

FUNKTIONALISIERTE NUKLEINSÄUREN:

**STUDIEN
&
SELEKTION VON RIBOZYMEN**



INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der
Fakultät für Biowissenschaften
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Jörg Christian Schlatterer

aus Stuttgart

Juni 2003

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Fakultät für Biowissenschaften

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Jörg Christian Schlatterer

aus Stuttgart

Tag der mündlichen Prüfung:

31.07.2003

FUNKTIONALISIERTE NUKLEINSÄUREN:

**STUDIEN
&
SELEKTION VON RIBOZYMEN**

Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke
Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. A. Jäschke in der Zeit von Oktober 1999 bis September 2002 am Institut für Biochemie im Fachbereich Chemie der Freien Universität Berlin sowie von Oktober 2002 bis Mai 2003 am Institut für Pharmazie und molekulare Biotechnologie im Fachbereich Biowissenschaften der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg angefertigt.

Hiermit versichere ich Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Jörg Schlatterer

Danksagung

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. Andres Jäschke für die interessante Aufgabenstellung, für die sehr gute Betreuung sowie fruchtbare Diskussionen herzlich danken. In unserer gemeinsamen Zeit in Berlin und Heidelberg konnte ich nicht nur über Wissenschaft sehr viel lernen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. V. A. Erdmann für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin.

Herzlich möchte ich mich bei den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe Andreas Zerressen, Barbara-Sylvia Weigand, Richard Wombacher, Dr. Mark Helm, Sonja Keiper, Dirk Bebenroth, Dr. Fritz Stuhlmann, Dr. Thorsten Ruppert, Dr. Burkhard Seelig, Dr. Felix Hausch und Dr. Christian Frauendorf bedanken. Ohne sie wäre eine angenehme Atmosphäre und ein konstruktives Arbeiten nicht möglich gewesen. Bärbel und Zerri, habt Dank für die netten Stunden innerhalb und außerhalb des Labors!!! Mark und Richard danke ich für so manche wissenschaftliche Diskussion, für die eine oder andere Vorlage beim Kicken und für die lustigen Stunden bei Gitter-Brezen und Radi. Zusammen mit Tango-Fee Sonja und Radler-Dirk sind wir ein tolles Team!

Fritz, vielen Dank für die fruchtbare Zusammenarbeit und interessanten Diskussionen. Fernerhin gilt mein Dank Prof. Dr. Elmar Weinhold sowie Dr. Goran Pljevaljic für die interessante Kooperation. Bedanken möchte ich mich bei meinen studentischen Mitarbeitern Joanna Hermainski und Florian Heyd für ihr Engagement in den jeweiligen Projekten.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. P. Franke für die umfangreichen MALDI-massenspektrometrischen Untersuchungen, Herrn Dr. Schäfer für die NMR-Untersuchungen, Dr. Sven Klußmann (NOXXON) für die Bereitstellung des Spiegelmers, Herrn G. Buchlow sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Erdmann.

Herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meinen Eltern, die mir diesen Werdegang ermöglichten und mir stets hilfreich zur Seite standen; sowie bei Anne, ohne deren steten Rückhalt schwierige Phasen des Doktorandendaseins nicht so leicht zu bewältigen gewesen wären.

Verzeichnis der Abkürzungen und Einheiten

ε	Molarer Extinktionskoeffizient
A	Adenosin
AMP, ATP	Adenosinmonophosphat, -triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	Cytidin
Ci	Curie, 1Ci = 37 MBq
CA	Celluloseacetat
cpm	Zählpulse pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
Demin.	demineralisiert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
GMP, GDP, GTP	Guanosinmonophosphat, -diphosphat, triphosphat
h	Stunde
HEG	Hexaethylglykol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
iBu	Isobutyryl
iPr	Isopropyl
kb	kilobasen
l	Liter
?	Wellenlänge
m	Meter
M	mol/l, molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD ₂₆₀	optische Dichte bei ? = 260 nm
Oligo	Oligonukleotid

p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SELEX	systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
ssDNA/RNA	einzelsträngige DNA/RNA
t	Zeit
T	Thymidin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris Borat EDTA-(Puffer)
TEAAc	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	Transfer-RNA
Ts	Toluolsulfonyl-
U	Units, Uridin
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Präfixe vor Einheiten:

f: Femto (10^{-15}); p: Pico (10^{-12}); n: Nano (10^{-9}); μ : Mikro (10^{-6}); m: Milli (10^{-3})

Inhalt

1	Einleitung	4
1.1	Biokatalyse	5
1.2	<i>In vitro</i> Selektion	8
1.3	Direkte Selektion	9
1.4	Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden	11
1.5	Desoxyribozyme	13
1.6	Immobilisierte Katalysatoren	14
2	Aufgabenstellung	15
3	Methoden	16
3.1	Organische Synthese	16
3.1.1	Darstellung von 2'-O, 3'-O, N ² -Triisobutyrylguanodin-5'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit	16
3.1.2	Synthese des Initiator-(S)-nukleotids	17
3.1.3	Synthese des Initiator-(N)-nukleotids	19
3.2	Oligonukleotide	21
3.2.1	Oligodesoxyribonukleotide	21
3.2.2	Oligoribonukleotide	22
3.3	Aufarbeitung und Charakterisierung von Nukleinsäuren	22
3.3.1	Gelelektrophorese	22
3.3.1.1	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	23
3.3.1.2	Agarosegelelektrophorese	24
3.3.2	Nachweis von Nukleinsäuren	24
3.3.2.1	Autoradiographie	24
3.3.2.2	Färbung mit Ethidiumbromid	24
3.3.2.3	Färbung mit SYBRGold	25
3.3.2.4	UV-Shadowing	25
3.3.3	Elution von Nukleinsäuren aus Gelen	25
3.3.4	Gelfiltration	26
3.3.5	Ethanol-fällung	26
3.3.6	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	27
3.4	Konzentrations- und Mengenbestimmung von Nukleinsäuren	28

3.4.1	Photometrische Messung	28
3.4.2	Cerenkov-Messung.....	28
3.5	Molekularbiologische Methoden.....	29
3.5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
3.5.2	T7-Transkriptionsreaktion	31
3.5.3	Reverse Transkription (RT).....	32
3.5.4	Klonierung.....	33
3.5.5	Sequenzierung.....	34
3.5.6	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden.....	34
3.5.6.1	Kinasierung (5'-Markierung durch Phosphorylierung).....	34
3.5.6.2	Ligation (3'-Markierung)	35
3.5.6.2	Transkription (unspezifische intramolekulare Markierung).....	35
3.5.6.3	Radioaktive PCR	36
3.6	Physikalische Methoden.....	36
3.6.1	Stopped Flow Methode	36
3.6.2	Quenched Flow Methode.....	37
3.7.	Derivatisierungsstudien von terminal funktionalisierten	
Oligoribonukleotiden	37	
3.7.1	5'-thiolmodifizierte Oligonukleotide	37
3.7.2	5'-aminomodifizierte Oligonukleotide	38
3.8	Sequenzspezifische Markierung von Desoxyoligonukleotiden	38
3.9	Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Agarose-Partikeln	39
3.9.1	Immobilisierung.....	39
3.9.2	Substratumsetzung auf derivatisierter Festphase.....	40
3.10	Durchführung der in vitro-Selektion.....	40
3.11	Charakterisierung der selektierten RNAs.....	42
3.11.1	Geschwindigkeitskonstanten für immobilisierte RNA.....	42
3.11.2	Fluoreszenz-Assay	42
4	Ergebnisse und Diskussion	44
4.1	5'-terminale Funktionalisierung von Oligonukleotiden.....	44
4.1.1	Konzept.....	44
4.1.2	Initiator-(S)-nukleotid	46
4.1.2.1	Initiator-(S)-nukleotidsynthese.....	46
4.1.2.2	Initiator-(S)-nukleotideinbau per T7-Transkription	49

4.1.3 Initiator-(N)-nukleotid	51
4.1.3.1 Initiator-(N)-nukleotidsynthese	51
4.1.3.1 Initiator-(N)-nukleotideinbau per T7-Transkription	54
4.1.4 Ausblick	56
4.2 Interne Funktionalisierung von Desoxyoligonukleotiden.....	57
4.2.1 Konzept.....	57
4.2.2 Testsequenzstudien.....	61
4.2.3 Ausblick	65
4.3 Immobilisiertes Diels-Alderase-Ribozym	66
4.3.1 Konzept.....	66
4.3.2 Immobilisierung des Diels-Alderase-Ribozyms.....	68
4.3.3 Untersuchung der immobilisierten Diels-Alderase	69
4.3.4 Ausblick	72
4.4 Selektion schneller Diels-Alderase-Ribozyme.....	74
4.4.1 Selektionsstrategie	74
4.4.2 Durchführung der Selektion	79
4.4.3 Klonierung und Sequenzanalyse	84
4.4.4 Ausblick	89
6 Schlussfolgerung	91
7 Zusammenfassung.....	96
Summary	96
8 Literaturverzeichnis	100
Anhang	104

1 Einleitung

Der Neanderthaler, das intelligente Ergebnis seiner Zeit, ein Vorfahr und Ursprung des heutigen Wissens. Anhand seiner Existenz ist die natürliche Evolution, der Fortschritt, bestens dargestellt. Obwohl er schon vor über 100 000 Jahren lebte, ist jedoch sein Alter im Vergleich zum Datum der geschätzten Erdentstehung (vor 4.5 Milliarden Jahren) gering. Er besaß ein Wissen über Werkzeuge, die er einzusetzen wusste. Er bediente sich grober Steine, großer Stöcke, um sein tägliches Leben zu vereinfachen. Mit der Weiterentwicklung der damaligen Lebensformen, nahm das Wissen und die Fertigkeiten exponentiell zu. Heutzutage sind die Hilfsmittel wesentlich kleiner, mit denen der Fortschritt vorangetrieben werden kann. So klein, dass sie auf molekularer und energetischer Ebene anzusiedeln sind. Das Herabsetzen der aufzubringenden Energie ist Ziel und Merkmal fortschrittlicher Aktionen.

Die molekulare Grundlage allen Fortschritts ist wiederum die Chemie; die Entwicklung effizienter chemischer Synthesen entspricht dem Schlüssel zum Fortschritt. Demzufolge sind Industrie, Pharmaforschung und Medizin an der Bereitstellung hochspezifischer Katalysatoren interessiert, welche die Energie chemischer Reaktion herabsetzen. Es ist essentiell, einen Weg zum Design oder zur Auffindung solcher Katalysatoren aufzuzeigen und Methoden zu entwickeln, die zur Bereitstellung der gewünschten katalytisch aktiven Substanzen führen.

Der Neanderthaler war „Opfer“ der Evolution, der natürlichen Selektion. Wir sind heute in der Lage jenes Selektionsprinzip auf die molekulare Ebene zu übertragen, so dass die Evolution/der Fortschritt künstlich vorangetrieben werden kann.

Die Selektion im Reagenzglas als Werkzeug des heutigen „Neanderthalers“ stellt die große Herausforderung dieser Doktorarbeit dar. Die hier beschriebenen Initiatornukleotide, Grundlagen für eine neu entwickelte Selektionsstrategie, isolierten Biokatalysatoren und Applikations-Verifizierungen sind Ausgangspunkte für weitere wissenschaftliche Projekte.

1.1 Biokatalyse

Enzyme sind Biokatalysatoren, die chemische Reaktionen des Stoffwechsels beschleunigen. Sie sind dabei in hohem Maße substrat- und wirkungsspezifisch. Meist wird als Substrat nur eine Verbindung bzw. ein Verbindungstyp akzeptiert oder nur ein bestimmter Reaktionstyp beschleunigt, wobei die regio-, stereo- und enantioselektive Umsetzung des Substrates besonders charakteristisch ist. Enzyme werden in immer stärkerem Maße zur selektiven Stoffwandlung auch außerhalb des Zellbereichs eingesetzt, um diese hohe Spezifität ebenso in der organischen Synthese nutzen zu können. Jedoch ergibt sich aus genau dieser hohen Spezifität auch das Problem, dass die natürlich vorkommenden Enzyme in der Regel auf ihre biologische Funktion beschränkt sind. Ein gezieltes Design von künstlichen Enzymen ist mit dem heutigen Stand der Technik noch nicht möglich. Die hierzu notwendigen Kenntnisse über das Zusammenwirken von atomarem Aufbau, dreidimensionaler Struktur und katalytischer Aktivität sind heute noch längst nicht ausreichend.

Eine ebenso elegante wie wirkungsvolle Alternative, die dieses Problem umgeht, ist der Ansatz der kombinatorischen Chemie ^[1]. Hier wird eine große Bibliothek von Substanzen teilweise zufällig hergestellt, in der sich potentiell Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften (z.B. Katalyse einer bestimmten Reaktion) befinden. Diese müssen dann noch isoliert und identifiziert werden. Je größer die Vielfalt der synthetisierten Bibliothek ist, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit, dass sie das gesuchte Molekül enthält. Mit steigender Komplexität wird aber auch die Isolierung und Identifizierung immer diffiziler.

Bis zum Anfang der achtziger Jahre war die verbreitete Lehrmeinung, dass die gesamte biologische Katalyse durch Proteine bewerkstelligt wird. Mit der Entdeckung der ersten katalytisch wirksamen Ribonukleinsäure 1982 durch T. R. Cech gesellten sich zu den Proteinenzymen die Ribozyme (aus Ribonukleinsäure und Enzym). Cech und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sich die ribosomale RNA von *Tetrahymena thermophila* autokatalytisch selbst spleißen kann. Dabei schneidet diese RNA in Anwesenheit von Guanosin oder einem Guanosin-Nukleotid (GMP, GDP, GTP) ein sogenanntes Intron aus ihrer eigenen Sequenz heraus und fügt die flankierenden Exons wieder zusammen ^[2, 3]. Kurze Zeit später gelang es S. Altman nachzuweisen, dass die RNA-Komponente der eubakteriellen RNase P in der Lage ist, auch in Abwesenheit der Proteineinheit prä-tRNA zu prozessieren ^[4]. Für ihre grundlegenden Arbeiten auf dem Gebiet der katalytischen RNA wurden S. Altman ^[5] und T. R. Cech ^[6] im Jahre 1989 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Seitdem sind eine

Reihe weiterer natürlicher Ribozyme entdeckt worden, wobei hier nur stellvertretend die Ribozyme Gruppe II-Intron ^[7], Hammerhead ^[8], Hairpin ^[9] und Hepatitis Delta-Virus ^[10] genannt werden sollen.

Diese Erkenntnis, dass RNA nicht nur ihre eigene Bauanleitung in Form der genetischen Information enthält, sondern auch durch ihre Struktur katalytische Funktionen aufweist, leistete einer schon in den 60er Jahren entwickelten Idee weiteren Vorschub: In einer frühen Phase der Entstehung des Lebens soll RNA vor allem durch ihre funktionellen Fähigkeiten dominiert haben. Diese neuen Einsichten führten nun zur Aufstellung der Hypothese der präbiotischen "RNA-Welt" ^[11-13]. In heute existierenden Organismen stellt die RNA vor allem den Übersetzer der genetischen Information aus der DNA in die funktionsausübenden Proteine dar, wie es stark vereinfacht als das *Zentrale Dogma der Molekularbiologie* (siehe Abbildung 1) von Francis Crick beschrieben wurde.

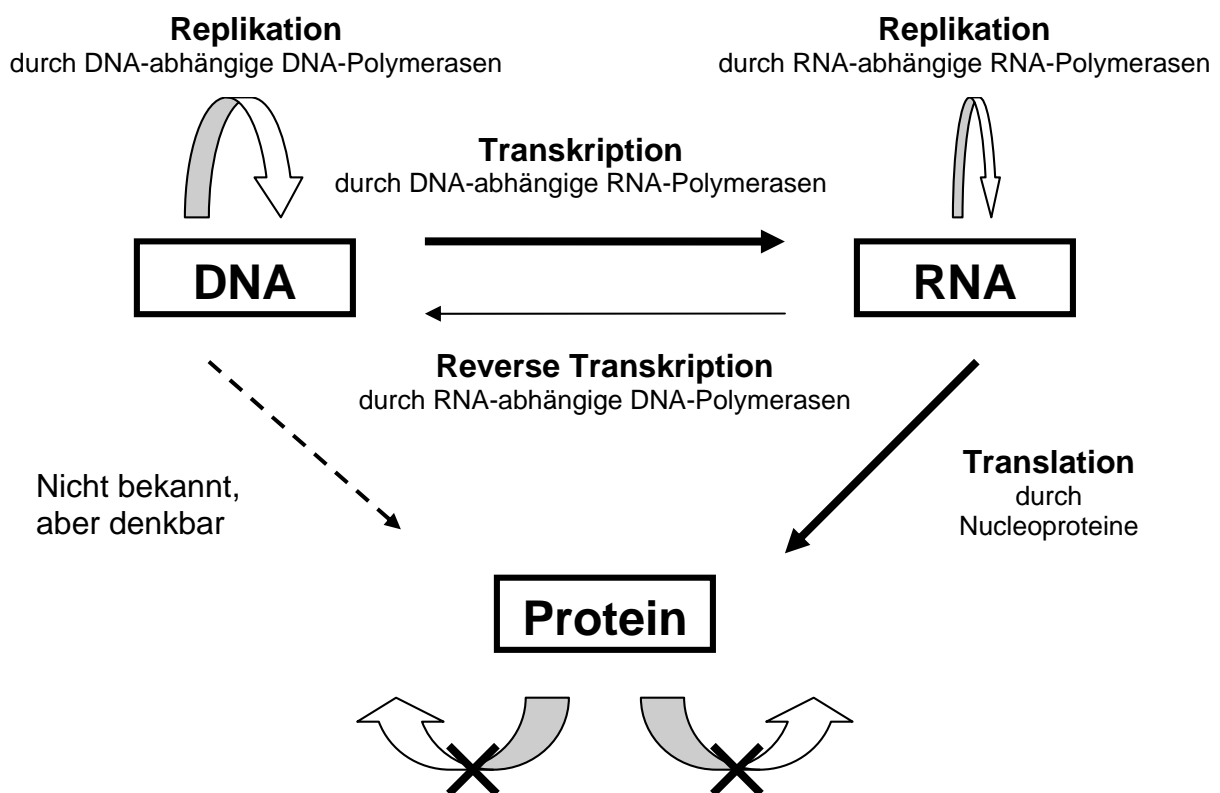


Abbildung 1: Zentrales Dogma der Molekularbiologie

Daraus resultiert jedoch ein Problem bei der Frage zur Entstehung des Lebens: Die genetische Information der DNA ist ohne Proteine nicht replizierbar; die Proteine als Funktionsträger können hingegen ohne genetische Information nicht produziert werden. Dass die Stoffklassen zunächst parallel und unabhängig entstanden sind, erscheint höchst unwahrscheinlich. Was

gab es also zuerst? Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die Imagination der "RNA-Welt" ^[14]. RNA kann Katalysator und gleichzeitig Informationsträger sein. Somit wird ein selbstreplizierendes System denkbar, das ausschließlich aus RNA-Molekülen bestanden haben und so der Vorläufer der heutigen metabolischen Prozesse gewesen sein könnte (siehe Abbildung 2) ^[15].

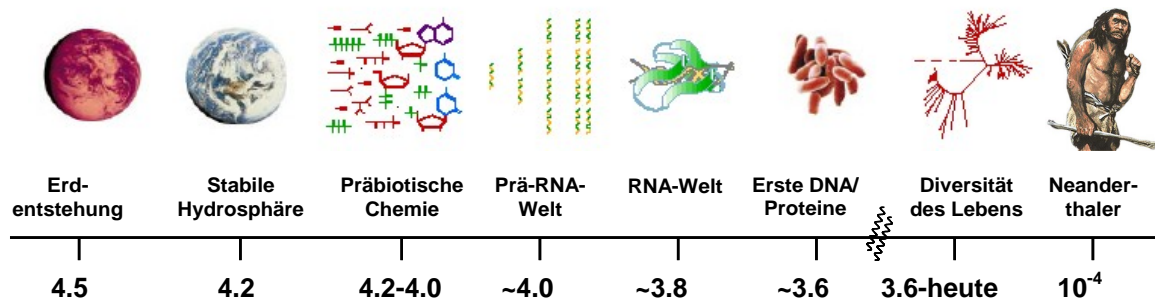


Abbildung 2: Zeitskala zur Erdgeschichte des Lebens, ungefähre Daten in Milliarden Jahren vor der Gegenwart

Dieser Dualismus der RNA von Strukturinformation und Funktion erlaubt schließlich auch die Anwendung des Prinzips der kombinatorischen Chemie bei der Suche nach neuartigen RNA-Enzymen, den Ribozymen. Es lassen sich kombinatorische RNA-Bibliotheken von kaum vorstellbarer Komplexität (bis ca. 10^{16} Moleküle) herstellen, bei denen jedes einzelne Exemplar seinen eigenen Bauplan faktisch mit sich führt. Bestimmte Ribonukleinsäuren können aus diesen Bibliotheken in vitro selektiert werden.

1.2 *In vitro* Selektion

Mit der Entwicklung der kombinatorischen Chemie konnte 1990 zeitgleich von den Arbeitsgruppen Szostak ^[16], Gold ^[17] und Joyce ^[18] gezeigt werden, dass der duale Charakter von Nukleinsäuren genutzt werden kann, um durch künstliche Evolution Oligonukleotide mit neuen Eigenschaften zu generieren, die in der Natur nicht vorkommen.

Dieses ursprünglich zur Selektion spezifischer Liganden (Aptamere) entwickelte Verfahren, auch als SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) bezeichnet ^[17], basiert auf einer systematischen, iterativen Anreicherung von spezifisch bindenden oder katalytisch aktiven Nukleinsäuren, ausgehend von einer kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliothek (Pool). Dabei wird deren dualer Charakter ausgenutzt, um zunächst nach aktiven Molekülen zu selektieren, die anschließend amplifiziert werden können. Diese Möglichkeit zur Vervielfältigung der aktiven Spezies ist der entscheidende Vorteil gegenüber anderen Stoffklassen und Screeningverfahren, der es erlaubt, mehrere Selektions- und Amplifizierungsschritte hintereinander durchzuführen (siehe Abbildung 3) ^[19]:

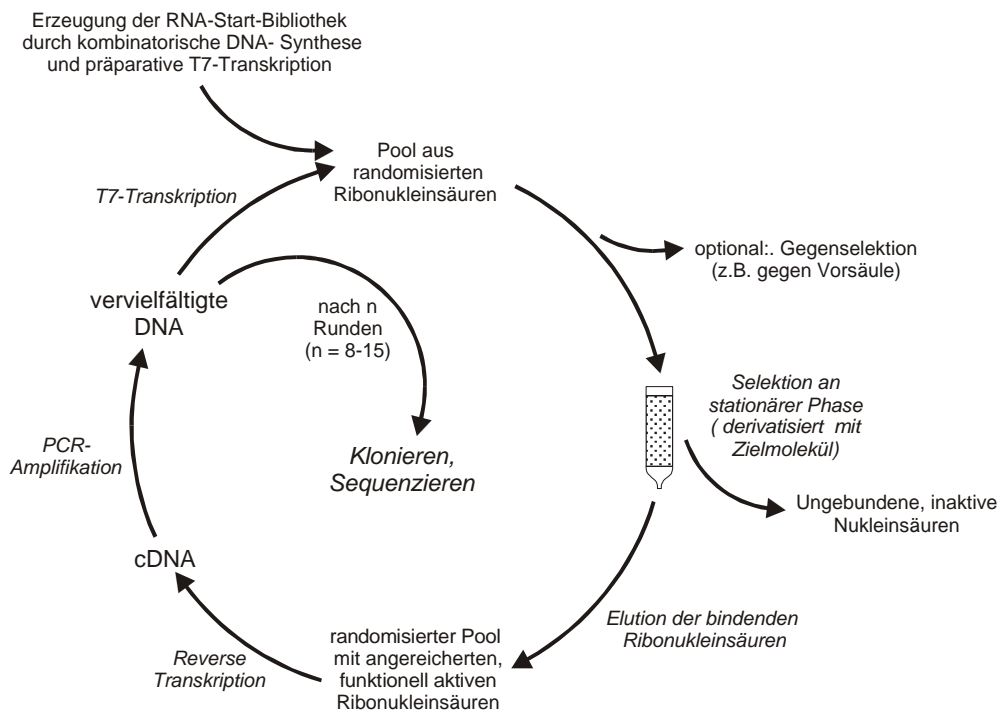


Abbildung 3: Schema zur *in vitro* Selektion von hochaffinen Liganden (Aptamere); T7- und Reverse Transkription sind weitere Schritte, wenn RNA-Bibliotheken untersucht werden.

Zu Beginn eines Selektionsexperimentes wird eine Bibliothek aus DNA-Molekülen, ein sogenannter Pool, erzeugt. Der DNA-Pool wird durch automatische Oligonukleotid-

Festphasensynthese chemisch synthetisiert. Um diese DNA-Matrizen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigen zu können, ist dem randomisierten, dem willkürlichen Bereichen an beiden Enden jeweils ein konstanter Primerbindungsstellen-Bereich von je ca. 20 Nukleotiden angefügt. Die Gesamtausbeute der Oligonukleotidsynthese geht mit steigender Nukleotidanzahl zurück. Heute gebräuchliche Syntheseautomaten erlauben die Synthese von etwa 150 Nukleotide langen Sequenzen mit noch vertretbarer Ausbeute. Daraus ergibt sich die maximale Länge für randomisierte Bereiche der Pools von ungefähr 100 bis 120 Nukleotiden. Möchte man längere Pools zur Selektion einsetzen, kann man das durch Synthese zweier oder mehrerer kürzerer Pools erreichen, die dann durch Ligation verknüpft werden müssen ^[20]. Mit Hilfe der PCR amplifiziert man nicht nur die chemisch synthetisierte DNA, um für die Selektion mehrere Kopien jeder Sequenz einsetzen zu können, sondern man erzeugt auch aus der zunächst einzelsträngigen DNA (ssDNA) die doppelsträngige DNA (dsDNA). Gleichzeitig wird durch Verwendung entsprechender Primer, die über die konstanten Primerbindungsstellen der DNA-Matrizen hinausreichen, die DNA um einen sogenannten Promotorbereich für die Erkennung durch die T7-RNA-Polymerase verlängert. Die doppelsträngige DNA mit T7-Promotor (siehe Abbildung 4) wird dann in der *in vitro* Transkription durch die DNA-abhängige-RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 in einzelsträngige RNA umgeschrieben. Diese RNA bildet den Ausgangspool für das anschließende Selektionsexperiment.

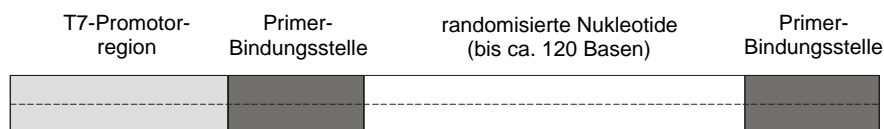


Abbildung 4: Schematische Darstellung der doppelsträngigen DNA-Matrize.

Im eigentlichen Selektionsschritt werden die RNA-Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften von den restlichen abgetrennt und anschließend vervielfältigt. In vielen Fällen lässt sich diese Trennung durch Affinitätschromatographie ^[21] erreichen.

Einen Weg zur Selektion von katalytisch aktiven Nukleinsäuren stellt die direkte Selektion dar.

1.3 Direkte Selektion

Man kann Ribonukleinsäuren direkt nach katalytischer Aktivität selektieren, wenn dabei die Reaktion intramolekular katalysiert wird. Die Nukleinsäure selbst muss dann sowohl

Katalysator als auch Reaktionspartner sein. Das bedeutet, dass der Katalysator durch die Reaktion eine Veränderung erfährt und somit der Katalysatordefinition nicht entspricht. Dadurch wird er von den nicht katalysierenden Nukleinsäuren unterscheidbar und kann selektiert werden. Als Selektionskriterium werden dabei unterschiedliche Eigenschaften herangezogen. Um beispielsweise Ribozyme zu erzeugen, die sich selbst spalten^[22], kann die daraus resultierende veränderte elektrophoretische Mobilität zur Abtrennung von den restlichen inaktiven RNAs genutzt werden. Es gibt weiterhin die Möglichkeit, dass die katalytische RNA durch die Reaktion mit einem Reaktanden X andere selektierbare Funktionen erwirbt. Trägt dieser eine Ankergruppe wie beispielsweise Biotin, so erhält auch das Ribozym nach der Reaktion diese Gruppe. Es kann anschließend durch Affinitätschromatographie, im speziellen Fall mit einer Streptavidin-Festphase, immobilisiert werden. Dem schließt sich eine reverse Transkription und PCR an, bevor ein neuer Selektionszyklus begonnen wird. Eine schematische Darstellung der Strategie ist in Abbildung 5 dargestellt.

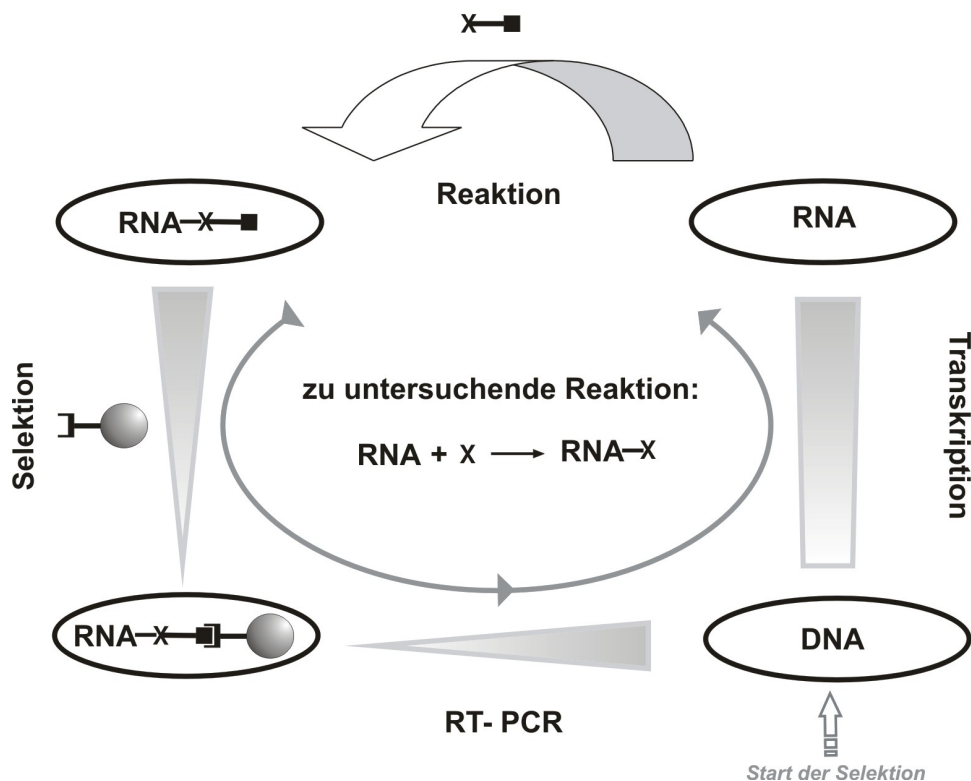


Abbildung 5: Direkte Selektion von selbstmodifizierenden RNAs,

■ Ankergruppe (z.B. Biotin); ■-Kugel Festphase (z.B. Streptavidinagarose)

Auf diese Weise wurden künstliche Ribozyme mit unterschiedlichen Aktivitäten identifiziert. So wurden RNAs beschrieben, die eine Ligation^{[23] [24]}, Alkylierung^[25, 26], einen

Aminoacyltransfer ^[27], eine Polynukleotidphosphorylierung^[28], eine Michael-Reaktion ^[29] oder die Spaltung einer Amidbindung ^[27, 30] katalysieren. In einzelnen Fällen ist es sogar gelungen, das erhaltene selbstmodifizierende Ribozym rational in einen Enzymteil und einen Substratteil zu zerlegen. Dadurch wurden Katalysatoren im eigentlichen Sinne erhalten ^[28, 31]. Mit der Methode der direkten Selektion sind auch Optimierungen bzw. Mutationsstudien mit natürlichen Ribozymen durchgeführt worden, indem der zur Selektion eingesetzte Pool aus Varianten dieser Ribozyme bestand (Hammerhead ^[32], Hairpin ^[33]).

Neben Ribozymen sind auch DNA-Enzyme analog zugänglich. Das erste Desoxyribozym wurde 1994 selektiert ^[34]. Natürlich vorkommende DNA-Enzyme sind hingegen nicht bekannt.

Von ihrem Selektionssystem her sind alle oben beschriebenen Ribozyme jedoch auf reine Selbstmodifizierungsreaktionen beschränkt. Einer der beiden Reaktionspartner ist dabei immer die RNA selbst. Die Selektion basiert auf zwei völlig unterschiedlichen Kriterien. Die RNA muss nämlich nicht nur ein guter Katalysator sein, sondern auch ein geeignetes Substrat darstellen. Ausgezeichnete Katalysatoren, die aber nur schlecht als Substrat geeignet sind, können sich in der Selektion nicht durchsetzen. Die Strategie ist auf Reaktionen zwischen zwei nicht-RNA-Molekülen nicht anwendbar.

1.4 Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden

Um die direkte Selektion auf beliebige bimolekulare Reaktionen zwischen zwei Molekülen zu erweitern und dabei die bestehenden Limitationen zu umgehen, wurde in der Arbeitsgruppe Jäschke das Prinzip für eine direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden entwickelt ^[35]. Für eine Reaktion $A + B \longrightarrow C$ wird das Problem zunächst wieder auf eine intramolekulare Katalyse zurückgeführt. Der Reaktand A wird kovalent über einen langen flexiblen Linker an die RNA gekoppelt (siehe Abbildung 6). Der zweite Reaktand B trägt eine Ankergruppe, beispielsweise Biotin. Diejenigen RNA-Moleküle, welche die Reaktion zwischen A und B katalysieren, erwerben damit automatisch diese Ankergruppe und können isoliert werden. Vor einer erneuten Selektionsrunde muss jedoch der Reaktand A mit dem Linker wieder neu an die RNA geknüpft werden.

Diese Strategie wurde kürzlich erfolgreich zur Selektion von RNA-Molekülen eingesetzt, die Diels-Alder-Reaktionen katalysieren. Seelig und Jäschke identifizierten aus einer RNA-Bibliothek Moleküle, die die Knüpfung von C-C-Bindungen zwischen linkergekoppeltem Anthracen und biotinyliertem Maleimid bis zu 20.000fach beschleunigen ^[31]. Auf sehr

ähnliche Weise isolierten Eaton und Mitarbeiter C-C- und C-N-bindungsknüpfende Ribozyme [30, 36].

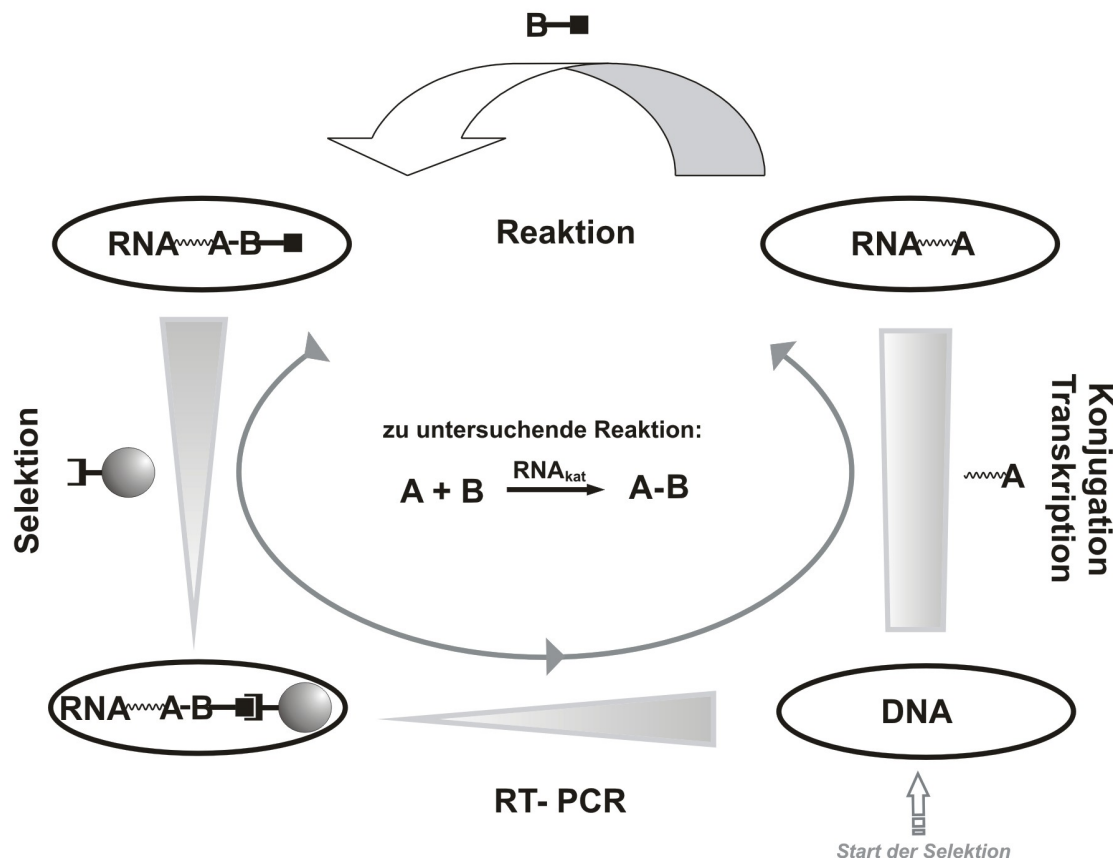


Abbildung 6: Direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden,

—■ Ankergruppe (z.B. Biotin); —● Festphase (z.B. Streptavidinagarose);
 ~A Linkergekoppelter Reaktand

Der entscheidende Schritt dieser Methode ist die Verwendung des Linkers. Durch ihn werden Katalysator und Substrat, das nun auch ein RNA-fremdes Molekül sein kann, räumlich voneinander getrennt. Die RNA muss keine günstigen Substrateigenschaften mehr besitzen. Durch den Linker bleiben Katalysator und Substrat trotzdem noch verbunden, so dass man die katalytische RNA selektieren kann.

Der Linker sollte dabei sehr flexibel sein, damit sich die RNA möglichst frei zu den beiden Reaktanden positionieren kann. Er sollte keine übergeordneten Strukturen ausbilden und sich damit nicht spezifisch am dreidimensionalen Aufbau der RNA beteiligen. Seine chemische Natur sollte möglichst inert sein, so dass er sich weitgehend nicht an der chemischen Reaktion beteiligen kann. Aufgrund der hohen Flexibilität, der chemischen Beständigkeit und der sehr guten Löslichkeit in wässrigen Medien eignet sich Polyethylenglykol als Linker [37, 38]. Es ist

über ein großes Spektrum von Polymerisationsgraden verfügbar, womit sich eine nahezu beliebige Länge des Linkers einsetzen lässt.

Um eine Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden durchführen zu können, sind Methoden für ihre Einführung in enzymatisch synthetisierte, kombinatorische RNA-Bibliotheken notwendig. Hierfür kommen hauptsächlich zwei, vielfach erprobte, enzymatische Verfahren in Betracht:

- Transkription einer DNA-Matrize mit anschließender 3'-terminaler Modifizierung durch Einfügen eines linkergekoppelten Reaktanden durch T4-RNA-Ligase ^[39-41]
- 5'-terminale Modifikation der RNA durch Einbau eines Initiator nukleotids durch T7-RNA-Polymerase während der Transkription ^[42-44]

Das zweitgenannte enzymatische Verfahren bietet gegenüber dem ersten den Vorteil, daß es innerhalb nur eines experimentellen Schrittes möglich ist, ein RNA-Konjugat herzustellen.

So konnte beispielweise durch Arbeiten von Seelig und Jäschke gezeigt werden, daß es auf diesem „einfachen“ Wege möglich ist, Anthracen-PEG-pG 5'-terminal durch T7-RNA-Polymerase an ein Oligonukleotid zu koppeln ^[43, 44].

1.5 Desoxyribozyme

Nicht nur RNA-Bibliotheken können auf potentielle Katalysatoren hin untersucht werden, sondern auch Bibliotheken, die auf Desoxy-RNA-Molekülen basieren.

DNA ist neben der Speicherung von Information prinzipiell zur Ausbildung von katalytisch aktiven Strukturen fähig ^[45]. Während jedoch etliche natürliche Ribozyme aus Organismen isoliert werden konnten, die dort essentielle, katalytische Funktionen erfüllen, ist bisher kein Fall eines biologischen Desoxyribozyms bekannt ^[46, 47]. Es wird diskutiert, dass die Ursache hierfür in der fehlenden 2'-OH Gruppe liegt, in der sich DNA und RNA unterscheiden ^[48]. Diese soll sowohl für die größere strukturelle Vielfalt von RNA verantwortlich sein, als auch durch die zusätzliche chemische Funktionalität direkt an katalytischen Prozessen beteiligt sein. Für DNAs sind ungewöhnliche Struktur motive wie Haarnadelschleifen, Pseudoknoten, Guaninquartette, DNA-Kreuzungen, Z-DNA, P-DNA und Tripelhelices bekannt ^[49], die z.T. wichtige biologische Funktionen wie bei den Telomeren ^[50] oder in der genetischen Rekombination haben.

Dass auch DNA in der Tat katalytisch aktiv sein kann, wurde erst durch *in vitro* Selektionsexperimente erfolgreich gezeigt ^[51]. So wurden neben verschiedensten hochaffinen DNA-Aptameren ^[52] Desoxyribozyme für DNA-Ligation ^[53], DNA-Phosphorylierung ^[47]

sowie für DNA-^[54] und RNA-Spaltung^[34, 55] beschrieben. Technisch unterscheiden sich die Selektionen von DNA und RNA dadurch, dass die gesuchten DNA-Sequenzen theoretisch direkt mit PCR amplifiziert werden können und deshalb keine T7- oder reverse Transkription nötig ist. Auch bei DNA bleibt die direkte Selektion jedoch auf die Selbstmodifikation beschränkt.

Wegen der erhöhten chemischen und biologischen Stabilität ist die Verwendung von DNA gegenüber RNA-Molekülen von Vorteil, zumal der synthetische Aufwand zur Herstellung deutlich geringer ist. Es gibt daher ein wirtschaftliches Interesse, inwieweit die katalytischen Fähigkeiten von Ribonukleinsäuren auf DNA übertragen werden können.

1.6 Immobilisierte Katalysatoren

Schon in den 50er Jahren wurden Protein-Enzyme an festen Phasen oder in polymerer Matrix immobilisiert^[56-58].

Der Vorteil fixierter Katalysatoren liegt auf der Hand. Zum einen können sie auf einfache Art und Weise von den Substraten und Reaktionsprodukten getrennt werden, zum anderen führt ihre Wiederverwendbarkeit zu Kostenvorteilen. Somit ist eine praktikable Handhabung und ein wirtschaftliches Arbeiten ohne hohen Verbrauch an Enzym gewährleistet^[59]. Aktivitätsverlust der Biokatalysatoren und veränderte kinetische Eigenschaften der Reaktion können durch unterschiedliche feste Phasen auftreten und müssen je nach Katalysator optimiert werden.

In den letzten Jahren wurden andere katalytisch aktive Biopolymere wie Oligonukleotide ebenfalls an festen Phasen immobilisiert^[60]. Das hierdurch geschaffene Potential, Reaktoren auf Nukleinsäurebasis zu generieren, und die generelle Option von immobilisierten, maßgeschneiderte Ribozymen, lässt zahlreiche Anwendungen möglich erscheinen.

2 Aufgabenstellung

Diese Arbeit hat die Weiterentwicklung von Selektionstechniken zur Generierung von katalytisch aktiven Nukleinsäuren sowie deren Einsatz in der organisch-chemischen Synthese zum Gegenstand.

Die *in vitro* Selektion ist ein effektives Werkzeug, um maßgeschneiderte Biokatalysatoren auf Nukleinsäurebasis zu erhalten. Für den Einsatz dieser Werkzeuge ist es notwendig, eine Funktionalisierung von Oligonukleotiden gezielt und reproduzierbar durchzuführen. Zum einen ermöglicht das Einfügen linkergekoppelter Reaktanden die Selektion neuer Biokatalysatoren, die eine Reaktion zwischen der eingefügten, funktionellen Gruppe und einem freien Reaktanden beschleunigen; zum anderen können über die Funktionalisierung auf chemischem Wege potentielle Cofaktoren oder Effektoren eingeführt werden, die die chemische Umsetzung begünstigen.

Die erste Aufgabe dieser Arbeit ist die Entwicklung und Evaluierung neuer enzymatischer Methoden zur Einführung funktioneller Gruppen an terminalen und internen Positionen von Nukleinsäuren.

Hierzu sollte einerseits ein Konzept entwickelt werden, mit dessen Hilfe auf einfache Art und Weise Funktionalitäten an das Ende von Ribonukleinsäuren angefügt werden können. Andererseits sollte evaluiert werden, ob sich die sequenzspezifische Erkennung von Nukleinsäure-Molekülen durch Enzyme des Restriktions-/Methylierungssystems zur gezielten Funktionalisierung interner Positionen einsetzen lässt. Beide Systeme mussten auf ihre Einsetzbarkeit in Selektionsexperimenten hin untersucht werden.

Die praktische Verwendung von Ribozymen als interessante Kandidaten für maßgeschneiderte Enzyme in der organischen Chemie hängt von ihren Produktionskosten, ihrer Stabilität, katalytischen Effizienz und Selektivität ab. Der zweite Teil dieser Arbeit richtet sich an die Entwicklung einer methodischen Plattform zum Einsatz von Ribozymen in der Wirkstoff-Synthese. Einerseits sollte getestet werden, ob die Immobilisierung von Ribozymen an einer festen Phase zu einem aktiven, selektiven und stabilen Katalysatorsystem führt, andererseits sollte eine Strategie zur Selektion besonders schneller Ribozyme entwickelt werden. Hierzu diente als Modellsystem die in unserer Arbeitsgruppe entdeckte RNA-katalysierte Diels-Alder Reaktion.

3 Methoden

3.1 Organische Synthese

3.1.1 Darstellung von 2'-O, 3'-O, N²-Triisobutyrylguanosin-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit

2'-O, 3'-O, N²-Triisobutyrylguanosin **3**

5'-Dimethoxytrityl-N²-isobutyrylguanosin (2.18 g, 3.3 mmol) wurde zu einer Lösung von Isobuttersäureanhydrid (5.54 ml, 33 mmol) in Pyridin (30 ml) gegeben und 20 h gerührt. Pyridin wurde anschließend abdestilliert. Der verbleibende Rückstand wurde in Wasser gelöst (30 ml) und mit Dichlormethan (50 ml) extrahiert. Nach Ausschütteln mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, gesättigter NaCl-Lösung und Wasser wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Das erhaltene Produkt wurde durch Kieselgel-Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH/Triethylamin 96:4:0.25 v/v) gereinigt. Die gesammelten Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, in Hexan umkristallisiert und mit Trichloressigsäure (3%) in Dichlormethan für 2 Minuten entschützt. Die Lösung wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, gesättigter NaCl-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde eingengt und durch Kieselgel-Säulenchromatographie (CH₂Cl₂:MeOH; 9:1) gereinigt. Es wurden 800 mg (49 %) an 2'-O, 3'-O, N²-Triisobutyrylguanosin **3** erhalten.

M (C₂₂H₃₁O₈N₅) = 493.5 g/mol

R_f = 0.51 (CH₂Cl₂:MeOH; 9:1)

¹H-NMR (CHCl₃) δ = 1.0-1.23 (m, 18 H; 6x CH₃-Ibu), 2.4, 2.6 (2x septett, 2x 1H; CH-2',3'-Ibu), 2.78 (septett, 1H; CH-N²-Ibu), 3.74 (dd, 1H; H-5'), 3.92 (dd, 1H; H-5'), 4.2 (q, 1H; H-4'), 5.63 (dd, 1H; H-3'); 5.86 (d, 1H; H-1'), 5.91 (t, 1H; H-2'), 7.8 (s, 1H; H-8)

¹³C-NMR (CHCl₃): δ = 18.5, 33.5, 33.7, 36.1, 61.7, 71.1, 72.3, 84.4, 87.4, 122.1, 138.9, 147.6, 148, 155.3, 175.3, 175.8, 179.4; ESI⁺-MS: berechnet für C₂₂H₃₁O₈N₅ [M⁺] = 493, gemessen 493.

2'-O, 3'-O, N²-Triisobutyrylguanosin-5'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit 4

Der verwendete Rundkolben wurde mit Stopfen und Magnetrührer im Trockenschrank getrocknet und im Exsikkator abgekühlt. 2'-O, 3'-O, N²-Triisobutyrylguanosin 3 (404 mg, 0.82 mmol) wurde im Vakuum über Nacht über P₄O₁₀ getrocknet und danach in Dichlormethan (4 ml, unmittelbar vor dem Gebrauch am Rückfluß über CaH₂ gekocht und anschließend unter Lichtausschluß destilliert) unter Argonschutz gelöst. N,N-Diisopropylethylamin (1.2 ml, 6.9 mmol) wurde zugesetzt und anschließend Phosphorigsäure(2-cyanethylester)diisopropylamid-chlorid (274 µl, 1.23 mmol) zugetropft. Die Lösung wurde weitere 30 Minuten unter Lichtausschluss gerührt. 100 µl wasserfreies Methanol wurde hinzugegeben und die Lösung wurde mit CH₂Cl₂ auf 25 ml verdünnt. Nach Ausschütteln mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und mit Wasser wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Das erhaltene Phosphoramidit 4 wurde ohne weitere Aufreinigung für die anschließenden Reaktionen eingesetzt.

Die dünnschichtchromatographische Analyse in CHCl₂:MeOH:TEA (90:10:0.25) ergab eine Produktfraktion (R_f = 0.72) und eine schwache Bande des Ausgangsmaterials (R_f = 0.6), was auf eine fast vollständige Umsetzung schließen ließ.

M (C₃₁H₅₀N₇O₉P) = 695.75 g/mol

R_f = 0.72 (CH₂Cl₂:MeOH:TEA; 90:10:0.25)

3.1.2 Synthese des Initiator-(S)-nukleotids

Bromohexaethylenglykol 6

2-[2-[2-[2-[2-(2-Bromoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol

In einem ausgeheizten und mit Argon gespülten Kolben wurden 2.96 ml (11.6 mmol) Hexaethylenglykol (HEG) in 30 ml trockenem Toluol gelöst und mit 0.97 ml Triethylamin (TEA) versetzt.

Eine Lösung aus 0.45 ml (5.8 mmol) Thionylbromid in 1.7 ml Toluol wurde tropfenweise über 1 h zum Ansatz hinzugegeben. Nach einstündigem Sieden rührte der Ansatz 45 h bei Raumtemperatur.

Der entstandene Niederschlag wurde über Celite 545 (h = 1 cm) filtriert, das Filtrat mit 5 g Aktivkohle auf 50°C temperiert und dann wiederum über Celite 545 (h = 1 cm) filtriert. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und

anschließend das Produkt per Kieselgel-Säulenchromatographie (MeOH:CH₂Cl₂, 1:9) gereinigt.

Die Ausbeute an gelblichem 2-[2-[2-[2-[2-(2-Bromoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol **6** betrug 1.22 g (30%).

$M(C_{12}H_{25}O_6Br) = 345.23$ g/mol

$R_f = 0,46$ (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:9)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 3.4$ (t, 2H, CH₂-Br), 3.55-3.8 (m, 22H, CH₂-O)

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 31.0, 62.3, 69.9, 70.9, 72.8, 74.0$

MS [(+) FAB]: berechnet für C₁₂H₂₈O₆Br [M+H]⁺ = 345.23, gemessen 345

Trylmercaptohexaethylenglykol **8**

2-[2-[2-[2-[2-(2-Trylmercaptoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol

0.5 g (1.45 mmol) 2-[2-[2-[2-(2-Bromoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol wurden in 12ml Ethanol gelöst, mit 0.146ml NaOH (10M), 0.4 g (1.45 mmol) Triphenylmethanthiol versetzt und 15 h gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion wurde der Ansatz auf einem Eis/Wasserbad gekühlt, über Celite 545 filtriert und das Filtrat bis zur Trockene eingengt.

Das Produkt wurde per Kieselgel-Säulenchromatographie (MeOH:CH₂Cl₂, 1:9) gereinigt. Die Ausbeute an gelbem 2-[2-[2-[2-(2-Trylmercaptoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol **8** betrug 0.73 g (93%).

$M(C_{31}H_{40}O_6S) = 540.73$ g/mol

$R_f = 0,7$ (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:9)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 3.4$ (t, 2H, CH₂-S), 3.45-3.7 (m, 22H, CH₂-O), 7.1-7.4 (m, 15H, Ar-H)

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 31.0, 61.2, 68.3, 70.5, 73.1, 126.0, 128.1, 129.0, 144.0$

MS [(+) FAB]: berechnet für C₃₁H₄₀O₆S [M+H]⁺ = 540.71, gemessen 540

Trylgeschütztes Initiator-(S)-nukleotid **11**

Die verwendeten Geräte wurden wie bereits für Phosphoramidit **4** beschrieben getrocknet.

Trylmercaptohexaethylenglykol **8** (0.64 g, 1.18 mmol) und 0.69 Äquivalente des 2'-O, 3'-O, N²-Triisobutyrylguanosin-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidites **4** (0.82 mmol) wurden zweimal aus Pyridin codestilliert und im Vakuum über Nacht über P₄O₁₀ getrocknet. Die beiden Komponenten wurden in wasserfreiem Acetonitril (10 ml) gelöst. Dazu wurde unter Argon eine Lösung von Tetrazol in Acetonitril (8.5 ml/ 0.47 M, 4 mmol) hinzugegeben.

Nach 15 minütigem Rühren wurde mit einer Jodlösung (12 ml / 0.1 M in Tetrahydrofuran/Collidin/Wasser 2:2:1, 1.2 mmol) oxidiert. Nach 5 min wurde die Reaktionsmischung mit einer wässrigen Lösung von Natriumthiosulfat (1 M) solange versetzt, bis die braune Farbe des Jods verschwunden war. Das Produkt wurde mit Dichlormethan (70 ml) verdünnt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und das Produkt **11** durch Kieselgel-Säulenchromatographie (CH₂Cl₂:MeOH; 95:5; R_f = 0.21) gereinigt, anschließend ammoniakalisch (33% Ammoniak-Lösung) bei 55°C über Nacht entschützt und letztlich mittels HPLC gereinigt (Methode JS). Das Produkt wurde bei 26.5 Minuten aufgefangen und am Lyophilisator zur Trockene eingengt.

M (C₄₁H₅₂N₅O₁₃PS) = 885.92 g/mol

MALDI⁺-MS: berechnet für C₄₁H₅₂N₅O₁₃PS [MH⁺] = 885.9, gemessen 885.85

UV (H₂O): λ_{max} = 205, 253, 277 nm (Schulter)

Initiator-(S)-nukleotid

100 µl wässriger geschützter Initiator-(S)-Lösung (117 mM, 11.7 µmol) wurden mit 25 µl einer 1 M AgNO₃-Lösung versetzt. Nach 1h Inkubation bei RT und Schütteln bei 1000 rpm wurden 50 µl einer 0.5 M DTT-Lösung hinzugegeben, zentrifugiert und das Zentrifugat mit 500 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Mittels HPLC-Aufreinigung (Methode QJ) wurde das Produkt bei 11.9 Minuten isoliert und anschließend am Lyophilisator zur Trockne eingengt.

M (C₂₂H₃₈N₅O₁₃PS) = 643.60 g/mol

MALDI⁺-MS: berechnet für C₂₂H₃₈N₅O₁₃PS [MH⁺] = 643.2, gemessen 644

3.1.3 Synthese des Initiator-(N)-nukleotids

Bromohexaethylenglykol **6**

2-[2-[2-[2-[2-(2-Bromoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol

In einem ausgeheizten und mit Argon gespülten Kolben wurden 2.96 ml (11.6 mmol) Hexaethylenglykol (HEG) in 30 ml trockenem Toluol gelöst und mit 0.98 ml Triethylamin (TEA) versetzt.

Eine Lösung aus 0.45 ml (5.8mmol) Thionylbromid in 1.7 ml Toluol wurde tropfenweise über 1 h zum Ansatz hinzugegeben. Nach einstündigem Sieden rührte der Ansatz 45 h bei Raumtemperatur.

Der entstandene Niederschlag wurde über Celite 545 (h = 1cm) filtriert, das Filtrat mit 5 g Aktivkohle auf 50°C temperiert und dann wiederum über Celite 545 (h = 1 cm) filtriert. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und anschließend das Produkt per Kieselgel-Säulenchromatographie (MeOH:CH₂Cl₂, 1:9) gereinigt.

Die Ausbeute an gelblichem 2-[2-[2-[2-[2-(2-Bromoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol **6** betrug 1.22 g (30%).

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{Br}) = 345.23 \text{ g/mol}$

$R_f = 0,46$ (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:9)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 3.4$ (t, 2H, CH₂-Br), 3.55-3.8 (m, 22H, CH₂-O)

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 31.0, 62.3, 69.9, 70.9, 72.8, 74.0$

MS [(+) FAB]: berechnet für C₁₂H₂₈O₆Br [M+H]⁺ = 345.23, gemessen 345

Phthalimidohexaethylenglykol

2-[2-[2-[2-[2-(2-N-Phthalimidoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol

In einem ausgeheizten und mit Argon gespülten Kolben wurden 1.22 g (3.53 mmol) 2-[2-[2-[2-[2-(2-Bromoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol **6** in 22 ml DMF (abs.) gelöst und mit 0.82 g Phthalimid-Kalium versetzt. Nach 28-stündigem Erhitzen auf 100°C kühlte der Ansatz langsam ab, wurde dann mit 30 ml CH₂Cl₂ verdünnt und je einmal mit 30 ml demin. Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Das anschließende Trocknen der organischen Phase erfolgte mit Na₂SO₄. Der Ansatz wurde bis zur Trockene eingengt und das Produkt per Kieselgel-Säulenchromatographie (MeOH:CH₂Cl₂, 1:9) gereinigt. Die Ausbeute an leicht gelblichem 2-[2-[2-[2-[2-(2-N-Phthalimidoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol **14** betrug 1.08 g (75%).

$M(\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_8\text{N}) = 411.46 \text{ g/mol}$

$R_f = 0,42$ (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:9)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 3.45-3.75$ (m, 22H, CH₂-O), 3.85 (t, 2H, CH₂-N), 7.65 (t, 2H, Ar-H), 7.75 (d, 2H, Ar-H)

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 38.5, 61.0, 68.1, 70.9, 73.1, 124.0, 132.0$

MS [(+) FAB]: berechnet für C₂₀H₂₉O₈N [M+H]⁺ = 411.45, gemessen 412

Initiator-(N)-nukleotid

Die verwendeten Geräte wurden wieder wie für Phosphoramidit **4** beschrieben getrocknet.

Phthalimidohexaethylenglykol **14** (0.3 g, 0.73 mmol) und 0.69 Äquivalente des 2'-O, 3'-O, N²-Triisobutyrylguanosin-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidits **4** (0.44 mmol) wurden zweimal aus Pyridin codestilliert und im Vakuum über Nacht über P₄O₁₀ getrocknet. Die beiden Komponenten wurden in wasserfreiem Acetonitril (10 ml) gelöst. Dazu wurde unter Argon eine Lösung von Tetrazol in Acetonitril (9 ml/ 0.47 M, 4 mmol) hinzugegeben. Nach 15 minütigem Rühren wurde mit einer Jodlösung (8 ml / 0.1 M in Tetrahydrofuran/Collidin/Wasser 2:2:1, 0.8 mmol) oxidiert. Nach 5 min wurde die Reaktionsmischung mit einer wässrigen Lösung von Natriumthiosulfat (1 M) solange versetzt, bis die braune Farbe des Jods verschwunden war. Das Produkt wurde mit Dichlormethan (50 ml) verdünnt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und das Produkt **17** durch Kieselgel-Säulenchromatographie (CH₂Cl₂:MeOH; 95:5; R_f = 0.12) gereinigt, anschließend ammoniakalisch (33% Ammoniak-Lösung) bei 55°C über Nacht entschützt und letztlich mittels HPLC gereinigt (Methode JS). Das Produkt wurde bei 6.8 Minuten aufgefangen und am Lyophylisator zur Trockene eingengt.

M (C₂₂H₃₉N₆O₁₃P) = 626,55 g/mol

MALDI⁺-MS: berechnet für C₂₂H₃₉N₆O₁₃P [MH⁺] = 626,5, gemessen 627

3.2 Oligonukleotide

3.2.1 Oligodesoxyribonukleotide

5'-terminale Funktionalisierungsstudien (Initiatornukleotideinbau)

B25S (sense) 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC TCA GCC TAC GAG
CCT GAG CC-3'

B25A (antisense) 5'-GGC TCA GGC TCG TAG GCT GAG CTC CTA TAG TGA GTC
GTA T TA GA-3'

B10S (sense) 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC TCA GC-3'

B10A (antisense) 5'-GCT GAG CTC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA-3'

Interne, sequenzspezifische Funktionalisierungsstudien

Primer WA 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGA C-3'

Primer WB 5'-GGC GGT CGG ATC CAC AC-3'

Primer WB3'r	5'-GGC GGT CGG ATC CAC ArC-3'
JSQ	5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGA CCG TCG ACG GTG TGG ATC CGA CCG CC-3'
JSN	5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGA CCG TAG CCG GTG TGG ATC CGA CCG CC-3'

Selektion von schnellen Diels-Alderase-Ribozymen

Primer A	5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC TCA GCC TTC ACT GC-3'
Primer B	5'-GTG GAT CCG ACC GTG GTG CC-3'
DNA-Bibliothek	5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC TCA GCC TTC ACT GC – N ₁₂₀ – GGC ACC ACG GTC GGA TCC AC-3'

3.2.2 Oligoribonukleotide

Immobilisierungsstudien

49mer D-RNA	5'-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GCC GUG CCA GCU CUU CGG AGC AAU ACU CGG C-3'
49mer L-RNA	5'-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GCC GUG CCA GCU CUU CGG AGC AAU ACU CGG C-3'

3.3 Aufarbeitung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

3.3.1 Gelelektrophorese

Ein Molekül mit einer Nettoladung wandert im elektrischen Feld. Die auf dieser Tatsache beruhende Gelelektrophorese ist eine effiziente Methode zur Trennung von Proteingemischen oder Nukleinsäuren. Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Moleküle hängt dabei von ihrer Ladung, ihrer Beweglichkeit im umgebenden Medium und von der angelegten elektrischen Feldstärke ab. Elektrophoretische Trennungen werden meist nicht in freier Lösung, sondern in restriktiven Medien (z.B. in Gelen) durchgeführt. Zum einen verhindern Gele Konvektionsströme, die durch kleine Temperaturgradienten verursacht werden. Zum anderen tritt je nach Wahl der Porengröße des Gels ein weiterer Trenneffekt nach Größe der wandernden Moleküle auf. Jene, die kleiner als die Poren sind, wandern sehr schnell. Solche,

die deutlich größer sind als die Poren, sind praktisch unbeweglich. Dazwischen gibt es jede Abstufung. Zur elektrophoretischen Trennung werden häufig Polyacrylamidgele eingesetzt, da sie chemisch inert sind und sich leicht durch Polymerisation aus dem Monomer Acrylamid herstellen lassen. Außerdem lässt sich die Porengröße durch unterschiedliche Konzentrationen an Acrylamid und Quervernetzer Methylenbisacrylamid einstellen. Durch Zusatz von denaturierenden Agentien und damit verbundener Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur lässt sich die Gelelektrophorese auch zur Trennung vornehmlich nach der Kettenlänge der Nukleinsäuren einsetzen. Für die Trennung größerer Nukleinsäuren wird eher Agarose als Gelmatrix eingesetzt.

3.3.1.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Das Monomer Acrylamid wurde zusammen mit dem quervernetzenden Reagenz N, N'-Methylenbisacrylamid durch Zusatz des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS) und dem Stabilisator N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zur Polymerisation gebracht. Zur Denaturierung enthielt die Mischung 8.3 M Harnstoff.

Für die Auftrennung von Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge wurden Polyacrylamidgele in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Es wurden fertige Stammlösungen Rotiphorese von der Firma Roth verwendet (25 %).

Acrylamidkonzentration	6 %	9 %	10%	18 %	20 %
Acrylamid / Bisacrylamid (19:1)	12 ml	18 ml	20 ml	36 ml	40 ml
10 x TBE	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Verdünner	33 ml	27 ml	25 ml	9 ml	5 ml

Die Polymerisation des Gels wurde durch Zugabe von 400 µl APS (10 %) und 40 µl TEMED gestartet. Die Lösung wurde blasenfrei zwischen zwei Glasplatten (16 x 30 cm bzw. 32 x 30 cm) gegossen, die zuvor durch 1 mm dicke Spacer an drei Seiten abgedichtet wurden. Nach Einsetzen des Kammes für die Taschen zur Probenauftragung wurde das Gel nach 30 Minuten Polymerisationszeit in einer vertikalen Gelapparatur für weitere 30 Minuten bei 500 Volt in 1 x TBE-Puffer ohne Probe laufen gelassen, wobei mehrmals die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült wurden.

Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen Formamid versetzt, für 5 Minuten auf 90°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. In nicht genutzten Spuren wurde Bromphenolblau und Xylencyanol in Probenpuffer als Standards aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 600 Volt durchgeführt.

3.3.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde für die Analyse der DNA-Produkte aus der PCR nach jeder Selektionsrunde und zur Aufreinigung der DNA aus den PCR-Reaktionen mit den einzelnen Klonen eingesetzt. Es wurden 2 %-ige (w/v) Agarosegele verwendet. Dazu wurde 0.8 g Agarose in 40 ml 0.5 x TBE gegeben, in der Mikrowelle zum Sieden gebracht und durch Umschwenken gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 40°C wurde das noch flüssige Gel in eine Flachbett-Gelapparatur (10 x 6.5 cm) mit Kamm gegossen. Nach dem Erkalten und Erstarren des Gels wurden die Proben in nativem Probenpuffer aufgetragen. In einer Nachbarspur wurde Bromphenolblau und Xylencyanol sowie eine DNA-Leiter als Längenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 30 Minuten bei 200 Volt durchgeführt.

3.3.2 Nachweis von Nukleinsäuren

3.3.2.1 Autoradiographie

Die Verwendung von radioaktiver Markierung ist eine empfindliche Nachweismethode von Nukleinsäuren.

Das Elektrophoresegel mit den aufgetrennten radioaktiv markierten RNA- oder DNA-Proben wurde dazu von einer der beiden Glasplatten gelöst, in Folie eingeschlagen und im Dunkeln in einer Röntgenfilmkassette X-Omatic der Firma Kodak direkt auf einen Röntgenfilm RX (Fuji) gelegt. Je nach spezifischer Aktivität des verwendeten radioaktiven Isotops und der Menge der Nukleinsäure wurde dieser Film für wenige Minuten bis mehrere Tage bei -80°C exponiert und anschließend entwickelt (Röntgenentwickler G150, AGFA GEVAERT N. V.; Spülen mit Wasser; Röntgenfixierer G350, AGFA GEVAERT N. V.; Spülen mit Wasser) und getrocknet.

Alternativ dazu wurde das in Folie eingeschlagene Gel auf dem Phosphorimager Storm 840 der Firma Molecular Dynamics analysiert.

3.3.2.2 Färbung mit Ethidiumbromid

Ab einer gewissen Mindestmenge an Nukleinsäure (25ng) ist diese Methode zum schnellen Nachweis gut geeignet und wurde vor allem bei den Agarosegelen eingesetzt. Ethidiumbromid ist ein heterozyklischer Fluoreszenzfarbstoff, der in Nukleinsäurestrukturen

interkalieren kann. Er wurde als Lösung (0.5 µg/ml 0.5 x TBE) zum Färben von Gelen eingesetzt, indem diese darin für 30 Minuten geschwenkt wurden. Alternativ dazu wurde Ethidiumbromid in derselben Konzentration direkt zu den Agarosegellösungen gegeben. Auf einem Transilluminator mit Licht der Wellenlänge 306 nm konnten die Nukleinsäurebanden durch orangene Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

3.3.2.3 Färbung mit SYBRGold

Die SYBRGold-Färbung ist die empfindlichste Nachweis-Methode für doppel- oder einzelsträngigen Nukleinsäuren in Gelen. Ihre Sensitivität ist über 10mal größer als die der Ethidiumbromid-Färbung. SYBRGold ist ein Nukleinsäure-Interkalator, dessen Toxizität als hoch einzuschätzen ist. Das Anregungsmaximum für den Fluoreszenzfarbstoff-Nukleinsäure-Komplex liegt bei ~495 nm im sichtbaren und bei ~300 nm im ultravioletten Bereich. Das Emissions-Maximum befindet sich bei einer Wellenlänge von ~537 nm.

Das Gel wurde zum Färben in eine mit 1xSYBRGold-Lösung (10000x Konzentrat mit Wasser verdünnt) gefüllte Wanne gelegt und für ca. 45 min bei langsamen Schütteln und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Nukleinsäurebanden mit Hilfe des Fluoreszenz-/Phosphorimagers Storm 840 der Firma Molecular Dynamics detektiert.

1x SYBRGold-Lösung wurde in einer lichtundurchlässigen Plastikflasche bei 4°C gelagert und maximal viermal verwendet.

3.3.2.4 UV-Shadowing

Ohne jegliche Anfärbung lassen sich Nukleinsäuren aufgrund ihrer UV-Absorption sichtbar machen. Das Gel wurde auf eine in Haushaltsfolie eingeschlagene Kieselgelplatte 60 F₂₅₄ mit Fluoreszenzfarbstoff gelegt und von oben mit Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Die Nukleotide waren durch Fluoreszenzlöschung zu erkennen. Wegen der sehr geringen Empfindlichkeit dieser Methode wurde sie nur bei präparativen Gelen angewendet. Die entsprechenden Banden konnten direkt unter der UV-Lampe ausgeschnitten werden. Da Licht dieser Wellenlänge aber photoinduzierte Schäden in den Nukleinsäuren hervorrufen kann, wurde die Bestrahlung so kurz wie möglich gehalten.

3.3.3 Elution von Nukleinsäuren aus Gelen

Die durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigten Oligonukleotide wurden aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten, in etwa 2 x 2 mm große Stückchen zerteilt und mit ca. 500 µl Natriumacetatlösung (0.3 M, pH = 5.5, für anschließende Ethanolfällung) pro Bande für 1 h bei 80°C geschüttelt. Die Elutionslösungen wurden

vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und für die anschließende Entsalzung durch Ethanolfällung oder Gelfiltration aufbewahrt.

Die Banden der DNA-Matrizen wurden aus dem Agarosegel über UV-Shadowing ausgeschnitten und mit dem QIAquick-Kit der Firma Qiagen nach den Anweisungen des Herstellers eluiert.

3.3.4 Gelfiltration

Mit diesem Verfahren wurden aus Nukleinsäurelösungen niedermolekulare Salzbestandteile abgetrennt. Es beruht auf dem Prinzip der Permeationschromatographie bzw. des Molekularsiebeffekts, bei dem ein Gel mit einer bestimmten Porengröße verwendet wird. Ab einer gewissen Größe sind Moleküle nicht mehr in der Lage, in diese Poren einzudringen und werden zuerst eluiert. Kleinere Moleküle permeieren die stationäre Phase und werden deshalb entsprechend retardiert. Es kamen Chromatographiesäulen mit Sephadex G-25-Material (NAP) der Firma Pharmacia Biotech zum Einsatz. Sie wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion der Produktfraktionen erfolgte durch Radioaktivitätsmessungen.

3.3.5 Ethanolfällung

Die am häufigsten angewendete Methode, um Nukleinsäuren zu konzentrieren und dabei niedermolekulare Bestandteile größtenteils abzutrennen, war die Ethanolfällung. Zunächst wurde die Lösung mit 3 M Natriumacetatlösung pH 5.5 auf 0.3 M NaAc eingestellt. Bei Proben, die nur sehr wenig Nukleinsäure enthielten, oder Oligonukleotiden mit weniger als 50 Basen wurde pro 300 µl wässriger Lösung noch 1 µl Glycogen (20 mg/ml) als Fällungshilfe zugegeben. Die Lösung wurde dann mit dem 2.5-fachen Volumen Ethanol gemischt und für mindestens 10 Minuten (schwer zu präzipitierende Proben bis zu mehreren Stunden) bei -20°C gefällt und anschließend für mindestens 30 Minuten bei 9500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene farblose Pellet wurde noch mit 70 % Ethanol gewaschen und 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen.

In äquivalenter Art und Weise wurde die Fällung von Nukleinsäuren mit einer Lithiumperchlorat-Lösung (2% w/v, Aceton) durchgeführt.

Bei Vorhandensein kleiner Gelfragmente wurden diese zuvor durch Filtration mit einem CENTREX MF-Zentrifugenfilter (Porengröße = 0.45 µm) der Firma Schleicher & Schuell aus der Lösung entfernt.

3.3.6 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC ist eine Säulenchromatographie, bei der durch Verwendung von sehr kleinen Teilchen für die stationäre Phase (5 bis 10 μm) eine sehr geringe Trennstufenhöhe und damit verbunden eine große Trennleistung erreicht wird. Zur Trennung von Nukleinsäuren wird eine unpolare Umkehrphase (engl. reversed phase) als stationäre Phase eingesetzt. Dafür werden die polaren Silanolgruppen von Kieselgel mit Alkylsilanen umgesetzt. Hier wurden C_{18} -Säulen mit entsprechend 18 Kohlenstoffatomen in der modifizierenden Alkylkette verwendet (Ultrasphere ODS C_{18} , 5 μm , 80 \AA , 250 x 4.6 mm der Firma Beckman; Luna C18 (2), 5 μm , 80 \AA , 250 x 4.6 mm der Firma Phenomenex). Die mobile Phase war ein binärer Gradient aus Puffer A (0.1 M TEAAc, pH 7.0) und Puffer B (0.1 M TEAAc, pH 7.0 in 80 % Acetonitril). Die chromatographische Trennung wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min und einer Säulentemperatur von 45°C durchgeführt. Es wurde die Gerätekonfiguration System Gold der Firma Beckman und die Gerätekonfiguration der Serie 1100 der Firma Agilent Technologies verwendet. Wenn nicht anders vermerkt, wurden entsprechend dem jeweiligen Trennproblem Gradienten von 1 bis 20 % oder 10 bis 60 % Puffer B programmiert.

Methode QJ			Methode JS		
Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0	99	1	0	99	1
16	50	50	30	0	100
21	10	90	35	0	100
23	0	100	40	99	1
25	0	100	45	99	1
28	99	1	-	-	-

Um enantiomere Diels-Alder-Produkte zu trennen, wurde eine Chiral-NEA-(R)-Säule (YMC Europe 250 x 4.6 mm) verwendet. Die Trennung erfolgte über einen isokratischen Wasser/Ethanol-Gradienten (60:40) bei einer Flussrate von 0.8 ml/min.

3.4 Konzentrations- und Mengenbestimmung von Nukleinsäuren

3.4.1 Photometrische Messung

Die Nukleobasen der Nukleinsäuren weisen bei ca. 260 nm ein starkes Absorptionsmaximum auf. Wird bei dieser Wellenlänge die UV-Absorption gemessen, so lässt sich über die Extinktion die Konzentration von Nukleinsäurelösungen bestimmen. Für verdünnte Lösungen kann das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde gelegt werden: $E = \varepsilon * c * d$ (E = Extinktion, ε = molarer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration des gelösten Stoffes, d = Schichtdicke der Küvette). Die Einheit der Extinktion ist die optische Dichte OD. Eine OD_{260} entspricht einer Menge des absorbierenden Stoffes, die in 1 ml Wasser gelöst, im Spektralphotometer mit der Küvettendicke 1 cm bei 260 nm einen Absorptionswert von 1 erzeugt. Weiterhin wurden folgende Näherungen benutzt:

1 OD_{260} entspricht 30 μg einer ssDNA, 50 μg einer dsDNA, 40 μg einer ssRNA ;

$$\text{Stoffmenge der DNA in } \mu\text{mol} = \frac{\text{Gesamt } OD_{260}}{(10 * \text{Anzahl der Basen im Oligo})};$$

$$\text{Masse der DNA in } \mu\text{g} = \frac{(\text{pmol} * \text{Basenzahl} * 325)}{1000000};$$

Molmasse der DNA in g/mol = $(dA * 312,2) + (dC * 288,2) + (dG * 328,2) + (dT * 303,2)$ (dA , dC , dG , dT = Anzahl der entsprechenden Nukleotide im Oligo).

Zur Bestimmung der Konzentration von Initiator-(S)- und Initiator-(N)-nukleotid-Lösungen wurde von einem molaren Extinktionskoeffizienten für Guanosin von $\varepsilon_{260} = 9035$ ausgegangen, bei der Konzentrationsbestimmung von Anthracen-PEG-Initiatornukleotid-Lösungen von molaren Extinktionskoeffizienten für Anthracen von $\varepsilon_{252} = 220000$ und Guanosin von $\varepsilon_{252} = 13400$.

3.4.2 Cerenkov-Messung

Für eine hochempfindliche und einfache Bestimmung der Nukleotidmengen wurden diese mit ^{32}P radioaktiv markiert. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit einem Szintillationszähler LS 6000 SC der Firma Beckmann. Die von den verwendeten Proben ausgehende radioaktive Strahlung erzeugt bei Durchgang durch ein bestimmtes Medium im Gerät die sogenannte Cerenkovstrahlung. Die entstandenen Photonen werden dann mit dem

Sekundärelektronenvervielfacher registriert und zur Quantifizierung der markierten Nukleinsäuren benutzt. Die radioaktiven Proben wurden im Cerenkov-Modus ohne Zugabe von Szintillationsflüssigkeit vermessen. Die genauen Gleichungen zur Berechnung der Nukleinsäuremenge sind bei den entsprechenden Experimenten angegeben (vgl. 3.5.2).

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (engl. *polymerase chain reaction*) ist eine Methode für die exponentielle Vervielfältigung von bestimmten DNA-Molekülen. Dazu werden spezielle Primer (kurze Oligonukleotide) benötigt, die komplementär am 3'- bzw. 5'-Ende der zu vervielfältigenden Sequenz hybridisieren und dann in der Reaktion verlängert werden. Die PCR lässt sich in verschiedene Schritte unterteilen. Zunächst werden durch kurzzeitiges Erhitzen auf hohe Temperaturen eventuell doppelsträngig vorliegende DNA-Stränge voneinander getrennt. Daran schließt sich die Hybridisierung mit den beiden Primern an. Dabei wird durch schnelles Abkühlen auf die Hybridisierungstemperatur und einen großen Überschuss an Primern die Rückbildung des vorher vorliegenden DNA-Doppelstranges minimiert. Nun wird die DNA-Synthese durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und ausgehend von den angelagerten Primern mit den 4 Desoxynukleotridiphosphaten (dNTPs) durchgeführt. Hier wurde die hitzestabile *Taq*-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet. Als Matrize für die PCR kann doppelsträngige wie auch einzelsträngige DNA benutzt werden. Durch Verwendung terminal überhängender Primer kann die ursprüngliche DNA-Sequenz in der PCR um diesen Überhang verlängert werden. Ein einziges DNA-Molekül kann mit der PCR vermehrt und nachgewiesen werden. Dabei kann ein Zyklus praktisch beliebig oft wiederholt werden. Theoretisch kann sich die Anzahl der eingesetzten DNA-Moleküle pro PCR-Zyklus verdoppeln.

Alle durchgeführten PCR-Reaktionen wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.3.1.2), Ethidiumbromidfärbung und anschließender Transillumination (siehe 3.3.2.2) analysiert.

PCR von DNA

Zum Zwecke der radioaktiven DNA-Markierung kann den Ansätzen während der PCR α - 32 P-dNTP zugesetzt werden. Zur jeweiligem spezifischen Markierung von amplifizierte DNA wurden radioaktive Primer WA, WB, WB3'r in der PCR eingesetzt.

Die PCR wurde im Peltier-Thermocycler PTC-100 (MJ Research) durchgeführt.

Standardansatz:	
x μ l	DNA-Matrize
2 μ l	Primer A (50 μ M)
2 μ l	Primer B (50 μ M)
5 μ l	<i>Taq</i> -Puffer ohne MgCl ₂ (10x)
4 μ l	MgCl ₂ (50 mM)
4 μ l	dNTP-Mix (25 mM je dNTP)
1 μ l	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μ l)
ad 100 μ l	Wasser

Standard-PCR-Methode:	
Temperatur	Zeit
94 °C	3 min; Denaturierung vor 1. Zyklus
94 °C	1 min Denaturierung
50 °C	1.5 min Hybridisierung
72 °C	2.5 min Extension
10-20 Zyklen	

PCR-Methode S:	
Temperatur	Zeit
94 °C	3 min
94 °C	1 min
50 °C	1.5 min
72 °C	2.5 min
20 Zyklen	
92 °C	1 min
50 °C	1.5 min
72 °C	10 min
94 °C	1 min

Mutagene PCR

Zur Erhöhung der DNA-Pool-Diversität wurden nach den Runden 7 und 10 der durchgeführten Selektion mutagene PCR-Reaktionen mit dem Ziel, unspezifische Mutationen innerhalb der DNA-Stränge zu erzeugen, durchgeführt. Hierzu wurde das GeneMorphTM PCR Mutagenesis Kit der Firma Stratagene nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die

verwendete Mutazym DNA Polymerase führt zu einer speziell in GC-reichen Regionen fehleranfälligen PCR. Die Fehlerrate beträgt 1 - 7 Basen pro kb und PCR-Zyklus ^[61-63].

100 ng dsDNA des zu mutierenden Pools konnten innerhalb der ersten mutagenen PCR amplifiziert werden. Innerhalb einer weiteren mutagenen Vervielfältigung wurde 1 µl einer 1:1000 Verdünnung des davorigen Amplifikats eingesetzt. Nach der dritten, äquivalent durchgeführten mutagenen Polymerase-Kettenreaktion musste das DNA-Templat für die nächste Selektionsrunde generiert werden. Hierzu wurde aus jeder der vier PCR-Produkt-Bibliotheken ein Teil entnommen und ein 1:1:1:1-Gemisch hergestellt, welches in der nächsten Selektionsrunde als DNA-Pool eingesetzt wurde. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass sich während der Mutagenese die Pool-Diversität erhöht und keine Desoxyribonukleinsäuren verloren gehen.

3.5.2 T7-Transkriptionsreaktion

Mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 lässt sich eine DNA-Sequenz in eine komplementäre RNA umschreiben, sofern sie an ihrem 3'-Ende einen 17 Basenpaare langen doppelsträngigen Erkennungsbereich (T7-Promotor) besitzt. Die eingebauten Basen werden in Form von Nukleosidtriphosphaten (NTP) benötigt. Durch Einsatz von α -³²P-markiertem NTP lässt sich die hergestellte RNA radioaktiv markieren. Die RNA-Synthese beginnt stets mit einem Guanodin, wobei sich die Ausbeuten der Transkription deutlich erhöhen, wenn die RNA mit mehreren Guanosinen startet. Die Transkriptionsreaktionen wurden prinzipiell durchgeführt, wie in der Literatur beschrieben ^[64].

Standardansatz:	
x µl	dsDNA-Matrizen mit Promotorbereich (z.B. 20 pmol)
5 µl	Transkriptionspuffer (10x)
5 µl	Dithiothreitol (100 mM)
1 µl	Rinderserumalbumin (20 mg/ml)
4 µl	NTP-Mix (je 25mM)
2 µl	α - ³² P-CTP
2 µl	T7-Polymerase (50 U/µl)
ad 50 µl	Wasser

Als DNA-Matrizen wurden durch PCR hergestellte DNAs oder hybridisierte synthetische Oligonukleotide eingesetzt. In der *in vitro*-Selektion wurde für die T7-Transkription jeweils ca. 1/8 des PCR-Produktes aus der vorangegangenen Selektionsrunde als Matrize verwendet.

Zur Erzeugung von amino- und thiolmodifizierter RNA wurden jeweils die Initiator-(N)- und Initiator-(S)-nukleotide in Konzentrationen von 1-4 mM den Transkriptionsansätzen zugegeben, wobei die GTP-Konzentration dabei teilweise erniedrigt wurde. Die eingesetzten Konzentrationen sind an entsprechender Stelle angegeben.

Während der Selektion wurde 3 mM GTP und 2 mM Anthracen-Initiatornukleotid in der Transkription verwendet. Es wurde ein unaufgereinigtes polydisperses Anthracen-Initiatornukleotid mit mittlerer PEG-Kettenlänge von 13 Ethylenglycoleinheiten eingesetzt.

In der Regel wurde zur radioaktiven Markierung α -³²P-CTP benutzt. Die Inkubation des Transkriptionsansatzes erfolgte für mindestens 2 Stunden bei 37°. Es wurde ein Aliquot (2 μ l) zur radioaktiven Bestimmung der hergestellten Menge an RNA abgenommen und der Reaktionsansatz direkt durch denaturierende PAGE gereinigt, aus dem Gel eluiert und durch Ethanolfällung entsalzt. Für die Quantifizierung der Nukleinsäuren wurde die erhaltene RNA am Cerenkov-Zähler vermessen.

Zur anschließenden Mengenermittlung wurden folgende Formeln benutzt:

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

$$\text{RNA-Stoffmenge [nmol]} = \frac{\text{Einbaurate} * \text{Konzentration CTP } [\mu\text{M}] * \text{Ansatzvolumen } [\mu\text{l}]}{\text{Anzahl der im Transkript vorkommenden Cytidine}}$$

$$\text{Zahl der RNA-Kopien pro DNA-Matrize} = \frac{\text{Stoffmenge Transkript [mol]}}{\text{Stoffmenge der DNA – Matrize [mol]}}$$

3.5.3 Reverse Transkription (RT)

Nach jeder Selektionsrunde muss die selektierte RNA vor der PCR-Amplifizierung in DNA umgeschrieben werden. Dazu wurde eine RNA-abhängige DNA-Polymerase oder auch Reverse Transkriptase benutzt. Es ist ein DNA-Primer notwendig, der an die RNA hybridisiert und dessen freies 3'-OH-Ende dann komplementär zu der RNA-Matrize durch dieses Enzym verlängert wird. Hier wurde die SuperScript II RNase H⁻ reverse Transkriptase verwendet. Als Matrize diente die selektierte RNA, die noch über Biotin an die

Streptavidinagarose gebunden war. Um eine mögliche Adsorption der Reversen Transkriptase an der Festphase zu unterbinden wurde dem Ansatz Rinderserumalbumin zugegeben.

Ansatz:	
<i>Hybridisierungsschritt</i>	
80 µl	RNA-Matrize (auf Streptavidinagarose)
48 µl	Primer B (50 µM)
10 min bei 85°C, dann 4 min auf Eis	
<i>Reverse Transkription</i>	
6 µl	Rinderserumalbumin (20 mg/ml)
48 µl	First Strand Buffer (5 x)
10 µl	Dithiothreitol (100 mM)
12 µl	dNTP-Mix (je dNTP 10 µM)
32 µl	Wasser
2 min bei 55°C	
4 µl	SuperScript II RTase (200 U/µl)
60 min bei 55°C	

3.5.4 Klonierung

Die nach den Selektionsrunden 15 {JS15D1 (A)}, 14 {JS14C1.5 (B)}, 10 {JS10C (C)} und 8 {JS8C (D)} erhaltenen katalytischen RNAs wurden in DNA umgeschrieben und wie auch der Ansatz b47 (vgl. 4.2.2) mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde durch Inkubation für weitere 7 Minuten bei 72°C erreicht, dass die PCR-Produkte durch die Taq-Polymerase 3'-terminal adenyliert wurden. Diese DNA-Moleküle konnten mit dem Qiagen PCT Cloning^{plus} Kit der Firma Qiagen in einen Plasmidvektor (pDrive Cloning Vector) kloniert werden. Dabei wurde nach den Vorschriften des Herstellers gearbeitet. Das Klonierungskit beinhaltet einen linearisierten Vektor, der einen einzelnen 3'-überhängenden Desoxythymidin-Rest besitzt. Dadurch wird die Ligation des 3'-adenylierten PCR-Produktes vereinfacht ermöglicht. Es wird die Ligase-Aktivität der Topoisomerase genutzt, welche den "aktivierten", linearisierten Vektor spontan bei Temperaturen von 4°C - 16°C innerhalb von 30 Minuten ligiert. Der Vektor wurde in die mitgelieferten Zellen transformiert. Diese *E. coli*-Zellen (Qiagen EZ Competent Cells) wurden entsprechend den Herstellerangaben auf LB-Platten (Luria-Bertani-Medium) ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Das LB-Medium enthielt Ampicillin und

war zuvor mit X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β ,D-galactopyranosid) und IPTG (Isopropylthio- β ,D-galactopyranosid) behandelt worden. Nur die Zellen, in die erfolgreich ein Plasmid transformiert wurde, konnten durch die Plasmid-vermittelte Antibiotika-Resistenz auf dem Medium wachsen. Die Stelle im Plasmid, in welche die DNA kloniert wurde, befindet sich mitten im Plasmid-Gen für das α -Peptid der β -Galactosidase. Diese β -Galactosidase spaltet mit Hilfe von IPTG X-gal in einen blauen Farbstoff. Die nicht-rekombinanten Klone mit noch intaktem Gen sind so durch ihre Blaufärbung zu erkennen. Die weißen Klone mit insertierter DNA, und somit defektem Gen, wurden direkt in LB-Übernachtsmedien geimpft, um die DNA-Plasmide in vivo für die Sequenzierung zu amplifizieren. Für diese Präparation wurden zwei verschiedene Kits verwendet, nach deren Anleitung strikt verfahren wurde. Sowohl das QIAprep 8Turbo Miniprep Kit der Firma Qiagen als auch das Wizard[®]SV 96 Plasmid DNA Purification System der Firma Promega erbrachten jeweils eine maximale Ausbeute von 1,8 μ g DNA.

3.5.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Didesoxymethode von Sanger et al. (1977) durch die Firma SEQLAB durchgeführt. Dazu wurde die Plasmid-DNA nach genauer Anweisung durch Zugabe von spezifischen Primern präpariert und eingeschickt.

Primer M13universal (-21): 5'-d[TGT AAA ACG ACG GCC AGT]-3'

Primer M13reverse (-29): 5'-d[CAG GAA ACA GCT ATG ACC]-3'

3.5.6 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

3.5.6.1 Kinasierung (5'-Markierung durch Phosphorylierung)

Ansatz:	
1 μ l	Primer B (2 μ M)
1 μ l	Kinase-Puffer (10 x)
2 μ l	Wasser
1 μ l	T4-Polynukleotidkinase (10 U / μ l)
5 μ l	γ - ³² P-ATP

Der freie 5'-Terminus von Oligonukleotiden lässt sich mit dem Enzym Polynukleotid-Kinase aus dem Phagen T4 phosphorylieren. Dabei wird das γ -Phosphat eines ATPs auf die 5'-Hydroxylgruppe des Oligonukleotids übertragen. Benutzt man γ - ^{32}P -ATP, wird somit eine radioaktive Markierung ermöglicht. Nach Inkubation bei 37°C für 1.5 Stunden wurde der Ansatz durch PAGE (vgl. 3.3.1.1) aufgereinigt, das Oligonukleotid eluiert (vgl. 3.3.3) und gefällt (vgl. 3.3.5).

3.5.6.2 Ligation (3'-Markierung)

Mit dem Enzym T4-RNA-Ligase kann die 3'-Hydroxylgruppe einer RNA mit der 5'-alpha-Phosphatgruppe eines weiteren RNA-Moleküls in Gegenwart von ATP verknüpft werden. Bei Verwendung von beispielsweise Cytidin-3'-[5'- ^{32}P]-diphosphat erlaubt diese Reaktion die radioaktive Markierung des 3'-Terminus von RNA (England & Uhlenbeck, 1978).

Ansatz:	
x μl	RNA (z.B. 3 pmol)
1.5 μl	Ligase-Puffer incl. ATP (10 x)
1 μl	5'-[^{32}P]-pCp (3.3 μM , 10 μCi)
1 μl	T4-RNA-Ligase (11 U / μl)
ad 15 μl	Wasser

Der Ansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann durch PAGE (vgl. 3.3.1.1) gereinigt, die RNA eluiert (vgl. 3.3.3) und gefällt (vgl. 3.3.5).

3.5.6.2 Transkription (unspezifische intramolekulare Markierung)

Innerhalb der Transkription von DNA-Templates mit Hilfe DNA-abhängiger RNA-Polymerase können radioaktiv markierte Nucleosidtriphosphate eingesetzt werden. Bei Verwendung von beispielsweise α - ^{32}P -CTP erlaubt die Reaktion die radioaktive Markierung aller Phosphatgruppen, die mit dem Cytidin in das transkribierte Oligonukleotid eingebaut werden (Ansatz: vgl. 3.5.2).

3.5.6.3 Radioaktive PCR

Durch Verwendung von radioaktiv markierten Primern (vgl. 3.5.6) ist es möglich, die DNA lokaldefiniert radioaktiv zu markieren.

Wird die PCR mit radioaktiven Desoxynukleosidtriphosphaten (z.B. α - ^{32}P -dCTP) durchgeführt, so kommt es durch Einbau der α - ^{32}P markierten Nucleoside zu einer nucleosidspezifischen Markierung der DNA.

Die hierfür notwendigen Ansätze werden analog den unter 3.5.1 angegebenen Bedingungen durchgeführt, wobei die entsprechenden Substrate, ganz oder nur partiell (je nach späterer Anwendung) gegen die hier beschriebenen radioaktiven Moleküle substituiert werden.

3.6 Physikalische Methoden

3.6.1 Stopped Flow Methode

Bei der Messung von hohen Reaktionsgeschwindigkeiten ergeben sich experimentelle Probleme, da sich das Reaktionsgleichgewicht häufig schon während der Mischzeit der Reaktanden so gut wie eingestellt hat. Der Versuch, die Mischung zweier Lösungen optimal zu gestalten und damit die Mischzeit zu minimieren, führte zur Entwicklung der sogenannten Strömungsmethoden (Flow Methods). Dabei werden die Reaktanden strömend gemischt. Bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten und geeigneter Wahl der Dimensionen der Messapparatur kann so die Mischzeit auf unter 0.001 s reduziert werden. Bei der Stopped Flow Methode wird der Zufluss der Lösungen in die Mischzelle nach kurzer Zeit gestoppt. Unmittelbar nach der Mischzelle wird der zeitliche Verlauf der Reaktion spektrometrisch detektiert.

Unter Verwendung des Gerätes SFM-20 der Firma BioLogic sowie der Software MPS-32 v.1.22 konnten innerhalb dieser Doktorarbeit die Stopped-Flow-Versuche (siehe 4.4.1) durchgeführt werden.

Hierzu wurde Spritze 1 mit 0.5 mM Biotinmaleimid- (2% v/v DMSO, 10% v/v EtOH in 1x Minimalpuffer) und Spritze 2 mit 0.5 M β -Mercaptoethanol-Lösung (2% v/v DMSO, 10% v/v EtOH in 1x Minimalpuffer) befüllt.

Die Reaktion zwischen Biotinmaleimid und β -Mercaptoethanol konnte computergesteuert durch das Mischen von jeweils 100 μl Reaktionslösung initiiert sowie die schnelle Kinetik bei einer Wellenlänge von 303 nm, dem Absorptionsmaximum des Maleimids, verfolgt werden.

3.6.2 Quenched Flow Methode

Auch bei der Quenched Flow Methode werden die Reaktanden durch Spritzen in eine Mischkammer gedrückt. Nach einer gewissen Verweilzeit wird das Reaktionsgemisch mit einer dritten Lösung, die den Reaktionsverlauf anhält („quenched“) versetzt. Die hier verwendete Quenched-Flow-Anlage QFM-20 der Firma BioLogic unter der Software MPS-32 v.1.22 besitzt ein motor- und computergesteuertes Zweispritzensystem. Spritze 1 bedient die Probenschleifen L1 und L2, Spritze 2 ist für das Terminierungsreagenz zuständig (vgl. 4.4.1). Wie im folgenden Ansatz beschrieben wurden die Spritzen und Probenschleifen gefüllt:

	Medium	Volumen	Injiziertes Volumen
Spritze 1	Wasser	5 ml	200 µl
Spritze 2	β-Mercaptoethanol (25 mM in 1x Minimalpuffer)	2.5 ml	300 µl
Probenschleife 1	RNA (2.0-0.6 µM in 1x Minimalpuffer)	110 µl	50 µl
Probenschleife 2	Biotinmaleimid (50 µM in 1x Minimalpuffer, 4% v/v DMSO)	700 µl	50 µl

Die Reaktionszeiten betragen 1500 und 500 ms.

3.7. Derivatisierungsstudien von terminal funktionalisierten Oligoribonukleotiden

3.7.1 5'-thiolmodifizierte Oligonukleotide

Doppelsträngiges B10 wurde nach einem Standard-Transkriptionsansatz (vgl. 3.5.2, Initiator-(S)-nukleotid: GTP = 4 : 1) in RNA umgeschrieben und über eine NAP10-Säule aufgereinigt und gefällt. Das gewaschene und getrocknete Pellet (ca. 1 nmol RNA) wurde in 60 µl Wasser aufgenommen und in drei Chargen (I, II, III) zu je 20 µl aufgeteilt. Ansätze II und III konnten nun mit Biotinmaleimid (66 nmol in DMSO) versetzt und bei 40°C für eine 1h inkubiert werden. Nach anschließender zweimaligen Ethanol-fällung wurde die umgesetzte RNA gewaschen sowie getrocknet. Ansatz III wurde erneut in 20 µl Wasser gelöst und mit 40 µl Neutravidinlösung (0.01mg / µl in Wasser) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die

jeweiligen Umsetzungen der Ansätze I – III konnten auf einem 18%igen Polyacrylamidgel (Länge = 40 cm) per Autoradiographie nachvollzogen und ausgewertet werden.

3.7.2 5'-aminomodifizierte Oligonukleotide

Doppelsträngiges B10 wurde nach einem Standard-Transkriptionsansatz (vgl. 3.5.2, Initiator-(N)-nukleotid: GTP = 4 : 1) in RNA umgeschrieben und über eine NAP10-Säule aufgereinigt und gefällt. Das gewaschene und getrocknete Pellet (ca. 1 nmol RNA) wurde in 60 µl Wasser aufgenommen und in drei Chargen (I, II, III) zu je 20 µl aufgeteilt. Ansätze II und III konnten nun mit Sulfo-NHS-Biotin (0.33 mg in H₂O) versetzt und bei 40°C für eine 1h inkubiert werden. Nach anschließender zweimaligen Ethanol-fällung wurde die umgesetzte RNA gewaschen sowie getrocknet. Ansatz III wurde erneut in 15 µl Wasser gelöst und mit 40 µl Neutravidinlösung (0.01mg / µl) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die jeweiligen Umsetzungen der Ansätze I – III konnten auf einem 18%igen Polyacrylamidgel (Länge = 40 cm) per Autoradiographie nachvollzogen und ausgewertet werden.

3.8 Sequenzspezifische Markierung von Desoxyoligonukleotiden

Bei unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Elmar Weinhold, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, wurden JSQ und JSN von Goran Pljevaljcic sequenzspezifisch biotinyliert. Die sequenzspezifische Markierung wurde über einen Neutravidinshift auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel detektiert.

Um die Amplifizierbarkeit der intern verzweigten DNA zu überprüfen, wurden die biotinylierten Sequenzen aus einem 10%igen, denaturierenden Gel, nach einer Laufstrecke von ca. 38cm ausgeschnitten, eluiert, gefällt und gewaschen.

Innerhalb der PCR Studien wurden folgende PCR-Methoden verwendet:

	Methode: W1	Methode: W2	Methode: W3	Methode: W4	Methode: W5
<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>				
95°C	4 min	4 min	4 min	4 min	4 min
55°C	4 min	4 min	4 min	4 min	4 min
72°C	3 min	4 min	5 min	60 min	120 min
95°C	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min
0°C	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min

Hierzu wurde folgender Ansatz erstellt:

Ansatz:	
x µl	Template
5 µl	10x PCR Puffer
3µl	Primer WB3'r (50 µM)
4 µl	dm ⁶ ATP/dGTP/dCTP/dTTP-Mix (jeweils 5mM)
4 µl	MgCl ₂ (50mM)
1 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
Ad 50 µl	Wasser

3.9 Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Agarose-Partikeln

3.9.1 Immobilisierung

600 pmol 49mer D-RNA (vgl.3.2.2) wurden mit 2 pmol kinasierter 49mer D-RNA (vgl. 3.5.6) dotiert und in 200 µl Natriumperiodatlösung (43 mM in Wasser) für 1 h bei +4°C inkubiert. Die RNA wurde mit LiClO₄-Lösung (2% (w/v) in Aceton) gefällt, gewaschen und getrocknet. In 60 µl einer Natriumacetatlösung (0.1 M, pH 5.5) konnte das Pellet gelöst und mit 30 µl Carbolink-Suspension (adipic acid dihydrazide agarose, Pierce) versetzt werden. Nach zweitägiger Inkubation bei 27°C und Schütteln bei 1000 rpm wurde der Überstand über einen CENTREX MF Zentrifugenfilter (Porengröße 0.45 µm, CA) der Firma Schleicher & Schuell von der festen Phase getrennt. Anschließend wurden die Agarose-Partikel sechsmal mit jeweils 90 µl Wasser gewaschen. Die Immobilisierungsrate von 49mer D-RNA auf der Carbolink-Festphase konnte über Radioaktivitätsmessungen festgestellt werden. In äquivalenter Weise wurde die L-RNA immobilisiert.

3.9.2 Substratumsetzung auf derivatisierter Festphase

Für alle Reaktionsansätze wurde derselbe Standardansatz verwendet.

Ansatz:	
11 μ l	5x Minimalpuffer
1 μ l	Maleimidkomponente (50 mM in Acetonitril)
2 μ l	Anthracenkomponente (6 mM in Ethanol)
41 μ l	Wasser

Alle Komponenten des Standardansatzes wurden gemischt und dann auf die entsprechende feste Phase gegeben. Die Inkubation verlief bei 26°C und Schütteln bei 1000 rpm. Nach einer Stunde wurde der Reaktionsansatz über einen CENTREX MF Filter zentrifugiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l β -Mercaptoethanol (25mM in 1x Minimalpuffer) gestoppt. Die feste Phase wurde anschließend fünfmal mit je 80 μ l Wasser gewaschen und in Wasser bei -20°C gelagert.

3.10 Durchführung der in vitro-Selektion

Als Ausgangspool für die Selektion schneller Diels-Alderase-Ribozyme diente der DNA-Pool 5 von Burckhard Seelig, welcher ebenfalls auf [4+2]-Cycloadditions-katalysierende Ribozyme selektierte. Die in dieser Doktorarbeit beschriebene Selektion beginnt demnach mit dem sechsten Zyklus. Die angereicherte Bibliothek der fünften Runde war die letzte vor dem ersten Anstieg der Immobilisierungsrates innerhalb seiner Selektion^[65]. Dieser Pool wurde wie unter 3.5.2 beschrieben unter Verwendung von α -³²P-CTP und Anthracen-PEG-Initiatornukleotid (Initiatornukleotid : GTP = 3 : 2) transkribiert sowie über ein 6%-iges Polyacrylamidgel aufgereinigt. Die RNA-Bande wurde mittels Autoradiographie detektiert und ausgeschnitten. Daraufhin konnte die RNA eluiert und gefällt werden.

Eine anschließende Gegenselektion sollte verhindern, dass unspezifische Binder an der Streptavidinagarose-Festphase der Firma Sigma zurückgehalten werden und somit in die nächste Selektionsrunde gelangen. Eine Gegenselektion fand jeweils zwischen Rund 5 und 6 sowie zwischen Runde 9 und 10 statt. Dazu wurde die gesamte RNA in 150 μ l Immobilisierungspuffer (1 M NaCl, 10 mM HEPES pH 7.2, 5mM EDTA) gelöst, für fünf Minuten auf 85°C erhitzt und anschließend auf die präparierte Festphase gegeben. Es wurden während der gesamten Selektion je 150 μ l Streptavidinagarose-Suspension in einem CENTREX MF Filter eingesetzt.

Präparation der Streptavidinagarose-Festphase		
<i>Volumen</i>	<i>Medium</i>	<i>Zeit</i>
150 µl	Streptavidinagarose-Suspension	-
3 x 150 µl	Immobilisierungspuffer	1 min
150 µl	t-RNA-Lösung (2mg/ml in Immobilisierungspuffer)	10 min
150 µl	Immobilisierungspuffer	1 min

Nach 10-minütiger Inkubation erfolgte die Zentrifugation des Ansatzes. Die feste Phase wurde zweimal mit jeweils 100 µl Immobilisierungspuffer gewaschen und die RNA über Ethanolfällung erhalten.

Nun konnte der eigentliche Selektionsschritt gestartet werden. Die Anthracen-PEG-RNA wurde in 1x Minimalpuffer gelöst [$c_{\text{Anthracen-PEG-RNA}} \sim 0.06 \mu\text{M} - 0.4 \mu\text{M}$; $c_{\text{Anthracen-PEG-RNA, final}} \sim 0.03 \mu\text{M} - 0.2 \mu\text{M}$] [finale Konzentrationen an RNA-Konjugat: *Runde 6*: 0.03 µM; *Runde 7*: 0.05 µM; *Runde 8*: 0.04 µM; *Runde 9*: 0.11 µM; *Runde 10*: 0.09 µM; *Runde 11*: 0.04 µM; *Runde 12*: 0.07 µM; *Runde 13*: 0.08 µM; *Runde 14*: 0.2 µM; *Runde 15*: 0.04 µM; *Runde 16*: 0.07 µM; *Runde 17*: 0.04 µM] und für 5 Minuten bei 85°C denaturiert. Nachdem der Ansatz abgekühlt war, konnte frisch zubereitete Lösung von Biotinmaleimid (1.25mM in Dimethylsulfoxid) entsprechend einer finalen Biotinmaleimid-Konzentration von 25 µM (>50facher Überschuss gegenüber Anthracen-PEG-RNA) und einer Dimethylsulfoxid-Konzentration von 2% zugesetzt und damit die Reaktion initiiert werden. Aufgrund der geringen Reaktionszeiten bei manchen Selektionsrunden wurde die Reaktion in der Quenched-Flow-Apparatur durchgeführt. Dabei richtete sich die finale Anthracen-PEG-Konzentration nach der Transkriptionsausbeute und nach dem minimalen Probenschleifenvolumen von 50µl.

Nach der jeweiligen Reaktionszeit (5 min bis 0.5 s) wurde die Reaktion durch Zugabe von β-Mercaptoethanol (final 10 mM) terminiert. Die Präzipitation der Nukleinsäuren erfolgte über zweimalige Ethanolfällung, Waschen mit EtOH und anschließendem Trocknen. Danach wurde die RNA in 150 µl Immobilisierungspuffer gelöst, zur Denaturierung für 10 Minuten auf 85°C temperiert und sofort auf die präparierte Streptavidinfestphase gegeben. Nach halbstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln (700 rpm) konnten die nicht immobilisierten Ribonukleinsäuren durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die feste Phase wurde nun solange mit Waschpuffer (8 M Harnstoff, 0.1 M Tris-HCL pH 7.4) gewaschen, bis in den Waschfraktionen keine Radioaktivität mehr zu detektieren war. Nun folgte die Reverse Transkription (vgl. 3.5.3) direkt von der Streptavidinagarose in einem

Reaktionsgefäß. Vor der anschließenden PCR wurde der RT-Ansatz zentrifugiert und der Überstand bis auf 80 µl abgenommen. Dieser Rest wurde der PCR-Ansatzberechnung (vgl. 3.5.1) zugrunde gelegt. Nach dem Amplifizieren konnte ein neuer Selektionszyklus gestartet werden.

Nach den Selektionsrunden 6 und 9 wurde nach der Polymerase-Kettenreaktion jeweils mit 100 ng dsDNA mutagene PCR-Reaktion durchgeführt. Die Matrizen-DNA der nachfolgenden Transkriptionen bestand zu gleichen Teilen aus dem jeweiligen DNA-Amplifikat 1, 2, 3 und 4 (vgl. 3.5.1).

3.11 Charakterisierung der selektierten RNAs

3.11.1 Geschwindigkeitskonstanten für immobilisierte RNA

Für die in jeder Selektionsrunde isolierte RNA wurde aus dem Prozentsatz der immobilisierten RNA ($\%_{\text{immo}}$) eine scheinbare (engl. apparent) Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{app} nach folgender Formel berechnet:

$$k_{\text{app}} = \frac{1}{t * ((BM)_0 - (A - RNA)_0)} * \ln \frac{((A - RNA)_0 * (BM)_t)}{(A - RNA)_t * (BM)_0}$$

wobei $(BM)_0$ und $(A-RNA)_0$ die Ausgangskonzentrationen von Biotinmaleimid und Anthracen-PEG-RNA waren und die entsprechenden Konzentrationen zur Zeit t wie folgt berechnet wurden:

$$(A - RNA)_t = \frac{100 - \%_{\text{immo}}}{100 * (A - RNA)_0}$$

$$(BM)_t = (BM)_0 - (A-RNA)_0 + (A-RNA)_t$$

3.11.2 Fluoreszenz-Assay

Anthracen ist ein Fluorophor, das bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 253 nm eine typische blau-violette Fluoreszenz bei 419 nm zeigt. Durch die Reaktion mit dem Maleimid in der Diels-Alder-Reaktion wird das dreigliedrige aromatische Ringsystem zerstört und die Fähigkeit zu der beschriebenen Fluoreszenz geht verloren. Hier bot sich eine äußerst einfache

Nachweismethode der Zerstörung des Anthracen-Ringsystemes durch Messung der entsprechenden Fluoreszenzabnahme an.

Die Messungen wurden am Fluoreszenzspektrometer MOS-250 der Firma BioLogic mit der Software Biokine v3.27 bei den oben angegebenen Wellenlängen durchgeführt. Dazu wurde RNA-Konjugat in 53.9 μl Minimalpuffer gelöst und im Strahlengang des Spektrometers platziert. Nach ca. 30 s wurde die Mikro-Fluoreszenz-Küvette entfernt und die Reaktion durch Zugabe von 1.1 μl Biotinmaleimid-Lösung gestartet. Die Endkonzentration an Biotinmaleimid betrug 25 μM , das entsprach ca. einem 50fachen Überschuss über der jeweiligen Anthracen-PEG-RNA. Die Lösung war 2 %-ig an Dimethylsulfoxid. Anschließend wurde durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen mit der Pipette gemischt und die Küvette wieder im Strahlengang platziert. Nun konnte die Abnahme der Anthracenfluoreszenz über mindestens 1100 Sekunden verfolgt werden. Die scheinbaren Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_{app} wurden graphisch aus den Anfangsgeschwindigkeiten extrapoliert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 5'-terminale Funktionalisierung von Oligonukleotiden

Universell derivatisierbare Oligonukleotide sind essentiell, um das große Potential der Nucleinsäurechemie im Bereich der Katalyse auszuschöpfen. In diesem Kapitel werden Konzepte und deren Umsetzung zur Konstruktion terminal funktionalisierter Oligonukleotide vorgestellt. Zudem wird ein weitreichender Ausblick auf daraus resultierende, zukünftige Forschungsprojekte gegeben.

4.1.1 Konzept

Um RNA mittels einer über einen Linker gekoppelten funktionellen Gruppe terminal zu modifizieren, bietet sich die 5'-terminale Modifizierung an. Sie besitzt gegenüber der Modifizierung am 3'-Ende der RNA den Vorteil, dass das RNA-Konjugat innerhalb eines einzigen experimentellen Schrittes erhalten werden kann (siehe Abbildung 7).

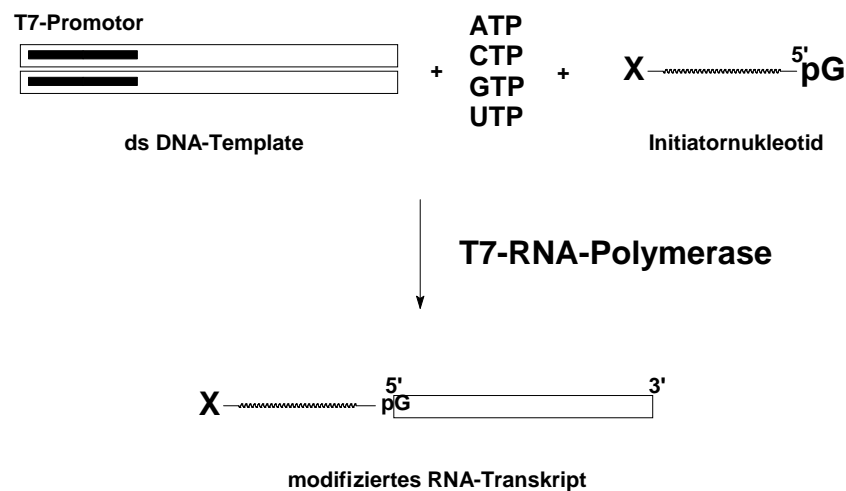


Abbildung 7: Allgemeines Schema zur 5'-Modifizierung der RNA per T7-Transkription durch Verwendung von ternären Initiator-nukleotiden. X = funktionelle Gruppe.

Die Ligation mit T4-RNA-Ligase ist zwar ebenfalls effektiv und führt zu einem entsprechenden Konjugat, aber die davor notwendige Transkription bedeutet einen umfangreicheren Syntheseweg.

Die T7-Polymerase (Enzym, welches doppelsträngige DNA in einzelsträngige RNA umschreibt) beginnt die Transkription immer mit einem Guanosin. Es ist bekannt, daß bestimmte Modifizierungen des Guanins dabei toleriert werden. So ist zum Beispiel die Einführung von Nukleosidmonophosphaten^[66], Thiophosphaten^[67], kurzen Oligonukleotiden^[42] und Anthracen-PEG-Linkern^[43] beschrieben.

Um eine 5'-terminale Funtionalisierung von Oligonukleotiden zu erreichen wurde folgendes allgemeines Initiatornukleotid **1** entworfen:

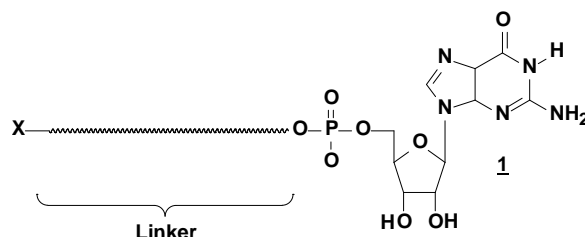


Abbildung 8: Darstellung des allgemeinen Initiatornukleotids. X = HS- vel H₂N-.

Als Grundgerüst dieses Initiatornukleotids diente das käuflich erhältliche 5'-Dimethoxytrityl-N²-isobutyrylguanosenin.

5'-Dimethoxytrityl-N²-isobutyrylguanosenin **2** wurde mit Isobuttersäureanhydrid umgesetzt, die freien Hydroxylgruppen durch Isobutyrylgruppen geschützt und anschließend die DMTr-Schutzgruppe mit Trichloressigsäure abgespalten. Nach Umsetzung von **3** mit Phosphorigsäure(2-cyanoethylester)diisopropylamidchlorid erhielt man ein mit dem Linker koppelbares Guanoseninphosphoramidit **4**^[65] (siehe Abbildung 9).

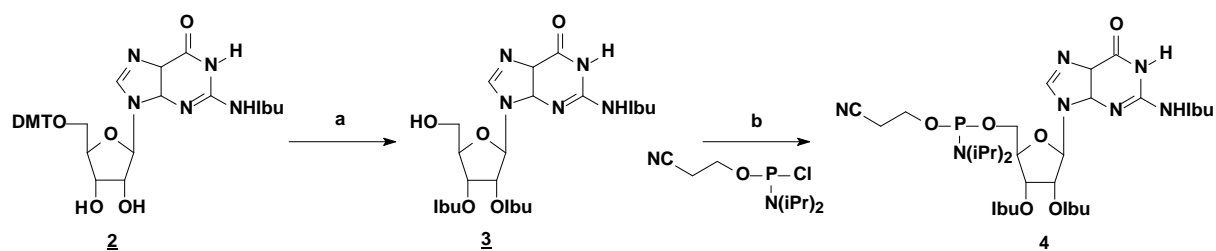


Abbildung 9: Synthese des Guanoseninphosphoramidits. (a) Pyridin, Isobuttersäureanhydrid; Dichlormethan; Trichloressigsäure; (b) Dichlormethan, N,N-Diisopropylethylamin.

Als effektiver Linker zwischen funktioneller Gruppe und Guanosenin erwies sich Hexaethylenglykol. Hexaethylenglykol erfüllt alle Anforderungen an einen Linker. Es ist ein flexibles Molekül, so dass sich die RNA möglichst frei zu den beiden Reaktanden

positionieren kann. Es bildet keine übergeordneten Strukturen aus und beteiligt sich damit nicht spezifisch an dem dreidimensionalen Aufbau der RNA. Das Molekül ist chemisch beständig und weist eine gute Löslichkeit in wässrigen Medien auf. Dr. Seelig aus der hiesigen Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass schon das Hexamer der Ethylenglykolkondensation die Möglichkeit bietet, als Modifizierung des Guanosins per T7-Transkription in ein Oligonukleotid eingebaut zu werden ^[44].

Zhang et al. entwickelten parallel zu den hier beschriebenen Initiator-nukleotiden 5' Sulfhydryl-Initiatoren mit einer Linkerlänge von zwei bis vier Ethylenglykol-Einheiten ^[68]. Sie verfolgten eine andere organische Synthesestrategie und erhielten dadurch kurze 5' modifizierte Guanosinmonophosphate. Da nur durch hohe Flexibilität und ausreichende Linkerlänge mögliche aktive Zentren von potentiellen Ribozymen erreicht werden können, werden die hier synthetisierten Initiator-nukleotide mit einer Linkerlänge von sechs Ethylenglykoleinheiten in Selektionsexperimenten von größerem Vorteil sein.

Da in dieser Doktorarbeit zwei verschiedene Initiator-nukleotide, ein 5'-amino- und ein 5'-thiolmodifiziertes Initiator-nukleotid, synthetisiert und deren Einbau in Oligoribonukleotide studiert werden sollte, war es nun essentiell, das Design der 5'-Nukleotidtermini individuell zu gestalten.

4.1.2 Initiator-(S)-nukleotid

4.1.2.1 Initiator-(S)-nukleotidsynthese

Die Synthese des Initiator-(S)-nukleotides beruht auf der Kopplung des Guanosinphosphoramidits **4** mit tritylgeschütztem Mercaptohexaethylenglykol **8** (siehe Abbildung 12).

Als Edukt für die Synthese des funktionalisierten Hexaethylenglykols diene das käuflich erhältliche Hexaethylenglykol **5**. Dieses wurde mit Hilfe von Thionylbromid monohalogeniert ^[69] und anschließend durch eine nucleophile Substitution des Triphenylmethylmercaptans ^[70] **7** am bromierten Kohlenstoffatom des Bromohexaethylenglykols **6** in das Tritylmercaptohexaethylenglykol **8** überführt. Sowohl die Struktur des Bromohexaethylenglykols **6** als auch die des Tritylmercaptohexaethylenglykols **7** konnte mit Hilfe von ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrometrie und dem jeweiligen Molekülpeak im Massenspektrum gesichert werden.

Die Kopplung des Guanosinphosphoramidits **4** mit Tritylmercaptohexaethylenglykol **8** erfolgte durch Tetrazol. Die anschließende Oxidation des Phosphittriesters **9** mit Jod lieferte

nach säulenchromatographischer Reinigung, ammoniakalischem Entschützen, und Reinigung des Ansatzes mittels HPLC das tritylgeschützte Initiatornukleotid **10**.

Die Struktursicherung erfolgte per MALDI-Massenspektrum (Abbildung 10). Bei der Sicherung der Struktur des tritylgeschützten Initiatornukleotids traten 2 Signale bei $m/z = 642.4$ (berechnet für **12**: 643.6) und 884.61 (berechnet für **11**: 885.9) auf. Da das MALDI-Massenspektrum im negativen Modus aufgenommen wurde, bestätigt der Molekülpeak bei $m/z = 884.61$ die berechnete Molmasse. Die Bindung zwischen Tritylschutzgruppe und Schwefelatom ist anscheinend so instabil, daß sie sich während der Aufnahme des MALDI-Massenspektrums löst und das Initiatornukleotid **12** entsteht.

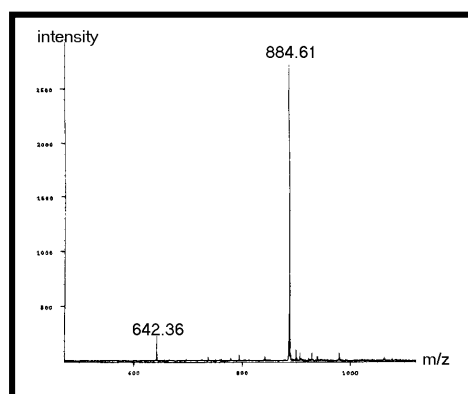


Abbildung 10: MALDI-TOF Massenspektrum des Initiatornukleotids **11. Negativer Modus.**

Durch mehrstündige Reaktion des tritylgeschützten Produktes mit Silbernitratlösung^[71] und anschließender Umsetzung mit DTT wurde das Initiatornukleotid **12** erhalten.

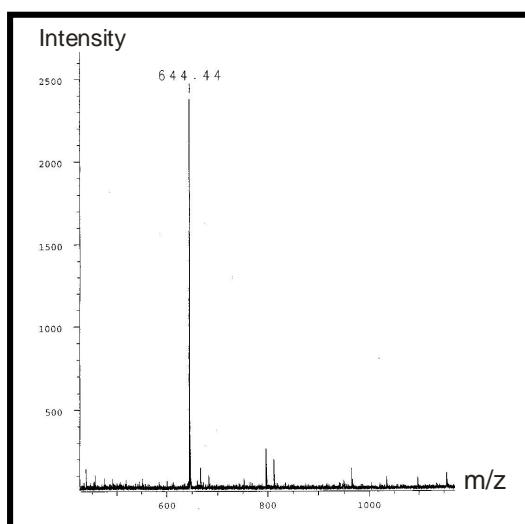


Abbildung 11: MALDI-TOF Massenspektrum des Initiatornukleotids **12. Positiver Modus.**

Auch bei diesem Molekül erfolgte die Struktursicherung per MALDI-Massenspektrometrie (siehe Abbildung 11). Das Signal bei $m/z = 644.4$ (berechnet für **12**: 643.6) charakterisiert die Struktur des synthetisierten Initiatornukleotids. Da das MALDI-Massenspektrum im positiven Modus aufgenommen wurde, bestätigt der Molekülpeak bei $m/z = 644.4$ die berechnete Molmasse.

4.1.2.2 Initiator-(S)-nukleotideinbau per T7-Transkription

Für den Einbau des Initiator-(S)-nukleotides in RNA per T7-Transkription musste ein für diese Problematik geeignetes DNA-Template verwendet werden. Um Transkript und Konjugat durch PAGE trennen zu können, sollte die relative Molekulargewichtszunahme durch Erlangen des thiolmodifizierten HEG-Spacers möglichst groß sein. D.h. je kleiner das Transkript desto deutlicher wird der Mobilitätsunterschied zwischen Konjugat und Transkript sein. Allerdings sollte auch auf die Transkribierbarkeit des Templates geachtet werden. Je kürzer das Transkript desto weniger hebt sich die Produktbande von frühen Abbruchbanden, die nach jedem Transkriptionstart auftreten, hervor. Es wurde aus den besagten Gründen ein 10mer Template verwendet, das beide Kriterien berücksichtigen soll. Zwar konnten im Laufe der Experimente stets die frühen Abbruchbanden der Transkription erkannt werden, was jedoch die Deutlichkeit der eigentlichen Transkript- bzw. Konjugatbande nicht beeinflusste.

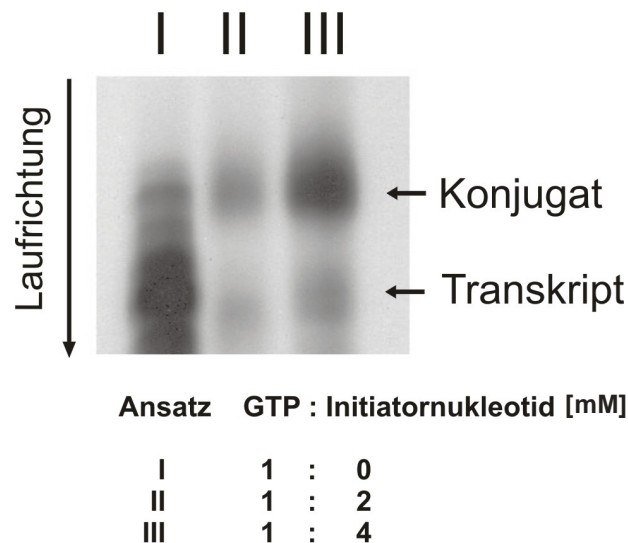


Abbildung 13: Enzymatischer Einbau des Initiator-(S)-nukleotides. Autoradiogramm eines Polyacrylamidgels.

Wie der Abbildung 13 zu entnehmen ist, wurden bei der T7-Transkription unterschiedliche Initiatornukleotidkonzentrationen eingesetzt. Die Detektion der Transkript- und Konjugatbanden auf einem Polyacrylamidgel erfolgte über Autoradiographie (vgl. 3.3.2.3). Aufgrund der unterschiedlichen α - ^{32}P -CTP-Konzentrationen ist in dem mittleren Ansatz generell eine schwächere Intensität der Banden zu erkennen. Dies führte dazu, dass auf einer Höhe die Intensität der Transkriptbande ab- und entsprechend die der Konjugatbande zunahm. Hiermit ist der konzentrationsabhängige Einbau des entschützten Initiator-(S)-nukleotids in Oligonukleotide bewiesen.

Um einen weiteren Beweis für den Einbau des intakten Initiators zu liefern und gleichzeitig seine bestehende Reaktivität zu demonstrieren, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Das 5'-thiolmodifizierte Konjugat und das Transkript einer 25 Nukleotide umfassenden RNA wurde mit Biotinmaleimid nach dem folgenden Schema (siehe Abbildung 14) umgesetzt.

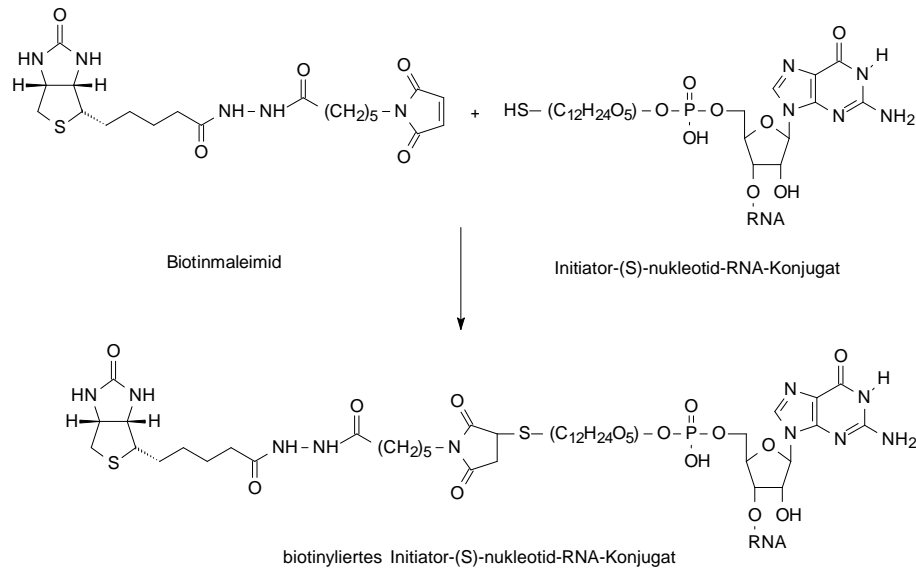


Abbildung 14: Reaktion von Biotinmaleimid mit Initiator-(S)-nukleotid-RNA.

Die Analyse durch 8%ige PAGE ermöglichte eine Produktidentifikation (siehe Abbildung 15). In der Spur I ist Konjugat/RNA, in Spur II mit Biotinmaleimid umgesetzter Ansatz I und in Spur III mit Neutravidin versetzter Ansatz II, der zuvor einer Ethanol-Fällung unterzogen wurde, aufgetragen worden. Aufgrund des geringen Mobilitätsunterschiedes zwischen Konjugat/RNA und biotinyliertem Konjugat retardiert das biotinylierte Produkt geringfügig stärker und ist als einzelne Bande in Spur II zu erkennen. Nach Umsetzen des biotinylierten 25mers mit Neutravidinlösung^[72] konnte eine deutliche Retardierung des Neutravidin-Biotin-25mer-Komplexes in Spur III beobachtet werden. D.h. das Initiator-(S)-nukleotid wurde in das 25mer eingebaut und besitzt eine modifizierbare und damit für die Kopplung anderer potentieller Reaktanden essentielle 5'-terminale Thiolmodifizierung.

Daraus kann gefolgert werden, dass das synthetisierte Initiator-(S)-nukleotid in Oligoribonukleotide durch T7-Transkription einbaubar ist. Die durch den Initiator eingeführte Thiolgruppe weist weiterhin eine starke Reaktivität auf.

Zudem zeigten Studien zur Fluoreszenzmarkierung von thiol-initiierten Decameren den erfolgreichen Einsatz von den hier beschriebenen Initiator-(S)-nukleotiden. Ein direkter

Beweis durch ein MALDI-Massenspektrum von thiolmodifizierten Oligomeren steht noch aus.

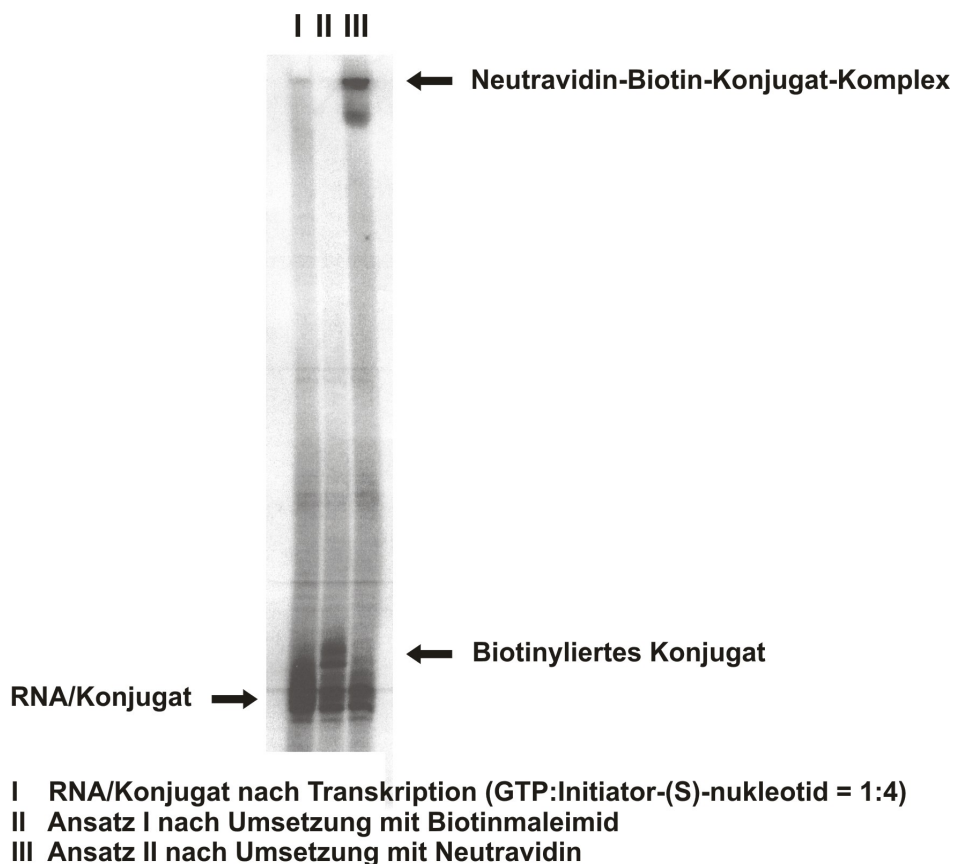


Abbildung 15: Untersuchung der Derivatisierungsmöglichkeit von Initiator-(S)-nukleotid-Konjugat; Reaktion von Biotinmaleimid mit Initiator-(S)-nukleotid-RNA. Autoradiogramm eines Polyacrylamidgels.

Zum einen können nun Ribozyme selektiert werden, die Disulfidbrückenbildungen, S-Acylierungen, S-Alkylierungen ^[73, 74] oder auch Substitutionen mit Alkyhalogeniden und Sulfonsäureestern katalysieren.

Zum anderen können vor allen Dingen eine Vielzahl potentieller Reaktanden in kombinatorische RNA-Bibliotheken eingeführt werden, um neuartige Ribozyme zu selektieren.

4.1.3 Initiator-(N)-nukleotid

4.1.3.1 Initiator-(N)-nukleotidsynthese

Die Synthese des Initiator-(N)-nukleotids beruht auf der Kopplung des Guanosinphosphoramidits **4** mit phthalimidogeschütztem Aminohexaethylglykol **14** (siehe Abbildung 17). Als Edukt für die Synthese des funktionalisierten HEGs fungierte wiederum

Hexaethylenglykol **5**. Dieses wird mit Hilfe von Thionylbromid monohalogeniert ^[69] und anschließend durch nucleophile Substitution des Phthalimid-Kaliums am bromierten Kohlenstoffatom des Bromhexaethylenglykols **6** in das Phthalimidohexaethylenglykol **14** via Gabriel-Synthese ^[75] überführt.

Die Kopplung des Guanosinphosphoramidits **4** mit Phthalimidohexaethylenglykol **14** erfolgte durch Tetrazol. Die anschließende Oxidation des Phosphitriesters **15** mit Jod sollte nach ammoniakalischem Entschützen und Reinigung des Ansatzes per HPLC das schon entschützte Initiatornukleotid **18** liefern.

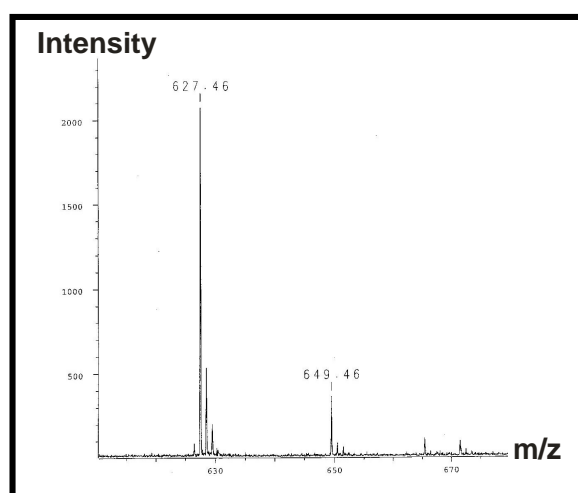


Abbildung 16: MALDI-TOF Massenspektrum des Initiatornukleotids **18. Positiver Modus.**

Das MALDI-Massenspektrum des Initiatornukleotids **18** zeigt bei der Aufnahme im negativen Modus einen Molekülpeak bei $m/z = 627.4$ (siehe Abbildung 16). Die Zahlenwerte bei $m/z = 649.4$ und 665.4 entsprechen den üblichen Molekül-Alkaliassoziaten von Na^+ und K^+ . Der berechnete Wert für den entschützten Initiator liegt bei 626.5 . Damit ist die Struktur des Initiator-(N)-nukleotids ebenfalls gesichert.

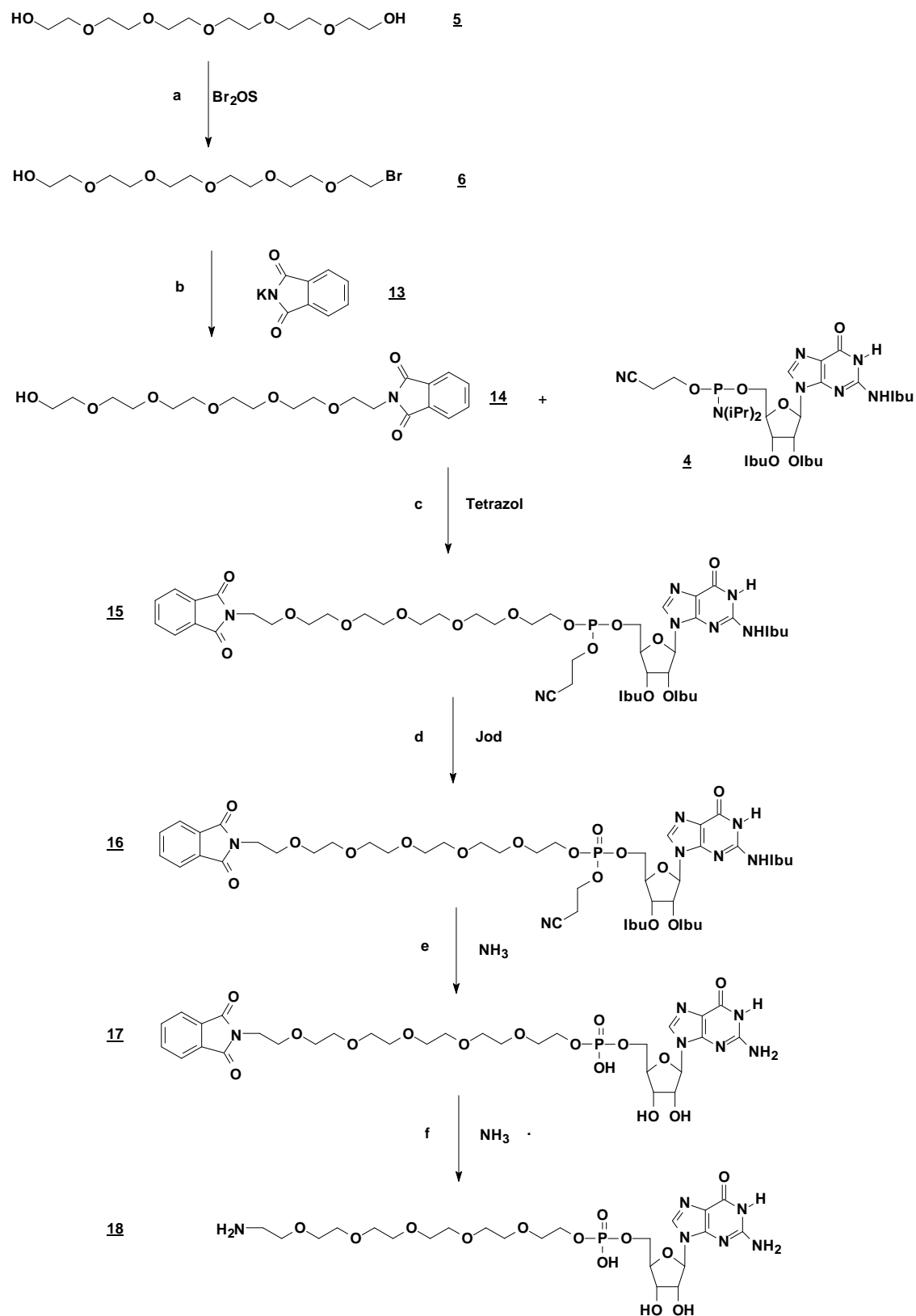


Abbildung 17: Darstellung des Initiator-(N)-Nucleotids. (a) Toluene, Triethylamin; (b) DMF, Dichlormethan; (c) Acetonitril; (d) Acetonitril; (e) Wasser; (f) Wasser.

4.1.3.1 Initiator-(N)-nukleotideinbau per T7-Transkription

Um den Einbau des Initiator-(N)-nukleotides in RNA per T7-Transkription zu demonstrieren, wurde wie unter 4.1.2.2 diskutiert ein 10mer template verwendet.

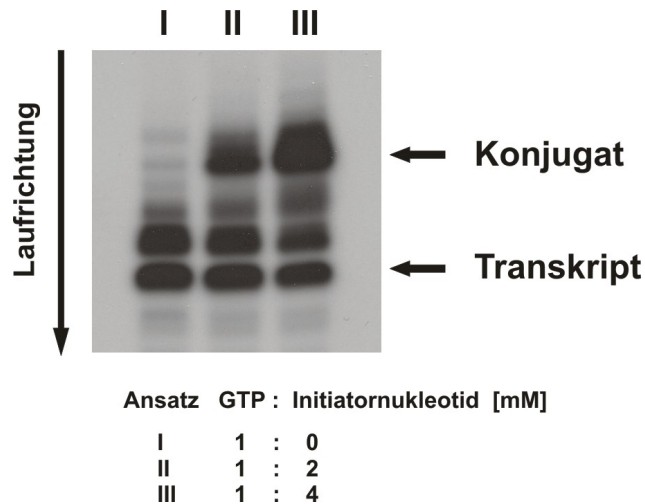


Abbildung 18: Enzymatischer Einbau des Initiator-(N)-nukleotides.
Autoradiogramm eines Polyacrylamidgels.

Wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, wurden unterschiedliche Initiatornukleotidkonzentrationen eingesetzt. Dies führte zu einem konzentrationsabhängigen Einbau an Initiatornukleotid. Je höher die Konzentration an Initiator war, desto intensiver war die Konjugat- und dementsprechend schwächer die Transkriptbande. Hiermit ist der Einbau des entschützten Initiator-(N)-nukleotids in Oligonukleotide bewiesen. Ein indirekter Beweis für die gelungene Initiation sowie ein direkter Beweis für die bestehende Reaktivität der terminal eingeführten Aminogruppe stellt folgendes Experiment dar.

Das 5'-aminomodifizierte Konjugat einer 10 Nukleotide umfassenden RNA wurde mit Sulfo-NHS-Biotin ^[76] nach dem folgenden Schema umgesetzt (siehe Abbildung 19).

Nach Umsetzen des nun biotinylierten 10mers mit Neutravidinlösung ^[72] konnte eine deutliche Retardierung des Neutravidin-Biotin-10mer-Komplexes beobachtet werden. Dies zeigt, dass das Initiator-(N)-nukleotid durch T7-Transkription in das 10mer eingebaut wurde. Zudem stellt das erfolgreiche Umsetzen des Konjugates mit Sulfo-NHS-Biotin einen weiteren Beweis für die erfolgreiche Amino-Initiierung von Oligonukleotiden dar und demonstriert gleichzeitig das Potential des eingebauten Initiator-(N)-nukleotids, als universelle Ankergruppe für potentielle Reaktanden zu fungieren.

Der universelle Einsatz des in RNA-Bibliotheken einsetzbaren Amino-Initiators ist bewiesen.

4.1.4 Ausblick

Sowohl das synthetisierte Initiator-(S)- als auch das Initiator-(N)-nukleotid stellen den Ausgangspunkt für weitere Experimente dar.

RNA-Linker-Thiol-Bibliotheken könnten benutzt werden, um beispielsweise über die Methode der direkten Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden RNA-Katalysatoren für S-Alkylierungen aufzufinden. Außerdem könnte eine Vielzahl potentieller Reaktanden über Alkylhalogenide, Maleimide oder Disulfid-Zwischenstufen an die Thiolfunktion gekoppelt und dann in Selektionen eingesetzt werden.

5'-terminal aminomodifizierte RNA-Pools könnten ebenfalls dazu ausgenutzt werden, über Derivatisierung bzw. die Kopplung potentieller Reaktanden mit dem RNA-Konjugat, neue Ribozyme, welche für die Wirkstoffsynthesen und wiederum für das Etablieren der RNA-Welt-Hypothese von Nutzen sein können, zu selektieren.

4.2 Interne Funktionalisierung von Desoxyoligonukleotiden

In diesem Kapitel wird der Möglichkeit der internen Funktionalisierung von Nukleinsäuren durch Verwendung von Enzymen des Restriktions-/Methylierungssystems nachgegangen. Hierbei wird ein Konzept vorgestellt, welches zur internen Modifizierung von DNA führt. Anschließend werden die Auswirkungen und weiterführenden Experimente diskutiert.

4.2.1 Konzept

Die generelle Notwendigkeit, in kombinatorische Oligonukleotid-Bibliotheken funktionelle Gruppen einzuführen, wurde bereits ausführlich besprochen. Es existieren verschiedene terminale Funktionalisierungsvarianten^[39, 41, 42]. Die Methode der internen Funktionalisierung wurde bisher noch nicht erfolgreich eingesetzt. Diese weist eine Reihe von Vorteilen auf. Über reaktive Zentren können weitere potentielle Reaktanden an Nukleinsäuren verankert werden und somit über diverse Selektionsmethoden zur Isolierung neuer Biokatalysatoren führen. Eine interne Modifizierung durch diverse Reaktanden könnte diese je nach Länge der Primärstruktur und Position der Funktionalisierung in die direkte räumliche Nähe von katalytisch aktiven Zentren lenken, was durch terminales Labeling und ggf. unzureichender Linkerlänge nicht notwendigerweise gegeben ist.

Ferner wären Selektionsstrategien unter Verwendung von mehreren Funktionalisierungen denkbar. Z.B. eine terminale und eine interne Funktionalisierung in demselben Molekül. Hierbei könnte es sich um eine Funktionalität handeln, über die ein potentieller Reaktand oder beispielsweise ein Coenzym, eingeführt werden könnte. Das Einfügen beider Reaktanden in einem Nukleinsäure-Molekül macht für Selektionsexperimente bedingt Sinn. Die klassische Methode der direkten Selektion mit involvierter Ankergruppe müsste variiert werden. Die interne Funktionalisierung sollte aus erwähntem Grunde innerhalb einer randomisierten Oligonukleotidprimärstruktur, welche die Vielfalt an potentiellen Katalysatoren einer Nukleinsäurebibliothek bestimmt, liegen. Sequenzspezifisch markierende Enzyme des Restriktions-/Methylierungssystems können eine solche Derivatisierung erreichen. Die N6-Adenin-DNA-Methyltransferase (MTase) *M·TaqI*^[77-79] ist ein solches Enzym. In zellulären Prozessen katalysiert *M·TaqI* sequenzspezifisch den Transfer einer Methylgruppe des S-Adenosyl-L-Methionins auf ein Adenin. Weinhold und Mitarbeiter zeigten, dass jene Methyltransferase zudem einen unnatürlichen Aziridin-Cofaktor akzeptiert und diesen auf das

N6-Atom eines Adenins (siehe Abbildung 21), welches sich in der spezifischen Sequenz TCGA im letzten Nukleotid befindet, überträgt.

Diese kovalente, sequenzspezifische Markierung durch MTasen wird SMILing (Sequenzspezifische Methyltransferasen Induziertes Labeling) von DNA genannt. Neben der *M·TaqI* gibt es noch weitere Methyltransferasen (C5-Cytosin-DNA-MTase *M·HhaI* ^[80, 81], N4-Cytosin-DNA-Mtase *M·BcnIB* ^[82, 83], die die Kupplung von *N*-Adenosylaziridin mit DNA katalysieren ^[84].

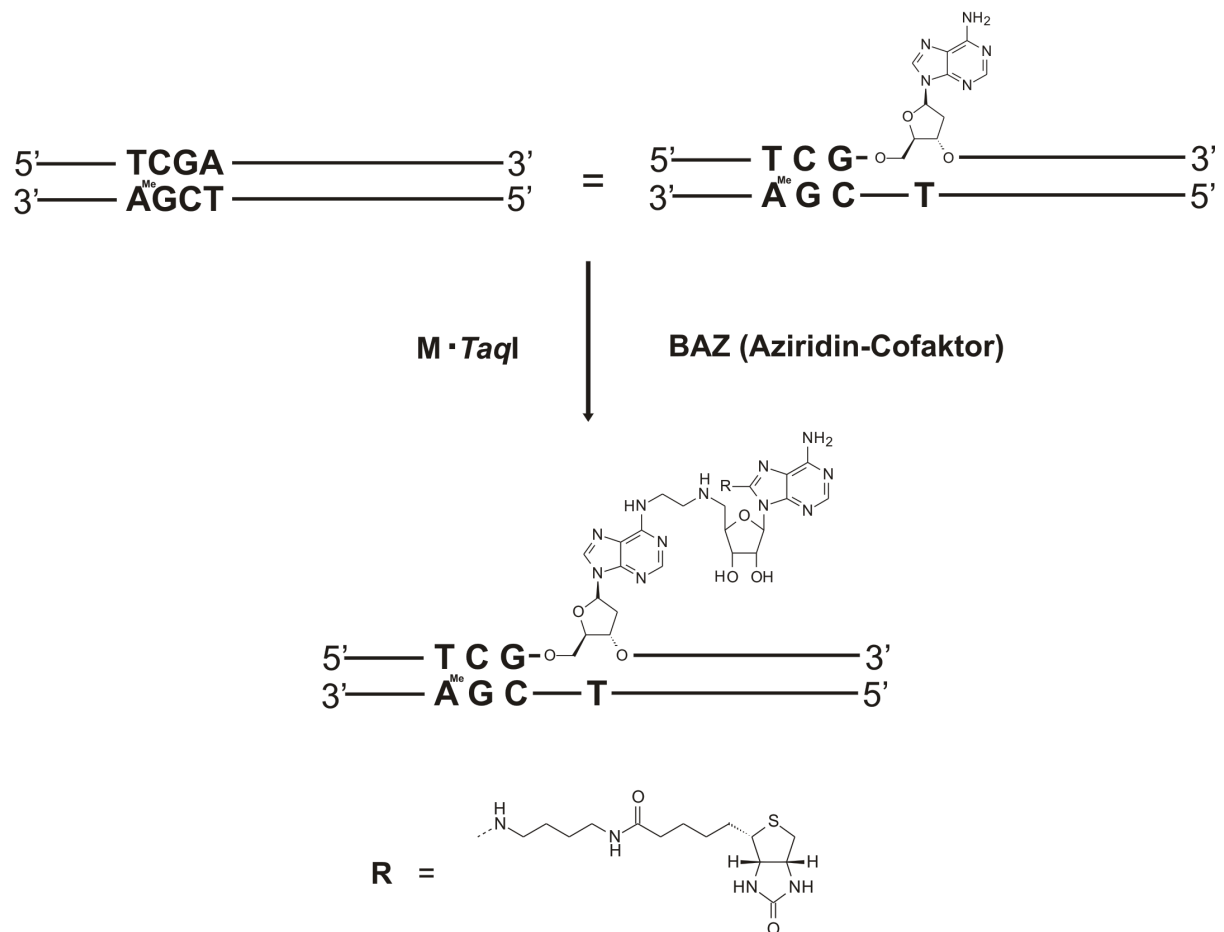


Abbildung 21: Schema der *M·TaqI* katalysierten, sequenzspezifischen Markierung (Biotinylierung) von DNA.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elmar Weinhold (Max-Plank-Institut Dortmund) haben wir uns für den Einsatz der Methyltransferase *M·TaqI* und daher auch für das Katalysesystem DNA entschieden. Wegen der erhöhten chemischen und biologischen Stabilität ist die Verwendung von DNA gegenüber RNA-Molekülen von Vorteil, zumal der synthetische Aufwand zur Herstellung deutlich geringer ist. Es gibt daher generell ein wirtschaftliches Interesse, herauszufinden, inwiefern die katalytischen Fähigkeiten von

Ribonukleinsäuren auf DNA übertragen werden können. Im DNA-Doppelstrang liegt die für *M·TaqI* essentielle Sequenz TCGA palindromisch vor. D.h. das Enzym würde den natürlichen Doppelstrang auf zwei Seiten modifizieren. Falls im sense- und antisense-Strang der DNA noch weitere spezifische Quartette aufträten, würden auch dort die entsprechenden Gruppen gekoppelt werden. Um dieses Phänomen einzuengen ist stets darauf zu achten, dass der antisense-Strang an sämtlichen Adeninen methyliert (z.B. durch PCR mit dm^6ATP) vorliegt und damit für das SMILing inert ist. Falls im randomisierten Bereich einer Poolsequenz zufällig dieses Quartett existieren würde, dann würde die Sequenz mehrmals modifiziert werden.

Eine Strategie für ein Selektionssystem wird im folgenden Schema vorgestellt. Die DNA-Bibliothek sollte so konstruiert sein, dass jedes Molekül zwei den randomisierten Bereich flankierende Primerbindungsstellen und die Erkennungssequenz TCGA der Methyltransferase *M·TaqI* aufweist. Dieses Quartett sollte aus besagten Gründen im randomisierten Bereich eingefügt sein. Zunächst wird die DNA-Bibliothek amplifiziert, indem sie durch den Einsatz von Primer A, einem 3'-Ribo-Primer und einem standardmäßigen dNTP-Mix mehrere PCR-Zyklen durchläuft. Der Antisense-Strang enthält jeweils ein Ribonukleotid, welches im alkalischen Milieu zur Hydrolyse und somit zur Spaltung der DNA führt ^[85]. Damit die MTase TCGA-spezifisch nur den Sense-Strang funktionalisieren kann, muss die komplementäre DNA-Sequenz gegen einen von der Primärstruktur identischen, an den Adenin-Basen methylierten Strang ausgetauscht werden. Dies geschieht dadurch, dass im alkalischen Milieu der Antisensebereich fragmentiert vorliegt und nach Neutralisation der relevante Strang über Polyacrylamid-Gelelektrophorese isoliert wird. Mit Hilfe eines einzigen PCR-Zyklus ist es möglich, den komplementären Strang durch Einsatz von dm^6ATP methyliert herzustellen. Nun erfolgt das SMILing der DNA durch Insertieren des funktionalisierten Cofaktoranalogs. Nach Abtrennen des methylierten Antisensestranges durch erneute alkalische Hydrolyse kann die nun intern funktionalisierte DNA mit einem Reaktanden entsprechend inkubiert und anschließend die katalytisch aktiven Desoxyribozyme selektiert werden. Eine neue Selektionrunde kann beginnen.

Es stellt sich die Frage, inwiefern die DNA-abhängigen DNA-Polymerasen eine Verzweigung innerhalb des Lesemusters bzw. eine interne Funktionalisierung tolerieren. Dieser Schritt ist für das genaue Amplifizieren der selektierten Nukleinsäuren essentiell. Unter der Annahme, nur ein einziges katalytisch aktives Molekül könne isoliert werden, ist es wichtig, dass die Polymerase diese aktive Sequenz bzw. Struktur nicht durch Mutationen zerstört oder diese gar überhaupt nicht vervielfältigt.

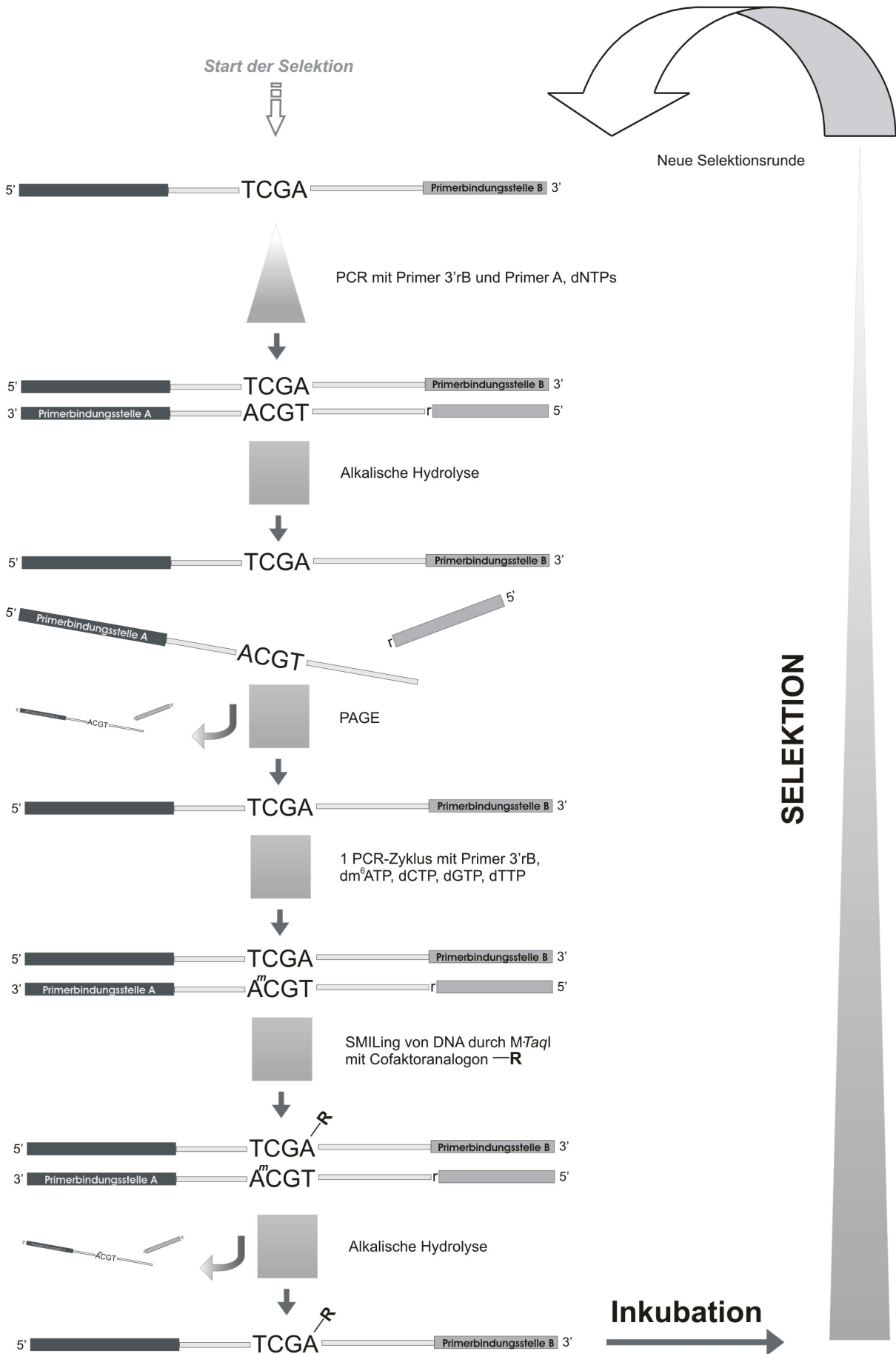


Abbildung 22: Selektionsschema zur Isolierung von Desoxyribozymen unter Verwendung der SMILING-Technik.

Um diese prinzipielle Frage zu klären, wurden definierte Testsequenzen entwickelt, welche in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elmar Weinhold per SMILing-Reaktion^[86] intern biotinyliert wurden.

Nach erfolgter Analytik der sequenzspezifischen Biotinylierung sollen PCR- und anschließend Sequenzierungs-Studien die gestellte Frage beantworten.

4.2.2 Testsequenzstudien

Testsequenzen sollten Aufschluss darüber geben, ob das vorhergehend erläuterte Selektionsschema in die Tat umgesetzt werden kann.

Sie sollten konkrete DNA-Sequenzen darstellen, die zwei Primerbindungsstellen und das *M*TaqI spezifische TCGA-Quartett aufweisen. Die Sequenzen JSQ und JSN (Kontrolle), zwei 47mere, wurden entwickelt, deren zwei Primerbereiche eine 8 Nukleotide lange Sequenz flankieren (siehe Abbildung 23).

JSQ

5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGA CCG **TCG ACG** GTG TGG ATC CGA CCG CC-3'

JSN

5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGA CCG **TAG CCG** GTG TGG ATC CGA CCG CC-3'

Abbildung 23: Primärstrukturen der Testsequenzen JSQ und JSN.

JSQ beinhaltet das Quartett TCGA, JSN nicht. Von beiden DNA-Sequenzen wurden jeweils 30nmol beim Kooperationspartner als dsDNA (methylierter Antisensestrang) der SMILing Technik unterzogen. Als Cofaktoranalogen wurde BAZ (siehe Abbildung 24) und als Enzym *M*TaqI verwendet. Nach der dortigen Analytik (Trennung der umgesetzten von den ursprünglichen Molekülen durch Streptavidin-Fluoreszein-Shift auf einem denaturierenden Acrylamid-Gel (siehe Abbildung 25) als Beweis für die interne Biotinylierung) konnte davon ausgegangen werden, dass JSQ, aber nicht JSN, durch das Enzym biotinyliert vorlag.

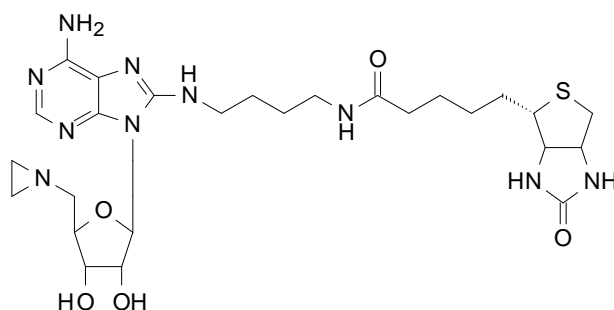


Abbildung 24: Aziridincofaktor BAZ.

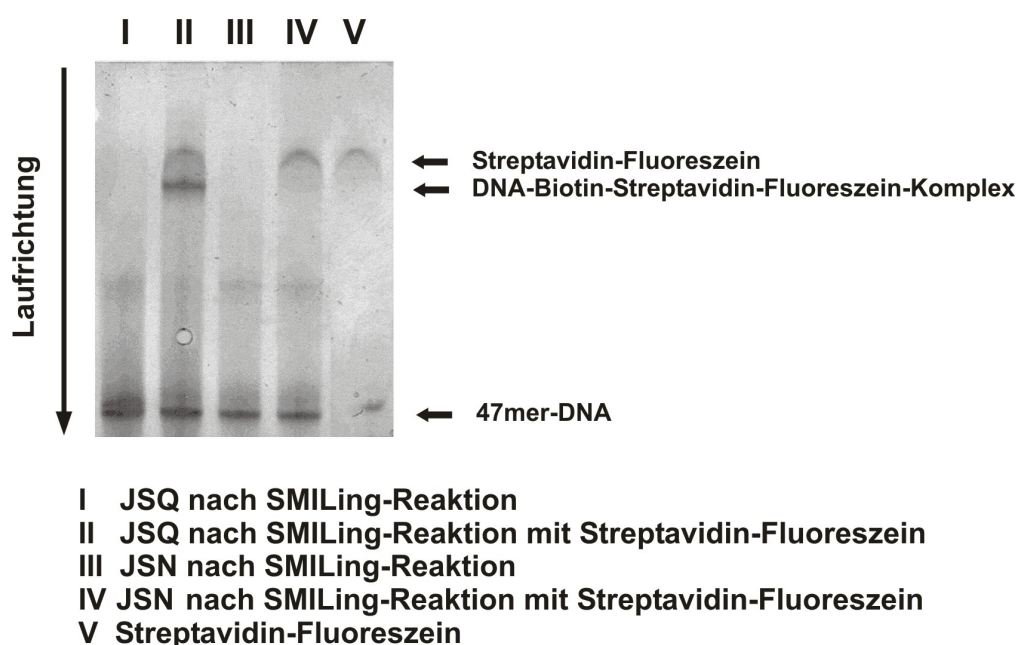


Abbildung 25: Analytik des SMILings von 47mer Testsequenzen JSQ und JSN. Denaturierendes Acrylamid-Gel.

Nach Erhalt der sequenzspezifisch markierten dsDNA (der Antisense-Strang lag am Adenin methyliert vor) mussten die biotinylierten Moleküle von der unumgesetzten Sense- und Antisense-DNA abgetrennt werden. Dies gelang über ein denaturierendes Polyacrylamidgel. Aufgrund der erhöhten Molekülmasse der biotinylierten Sequenzen wies die gelabelte, einzelsträngige DNA eine stärkere Retardation als alle anderen Moleküle auf und konnte mit Hilfe der SYBRGold-Färbetechnik detektiert (siehe Abbildung 26), aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und gefällt werden.



Abbildung 26: Trennung von biotinylierten JSQ- von nicht biotinylierten JSQ-Sequenzen. SYBRGold-Färbung eines Polyacrylamidgels.

Die modifizierten Einzelstränge mussten nun amplifiziert werden. Dazu wurden PCR Methoden entwickelt, die durch Einsatz von radioaktiv markiertem Primer WB3'r zunächst die Bildung des Antisense-Stranges untersuchten (siehe Abbildung 27). Die hierzu verwendeten Methoden W3 und W4 unterscheiden sich in der Länge des Elongationsschrittes, W3 beinhaltet einen 5 Minuten und W4 einen 60 Minuten-Elongationsschritt.

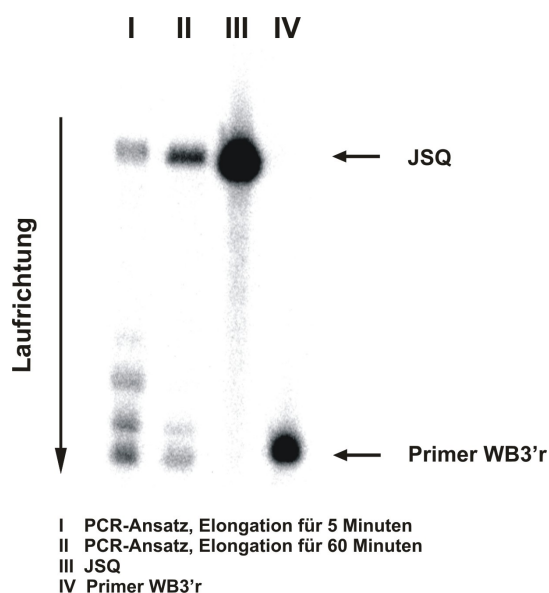


Abbildung 27: Amplifizierungsstudien von biotinyliertem JSQ mit radioaktiv markiertem Primer WB3'r. Autoradiogramm eines Polyacrylamidgels.

Auf der Autoradiographie eines 10%igen, denaturierenden Polyacrylamid-Gels sieht man deutlich, dass der Antisense-Strang gebildet wird. Nach fünfminütiger Elongation ist auf dem Polyacrylamidgel eine Bande zu erkennen, die dem Komplementärstrang zuzuordnen ist. Die frühen Abbruchbanden deuten darauf hin, dass die Taq-Polymerase an der sequenzspezifisch eingeführten Verzweigung (siehe Abbildung 21) anhält und erst nach einer gewissen

Wartezeit den weiteren Komplementärstrang synthetisiert. Nach 60 minütiger Elongation sind die Abbruchbanden fast nicht mehr zu erkennen. Die Komplementärstrangbande ist dafür umso intensiver. Daraus kann geschlossen werden, dass die DNA-abhängige Taq-Polymerase, die durch SMILing der Desoxyribonukleinsäure biotinylierte Sense-DNA trotz der internen Funktionalisierung toleriert und auch in PCR-Experimenten mit mehreren Zyklen, wie sie in Selektionen zur Amplifikation notwendig sind, eingesetzt werden kann.

Ob die DNA-Polymerase den korrekten Strang synthetisiert, d.h. die genaue Komplementarität herstellt, ist mit dem davorigen Experiment nicht klar. Um eine genaue Auskunft über die Arbeitszuverlässigkeit der Taq-Polymerase zu erhalten, wurden Sequenzierungsstudien herangezogen. Dazu wurde die biotinylierte DNA nach einer 120minütigen Elongation (W5) und Aufreinigen über denaturierende PAGE als Bande ausgeschnitten und eluiert, gefällt, gewaschen und das Pellet getrocknet. Nun erfolgte eine weitere PCR-Amplifikation mit Primer WA und WB unter Verwendung der Methode S. Die so erhaltenen Nukleinsäuren wurden nach Anweisungen des Herstellers mit dem Qiagen PCT Cloning^{plus} Kit der Firma Qiagen in einem Plasmidvektor (pDrive Cloning Vector) kloniert (siehe 3.5.4). Neun Klone wurden sequenziert (siehe 3.5.5).

Nach Auswertung der erhaltenen Sequenzen, konnte folgendes Ergebnis festgehalten werden: Von neun Klonen enthielten drei Mutationen, sechs DNA-Moleküle dahingegen die zu erwartende Sequenz.

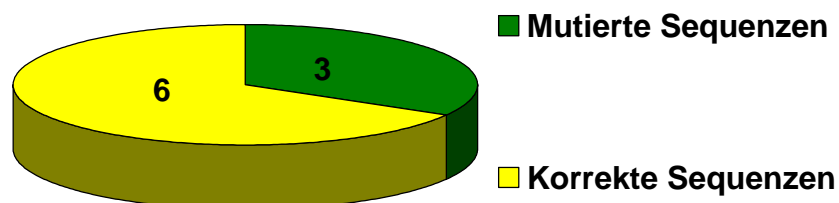


Abbildung 28: Darstellung der Sequenzhäufigkeit nach PCR- und Sequenzierungs-Studien von geSMILter DNA.

Die beobachteten Mutationen können wie folgt beschrieben werden:

- a) Punktmutation: C-T-Austausch direkt nach dem essentiellen Quartett TCGA
- b) Doppelte Punktmutation innerhalb des Quartetts TCGA: kompletter A-C-/C-A-Austausch in essentielltem Sequenzabschnitt

Anhand dieser aufgefundenen Mutation kann daraus geschlossen werden, dass Taq-Polymerase sequenzspezifisch, methyltransferasen-induzierte, biotinylierte Testsequenz-DNA als Templat für die PCR erkennt und sie mit einer Wahrscheinlichkeit von 66% korrekt

komplementär erstellt. Damit ist der Grundstein für direkte Selektionen intern funktionalisierter Desoxyribozymen gelegt.

4.2.3 Ausblick

Mit Hilfe der hier beschriebenen Testsequenzen konnte gezeigt werden, dass das SMILing von DNA die Amplifikation der modifizierten Nukleinsäuren mittels PCR zulässt. Hierbei erzeugt die Taq-Polymerase aufgrund der Einwirkung der internen Funktionalisierung teilweise Mutationen.

Selektionen werden mit Nukleinsäure-Pools durchgeführt, die einen wesentlich größeren Nukleotidbereich zwischen den Primerbindungsstellen aufweisen als die hier verwendeten Testsequenzen. Es ist daher empfehlenswert vor dem Einsatz der SMILing-Technik in Selektionsexperimenten analoge Studien mit längeren Sequenzen durchzuführen. Dadurch, dass das essentielle Quartett TCGA drei Nukleotide hinter der 47mer-Primerbindungsstelle lokalisiert ist, kann es zu einer erhöhten Fehlerrate in diesem Bereich gekommen sein. Die Taq-Polymerase besitzt eine hohe Arbeitsgenauigkeit, die jedoch im unmittelbaren Postprimerbereich geringer ist. Die Fehlerwahrscheinlichkeit von 33%, wie sie in den hier beschriebenen Experimenten sich darstellt, muss daher nicht unbedingt auf die interne Modifizierung zurückzuführen sein. Studien unter DNA-SELEX-Bedingungen sind daher ratsam.

Sobald diese Studien die hier vorgestellten Ergebnisse stützen, ist an die Durchführung von Selektionsexperimenten zu denken. Durch die Fehlerrate wird zwar im Amplifizierungsschritt eines von drei katalytisch aktiven DNA-Moleküle durch Mutationen inaktiviert oder zumindest für die SMILing-Reaktion unbrauchbar gemacht werden. Wenn jedoch genügend Kopien pro potentiellen Katalysator vorliegen, sollte sich die Selektion trotzdem durchführen lassen. Mit dem hier verwendeten Biotin-Cofaktoranalogen könnten Katalysatoren isoliert werden, die als einen Reaktanden Biotin akzeptieren. Da hierdurch das Katalyse-Potential sehr eingeschränkt ist, müssen weitere Cofaktoranaloga erprobt werden, die zum einen direkt einen Reaktanden darstellen oder über die weitere potentielle Reaktanden eingefügt werden können. Beispielsweise könnte mit Hilfe eines Aminolinker-Adenin-Aziridinderivates die SMILing-Reaktion durchgeführt werden. Die so gelabelten Sequenzen müssten isoliert und Derivatisierungs-Studien mit der hier angedachten, über einen Linker eingefügten Aminogruppe durchgeführt werden. Mit derartigen Studien ließe sich ein großes Potential der Desoxyribozyme ausschöpfen.

4.3 Immobilisiertes Diels-Alderase-Ribozym

Die praktische Verwendung von maßgeschneiderten Ribozymen hängt im großen Maße von dem kostengünstigen Design der jeweiligen Synthese ab. Hierbei können an einer festen Phase fixierte Katalysatoren einen weiteren Schritt in die Richtung des industriellen Einsatzes von katalytisch aktiven Nukleinsäuren in der organischen Chemie sein. In den folgenden Kapiteln werden Konzepte, entsprechende Umsetzungen und Ergebnisse bezüglich Immobilisierungsstudien sowie darauf folgende Aktivitäts- und Langzeitstabilitätsstudien von immobilisierten RNA-Enzymen vorgestellt und weiterführend diskutiert.

4.3.1 Konzept

Immobilisierte Katalysatoren weisen generelle Vorteile gegenüber der sich frei in Lösung oder im Reaktionsansatz befindlichen Spezies auf. Einfaches Abtrennen des immobilisierten Biokatalysators von den Reaktionsprodukten, die Wiederverwendbarkeit und die daraus resultierenden Kostenvorteile tragen zur Attraktivität fixierter Katalysatoren bei [56, 57]. Nachdem auch mittlerweile proteinogene Katalysatoren in der chemischen Industrie festphasen-immobilisiert eingesetzt werden, liegt es nahe, für die organische Synthese relevante, katalytisch aktive Nukleinsäuren zu immobilisieren und ihre Einsetzbarkeit zu studieren.

Bei der nach ihren Entdeckern benannten Diels-Alder-Reaktion handelt es sich um eine in der Natur relevante und in der chemischen Industrie fest verankerte Reaktion. Sie verläuft streng stereospezifisch und es entsteht ein Produkt von ganz bestimmter, eindeutig festgelegter Konfiguration.



Abbildung 29: Endriandra (Lauraceae) und deren Früchte, aus denen Endiandrinsäure isoliert werden kann.



Die Diels-Alder-Reaktion ist besonders zur Synthese von Naturstoffen, die alicyclische Ringe enthalten, wichtig geworden. In der Natur relevante Stoffe/Wirkstoffe, die u.a. durch Diels-Alder-Reaktionen entstehen sind z.B. Mevinolin (*Aspergillus terreus*)^[87], Nargenicin (*Nocardia argentinensis*)^[88], Heliocide H1 (*Gossypium hirsutum*) und Endiandrinsäure (*Endiandra Lauraceae*)^[89,90].

Nukleinsäuren können die Diels-Alder-Reaktion katalysieren. Die von Burkhard Seelig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andres Jäschke, Freie Universität Berlin) selektierten Diels-Alderase-Ribozyme führten zu einem 49mer-Minimalmotiv (siehe Abbildung 30), welches eine 1000fache Reaktionsbeschleunigung zwischen dem frei in Lösung vorkommenden Dien und Dienophil zulässt. Es handelt sich hierbei um das erste maßgeschneiderte Ribozym, welches die Reaktion zwischen zwei freien Reaktanden mit multiplen Turnover katalysiert^[91]. Das synthetische Spiegelbild dieses Minimalmotivs (bestehend aus L-Ribonukleotiden) weist die umgekehrte Stereoselektivität auf. Die Substratspezifität des Ribozyms wurde intensiv studiert^[92]. Aufgrund der geringen Größe des durchaus effektiven Minimalmotivs, ist es möglich, dieses selbst auf einfache Art und Weise am Oligonukleotid-Synthesizer herzustellen oder ohne größeren Kostenaufwand im Mikromolmaßstab von einem kommerziellen Unternehmen herstellen zu lassen. Diese katalytisch aktive RNA, welche die [4+2] Cycloaddition zwischen dem Dien Anthracen und dem Dienophil Maleimid katalysiert (siehe Abbildung 31), ist daher jederzeit zugänglich.

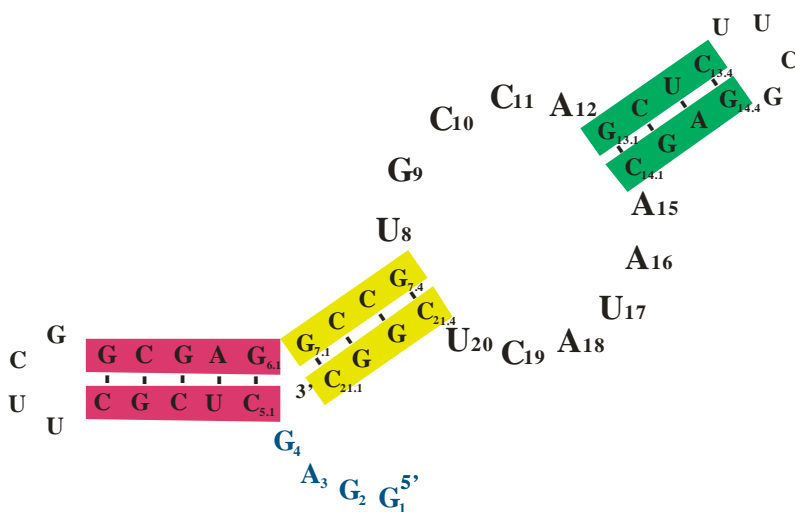


Abbildung 30: 49-mer Minimalmotiv des Diels-Alderase-Ribozyms.

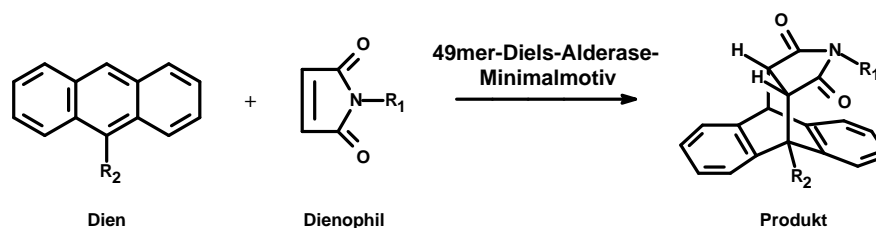


Abbildung 31: allgemeine Reaktion zwischen Dien (Anthracen) und Dienophil (Maleimid); R_1 = lipohiler oder -phober Rest; R_2 = hydrophiler Rest .

Wie in Abbildung 31 zu erkennen ist müssen die Reaktanden, deren Reaktion von einem Ribozym katalysiert wird, bestimmte Eigenschaften erfüllen. Sie müssen bedingt wasserlöslich sein, sonst kann sich die Diels-Alderase als hydrophiles Molekül nicht im Reaktionsmedium lösen und somit auch keine essentiellen Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden, um die Reaktion zu beschleunigen.

Beim Einsatz von Anthracen-Derivaten als Reaktanden ist darauf zu achten, dass sie einen lipophoben Rest besitzen. Hierbei hat sich eine Substitution an der C-9 mit Polyethylenglykolen bewährt. Aufgrund der Anthracen-Derivatisierung entstehen in der katalysierten Diels-Alder Reaktion Enantiomere. Freies D-Ribozym bevorzugt die Synthese des einen, freies Spiegelmer (L-Ribozym) hingegen die Synthese des anderen Enantiomers. Innerhalb der hier beschriebenen Immobilisierungs-Studien war es sinnvoll, beide Konfigurationen der Nukleinsäuren an einer festen Phase zu fixieren, damit die gegebenenfalls beibehaltene Enantioselektivität demonstriert werden kann.

D- und L-RNA mussten an einer geeigneten Matrix kovalent gebunden und anschließend ihre Eigenschaften als Katalysator untersucht werden.

4.3.2 Immobilisierung des Diels-Alderase-Ribozyms

Zur Immobilisierung von Ribonukleinsäuren an festen Phasen wurde Adipinsäure-Dihydrazid-Agarose der Firma Pierce (Carbolink-Suspension) verwendet. Der Abstand zwischen funktioneller Gruppe und der Festphasen-Oberfläche beträgt 24 C-Atome. Mittels Periodatoxidation wurde das 3'-*cis*-Diol der Ribose der jeweiligen Ribonukleinsäure in das entsprechende Dialdehyd überführt^[93]. Die neu entstandene funktionelle Gruppe erlaubte es, das 49mer-Minimalmotiv der Diels-Alderase an der Hydrazid-Festphase^[60] zu immobilisieren (siehe Abbildung 32).

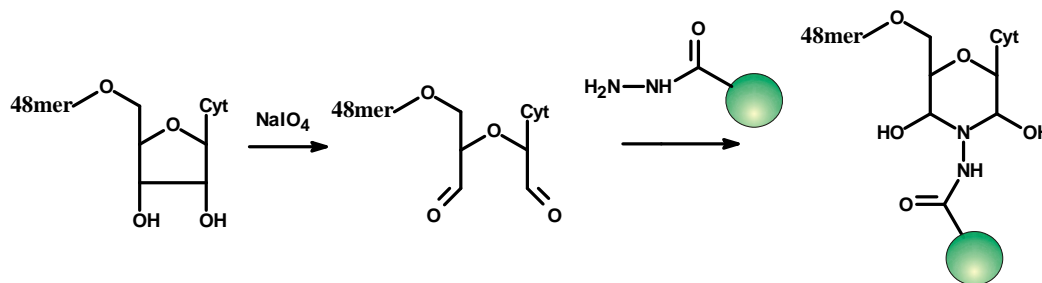


Abbildung 32: Reaktionsschema der Immobilisierung des 49mer-Minimalmotiv des Diels Alderase-Ribozyms an der Hydrazidoberfläche der Adipinsäure-Dihydrazid-Agarose.

Die Inkubation von radioaktiv markiertem Diels-Alderase Ribozym (D- und L-RNA) mit NaIO_4 -Lösung bei 4°C ergab innerhalb einer Stunde eine quantitative Oxidation ohne detektierbare Degradation. Nachdem das Perjodat über Präzipitation entfernt wurde, wurde die oxidierte RNA unterschiedlich lang mit Adipinsäure-Dihydrazid-Agarose inkubiert und anschließend die feste Phase mit Wasser gewaschen. Die Quantifizierung von ^{32}P durch Szintillationszählung erlaubte eine Abschätzung der Kopplungsausbeute. Nach 14 Stunden wurden 43% der eingesetzten RNA, nach 20 Stunden 55% immobilisiert. Die beste Immobilisierungsrate wurde nach 48 Stunden bei Raumtemperatur mit 98% erreicht. Dies entspricht einer Beladung von 49 pmol/ μl nassem Gel.

4.3.3 Untersuchung der immobilisierten Diels-Alderase

Nach erfolgreicher Immobilisierung der Ribonukleinsäuren an der Agarose-Festphase wurde nun deren katalytische Aktivität untersucht. Es ist keineswegs selbstverständlich, dass Katalysatoren im gebundenen Zustand wie auch Lösung dieselben Eigenschaften aufweisen. Da die Verankerung der Ribonukleinsäure am 3'-Ende des Moleküls und damit in der Nachbarschaft der für die Aktivität des Ribozyms essentiellen zwei Helices befindet (siehe Abbildung 33), war eine Verringerung der katalytischen Aktivität zu erwarten.

Um die Katalyse-Aktivität der gebundenen RNAs zu untersuchen, wurden in den entwickelten Experimenten drei verschieden beladene Agarosen verwendet. Auf der ersten befand sich das verankerte D-Ribozym, auf der zweiten das entsprechende, immobilisierte Spiegelmer. Die dritte Festphase war die unmodifizierte Adipinsäure-Dihydrazid-Agarose als Negativkontrolle. Als Substrate wurden 9-Hexaethylglykol-Anthracen (9-HEG A) und N-Pentylmaleimid (NPM), deren Umsetzung von frei in Lösung befindlichen 49mer bekannt war, verwendet. Aufgrund von unterschiedlicher Solvatationseigenschaften wurden das

Anthracen-Derivate in ethanolischer Lösung, die Maleimidderivat in Acetonitril gelöst eingesetzt. Der jeweilige Ansatz (Maleimid : Anthracen = 4 :1) wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend mit der festen Phase in einem Mikrozentrifugenfilter gemischt (siehe 3.5.8.2). Hierbei wurde zügig gearbeitet (Pipettierzeit < 30 s), um die Hintergrundreaktion so gering wie möglich zu halten. Die Agarose war zuvor in einem Mikrozentrifugenfilter zweimal mit jeweils 80 µl Wasser gewaschen worden. Nach einstündiger Reaktion bei 26°C und Schütteln bei 1000 rpm wurde die Reaktion abgebrochen, indem der Ansatz zentrifugiert und das Zentrifugat mit β-Mercaptoethanol versetzt wurde.

In Abbildung 33 ist das Schema dieser Versuche dargestellt: Anthracen und Maleimid werden als Substrate auf die mit Ribozym derivatisierte feste Phase gegeben und reagieren dort. Das Zentrifugat enthält ein Enantiomergemisch.

Die Produkte der bimolekularen Diels-Alder Reaktion wurden mittels HPLC analysiert.

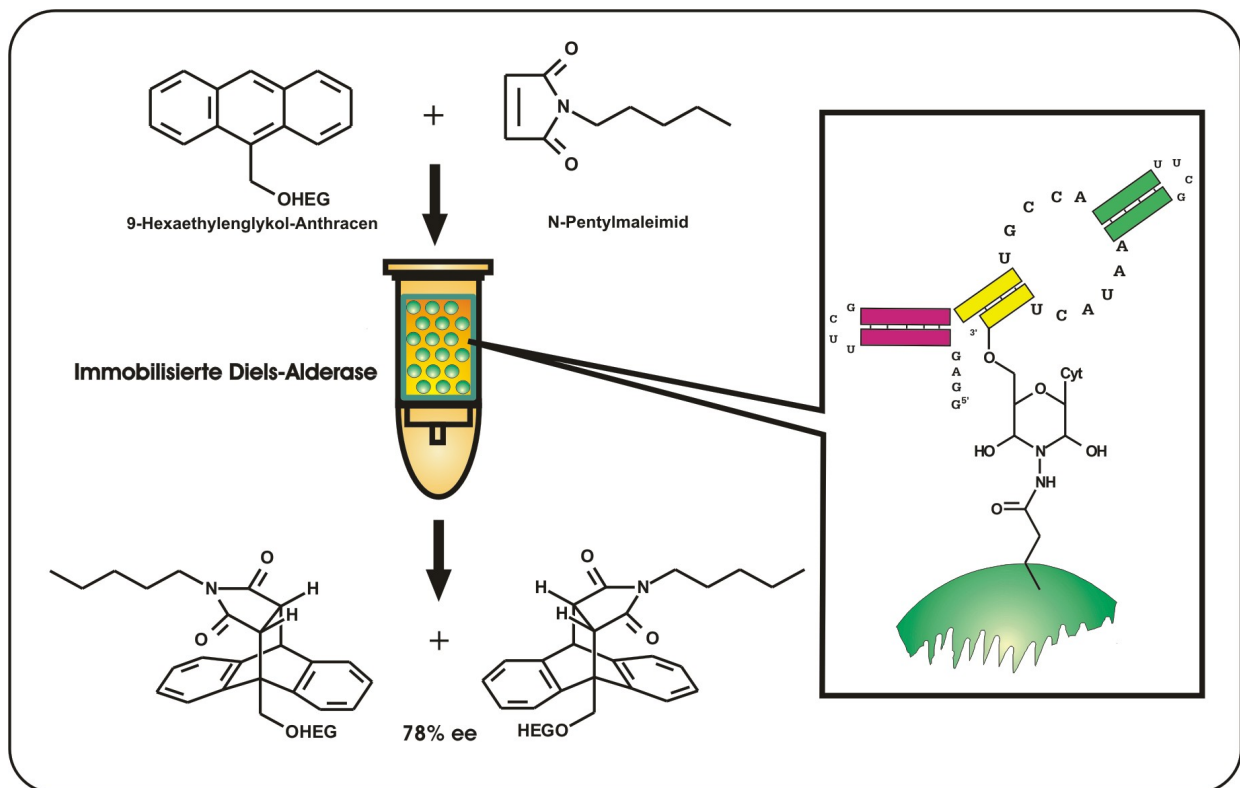


Abbildung 33: RNA katalysierte [4+2] Cycloaddition unter Verwendung einer Ribozym aktivierten Festphase.

Durch Vergleich der Produktbildung auf den diversen Festphasen konnte die katalytische Aktivität nachgewiesen werden. 600 pmol immobilisiertes Ribozym setzt 9.5 nmol 9-Hexaethylglykol-Anthracen unter den im experimentellen Teil beschriebenen

Reaktionsbedingungen um. Dieselbe Menge an freiem Diels-Alderase-Ribozym führt unter den gleichen Reaktionsbedingungen zu einer Umsetzung von 10.7 nmol an Anthracenderivat. Die Zugänglichkeit und Geometrie des katalytischen Zentrums wurden durch die Immobilisierung offenbar nicht verändert. Die Enantioselektivität der Reaktion ist durch das immobilisierte wie auch durch das freie Ribozym vergleichbar (78 ± 8 % ee versus 88 ± 8 % ee; siehe Abbildung 34). Unter Verwendung einer chiralen Säule und eines isokratischen Lösungsmittelgradienten (Wasser : Ethanol = 60 : 40) konnten die Produktpeaks der unterschiedlichen Enantiomere getrennt werden. Die untere Kurve in den Chromatogrammen korrespondiert mit der unkatalysierten Hintergrundreaktion. Beide Enantiomere liegen in ungefähr gleichen Mengen vor. Auf der linken Seite (A) sind die Produkte von der durch immobilisierte D-RNA katalysierten Reaktion, auf der rechten Seite (B) die des fixierten Spiegelmers zu erkennen.

Dementsprechend zeigt die linke Seite ein Enantiomer im Überschuss gegenüber des anderen, auf der rechten Seite ist die Situation umgekehrt.

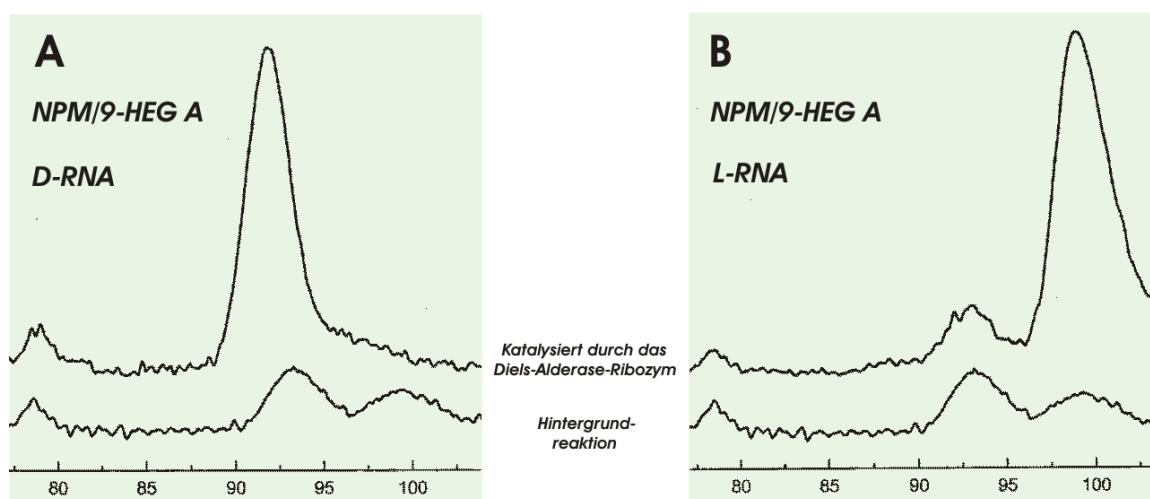


Abbildung 34: Chirale HPLC-Analyse der Diels-Alder-Reaktion; katalysiert von 49-mer D-RNA (A) und dem enantiomeren 49-mer L-Ribozym (B); jeweiliger Vergleich mit der unkatalysierten Hintergrundreaktion.

Für den praktischen Gebrauch von immobilisierten Katalysatoren ist ihre Langzeitstabilität ein wichtiges Kriterium. Um dies experimentell im Falle des immobilisierten Diels-Alderase Ribozyms auszutesten, wurde auf einer aktivierten Festphase über 40mal Reaktionen mit Anthracen- und Maleimidderivaten unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Experimente erstreckten sich über einen Zeitraum von ca. 10 Monaten. Zwischen den einzelnen Untersuchungen wurde die ribozymderivatisierte Agarose bei -20°C gelagert. Nach

43 Regenerierungen wies die Matrix noch 83% ihrer Anfangsaktivität auf (siehe Abbildung 35). Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich enantioselektiver Produktbildung detektiert werden. Diese Ergebnisse demonstrieren eine gute Langzeitstabilität der immobilisierten Diels-Alderase Ribozyme.

Wie von früheren Experimenten zu erwarten war, setzt auch das immobilisierte 49mer unterschiedlich substituierte Anthracen- und Maleimidderivate stereoselektiv um.

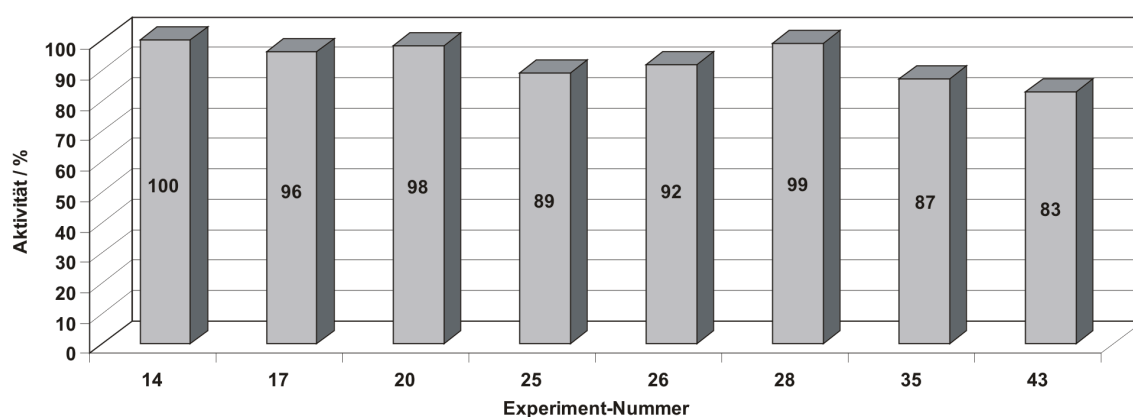


Abbildung 35: Untersuchungen zur Langzeitstabilität von immobilisiertem D-Ribozym. Relative Ausbeute von ribozym-katalysierter Reaktion zwischen 9-HEG A und NPM über eine Periode von 11 Monaten mit stets konstanten Reaktionsbedingungen.

4.3.4 Ausblick

Da gezeigt werden konnte, dass das maßgeschneiderte 49mer des Diels-Alderase Ribozyms im immobilisierten Zustand seine katalytischen Eigenschaften und die Selektivität beibehält, sollten zum einen weitere Studien zum systematischen Erforschen der Beziehung zwischen Substitutionsmustern, Reaktivität und Selektivität, zum anderen weitere Einsatzstrategien immobilisierter, maßgeschneiderter Ribozyme mit multiplen Turnover entwickelt und durchgeführt werden.

Da die hier verwendete, katalytische RNA im fixierten Zustand über 40mal regenerierbar war und eine sehr gute Langzeitstabilität aufwies, liegt es nahe, einen Ribozymreaktor zu konstruieren, der ein Durchflusssystem beinhaltet. Ein Reaktionsgemisch aus Substraten und Puffer durchläuft eine durch Filter verschlossene Zelle, in der sich eine feste Phase mit

immobilisiertem Diels-Alder-Ribozym befindet. Die Produktausbeute an entsprechendem Enantiomer hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Je mehr RNA immobilisiert vorliegt, je niedriger die Flussgeschwindigkeit des Reaktionsgemisches ist, desto höher wird der Umsatz sein. Da beim bisherigen System kein Druck angewendet wurde und ein Lösungsmittelfluss stets eine Druckerhöhung mit sich bringt, müsste zunächst ausgetestet werden, inwiefern die hier verwendete feste Phase ausgetauscht werden müsste. Agarose-Partikel sind druckempfindlicher als andere Trägermaterialien (z.B. CPG), was durchaus die katalytische Aktivität des Ribozyms beeinflussen könnte.

Außerdem wird der Erfolg eines solchen Durchflussreaktors maßgeblich von der Effektivität der verwendeten Katalysatoren beeinflusst. Die vom 49mer-Minimalmotiv der Diels-Alderase bewerkstelligte 1000fache Reaktionsbeschleunigung gegenüber der Hintergrundreaktion ist zwar sehr beachtlich, jedoch für einen großtechnischen Einsatz sicherlich zu gering. Schnellere Diels-Alderasen könnten dieses Projekt sozusagen katalytisch beschleunigen. D.h. eine erneute Selektion von Ribozymen, die eine [4+2] Cycloaddition zwischen Anthracen und Maleimid-Derivaten katalysieren, könnte einen erfolgversprechenden Durchbruch in dieser Synthesetechnik bringen.

Ist ein solcher funktionsfähiger Durchflussreaktor etabliert, so können weitere für spezielle Reaktionen maßgeschneiderte Ribozyme immobilisiert werden und somit durch die Kombination aus Selektion spezifischer Katalysatoren auf Nukleinsäurebasis und großtechnischer Durchflusssynthese ein neue Gebiete in der Wirkstoff- oder organischen Synthese betreten werden.

Zudem ist es denkbar, fixierte Ribonukleinsäuren in Screening-Verfahren zur Substrat-Evaluierung einzusetzen. Ein Ribozym wird z.B. auf einer oberflächenderivatisierten 96 Well-Plate immobilisiert und beschleunigt in jeder einzelnen Vertiefung mehr oder weniger eine Reaktion zwischen zwei Edukten, die in der Bibliothek-Substratmatrix als einzigartigen Kombination auftreten. Durch automatisierte Analytik per HPLC oder spektrometrische Verfahren sollten so die geeigneten Substratpaarungen für das Ribozym erkannt werden können.

4.4 Selektion schneller Diels-Alderase-Ribozyme

Um die Effizienz einer organischen, von immobilisierten Ribozymen katalysierten Synthese zu steigern, muss entweder eine größere Stoffmenge an Ribozym oder eine katalytisch aktivere RNA immobilisiert werden. Die erhöhte Ribozymkonzentration ist ein möglicher, aber durch die Bindungskapazität der verwendeten Festphase limitierter Weg. Weitaus effizienter wird die Immobilisierung von RNA-Enzymen von erhöhter Aktivität sein. Die folgenden Seiten werden die Strategie, Durchführung und Auswertung einer Selektion effektiverer Ribozyme anhand der Diels-Alderase aufweisen.

4.4.1 Selektionsstrategie

Die Katalyse der Diels-Alder-Reaktion durch Ribonukleinsäuren wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen ^[31, 36] beschrieben. Burkhard Seelig und Andres Jäschke isolierten jedoch Diels-Alderase-Ribozyme, die die Eigenschaften von echten Katalysatoren aufwiesen ^[31]. Die selektierten Biokatalysatoren beschleunigten die Reaktion zwischen Anthracen-PEG und Biotinmaleimid bis zu 20000fach.

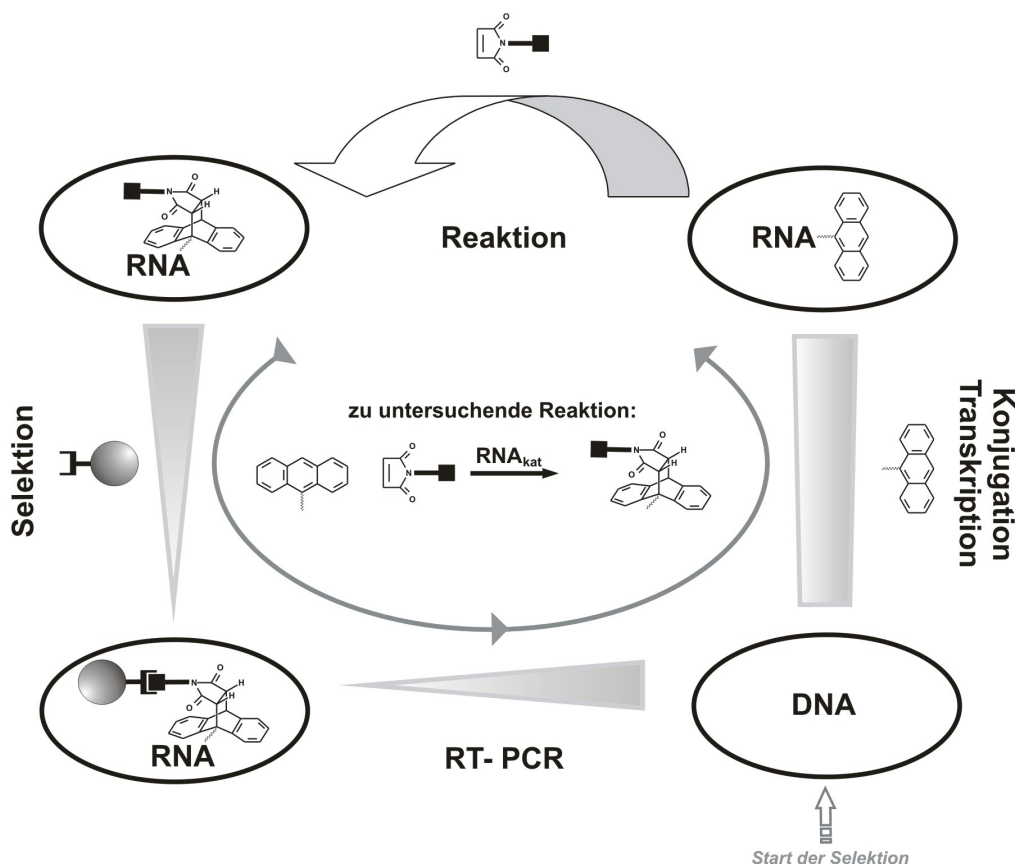


Abbildung 36: Selektionsschema für RNA-Katalysatoren der Diels-Alder-Reaktion.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, Ribozyme zu erzeugen, welche die Diels-Alder-Reaktion zwischen Anthracen und Maleimid besonders effizient katalysieren können. Dabei sollte der Selektionsdruck so erhöht werden, dass mit der Methode der „direkten Selektion linkergekoppelter Reaktanden“ Ribonukleinsäuren isoliert werden (siehe Abbildung 36), die die Diels-Alder-Reaktion schneller katalysieren als die bereits selektierten Moleküle.

Der angereicherte Pool der fünften Selektionsrunde von Burkhard Seelig schien ein geeigneter Ausgangspunkt für diese Selektion zu sein. Die Bibliothek war angereichert und sollte in der nächsten Runde zur Selektion von 15% der Gesamt-RNA bei einem Selektionsdruck von 60 Minuten führen.

Zunächst musste die DNA in RNA umgeschrieben und dabei über einen Linker das Anthracen eingeführt werden. Es wird in dieser wie in der ursprünglichen Selektion ein Anthracen-PEG-Guanosin als Initiator nukleotid^[44] verwendet (siehe Abbildung 37).

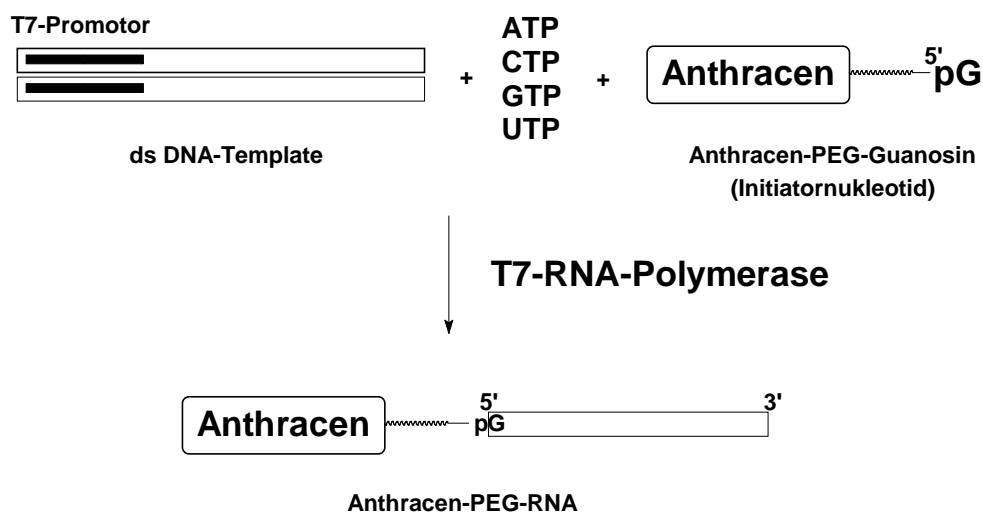


Abbildung 37: Schema der 5'-Modifizierung von RNA mit T7-RNA-Polymerase durch Verwendung Anthracen-PEG-Guanosin als Initiator nukleotid^[44].

Das Initiator nukleotid wurde im Labor für Studien des von Burkhard Seelig konstruierten Diels-Alderase-Minimalmotives zentral hergestellt und konnte daher direkt eingesetzt werden. Durch das eingesetzte Initiator nukleotid/GTP-Verhältnis von 2:3 wurde bei jeder Transkription eine Konjugation von ca. 50% angestrebt. Der zur Selektion als Matrize verwendete DNA-Pool erzeugte einen entsprechenden RNA-Pool, der aufgrund seines langen randomisierten Bereiches eine gewisse Verteilung der elektrophoretischen Mobilitäten aufwies. Außerdem bewirkte eine Anthracen-PEG-Modifizierung bei der großen Länge der RNA von 159 Nucleotiden nur einen sehr geringen Mobilitätsunterschied, so dass während der Selektion keine Trennung von Konjugat und reinem Transkript erfolgte. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass das Ausschneiden der Konjugat-Transkriptbande einen

wichtigen, exakt durchzuführenden Schritt darstellt. Verwendet man in der darauf folgenden Umsetzung die gesamte, eluierte RNA, so mag es keinerlei Versuchsbeeinflussungen geben. Sobald aber die Bande geteilt wird, kommt es zu einer von der Theorie abweichenden Transkript-Konjugat-Verteilung.

Zur Selektion von schnellen Diels-Alderase-Ribozymen muss ein höherer Selektionsdruck angelegt werden als der, der zur Generierung des 49mer-Minimalmotives führte.

Der Selektionsdruck kann generell verschiedenartig beeinflusst werden; durch Veränderung der eingesetzten Konzentrationen, durch Veränderung des pH-Wertes, wie auch durch die veränderte Reaktionszeit. Je kürzer die Reaktionszeit ist, desto höher ist der Selektionsdruck und es können dadurch effektivere, katalytisch aktive Ribonukleinsäuren isoliert werden.

Burkhard Seelig isolierte seine Ribozyme mit einem maximalen Selektionsdruck von einer Minute und terminierte die Reaktion durch Fällen des Reaktionsansatzes. Auf dem Gebiet der Enzymkinetik ist die Beobachtung von sehr schnellen Reaktionen üblich. Dabei werden Quenched-Flow-Apparaturen verwendet, mit denen Reaktionszeiten im Milli- und Mikrosekundenbereich generiert werden können ^[94-96]. Die Übertragung dieser Technik auf die hier beschriebene Selektion „schneller“ Ribozyme ermöglicht den geforderten, erhöhten Selektionsdruck. In Quenched-Flow-Experimenten kann die Ethanol-fällung aufgrund einer zu hohen Ungenauigkeit nicht mehr als terminierender Schritt eingesetzt werden.

Durch eine schnelle chemische Reaktion zwischen einem der Reaktanden, Anthracen oder Maleimid und einem reaktiven Agens könnte die kurze Reaktionszeit bewerkstelligt werden.

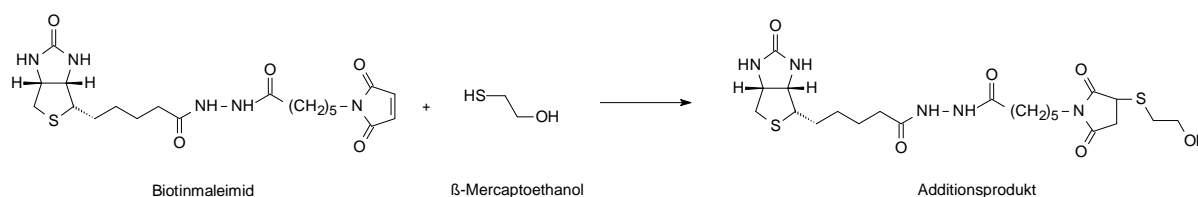


Abbildung 39: Reaktion zwischen Biotinmaleimid und β-Mercaptoethanol.

Maleimide addieren Thiole (siehe Abbildung 39). Die reaktive Doppelbindung im Maleimid kann durch Michael-Addition eines Thiols zerstört und eine Diels-Alder-Reaktion somit terminiert werden. Die Dauer der Reaktion wurde mit Hilfe einer Stopped-Flow-Apparatur der Firma BioLogic untersucht. Hierzu wurde Spritze S1 mit β-Mercaptoethanol- (0.5 M, in 1x Minimalpuffer, 2% v/v DMSO, 10% v/v Ethanol) und S2 mit Biotinmaleimid-Lösung (0.5

mM, in 1x Minimalpuffer, 2% v/v DMSO, 10% v/v Ethanol) gefüllt, die Reaktion initiiert und die Abnahme der Extinktion bei 303nm beobachtet.

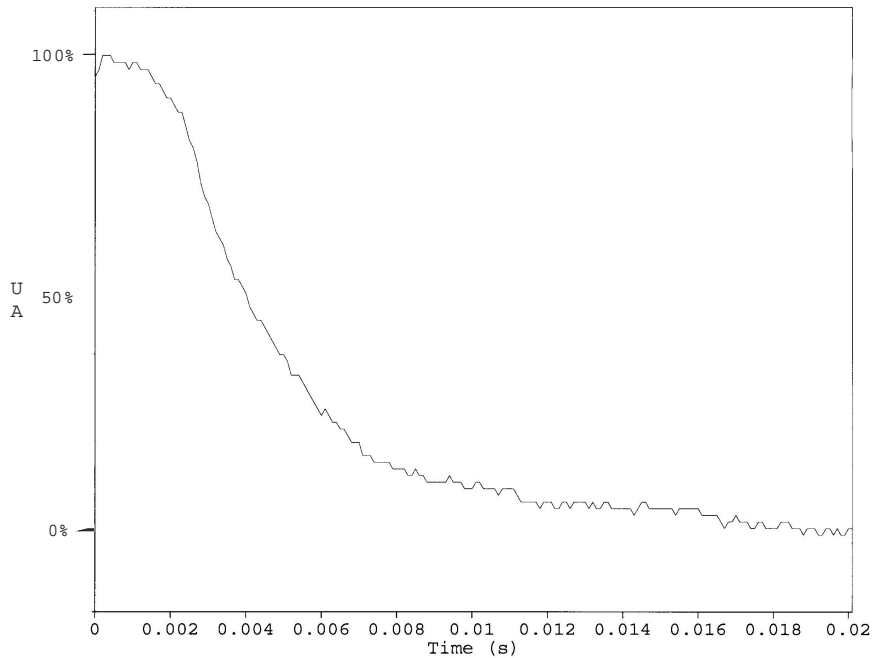


Abbildung 40: Reaktionskinetik zwischen Biotinmaleimid und β -Mercaptoethanol.

Wie der Abbildung 40 zu entnehmen ist, ist bei einem 1000fachen Überschuss von β -Mercaptoethanol (Quencher) gegenüber der Maleimidkomponente und unter Selektionsbedingungen die Reaktion nach 15ms abgeschlossen. Aufgrund dieser schnellen Reaktion ist es möglich den Selektionsdruck auf maximal 15 ms zu erhöhen. Da eine Reaktion schwerlich nicht einmal im Sekundenbereich mit den üblichen Handgriffen beendet werden kann, musste auf die Quenched-Flow-Apparatur der Firma Bio-Logik zurückgegriffen werden. Diese Apparatur besteht aus zwei Spritzen (S1, S2), zwei Probenschleifen (L1, L2), zwei Mixkammern (M1, M2), einer Reaktions- (RS) und einer Ausgangsschleife (AS) (siehe Abbildung 41).

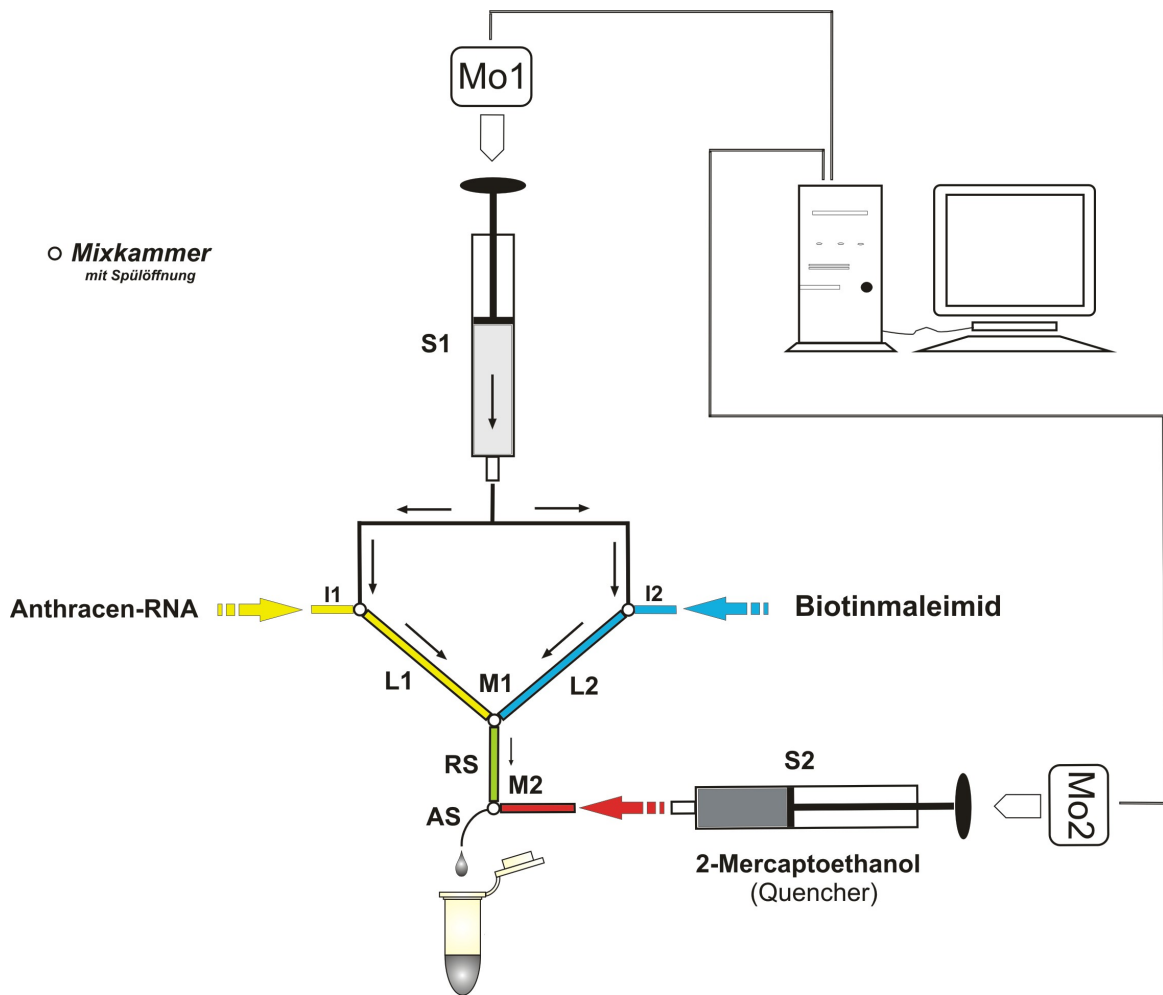


Abbildung 41: Schematische Darstellung der BioLogic Quenched-Flow-Apparatur.

Beide Spritzen werden über computerregulierte Motoren (Mo1, Mo2) als essentieller Bestandteil der Quenched-Flow-Apparatur gesteuert. S1 (Spritze 1) bedient L1 und L2, d.h. werden 100ul Wasser/Puffer aus S1 in das Schleifensystem injiziert, so werden jeweils 50ul aus L1/L2 über die Mixkammer 1 (M1) in die Reaktionsschleife (RS) überführt, wobei Reaktand 1 (aus L1) und Reaktand 2 (aus L2) genau solange in RS verweilen wie die in der Software (Biokine v3.27) eingestellte Reaktionszeit es vorsieht. Über S2 bzw. M2 wird der Quencher injiziert und die Reaktion abgebrochen. Die Ausgangsschleife (AS) führt das abreagierte Reaktionsgemisch in einen Auffangbehälter. Über Nachspülen von M2 ist es möglich, das verbleibende Volumen in AS mit Hilfe eines Luftüberdruckes in den Auffangbehälter zu überführen. Das Reinigen der Reaktionsschleife erfolgt über die Spülöffnung von M1 mittels Wasser/Pufferinjektion.

Die Funktion der Anlage wurde mit Farbstofflösungen (Bromphenolblau) und anschließender Quantifizierung per UV-Absorption überprüft. Im Auffangbehälter konnten maximal 80% der

zu erwartenden Menge detektiert werden. Aufgrund der einfach gestalteten Misch- und Spülkammern ist davon auszugehen, dass die restliche Menge erst nach erfolgter Reaktion entfernt werden konnte.

Sämtliche Leitungen bestanden aus Plastikschläuchen (PE), die ohne Vorbehandlung einen Teil der RNA durch elektrostatische Wechselwirkungen gebunden hätten. Durch prophylaktisches Spülen sämtlicher Schleifen mit einer t-RNA-haltigen (2mg/ml), wässrigen Lösung konnte dieses Phänomen weitestgehend unterdrückt werden. Ständige Kontrolle mit Radioaktivitätsdetektoren sorgten für den Überblick über den Verbleib der radioaktiv markierten RNA.

4.4.2 Durchführung der Selektion

Der angereicherte Pool der fünften Selektionsrunde von Burkhard Seelig war der Ausgangspool dieser Selektion. Diese angereicherte DNA-Bibliothek wurde zunächst mittels Polymerasekettenreaktion erneut vervielfältigt und anschliessend mit DNA-abhängiger T7-RNA-Polymerase (siehe Abbildung 43) transkribiert, wobei in Anwesenheit von Anthracen-PEG-Initiatornukleotid (GTP : Initiator = 3 : 2) ca. 50% Konjugat entstanden ist. Die Transkript und Konjugat beinhaltende Bande wurde komplett ausgeschnitten, zweimal eluiert, die RNA mittels Ethanol fällung präzipitiert, mit EtOH gewaschen und anschliessend getrocknet. Vor den Selektionsrunden 6 und 11 wurde, um unspezifisch bindende Nukleinsäuren zu isolieren und zu verwerfen, eine Gegenselektion durchgeführt (vgl. 3.10). Anschließend (bzw. in den anderen Selektionsrunden direkt ohne Gegenselektion) wurde das Konjugat mit Biotinmaleimid umgesetzt. Hierzu wurde die RNA in Minimalpuffer kurzzeitig bei 85°C denaturiert, die Renaturierung erfolgte innerhalb von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Der stets verwendete Minimalpuffer entspricht dem optimierten Puffersystem für das Minimalmotiv der Diels-Alderase. Das RNA-Konjugat mit einer finalen Konzentration von 0,03 µM – 0,2 µM (vgl. 3.10) wurde dann mit 25 µM (final) Biotinmaleimid inkubiert. Nach der entsprechenden Reaktionszeit erfolgte die Termination der Reaktion durch Inkubation mit 25 mM β-Mercaptoethanol. Die gesamte RNA wurde zur vollständigen Entfernung des inaktivierten Biotinmaleimids und des Quenchers zweimal gefällt, in Immobilisierungspuffer gelöst, hitzedenaturiert und in einem Mikrozentrifugenfilter mit der Streptavidinagarose inkubiert. Diese war zuvor mit t-RNA behandelt worden (vgl. 3.6), um eventuell vorhandene unspezifisch RNA-bindende Stellen abzusättigen. Die nicht immobilisierten RNAs wurden abzentrifugiert und die Streptavidinfestphase mehrfach in denaturierendem Waschpuffer aufgeschlämmt und auf einen neuen Mikrozentrifugenfilter

gegeben. So konnten eventuell am Filter unspezifisch immobilisierten RNAs abgetrennt werden. Die RNA wurde direkt von der Streptavidinfestphase herunter revers transkribiert und mittels PCR amplifiziert. Es wurde dem Ansatz Rinderserumalbumin zugesetzt, um eine mögliche Adsorption der Enzyme auf der Festphasenoberfläche zu minimieren. Nun wurde eine weitere Selektionsrunde begonnen.

Die Einstellung und Überprüfung des Selektionsdruckes erfolgte bis zu einer Reaktionszeit von 10 Sekunden per Hand und Stoppuhr. Bei größerem Selektionsdruck musste die Quenched-Flow-Apparatur verwendet werden. Beim manuellen Arbeiten konnten durch variable Volumengestaltung stets die oben angegebenen Konzentrationen eingehalten werden. Sobald jedoch die Quenched-Flow-Apparatur verwendet wurde, war die 50 μ l-Probenschleife für die RNA-Konzentration limitierend.

Der Probenschleife ($V = 50 \mu$ l) ist eine Injektionschleife ($V = 10 \mu$ l) vorgeschaltet. Die RNA musste in genau so viel Minimalpuffer gelöst werden, dass, um die Probenschleife zu füllen, auch die Injektionschleife komplett mit Medium gefüllt war. Weitere 50 μ l waren für das Spritzen-Totvolumen etc. nötig. D.h. die RNA (200 pmol – 60 pmol), die je nach Transkriptionsausbeute erhalten wurde, musste mindestens in 110 μ l gelöst und im Experiment eingesetzt werden. Da Ribonukleinsäuren eine hohe Affinität bezüglich Plastik (PE) aufweisen, konnte trotz Verwendung silanisierter Reaktionsgefäße nie die vollständige Substanzmenge in Lösung gebracht werden. Demzufolge war in jeder Selektionsrunde (Reaktionszeit < 10 s) die tatsächliche Konzentration an Konjugat = 0.2 μ M. Biotinmaleimid- und β -Mercaptoethanol konnten durch eine große Menge an Reinsubstanzen stets in den genau angegebenen Konzentrationen eingesetzt werden. Es ist kein multipler Turnover durch die kovalente Verknüpfung von Anthracen und RNA möglich und somit für die Katalysatoren nur die lokale Konzentration an Biotinmaleimid bestimmend. Da diese für jedes Anthracen-Molekül gleich bleibt, sollte die zwangsweise Senkung der Konjugat-Konzentration keinen größeren Einfluss auf den Gesamtselektionsdruck besitzen.

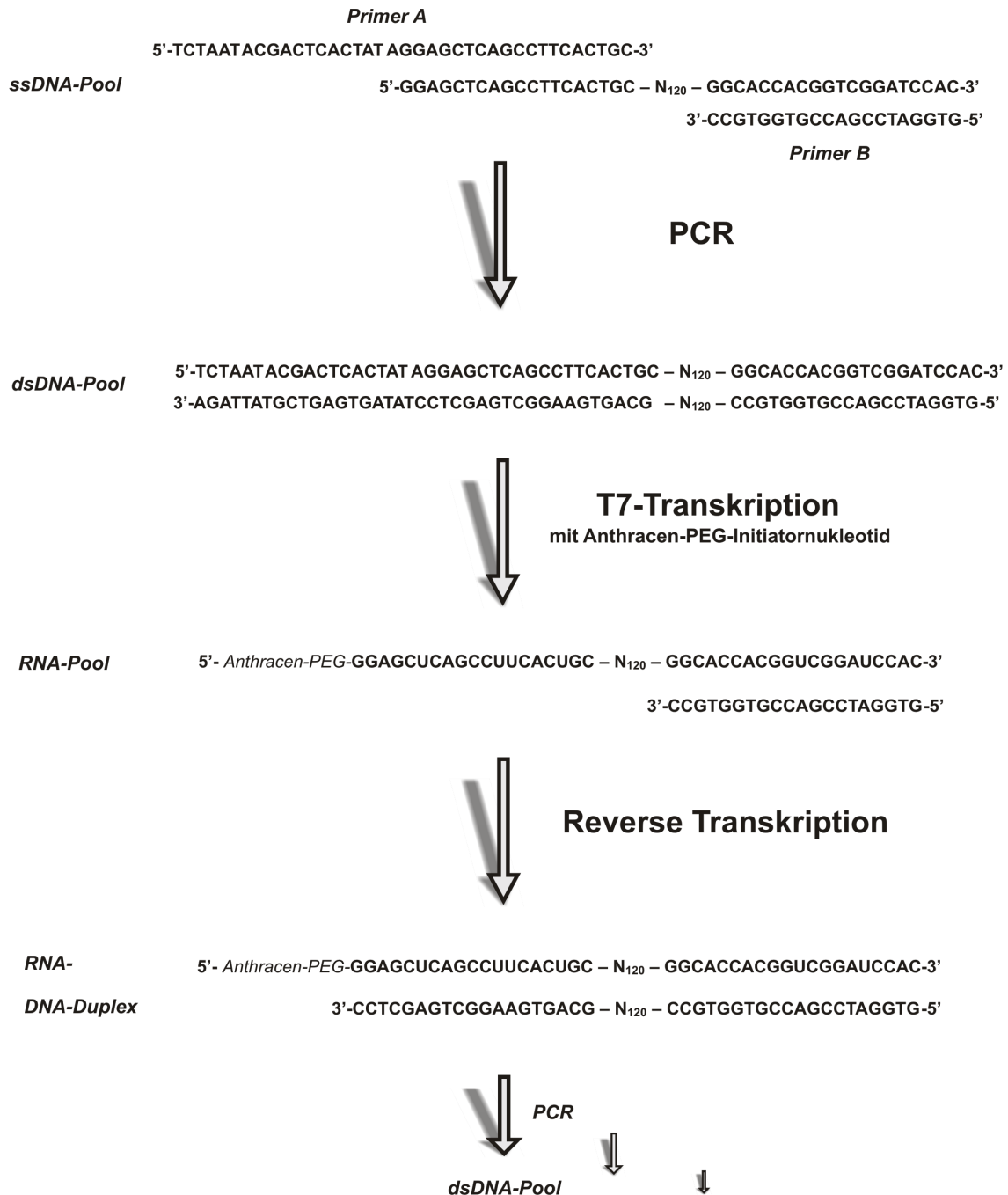


Abbildung 42: Sequenzgenaue Darstellung eines Selektionszyklusses.

Neben Gegenselektionen (vor der 6. und 11. Selektionsrunde) wurden abweichend von der standardmäßig durchgeführten Selektionsprozedur mutagene PCRs (vor der 7. und 10. Selektionsrunde) durchgeführt. Hierdurch sollte die Diversität der angereicherten DNA-Bibliothek erhöht und durch Punktmutationen RNA-Moleküle generiert werden, die bessere katalytische Eigenschaften als die der Ursprung-RNA aufweisen. Ob durch die Verwendung des GeneMorphTM PCR Mutagenesis Kits der Firma Stratagene tatsächlich die Moleküle

entstanden sind, die letztendlich selektiert wurden, oder wie hoch die reale Mutationsrate war, konnte nicht nachvollzogen werden.

In den ersten fünf Runden der Selektion, die Burkhard Seelig innerhalb seiner Doktorarbeit durchführte, wurden 0.1 % und 0.2 % RNA durch Immobilisierung an der Streptavidinfestphase selektiert. Es war die Aufgabe dieser Doktorarbeit, in den darauf folgenden Zyklen differente Ribonukleinsäuren zu isolieren. Die sechste Runde wurde mit unverändertem Pool durchgeführt. Es konnten nach fünfminütiger Reaktionszeit 13 % des RNA-Konjugats an der Festphase immobilisiert werden (siehe Abbildung 43).

Der erwartete Anstieg wurde damit nachvollzogen und die erhaltene DNA mittels mutagener PCR verändert. In dem darauffolgenden Zyklus konnten mit demselben Selektionsdruck 13 %, mit einer Reaktionszeit von 30 s gerade 3 % der RNA-Konjugate zurückgehalten werden. Wie sofort erkennbar ist, hat die mutagene PCR aktive Sequenzen inaktiviert und somit den bei fünfminütiger Inkubation zu erwartenden Anstieg verhindert. Unter der Annahme, dass neben den inaktivierten Molekülen auch neue und vielleicht effektivere Katalysatoren generiert wurden, konnte tatsächlich von erfolgreichen Mutationen innerhalb der mutagenen PCR ausgegangen werden.

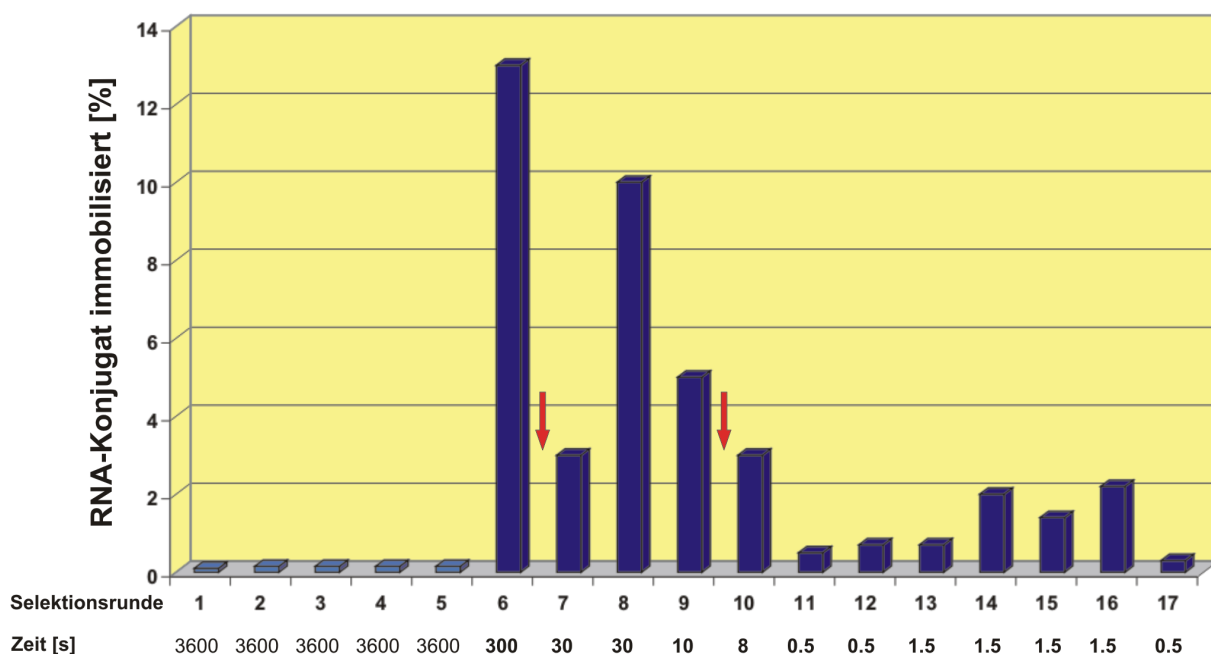


Abbildung 43: Anreicherung der biotinylierten RNA in jeder Selektionrunde.

↓ : *in vitro*-Mutagenese.

Um zwei Reaktionen parallel durchzuführen, einmal bei gleicher, einmal bei verkürzter Reaktionszeit, wurde generell nach jeder Selektionsrunde die erhaltene RNA in der doppelten Menge Minimalpuffer, wie es für einen Ansatz beschrieben wurde, gelöst. Beide Ansätze waren nötig, um einerseits die Anreicherung nachzuvollziehen und andererseits die Selektion voranzutreiben.

Der Selektionsdruck wurde in den Runden 7, 8, 9, 10 und 11 kontinuierlich erhöht (siehe Abbildung 43), die Immobilisierungsrate nahm wie zu erwarten kontinuierlich ab. Bei einer Reaktionszeit von 0.5 s wurde der Druck nicht weiter erhöht. Es konnte ein Immobilisierungsratenanstieg von 0.3% in der Runde 11 auf 0.5% in der Runde 12 registriert werden.

Der Nukleinsäure-Pool erholte sich anscheinend allmählich von den zuvor drastisch veränderten Reaktionsbedingungen. Allerdings musste in der darauffolgenden Selektionsrunde die Reaktionszeit auf 1.5 s erhöht werden, da widererwartend die Immobilisierungsrate eingebrochen wäre. In den Selektionsrunden 13, 14, 15 und 16 blieb der Selektionsdruck unverändert bei 1.5 s, was zu einem temporär geringen Anstieg der Immobilisierungsrate führte. Wären alle auf der Festphase zurückgehaltenen Moleküle Biokatalysatoren, die innerhalb von 1.5 s die Reaktion beschleunigten, dann hätte sich der Anstieg in einer anderen Größenordnung bewegen müssen. Aufgrund der Amplifikation aller zurückgehaltener aktiver Moleküle, wäre von 0.7 % (Runde 13), nach praktischer Erfahrung zu urteilen, ein Anstieg auf 20 - 40% statt „nur“ auf 2% (Runde 14) zu erwarten gewesen.

In der Selektionsrunde 17 wurde nochmals der Selektionsdruck auf 0.5 s erhöht und dabei 0.3 % der RNA-Konjugate immobilisiert. Aufgrund der Tatsache, dass der verwendete Nukleinsäure-Pool erschöpfend extrahiert wurde, musste angenommen werden, dass weiteres Senken der Reaktionszeit keinen Effekt hätte erkennen lassen können.

Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass insgesamt weit über 40 Selektionsrunden durchgeführt wurden und hier nur die Selektionslinie dargestellt wird, welche letztendlich zur Isolierung von Einzelstrukturen führte.

Wie in Abbildung 44 zu erkennen ist, ist der Sättigungsgrad bezüglich der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten (k_{app}) schon nach der 14. Selektionsrunde erreicht. Es waren offensichtlich keine weiteren effektiven RNA-Katalysatoren aus dem angereicherten Pool zu isolieren. Die Selektion wurde abgebrochen.

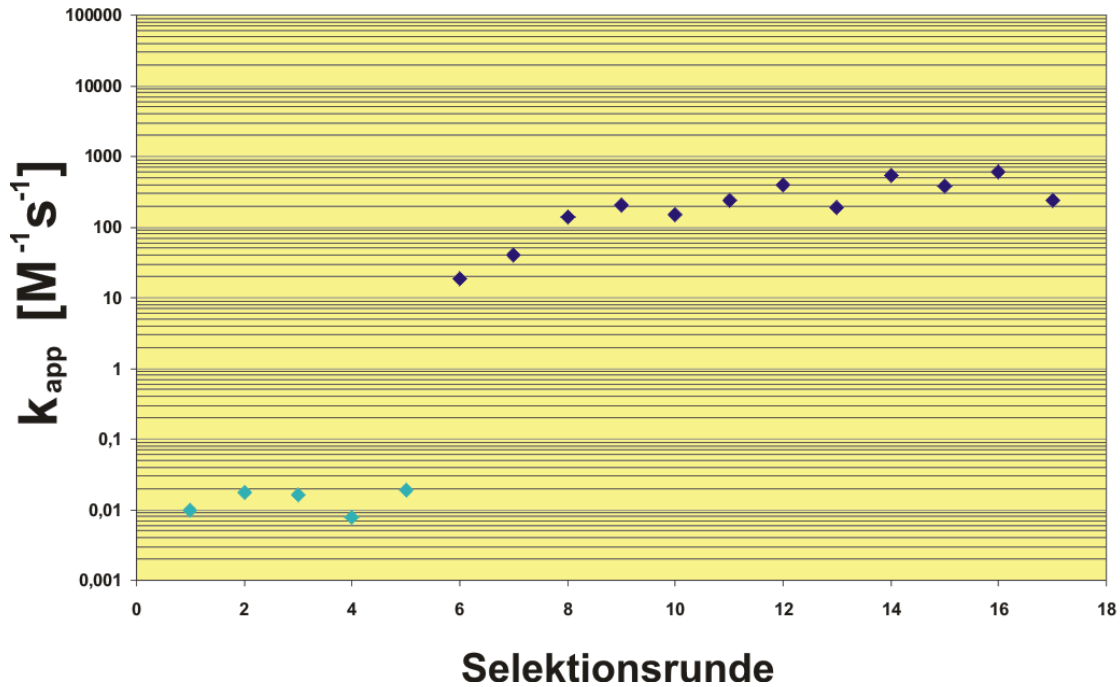


Abbildung 44: Erhöhung der Ribozymaktivität im Verlauf der Selektion.

Werden die hier ermittelten Sättigungswerte für k_{app} mit denen von Burkhard Seelig verglichen, so ist eine Erhöhung zu erkennen. Die scheinbare Geschwindigkeitskonstante des RNA-Pools in der Seelig'schen Runde 10 (letzte Runde mit höchstem k_{app}) betrug $85 M^{-1} s^{-1}$, wohingegen der 16.-Runden-Pool dieser Selektion den maximalen k_{app} -Wert $590 M^{-1} s^{-1}$ aufwies. Dies entsprach einer 50000-fachen Reaktionsbeschleunigung. Der Verbesserungsfaktor von ~ 7 sollte sich tendenziell in der Einzelsequenzanalyse bestätigen lassen.

4.4.3 Klonierung und Sequenzanalyse

Die nach den Selektionsrunden 15 (JS15D1; A), 14 (JS14C1.5; B), 10 (JS10C; C) und 8 (JS8C; D) erhaltenen katalytisch aktiven RNAs wurden in DNA umgeschrieben, mittels PCR amplifiziert und anschliessend mit einem Cloning Kit der Firma Qiagen kloniert. 70 Klone konnten von LB-Nährplatten isoliert und mittels PCR unter Einsatz von M13universal- und M13reverse-Primer direkt aus den Zellen heraus amplifiziert und zum Sequenzieren (SeqLab) geschickt werden.

Nach Erhalt und Auswertung der Sequenzierungsdateien konnten 53 Primärstrukturen eindeutig festgelegt werden. Nach Aussortieren der eigenen Dubletten und von Burkhard Seelig isolierten Moleküle, verblieben 39 Sequenzen.

Um aus den 39 Klonen die individuellen RNA-Spezies durch T7-Transkription herstellen zu können, wurden wiederum direkt aus den Zellen heraus unter Einsatz von Primer A und B die DNA amplifiziert und anschließend in RNA unter Anwesenheit von Anthracen-PEG-Initiatornukleotid umgeschrieben. Nach spektrometrischen Assays verblieben 19 Sequenzen, die genauer betrachtet werden sollten.

Hierzu wurden erneut von den entsprechenden Klonen RNA-Konjugate hergestellt und diese am Fluoreszenzspektrometer der Firma Biologik kinetisch vermessen.

Primärstrukturen der Klone	k_{app} ($s^{-1}M^{-1}$)
>1406JS11 B1 GGAGCTCAGCCTTCACCTGCGGGAGCAAGGAGTTTCGACTGCAAGCCCCGATAGGAAGACTGAGAACC TGCCA ACCAGATGTTAACGTTGACATACCATCGGG AATACT CGTCTG GTTTCGGCGTGGTGAITTTGTTATCGGGACCACCGGTCGGATCCAC	852
>2106JS19 C10 GGAGCTCAGCCTTCACCTGCGGTAGCTTAGGATGCTACCCCGGAAGCTGAGGCTG TGCCA GGTAAGGTAATAAACACAGACC AATACT CAGCACAATAATAATGGGTCTGA TGGTCAITCTCGTGTGCCCTCCCTAGGCCACCACCGGTCGGATCCAC	394
>0606JS16 B5 GGAGCCAGCCTTCACCTGCTGGGGCATATACGTGATCCACTAGTAGCTGGGACCG TGCCA CGACATGGAGGTACACACTGTCACCCCATGTTG AATACT CGGTATGGGTCGTAG CCGCGCCTTCACAGGCCACCACGGTCGGATCCAC	529
>0606JS10 B4 GGAGCTCAGCCTTCACCTGCTGGGGCATATACGAGACCCACTAGTAGCTGGGACCG TGCCA CGACATGGAAGTACTCACTGTCACCCCATGTTT AATACT CGGTATGGGTCGTGA GCCGCGCCTTCACAGGCCACCACGGTCGGATCCAC	867
>2106JS04 D6 GGAGCTCAGCCTTCAC TGCCA GCCAAAGCATTTCGAGCCAGACAGTATCCGCTGAGGCTG TGCCA ACGAAATGTCGCTGTCTATGTAGCGATTTCGT GATACT CAGCGT GTCGCCAGACCGTTGCTTCAGGGCACCACGGTCGGATCCAC	157
>0606JS04 D3 GGAGCTCAGCCTTCAC TGCCA GCCAAAGCATTTCGAGCCAGACAGTATCCGCTGAGGCTG TGCCA ACGAAATGTCGCTGTCTATGTAACGATTTCGT GATACT CAGCGT GTCGCCAGACCGTTGCTTCAGGGCACCACGGTCGGATCCAC	94
>2106JS03 C6 GGAGCTCAGCCTTCAC TGCCA GCCAAAGCATTTCGAGCCAGACAGTATCCGCTGAGGCTG TGCCA ACGAAATGTCGCTGTCTATGTAACGATTTCGT GATACT CAGCGT GTCGCCAGACCGTTGCTTCAGGGCACCACGGTCGGATCCAC	108
>0606JS17 C5 GGAGCTCAGCCTTCAC TGCCA GCCAAAGCATTTCGAGCCAGACAGTATCCGCTGAGGCTG TGCCA ACGAAATGTCGCTGTCTATGTAACGATTTCGT GATACT CAGCGT GTCGCCAGACCGTTGCTTCAGGGCACCACGGTCGGATCCAC	138
>0606JS15 A5 GGAGCTCAGCCTTCAC TGCCA GCCAAAGCATTTCGAGCCAGACAGTATCCGCTGAGGCTG TGCCA ACGAAATGTCGCTGTCTATGTAACGATTTCGT AATACT CAGCGT GTCGCCAGACCGTTGCCCTCAGGGCACCACGGTCGGATCCAC	535
>0606JS09 A4 GGAGCTCAGCCTTCAC TGCCAATACTGCCA ACGCGATTCTCGGGCAGGCTGGGATCGTGCCGCCCTGTGTAGTTACGATCTAAGGATCATCTTGATTCGGCTCCGAAAGGG AACACTCGATGGGATCTGGCACCACCGGTCGGATCCAC	482
>0606JS01 A3 GGAGCTCAGCCTTCAC TGCTAATACCGCCA ACGCGGCTCTGTCGAGGCTGGGATCGTGCCGCCCTTTGTAGTTACGACATAAAGGATCACCTTGATTCGGCTACGTAAGGGA ACACTCGATGGGATCTGGCACCACCGGTCGGATCCAC	309
>2106JS26 B12 GGAGCTCAGCCTTCACCTGATTGCTATGGAGACTGGGGCTG TGCC GCCCGGCCCGCTGTATGAAT AATACT GACGCTAAGGCCGGG AATACT CAGCACTATGGACCGACT GTCATATTCCTCTCGGGCACCACCGGTCGGATCCAC	482
>2106JS14 B09 GGAGCTCAGCCTTCACCTGCGTAGAGATGTCGCATGTCACCTCCCTACAAGTGCTCACGCGTGTCTCGCCGATGCACCTAAGCTGAGGCC TGCCA GGAAATCGCGATTTC AAT ACT CGGCACCACCGGTCGGATCCAC	361
>0406JS04 B2 GGAGCTCAGCCTTCACCTGCTGGCTGAGTCCG TGCCA GCTAACCGTCCATTTCGACGGTAGA AATACT CGGAATTATTCTGTTTTGGGTCACACCCCTGGATCTCCTTTGTTATGACT TTACCTCGTAACACGGGCACCACCGGTCGGATCCAC	884
>2106JS17 A10 GGAGCTCAGCCTTCACCTGCTGGCTGAGTCCG TGCCA GCTAACCGTCCCTTCGACGGTGA AATACT CGGAATTATTCTTTCTCGGATTACACCCCTGGATCTCCTTTTGTATGA CGTTATGTCGTAACACGGGCACCACCGGTCGGATCCAC	556
>0406JS01 A1 GGAGCTCAGCCTTCACCTGCTGGCTGAGTCCG TGCCA GCTAACCGTCCCTTCGCGGTAGA AATACT CGGAATTATTCTTTTCGGATTACACCCCTGGATCTCCTTTTATGACT TTACGTCATAACACAGGGCACCACCGGTCGGATCCAC	735
>2106JS22 B11 GGAGCTCAGCCTTCACATGCTGAGACCG TGCCA GCTACCCGTCCTTCGACGGTAGA AATACT CGGAATTATTCTTTTTCGGATTACGCCCTGGATCTCCTTTGTTATGACTTT ACGTCGTAACACGGGCACCACCGGTCGGATCCAC	943
>0606JS02 B3 GGAGCTCAGCCTTCACCTGCTGAGGCC TGCCA GGATGTCGCTCCTGAATTACGATTCCCAAAAGTTGGGAGTTCTCCCTCAGATCCTGGGCTTCGATTCTTAAACGGGCGT TC AATACT CGGCACCACCGGTCGGATCCAC	723
>2407JS01 C1 GGAGCTCAGCCTTCACCTGCTGAGACCG TGCCA ACCTTTCATGGAGGCGTGGCTCCCTGACATCACCAATCTCTGAAGCGT AATACT CGGACTTCTTACCAAGTGTGCTTTTG AGTTTCACTT CGGGCACCACCGGTCGGATCCAC	119

Abbildung 45: Primärstrukturen der katalytisch aktiven Sequenzen mit Geschwindigkeitskonstanten (k_{app}); Graphisches Schema: konstante Sequenz für Primer-Bindung, Bulge 1 und Bulge 2, Punktmutationen.

14 Sequenzen beschleunigten die Reaktion mehr als 23000-fach. Die besten Sequenzen besaßen eine k_{app} von etwa $940 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, einer Beschleunigung um den Faktor 72000. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der aktiven Klone sind in Abbildung 45 dargestellt. Werden diese Klone mit den von Burkhard Seelig isolierten und kinetisch charakterisierten Molekülen ($k_{app} < 241 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) verglichen, so ist eine deutliche Verbesserung der Geschwindigkeitskonstanten zu erkennen.

Betrachtet man die katalytischen Eigenschaften der angereicherten Nukleinsäure-Bibliotheken (vgl. 4.4.2), so fällt im Vergleich zu den Seeligschen Pools eine Diskrepanz auf. Der dort bemerkte Verbesserungsfaktor ~ 7 ist im Einzelsequenzvergleich nicht zu erkennen, er beträgt 3.5. D.h. innerhalb der Klonierung müssen Sequenzen nicht berücksichtigt worden sein, so dass katalytisch weniger aktive Ribonukleinsäuren im weiteren Verlauf mitgeschleppt wurden.

Dies kann durch das willkürliche Aussuchen und Weiterverarbeiten der auf dem LB-Medium gewachsenen Kolonien erklärt werden. Manche Kolonien wuchsen sehr dicht beieinander, so dass die Isolierung einer einzelnen unmöglich war, andere konnten ohne Beeinträchtigung anderer Klone aufgenommen und weiterverarbeitet werden. Es ist möglich, dass innerhalb dieses Schrittes einige sehr aktive Ribozyme verloren gegangen sind.

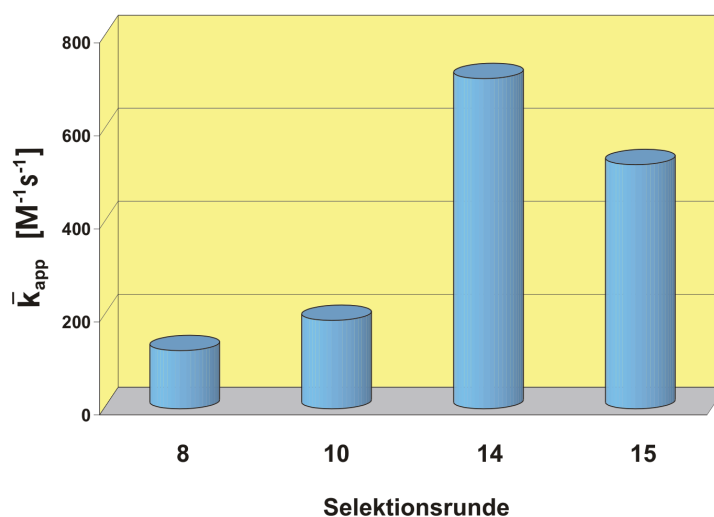


Abbildung 46: Mittelwertanalyse der Einzelsequenz-Geschwindigkeitskonstanten bezogen auf die zur Klonierung verwendeten Pools.

Die Einzelsequenz-Zuordnung zu den ursprünglichen Pools bestätigt die Theorie. Hierzu wurden die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Poolsequenzen gemittelt. Die schnellsten Ribozyme stammen aus dem klonierten Pool der 14. Selektionsrunde. Die niedrigsten Geschwindigkeitskonstanten weisen die Sequenzen der 8.-Runden-Bibliothek auf. Die Ribozyme aus der 15. Selektionsrunde sind weniger aktiv als die des vorangegangenen

Zyklus. Dies ist zum einen durch die nicht optimale Isolierung einzelner Kolonien wie auch durch die generell geringere Aktivität des Pools (vgl. 4.4.2) und damit mit dem Verlust aktiver Moleküle während der Selektion erklärbar.

Neben den erhaltenen kinetischen Daten sind die Primärstrukturen und die Kombination beider von Bedeutung. Burckhard Seelig entwickelte aufgrund seiner Selektion das 49mer-Diels-Alderase-Minimalmotiv (siehe Abbildung 47). In diesem Modell sind manche Strukturmerkmale besonders auffällig und für die Aktivität des Ribozyms essentiell.

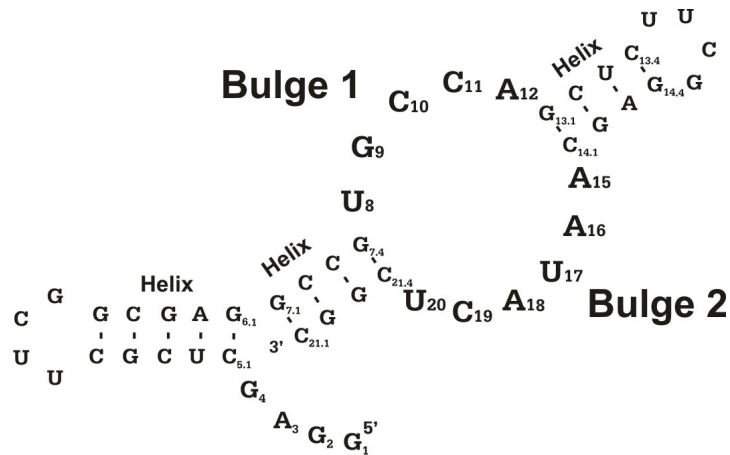


Abbildung 47: 49-mer Minimalmotiv des Diels-Alderase-Ribozyms

Die wichtigsten Strukturelemente, die zur katalytischen Aktivität des Minimalmotives beitragen, sind Bulge 1 und 2 sowie die mittlere Helix. Die Bulges bilden vermutlich durch ihre blasenartige Struktur das katalytische Zentrum des Ribozyms, in welches der GGAG-Terminus als „Arm“ hineinragt. Die Helices übernehmen ebenfalls eine essentielle, vorrangig stabilisierende Rolle. Die mittlere Helix liegt in der Länge auf vier Basenpaare konserviert vor. Die den Bulgebereich abschließenden Basenpaare stellen ein wichtiges Element des 49mer-RNA Enzyms dar. Die Nukleotide 7.4 und 21.4 sind bezüglich Purin- und Pyrimidinbasen konserviert, wohingegen die Nukleotide 13.1 und 14.1 Mutationen sowie Basenfehlpaarungen erlauben. Der Bereich 7.4/21.4 muss einem Watson-Crick-Basenpaar der angegebenen Purin-Pyrimidin-Orientierung entsprechen, sonst wird die Katalyse-Aktivität des Oligonukleotides weitestgehend unterbunden ^[97].

Anhand des Sekundärstrukturvorschlages zur Sequenz von Klon 0406JS01 A1 (siehe Abbildung 48) werden die erhaltenen Struktur motive diskutiert. Die Sekundärstruktur wurde mit dem RNA-Faltungsprogramm *RNA mfold* ^[98] generiert und stellt die Nukleinsäure in der energetisch günstigsten Faltung (freie Energie = -47.5 kcal/mol) dar. Die Blasen-Motive (Bulge1 und Bulge2) des 49mers sind auch hier vorhanden. Sie bilden im Sekundärstrukturmodell als gegenüberliegende, einzelsträngige Bereiche ebenfalls ein

Blasenmotiv. Die bulge-abschließende Basenpaare bestehen hier in korrekt ausgerichteten, komplementären G-C-Anordnungen, die in flankierende, doppelsträngige Bereiche übergehen. Die Nukleotide 38 und 60 könnten im Vergleich zum 49-mer Minimalmotiv eine tolerierbare Fehlpaarung und damit eine Blasenweiterung darstellen. Das der Blase angeschlossene Stamm-Triplet CCG bzw. CGG und der freie GGAG 5'-Terminus sind ebenfalls im Vergleich mit dem Minimalmotiv des Diels-Alderase-Ribozyms wiederzufinden, wobei ein weiteres komplementäres A-U-Basenpaar sich anschließen könnte. Dies wäre zum einen mit der der Länge nach konservierten Helix des Minimalmotives vereinbar und zum anderen könnte es auf einen Klappmechanismus des folgenden, uridinreichen Bereiches hindeuten. Es ist anzunehmen, dass Uridin durch seine Eigenschaft mit allen anderen Basen Paare bilden zu können ^[99], als Polyuridin aktiv an der Katalyse der Diels-Alder-Reaktion teilnimmt. Dies könnte durch temporäre Basenpaarung der Bereiche 71-76 mit 78-83 geschehen.

Es sind komplementäre Quintette bemerkenswert. Die Bereiche von Nukleotid 31-35 sowie 132-136 könnten in der Tertiärstruktur miteinander wechselwirken und somit eine wichtige Funktion in der Katalyse der Diels-Alder-Reaktion übernehmen. Die temporäre Basenpaarung der Quintette könnten an Substratbindung und Produktauswurf via KICK-IN-/KICK-OFF-Mechanismus durch Konformationsänderung der dreidimensionalen Struktur beteiligt sein.

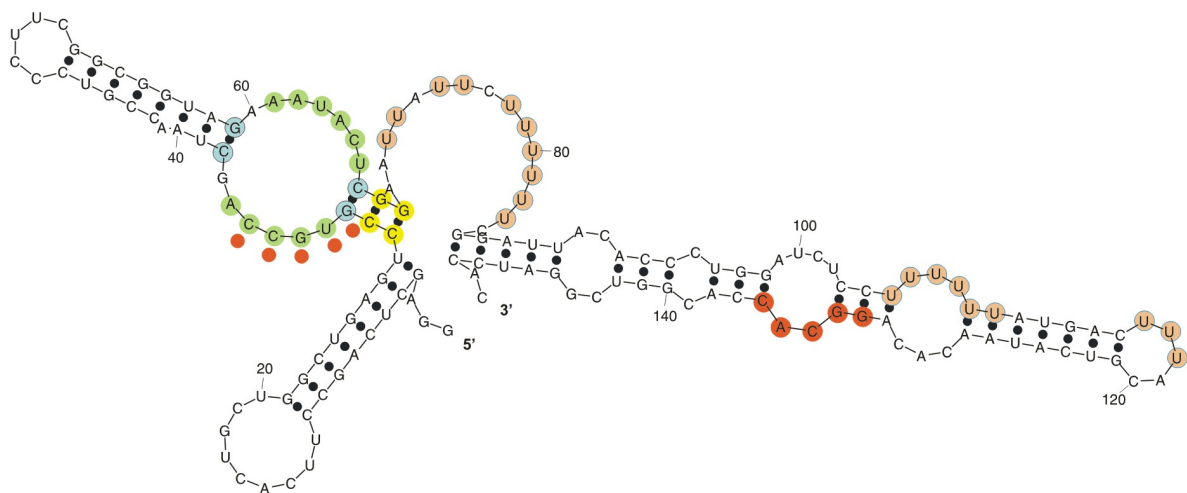


Abbildung 48: Sekundärstrukturvorschlag zur Sequenz von Klon 0406JS01 A1;

- Bulge-1- und -2-Motive; ● Bulge abschließende Basenpaare;
- beibehaltener Helixbereich; ● mögliche, tertiäre Wechselwirkungen;
- Polyuridin-Bereich.

Mit Hilfe des Custalw-Cluster-Alignment-Algorithmus im Multalin-Programm-Paket ^[100] konnten die Homologien zwischen den neuen, schnellen Diels-Alderasen und dem 49mer-

Minimalmotiv aufgefunden werden. Im Vergleich aller Primärstrukturen der untersuchten Klone sind die stets beibehaltenen Blasen-Motive, wobei vereinzelte Punktmutationen (z.B. Klon D6) auftreten können, auffällig. Verschachtelung beider Bulge-Bereiche, wie in der Primärstruktur des Klons A4, werden ebenfalls beobachtet. Die Klone mit den größten apparenten Geschwindigkeitskonstanten, weisen zudem Poly-Mononukleotid-Bereiche (siehe Abbildung 48; Polyuridin-Bereich) auf, was als Zeichen für die Steigerung der katalytischen Aktivität durch Präsenz dieser Strukturmerkmale interpretiert werden kann.

Neben den einzelsträngigen Bulge-Bereichen, die in der Sekundärstruktur nicht in räumlicher Nähe sein müssen, treten flankierende, doppelsträngige Bereiche auf, die die Blasenstrukturen stützen.

4.4.4 Ausblick

Da innerhalb dieser Arbeit schnelle Diels-Alderase-Ribozyme (z. B. B11, B4, B1) isoliert und charakterisiert werden konnten, stehen weitere Aufgaben an.

Die gemeinsamen Strukturmerkmale aller neu selektierten Ribozyme im Vergleich zum 49mer-Diels-Alderase-Minimalmotiv waren aufgrund der Start-Bibliothek zu erwarten. Mutagene PCR konnte keine neue, aber eine leicht veränderte Diversität der verwendeten DNA-Pools herstellen.

Da katalytisch aktivere Moleküle als die bisher bekannten isoliert wurden, müssen die neuen, die Aktivität erhöhenden Primär-, Sekundär- und Tertiär-Strukturmerkmale dazu ausgenutzt werden, das bestehende 49mer-Modell zu optimieren oder gar ein neues, effektiveres Minimalmotiv zu generieren. Aufgrund der erhaltenen Daten und der daraus folgenden Experimenten (Verkürzungsstudien, Chemical Probing, Mutationsanalyse, Kristallstrukturanalyse) muss ein solches Vorhaben in die Tat umzusetzen sein.

Die Quenched-Flow-Methodik wurde in dieser Arbeit erstmals in Selektionsexperimenten etabliert. Durch dieselbe Selektionsstrategie und die Wahl einer neuen, chemisch synthetisierten Ausgangs-DNA-Bibliothek können katalytisch aktive Ribonukleinsäuren isoliert werden, die bis jetzt völlig unbekannt, immer wiederkehrende Primär und Sekundär-Strukturmerkmale aufweisen.

Wie unter 4.3 beschrieben, hängt die Funktionalität und die Praktikabilität eines Ribozym-Reaktors unwillkürlich mit der katalytischen Aktivität der eingesetzten Nukleinsäuren zusammen. Die hier selektierten Diels-Alderasen beschleunigen die Reaktion zwischen dem

Dien Anthracen und dem Dienophil Maleimid bis zu 72000fach. D.h. durch den Verbesserungsfaktor von 3.5 sind effektivere Ribozym-Reaktoren zu gestalten. Die Ribozyme könnten direkt als RNA durch Einbeziehung von Ligationstechniken chemisch synthetisiert und anschließend an einem Trägermaterial immobilisiert werden (siehe 4.3). Je weniger Nukleotide ein Molekül enthält, desto praktikabler ist die chemische Synthese der RNA. Vorgeschnittene Verkürzungsstudien könnten zu solchen „Minimalmotiven“ führen, wobei die hohe Reaktionsbeschleunigung sicherlich nicht beibehalten werden kann.

Es wäre zusätzlich denkbar die DNA-Klone per T7-Transkription in RNA umzuschreiben und diese über Gelelektrophorese zu reinigen sowie zu isolieren. Durch anschließendes Immobilisieren der Ribonukleinsäuren wäre ebenfalls ein Ribozymreaktor generierbar.

6 Schlussfolgerung

Evolutive Prozesse dienen der Generierung und Optimierung chemischer und biologischer Funktionen. Während die natürliche Evolution unzählige Jahre damit verbringen kann, den molekularen Fortschritt voranzutreiben, sind heutige Forscher dazu angehalten, innerhalb kurzer Zeit zielgerichtet, durch Selektion unterschiedlichster Ansätze wissenschaftliche Projekte zu realisieren. Nicht nur die Evolution von gedanklichen Strategien sondern auch die Selektion im Reagenzglas führt heutzutage zur exponentiellen Anreicherung des Wissens.

Ein modernes Werkzeug des bioorganischen Chemikers ist die *in vitro* Selektion, welche auf stringenter Weise zu einem auswertbaren Ergebnis führt. Hierdurch ist es möglich, aus einer unvorstellbaren großen Menge an Molekülen diejenigen zu isolieren, die die gewünschten bindenden oder katalytischen Eigenschaften besitzen. Durch Vervielfältigung dieser Spezies und anschließender erneuter Selektion der „Besten“ aus der großen Menge der „Spezialisten“, können innerhalb kurzer Zeit maßgeschneiderte Moleküle erhalten werden.

Die hier beschriebenen Ergebnisse greifen nahtlos ineinander über. Die Selektion vieler RNA-Katalysatoren ist nur mit entsprechend derivatisierbaren Nukleinsäuren möglich. Wurden Ribozyme selektiert, so sollten sie eine Anwendung in unterschiedlichen Bereichen der chemischen Industrie, Pharmaforschung oder Medizin finden. So werden drei essentielle Bereiche der *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren (Grundlagenforschung zur Generierung von terminalen und molekulinternen Derivatisierungsstrategien von Nukleinsäuren, Selektion von Ribozymen und anwendungsbezogene Studien von *in vitro* selektierten RNA Enzymen) in dieser Arbeit erfolgreich abgedeckt. Es werden nun im Einzelnen die unterschiedlichen Kapitel erörtert und der Bezug untereinander sowie zu nachfolgenden Projekten dargestellt.

Nukleinsäuren bieten neben ihrer Eigenschaft als Informationsträger eine weitere Eigenheit. Sie können als echte Katalysatoren Reaktionen beschleunigen ^[31]. Um katalytisch aktive RNA/DNA aus einer Nukleinsäurebibliothek isolieren zu können, ist es hilfreich, zusätzliche Funktionalitäten in Oligonukleotide einzuführen. Über jene Funktionalitäten können zum einen weitere potentielle Reaktanden (die mit einem weiteren Substrat eine Reaktion eingehen können) in Nukleinsäuren eingeführt werden. Zum anderen sind die funktionellen Gruppen selbst innerhalb von *in vitro* Selektionschemata potentielle Substrate. Es ist vorteilhaft, eine große Diversität innerhalb der Funktionalisierungsmöglichkeiten zu besitzen; sei es eine möglichst große Anzahl an verschiedenen funktionelle Gruppen, die in die Nukleinsäuren eingeführt werden können oder eine räumliche Flexibilität. Der Ort der Funktionalisierung

kann das Ergebnis einer Selektion mitbestimmen; d.h. es kann weitreichende Folgen besitzen, ob die funktionelle Gruppe an einem Ende des Oligonukleotids oder innerhalb der Primärstruktur eingeführt wird. Auch hierbei ist eine möglichst hohe Diversität anzustreben, um dem Werkzeugkasten des bioorganischen Chemikers weitere Werkzeuge hinzuzufügen. Die hier vorgestellten, synthetisierten Initiatornukleotide sind Bausteine für Selektionsexperimente. Über ihre 5'-terminale Amino- bzw. Thiol-Gruppe ist es sowohl möglich, weitere potentielle Reaktanden einzuführen, als auch ihre funktionelle Gruppe direkt als Substrat in Selektionsexperimenten zu involvieren. Die entsprechenden Derivatisierungsstudien von enzymatisch in RNA eingebauten Initiatornukleotiden belegen eindeutig diese Eigenschaften.

Ebenso zeigen die Experimente zur internen Funktionalisierung von Desoxyribozymen, dass DNA über enzymatische Reaktionen molekulintern und ortsspezifisch derivatisiert werden kann. Die eingeführte Biotingruppe kann zwar nicht zur universellen Derivatisierbarkeit herangezogen werden, zeigt aber deutlich, dass die Methyltransferase *M.TaqI* Oligonukleotide mit Hilfe eines synthetischen Aziridin-Cofaktors sequenzspezifisch markieren kann. Diese Markierung beeinträchtigt eine Amplifizierung durch Taq-Polymerase mittels PCR zu 33% und beweist dadurch grundsätzlich die Kompatibilität bezüglich des aufgezeigten Selektionsschemas (vgl. 4.2.1). Durch korrekte Weitergabe der Sequenzinformation über PCR ist es möglich, die Erkennungssequenz für die Methyltransferase in den nächsten Selektionszyklus positionsgenau zu übertragen. In jeder Runde der Selektion können die Modifizierung an derselben Stelle innerhalb der Pool-DNA erfolgen. Die vorgestellten PCR-Versuche sollten für den Einsatz in *in vitro* Selektionen weiter optimiert werden.

Um eine interne, generelle Derivatisierbarkeit zu erreichen, müssten weitere Studien angeschlossen werden. Beispielsweise könnte ein Amino- oder Thiolgruppe tragender Aziridin-Cofaktor dazu eingesetzt werden, DNA sequenzspezifisch intern zu markieren. Über Acylierungs- oder Alkylierungsreaktionen könnten weitere potentielle Reaktanden kovalent an die Nukleinsäure gebunden werden. Auch diese molekulinternen Verzweigungen sollten den Amplifizierungsschritt innerhalb einer Selektion nur geringfügig beeinträchtigen. Es sind Selektionsschemata denkbar, bei denen nicht nur eine Funktionalisierung pro Molekül vorliegt. Zwei unterschiedliche Funktionalitäten brächten die Möglichkeit mit sich, in einem Molekül sowohl Reaktand als auch ein Coenzym bzw. Effektor zu insertieren. Beispielsweise könnten Selektionen entworfen werden, bei denen als quasi-prothetische Gruppen Moleküle wie Flavin-Coenzyme an der Nukleinsäure fixiert werden, wohingegen über die andere

Funktionalität ein Substrat für die Reaktion kovalent gebunden werden könnte. Hierdurch entstehen neue Voraussetzungen für interessante Fragestellungen.

Als Beispiel für die Nützlichkeit von in Nukleinsäuren insertierbaren Funktionalitäten innerhalb von Selektionsexperimenten dient das bereits praktisch verwendete, im Folgenden eingesetzte Diels-Alderase-Ribozym. Ein in RNA enzymatisch einfügbares Anthracen-Derivat war die Voraussetzung zur Generierung des hier verwendeten 49mer-Minimalmotives^[31].

Dieses Molekül ist das erste Ribozym, welches eine Reaktion mit zwei frei in Lösung befindlichen Substraten und mehrfachem Umsatz katalysiert. Dabei verläuft die Katalyse bezüglich der Reaktion zwischen den untersuchten Anthracen- und Dienophil-Derivaten streng stereospezifisch. Da die Diels-Alder-Reaktion eine wichtige Reaktion in der Naturstoffsynthese sowie der klassischen organischen Chemie darstellt, bot es sich an, mit dem Diels-Alder-RNA-Enzym anwendungsbezogene Studien durchzuführen. Enzyme wurden in den letzten Jahren vermehrt in der organischen Synthese eingesetzt. Milde Reaktionsbedingungen, hohe Stereo- und Chemo Selektivität haben Forscher veranlasst, Enzyme als attraktive Alternativen gegenüber traditionellen Katalysatoren in der Synthese einzusetzen. Hohe Produktionskosten und geringe Stabilität sind Nachteile der katalysierenden Proteine, die heutzutage auch an festen Phasen immobilisiert eingesetzt werden^[56]. Generell bieten immobilisierte Katalysatoren gegenüber frei im Reaktionsansatz befindlichen Spezies Vorteile. Einfaches Abtrennen des Katalysators von den Reaktionsprodukten, unmittelbare Wiederverwendbarkeit sowie Kostenvorteile sprechen für den Einsatz von fixierten Katalysatoren^[57]. Mit diesem Hintergrund wurden Immobilisierungs-Studien des 49mer-Diels-Alderase-Ribozyms durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der Katalysator quantitativ, kovalent an einer festen Phase gebunden werden kann. Seine katalytische Aktivität und Selektivität blieben dabei erhalten, wobei zudem eine hervorragende Langzeitstabilität des fixierten Ribozyms beobachtet werden konnte. Zukünftige Studien müssen zum systematischen Erforschen der Beziehung zwischen Substitutionsmuster, Reaktivität und Selektivität der Anthracen- und Maleimid-Derivate durchgeführt werden. Die Substitutionsmuster der Substrate sind von der Lösungsmittelakzeptanz des Ribozyms abhängig. Bis heute konnte unter Verwendung des freien Diels-Alderase-Ribozyms der organische Lösungsmittelanteil nur geringfügig erhöht werden^[92]. Es ist daher sinnvoll, das immobilisierte 49mer des RNA-Katalysators auf seine Akzeptanz bezüglich Erhöhung des organischen Lösungsmittelanteils zu untersuchen. Durch Lösungsmittelflexibilität könnte das immobilisierte Diels-Alderase-Ribozym in der

organischen-Chemie sein praktisches Einsatzpotential erhöhen. Um eine kontinuierliche Synthese zu gewährleisten, könnte ein Durchflussreaktor unter Verwendung immobilisierter, maßgeschneiderter Ribozyme entwickelt werden. Die bei den hier vorgestellten Immobilisierungsexperimenten verwendete weiche Agarose wird jedoch für solche Durchflusszellen als Matrix wahrscheinlich aufgrund von Druckproblemen nicht verwendbar sein. Ein hoher Druck deformiert Agarose-Partikel und kann dadurch das Durchfluss-System empfindlich stören. Das Testen anderer Festphasen ist daher essentiell.

Die Effektivität eines Nukleinsäurereaktors hängt neben der Bindungskapazität der Festphase von der Qualität des fixierten Katalysators ab. Das hier verwendete 49mer-Minimalmotiv beschleunigt die [4+2] Cycloaddition zwischen zwei freien Anthracen- und Maleimid-Derivaten bis zum Faktor 1000. Werden katalytisch aktivere Nukleinsäuren an einer Matrix fixiert, so wird auch der Reaktor einen größeren Umsatz bewerkstelligen können.

Die Generierung neuer, katalytisch aktiverer Diels-Alderase-Ribozyme war essentiell. Hierzu konnten aus einer angereicherten, kombinatorischen RNA-Bibliothek mit Hilfe der *in vitro* Selektionstechnik 19 Diels-Alderase-Ribozyme isoliert und charakterisiert werden. Mit einer bis zu 72000fachen Beschleunigung der Reaktion zwischen Anthracen und Maleimid sind sie wesentlich schneller als das in der Immobilisierungsstudie eingesetzte RNA-49mer. Die neuen RNA-Enzyme entsprechen noch nicht der eigentlichen Katalysator-Definition. Sie gehen verändert aus der Reaktion heraus, indem sie das Anthracen und damit nach der Reaktion auch das Diels-Alder-Produkt kovalent binden. Es müssen in weiterführenden Untersuchungen diejenigen Ribozyme ermittelt werden, die die Reaktion mit freien Reaktanden und multiplem Turnover durchführen. Befinden sich solche Spezies unter den neu selektierten Katalysatoren, dann können diese an einer festen Phase immobilisiert und in einem effektiveren Ribozymreaktor zur Durchfluss-Synthese eingesetzt werden. Aufgrund der aufwendigen Synthese von 160 Nukleotide umfassende RNA (vgl. 1.2, 4.4.4), könnten die Ribonukleinsäuren auch enzymatisch über die jeweilige DNA-Matrize generiert und anschließend immobilisiert werden.

Eine weitere Herausforderung ist das Weiterentwickeln des Diels-Alderase-Minimalmotives, was aufgrund seiner geringeren Länge durch Festphasensynthese jederzeit problemlos erhältlich ist. Hierzu müsste die Primärstruktur des 49mers entsprechend der Sekundärstrukturanalyse neuer Ribozyme modifiziert werden. Das Einfügen von Poly-U-Bereichen und von einem zum Bulge 1 komplementären Bereich könnte, wie im Kapitel 4.4.2 diskutiert, die katalytische Aktivität des Ribozyms steigern.

Die bei der *in vitro* Selektion neuer Diels-Alderase-Ribozyme etablierte Quenched-Flow-Technik muss zukünftig den Selektionsdruck neuer Selektionsprojekte mitgestalten. Alle Ergebnisse dieser Arbeit zeigen das nahtlose Ineinanderübergreifen der unterschiedlichen Projekte. Es wurden weitere, wichtige Werkzeuge für die Tätigkeit des bioorganischen Chemikers generiert, bestehenden Ribozymen eine Technologiebasis bereitet und neue, katalytisch aktive RNA-Katalysatoren selektiert.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die für die *in vitro* Selektion katalytisch aktiver Nucleinsäuren erforderlichen Techniken weiterentwickelt und die Einsetzbarkeit von Ribozymen in der organischen Chemie unter qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten evaluiert.

Für die *in vitro* Selektion neuer RNA/DNA-Katalysatoren ist generell die Derivatisierbarkeit von Nucleinsäuren essentiell. Je mehr Möglichkeiten bestehen, in Oligonucleotide funktionelle Gruppen einzuführen, desto größer ist die mögliche Diversität zu isolierender Katalysatoren. Innerhalb dieser Doktorarbeit konnten generell zwei unterschiedliche Funktionalisierungsansätze erarbeitet werden. Über enzymatische Reaktionen konnten sowohl an terminalen wie auch an molekulinternen Positionen von Nucleinsäuren Funktionalitäten eingefügt werden. Die Synthese zweier Initiatornucleotide zum terminalen Einbau einer Thiol- bzw. Amino-Funktionalisierung in Ribonucleinsäuren ist ein Ergebnis dieser Arbeit. Die jeweilige Struktur der Initiatornucleotide konnte mittels MALDI-MS gesichert, ihr Einbau durch T7-RNA-Polymerase in Oligonucleotide per Autoradiographie von Polyacrylamidgelen gezeigt und durch anschließende Umsetzung mit Biotinmaleimid (Initiator-SH-nucleotid) bzw. Sulfo-NHS-Biotin (Initiator-NH₂-nucleotid) ihre Derivatisierbarkeit bewiesen werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die molekulinterne Funktionalisierung von Desoxyribonucleinsäuren durch Verwendung einer sequenzspezifischen Methyltransferase (*MTaqI*) und eines biotinylierten Cofaktoranalogs möglich ist. Die intern funktionalisierte DNA konnte mittels PCR amplifiziert werden. Dadurch wurde die Kompatibilität mit einem aufgestellten Selektionsschema bewiesen.

Die Bildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen wird als essentieller Bestandteil im Metabolismus einer hypothetischen RNA-Welt angesehen. Künstliche RNA-Katalysatoren wie das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Diels-Alderase-Ribozym können diese These stützen und darüber hinaus Ausgangspunkt für den Einsatz *in vitro* selektierter Biokatalysatoren in der Wirkstoffsynthese darstellen. Die praktische Verwendung solcher maßgeschneiderter Ribozyme in der Synthese hängt von den Produktionskosten, Stabilität und Effektivität des Katalysators ab. In Hinblick auf die zukünftige Wirtschaftlichkeit ribozymkatalysierter Reaktionen wurde hier partiell die Technologiebasis für einen Ribozymreaktor geschaffen. Das 49-mer-Minimalmotiv des Diels-Alderase Ribozyms wurde nahezu quantitativ kovalent an einer Festphase immobilisiert. Die katalytische Aktivität und

Selektivität blieben dabei erhalten. Die aktivierte Festphase wies eine sehr gute Langzeit-Stabilität auf. Dadurch wurden wesentliche Kriterien bezüglich der Konstruktion eines Ribozymreaktors zur ökonomischen Synthese erfüllt. Zur Umsetzung dieser Idee muss die Effektivität des immobilisierten Ribozyms gesteigert werden. Um dieses Ziel zu erreichen wurden neue, effektivere Diels-Alderasen generiert und charakterisiert. Dabei wurden katalytische RNAs aus einer angereicherten, kombinatorischen RNA-Bibliothek mit Hilfe der *in vitro* Selektionstechnik durch Einsatz einer Quenched-Flow-Apparatur isoliert. Der Selektionsdruck wurde durch das Herabsenken der Reaktionszeit bis in den Millisekundenbereich erhöht. Nach 17 Selektionsrunden wurde die Selektion beendet. 19 Diels-Alderase-Ribozyme konnten nach Klonierung und Sequenzierung mittels fluoreszenzspektrometrischen Assays kinetisch charakterisiert werden. Demnach beschleunigen die aktivsten Sequenzen die Reaktion zwischen Anthracen-Konjugat und Biotinmaleimid um das ca. 72000fache und weisen eine apparente Geschwindigkeitskonstante von ca. $940 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf. Die aktivsten Sequenzen der Selektion beschleunigen die Diels-Alder-Reaktion 3.5 mal besser als das bislang immobilisierten 49-mer des Diels-Alderase-Ribozyms in vergleichbaren Studien.

Summary

Within this thesis the techniques for the *in vitro* selection of catalytic active nucleic acids were refined and the organic-chemical application of ribozymes was evaluated with respect to qualitative and quantitative aspects.

Generally, the possibility to form derivatives is essential for *in vitro* selection of new RNA enzymes. The more functional groups can be inserted into oligonucleotides the broader is the diversity of catalysts to be isolated. Within this research work two different ways to functionalize nucleic acids could be presented. It was possible to insert enzymatically functionalities at terminal and internal positions of oligonucleotides. This resulted in the synthesis of two initiator-nucleotides for terminal integration. The structure of the amino- and thiol-initiators could be confirmed by MALDI-MS. Using T7 polymerase their enzymatic integration in RNA could be shown by autoradiography of polyacrylamide gels. Such conjugates were converted successfully with biotinmaleimide (initiator-SH-nucleotide) and sulfo-NHS-biotin (initiator-NH₂-nucleotide), proving the possible generation of RNA derivatives. Further, the sequence-specific, methyltransferase (M^{TaqI})-induced labeling of DNA demonstrated the possible integration of a biotinylated aziridine cofactor into oligonucleotides. Such internally functionalized DNA could be amplified by PCR. Thereby the compatibility concerning the advanced selection scheme was shown.

C-C bond formation is essential in metabolism of a hypothetical RNA world. Artificial RNA catalysts (such as the Diels-Alderase ribozyme developed in our group) support this theory. In addition *in vitro* selected biocatalysts can be the origin for ribozyme application in active agent chemistry. The practical use of reaction-tailored RNA enzymes in synthesis depends on their production costs, their stability as well as their efficiency. This thesis contributed to the development of a technology platform based on economic ribozyme catalyzed reactions. The 49mer minimal motif of the Diels-Alderase was attached covalently to a solid phase in a near-quantitative manner. Its catalytic activity and selectivity was maintained for many cycles of catalysis. The activated resin showed excellent long-term stability. Thereby, important basic prerequisites for the construction of a ribozyme reactor were accomplished. The immobilization of Diels-Alderase ribozymes with higher rate accelerations has been necessary for enhancing the efficiency of such a reactor. Therefore new and more effective Diels-Alderases were generated and characterized. By using a quenched-flow-apparatus, catalyzing RNAs were isolated from a combinatorial RNA library. The selection pressure was increased

by decreasing reaction time down to milliseconds. The selection was stopped after 17 cycles. After cloning and sequencing 19 Diels-Alderase ribozymes could be characterized by fluorometric assays. According to these measurements, the most active sequences accelerate the reaction between anthracene-conjugates and biotinmaleimide up to 72000fold. They show an apparent velocity constant of about $940 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The most active sequences accelerate the Diels-Alderase reaction 3.5 fold better than the up to now immobilized 49mers of the Diels-Alderase ribozyme in comparable studies.

8 Literaturverzeichnis

- [1] M. J. Plunkett, Ellmann, J.A., *Spektr. Wiss. Spezial* **1997**, 6, 28.
- [2] T. R. Cech, A. J. Zaug, P. J. Grabowski, *Cell* **1981**, 27, 487.
- [3] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, 31, 147.
- [4] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, 35, 849.
- [5] S. Altman, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 735.
- [6] T. R. Cech, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 745.
- [7] F. Michel, J. L. Ferat, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 435.
- [8] G. A. Prody, J. T. Bakos, I. R. Buzayan, I. R. Schneider, G. Bruening, *Science* **1986**, 231, 1577.
- [9] A. Hampel, R. Tritz, M. Hicks, P. Cruz, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 299.
- [10] M. Y.-P. Kuo, L. Sharmeen, G. Dinter-Gottlieb, J. Taylor, *J. Virol.* **1988**, 62, 4439.
- [11] P. A. Sharp, *Cell* **1985**, 42, 397.
- [12] W. Gilbert, *Nature* **1986**, 319, 618.
- [13] R. Lewin, *Science* **1986**, 231, 545.
- [14] M. Yarus, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 260.
- [15] J. A. Doudna, T. R. Cech, *Nature* **2002**, 418, 222.
- [16] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 346, 818.
- [17] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, 249, 505.
- [18] A. A. Beaudry, G. F. Joyce, *Biochemistry* **1990**, 29, 6534.
- [19] M. Famulok, J. W. Szostak, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 1001.
- [20] D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Science* **1993**, 261, 1411.
- [21] S. J. Klug, M. Famulok, *Mol. Biol. Rep.* **1994**, 20, 97.
- [22] K. P. Williams, S. Ciafre, G. P. Tocchini-Valentini, *Embo J.* **1995**, 14, 4551.
- [23] K. E. McGinness, G. F. Joyce, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 2987.
- [24] L. F. Landweber, I. D. Pokrovskaya, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, 96, 173.
- [25] M. Wecker, D. Smith, L. Gold, *RNA* **1996**, 2, 982.
- [26] C. Wilson, J. Nix, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1998**, 37, 14410.
- [27] P. A. Lohse, J. W. Szostak, *Nature* **1996**, 381, 442.
- [28] J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Nature* **1994**, 371, 31.

- [29] G. Sengle, A. Eisenfuhr, P. S. Arora, J. S. Nowick, M. Famulok, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 459.
- [30] T. W. Wiegand, R. C. Janssen, B. E. Eaton, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 675.
- [31] B. Seelig, A. Jäschke, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 167.
- [32] N. K. Vaish, P. A. Heaton, F. Eckstein, *Biochemistry* **1997**, *36*, 6495.
- [33] A. Berzal-Herranz, S. Joseph, B. M. Chowrira, S. E. Butcher, J. M. Burke, *Embo J.* **1993**, *12*, 2567.
- [34] R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 223.
- [35] A. Jäschke, in *The many faces of RNA* (Eds.: D. S. Eggleston, C. D. Prescott, N. D. Pearson), Academic Press, San Diego, **1998**, pp. 179.
- [36] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, *Nature* **1997**, *389*, 54.
- [37] A. Jäschke, J. P. Fürste, V. A. Erdmann, D. Cech, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 1880.
- [38] A. Jäschke, J. P. Fürste, E. Nordhoff, F. Hillenkamp, D. Cech, V. A. Erdmann, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4810.
- [39] G. Igloi, *Anal. Biochem.* **1996**, *233*, 124.
- [40] P. J. Romaniuk, O. C. Uhlenbeck, *Methods Enzymol.* **1983**, *100*, 52.
- [41] F. Hausch, A. Jäschke, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 885.
- [42] C. Pitulle, R. G. Kleinedam, B. Sproat, G. Krupp, *Gene* **1992**, *112*, 101.
- [43] B. Seelig, A. Jäschke, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7729.
- [44] B. Seelig, A. Jäschke, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 371.
- [45] D. Sen, C. R. Geyer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 680.
- [46] Y. Li, R. R. Breaker, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 315.
- [47] Y. Li, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 2746.
- [48] R. R. Breaker, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 427.
- [49] A. Rich, *Gene* **1993**, *1353*, 99.
- [50] V. Lundblad, J. W. Szostak, *Cell* **1989**, *57*, 633.
- [51] R. R. Breaker, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 371.
- [52] S. E. Osborne, A. D. Ellington, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 349.
- [53] B. Cuenoud, J. W. Szostak, *Nature* **1995**, *375*, 611.
- [54] N. Carmi, L. A. Shultz, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 1039.
- [55] S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4262.
- [56] W. Hartmeier, in *Immobilisierte Biokatalysatoren*, Springer, **1986**, pp. 18.
- [57] K. Buchholz, V. Kasche, *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*, VCH, Weinheim, **1997**.

- [58] I. C. H. Silmann, E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.* **1966**, 35, 873.
- [59] W. Tischer, F. Wedekind, in *Biocatalysis - From Discovery to Application, Vol. 200* (Ed.: W. D. Fessner), Springer, Berlin Heidelberg New York, **1999**, pp. 95.
- [60] H. Murakami, N. J. Bonzagni, H. Suga, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6834.
- [61] J. Cline, J. C. Braman, H. H. Hogrefe, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 3546.
- [62] J. R. Cherry, M. H. Lamsa, P. Schneider, J. Vind, A. Svendsen, A. Jones, A. H. Pedersen, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 379.
- [63] P. S. Daugherty, G. Chen, B. L. Iverson, G. Georgiou, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000**, 97, 2029.
- [64] J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 8783.
- [65] B. Seelig, Dissertation, Freie Universität Berlin, **1999**.
- [66] A. B. Burgin, N. R. Pace, *EMBO J.* **1990**, 9, 4111.
- [67] N. Logsdon, C. G. Lee, J. W. Harper, *Anal. Biochem.* **1992**, 205, 36.
- [68] L. Zhang, L. Sun, Z. Cui, R. L. Gottlieb, B. Zhang, *Bioconjug. Chem.* **2001**, 12, 939.
- [69] A. F. Bückmann, M. Morr, *Makromol. Chem.* **1981**, 182, 1379.
- [70] F. Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues*, IRL Press, **1991**, 190.
- [71] F. Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues*, IRL Press, **1991**, 201.
- [72] Y. Hiller, J. M. Gershoni, E. A. Bayer, M. Wilchek, *Biochem. J.* **1987**, 248, 167.
- [73] S. Zalipsky, *Eur. Polym. J.* **1983**, 19, 1177.
- [74] I. Y. Kim, Z. Veres, T. C. Stadtman, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 19650.
- [75] D. Landini, F. Rolla, *Synthesis* **1976**, 389.
- [76] J. G. Altin, E. B. Pagler, *Anal. Biochem.* **1995**, 224, 382.
- [77] F. Barany, B. Slatko, M. Danzitz, D. Cowburn, I. Schildkraut, G. G. Wilson, *Gene* **1992**, 112, 91.
- [78] B. E. Slatko, J. S. Benner, T. Jager-Quinton, L. S. Moran, T. G. Simcox, E. M. Van Cott, G. G. Wilson, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 9781.
- [79] K. Goedecke, M. Pignot, R. S. Goody, A. J. Scheidig, E. Weinhold, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 121.
- [80] J. C. Wu, D. V. Santi, *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 703.
- [81] S. Kumar, X. Cheng, S. Klimasauskas, S. Mi, J. Posfai, R. J. Roberts, G. G. Wilson, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 1.
- [82] E. Merkiene, G. Vilkaitis, S. Klimasauskas, *Biol. Chem.* **1998**, 379, 569.
- [83] A. Janulaitis, S. Klimasauskas, M. Petrusyte, V. Butkus, *FEBS Lett.* **1983**, 161, 131.

-
- [84] G. Pljevaljcic, Dissertation, Universität Dortmund, **2002**.
- [85] F. Hausch, A. Jaschke, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, E35.
- [86] G. Pljevaljcic, M. Pignot, E. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3486.
- [87] D. J. Witter, J. C. Vederas, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2613.
- [88] D. E. Cane, C. C. Yang, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1985**, *38*, 423.
- [89] K. C. Nicolaou, N. A. Petasis, R. E. Zipkin, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5560.
- [90] K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, T. Montagnon, G. E. Vassilikogiannakis, *Angew. Chem.* **2002**, *144*, 1742.
- [91] B. Seelig, S. Keiper, F. Stuhlmann, A. Jaschke, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 4576.
- [92] F. Stuhlmann, A. Jaschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3238.
- [93] F. Hansske, F. Cramer, *Methods Enzymol.* **1979**, *59*, 172.
- [94] G. Divita, B. Muller, U. Immendorfer, M. Gautel, K. Rittinger, T. Restle, R. S. Goody, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7966.
- [95] A. R. Fersht, R. Jakes, *Biochemistry* **1975**, *14*, 3350.
- [96] A. Wagner, I. Simon, M. Sprinzl, R. S. Goody, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12535.
- [97] D. Bebenroth, B. Seelig, A. Jäschke, **2003**, p. in preparation.
- [98] D. H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker, D. H. Turner, *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 911.
- [99] N. B. Leontis, J. Stombaugh, E. Westhof, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3497.
- [100] F. Corpet, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 10881.

Anhang

A Geräte, Chemikalien, Enzyme und Puffer

Geräte:

Autoklav	Sterico AG
Elektrophoresekammern	Bio-Rad, MINI SUB™ DNA CELL Eigenbau für PAGE
ESI-Massenspektrometer	MAT 7M, Finnigan
Expositionskassetten	Kodak X-Omatic
Fluoreszenzspektrometer	Biologik
Fluoreszenzküvette	Quarzglas SUPRASIL, HELLMA
Fluoreszenzimager	Storm 840, Molecular Dynamics
Geldokumentationsanlage	BioRad
Heizschrank	Heraeus, T5042 EK
HPLC-Anlage	Beckman, System Gold
HPLC-Anlage	Agilent Technologies, Serie 1100
HPLC-Säulen:	
- Ultrasphere ODS C ₁₈ , 5 µm, 250 x 4.6 mm	Beckman
- Luna 80 C ₁₈ , 5 µm, 250 x 4.6 mm	Phenomenex
Kühlfalle	Vakuubrand
Lumineszenzspektrometer	LS50B, Perkin Elmer
Magnetrührer	IKA-Combimag RCT
MALDI-Massenspektrometer	Bruker Reflex
NMR-Spektrometer	Bruker A250, Bruker AMX500
Ölpumpe	Heraeus, DS1
PCR-Geräte	MJ Research PTC 100
pH-Meter	Knick, Calimatic 761
Phosphorimager	Storm 840, Molecular Dynamics
Pipetten	Gilson, Pipetman P2, P20, P200, P1000
Quenched-Flow-Anlage	BioLogik
Reaktionsgefäße, silikonisiert	Biozym
Reinstwasseranlage	Milli-Q, Millipore
Rotationsverdampfer	Büchi, Rotavapor R
Röntgenfilme	Fuji, Medical X-ray Film RXOG (Safety)
Röntgenfilmkassetten	Kodak, X-OMATIC
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein
Spannungsgeber	Pharmacia, ECPS 3000/150 und 500/400
Sterilfiltrationsanlage	Schleicher & Schuell
Stopped-Flow-Anlage	BioLogik
Szintillationszähler	Beckman LS 6000 SC
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer 5436
UV-Küvetten	Quarzglas SUPRASIL, HELLMA
UV-Spektrometer	Shimadzu, UV-160A
UV-Transilluminator	CAMAC Reprostar II
Vakuumpumpe	Vakuubrand, Membran-Vakuumpumpe
Vakuumentrifuge	Savant, Speed Vac Concentrator
Videosystem	Mitsubishi, CS I mit Videoprozessor
Waagen	Mettler AE 163 und AC 88; Sartorius
Wasserbäder	Julabo, U3; Heidolph HBR 2
Zentrifugen	Heraeus Christ, Biofuge 13R, A Du Pont, Sorvall RC28S Sigma 112

Chemikalien

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

Aceton	Merck
Acetonitril	J. T. Baker
[γ - ³² P]-Adenosin-5'-triphosphat	ICN Pharmaceuticals
Agar	GIBCO BRL
Agarose	GIBCO BRL
Aluminiumchlorid	Merck
Ammoniak-Lösung 33 %	Riedel de Haen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Fluka
Argon	Messer
Bariumchlorid Dihydrat	Aldrich
Benzen	Fluka
Biotin	Aldrich
Biotinmaleimid	Sigma
Biotin 3-sulfo-N-hydroxysuccinimidester (Sulfo-NHS-Biotin)	Sigma
Borsäure, reinst kristallisiert	Riedel de Haen
5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β ,D-galactopyranosid (X-gal)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Calciumhydrid	Aldrich
Chloroform	J. T. Baker
Cobalt(II)-chlorid	Merck
[α - ³² P]-Cytidin-5'-triphosphat	Amersham Biosciences
Dichlormethan	J. T. Baker
Diethylether	Merck
Diisopropylethylamin	Aldrich
Dimethoxytritylchlorid	ChemGenes
5'-Dimethoxytrityl-N ² -isobutyrylguanodin	ChemGenes
Dimethylaminopyridin (DMAP)	Fluka
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
2,3-Di(4-pyridyl)-2,3-butandiol	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
[α - ³² P]-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	ICN Pharmaceuticals
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP's)	MBI Fermentas
Essigsäure	J. T. Baker
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	J. T. Baker
Formamid	Merck
Glycerol	Merck
Glycogen	Boehringer Mannheim
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	Merck
Hexaethylenglycol	Fluka
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	GERBU
Isobuttersäureanhydrid	Aldrich
Isopropylthio- β ,D-galactopyranosid (IPTG)	Bachem Feinchemikalien
Jod-Lösung	s. Oligonukleotidsynthese
Kaliumjodid	Aldrich
Magnesiumchlorid-6-Hydrat	Riedel de Haën
Mangan(II)-chlorid	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol (wasserfrei)	Aldrich
Natriumacetat	Riedel de Haën
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck

<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Riedel de Haën
Natriumhydroxid	Merck
Natriumsulfat	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
Neutravidin	Pierce
Ninhydrin	Merck
Nukleosidtriphosphate (NTP's)	Boehringer Mannheim
Palladium(II)-chlorid	Aldrich
Phenol (wassergesättigt, pH 7.9)	Amresco
Phosphorigsäure(2-cyanoethylester)diisopropylamidchlorid	Aldrich
Phosphorpentoxid	Fluka
Phthalimid-Kalium	Janssen-Chimica
Pyridin	Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer Mannheim
Röntgenentwickler	AGFA-Gevaert G150
Röntgenfixierer	AGFA-Gevaert G334
Rothiphorese DNA Sequenziersystem	Carl Roth
Salzsäure 37% (chemisch rein)	Riedel de Haën
Spermidin-trihydrochlorid	Fluka
Streptavidin-Agarose	Sigma
Sulfo-NHS-Biotin (Biotin 3-sulfo-N-hydroxysuccinimidester)	Sigma
SYBRGold	Molecular Probes
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka
1H-Tetrazol	s. Oligonukleotidsynthese
Thionylbromid	Fluka
Toluol	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Triethylamin (Micro Select)	Fluka
Triphenylmercaptan	Fluka
Triphenylphosphin	Fluka
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), enzyme grade	AppliChem
t-RNA	Boehringer Mannheim
Wismutnitrat (BiO·NO ₃ ·H ₂ O)	Fluka
Xylencyanol FF	Eastman Kodak & Co
Zink(II)-chlorid	Merck

Enzyme:

SuperScript™ II RNase H RT	GIBCO BRL
<i>Taq</i> -Polymerase	GIBCO BRL, Rapidozym
T4-RNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
T7-RNA-Polymerase	Stratagene

Wasser:

Das verwendete Wasser wurde einer Milli Q-Anlage von Millipore aufbereitet.

Puffer und Lösungen:**First Strand Buffer (5x)**

250 mM Tris-HCl pH 8.3
375 mM KCl
15 mM MgCl₂

Immobilisierungspuffer

1 M NaCl
10 mM HEPES pH 7.2
5 mM EDTA

Kinase-Puffer (10x)

500 mM Tris-HCl, pH 7.6
100 mM MgCl₂
50 mM DTT
1 mM Spermidin
1 mM EDTA

LB-Medium

10 g Pepton Nr. 140 aus Casein
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 l Wasser, pH 7.0 mit NaOH
- autoklavieren 20 min/120°C

LB-Agarplatten

300 ml LB-Medium
4.5 g Agar
- autoklavieren 20 min/120°C
- bei ca. 55°C 150 µl Ampicillin (100 mg/ml)
- in sterile Petrischalen gießen

Ligase-Puffer (10x)

500 mM HEPES-NaOH pH 8.3
100 mM MgCl₂
1 mM ATP

Probenpuffer, nativ (Agarosegel)

0.25 % Xylencyanol FF
0.25 % Bromphenolblau
30 % Glycerol

Probenpuffer (PAGE)

0.5 % Xylencyanol FF
0.05 % Bromphenolblau
50 % Formamid

Puffer A (HPLC)

0.1 M TEAAc pH 7.0

Puffer B (HPLC)

0.1 M TEAAc pH 7.0
80 % Acetonitril

Minimalpuffer (Selektionspuffer)

30 mM Tris-HCl pH 7.4
300 mM NaCl
80 mM MgCl₂

Taq-Puffer (10x)

200 mM Tris-HCl pH 8.4
500 mM KCl

TBE-Puffer

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

Transkriptionspuffer (10x)

800 mM HEPES, pH 7.5
220 mM MgCl₂
10 mM Spermidin

Wasch-Puffer

8 M Harnstoff
0.1 M Tris-HCl pH 7.4

Sonstige Materialien:

100bp-DNA-Leiter	MBI Fermentas
DC-Alufohlen Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck
GeneMorph™ PCR Mutagenesis Kit	Stratagene
Kieselgel (0.063-0.200 mm)	J.T. Baker
Zentrifungenfilter CENTREX MF, 0.45 µm, CA	Schleicher & Schuell
NAP-Säulen	Pharmacia
Qiagen PCT Cloning ^{plus} Kit	Qiagen
QIAprep 8Turbo Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Wizard®SV 96 Plasmid DNA Purification System	Promega

B Publikationen

- 1.) Jörg Schlatterer, Friedrich Stuhlmann, Andres Jäschke, "Towards a ribozyme reactor: immobilized Diels-Alderase ribozyme" *Entering an unexplored world: RNA Targeting*, 2003, 59
- 2.) Jörg Schlatterer, Friedrich Stuhlmann, Andres Jäschke, "Stereoselective Synthesis using Immobilized Diels-Alderase Ribozymes", *ChemBioChem*, 2003, eingereicht
- 3.) Jörg Schlatterer, Barbara-Sylvia Weigand, Andreas Zerressen, Mark Helm, Andres Jäschke, "Ribozymes: Revolutionary catalysts in organic synthesis?" in Vorbereitung
- 4.) Jörg Schlatterer, Mark Helm, Andres Jäschke, „Chemoenzymatic Synthesis of 5'-thiol- and 5'-amino-modified RNA“ in Vorbereitung

C Preise, Vorträge und Poster

- 1.) Preis:
Buchpreis des Fonds der chemischen Industrie,
Berlin, 25. Mai 1992
- 2.) Vortrag:
Schlatterer, J., Stuhlmann, F., Jäschke, A., "Towards a ribozyme reactor: immobilized Diels-Alderase ribozyme" *Aventis [i] lab initiative*, Wiesbaden,
23. Januar 2003
- 3.) Poster:
Schlatterer, J., Stuhlmann, F., Jäschke, A., "Towards a ribozyme reactor: immobilized Diels-Alderase ribozyme", Wiesbaden, 23.-25. Januar 2003

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.