die Synthese der Lysinamide (**20**) wurde in analoger Weise durchgeführt (Schema 2). Anstelle der Alkohole wurden in diesen Fällen Amine im ersten Schritt eingesetzt. Auch hier waren Reinheit und Ausbeuten zufriedenstellend.

Der einzige Ester, der aufgrund seiner sterischen Hinderung nicht mit dem oben beschriebenen Syntheseprotokoll herstellbar war, war der *tert*-Butylester (**19g**). In diesem Fall wurde auf eine alternative Synthese zurückgegriffen (Schema 3).



Schema 3: Synthese des Lysin-*tert*-Butylesters (**19g**).

Ein Lysin-*tert*-Butylester, dessen Seitenkette mit einer *Cbz*-Gruppe geschützt ist, ist kommerziell erhältlich. Diese Schutzgruppe konnte in der Mikrowelle nach einem generellen Entschützungsprotokoll von Daga *et al.* mit Hilfe von Ammoniumformiat und einem Palladium-Katalysator abgespalten werden [146]. Das Produkt wurde nach Entfernen des Katalysators und des Lösemittels so rein erhalten, dass eine weitere Aufreinigung nicht nötig war. Das Formiat-Gegenion wurde durch Chlorid ersetzt, damit alle Lysinanaloga in identischer Form vorlagen. Die Ausbeute der Synthese war mit 98 % sehr gut.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gelungen ist, eine große Bandbreite an säuremodifizierten Lysinanaloga (**19**, **20**) in guten Ausbeuten und sehr hohen Reinheiten zu synthetisieren. Die Synthese wurde in zwei Stufen realisiert, wobei nur das Zwischenprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt werden musste. Die Verwendung von HCl in Diethylether für die finale Entschützung führte zu sehr reinen Endprodukten, was einen deutlich geringeren Zeitaufwand bedeutet als bei dem sonst üblichen Protokoll unter Verwendung von Trifluoressigsäure.

Im Folgenden wurde die Bindungsfähigkeit dieser Analoga mit dem Aptamer des Lysin-Riboswitches untersucht. Dadurch sollte Einblick in die Größe und Flexibilität der Bindungstasche gewonnen werden, was für die Planung und Synthese einer Lysin-Photoaffinitäts-sonde von großer Bedeutung ist. Ähnliche Studien gehören zum üblichen

Vorgehen bei der Untersuchung von RNA-Aptameren [107,147] und wurden beispielsweise auch mit dem Diels-Alderase Ribozym durchgeführt [148]. Auch für Riboswitches werden solche Studien durchgeführt, wenn auch meist mit einem recht groben systematischen Muster [98,149,150].

3.3.2 Bindungsanalyse mittels In-Line Probing

Die Standardmethode zur Analyse der Bindung von kleinen organischen Molekülen an Aptamere ist das In-Line Probing [88]. Aus diesem Grund wurden alle Lysinanaloga mit dieser Methode auf ihre Affinität zum Riboswitch hin überprüft. Primär lässt sich dabei feststellen, ob eine Substanz überhaupt mit der RNA interagiert und ob diese Interaktion auf einer spezifischen Bindung beruht. Ist dies der Fall, so ist es möglich, mittels eines Titrationsexperimentes die Dissoziationskonstante des Liganden zu bestimmen.

Für diese Versuche wurde das Aptamer des Lysin-Riboswitches *in vitro* transkribiert und 5'-³²P-markiert. Anschließend wurden mit dem 179mer In-Line Probing-Experimente durchgeführt, wobei *L*-Lysin oder ein entsprechendes Analogon in Konzentrationen zwischen 1 nM und 10 mM zu der Lösung gegeben wurden.

Die Analyse des Spaltungsmusters zeigt, dass bei Zugabe von *L*-Lysin die Intensität der Spaltungsbanden in drei Regionen moduliert wird, wie bereits in vorangegangenen Veröffentlichungen beschrieben wurde (Abbildung 16A und B) [98]. Diese drei Regionen nehmen an der Erkennung der Aminosäure teil. Während die Nukleotide 84-86 (Region 3) Wasserstoffbrücken zum ϵ -Amin der Lysin-Seitenkette ausbilden, binden die Nukleotide 148-149 (Region 2) an die Säurefunktion und das α -Amin. Auch für die Nukleotide 170-174 (Region 1) ist eine Reduktion der Spaltung im Zuge der Bindung des Metaboliten zu sehen, obwohl sie keine direkten Kontakte zum Lysin ausbilden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Nukleotide die Stabilisierung der Bindungstasche unterstützen [100,101].

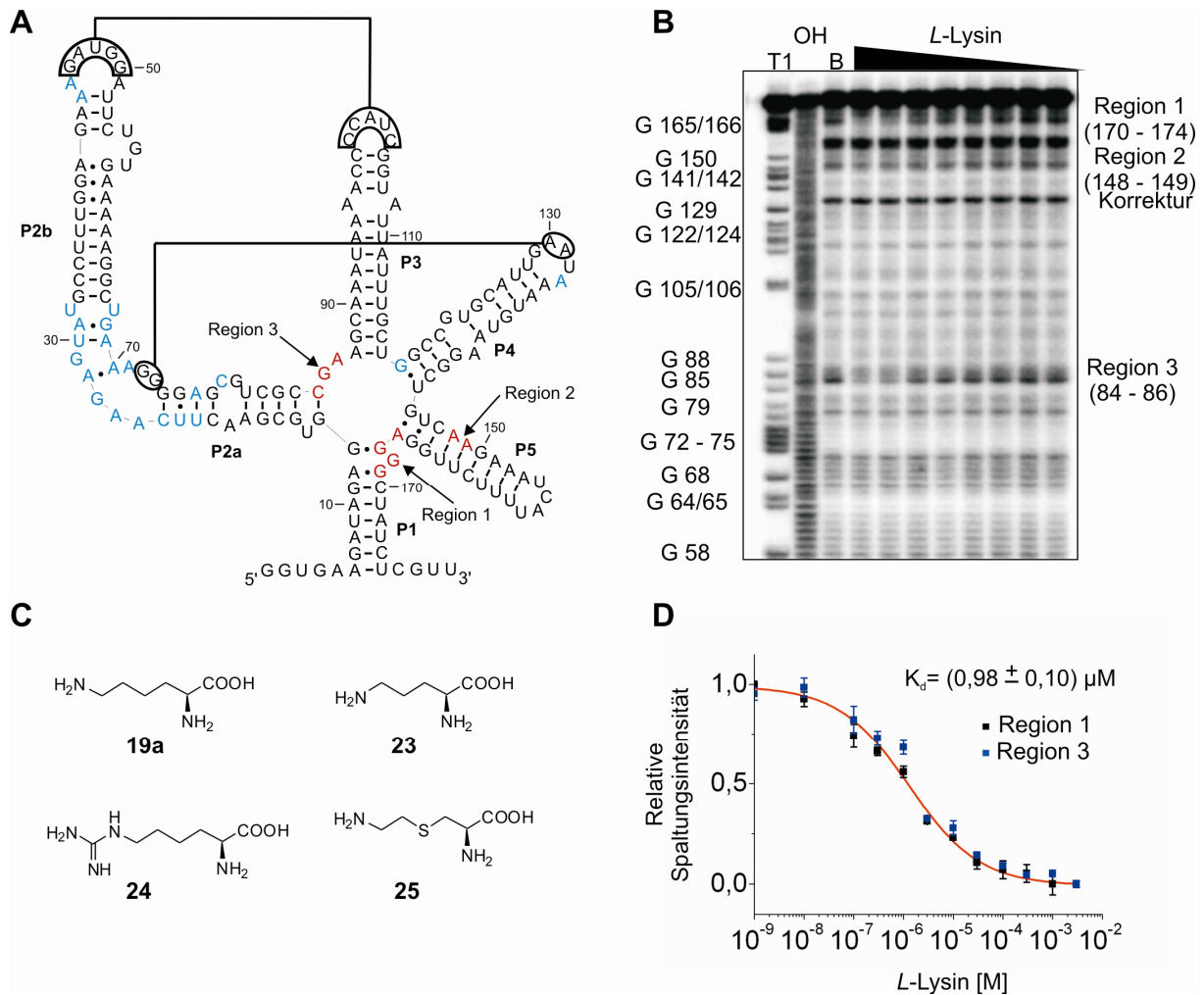


Abbildung 16: **A:** 2D-Struktur des *lysC* Lysin-Riboswitch-Aptamers aus *B. subtilis*. Nukleotide, die in blau dargestellt sind, zeigen Spaltungsaktivität im In-Line Probing-Experiment. Rot dargestellte Nukleotide weisen lysinabhängige Veränderungen der Spaltungsintensität auf. **B:** In-Line Probing-Analyse des ³²P-markierten Aptamers in Abwesenheit (Spur B) oder Anwesenheit von L-Lysin (1 nM – 3 mM). Die Spuren T1 und OH stellen eine G-spezifische Sequenzleiter beziehungsweise einen partiellen alkalischen Verdau der RNA dar¹³. **C:** L-Lysin (**19a**) sowie die drei Lysin-analogen Substanzen Ornithin (**23**), Homoarginin (**24**) und Aminoethylcystein (**25**). **D:** Auftragung der relativen Spaltungsintensität (korrigiert auf Beladungsunterschiede unter Benutzung der intensiven lysinunabhängigen Spaltungsbande „Korrektur“ und normalisiert) für die Regionen 1 und 3 gegen die Konzentration an L-Lysin.

Da die beschriebenen Änderungen graduell mit steigender Lysin-Konzentration zunehmen, ist es möglich, die relativen Spaltungsintensitäten der variablen Banden gegen die

¹³ Alle in dieser Arbeit präsentierten Gel-Bilder sind nur auf Helligkeit und Kontrast korrigiert, wie es beispielsweise in der Zeitschrift „Nucleic Acids Research“ Vorgabe für die Autoren ist.

Konzentration des Effektors aufzutragen. Hieraus lässt sich eine Dissoziationskonstante ableiten (Abbildung 16D), die mit $(0,98 \pm 0,10) \mu\text{M}$ in Übereinstimmung mit den literaturbekannten Werten ist ($1 \mu\text{M}$) [96]. Eine Negativkontrolle mit Ornithin zeigte analog zu vorherigen Messungen keine Bindung an das Aptamer [96].

Da die Änderung des Spaltungsmusters auf der spezifischen Bindung des Lysins beruht, lässt sich aus dem Auftreten eines identischen Spaltungsmusters bei Anwesenheit der Lysinanaloga schließen, dass der Bindungsmodus an das Aptamer identisch mit dem des natürlichen Liganden (*L*-Lysin) ist.

In ersten In-Line Probing-Experimenten mit Lysinestern (**19b-i**) wurden Spaltungsmuster erhalten, die identisch mit dem des *L*-Lysins waren und somit eine Bindung der Ester an den Riboswitch indizierten. Daraufhin wurde die Möglichkeit überprüft, dass die Ester bei den Bedingungen des Versuchs ($\text{pH } 8,5$; 20 mM Mg^{2+} ; 100 mM K^{+}) instabil sein und sich zu Lysin zersetzen könnten¹⁴. *L*-Lysin sowie alle Analoga wurden 24 h bei 35°C im In-Line Probing-Puffer inkubiert. Dies entspricht exakt den Bedingungen des Experimentes. Anschließend wurden die Proben mittels LC-MS analysiert und die Chromatogramme auf Veränderungen hin untersucht. Die Daten wurden jeweils für den extrahierten Ionenstrom der Molekülionen des Analogons und des Lysins ausgewertet (Abbildung 17).

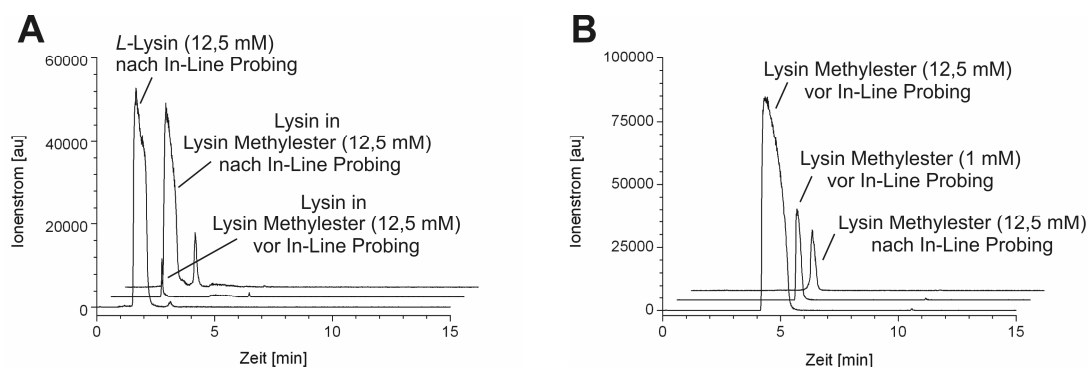


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramme (LC-MS mit Detektion des Ionenstroms) von Lysin und dem Lysin-Methylester. Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher extrahierter Ionenströme sind die Chromatogramme nur innerhalb eines Feldes vergleichbar, nicht aber die beiden Felder miteinander. **A:** Extrahierter Ionenstrom des Lysin-Molekülionen-Peaks ($m/z = 147$). **B:** Extrahierter Molekülionenstrom des Lysin-Methylester-Molekülionen-Peaks ($m/z = 161$).

¹⁴ Diese Zersetzung entspricht einer Verseifungsreaktion, wie sie üblicherweise unter Verwendung starker Alkalihydroxid-Lösungen durchgeführt wird.

Mit Hilfe einer Kalibriergeraden konnte die Konzentration von Lysin in jeder Probe bestimmt werden. Für Lysin sowie für alle Amid-Analoga (**20a-c**) und Homoarginin (**24**) war keine Veränderung der Chromatogramme feststellbar. Diese Substanzen sind also unter In-Line Probing-Bedingungen chemisch stabil. Im Gegensatz dazu zeigte sich entgegen den Erwartungen, dass die Lysinester (**19b-i**), abhängig von ihrem sterischen Anspruch, im Verlauf des Versuchs zu einem signifikanten Anteil zu Lysin gespalten werden (siehe Abbildung 17 und Tabelle 2).

Die Daten zeigen, dass vergleichsweise kleine Ester, wie der Methyl- (**19b**) und der Ethylester (**19c**), nach 24 h nur noch in Spuren vorliegen. Alle Bindungsdaten, die in In-Line Probing-Experimenten mit diesen Substanzen gemessen wurden, sind demnach falsch. Es handelt sich (zumindest teilweise) um die Bindung des Lysins, welches im Verlauf der Inkubation entsteht.

Tabelle 2: Dissoziationskonstanten, die im In-Line Probing ermittelt wurden. Grün markierte Werte sind zuverlässig, da sich die Substanz nicht im Verlauf des Experimentes zersetzt. Bei gelb unterlegten Werten liegt eine mäßig starke Zersetzung vor. Rot markierte Werte stammen von Lysinanaloga, die sich zu großen Anteilen zersetzen. In der rechten Spalte ist der Anteil des Verseifungsproduktes angegeben (in % der Gesamt-Stoffmenge). Ermittelt wurde dieser mittels LC-MS im Vergleich zu einer Probe freien Lysins in denselben Pufferbedingungen.

Lysinanalogon	ermittelter K_d -Wert ^a [μ M]	Zersetzung durch In-Line Probing ^b [%]
L-Lysin (19a)	0,98 $\pm$ 0,10	n. a.
Lysin-Methylester (19b)	1,4 $\pm$ 0,6	76 $\pm$ 1
Lysin-Ethylester (19c)	1,8 $\pm$ 0,4	70,0 $\pm$ 0,3
Lysin- <i>n</i> -Propylester (19d)	3,9 $\pm$ 1,9	68 $\pm$ 4
Lysin-Isopropylester (19e)	21 $\pm$ 5	25 $\pm$ 5
Lysin- <i>sek</i> -Butylester (19f)	13,7 $\pm$ 1,7	25 $\pm$ 1
Lysin- <i>tert</i> -Butylester (19g)	24 $\pm$ 4	35 $\pm$ 3
Lysin-Isobutylester (19h)	5,0 $\pm$ 0,8	40 $\pm$ 4
Lysin-Benzylester (19i)	1,6 $\pm$ 0,3	70 $\pm$ 7
Lysinamid (20a)	45 $\pm$ 6	0
Lysin-Methylamid (20b)	>100	0
Lysin-Ethylamid (20c)	>1000	0
Homoarginin (24)	73 $\pm$ 13	0

^a Werte im Triplikat; Fehler entspricht der Standardabweichung. ^b Werte im Duplikat

Versucht man dennoch, aus den gewonnenen Daten Dissoziationskonstanten zu berechnen, so stellt man fest, dass der ermittelte K_d -Wert umso besser ist, je mehr Lysin in den LC-MS-Messungen nachgewiesen wurde (Tabelle 2). Die grobe Korrelation der auf diese Weise erhaltenen K_d -Werte mit dem Ausmaß der Zersetzung entspricht dem zu erwartenden Verhalten.

Sterisch stärker gehinderte Ester wie zum Beispiel der Isopropyl- (**19e**) oder der *tert*-Butylester (**19g**), zerfallen zwar weniger stark, aber auch in diesen Fällen lässt sich der eindeutige Beweis, dass alle experimentellen Beobachtungen vom Ester und nicht von Lysin induziert wurden, nicht führen.

Die mittels LC-MS erhobenen Daten wurden in ihrer qualitativen Aussage durch dünnschichtchromatographische Messungen verifiziert. Auf Basis dieser Daten lässt sich demnach keine Aussage über die Bindung von Lysinestern an den Lysin-Riboswitch machen. Eine Inkubation von **19b** unter den Bedingungen eines Blei-Probing [151,152], welches eine Alternative zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten darstellen könnte¹⁵, zeigte den gleichen, starken Anteil an Zersetzungsprodukt.

Andere chemische Probing-Verfahren wie zum Beispiel Hydroxyl-Radikal-Probing [153,154] oder SHAPE Probing („*Selective Hydroxy Acylation and Primer Extension*“) [155,156], die bereits bei Riboswitches eingesetzt wurden, könnten eventuell eine qualitative Aussage über die Bindung geben. Bei diesen Methoden ist jedoch eine Quantifizierung ebenfalls nicht möglich, da die eingesetzten Reagenzien mit den Aminfunktionen des Lysins reagieren und somit die Konzentration des Analyten beeinflussen.

Aussagen über die Erkennung der Ester-Analoga durch den Riboswitch können außerdem indirekt mit Hilfe von *in vitro* Transkriptions-Stop- und *in vivo* Reporter-Gen-Assays getroffen werden (siehe Kapitel 3.3.3 und 3.3.4). Auch in diesen Fällen muss allerdings die Stabilität der Ester unter den Bedingungen des Experimentes überprüft werden.

Im Gegensatz zu den Estern (**19b-i**) sind die Lysinamide (**20a-c**) unter den Bedingungen des In-Line Probing stabil. Die für diese Analoga ermittelten K_d -Werte sind somit zuverlässig. Die Versuche wurden neben dem Lysinamid auch mit Lysin-Methyl- und -Ethylamid durchgeführt. Alle drei Substanzen unterscheiden sich von *L*-Lysin dadurch, dass die

¹⁵ Bisher wurde Blei-Probing meines Wissens noch nie im Zusammenhang mit der Bestimmung von Dissoziationskonstanten verwendet. Da der Mechanismus der Struktursondierung dem des In-Line Probing aber ähnelt, ist es durchaus möglich, dass eine solche Bestimmung durchgeführt werden kann.

Carboxylfunktion keine negative Ladung mehr tragen kann. Sie ist auch nicht in dem Maße negativ polarisiert wie es bei einem Ester der Fall ist. Dadurch sind die Amide keine Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptoren mehr. Diese Eigenschaft beschrieben Blount *et al.* als essentiell für die Bindung an das Aptamer. Biochemische Daten, die diese Hypothese untermauern, fehlen aber bisher (vergleiche auch Abbildung 8B) [98].

Im In-Line Probing-Experiment mit dem Lysin-Riboswitch-Aptamer zeigte das Lysinamid dasselbe konzentrationsabhängige Verhalten wie *L*-Lysin (Abbildung 18).

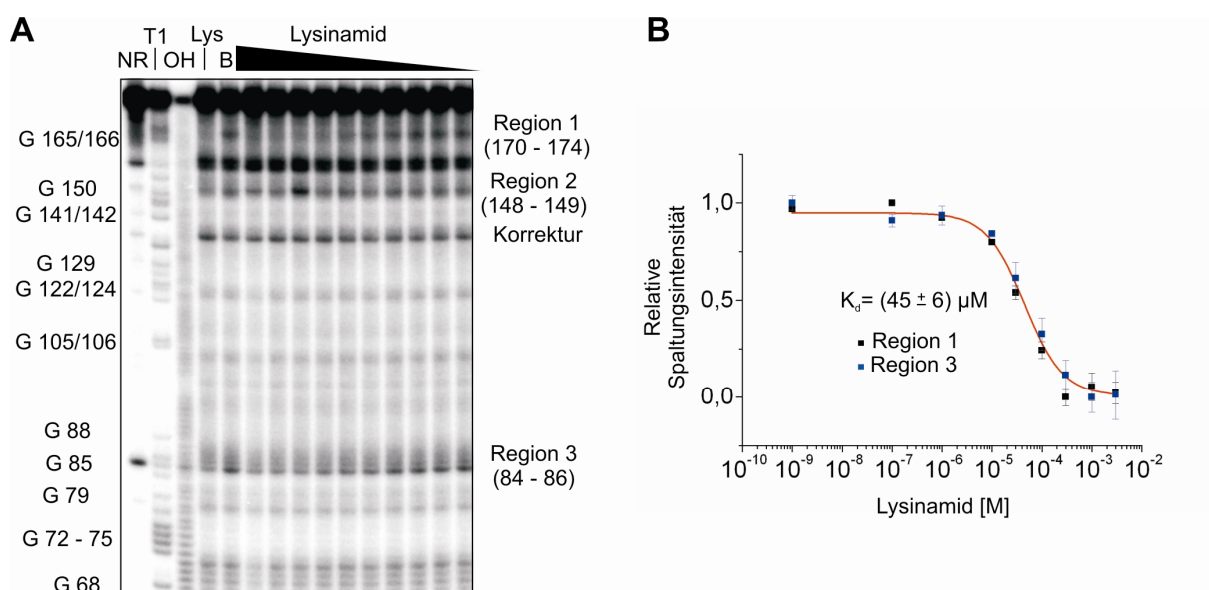


Abbildung 18: **A:** In-Line Probing-Analyse von Lysinamid. **B:** Graphische Darstellung der Ermittlung der Dissoziationskonstante.

Bei Zugabe von hohen Amidkonzentrationen wurde die Modulation der Spaltungsintensität für dieselben Regionen beobachtet wie beim natürlichen Liganden. Es liegt somit eine spezifische Bindung des Lysinamids an das Aptamer vor. Die Bindungskonstante wurde mit $(45 \pm 6) \mu\text{M}$ bestimmt. Damit liegt sie deutlich höher als für *L*-Lysin. Offensichtlich spielt das freie Carboxylat eine wichtige Rolle für die Bindung, es ist aber nicht in dem Maße essentiell, wie von Blount *et al.* angenommen [98]. Bei der Erweiterung des Amids in ein Methylamid (**20b**) geht die Affinität so stark zurück, dass eine Berechnung der Dissoziationskonstante nicht mehr möglich ist. Einzig der leichte, spezifische Rückgang an Bandenintensität bei hohen Konzentrationen lässt auf eine schwache Bindung schließen. Für das Ethylamid (**20c**) dagegen konnte keine Bindung mehr detektiert werden. Alle Spaltungen des In-Line Probings sind unabhängig von der Konzentration dieses Analogons.

Während also eine Bindung der Lysinester-Analoga auf Basis der In-Line Probing-Versuche weder bewiesen noch ausgeschlossen werden kann, lässt sich für die Amide feststellen, dass das unsubstituierte Lysinamid weiterhin Affinität zum Riboswitch aufweist, welche bei Einführung von weiteren Substituenten (**20b,c**) stark zurückgeht. Eine Derivatisierung der Säurefunktion des Lysins ist somit möglich, wenn auch auf Kosten der Bindungsstärke.

Die Erkenntnis, dass In-Line Probing-Studien insbesondere für Bindungsstudien von Estern aufgrund der Instabilität dieser Substanzen offenbar nicht geeignet sind, wirft auch Fragen nach der Zuverlässigkeit der Ergebnisse in anderen Publikationen auf. Beispielsweise wurde für den Glycin-Methylester auf Basis eines In-Line Probing-Experimentes eine starke Bindung an den Glycin-Riboswitch postuliert [89]. Diese wurde allerdings weder durch weitere Experimente überprüft, noch enthält die Veröffentlichung Daten über die Stabilität des Esters unter In-Line Probing-Bedingungen. Aufgrund dessen muss die nachgewiesene Bindung in Frage gestellt werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen deutlich, dass eine Analyse der Stabilität des Effektormoleküls notwendig ist, um Artefakte aufgrund von Degradationsvorgängen ausschließen und zuverlässige Aussagen über das Bindungsverhalten treffen zu können.

3.3.3 Transkriptions-Stop-Assay mit dem Lysin-Riboswitch

Mit dem *in vitro* Transkriptions-Stop-Assay¹⁶ wird die Funktion des Riboswitches untersucht. Die mit diesem Assay gewonnenen Daten sind zwar kein direkter Beweis für eine spezifische Bindung, lassen aber durchaus Rückschlüsse auf eine generelle Affinität des Effektors zu der entsprechenden RNA zu.

Das Templat wurde mit einem starken Promoter versehen. Der λ Pr-Promoter wird für diesen Zweck empfohlen, da er eine robuste und starke Induktion der *E. coli* RNA-Polymerase bewirkt [90,157]. Das Templat aus der Vorläuferregion des *lysC* Gens von *B. subtilis* umfasst die vollständige Sequenz des Lysin-Riboswitches (Aptamer und Expressionsplattform) inklusive 53 Nukleotiden im Anschluss an den Terminator, die zur Unterscheidung des Volllängenproduktes vom terminierten Produkt benötigt werden. Der Startpunkt entspricht dem natürlichen Beginn der Transkription [158]. Wie in früheren Studien wurde die

¹⁶ Der Transkriptions-Stop-Assay kann in zwei Versionen durchgeführt werden: Entweder wird das Templat in einer normalen Transkription mit *E. coli* RNA Polymerase abgelesen. Diese reagiert im Gegensatz zur T7 RNA Polymerase auf dieselben Abbruchsignale wie das Enzym aus *B. subtilis*. Diese Version wird in der Arbeit als *multi round* Assay bezeichnet. Im zweiten Fall wird die Transkription des Templats auf einen Durchgang begrenzt, so dass man von einem *single round* Assay spricht (siehe auch Kapitel 1.5.2) [90]

Punktmutation C6G eingeführt, damit die ersten 16 Nukleotide kein Cytosin enthalten und das Templat in einem *single round* Assay genutzt werden kann (Abbildung 19) [96,98].

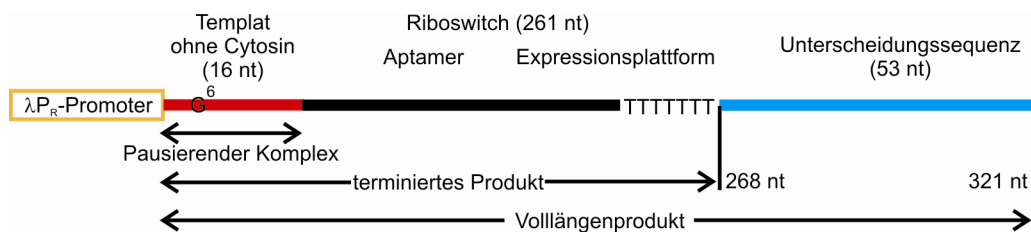


Abbildung 19: Templat des *LysC* Lysin-Riboswitches im Transkriptions-Stop-Assay. Die Pfeile verdeutlichen die Produkte, die im Verlauf eines *single round* Assays entstehen.

Die Herstellung des Templates erwies sich als schwieriger als erwartet. Eine optimale Qualität konnte schließlich erreicht werden, indem die Zielsequenz (einschließlich der oben beschriebenen Mutation) mit spezifischen Primern von genomischer DNA amplifiziert und mit dem Promoter versehen wurde. Die Verwendung von aufgereinigtem PCR-Produkt im Assay führte zu einer fehlerhaften Transkription, so dass eine Analyse der Daten nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde eine alternative Herstellung des Transkriptionstemplates entwickelt. Die in der PCR amplifizierten Konstrukte wurden in geeignete Vektoren kloniert und sequenziert. Plasmide mit der korrekten Sequenz wurden einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* unterzogen. Dieses lineare Produkt konnte im Assay eingesetzt werden.

Der Versuch wurde sowohl als *multi round* als auch als *single round* Assay durchgeführt, wobei in letzterem Fall die Reinitiation der Transkription durch Zugabe von Rifampicin inhibiert wurde.

Die Stabilität der Lysinanaloga (**19b-i**, **20a-c**, **23**, **24**) wurde mittels LC-MS für die Reaktionsbedingungen untersucht, die im Rahmen der Versuche verwendet wurden (37°C für 22 Min. bei pH 7,5; 10 mM Mg²⁺; 50 mM K⁺)¹⁷. Bei den LC-MS-Messungen konnte für einige Ester Zersetzung in geringem Umfang nachgewiesen werden (maximale Endkonzentration an Lysin: 200 µM bei Einsatz von 10 mM Ester). Ein Vergleich mit den von Blouin *et al.* publizierten Daten zur Lysin-induzierten Termination der Transkription zeigt, dass der Riboswitch in Gegenwart solch niedriger Konzentrationen nur minimale Aktivität zeigt (ca. 5 % des Maximizeffekts) [102]. In Experimenten, die von K. Höfer durchgeführt wurden, zeigte sich bei der gleichen Konzentration überhaupt kein Einfluss auf die

¹⁷ Zum Vergleich die Daten für die analogen Tests im In-Line Probing-Puffer: 37°C für 24 h bei pH 8,5; 20 mM Mg²⁺; 100 mM K⁺.

Termination. Daher sind die Werte, die mit dem Lysin-Methylester **19b** ermittelt wurden, zuverlässig.

Zuerst wurden die Versuche in ihrer Ausführung als *multi round* Assay durchgeführt, da dies experimentell einfacher ist (Abbildung 20). Alle getesteten Analoga wurden in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt. Dadurch, dass die Dissoziationskonstante des vollständigen Riboswitches etwa 1000fach höher liegt als für das Aptamer, sind weitaus höhere Ligandenkonzentrationen als im In-Line Probing nötig, um einen Effekt zu erzielen [96].

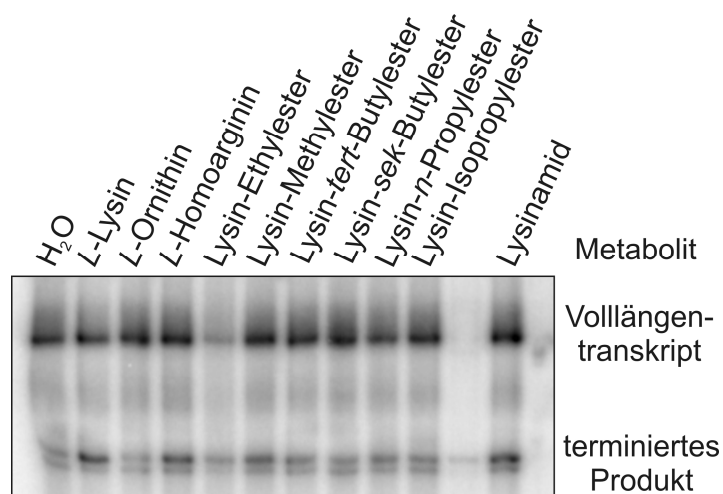


Abbildung 20: *Multi round* Transkriptions-Stop-Assay. *L*-Lysin sowie verschiedene Analoga (10 mM) werden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, *in vitro* einen Abbruch der Transkription durch Bindung an das Aptamer des Lysin-Riboswitches zu induzieren.

Während in Gegenwart von *L*-Lysin 31 % der Transkripte nach dem Terminator abgebrochen waren, wurden in Abwesenheit eines Liganden nur 10 % terminierte Produkte detektiert (Abbildung 20 und Tabelle 3). Für vier Analoga konnte eine deutlich erhöhte Termination festgestellt werden. Dabei handelt es sich um **20a** und **24** sowie die beiden kleinsten Ester, den Methyl- und den Ethylester.

Für **19d**, **19e**, **19f** und **23** ist der Anteil an terminiertem Produkt so gering, dass davon ausgegangen werden kann, dass kein oder nur ein sehr geringer Effekt dieser Substanzen auf den Riboswitch vorliegt (Tabelle 3). Dabei sollte erwähnt werden, dass das Ausbleiben einer Terminationsverstärkung nicht zwingend bedeutet, dass das Analogon nicht in der Lage ist, an das Aptamer zu binden. Es ist durchaus vorstellbar, dass Substanzen existieren, die zwar eine Affinität zum Aptamer aufweisen, jedoch nicht in der Lage sind, die strukturelle Reorganisation zur Bildung der Terminationshaarnadel zu induzieren. Nur der umgekehrte

Fall, die Verstärkung der Transkriptions-Termination, ist ein sicherer Hinweis auf die Bindung des Effektormoleküls.

Tabelle 3: Quantifizierung der Termination. Für alle getesteten Lysinanaloga wurde der Anteil an terminiertem Produkt ermittelt. In beiden linken Spalten sind die für den *multi round* Assay berechneten Werte gezeigt, in den beiden rechten Spalten die für den *single round* Assay. Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden die Werte jeweils normalisiert.

Effektor	<i>multi round</i>		<i>single round</i>	
	% terminiert	normalisiert ^a	% terminiert ^b	normalisiert ^c
Wasser	10	0 %	7 ± 4	0 %
L-Lysin (19a)	31	100 %	42 ± 1	100 %
L-Ornithin (23)	6	0 %	n. d.	n. d.
L-Homoarginin (24)	27	84 %	19	34 %
Lysin-Methylester (19b)	26	80 %	17 ± 5	29 %
Lysin-Ethylester (19c)	32	104 %	10	9 %
Lysin- <i>n</i> -Propylester (19d)	14	32 %	4	0 %
Lysin-Isopropylester (19e)	14	32 %	9	6 %
Lysin- <i>sek</i> -Butylester (19f)	12	24 %	16	26 %
Lysin- <i>tert</i> -Butylester (19g)	19	52 %	11	11 %
Lysinamid (20a)	30	96 %	34 ± 8	77 %
Lysin-Methylamid (20b)	n.d.	n.d.	10 ± 5	9 %

^a Die Fehler der normalisierten Werte betragen mindestens 12 Prozentpunkte, was der Differenz von 1 %-Punkt mehr oder weniger Termination entspricht. Wahrscheinlich ist er jedoch bedeutend größer.

^b Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung von Triplikaten. Werte ohne Fehlerangabe wurden nur einfach gemessen.

^c Die Fehler der angegebenen Werte betragen jeweils ca. 10 %-Punkte (berechnet über die Standardabweichung des Triplikates).

Erstaunlicherweise zeigte **19g** mit 19 % (normalisiert ~50 %) Termination eine gewisse Aktivität (Tabelle 3). Dies ist mit den vorliegenden Daten nicht zu erklären, da Ester mit geringerem sterischen Anspruch weniger Effekt auf den Schalter hatten. Insgesamt war aber festzustellen, dass die Daten noch verbesserungsfähig waren, was hauptsächlich von K. Höfer in ihrer Masterarbeit durch die Umstellung auf einen *single round* Transkriptions-Stop-Assay und die Optimierung der Templat-Qualität erreicht wurde. Der *single round* Assay hat außerdem den Vorteil, dass Fehler ausgeschlossen werden, die auf der unterschiedlichen Länge von terminiertem und Vollängenprodukt sowie der Tatsache, dass

die Initiation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Transkription ist, beruhen (vergleiche auch Kapitel 1.5.2) [90].

In diesen Versuchen konnten die Ergebnisse des vorangegangenen *multi round* Assays teilweise bestätigt werden. Der Unterschied im Verhältnis von terminiertem zu Vollängenprodukt wurde zwischen Negativ- (Wasser; 0 % normalisierte Termination) und Positivkontrolle (*L*-Lysin; 100 %) größer, so dass die Genauigkeit der Zwischenwerte zunahm (Tabelle 3). Die Beobachtung, dass Homoarginin (34 %), das Lysinamid (77 %) sowie der Lysin-Methylester (29 %) eine Zunahme der Termination induzieren, ließ sich bestätigen. Die Verhältnisse zueinander wurden aber etwas verschoben, so dass **20a** einen größeren Einfluss auf die Termination hat als **19b** und **24** (Tabelle 3). Eine weitere Substanz, für die eine Aktivität gemessen werden konnte (allerdings nur im *single round* Assay), ist der Lysin-*sek*-Butylester (26 %). Dieser Wert ist jedoch nicht konsistent mit den Daten der anderen Analoga, da diese keine signifikante Induktion der Termination aufweisen. Eine Messung im Triplikat sollte Aufschluss darüber geben, ob dieser Wert tatsächlich aus einer Bindung des Esters resultiert.

Der Transkriptions-Stop-Assay unterstützt die im In-Line-Probing gewonnenen Daten zur Bindung des Lysinamids. Beide Methoden zeigen, dass dieses Analogon an das Aptamer des Lysin-Riboswitches bindet, wenn auch mit geringerer Affinität als der natürliche Ligand. Darüber hinaus zeigen die erhöhten Terminationswerte für den Lysin-Methylester, dass auch dieser eine Bindung an das Aptamer aufweist. Diese Aussage war aufgrund der Zersetzung der Ester auf Basis der In-Line Probing-Daten nicht möglich. Wird die Säurefunktion des Lysins aber mit größeren Substituenten derivatisiert, geht die Affinität so stark zurück, dass kein signifikanter Einfluss auf die Termination messbar ist.

3.3.4 Reporter-gen-Assay mit dem Lysin-Riboswitch¹⁸

Nachdem die *in vitro* Untersuchungen der Analoga abgeschlossen waren, wurde damit fortgefahren, einige Analoga auf ihr Verhalten *in vivo* hin zu untersuchen. Das Templat des Lysin-Riboswitches wurde in ein geeignetes Plasmid (pDG1661, *Bacillus genetic stock center*, Columbus Ohio, USA) kloniert und in *B. subtilis* (1A40, *Bacillus genetic stock center*, Columbus Ohio, USA) transformiert. Das Plasmid enthält ein *lacZ*-Gen, welches unter die Kontrolle des Riboswitches gestellt wurde. Die Aktivität des Schalters konnte also anhand

¹⁸ Die Ausführung des Reporter-gen-Assays wurde gemeinsam mit K. Höfer geplant. Alle Versuche wurden von ihr im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

der Expression von β -Galactosidase bestimmt werden, die über den Abbau von *o*-Nitrophenyl-Galactose ermittelt wird [95].

Die Messungen der Aktivität des Schalters in Abhängigkeit von *L*-Lysin und den Analoga Lysin-Methylester (**19b**), Lysinamid (**20a**) und Lysin-Methylamid (**20b**) können somit Aufschluss darüber geben, ob die *in vitro* ermittelten Daten eine Relevanz im lebenden Organismus haben.

Auch in diesem Fall wurde für **19b** die Stabilität unter den Versuchsbedingungen ermittelt. Es wurde eine partielle Zersetzung des Esters bei LC-MS-Messungen nachgewiesen, die jedoch vom Lysin-Verbrauch der Bakterien überkompensiert wird¹⁹. Dadurch ist es möglich, ausschließlich den Effekt zu messen, den **19b** auf den Riboswitch *in vivo* ausübt.

Die Experimente ergaben eine hohe β -Galactosidase-Aktivität in Lysin-armem Minimalmedium, was bedeutet, dass das Templat vollständig abgelesen wird. In einem Lysin-reichen Medium wurde wie erwartet ein gegensätzliches Verhalten gemessen. Die Aktivität der β -Galactosidase war niedrig, was darauf zurückzuführen ist, dass Lysin an den Riboswitch bindet. Dadurch wird eine strukturelle Änderung induziert, die zur Bildung der Terminationshaarnadel führt und die Biosynthese des Vollängentranskriptes verhindert.

Der Methylester zeigt das gleiche Verhalten wie Lysin, woraus sich schließen lässt, dass er an den Riboswitch bindet und in der Lage ist, dieselben Strukturänderungen hervorzurufen wie der natürliche Ligand. Diese Beobachtung wurde durch mehrere Kontrollexperimente von K. Höfer untermauert. Unter anderem wurde Lysin kontinuierlich in der Menge zugegeben, die bei den LC-MS-Messungen für die Zersetzung bestimmt wurden, wodurch nicht derselbe Effekt hervorgerufen werden konnte wie bei den Versuchen mit dem Ester. Alle Kontrollexperimente stützten die Theorie der Bindung des Methylesters an den Riboswitch.

Das Experiment wurde außerdem in Gegenwart der Amide **20a** und **20b** durchgeführt. Für beide wird eine hohe β -Galactosidase-Aktivität gemessen. Das bedeutet, dass beide Analoga *in vivo* keinen Einfluss auf den Riboswitch haben. Während dies für **20b** den Erwartungen entsprach, ist es im Falle von **20a** überraschend. Lysinamid (**20a**) zeigte in allen vorhergehenden Assays einen Einfluss auf den Riboswitch. Im Transkriptions-Stop-Assay war der Effekt sogar stärker als beim Lysin-Methylester (**19b**). Dass diese Daten im *in vivo* Assay dennoch nicht bestätigt wurden, könnte daran liegen, dass **20a** nicht in die Zelle

¹⁹ Alle LC-MS-Messungen wurden von B. Strauß durchgeführt und gemeinsam mit K. Höfer analysiert.

aufgenommen wird. Eine Metabolisierung kann weitgehend ausgeschlossen werden, da die *B. subtilis* Kulturen in Gegenwart des Amids kein Wachstum zeigen. Sie können das Analogon also offenbar nicht als Ersatz für Lysin nutzen.

Zusammenfassend konnte mit drei verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, dass der Lysin-Riboswitch eine Affinität zu Lysinamid (*in vitro*) und dem Lysin-Methylester (*in vitro* und *in vivo*) aufweist und die negative Ladung der Säurefunktion entgegen der bisherigen Literaturmeinung nicht entscheidend für die Bindung an den Riboswitch ist. Für das Lysin-Methylamid kann eine Bindung an den Riboswitch ausgeschlossen werden. Alle anderen säuremodifizierten Analoga lassen keine letztgültigen Schlüsse zu. Die Daten des Transkriptions-Stop-Assays deuten aber auf eine Bindung der kleinen Ester hin.

Diese Ergebnisse flossen in die Entwicklung von Photoaffinitätssonden ein, die spezifisch mit dem Lysin-Riboswitch interagieren sollen. Da die negative Ladung der Säurefunktion des Lysins nicht in dem Maße entscheidend für die Bindung an den Riboswitch ist wie bisher angenommen, wurde der Entschluss gefasst, auch die Veresterung des Lysins in der Synthese der Photoaffinitätssonden zu berücksichtigen (Kapitel 3.4.3).

3.4 Synthese von Lysin-Photoaffinitätssonden

Ausgehend von Daten über die Affinität der Lysinester und –amide, der Kristallstruktur des Riboswitches und dem von Blount *et al.* entwickelten Bindungsmodell wurden drei Photoaffinitätssonden entworfen, für die die Bindung an das Aptamer erwartet wurde [98].

Alle drei Sonden (**26-28**) enthalten Phenylazid als photoreaktive Gruppe, wie in Kapitel 3.1.3 besprochen wurde (Abbildung 21) [47]. Für zwei der Sonden (**26, 27**) wird ein terminales Alkin als latente Anreicherungsfunktion geplant, die dritte Sonde (**28**) wird direkt biotinyliert.

Die entscheidenden Informationen, die durch das Ausloten der Bindungstasche mit Hilfe der säuremodifizierten Analoga gewonnen wurden, flossen in die Möglichkeiten zur Verknüpfung des Lysins mit der Sonde ein. So konnte gezeigt werden, dass zwei Wege der Verknüpfung erfolgversprechend sind. Im einen Fall, der auf Basis der Literaturdaten [96,98] entwickelt wurde, erfolgte die Derivatisierung über das Amin der Seitenkette. Zu diesem Zweck wurde das Amin in ein bisalkyliertes Guanidin umgewandelt. Zwei der drei Sonden (**26, 28**) enthalten diese Verknüpfungsvariante (Abbildung 21).

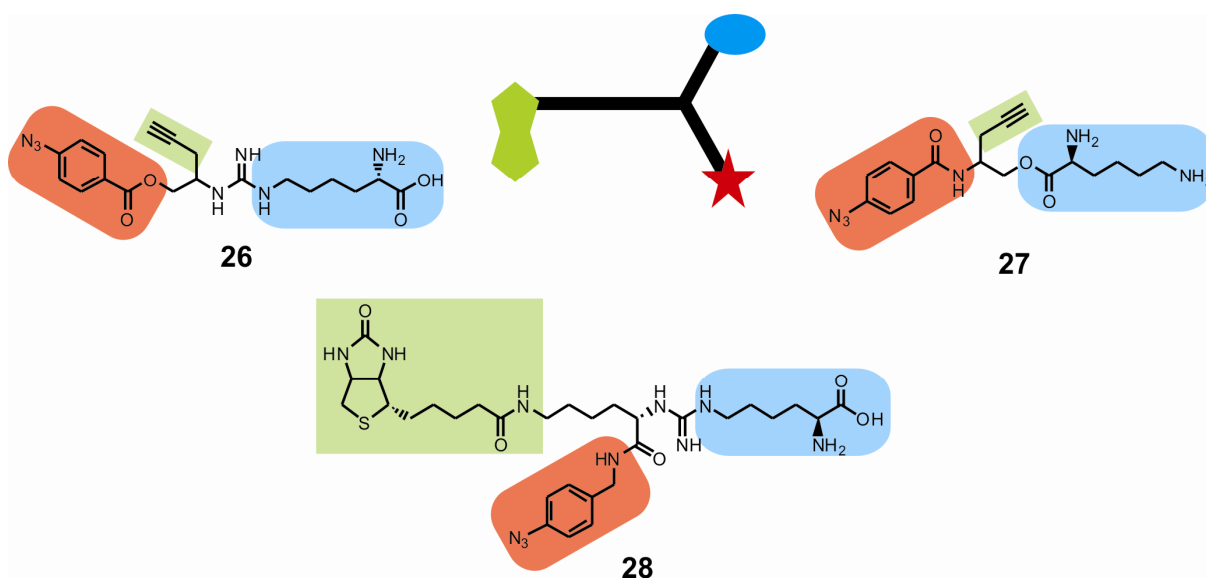
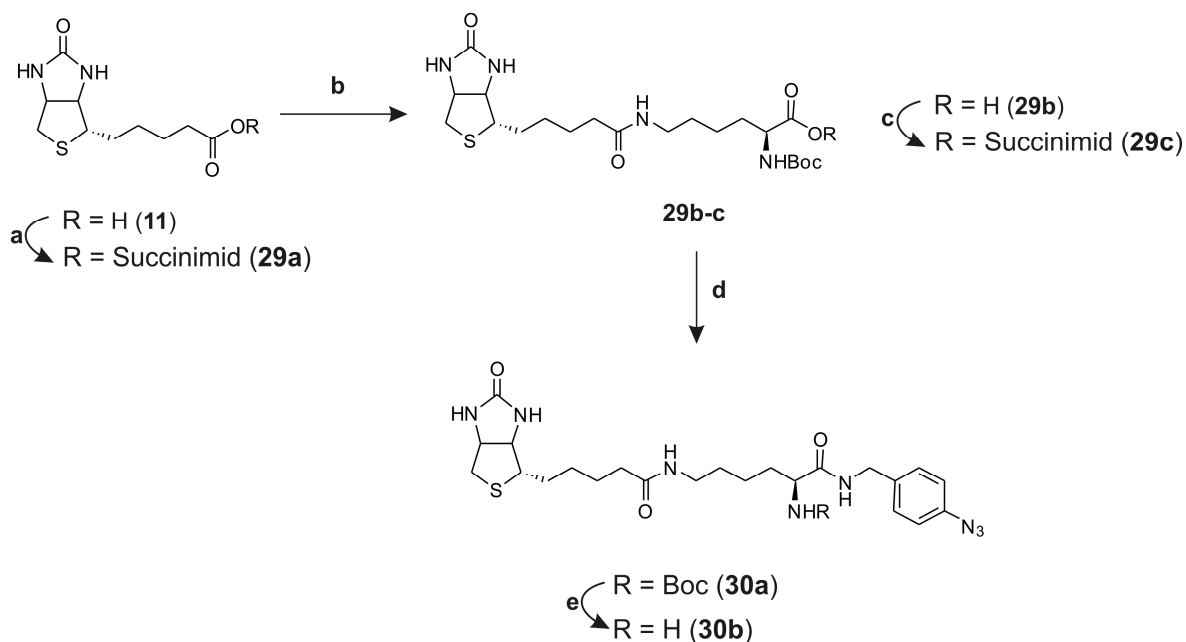


Abbildung 21: Die drei in dieser Arbeit verwendeten Photoaffinitätssonden **26**, **27** und **28** mit Markierung der jeweiligen Funktionen. Entsprechend der in dieser Arbeit gewählten Konvention ist der Metabolit blau markiert. Die photoreaktive Gruppe ist rot unterlegt und die (latente) Anreicherungsfunktion grün dargestellt.

Das Design der dritten Sonde (**27**) fußt auf den Erkenntnissen, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden. In diesem Fall wurde der Metabolit in Form eines Esters über die Säurefunktion des Lysins mit den restlichen Komponenten der Sonde verknüpft (siehe Abbildung 21). Durch diese zwei Derivatisierungspositionen wird die photoreaktive Gruppe auf die jeweils andere Seite des Aptamers dirigiert (vergleiche auch Abbildung 14), wodurch unterschiedliche Teile der Riboswitchsequenz potentiell für eine Reaktion zur Verfügung stehen. Die Wahrscheinlichkeit eines Crosslinks wird somit erhöht.

3.4.1 Synthese einer biotinylierten Photoaffinitätssonde auf Homoargininbasis

Für die Synthese der biotinylierten Sonde wurde nach literaturbekannten Vorschriften der NHS-Ester von Biotin (**29a**) hergestellt und mit α -Boc-Lysin zum Boc-Biotin (**29b**) verbunden [126,159]. Beide Synthesen wurden bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt [125]. **29b** wurde dann erneut nach einer Literaturvorschrift als NHS-Ester **29c** aktiviert (siehe Schema 4) [160].



Schema 4: Synthese des biotinylierten bifunktionalen Bausteins (**30b**). **a:** DCC, NHS, DMF Ausbeute: 95 %. **b:** DIPEA, α -Boc-Lysin, DMF, Ausbeute: 92 %. **c:** DCC, NHS, DIPCDI, DMF, iPrOH, Ausbeute: 85 %. **d:** *p*-Azidobenzylamin, NMM, DMF, Ausbeute: 71 %. **e:** TFA, DCM, Ausbeute: 83 %.

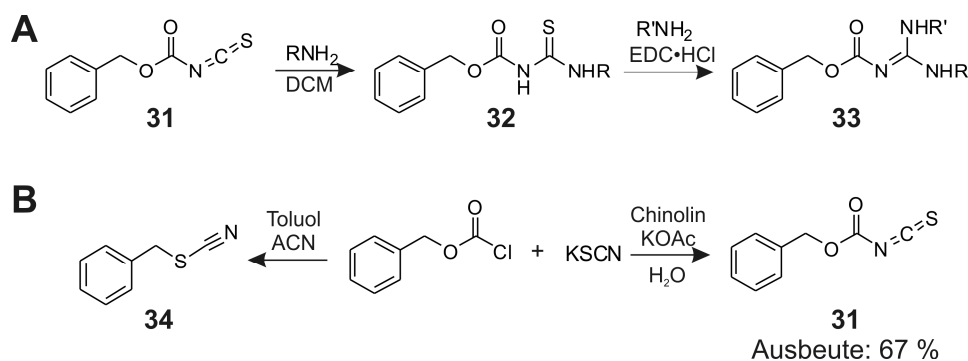
Die Ausbeute über diese ersten drei Stufen betrug 74 %. Der NHS-Ester **29c** wurde unter Einwirkung von Base mit *p*-Azidobenzylamin²⁰ verknüpft (**30a**) und anschließend durch TFA in DCM zu **30b** entschützt. Die Ausbeute betrug 59 % über zwei Schritte.

Prinzipiell ist es möglich, diesen bifunktionalen Baustein im Folgenden mit einer Vielzahl an verschiedenen Metaboliten zu einem bisalkylierten Guanidin umzusetzen, die ein nicht-essentielles primäres Amin enthalten, auch wenn in dieser Arbeit nur an der Synthese von Lysinsonden gearbeitet wurde²¹.

Zentrale Zwischenstufe bei der Synthese bisalkylierter Guanidine (**33**) ist, wie in Schema 5A dargestellt, ein Thioharnstoffderivat (**32**), welches bei der Umsetzung eines primärenamins mit Carboxybenzyl-(Cbz)-Isothiocyanat (**31**) entsteht [162].

²⁰ *p*-Azidobenzylamin wurde von R. Wombacher synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt [47,161]

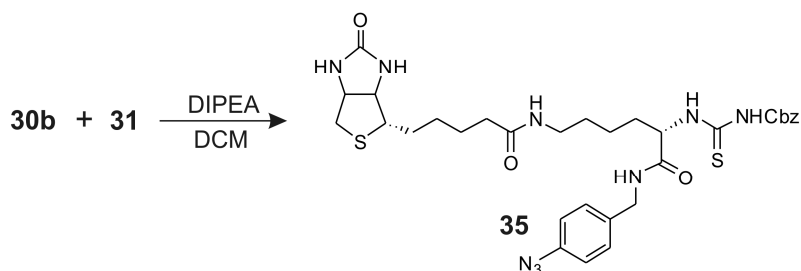
²¹ Auch die Umsetzung mit Carbonsäuren unter Bildung von Amiden ist ausgehend von dieser Substanz zur Synthese einer vollständigen Photoaffinitäts-sonde möglich.



Schema 5: **A:** Generelles Schema zur Herstellung von bisalkylierten Guanidinen (**33**). **B:** Synthese von Cbz-Isothiocyanat (**31**) und des unerwünschten Nebenproduktes Benzylthiocyanat (**34**).

Dieses Isothiocyanat (**31**) wurde nach literaturbekannten Vorschriften hergestellt, wobei sich zeigte, dass mit den von Linton *et al.* beschriebenen Bedingungen nur Benzylthiocyanat (**34**) isoliert werden konnte (Schema 5B), was vom erwünschten Produkt nur auf Basis der Molekülmasse unterschieden werden konnte [162]. Erst die Bedingungen, die von Lanman *et al.* für diese Synthese gewählt worden waren, lieferten das gewünschte Produkt (**31** in Schema 5B) [163].

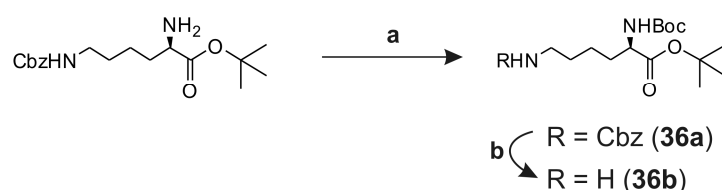
Um den Thioharnstoff (**35**) zu erhalten, wurde (**31**) anschließend im basischen Milieu mit dem Amin (**30b**) unter Eiskühlung umgesetzt (Schema 6). Die Ausbeute betrug 25 %.



Schema 6: Synthese des Thioharnstoffs (**35**), durch Addition des biotinylierten bifunktionalen Bausteins **30b** an **31** Ausbeute: 25 %.

Der Schlüsselschritt der Herstellung bisalkylierter Guanidine (**33**) ist die Umsetzung des Cbz-geschützten Thioharnstoffs (**32**) mit einem Überschuss an primärem Amin und dem Aktivator EDC·HCl (siehe Schema 5A) [162,164]. Hierbei wird formal das Schwefel-Atom des Thioharnstoffs durch das Amin ersetzt. Dadurch entsteht ein Guanidin, welches eine Cbz-Schutzgruppe, sowie zwei (aus den eingesetzten Aminen stammenden) Alkylsubstituenten enthält. Im vorliegenden Fall wurde als primäres Amin der *tert*-Butylester

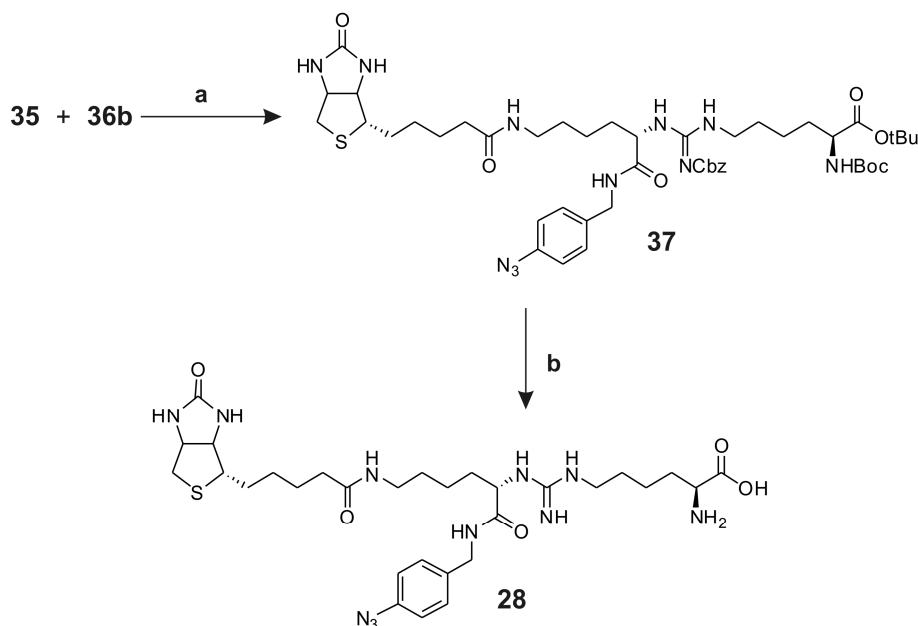
von α -Boc-Lysin (**36b**) eingesetzt. Diese literaturbekannte Substanz wurde schon häufig für Derivatisierungen der Lysin-Seitenkette verwendet [165-167] und hat den Vorteil, dass sich beide Schutzgruppen unter Einwirkung starker Säuren abspalten lassen, was bei den meisten üblichen Schutzgruppen für Säurefunktionen nicht möglich ist. Die Synthese dieses Amins erfolgte ausgehend vom kommerziell erhältlichen ϵ -Cbz-Lysin-*tert*-Butylester über eine zweistufige Synthese, wobei zuerst nach einer Vorschrift von Bergeron *et al.* das α -Amin der Aminosäure mit Boc-Anhydrid geschützt wird (**36a**) [165] und anschließend die Cbz-Schutzgruppe reduktiv abgespalten wird (**36b**), wie im folgenden Schema dargestellt.



Schema 7: Synthese von α -Boc-Lysin-*tert*-Butylester (**36b**). **a:** Boc_2O , NaHCO_3 , H_2O , CHCl_3 , Δ , Ausbeute: 99 %. **b:** HCOONH_4 , Pd/C , iPrOH , μW , Ausbeute: 85 %.

Die Entschützung wurde analog zu der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Synthese des Lysin-*tert*-Butylesters (**19g**) in der Mikrowelle unter Abwandlung eines Protokolls von Daga *et al.* unternommen, wobei die Reduktion der Schutzgruppe durch Ammoniumformiat in Isopropanol über einem heterogenen Palladiumkatalysator erreicht wird (Schema 7) [146]. Dies hat den Vorteil, dass sehr reines Produkt (**36b**) entsteht, welches nach Entfernung des Katalysators direkt verwendet werden kann. Die Ausbeute über diese beiden Stufen lag bei 85 %.

Die Reaktion von **36b** mit dem Thioharnstoff **35** führte zur vollständig geschützten biotinylierten Lysinsonde (**37**) mit einer Ausbeute von 92 % bei einem 2,5fachen Überschuss des Amins (Schema 8).



Schema 8: Synthese der biotinylierten Photoaffinitätssonde (**28**). **a:** EDC•HCl, DIPEA, DCM, Ausbeute: 92 %. **b:** TFA, Thioanisol, DCM, Ausbeute: 50 %

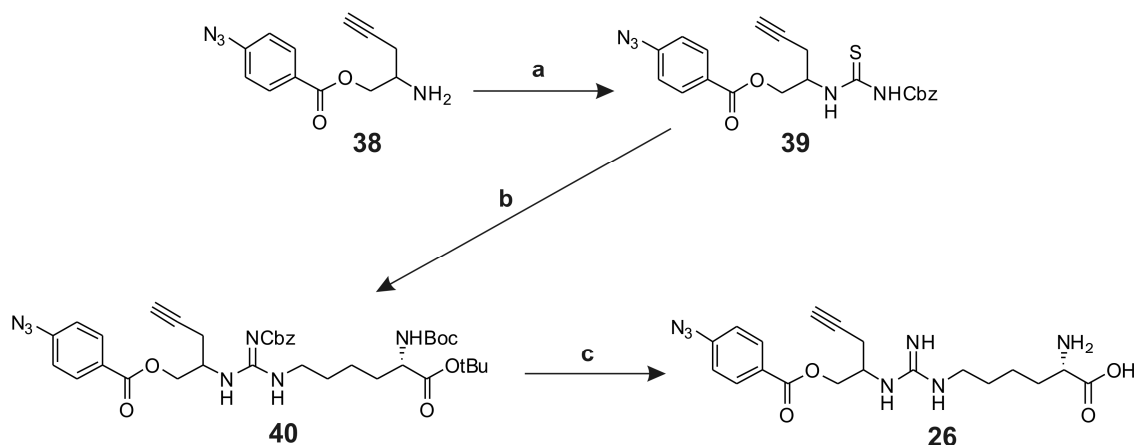
Als Reagenz für die finale Entschützung von **37** zu **28** wurde 50 % TFA in DCM mit Zusatz von Thioanisol gewählt, um reaktive Nebenprodukte abzufangen (Schema 8). Mit dieser Methode war es möglich, alle drei Schutzgruppen (*tert*-Butylester, *Boc*, *Cbz*) in einem Schritt zu entfernen. Dadurch konnten aufwändige Reinigungsschritte zwischen einzelnen Entschützungen vermieden werden. Die Aufreinigung von **28** erfolgte über Umkehrphasen-HPLC, wobei so wenig Produkt isoliert werden konnte, dass eine Charakterisierung nur mittels hochauflösender Massenspektrometrie möglich war.

3.4.2 Synthese einer konvertierbaren Photoaffinitätssonde auf Homoargininbasis

Die zweite Sonde (**26**), die auf der Basis von Lysin im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde, unterscheidet sich von **28** dadurch, dass die Anreicherungsfunktion nicht aus Biotin besteht, sondern durch ein terminales Alkin ersetzt wurde. Die Verknüpfung zum Lysin erfolgte auch bei dieser Sonde über ein bisalkyliertes Guanidin.

Synthesebausteine, die ein terminales Alkin enthalten, wurden von A. Samanta ausgehend von Propargylglycin (**11**; siehe Abbildung 11) über mehrere Schützungs- und Entschützungs- sowie Reduktions- und Kopplungsschritte hergestellt, so dass Intermediate erhalten wurden, die ein aromatisches Azid als photoreaktive Gruppe und eine weitere freie Funktionalität (Amin oder Alkohol) zur Derivatisierung mit dem Metabolitanalogon enthalten. Eines dieser Zwischenprodukte (**38**) wurde analog zur vorher beschriebenen Synthese bisalkylierter

Guanidine zuerst mit dem *Cbz*-Isothiocyanat (**31**) zu **39** umgesetzt (Ausbeute: 70 %). Die anschließende Reaktion mit **36b** in Gegenwart von EDC•HCl zur vollständig geschützten Photoaffinitätssonde (**40**) gelang mit einer Ausbeute von 68 % (Schema 9).



Schema 9: Synthese der Photoaffinitätssonde (**26**). **a:** **31**, DIPEA, DCM, Ausbeute: 70 %. **b:** **36b**, EDC•HCl, DIPEA, DCM, Ausbeute: 68 %. **c:** TFA, Thioanisol, DCM, Ausbeute: 50 %.

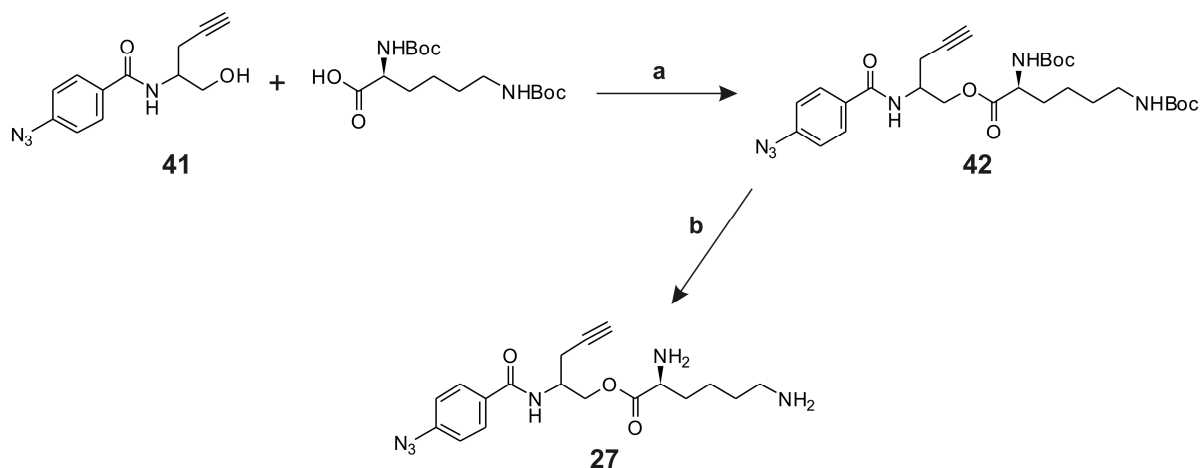
Die Reinigungsprozesse für die nicht-biotinylierten Substanzen gestalteten sich bedeutend einfacher als bei ihren biotinylierten Analoga. Die finale Entschützung wurde wie oben beschrieben vorgenommen und lieferte nach einer Aufreinigung mit Umkehrphasen-HPLC das finale Produkt (**26**) in einer Ausbeute von 50 % (siehe Schema 9).

3.4.3 Synthese einer konvertierbaren Photoaffinitätssonde auf Lysinesterbasis

Für die dritte Sonde (**27**) wurde die Säurefunktion des Lysins in Form eines Esters mit der Sonde verbunden. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben wurde, schließen die Daten des In-Line Probing und des Transkriptions-Stop-Assays verschiedener Lysinester und –amide die Bindung eines solchen Analogons an den Riboswitch nicht aus. Aus diesem Grund und auch aufgrund der Einfachheit der Herstellung wurde die Synthese einer Ester-gekoppelten Lysin-Photoaffinitätssonde durchgeführt.

Die Sonde **27** ist **26** sehr ähnlich. Die grundsätzlichen Bausteine wurden beibehalten und nur die Art der Verknüpfung modifiziert. Wie bei der vorher beschriebenen Synthese wurde auch hier ein auf Propargylglycin basierender bifunktionaler Baustein mit photoreaktiver Gruppe und latenter Anreicherungsfunktion verwendet, der von A. Samanta hergestellt worden war (**41**). Im Unterschied zu **38** liegt als freie Funktionalität, die zu einer Kopplung an den Metaboliten zur Verfügung steht, aber kein Amin sondern ein Alkohol vor.

Der entscheidende Schritt zum Aufbau der säuremodifizierten Sonde (**27**) war dementsprechend, anders als in den beiden vorherigen Fällen, die Kopplung des Alkohols **41** an kommerziell erhältliches Di-*Boc*-geschütztes Lysin (Schema 10).



Schema 10: Synthese einer konvertierbaren Photoaffinitätssonde (**27**) basierend auf einem Lysinester. **a:** EDC·HCl, DIPEA, DCM, Ausbeute: 80 %. **b:** TFA, Thioanisol, DCM, Ausbeute: 94 %.

Analog zum Vorgehen für die anderen Lysinester wurden beide Substanzen mittels DCC-Aktivierung in DCM miteinander verknüpft (**42**, Ausbeute 80 %) und anschließend unter denselben Bedingungen entschützt, wie sie für die anderen beiden Sonden (**26**, **28**) beschrieben wurden. Die Ausbeute von **27** lag mit 94 % jedoch deutlich höher als bei diesen. Um das Produkt in molekularbiologischer Reinheit zu erhalten, wurde es mittels präparativer Umkehrphasen-Chromatographie gereinigt.

3.4.4 Diskussion der Synthesen

Es ist erfolgreich gelungen, drei Photoaffinitätssonden auf der Basis von Lysin zu synthetisieren, die sich in ihrem Aufbau und der Derivatisierung des Metaboliten unterscheiden. Für alle drei Sonden wurde Phenylazid als photoreaktive Gruppe eingesetzt. Dies minimiert den Optimierungsbedarf für die Bestrahlung der Sonden im Rahmen eines Photoaffinitäts-Crosslinkings. Eine der Sonden (**28**) enthält die Anreicherungsfunktion Biotin, während diese bei den beiden konvertierbaren Sonden (**26**, **27**) im Anschluss an die Photoreaktion durch eine Kupfer-katalysierte Azid-Alkin „Click“-Reaktion eingeführt werden muss. Diese spätere Einführung von Biotin hat den Vorteil, dass der Verlauf der Synthese durch eine bessere Löslichkeit der Substanzen und eine vereinfachte Aufreinigung der Produkte erleichtert wird. Andererseits werden durch die nachträgliche Einführung der Anreicherungsfunktion zusätzliche Fällungs- und Trennungsschritte im Verlauf des Protokolls

zur ABC Transkriptomanalyse nötig. Dies ist vor allem im Hinblick auf die zu erwartenden geringen Mengen an RNA kritisch.

Die Veresterung des Lysins zur Synthese der Sonde **27** gelang mit sehr guten Ausbeuten. In den beiden anderen Sonden (**26**, **28**) ist das Lysin über das Amin der Seitenkette mit den anderen Komponenten der Sonde in Form eines bisalkylierten Guanidins verknüpft. Die in der Literatur für analoge Synthesen beschriebenen hohen Ausbeuten bei den Schlüsselschritten konnten hierbei allerdings nicht erreicht werden [162,164]. Dennoch wurden die Photoaffinitätssonden in konvergenten Synthesen über zwölf (**28**) beziehungsweise sechs (**26**) Stufen erfolgreich hergestellt werden.

Im Folgenden soll die Affinität der Sonden zum Lysin-Riboswitch-Aptamer untersucht werden.

3.5 In-Line Probing der Photoaffinitätssonden

Von den beiden Sonden **26** und **27** wurde Reinstoff in ausreichender Menge hergestellt, so dass die Vorhersagen hinsichtlich der Bindung an den Lysin-Riboswitch mittels In-Line Probing überprüft werden konnten. Wie für die anderen Esteranaloga muss auch für die Sonde **27** festgestellt werden, dass In-Line Probing nicht die geeignete Methode ist, um eine Bindung nachzuweisen. Die Substanz zersetzt sich unter den Bedingungen des Experimentes teilweise zu Lysin und die so erlangten Daten sind nicht auswertbar. Diese Zersetzung wurde, wie bereits in Kapitel 3.3.2 für die anderen Esteranaloga des Lysins besprochen, mit Hilfe von LC-MS-Messungen nachgewiesen. Im Gegensatz zu **27** ist die Sonde **26**, die über ein bisalkyliertes Guanidin mit Lysin verknüpft ist, stabil unter In-Line Probing-Bedingungen. Die Affinität zum Aptamer des Lysin-Riboswitches konnte somit untersucht und eine Dissoziationskonstante berechnet werden.

Ein In-Line Probing-Experiment wurde mit dem Lysin-Riboswitch-Aptamer in Gegenwart von **26** durchgeführt. Das Spaltungsmuster wurde anschließend mit denen verglichen, die vom natürlichen Liganden *L*-Lysin sowie von Homoarginin (**24**) induziert werden (siehe auch Abbildung 16C). Von **24** ist bekannt, dass es an das Aptamer bindet [98]. Außerdem stellt es strukturell das Bindeglied zwischen Lysin und der Sonde **26** dar. Die Versuche ergaben, dass die Photoaffinitätssonde dieselben Veränderungen im Spaltungsmuster hervorruft, wie dies bei *L*-Lysin und Homoarginin der Fall ist (Abbildung 22A). Die Bindung von **26** an das Aptamer ist demnach spezifisch.

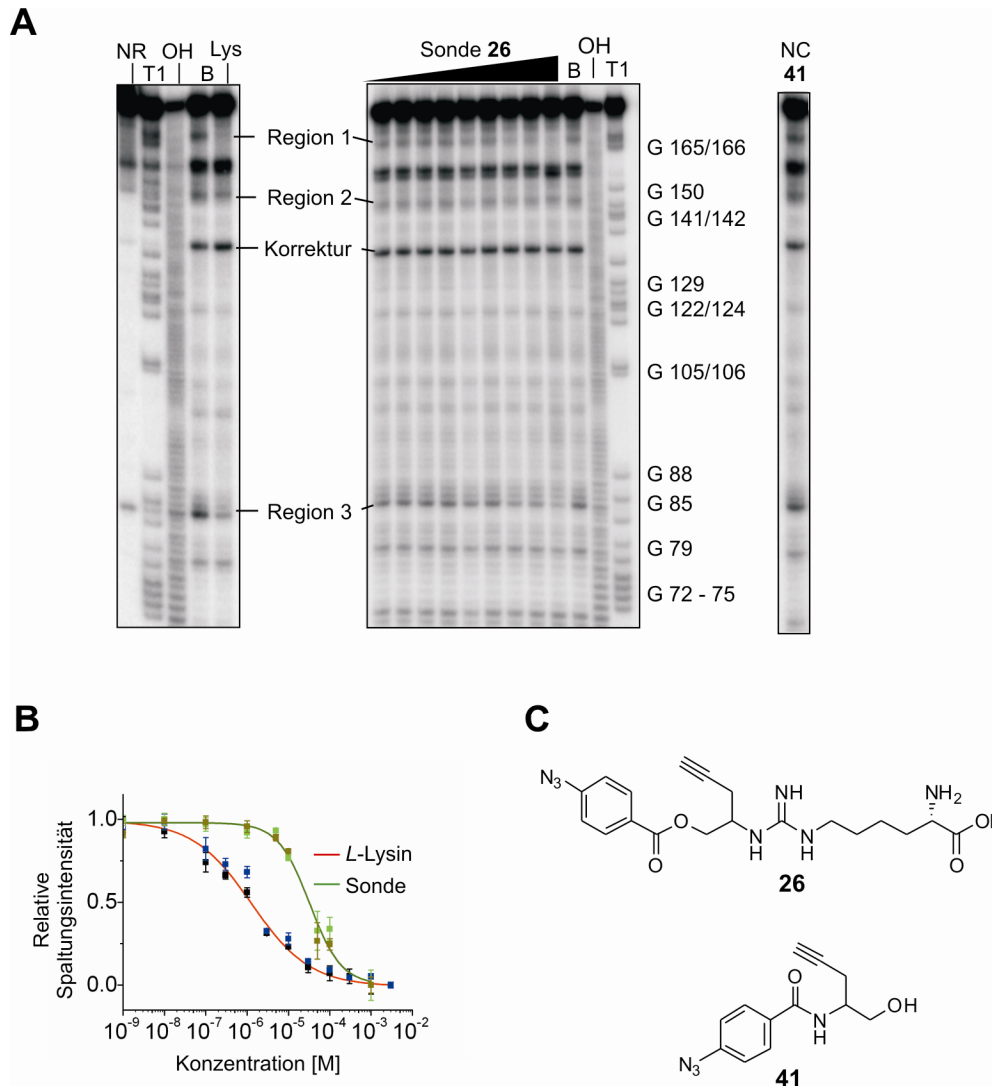


Abbildung 22: In-Line Probing-Analyse der Photoaffinitätssonde (**26**). **A:** Linkes Feld: In-Line Probing-Analyse des Lysin-Riboswitch-Aptamers in Abwesenheit (Spur B) und Anwesenheit von *L*-Lysin (1 mM). Die Spuren NR, T1 und OH enthalten jeweils unreaktierte RNA, eine G-spezifische Sequenzleiter und einen partiellen alkalischen Verdau der Sequenz. Mittleres Feld: In-Line Probing des Aptamers in Abwesenheit und Anwesenheit der Photoaffinitätssonde (**26**) in unterschiedlichen Konzentrationen (1 nM – 1 mM). Rechtes Feld: In-Line Probing-Analyse des Aptamers mit dem bifunktionalen Baustein (**41**; 1 mM). Regionen, deren Intensität sich bei einer spezifischen Interaktion des Liganden ändert, sind ebenso angegeben wie ausgewählte Banden der Sequenzleiter. **B:** Graph für die Ermittlung der Dissoziationskonstante für *L*-Lysin (blau und schwarz) (siehe auch Abbildung 16B) sowie für **26** (grün und braun). Die relative Spaltungsintensität der Regionen 1 (blau und braun) und 3 (schwarz und grün) wurde nach einer Korrektur auf Beladungsunterschiede mit Hilfe der lysinunabhängigen Spaltungsbande „Korrektur“ und einem Normalisierungsschritt gegen die Lysinkonzentration aufgetragen. **C:** Strukturformeln der beiden in diesen Versuchen eingesetzten Substanzen - der Photoaffinitätssonde (**26**) und dem bifunktionalen Baustein (**41**).

Um zusätzlich auszuschließen, dass ein Fragment der Sonde, welches kein Lysin enthält (der bifunktionale Baustein), eine spezifische Affinität zum Aptamer aufweist, wurde der bifunktionale Baustein (**41**) auf eine mögliche Bindung getestet (siehe Abbildung 22A,C). Diese Substanz sollte nicht in der Lage sein, dieselben Änderungen am Spaltungsmuster zu induzieren wie *L*-Lysin, da sie keine Lysin-Untereinheit beinhaltet. Dadurch kann eine Bindung in der Tasche des Aptamers nicht stattfinden. Wie erwartet wurde auch bei hohen Konzentrationen (1 mM) von **41** keine Aktivität festgestellt. Alle Lysinanaloga, die eine Affinität zum Aptamer aufweisen, zeigen bei dieser Konzentration Auswirkungen auf das Spaltungsmuster. Aus den Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Bindung von **26** an das Aptamer nicht nur spezifisch ist, sondern einzig darauf beruht, dass ein Lysinanalogon Teil der Sonde ist. Die Lysin-Untereinheit ist somit das entscheidende Strukturmotiv für die Bindung.

Die Dissoziationskonstante von **26** wurde in einem Titrationsexperiment ermittelt und konnte mit $(33 \pm 7) \mu\text{M}$ berechnet werden (Abbildung 22A, B). Die Affinität des natürlichen Liganden ist zwar deutlich höher ($K_d = \sim 1 \mu\text{M}$), die Dissoziationskonstante von **26** liegt aber durchaus in einem Bereich, in dem eine Bindung an den Riboswitch als relevant angesehen werden darf. Das bekannte, antibiotisch wirksame Lysinanalogon AEC (**25** in Abbildung 16C) wurde mit einem K_d -Wert von $\sim 30 \mu\text{M}$ beschrieben [96]. Die Bindung an das Aptamer sollte demnach für die geplanten Photoaffinitäts-Crosslinking-Experimente ausreichend stark sein. Neben der Bindungsstärke ist außerdem die Spezifität der Bindung von Bedeutung für die Bewertung der Qualität einer Photoaffinitätssonde.

Im Falle der Photoaffinitätssonde **26** konnte in den In-Line Probing-Experimenten somit gezeigt werden, dass sie mit einem K_d -Wert von $33 \mu\text{M}$ spezifisch an das Aptamer des Lysin-Riboswitches bindet. Außerdem ist zu erkennen, dass die Bindung abhängig von der Anwesenheit der Lysin-Untereinheit im Molekül ist und ein bifunktionaler Baustein ohne dieses Metabolitanalogon keine Affinität zum Aptamer aufweist. Eine unspezifische Interaktion der photoreaktiven Gruppe oder der Anreicherungsfunktion mit der Aptamer-Sequenz lässt sich aufgrund dieser Messungen ausschließen. Durch die Verwendung identischer Sondenbausteine lässt sich eine unspezifische Bindung außerdem für die Photoaffinitätssonde **27** ausschließen. Damit konnten die Designprinzipien, die diesen Sonden zugrunde lagen, bestätigt werden.

3.6 Photocrosslinking der Photoaffinitätssonden mit dem Lysin-Riboswitch-Aptamer²²

Nachdem die Sonden **26** und **27** bezüglich ihrer spezifischen Bindung an das Aptamer des Lysin-Riboswitches getestet worden waren, war es das Ziel zu überprüfen, ob ein spezifischer Photocrosslink mit dem Aptamer möglich ist. Auch wenn die Zersetzung der Ester-verknüpften Sonde **27** unter In-Line Probing-Bedingungen nachgewiesen wurde, erschien es doch sinnvoll, sie in die Photocrosslinking-Versuche einzuschließen. Die Photoreaktion findet innerhalb kurzer Zeit statt (Bestrahlungsdauer: 10 Min)²³. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass in diesem Zeitraum so viel Lysin entsteht, dass die Sonde kompetitiv aus der Bindungstasche verdrängt werden kann.

Für die Versuche wurden das 5'-³²P-markierte Aptamer des Lysin-Riboswitches in relativ hoher Konzentration (1 µM) mit der Sonde gemischt und mit einer UV-Handlampe mit Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt²⁴. Anschließend wurden die Proben mehrfach mit verschiedenen, organischen Lösemitteln extrahiert und die RNA mit Ethanol gefällt, um überschüssige Sonde zu entfernen. Die latente Anreicherungsfunktion wurde danach in einer Kupfer-katalysierten „Click“-Reaktion mit Biotin-Azid (**5**) umgesetzt (siehe auch Abbildung 12B). Die RNA musste dann erneut durch eine Fällung aufgereinigt werden, da der große Überschuss an Biotin-Azid, der in der „Click“-Reaktion nötig ist, bei der nachfolgenden Immobilisierung stört.

Der Anteil an Crosslink-Produkt wurde folgendermaßen ermittelt: Eine Positivkontrolle aus chemisch biotinylierter RNA wurde auf Streptavidin-Agarose-Kügelchen immobilisiert. Nach dem Entfernen des Überstandes sowie mehrfachen Waschschritten wurde die Radioaktivität der Festphase sowie der Lösungen bestimmt und miteinander verglichen. Dieses Verhältnis wurde als das maximal erreichbare auf 100 % gesetzt. Ebenso wurden alle Proben mit Lysin-Photoaffinitätssonden immobilisiert und gewaschen. Das dabei ermittelte Verhältnis der Aktivitätswerte zwischen Festphase und Waschlösungen wurde in Bezug zur Positivkontrolle gesetzt.

²² Die in diesem Abschnitt beschriebenen Photocrosslinking-Experimente mit den Sonden **26** und **27** wurden von A. Samanta im Rahmen seiner Promotion durchgeführt.

²³ Zum Vergleich: Für ein In-Line Probing-Experiment werden die Proben bei der gleichen Temperatur im selben Puffer 40 h inkubiert.

²⁴ Das Vorgehen von A. Samanta unterscheidet sich stark von dem von mir im Zusammenhang mit den cAMP-Sonden gewählten Verfahren. Aus diesem Grund werden die experimentellen Details an dieser Stelle ausgeführt. Die von mir durchgeführten Photoaffinitäts-Crosslinking-Versuche mit cAMP-Sonden werden im folgenden Kapitel besprochen und im Kapitel 5.2.5 detailliert beschrieben.

Für beide Sonden (**26** und **27**) konnte nachgewiesen werden, dass das Aptamer nur nach einer Bestrahlung der Proben immobilisiert werden konnte. Der Hintergrundwert, der ohne Bestrahlung gemessen wurde, entspricht ca. 0,8 % Immobilisierung. Eine unspezifische Interaktion des Riboswitch-Aptamers mit der Festphase kann demnach ausgeschlossen werden.

Werden die Proben allerdings in Gegenwart von 100 μM Photoaffinitätssonde bestrahlt, so lassen sich 11 % der RNA bei Verwendung von **26** immobilisieren, für **27** sind es sogar 92,5 %. Bei Verringerung der Konzentration auf 10 μM geht allerdings auch für **27** der Anteil an Crosslink-Produkt auf 9,2 % zurück. Die letzten beiden Werte konnten über Gel-Assays mittels Streptavidin-Verschiebungen untermauert werden (siehe auch Kapitel 3.7). Da **27** die besseren Aktivitätswerte aufwies, wurde vorerst nur mit dieser Sonde weitergearbeitet. Die Konzentration wurde auf 100 μM festgelegt, da durch die hohe Reaktivität bei dieser Konzentration Unterschiede gut festzustellen waren.

Die Überprüfung, ob der Crosslink auf einer spezifischen Interaktion der Photoaffinitätssonde mit dem Aptamer beruht, erfolgte mit Hilfe mehrerer Experimente. Zuerst wurde die Probe mit steigenden Konzentrationen an Lysin versetzt. Bindet die Sonde spezifisch in der Tasche des Aptamers, so ist es möglich, sie durch Zugabe eines Überschusses an Lysin daraus zu verdrängen und dadurch den Crosslink kompetitiv zu inhibieren.

Tabelle 4: Anteil der immobilisierten RNA bei steigender Lysin-Konzentration. Die Konzentration der Sonde **27** betrug in allen Fällen 100 μM .

Konzentration Lysin [mM]	Produktanteil [% immobilisierte RNA]
0	92,5
0,1	85
0,2	50
20	34

Tabelle 4 zeigt, dass sich der Produktanteil schon durch den Zusatz von zwei Äquivalenten des natürlichen Liganden auf etwa die Hälfte (50 %) reduzieren ließ. Bei Zugabe eines 200fachen Überschusses an Lysin war der Anteil an Crosslink-Produkt um ca. 2/3 auf 34 % reduziert. Auch wenn Zwischenwerte für ein vollständiges Bild fehlen, wird deutlich, dass der Crosslink zumindest zum Teil auf der spezifischen Bindung der Sonde an das Aptamer beruht. Eine Aktivität von 34 % bei einem 200fachen Lysin-Überschuss ist allerdings als verhältnismäßig hoch einzustufen. Inwiefern dies auf die relativ hohe Sondenkonzentration

oder konzentrationsunabhängige unspezifische Interaktionen der Sonde mit dem Aptamer zurückzuführen ist, ließ sich auf Basis der vorliegenden Daten zunächst nicht entscheiden.

Um dies näher zu untersuchen, wurde der bifunktionale Baustein (**41**), der keine Lysin-Untereinheit enthält, in Crosslinking-Versuchen eingesetzt. Von diesem Baustein konnte im In-Line Probing gezeigt werden, dass keine spezifische Interaktion mit dem Aptamer vorliegt (siehe Abbildung 22A). Der Anteil an Crosslink-Produkt, der bei einer Bestrahlung dieses Moleküls in Gegenwart des Aptamers entsteht, sollte demnach ausschließlich auf unspezifischen oder zufälligen Interaktionen mit der RNA beruhen. Dies ist ein Maß dafür, wie stark der Einfluss der Sondenbestandteile ist, die keinen Beitrag zur Bindung der Sonde leisten sollten. Nach der Bestrahlung und Umsetzung mit Biotin-Azid konnten bei einer Konzentration von 100 μM des Bausteins 4 % der RNA immobilisiert werden. Durch die Zugabe von einem Äquivalent Lysin ließ sich dieser Wert nur unwesentlich auf 3,5 % reduzieren. Die Reaktion beruht somit nicht auf einer spezifischen Interaktion in der Lysin-Bindungstasche des Aptamers. Der bifunktionale Baustein, bestehend aus Propargylglycin und photoreaktiver Gruppe, trägt demnach nur in sehr geringem Maße zu unspezifischer Crosslink-Bildung bei.

Eine weitere Möglichkeit, den Anteil an unspezifischem Crosslink abzuschätzen, ist die Durchführung eines Crosslink-Experimentes mit einer RNA-Probe, die keine Affinität zur Photoaffinitätssonde aufweist. Zweckmäßigerweise werden dazu Sequenzen verwendet, die eine ähnliche Länge wie das Aptamer haben. Sollte der unspezifische Crosslink auf einer Interaktion mit dem Phosphat-Rückgrat der RNA beruhen, so wäre der Produktanteil abhängig von der Länge des eingesetzten Oligonukleotids. Die Verwendung von Sequenzen ähnlicher Länge ermöglicht dementsprechend eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse (siehe auch Kapitel 3.7). Für die Versuche wurde die Photoaffinitätssonde **27** beziehungsweise der bifunktionale Baustein (**41**) in verschiedenen Konzentrationen von 5 μM bis 200 μM mit einem randomisierten RNA-Pool²⁵ von 233 nt Länge (1 μM) gemischt und bestrahlt. Während für **41** analog zum Aptamer nur minimale Reaktivität festzustellen war (1,5 % - 2 % Immobilisierung für alle Konzentrationen), nahm für die Sonde **27** der Anteil an immobilisierter RNA mit steigender Sonden-Konzentration drastisch von 4 % (5 μM) auf 62 % (200 μM) zu. Ein Vergleich dieser Werte mit dem Lysin-Riboswitch-Aptamer (der Positivkontrolle) zeigt, dass der Crosslink-Anteil beim Aptamer durchgängig höher ist als bei der vergleichbaren Probe mit dem randomisierten RNA-Pool. Für eine Sondenkonzentration

²⁵ Dieser RNA-Pool wurde von S. Ameta zur Verfügung gestellt.

von 10 μM liegen die Werte bei 9 % für den Riboswitch, zu 7 % für den Pool und für 100 μM Sonde bei 92,5 % zu 47 %.

Diese Ergebnisse können noch nicht abschließend bewertet werden. Besonders zwei Beobachtungen legen jedoch den Schluss nahe, dass durch die Entfernung der negativen Ladung im Zuge der Veresterung der Säurefunktion des Lysins die Affinität der Sonden zum negativ geladenen Phosphat-Rückgrat zunimmt. Falls dies der Fall ist, würde der Anteil an unspezifischem Crosslink mit steigender Sequenzlänge zunehmen. Ein Indiz, das für eine solche Interpretation spricht, ist der Produktanteil von 34 % bei Bestrahlung des Aptamers und 100 μM der Sonde **27** in Gegenwart von 200 Äquivalenten Lysin. Lysin ist offenbar nicht in der Lage, die Sonde vollständig von der RNA zu verdrängen, was für eine hohe Affinität von **27** zur RNA spricht. Dass diese Affinität (zum Teil) unspezifisch ist, zeigt der relativ hohe Produktanteil von 47 % bei Bestrahlung der Sonde (100 μM) mit dem RNA-Pool (ohne Zugabe von Lysin). Das zweite Indiz sind die 11 % Crosslink-Produkt bei Bestrahlung des Aptamers und 100 μM von **26**. Dieser Wert ist deutlich niedriger als die 92,5 % von **27** bei gleicher Konzentration. Da bei **26** die Säurefunktion frei vorliegt, ist das Molekül weniger stark positiv geladen, so dass ein Teil der Differenz in der Crosslink-Effizienz möglicherweise auf eine reduzierte unspezifische Interaktion von **26** mit der RNA zurückzuführen ist. Um diese Hypothese zu stützen, müssen allerdings weitere Crosslink-Experimente (vor allem mit einem Überschuss Lysin) durchgeführt werden

Für eine ABC Transkriptomanalyse ist ein zu hoher Anteil an unspezifischer Produktbildung eventuell problematisch. Der Anteil an spezifischem Produkt wird dann zu stark zurückgedrängt, wodurch keine optimale Anreicherung der spezifisch reagierenden Sequenzen mehr möglich ist.

Derzeit wird die Photoaffinitätssonde **27** von A. Samanta und M.-L. Winz in einem Experiment eingesetzt, bei dem eine ABC Transkriptomanalyse von *B. subtilis* durchgeführt wird. Dabei wird unter anderem eine Antwort auf diese Frage erwartet. In dem Experiment wird die Probe in Gegenwart von Total-RNA aus *B. subtilis* bestrahlt. Da diese den bekannten LysC Lysin-Riboswitch enthält, sollte es möglich sein, diesen zu isolieren und mit Hilfe einer qPCR nachzuweisen²⁶.

Zusammenfassend ist es gelungen, die Photoaffinitätssonden **26** und **27** in einem Photocrosslinking-Experiment mit dem Lysin-Riboswitch-Aptamer zu verbinden. Während

²⁶ Das genaue Vorgehen bei einer ABC Transkriptomanalyse wird im folgenden Kapitel 2.7 im Zusammenhang mit Photoaffinitätssonden basierend auf cAMP beschrieben.

für **26** die Crosslink-Effizienz mit 11 % Produktbildung bestimmt wurde, lag sie für **27** bei 92,5 %. Für **27** konnte gezeigt werden, dass der Crosslink (zumindest teilweise) spezifisch ist und durch einen Überschuss an Lysin (dem natürlichen Liganden) inhibiert werden kann. Ein signifikanter Anteil an unspezifischem Crosslink wurde jedoch sowohl bei Zugabe eines Überschusses an Lysin (34 % Produktbildung) als auch bei Inkubation mit einem randomisierten RNA-Pool (47 % Crosslink-Produkt) detektiert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die unspezifische Bindung vom Metabolitanalogon und nicht von der photoreaktiven Gruppe oder der latenten Anreicherungsfunktion induziert wird. Ein analoger Test der Sonde **26** sowie weitere Untersuchungen zu den übrigen Sonden und vorbereitende Versuche zu einer ABC Transkriptomanalyse mit diesen Molekülen werden derzeit durchgeführt.

Tiefergehende Studien zum Photoaffinitäts-Crosslinking mit RNA und der darauf aufbauenden ABC Transkriptomanalyse werden außerdem im folgenden Kapitel im Zusammenhang mit cAMP-spezifischen Sonden beschrieben.

3.7 Photoaffinitäts-Crosslinking mit cAMP-Photoaffinitätssonden

Im Verlauf der Bestrahlungs-Experimente mit den Lysin-Photoaffinitätssonden stellte sich heraus, dass die Reaktion der aktivierten Arylazide mit der RNA einer der kritischsten Schritte in der Entwicklung eines Protokolls zur ABC Transkriptomanalyse ist. Dadurch wurde es nötig, mehr Informationen über Photocrosslinking-Reaktionen zwischen RNA und kleinen Molekülen zu sammeln. Die Situation einer lichtinduzierten Vernetzung eines Metaboliten mit einem RNA-Aptamer sollte möglichst genau imitiert werden. Zu diesem Zweck wurden drei Photoaffinitätssonden getestet (**43**, **44**, **45**)²⁷. Diese Sonden basieren auf cyclischem 3'-5'-Adenosin-Monophosphat (cAMP) und unterscheiden sich nur in ihrer photoreaktiven Gruppe (Abbildung 23).

²⁷ Diese drei Photoaffinitätssonden wurden von Caprotec erworben. Eine der Sonden (**43**) wurde bereits im Rahmen einer AfBPP-Studie eingesetzt [168].

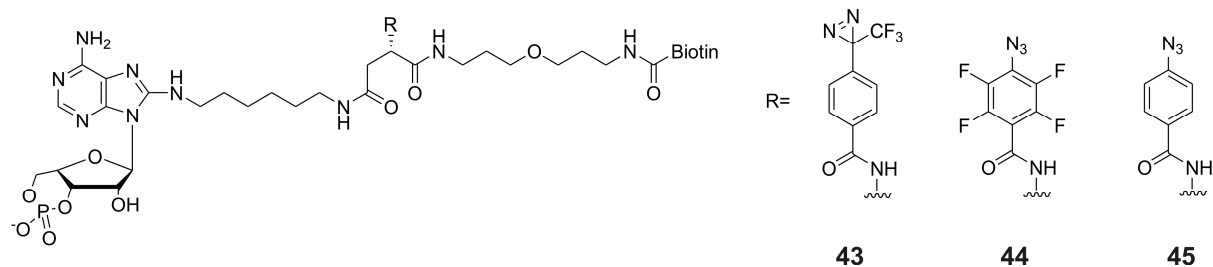


Abbildung 23: Struktur der drei Photoaffinitätssonden, die in den Experimenten eingesetzt wurden.

In zwei Fällen handelt es sich um Phenylazide (**44**, **45**), von denen eines perfluoriert ist (**44**) und dadurch bei höheren Wellenlängen angeregt werden kann. Die Einführung der Fluorsubstituenten hat auch zur Folge, dass sich der Mechanismus der Crosslink-Reaktion ändert (siehe auch Kapitel 3.1). Während unsubstituierte Phenylazide hauptsächlich Reaktionen mit Nukleophilen eingehen, erfolgt die Verknüpfung der perfluorierten Varianten radikalvermittelt durch Insertion in CH-Bindungen. Die dritte eingesetzte photoreaktive Gruppe ist ein Diazirin (**43**). Diazirine reagieren auf demselben Weg wie perfluorierte Phenylazide, sind aber reaktiver als diese, da die entstehenden Carbene energiereicher sind als die analogen Nitrene, die beim Zerfall der Azide generiert werden [169,170].

Diese drei Sonden wurden in der vorliegenden Arbeit in Kombination mit einem cAMP-Aptamer eingesetzt, welches im Jahr 2000 von Koizumi und Breaker selektiert worden war (siehe Kapitel 1.7, Abbildung 9A) [107]. Eine Eigenschaft des Aptamers ist für die Crosslinking-Experimente von außerordentlicher Bedeutung. Dabei handelt es sich um die Tatsache, dass das Aptamer aufgrund der Selektionskriterien in der Lage ist cAMP-Derivate zu binden, die mit sterisch anspruchsvollen Gruppen in der C8-Position des Adenins modifiziert sind²⁸ (siehe Kapitel 1.7, Abbildung 9B) [107]. Durch diese Eigenschaft ist es wahrscheinlich, dass alle drei Sonden Affinität zum cAMP-Aptamer aufweisen, da sie über die C8-Position des Adenins mit Biotin und der photoreaktiven Gruppe verbunden sind (vergleiche Abbildung 23).

Hinsichtlich seiner Selektivität und seiner Bindungskonstante [K_d (cAMP) = 10 μ M] ist das Aptamer durchaus vergleichbar mit natürlichen Riboswitch-Aptameren. Seine im Vergleich zum Lysin-Aptamer kurze Sequenz (31 nt vs. 179 nt) ermöglicht allerdings die direkte Beobachtung des Crosslinks auf denaturierenden PAGE-Gelen über die Änderung im Laufverhalten.

²⁸ Verwandte Substanzen, die an anderen Positionen modifiziert sind (z. B. 3'- und 5'-AMP, ADP, 1-Methyladenin), werden häufig nicht vom Aptamer gebunden [107].

3.7.1 Photocrosslinking der cAMP-Photoaffinitätssonden mit dem cAMP-Aptamer

Die drei cAMP-Sonden (20 μM) wurden jeweils mit 5'-radioaktiv markiertem Aptamer (100 nM) inkubiert und mit UV-Licht von 310 nm Wellenlänge²⁹ bestrahlt (vergleiche auch Kapitel 3.6). Die entstehenden Substanzen wurden direkt über ein denaturierendes PAGE-Gel aufgetrennt (Abbildung 24A). Bei einem erfolgreichen Crosslink wird das Aptamer so stark modifiziert, dass eine deutliche Veränderung der elektrophoretischen Mobilität auf dem PAGE-Gel zu beobachten ist.

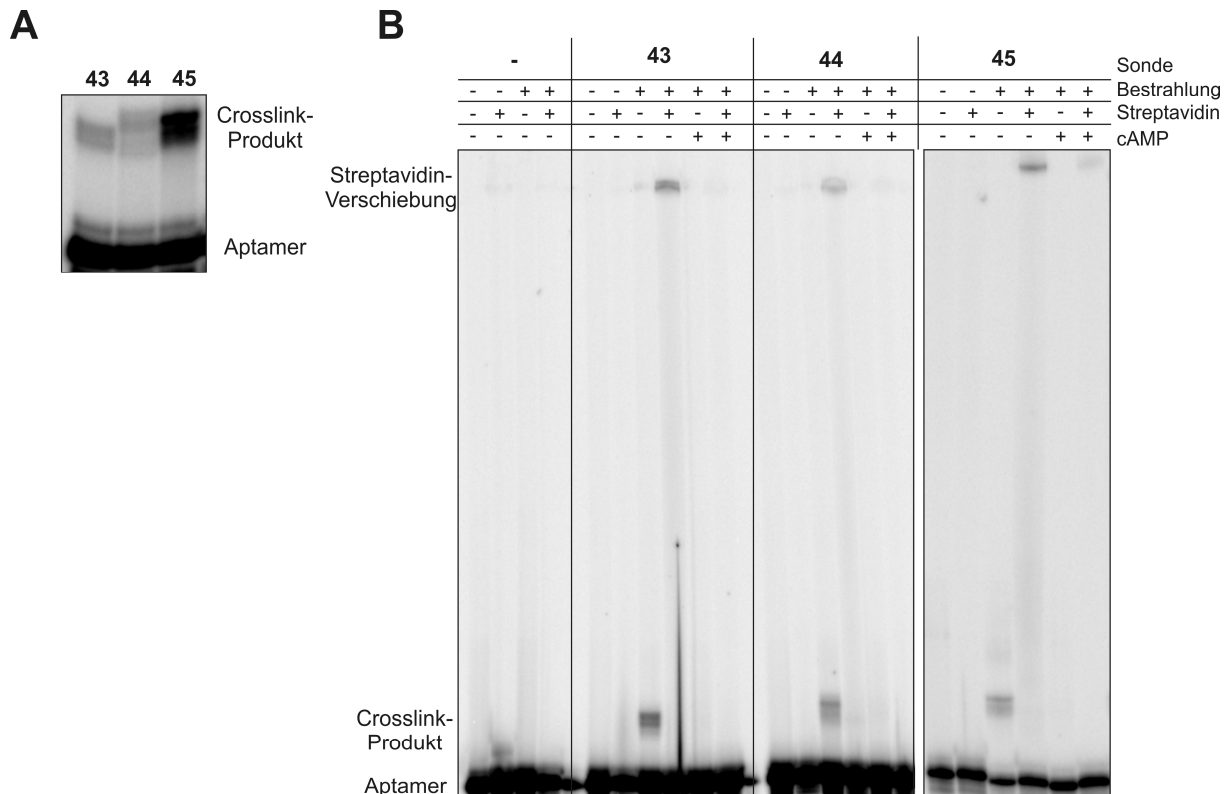


Abbildung 24: Analyse der Gel-Verschiebungen durch Photocrosslinks für die drei Photoaffinitäts-sonden. **A:** Produkte der Photoreaktion bei Bestrahlung einer Lösung von cAMP-Aptamer (^{32}P -markiert) mit den drei Sonden **43**, **44** und **45**. **B:** Detaillierte Analyse des Crosslinks mit Kontrollexperimenten.

Die Effektivität des Crosslinks lässt sich für die verschiedenen Sonden bestimmen, indem die Intensität der Produktbande mit der des unmodifizierten Aptamers verglichen wird, was deutlich einfacher und weniger fehleranfällig ist als das von A. Samanta gewählte Verfahren bei den Lysin-Photoaffinitätssonden. Beim Lysin-Riboswitch-Aptamer ist ein solches direktes Vorgehen allerdings nicht möglich, da der Unterschied der elektrophoretischen Mobilität

²⁹ Bei dieser Wellenlänge werden RNA-RNA-Crosslinks weitgehend ausgeschlossen.

aufgrund der großen Sequenzlänge zu gering ist. Für das cAMP-Aptamer konnte mit diesem Ansatz gezeigt werden, dass eine Bestrahlung der Sonde **43** zu $(2,9 \pm 1,0) \%$ Produkt führt und bei **44** zu $(2,7 \pm 0,9) \%$ ³⁰. Das mit Abstand beste Ergebnis konnte allerdings mit der Sonde **45** erzielt werden. Hier entstand $(16,9 \pm 1,9) \%$ des Crosslink-Produktes. Eine mögliche Erklärung für diese Differenz ist der bereits eingangs des Kapitels erwähnte Unterschied im Crosslink-Mechanismus. Möglicherweise ist bei der Bindung der Sonde durch das Aptamer ein nukleophiler Angriff der RNA auf die Sonde gegenüber einer CH-Insertion bevorzugt. Die Produkte der Reaktion mit den verschiedenen Sonden zeigen unterschiedliches Laufverhalten (Abbildung 24A), was darauf hindeutet, dass es sich um unterschiedliche Produkte handelt. Die Sonden **44** und **45** zeigen sogar mehrere Banden. Demnach haben sie offenbar mehrere Angriffspunkte am Aptamer.

Eine Analyse der Spuren ohne Sondenzugabe in Abbildung 24B zeigt zum einen, dass es sich bei den Produktbanden nicht um RNA-RNA-Crosslinks oder intramolekulare Reaktionen handelt, da auch nach einer Bestrahlung des Aptamers nur die Bande des Ausgangsstoffes sichtbar ist. In den Spuren, in denen die Proben mit Photoaffinitätssonde versetzt waren, aber keine Bestrahlung vorgenommen wurde, ist keine Produktbildung feststellbar. Dies zeigt, dass die Crosslink-Produkte durch eine Photoreaktion entstehen. Wie in Abbildung 24B außerdem zu sehen ist, lassen sich alle Produktbanden durch die Zugabe von Streptavidin stark verschieben, was beweist, dass diese Banden ein Produkt aus Photoaffinitätssonde (inklusive Biotin) und radioaktiv markierter RNA enthalten. Die Verschiebung beruht nicht auf einer unspezifischen Interaktion des Oligonukleotids mit Streptavidin, sondern ist einzig auf die Interaktion des Proteins mit dem in den Sonden enthaltenen Biotin zurückzuführen.

Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der Crosslink-Effizienz in Bezug auf die Puffer-Zusammensetzung und speziell die Magnesium-Ionen-Konzentration untersucht. Der Anteil an Crosslink-Produkt war unabhängig von der Zusammensetzung der Salze im Puffer und stabil bis hinab zu einer Konzentration von 100 μM Magnesium-Ionen.

In einem zeitabhängigen Experiment konnte gezeigt werden, dass eine Sättigung des Crosslinks nach einer Bestrahlungsdauer von 3 - 5 Minuten (**44**, **45**) und 5 – 8 Minuten (**43**) erreicht wurde (Abbildung 25A). Um in den folgenden Versuchen sicher zu stellen, dass die Bestrahlungsdauer tatsächlich ausreichend war, wurden die Proben jeweils 10 Minuten bestrahlt.

³⁰ Die gezeigten Werte wurden durch Messungen im Triplikat ermittelt. Die angegebenen Fehlerwerte entsprechen den Standardabweichungen.

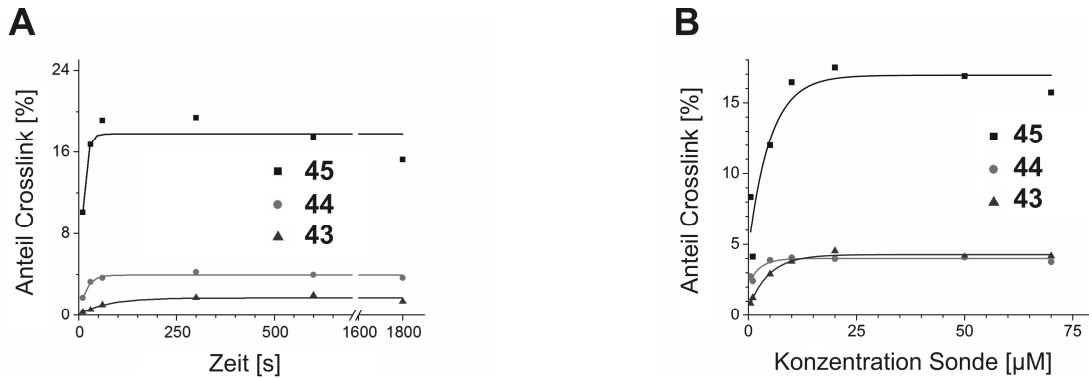


Abbildung 25: **A:** Anteil an Crosslink-Produkt in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer für alle drei Sonden. **B:** Anteil an Crosslink-Produkt in Abhängigkeit der Konzentration der drei Photoaffinitäts-sonden.

Der nächste Schritt war die Überprüfung der optimalen Konzentration der Sonde, um möglichst viel Crosslink-Produkt zu generieren. In den ersten Experimenten wurde eine Sondenkonzentration von 20 μ M verwendet, da cAMP für das cAMP-Aptamer eine Dissoziationskonstante von ~ 10 μ M aufweist und die eingesetzte Sondenkonzentration oberhalb dieses Wertes liegen sollte, um eine möglichst gute Bindung und Produktbildung zu gewährleisten. Ausgehend von diesem Wert wurde sie bis auf 70 μ M erhöht beziehungsweise auf 0,5 μ M erniedrigt (Abbildung 25B). Dabei ließ sich feststellen, dass der Anteil an Produkt unabhängig von der Art der Sonde mit steigender Konzentration stetig zunimmt, bis er schließlich in eine Sättigungsphase eintritt. Je nach Sonde liegt die Konzentration, bei der diese Sättigung erreicht wird, zwischen ca. 5 μ M (**44**) und ca. 20 μ M (**43**). Eine Erhöhung der Sondenkonzentration über diesen Punkt hinaus führt dann nicht zu einer weiteren Erhöhung des Crosslink-Anteils. Ein solches Verhalten ist typisch für eine spezifische Interaktion zwischen einem kleinen organisch-chemischen Liganden und einem Biomolekül. Die Konzentration von 20 μ M wurde daraufhin in allen Experimenten mit den Sonden verwendet, da sie sich als ideal erwies, um einen möglichst hohen Anteil an Crosslink-Produkt bei gleichzeitig niedriger Sondenkonzentration zu generieren. Ein zu hoher Überschuss an Photoaffinitäts-sonde ist nicht sinnvoll, da dies die Gefahr einer Zunahme des Anteils an unspezifischen Crosslink-Produkten erhöht.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Photoaffinitäts-sonden **43**, **44** und **45** nach Bestrahlung mit UV-Licht kovalent mit dem cAMP-Aptamer verbunden sind. Dadurch wird die RNA mit Biotin verknüpft, was mittels Streptavidin-Verschiebungen gezeigt wurde. Hinsichtlich der Effektivität der Produktbildung ist die Sonde **45** den anderen beiden weit

überlegen. Allerdings lassen diese Ergebnisse noch keinen Rückschluss darauf zu, ob es sich um eine spezifische Reaktion handelt, die aufgrund der Affinität des Aptamers zur cAMP-Komponente der Sonden stattfindet. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Crosslinks durch unspezifische Interaktionen der photoreaktiven Gruppe mit der RNA entstehen, wie sie auch aus der Literatur bekannt sind [133,171].

3.7.2 Spezifität des Crosslinks

Der Nachweis, dass der Crosslink spezifisch ist, ist von besonderer Bedeutung. Damit eine Photoaffinitätssonde erfolgreich im Rahmen einer ABC Transkriptomanalyse eingesetzt werden kann, muss der Crosslink spezifisch sein. Diese Spezifität kann aber nur erreicht werden, wenn auch die Interaktion der Sonde mit der Ziel-RNA-Sequenz spezifisch ist. Das bedeutet, dass die Affinität nur aufgrund definierter, molekularer Charakteristika der Sonde, nämlich ihrer Ähnlichkeit zu cAMP (oder im bereits besprochenen Fall zu Lysin), bestehen sollte. Falls nicht die Erkennung der Sonde in einer Bindungstasche des Aptamers, sondern nur elektronische Wechselwirkungen mit den Phosphatrückgrat des Oligonukleotids oder unspezifische Stapelwechselwirkungen die treibende Kraft für den Crosslink sind, büßt die Sonde an Spezifität ein, wenn diese nicht sogar vollständig verloren geht. Ob eine spezifische Interaktion vorliegt, lässt sich verhältnismäßig einfach mit einer Kombination aus zwei Experimenten nachweisen.

Im ersten Experiment wird der Lösung aus Aptamer und Photoaffinitätssonde ein Überschuss an natürlichem Liganden zugesetzt (im vorliegenden Fall ein 50facher Überschuss an cAMP). Ist die Triebkraft des Crosslinks die spezifische Interaktion in einer Bindungstasche des Aptamers, so lässt sich die Sonde durch den natürlichen Liganden kompetitiv verdrängen. Dadurch wird ein spezifischer Crosslink inhibiert. Aus diesem Grund wird dieses Experiment im Folgenden „Inhibitionsexperiment“ genannt. Sollte der Crosslink weiterhin so stark sein wie in Abwesenheit des natürlichen Liganden, so ist er unspezifisch und die Sonde kann nicht zur Detektion dieses Biomoleküls eingesetzt werden.

Im zweiten Experiment wird die Photoaffinitätssonde mit einer oder mehreren verschiedenen RNA-Sequenzen inkubiert, die (voraussichtlich) keine spezifische Affinität zu der Sonde beziehungsweise dem zugrunde liegenden Metaboliten haben. Idealerweise kann in einem solchen Versuch kein Crosslink nachgewiesen werden. Dies ist in der Realität aber nicht der Fall, da sich während der Bestrahlungszeit immer wieder Sondenmoleküle zufällig in Nachbarschaft zu „unspezifischen“ RNA-Sequenzen aufhalten und mit diesen reagieren können. Entscheidend ist, dass diese Crosslinks einen möglichst geringen Anteil haben und sich nicht durch Zugabe des natürlichen Liganden unterdrücken lassen.

Wenn beide Experimente den erwünschten Ausgang haben, kann man davon ausgehen, dass eine Photoaffinitätssonde vorliegt, die eine spezifische Affinität zu einer bestimmten Art von Biomolekülen hat. Für die Spezifität ist nur der Teil der Photoaffinitätssonde verantwortlich, der den Metaboliten imitiert.

Mit allen drei Sonden und dem cAMP-Aptamer wurde daher ein Inhibitionsexperiment durchgeführt (Abbildung 24B; Spuren mit Zugabe von cAMP). Zu einer Lösung des Aptamers und der Sonde wurde ein 50facher Überschuss an cAMP (über die Sondenkonzentration) gegeben. Es ist anzunehmen, dass der „natürliche“ Ligand des Aptamers eine bessere Bindungskonstante besitzt als die stark modifizierte Sonde. Dadurch werden alle Bindungstaschen statistisch von cAMP besetzt und ein spezifischer Crosslink ist inhibiert. Dieses Verhalten wurde für alle drei Sonden bei verschiedenen RNA-Konzentrationen beobachtet. Der Anteil des Crosslink-Produktes geht in Gegenwart von cAMP mit 0,5 % Produktanteil auf das Hintergrundniveau zurück (Abbildung 24B)³¹. Es kann somit der Schluss gezogen werden, dass die Triebkraft zur Produktbildung eine spezifische Interaktion der Sonden mit dem Aptamer ist, welche durch den natürlichen Liganden aufgehoben werden kann. Anreicherungsfaktoren für alle Sonden wurden berechnet, indem der Anteil an Crosslink-Produkt in Abwesenheit von cAMP durch den Anteil an Produkt in Gegenwart von cAMP dividiert wurde. Entsprechend der ermittelten Anteile des Crosslink-Produktes liegen diese Anreicherungsfaktoren bei 5,4 für **44**, 5,8 für **43** und 33,9 für **45**.

Die Untersuchung des Ausmaßes an Crosslink mit „unspezifischen“ Sequenzen wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Zuerst wurden die Sonden mit einer unstrukturierten RNA-Sequenz inkubiert, die eine ähnliche Länge hat wie das cAMP-Aptamer (29 nt vs. 31 nt). Mit keiner der Sonden konnte nach der Bestrahlung ein Crosslink detektiert werden (Abbildung 26A). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass der Crosslink spezifisch ist.

³¹ Da bei Zugabe eines Überschusses an cAMP keine definierten Banden mehr entstehen, wurde die konservativste Abschätzung getroffen. Es ist durchaus möglich, dass der Produktanteil noch niedriger liegt. In diesem Fall wären die Anreicherungsfaktoren unterbestimmt, da sie direkt vom Produktanteil der Inhibitionskontrolle abhängen.

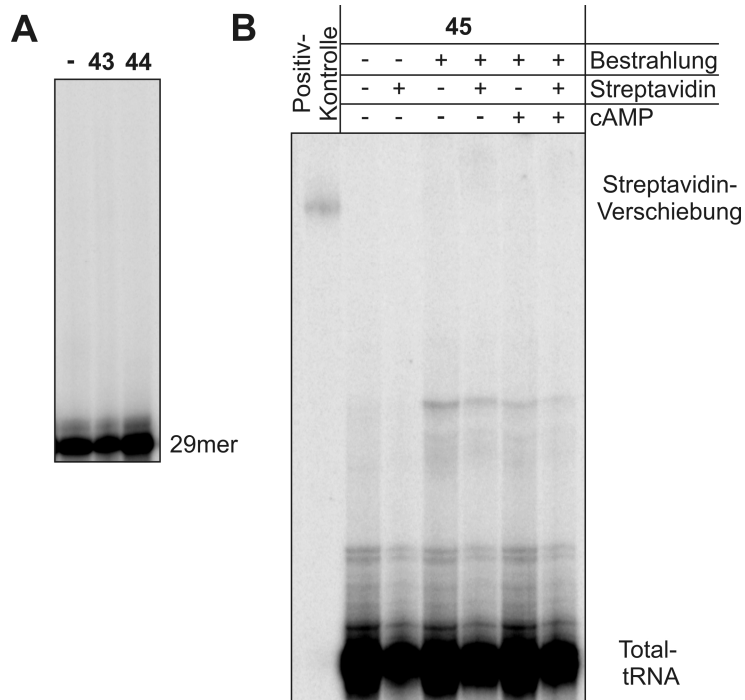


Abbildung 26: Photocrosslinking-Versuche von RNA-Sequenzen ohne Affinität zu cAMP. **A:** Ergebnis der Bestrahlung eines unstrukturierten 29mer mit **43** beziehungsweise **44**. „-“ stellt eine unbestrahlte Probe ohne Zusatz einer Photoaffinitätssonde dar. **B:** Ergebnis der Bestrahlung von ^{32}P -markierter Total-tRNA-Proben in Gegenwart der Sonde **45** mit verschiedenen Kontrollen.

Im nächsten Schritt wurde der Crosslink mit RNA-Sequenzen untersucht, die länger sind und eine komplexe Struktur haben. Beides ist von Bedeutung für die ABC Transkriptomanalyse. Eine komplexe Struktur eröffnet Möglichkeiten zu vielfältigen Wechselwirkungen mit kleinen Molekülen, zu denen unstrukturierte Sequenzen nicht in der Lage sind. Auch Stapelwechselwirkungen sind nur im Zusammenhang mit Oligonukleotiden zu untersuchen, die geordnete Strukturen ausbilden. Die Länge der Sequenzen ist insofern von Bedeutung, dass schwache Interaktionen mit bestimmten Basen oder dem Rückgrat der RNA zur Bildung von unspezifischen Crosslink-Produkten führen können, wie schon zuvor angedeutet wurde (siehe Kapitel 3.6). Bei kurzen Oligonukleotiden sind diese Produkte häufig nicht detektierbar, während sie mit zunehmender Länge der Sequenzen immer relevanter werden. Für Studien mit Total-RNA könnte dies zu einem Problem werden, da viele häufige, natürliche RNA-Spezies weitaus länger sind als die meisten bekannten Riboswitches.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Total-tRNA von *E. coli* mit ^{32}P radioaktiv markiert und auf ihre Fähigkeit hin überprüft, mit den cAMP-Photoaffinitätssonden zu reagieren (Abbildung 26B). tRNAs zählen zwar zu den vergleichsweise kurzen natürlichen

RNA-Sequenzen, sind aber dennoch ungefähr 2,5-fach so lang wie das cAMP-Aptamer. Außerdem kann der Crosslink weiterhin mit dem Gel-Assay untersucht werden, was bei einer Total-RNA nicht möglich wäre. Daraus ergibt sich eine gute Vergleichbarkeit mit den bisherigen Resultaten. Das Ergebnis zeigte nur sehr wenig Crosslink-Produkt (0,6 % – 0,8 %, je nach Sonde) sowie einige Banden, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, da sie einen zu großen Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität aufweisen, um Produkte einer Photoreaktion zwischen Sonde und tRNA zu sein (Abbildung 26B). Darüber hinaus ist der Anreicherungsfaktor im Gegensatz zum cAMP-Aptamer sehr klein (**43**: 1,4; **44** 1,7; **45**: 2,0). Die Entstehung der Banden ist somit nahezu unabhängig von der Gegenwart des cAMPs. Außerdem lassen sie sich nicht durch die Zugabe von Streptavidin verschieben, was beweist, dass kein Biotin in diesen Banden vorhanden ist und sie demnach keine Produkte einer Reaktion der RNA mit der Sonde sind³². Substanzen ohne Biotin werden jedoch im Verlauf der ABC Transkriptomanalyse nicht immobilisiert und sind daher nicht relevant.

Insgesamt lässt sich schließen, dass es sich bei dem beobachteten schwachen Crosslink um das Resultat einer unspezifischen Reaktion der tRNA handelt, die nicht von cAMP beeinflusst wird. Darüber hinaus ist die Interaktion so schwach, dass sie für die Durchführung eines Crosslink-Experimentes mit zellulärer RNA unproblematisch sein sollte.

Anschließend wurde untersucht, inwieweit die Gegenwart von „Fremd-RNA“ den spezifischen Crosslink mit dem cAMP-Aptamer beeinflusst. Dazu wurde das Aptamer mit der Total-tRNA aus *E. coli* in einem 1:1 Verhältnis gemischt und nach Zugabe der Photoaffinitätssonde bestrahlt (Abbildung 27)³³.

³² Eventuell könnte es sich um die Reaktion zweier tRNA-Sequenzen miteinander handeln beispielsweise durch eine Photoreaktion thiomodifizierter Nukleobasen. Diese Nukleobasen sind natürlicher Bestandteil der *E. coli* tRNA vor und reagieren im Gegensatz zu den unmodifizierten Nukleobasen bei Bestrahlung mit Licht von 310 nm Wellenlänge.

³³ Verhältnisse und Überschüsse werden in diesem Kapitel grundsätzlich als Verhältnisse der Massen zueinander angegeben. Während sich die Konzentration einer Oligonukleotid-Probe in µg/µl auch für komplexe Proben wie Total-tRNA und Total-RNA leicht bestimmen lässt, ist es nicht ohne Weiteres möglich und auch nicht immer sinnvoll, eine molare Konzentration für solche Proben anzugeben.

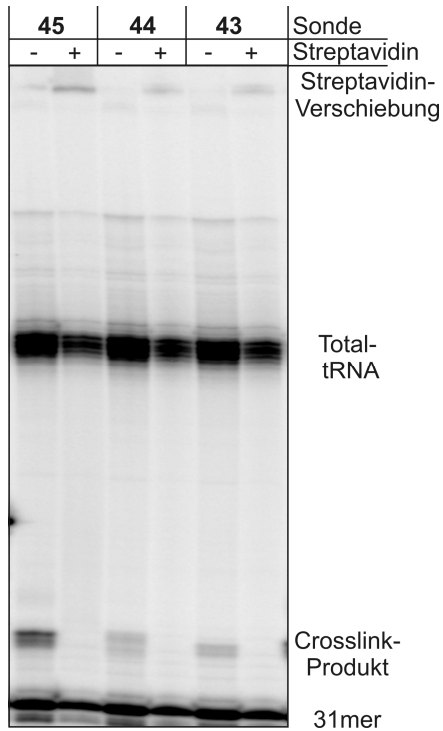


Abbildung 27: Analyse der Bestrahlung von 1:1-Gemischen aus dem cAMP-Aptamer (31mer) und der Total-tRNA aus *E. coli* (beide 5'-³²P-markiert) mit den Sonden **43**, **44** und **45**. Durch die Zugabe von Streptavidin wurden alle Reaktionsprodukte aus Photoaffinitätssonde und radioaktiv markierter RNA verschoben.

Bei allen drei Sonden ist die Crosslink-Effizienz für das cAMP-Aptamer unabhängig von der Anwesenheit der tRNA. Gleichzeitig zeigt auch die Total-tRNA in beiden Experimenten dasselbe Crosslink-Verhalten unabhängig von der Anwesenheit des Aptamers (vergleiche auch Abbildung 24 und Abbildung 26B). Die Sonden sind demnach in der Lage, zwischen einer „spezifischen“ und einer „unspezifischen“ RNA zu diskriminieren. Die Gegenwart von nicht-bindenden Sequenzen hat keinen Einfluss auf den spezifischen Crosslink.

3.7.3 Photoaffinitäts-Crosslinking mit einem Überschuss an nicht-bindender RNA

Die Untersuchung des Verhaltens in einer 1:1-Mischung ist nicht ausreichend, um eine natürliche Situation zu simulieren. Bei der Durchführung einer ABC Transkriptomanalyse ist damit zu rechnen, dass der bei weitem überwiegende Teil der Sequenzen keine spezifische Affinität zu der eingesetzten Sonde aufweist.

Um diesen Zustand nachzuahmen, wurde die Total-tRNA aus *E. coli* in einem 2000fachen Überschuss zum cAMP-Aptamer eingesetzt (Abbildung 28). Dies war in Crosslink-Experimenten mit der Sonde **44** problematisch, da der Crosslink in den Bereich des unspezifischen Hintergrundes reduziert wurde und sich nicht mehr entscheidend von der Inhibitionskontrolle abhob (Anreicherungsfaktor: 1.9).



Abbildung 28: Crosslink der Sonde **45** mit dem cAMP-Aptamer (^{32}P -markiert) in Gegenwart eines 2000fachen Überschusses an *E. coli* Total-tRNA (nicht radioaktiv).

Die Sonde **43** zeigte einen etwas besseren Anreicherungsfaktor von 5,8. Das beste Ergebnis wurde aber auch hier mit der Sonde **45** erzielt. Sie zeigt weiterhin eine Spezifität, die für eine ABC Transkriptomanalyse ausreichen sollte. Ein Vergleich der Intensitäten des Crosslink-Produktes in Abwesenheit und Anwesenheit von cAMP (Inhibitionskontrolle) ergibt einen Anreicherungsfaktor von 13,4.

Die Versuche zur Analyse der Spezifität des Crosslinks zeigen, dass es sich bei der Reaktion zwischen den cAMP-Photoaffinitätssonden und dem cAMP-Aptamer um eine in hohem Maße spezifische Reaktion handelt. Einerseits ist ein Überschuss an nativem Liganden (cAMP) in der Lage die Reaktion vollständig zu unterdrücken, was ein deutliches Zeichen dafür ist, dass cAMP und die Sonden dieselben Bindungsstellen am Aptamer besetzen. Zum anderen ist die Reaktivität der drei Photoaffinitätssonden gegenüber „unspezifischer“ RNA (Total-tRNA) auch in großen Mengen niedrig. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es sich bei der Reaktion zwischen den Photoaffinitätssonden und dem cAMP-Aptamer um einen spezifischen Crosslink handelt.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Anreicherung an Crosslink-Produkt in Gegenwart eines 2000fachen Überschusses an tRNA möglich ist. Dies verdeutlicht, dass die spezifische Reaktion effektiv genug ist, um einen großen Konzentrationsbereich abzudecken, was eine Voraussetzung für den Einsatz in einer ABC Transkriptomanalyse ist.

Diese Ergebnisse sowie die im vorangegangenen Kapitel besprochenen Crosslinks der Lysin-Photoaffinitätssonden sind die ersten Beispiele spezifischer bimolekularer Photocrosslinking-Reaktionen zwischen einem RNA-Oligonukleotid und einem kleinen Molekül. Bisher mussten die Reaktionspartner kovalent miteinander verbunden sein, um die lokale Konzentration so weit zu erhöhen, dass eine solche Reaktion an spezifischen Positionen der RNA möglich war (siehe Kapitel 1.2). Durch die spezifische Verknüpfung von Photoaffinitätssonden und RNA-Oligonukleotiden eröffnen sich vollkommen neue Wege zur Untersuchung von Interaktionen des Transkriptoms mit Metaboliten (siehe Kapitel 3.8).

3.7.4 Spezifisches Photocrosslinking eines cAMP-Aptamers in *E. coli* Total-RNA

Da die Tests mit einem Überschuss an tRNA in Bezug auf die Photoaffinitätssonde **45** gut verlaufen waren, wurde im nächsten Schritt die Situation simuliert, wie sie sich in einer ABC Transkriptomanalyse darstellt. Dafür wurde Total-RNA aus *E. coli* isoliert und in einem 50 – 50000fachen Überschuss dem cAMP-Aptamer zugesetzt (Abbildung 29A). Dies soll die natürliche Situation, in der ein Aptamer in Gegenwart eines großen Überschusses an Total-RNA vorliegt, nachahmen.

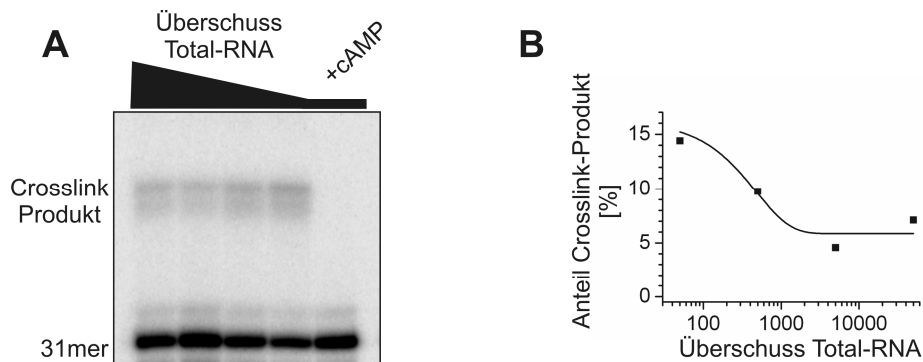


Abbildung 29: **A:** Analyse des Crosslinks der Sonde **45** mit dem cAMP-Aptamer (^{32}P -markiert) in Gegenwart verschieden großer Überschüsse an Total-RNA (nicht radioaktiv markiert). **B:** Graphische Darstellung des Anteils an Crosslink-Produkt in Abhängigkeit vom Überschuss an Total-RNA in der Probe. Die Trendlinie entspricht einem exponentiellen Fit, in den der Anteil des Produktes in Abwesenheit von Total-RNA miteinbezogen wurde.

Die Ergebnisse der Crosslink-Versuche mit **45** zeigen, dass die Effizienz des Crosslinks abhängig vom Überschuss an Total-RNA ist. Während das cAMP-Aptamer in Abwesenheit „unspezifischer“ Sequenzen einen Anreicherungsfaktor von 34,7 für die Sonde **45** hat, fällt dieser auf 28,8 bei einem 50fachen Überschuss an Total-RNA und auf ein Minimum 9,5 bei einem 5000fachen Überschuss (Abbildung 29B).

Dies ist ein Rückgang der Effizienz etwa um den Faktor drei. Dennoch ist festzuhalten, dass Anreicherungsfaktoren im Bereich von zehn nur von Sequenzen zu erreichen sind, die eine Sonde spezifisch binden können. Mit „unspezifischen“ Sequenzen wurde maximal ein Anreicherungsfaktor von 2,0 erreicht (bei Total-tRNA).

Daher kann der Schluss gezogen werden, dass es möglich ist, ein cAMP-Aptamer in einer Probe mit 50000fachem Überschuss an *E. coli* Total-RNA mittels Photocrosslinkings spezifisch mit einer Anreicherungsfunktion zu verknüpfen. Die Spezifität des Crosslinks beruht einzig auf der Kraft der Bindung des kleinen Moleküls an das Aptamer. Sie kann über

den Vergleich zweier Proben in Anwesenheit und Abwesenheit von cAMP als Anreicherungsfaktor quantifiziert werden.

3.8 Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse

3.8.1 Vorüberlegungen zur Sequenzanalyse und Entwicklung eines geeigneten Protokolls

In den vorangegangenen Abschnitten konnte in grundlegenden Modellversuchen gezeigt werden, dass der spezifische Crosslink einer Photoaffinitätssonde mit einem Aptamer in einer natürlichen Probe möglich ist (Abbildung 24B und Schema 11A).

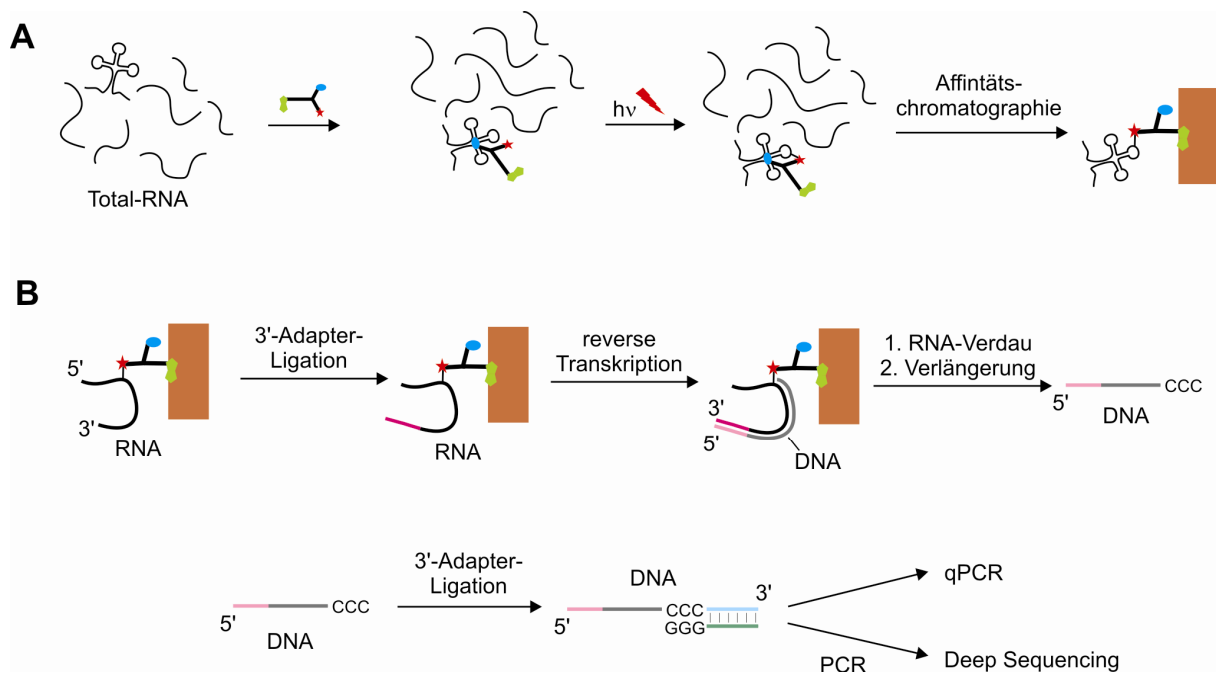
Der Erfolg dieser Reaktion ist jedoch nicht ausreichend, um ein Transkriptom auch tatsächlich analysieren zu können. Das Problem ist, dass sowohl für die reverse Transkription der separierten RNA in cDNA als auch für die nachfolgende PCR-Amplifizierung Primer-Bindestellen mit bekannter Sequenz benötigt werden. In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Einbringung solcher Primer-Bindestellen vor allem in Zusammenhang mit der Suche nach kleinen regulatorischen RNA-Spezies (miRNA, siRNA, u.ä.) schon beschrieben worden (siehe auch Kapitel 1.3) [58,172,173].

Bei RNA-Sequenzen, die über ein Photoaffinitäts-Crosslinking isoliert wurden, muss beachtet werden, dass die reverse Transkription an der Position des Crosslinks möglicherweise abbricht. Der sterische Block, der durch den Crosslink und die anschließende Immobilisierung an dieser Position eingeführt wird, kann vom Enzym in einigen Fällen nicht überlesen werden (Schema 11B, obere Zeile)³⁴ [51]. Dieses Abbruchverhalten führt dazu, dass es nicht sinnvoll ist, beide Primer-Bindestellen über Adaptoren auf der RNA-Ebene einzuführen, was ein übliches Vorgehen bei der Suche nach kleinen, nicht-kodierenden RNAs ist [173,176]. Im Falle der Einführung beider Adaptoren auf der RNA-Ebene wird der 5'-Adapter bei einem Abbruch der reversen Transkription nicht umgeschrieben und geht damit verloren. In der Folge können diese verkürzten Sequenzen auch in der anschließenden PCR nicht amplifiziert werden.

³⁴ Im Zusammenhang mit indirekten chemischen Probing-Verfahren wird exakt dieses Verhalten der reversen Transkriptase zur Strukturanalyse der RNA ausgenutzt. Bei Methoden wie DMS-Probing oder SHAPE werden sterische Blockaden chemisch eingeführt und die Abbruchprodukte der anschließenden reversen Transkription auf einem PAGE-Gel analysiert [155,174,175]

Aus diesem Grund wurde ein Protokoll entwickelt, bei dem zuerst der 3'-Adapter an die RNA ligiert wird. Im Anschluss an die nachfolgende reverse Transkription wird die zweite Primer-Bindestelle auf der cDNA-Ebene eingeführt (Schema 11B, untere Zeile)³⁵.

Im Detail stellt sich der Ablauf des Protokolls folgendermaßen dar: Durch das Photoaffinitäts-Crosslinking werden die „aktiven“ RNA-Sequenzen der Probe mit der Biotin-Anreicherungsfunktion der Sonde kovalent verbunden (Schema 11A). Anschließend erfolgt die Immobilisierung dieser Oligonukleotide auf Streptavidin-beschichteten Agarose-Kügelchen und ihre Separierung von den „inaktiven“ Sequenzen durch Wasch-Schritte unter stark denaturierenden Bedingungen.



Schema 11: Schematischer Ablauf einer ABC Transkriptomanalyse. **A:** Photoaffinitäts-Crosslinking mit einer Total-RNA-Probe und anschließende Immobilisierung. **B:** Schema des Protokolls zur Sequenzaufklärung und Quantifizierung der immobilisierten Oligonukleotide.

An den 3'-Terminus der immobilisierten Sequenzen wird mit Hilfe der verkürzten RNA-Ligase 2 (1-249; *RNA ligase 2, truncated*) ein präadenylierter Adapter ligiert, der am 3'-Ende chemisch blockiert ist, um Selbstligationen zu unterbinden [176]. In Abwesenheit von ATP ist die verkürzte RNA-Ligase 2 ausschließlich in der Lage, die präadenylierten Sequenzen zu verarbeiten und mit der RNA zu verbinden. Dies erzeugt spezifischere Produkte als andere Methoden der 3'-Adapter-Ligation, da Reaktionen einzelner 5'-phosphorylierter

³⁵ Das generelle Protokoll zur Einführung der Adaptoren wurde von M.-L. Winz entwickelt. Es wurde von mir für die in diesem Kapitel besprochenen Proben optimiert und angewendet.

RNA-Sequenzen, die Bestandteil der Probe sind, verhindert werden [177]. Im Anschluss daran wird die reverse Transkription auf der Festphase durchgeführt und das Produkt durch alkalischen Verdau der RNA freigesetzt.

Das 3'-Ende der cDNA, was dem komplementären 5'-Ende der RNA entspricht und demnach keinen Adapter enthält, wird mit Hilfe der terminalen Desoxynuklotidyl-Transferase (TdT) um drei bis vier Cytosin-Ribonukleotide verlängert (Schema 11B) [178]. Dadurch erhält der Terminus eine bekannte Sequenz und ein doppelsträngiger Adapter (Anker) mit einem Überhang von drei Guanotin-Nukleotiden kann mit Hilfe der DNA-Ligase 1 daran ligiert werden (Schema 11B) [179,180]. Dies ähnelt dem Vorgehen bei der cDNA-Bibliothekserzeugung nach der SMART-Methode von Clontech [181]. Von der direkten Ligation eines Adapters an die cDNA wurde nur vereinzelt berichtet [182], da alle üblichen Ligasen eine sehr geringe Aktivität bei einzelsträngiger DNA aufweisen.

Im Anschluss an die Ligation liegt eine einzelsträngige cDNA vor, die an beiden Enden eine bekannte Adaptersequenz enthält und über eine PCR amplifiziert werden kann (Schema 11B). Das in diesem Kapitel (3.8.1) vorgestellte Protokoll wird im Folgenden als Adapter-Ligations-Protokoll bezeichnet.

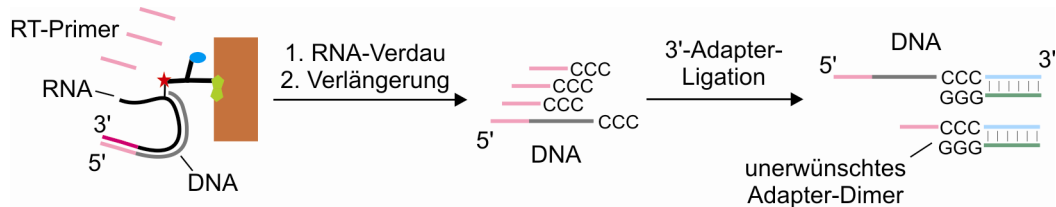
3.8.2 Funktionsbeweis des Crosslink-Adapter-Ligations-Protokolls

Vor der Analyse eines kompletten Transkriptoms wurde zuerst überprüft, ob die Anreicherung an Produkt zwischen einer Crosslink-Probe und der dazugehörigen Inhibitionskontrolle, die bei den Gel-Assays festgestellt wurde, im Verlauf des Adapter-Ligations-Protokolls tatsächlich erhalten bleibt.

Hierfür wurde eine Probe mit cAMP-Aptamer und der Sonde **45** sowie die entsprechende Inhibitionskontrolle (mit einem Überschuss an cAMP) bestrahlt und immobilisiert. Im Anschluss an das Adapter-Ligations-Protokoll wurde eine qPCR mit den Proben durchgeführt, um das Verhältnis an isoliertem Aptamer in beiden Proben bestimmen zu können. Dies sollte im Bereich der zuvor berechneten Anreicherungsfaktoren liegen. In vorbereitenden Versuchen wurden verschiedene Primer getestet, um eine geeignete Kombination zu finden, die insbesondere auch in der Lage sein sollte abzubilden, dass das Aptamer mit beiden Adaptoren versehen wurde. Insofern eigneten sich jene Primer nicht, die ausschließlich spezifisch für die Aptamer-Sequenz sind. Genauso wenig geeignet zur Quantifizierung sind jedoch auch die Adapter-spezifischen Primer.

Ein Grund hierfür liegt im Ablauf des Protokolls. Im Anschluss an die reverse Transkription ist es nicht möglich, den dafür verwendeten RT-Primer restlos zu entfernen. Verbleibender

Primer kann jedoch genau wie die RNA der Probe durch TdT enzymatisch mit mehreren Cytosin-Nukleotiden verlängert und anschließend in der Ligation mit dem Anker verbunden werden. Dadurch entsteht ein Adapter-Dimer (Schema 12)³⁶.

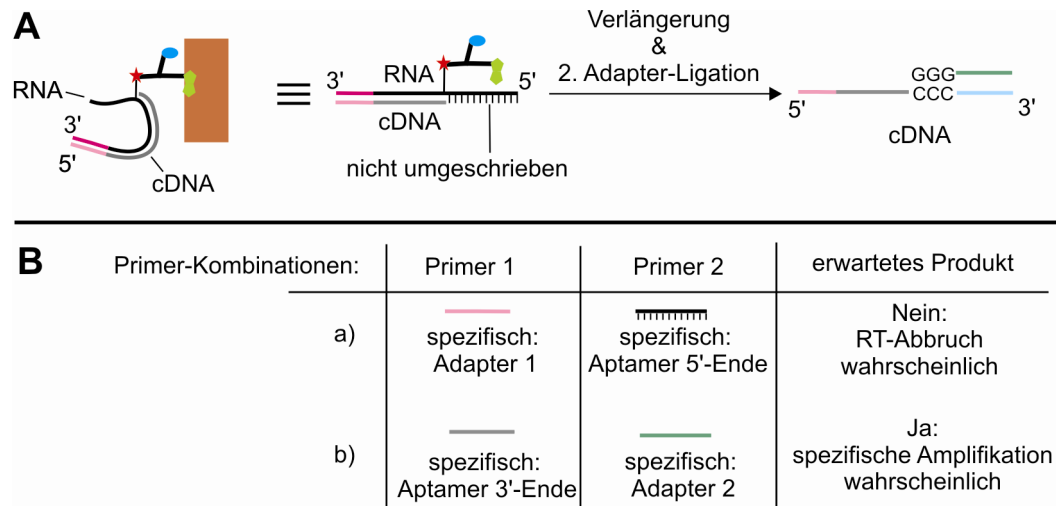


Schema 12: Schematische Darstellung der Herkunft von Adapter-Dimeren durch enzymatische Verlängerung des RT-Primers und anschließende Ligation an den Anker.

Durch intensives Waschen der Festphase und einen Exonuklease-Verdau kann dieses zwar reduziert, aber nicht vollständig unterdrückt werden. Außerdem tragen bei einer ABC Transkriptomanalyse alle Sequenzen, die während des Crosslinkings mit der Sonde verbunden wurden, beide Adaptoren. Daher kann bei einer qPCR mit Adapter-spezifischen Primern kein spezifisches Amplifikationsprodukt entstehen. Aus diesen Überlegungen folgt, dass eine Kombination aus einem Aptamer-spezifischen und einem Adapter-spezifischen Primer verwendet werden muss, um die Fragestellung zu beantworten.

In Schema 13 ist zu sehen, dass eine der beiden möglichen Kombinationen gegenüber der anderen zu bevorzugen ist. Der Hauptgrund ist der zu erwartende Abbruch der reversen Transkription als Folge des Crosslinks und der Immobilisierung. Dadurch wird ein Teil der RNA nicht in cDNA umgeschrieben (Schema 13A).

³⁶ Dieses Adapter-Dimer darf nicht mit einem Primer-Dimer verwechselt werden, wie es bei einer PCR mit schlecht gewählter Primer-Kombination auftreten kann.



Schema 13: Erläuterung der Wahl der Primer-Kombination zur Durchführung einer qPCR.

A: Schematische Darstellung des Abbruchs der reversen Transkription und nachfolgende Prozessierung der cDNA. **B:** Mögliche Primer-Kombinationen für die qPCR.

Diese Verkürzung kann so stark sein, dass ein Primer, der das 5'-Ende der RNA repräsentiert und somit revers-komplementär zum 3'-Ende der cDNA ist, nicht binden kann (Schema 13B, Primer Kombination a).

Bei der Verwendung eines Primers, der spezifisch für das 3'-Ende des Aptamers ist, besteht eine größere Wahrscheinlichkeit, dass der entsprechende Abschnitt der RNA vorliegt, da dieser bei der reversen Transkription zuerst umgeschrieben wird und somit seltener von einem Abbruch betroffen ist. Da der zweite Primer in dieser Kombination revers komplementär zum zweiten Adapter ist, wird mit dieser qPCR gleichzeitig der Erfolg des Adapter-Ligations-Protokolls überprüft (Schema 13B, Primer Kombination b).

Eine im Vorfeld der qPCR durchgeführte Test-Amplifizierung der cDNA konnte die Hypothese für diesen speziellen Fall bestätigen. Nur mit dem letztgenannten Set an Primern konnte ein spezifisches PCR-Produkt detektiert werden. Der Verlauf der dazugehörigen qPCR ist in Abbildung 30A zu sehen³⁷. Mit einer relativen Quantifizierung, die der Pfaffl-Methode [183] ähnelt, wurde berechnet, dass in der Probe ohne cAMP 33,7mal soviel Zielsequenz vorlag wie in der Inhibitionskontrolle mit cAMP (Abbildung 30B).

³⁷ Alle in dieser Arbeit beschriebenen qPCRs wurden unter Beachtung der MIQE-Richtlinien durchgeführt (siehe auch Kapitel 5.2.7) [60].

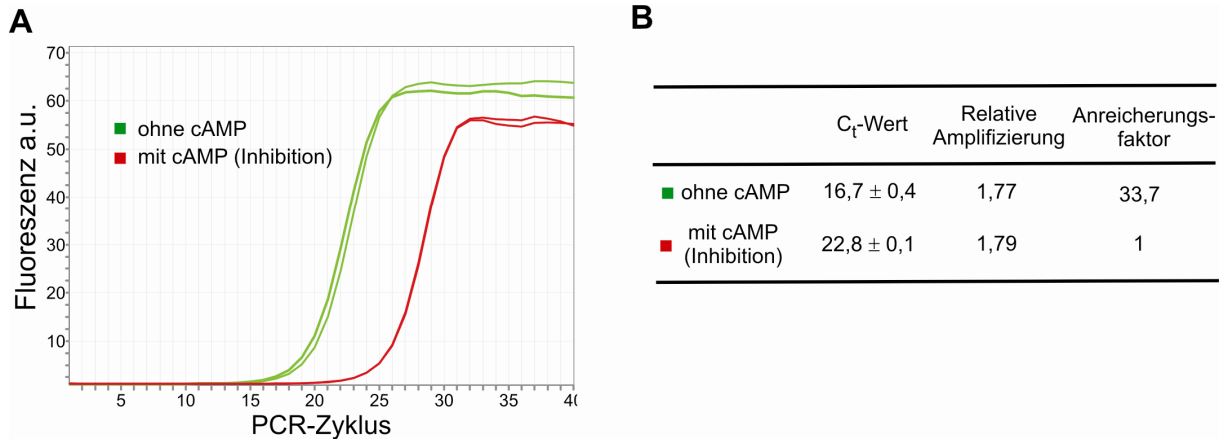


Abbildung 30: qPCR von zwei Proben des cAMP-Aptamers nach Photoaffinitäts-Crosslinking und Adapter-Ligations-Protokoll. **A:** qPCR-Resultat mit Primer-Kombination b) (Schema 13B) für die Crosslink-Probe (grün) und die Inhibitionskontrolle (rot). **B:** Tabelle mit wichtigen Kennzahlen der qPCR, berechnet mit dem „Comparative Quantitation Analysis“-Algorithmus der RotorGene 6000 Series Software Version 1.7.

Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem im Gel-Assay bestimmten Anreicherungsfaktor von 33,9. Eine Analyse der Schmelzpunkte zeigte die Bildung eines einzelnen, spezifischen Produktes. Das Adapter-Ligations-Protokoll ändert demnach nichts an den Verhältnissen zwischen der Crosslink-Probe und der Inhibitionskontrolle.

Die Quantifizierung auf diese Weise ist jedoch nicht unproblematisch. Dadurch dass die einzige Sequenz in den Proben die des Aptamers ist, fehlt ein Bezugspunkt, der eine korrekte Aussage über die Verhältnisse erlauben würde. Eine Korrektur, wie sie üblicherweise über ein Referenz- oder *Housekeeping*-Gen gemacht wird, ist daher bei den vorliegenden Proben nicht möglich. Dem Mangel an Korrekturmöglichkeiten wurde in einem Anschlussexperiment Rechnung getragen.

3.8.3 Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse eines *E. coli*-Transkriptoms mit Zusatz einer Positivkontrolle

Aus *E. coli* wurde Total-RNA isoliert und diese mit einem Anteil an cAMP-Aptamer gemischt. Die Probe wurde halbiert, um Unterschiede in der Startkonzentration so gering wie möglich zu halten. Dadurch muss das verwendete Referenzgen nicht wie bei Gen-Expressionsanalysen biologische Unterschiede zwischen den Proben ausgleichen, sondern nur Differenzen, die im Verlauf des Protokolls entstehen, korrigieren. Den Proben wurde wie im vorangegangenen Experiment die Photoaffinitätssonde und im Falle der Inhibitionskontrolle ein Überschuss an cAMP zugegeben. Beide Proben wurden bestrahlt und immobilisiert.

Nach dem Adapter-Ligations-Protokoll wurde wie oben beschrieben eine qPCR durchgeführt. Zusätzlich zu der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Kombination aus Adapter- und Aptamer-spezifischen Primern wurde ein Primerpaar eingesetzt, das einen Teil der 16S rRNA von *E. coli* amplifiziert. Die Verwendung von rRNA als Referenz bietet sich aus mehreren Gründen an: Zum einen wurde sie bereits in der Literatur zur Korrektur von qPCRs verwendet [184,185], zum anderen wird rRNA in großer Kopienzahl transkribiert. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass einige Sequenzen unspezifisch mit der Photoaffinitätssonde reagieren und immobilisiert werden. Außerdem kann man davon ausgehen, dass sich rRNA vollständig indifferent gegenüber cAMP verhält, so dass eine Beeinflussung des Crosslinks durch die Zugabe von cAMP sehr unwahrscheinlich erscheint.

Die Versuche ergaben, dass der C_t -Wert für die rRNA unabhängig von der Anwesenheit von cAMP war (Abbildung 31A, B). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass cAMP keinen Einfluss auf die Reaktivität der *E. coli* 16S rRNA hat. Somit kann sie als Referenz für die Quantifizierung des cAMP-Aptamers dienen. Für beide Primer-Kombinationen liegen die C_t -Werte deutlich über denen für eine unspezifische Amplifikation. In Kontrollen ohne Templat wurde für die Primer der rRNA ein C_t -Wert von $33,2 \pm 0,5$ berechnet, für das Aptamer ein C_t -Wert von 36 ± 2 . In Kontrollen ohne Primer wurde überhaupt kein Anstieg der Fluoreszenz gemessen³⁸. Die C_t -Werte der rRNA konnten durch ein Experiment bestätigt werden, bei dem Crosslinking und Adapter-Ligations-Protokoll ausschließlich mit *E. coli* Total-RNA durchgeführt wurde. Eine Störung durch die Anwesenheit des cAMP-Aptamers als Positivkontrolle kann damit ausgeschlossen werden.

Für das cAMP-Aptamer konnte im qPCR-Versuch in Abwesenheit von cAMP nach einer Korrektur über das Referenzgen 16,6mal mehr Sequenz nachgewiesen werden als in Anwesenheit des Nukleotids (Abbildung 31A und C).

³⁸ Diese Kontrollen waren nötig, da sich noch Anker-Sequenzen aus der zweiten Adapter-Ligation in der Templatlösung befanden, die identisch mit einem der PCR-Primer sind. Wie aber auch die qPCR-Ergebnisse zeigten, war die Konzentration dieser Sequenzen so niedrig, dass keine störenden Effekte von ihnen ausgehen.

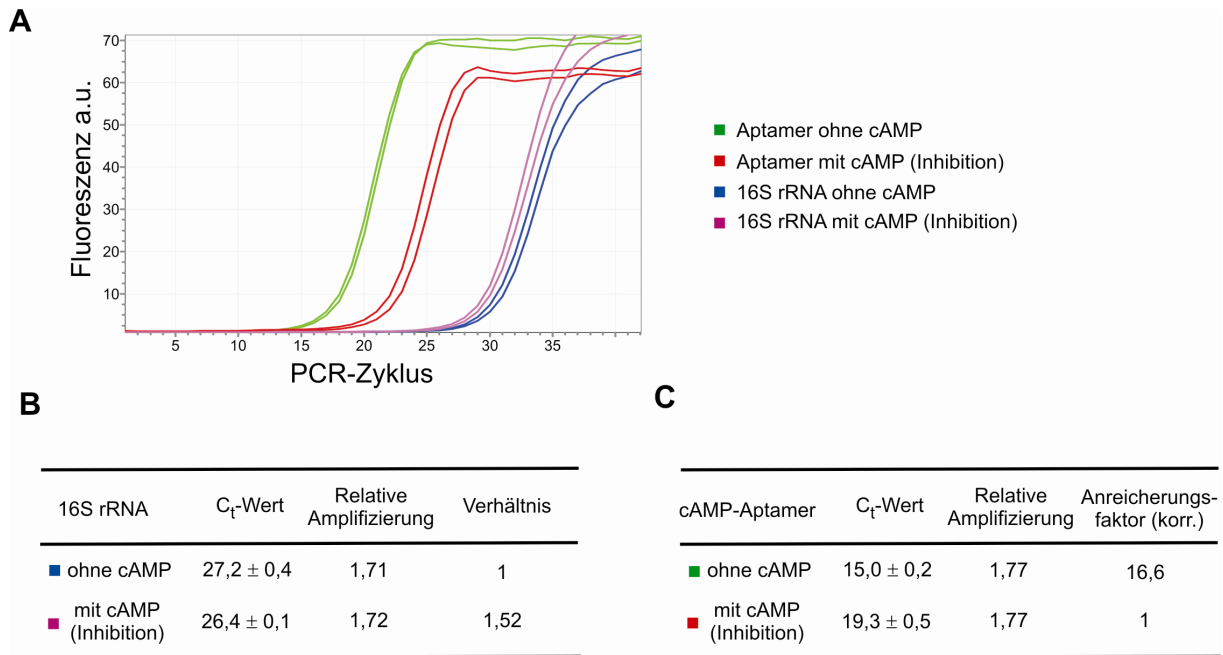


Abbildung 31: qPCR einer ABC Transkriptomanalyse mit Zugabe einer Positivkontrolle. **A:** qPCR-Resultat (Duplikate) mit Primer-Kombination b) (Schema 13B) (grün und rot) beziehungsweise mit genspezifischen Primern für die 16S rRNA (Referenzgen) (blau und rosa). Jeweils eine qPCR für die Crosslink-Probe (grün und blau) und die Inhibitionskontrolle (rot und rosa). **B:** Tabelle mit wichtigen Kennzahlen der qPCR für das Referenzgen. **C:** Tabelle mit wichtigen Kennzahlen der qPCR für das cAMP-Aptamer. Die Anreicherungs-faktoren wurden mit Hilfe des Referenzgens korrigiert.

Wie bei den Proben mit der isolierten Aptamer-Sequenz wurde auch in Gegenwart von Total-RNA die Positivkontrolle angereichert. Außerdem konnte die qPCR die Ergebnisse der Gel-Assays bestätigen, dass nämlich die Anreicherung der Aptamer-Sequenz bei einem Überschuss an Total-RNA weniger stark, aber dennoch groß genug ist (vergleiche Kapitel 3.7.4).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse somit, dass es möglich ist, ein RNA-Aptamer mittels Photoaffinitäts-Crosslinking selektiv in einer Probe natürlicher RNA anzureichern. Primer-Bindestellen zur PCR-Amplifizierung und nachfolgenden Sequenzanalyse wurden über ein Adapter-Ligations-Protokoll eingeführt. In einer qPCR konnte schließlich nachgewiesen werden, dass sowohl die Ligation beider Adapter effektiv ist als auch die Anreicherungs-faktoren der Treffersequenzen im Vergleich der Probe mit einer Inhibitionskontrolle im Verlauf des Protokolls nicht verändert werden.

Der Funktionsbeweis des Protokolls zur ABC Transkriptomanalyse, bestehend aus Photoaffinitäts-Crosslinking, Immobilisierung und einem Adapter-Ligations-Protokoll mit reverser Transkription, konnte somit erbracht werden.

3.8.4 Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse eines Maus-Transkriptoms mit Zusatz einer Positivkontrolle

Um einen tieferen Einblick in das cAMP-bindende Transkriptom einer Spezies zu bekommen, ist es nötig, eine Sequenzierung der Probe und der Inhibitionskontrolle mit den Methoden des „*next generation sequencings*“ [186] durchzuführen. Durch diese Einzelmolekül-Sequenzierungs-Techniken ist es möglich, die Zusammensetzung eines Transkriptoms beziehungsweise der entsprechenden cDNA-Bibliothek mit einer Genauigkeit abzubilden, die mit einer herkömmlichen Klonierung und der anschließenden Sequenzierung unerreichbar wäre.

Dieses „*deep sequencing*“ kann an der Universität Heidelberg in der „Core Facility“ durchgeführt werden. In den Gesprächen mit den zuständigen Mitarbeitern zeigte sich, dass die Analyse eines eukaryotischen Transkriptoms mit den dort zur Verfügung stehenden Mitteln einfacher zu bewerkstelligen ist als die einer prokaryotischen Probe. Außerdem ist cAMP in prokaryotischen Organismen zwar beispielsweise als „Hungersignal“ bekannt [187,188], seine Rolle als sekundärer Botenstoff (*second messenger*) in Eukaryoten ist aber weitaus bedeutender [189]. Dies lässt eine Interaktion von RNA mit diesem Molekül in eukaryotischen Spezies wahrscheinlicher erscheinen.

Aus diesem Grund wurde für den Funktionsbeweis des Protokolls eine Isolation von Total-RNA aus Mäuseleber durchgeführt. Die Probe wurde wie zuvor die *E. coli* Total-RNA mit dem cAMP-Aptamer als Positivkontrolle versetzt. Die Konzentration der Total-RNA (ca. 3,5 µg/µl in 100 µl Probe) entspricht in diesen Versuchen den Proteinkonzentrationen, die für analoge AfBPP-Experimente vom Hersteller der Photoaffinitätssonden empfohlen werden (2 - 5 µg/µl in 100 µl Probe; C8-cAMP caproKit™ „OffBead“ *Protocol for Capturing in Solution*; Caprotec). Außerdem ist die Konzentration der Positivkontrolle (50 nM, entspricht ca. 500 pg/µl) in einem solchen Maß gesenkt worden, dass sie schließlich in einem Bereich liegt, der für natürlich vorkommende, Metaboliten-bindende RNA-Sequenzen realistischer erscheint. Einen Wert hierfür abzuschätzen ist aber schwierig, da Studien zur Kopienzahl von Riboswitches meines Wissens bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Durch diese Anpassungen wurde der Überschuss an Total-RNA über das Aptamer von 7,5fach (bei *E. coli*) auf 7000fach erhöht.

Wie zuvor bei den prokaryotischen Proben wurde auch diese Probe halbiert und jeweils mit der Photoaffinitätssonde **45** sowie im Fall der Inhibitionskontrolle mit einem Überschuss an cAMP versetzt. Nach der Bestrahlung und der anschließenden Immobilisierung wurde das Adapter-Ligations-Protokoll auf die Proben angewendet. Im Anschluss konnten die Proben analog zum oben beschriebenen Vorgehen mittels qPCR analysiert werden (Abbildung 32A).

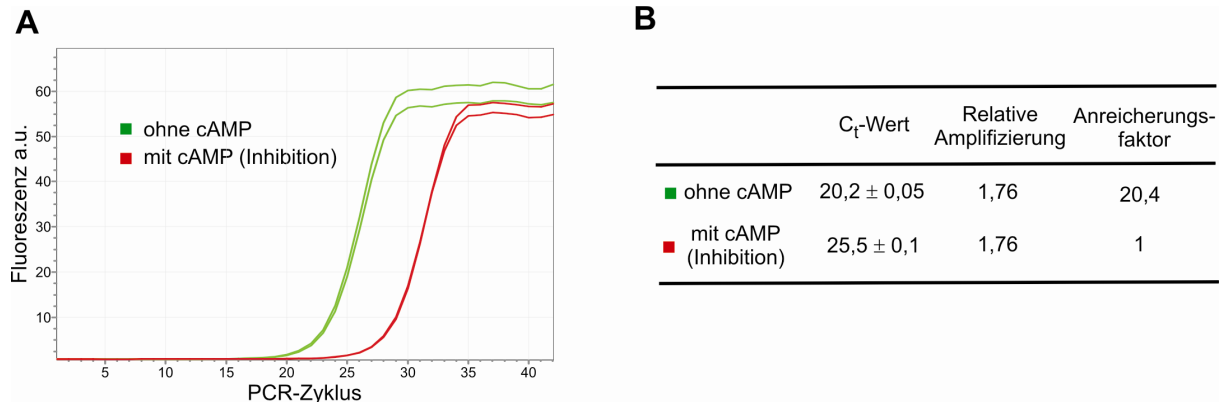


Abbildung 32: qPCR-Resultate einer ABC Analyse des Maus-Transkriptoms mit Zugabe einer Positivkontrolle. **A:** qPCR-Resultat mit Primer-Kombination b) (Schema 13B) für die Crosslink-Probe (grün) und die Inhibitionskontrolle (rot). **B:** Tabelle mit wichtigen Kennzahlen der qPCR für das Referenzgen.

In diesem Fall wurde in den Proben ohne cAMP 20,4mal mehr cAMP-Aptamer detektiert als in den Vergleichsproben, bei denen der spezifische Crosslink durch die Zugabe von cAMP unterdrückt wurde (Abbildung 32B).

Die Anreicherung einer cAMP-bindenden RNA-Sequenz ist demnach auch in einer eukaryotischen Probe unter weitaus drastischeren Bedingungen (geringere Konzentration an Positivkontrolle bei gleichzeitig erhöhter Total-RNA-Konzentration) möglich.

Für die Analyse aller Sequenzen des Transkriptoms wurde die cDNA, die aus der zweiten Adapter-Ligation erhalten wurde, mit den Adapter-spezifischen Primern PCR-amplifiziert und bei der „Deep Sequencing Facility“ der Universität Heidelberg zur Analyse in Auftrag gegeben³⁹. Die Ergebnisse dieser Sequenzanalyse stehen allerdings noch aus. Diese sollten mit einer exakteren Bestimmung der Anreicherungsfaktoren einhergehen. So können beispielsweise multiple Referenzgene gewählt werden, um die Quantifizierung in der qPCR zu verbessern [190].

³⁹ Mit Hilfe einer qPCR konnte abgeschätzt werden, dass eine PCR-Amplifizierung keinen Einfluss auf den Anreicherungsfaktor hat.

Außerdem können Sequenzen identifiziert werden, die in der Probe ohne cAMP gegenüber der Inhibitionskontrolle angereichert wurden. Überschreitet der Anreicherungsfaktor einen gewissen Grenzwert, so deutet dies auf eine spezifische Interaktion des cAMP mit der entsprechenden Sequenz hin, welche nachfolgend mittels qPCR und weiterer biochemischer und molekularbiologischer Methoden verifiziert und charakterisiert werden muss.

3.9 Direkte Strukturanalyse modifizierter RNA mit fluoreszentem In-Line Probing [191]

In den vorangegangenen Kapiteln wurde unter anderem beschrieben, wie chemische Probingverfahren zur Untersuchung von strukturierter RNA beziehungsweise zur Analyse der Bindung von kleinen Molekülen an RNA verwendet werden können. Normalerweise wird die zu untersuchende RNA hierfür an einem Terminus radioaktiv markiert und die beim Probing entstehenden Spaltprodukte über eine Gelelektrophorese analysiert. In den letzten Jahren hat jedoch die Zahl an Fluoreszenz-Studien zur Strukturaufklärung von RNA-Sequenzen stark zugenommen (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.9)⁴⁰. Auch andere Modifikationen, wie zum Beispiel photospaltbare Schutzgruppen oder unnatürliche Basen und Zucker zur Erweiterung und Veränderung der molekularen Charakteristika von RNA haben mehr und mehr Einzug gehalten, nicht zuletzt auch in der medizinischen Chemie [112,192,193]. Oftmals wird aber nur angenommen, dass in den hochgradig modifizierten Oligonukleotiden die Eigenschaften der unmodifizierten Ausgangssequenzen erhalten bleiben. In den meisten Fällen wird nicht durch unabhängige Tests untersucht, welchen Einfluss diese Modifikationen auf die Struktur des Oligonukleotids haben. Aufgrund dieser Entwicklung besteht ein Bedarf an neuen Methoden, die es ermöglichen, Aussagen über die Struktur der modifizierten Sequenz zu machen.

Ziel der folgenden Abschnitte ist es somit, zuerst nachzuweisen, ob eine Fluoreszenzmarkierung in der Lage ist, dieselben Ergebnisse in einem In-Line Probing-Versuch zu erzielen, wie die üblicherweise verwendeten ³²P-Radioaktivmarkierungen (Kapitel 3.9.1). Gelingt dies, so soll im Folgenden untersucht werden, ob es möglich ist, mittels bereits in der Sequenz befindlicher Fluoreszenzfarbstoffe Aussagen darüber zu treffen, inwiefern diese Markierungen die native Struktur der RNA-Sequenz beeinflussen (Kapitel 3.9.2). Bei diesen Versuchen wird die Komplexität der Markierungen sukzessive

⁴⁰ Unter den Stichworten „FRET RNA“ findet man bei einer SciFinder-Themensuche einen stetigen Anstieg der Publikationstätigkeit von jährlich zwei Publikationen 1998 bis auf 48 Veröffentlichungen 2010.

gesteigert. Schließlich sollen Oligonukleotide untersucht werden, deren Struktur mit Hilfe von photospaltbaren Schutzgruppen absichtlich gestört wurde (Kapitel 3.9.3). Dabei ist es von besonderem Interesse nachzuweisen, ob tatsächlich die Strukturelemente gestört werden, die der Planung der Konstrukte zu Grunde lagen.

3.9.1 Austausch endständiger ^{32}P -Markierungen in einfachen Probing-Experimenten

Um zu überprüfen, ob der Austausch einer endständigen Radioaktivmarkierung durch einen fluoreszenten Farbstoff dieselben Ergebnisse liefert, wurde ein In-Line Probing-Experiment mit dem 179mer Riboswitch-Aptamer des *lysC* Gens von *B. subtilis* durchgeführt. Da dieses Aptamer wie in Kapitel 1.6 beschrieben eine vorgeformte Bindungstasche besitzt, ändert sich die Intensität der Spaltung in einem In-Line Probing-Experiment nur bei den Nukleotiden, die sich in direkter Nachbarschaft zum Lysin befinden oder aktiv an der Bindung des Liganden teilnehmen. Die Detektion dieser vergleichsweise kleinen Änderungen bei einem der längsten, bekannten natürlichen Riboswitches ist eine größere Herausforderung als die Detektion globaler Umfaltungsvorgänge, wie sie bei anderen natürlichen Riboswitch-Aptameren im Fall einer Ligandenbindung beobachtet werden [194].

Der Riboswitch wurde über *in vitro* Transkription hergestellt und am 5'-Terminus mit Atto 633 oder ^{32}P markiert. Diese beiden Sequenzen wurden in einem In-Line Probing-Experiment mit unterschiedlichen Konzentrationen an *L*-Lysin getestet (1 nM – 1 mM). Wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, konnte aus dem resultierenden Spaltungsmuster die Dissoziationskonstante des Liganden berechnet werden (Abbildung 33a und b).

Die Daten, die mit der Fluoreszenz- beziehungsweise Radioaktivmarkierung ermittelt wurden, stimmen gut miteinander und mit den Literaturwerten überein [98]. Das Spaltungsmuster war im Fall der Fluoreszenzmarkierung stabil und reproduzierbar. Die drei Regionen, in denen sich die Spaltung aufgrund steigender Lysin-Konzentrationen ändert, sind in beiden Fällen identisch.

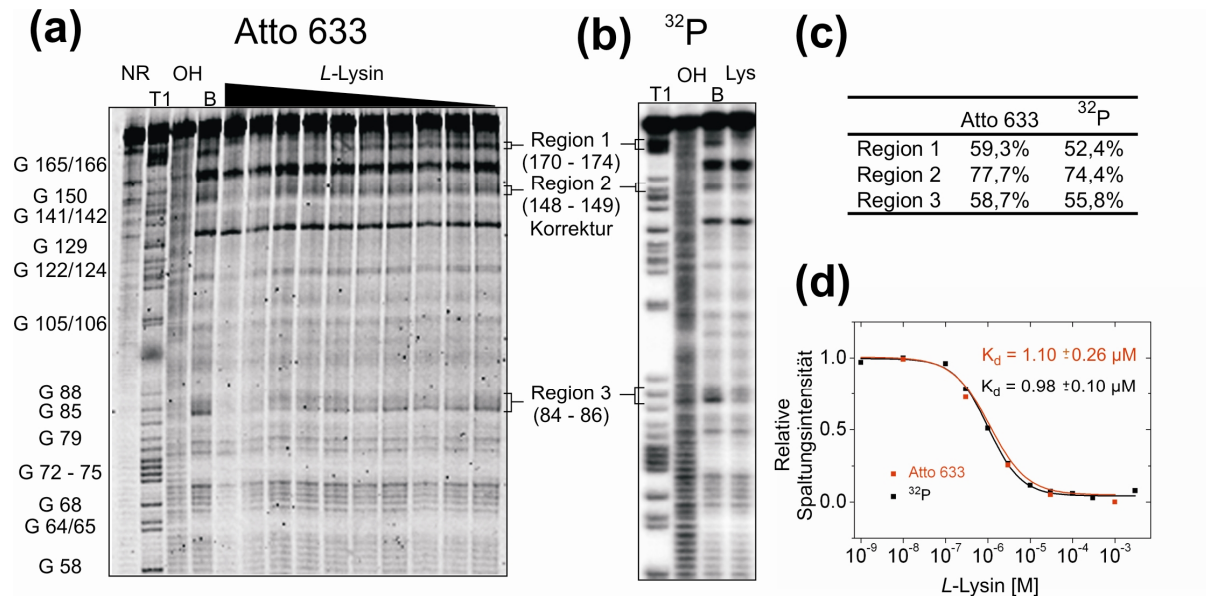


Abbildung 33: Vergleich einer Fluoreszenzmarkierung mit einer radioaktiven ^{32}P -Markierung in einer Riboswitch-Bindungs-Studie: **(a)** In-Line Probing-Analyse eines 5'-Atto 633-markierten *lysC* Lysin-Riboswitch-Aptamers aus *B. subtilis*. Die Reaktion wurde in Abwesenheit (Spur B) oder Anwesenheit von *L*-Lysin (1 nM – 1 mM) durchgeführt. NR, T1 und OH sind Spalten mit unbehandelter RNA, einer G-spezifischen Sequenzleiter und einem partiellen alkalischen Verdau. Ausgewählte Banden der T1-Leiter sind der jeweiligen Nukleotidposition zugeordnet (vergleiche Abbildung 16). Die Regionen 1-3 repräsentieren Stellen, an denen sich die spontane Spaltung mit der Lysin-Konzentration ändert. **(b)** In-Line Probing Analyse des 5'- ^{32}P -markierten Aptamers. „Lys“ entspricht einem Versuch in Gegenwart von 1 mM *L*-Lysin. **(c)** Vergleich der Spaltungsintensitäten in allen drei Regionen Lysin-induzierter Spaltungsmodulation. Für beide Markierungen wurde die Intensität der Spaltungsbanden in Gegenwart von 1 mM *L*-Lysin durch die Spaltungsintensität in Abwesenheit des Liganden geteilt (im Anschluss an eine Hintergrundkorrektur). **(d)** Graph der relativen Spaltungsintensitäten (korrigiert auf Ladungsunterschiede mit Hilfe der starken Lysin-unabhängigen Spaltungsbande, die mit „Korrektur“ beschriftet ist, und normalisiert) in Region 1 für beide Markierungen (^{32}P in schwarz, Atto 633 in rot) gegen die Konzentration an *L*-Lysin.

Die Intensitätsabschwächung, die in diesen drei Regionen beobachtet wird, ist für beide Markierungen ähnlich stark (Abbildung 33c). In Abbildung 33d ist die Bestimmung der Dissoziationskonstante zu sehen. Für die fluoreszente Markierung wurde ein K_d -Wert von $(1,10 \pm 0,26) \mu\text{M}$ errechnet, was gut mit dem für ^{32}P ermittelten Wert von $(0,98 \pm 0,10) \mu\text{M}$ und mit den publizierten Daten ($1 \mu\text{M}$) übereinstimmt [96].

Die Ergebnisse zeigen, dass Fluoreszenz-Markierungen für Bindungsstudien von Liganden an große RNA-Aptamere geeignet sind und die Ergebnisse mit denen übereinstimmen, die mit Radioaktivmarkierungen erhalten werden.

3.9.2 Fluoreszentes Probing mit stark modifizierten, strukturierten kleinen Ribozymen

In jüngster Vergangenheit ist die Untersuchung der Faltung von Riboswitches mittels Fluoreszenzspektroskopie in den Fokus des Interesses gerückt [117,118]. Dies ist bei Riboswitches von besonderer Bedeutung, da Änderungen in der Faltung einen direkten Einfluss auf die Genexpression haben. Aus diesem Grund sollte anhand eines Modellsystems gezeigt werden, dass Konstrukte, die für derartige Studien geeignet sind, mit fluoreszentem In-Line Probing analysiert werden und Aussagen über den (unerwünschten) Einfluss der Markierungen auf die Struktur gemacht werden können.

Als Modellsystem für eine RNA-Sequenz, die in der Lage ist, kleine Moleküle zu binden, diente ein Diels-Alderase (DAse) Ribozym [108]. Die DAse ist, wie in der Einleitung dargelegt, ein kleines, kompaktes und hochstrukturiertes Ribozym, welches eine Cycloaddition zwischen einem Anthracen und einem Maleimid katalysiert [108]. Im Arbeitskreis Jäschke wurden bereits strukturelle und dynamische Fragestellungen erfolgreich bearbeitet, unter anderem durch die Einbringung von Fluoreszenzfarbstoffen für FRET-Messungen [113,114].

Die Information, die man bei der direkten Analyse einer Fluoreszenzmarkierung erhalten könnte, wäre hilfreich für die Auswahl der optimalen Position einer Markierung, bei der die dreidimensionale Struktur der RNA weiterhin intakt ist und die RNA voll funktionsfähig bleibt. Kleine, lokale Veränderungen können nicht direkt durch eine Änderung der FRET-Effizienzen beobachtet werden, da die globale Faltung größtenteils unverändert bleibt. Im Gegensatz dazu sind In-Line Probing-Experimente in der Lage, Informationen auf Einzelnukleotidebene zu liefern und können somit kleine Störungen der RNA-Feinstruktur auflösen.

Mit Ausnahme des unmodifizierten Ribozyms, welches zur Radioaktivmarkierung verwendet wurde, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten DAse-Konstrukte von A. Nierth und M. Singer (im Falle der photogeschützten Konstrukte) geplant und hergestellt [112,195,196]. Zusätzlich zu zwei Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 und Cy5) enthalten alle Sequenzen eine Biotin-Modifikation am 3'-Ende (Abbildung 34a). Die Positionen der Farbstoffe wurden so ausgewählt, dass sie Einblicke in die Rolle unterschiedlicher Strukturelemente des Ribozyms im Rahmen von Einzelmolekül-FRET-Studien geben können. Auch wenn, wie im vorliegenden Fall, die Farbstoffpositionen mit Hilfe einer hochaufgelösten Kristallstruktur ausgewählt wurden, ist es nicht möglich vorherzusagen, welche der Positionen einen unerwünschten Einfluss auf die Struktur des Ribozyms haben könnten. Tatsächlich führten Aktivitätsmessungen, die mit diesen FRET-markierten DAse-Ribozymen durchgeführt wurden, zum Teil zu überraschenden Ergebnissen [195].

3.9.2.1 In-Line Probing von Konstrukten mit zwei terminalen Markierungen

Die meisten der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte sind an beiden Enden chemisch modifiziert und daher nicht ohne Schwierigkeiten radioaktiv markierbar, da die ^{32}P -Markierung mit den Standardmethoden an einem der Enden eingeführt wird. In diesen Fällen sind die Fluoreszenzmarkierungen, die sich schon in der Sequenz befinden, die einzige Möglichkeit, um strukturelle Daten im Rahmen eines In-Line Probing zu erhalten. Mit allen Ribozym-Konstrukten wurden In-Line Probing-Experimente bei drei verschiedenen Konzentrationen von Magnesium-Ionen durchgeführt (Abbildung 34d). In Abwesenheit von Magnesium-Ionen ist das Ribozym inaktiv, da sich die Tertiärstruktur nicht korrekt ausbildet. 80 mM ist die Konzentration, bei der alle üblichen Untersuchungen der Ribozyme (zum Beispiel Aktivitätsmessungen oder smFRET) durchgeführt wurden und bei der das Ribozym volle Aktivität aufweist. 20 mM Mg^{2+} wurde als Zwischenwert gewählt [110].

Das Spaltungsmuster der Probing-Versuche wurde für jedes Konstrukt analysiert und mit einer Referenz verglichen, die aus dem unmodifizierten 5'- ^{32}P -markierten Wildtyp (wt) Ribozym besteht (Abbildung 34c). Konstrukt **A** (Abbildung 34a) ist ein Oligonukleotid, das an beiden Termini eine Fluoreszenzmarkierung hat. Dadurch werden im Verlauf eines Probing-Experimentes simultan zwei Spaltungsmuster generiert. Der Cy3-Farbstoff, der am 5'-Ende angebracht ist, führt zu einem Spaltungsmuster, das identisch mit dem der 5'- ^{32}P -Markierung ist und alle Spaltprodukte zeigt, die vom 3'-Ende her verkürzt sind. Die Gegenstücke, welche den Strangbruch am 5'-Ende aufweisen, können auf demselben PAGE-Gel mit Hilfe der Cy5-Markierung visualisiert werden, die am U50 angebracht ist (und eine terminale 3'-Markierung darstellt). Diese Möglichkeit des „*Duplexings*“ (der simultanen Messung zweier Farbstoffe oder sonstiger Signalgeber) vereinfacht die Beobachtung einer kompletten RNA-Sequenz auf einem Gel, ohne Kompromisse bei der Auflösung der Basen machen zu müssen (Abbildung 34b).

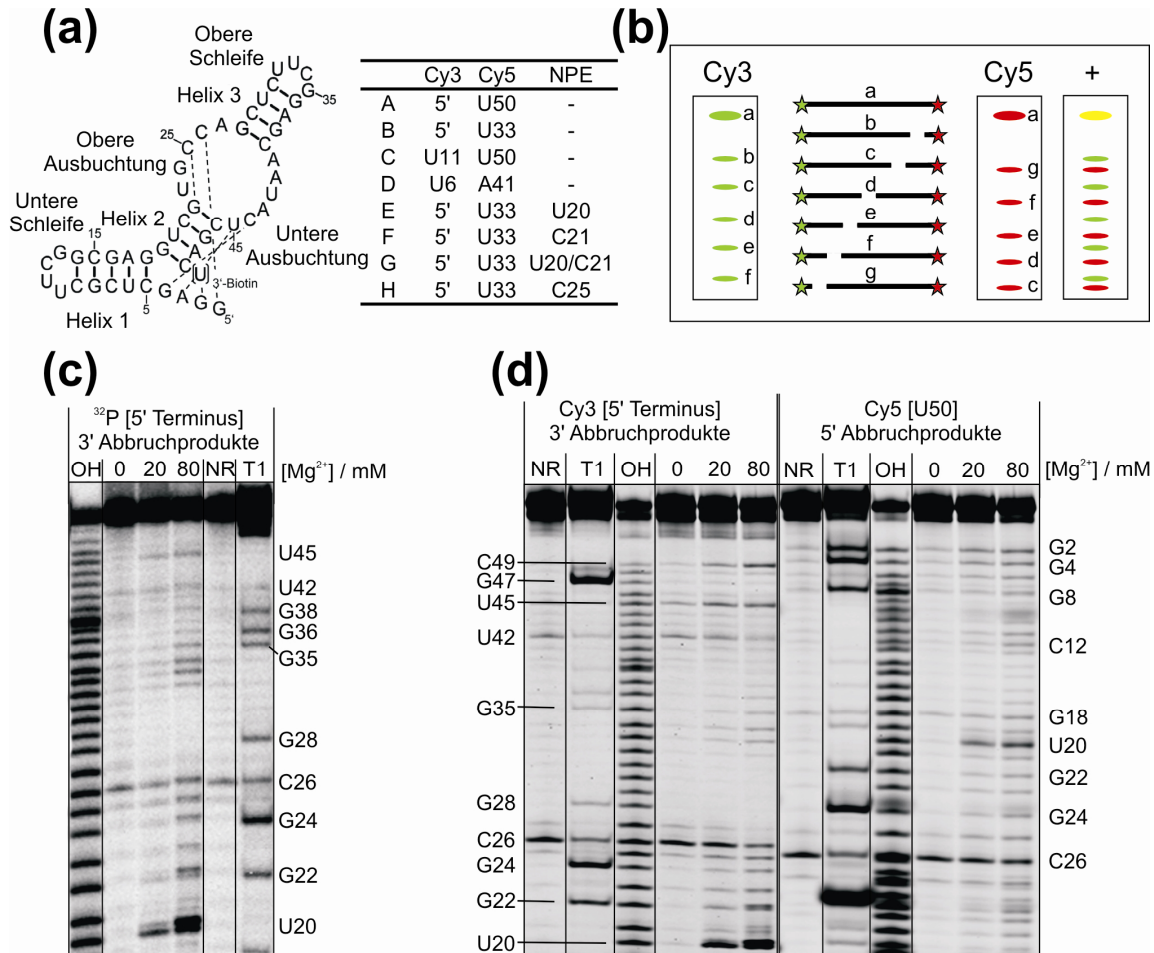


Abbildung 34: In-Line Probing-Analyse des Konstruktes mit zwei terminalen Markierungen. **(a)** Sekundärstruktur des Dase-Ribozyms. Wichtige strukturelle Bestandteile sind beschriftet. Die gestrichelten Linien zeigen den verschränkten Pseudoknoten an. U50 ist eingeklammert, da es nur in Konstrukt **A** und **C** vorhanden ist. Die Tabelle zeigt die Position der Farbstoffe und der photospaltbaren NPE-Schutzgruppen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden. **(b)** Schematische Darstellung einer RNA, die mit Fluoreszenzfarbstoffen an beiden Enden markiert wurde. Die Farbstoffe werden durch Sterne dargestellt, Spaltungsstellen durch Unterbrechungen des schwarzen Oligonukleotids. Die drei Felder, die mit Cy3, Cy5 und + beschriftet sind, repräsentieren Gelscans der jeweiligen Farbstoffe und ein überlagertes Bild. Gelbe Banden zeigen eine Überlagerung beider Farbstoffe an. **(c)** In-Line Probing-Analyse des 5'-³²P-markierten Wildtyp-Dase-Ribozyms. Die Reaktionen wurden bei verschiedenen Mg²⁺-Konzentrationen durchgeführt (0, 20, 80 mM). **(d)** In-Line Probing-Analyse des ^{Cy3}5'-^{Cy5}U50-markierten Dase-Konstruktes **A**. Die Bilder beider Farbstoffe wurden unabhängig voneinander von demselben Gel aufgenommen. Ausgewählte Spaltungsbanden sind auf der linken (für den Cy3-Scan) beziehungsweise rechten (für den Cy5-Scan) Seite der Abbildung angegeben.

Die Analyse des Spaltungsmusters der DAs zeigt Anzeichen für eine sehr kompakte, geordnete Struktur sowohl beim Wildtyp als auch bei Konstrukt **A**. Übereinstimmend mit älteren Blei-Probing Studien [110] können die folgenden Beobachtungen gemacht werden (Abbildung 34d): Während in der Region der oberen Ausbuchtung (*upper buldge*, Nukleotide 20-26) und in der oberen Schleife (*tetraloop*, Nukleotide 33-35) starke Spaltungen feststellbar sind, werden die Phosphodiesterbindungen in Helix 3 (Nukleotide 27-32 und 36-39) entsprechend der Theorie nicht gespalten. In der unteren Ausbuchtung (*lower buldge*, Nukleotide 40-45) ist an einigen Stellen eine schwache Spaltungsintensität sichtbar. Mit Hilfe der 3'-Markierung wird außerdem deutlich, dass die Helix 1 (Nukleotide 5-18), abgesehen von der unteren Schleife um U11, nur sehr schwache Spaltungsbanden aufweist. Die Spaltungsbanden, die bei den Nukleotiden U6, G8 und C9 beobachtet werden, beruhen wahrscheinlich auf einer Magnesium-Ionen-Bindungsstelle in direkter Nachbarschaft [197]. In Übereinstimmung mit älteren Daten ist Helix 2 die schwächste der drei Helices und zeigt signifikante Spaltung (Nukleotide 19-22, 46-49). Zwei intensive Banden (*cleavage hotspots*), die mit Pyrimidin-Purin-Überkreuzungen (*pyrimidine purine junctions*) korrespondieren und bereits in früheren Studien beobachtet wurden, werden auch in diesen Experimenten nachgewiesen (C26, U42, siehe auch Ladungskontrolle, Spur NR).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass weder die Gesamtstruktur des Ribozyms noch relevante strukturelle Details durch die fluoreszenten Markierungen an den beiden Enden beeinflusst werden, da das Spaltungsmuster von Konstrukt **A** identisch mit dem des Wildtyp-Ribozyms ist. Diese Beobachtung war nur möglich, indem die bereits in der Sequenz befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe als Reporter genutzt wurden. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde für Konstrukt **A** die volle katalytische Aktivität, verglichen mit dem Wildtyp, gemessen [195]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit zweier Markierungen im Rahmen eines „*Duplexings*“ zusätzliche Informationen erhalten werden, die bei einer einfachen Radioaktivmarkierung verborgen bleiben.

3.9.2.2 In-Line Probing von Konstrukten mit einer terminalen und einer internen Markierung

Die Situation, dass beide Markierungen an den beiden Enden des Oligonukleotids angebracht sind, ist eher selten für FRET-Konstrukte. In chemischen Probing-Experimenten dagegen wurden interne Markierungen bisher vollständig vernachlässigt. Dies ist hauptsächlich auf zwei Gründe zurückzuführen: Erstens ist die selektive Markierung eines bestimmten Nukleotids in einer RNA-Sequenz weitaus aufwändiger als die Einführung einer endständigen Markierung und zweitens ist die Analyse eines Spaltungsmusters, welches von einem internen Label generiert wurde, bedeutend schwieriger. Im Gegensatz zu den einfach

zu interpretierenden Leiter-artigen Spaltungsmustern, die bei endständigen Markierungen erhalten werden, generiert man bei einer internen Markierung zwei Leitern, die sich auf dem Gel überlagern und ohne zusätzliche Informationen keinen spezifischen Spaltprodukten zugeordnet werden können (Abbildung 34b). Häufig entstehen zwei Spaltprodukte von exakt derselben Länge durch Spaltungen an unterschiedlichen Positionen. Beim DAse- Ribozym zum Beispiel führt die Spaltung an G2 zu einem 47mer genauso wie die Spaltung an G47. Die zwei Produkte können nicht direkt unterschieden werden, da sie beide den gleichen Farbstoff tragen und sehr ähnliche elektrophoretische Mobilitäten aufweisen. Dennoch überlagern sich die beiden Banden nicht perfekt, da es sich um unterschiedliche Sequenzen handelt oder, wie bei den für diese Arbeit verwendeten Konstrukten, die Spaltprodukte unterschiedliche Modifikationen tragen (Abbildung 35b). Somit kann das Probing-Muster, das von der terminalen Markierung erhalten wird (und das nur eine Art von Abbruchsequenzen zeigt), als interner Standard genutzt werden, um die 3'-Abbruchsequenzen von den 5'-Abbruchsequenzen im Spaltmuster der internen Markierung zu unterscheiden. Dies ist möglich, da alle Spaltprodukte, die beide Farbstoffe tragen, in beiden Scans vorhanden sein und sich perfekt überlagern müssen, sowohl in Bezug auf ihre Lage als auch auf ihre Intensität. Das Bild, das von der terminalen Markierung generiert wurde, kann also nach einem Normalisierungsschritt vom Bild der internen Markierung subtrahiert werden. Anschließend sind nur noch solche Banden sichtbar, die ausschließlich die interne Markierung beinhalten. Das Spaltungsmuster kann im Anschluss zweifelsfrei bestimmten Nukleotiden zugeordnet werden.

Diese Situation wurde mit den Konstrukten **B** und **C** untersucht (Abbildung 34a). Während **B** eine 5'-terminale und eine interne Markierung hat, sind die Farbstoffe bei **C** intern und am 3'-Ende angebracht. Die Position des internen Farbstoffes in Konstrukt **B** lässt sich in Abbildung 35a direkt an der großen Lücke in der alkalischen Spaltungsleiter ablesen.

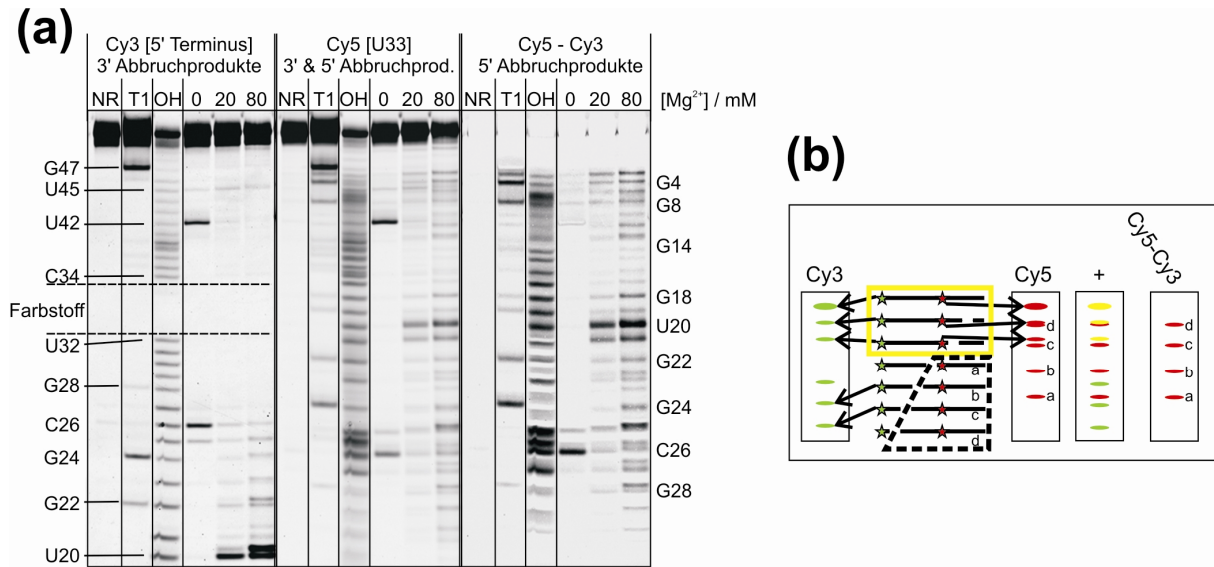


Abbildung 35: In-Line Probing-Analyse mit einer terminalen und einer internen Markierung. **(a)** In-Line Probing-Analyse des Cy35'-Cy5U33-markierten DAse-Konstruktes **B**. Das rechte Bild ist die Subtraktion des Cy3-Scans vom Cy5-Scan nach der Normalisierung. Ausgewählte Spaltungsstellen sind auf der rechten (für den Cy3-Scan) beziehungsweise linken (für das Subtraktionsbild) Seite des Gels angegeben. Die Position der internen Markierung ist mittels gestrichelter Linien angegeben. **(b)** Schematische Darstellung des Probing-Experimentes. Das Feld, welches mit Cy5-Cy3 überschrieben ist, stellt das Subtraktionsbild dar, wobei alle Werte <0 auf null gesetzt werden. Der gelbe Kasten zeigt an, welche Spaltungsprodukte sich in beiden Scans überlagern (dargestellt als gelbe Banden). Die gestrichelte Box zeigt die Produkte der Spaltung, die im Subtraktionsbild sichtbar sind.

Das Muster, das beim In-Line Probing für **B** erhalten wird, zeigt, dass viele Informationen aus den Bereichen des Gels erhalten werden, die erst nach einer Bildbearbeitung analysiert werden können (Abbildung 35a). Das Ausmaß der Spaltung der Nukleotide G1 bis G14 kann nur zugeordnet werden, wenn alle 3'-Abbruchprodukte, die beide Farbstoffe tragen, vom Bild subtrahiert wurden (siehe Abbildung 35b).

Insgesamt ist das Spaltungsmuster dem des Wildtyps sehr ähnlich. Dennoch lassen sich leichte Unterschiede bei **B** feststellen. Am Auffälligsten ist das Verschwinden der Spaltungsbande von U42 bei hohen Magnesium-Ionen-Konzentrationen, was eine vom Wildtyp abweichende Konformation dieses Nukleotids anzeigt. Da U42 eine Schlüsselrolle im Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk der katalytischen Tasche des Ribozyms einnimmt, ist es nicht verwunderlich, dass die Aktivität dieses Konstruktes im Vergleich zum Wildtyp auf 60 % zurückgeht, während die Konstrukte **A** und **C** voll aktiv sind [195].

Das Fehlen der Spaltung in der oberen Schleife, an der die interne Markierung angebracht ist, sollte den Erwartungen zufolge keinen entscheidenden Einfluss haben, da diese Nukleotide weit entfernt vom aktiven Zentrum lokalisiert sind.

Das Spaltungsmuster von **C** ist im Wesentlichen identisch mit dem des Wildtyp-Ribozyms (Abbildung 36).

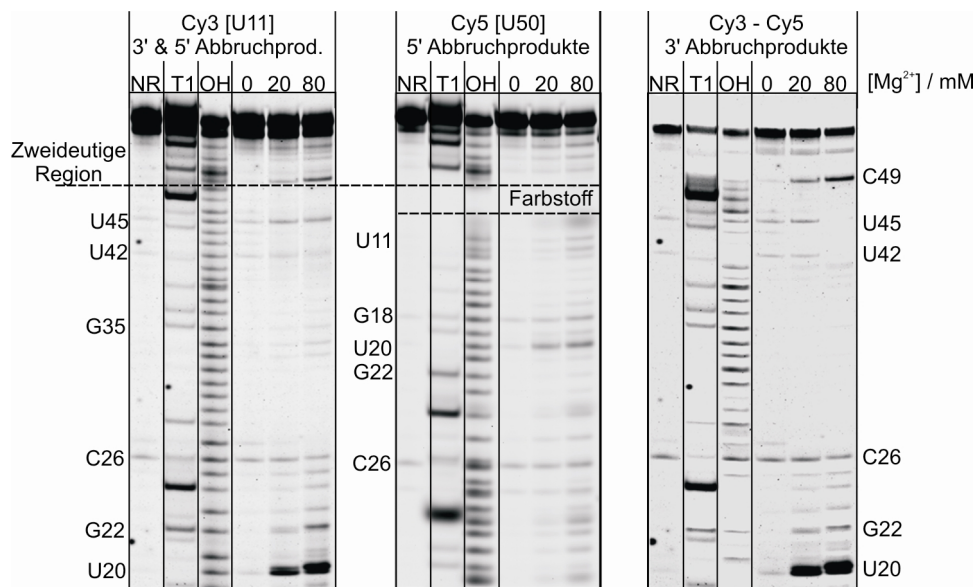


Abbildung 36: In-Line Probing-Analyse des ^{Cy3}U11-^{Cy5}U50-markierten DAs-Ribozyms **C**. Die Bilder beider Farbstoffe wurden unabhängig voneinander von demselben Gel aufgenommen (linkes und mittleres Bild). Das rechte Bild ist die Subtraktion des Cy5-Scans (Mitte) vom Cy3-Scan (links) nach einer Normalisierung. Die Position des internen Farbstoffes ist mittels gestrichelter Linien angegeben.

In diesem Fall besteht die einzige Zusatzinformation, die aus der Anwesenheit des zweiten Farbstoffes resultiert, in der Spaltungsbande von C49, die auf das angehängte U50 zurückzuführen ist, welches keinen Einfluss auf die Ausbildung oder Stabilisierung der Ribozymstruktur hat.

3.9.2.3 In-Line Probing von Konstrukten mit zwei internen Farbstoffmarkierungen

Im dritten möglichen Fall sind beide Farbstoffe intern angebracht (Konstrukt **D**, siehe Abbildung 34a). Hier enthalten beide Scans mehrdeutige Regionen. Banden, die aus einer Spaltung zwischen den beiden Markierungen resultieren, können eindeutig zugeordnet werden, da sie nur einen Farbstoff tragen und daher nur in einem Kanal erscheinen. Sie werden entweder direkt aufgelöst oder können im Anschluss an einen Subtraktionsschritt wie

Spaltungsstelle unter dem direkten Einfluss der Markierung steht und sich außerdem in der Ausbuchtung befindet, in der Spaltungen durchaus zu beobachten ist. Zusätzlich fehlt in **D** die Spaltungsbande für U45, die in allen Referenzkonstrukten vorhanden ist (Abbildung 37b). Da sich dieses Nukleotid genau wie U42 in der unteren Ausbuchtung befindet, kann der Schluss gezogen werden, dass diese Region signifikante strukturelle Störungen aufweist. Dies könnte auch die Erklärung für die komplette katalytische Inaktivität dieses FRET-Konstruktes sein [195].

Zusammenfassend demonstrieren die Resultate, dass die fluoreszenten Markierungen in RNA-FRET-Konstrukten dazu geeignet sind, kleine, lokale, strukturelle Änderungen, die von ihnen selbst ausgelöst werden, mittels In-Line Probing anzuzeigen. Während in keinem der besprochenen Konstrukte die globale Struktur des Ribozyms gestört war, zeigten zwei Konstrukte leichte Variationen im Spaltungsmuster, die auf strukturelle Veränderungen in der katalytischen Tasche zurückzuführen sind (Abbildung 37b). Diese Beobachtungen korrelieren mit der reduzierten katalytischen Aktivität, die genau für diese beiden Konstrukte nachgewiesen wurde. Es existiert meines Wissens nach derzeit keine andere, direkte, analytische Methode, die in der Lage ist, den strukturellen Effekt einer Farbstoffmarkierung mit Einzelnukleotidauflösung wiederzugeben. Indirekte RNA-Probing-Techniken wie beispielsweise SHAPE können zu diesem Zweck nicht genutzt werden, da sie auf enzymatischer Primer-Verlängerung beruhen, welche durch interne Modifikationen (wie Fluoreszenz-Farbstoffe) stark behindert werden kann und in den meisten Fällen auch wird [155].

3.9.3 In-Line Probing von fluoreszenzmarkierten aktivierbaren Oligonukleotiden

Nachdem demonstriert wurde, dass mit Hilfe von fluoreszentem In-Line Probing Positionen für die Einführung der Farbstoffe ermittelt werden können, welche die Funktion des Oligonukleotids nicht beeinflussen, wurde die Fragestellung ins Gegenteil verkehrt: Ist es mit derselben Methode also möglich, eine beabsichtigte, effektive Zerstörung der Struktur eines Ribozyms, beispielsweise durch photospaltbare Schutzgruppen, zu verifizieren?

Verschiedene DAsE-Konstrukte (**E-H**), die ausgehend von dem Konstrukt **B** (^{Cy5}5'-^{Cy3}U33) mit photospaltbaren Schutzgruppen in verschiedenen Positionen modifiziert worden waren (Abbildung 34a), wurden in In-Line Probing-Experimenten untersucht. Die Konstrukte, die für spätere Einzelmolekülstudien zur Faltungsdynamik des Ribozyms verwendet werden sollen, sind zusätzlich zu den bestehenden Modifikationen des Konstruktes **B** mit ein oder zwei *o*-Nitrophenylethyl-(NPE)-Gruppen [198] derivatisiert. Diese NPE-Gruppen sind an Positionen angebracht, von denen vermutet wird, dass sie für die korrekte Faltung und damit

Aus Abbildung 38 wird deutlich, dass das Konstrukt **E** große Ähnlichkeiten zu **B** aufweist. In Gegenwart von Magnesium-Ionen wird nur die Spaltung bei Nukleotid U20 (dem Nukleotid, welches die photospaltbare Gruppe trägt) intensiviert. Die Modifikation verhindert offensichtlich nicht die Bildung der Helix 2 und die katalytische Tasche scheint weitgehend intakt zu sein. Dies korreliert mit der katalytischen Aktivität von **E**, die mit 30 % im Vergleich zu **B** zwar reduziert, aber dennoch vorhanden ist [196].

Im Konstrukt **F** und dem doppelt geschützten Ribozym **G** sind ausgedehnte Regionen mit regelmäßigem Spaltungsmuster sichtbar (U20-A27 und A40-C49). Dies deutet darauf hin, dass sowohl Helix 2 als auch die geordnete katalytische Tasche zerstört sind. Die einzigen beiden Teile der Struktur, die von der Spaltung ausgenommen sind und daher intakt sein sollten, sind die Helices 1 und 3 (Abbildung 38). Die Tatsache, dass beide Konstrukte keine katalytische Aktivität aufweisen, stimmt mit dieser Beobachtung überein [196].

In Konstrukt **H** ist die photospaltbare Gruppe am exozyklischen Amin des Nukleotids C25 lokalisiert. Diese funktionelle Gruppe hat im unmodifizierten Ribozym eine Wasserstoffbrückenbindung zum G2 am 5'-Ende der Sequenz und bildet so einen Pseudoknoten (gestrichelte Linie in Abbildung 34a). Außerdem geht das Amin eine wichtige Wasserstoffbrückeninteraktion mit U42 in der unteren Ausbuchtung ein und formt dadurch ein Basen-Tripel, das essentiell für die Aktivität ist [111,115]. Eine Modifikation dieser Funktionalität mit einer photospaltbaren Gruppe sollte die beiden Interaktionen unterbinden. Das Spaltungsmuster des Konstruktes zeigt an, dass die globale Faltung des Ribozyms unverändert ist und alle drei Helices intakt sind. Die Spaltung ist nur auf beiden Seiten der Ausbuchtung intensiviert, was auf eine weniger geordnete Struktur an diesen Stellen hindeutet. Zusätzlich lassen sich starke Spaltungsbanden für den Bereich der Nukleotide G1-G4 beobachten, was bedeutet, dass der Pseudoknoten geöffnet ist (Abbildung 38). Für dieses Konstrukt wurde ein fast vollständiger Verlust der Aktivität gefunden (2 % im Vergleich zu **B**). Die Aktivität konnte durch Bestrahlung mit UV-Licht und damit Abspaltung der photospaltbaren Gruppe vollständig wiedererlangt werden [112].

Die Modifikation des Ribozyms mit photospaltbaren Schutzgruppen beeinflusst abhängig von der Position die Struktur der RNA auf sehr unterschiedliche Weise. Während Aussagen darüber, ob eine Modifikation die Funktion der RNA stört, meist sehr leicht getroffen werden können (beispielsweise durch Messung von Ribozym-Aktivitäten oder Bindungskonstanten), geben diese Untersuchungen keinen Aufschluss darüber, welches Strukturelement tatsächlich beeinflusst wird. Die Frage, ob die Annahmen bezüglich Strukturveränderungen,

die bei der Auswahl der zu modifizierenden Positionen getroffen wurden, auch eintreffen, wird meist nicht geklärt.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen In-Line Probing-Experimente mit fluoreszenten Markierungen zeigen jedoch, dass es möglich ist nachzuweisen, welches Element der Sekundär- oder Tertiärstruktur durch die Einführung der Modifikation tatsächlich gestört wird. So konnte gezeigt werden, dass die photospaltbare Schutzgruppe in Konstrukt **H**, wie bei der Planung vorgesehen, ausschließlich die Tertiärstruktur stört (Pseudoknoten und Basen-Triple), während alle drei Helices intakt bleiben. Die Störung von Helix zwei, die bei den Konstrukten **E**, **F** und **G** geplant war, konnte dagegen nur für die letzteren beiden nachgewiesen werden. Bei **E** ist die Sekundärstruktur weitgehend intakt. Offenbar reicht die Modifikation dieser Position nicht aus, um die Helix 2 vollständig zu destabilisieren. Alle diese Daten korrelieren mit den Aktivitätsmessungen des Ribozyms, die einzig für Konstrukt **E** eine Restaktivität ausweisen.

Bei keinem der beschriebenen Konstrukte wäre eine Radioaktivmarkierung der Konstrukte mit den üblichen Methoden möglich gewesen, da beide Termini bereits modifiziert sind (5'-Cy3 und 3'-Biotin).

4 Fazit und Ausblick

4.1 Erkenntnisse über die Bindungstasche des Lysin-Riboswitches

Durch die Untersuchungen des Breaker-Labors lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits einige Informationen über die Bindung verschiedener Lysin-analoger Moleküle an den Lysin-Riboswitch vor [96,98]. Die Daten ergaben aber keinesfalls ein vollständiges Bild über die Bindungstasche und die Grenzen, die einer Erkennung von kleinen Molekülen gesteckt sind. Für die Planung von Lysin-Photoaffinitätssonden, für die der Metabolit zwingend erweitert werden muss, war es insbesondere störend, dass nur sehr wenige Literaturdaten über die Derivatisierung der Säurefunktion vorlagen. Andererseits wurde von Blount *et al.* eine Bindung von säuremodifizierten Lysinanaloga an den Riboswitch ausgeschlossen, wobei unklar ist, auf welcher Basis diese Aussage gemacht wurde [98]. Der Mangel an zuverlässigen Daten machte eine systematische Studie nötig, die die Affinität einer homologen Reihe von Lysinstern und –amiden zum Riboswitch-Aptamer untersucht. Dementsprechend wurden neun säuremodifizierte Lysinanaloga synthetisiert, die ein breites Bild über die Aufnahmefähigkeit der Bindungstasche in diesem Bereich geben können. Die Aussicht auf einen Erfolg der Experimente wurde durch die Kristallstruktur unterstützt, die im Jahr 2008 gelöst wurde und die eine vergleichsweise große Öffnung des Aptamers in Nachbarschaft zur Säurefunktion zeigt [100].

Alle säuremodifizierten Lysinanaloga wurden mit drei Methoden auf ihre Affinität zum Riboswitch untersucht: In-Line Probing, *in vitro* Transkriptions-Stop-Assay und *in vivo* Reporter-Gen-Assay. In den In-Line Probing-Experimenten konnten einzig für die Amide zuverlässige Daten generiert werden, da sich die Ester unter den experimentellen Bedingungen zersetzten. Für das Lysinamid konnte eine Dissoziationskonstante (K_d) von 45 μM berechnet werden. Damit ist die Annahme widerlegt, dass eine negative Ladung der Säurefunktion unabdingbar für die Bindung an den Riboswitch ist. Dennoch führt die Entfernung dieser Ladung zu einem starken Einbruch der Affinität [$K_d(\text{Lysin})$: 1 μM]. Eine Erweiterung des Amids mit Alkylketten führte zum vollständigen Ausbleiben der Bindung. Die Tatsache, dass Ester mit der Technik des In-Line Probings nicht studiert werden können, war überraschend, besonders da in der Literatur bereits In-Line Probing-Bindungsstudien von Estern existieren [89]. Die mittels LC-MS- und Dünnschichtchromatographie nachgewiesene Zersetzung der Lysinester zeigt, dass alle Analyten grundsätzlich auf ihre Eignung bei den entsprechenden Versuchsbedingungen hin überprüft werden müssen, um ihre Stabilität zu zeigen und somit belastbare Erkenntnisse zu gewinnen.

Die Analoga wurden des Weiteren mittels eines Transkriptions-Stop-Assays untersucht, bei dem keine Degradation stattfand. In diesem konnte in Zusammenarbeit mit K. Höfer die Affinität des Lysinamids bestätigt werden und auch eine Bindung des Lysin-Methylesters nachgewiesen werden. Alle anderen Ester zeigten keine oder nur eine sehr geringe Affinität. Dies deutet darauf hin, dass kleine Modifikationen an der Lysin-Säurefunktion durchaus toleriert werden, während eine Verlängerung der Alkylkette und eine Vergrößerung des sterischen Anspruchs relativ schnell zu einem Einbruch der Affinität führt.

Abschließend wurden die interessantesten Analoga von K. Höfer in einem *in vivo* Reporter-Gen-Assay überprüft. Dieses Vorgehen entspricht dem üblichen Ablauf von Bindungsstudien mit Riboswitches. Während die Bindung des Lysin-Methylesters bestätigt werden konnte, zeigte das Lysinamid trotz besserer Ausgangsdaten in den *in vitro*-Versuchen keine Wirkung. Möglicherweise wird das Amid nicht in die Zellen aufgenommen oder sehr schnell zu einem Stoff abgebaut, der keine Affinität zum Aptamer aufweist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Bindung an den Riboswitch für Lysinanaloge mit kleinen Modifikationen der Säurefunktion erhalten bleibt. Dies ist besonders interessant im Hinblick darauf, dass der Lysin-Riboswitch in der Literatur mehrfach als Target für antibiotisch wirksame Substanzen Erwähnung fand [98,143].

Für die Entwicklung weiterer Lysinanaloge mit potentiell antibiotischer Wirkung sind diese Daten ein guter Ausgangspunkt. Besonderes Augenmerk könnte dabei beispielsweise auf eine (formale) Reduktion der Säurefunktion in ein Keton gelegt werden oder auf eine Monoalkylierung des Amins der Seitenkette. Beide Derivatisierungen sollten nach derzeitigem Kenntnisstand die Affinität zum Riboswitch nicht stören. Im Hinblick auf den Einsatz von Lysinanaloge als Antibiotika sollte ein besonderes Augenmerk auf die Interaktion mit der Lysyl-tRNA-Synthetase gelegt werden. Von Ataide *et al.* wurde gezeigt, dass ein erfolgreiches Antibiotikum auf Lysinbasis sowohl den Riboswitch als auch das Enzym effektiv inhibieren muss [143].

Ein weiteres Ergebnis der Versuche mit den Lysinestern ist, dass die Untersuchung der chemischen Stabilität der getesteten Moleküle unter den Bedingungen des chemischen Probing-Versuches unabdingbar ist. Diesem Problem wurde in der Literatur bisher wenig Beachtung geschenkt. Es ist aber klar, dass zuverlässige Bindungsdaten nur erlangt werden können, wenn die Analyten stabil sind. Dies trifft nicht allein auf das In-Line Probing zu. Auch andere beliebte Probing-Verfahren wie SHAPE [155,156] oder Hydroxyl-Radikal-Probing [153,154] laufen unter Bedingungen ab, bei denen ein breites Spektrum an Molekülen reagieren kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass ein Bedarf an

Verfahren zur RNA-Strukturanalyse besteht, die noch selektiver mit der RNA in Beziehung stehen als die bisherigen.

4.2 Lysin-Photoaffinitätssonden: Bindungsstudien und Photocrosslinking

Aufbauend auf den Erkenntnissen der Bindungsstudien und den Literaturdaten über den Lysin-Riboswitch wurden drei Photoaffinitätssonden nach dem Vorbild der AfBPP-Sonden geplant und synthetisiert. Während die Sonden alle ein Phenylazid als photoreaktive Gruppe tragen, unterscheiden sie sich in ihrer Anreicherungsfunktion, die bei zwei (konvertierbaren) Sonden (**26** und **27**, Abbildung 21) nur latent in Form eines terminalen Alkins vorhanden ist. Dieses kann über eine Kupfer-katalysierte „Click“-Reaktion mit einem Biotinazid verbunden werden. Die dritte Sonde (**28**, Abbildung 21) wurde direkt mit Biotin derivatisiert. Außerdem unterscheiden sich die Sonden in ihrer Verknüpfung mit Lysin. Während zwei Sonden (**26** und **28**) über das terminale Amin der Seitenkette in Form eines bisalkylierten Guanidins derivatisiert wurden, liegt in der dritten Sonde (**27**) ein Lysinester vor. Die Synthese mehrerer Photoaffinitätssonden ist aus folgenden Gründen sinnvoll: Einerseits lassen sich Bindungsfähigkeit und Reaktivität der Sonden nur sehr schwer vorhersagen. Andererseits wurde bereits für andere Photoaffinitätssonden gezeigt, dass Veränderungen im Molekül teils drastische Veränderungen im Spektrum der isolierten Biomoleküle zur Folge haben [35]. Der Einsatz mehrerer Sonde auf Basis unterschiedlicher Komponenten oder Verknüpfungen hat demnach größere Erfolgchancen und liefert voraussichtlich ein vollständigeres Bild der Interaktionen des Metaboliten mit verschiedenen Biomolekülen.

Für eine der Sonden (**26**) konnte mittels In-Line Probing eine Dissoziationskonstante von 33 μM bestimmt werden. Wie erwartet ist die Bindung damit schwächer als die des natürlichen Metaboliten, liegt aber in einem Bereich, in dem bekannt ist, dass Effekte durchaus zu erwarten sind. Mit AEC (**25**) ist eine antibiotisch wirksame Substanz bekannt, die auf den Lysin-Riboswitch wirkt und deren Dissoziationskonstante bei 30 μM liegt [96]. In den anschließenden Photocrosslink-Versuchen konnte von A. Samanta nachgewiesen werden, dass die Sonde mit dem Aptamer des Riboswitches interagiert und bei Bestrahlung ein Crosslink-Produkt mit einer Effizienz von 11 % bildet.

Für die Photoaffinitätssonde **27** wurden weitergehende Versuche unternommen, bei denen gezeigt werden konnte, dass die Produktbildung von 92,5 % bei Zugabe eines Überschusses Lysin auf 34 % zurückgeht, was ein Zeichen dafür ist, dass der Crosslink zumindest zum Teil durch die spezifische Interaktion der Sonde mit dem Aptamer zustande kommt, wobei

ebenfalls ein signifikanter Anteil unspezifischer Crosslinks gebildet wird. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass auch mit einem randomisierten RNA-Pool, der nahezu ausschließlich unspezifisch reagieren sollte, relativ viel Crosslink-Produkt entsteht (47 %).

Auch wenn weitere Untersuchungen zu diesen Sonden nötig sind, um ein umfassendes Bild zu bekommen, so wird doch bereits anhand der derzeitigen Daten deutlich, dass die Lysin-Photoaffinitätssonden spezifisch an den Riboswitch binden und bei Bestrahlung einen Crosslink eingehen. Inwieweit der vergleichsweise hohe Anteil an unspezifischer Bindung ein Problem für eine ABC Transkriptomanalyse wird, lässt sich noch nicht abschließend bewerten. Wahrscheinlich ist der relativ hohe Anteil an unspezifischem Crosslink bei **27** unter anderem auf die starke positive Partialladung des Moleküls zurückzuführen, die es in Folge der Veresterung trägt. Dadurch sind ionische Interaktionen mit dem Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren bevorzugt. Möglicherweise können diese unspezifischen Interaktionen durch Zusatz Lysin-ähnlicher Moleküle, von denen bekannt ist, dass sie keine Affinität zum Riboswitch haben (beispielsweise Ornithin oder Hexandiamin), reduziert oder aufgehoben werden.

Derselben Argumentationslinie folgend ist für die Sonde **26** daher zu erwarten, dass der Anteil an unspezifischem Crosslink niedrig ist, da die Säurefunktion frei und negativ geladen ist. Dadurch sind die ionischen Interaktionen erschwert beziehungsweise unterdrückt. Allerdings fehlen für **26** Daten, die diese Hypothese stützen, bisher vollständig.

Abzuwarten bleibt, wie es gelingt, den Photocrosslink dieser Sonden so spezifisch zu machen, dass eine ABC Transkriptomanalyse möglich wird. Möglicherweise ist es ausreichend, Additive während der Bestrahlung zuzugeben, die eine unspezifische Interaktion mit dem Phosphatrückgrat unterdrücken. Andernfalls müssen die Sonden eventuell neu geplant werden und verbesserte Verknüpfungspunkte mit dem Metaboliten gefunden werden. So würden sich vor allem Derivatisierungen des Amins der Seitenkette anbieten, da diese die Ladung des Moleküls am wenigsten beeinflussen. In näherer Zukunft sollten die Crosslinking-Versuche mit der Sonde **26** hierüber schon einigen Aufschluss ergeben.

4.3 cAMP-Photoaffinitätssonden: Crosslinking und ABC Transkriptomanalyse

Die Auswertung der Crosslinking-Versuche stellte sich bei den Lysin-Photoaffinitätssonden als relativ schwierig und komplex dar. Aus diesem Grund wurde der Crosslink zwischen RNA und einer Photoaffinitätssonde mit einem zweiten Modellsystem, dem kleinen, künstlichen

cAMP-Aptamer, studiert. Durch die Möglichkeit der Verwendung eines Gel-basierten Assays konnte mit cAMP-Photoaffinitätssonden in vergleichsweise kurzer Zeit eine große Datenmenge generiert werden.

Die Crosslinks dieses Modellsystems sind zusammen mit den zuvor beschriebenen Reaktionen der Lysin-Photoaffinitätssonden die ersten Beispiele spezifischer bimolekularer Photoreaktionen zwischen einem kleinen Molekül und einem RNA-Oligonukleotid. Der Erfolg dieser Reaktion ist eine unabdingbare Voraussetzung für die ABC Transkriptomanalyse, da der spezifische bimolekulare Crosslink einer der Schlüsselschritte des Protokolls ist.

Die Ausbeuten der Reaktion der cAMP-Sonden mit dem entsprechenden Aptamer sind mit ca. 3 % für die Sonden **43** und **44** und 17 % für **45** nicht besonders hoch, aber die Spezifität der Reaktion ist ausgezeichnet. So konnte mit anderen Sequenzen, von denen keine Affinität zu cAMP bekannt ist, selbst bei hohen Konzentrationen von RNA und Photoaffinitätssonde keine Produktbildung detektiert werden. Außerdem ließ sich der Crosslink durch die Zugabe eines Überschusses an cAMP nahezu vollständig inhibieren. Auf Basis dieser Inhibitionskontrollen wurden mit Gel-Assays und in qPCR-Experimenten Anreicherungsfaktoren von bis zu 34 berechnet. Die Differenz in der Effektivität, die zwischen den verschiedenen Sonden zu sehen ist, lässt sich vermutlich auf die Unterschiede im Mechanismus des Crosslinks zurückführen, da sich die drei Sonden abgesehen von der photoreaktiven Gruppe in ihrem Aufbau nicht unterscheiden. Offenbar ist die nukleophile Addition, welche den bevorzugten Reaktionsweg von **45** darstellt, besser zum Crosslink der Sonden mit dem Aptamer geeignet als die radikalische Insertion in CH-Bindungen, die bei **43** und **45** hauptsächlich auftritt. Es fehlen aber Daten, die diese Vermutung bestätigen.

Bei Zugabe eines Überschusses an nicht-bindender RNA (Total-tRNA oder Total-RNA) gingen die Anreicherungsfaktoren zurück. Dieses Verhalten wurde erwartet, da unspezifische Reaktionen der Photoaffinitätssonden nie vollständig ausgeschlossen werden können und durch den Überschuss eine Vielzahl an Reaktionspartnern zur Verfügung steht, die die reaktiven Zwischenstufen abfangen können. Aufgrund dieses unspezifischen Verhaltens ist ein Vergleich der Crosslink-Proben mit den Inhibitionskontrollen unerlässlich. Die Anreicherungsfaktoren blieben aber auch bei einem sehr hohen Überschuss an „Fremd-RNA“ mit ca. 10 noch in einem Bereich, in dem die Isolation von Sequenzen mit spezifischer Affinität zu den Sonden möglich sein sollte.

Im Anschluss an die vorbereitenden Crosslink-Studien wurden zwei ABC Transkriptomanalysen mit *E. coli*- beziehungsweise Maus-Total-RNA durchgeführt. Das Protokoll zur Einführung der Primer-Bindestellen und zur reversen Transkription, welches von M.-L. Winz

entwickelt worden war und sich an den Photocrosslink anschließt, wurde für die vorliegenden Proben optimiert.

Eine qPCR-Analyse der beiden Proben mit *E. coli* Total-RNA (mit und ohne cAMP), denen das Aptamer zugesetzt worden war, zeigte eine Anreicherung der cAMP-Aptamersequenz um das 16fache, während die 16S rRNA des Bakteriums in beiden Proben in nahezu identischer Konzentration vorlag. Damit wurde der Funktionsbeweis des Protokolls zur ABC Transkriptomanalyse erbracht.

Die Daten für das Maus-Genom deuten auf eine ähnlich gute Anreicherung unter weitaus stringenteren Bedingungen hin. Derzeit werden diese Proben an der „*Deep Sequencing Facility*“ der Universität Heidelberg analysiert.

Mittelfristig werden Daten erwartet, die Aufschluss darüber geben, ob es in eukaryotischen Zellen RNA-Sequenzen gibt, die mit cAMP interagieren. Sollte in den Sequenzierdaten eine Anreicherung bestimmter Transkripte gegenüber der Inhibitionskontrolle festzustellen sein, so muss im Folgenden der genetische Zusammenhang des Transkriptes bestimmt und die Sequenzen *in vitro* auf ihre Affinität zu dem Sekundärbotenstoff getestet werden.

Längerfristig wird es interessant sein, ob es im Menschen RNA-Sequenzen gibt, die mit Metaboliten irgendeiner Art interagieren. Nach den Erfahrungen mit den prokaryotischen Riboswitches handelt es sich bei RNA-affinen Metaboliten häufig aber nicht ausschließlich um Moleküle, die eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zu den Nukleotiden aufweisen [199]. Dies könnte ein guter Ansatzpunkt für weiter gehende ABC Transkriptomanalysen sein.

Methodisch könnte vor allem eine systematische Untersuchung der photoreaktiven Gruppen nützlich sein. Die bisher in Photoaffinitätssonden verwendeten Funktionen wurden hauptsächlich für den Einsatz mit Proteinen optimiert. Für die Anforderungen eines Photocrosslinks mit Nukleinsäuren sind jedoch andere bekannte photoreaktive Gruppen (wie zum Beispiel Psoralene) möglicherweise besser geeignet. Auch der Einsatz neuartiger photoreaktiver Gruppen für Nukleinsäuren wurde in der Literatur in den letzten Jahren beschrieben [200,201].

4.4 Fluoreszentes In-Line Probing [191]

Fluoreszenz ist heutzutage das bevorzugte Detektionssignal der meisten Studien zu RNA-Faltung, -Aktivität und -Struktur, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Obwohl die Einführung großer fluoreszenter Farbstoffe ein massiver Eingriff in die lokale Struktur der RNA ist, wird häufig nur angenommen, dass die strukturelle Integrität des Moleküls erhalten bleibt.

Die Untersuchungen an zwei sehr verschiedenen RNAs mit unterschiedlicher Länge, Modifikationsstatus und Eigenschaften, die in dieser Arbeit beschrieben werden, zeigen, dass mit Fluoreszenzmarkierungen Informationen auf Einzelnukleotidebene gewonnen werden können. Für das Lysin-Riboswitch-Aptamer konnten die Ergebnisse, die mit einer Radioaktivmarkierung zum Bindungsverhalten des Lysins erhalten wurden, mit einer 5'-terminalen Fluoreszenzmarkierung bestätigt werden. Dieselben Regionen der Sequenz zeigen lysinabhängige Intensitätsänderungen im gleichen Umfang unabhängig von der Markierung. Außerdem wurde mit beiden Techniken dieselbe Dissoziationskonstante von 1 μ M für Lysin berechnet. Es ist demnach möglich, in Bindungsstudien an großen RNA-Aptameren Radioaktivmarkierungen durch fluoreszente Farbstoffe zu ersetzen.

Mit dem vergleichsweise kleinen, aber hochstrukturierten Diels-Alderase Ribozym wurde untersucht, ob die Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen an unterschiedlichen Positionen der Sequenz die native Struktur des Ribozyms stört und ob diese Störungen direkt über die Markierungen detektiert werden können. Die Änderungen, die durch die Einführung der Farbstoffe an verschiedenen internen Positionen hervorgerufen wurden, waren zwar lokal begrenzt, so dass sich die FRET-Effizienzen nicht änderten, hatten aber großen Einfluss auf die Aktivität des Ribozyms. Dies unterstreicht die Relevanz einer Einzelnukleotidauflösung für die Untersuchung der strukturellen Änderungen. Derzeit existiert keine andere analytische Methode, mit Hilfe derer eine solche Analyse in vergleichbarer Auflösung möglich wäre.

Im Folgenden wurden die Auswirkungen einer Modifikation der RNA mit photospaltbaren Schutzgruppen untersucht. Während es meist einfach ist, den Einfluss der Modifikation auf die Funktion zu bestimmen (über die Messung von Bindungskonstanten oder der Aktivität), kann in den seltensten Fällen bewiesen werden, dass dieser Einfluss tatsächlich auf den Designprinzipien beruht, die Ziel des Experimentators waren. Mit Hilfe des fluoreszenten In-Line Probings war es möglich, bei sehr stark modifizierten DAse Ribozymen mit photospaltbaren Schutzgruppen den Einfluss dieser Modifikationen auf die Sekundär- und Tertiärstruktur des Ribozyms zu bestimmen. Das Ausmaß der Störung der nativen Struktur korrelierte mit den Aktivitätswerten für das jeweilige Konstrukt.

Neben der Nutzung von Fluorophoren als Reporter in chemischen Probing-Experimenten wurden zwei weitere Neuheiten eingeführt: Zum einen sind die vorgestellten Ergebnisse die ersten, bei denen interne Markierungen in chemischen Probing-Studien eingesetzt wurden. Dies wäre theoretisch auch mit radioaktiven Markierungen möglich, stellt jedoch einen unverhältnismäßig großen Arbeitsaufwand dar. Zum anderen wurde die Existenz zweier Markierungen ausgenutzt, um zusätzliche Strukturinformationen zu erhalten. Während die Einführung einer zweiten Markierung vom Standpunkt des Probings her gesehen einen geringen zusätzlichen Nutzen darstellt, so liefert sie doch in fast jedem Fall zusätzliche Informationen. Da die Anwesenheit von zwei Fluoreszenzfarbstoffen eine Voraussetzung für FRET-Messungen ist, können diese Zusatzinformationen für die entsprechenden Konstrukte genutzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die überlappenden Leiter-artigen Muster, die bei den internen Markierungen entstehen, durch einfache Subtraktion der Gelbilder dekonvolutiert werden können.

Somit ist fluoreszentes In-Line Probing eine vielversprechende Technik zur Strukturuntersuchung von RNA-Sequenzen unterschiedlicher Länge. Während es dieselbe exzellente Auflösung aufweist wie herkömmliche Probing-Methoden mit radioaktiven Markierungen, ist es sehr viel unkomplizierter auf hochmodifizierte RNAs anwendbar, wie sie typischerweise in biophysikalischen Studien verwendet werden.

In Zukunft sollte dieses Verfahren zu einer Standardmethode in der Validierung von Konstrukten für FRET-Studien und ähnliche biophysikalische Methoden werden. Weicht die Struktur der modifizierten Konstrukte zu stark von der nativen ab, so können die in einem FRET-Experiment ermittelten Daten kein korrektes Bild ergeben, selbst wenn sie im Einzelfall noch in der Lage sein sollten, trotz der Störungen ihre native Funktion auszuführen. Außerdem ist die vorgestellte Methode gut dazu geeignet, Oligonukleotide mit photospaltbaren Schutzgruppen hinsichtlich ihrer strukturellen Beschaffenheit zu untersuchen. Nur so lässt sich zuverlässig beweisen, dass die Ziele, die mit der Einführung verfolgt wurden, tatsächlich im Detail erreicht wurden.

5. Material und Methoden

5.1 Chemischer Teil

5.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Alle Reaktionen wurden unter Argonatmosphäre in trockenen Lösemitteln in Kolben aus Borsilikatglas durchgeführt. Synthesen, bei denen photoreaktive Substanzen verwendet wurden, fanden unter Lichtausschluss entweder in einem Braunglaskolben oder einem mit Alufolie umwickelten Kolben statt. Flüssige Reagenzien wurden mit Hilfe von Injektionsspritzen (BD Discardit™ 2 ml – 20 ml und Injekt®-F 1ml, Braun) und Stahlnadeln (Sterican®, 0,80x120 mm, Braun) zu den Reaktionsmischungen gegeben. Die Lösungen wurden mittels PTFE-beschichteten Magnetrührern durchmischt. Temperaturen oberhalb der Raumtemperatur wurden mit Hilfe von Silikonölbädern und MR 3001 K-Heizplatten (Heidolph) eingestellt. Synthesen im Mikrowellenreaktor wurden in einer Discover LabMate Mikrowelle von CEM in einem „Mono-Mode“-Reaktionsbehälter durchgeführt. Alle Reaktionen wurden in dickwandigen Reaktionsgefäßen angesetzt, die mit Teflonsepten versehen sowie mit einem Drucksensor ausgestattet wurden. Die Steuerung der Bestrahlungsleistung wurde temperaturkontrolliert vorgenommen. Die Reaktionen wurden durch Rühren gemischt und mittels Druckluft gekühlt.

5.1.1.1 Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Die Reaktionskontrolle wurde dünnschichtchromatographisch vorgenommen mit Hilfe von Polygram Sil G/UV₂₅₄ 40x80 mm Folien (Macherey-Nagel). Edukte und Produkte wurden entweder durch Bestrahlung mit 254 nm Licht mittels Nu-8 KL UV-Lampen (Benda) oder durch Anfärbung mit einem geeigneten Reagenz sichtbar gemacht. Insbesondere wurde hierfür das *Blue-Shift*-Reagenz⁴¹ als Färbereagenz mit genereller Aktivität verwendet. Für Aminosäuren aller Art hat sich die Anfärbung mit Ninhydrin bewährt (0,2 g Ninhydrin in 100 ml EtOH). Biotinylierte Sequenzen ließen sich mit N,N-Dimethyl-p-aminozimtaldehyd (DMACA) sichtbar machen [202].

Die säulenchromatographische Aufreinigung der Reaktionsprodukte wurde mit Silica durchgeführt (Kieselgel 60 M, 0,04-0,063 mm, Macherey-Nagel).

⁴¹ 1 g Ce(SO₄)₂ und 21 g Molybdätophosphorsäure in 500 ml Wasser und 31 ml H₂SO_{4,konz.}

5.1.1.2 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit einem Varian Mercury Plus 300 MHz Spektrometer (300,13 MHz für ^1H , 75,74 MHz für ^{13}C) oder einem Varian NMR-System 500 MHz (500,13 MHz für ^1H , 125,75 MHz für ^{13}C) aufgenommen. Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur in deuterierten Lösemitteln aufgenommen und auf das jeweilige Lösemittelsignal kalibriert [203]. Die Auswertung der Spektren erfolgte nach erster Ordnung. Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von zweidimensionalen NMR-Experimenten (COSY, HSQC, HMBC; HH- /CH-Korrelationsspektren) vorgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale δ wird in ppm angegeben. Bedeutung der Abkürzungen: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Duplett, t = Triplett, m = Multiplett, Ar = aromatische Protonen, Ph = Phenyl.⁴²

Die Auswertung der Spektren wurde mit Hilfe der MestRe-C v4.9.9.9-Software durchgeführt.

5.1.1.3 Massenspektrometrie und IR-Spektroskopie

Massenspektrometrie wurde an folgenden Geräten durchgeführt:

EI und FAB: Finnigan MAT 8200 (bedient durch H. Rudy).

Für FAB-Messungen wurde eine 3-Nitrobenzylalkohol-Matrix verwendet.

MALDI: Bruker BiFlex III (bedient durch H. Rudy), mit einer DHB-Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure).

HR-ESI: - Bruker micrOTOF-Q II (bedient durch H. Rudy oder im Falle von LC-MS-Daten B. Strauß). Kalibrierung mit Natriumformiat-Clustern.

- Finnigan TSQ 700 (bedient durch N. Nieth am Organisch chemischen Institut der Universität Heidelberg).

FT-IR-Spektren wurden an einem JASCO FT/IR 4100 Gerät aufgenommen.

5.1.1.4 HPLC-Aufreinigungen und LC-MS-Versuche

Aufreinigungen mittels semipräparativer HPLC wurden an einem Agilent 1100 Series System mittels UV/Vis-Detektion unter Verwendung einer Luna RP-C18 Säule (100 Å, 5,0 μm , 250x15 mm; Phenomenex) bei einem Fluss von 5,0 ml/Min durchgeführt. Vor der Injektion

⁴² Die Nummerierung der Atome erfolgte nicht immer nach IUPAC-Regeln.

wurden die Proben mit einem 0,22 µm Teflon-Spritzenfilter (Millipore) von Schwebstoffen befreit.

LC-MS-Versuche wurden an einer Agilent 1200 Series Anlage in Kopplung mit dem Bruker micrOTOF-ESI-Massenspektrometer mit MS-Detektion durchgeführt. Die LC-Trennung der Proben wurde mit einer Luna RP-C18 Säule (3,0 µm, 100x4,6 mm; Phenomenex) bei Flussraten von 0,2 ml/Min durchgeführt nach einem publizierten Gradienten [204]. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe der DataAnalysis Software 4.0 (Bruker Daltonics).

5.1.2 Synthese der säuremodifizierten Lysinanaloga

AAV 1: Synthese der Di-*Boc*-geschützten Lysinester und -amide⁴³

519 mg (1,50 mmol) *Boc*-Lys(*Boc*)OH wurden in 10 ml trockenen DCM gelöst. Dann wurden 1.1 eq DCC hinzugegeben (340 mg / 1,65 mmol), woraufhin nach wenigen Sekunden ein weißer Feststoff ausfiel. Nach der Zugabe von 0,1 eq DMAP (18 mg / 0,1 mmol) und 1,5 eq des entsprechenden Alkohols bzw. Amins (2,25 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 8 h (für Ester) bzw. über Nacht (für Amide) bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde das ausgefallene DCU abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch über Silica.

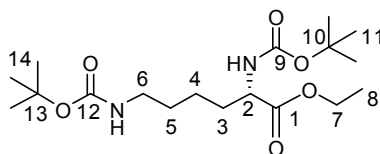
AAV 2: Entschützung der Lysinester und –amide⁴⁴

0,3 mmol des geschützten Lysinesters bzw. –amids wurden in 4 ml 2 M HCl in DEE gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Am nächsten Tag war das Produkt ausgefallen. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert und der Rückstand am Ölpumpenvakuum getrocknet.

⁴³ Das Vorgehen entspricht dem Steglich-Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren [144].

⁴⁴ Entschützungen der *Boc*-Funktion mit diesem Protokoll sind literaturbekannt [145].

(S)-Ethyl-2,6-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)hexanoat (21c)⁴⁵



Ausbeute: 89 %

Eluent (Säulenchromatographie): nHexan / EE 3:1

R_f-Wert: (CyHex / EE 3:1) 0,28

¹H NMR (300,13 MHz; CDCl₃): 1,25-1,30 (t; 3H; ³J=7,12 Hz; H₈); 1,44 (s; 18H; H₁₁; H₁₄); 1,30-1,88 (m; 6H; H₃; H₄; H₅); 3,07-3,13 (dt; ²J=13,00 Hz; ³J=6,17 Hz; 2H; H₆); 4,15-4,22 (q; ³J=7,19 Hz; 2H; H₇); 4,17-4,30 (m; 1H; H₂); 4,51-4,63 (bs; N_αH); 5,01-5,13 (bs; N_εH)

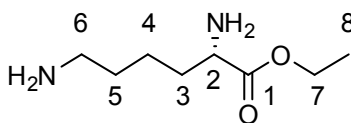
¹³C NMR (75,74 MHz; CDCl₃): 14,2 (C₈); 22,4 (C₄); 28,3; 28,4 (C₁₁; C₁₄); 29,5 (C₅); 32,4 (C₃); 40,1 (C₆); 53,3 (C₂); 61,3 (C₇); 79,2; 79,9 (C₁₀; C₁₃); 155,5; 156,1 (C₉; C₁₂); 172,8 (C₁)

MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet [M+Na]⁺: 397,2309 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 397,2321 [M+Na]⁺

(S)-Ethyl-2,6-diaminohexanoat (19c)⁴⁶



Ausbeute: 77%

¹H NMR (300,13 MHz; CD₃OD): 1,31-1,36 (t; 3H; ³J=7,05 Hz; H₈); 1,46-1,65 (m; 2H; H₄); 1,66-1,80 (m; 2H; H₅); 1,85-2,07 (m; 2H; H₃); 2,94-2,99 (t; ³J=7,55 Hz; 2H; H₆); 4,02-4,07 (t; ³J=6,61 Hz; 1H; H₂); 4,28-4,36 (q; ³J=7,05 Hz; 2H; H₇)

⁴⁵ Die Substanz wurde bereits mit alternativem Syntheseweg und ohne Analytik beschrieben [205].

⁴⁶ Die Synthese dieser Substanz wurde mehrfach auf anderen Wegen publiziert, aber ohne vergleichbare Analytik [206-208].

¹³C NMR (75,74 MHz; CD₃OD): 13,0 (C₈); 21,7 (C₄); 26,6 (C₅), 29,7 (C₃), 38,9 (C₆), 52,3 (C₂), 62,3 (C₇), 168,9 (C₁)

MS: (HR-ESI pos.)

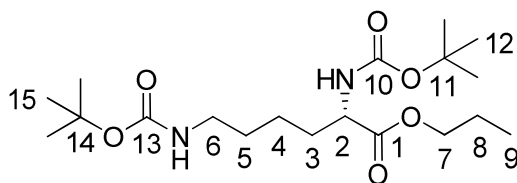
Berechnet [M+H]⁺: 175,1441 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 175,1438 [M+H]⁺, 197,1253 [M+Na]⁺

Zerfallsprodukte: *m/z*: 84,08 [M-NH₂-COOEt zyklisiert]⁺, 158,12 [M-NH₂+H zyklisiert]⁺

Retentionszeit (LC-MS): 3,9 Min

(S)-*n*-Propyl-2,6-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)hexanoat (21d)



Ausbeute: 50 %

Eluent (Säulenchromatographie): Cyclohexan / EE 5:1

R_f-Wert: (Cyclohexan / EE 5:1) 0,18

¹H NMR (300,13 MHz, CDCl₃): 0,92-0,97 (t, 3H; ³J=7,49 Hz; H₉); 1,17-1,88 (m; 8H; H₃; H₄; H₅; H₈); 1,44 (s; 18H; H₁₂; H₁₅); 3,05-3,16 (dt, ²J=12,62 Hz; ³J=6,46 Hz; 2H; H₆); 4,06-4,12 (dt, ²J=2,28 Hz; ³J=6,75 Hz; 2H; H₇); 4,23-4,31 (m; 1H; H₂); 4,49-4,61 (bs; N_dH); 5,01-5,12 (bs; N_eH)

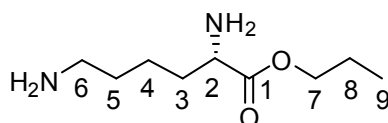
¹³C NMR (75,74 MHz; CDCl₃): 10,3 (C₉); 21,9 (C₈); 22,5 (C₄); 26,9 (C₅); 28,3; 28,4 (C₁₂; C₁₅); 29,6 (C₃); 32,5 (C₆); 40,4 (C₂); 66,9 (C₇); 79,1; 79,8 (C₁₁; C₁₄); 155,6; 156,0 (C₁₀; C₁₃); 168,5 (C₁)

MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet [M+Na]⁺: 411,2466 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 411,2477 [M+Na]⁺

(S)-n-Propyl-2,6-diaminohexanoat (19d)⁴⁷



Ausbeute: 68%

¹H NMR (500,13 MHz; CD₃OD): 0,97-1,01 (t; 3H; ³J=7,46 Hz ; H₉); 1,46-1,64 (m; 2H; H₄); 1,70-1,78 (m; 4H; H₅; H₈); 1,89-2,04 (m; 2H; H₃); 2,93-2,98 (t; ³J=7,83 Hz; 2H; H₆); 4,05-4,09 (t; ³J=6,54 Hz; 1H; H₂); 4,21-4,25 (t; ³J=6,54 Hz; 2H; H₇)

¹³C NMR (125,75 MHz; CD₃OD): 10,6 (C₉); 23,0; 23,3 (C₈; C₄); 26,6 (C₅); 29,7 (C₅); 38,9 (C₆); 52,3 (C₂); 62,3 (C₇)168,9 (C₁)

MS: (HR-ESI pos.)

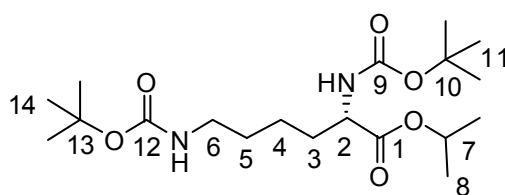
Berechnet [M+H]⁺: 189,1598 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 189,1602 [M+H]⁺

Zerfallsprodukte: *m/z*: 172,1339 [M+H-CH₃]⁺, 130,0863 [M+H-nPr-NH₂, zyklisiert]⁺

Retentionszeit (LC-MS): 9,3 Min

(S)-Isopropyl-2,6-bis(*tert*-butoxycarbonylamino) hexanoat (21e)



Ausbeute: 100 %

Eluent (Säulenchromatographie): nHexan / EE 5:1

R_f-Wert: (CyHex / EE 5:1) 0,27

⁴⁷ Die Synthese dieser Substanz wurde bereits auf anderem Wege publiziert, aber ohne vergleichbare Analytik [209].

¹H NMR (300,13 MHz; CDCl₃): 1,22-1,27 (2d; 6H; ³J=6,31 Hz ; H_{8a}, H_{8b}) ; 1,30-1,88 (m; 6H; H₃; H₄; H₅); 1,44 (s; 18H; H₁₁; H₁₄); 3,05-3,15 (dt; ²J=12,33 Hz; ³J=6,39 Hz; 2H; H₆); 4,16-4,27 (m; 1H; H₂); 4,49-4,63 (bs; N_dH); 4,97-5,10 (septett; ³J=6,31 Hz; 1H; H₇); 4,99-5,13 (bs; N_eH)

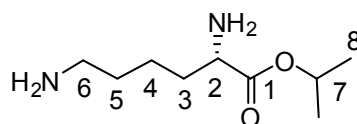
¹³C NMR (75,74 MHz; CDCl₃): 21,7; 21,8 (C_{8a}, C_{8b}); 22,4 (C₄); 28,3; 28,4 (C₁₁; C₁₄); 29,6 (C₅); 32,5 (C₃); 40,2 (C₆); 53,4 (C₂); 68,9 (C₇); 79,1; 79,7 (C₁₀; C₁₃); 155,5; 156,0 (C₉; C₁₂); 172,2 (C₁)

MS: (HR-ESI)

Berechnet [M+H]⁺: 389,2646 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 389,2632 [M+H]⁺; 411,2460 [M+Na]⁺

(S)-Isopropyl-2,6-diaminohexanoat (19e)⁴⁸



Ausbeute: 95%

¹H NMR (500,13 MHz; CD₃OD): 1,30-1,35 (d; 6H; ³J=6,09 Hz ; H₈); 1,45-1,67 (m; 2H; H₄); 1,67-1,84 (m; 2H; H₅); 1,86-2,06 (m; 2H; H₃); 2,93-3,02 (t; ³J=7,78 Hz; 2H; H₆); 4,00-4,07 (t; ³J=6,53 Hz; 1H; H₂); 5,07-5,19 (septett; ³J=6,09 Hz; 1H; H₇)

¹³C NMR (125,75 MHz; CD₃OD): 21,9 (C₈); 23,2 (C₄); 28,0 (C₅); 31,1 (C₃); 40,4 (C₆); 53,8 (C₂); 72,1 (C₇); 169,8 (C₁)

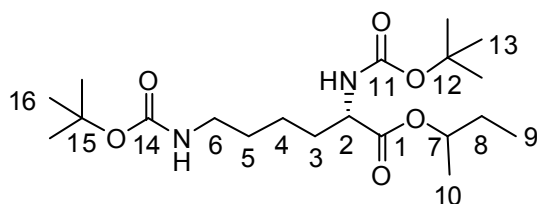
MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet [M+H]⁺: 189,1598 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 189,1601 [M+H]⁺

Retentionszeit (LC-MS): 9,4 Min

⁴⁸ Diese Substanz wurde bereits im Rahmen von GC-Untersuchungen auf anderem Wege synthetisiert. Es fehlt aber vergleichbare Analytik [210].

(2S)-sek-Butyl-2,6-bis(tert-butoxycarbonylamino) hexanoat (21f)

Ausbeute: 93 %

Eluent (Säulenchromatographie): Cyclohexan / EE 5:1

R_f-Wert: (CyHex / EE 5:1) 0,16

¹H NMR (500,13 MHz; CDCl₃)⁴⁹: 0,85-0,92 (t; 3H; ³J=7,56 Hz; H₉); 1,18-1,23 (t; 3H; ³J=6,09 Hz; H₁₀); 1,29-1,87 (m; 8H; H₃; H₄; H₅; H₈); 1,43 (s; 18H; H₁₃; H₁₆); 3,04-3,14 (dt; ²J=11,16 Hz; ³J=6,31 Hz; 2H; H₆); 4,17-4,28 (m; 1H; H₂); 4,49-4,65 (bs; N_αH); 4,80-4,93 (tq; ³J(H₇; H₈)=6,31 Hz; ³J(H₇; H₁₀)=6,09 Hz; 2H; H₇) 5,03-5,15 (bs; N_εH)

¹³C NMR (125,75 MHz; CDCl₃): 9,7 (C₉); 19,4 (C₁₀); 22,4 (C₄); 26,9 (C₅); 28,3; 28,4 (C₁₃; C₁₆); 28,7 (C₈); 32,5 (C₃); 40,4 (C₆); 53,4 (C₂); 73,4 (C₇); 79,1; 79,7 (C₁₂; C₁₅); 155,4; 156,0 (C₁₁; C₁₄); 172,4 (C₁)

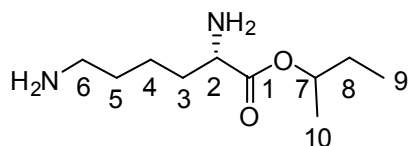
MS: (HR-ESI; pos.)

Berechnet [M+Na]⁺: 425,2622 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 425,2627 [M+Na]⁺

⁴⁹ Die Signale der Esterkette erscheinen teilweise verdoppelt. Dies liegt an den beiden Diastereomeren, die aufgrund der Reaktion des enantiomerenreinen L-Lysin mit dem racemischen sek-Butylalkohol entstehen.

(2S)-sek-Butyl-2,6-diaminohexanoat (19f)



Ausbeute: 53%

^1H NMR (500,13 MHz; CD_3OD)⁵⁰: 0,93-0,97 (t; 3H; $^3J=7,40$ Hz; H_9); 1,29-1,31 (d; 3H; $^3J=6,24$ Hz; H_{10}); 1,46-1,79 (m; 6H; H_4 ; H_5 ; H_8); 1,88-2,06 (m; 2H; H_3); 2,94-2,98 (t; $^3J=7,64$ Hz; 2H; H_6); 4,03-4,07 (t; $^3J=6,48$ Hz; 1H; H_2); 4,94-5,02 (m; 1H; H_7)

^{13}C NMR (125,75 MHz; CD_3OD): 10,1 (C_9); 19,6 (C_{10}); 23,3 (C_4); 28,1 (C_5); 29,7 (C_8); 31,1 (C_3); 40,3 (C_6); 53,9 (C_2); 76,7 (C_7); 170,1 (C_1)

MS: (HR-ESI pos.)

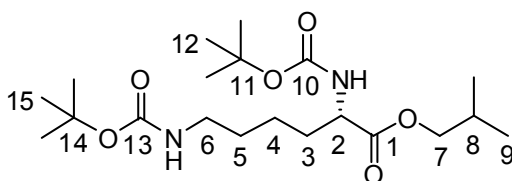
Berechnet $[\text{M}+\text{H}]^+$: 203,1754 g/mol

Beobachtet: m/z : 203,1761 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 405,3461 $[2\text{M}+\text{H}]^+$

Zerfallsprodukte: m/z : 186,1533 $[\text{M}-\text{NH}_2]^+$

Retentionszeit (LC-MS): 9,7 Min

(S)-Isobutyl-2,6-bis(tert-butoxycarbonylamino)-hexanoat (21h)



Ausbeute: 90 %

Eluent (Säulenchromatographie): Cyclohexan / EE 5:1

R_f -Wert: (Cyclohexan / EE 5:1) 0,33

⁵⁰Die Signale der Esterkette erscheinen teilweise verdoppelt. Dies liegt an den beiden Diastereomeren, die aufgrund der Reaktion des enantiomerenreinen L-Lysin mit dem racemischen sek-Butylalkohol entstehen.

¹H NMR (300,13 MHz; CDCl₃): 0,85-0,90 (d; 6H; ³J=6,68 Hz ; H₉); 1,26-1,95 (m; 8H; H₃; H₄; H₅; H₈); 1,38 (s; 18H; H₁₂; H₁₅); 2,99-3,10 (m; 2H; H₆); 3,79-3,92 (m; 2H; H₇); 4,17-4,27 (m; 1H; H₂); 4,58-4,72 (bs; N_αH); 5,07-5,16 (bs; N_εH)

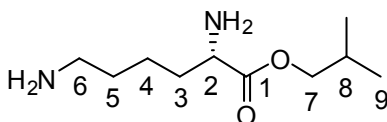
¹³C NMR (75,74 MHz; CDCl₃): 18,9 (C₉); 22,4 (C₄); 27,6 (C₅); 28,2; 28,3 (C₁₂; C₁₅); 29,5 (C₈); 32,3 (C₃); 40,0 (C₆); 53,2 (C₂); 71,2 (C₇); 78,9; 79,6 (C₁₁; C₁₄); 155,4; 155,9 (C₁₀; C₁₃); 172,7 (C₁)

MS: (HR-ESI; pos.)

Berechnet [M+Na]⁺: 425,2622 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 425,2640 [M+Na]⁺

(S)-Isobutyl-2,6-diaminohexanoat (19f)



Ausbeute: 100%

¹H NMR (300,13 MHz; CD₃OD): 0,96-1,00 (d; 6H; ³J=6,68 Hz; H₉); 1,45-1,66 (m; 2H; H₄); 1,66-1,82 (m; 2H; H₅); 1,88-2,10 (m; 3H; H₃; H₈); 2,91-3,01 (t; ³J=7,34 Hz; 2H; H₆); 4,03-4,07 (d; ³J=6,53 Hz; 2H; H₇); 4,06-4,13 (t; ³J=6,09 Hz; 1H; H₂)

¹³C NMR (75,74 MHz; CD₃OD): 19,3 (C₉); 23,3 (C₄); 28,1 (C₅); 29,0 (C₈); 31,1 (C₃); 40,3 (C₆); 53,8 (C₂); 73,5 (C₇); 170,5 (C₁)

MS: (HR-ESI pos,)

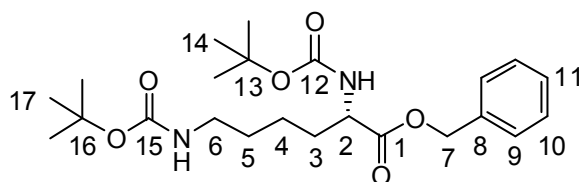
Berechnet [M+H]⁺: 203,1754 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 203,1710 [M+H]⁺; 405,3347 [2M+H]⁺

Zerfallsprodukte: *m/z*: 186,1529 [M-NH₂]⁺

Retentionszeit (LC-MS): 9,7 Min

(S)-Benzyl-2,6-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)hexanoat (21i)⁵¹



Ausbeute: 89%

Eluent (Säulenchromatographie): Cyclohexan / EE 5:1 → 2:1

R_f-Wert: (Cyclohexan / EE 2:1) 0,43

¹H NMR (500,13 MHz; CDCl₃): 1,23-1,85 (m; 6H; H₃; H₄; H₅); 1,44 (s; 18H; H₁₄; H₁₇); 3,02-3,10 (m; 2H; H₆); 4,29-4,35 (m; 1H; H₂); 4,48-4,55 (bs; N_αH); 5,04-5,13 (bs; N_εH); 5,11-5,22 (m; 2H; H₇); 7,31-7,39 (m; 5H; H₉; H₁₀; H₁₁)

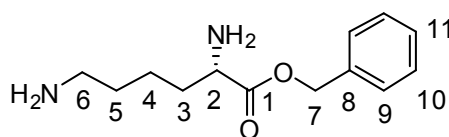
¹³C NMR (125,75 MHz; CDCl₃): 22,4 (C₄); 28,3; 28,4 (C₁₄; C₁₇); 29,5 (C₅); 32,3 (C₃); 40,1 (C₆); 53,3 (C₂); 67,0 (C₇); 79,1; 79,9 (C₁₃; C₁₆); 128,3; 128,4; 128,5 (C₉; C₁₀; C₁₁); 135,4 (C₈); 155,4; 156,0 (C₁₂; C₁₅); 172,6 (C₁)

MS: (ESI; pos.)

Berechnet [M+Na]⁺: 459,24 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 459,26 [M+Na]⁺

(S)-Benzyl-2,6-diaminohexanoat (19i)



Ausbeute: 89%

¹H NMR (300,13 MHz; CD₃OD): 1,29-2,17 (m; 6H; H₃; H₄; H₅); 2,81-2,99 (bs; 2H; H₆); 4,05-4,19 (s; 1H; H₂); 5,22-5,38 (bs; 2H; H₇); 7,33-7,48 (m; 5H; H₉; H₁₀; H₁₁)

⁵¹ Die Substanz ist bereits literaturbekannt [211].

¹³C NMR (75,74 MHz; CD₃OD): 23,1 (C₄); 28,0 (C₅); 31,1 (C₃); 40,6 (C₆); 53,8 (C₂); 69,4 (C₇); 129,7; 129,8; 129,9 (C₉; C₁₀; C₁₁); 136,3 (C₈); 170,1 (C₁)

MS: (HR-ESI pos.)

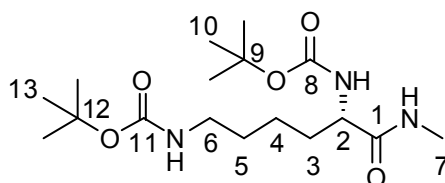
Berechnet [M+H]⁺: 237,1598 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 237,1605 [M+H]⁺; 473,2324 [2M+H]⁺

Zerfallsprodukte: *m/z*: 220,1395 [M-NH₂]⁺

Retentionszeit (LC-MS): 10,2 Min

(S)-2,6-Bis(tert-butoxycarbonylamino)-N-methylhexanamid (22b)⁵²



Ausbeute: 45,5 %

Eluent (Säulenchromatographie): nHexan / EE 3:1 → 1:3

R_f-Wert: (Cyclohexan / EE 1:1) 0,09

¹H NMR (300,13 MHz; CDCl₃): 1,28-1,91 (m; 6H; H₃; H₄; H₅); 1,44 (s; 18H; H₁₀; H₁₃); 2,82 (d; ³J=4,92 Hz; 3H; H₇); 3,07-3,14 (dt; ²J=12,70 Hz; ³J=6,50 Hz; 2H; H₆); 3,99-4,05 (m; 1H; H₂); 4,52-4,65 (bs; NH_α); 5,01-5,14 (bs; NH_ε); 6,08-6,20 (bs; NH_{Amid})

¹³C NMR (75,74 MHz; CDCl₃): 22,6 (C₄); 26,2 (C₇); 28,3; 28,4 (C₁₀; C₁₃); 29,7 (C₅); 32,0 (C₃); 39,9 (C₆); 54,5 (C₂); 79,2; 80,4 (C₉; C₁₂); 155,8; 156,2 (C₈; C₁₁); 172,6 (C₁)

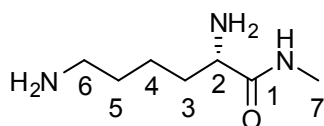
MS: (HR-ESI; pos.)

Berechnet [M+Na]⁺: 382,2312 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 382,2325 [M+Na]⁺

⁵² Eine Synthese dieser Substanz, die der durchgeführten sehr ähnlich ist, wurde bereits publiziert, allerdings ohne vergleichbare Analytik [212].

(S)-2,6-Diamino-N-methylhexanamid (20b)⁵³



Ausbeute: 97 %

¹H NMR (300,13 MHz; CD₃OD): 1,41-1,54 (m; 2H; H₄); 1,66-1,78 (m; 2H; H₅); 1,79-1,98 (m; 2H; H₃); 2,80 (s; 3H; H₇); 2,91-2,99 (t; ³J=7,78 Hz; 2H; H₆); 3,83-3,89 (t; ³J=6,61 Hz; 1H; H₂)

¹³C NMR (75,74 MHz; CD₃OD): 21,6 (C₄); 24,9 (C₇); 26,7 (C₅); 30,6 (C₃); 38,9 (C₆); 52,8 (C₂); 168,8 (C₁)

MS: (HR-ESI pos)

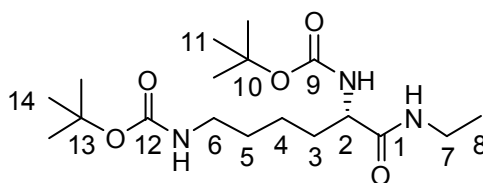
Berechnet [M+H]⁺: 160,1444 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 160,1444 [M+H]⁺; 182,1262 [M+Na]⁺

Zerfallsprodukte: *m/z*: 84,08 [M-NH₂-CONHMe+H zyklisiert]⁺; 143,12 [M-NH₂+H zyklisiert]⁺; 320,25 [2M+H]⁺

Retentionszeit (LC-MS): 6,0 Min

(S)-2,6-Bis(*tert*-butoxycarbonylamino)-N-ethylhexanamid (22c)



Ausbeute: 56 %

Eluent (Säulenchromatographie): Cyclohexan / EE 1:1

R_f-Wert: (Cyclohexan / EE 1:1) 0,42

⁵³ Die Substanz wurde bereits auf anderem Wege synthetisiert. Die ¹H-Spektren sind identisch [212].

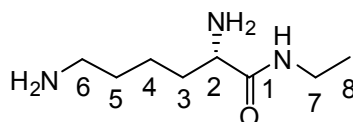
¹H NMR (300,13 MHz; CDCl₃): 1,11-1,16 (t; ³J=7,27 Hz; 3H; H₈); 1,20-1,96 (m; 6H; H₃; H₄; H₅); 1,44 (s; 18H; H₁₁; H₁₄); 3,06-3,16 (dt; ²J=12,77 Hz; ³J=6,53 Hz; 2H; H₆); 3,24-3,34 (m; 2H; H₇); 3,94-4,04 (m; 1H; H₂); 4,53-4,63 (bs; NH_α); 5,01-5,15 (bs; NH_ε); 6,04-6,15 (bs; NH_{Amid})

MS: (HR-ESI; pos.)

Berechnet [M+Na]⁺: 396,2469 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 396,2481 [M+Na]⁺

(S)-2,6-Diamino-N-ethylhexanamid (20c)



Ausbeute: 98 %

¹H NMR (300,13 MHz; CD₃OD): 1,14-1,20 (t; ³J=7,19 Hz; 3H; H₈); 1,42-1,56 (m; 2H; H₄); 1,66-1,79 (m; 2H; H₅); 1,80-1,97 (m; 2H; H₃); 2,91-2,99 (t; ³J=7,85 Hz; 2H; H₆); 3,23-3,31 (q; ³J=7,19 Hz; 2H; H₇); 3,81-3,87 (t; ³J=6,61 Hz; 1H; H₂)

¹³C NMR (75,74 MHz; CD₃OD): 13,3 (C₈); 21,6 (C₄); 26,7 (C₅); 30,7 (C₃); 34,1 (C₇); 38,9 (C₆); 52,8 (C₂); 168,2 (C₁)

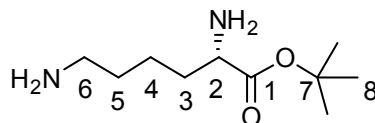
MS: (HR-ESI; pos.) LC-MS

Berechnet [M+H]⁺: 174,1601 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 174,1590 [M+H]⁺; 347,3133 [2M+H]⁺

Zerfallsprodukte: *m/z*: 157,1293 [M-NH₂]⁺

Retentionszeit (LC-MS): 11,8 Min

(S)-tert-Butyl 2,6-diaminohexanoat (19g)⁵⁴

370 mg (1 mmol) des ϵ -Cbz-geschützten Lysin-*tert*-Butylesters wurden in der Mikrowelle nach Zugabe von 51 mg Palladium auf Kohle (10% $\rightarrow$ 5 mol%) und 252 mg (4 mmol) Ammoniumformiat drei Mal bei 15 W auf 65°C erhitzt. Zwischen den einzelnen Zyklen wurde die Reaktion auf Eis gekühlt.

Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Da das Rohprodukt noch Rückstände von Lösemittel und Formiat enthielt, wurde es in 1% HCl aufgenommen und lyophilisiert. Auf diese Weise konnten 269 mg (977 μ mol) des Produktes als Bis-Hydrochloridsalz erhalten werden.

Ausbeute: 98 %

¹H NMR (300,13 MHz; CD₃OD): 1,46-1,64 (m; 2H; H₄); 1,54 (s; 9H; H₈); 1,67-1,82 (m; 2H; H₅); 1,84-2,04 (m; 2H; H₃); 2,93-3,01 (t; ³J=7,85 Hz; 2H; H₆); 3,90-3,97 (t; ³J=6,61 Hz; 1H; H₂)

¹³C NMR (75,74 MHz; CD₃OD): 23,6 (C₄); 28,3 (C₈); 29,2 (C₅); 35,0 (C₃); 40,8 (C₆); 55,4 (C₂); 82,5 (C₇); 175,7 (C₁)

MS: (ESI; pos.)

Berechnet [M+H]⁺: 203,1754 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 203,1759 [M+H]⁺, 405,3457 [2M+H]⁺

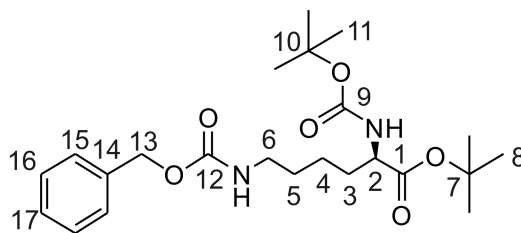
Zerfallsprodukte: *m/z*: 147,1129 [M-C(CH₃)₃]⁺, 130,0854 [M-COO^tBu, zyklisiert]⁺

Retentionszeit (LC-MS): 9,7 Min

⁵⁴ Die Substanz wurde bereits auf anderem Wege hergestellt, allerdings ohne Angabe vergleichbarer Analytik [213]. Die durchgeführte Synthese lehnt sich an ein Cbz-Entschützungsprotokoll von Daga *et al.* an [146].

5.1.3 Synthese der biotinylierten Lysin-Photoaffinitätssonde

(S)-*tert*-Butyl-6-(benzoxycarbonylamino)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)hexanoat (36a)⁵⁵



2 g (5,36 mmol) ϵ -Cbz-geschützter Lysin-*tert*-Butylester wurden in 15 ml Chloroform gelöst, Eine Lösung von 0,44 g (5,63 mmol) NaHCO₃ in 10 ml Wasser wurde zu der Chloroform-Lösung gegeben und die Emulsion so lange heftig gerührt, bis die Gasentwicklung abgeklungen war. Dann wurden 1,17 g (5,36 mmol) Boc-Anhydrid in 8 ml Chloroform zugegeben und auf 75°C erhitzt. Nach 1,5 h Rühren unter Rückfluss wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase zwei Mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂; Eluent: EE/n-Hex 1:3). Nach Entfernen des Lösemittels erhält man 2,31 g (5,32 mmol) des Produktes als farbloses Öl.

Ausbeute: 99 % [Lit.: 98 %]

R_f-Wert: (EE / CyHex 1:3) 0,24

¹H NMR (300,13 MHz; CDCl₃): 1,29-1,83(m; 6H; H₃; H₄; H₅); 1,43 (s; 9H; H₁₁); 1,45 (s; 9H; H₈); 3,14-3,23 (m; 2H; H₆); 4,10-4,19 (m; 1H; H₂); 4,77-4,87 (m; 1H; NH); 5,01-5,07 (bs; 1H; NH); 5,05-5,13 (s; 2H; H₁₃); 7,29-7,38 (m; 5H; H_{Ph})

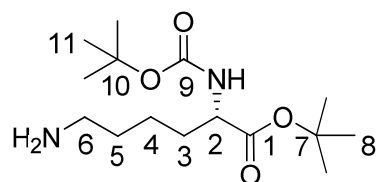
¹³C NMR (75,74 MHz; CDCl₃): 22,3 (C₄); 28,0 (C₈/C₁₁); 28,3 (C₈/C₁₁); 29,4 (C₅); 32,6 (C₃); 40,7 (C₆); 53,6 (C₂); 66,6 (C₁₃); 79,7 (C₁₀); 81,8 (C₇); 128,0; 128,1; 128,5 (C₁₅; C₁₆; C₁₇); 136,6 (C₁₄); 155,4 (C₉); 156,4 (C₁₂); 171,9 (C₁)

MS: (MALDI pos.)

Berechnet [M+Na]⁺: 459,2 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 459,0 [M+Na]⁺

⁵⁵ Die Synthese wurde nach der von Bergeron *et al.* publizierten Vorschrift durchgeführt [165]. Die NMR-Spektren entsprechen den publizierten.

(S)-tert-Butyl-6-amino-2-(tert-butoxycarbonylamino)hexanoat (36b)⁵⁶

643 mg (1,47 mmol) des vollständig geschützten Lysinderivats **36a** wurden in 2 ml trockenem Isopropanol gelöst und 77 mg (5 mol%) Palladium auf Kohle (10%) sowie 370 mg (5,88 mmol) Ammoniumformiat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde in der Mikrowelle mit 30 W bestrahlt, bis eine Temperatur von 85°C erreicht war. Diese Temperatur wurde für 1 Min gehalten. Dann wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt und der Zyklus vier Mal wiederholt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Trocknen der Substanz wurden 378 mg (1,25 mmol) des Produktes als gelbliches Öl erhalten. Das Produkt war von ausreichender Reinheit und wurde ohne weitere Aufreinigung in den folgenden Reaktionen eingesetzt.

Ausbeute: 85%

R_f-Wert: (DCM / MeOH 9:3) 0,55

¹H NMR (300,13 MHz; CD₃OD): 1,19-1,84 (m; 6H; H₃; H₄; H₅); 1,45 (s; 18H; H₈; H₁₁); 2,62-2,69 (t; ³J=7,03 Hz; 2H; H₆); 3,91-3,98 (m; 1H; H₂)

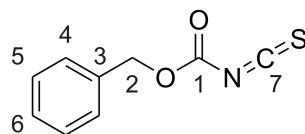
¹³C NMR (75,74 MHz; CD₃OD): 24,3 (C₄); 28,3; 28,8 (C₈; C₁₁); 32,5; 33,0 (C₃; C₅); 42,2 (C₆); 55,8 (C₂); 80,4 (C₁₀); 82,5 (C₇); 158,2 (C₉); 173,9 (C₁)

MS: (MALDI pos.)

Berechnet [M+H]⁺: 303,2 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 303,2 [M+H]⁺

⁵⁶ Die Substanz wurde bereits von Bergeron *et al.* auf anderem Wege synthetisiert [165]. Die analytischen Daten entsprechen den veröffentlichten. Die durchgeführte Entschützung ist an ein Protokoll von Daga *et al.* angelehnt [146].

O-Benzylcarbonisothiocyanatidat (31)⁵⁷

3,3 g (34 mmol) Kaliumthiocyanat wurde in 3 ml Wasser gelöst. Nach der Zugabe von 57 mg Kaliumacetat und 50 µl Chinolin wurde das Gemisch auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 2,15 g (12,7 mmol) Benzylchloroformat mit Hilfe einer Spritzenpumpe über den Zeitraum von 1 h zugetropft. Dann wurde die gelbe Emulsion 3,5 h bei 0°C gerührt und im Anschluss vier Mal mit DCM extrahiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂; Eluent: DCM/CyHex 3:17 → 3:15). Es konnten 1,64 g (8,5 mmol) des Produktes als gelbe Flüssigkeit isoliert werden.

Ausbeute: 67 % [Lit. 67 %]

R_f-Wert: (DCM / CyHex 3:17) 0,24

¹H NMR (300,13 MHz; CDCl₃): 5,22 (s; 2H; H₂); 7,38-7,41 (m; 5H; H_{Ph})

¹³C NMR (75,74 MHz; CDCl₃): 70,6 (C₂); 128,6; 128,8 (C₄; C₅); 129,0 (C₆); 133,9 (C₃); 141,2 (C₇); 147,2 (C₁)

MS: (EI pos)

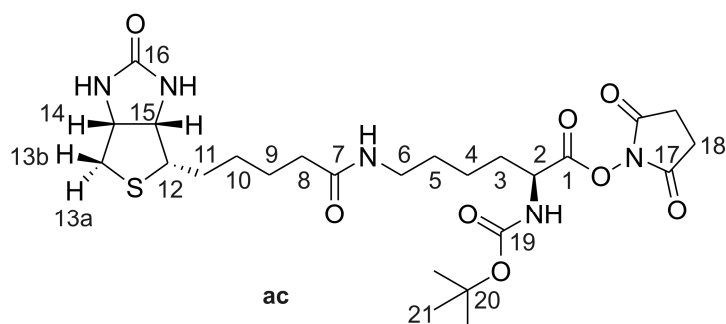
Berechnet [M]⁺: 193,0 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 193,0 [M]⁺

IR (cm⁻¹): 1737 (ν (C=O), 1945 (ν NCS)

⁵⁷ Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Lanman *et al.* durchgeführt [163]. Die analytischen Daten sind identisch.

(S)-2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 2-(tert-butoxycarbonylamino)-6-(5-((4S)-2-oxo-hexahydro-1H-thieno(3,4-d)imidazol-4-yl)pentanamido)hexanoat (29c)⁵⁸



572 mg (1,12 mmol) α -Boc-Biocytin **29b**⁵⁹ wurden in 15 ml eines 1:1 Gemisches aus trockenem DMF und Isopropanol gelöst und 169 mg (1,45 mmol) NHS in weiteren 5 ml des Lösemittelgemisches zugegeben. Anschließend wurden 229 mg (1,82 mmol) DIPCDI langsam zugetropft und das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Nach 17 h wurde das Lösemittel am Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand in 10 ml Chloroform aufgenommen. Diese Lösung wurde auf 50 ml einer eisgekühlten 1:1 Mischung aus DEE und Cyclohexan getropft. Der ausfallende weiße Feststoff wurde abfiltriert und mit DEE/Cyclohexan (1:1) gewaschen. Falls das Produkt noch Rückstände an Diisopropylharnstoff enthielt, wurde die Fällung wiederholt.

Das Produkt wurde als weißes Pulver erhalten (588 mg; 1,03 mmol).

Ausbeute: 85 % [Lit. 93 %]

R_f-Wert: (DCM / MeOH 9:1) 0,28

¹H NMR (300,13 MHz; CDCl₃): 1,34-1,97 (m; 12H; H₃; H₄; H₅; H₉; H₁₀; H₁₁); 1,44 (s; 9H; H₂₁); 2,15-2,23 (t; ³J=7,47 Hz; 2H; H₈); 2,67-2,95 (m; 2H; H₁₃); 2,85 (s; 4H; H₁₈); 3,08-3,30 (m; 3H; H₆; H₁₂); 4,27-4,34 (m; 1H; H₁₅); 4,47-4,54 (m; 1H; H₁₄); 4,58-4,67 (m; 1H; H₂); 5,34-5,42 (d; 1H; ³J=7,77 Hz; NH); 5,72-5,80 (bs; 1H; NH); 6,38-6,65 (m; 2H; NH)

¹³C NMR (75,74 MHz; CD₃OD): 24,0; 26,3; 26,6; 26,9; 28,7; 29,5; 29,8 (C₄; C₅; C₉; C₁₀; C₁₁; C₁₈; C₂₁); 32,4 (C₃); 36,9 (C₈); 40,0 (C₁₂); 41,1 (C₁₃); 53,4 (C₂); 57,0 (C₆); 61,6 (C₁₄); 63,4 (C₁₅); 80,5 (C₂₀); 157,7 (C₁₉); 166,1 (C₁₆); 171,4 (C₁₇); 174,9 (C₁); 176,0 (C₇)

MS: (FAB pos.)

⁵⁸ Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Wilbur *et al.* durchgeführt [160]. Das ¹H-NMR- und das Massenspektrum entsprechen der Literatur, ein ¹³C-Spektrum ist nicht publiziert.

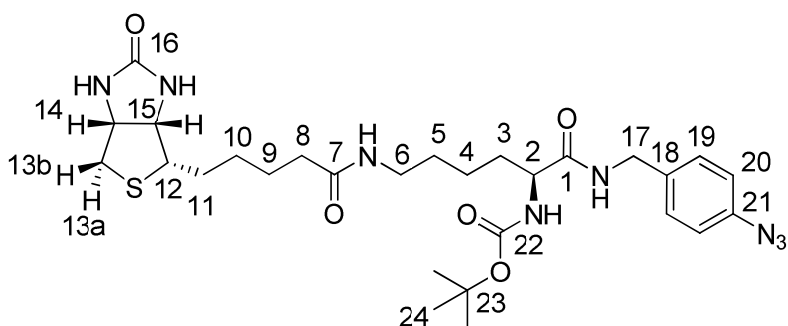
⁵⁹ Diese Substanz wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit hergestellt [125].

Berechnet $[M+H]^+$: 570,3 g/mol

Beobachtet: m/z : 570,0 $[M+H]^+$

Zerfallsprodukte: m/z : 470,0 $[M-Boc]^+$; 514,0 $[M+tBu]^+$

***tert*-Butyl-(S)-1-(4-azidobenzylamino)-1-oxo-6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno(3,4-d)imidazol-4-yl)pentanamido)hexan-2-ylcarbammat (30a)**



130 mg (880 μ mol) p-Azidobenzylamin (zur Verfügung gestellt von R. Wombacher) wurden in 7 ml trockenem DMF gelöst und mit 133 mg (1,32 mmol) NMM versetzt. Dann wurden 500 mg (880 μ mol) des Boc-Biocytin-NHS-Esters **29c**, gelöst in 13 ml trockenem DMF, zugetropft. Nachdem über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon gerührt worden war, wurde das Reaktionsgemisch auf 150 ml Wasser gegeben. Diese Lösung wird drei Mal mit einem 15:1 Gemisch von Chloroform und Methanol extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 ; Eluent: DCM/MeOH 97:3 $\rightarrow$ 9:1).

Nach Entfernen des Lösemittels wurden 375 mg (623 μ mol) des Produktes als leuchtend gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 71 %

R_f-Wert: (DCM / MeOH 9:1) 0,59

^1H NMR (300,13 MHz; $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1): 1,23-1,80(m; 12H; H_3 ; H_4 ; H_5 ; H_9 ; H_{10} ; H_{11}); 1,40 (s; 9H; H_{24}); 2,13-2,20 (t; $^3J=7,40$ Hz; 2H; H_8); 2,67-2,73 (d; $^2J=12,82$ Hz; 1H; H_{13a}); 2,86-2,93 (dd; $^2J=12,82$ Hz; $^3J=4,91$ Hz; 1H; H_{13b}); 3,09-3,21 (m; 3H; H_6 ; H_{12}); 3,96-4,04 (t; $^3J=6,59$ Hz; 1H; H_2); 4,25-4,51 (m; 3H; H_{15} ; H_{17}); 4,45-4,51 (dd; 1H; $^3J=4,54$ Hz; $^3J=7,62$ Hz H_{14}); 6,93-6,98 (d; 2H; $^3J=8,72$ Hz; H_{20}); 7,24-7,29 (d; 2H; $^3J=8,72$ Hz; H_{19})

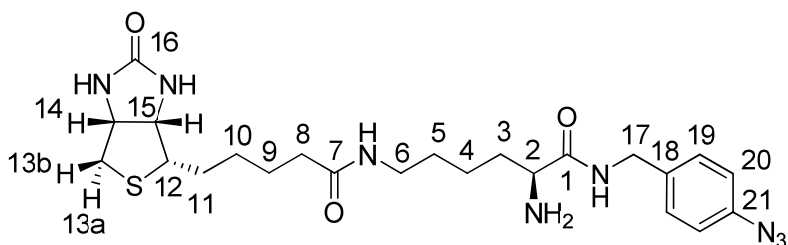
¹³C NMR (75,74 MHz; CDCl₃/ CD₃OD 1:1): 23,6; 26,2; 28,7; 29,1; 29,4 (C₄; C₅; C₉; C₁₀; C₁₁); 28,5 (C₂₄); 32,6 (C₃); 36,2 (C₈); 39,5 (C₁₂); 40,7 (C₁₃); 43,1 (C₁₇); 55,4 (C₂); 56,3 (C₆); 60,9 (C₁₄); 62,7 (C₁₅); 80,5 (C₂₃); 119,6 (C₂₀); 129,5 (C₁₉); 135,8 (C₁₈); 139,7 (C₂₁); 157,0 (C₂₂); 165,1 (C₁₆); 174,2 (C₁); 175,2 (C₇)

MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet [M+H]⁺: 603,30716 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 603,30796 [M+H]⁺, 625,3 [M+Na]⁺; 641,3 [M+K]⁺

(S)-2-Amino-N-(4-azidobenzyl)-6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno(3,4-*d*)imidazol-4-yl)pentanamido)hexanamid (30b)



186 mg (309 µmol) von **30a** wurden in 0,8 ml trockenem DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann wurden 0,2 ml TFA zugetropft, so dass eine 20%ige Lösung entstand und 30 Min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde die Kühlung entfernt und das Rühren für weitere 30 Min bei Raumtemperatur fortgesetzt. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer und im Ölpumpenvakuum entfernt, das Rohprodukt konnte säulenchromatographisch aufgereinigt werden: SiO₂, Eluent: DCM/MeOH 10:3 → 3:10.

120 mg (239 µmol) des Produktes konnten nach Entfernen des Lösemittels isoliert werden.

Ausbeute: 77%

R_f-Wert: (DCM / MeOH 10:3) 0,29

¹H NMR (300,13 MHz; CD₃OD): 1,27-1,88 (m; 12H; H₃; H₄; H₅; H₉; H₁₀; H₁₁); 2,16-2,24 (t; ³J=7,18 Hz; 2H; H₈); 2,67-2,73 (d; ²J=12,60 Hz; 1H; H_{13a}); 2,89-2,96 (dd; ²J=12,82 Hz; ³J=4,84 Hz; 1H; H_{13b}); 3,11-3,24 (m; 3H; H₆; H₁₂); 3,67-3,73 (m; 1H; H₂); 4,28-4,34 (dd; ³J=4,40 Hz; ³J=7,91 Hz; 1H; H₁₅); 4,40-4,44 (d; 1H; ³J=3,96 Hz; H₁₇); 4,47-4,53 (dd; 1H; ³J=4,69 Hz; ³J=7,91 Hz; H₁₄); 7,00-7,05 (d; 2H; ³J=8,42 Hz; H₂₀); 7,31-7,36 (d; 2H; ³J=8,42 Hz; H₁₉)

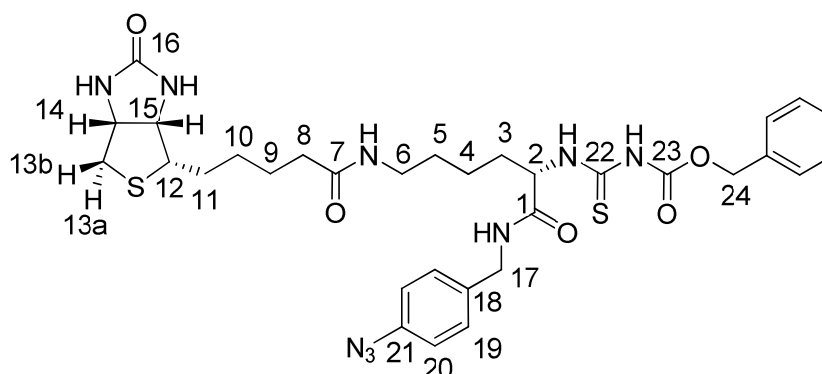
¹³C NMR (75,74 MHz; CD₃OD): 23,8; 26,9; 27,9; 29,5; 30,1 (C₄; C₅; C₉; C₁₀; C₁₁); 33,8 (C₃); 36,8 (C₈); 39,8 (C₁₂); 41,1 (C₁₃); 44,0 (C₁₇); 57,0 (C₆); 61,7 (C₂); 63,4 (C₁₄); 64,2 (C₁₅); 120,2 (C₂₀); 130,5 (C₁₉); 136,3 (C₁₈); 140,7 (C₂₁); 166,8 (C₁₆); 170,3 (C₁); 176,1 (C₇)

MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet [M+H]⁺: 503,25473 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 503,25466 [M+H]⁺, 1005,5 [2M+H]⁺

(S)-N-(4-Azidobenzyl)-2-(3-(benzyloxycarbonyl)thioureido)-6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno(3,4-*d*)imidazol-4-yl)pentanamido)hexanamid (35)



Cbz-Isothiocyanat (**31**) (28 mg, 145 µmol) wurde in 1,6 ml trockenem DCM gelöst und auf 0°C gekühlt, 60 mg (120 µmol) des Amins **30b** wurde in 10% MeOH in DCM unter Zugabe von 80 µl (360 µmol) TEA gelöst und langsam zum Isothiocyanat getropft. Nach 15 Min Rühren bei 0°C wurde die Eiskühlung entfernt und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. SiO₂, Eluent: DCM/MeOH 96:4 → 9:1

Nach Entfernen des Lösemittels wurden 25 mg (36 µmol) des Produktes erhalten.

Ausbeute: 25%

R_f-Wert: (DCM / MeOH 9:1) 0,37

¹H NMR (300,13 MHz; CD₃OD): 1,25-2,00 (m; 12H; H₃; H₄; H₅; H₉; H₁₀; H₁₁); 2,17-2,20 (t; ³J=7,34 Hz; 2H; H₈); 2,67-2,71 (d; ²J=12,72 Hz; 1H; H_{13a}); 2,90-2,94 (dd; ²J=12,72 Hz; ³J=4,89 Hz; 1H; H_{13b}); 3,13-3,26 (m; 3H; H₆; H₁₂); 4,27-4,30 (dd; 1H; ³J=4,40 Hz; ³J=7,83 Hz H₁₅); 4,36-4,39 (m; 2H; H₁₇); 4,46-4,50 (dd; 1H; ³J=4,40 Hz; ³J=7,83 Hz H₁₄); 4,90-4,93 (dd; ³J=5,62 Hz; ³J=7,34 Hz; 1H; H₂); 5,19-5,25 (m; 2H; H₂₄); 6,99-7,02 (d; 2H; ³J=8,56 Hz; H₂₀); 7,31-7,43 (m; 7H; H₁₉; H_{Phenyl Cbz})

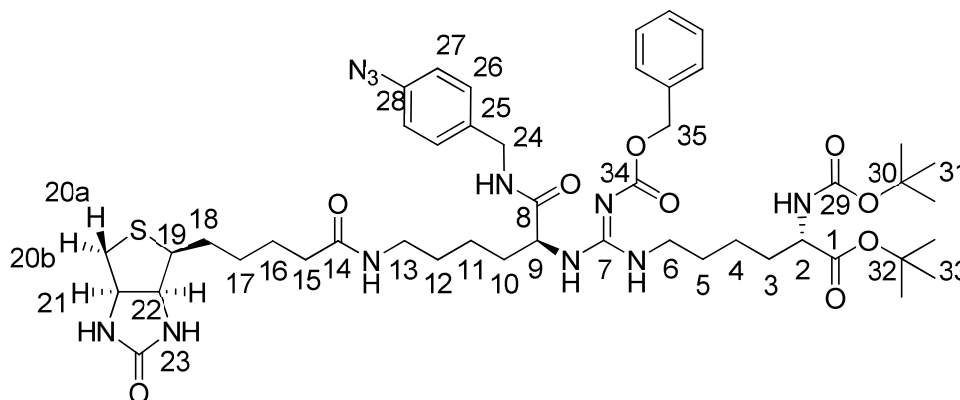
¹³C NMR (75,74 MHz; CD₃OD): 23,8; 27,0; 29,5; 29,7; 30,0 (C₄; C₅; C₉; C₁₀; C₁₁); 33,1 (C₃); 36,9 (C₈); 40,1 (C₁₂); 41,1 (C₁₃); 43,6 (C₁₇); 57,0 (C₆); 60,0 (C₂); 61,7 (C₁₄); 63,4 (C₁₅); 68,8 (C₂₄); 120,1 (C₂₀); 129,4; 129,6; 129,7; 130,3 (C₁₉; 3x C_{Phenyl Cbz}); 136,8; 136,9 (C₁₈; C_{Phenyl Cbz}); 140,4 (C₂₁); 155,0 (C₂₃); 166,1 (C₁₆); 173,3 (C₁); 176,1 (C₇); 181,6 (C₂₂)

MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet [M+H]⁺: 696,27448 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 696,27575 [M+H]⁺; 718,3 [M+Na]⁺; 734,2 [M+K]⁺

(S)-tert-Butyl-6-(3-((S)-1-(4-azidobenzylamino)-1-oxo-6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno(3,4-d)imidazol-4-yl)pentanamido)hexan-2-yl)-2-(benzyloxycarbonyl)-guanidino)-2-(tert-butoxycarbonylamino)hexanoat (37)



25 mg (36 µmol) des Thioharnstoffderivats **35** wurden in 2 ml trockenem DCM gelöst und auf 0°C gekühlt und das in 1ml trockenem DCM gelöste Amin **36b** zugegeben. Nachdem EDC•HCl und DIPEA zugefügt worden waren, wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Lösung mit DCM auf das dreifache Volumen verdünnt und zwei Mal mit 1%iger HCl extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Nachdem das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. SiO₂, Eluent: DCM/MeOH 98:2 → 92:8

Es wurden 32 mg (33 µmol) des Produktes isoliert.

Ausbeute: 92%

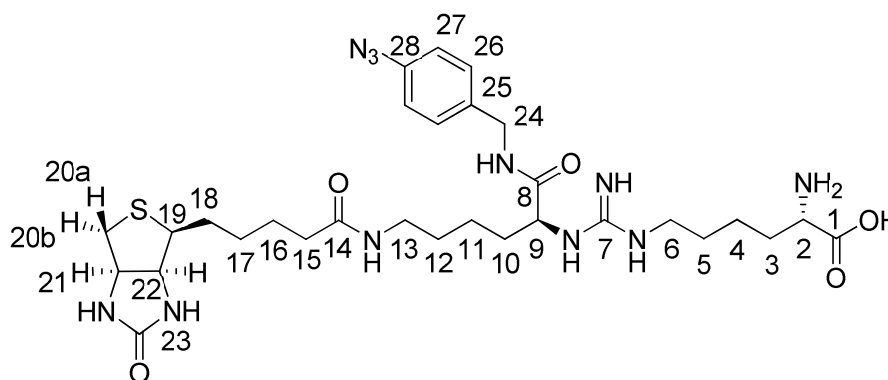
¹H NMR (300,13 MHz; CD₃OD): 1,27-1,89 (m; 18H; H₃; H₄; H₅; H₁₀; H₁₁; H₁₂; H₁₆; H₁₇; H₁₈); 1,44; 1,46 (2s; 18H; H₃₁; H₃₃); 2,15-2,22 (t; ³J=7,25 Hz; 2H; H₁₅); 2,65-2,71 (d; ²J=12,60 Hz; 1H; H_{20a}); 2,86-2,93 (dd; ²J=12,60 Hz; ³J=4,91 Hz; 1H; H_{20b}); 3,12-3,22 (m; 4H; H₆; H₁₃); 3,24-3,30 (m; 1H; H₁₉); 3,92-3,99 (m; 1H; H₂); 4,24-4,29 (dd; 1H; ³J=4,47 Hz; ³J=7,99 Hz H₂₂); 4,32-4,37 (d; 2H; ³J=5,20 Hz; H₂₄); 4,40-4,48 (m; 2H; H₉; H₂₁); 5,03-5,07 (s; 2H; H₃₅); 6,92-6,98 (d; 2H; ³J=8,72 Hz; H₂₇); 7,27-7,36 (m; 7H; H₂₆; H_{Phenyl Cbz})

MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet [M+H]⁺: 964,50732 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 964,50706 [M+H]⁺, 986,5 [M+Na]⁺; 1002,5 [M+K]⁺

(S)-2-Amino-6-(3-((S)-1-(4-azidobenzylamino)-1-oxo-6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno(3,4-d)imidazol-4-yl)pentanamido)hexan-2-yl)guanidine)hexansäure (28)



32 mg (33 µmol) des geschützten Guanidins **37** wurde in 250 µl trockenem DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde ein Gemisch aus 250 µl Thioanisol und 500 µl TFA gegeben und die Kühlung nach 10 Min entfernt. Nach weiteren 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösemittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit semipräparativer HPLC aufgereinigt. Gradient (Lösemittel: A = 0,1 M Triethylammoniumacetat in Wasser pH 7,4; B = 0,1 M Triethylammoniumacetat in Acetonitril/Wasser 8:2 pH 7,4) [%B/Zeit in Min]: 15/0; 30/15, 100/32; 100/40; 15/45.

Ausbeute: 50%

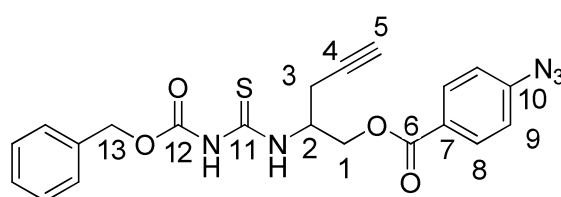
MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet $[M+H]^+$: 674,3555 g/mol

Beobachtet: m/z : 674,3564 $[M+H]^+$

5.1.4 Synthese der konvertierbaren Lysin-Photoaffinitätssonde auf Homoargininbasis

2-(3-(Benzyloxycarbonyl)thioureido)pent-4-ynyl 4-azidobenzoat (39)



Cbz-Isothiocyanat **31** (287 mg; 1,49 mmol) wurden in 2 ml trockenem DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Innerhalb von 15 Min wurde von A. Samanta zur Verfügung gestelltes 2-Aminopent-4-ynyl 4-azidobenzoat **38** (145 mg; 0,59 mmol) gelöst in 6 ml trockenem DCM zugetropft und die Kühlung anschließend entfernt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit DCM verdünnt und das Reaktionsgemisch mit 1%iger HCl zwei Mal gewaschen. Nachdem die organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung und über Natriumsulfat getrocknet worden waren, wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. SiO₂, Eluent: EE/CyHex: 1:4

Es konnten 229 mg (523 µmol) des orangefarbenen Produktes isoliert werden.

Ausbeute: 88%

R_f-Wert: (EE / CyHex 1:3) 0,46

¹H NMR (500,13 MHz; CDCl₃): 2,12-2,13 (t; 1H; ⁴J=2,69 Hz; H₅); 2,68-2,78 (m; 2H; H₃); 4,47-4,70 (m; 2H; H₁); 4,97-5,04 (m; 1H; H₂); 5,18 (s; 2H; H₁₃); 7,04-7,08 (d; 2H; ³J=8,73 Hz; H₉); 7,31-7,39 (m; 5H; H_{Phenyl Cbz}); 8,03-8,07 (d; 2H; ³J=8,73 Hz; H₈); 8,51 (s; 1H; N(C₁₂)H); 10,11-10,15 (d; 1H; ³J=8,50 Hz; N(C₂)H)

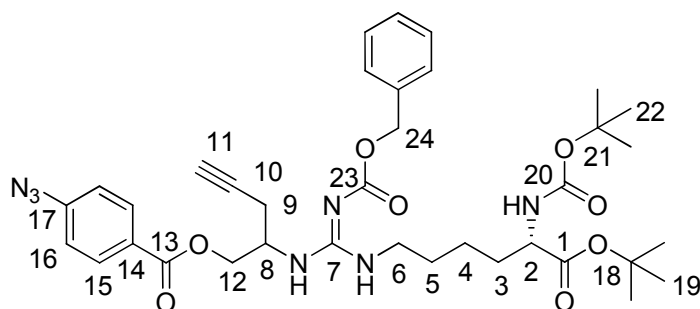
¹³C NMR (125,75 MHz; CDCl₃): 20,6 (C₃); 52,4 (C₂); 63,9 (C₁); 68,2 (C₁₃); 71,8 (C₅); 78,6 (C₄); 118,8 (C₉); 125,9 (C₇); 128,2; 128,6; 128,8 (5x C_{Phenyl Cbz}); 131,5 (C₈); 134,7 (C_{Phenyl Cbz}); 145,0 (C₁₀); 152,4 (C₁₂); 165,2 (C₆); 179,3 (C₁₁)

MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet $[M+H]^+$: 438,12305 g/mol

Beobachtet: m/z : 438,12349 $[M+H]^+$

(10S)-4-(Benzyloxycarbonylimino)-10-(*tert*-butoxycarbonyl)-14,14-dimethyl-12-oxo-2-(prop-2-ynyl)-13-oxa-3,5,11-triazapentadecyl 4-azidobenzoat (40)



39 mg Thioharnstoff **39** (88 μ mol) sowie 56 mg α -Boc-Lysin-*tert*-Butylester **36b** (185 μ mol) wurden gemeinsam mit 42 mg EDC $\cdot$ HCl (219 μ mol) in 5 ml trockenem DCM gelöst und 29 mg DIPEA (231 μ mol) zugegeben. Die Reaktion wurde nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur mit DCM verdünnt und drei Mal mit 1%iger HCl und zwei Mal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung sowie über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch: SiO₂, Eluent: (EE/CyHex) 2:1

Es konnten 42 mg (60 μ mol) Produkt isoliert werden.

Ausbeute: 68%

R_f-Wert: (EE / CyHex 1:2) 0,23

¹H NMR (500,13 MHz; CDCl₃): 1,33-1,82 (m; 6H; H₃; H₄; H₅); 1,45 (2s; 18H; H₁₉; H₂₂); 2,09-2,14 (s; 1H; H₁₁); 2,56-2,72 (m; 2H; H₉); 3,00-3,24 (bs; 2H; H₆); 4,11-4,22 (m; 1H; H₈); 4,31-4,41 (s; 1H; H₂); 4,56-4,62 (m; 1H; H_{12a}); 5,04-5,14 (m; 1H; H_{12b}); 5,10 (s; 2H; H₁₉); 7,04-7,08 (d; 2H; ³J=8,13 Hz; H₁₆); 7,26-7,41 (m; 5H; H_{Phenyl Cbz}); 7,99-8,04 (d; 2H; ³J=8,13 Hz; H₁₅)

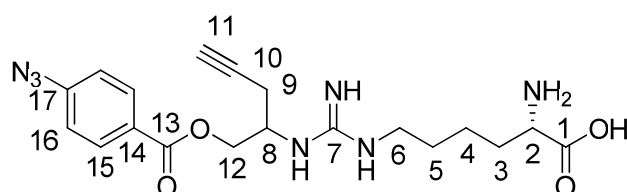
¹³C NMR (125,75 MHz; CDCl₃): 22,7 (C₄); 28,0 (C₁₉); 28,3 (C₂₂); 29,7 (C₅); 31,9 (C₃); 33,6 (C₉); 41,0 (C₆); 48,0 (C₈); 53,4 (C₂); 65,3; 66,6 (C₁₂; C₂₄); 71,9 (C₁₁); 77,3 (C₁₀); 79,7; 82,0 (C₁₈; C₂₀); 119,0 (C₁₆); 121,0 (C₁₄); 128,0; 128,3; 129,0 (5x C_{Phenyl Cbz}); 131,6 (C₁₅); 137,5 (C_{Phenyl Cbz}); 145,3 (C₁₇); 155,4 (C₂₀); 159,6 (C₂₃); 164,0 (C₇); 166,3 (C₁₃); 171,7 (C₁)

MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet [M+H]⁺: 706,3559 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 706,3453 [M+H]⁺

(2S)-2-Amino-6-(3-(1-(4-azidobenzoyloxy)pent-4-yn-2-yl)guanidin)hexansäure (26)



0,6 ml TFA wurde mit 0,2 ml Thioanisol gemischt und zu 17,5 mg (25 µmol) der vollständig geschützten Photoaffinitäts-sonde **40** gegeben, woraufhin eine orangefarbene Lösung entsteht. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösemittel am Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser und DEE aufgenommen und die wässrige Phase drei Mal mit DEE gewaschen. Die anschließende Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte mittels semipräparativer HPLC. Gradient (Lösemittel: A = 0,1 M Triethylammoniumacetat in Wasser pH 7,4; B = 0,1 M Triethylammoniumacetat in Acetonitril/Wasser 8:2 pH 7,4) [%B/Zeit in Min]: 30/0; 100/35, 100/40; 30/45.

Ausbeute: 50%

¹H NMR (500,13 MHz; D₂O): 1,27-1,44 (m; 2H; H₄); 1,48-1,55 (m; 2H; H₅); 1,76-1,83 (m; 2H; H₃); 2,51-2,53 (t; 1H; ⁴J=2,69 Hz; H₁₁); 2,62-2,76 (m; 2H; H₉); 3,14-3,18 (t; 2H; ³J=7,21 Hz; H₆); 3,65-3,69 (t; 1H; ³J=6,05 Hz; H₂); 4,19-4,25 (m; 1H; H₈); 4,49-4,56 (m; 1H; H₁₂); 7,22-7,26 (d; 2H; ³J=8,93 Hz; H₁₆); 8,05-8,08 (d; 2H; ³J=8,93 Hz; H₁₅)

¹³C NMR (125,75 MHz; D₂O): 20,7 (C₄); 21,5 (C₉); 23,2 (C₅); 27,5 (C₃); 40,9 (C₆); 49,8; 50,5 (C₈; C₁₁); 54,5 (C₂); 65,4 (C₁₂); 90,1 (C₁₀); 119,1 (C₁₆); 125,0 (C₁₄); 131,4 (C₁₅); 145,7 (C₁₇); 167,3 (C₇); 168,0; 168,2 (C₁; C₁₃)

MS: (HR-ESI pos.)

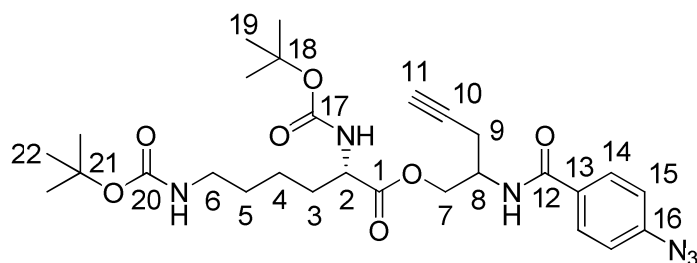
Berechnet $[M+D]^+$: 417,2104 g/mol

Beobachtet: m/z : 417,2095 $[M+D]^+$

Retentionszeit: 11,7 Min (LC-MS); 27,5 Min (HPLC)

5.1.5 Synthese der konvertierbaren Lysin-Photoaffinitätssonde auf Esterbasis

(6S)-2-(4-Azidobenzamido)pent-4-ynyl-2,2,14,14-tetramethyl-4,12-dioxo-3,13-dioxo-5,11-diazapentadecan-6-carboxylat (42)



270 mg (511 μ mol) des Dicyclohexylammoniumsalzes von Di-Boc-Lysin wurden in DCM gelöst und drei Mal mit 1%iger HCl gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels wurden 150 mg (435 μ mol) der freien Säure als farbloser Schaum erhalten.

Diese wurde im Anschluss in 20 ml trockenem DCM gelöst und 101 mg (492 μ mol) DCC sowie 100 mg (410 μ mol) des bifunktionalen Bausteins **41** (zur Verfügung gestellt von A. Samanta) zugegeben. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurden weitere 20 mg DCC zugefügt. Nachdem über Nacht gerührt wurde, konnte das ausgefallene DCU abfiltriert werden. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. SiO_2 , Eluent: EE/CyHex: 1:4 $\rightarrow$ 1:1

Es konnten 188 mg (329 μ mol) Produkt isoliert werden.

Ausbeute: 80%

R_f-Wert: (EE / CyHex 1:1) 0,52

$^1\text{H NMR}$ (300,13 MHz; CDCl_3): 1,18-1,88 (m; 6H; H_3 ; H_4 ; H_5); 1,38; 1,42 (2s; 18H; H_{19} ; H_{22}); 2,04-2,10 (m; 1H; H_{11}); 2,52-2,63 (m; 2H; H_9); 2,97-3,07 (m; 2H; H_6); 4,12-4,25 (m; 1H; H_8); 4,28-4,77 (m; 3H; H_2 ; H_7); 7,00-7,06 (d; 2H; $^3J=8,73$ Hz; H_{15}); 7,77-7,89 (m; 2H; H_{14})

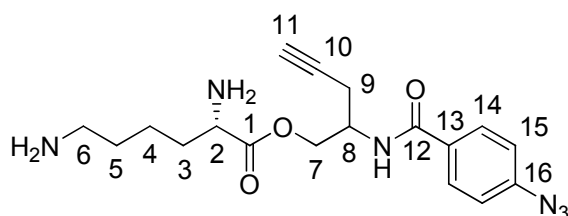
¹³C NMR (75,74 MHz; CDCl₃)⁶⁰: 21,4 (C₉); 22,2 (C₄); 26,8 (C₅); 28,2; 28,3 (C₁₉; C₂₂); 30,2 (C₃); 31,3 (C₁₁); 39,6 (C₆); 47,6 (C₂); 53,4 (C₈); 64,5 (C₇); 71,4 (C₁₀); 79,0; 79,9 (C₁₈; C₂₁); 118,9 (C₁₅); 129,1 (C₁₄); 130,3 (C₁₃); 143,4 (C₁₆); 155,6; 156,1 (C₁₇; C₂₀); 166,1 (C₁₂); 172,6 (C₁)

MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet [M+H]⁺: 573,30312 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 573,30376 [M+H]⁺

2-(4-Azidobenzamido)pent-4-ynyl (2S)-2,6-diaminohexanoat (27)



30 mg (52 µmol) des geschützten Lysinesters **42** wurden in 0,5 ml trockenem DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde ein Gemisch aus 250 µl TFA und 250 µl Thioanisol getropft. Nach vollendeter Zugabe wurde die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand in 1%iger HCl bzw. DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde zwei Mal mit 1%iger HCl extrahiert und jede wässrige Phase ein Mal mit frischem DCM gewaschen. Anschließend wurden die wässrigen Phasen vereinigt und das Lösemittel entfernt.

Das Rohprodukt wurde auf eine Varian IntelliFlash 310 System säulenchromatographisch gereinigt, RP-C18 SiO₂ (Varian, SuperFlash), Eluent: Wasser / Acetonitril (Min) 98:2 (5 Min) → 90:10 (10 Min) → 80:20 (30 Min)

Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden lyophilisiert. Es konnten 6,3 mg (17 µmol) reines Produkt isoliert werden.

Ausbeute: 33%

⁶⁰ Da durch die Veresterung des enantiomerenreinen Lysins mit der racemischen Propargylglycineinheit zwei Diastereomere entstehen, erscheinen einige Signale als Doppelsignale.

¹H NMR (500,13 MHz; CD₃OD): 1,43-1,71 (m; 4H; H₄; H₅); 1,84-2,02 (m; 2H; H₃); 2,42-2,44 (m; 1H; H₁₁); 2,57-2,70 (m; 2H; H₉); 2,85-2,91 (m; 2H; H₆); 4,07-4,13 (m; 1H; H₈); 4,33-4,65 (m; 3H; H₂; H₇); 7,16-7,20 (dd; 2H; ³J=8,25 Hz; ⁵J=2,87 Hz; H₁₅); 7,91-7,94 (dd; 2H; ³J=8,25 Hz; ⁵J=2,20 Hz; H₁₄)

¹³C NMR (125,75 MHz; CD₃OD)⁶¹: 21,2 (C₉); 23,2 (C₄); 28,1 (C₅); 31,1 (C₃); 40,3 (C₆); 42,6 (C₈); 53,8 (C₂); 67,8 (C₇); 72,3 (C₁₁); 80,6 (C₁₀); 120,1 (C₁₅); 130,5 (C₁₄); 131,7 (C₁₃); 145,3 (C₁₆); 169,2 (C₁₂); 170,4 (C₁)

MS: (HR-ESI pos.)

Berechnet [M+H]⁺: 373,1983 g/mol

Beobachtet: *m/z*: 373,1968 [M+H]⁺

Retentionszeit: 11,1 Min (LC-MS); 26,9 Min (HPLC, Gradient siehe **26**)

⁶¹ Da durch die Veresterung des enantiomerenreinen Lysins mit der racemischen Propargylglycin-Einheit zwei Diastereomere entstehen, erscheinen einige Signale als Doppelsignale.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Standardmethoden und Reagenzien

Kommerziell erhältliche Chemikalien, die in molekularbiologischen Versuchen eingesetzt wurden, entsprechen der jeweils höchsten möglichen Qualität. Der jeweilige Anbieter ist im Zusammenhang mit der Substanz oder im Reagenzienanhang angegeben.

Wasser wurde hochrein aus der Milli-Q, Synthesis A10 (Millipore) Anlage gewonnen und mit Hilfe von DEPC nach einem Standardprotokoll behandelt, autoklaviert und steril filtriert (Bottle-Top-Filter 75 mm, 0,2 µm, 500 ml, Nalgene) [214].

TBE-Puffer, der bei allen Gelelektrophoresen verwendet wurde, wurde als Konzentrat erworben (Carl Roth; 10x; 1,0 M Tris•HCl/Borat-Puffer, pH 8,3, 20 mM EDTA). Die Lösungen zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden ebenfalls als Konzentrat erworben und mit Wasser aus der Milli-Q-Anlage verdünnt (Carl Roth, Rotiphorese Fertiglösungen, Konzentrat, Verdünner und TBE-Puffer). Als Initiatoren der Polymerisation wurden APS in 10 %iger Lösung (1 ml pro 150 ml Acrylamidlösung) und TEMED (100 µl pro 150 ml Acrylamidlösung) eingesetzt. Die verwendeten Glasplatten wurden mit 2 %iger Dichlor-dimethylsilan-Lösung in DCM silanisiert.

Agarosegele zur Analyse von PCR-Produkten wurden mit Hilfe von UltraPure™ Agarose 1000 (Invitrogen) angefertigt. Zur Detektion der doppelsträngigen DNA wurde Ethidiumbromid (Carl Roth) zugesetzt.

Bei allen Arbeiten mit RNA wurde darauf geachtet, Kontaminationen durch ubiquitäre Nukleasen beispielsweise durch regelmäßige Reinigung des Arbeitsbereiches mit 3 %iger H₂O₂-Lösung zu vermeiden. Die beschriebenen Versuche wurden in silanisierten Reaktionsgefäßen (1,5 ml; Multi, Carl Roth oder 0,2 ml PCR-Gefäße; Biozym) unter Verwendung RNase-freier Filterspitzen (Greiner BioOne) durchgeführt.

Die Konzentration aller Oligonukleotide wurde mit Hilfe eines Nanodrop ND-1000-Spektrophotometers (PeqLab) bestimmt.

Die folgenden Arbeiten wurden unter Verwendung von Standardprotokollen durchgeführt [215]:

- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)
- Agarose-Gelelektrophorese

- Detektion von Nukleinsäuren durch Fluoreszenzlöschung von behandelten Dünnschichtchromatographie-Platten (*UV-Shadowing*)
- Elution von RNA-Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgelen über Nacht mit 0,3 M Ammoniumacetat-Puffer pH 5,5
- Ethanolfällung von Nukleinsäuren
- Bestimmung der Aktivität von Proben radioaktiv markierter RNA mittels Tscherenkov-Zählung (LS 6500 Szintillationszähler, Beckman-Coulter).
- PCR-Amplifizierungen wurden nach folgendem Standard-Protokoll vorgenommen, wenn nicht anders angegeben (Zyklenzahl und Hybridisierungstemperatur werden beim jeweiligen Experiment präzisiert):

Komponente	V [μ l]	Endkonzentration
PCR Puffer 10x [Rapidozym]	10	1x
MgCl ₂ [Rapidozym]	6	3 mM
Primer 1	5	0,5 μ M
Primer 2	5	0,5 μ M
dNTP-Mix	2,5	je 400 μ M
Templat	5	ca. 100 ng
Taq-Polymerase [Rapidozym]	5	25u
Wasser	61,5	-
Σ	100	

Amplifizierungsprotokoll:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	90°C	5 Min
2	90°C	1 Min
3	Hybridisierung	2 Min
4	72°C	1:30 Min
5	wiederhole ab 2	-
6	72°C	5 Min

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und in Wasser aufgenommen.

5.2.2 Liste der verwendeten Sequenzen

Nr.	Sequenz	Beschreibung	Synthese
S1	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTG AAG ATA GAG GTG CG-3'	5'-Terminus des 179 nt langen <i>LysC</i> Lysin-Riboswitch Aptamers inkl. T7-Promoter (kursiv)	IBA
S2	5'-AAC GAG ATA GCC CTC CAA GA-3'	Revers komplementärer Primer zur Synthese des 179 nt langen <i>LysC</i> Lysin-Riboswitch Aptamers	IBA
S3	5'-AAA TCT ATC ACC GCA AGG GAT AAA TAT CTA ACA CCG TGC GTG TTG ACT ATT TTA CCT CTG GCG GTG ATA ATG GTT GCA TGT ACT AAG GAG GTT GAA TTT GAT AGT TAG ATC GTG TTA TAT GG-3'	5'-Terminus des 321 nt langen <i>LysC</i> Lysin-Riboswitches inkl. λ Pr- Promotors (kursiv) mit Mutation C6G	IBA
S4	5'-CCC TTT ACA TTT TGG TTC GTG C-3'	Revers komplementärer Primer zur Synthese des 321 nt langen <i>LysC</i> Lysin-Riboswitches	IBA
S5	5'-AAA TCT ATC ACC GCA AGG G-3'	5'-Ende des λ Pr-Promotors	IBA
S6	5'-pGGA AGA GAU GGC GAC UAA AAC GAC UUG UCG C-3'	5'-Phosphoryliertes cAMP-Aptamer (RNA)	IBA
S7	5'-pCTG TAG GCA CCA TCA AT(hex)-3'	Adapter der ersten Adapter- Ligation	IBA
S8	5'-ATT GAT GGT GCC TAC AG-3'	Primer für die reverse Transkription	IBA
S9	5'-pCAC TCG GGC ACC AAG GAC(hex)-3'	Adapter für die zweite Adapter- Ligation	IBA
S10	5'-GTC CTT GGT GCC CGA GTG GG-3'	Teil des Ankers der zweiten Ligation und Adapter-spezifischer Primer	IBA
S11	5'-GCG ACA AGT CGT TTT AGT-3'	Aptamer-spezifischer Primer für die qPCR	IBA
S12	5'-GTT AAA ACT CAA ATG AAT TG-3 ,	Primer zur Amplifizierung der <i>E. coli</i> 16S rRNA	Biomers
S13	5'-TTG CAT CGA ATT AAA CC-3'	Primer zur Amplifizierung der <i>E. coli</i> 16S rRNA	Biomers
S14	5'-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GCC GUG CCA GCU CUU CGG AGC AAU ACU CGG C-3'	Unmodifiziertes Dase Ribozym	CSS
A	5'-Cy3-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GUC GUG CCA GCU CUU CGG AGC AAU ACU CGA CU(Cy5)-3'(Biotin)	Fluoreszenz-markiertes Dase Konstrukt	A. Nierth [195]

B	5'-Cy3-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GUC GUG CCA GCU CUU(Cy5) CGG AGC AAU ACU CGA C- 3'(Biotin)	Fluoreszenz-markiertes Dase Konstrukt	A. Nierth [195]
C	5'-GGA GCU CGC UU(Cy3)C GGC GAG GUC GUG CCA GCU CUU CGG AGC AAU ACU CGA CU(Cy5)-3'(Biotin)	Fluoreszenz-markiertes Dase Konstrukt	A. Nierth [195]
D	5'-GGA GCU(Cy3) CGC UUC GGC GAG GUC GUG CCA GCU CUU CGG AGC AA(Cy5)U ACU CGA C- 3'(Biotin)	Fluoreszenz-markiertes Dase Konstrukt	A. Nierth [195]
E	5'-Cy3-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GU(NPE)C GUG CCA GCU CUU(Cy5) CGG AGC AAU ACU CGA C-3'(Biotin)	Fluoreszenz-markiertes aktivierbares Dase Konstrukt	M. Singer [196]
F	5'-Cy3-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GUC(NPE) GUG CCA GCU CUU(Cy5) CGG AGC AAU ACU CGA C-3'(Biotin)	Fluoreszenz-markiertes aktivierbares Dase Konstrukt	M. Singer [196]
G	5'-Cy3-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GU(NPE)C(NPE) GUG CCA GCU CUU(Cy5) CGG AGC AAU ACU CGA C-3'(Biotin)	Fluoreszenz-markiertes aktivierbares Dase Konstrukt	M. Singer [196]
H	5'-Cy3-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GUC GUG C(NPE)CA GCU CUU(Cy5) CGG AGC AAU ACU CGA C-3'(Biotin)	Fluoreszenz-markiertes aktivierbares Dase Konstrukt	A. Nierth, M. Singer [112]

5.2.3 Lysin-Riboswitch

5.2.3.1 Amplifizierung der Template

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) wurde über Nacht bei 37°C, 250 rpm in LB Medium (Roth) kultiviert. Genomische DNA wurde mit den GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma) isoliert und verschiedene Bereiche der 5'-UTR des *LysC* Gens unter Verwendung des vom Hersteller angegebenen Protokolls mit der *Taq*-Polymerase (Rapidozym) PCR-amplifiziert:

T1: 305 nt - 126 nt vor dem Start der kodierenden Region. Die zu amplifizierende Sequenz stellt das Templat für das 179nt Lysin-Riboswitch-Aptamer mit T7-Promoter Sequenz dar. Die Primer **S1** und **S2** wurden zur Amplifikation verwendet (Hybridisierungs-(*Annealing*)-Temperatur: 57°C; Zyklen: 20).

T2: 330 nt – 9 nt vor dem Start der kodierenden Region. Die amplifizierte Sequenz stellt das Templat für den vollständigen Lysin-Riboswitch (321 nt) mit λ Pr-Promoter dar. Die Primer **S3** und **S4** wurden in der PCR verwendet: (Hybridisierungs-Temperatur: 57°C; Zyklen: 20).

Das Produkt kann mit dem alternativen Primer **S5** anstelle von **S3** reamplifiziert werden.

Das Produkt der Amplifikation von **T2** wurde mittels TA-Klonierung in einen pCR2.1 Vektor (Invitrogen) integriert. Hierfür wurde das PCR-Produkt mit 3'-A-Überhängen mit der Taq-Polymerase (Rapidozym) hergestellt und über Nacht bei 16°C in den Vektor ligiert.

Komponente	V [µl]	Endkonzentration
pCR-Vektor	4	25 ng/µl
Templat T2	1	25 ng/µl
Ligase Puffer 10x (Fermentas)	2	1x
T4-DNA-Ligase (Fermentas)	2	2 u
Wasser	11	-
Σ	20	

Das Produkt der Ligation (2 µl) wurde mit 50 µl kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen gemischt und 30 Min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeschock von 30 s bei 42°C wurden die Zellen erneut für 2 Min auf Eis gestellt und anschließend mit 500 µl Soc-Medium (*Super Optimal Broth with Catabolite Repression*) versetzt. Die Kultur wurde 1 h bei 37°C und 450 rpm inkubiert, bevor sie auf LB-Agar-Platten ausplattiert wurde, welche Ampicillin und Kanamycin enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C gelagert.

Um innerhalb kurzer Zeit positive Klone, die **T2** enthalten, zu identifizieren, wurde eine Kolonie-PCR nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt (Primer: M13 Primer (IBA)). Als Templat dienten einzelne Kolonien, die von der Platte genommen und in 20 µl Wasser suspendiert wurden. Diese Suspension wurde zum PCR-Mix gegeben. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel analysiert.

Die *E. coli* / Wasser-Suspension positiver Kolonien wurde in 10 ml LB-Medium mit Kanamycin gegeben und über Nacht bei 37°C (250 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plasmide mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Qiagen) isoliert und die DNA-Konzentration bestimmt.

Zur Kontrolle der Sequenz wurden 600 ng Plasmid mit 20 pmol M13-Primer zum Sequenzieren in Auftrag gegeben (Seqlab).

Um das Templat für die Transkriptions-Stop-Versuche zu linearisieren, wurden Plasmide mit korrekter Sequenz mittels *EcoRI* verdaut. Hierfür wurden die Plasmide entsprechend der Vorgaben des Herstellers 1,5 h mit *EcoRI* inkubiert und über 1 %ige Agarose-Gele aufgetrennt. Die Banden, die mit **T2** korrespondieren, wurden ausgeschnitten und das Produkt mit Hilfe des QIAquick gel extraction Kits (Qiagen) extrahiert. Die auf diese Weise erhaltenen Template konnten in den Transkriptions-Stop-Assays eingesetzt werden.

5.2.3.2 Transkription

Das Templat **T1** für das 179 nt Riboswitch Aptamer wurde mit der T7 RNA-Polymerase (präpariert von S. Dräger) 3 h bei 37°C transkribiert.

Komponente	V [μl]	Endkonzentration
Transkriptionspuffer 10x	10	1x
DTT	1	10 mM
BSA	4	40 ng/μl
NTP	je 4	4 mM
Templat	20	
T7 RNA-Polymerase	10	
Wasser	39	-
Σ	100	

Transkriptionspuffer 10x:

Komponente	Konzentration
Tris•HCl (pH 8,1; 25°C)	400 mM
Spermidin	10 mM
MgCl ₂	220 mM
Triton-X-100	0,10%

Die Produkte wurden über PAGE-Gele aufgereinigt, aus dem Gel eluiert und mit Ethanol gefällt.

5.2.3.3 5'-Radioaktivmarkierung

Für eine 5'-³²P-Markierung wurden 40 pmol RNA mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (Fermentas) bei 37°C für 1 h dephosphoryliert und das Enzym 10 Min bei 75°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde unter Zugabe von γ-³²P-ATP (Hartmann Analytics) und Polynukleotid Kinase (PNK) (Fermentas) 1 h bei 37°C inkubiert und die Sequenz so radioaktiv markiert. Das Produkt wurde über ein denaturierendes PAGE-Gel aufgereinigt, aus dem Gel eluiert und mit Ethanol gefällt.

5.2.3.4 In-Line Probing (mit Radioaktiv- oder Fluoreszenzmarkierung)

3 pmol des fluoreszenzmarkierten Riboswitch-Aptamers oder 0.03 pmol des 5'-³²P-markierten Aptamers wurden in 10 μl Puffer gelöst (50 mM Tris•HCl pH 8.5 bei 25°C; 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 μg *E. coli* Total-tRNA von Roche). Wenn angegeben, wurde

L-Lysin oder ein Lysinanalogon in der entsprechenden Konzentration (1 nM – 10 mM) zugegeben. Nach der Neufaltung der RNA (4 Min bei 70°C, dann 0.2°/sek bis 4°C und 10 Min bei 4°C) wurde die Probing Reaktion 24 h bei 35°C durchgeführt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Gel-Ladepuffer mit 7 M Harnstoff, 10 mM EDTA und Bromphenolblau (im Falle radioaktiv markierten Riboswitches zusätzlich Xylencyanol).

Ein partieller alkalischer Verdau der Sequenzen wurde durch Inkubation von 3 pmol fluoreszenzmarkiertem Aptamer oder 0.03 pmol radioaktivmarkierter RNA in 10 µl 50 mM NaHCO₃ Puffer (pH 9) mit 10 µg *E. coli* Total-tRNA bei 90°C für 5 Min erreicht. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem die Proben auf Eis gestellt und mit 10 µl Gel-Ladepuffer versetzt wurden.

G-spezifische Sequenzleitern wurden durch Inkubation von 3 pmol fluoreszenzmarkierter RNA oder 0.03 5'-³²P-markierten Aptamers mit 10 µg *E. coli* Total-tRNA in 10 µl 12.45 mM Natriumcitrat Puffer (pH 4.5) generiert. Der Puffer enthielt außerdem 3.5 M Harnstoff und 0.5 mM EDTA. Nach Denaturierung der RNA für 10 Min bei 55°C wurden 0.4 U (2µl) RNase T1 (Fermentas) zugefügt und die Probe weitere 10 Min bei 55°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe des Gel-Ladepuffers abgebrochen.

Die Spaltprodukte wurden über ein 10%iges PAGE-Gel aufgetrennt. Die Beladung betrug im Fall einer Fluoreszenzmarkierung 6 µl, bei ³²P-markierten Proben wurden 2 µl aufgetragen. Die Gele wurden 3 h bei 45 W laufen gelassen und mittels eines Typhoon 9400 Gel-Scanners (Amersham) visualisiert, wobei entweder die Atto 633 Markierung oder der radioaktive Phosphor mit dem „*Phosphorimaging*“-Verfahren [216,217] untersucht wurden. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der ImageQuant Software (Molecular Dynamics). Nach Abzug der durchschnittlichen Intensität eines Bereiches des Gels, der nicht von radioaktiver oder fluoreszenzmarkierter RNA durchdrungen worden war, wurden die In-Line Probing-Spuren auf Differenzen der Probeladung mit Hilfe der Lysin-unabhängigen Korrekturbande korrigiert. Die Spuren NR, T1 und OH wurden bei den Quantifizierungsvorgängen nicht beachtet.

Die Quantifizierung wurde im Anschluss an eine Normalisierung unter Verwendung der OriginPro8 Software (OriginLab) vorgenommen und die Daten an ein logistisches Dosis-Wirkungs-Modell angepasst. Hierfür wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \frac{x}{K_d}}$$

A_1 ist der obere, A_2 der untere Grenzwert der Kurve, K_d die Dissoziationskonstante, y der Anteil an Spaltprodukt und x die Konzentration des jeweiligen Effektormoleküls.

5.2.3.5 Transkriptions-Stop-Assay

a) Multi-round Transkriptions-Stop-Assay

Ein *multi round* Transkriptions-Stop-Assay entspricht einer normalen Transkription unter Verwendung des *E. coli* RNA Polymerase Holoenzym (E. coli RNAP; USB). Zu diesem Zweck wurde folgende Lösung angesetzt:

Komponente	V [μl]	Endkonzentration
USB Puffer 10x	1	1x
DTT (Fermentas)	0,5	5 mM
BSA (Fermentas)	0,5	50 ng/μl
ATP, GTP, CTP-Mix	1	je 1 mM
UTP	0,5	0,5 mM
α- ³² P-UTP (Hartmann Analytics)	1	1 μCi
Lysin, Analogon oder Wasser	1	10 mM
linearisiertes <i>EcoRI</i> verdautes T2	3,2	~10 ng/μl
<i>E. Coli</i> RNAP (USB)	1	2 u
Wasser	0,3	-
Σ	10	

USB Puffer 10x	
Tris•HCl pH 7,5 bei 25°C	400 mM
KCl	500 mM
MgCl ₂	100 mM

Die Reaktion wurde 1 h bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von Gel-Ladepuffer abgebrochen. Um das Enzym zu denaturieren wurde die Mischung 10 Min auf 75°C erhitzt und anschließend auf ein 8 % PAGE (Stärke 0,35 mm) geladen (Laufzeit: 3 h bei 45W).

Die Banden wurden mit Hilfe der Radioaktivität densitometrisch analysiert. Nach einer Hintergrundkorrektur über die Intensität eines Bereiches, der nicht von radioaktiv markierter Probe durchdrungen wurde, konnte das Verhältnis von terminiertem zu Vollängenprodukt über die Intensitäten in Bereichen gleicher Größe mit Hilfe der ImageQuant Software berechnet werden.

b) Single-round Transkriptions-Stop-Assay

Die *single-round* Transkriptions-Stop-Assays wurden in zwei Schritten durchgeführt. Auf einen Initiationsschritt, in dem der pausierende Komplex gebildet wird, folgt nach Zugabe der fehlenden Reagenzien die Elongation unter Einfluss des Effektors.

Für die Initiation wurden folgende Komponenten gemischt:

Komponente	V [μ l]	Endkonzentration
USB Puffer 10x	3,5	1x
ApA-Mix 10x	3,5	1x
DTT (Fermentas)	1,8	5 mM
BSA (Fermentas)	0,8	50 ng/ μ l
α - ³² P-UTP (Hartmann Analytics)	3	30 μ Ci
linearisiertes <i>Eco</i> RI verdautes T2	5	~10 ng/ μ l
<i>E. Coli</i> RNAP (USB)	3	6 u
Wasser	14,4	-
Σ (für 7 Reaktionen)	35	

Der ApA-Mix, welcher ein Dinukleotid aus zwei Adenosinen (ApA) enthält, das die Initiation der Transkription erleichtert, besteht aus folgenden Substanzen:

ApA-Mix 10x	
ApA-Dinukleotid (IBA)	1,5 mM
GTP, ATP	25 μ M
UTP	10 μ M

Der pausierende Komplex kann für alle Proben, die in diesem Experiment getestet werden sollen, gemeinsam angesetzt werden. Hierfür wurde das Reaktionsgemisch 15 Min bei 20°C inkubiert. Wurde die Bildung des pausierenden Komplexes untersucht, erfolgte an dieser Stelle die Zugabe von 1 Volumenäquivalent Gel-Ladepuffer. Zur Wiederaufnahme der Elongation wurden je 7 μ l des pausierenden Komplexes, welcher bis zu 30 Min auf Eis

gelagert wurde, kurz auf 37°C erwärmt und zu folgendem auf 37°C vorgewärmten Gemisch gegeben:

Komponente	V [μ l]	Endkonzentration
Effektor-Molekül oder Wasser	1	üblicherweise 5 - 10 mM
Rifampicin (Sigma)	1	100 μ g/ml
NTP-Mix	1	je 300 μ M
Σ (zzgl. 7 μ l pausierender Komplex)	3	

Die Proben wurden erneut 20 Min auf 37°C erwärmt und anschließend mit 10 μ l Gel-Ladepuffer versetzt. Zur Inaktivierung der Polymerase wurde 5 Min auf 95°C erhitzt, bevor die Proben über ein 8% PAGE-Gel (Stärke: 0,35 mm) aufgetrennt wurden. Die Auswertung erfolgte wie für den *multi-round* Assay beschrieben.

5.2.4 Analyse der Zersetzung der Lysinanaloga

5.2.4.1 Dünnschichtchromatographie

Lysin beziehungsweise ein Analogon wurden im zu testenden Reaktions-Puffer (beispielsweise In-Line Probing-Puffer) gelöst und für die Dauer des entsprechenden Versuchs bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 nmol jeder Testsubstanz auf die DC-Platte aufgetragen, mit Hilfe von Druckluft getrocknet und mit dem von Novabiochem für die Qualitätskontrolle von Lysin vorgeschlagenen Laufmittel (n-Butanol, AcOH, Wasser; 2:1:1) aufgetrennt (Novabiochem, Merck). Nachdem die Platte mittels Druckluft getrocknet worden war, konnten alle Aminosäure-Derivate durch Anfärbung mit Ninhydrin sichtbar gemacht werden (siehe auch Kapitel 5.1.1). Die Substanzen konnten anhand ihres R_f -Wertes und teilweise ihrer Färbung voneinander unterschieden werden. Der R_f -Wert des Lysins wurde mit 0,24 bestimmt. Eine exakte Quantifizierung war nicht möglich. Das Detektionslimit wurde über eine Verdünnungsreihe des Lysins mit 2 nmol bestimmt. Somit war es möglich, das Zersetzungsprodukt oder Verunreinigung der Ausgangssubstanzen bis hinunter zu 4 % zu bestimmen.

5.2.4.2 LC-MS-Messungen

Zu verschiedenen Zwecken wurden LC-MS-Messungen durchgeführt. Vor jeder Messreihe wurde das System mehrere Stunden mit hohem ACN-Gehalt gespült und Läufe ohne Analyt so lange durchgeführt, bis keine Störsignale mehr detektierbar waren. In allen Fällen wurden die zu untersuchenden Substanz mit folgendem Gradienten, der von Hegele *et al.* zum Nachweis von Lysin mittels LC-MS verwendet worden war, über eine Luna RP-C18 Säule

(3,0 μm , 100x4,6 mm; Phenomenex; Säulentemperatur: 40°C) bei einem Fluss von 0,2 ml/Min aufgetrennt [204]:

Zeit [Min]	Anteil LM B [%]
0	15
15	85
20	85
21	15
50	15

Die Zusammensetzung der Lösemittel A und B war wie folgt:

Lösemittel	
A	5 mM NFPA in Wasser
B	5 mM NFPA in ACN

Die Detektion der Analyten erfolgte mit Hilfe des Massenspektrometers. Anschließend wurde aus den Chromatogrammen der Rohdaten jeweils mit Hilfe der DataAnalysis Software 4.0 (Bruker Daltonics) der Ionenstrom des Molekülions des Analyten sowie des Lysins ($m/z = 147$) extrahiert ($\text{EIC}_{\text{Analyt}}$ bzw. EIC_{147} , *extracted ion current*). Dieses Vorgehen führt zu denselben Ergebnissen wie die Verwendung des Totalionenstroms (*total ion current*, TIC) bei etwas höherer Sensitivität. Die im jeweiligen Chromatogramm detektierten Signale wurden anschließend integriert und die Flächen miteinander verglichen.

Um eine Quantifizierung des Lysins zu ermöglichen, wurde eine Verdünnungsreihe von Lysin (50 μM bis 1 mM) im Triplikat hergestellt, gemessen und analysiert. Die auf diese Weise erlangte Kalibriergerade diente als Vergleich für die Quantifizierung des Lysins in den Reinsubstanzen der synthetisierten Analoga.

Um Lysin-Verunreinigungen in den synthetisierten Analoga nachzuweisen und zu quantifizieren, wurden 10 μl einer 12,5 mM wässrigen Lösung auf die oben beschriebene Weise analysiert. Die über den EIC_{147} und die Kalibriergerade bestimmte Lysin-Konzentration wurde von der Ausgangskonzentration des Analyten abgezogen, um dessen Reinheit zu bestimmen.

Zur Überprüfung der Zersetzung von Lysinanaloga wurden die Substanzen im zu untersuchenden Puffersystem gelöst und für die Zeit des entsprechenden Assays bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Um die Reaktion abzubrechen wurden die Proben mit einem Volumenäquivalent HCl so verdünnt, dass ein neutraler pH-Wert erreicht wurde

(Berechnungen mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung) und die Konzentration des Analyten bei 12,5 mM lag. 10 µl dieser Proben wurden dann wie oben beschrieben analysiert. Eine direkte Analyse des Lysin-Anteils über die Kalibriergerade war bei diesen Proben nicht möglich, da das Signal von Pufferbestandteilen überdeckt und verfälscht wurde. Der Anteil an Zersetzung wurde somit über das Verhältnis der Integrale bestimmt, die im EIC des jeweiligen Molekülionenpeaks für die Substanz vor und nach dem Versuch bestimmt wurden.

5.2.5 cAMP-Aptamer

5.2.5.1 Photocrosslinking des cAMP-Aptamers mit den entsprechenden Photoaffinitäts-sonden

Das 31 nt lange 5'-phosphorylierte cAMP-Aptamer **S6** (IBA) wurde analog zur oben beschriebenen Methode zur 5'-Radioaktivmarkierung (Kapitel 5.2.3.3) zuerst dephosphoryliert und anschließend mit γ -³²P-ATP rephosphoryliert.

In 10 µl des Puffers, der von Koizumi *et al.* als derjenige mit den besten Bindungseigenschaften beschrieben wurde (20 mM HEPES (pH 7,5), 450 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 5 mM CaCl₂), wurden zwischen 5 nM und 5 µM cAMP-Aptamer (Standardkonzentration: 100 nM) gelöst, wobei bei Verwendung eines Konzentrationsgradienten die Konzentration des radioaktiv markierten Aptamers jeweils nur 5 nM betrug, um gleiche Aktivitäten in jeder Probe zu erhalten [107]. Die restliche Stoffmenge wurde in Form des erworbenen nicht-markierten 31mers bereitgestellt. In Experimenten, in denen alle Proben die gleiche RNA-Stoffmenge enthielten, wurde das gesamte cAMP-Aptamer ³²P-markiert eingesetzt. Weitere RNA-Spezies wurden, soweit im jeweiligen Versuch vorgesehen, ebenfalls in der entsprechenden Konzentration (*E. coli* Total-RNA: 2,85 µg/µl, *E. coli* Total-tRNA: 1 µg/µl) zugegeben. Anschließend wurde die RNA neu gefaltet (70°C für 4 Min, 0,2°/sek bis 4°C, 4°C für 10 Min) und mit der entsprechenden Sonde (Caprotec) (0,5 µM – 70 µM; Standardkonzentration: 20 µM) versetzt. Im Fall eines Inhibitions-Experimentes wurde zuvor 1 mM cAMP (Caprotec) zugegeben⁶². Dann wurden alle Proben 30 Min auf Eis stehen gelassen, bevor sie in der Caprobox (Caprotec) für 10 Min (oder die angegebene Zeit zwischen 10 sek und 30 Min) bei 1°C mit Licht der Wellenlänge 310 nm ohne zusätzliche Abschirmung bestrahlt wurden.

Die bestrahlten Proben wurden halbiert. Eine Hälfte wurde direkt mit dem oben beschriebenen Gel-Ladepuffer versetzt, während zu der anderen Hälfte

⁶² Die Inhibitionsversuche wurden beim Einsatz unterschiedlicher Bedingungen immer unter der am schwierigsten zu inhibierenden Bedingung ausgeführt (höchste Sonden- oder RNA-Konzentration).

10 µg (10 µl; 0,155 u) Streptavidin (New England Biolabs) und einem nicht-denaturierenden Gel-Ladepuffer (50 % Glycerin mit Xylencyanol und Bromphenolblau) gemischt wurden. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 15 % PAGE-Gel über 5 h bei 40 W. Die Daten wurden mit der ImageQuant Software analysiert. Im Anschluss an eine Hintergrundkorrektur wurden für jede Probe die Bande des unveränderten, ³²P-markierten cAMP-Aptamers und die Produktbande zueinander ins Verhältnis gesetzt.

5.2.6 Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse

5.2.6.1 Isolation von Total-RNA aus E. coli

E. coli (Stamm: DH5-α) wurde über Nacht bei 37°C, 250 rpm in LB Medium (Roth) bis zu einer OD₆₀₀ von 3,0 kultiviert. Dann wurde die Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und mit frischem Medium bis OD₆₀₀ = 0,85 wachsen gelassen. Mehrere Proben von jeweils 1,2 ml der Kultur wurden bei 7000 rpm für 10 Min zentrifugiert. Die RNA der abgesetzten Bakterien wurde unter Verwendung des GenElute™ total RNA Purification Kits (Sigma) isoliert. Um auch Sequenzen unter 200 nt Länge zu erhalten, die bei Verwendung des total RNA Kits verworfen werden, wurde eine weitere Isolation mit dem mirPremier™ microRNA Isolation Kit (Sigma) durchgeführt. In beiden Fällen wurde die Isolation nach den Vorgaben der Hersteller durchgeführt und die isolierte Total-RNA in je 50 µl Wasser aufgenommen. Durchschnittlich konnten mit dem total RNA Purification Kit 70 ng/µl RNA isoliert werden, während bei dem micro RNA Isolation Kit 90 ng/µl RNA anfielen.

Eine Qualitätskontrolle der RNA wurde gelelektrophoretisch mit einem 15 % PAGE (Stärke: 1 mm) vorgenommen, wobei die Nukleinsäuren mit SYBR-Gold (Invitrogen) angefärbt und auf dem Typhoon 9400 Gel-Scanner visualisiert wurden.

5.2.6.2 Isolation von Total-RNA aus Lebergewebe einer Maus (mus musculus)

Die Leber einer Maus wurde präpariert und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren⁶³. In einem Mörser wurde das Gewebe unter flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zerkleinert und 250 mg in einen Homogenisator mit Teflonhülse (IKA) und mit einer BD Microlance™ 3 Kanüle (10 Mal aufziehen; Nadelgröße: 0,4x19 mm, 27 G) in Lyse-Puffer (Norgen) homogenisiert. Die RNA wurde unter Verwendung des Total RNA Purification Maxi Kits (Norgen) nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Die isolierte RNA (ca. 4 mg) wurde mit Ethanol gefällt, in 1 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

⁶³ Die Präparation wurde am IPMB der Universität Heidelberg im Arbeitskreis Müller von den dortigen Mitarbeitern durchgeführt.

5.2.6.3 Photocrosslinking

In der oben beschriebenen Pufferlösung (Kapitel 5.2.5) wurde die RNA gelöst (für *E. coli* Transkriptomanalyse: Volumen: 10 µl; Total-RNA: 0,4 µg/µl; cAMP-Aptamer: 5 µM; für Maus Transkriptomanalyse: Volumen: 100 µl; Total-RNA: 3,5 µg/µl; cAMP-Aptamer: 50 nM). Für den Crosslink wurde wie oben beschrieben vorgegangen, wobei jeweils eine Probe mit Zusatz von 1 mM cAMP angefertigt wurde (Inhibitionskontrolle) und eine Probe ohne cAMP. Nach der Bestrahlung wurden die Proben über Nacht bei -20°C gelagert.

5.2.6.4 Immobilisierungs-Ligations-Protokoll⁶⁴

a) Im Verlauf des Protokolls eingesetzte Puffer

Immopuffer

Komponente	Konzentration
HEPES (pH 7,2)	10 mM
NaCl	1 M
EDTA	5 mM

Strep-Wash Puffer

Komponente	Konzentration
Tris•HCl (pH 7,4; 25°C)	50 mM
Harnstoff	8 M

Ligations-Puffer 1

Komponente	Konzentration
Tris•HCl (pH 7,4; 25°C)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DMSO	15%
BSA	50 µg/ml

⁶⁴ Dieses Protokoll wurde von M.-L. Wenz in seinem generellen Aufbau entwickelt und von mir in der hier beschriebenen Form für die vorliegenden Experimente optimiert und angewendet.

First-Strand-Puffer

Komponente	Konzentration
Tris•HCl (pH 8,3; 25°C)	50 mM
KCl	75 mM
MgCl ₂	3 mM

5x F-Puffer

Komponente	Konzentration
Tris•HCl (pH 7,4; 25°C)	250 mM
MgCl ₂	50 mM

b) Präadenylierung des ersten Adapters

Im Vorfeld der Durchführung des Immobilisierungs-Ligations-Protokolls wurde der Adapter **S7**, der in der ersten Ligation verwendet wurde, nach einem Protokoll von Hafner *et al.* präadenyliert [173]. Hierzu wurden 5 nmol des Adapters in einem Eppendorf Concentrator 5301 zur Trockne eingedampft und in 10 µl einer Lösung bestehend aus 100 mM 5'-Adenosin-monophosphat-imidazolid (ImpA, bereitgestellt von M.-L. Winz) und 50 mM MgCl₂ für 1,5 h bei 50°C inkubiert. Dann wurden erneut 5 µl der Lösung zugegeben und eine weitere Stunde bei 50°C inkubiert. Die Aufreinigung des Produktes **S7*** erfolgte über eine Illustra NAP™-Säule (GE-Healthcare), wobei die Anwesenheit von Produkt im Elutionsvolumen mit Hilfe des veränderten Absorptionsspektrums am Nanodrop nachgewiesen wurde. Die Reinheit des Produktes wurde über ein 12 % dPAGE überprüft.

c) Immobilisierung der bestrahlten RNA⁶⁵

In Mobicol-„Classic“-Filtern (800 µl, 10 µm Porengröße; MoBiTec) werden 150 µl Pierce Immunopure Immobilized Streptavidin (Thermo Scientific) geladen und die überstehende Lösung von den Agarose-Kügelchen abzentrifugiert⁶⁶. Zur Äquilibration wurden die Kügelchen drei Mal mit je 400 µl Immopuffer versetzt, kurz verschüttelt und der Puffer abzentrifugiert.

⁶⁵ Das Protokoll wird zur besseren Übersichtlichkeit nur für die Analyse des Maus-Transkriptoms beschrieben. Im Falle der *E. coli* Transkriptomanalyse wurde die Immobilisierung durch das reduzierte Probenvolumen nur mit 10 µl immobilisiertem Streptavidin vorgenommen. Dementsprechend wurden alle enzymatischen Reaktionen in einem Zehntel des Volumens durchgeführt (reverse Transkription 1/5) und die Waschvolumina auf ein Viertel reduziert.

⁶⁶ Alle Zentrifugationsschritte dieses Protokolls wurden mit 12000 rpm für 1 min durchgeführt.

Dann wurde die Oberfläche der Kügelchen durch 20 Min Inkubation bei 1000 rpm und Raumtemperatur im Thermoshaker in 200 µl Immopuffer inaktiviert, dem 100 µg/ml BSA zugesetzt worden waren. Nach Abzentrifugieren dieser Lösung wurden die bestrahlten Proben, die mit je 100 µl doppelt konzentriertem Immopuffer gemischt worden waren, zu den Kügelchen gegeben und 1 h bei 1000 rpm im Thermoshaker bei Raumtemperatur geschüttelt.

Anschließend wurde der Überstand abzentrifugiert und der Vorgang mit weiteren 150 µl Pierce Immunopure Immobilized Streptavidin Kügelchen wiederholt. Diese wurden im Vorfeld exakt so behandelt wie oben beschrieben.

Die Festphasen mit immobilisierter RNA wurden fünf Mal mit je 400 µl Strep-Wash-Puffer gewaschen, verschüttelt und der Überstand abzentrifugiert.

d) Ligation des ersten Adapters an den 3'-Terminus der immobilisierten RNA

Die mit dem stark denaturierenden Strep-Wash Puffer behandelten Kügelchen mussten vor der Durchführung der enzymatischen Reaktion auf das neue Puffersystem äquilibriert werden. Hierfür wurden sie drei Mal mit 400 µl Ligations-Puffer 1 versetzt, verschüttelt und abzentrifugiert. Im Anschluss wurde die Oberfläche erneut inaktiviert durch Inkubation mit 400 µl Ligations-Puffer 1 für 20 Min bei Raumtemperatur und 1000 rpm im Thermoshaker. Danach wird noch ein Mal mit 400 µl Ligations-Puffer 1 gewaschen, verschüttelt und abzentrifugiert, bevor die Ligation gestartet wurde.

Für diese Reaktion wurde die Festphase mit 200 µl des Ligations-Puffers 1 versetzt, der zusätzlich 50 mM β -Mercaptoethanol, 50 pmol präadenyliertem Adapter **S7*** (siehe Abschnitt 5.2.6.4 b) enthält. Zur Ausführung der Reaktion wurde 100 u (10 µl) RNA-Ligase 1 (*T4 RNI1*, Fermentas) und 2000 u (10 µl) T4 RNA-Ligase 2 (verkürzte Version, *T4 RNI2 truncated*; New England Biolabs) zugegeben und die Proben 18 h bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde 100 µl NaCl-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 M zugegeben und die Filter 1 h bei Raumtemperatur und 1000 rpm im Thermoshaker inkubiert, damit Oligonukleotide, die sich während der Ligation von der Festphase gelöst hatten, wieder immobilisiert werden konnten. Dann wurde der Überstand abzentrifugiert und die Kügelchen fünf Mal mit je 400 µl Strep-Wash Puffer versetzt, verschüttelt und abzentrifugiert.

e) Reverse Transkription auf der Festphase

Die mit Primer-Bindestellen versehene, immobilisierte RNA wurde im nächsten Schritt revers transkribiert. Dazu wurde die Festphase drei Mal mit 400 µl First-Strand-Puffer gewaschen, verschüttelt und abzentrifugiert, um den stark denaturierenden Strep-Wash Puffer vollständig

zu entfernen. Anschließend wurde die Oberfläche der Kügelchen 20 Min bei Raumtemperatur und 1000 rpm im Thermoshaker durch Zugabe eines mit 100 µg/ml versetzten First-Strand-Puffer inaktiviert. Der Überstand wurde abzentrifugiert und die Festphase ein Mal mit First-Strand-Puffer gewaschen, verschüttelt und abzentrifugiert.

Dann wurden 50 µl einer 50 µM Lösung des RT-Primers **S8** zu den Kügelchen gegeben und die RNA 10 Min bei 80°C denaturiert. Im Anschluss wurden die Filter auf Eis gestellt, damit der Primer an den Adapter hybridisieren kann. Zu dieser Lösung wurden 225 µl der folgenden Lösung gegeben:

Komponente	V [µl]	Endkonzentration
First-Strand-Puffer 5x	50	1x
DTT	12,5	5 mM
BSA	12,5	50 ng/µl
dNTP-Mix	12,5	je 0,5 mM
Wasser	112,5	-
Σ	187,5	

Diese 237,5 µl Reaktionsgemisch wurden 3 Min auf 55°C temperiert und dann 12,5 µl (2500 u) SuperScript™II Reverse Transcriptase (Invitrogen) hinzugefügt, so dass das finale Volumen der Reaktion 250 µl betrug. Die reverse Transkription wurde 1h bei 55°C ausgeführt.

Im Anschluss wurde NaCl-Lösung bis zu einer Konzentration von 1 M zugegeben, um Sequenzen, die sich während der Reaktion von der Festphase gelöst haben, erneut zu immobilisieren und 1 h bei Raumtemperatur und 1000 rpm im Thermoshaker inkubiert. Nachdem der Überschuss abzentrifugiert worden war, wurde die Festphase erneut fünf Mal mit je 400 µl Strep-Wash Puffer gewaschen, verschüttelt und abzentrifugiert, um die Pufferkomponenten, das Enzym und vor allem den Überschuss **S8** zu entfernen.

f) Exonuklease-I-Verdau von verbleibendem RT-Primer

Anschließend wurde drei Mal mit 300 µl Exol-Puffer (Fermentas, mit Wasser auf 1x verdünnt) oder First-Strand-Puffer gewaschen, verschüttelt und abzentrifugiert. Dann wurde wie bei den vorherigen enzymatischen Reaktionen die Oberfläche der Kügelchen durch 20 Min Inkubation mit 300 µl Exol-Puffer, dem 100 µg/ml BSA zugesetzt worden waren, bei Raumtemperatur und 1000 rpm im Thermoshaker inaktiviert. Anschließend wurde die Festphase zwei weitere Male mit je 300 µl Exol-Puffer gewaschen, verschüttelt und abzentrifugiert.

Die Reaktion zum Verdau des verbleibenden einzelsträngigen RT-Primers **S8** wurde mit 200 µl Exol-Puffer und 10 µl (200 u) Exonuklease I (Exol, Fermentas) für 15 Min bei 37°C durchgeführt.

Die Pufferkomponenten, das Enzym und die Produkte des Verdau wurden dann durch dreimaliges Waschen mit 400 µl Strep-Wash Puffer sowie fünfmaliges Waschen mit Immopuffer entfernt⁶⁷.

g) Alkalischer Verdau der RNA zur Freisetzung der cDNA in Lösung und deren Fällung

Die cDNA wurde im nächsten Schritt von der Festphase gelöst, indem die RNA, an die sie gebunden ist, durch Zugabe von 225 µl 0,15 M NaOH-Lösung über 25 Min ohne Schütteln bei 55°C alkalisch verdaut wurde. Anschließend wurde der Überstand der Proben in ein frisch bereit gestelltes 1,7 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert, in dem je 112,5 µl 0,3 M HCl vorgelegt worden waren. Die Proben wurden ohne Zeitverlust auf Eis gestellt und mit 34 µl 5 M NH₄OAc-Puffer (pH 5,5) versetzt. Dann konnte die cDNA nach dem Standardprotokoll mit Ethanol gefällt werden.

h) CTP-Verlängerung (CTP-Tailing)⁶⁸

Damit an die einzelsträngige cDNA eine zweite Primerbindestelle für die PCR eingeführt werden konnte, wurde sie mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) und CTP am 3'-Terminus um drei bis vier Ribonukleotide verlängert. Hierfür wurde die gefällte cDNA in 20 µl einer Lösung aufgenommen, die TdT-Puffer (200 mM Kalium-Kakodylat, 25 mM Tris•HCl (pH 7,2 bei 25°C), 0,01 % Triton X-100 und 1 mM CoCl₂; Fermentas) sowie 1,25 mM CTP und 20 u TdT (Fermentas) enthält.

Diese Lösung wurde 60 Min bei 37°C im Thermoshaker inkubiert. Im Anschluss wurde das Enzym durch 10 Min Inkubation bei 70°C hitzeinaktiviert.

i) 3'-Ligation des zweiten Adapters mit T4 DNA-Ligase

Die Reaktionslösung der CTP-Verlängerung kann direkt in der zweiten Adapter-Ligation eingesetzt werden, wobei sie maximal ein Viertel des Gesamtvolumens ausmachen darf.

⁶⁷ Die Umstellung auf Immopuffer erleichtert im weiteren Verlauf des Protokolls das Wiederauflösen der cDNA.

⁶⁸ Bei den beiden folgenden Schritten wurden die Proben mit *E. coli* Total-RNA in der Hälfte des beschriebenen Volumens bearbeitet.

Um den doppelsträngigen Anker vorzubereiten, der als Adapter an die cDNA ligiert werden sollte, wurden zwei komplementäre DNA-Oligonukleotide (**S9** und **S10**) in 5 µM Konzentration (8 µl) gemischt und in der PCR-Maschine 30 s bei 90°C inkubiert, zur Hybridisierung mit 0,5 K/s bis auf 4°C abgekühlt und 10 Min bei dieser Temperatur gehalten. So entstand ein Doppelstrang (Anker) mit einem 3'-Überhang von zwei Guanosin-Nukleotiden, die in der Lage sind mit der 3'-Cytidin-Verlängerung der cDNA zu hybridisieren.

Die Reaktion wurde über Nacht (16 h) bei 4°C in folgender Lösung durchgeführt:

Komponente	V [µl]	Endkonzentration
TdT-Reaktions-Mix	20	-
Anker	8	je 5 µM
ATP	8	10 µM
F-Puffer 5x	16	1x
T4-DNA-Ligase (Fermentas)	4	120 u
Wasser	24	-
Σ	80	

Anschließend wurde das Enzym für 10 Min bei 75°C hitzeinaktiviert. Die cDNA wurde für alle nachfolgenden Untersuchungen bei -20°C gelagert.

5.2.7 Quantitative PCR

Um zu überprüfen wie viel mehr Kopien der Sequenz des cAMP-Aptamers in den Proben mit bzw. ohne cAMP enthalten sind und auf Basis dieser Daten einen Anreicherungsfaktor zu berechnen, wurden qPCRs durchgeführt. Die Primer-Kombination für das cAMP-Aptamer war: **S10** & **S11**. Für die Proben mit *E. coli* Total-RNA wurde die 16S rRNA als Referenzgen gewählt. Die entsprechenden Primer für das Referenzgen (**S12**, **S13**) wurden so gewählt, dass ein Amplikon der Länge 67 bp (Amplikon des cAMP-Aptamers mit Adapter zwischen 38 bp und 49 bp) gebildet wird und die Hybridisierungstemperatur für beide Sequenzen (Aptamer und Referenz) ähnlich ist.

Alle verwendeten Primer wurden mit BLAST [218] auf ihre Spezifität überprüft, mittels einer *in silico* PCR [219] auf die korrekte Länge des Amplikons und eventuelle Nebenprodukte getestet und auf mögliche Sekundärstrukturen oder Dimerbildungen [220] hin kontrolliert.

Die optimale Hybridisierungstemperatur für alle verwendeten Primer-Kombinationen wurde im Vorfeld der qPCR mit Hilfe einer Gradienten-PCR ermittelt.

Komponente	V [μ l]	Endkonzentration
cDNA-Probe	1	-
10x Puffer (Rapidozym)	2,5	1x
MgCl ₂	1,25	2,5 mM
Primer	je 0,5	je 0,5 μ M
dNTP-Mix	0,6	je 240 μ M
Taq-Polymerase (Rapidozym)	1	25u
Wasser	3,75	
Σ	25	

Amplifizierungsprotokoll:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	90°C	5 Min
2	90°C	1 Min
3	Gradient 40 – 60°C	2 Min
4	72°C	1:30 Min
5	wiederhole 14x ab 2	-
6	72°C	5 Min

Die qPCR wurde in einem Corbett Research RotorGene 2Plex HRM Gerät mit einem Rotor für 72 Proben durchgeführt. Die Detektion der amplifizierten Produkte wurde mit SYBR-Green unter Verwendung des SensiMix no-Rox (BioLine) vorgenommen.

Die qPCR-Proben wurden folgendermaßen angefertigt:

Komponente	V [μ l]
cDNA-Probe	2
SensiMix	6,25
Primer	je 0,25
Wasser	3,75
Σ	12,5

Die cDNA-Proben wurden in einer 1:5-Verdünnung eingesetzt, abgesehen von den Proben der Maus Transkriptomanalyse, die in einer 1:2-Verdünnung verwendet wurden. Die Konzentration der Primer betrug je 500 nM.

Alle Proben wurden im Duplikat gemessen (technische Duplikate). Für alle Primer-Kombinationen wurden Kontrollen ohne Templat-Zugabe angefertigt (*No template control*, NTC). Außerdem wurde für jede cDNA eine Amplifizierung ohne Zugabe von Primer durchgeführt.

Amplifizierungsprotokoll:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	10 Min
2	95°C	15 s
3	54°C	30 s
4	72°C	20 s
5	wiederhole 45x ab 2	-

Direkt nach Beendigung des Protokolls wurde im Gerät eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Hierfür wurde die Temperatur gleichmäßig von 72°C auf 95°C erhöht.

Die Analyse der Daten wurde mit Hilfe der RotorGene 6000 Series Software Version 1.7 (Corbett Research) durchgeführt. Zur Quantifizierung sowie zur Bestimmung der relativen Amplifizierung und der C_t -Werte wurde der „*Comparative Quantitation Analysis*“-Algorithmus der Software verwendet, welcher an die Pfaffl-Methode angelehnt ist [183].

5.2.8 Fluoreszentes In-Line Probing

5.2.8.1 Fluoreszentes In-Line Probing mit dem Lysin-Riboswitch

a) 5'-Fluoreszenzmarkierung

Für eine Fluoreszenzmarkierung mit Atto633 (Atto-Tec) wurden 600 pmol des 179 nt Transkriptionsproduktes unter Verwendung des *5'-EndTag Nucleic Acid End Labeling Kits* (Vector Laboratories) entsprechend der Angaben vom Hersteller dephosphoryliert, thiophosphoryliert und mit Atto633-Maleimid (Atto-Tec) markiert. Nach Phenol-Ether-Extraktion wurde die fluoreszenzmarkierte RNA mit Ethanol gefällt. Um verbleibende Spuren des Farbstoffs abzutrennen, wurde das Produkt anschließend mit einer *Spin Column* (GE Healthcare) gereinigt. Die Elution ergab 200 pmol markierte RNA.

b) In-Line Probing

Das In-Line Probing Experiment wurde durchgeführt wie in Kapitel 5.2.3.4 beschrieben.

5.2.8.2 Fluoreszentes In-Line Probing mit Diels-Alderase Ribozymen

2 pmol der von A. Nierth und M. Singer erhaltenen fluoreszenzmarkierten Dase Konstrukte **A-H** oder 0,2 pmol des nach der in Kapitel 5.2.1.3 beschriebenen Methode $5'$ - ^{32}P -markierten Ribozyms wurden in 10 μl eines Puffers gelöst, der 50 mM Tris•HCl (pH 8,5 bei 25°C), 100 mM KCl, 250 mM NaCl, 10 % EtOH sowie 0, 20 oder 80 mM MgCl_2 enthielt. Die Proben wurden zur Neufaltung 4 Min auf 70°C erhitzt und anschließend langsam abgekühlt. Dann wurden sie vier Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor die Reaktion durch Zugabe des in Kapitel 5.2.3.4 beschriebenen Ladepuffers abgebrochen wurde.

Ein partieller alkalischer Verdau wurde durch Inkubation von 2 pmol fluoreszentem oder 0,2 pmol radioaktiv markiertem Ribozym in 10 μl 50 mM NaHCO_3 -Puffer (pH 9) mit 10 μg *E. coli* Total-tRNA für 10 Min bei 90°C erreicht. Die Reaktionen wurden dadurch abgebrochen, dass die Proben auf Eis gestellt und mit Ladepuffer versetzt wurden.

G-spezifische Sequenzleitern mussten für jedes Experiment frisch hergestellt werden, indem 2 pmol fluoreszentes oder 0,2 pmol radioaktiv markiertes Ribozym in 10 μl eines 50 mM NaCitrat-Puffers (pH 5) mit 7 M Harnstoff gelöst wurde. Nachdem die Proben zwecks Denaturierung 10 Min auf 70°C erhitzt worden waren, wurden 0,2 μl (2 μl) RNase T1 (Fermentas) zugegeben. Nach weiteren 10 Min bei 70°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 μl Ladepuffer abgebrochen.

Die Spaltprodukte wurden auf 13,5 % PAGE-Gelen (Stärke 0,35 mm) separiert (je 9 μl). Die Gele wurden 3 h bei 45 W laufen gelassen und auf die Fluoreszenz-Farbstoffe am Typhoon 9400 gescannt. Die Prozessierung wurde mit der ImageJ-Software vorgenommen. Subtraktionsbilder wurden erhalten, indem der Hintergrund von beiden Scans abgezogen und die Intensitäten normalisiert wurden. Dann konnten das Bild der terminalen Markierung von dem der internen Markierung abgezogen werden, wobei alle Intensitätswerte, die <0 ergeben, auf Null gesetzt wurden.

6 Literaturverzeichnis

1. Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A. and Merrick, J.M. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, **269**, 496-512.
2. James, P. (1997) Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys*, **30**, 279-331.
3. Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. and Humphery-Smith, I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, **16**, 1090-1094.
4. Velculescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M.A., Bassett, D.E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, **88**, 243-251.
5. van Bakel, H., Nislow, C., Blencowe, B.J. and Hughes, T.R. (2010) Most "dark matter" transcripts are associated with known genes. *PLoS Biol*, **8**, e1000371.
6. Clark, M.B., Amaral, P.P., Schlesinger, F.J., Dinger, M.E., Taft, R.J., Rinn, J.L., Ponting, C.P., Stadler, P.F., Morris, K.V., Morillon, A., Rozowsky, J.S., Gerstein, M.B., Wahlestedt, C., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Gingeras, T.R. and Mattick, J.S. (2011) The reality of pervasive transcription. *PLoS Biol*, **9**, e1000625.
7. van Bakel, H., Nislow, C., Blencowe, B.J. and Hughes, T.R. (2011) Response to "the reality of pervasive transcription". *PLoS Biol*, **9**, e1001102.
8. Hodges, E., Xuan, Z., Balija, V., Kramer, M., Molla, M.N., Smith, S.W., Middle, C.M., Rodesch, M.J., Albert, T.J., Hannon, G.J. and McCombie, W.R. (2007) Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nat Genet*, **39**, 1522-1527.
9. Kapranov, P., Cawley, S.E., Drenkow, J., Bekiranov, S., Strausberg, R.L., Fodor, S.P. and Gingeras, T.R. (2002) Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science*, **296**, 916-919.
10. Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammanna, H., Helt, G., Sementchenko, V., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Ganesh, M., Ghosh, S., Bell, I., Gerhard, D.S. and Gingeras, T.R. (2005) Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science*, **308**, 1149-1154.
11. Bertone, P., Stolc, V., Royce, T.E., Rozowsky, J.S., Urban, A.E., Zhu, X., Rinn, J.L., Tongprasit, W., Samanta, M., Weissman, S., Gerstein, M. and Snyder, M. (2004) Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science*, **306**, 2242-2246.
12. Crick, F.C. (1955) *On Degenerate Templates And The Adaptor Hypothesis*.
13. Holley, R.W., Khorana, H.G. and Nirenberg, M.W. (1968) *Noble Prize in Physiology and Medicine "for their interpretation of the genetic code and its function in protein synthesis"*.
14. Jones, O.W., Jr. and Nirenberg, M.W. (1962) Qualitative survey of RNA codewords. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **48**, 2115-2123.
15. Khorana, H.G. (1968), *Nobel Lectures*.
16. Ohno, S. (1972) So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol*, **23**, 366-370.
17. Orgel, L.E. and Crick, F.H. (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, **284**, 604-607.
18. Cavalier-Smith, T. (1978) Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J Cell Sci*, **34**, 247-278.
19. Chen, Y.G., Kowtoniuk, W.E., Agarwal, I., Shen, Y. and Liu, D.R. (2009) LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA. *Nat Chem Biol*, **5**, 879-881.
20. Eddy, S.R. (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet*, **2**, 919-929.

21. Mercer, T.R., Dinger, M.E. and Mattick, J.S. (2009) Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, **10**, 155-159.
22. Weinberg, Z., Perreault, J., Meyer, M.M. and Breaker, R.R. (2009) Exceptional structured noncoding RNAs revealed by bacterial metagenome analysis. *Nature*, **462**, 656-659.
23. Mattick, J.S. (2011) The central role of RNA in human development and cognition. *FEBS Lett*, **585**, 1600-1616.
24. Cravatt, B.F., Wright, A.T. and Kozarich, J.W. (2008) Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem*, **77**, 383-414.
25. Evans, M.J. and Cravatt, B.F. (2006) Mechanism-based profiling of enzyme families. *Chem Rev*, **106**, 3279-3301.
26. Heal, W.P., Dang, T.H. and Tate, E.W. (2011) Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets. *Chem Soc Rev*, **40**, 246-257.
27. Müller, S., Kumari, S., Rodriguez, R. and Balasubramanian, S. (2010) Small-molecule-mediated G-quadruplex isolation from human cells. *Nat Chem*, **2**, 1095-1098.
28. Miranda-Rios, J., Navarro, M. and Soberon, M. (2001) A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9736-9741.
29. Meyer, M.M., Hammond, M.C., Salinas, Y., Roth, A., Sudarsan, N. and Breaker, R.R. (2011) Challenges of ligand identification for riboswitch candidates. *RNA Biol*, **8**, 5-10.
30. Abelson, J.N., Simon, M.I., Wilchek, M. and Bayer, E.A. (1990) Avidin-biotin technology. *Method Enzymol*, **184**.
31. Bayer, E.A. and Wilchek, M. (1990) Application of avidin-biotin technology to affinity-based separations. *J Chromatogr*, **510**, 3-11.
32. Patricelli, M.P. (2002) Activity-based probes for functional proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **1**, 151-158.
33. Liu, Y., Patricelli, M.P. and Cravatt, B.F. (1999) Activity-based protein profiling: the serine hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14694-14699.
34. Weerapana, E., Wang, C., Simon, G.M., Richter, F., Khare, S., Dillon, M.B., Bachovchin, D.A., Mowen, K., Baker, D. and Cravatt, B.F. (2010) Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature*, **468**, 790-795.
35. Gubbens, J., Ruijter, E., de Fays, L.E., Damen, J.M., de Kruijff, B., Slijper, M., Rijkers, D.T., Liskamp, R.M. and de Kroon, A.I. (2009) Photocrosslinking and click chemistry enable the specific detection of proteins interacting with phospholipids at the membrane interface. *Chem Biol*, **16**, 3-14.
36. Wirsing, L., Naumann, K. and Vogt, T. (2011) Arabidopsis methyltransferase fingerprints by affinity-based protein profiling. *Anal Biochem*, **408**, 220-225.
37. Brunner, J. (1993) New photolabeling and crosslinking methods. *Annu Rev Biochem*, **62**, 483-514.
38. Chan, E.W., Chattopadhyaya, S., Panicker, R.C., Huang, X. and Yao, S.Q. (2004) Developing photoactive affinity probes for proteomic profiling: hydroxamate-based probes for metalloproteases. *J Am Chem Soc*, **126**, 14435-14446.
39. Das, J. (2011) Aliphatic diazirines as photoaffinity probes for proteins: recent developments. *Chem Rev*, **111**, 4405-4417.
40. Shi, H., Liu, K., Xu, A. and Yao, S.Q. (2009) Small molecule microarray-facilitated screening of affinity-based probes (AfBPs) for gamma-secretase. *Chem Commun (Camb)*, 5030-5032.
41. Speers, A.E. and Cravatt, B.F. (2004) Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods. *Chem Biol*, **11**, 535-546.
42. Slack, J.L., Causey, C.P., Luo, Y. and Thompson, P.R. (2011) Development and use of clickable activity based protein profiling agents for protein arginine deiminase 4. *ACS Chem Biol*, **6**, 466-476.

43. Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V. and Sharpless, K.B. (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl*, **41**, 2596-2599.
44. Tornøe, C.W., Christensen, C. and Meldal, M. (2002) Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem*, **67**, 3057-3064.
45. Borda, E.J. and Sigurdsson, S.T. (2005) Investigation of Mg²⁺- and temperature-dependent folding of the hairpin ribozyme by photo-crosslinking: effects of photo-crosslinker tether length and chemistry. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1058-1068.
46. Pinard, R., Heckman, J.E. and Burke, J.M. (1999) Alignment of the two domains of the hairpin ribozyme-substrate complex defined by interdomain photoaffinity crosslinking. *J Mol Biol*, **287**, 239-251.
47. Wombacher, R. and Jäschke, A. (2008) Probing the active site of a diels-alderase ribozyme by photoaffinity cross-linking. *J Am Chem Soc*, **130**, 8594-8595.
48. Licatalosi, D.D., Mele, A., Fak, J.J., Ule, J., Kayikci, M., Chi, S.W., Clark, T.A., Schweitzer, A.C., Blume, J.E., Wang, X., Darnell, J.C. and Darnell, R.B. (2008) HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature*, **456**, 464-469.
49. Ule, J., Jensen, K., Mele, A. and Darnell, R.B. (2005) CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods*, **37**, 376-386.
50. Ule, J., Jensen, K.B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A. and Darnell, R.B. (2003) CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science*, **302**, 1212-1215.
51. König, J., Zarnack, K., Rot, G., Curk, T., Kayikci, M., Zupan, B., Turner, D.J., Luscombe, N.M. and Ule, J. (2010) iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 909-915.
52. Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A.C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G.S., Dewell, S., Zavolan, M. and Tuschl, T. (2010) Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, **141**, 129-141.
53. Kudla, G., Granneman, S., Hahn, D., Beggs, J.D. and Tollervey, D. (2011) Cross-linking, ligation, and sequencing of hybrids reveals RNA-RNA interactions in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 10010-10015.
54. Ozsolak, F., Platt, A.R., Jones, D.R., Reifengerger, J.G., Sass, L.E., McInerney, P., Thompson, J.F., Bowers, J., Jarosz, M. and Milos, P.M. (2009) Direct RNA sequencing. *Nature*, **461**, 814-818.
55. Li, W. and Ruan, K. (2009) MicroRNA detection by microarray. *Anal Bioanal Chem*, **394**, 1117-1124.
56. Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, **10**, 57-63.
57. Zhang, C. and Darnell, R.B. (2011) Mapping in vivo protein-RNA interactions at single-nucleotide resolution from HITS-CLIP data. *Nat Biotechnol*, **29**, 607-614.
58. Vogel, J. and Sharma, C.M. (2005) How to find small non-coding RNAs in bacteria. *Biol Chem*, **386**, 1219-1238.
59. VanGuilder, H.D., Vrana, K.E. and Freeman, W.M. (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, **44**, 619-626.
60. Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, **55**, 611-622.
61. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.

62. Abbott, M.A., Poiesz, B.J., Byrne, B.C., Kwok, S., Sninsky, J.J. and Ehrlich, G.D. (1988) Enzymatic gene amplification: qualitative and quantitative methods for detecting proviral DNA amplified in vitro. *J Infect Dis*, **158**, 1158-1169.
63. Becker-Andre, M. and Hahlbrock, K. (1989) Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res*, **17**, 9437-9446.
64. Wang, A.M., Doyle, M.V. and Mark, D.F. (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9717-9721.
65. Gibson, U.E., Heid, C.A. and Williams, P.M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, **6**, 995-1001.
66. Canales, R.D., Luo, Y., Willey, J.C., Austermler, B., Barbacioru, C.C., Boysen, C., Hunkapiller, K., Jensen, R.V., Knight, C.R., Lee, K.Y., Ma, Y., Maqsodi, B., Papallo, A., Peters, E.H., Poulter, K., Ruppel, P.L., Samaha, R.R., Shi, L., Yang, W., Zhang, L. and Goodsaid, F.M. (2006) Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol*, **24**, 1115-1122.
67. Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, **3**, 1101-1108.
68. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
69. Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. and Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, **8**, R19.
70. Stormo, G.D. and Ji, Y. (2001) Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9465-9467.
71. Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M.S., Zou, X., Brown, K.L. and Breaker, R.R. (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol*, **9**, 1043.
72. Blouin, S., Mulhbach, J., Penedo, J.C. and Lafontaine, D.A. (2009) Riboswitches: ancient and promising genetic regulators. *Chembiochem*, **10**, 400-416.
73. Winkler, W.C. and Breaker, R.R. (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 487-517.
74. Irnov, Kertsburg, A. and Winkler, W.C. (2006) Genetic control by cis-acting regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*: general principles and prospects for discovery. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**, 239-249.
75. Wachter, A., Tunc-Ozdemir, M., Grove, B.C., Green, P.J., Shintani, D.K. and Breaker, R.R. (2007) Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell*, **19**, 3437-3450.
76. Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N. and Breaker, R.R. (2007) Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature*, **447**, 497-500.
77. Croft, M.T., Moulin, M., Webb, M.E. and Smith, A.G. (2007) Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20770-20775.
78. Roth, A. and Breaker, R.R. (2009) The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu Rev Biochem*, **78**, 305-334.
79. Gusarov, I. and Nudler, E. (1999) The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol Cell*, **3**, 495-504.
80. Wilson, K.S. and von Hippel, P.H. (1995) Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8793-8797.
81. Nudler, E. and Mironov, A.S. (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci*, **29**, 11-17.
82. Grundy, F.J., Lehman, S.C. and Henkin, T.M. (2003) The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12057-12062.

83. Gelfand, M.S., Mironov, A.A., Jomantas, J., Kozlov, Y.I. and Perumov, D.A. (1999) A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. *Trends Genet*, **15**, 439-442.
84. Winkler, W.C., Cohen-Chalamish, S. and Breaker, R.R. (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15908-15913.
85. Grundy, F.J. and Henkin, T.M. (1998) The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, **30**, 737-749.
86. McDaniel, B.A., Grundy, F.J., Artsimovitch, I. and Henkin, T.M. (2003) Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3083-3088.
87. Soukup, G.A. and Breaker, R.R. (1999) Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA. *RNA*, **5**, 1308-1325.
88. Regulski, E.E. and Breaker, R.R. (2008) In-line probing analysis of riboswitches. *Methods Mol Biol*, **419**, 53-67.
89. Mandal, M., Lee, M., Barrick, J.E., Weinberg, Z., Emilsson, G.M., Ruzzo, W.L. and Breaker, R.R. (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science*, **306**, 275-279.
90. Artsimovitch, I. and Henkin, T.M. (2009) In vitro approaches to analysis of transcription termination. *Methods*, **47**, 37-43.
91. Wickiser, J.K. (2009) Kinetics of riboswitch regulation studied by in vitro transcription. *Methods Mol Biol*, **540**, 53-63.
92. Landick, R., Wang, D. and Chan, C.L. (1996) Quantitative analysis of transcriptional pausing by Escherichia coli RNA polymerase: his leader pause site as paradigm. *Methods Enzymol*, **274**, 334-353.
93. Ghim, C.M., Lee, S.K., Takayama, S. and Mitchell, R.J. (2010) The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *BMB Rep*, **43**, 451-460.
94. Giacomini, A., Corich, V., Ollero, F.J., Squartini, A. and Nuti, M.P. (1992) Experimental conditions may affect reproducibility of the beta-galactosidase assay. *FEMS Microbiol Lett*, **79**, 87-90.
95. Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
96. Sudarsan, N., Wickiser, J.K., Nakamura, S., Ebert, M.S. and Breaker, R.R. (2003) An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Dev*, **17**, 2688-2697.
97. Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A. and Gelfand, M.S. (2003) Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? *Nucleic Acids Res*, **31**, 6748-6757.
98. Blount, K.F., Wang, J.X., Lim, J., Sudarsan, N. and Breaker, R.R. (2007) Antibacterial lysine analogs that target lysine riboswitches. *Nat Chem Biol*, **3**, 44-49.
99. Garst, A.D., Héroux, A., Rambo, R.P. and Batey, R.T. (2008) Crystal structure of the lysine riboswitch regulatory mRNA element. *J Biol Chem*, **283**, 22347-22351.
100. Serganov, A., Huang, L. and Patel, D.J. (2008) Structural insights into amino acid binding and gene control by a lysine riboswitch. *Nature*, **455**, 1263-1267.
101. Serganov, A. and Patel, D.J. (2009) Amino acid recognition and gene regulation by riboswitches. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 592-611.
102. Blouin, S. and Lafontaine, D.A. (2007) A loop loop interaction and a K-turn motif located in the lysine aptamer domain are important for the riboswitch gene regulation control. *RNA*, **13**, 1256-1267.
103. Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.

104. Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**, 818-822.
105. Joyce, G.F. (1989) Amplification, mutation and selection of catalytic RNA. *Gene*, **82**, 83-87.
106. Gilbert, S.D. and Batey, R.T. (2005) Riboswitches: natural SELEXion. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 2401-2404.
107. Koizumi, M. and Breaker, R.R. (2000) Molecular recognition of cAMP by an RNA aptamer. *Biochemistry*, **39**, 8983-8992.
108. Seelig, B. and Jäschke, A. (1999) A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity. *Chem Biol*, **6**, 167-176.
109. Manoharan, V., Fürtig, B., Jäschke, A. and Schwalbe, H. (2009) Metal-induced folding of Diels-Alderase ribozymes studied by static and time-resolved NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, **131**, 6261-6270.
110. Keiper, S., Bebenroth, D., Seelig, B., Westhof, E. and Jäschke, A. (2004) Architecture of a Diels-Alderase ribozyme with a preformed catalytic pocket. *Chem Biol*, **11**, 1217-1227.
111. Kraut, S., Bebenroth, D., Nierth, A., Kobitski, A.Y., Nienhaus, G.U. and Jäschke, A. (2011) Three critical hydrogen bonds determine the catalytic activity of the Diels-Alderase ribozyme. *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkr1812.
112. Nierth, A., Singer, M. and Jäschke, A. (2010) Efficient photoactivation of a Diels-Alderase ribozyme. *Chem Commun (Camb)*, **46**, 7975-7977.
113. Nierth, A., Kobitski, A.Y., Nienhaus, G.U. and Jäschke, A. (2010) Anthracene-BODIPY dyads as fluorescent sensors for biocatalytic Diels-Alder reactions. *J Am Chem Soc*, **132**, 2646-2654.
114. Kobitski, A.Y., Nierth, A., Helm, M., Jäschke, A. and Nienhaus, G.U. (2007) Mg²⁺-dependent folding of a Diels-Alderase ribozyme probed by single-molecule FRET analysis. *Nucleic Acids Res*, **35**, 2047-2059.
115. Serganov, A., Keiper, S., Malinina, L., Tereshko, V., Skripkin, E., Höbartner, C., Polonskaia, A., Phan, A.T., Wombacher, R., Micura, R., Dauter, Z., Jäschke, A. and Patel, D.J. (2005) Structural basis for Diels-Alder ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 218-224.
116. Berezniak, T., Zahran, M., Imhof, P., Jäschke, A. and Smith, J.C. (2010) Magnesium-dependent active-site conformational selection in the Diels-Alderase ribozyme. *J Am Chem Soc*, **132**, 12587-12596.
117. Heppell, B., Blouin, S., Dussault, A.M., Mulhbach, J., Ennifar, E., Penedo, J.C. and Lafontaine, D.A. (2011) Molecular insights into the ligand-controlled organization of the SAM-I riboswitch. *Nat Chem Biol*, **7**, 384-392.
118. Haller, A., Rieder, U., Aigner, M., Blanchard, S.C. and Micura, R. (2011) Conformational capture of the SAM-II riboswitch. *Nat Chem Biol*, **7**, 393-400.
119. Steiner, M., Karunatilaka, K.S., Sigel, R.K. and Rueda, D. (2008) Single-molecule studies of group II intron ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 13853-13858.
120. Zhuang, X., Kim, H., Pereira, M.J., Babcock, H.P., Walter, N.G. and Chu, S. (2002) Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules. *Science*, **296**, 1473-1476.
121. Rhodes, M.M., Reblova, K., Sponer, J. and Walter, N.G. (2006) Trapped water molecules are essential to structural dynamics and function of a ribozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13380-13385.
122. Grünwald, D. and Singer, R.H. (2010) In vivo imaging of labelled endogenous beta-actin mRNA during nucleocytoplasmic transport. *Nature*, **467**, 604-607.
123. Chaulk, S.G. and MacMillan, A.M. (1998) Caged RNA: photo-control of a ribozyme reaction. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3173-3178.
124. Wenter, P., Fürtig, B., Hainard, A., Schwalbe, H. and Pitsch, S. (2005) Kinetics of photoinduced RNA refolding by real-time NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 2600-2603.
125. Strauss, B. (2007) Auf dem Weg der Synthese trifunktionaler Moleküle zur Isolierung von Riboswitches. *Universität Heidelberg; Diplom*.

126. Finn, F.M., Yamanouchi, K., Titus, G. and Hofmann, K. (1995) Trifunctional reagents for derivatizing sulfhydryl-groups. *Bioorg Chem*, **23**, 152-168.
127. Weber, P.C., Wendoloski, J.J., Pantoliano, M.W. and Salemme, F.R. (1992) Crystallographic and thermodynamic comparison of natural and synthetic ligands bound to streptavidin. *J Am Chem Soc*, **114**, 3197-3200.
128. Buchmueller, K.L., Hill, B.T., Platz, M.S. and Weeks, K.M. (2003) RNA-tethered phenyl azide photocrosslinking via a short-lived indiscriminant electrophile. *J Am Chem Soc*, **125**, 10850-10861.
129. Cech, T. and Pardue, M.L. (1977) Cross-linking of DNA with trimethylpsoralen is a probe for chromatin structure. *Cell*, **11**, 631-640.
130. Toussaint, M., Levasseur, G., Tremblay, M., Paquette, M. and Conconi, A. (2005) Psoralen photocrosslinking, a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I-transcribed ribosomal genes. *Biochem Cell Biol*, **83**, 449-459.
131. Le Breton, C., Hennion, M., Arimondo, P.B. and Hyrien, O. (2011) Replication-fork stalling and processing at a single psoralen interstrand crosslink in *Xenopus* egg extracts. *PLoS One*, **6**, e18554.
132. Vigny, P., Gaboriau, F., Voituriez, L. and Cadet, J. (1985) Chemical structure of psoralen-nucleic acid photoadducts. *Biochimie*, **67**, 317-325.
133. Bermudez, I., Garcia-Martinez, J., Perez-Ortin, J.E. and Roca, J. (2010) A method for genome-wide analysis of DNA helical tension by means of psoralen-DNA photobinding. *Nucleic Acids Res*, **38**, e182.
134. Li, Y.Z., Kirby, J.P., George, M.W., Poliakoff, M. and Schuster, G.B. (1988) 1,2-didehydroazepines from the photolysis of substituted aryl azides - analysis of their chemical and physical-properties by time-resolved spectroscopic methods. *J Am Chem Soc*, **110**, 8092-8098.
135. Rizk, M.S., Shi, X. and Platz, M.S. (2006) Lifetimes and reactivities of some 1,2-didehydroazepines commonly used in photoaffinity labeling experiments in aqueous solutions. *Biochemistry*, **45**, 543-551.
136. Poe, R., Schnapp, K., Young, M.J.T., Grayzar, J. and Platz, M.S. (1992) Chemistry and kinetics of singlet (pentafluorophenyl)nitrene. *J Am Chem Soc*, **114**, 5054-5067.
137. Wittelsberger, A., Mierke, D.F. and Rosenblatt, M. (2007) Distance restraints and resolution limit in molecular modeling of G protein-coupled receptor-peptide ligand interactions. *J Bone Miner Res*, **22**, S398-S398.
138. Wagner, P.J., Pabon, R., Park, B.S., Zand, A.R. and Ward, D.L. (1994) The regioselectivity of internal hydrogen abstraction by triplet O-tert-amylbenzophenone. *J Am Chem Soc*, **116**, 589-596.
139. Dorman, G. and Prestwich, G.D. (1994) Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry*, **33**, 5661-5673.
140. Früh, V., AP, I.J. and Siegal, G. (2011) How to catch a membrane protein in action: a review of functional membrane protein immobilization strategies and their applications. *Chem Rev*, **111**, 640-656.
141. Rusmini, F., Zhong, Z. and Feijen, J. (2007) Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*, **8**, 1775-1789.
142. Rasnik, I., McKinney, S.A. and Ha, T. (2005) Surfaces and orientations: much to FRET about? *Acc Chem Res*, **38**, 542-548.
143. Ataide, S.F., Wilson, S.N., Dang, S., Rogers, T.E., Roy, B., Banerjee, R., Henkin, T.M. and Ibba, M. (2007) Mechanisms of resistance to an amino acid antibiotic that targets translation. *ACS Chem Biol*, **2**, 819-827.
144. Neises, B. and Steglich, W. (1978) Einfaches Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren. *Angew Chem*, **90**, 556-557.

145. Wijtman, M., Pratt, D.A., Brinkhorst, J., Serwa, R., Valgimigli, L., Pedulli, G.F. and Porter, N.A. (2004) Synthesis and reactivity of some 6-substituted-2,4-dimethyl-3-pyridinol, a novel class of chain-breaking antioxidants. *J Org Chem*, **69**, 9215-9223.
146. Daga, M.C., Taddei, M. and Varchi, G. (2001) Rapid microwave-assisted deprotection of N-Cbz and N-Bn derivatives. *Tetrahedron Lett*, **42**, 5191-5194.
147. Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. and Polisky, B. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, **263**, 1425-1429.
148. Stuhlmann, F. and Jäschke, A. (2002) Characterization of an RNA active site: interactions between a Diels-Alderase ribozyme and its substrates and products. *J Am Chem Soc*, **124**, 3238-3244.
149. Kim, J.N., Blount, K.F., Puskarz, I., Lim, J., Link, K.H. and Breaker, R.R. (2009) Design and antimicrobial action of purine analogues that bind Guanine riboswitches. *ACS Chem Biol*, **4**, 915-927.
150. Lim, J., Winkler, W.C., Nakamura, S., Scott, V. and Breaker, R.R. (2006) Molecular-recognition characteristics of SAM-binding riboswitches. *Angew Chem Int Ed Engl*, **45**, 964-968.
151. Lindell, M., Romby, P. and Wagner, E.G. (2002) Lead(II) as a probe for investigating RNA structure in vivo. *RNA*, **8**, 534-541.
152. Ciesiolka, J., Michalowski, D., Wrzesinski, J., Krajewski, J. and Krzyzosiak, W.J. (1998) Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs. *J Mol Biol*, **275**, 211-220.
153. Wilson, K.S. and Noller, H.F. (1998) Mapping the position of translational elongation factor EF-G in the ribosome by directed hydroxyl radical probing. *Cell*, **92**, 131-139.
154. Lipfert, J., Das, R., Chu, V.B., Kudaravalli, M., Boyd, N., Herschlag, D. and Doniach, S. (2007) Structural transitions and thermodynamics of a glycine-dependent riboswitch from *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol*, **365**, 1393-1406.
155. Merino, E.J., Wilkinson, K.A., Coughlan, J.L. and Weeks, K.M. (2005) RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *J Am Chem Soc*, **127**, 4223-4231.
156. Blouin, S., Chinnappan, R. and Lafontaine, D.A. (2011) Folding of the lysine riboswitch: importance of peripheral elements for transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res*, **39**, 3373-3387.
157. deHaseth, P.L., Goldman, R.A., Cech, C.L. and Caruthers, M.H. (1983) Chemical synthesis and biochemical reactivity of bacteriophage lambda PR promoter. *Nucleic Acids Res*, **11**, 773-787.
158. Lu, Y., Shevtchenko, T.N. and Paulus, H. (1992) Fine-structure mapping of cis-acting control sites in the lysC operon of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, **71**, 23-27.
159. Reiss, P., Charvet, N., Roget, A., Dupuis, A., Grünwald, D., Carayon, S., Chandezon, F. and Livache, T. (2004) Biotinylated CdSe/ZnSe nanocrystals for specific fluorescent labeling. *J Mater Chem*, **14**, 2638-2642.
160. Wilbur, D.S., Pathare, P.M., Hamlin, D.K., Frownfelter, M.B., Kegley, B.B., Leung, W.Y. and Gee, K.R. (2000) Evaluation of biotin-dye conjugates for use in an HPLC assay to assess relative binding of biotin derivatives with avidin and streptavidin. *Bioconjug Chem*, **11**, 584-598.
161. Klapötke, T.M., Krumm, B., Piotrowski, H., Polborn, K. and Holl, G. (2003) Synthesis and structures of trifluoromethyl-, fluoro-, and azido-substituted hexabenzylhexaazaisowurtzitanes and isolation of a novel hexaazaisowurtzitane-based polycycle. *Chemistry*, **9**, 687-694.
162. Linton, B.R., Carr, A.J., Orner, B.P. and Hamilton, A.D. (2000) A versatile one-Pot synthesis of 1,3-substituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates. *J Org Chem*, **65**, 1566-1568.
163. Lanman, B.A., Overman, L.E., Paulini, R. and White, N.S. (2007) On the structure of palau'amine: evidence for the revised relative configuration from chemical synthesis. *J Am Chem Soc*, **129**, 12896-12900.

164. Schade, D., Kotthaus, J. and Clement, B. (2008) Efficient synthesis of optically pure N-omega-alkylated L-arginines. *Synthesis-Stuttgart*, 2391-2397.
165. Bergeron, R.J., Weimar, W.R., Müller, R., Zimmerman, C.O., McCosar, B.H., Yao, H. and Smith, R.E. (1998) Synthesis of reagents for the construction of hypusine and deoxyhypusine peptides and their application as peptidic antigens. *J Med Chem*, **41**, 3888-3900.
166. Zlatopolskiy, B.D., Radzom, M., Zeeck, A. and de Meijere, A. (2006) Synthesis and precursor-directed biosynthesis of new hormaomycin analogues. *Eur J Org Chem*, 1525-1534.
167. Shioiri, T., Yokokawa, F., Sugiyama, H., Katagiri, N., Oda, O. and Ogawa, H. (2001) An expeditious synthesis of pentosidine, an advanced glycation end product. *Tetrahedron*, **57**, 4759-4766.
168. Luo, Y., Blex, C., Baessler, O., Glinski, M., Dreger, M., Sefkow, M. and Köster, H. (2009) The cAMP capture compound mass spectrometry as a novel tool for targeting cAMP-binding proteins: from protein kinase A to potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *Mol Cell Proteomics*, **8**, 2843-2856.
169. Tate, J.J., Persinger, J. and Bartholomew, B. (1998) Survey of four different photoreactive moieties for DNA photoaffinity labeling of yeast RNA polymerase III transcription complexes. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1421-1426.
170. Bayley, H. (1983), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier, Amsterdam ; New York, pp. xiii, 187 p.
171. Forster, A.C., McInnes, J.L., Skingle, D.C. and Symons, R.H. (1985) Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucleic Acids Res*, **13**, 745-761.
172. Sharma, C.M. and Vogel, J. (2009) Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. *Curr Opin Microbiol*, **12**, 536-546.
173. Hafner, M., Landgraf, P., Ludwig, J., Rice, A., Ojo, T., Lin, C., Holoch, D., Lim, C. and Tuschl, T. (2008) Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods*, **44**, 3-12.
174. Stern, S., Moazed, D. and Noller, H.F. (1988) Structural analysis of RNA using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension. *Method Enzymol*, **164**, 481-489.
175. Behm-Ansmant, I., Helm, M. and Motorin, Y. (2011) Use of specific chemical reagents for detection of modified nucleotides in RNA. *J Nucleic Acids*, **2011**, 408053.
176. Aravin, A. and Tuschl, T. (2005) Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett*, **579**, 5830-5840.
177. Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B.D., Rice, C.M., Simon, V., Ho, D.D., Zavolan, M. and Tuschl, T. (2005) Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*, **2**, 269-276.
178. Roychoudhury, R., Jay, E. and Wu, R. (1976) Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res*, **3**, 863-877.
179. Rossi, R., Montecucco, A., Ciarrocchi, G. and Biamonti, G. (1997) Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2106-2113.
180. Schmidt, W.M. and Mueller, M.W. (1996) Controlled ribonucleotide tailing of cDNA ends (CRTC) by terminal deoxynucleotidyl transferase: a new approach in PCR-mediated analysis of mRNA sequences. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1789-1791.
181. Lee, R.C. and Ambros, V. (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 862-864.
182. Pak, J. and Fire, A. (2007) Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*, **315**, 241-244.

183. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
184. Einen, J., Thorseth, I.H. and Ovreas, L. (2008) Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol Lett*, **282**, 182-187.
185. Dai, D., Holder, D., Raskin, L. and Xi, C. (2011) Separation of the bacterial species, *Escherichia coli*, from mixed-species microbial communities for transcriptome analysis. *BMC Microbiol*, **11**, 59.
186. Shendure, J. and Ji, H. (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, **26**, 1135-1145.
187. Pesavento, C. and Hengge, R. (2009) Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr Opin Microbiol*, **12**, 170-176.
188. Botsford, J.L. and Harman, J.G. (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev*, **56**, 100-122.
189. Daniel, P.B., Walker, W.H. and Habener, J.F. (1998) Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr*, **18**, 353-383.
190. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0034.
191. Strauss, B., Nierth, A., Singer, M. and Jäschke, A. (2011) Direct structural analysis of modified RNA by fluorescent in-line probing. *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkr1733.
192. Wang, R.E., Wu, H., Niu, Y. and Cai, J. (2011) Improving the stability of aptamers by chemical modification. *Curr Med Chem*, **18**, 4126-4138.
193. Amblard, F., Cho, J.H. and Schinazi, R.F. (2009) Cu(I)-catalyzed Huisgen azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction in nucleoside, nucleotide, and oligonucleotide chemistry. *Chem Rev*, **109**, 4207-4220.
194. Garst, A.D., Edwards, A.L. and Batey, R.T. (2011) Riboswitches: structures and mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**.
195. Nierth, A. and Jäschke, A. (2011) Radioactive phosphorylation of alcohols to monitor biocatalytic Diels-Alder reactions. *PLoS One*, **6**, e21391.
196. Singer, M. (2010) Photoregulierung von artifiziellen Ribozymen. *Universität Heidelberg; Dissertation*.
197. Breslow, R. and Huang, D.L. (1991) Effects of metal ions, including Mg²⁺ and lanthanides, on the cleavage of ribonucleotides and RNA model compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4080-4083.
198. Höbartner, C. and Silverman, S.K. (2005) Modulation of RNA tertiary folding by incorporation of caged nucleotides. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 7305-7309.
199. Tucker, B.J. and Breaker, R.R. (2005) Riboswitches as versatile gene control elements. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 342-348.
200. Yoshimura, Y. and Fujimoto, K. (2008) Ultrafast reversible photo-cross-linking reaction: toward in situ DNA manipulation. *Org Lett*, **10**, 3227-3230.
201. Yoshimura, Y., Ohtake, T., Okada, H. and Fujimoto, K. (2009) A new approach for reversible RNA photocrosslinking reaction: application to sequence-specific RNA selection. *Chembiochem*, **10**, 1473-1476.
202. Schiewe, J., Gobel, S., Schwarz, M. and Neubert, R. (1996) Application of capillary zone electrophoresis for analyzing biotin in pharmaceutical formulations--a comparative study. *J Pharm Biomed Anal*, **14**, 435-439.
203. Gottlieb, H.E., Kotlyar, V. and Nudelman, A. (1997) NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J Org Chem*, **62**, 7512-7515.
204. Hegele, J., Buetler, T. and Delatour, T. (2008) Comparative LC-MS/MS profiling of free and protein-bound early and advanced glycation-induced lysine modifications in dairy products. *Anal Chim Acta*, **617**, 85-96.

205. Nevill, C.R. and Angell, P.T. (1998) Novel three-step hydroxy-deamination sequence: Conversion of lysine to 6-hydroxynorleucine derivatives. *Tetrahedron Lett*, **39**, 5671-5674.
206. Dymicky, M., Mellon, E.F. and Naghski, J. (1971) A general, highly efficient azeotropic method of esterification of amino acids. *Anal Biochem*, **41**, 487-491.
207. Werbin, H. and Palm, A. (1951) Trypsin hydrolysis of lysine ethyl ester. *J Am Chem Soc*, **73**, 1382.
208. Akabori, S. and Kaneko, T. (1936) *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **11**, 208-213.
209. Florsheimer, A. and Kula, M.R. (1988) The application of N-alpha-formyl amino-acid esters in the enzyme-catalyzed peptide-synthesis. *Monatsh Chem*, **119**, 1323-1331.
210. Silfer, J.A., Engel, M.H., Macko, S.A. and Jumeau, E.J. (1991) Stable carbon isotope analysis of amino-acid enantiomers by conventional isotope ratio mass-spectrometry and combined gas-chromatography isotope ratio mass-spectrometry. *Anal Chem*, **63**, 370-374.
211. Xu, H., Kinsell, G.R., Zhang, J., Li, M. and Rudkevich, D.M. (2003) Calixarene amino acids; building blocks for calixarene peptides and peptide-dendrimers. *Tetrahedron*, **59**, 5873-5848.
212. Huang, X.F., Rickman, B.H., Borhan, B., Berova, N. and Nakanishi, K. (1998) Zinc porphyrin tweezer in host-guest complexation: Determination of absolute configurations of diamines, amino acids, and amino alcohols by circular dichroism. *J Am Chem Soc*, **120**, 6185-6186.
213. Kitaguchi, H., Ono, M., Itoh, I. and Klibanov, A.M. (1991) Regioselective modification of Lysine's amino groups by proteases. *Agric Biol Chem*, **55**, 3067-3073.
214. Persson, T., Willkomm, D.K. and Hartmann, R.K. (2005) In Hartmann, R. K., Bindereif, A., Schön, A. and Westhof, E. (eds.), *Handbook of RNA Biochemistry*, pp. 69.
215. Hartmann, R.K., Bindereif, A., Schön, A. and Westhof, E. (2005) *Handbook of RNA Biochemistry*.
216. Johnston, R.F., Pickett, S.C. and Barker, D.L. (1990) Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis*, **11**, 355-360.
217. Cheng, Y.T., Soodprasert, T. and Hutchinson, J.M.R. (1996) Radioactivity measurements using storage phosphor technology. *Appl Radiat Isotopes*, **47**, 1023-1031.
218. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
219. Bikandi, J., San Millan, R., Rementeria, A. and Garaizar, J. (2004) In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*, **20**, 798-799.
220. Kibbe, W.A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*, **35**, W43-46.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

μW	Mikrowellenstrahlung
ABC Transkriptomanalyse	Affinitätsbasierte chemische Transkriptomanalyse
ABPP	Activity-based protein profiling; Aktivitätsbasierte Protein-Profilerstellung
ACN	Acetonitril
AEC	Aminoethylcystein
AfBPP	Affinity-based protein profiling; Affinitätsbasierte Protein-Profilerstellung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenin-Triphosphat
B	Blindprobe (Probe ohne Effektor)
Boc	Butoxycarbonyl
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenin-Monophosphat
Cbz	Carboxybenzyl
cDNA	complementary DANN; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLASH	Crosslinking, Ligation and Sequencing of Hybrids
CLIP /iCLIP / PAR-CLIP	Crosslinking and immunoprecipitation /individual CLIP / Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced CLIP
COSY	Correlated Spectroscopy
Ct	Cycle of threshold
CTP	Cytosin-Triphosphat
Cy3/Cy5	Cyanin-Farbstoffe, die häufig bei FRET-Experimenten eingesetzt werden
CyHex	Cyclohexan
Dase	Diels-Alderase
DCC	Dicyclohexyl-Carbodiimid
DCM	Dichlormethan
DCU	Dicyclohexyl-Harnstoff
DEE	Diethylether
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIPCDI	Diisopropyl-Carbodiimid
DIPEA	Diisopropyl-ethylamin
DMAP	N,N-Dimethyl-p-aminopyridin
DMF	Dmethylformamid
DMS	Dimethylsulfat
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EE	Ethylacetat (Essigester)
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektronen-Spray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FAB	Fast atom bombardment
(sm)FRET	(single molecule) Förster Resonanz Transfer
ges.	gesättigt

GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-Triphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
n-Hex	n-Hexan
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy
HPLC	High performance liquid chromatography
HR-ESI	High resolution electron spray ionization
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
iPrOH	Isopropanol
(FT)-IR	Fourier-transformiertes Infrarotspektrogramm
Kd	Dissoziationskonstante
LB-Medium	lysogeny broth Medium
LCMS	Liquid chromatography and mass spectrometry
Lys	Lysin
MALDI	Matrix assisted LASER desorption and ionization
MeOH	Methanol
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n.a.	nicht anwendbar
n.d.	nicht durchgeführt
NC	Negativkontrolle
NFPA	Nonafluorpentansäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
NPE	Nitrophenylethyl
NR	Probe, die keiner Reaktion unterzogen wurde (no reaction)
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosid-Triphosphat
OH	alkalischer Verdau (bei Gelabbildungen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
pH	potentia Hydrogenii
qPCR	quantitative real time PCR
RBP	RNA-bindendes Protein
Rf-Wert	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
sek-Butyl	sekundär Butyl
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment; systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
SHAPE	Selective hydroxyl acylation and primer extension
siRNA	silencing RNA
T1	G-spezifische Leiter auf PAGE-Gelen, die mittel RNase T1-Verdaus erzeugt wurde.
TBE	Tris-Borat EDTA-Puffer
tBu	tertiär Butyl

TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tert-Butyl	tertiär Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
tRNA	Transfer-RNA
UTP	Uracil-Triphosphat
UTR	Untranslatierter Bereich (untranslated region)
UV	Ultraviolettes Licht
VIS	Licht im sichtbaren Bereich des Spektrums
Δ	a) Hitze (bei chemischen Experimenten) b) Differenz (bei qPCR)

7.2 Geräteverzeichnis

Autoklav	Varioklav, H+P
Crosslinking Gerät	Caprotec, caproBox
Elektrophorese	Amersham Biosciences, Electrophoresis Power Supply - EPS 3501 XL
Geldokumentation (Agarosegele)	Alpha Innotec, alphaimager 2200
Geldokumentation (PAGE)	GE Healthcare Life Sciences, Typhoon 9400
Heizplatten	Heidolph, MR 3001 K
HPLC-Analge (LCMS)	Agilent Technologies, Serie 1200
HPLC-Anlage	Agilent Technologies, Seire 1100
IR-Spektroskop	Jasco FT/IR 4100
Kryostat (Rotationsverdampfer)	WK 500, Lauda
Lyophilisator	Christ, Alpha 1-4 LD Plus
Massenspektrometer	Bruker, BIFLEX III (MALDI); Finnigan MAT 8200 (EI und FAB); Bruker micrOTOF-Q II (HR-ESI und LCMS)
NMR-Spektroskopie	Varian, 300 MHz Mercury Plus; Varian, 500 MHz NMR System
Nukleinsäure Konzentrationsbestimmung	Nanodrop, ND-1000
Ölpumpe	RC 6, Vacubrand
qPCR	Corbett Rotor-Gene 6000
PCR	MJ Research, PTC-100 und PTC-200 Peltier Thermal Cycler
pH-Meter	MP 220, Mettler Toledo
<i>Phosphorimager Screens</i>	Amersham, Storage Phosphor Screen
Pipetten	Abimed, LABMATE, P2, P20, P200, P1000
Reinstwasseranlage	Millipore, Milli-Q
Rotationsverdampfer	Hei-Vap Value, Heidolph
Spritzenpumpe	kdScientific
Synthesemikrowelle	CEM, LabMate Discover
Szintillationszähler	LS 6500, Beckman Coulter
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer comfort
Vakuumzentrifugen	Eppendorf, Concentrator 5301
Waagen	Mettler Toledo, AX105 und AX204
Zentrifugen	Hettich, Mikro 120 und Mikro 200R; Eppendorf, 5804R; Haraeus, Multifuge 4 KR

7.3 Reagenzienanhang

2 M HCl in DEE	Aldrich
Ammoniumformiat	Aldrich
APS	Roth
ATP / CTP / GTP / UTP	Fermentas
Benzylalkohol	Sigma
Benzylchloroformat	ABCR / Aldrich
Boc-Anhydrid	Fluka
BocLys(Boc)OH Dicyclohexylammoniumsalz	Bachem
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Roth
CaCl ₂	Applichem
Ce(SO ₄) ₂	Aldrich
Celite	Fluka
Chinolin	Aldrich
dATP / dCTP / dGTP / TTP	Fermentas
DCC	Fluka
DEPC	Sigma
deuterierte Lösemittel	Euriso-Top
Dichlor-dimethylsilan	Sigma
DIPCDI	Aldrich
DIPEA	Aldrich
DMACA	TCI
DMAP	Aldrich
DTT	Fermentas
EDC*HCl	Fluka
EDTA	Applichem
Ethylamin 2 M in THF	Aldrich
Harnstoff	Sigma
HCl	AVS Titrimorm
HEPES	Roth
Isobutanol	Fluka
Kanamycin	Aldrich
KCl	Applichem
KOAc	Riedel de Haen
KSCN	Sigma
Lysin	Sigma
Lysinamid	Sigma
Lysin-Methylester	Bachem
Lys(Cbz)OtBu	Bachem
Methylamin 8 M in EtOH	Fluka
MgCl ₂	Applichem
MnCl ₂	Aldrich
Molybdätrophosphorsäure	Aldrich
NaCitrat	Fluka
NaCl	Applichem
NaHCO ₃	Grüssing
NaOH	Applichem
Natriumsulfat	Applichem
NH ₄ OAc	Grüssing

NHS	Aldrich
Ninhydrin	Sigma
NMM	Aldrich
Nonafluorpentansäure	ABCR
n-Propanol	Grüssing
Pd/C	Acros
Rifampicin	Sigma
sek-Butanol	Sigma
TEMED	Roth
TFA	Sigma
Thioanisol	Aldrich
Triethylamin	ABCR
Tris-Base	Roth
Xylencyanol	Aldrich

Aus der vorliegenden Arbeit sind die folgenden wissenschaftlichen Beiträge entstanden:

- **Publikation**

Direct structural analysis of modified RNA by fluorescent in-line probing, B. Strauss, A. Nierth, M. Singer, A. Jäschke, *Nucleic Acids Research*, **2011**, doi: 10.1093/nar/gkr733

- **Vortrag**

Photoaffinity Probes – New Tools for Chemical RNomics, 4th Nucleic Acid Chemical Biology PhD Summer School, Odense, Dänemark, 21. - 25. Juni **2009**

- **Poster-Präsentationen**

- *Library synthesis of Photoaffinity Probes – New Tools for Chemical RNomics*, A. Samanta & B. Strauss (equal contribution), V. Darnedde, M.-L. Winz, A. Jäschke, EMBL Conference on Chemical Biology, 8. - 11. Oktober **2008**
- *Photoaffinity Probes – New Tools for Chemical RNomics*, B. Strauss, V. Darnedde, A. Samanta, A. Jäschke, 4th Nucleic Acid Chemical Biology PhD Summer School, Odense, Dänemark, 21. - 25. Juni **2009**
- *Synthesis of a Chemical Probe for Affinity-Based Chemical RNomics & Evaluation of Its Binding Characteristics*, B. Strauss, A. Samanta, A. Jäschke
 - a) 19th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Lyon, Frankreich, 29. August – 3. September **2010**
 - b) 5. Nukleinsäurechemie-Treffen, Frankfurt, 29 – 30. September **2011**

- **Preise**

- EMBL Chemical Biology Poster Award, *Library synthesis of Photoaffinity Probes – New Tools for Chemical RNomics*, A. Samanta & B. Strauss (equal contribution), V. Darnedde, M.-L. Winz, A. Jäschke, EMBL Conference on Chemical Biology, 8. - 11. Oktober **2008**
- Nucleic Acids Research Best Poster Prize, *Synthesis of an Chemical Probe for Affinity-Based Chemical RNomics & Evaluation of Its Binding Characteristics*, B. Strauss, A. Samanta, A. Jäschke, 19th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Lyon, Frankreich, 29. August – 3. September **2010**

Danksagung

Zum Ende dieser Arbeit ist der Punkt gekommen, an dem es gilt, Dank zu sagen:

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Andres Jäschke bedanken, der mir Gelegenheit gegeben hat, vier Jahre an einem spannenden Thema zu arbeiten und mir immer auch die Freiheit gelassen hat, neue Wege zu gehen. Vor allem in den kritischen Phasen dieser Arbeit war ich mir seiner Hilfe bewusst.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Mark Helm, der die Zweitbetreuung dieser Arbeit eigentlich schon früher übernommen hatte, als die offiziellen Dokumente besagen. Ich erinnere einige Gespräche, die mir besonders in den frühen Tagen meiner Promotion hilfreich und anleitend waren.

Meinen Korrekturlesern Andrea Strauß, Sandeep Ameta, Dr. Murat Sünbül, Dr. Alexander Nierth, Juliane Schoch, André Krause, Katharina Höfer, Marie-Luise Winz und Dr. Anna Wiesmayr ist es zu verdanken, dass dieses Werk (hoffentlich) lesbar und fehlerfrei vorliegt. Eure Anmerkungen waren sehr hilfreich.

Bei Sandra Suhm, Heiko Rudy und Tobias Timmermann möchte ich mich für ihre unermüdliche Hilfe im Laboralltag bedanken. Sei es bei der chemischen Synthese, ausgefallenen spektroskopischen Wünschen oder Umorganisationen des Labors, auf diese drei Personen konnte ich mich jederzeit verlassen. Viola Funk und Karin Weiß möchte ich für ihre Hilfe in allen administrativen und bürokratischen Fragen bedanken. Ihr seid im wahrsten Sinne des Wortes die gute Seele dieser Gruppe.

Ein Dank gilt auch meinen ehemaligen Praktikanten, die durch ihre Forschungen meine Arbeit vorangebracht haben: Juliane Schoch, Björn Schmalzbauer, Katharina Höfer und Sara Osman.

Ein besonderer Dank gilt den Menschen, die in meiner Zeit in dieser Gruppe nicht nur Kollegen geblieben sind, sondern zu Freunden wurden. Sandra, Sandeep, Juliane, Katharina, Marco und Alex: ihr alle habt mir durch die schweren Tage in den letzten Jahren geholfen, mich und meine Arbeit in vielen guten persönlichen und wissenschaftlichen Gesprächen vorangebracht und wir haben viel Spaß miteinander gehabt. Ich bin euch sehr dankbar dafür und hoffe, wir verlieren uns nicht ganz aus den Augen.

Schließlich möchte ich aus ganzem Herzen meiner Familie danken: Ihr drei, Andrea, Florian und David, habt großen Anteil daran, dass ich meine Forschungen so machen konnte. Ihr seid mir Stütze und Ausgleich gewesen in dieser Zeit und musstet hin und wieder auch so manches ertragen. Ich weiß, was ich an euch habe und bin glücklich über eine so tolle Frau und so liebenswerte Kinder.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig durchgeführt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Benjamin Strauß

Heidelberg, den 03.11.2011