

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Richard Wombacher

aus Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2005

Untersuchungen zu Struktur und Mechanismus eines Diels-Alder Ribozyms

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

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mir die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Andres Jäschke für die Betreuung der Arbeit, der Überlassung des interessanten Themas und seiner steten Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Nils Metzler-Nolte danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dinshaw J. Patel und Dr. Alexander Serganov vom Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York für die erfolgreiche und interessante Zusammenarbeit.

Dr. Mark Helm, Dr. Sonja Keiper und Dr. Fritz Stuhlmann möchte ich danken für viele bereichernde Gespräche und ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung zur Lösung von präparativen Problemen. Ein besonderer Dank gilt hierbei Mark für die freundliche Aufnahme in seinem Büro.

Sandra Suhm, Heiko Rudy und Tobias Timmermann danke ich für ihre exzellente technische Assistenz. Außerdem bedanke ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die hervorragende Arbeitsatmosphäre. Weiterer Dank gilt Dr. Ulrich Hoffmanns und Dr. Tim Kersebohm für die Beratung in Grafik- und Computerfragen und der Mittwochs Sportgruppe für die früh morgendliche Körperertüchtigung.

Darüber hinaus danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung in allen Bereichen, ohne die vieles schwerer gefallen wäre. Ganz besonderer Dank gilt auch Eva für die Geduld und Unterstützung während der gesamten letzten Jahre.

Für Eva

Zusammenfassung Wombacher, Richard; Dipl.-Chemiker; 24.10.2005

Titel: Untersuchungen zu Struktur und Mechanismus eines Diels-Alder Ribozyms

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

Das Forschungsgebiet der katalytischen RNA hat sich seit der Entdeckung der natürlichen Ribozyme stark weiterentwickelt. Neben der Erforschung der natürlichen Ribozyme hat sich mit der SELEX-Technik (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, künstliche Ribozyme herzustellen. Damit gelang es, die Bandbreite der durch Ribozyme katalysierbare Reaktionen enorm zu erweitern. Unter anderem konnte ein künstlicher RNA Katalysator generiert werden, der eine C-C-Bindungsknüpfung in einer [4+2]-Cycloaddition, eine sogenannte Diels-Alder Reaktion, katalysiert. Dieser künstliche RNA-Katalysator beschleunigt die Reaktion zwischen Anthracen- und Maleimidderivaten als erstes künstliches Ribozym in einer echten enzymatischen Katalyse. Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Aufklärung von Struktur und Mechanismus dieses Diels-Alder Ribozyms.

Mit der Synthese verschiedener Maleimidderivate und der Untersuchung derer Substrateigenschaften für das Diels-Alder Ribozym konnte die räumliche Struktur und Beschaffenheit des aktiven Zentrums charakterisiert werden. Die Synthese von photoreaktiven Maleimidsubstraten, und der Einsatz dieser in Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten erlaubten eine erstmalige genaue Lokalisierung des aktiven Zentrums des Ribozyms. Mit der Herstellung schweratommodifizierter Ribozym-Produkt-Konstrukte für die Lösung des Phasenproblems, konnte ein Beitrag zur Lösung der Kristallstruktur geleistet werden. Die Kristallstrukturen des Ribozym-Produkt-Komplexes und des „freien“ Ribozyms zeigten sich in guter Übereinstimmung mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen aus Substratvariationstoleranzuntersuchungen und Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten. Aus dem Kontext dieser Ergebnisse konnte ein konkretes Bild der Struktur-Funktionsbeziehung des Diels-Alder Ribozyms entworfen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die RNA eine λ -förmige verschlungene Pseudoknoten Struktur mit einer vorgeformten Bindungstasche besitzt. Diese Struktur ermöglicht die Katalyse über „proximity“-Effekte im aktiven Zentrum und durch Stabilisierung des Übergangszustandes. In Untersuchungen der Enantioselektivität des Ribozyms konnte eine Abhängigkeit der Enantioselektivität vom verwendeten Reaktionsformat gezeigt werden. In der intramolekularen Katalyse (*in cis*-Format) erhält man eine genau umgekehrte Enantioselektivität zu der in intermolekularer Katalyse (*in trans*-Format) erhaltenen Enantioselektivität. Zur Erklärung dieser außergewöhnlichen stereoselektiven Eigenschaft wurde ein kontrollierter Zugang zum aktiven Zentrum durch eine „Vordertür“ oder eine „Hintertür“ postuliert. Die Existenz eines solchen kontrollierten „Hintertürzugangs“ zum aktiven Zentrum konnte in weiteren Untersuchungen zur Enantioselektivität unter Verwendung unterschiedlicher Ethylenglykollinkerlängen in der intramolekularen Katalyse (*in cis*-Format) untermauert werden. Auf der Basis dieser Ergebnisse konnte ein Modell zur stereoselektiven Erkennung erstellt werden, welches als „3-Punkt-1-Orientierung“ Modell bezeichnet werden kann.

Summary

Wombacher, Richard; Dipl.-Chemiker; 24.10.2005

Title: Investigations on structure and mechanism of a Diels-Alder Ribozyme

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

Since its discovery twenty years ago, the research field of catalytic ribonucleic acids has developed rapidly. Apart from the investigation of naturally occurring ribozymes, the development of the SELEX method made it possible to generate artificial ribozymes with custom made properties. It has thus been demonstrated that nucleic acids can catalyze a broad range of chemical reactions.

Ribozymes from a combinatorial RNA library have previously been isolated that catalyze the formation of carbon-carbon bonds by the Diels-Alder reaction, a [4+2] cycloaddition. A minimal Diels-Alder Ribozyme is able to accelerate the reaction of an aromatic diene (anthracene) with a dienophile (maleimide) in aqueous solution. The goal of this work was to shed light on the structural and mechanistic properties of this Diels-Alder Ribozyme. To this end, various maleimid derivatives were synthesized and tested as substrates for the Diels-Alder Ribozyme. From these results the spatial structure and functional features of the active site could be characterized. Specific photoreactive substrates were synthesized and used in photoaffinity crosslinking experiments to localize the active site of the Ribozyme. With the preparation of heavy atom derivatives of modified Ribozyme-product complexes this work made significant contributions to the solution of the Diels-Alder ribozyme crystal structure by X-ray diffraction studies. These studies showed that the RNA adopts a λ -shaped nested pseudoknot architecture whose preformed binding pocket is precisely complementary in shape to the reaction product. X-ray structures of the ribozyme-product complex and of the "free"-ribozyme are in agreement with the structural investigations of substrate acceptance and photoaffinity experiments presented in this work. The combination of structural data and biochemical experiments allowed rationalization of the structure-function relationship for Ribozyme catalyzed Diels-Alder reactions. A combination of proximity and complementarity to a proposed transition state emerged as the most likely catalytic mechanism.

This work also presents extensive studies on the stereoselectivity of the Diels-Alder ribozyme. Experiments could show that the enantioselectivity of the Diels Alder Ribozyme depends on the ribozym's reaction format. Interestingly, intramolecular catalysis (*in cis*-format) led predominantly to the formation of the *S,S*-enantiomer product, whereas intermolecular catalysis (*in trans*-format) was found to yield product of the opposite *R,R*-configuration. This experimental observation led to the postulation of a "front door" and a "back door" entrance to the active site. The hypothesis of a restricted "back door" access was supported by experiments including tethers of varying length. On the basis of these results an improved model for stereoselective recognition, namely a "3-point-1-direction" model was proposed.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Ribozyme	1
1.1.1	<i>Künstliche Ribozyme</i>	3
1.2	Biokatalysatoren für die Diels-Alder Reaktion	6
1.2.1	<i>Diels-Alder Reaktion</i>	6
1.2.2	<i>Katalyse der Diels-Alder Reaktion</i>	7
1.2.3	<i>Enzyme</i>	9
1.2.4	<i>Katalytische Antikörper</i>	9
1.2.5	<i>Ribozyme</i>	10
1.3	Das Diels-Alder Ribozym	11
2	Ziel der Arbeit	17
3	Material und Methoden	21
3.1	Oligoribonukleotide	21
3.2	Oligodesoxyribonukleotide	22
3.3	Enzymatische Synthese von Oligoribonukleinsäuren durch	22
3.4	T7-Transkription mit Initiator nukleotid	24
3.5	Standardmethoden und Reagenzsysteme	25
3.6	Chemische Synthese von Nukleinsäuren	25
3.6.1	<i>Synthese von Phosphoramiditen zur Kopplung von Anthracen</i>	27
3.6.2	<i>Synthese von 5'-konjugierten Oligoribonukleotiden</i>	28
3.7	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	29
3.7.1	<i>5'-Markierung durch Phosphorylierung</i>	29
3.7.2	<i>3'-Markierung durch Ligation</i>	29
3.8	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	30
3.8.1	<i>Reversed-phase-HPLC</i>	30
3.8.2	<i>HPLC an chiralen Festphasen</i>	31
3.9	Aktivitätsmessung von Ribozymen	32
3.9.1	<i>HPLC-Assay</i>	32
3.9.2	<i>UV-Spektrometrischer Assay</i>	32
3.9.3	<i>Fluoreszenzspektrometrischer Assay</i>	33

3.10	Photoaffinitätsmarkierungsexperimente	33
3.11	Enzymatischer und chemischer Verdau zur RNA Sequenzanalyse.....	34
3.11.1	<i>Spaltung mit RNasen</i>	34
3.11.2	<i>Limitierte alkalische Hydrolyse</i>	35
3.12	Enantioselektivitätsuntersuchungen.....	35
3.12.1	<i>Bestimmung im Trans –Assay</i>	35
3.12.2	<i>Bestimmung im Cis-Assay</i>	35
3.13	Chemische Synthese	36
4	Ergebnisse	57
4.1	Substratspezifität des Diels-Alder Ribozyms	57
4.1.1	<i>Synthese von Maleimidsubstraten</i>	58
4.1.2	<i>Substratvariationstoleranz</i>	60
4.2	Photoaffinitätsmarkierung des aktiven Zentrums	63
4.2.1	<i>Synthese von photoreaktiven Verbindungen</i>	65
4.2.2	<i>Synthese von Photoreaktiven Substraten</i>	65
4.2.3	<i>Photoaffinitätsmarkierungsexperimente</i>	70
4.3	Schweratomderivate für Kristallisationsexperimente	75
4.4	Kristallstruktur des Diels-Alder Ribozyms.....	79
4.5	Enantioselektivität des Diels-Alder Ribozyms	83
4.5.1	<i>Einfluss der Länge des Ethylenglykollinkers auf die Enantioselektivität</i> 89	
5	Diskussion.....	93
5.1	Strukturelle und Mechanistische Eigenschaften des Diels-Alder Ribozyms..	93
5.1.2	<i>Substratvariationstoleranz und Photoaffinitätsmarkierung</i>	94
5.1.3	<i>Die Kristallstruktur</i>	96
5.1.4	<i>Enantioselektivität</i>	101
5.2	Vergleich mit anderen Diels-Alderasen.....	107
5.3	Vergleich mit anderen Ribozymstrukturen.....	110
6	Zusammenfassung	113
7	Summary	115
8	Anhang	117
9	Literatur	123

1 Einleitung

Die Grundlage des Lebens ist die Speicherung der Erbinformation durch DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure). Diese Information wird in allen Organismen mit Hilfe von mRNA, tRNA und Ribosomen in die entsprechenden Aminosäuresequenzen übersetzt. Nach Faltung der Aminosäurekette in eine dreidimensionale Struktur führt das Protein lebenswichtige Funktionen aus. Informationsspeicherung (Genotyp) und Funktion (Phänotyp) liegen damit in den Händen unterschiedlicher Moleküle. DNA und RNA einerseits und den Proteinen andererseits.

1.1 Ribozyme

In den achtziger Jahren entdeckten T. Cech und S. Altman, dass Ribonukleinsäuren neben der Speicherung von Information auch in der Lage sein können, chemische Reaktionen zu katalysieren. Diese katalytischen RNAs werden, in Anlehnung an ihre enzymvergleichbaren katalytischen Eigenschaften, Ribozyme genannt. In Ribozymen sind Genotyp und Phänotyp in einem Molekül vereint. Aus dieser Entdeckung entwickelte sich die Idee einer frühen RNA-Welt^{1, 2}, bei der alle wichtigen Aufgaben von RNA-Molekülen übernommen werden, auch jene der Vererbung, Informationsspeicherung und Beschleunigung chemischer Reaktionen – das heißt Biosynthese und Energiestoffwechsel.

1.1.1 Natürliche Ribozyme

Die Existenz katalytischer RNA wurde erstmals 1982 von Cech und Mitarbeitern nachgewiesen. Sie konnten zeigen, dass dem posttranskriptionalen Spleißen des Gruppe I-Introns aus *Tetrahymena thermophila* ein Selbstspaltungsmechanismus zugrunde liegt^{3,4}.

Zeitgleich entdeckten Altman und Mitarbeiter, dass die Aktivität der bakteriellen Ribonuklease P, bestehend aus RNA- und Proteinuntereinheiten, ausschliesslich auf deren RNA-Untereinheit zurückzuführen ist^{5,6}. Seit dem ist eine grosse Anzahl weiterer natürlicher Ribozyme entdeckt worden. Allein mehr als 100 weitere Sequenzen, die der Gruppe I-Intron Familie (aus verschiedenen Mikroorganismen) zuzuordnen sind. Dazu kommen eine ebenso beachtliche Menge Ribozyme der Gruppe II-Intron Familie^{7,8} (aus mitochondrialen Genen von Pflanzen, Pilzen und Hefen), welche über einen anderen Mechanismus RNA spalten. Zu dem gibt es Virus- oder Viroid-Ribozyme wie das Hammerhead Ribozym^{9,10} (aus Pflanzenviroiden), das Hepatitis Delta Virus-Ribozym¹¹⁻¹³ (HDV), das Hairpin Ribozym¹⁴ (aus Tabak-Virus-Ringspot Satellit) und das *Neurospora Varkud* Satellit Ribozym¹⁵.

Ribonukleinsäuren bestehen aus den 4 Nukleosiden Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin und sind über Phosphordiester zu der Primärstruktur verbunden. Trotz der, verglichen zu den aus mindestens 20 Aminosäuren aufgebauten Proteinen, geringen Primärstrukturvariationsmöglichkeiten sind RNAs in der Lage, Sekundär- und Tertiärstrukturen auszubilden¹⁶⁻¹⁸. Die wichtigsten bekannten Faltungsmuster sind doppelsträngige Bereiche (*helices*), Haarnadelschlaufen und innere Schlaufen (*loops*), Ausstülpungen (*bulges*), Kreuzungsstellen (*3 way / 4 way-junctions*), Pseudoknoten (*pseudoknots*) und doppelte Pseudoknoten (*double pseudoknots*). Diese Strukturelemente erlauben es der RNA, spezifische Bindungsstellen und katalytische Zentren auszubilden, die eine Grundlage zur Katalyse von chemischen Reaktionen darstellen.

Das wohl eindrucksvollste Beispiel für das aus dieser strukturellen Variabilität hervorgehende katalytische Potential ist das Ribosom. Vor kurzem konnte die Kristallstruktur des gesamten Ribosom-Komplexes, der zu $\frac{1}{3}$ aus Protein- und $\frac{2}{3}$ aus rRNA-Anteilen besteht, gelöst werden¹⁹⁻²¹. Dabei stellte sich heraus, dass ausschließlich RNA der Pep-

tidyltransferase das katalytische Zentrum zur Peptidbindungsknüpfung bildet. Das Ribosom ist somit ebenfalls ein Ribozym.

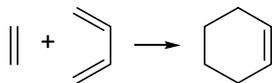
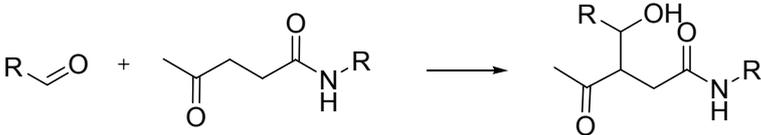
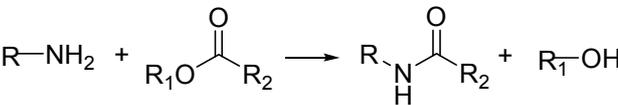
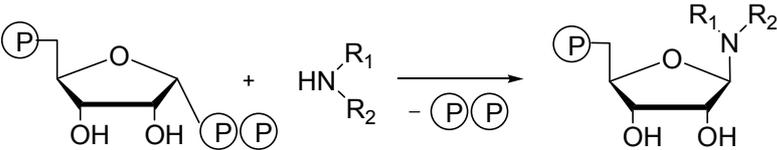
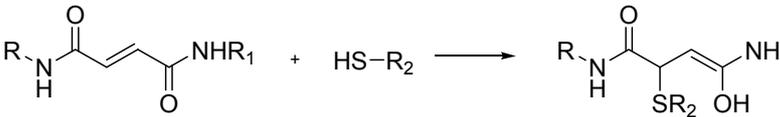
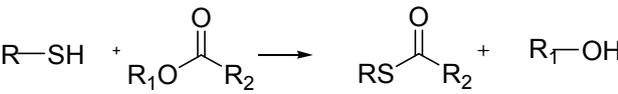
Die für strukturelle Motive verantwortlichen Wechselwirkungen resultieren hauptsächlich aus den Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleobasen. Dabei bildet das Watson-Crick H-Brückenmuster den Grossteil der Wechselwirkungen. Alternative H-Brückenwechselwirkungen, wie die umgekehrte (*reversed*) Watson-Crick Paarung, die Hoogsteen und umgekehrte (*reversed*) Hoogsteen Basenpaarung und die Wobble Basenpaarung sind jedoch maßgeblich an der Ausbildung komplexer Tertiärstrukturen beteiligt^{18, 22}.

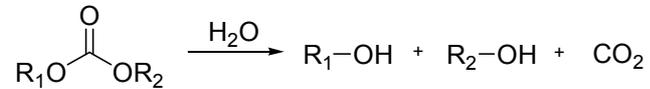
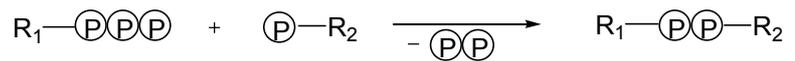
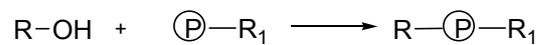
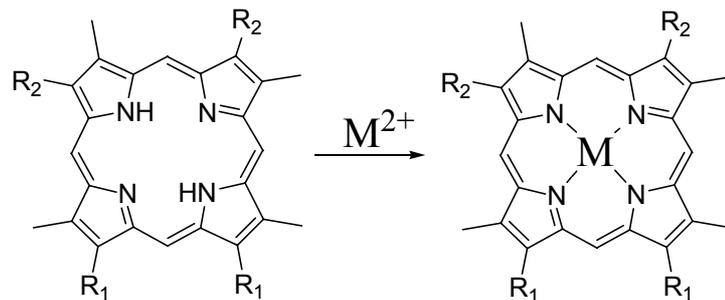
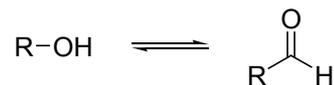
In jüngster Zeit wurde entdeckt, dass Genexpression lebender Zellen durch spezifische Wechselwirkungen zwischen mRNA und kleinen Molekülen (Metabolite) kontrolliert wird²³⁻²⁵. Die Experimente verdeutlichen den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion von Ribonukleinsäuren und sind ein weiterer Beleg für deren wichtige biologische Rolle, die weit über Informationsspeicherung und -transport hinausgeht.

1.1.1 Künstliche Ribozyme

Die Entdeckung von katalytischer RNA warf eine für die Existenz einer RNA-Welt wichtige Frage über das katalytische Potential der RNA auf. Ist RNA in der Lage eine sehr viel größere Anzahl von Reaktionen zu katalysieren, als die bekannten natürlich vorkommenden Ribozyme es vermögen? Eine hilfreiche Technik, um dies Frage zu beantworten, ist *in vitro* Selektion, die sich auf Grundlage der SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) Methode von Tuerk und Gold Anfang 1990 entwickelte^{26, 27}. Mit *in vitro* Selektionsmethoden konnten eine große Anzahl neuer, künstlicher Ribozyme selektiert werden, die das Spektrum der von RNA katalysierten Reaktionen eindrucksvoll erweiterten. *In vitro* Selektion ist ein kombinatorischer Ansatz, in dem aus großen randomisierten Nukleinsäurebibliotheken mittels Selektionsstrategien Sequenzen mit bestimmten Eigenschaften, wie das Binden eines Zielmoleküls oder der Beschleunigung einer bestimmten Reaktion angereichert werden. Die selektierten Nukleinsäuren, die in der Lage sind Moleküle spezifisch zu binden, bezeichnet man als Aptamere. Solche Nukleinsäuren, mit spezifisch katalytischen Funktionen bezeichnet man als artifizielle Ribozyme. In den letzten zehn Jahren konnten eine große Anzahl

solcher neuer künstlicher Ribozyme von verschiedenen Arbeitsgruppen evolviert werden. Eineige dieser künstlichen Ribozyme katalysieren Reaktionen, für die keine natürlichen Ribozyme bekannt sind. Während die bisher entdeckten natürlichen Ribozyme auf Phosphatesterbindungs-knüpfung und -spaltung, sowie Peptidbindungs-knüpfung beschränkt sind, konnten künstliche Ribozyme für eine große Zahl völlig anderer Reaktionstypen selektiert werden (Tab. 1).

<i>Reaktionstyp</i>	<i>Katalysierte Reaktion</i>
C-C Bindungsknüpfung	
Diels-Alder Reaktion ^{28, 29}	
Aldolreaktion ³⁰	
C-N Bindungsknüpfung	
Amidbindungsknüpfung ³¹⁻³³	
N-Glykosidische Bindungsknüpfung ^{34, 35}	
C-S Bindungsknüpfung	
S-Michael Reaktion ³⁶	
S-Acylierung ³⁷	
C-O Bindungsknüpfung	

Umesterung³⁸⁻⁴¹Carbonathydrolyse⁴²**P-O Bindungsknüpfung**Phosphoranhydridbildung^{43, 44}RNA Ligation⁴⁵⁻⁴⁸**C-Metall****Bindungsknüpfung**Porphyrin Metallkomplexbildung⁴⁹**Redox Reaktionen**Oxidation and Reduktion^{50, 51}

Tab. 1 Beispiele für durch Ribozyme katalysierte Reaktionen. Reste, die Nucleinsäuren beinhalten sind mit R gekennzeichnet. Reste, die keine Nucleinsäure enthalten, mit R₁ bzw. R₂. Phosphatgruppen sind als eingekreistes P dargestellt. (Tabelle aus „Aptamers, Ribozymes and Deoxyribozymes“, Wiley VCH)

1.2 Biokatalysatoren für die Diels-Alder Reaktion

1.2.1 Diels-Alder Reaktion

Die Diels-Alder-Reaktion⁵², benannt nach Otto Diels und Kurt Alder ist eine leistungsfähiger Reaktionstyp in der organischen Synthese zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen⁵³⁻⁵⁵. Sie ermöglicht einen einfachen, stereospezifischen Zugang zu sechsgliedrigen Ringen. Sie ist eine [4 + 2] Cycloaddition zwischen einem Dienophil und einem Dien. Es werden aus drei C-C π -Bindungen zwei neue σ -Bindungen und eine π -Bindung gebildet. Sie läuft in einem konzertierten Prozess über einen cyclischen Übergangszustand ab, wobei die Woodward-Hoffmann-Regeln von der Erhaltung der Orbitalsymmetrie gelten^{56, 57}.

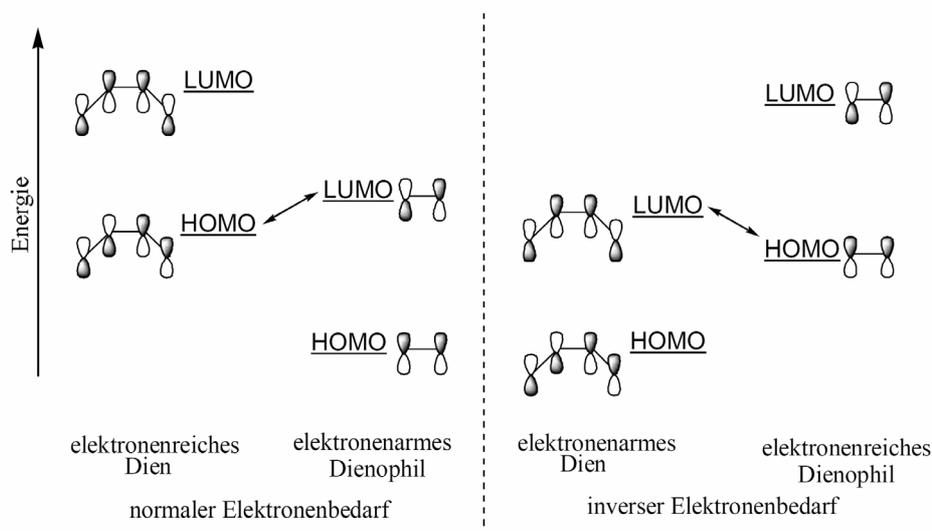


Abb. 1 *Energieschema mit HOMO (highest occupied molecular orbital) / LUMO (lowest unoccupied molecular orbital)-Wechselwirkungen der Diels-Alder Reaktion mit normalem und inversem Elektronenbedarf.*

Im Fall der Diels-Alder-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf kann durch das Einführen von elektronenreichen Gruppen am Dien und damit der Erhöhung des HOMOs

oder durch Einführen von Substituenten mit Elektronendefizit am Dienophil und einer Erniedrigung des LUMOs, die Differenz zwischen HOMO und LUMO verringert werden. Die daraus resultierende bessere Überlappung der Grenzorbitale führt dann im Rahmen der FMO-Theorie zu einer gesteigerten Reaktivität. Für Diels-Alder-Reaktionen mit inversem Elektronenbedarf gilt das Gegenteil.

Bei einer Diels–Alder Reaktion können bis zu vier Stereozentren auf einmal aufgebaut werden. In Kombination mit der Vielfalt der möglichen Reaktanden ist ersichtlich, warum diese Reaktion eine der wichtigsten stereoselektiven C-C Verknüpfungen in der Organisch-Chemischen Synthese darstellt.

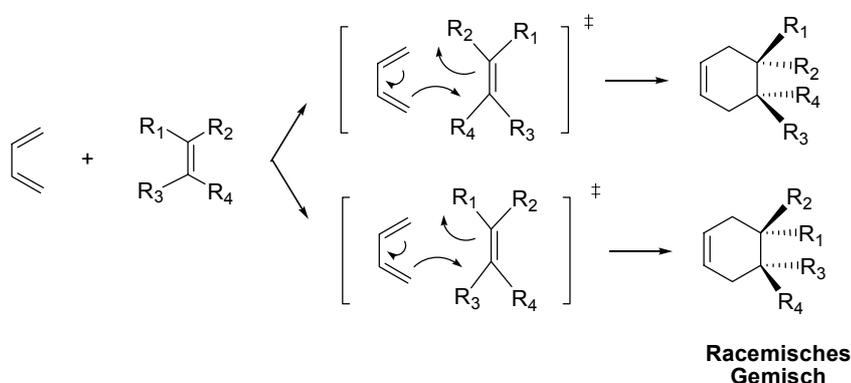


Abb. 2 Stereochemie der Diels-Alder Reaktion. Entstehung eines racemischen Gemisches, bei der Bildung von zwei neuen Stereozentren.

Es wird spekuliert, dass sich auch die Natur beim Aufbau einiger Sekundärmetabolite dieser Reaktion bedient. Viele der auf dieser Annahme beruhenden Biosynthese-Vorschläge enthalten die Möglichkeit einer enzymatischen Katalyse der [4 + 2]-Cycloaddition, die zum Naturstoff mit der „richtigen“ Konfiguration führt.

1.2.2 Katalyse der Diels-Alder Reaktion

Unkatalysiert müssen [4+2]-Cycloadditionen häufig bei relativ hohen Temperaturen durchgeführt werden (100 °C, in hochsiedenden Lösungsmitteln wie z.B. Xylol), was zu unerwünschten Nebenreaktionen und zur Beschleunigung der entropisch bevorteil-

ten, konkurrierenden Retro-Diels-Alder-Reaktion führen kann. Erst durch die Entdeckung von Lewis-Säuren (z. B. AlCl_3) als hochaktive Katalysatoren, wurde die Diels-Alder-Reaktion für Reaktionen mit temperaturempfindlichen Reagenzien anwendbar⁵⁸. Mittels Lewis-Säuren können heute Diels-Alder-Reaktionen bei tiefen Temperaturen (z. B. $-100\text{ }^\circ\text{C}$) durchgeführt werden. Durch Ausbildung stabiler Komplexe mit Übergangszuständen können chirale Lewis-azide Substanzen Stereoinformation in Reaktionen prochiraler Verbindungen induzieren, d.h., durch einen chiralen Katalysator kann ein einzelnes Enantiomer selektiv gebildet werden, trotz gleicher Reaktionsenthalpie der enantiomeren Produkte gegenüber den Ausgangsmaterialien⁵³. Der einzige Unterschied zwischen den jeweiligen Reaktionswegen besteht in den unterschiedlichen Energien der Übergangszustände, in denen der Katalysator die Reaktanden komplexiert und damit die energetischen Barrieren zu den beiden Enantiomeren unterschiedlich hoch sind. Die *enantioselektive Induktion* durch chirale Lewis-Säuren hat weite Anwendung in der organischen Synthese gefunden⁵⁴. Neben den inzwischen häufig verwendeten Lewis-Säure Katalysatoren gibt es eine große Anzahl von Untersuchungen zur Lösungsmittelabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Diels-Alder Reaktion. In Arbeiten von Breslow et al. wurden verschiedene Diene und Dienophile auf ihre Reaktionsgeschwindigkeiten zu den entsprechenden Diels-Alder-Produkten in Abhängigkeit von verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass polare Lösungsmittel und im besonderen Wasser die Reaktion um ein vielfaches beschleunigen können. Dieser Befund wird auf einen *hydrophobic effect* zurückgeführt. Er resultiert aus der Tendenz zu Aggregation unpolarer Verbindungen in Wasser, um die Kohlenwasserstoff-Wasser Grenzfläche zu minimieren. Dieser Effekt ist auch ursächlich für die Beschleunigung der Diels-Alder Reaktionen durch Makromoleküle wie Cyclo-dextrine, welche die Reaktionspartner in der hydrophoben Kavität binden und dadurch die Reaktanden in unmittelbare Nähe bringen. Ein hierfür eindrucksvolles Beispiel ist das so genannte „Rebek’s Tennisball“ Makromolekül^{59, 60}. Dabei wird durch das Makromolekül mittels simultaner Verkapselung eine hydrophobe passgenaue Umgebung bereitgestellt und die Diels-Alder Reaktion zwischen *p*-Benzochinon und Cyclohexadien um das 200fache beschleunigt⁵⁹. Solche Makromoleküle dienen mit ihren hydrophoben Bindungstaschen häufig als künstliche Enzymmodelle.

1.2.3 Enzyme

Enzyme können Reaktionen katalysieren indem sie die Struktur und Ladung des sich bildenden Übergangszustands stabilisieren⁶¹⁻⁶³. Bei den meisten dieser Reaktionen unterscheiden sich sowohl das Substrat als auch das Produkt strukturell deutlich vom Übergangszustand. Daher sind sowohl das Produkt als auch das Substrat lockerer an das Enzym gebunden als der aktivierte Komplex, was die Katalyse ermöglicht. Bei Diels-Alder-Reaktionen ist jedoch der Übergangszustand hoch geordnet und ähnelt strukturell stark dem Produkt⁶⁴. Ein Enzym, das diesen Übergangszustand stabilisiert, sollte auch das Produkt stark binden und dadurch inhibiert werden. Ein Fortschreiten der Reaktion und eine Katalyse würden also inhibiert werden. Alternativ kann die freie Aktivierungsenergie einer Reaktion auch durch eine Erhöhung der Grundzustandsenergie der Reaktanden erniedrigt werden. Bei Diels-Alder-Reaktionen könnte das durch Einführen einer Torsionsspannung in Dienophil oder Dien bewerkstelligt werden, es ist aber schwierig, eindeutige Beispiele dafür in der Literatur zu finden. Die Aussicht auf den Nachweis einer Diels-Alderase ist daher für mechanistisch interessierten Enzymologen verlockend, da hierüber auch ein in der Natur neuartiger Katalysemechanismus entdeckt werden könnte. In den letzten Jahren wurden vermehrt natürliche Diels-Alder Reaktionen entdeckt bei denen Diels-Alderase Enzyme eine Rolle spielen könnten. Experimentelle Belege liegen für die Lovastatinnonaketid-Synthase⁶⁵ vor, die an der Biosynthese von Lovastatin und der Makrophomat-Synthase⁶⁶ zur Produktion von Makrophomsäure beteiligt ist. Für letztere wurde die Kristallstruktur von Ose *et al.* 2003 gelöst⁶⁷.

1.2.4 Katalytische Antikörper

Die Katalyse der Diels-Alder Reaktion durch katalytische Antikörper (Abzyme) ist bereits seit 15 Jahren bekannt^{61, 63, 68}. 1989 berichteten Hilvert *et al.* als erste über die Katalyse einer Diels-Alder Reaktion mittels Antikörper⁶⁹. Sie gewannen, wie bei der Herstellung katalytischer Antikörper üblich, monoklonale Antikörper gegen ein Übergangszustandsanalogon für die Reaktion zwischen Tetrachlorthiophendioxid und N-Ethylmaleimid. Dabei wird die Produkthemmung verhindert, indem das labile Cycloadukt SO₂ abspaltet und das Produkt dem Übergangszustand nicht mehr ähnelt. Im Ver-

lauf der darauf folgenden Jahre konnten weitere katalytische Antikörper für Diels-Alder⁷⁰ und Retro-Diels-Alder Reaktionen⁷¹ entwickelt werden. Diese werden ebenso wie die kürzlich entdeckten Diels-Alderase Enzyme in der hier vorgelegten Arbeit zu der mechanistischen und strukturellen Betrachtung eines Diels-Alderase Ribozyms herangezogen.

1.2.5 Ribozyme

Die Diels-Alder Reaktion war gerade in Hinsicht auf ihren Reaktionstyp der Cycloaddition mit Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen ein besonders interessantes Ziel für die Selektion künstlicher RNA-Katalysatoren. Zum einen handelte es sich um eine Reaktion über deren Katalyse mittels Enzymen sehr wenig bekannt war, der aber gerade durch ihr großes Einsatzpotential in der präparativen organischen Chemie eine bedeutende Rolle zukommt. Es gab bereits Versuche, Ribozyme durch Selektion gegen Übergangszustandsanaloga der Diels-Alder-Reaktion zu erhalten. Obwohl erfolgreich bindende RNA-Moleküle angereichert wurden, konnten keine Katalysatoren daraus evolviert werden⁷². Erstmals gelang es Tarasow und Eaton, künstliche Ribozyme für eine Diels-Alder-Reaktion mit einem aliphatischen Dien zu selektieren⁷³. Dabei war die RNA-Bibliothek durch Einführen von Pyridylresten in Uridin erweitert funktionalisiert worden. Diese Substitutionen wie auch die Anwesenheit von Kupfer-Ionen sind für die katalytische Wirkung unerlässlich²⁸. Zudem war dieses Ribozym nur in selbstmodifizierender Form katalytisch aktiv, was ausschließlich „single-turnover“ zulässt.

Das in dieser Arbeit untersuchte Diels-Alder Ribozym wurde von Seelig und Jäschke mittels *in vitro* Selektion evolviert und wurde bereits von Stuhlman, Keiper und Bebenroth teilweise charakterisiert. Es hat sich nach weiteren Untersuchungen als das erste wirklich enzymähnliche künstliche Ribozym herausgestellt. Diese spezifischen Eigenschaften werden im anschließenden **Kapitel 1.3** genauer beschrieben.

1.3 Das Diels-Alder Ribozym

In der Arbeitsgruppe von Andres Jäschke konnten mittels direkter *in vitro* Selektion Nukleinsäuresequenzen bestimmt werden, die in der Lage sind, eine [4+2] Diels-Alder Reaktion zwischen Anthracen- und Maleimidderivaten zu beschleunigen²⁹. Die [4+2] Cycloaddition zwischen Anthracen und Maleimid ist eine Diels-Alder Reaktion mit normalem Elektronenbedarf, bei der das „highest occupied molecular orbital“ (HOMO) des Diens mit dem „lowest unoccupied molecular orbital“ (LUMO) des elektronenarmen Dienophils in Wechselwirkung tritt⁷⁴. In der Selektion wurde Anthracen als Dien über einen Polyethylenglykollinker an das 5'-Ende der RNA-Bibliothek mit $2 \cdot 10^{14}$ Molekülen, die 120 randomisierte Nukleotide enthielt, kovalent gebunden. Das Dienophil Maleimid ist mit einem Biotinylrest als Ankergruppe versehen (Abb.3). So konnten alle Spezies, die im Verlaufe der Reaktion diese Ankergruppe durch Bindungsknüpfung erwarben, mittels Affinitätschromatographie an einer Streptavidin-Festphase immobilisiert werden. Nach zehn Selektionsrunden war die Reaktivität der angereicherten Bibliothek um das 10000-fache gegenüber der Ausgangsbibliothek erhöht.

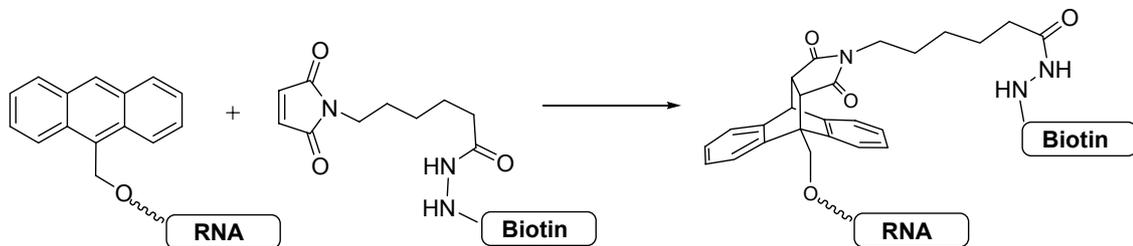


Abb. 3 Diels-Alder Reaktion zwischen Anthracen (Dien) und Maleimid (Dienophil) mit den Selektionsbedingten Modifikationen.

Nach Klonierung und Sequenzierung konnten 13 verschiedene Sequenzfamilien identifiziert werden, von denen die Besten die Reaktion 20000-fach beschleunigten. Es konnte ein kleines Motiv ermittelt werden, das in 90% aller aktiven Sequenzen vorhanden war. Die Sequenz des Minimalmotivs besteht aus 49 Nukleotiden und beschleunigt die Reaktion zwischen Anthracen und Biotinmaleimid um das 18500 fache in der intramolekularen Reaktion (*in cis*). Dieses Motiv besteht nach Sekundärstrukturanalyse aus drei Helices und drei formal einzelsträngigen Bereichen. Davon formen zwei eine innere

Schlaufe (hier als *bulge* bezeichnet) (Abb. 4a). In Mutationsanalysen und Probingstudien konnte gezeigt werden, dass dieser Bulgebereich und die vier ungepaarten Nukleotide am 5'-Terminus für die Ausbildung einer aktiven Tertiärstruktur zur Katalyse der Diels-Alder Reaktion eine wichtige Rolle spielen⁷⁵. Ausgehend von dieser Sekundärstruktur konnten durch formales Auftrennen des ersten und des zweiten Tetraloops (Loop 1 bzw. Loop 2) zweisträngige (Abb. 4b) bzw. dreisträngige Varianten (Abb. 4c) des Ribozyms erhalten werden.

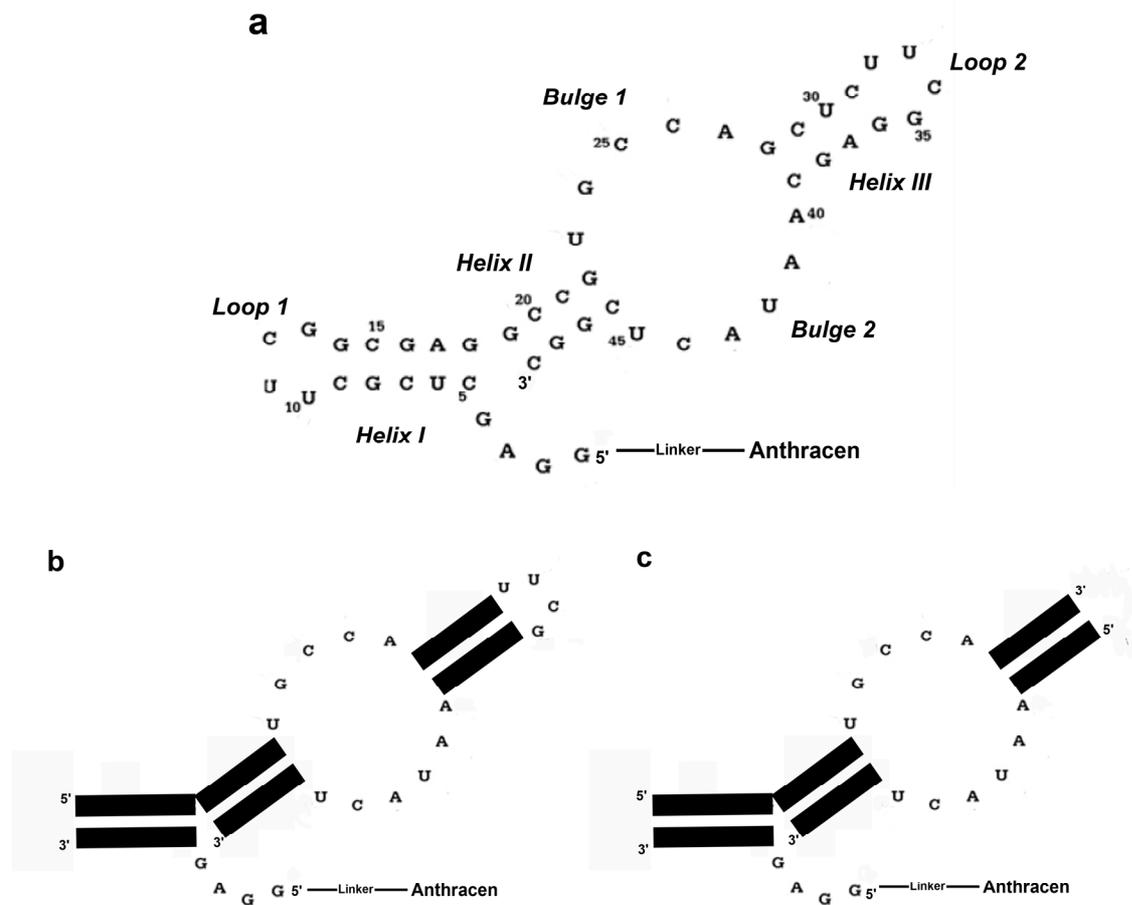


Abb. 4 Vorgeschlagenes katalytisch aktives 49-mer Minimalmotiv des Diels-Alder Ribozyms. (a) Die beiden Teile der asymmetrischen Schlaufe werden als *Bulge 1* und *Bulge 2* bezeichnet. *Helix I* und *Helix II* werden von zwei Schlaufen (*Loop 1*, *Loop 2*) geschlossen. Am 5'-Terminus ist Anthracen über einen Polyethylenglykollinker kovalent gebunden. (b) Schematische Darstellung der zweisträngigen Ribozym-Variante; bestehend aus 38-mer und 11-mer-Linker-Anthracen Konjugatstrang. (c) Schematische Darstellung der dreisträngigen Variante; bestehend aus 24-mer, 18-mer und dem 11-mer-Linker-Anthracen Konjugatstrang²⁹.

Das zweisträngige Ribozymkonstrukt besteht aus einem 38-mer und dem 11-mer, welches am 5'-Terminus über einen Linker mit Anthracen verbunden ist. Das dreisträngige Ribozymkonstrukt besteht aus 24-mer, 18-mer und dem Substratverknüpften 11-mer Strang. Beide Konstrukte zeigen eine ähnlich hohe Aktivität wie die 49-mer Minimalsequenz. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die 49-mer Sequenz auch die Reaktion zwischen den „freien“ Reaktanden katalysiert (*in trans*)⁷⁶. Das bedeutet, dass das Anthracen nicht notwendigerweise kovalent am 5'-Terminus der Sequenz gebunden sein muss, um vom Ribozym als Substrat erkannt zu werden. Dieses Ribozym ist somit ein echter Katalysator, der unverändert aus der Reaktion hervorgeht. Man unterscheidet bei Ribozymen so genannte *in cis* Aktivität und *in trans* Aktivität. Diese Nomenklatur ist unbedingt zu unterscheiden von den in der Chemie gebräuchlichen Begriffen *cis* und *trans* als Konfigurationsisomere. Die Bezeichnungen *in cis* und *in trans* haben ihren Ursprung in der Biologie und sind als Termini auf dem Gebiet der Ribozymforschung etabliert. Als *in cis* bezeichnet man die Katalyse einer Selbstmodifikationsreaktion (intramolekular). Als *in trans* bezeichnet man die Katalyse einer Reaktion die keine Veränderung der chemischen Konstitution des Katalysators selbst zur Folge hat (intermolekular). Für *in trans* aktive Ribozyme ist das Substrat nicht Teil des Ribozyms selbst. Dabei ist jedoch darauf hinzuweisen, dass eine genaue Definition schwierig ist, unter der Berücksichtigung das gerade im Fall der Ribozyme das Substrat häufig strukturgebender Teil des Katalysators ist, auch wenn es nur über Basenpaarungen und somit nicht kovalent an das Ribozym gebunden ist. Für die vorliegende Arbeit soll im Folgenden die Definition von *in cis* und *in trans* wie oben beschrieben verwendet werden.

Die *in trans* Aktivität des 49-mer Diels-Alder Ribozyms ermöglicht es, unterschiedliche Derivate des Anthracens sowie des Maleimids auf ihre Substrateigenschaften zu untersuchen. Abbildung 5 gibt eine Übersicht der bisherigen Ergebnisse⁷⁷. Beide Reaktanden werden durch hydrophobe Wechselwirkungen spezifisch vom Ribozym erkannt, wobei prinzipiell das Dien als Anthracen und das Dienophil als Maleimid vorliegen müssen. Bezüglich des Anthracens zeigte sich, dass alle Positionen mit Ausnahme der 2- und 3-Position (rot), Substitutionen der Größe einer Methylgruppe erlauben. Das Maleimid ist am Stickstoffsubstituenten mit Alkylketten unterschiedlicher Länge derivatisierbar. Eine Methylgruppe als Substituent in α -Position dieser Alkylkette ist jedoch verboten. Maleimidderivate mit einer Methylgruppe an der Doppelbindung des Maleimids zeigen

ebenfalls keine Aktivität. Aus diesen Versuchen kann man sich eine grobe Vorstellung einer eventuellen Bindungstasche für die Substrate machen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nicht direkt zwischen sterischen und elektronischen Ursachen für die Nichtumsetzung durch das Ribozym unterschieden werden kann.

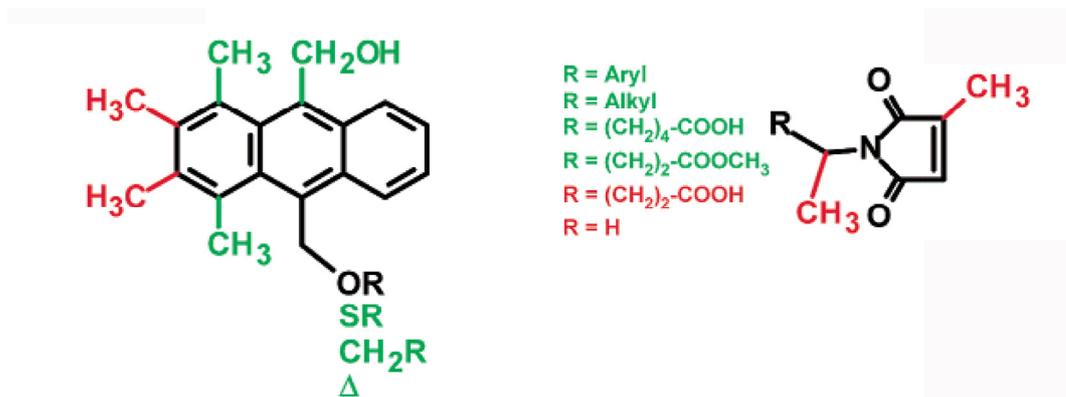


Abb. 5 Substratvariationstoleranz des Diels-Alder Ribozyms. Vom Ribozym tolerierte Substituenten sind grün dargestellt, nicht tolerierte Substituenten rot⁷⁷.

Eine besondere Eigenschaft der Diels-Alder Reaktion ist die Bildung von Stereoisomeren. Untersuchungen zur Enantioselektivität des Ribozyms zeigten, dass die Diels-Alder Reaktion zwischen Anthracen und Maleimid mit hoher Enantioselektivität katalysiert wird. Dabei ist der Enantiomerenüberschuß (ee) hauptsächlich abhängig vom sterischen Anspruch des Substituenten in 9-Position des Anthracens. Während 9-Hydroxymethylanthracen lediglich mit einem ee von 16 % umgesetzt wird, liegt der ee für die Umsetzung mit 9-Methylhexaethylglykolanthracen bei über 90 %. Um zu überprüfen, wie sich das Diels-Alder-Ribozym als chiraler Katalysator bei Umkehrung seiner Konfiguration verhält, wurde ein synthetisches 49-mer, das ausschließlich aus Nucleotiden mit L-Riboseeinheiten aufgebaut ist, also das Spiegelbild des Ribozyms, hinsichtlich der Verteilung der enantiomeren Produkte untersucht. Diese so genannten Spiegelmere sind Spiegelbilder der natürlichen RNAs aus D-Nucleotiden, weil alle Chiralitätszentren in einem Molekül umgekehrt werden^{78, 79}.

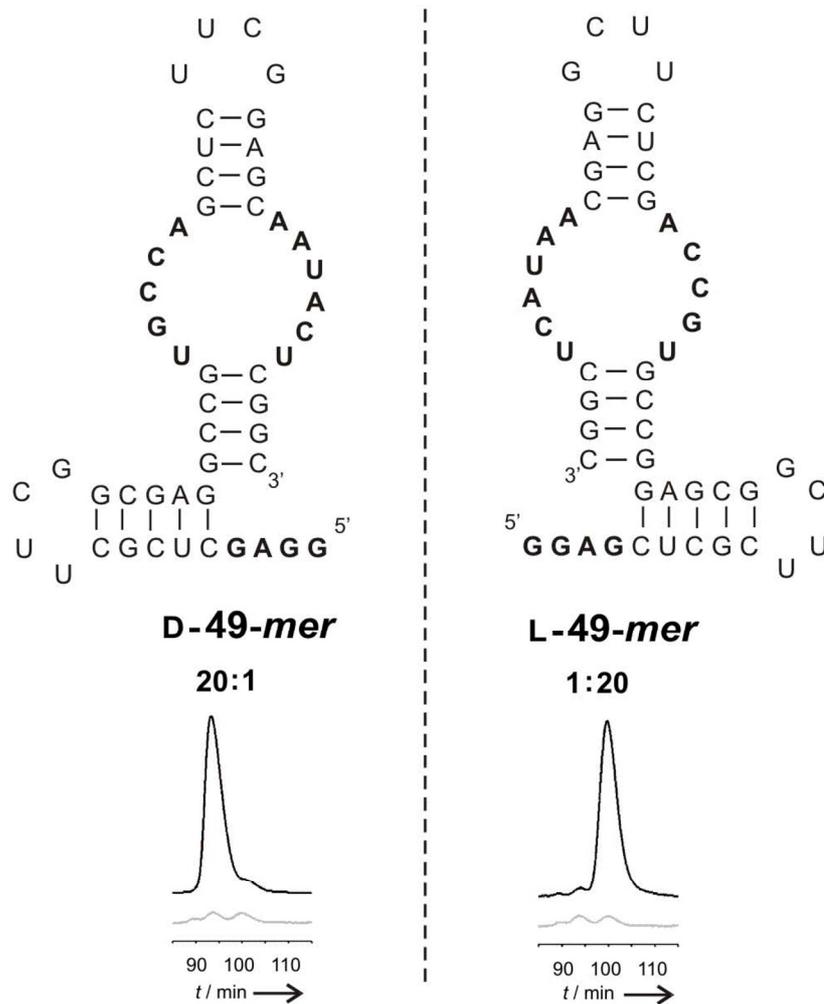


Abb. 6 Ribozymkatalysierte Diels-Alder Reaktion (in trans). Umgekehrte Enantioselektivität des D-Ribozyms und des L-Ribozyms. Die Chromatogramme zeigen die chirale HPLC-Analyse der Diels-Alder Produkte in Gegenwart des D-49-mers (links) und des Spiegelmers L-49-mer (rechts). Die Peaks sind den Produktenantiomeren zuzuordnen. Die Ribozymkatalysierte Reaktion setzt die Substrate mit einem 90%igen Enantiomerenüberschuß um, während in der unkatalysierten Hintergrundreaktion ein racemisches Gemisch entsteht⁷⁶.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Spiegelmerer in Bezug auf ebenfalls gespiegelte Zielmoleküle erwartungsgemäß nicht verändern⁷⁶. Sie besitzen jedoch gegenüber natürlicher RNA den großen Vorteil, vollkommen resistent gegen natürlich vorkommende Nukleasen zu sein, was diese Technologie zu einem Erfolg versprechenden Ansatz macht. Erwartungsgemäß besitzt

das L-Spiegelmer-Ribozym genau umgekehrte enantioselektive Eigenschaften zum D-Ribozym (Abb. 6).

Das Diels-Alder Ribozym ist der erste künstliche Ribozymvertreter, der in der Lage ist eine C-C-Bindungsreaktion zwischen zwei kleinen „freien“ organischen Reaktanden zu katalysieren wobei die Bindungsknüpfung enantioselektiv stattfindet. Damit besitzt dieses Ribozym mit Enzymen vergleichbare Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen vorgestellt, die zur weiteren Aufklärung von Struktur und Mechanismus dieses Biokatalysators durchgeführt wurden.

2 Ziel der Arbeit

Untersuchungsgegenstand der hier vorliegenden Arbeit ist das in der Einleitung vorgestellte Diels-Alder Ribozym. In dieser Arbeit sollte Struktur und Mechanismus dieses Diels-Alder Ribozyms untersucht und in vergleichenden Zusammenhang zu anderen Diels-Alder Katalysatoren und Biokatalysatoren gestellt werden. Dazu wurden verschiedene Ansätze verfolgt.

Mittels chemischer Substitutionsanalyse wurde die Akzeptanz des Ribozyms gegenüber Änderungen in der Substratstruktur getestet. Verschiedene Dien- und Dienophilderivate wurden synthetisiert und auf ihre Substrateigenschaften geprüft. Akzeptanzen oder Intoleranzen gegenüber bestimmten Substratmodifikationen sollen Aufschluss über die strukturelle Beschaffenheiten und Dimensionen eines aktiven Zentrums geben. Gleichzeitig sind diese Informationen Voraussetzung, um Modifikationen für weitere Experimente zur Untersuchung von Struktur sowie Dynamik einzuführen. Substrate für verschiedene Ansätze zur Strukturaufklärung und Untersuchung des Mechanismus sollten synthetisiert werden, wie Schweratom-Derivate zur Kristallstrukturaufklärung, photoreaktive Substrate für Photoaffinitätsmarkierungen und fluoreszenzmarkierte Substrate für die Untersuchung dynamischer Aspekte des Ribozyms. In Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten sollte erstmals das aktive Zentrum des Ribozyms lokalisiert werden. Mit der Lösung der Kristallstruktur des Diels-Alder Ribozyms, zu der diese Arbeit beigetragen hat, ergab sich die Möglichkeit diese Experimente mit der Kristallstruktur auf die Vereinbarkeit der Ergebnisse zu untersuchen.

Weiteres Ziel der Arbeit ist es ein Verständnis der mechanistischen Grundlage ribozymkatalysierter Diels-Alder Reaktionen zu erhalten. Dazu sollten verschiedene Ribozymkonstrukte synthetisiert werden, wobei ein besonderer Schwerpunkt auf der Untersuchung der Enantioselektivität des Ribozyms liegt. Schließlich sollten Beiträge zur Aufklärung von Funktionsweisen von Ribozymen geleistet werden um diese mit enzymatischen Biokatalysatoren vergleichend unter dem allgemeinen Aspekt der Katalyse zu betrachten.

3 Material und Methoden

3.1 Oligoribonukleotide

Alle Sequenzen sind in der Richtung 5' → 3' angegeben. Die Oligoribonukleotide wurden als Produkte aus chemischer Festphasensynthese entweder käuflich erworben (Fa. Dharmacon Inc.⁸⁰ und Fa. CSS) oder selbst synthetisiert bzw. durch *in vitro* Transkription mit geeigneten DNA-Templaten hergestellt.

49-mer:

GGAGCUCGCUUCGGCGAGGCCGUGCCAGCUCUUCGGAGCAAUACUCGG

38-mer :

GGGCGAGGCCGUGCCAGCUCUUCGGAGCAAUACUCGGC

11-mer :

GGAGCUCGCCC

11mer-5'-EG_n-Anthracen :

Anthracen-EG₂-GGAGCUCGCCC

Anthracen-EG₃-GGAGCUCGCCC

Anthracen-EG₄-GGAGCUCGCCC

Anthracen-EG₆-GGAGCUCGCCC

Anthracen-EG₈-GGAGCUCGCCC

Anthracen-EG₁₀-GGAGCUCGCCC

Anthracen-EG₁₂-GGAGCUCGCCC

11mer-5'-A-EG₁₂-Anthracen :

Anthracen-EG₁₂-AGGAGCUCGCCC

11mer-5'-AA-EG₁₂-Anthracen :

Anthracen-EG₁₂-AAGGAGCUCGCCC

3.2 Oligodesoxyribonukleotide

Alle Sequenzen sind in der Richtung 5' → 3' angegeben. Die Oligodesoxyribonukleotide wurden als Produkte aus chemischer Festphasensynthese käuflich erworben (Fa. I-BA).

49-mer template antisense

GCCGAGTATTGCTCCGAAGAGCTGGCACGGCCTCGCCGAAGCGAGCTCCTA
TAGTGAGTCGTATTAGA

49-mer sense

TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTC

38-mer template antisense

GCCGAGTATTGCTCCGAAGAGCTGGCACGGCCTCGCCCTATAGTGAGT-
CGTATTAGA

38-mer sense

TCTAATACGACTCACTATAGGGCGAG

3.3 Enzymatische Synthese von Oligoribonukleinsäuren durch

T7-Transkription

Mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 lässt sich *in vitro* eine DNA-Sequenz in eine komplementäre RNA umschreiben, sofern sie an ihrem 3'-Ende einen 17 Basenpaare langen doppelsträngigen Erkennungsbereich (T7-Promotor) besitzt^{81, 82}. Die eingebauten Basen werden in Form von Nucleosidtriphosphaten (NTPs) benötigt. Durch Einsetzen von α -³²P-NTP oder auch γ -³²P-GTP läßt sich die hergestellte RNA radioaktiv markieren. Die RNA-Synthese beginnt im Anschluss an die Promotorregion stets mit einem Guanosinnucleotid, wobei sich die Ausbeuten der Transkription deutlich erhöhen, wenn die RNA mit zwei oder mehreren Guanosinnucleotiden beginnt.

Als DNA-Matrizen wurden hybridisierte synthetische Oligonucleotide eingesetzt. Sie wurden durch Erhitzen der äquimolaren Mischung der beiden DNA-Stränge auf 95°C

für 3 Minuten und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur über einen Zeitraum von mehr als 1 h präpariert. Es wurden so die DNA-Matrizen für das 49-mer Ribozym und für die Substrat-RNA-Konjugate (8-mer bis 11-mer) aus entsprechenden synthetischen Oligonucleotiden hybridisiert.

Standardansatz für Hybridisierung:

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

Standardansatz für Transkription:

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

10x Transkriptionspuffer:

800 mM	HEPES, pH 7,5
220 mM	MgCl ₂
10 mM	Spermidin

In der Regel wurde zur radioaktiven Markierung α -³²P-CTP benutzt. Der Transkriptionsansatz wurde für 2-4 Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurde ein Ali-

quot (2 µl) zur radioaktiven Bestimmung der hergestellten Menge an RNA abgenommen und der Reaktionsansatz direkt durch denaturierende PAGE gereinigt. Die Produktbanden wurden über Autoradiographie detektiert, aus dem Gel ausgeschnitten, mit 0,3 M Natriumacetat pH 5,5 2 x ca. 45 min bei 70 °C eluiert und mit Ethanol präzipitiert. Die erhaltene RNA und das Aliquot wurden am Cerenkov-Zähler vermessen und daraus die Ausbeute bestimmt. Für die Quantifizierung der RNA wurden folgende Formeln benutzt:

$$\text{Einbaerate des } \alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP} = \frac{\text{Radioaktivität der RNA [cpm]} * 100\%}{\text{eingesetzte Gesamtradioaktivität [cpm]}}$$

$$\text{RNA - Stoffmenge} = \frac{\text{Einbaerate} * \text{Konzentration CTP} * \text{Ansatzvolumen}}{\text{Anzahl der im Transkript vorkommenden Cytidine}}$$

3.4 T7-Transkription mit Initiatornukleotid

Das Enzym T7-RNA-Polymerase toleriert manche chemische Modifikationen im Initiationsschritt⁸³. Während der Initiation der Transkription setzt das Enzym Guanosinmonophosphat oder 5'-Konjugate von Guanosinmonophosphat um und baut diese am 5'-Ende der RNA-Transkripte ein, jedoch nicht während der Elongationsschritte.

Zur Erzeugung von 5'-Anthracen-Hexaethylenglycol-modifizierter RNA wurde das Initiatornucleotid Anthracenmethylen-hexaethylenglycol-guanosin in Konzentrationen von 1-4 mM den Transkriptionsansätzen zugegeben, wobei die GTP-Konzentration dabei teilweise erniedrigt wurde^{84, 85}. Die Durchführung der Reaktion und Aufreinigung erfolgte analog zur Transkription ohne Initiatornucleotid, wobei sich hier das Anthracen-RNA-Konjugat aufgrund seiner geringeren elektrophoretischen Mobilität von den unmodifizierten Transkripten abtrennen ließ.

Standardansatz:

30 µl	dsDNA-Matrizen mit Promotorbereich (z.B. 20 µM)
10 µl	10x Transkriptionspuffer
10 µl	Dithiothreitol (0,1 M, Gibco-BRL)
1,2 µl	Rinderserumalbumin (20 mg/ml, Boehringer Mannheim)
10 µl	α - ³² P-CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham)
je 4 µl	ATP, CTP, UTP (je 100 mM, Roche)
2 µl	GTP (100 mM, Roche)
75 OD	Anthracen-EG ₆ -Guanosin
4 µl	T7-Polymerase (50 U/µl, Stratagene)
ad 100 µl	Wasser

3.5 Standartmethoden und Reagenzsysteme

Folgende Standardmethoden wurden entsprechend der angegebenen Literaturstellen⁸⁶,⁸⁷ oder nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ethanol- und Isopropanolfällungen, Polyacrylamidgelelektrophorese (Rothiphorese DNA Sequenziersystem, Roth), Agarosegelelektrophorese, NAP 5 - Gelfiltration, photometrische Mengenbestimmung von Nucleinsäuren, Cerenkov-Messung, Elution von Nucleinsäuren aus Gelen, Anfärben von Gelen mit SYBRGold™, UV-Shadowing.

3.6 Chemische Synthese von Nucleinsäuren

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

Es wurde mit β -Cyanoethylphosphoramiditen gearbeitet, deren exocyclische Aminogruppen mit den üblichen Schutzgruppen geschützt waren: *iso*Butyryl-G, Benzoyl-A

und Benzoyl-C. Die 2'-Hydroxylgruppe der Ribophosphoramidite war als *tert*Butyldimethylsilylether geschützt.

Die Synthesen wurden im 0,2 oder 1 µmol-Maßstab durchgeführt. Dazu kam CPG-Säulenmaterial (*controlled pore glass*) mit einer Porengröße von 500 Å zum Einsatz. Die Standardsyntheseprotokolle des Geräteherstellers wurden in der Arbeitsgruppe optimiert: Waschschritte erfolgten mit der 1,5- bis 2-fachen Zahl an Pulsen und der Oxidationsschritt wurde mit der 2- bis 3-fachen Menge an Oxidationsreagenz durchgeführt. Für DNA-Synthesen wurde Dicyanoimidazol als Aktivator benutzt. Durch die Verwendung von 0,2 M Benzylthiotetrazol (BTT) als Aktivator bei RNA-Synthesen konnte der Amiditverbrauch auf zwei Drittel der ursprünglichen Menge gesenkt und außerdem die Kopplungszeit von ca. 10 auf 4 Minuten verkürzt werden⁸⁸. Die Amidite wurden in Konzentrationen von 0,1 M als Lösungen in Acetonitril eingesetzt. Im Folgenden ist ein typisches Syntheseprotokoll für eine RNA-Synthese im 1 µmol-Maßstab im Expedite-Format wiedergegeben:

Function	Mode	Amount	Time(sec)	Description
\$Deblocking				
144 /*Index Fract. Coll.	*/ NA	1	0	"Event out ON"
0 /*Default	*/ WAIT	0	1.5	"Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off	*/ NA	1	1	"START data collection"
38 /*Diverted Wsh A	*/ PULSE	15	0	"Flush system with Wsh A"
16 /*Dblk	*/ PULSE	20	0	"Dblk to column"
0 /*Default	*/ WAIT	0	20	"Default"
16 /*Dblk	*/ PULSE	20	0	"Deblock"
0 /*Default	*/ WAIT	0	20	"Default"
16 /*Dblk	*/ PULSE	20	0	"Dblk"
0 /*Default	*/ WAIT	0	20	"Default"
38 /*Diverted Wsh A	*/ PULSE	60	0	"Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off	*/ NA	0	1	"STOP data collection"
144 /*Index Fract. Coll.	*/ NA	2	0	"Event out OFF"
\$Coupling				
1 /*Wsh	*/ PULSE	8	0	"Flush system with Wsh"
2 /*Act	*/ PULSE	5	0	"Flush system with Act"
18 /*A + Act	*/ PULSE	6	0	"Monomer + Act to column"
18 /*A + Act	*/ PULSE	2	0	"Couple monomer"
0 /*Default	*/ WAIT	0	80	"Default"
18 /*A + Act	*/ PULSE	2	0	"A + Act"
0 /*Default	*/ WAIT	0	80	"Default"
2 /*Act	*/ PULSE	5	78	"Couple monomer"
1 /*Wsh	*/ PULSE	2	24	"Couple monomer"
1 /*Wsh	*/ PULSE	21	0	"Flush system with Wsh"

```

$Capping
12 /*Wsh A          */ PULSE  30    0 "Flush system with Wsh A"
13 /*Caps          */ PULSE   7     0 "Caps to column"
13 /*Caps          */ PULSE   6    15 "Cap"
12 /*Wsh A        */ PULSE   9    23 "Cap"
12 /*Wsh A        */ PULSE  21     0 "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
15 /*Ox           */ PULSE  50     0 "Ox to column"
0  /*Default      */ WAIT    0    20 "Default"
12 /*Wsh A        */ PULSE  35     0 "Flush system with Wsh A"
$Capping
13 /*Caps          */ PULSE   7     0 "Caps to column"
12 /*Wsh A        */ PULSE  45     0 "End of cycle wash".

```

Die Abspaltung des synthetisierten Oligonukleotides vom Trägermaterial und Basenschutzung erfolgte mit 0,5-2 ml 40%-iger wässriger Methylaminlösung bei 65°C für 10-20 min im Wasserbad ⁸⁹. Die überstehende Lösung wurde dann abgenommen und das CPG-Trägermaterial noch 3x mit je 1 ml einer Lösung aus Ethanol, Acetonitril und Wasser im Mischungsverhältnis 3:1:1 gewaschen. Diese Filtrate wurden vereinigt und nach vorheriger Kühlung in flüssigem Stickstoff im Vakuum zur Trockne eingengt. Die Abspaltung der Silylschutzgruppen durch Flusssäure erfolgte mit 250 µl einer Mischung aus N-Methylpyrrolidinon, Triethylamin und Triethylamin*Trihydrofluorid im Verhältnis 3:1, 5:2 für 90 min bei 65°C ⁹⁰. Um das Rohprodukt durch *reversed phase*-HPLC aufzureinigen zu können, mussten die Fluoridionen entfernt werden. Dies geschah durch Schütteln mit 500 µl Isopropyltrimethylsilylether und nachfolgende Fällung des Rohproduktes mit 1 ml Diethylether bei Raumtemperatur.

Die RNA wurde anschließend durch *umkehrphasen*-HPLC an einer C₁₈-Festphase aufgereinigt. Die Detektion erfolgte über die UV-Absorption bei 260 nm. Die Peaks wurden fraktioniert und anschließend im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die gereinigten Oligoribonucleotide wurden danach noch durch NAP 5-Gelfiltration und Ethanol-fällung entsalzt.

3.6.1 Synthese von Phosphoramiditen zur Kopplung von Anthracen

(0,749 mmol) des als Alkohol vorliegenden Anthracen-n-ethylenglykolderivats werden für 12 h am Vacuum mit 3 x 5 ml Toluol koevaporiert und in 4ml säurefreiem CH₂Cl₂ unter Argon und Zugabe von 0,39 ml (2,2 mmol) Hünig Base (Diispropylethylamin

DIPEA) unter Lichtausschluss gelöst. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt und 0,20 ml (0,9 mmol) 2-Cyanoethyl-N,N'-diisopropylchlorophosphoramidit zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 1 h gerührt, während die Temperatur langsam auf RT gebracht wird. Die Lösung färbt sich braun und wird bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt, bis im Dünnschichtchromatogramm kein Edukt mehr detektiert wird (Laufmittel: Ethylacetat/TEA 100:1). Das Reaktionsgemisch wird im Anschluß direkt über Kieselgelchromatographie aufgereinigt (Laufmittel Ethylacetat/TEA 95:5) und das erhaltene gelbliche Öl wird unter Argon bei -20°C gelagert und so bald als möglich zur Synthese von 5'-konjugierten Oligoribonukleotide eingesetzt.

3.6.2 Synthese von 5'-konjugierten Oligoribonukleotiden

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

3.7 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

3.7.1 5'-Markierung durch Phosphorylierung

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

Standardansatz:

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

Nach Inkubation bei 37°C für 1,5-2 Stunden wurde der Ansatz durch 15% PAGE (Sequenziergelapparatur) aufgereinigt, autoradiographiert, ausgeschnitten und das Oligonucleotid mit je 150 μl Maxam & Gilbert-Elutionslösung (0,5 M NH_4OAc ; pH 5,5; 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0,1 mM EDTA, 0,1% SDS) 3x30 min bei 37 °C eluiert. Als Fällungshilfe wurden 20 μg 5',3'-Adenosindiphosphat (pAp) zugegeben und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 30 μl Wasser gelöst und durch Gelfiltration (Sephadex G-25) entsalzt.

3.7.2 3'-Markierung durch Ligation

Mit dem Enzym T4-RNA-Ligase kann die 3'-Hydroxylgruppe einer RNA mit der 5'-Phosphatgruppe eines weiteren RNA-Moleküls in Gegenwart von ATP verestert werden. Bei Verwendung von beispielsweise Cytidin-3'-(5'- ^{32}P)-diphosphat (pCp) erlaubt diese Reaktion die radioaktive Markierung des 3'-Terminus von RNA⁹¹.

Standardansatz:

1 μ l	RNA aus chemischer Synthese (z.B. 10 pmol)
	3 min 65°C, dann 10 min auf Eis
1,5 μ l	10 x Ligationspuffer (MBI Fermentas)
1,5 μ l	1 mM ATP
3 μ l	α - ³² P-pCp (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham)
2 μ l	T4-RNA-Ligase (20 U/ μ l, MBI Fermentas)
ad 15 μ l	Wasser

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

3.8 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

3.8.1 Reversed-phase-HPLC

HPLC ist eine Säulenchromatographie, bei der durch Verwendung von sehr feinkörnigem Trägermaterial für die stationäre Phase (5 bis 10 μ m) eine sehr geringe Trennhöhe und damit verbunden eine große Trennleistung erreicht wird. Zur Trennung von Nucleinsäuren wird eine unpolare Umkehrphase (*reversed phase*) als stationäre Phase eingesetzt. Dafür werden die polaren Silanolgruppen von Kieselgel mit Alkylsilanen umgesetzt. Hier wurden C₁₈-Säulen mit 18 Kohlenstoffatomen in der modifizierenden Alkylkette verwendet (Ultrasphere ODS C18, 5 μ m, 80 Å Porengröße, 250 x 4,6 mm bzw. „LUNA“ der Firmen Beckmann und Phenomenex). Die mobile Phase war ein binärer Gradient aus Puffer A (0,1 M TEAAc, pH 7,0) und Puffer B (0,1 M TEAAc, pH 7,0 in 80% Acetonitril). Die chromatographische Trennung wurde mit einer Flußrate

von 1 ml/min und einer Säulentemperatur von 45°C durchgeführt. Es wurden die Gerätekonfigurationen System Gold der Firma Beckmann und ChemStation von Hewlett-Packard verwendet. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei einer oder mehreren durch die Methode bestimmten Wellenlängen.

HPLC-Methode zur Reinigung von kurzen Oligonucleotiden:

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

HPLC-Methode zur Reinigung von Anthracenmethylen-n-ethylenglykol-11-mer-RNA-Konjugat:

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

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

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

3.8.2 HPLC an chiralen Festphasen

Für die Untersuchungen zur Enantioselektivität wurde eine chiral derivatisierte *reversed phase* genutzt.

Die Trennung der enantiomeren Diels-Alder Produkte erfolgte auf einer Umkehrphase, die mit (R)- α -Naphthylethylamin als chiraler Gruppe derivatisiert war.

Säule: YMC Chiral NEA (R) (YMC Europe), 250 x 4,6 mm, S-5 μ m, 300 Å

Flussrate: 0,8 ml min⁻¹, Temperatur: 46°C, UV-Detektion: 210 nm

Gradient I: Wasser/Ethanol 65:35 isokratisch,

Gradient II: Wasser/Ethanol 63:37 isokratisch,

oder Gradient III: Wasser/Ethanol 60:40 isokratisch.

3.9 Aktivitätsmessung von Ribozymen

3.9.1 HPLC-Assay

Eine rein qualitative Bestimmung der Substrateigenschaften eines Großteils der Maleimide wurde in einem *in cis* HPLC-Assay durchgeführt. Zu einer Lösung von 0,2 mM 38-mer und 0,1 mM 11-mer-EG₆-Anthracen in 30 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl und 80 mM MgCl₂ wurde eine 10 mM ethanolische Lösung des jeweiligen Dienophils zugegeben zu einer Finalkonzentration von 1 mM. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μ l β -Mercaptoethanol abgestoppt und der Reaktionsansatz HPLC-Chromatographisch aufgetrennt. Der gleiche Ansatz ohne 38-mer wurde für eine Hintergrundreaktion ebenfalls HPLC-Chromatographisch aufgetrennt. Aus dem Vergleich der entstanden Menge an 11-mer-EG₆-Produkt lässt sich eine qualitative Beurteilung der Substrateigenschaften des jeweiligen Dienophils treffen. Die HPL Chromatographische Auftrennung erfolgte nach den in *Kapitel 3.8.1* beschriebenen Bedingungen.

3.9.2 UV-Spektrometrischer Assay

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

Auf diese Weise können relative Reaktionsgeschwindigkeiten durch UV/Vis-Spektroskopie bestimmt werden. Die Absorption der jeweiligen Anthracenderivate bei

einer Wellenlänge von 365 nm wurde 15 min bei Raumtemperatur verfolgt. Die Reaktionen wurden in 30 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4), 300 mM NaCl und 80 mM MgCl₂ durchgeführt, wobei je nach Löslichkeit der Komponenten ein Anteil von bis zu 10% organischem Lösungsmittel zugesetzt wurde. Die katalysierten Reaktionen wurden mit 7 µM Ribozym durchgeführt. Die finale Konzentration des Diens war 100 µM und die des Dienophils 1 mM. Die Reaktionen wurden in einer Mikroküvette in einem Volumen von 7 µl verfolgt (Hellma, 1mm bzw. 1 cm Schichtdicke)..

3.9.3 Fluoreszenzspektrometrischer Assay

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

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

3.10 Photoaffinitätsmarkierungsexperimente

Alle Durchführungen wurden unter Verwendung brauner Eppendorfgefäße vorgenommen. Zu einer Lösung von 50 µM 38-mer (mit 5'-³²P-markiertem 38-mer ~5 x 10⁶ cpm) und 25 µM 11-mer-EG₆-Anthracen in 30 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl und 80 mM MgCl₂ wurde unter Lichtausschluss eine 10 mM ethanolische Lösung 1-(4-Azidobenzyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (**38**) zu einer Finalkonzentration von 1mM zugegeben. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die RNA mittels Gelfiltration (DyeEx[®] Amersham) entsalzt und vom Überschuss an **38** abgetrennt. Die erhaltene Lösung wurde

eingedampft und das Pellet erneut in 30 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl und 80 mM MgCl₂ gelöst. Diese Lösung wurde für 20 min unter Verwendung eines Polystyren-filters mit Licht der Wellenlänge 302 nm bestrahlt. Anschließend wurde 1 µl DTT und 10 µl Formamid zugegeben. Die Probe wurde über ein 15%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Bande des Photoaffinitätsmarkierungsprodukts mittels Phosphorimager identifiziert. Die Produktbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit 550 µl Maxam & Gilbert-Elutionslösung (0,5 M NH₄OAc; pH 5,5; 10 mM Mg(OAc)₂, 0,1 mM EDTA, 0,1% SDS) 6h bei 37°C eluiert. Als Fällungshilfe wurden 20 µg 5',3'-Adenosindiphosphat (pAp) zugegeben und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gefällt. Das Pellet wurde im Anschluss einer limitierten alkalischen Hydrolyse unterworfen (*Kapitel 3.11.2*).

3.11 Enzymatischer und chemischer Verdau zur RNA Sequenzanalyse

Im folgenden werden die Methoden aufgeführt, mit denen die Sequenzanalyse für die Photoaffinitätsmarkierungsexperimente durchgeführt wurden⁹². Die RNA-Spaltprodukte wurden zugeordnet, indem bei der Gelelektrophorese parallel Produkte aus alkalischer RNA-Hydrolyse und limitierter Spaltung mit RNase T1 der gleichen RNA aufgetragen wurden. Die markierte RNA wurde dem Verdau in Gegenwart von tRNA als Carrier unterworfen. Nach der Aufarbeitung wurden die erzeugten RNA-Fragmente auf einem Sequenziergel aufgetrennt und autoradiographiert.

3.11.1 Spaltung mit RNasen

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

Die ³²P-markierte RNA (50.000 cpm/Ansatz) wurde in 1 µl Millipore Wasser gelöst und mit 0,37 µl tRNA (30µg/µl) versetzt. Anschließend wurde 10 µl T1-Puffer für denaturierende Bedingungen (12,5 mM Natriumcitrat pH 4,5, 0,5 mM EDTA, 3,5 M Harnstoff) zugegeben und für 10 min bei 55°C inkubiert. Dem Reaktionsansatz wurden 0,05 U RNase T1 zugegeben und erneut für 10 min bei 55°C inkubiert. Die Reaktion wurde

anschließend sofort auf Eis gesetzt und durch Zugabe von 10 μl Formamid gestoppt. Die Probe wurde auf ein 15%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel geladen, die Elektrophorese bei 1500 Volt für 3 h durchgeführt und die Banden mittels Phosphorimager analysiert.

3.11.2 Limitierte alkalische Hydrolyse

Die ^{32}P -markierte RNA (50.000 cpm/Ansatz) wurde in 1 μl Millipore Wasser gelöst und mit 0,37 μl tRNA (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt. Anschließend wurde nach Zugabe von 10 μl 50 mM Natriumhydrogencarbonat-Lösung (pH 9,0) bei 90°C für 8 min bei 90° inkubiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz sofort auf Eis gesetzt und 10 μl Formamid zugegeben. Die Probe wurde auf ein 15%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel geladen, die Elektrophorese bei 1500 Volt für 3 h durchgeführt und die Banden mittels Phosphorimager analysiert.

3.12 Enantioselektivitätsuntersuchungen

3.12.1 Bestimmung im *Trans* –Assay

Zu einer 15 μM wässrigen Lösung 49-mer Ribozym, 1 mM wurde 9-n-Ethylebglykol-anthracen in 30 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl und 100 mM 80 mM Mg_2Cl wurde eine 10 mM ethanolische Lösung N-Pentylmaleimid zugegeben zu einer Finalkonzentration von 1 mM. Nach 10 min Reaktionszeit wird die Reaktion durch Zugabe von 1 μl β -Mercaptoethanol die Reaktion gestoppt und über chirale HPL Chromatographie analysiert (*Kapitel 3.8.2*)

3.12.2 Bestimmung im *Cis*-Assay

Zu einer wässrigen Lösung 0,4 mM 38-mer und 0,2 11-mer- EG_n -Anthracen in in 30 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl und 100 mM 80 mM Mg_2Cl wurde eine 10 mM ethanolische Lösung N-Pentylmaleimid zu einer Finalkonzentration von 1 mM zugegeben. Nach 10 min Reaktionszeit wird die Reaktion durch Zugabe von 1 μl β -Mercaptoethanol die Reaktion gestoppt und das 11-mer- EG_n -Diels-Alder Produkt über umkehr Phasen HPL Chromatographie isoliert. Durch Verdau des isolierten Produkts

mit Phosphodiesterase I (PDE I von *Crotalus adamanteus*, Sigma) wurde die RNA vom Diels-Alder Produkt von der RNA abgespalten. Dazu wurde das Pellet des 11-mer-EG_n-Diels-Alder Produkts mit 100 µl PDE I (0,05 U/ml) in PDE-Puffer (0.1 M NaCl, 15 mM MgCl₂, 0,1 M Tris HCl pH 8.5) für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung über einen 3000 mw „cut off“ Filter (Microcon YM-3, Millipore) gegeben um die Phosphodiesterase abzutrennen. Die erhaltene Lösung wurde direkt mittels chiraler HPL Chromatographie analysiert. Für EG₁-EG₆ mit Gradient I, für EG₈ und EG₁₀ Gradient II und für EG₁₂ mit Gradient III (*Kapitel 3.8.2*).

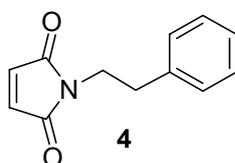
3.13 Chemische Synthese

Generelles zur Synthese

Alle Reagenzien wurden erworben von Aldrich, Fluka oder Acros Organics und verwendet ohne weitere Aufreinigung. Die reinen Stereoisomere der chiralen Amine wurden von der Firma ChiProsTM der BASF AG zur Verfügung gestellt. Wasserfreie Lösungsmittel (DMF, MeCN, CH₂Cl₂) wurden erworben bei Fluka und über Molekularsieb aufbewahrt. Säurefreies CH₂Cl₂ wurden erhalten durch lagern des Lösungsmittels über Kaliumcarbonat (K₂CO₃) für mindestens 12 h. Die Durchführung von Reaktionen lichtempfindlichen Verbindungen wurden alle in Glasgeräten aus Braunglas durchgeführt. Dünnschichtchromatographie wurde durchgeführt unter Verwendung von Kieselgelplatten der Firma Macherey-Nagel (Polygram[®] Sil G/UV₂₅₄ 40 x 80 mm). Flashchromatographie wurde durchgeführt mit Kieselgel (Korngröße 40 µm) von J.T. Baker. NMR Spektren wurden aufgenommen auf Bruker AM-360, AC-300, DRX-300 Spektrometer. ¹H und ¹³C Spektren wurden kalibriert auf TMS auf der Basis der chemischen Verschiebung des verwendeten Solvents als interner Standard. ³¹P-NMR Spektren wurden kalibriert auf einen externen Standard (85% H₃PO₄). Zur Charakterisierung der Signale werden die Abkürzungen wie folgt verwendet: s = singlett, d = duplett, t = triplett, q = quartett, quin = quintett, sext = sextett, m = multipllett. FAB (Glycerin- oder NBA-Matrix) und EI (70 eV) Massenspektren wurden aufgenommen auf einem Mat 8200 Instrument. Die Zusammensetzung charakteristische Massenfragmente sind in eckigen Klammern angegeben.

Allgemeine Vorschrift zur Synthese von Maleimidderivaten

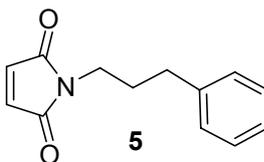
1 g (10,2 mmol) Maleinsäureanhydrid werden in 10 ml absolutem Acetonitril gelöst. 11.1 mmol des Amin werden in 5-10ml absolutem Acetonitril gelöst und über einen Zeitraum von 5 min zu der eisgekühlten Lösung langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird nach Entfernung des Eisbades für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluß wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der weißlich Kristalline Rückstand in 20 ml Eisessig aufgenommen und nach Zugabe von 0,5 g Natriumacetat für 4-6 h bei 85°C gerührt. Der Reaktionsansatz färbt sich dunkel. Der Eisessig wird abdestilliert und das Produkt wird aus dem schwarzen Rückstand mittels Flashchromatographie über Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel CH₂Cl₂ oder CH₂Cl₂/EtOH 9:1). Die Maleimide werden in einer Ausbeute von 70-80 % erhalten.

1-Phenethyl-1H-pyrrol-2,5-dion (4)

¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 7.47-7.59 (m, 5H), 6.91 (s, 2H), 4.04 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 3.18 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz) ppm

¹³C-NMR (90 MHz, CDCl₃): δ 168.51, 135.23, 132.54, 128.39, 127.13, 126.27 ppm

MS-EI: (m/z) [M]⁺ 201.1 (berechnet für [C₁₂H₁₁NO₂]⁺ 201.08)

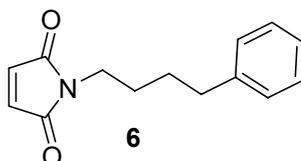
1-(3-Phenylpropyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (5)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.46-7.59 (m, 5H), 6.95 (s, 2H), 3.89 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.93 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz), 2.25 (quint., 2H, $J = 7.3$ Hz) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.76, 140.92, 133.97, 128.39, 128.27, 125.99, 37.68, 33.08, 29.74 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 215.1 (berechnet für $[\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2]^+$ 215.09)

1-(4-Phenylbutyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (6)

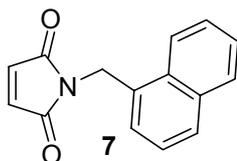


$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.39-7.53 (m, 5H), 6.91 (s, 2H), 3.78 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 2.87 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 1.86 (m, 4H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.77, 141.88, 136.37, 133.97, 128.27, 125.76, 37.56, 35.22, 28.4, 28.03 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 229.1 (berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ 229.11)

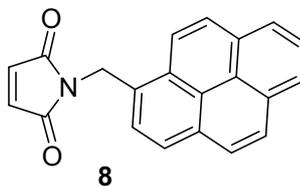
1-((Naphthalen-1-yl)methyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (7)



$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 8.26 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.82 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.80 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.4-7.59 (m, 4H), 6.71 (s, 2H), 5.16 (s, 2H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.51, 134.21, 133.78, 131.25, 131.11, 128.74, 127.21, 126.54, 125.85, 125.23, 123.28, 39.35 ppm

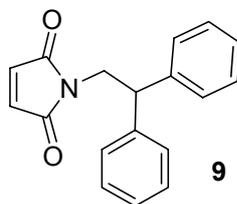
MS-FAB: (m/z) $[\text{M}]^+$ 237.1 (berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2]^+$ 237.08), $[\text{M}+\text{H}]^+$ 238,1 (berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2+\text{H}]^+$ 238.08), $[\text{M}+\text{K}]^+$ 276.1 (berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2+\text{K}]^+$ 276.08)

1-(2,2-Diphenylethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (8)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.52 (m, 10H), 6.78 (s, 2H), 4.85 (t, 1H, $J = 8.5$ Hz), 4.38 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.44, 146.94, 133.78, 128.50, 128.05, 126.86, 48.71, 42.36 ppm

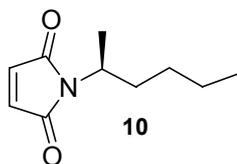
MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 277.1 (berechnet für $[\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ 277.11)

1-((Pyren-1-yl)methyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (9)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 8.54 (d, 2H, $J = 9.3$ Hz), 7.98-8.2 (m, 7H), 6.69 (s, 7H), 5.4 (s, 2H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.6, 136.35, 134.19, 131.22, 131.17, 130.75, 130.59, 128.97, 128.74, 128.11, 127.83, 127.59, 127.28, 125.99, 125.36, 124.78, 124.63, 122.76, 39.5 ppm

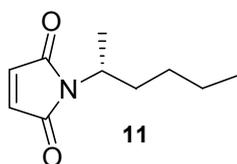
MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 311.1 (berechnet für $[\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{NO}_2]^+$ 311.09)

1-((S)-Hexan-2-yl)-1H-pyrrol-2,5-dion (10)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.69 (s, 2H), 4.20 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.43 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.21-1.38 (m, 4H), 0.93 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 171.00, 133.83, 47.41, 33.46, 29.67, 22.24, 18.65, 13.90 ppm

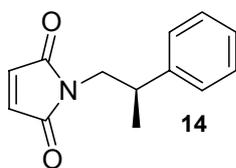
MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 181.1 (berechnet für $[\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ 181.11)

1-((R)-Hexan-2-yl)-1H-pyrrol-2,5-dion (11)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.65 (s, 2H), 4.16 (m, 1H), 1.95 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.40 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.17-1.25 (m, 4H), 0.89 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.93, 133.78, 47.31, 33.39, 29.63, 22.18, 18.59, 13.84 ppm

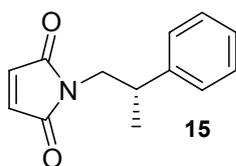
MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 181.1 (berechnet für $[\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ 181.11)

1-((R)-2-Phenylpropyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (14)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.39-7.51 (m, 5H), 6.82 (s, 2H), 3.86 (dq, 2H, $J = 8.0$ Hz, $J = 13.6$ Hz), 3.44 (sext, 1H, $J = 7.2$ Hz), 1.47 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.69, 143.11, 136.54, 133.68, 128.46, 127.28, 126.82, 44.73, 38.5, 22.16 ppm

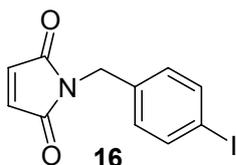
MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 216.1 (berechnet für $[\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2]^+$ 215.09)

1-((S)-2-Phenylpropyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (15)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.4-7.52 (m, 5H), 6.83 (s, 2H), 3.87 (dq, 2H, $J = 8.0$ Hz, $J = 13.7$ Hz), 3.45 (sext, 1H, $J = 7.2$ Hz), 1.48 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.60, 142.90, 136.40, 133.74, 128.37, 127.15, 126.70, 44.50, 38.5, 22.03 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 216.1 (berechnet für $[\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2]^+$ 215.09)

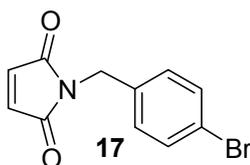
1-(4-Iodobenzyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (16)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.64 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.09 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 6.71 (s, 2H), 4.60 (s, 2H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.5, 138.09, 136.00, 134.54, 130.67, 93.84, 41.18 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 313 (berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_8\text{INO}_2]^+$ 312.96)

1-(4-bromobenzyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (17)

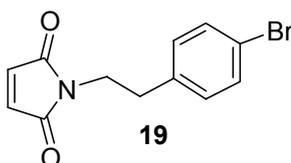


$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.42 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.21 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 6.7 (s, 2H), 4.6 (s, 2H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.18, 135.19, 134.19, 131.77, 130.15, 121.9, 40.75 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 264.9 (berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_8\text{NO}_2\text{Br}]^+$ 264.97)

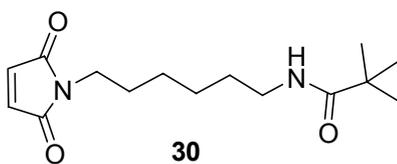
1-(4-Bromophenethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (19)



$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.4 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.07 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 3.72 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 2.86 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.42, 136.7, 134.01, 131.61, 130.5, 120.56, 38.69, 33.81 ppm

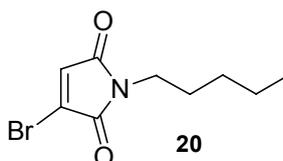
MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 279 (berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Br}]^+$ 278.99)

1-(N-tert-Butylcarboxycarbonyl-6-aminohexyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (30)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.69 (s, 2H), 3.49 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 3.07 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 1.57 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.26 (m, 6H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 170.87, 156.20, 134.05, 60.39, 37.72, 30.91, 29.90, 28.40, 27.80, 26.35, 26.23, 26.16, 20.33 ppm

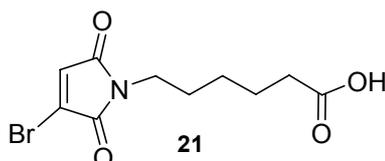
MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 296 (berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2]^+$ 296.21)

3-Bromo-1-pentyl-1H-pyrrol-2,5-dion (39)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.85 (s, 1H), 3.59 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 1.59 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.25 (m, 4H), 0.88 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 168.59, 165.31, 131.72, 131.24, 38.06, 28.1, 22.13, 13.85 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 245 (berechnet für $[\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_2\text{Br}]^+$ 245.01)

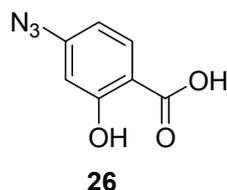
6-(3-Bromo-2,5-dioxo-2H-pyrrol-1(5H)-yl)hexansäure (40)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.87 (s, 1H), 3.57 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.35 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 1.59-1.7 (m, 4H), 1.31-1.39 (m, 2H) ppm

^{13}C -NMR (90 MHz, CDCl_3): δ 179.43, 168.84, 165.56, 132.0, 131.55, 38.79, 33.88, 28.31, 26.27, 24.25 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 289 (berechnet für $[\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{Br}]^+$ 288.99)

Synthese von 4-Azido-2-hydroxybenzoesäure (26)

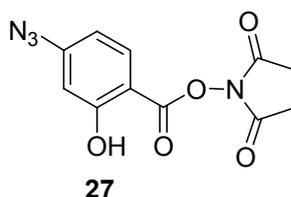


In einem 2 l Dreihalskolben werden zu einer röhrenden Suspension von 5 g (33 mmol) 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure (**25**) in 130 ml dest. Wasser 25 ml konzentrierte Schwefelsäure H_2SO_4 zugegeben. Die Suspension wird mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt und es werden 2,8 g (40 mmol) NaNO_2 gelöst in 25 ml dest. Wasser zugegeben. Nach 1 h röhren bei 0°C , wird zu dem weiterhin gekühlten Gemisch eine Lösung von 3,6 g (56 mmol) in 20 ml dest. Wasser langsam zugetropft. Es kommt zu Schaumbildung unter starker Gasentwicklung, weswegen die Verwendung eines 2 l Kolbens angeraten wird. Nach Beendigung der Zugabe wird das Reaktionsgemisch weiterhin für 1 h bei 0°C und anschließend für 30 h bei RT geröhrt. Die erhaltene Lösung wird 3 mal mit 150 ml Ethylacetat extrahiert und die gesammelte organische Phase mit 200 ml Brine gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Man erhält 4,8 g (26,81 mmol; 81,2 %) eines orangefarbenen kristallinen Feststoffes.

^1H -NMR (360 MHz, CDCl_3): δ 7.88 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.62 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.6 (s, 1H) ppm

^{13}C -NMR (90 MHz, CDCl_3): δ 172.82, 164.47, 148.47, 133.26, 111.17, 110.83, 107.74 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 179 (berechnet für $[\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3]^+$ 179.03); $[\text{M}-\text{N}_2]^+$ 151 (berechnet für $[\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3]^+$ 151.03)

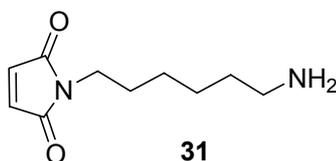
Synthese von 1-[(4-Azido-2-hydroxybenzoyl)oxy]-2,5-pyrrolidindion (27)

1,35 g (7,5 mmol) 4-Azido-2-hydroxybenzoesäure (**26**) werden in einem Lösungsmittelgemisch aus 25 ml CH₂Cl₂ und 25 ml DMF gelöst und 0,94 g (8,3 mmol) N-Hydroxysuccinimid zugegeben. Unter Eiskühlung wird eine Lösung von 1,58 g (7,5 mmol) N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 5 ml DMF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 12 h bei RT gerührt. Anschließend wird der entstandene Feststoff abfiltriert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Ethylacetat/Petrolether 1:1 umkristallisiert. Man erhält 1,57 g (5,7 mmol; 76 %) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 7.88 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 6.68 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 6.62 (dd, 1H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.6 Hz), 2.34 (s, 4H) ppm

¹³C-NMR (90 MHz, CDCl₃): δ 170.47, 160.98, 147.34, 133.41, 110.62, 107.45, 107.29, 25.45 ppm

MS-EI: (m/z) [M]⁺ 276.1 (berechnet für [C₁₅H₁₀N₄O₂]⁺ 276.05), [M-N₂]⁺ 248.0 (berechnet für [C₁₅H₁₀N₂O₂]⁺ 248.04)

Synthese von 1-(6-Aminohexyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (31)

1,4 g (5 mmol) 1-(N-tert-Butylcarboxycarbonyl-6-aminohexyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (**30**) werden in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit 1 ml Trifluoressigsäure (TFA) versetzt. Nach 30 min Reaktionszeit werden erneut 2 ml TFA zugegeben. Der Reaktionsverlauf wird über Dünnschichtchromatographie (SiO₂, Laufmittel Ethylacetat/Hexan 1:1 R_f Ed: 0.8; R_f Prod:

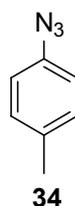
0.1) verfolgt und nach vollständigem Umsatz nach 30 min das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie über Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel CH₂Cl₂ (0,5 % TEA)). Man erhält 745 mg (3,5 mmol, 76 %) eines weißlichen Feststoffs, der bei RT zu einem farblosen Öl schmilzt.

¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 6.72 (s, 2H), 3.51 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 3.1 (m, 2H), 1.7 (m, 2H), 1.28 (m, 2H) ppm

¹³C-NMR (90 MHz, CDCl₃): δ 170.90, 134.09, 39.66, 37.36, 28.00, 27.19, 25.73, 25.40 ppm

MS-EI: (m/z) [M]⁺ 196 (berechnet für [C₁₀H₁₆N₂O₂]⁺ 196.12)

Synthese von 1-Azido-1-methylbenzol (34)



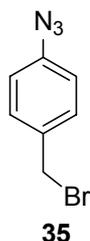
In einem 2 l Dreihalskolben werden zu einer rührenden Suspension von 10 g (93,3 mmol) *p*-Toluidin (**33**) in 200 ml dest. Wasser 25 ml konzentrierte Schwefelsäure H₂SO₄ zugegeben. Die Suspension wird mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt und es werden 7 g (100 mmol) NaNO₂ gelöst in 25 ml dest. Wasser zugegeben. Nach 1 h rühren bei 0°C, wird zu dem weiterhin gekühlten Gemisch eine Lösung von 9,6 g (150 mmol) Natriumazid (NaN₃) in 20 ml dest. Wasser langsam zugetropft. Es kommt zu Schaumbildung unter starker Gasentwicklung, weswegen die Verwendung eines 2 l Kolbens angeraten wird. Nach Beendigung der Zugabe wird das Reaktionsgemisch weiterhin für 1 h bei 0°C und anschließend für 30 h bei RT gerührt. Die erhaltene Lösung wird 3 x mit 150 ml Ethylacetat extrahiert und die gesammelte organische Phase mit 200 ml Brine gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird über Kieselgelchromatographie (Laufmittel Hexan/ CH₂Cl₂ 4:1) aufgereinigt und man erhält 8,82 g (66,2 mmol, 71 %) eines gelblichen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.16 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 6.93 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 2.33 (s, 3H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 141.51, 138.11, 128.50, 127.42, 24.34 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 133 (berechnet für $[\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3]^+$ 133.06), $[\text{M}-\text{N}_2]^+$ 105 (berechnet für $[\text{C}_7\text{H}_7\text{N}]^+$ 105.06)

Synthese von 4-Azidobenzylbromid (35)

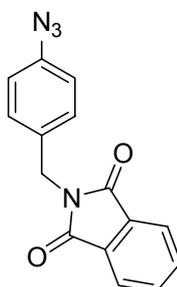


6,5 g (48,5 mmol) 1-Azido-1-methylbenzol (**34**), 9,5 g (53,4 mmol) N-Bromsuccinimid NBS und 770 mg AIBN werden in 100 ml Benzol unter Lichtausschluss für 5 h zum Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wird der Ansatz in 100 ml Wasser/Ether (1:1) geschüttelt. Die organischen Phasen werden abgetrennt und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Kieselgelchromatographie aufgereinigt (Laufmittel Petrolether). Man erhält 6.07 g (28,61 mmol, 59 %) eines bräunlichen Feststoffes, der unter Lichtausschluss gelagert wird. Umsatz sowie Aufreinigung werden in Braunglasgeräten durchgeführt um die Verbindungen vor Zersetzung durch Lichteinfluss zu schützen.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.95 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.57 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 5.08 (s, 2H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 144.17, 139.57, 130.14, 118.9, 32.74 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 211 (berechnet für $[\text{C}_7\text{H}_6\text{BrN}_3]^+$ 210.97), $[\text{M}-\text{N}_2]^+$ 183 (berechnet für $[\text{C}_7\text{H}_6\text{BrN}]^+$ 182.97)

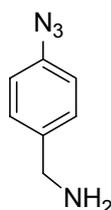
Synthese von 2-(4-Azidobenzyl)isoindolin-1,3-dion (36)**36**

In einem Braunglasrundkolben werden 2,5 g (12 mmol) und 2,2 g (12 mmol) Kaliumphthalimid in 30 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Das Reaktionsgemisch wird unter Rühren auf 80 °C erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird Dünnschichtchromatographisch verfolgt (SiO₂, Laufmittel Petrolether R_{f Ed}: 0,3; R_{f Ed} : 0) und nach Beendigung der Reaktion (3 h) wird das Reaktionsgemisch in Eiswasser geschüttet. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Man erhält 3 g (10,8 mmol, 90%) eines gelblichen Feststoffes, der unter Lichtausschluss gelagert wird.

¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 7.82-7.84 (m, 2H), 7.69-7.71 (m, 2H), 7.43 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 6.97 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 4,81 (s, 2H) ppm

¹³C-NMR (90 MHz, CDCl₃): δ 167.97, 139.65, 134.05, 133.08, 132.04, 130.26, 123.39, 119.23 ppm

MS-EI: (m/z) [M]⁺ 278 (berechnet für [C₁₅H₁₀N₄O₂]⁺ 278.08), [M-N₂]⁺ 250 (berechnet für [C₁₁H₈N₂O₂]⁺ 250.08)

Synthese von 4-Azidobenzylamin (37)

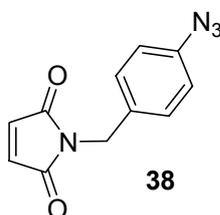
3 g (10,8 mmol) 2-(4-Azidobenzyl)isoindolin-1,3-dion (**36**) werden unter Lichtausschluss in 50 ml Ethanol gelöst. Anschließend werden 4,5 ml Hydrazin-Monohydrat (64 %ige wässrige Lösung) zugegeben und für 3 h unter Rückfluß gerührt. Der entstandene Niederschlag wird durch Zugabe von 30 ml 10 %iger Natronlauge unter fortwährendem Rühren gelöst. Das Reaktionsgemisch wird mit 4 x 50 ml CH₂Cl₂ und die gesammelte organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Nach entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhält man 1,25 g (8,44 mmol, 78%) eines bernsteinfarbenen Feststoffes, der unter Lichtausschluss gelagert wird.

¹H-NMR (360 MHz, DMSO-d₆): δ 7.36 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.04 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 3.69 (s, 2H) ppm

¹³C-NMR (90 MHz, DMSO-d₆): δ 140.00, 138.41, 128.53, 128.50, 119.00, 45.81 ppm

MS-EI: (m/z) [M]⁺ 148 (berechnet für [C₇H₆N₄]⁺ 148.07), [M-N₂]⁺ 120 (berechnet für [C₇H₆N₂]⁺ 120.07)

Synthese von 1-(4-Azidobenzyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (**38**)



500 mg (3,38 mmol) 4-Azidobenzylamin (**37**) und Maleinsäureanhydrid (3,38 mmol) (**1**) werden in einem 50 ml-Braunglasrundkolben mit 15 ml absolutem CH₂Cl₂ gelöst und es werden unter Eiskühlung bei 0°C sukzessive 517 mg (3,38 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 740 mg N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird nach Rühren für 12 h bei 0°C filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie über Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel Ethylacetat). Man erhält 516 mg (2,26 mmol, 67 %) eines bernsteinfarbenen Feststoffes, der unter Lichtausschluss gelagert wird.

¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 7.35 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 6.97 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.71 (s, 2H), 4.64 (s, 2H) ppm

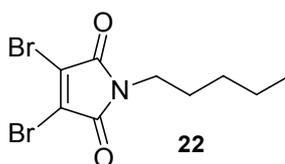
^{13}C -NMR (90 MHz, CDCl_3): δ 166.8, 139.55, 134.05, 132.72, 129.88, 119.08, 40.64 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 228 (berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2]^+$ 228.21), $[\text{M}-\text{N}_2]^+$ 200 (berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2]^+$ 200.06)

Allgemeine Vorschrift zur Synthese von 3,4-Dibrommaleimiden

Zu einer Lösung von 670 mg (2,63 mmol) 3,4-dibromo-1H-pyrrole-2,5-dione in 10 ml Aceton werden 387 mg wasserfreies Kaliumcarbonat (K_2CO_3) und 2,8 mmol des entsprechenden Bromids hinzu gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wird 10 ml Wasser zugegeben und die Reaktionsmischung wird extrahiert mit Ethylacetat. Die organischen Phasen werden Vereinigt und mit Brine gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat/Hexan 1:1). Man erhält Ausbeuten zwischen 70-80 % eines schwach orangefarbenen Feststoffes.

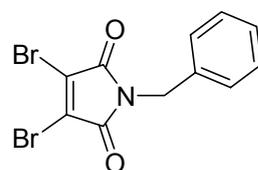
3,4-Dibromo-1-pentyl-1H-pyrrol-2,5-dion (41)



^1H -NMR (360 MHz, CDCl_3): δ 3.6 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.53 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz), 1,23-1,37 (m, 4H), 0,89 (t, 3H, $J = 7.11$ Hz) ppm

^{13}C -NMR (90 MHz, CDCl_3): δ 163.96, 129.3, 39.81, 28.71, 28.11, 22.13, 13.86 ppm

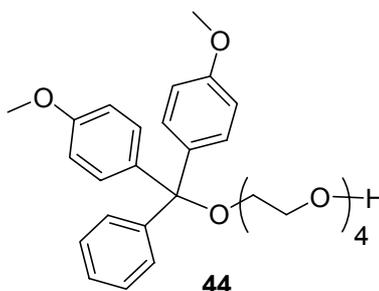
MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 324.9 (berechnet für $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Br}_2]^+$ 324.91)

Synthese von 1-Benzyl-3,4-dibromo-1H-pyrrol-2,5-dion (42)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 7.3 (m, 5H), 4.7 (s, 2H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 164.32, 128,90, 140.16, 129.42, 127.61, 125,35 ppm

MS-EI: (m/z) $[\text{M}]^+$ 342.9 (berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_7\text{NO}_2\text{Br}_2]^+$ 342.88)

Synthese von (4, 4'-Dimethoxytrityl)tetraethylglykol (44)

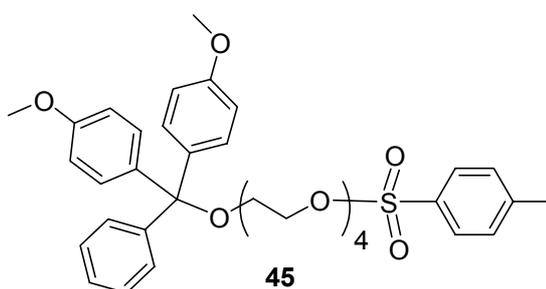
10 g (51.5 mmol) Tetraethylglykol (**43**) werden 3 mal mit 35 ml Toluol koevaporiert und unter Argon in 40 ml säurefreiem CH_2Cl_2 zusammen mit 2,6 ml (19 mmol, 0,37 equiv.) Triethylamin (TEA) und 63 mg (0,52 mmol, 0,01 equiv.) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) gelöst. Eine Lösung von 3,68 g (11,7 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in 40 ml säurefreiem CH_2Cl_2 wird langsam bei RT über eine Spritzenpumpe innerhalb eines Zeitraums von 16 h zugetropft. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 120 ml CH_2Cl_2 verdünnt und mit 100 ml 5%iger NaHCO_3 , 100 ml Wasser und 2 x 100 ml Brine gewaschen. Nach trocknen mit MgSO_4 und entfernen des Lösungsmittels erhält man ein gelbes Öl als Rohprodukt. Aufreinigung mittels Flashchromatographie (Laufmittel Hexan/Ethylacetat 1:1 nach 100 % Ethylacetat (1 % TEA)) liefert 4,6 g (4,6 mmol, 79%) eines gelbliches Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 7.53-7.47 (m, 2H), 7.41-7.17 (m, 7H), 6.91-6.83 (m, 4H), 3.75 (s, 6H), 3.67-3.50 (m, 14H), 3.19 (t, 2H, $J = 5.0$ Hz) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90.5 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 160.45, 147.35, 138.12, 131.87, 129.97, 129.46, 128.37, 114.77, 87.56, 74.50, 72.45, 72.31, 72.27, 72.16, 72.13, 65.04, 62.97, 56.44 ppm

FAB MS: m/z $[\text{M}]^+$ 496.3 (berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_7]^+$ 496.25)

Synthese von (4, 4'-Dimethoxytrityl)tetraethylenglykol-*p*-toluolsulfonat (45)

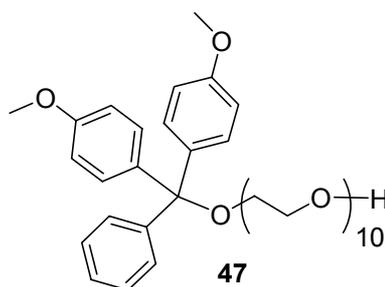


7,5 g (15,1 mmol) 4, 4'-Dimethoxytrityl)tetraethylenglykol (44) werden 3 x mit 35 ml Toluol koevaporiert und zusammen mit 92 mg (0,79 mmol) DMAP und 6,3 ml TEA (45 mmol) in 80 ml säurefreiem CH_2Cl_2 gelöst. Das Reaktionsgemisch wird 0°C abgekühlt und 3,17 g (16.6 mmol) *p*-Toluolsulfonylchlorid werden zugegeben. Unter fortwährendem Rühren lässt man das Reaktionsgemisch über 12 h auf RT erwärmen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 200 ml Ethylacetat verdünnt und mit 2 x 80 ml 5%iger NaHCO_3 , 80 ml Wasser und 2 x 80 ml Brine gewaschen. Nach trocknen mit MgSO_4 und entfernen des Lösungsmittels erhält man 9,78 g (15 mmol, 99%) eines gelben Öls, dass keiner weiteren Aufreinigung bedarf um im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt werden zu können.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 7.81-7.76 (m, 2H), 7.51-7.41 (m, 4H), 7.38-7.17 (m, 7H), 6.89-6.83 (m, 4H), 4.12 (t, 2H, $J = 4.5$ Hz), 3.76 (s, 6H), 3.65-3.49 (m, 12H), 3.17 (t, 2H, $J = 5.0$ Hz), 2.42 (s, 3H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (90.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 160.49, 147.37, 146.69, 138.15, 135.31, 131.89, 131.78, 129.99, 129.68, 129.48, 128.40, 114.79, 87.58, 72.47, 72.30, 72.26, 72.22, 72.18, 71.62, 70.26, 65.07, 56.46 ppm

FAB MS: m/z $[\text{M}]^+$ 650.3 (berechnet für $[\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{O}_9\text{S}]^+$ 650.25)

Synthese von (4,4'-Dimethoxytrityl)decaethylenglykol (47)

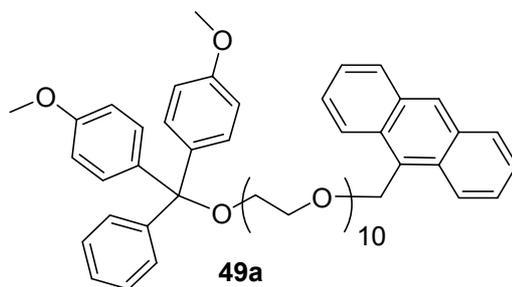
6,52 g (23,1 mmol) Hexaethylenglykol (**46**) werden mit 3 x 20 ml Toluol koevaporiert und in 20 ml absolutem Dimethylformamid (DMF) unter Argon gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und 0,61 g (60 % in Öl, 15,3 mmol) Natriumhydrid werden zugegeben. Die Lösung wird für weitere 10 min bei 0°C und 15 min bei RT gerührt. 5,01 g (4, 4'-Dimethoxytrityl)tetraethylenglykol-p-toluolsulfonat (**45**) werden mit 3 x 20 ml Toluol koevaporiert und in 15 ml absolutem Dimethylformamid (DMF) unter Argon gelöst und langsam über einen Zeitraum von 16 h mit einer Spritzenpumpe zu der Lösung zugetropft. Nach 20 h wird dem Reaktionsgemisch 200 ml CH₂Cl₂ zugegeben und mit 5 x 100 ml Wasser, 100 ml 5%iger NaHCO₃ und 100 ml Brine gewaschen. Nach trocknen mit MgSO₄ und entfernen des Lösungsmittels erhält man ein bräunliches Öl. Aufreinigung mittels Flashchromatographie über Kieselgel (Laufmittel Ethylacetat/Ethanol 92:8 nach 60:40 (1% TEA) liefert 4,26 (5,6 mmol) eines hellen gelben Öls.

¹H-NMR (360 MHz, (CD₃)₂CO): δ 7.53-7.45 (m, 2H), 7.40-7.17 (m, 7H), 6.92-6.83 (m, 4H), 3.78 (s, 6H), 3.67-3.48 (m, 38H), 3.17 (t, 2H, J=5.0 Hz) ppm

¹³C-NMR (75.5 MHz; (CD₃)₂CO): δ 160.49, 147.37, 138.16, 131.89, 129.99, 129.48, 128.40, 114.80, 87.59, 74.52, 72.49, 72.32, 72.21, 72.08, 71.87, 65.08, 62.98, 56.48 ppm

FAB MS: m/z [M]⁺ 760 (berechnet für [C₄₁H₆₀O₁₃]⁺ 760.40), m/z [M+Na]⁺ 783 (berechnet für [C₄₁H₆₀O₁₃+Na]⁺ 783.39)

Synthese von 1-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)-29-(9-anthrhylmethoxy)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosan (49a)



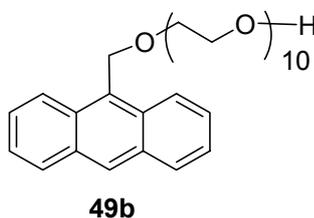
1,04 g (1,31 mmol) (4,4'-Dimethoxytrityl)decaethylenglykol (**47**) werden mit 3 x 20 ml Toluol koevaporiert und in 10 ml absolutem Acetonitril (MeCN) unter Argon gelöst. 84 mg (60 % in Öl, 2,1 mmol) werden zugegeben und die Reaktionsmischung für 5 min bei RT gerührt. Anschließend werden 328 mg (1,44 mmol) 9-Chlormethylantracen zugegeben und für weitere 60 min bei 40°C gerührt. Der Reaktionsverlauf wird über Dünnschichtchromatographie (Laufmittel Ethylacetat/Methanol 98:2) verfolgt und nach vollständiger Umsetzung mit 8 ml Wasser gequenched. Danach werden weitere 80 ml Ethylacetat und 40 ml Wasser zugegeben und die organische Phase abgetrennt. Nach waschen mit 2 x 40 ml Wasser und 2 x 40 ml Brine wird die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene gelbe Ölige Rückstand wird mittels Flashchromatographie über Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel Ethylacetat (1 % TEA)). Man erhält 911 mg (0,958 mmol, 73 %) eines hellgelben Öls.

¹H-NMR (300 MHz (CD₃)₂CO): δ 8.55 (s, 1H), 8.50 (d, 2H, *J* = Hz), 8.06 (d, 2H, *J* = Hz), 7.60-7.46 (m, 6H), 7.40-7.18 (m, 7H), 6.86 (m, 4 H), 5.54 (s, 2H), 3.83 (t, 2H, *J* = Hz), 3.75 (s, 6H), 3.69-3.46 (m, 36H), 3.17 (t, 2H, *J* = 5.2 Hz) ppm

¹³C-NMR (75.5 MHz, (CD₃)₂CO): δ 164.74, 160.46, 147.35, 138.16, 133.38, 132.82, 131.88, 131.48, 130.65, 130.00, 129.82, 129.48, 128.39, 127.87, 126.85, 126.61, 114.81, 87.60, 72.55, 72.47, 72.28, 72.18, 71.87, 71.55, 66.71, 66.18, 65.08, 62.38, 56.48 ppm

FAB MS: *m/z* [M+Na]⁺ 974.2 (berechnet für [C₅₆H₇₀O₁₃+Na]⁺ 973.47), [M]⁺ 951.2 (berechnet für [C₅₆H₇₀O₁₃]⁺ 950.48)

Synthese von 29-(9-anthrhylmethoxy)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosan-1-ol (49b)



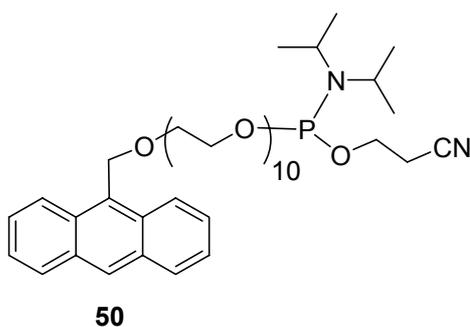
1,25 g (1,31 mmol) 1-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)-29-(9-anthrhylmethoxy)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosan (**49a**) werden in 30 ml einer 3 %igen Lösung von TFA in CH₂Cl₂ gelöst. Nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur wird dem Reaktionsgemisch 40 ml gesättigte NaHCO₃-Lösung zugegeben. Anschließend wird das Gemisch mit 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert und die organische Phase mit 40 ml Brine gewaschen, getrocknet über MgSO₄ und das Lösungsmittel abdestilliert. Man erhält ein gelbliches Öl als Rohprodukt das durch Kieselgelchromatographie über eine kurze Säule aufgereinigt wird (Laufmittel Ethylacetat/Methanol 98:2 nach Ethylacetat/CH₂Cl₂/Methanol 77:15:8). Man erhält 750 mg (1,16 mmol) eines hellgelben Öls.

¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ 8.58-8.47 (m, 3H), 8.07 (m, 2H), 7.62-7.47 (m, 4H), 5.55 (s, 2H), 3.84 (m, 2H), 3.67 (m, 2H), 3.67-3.48 (m, 36H) ppm

¹³C-NMR (75.5 MHz, (CD₃)₂CO): δ 133.40, 132.83, 131.49, 130.67, 129.83, 127.88, 126.87, 126.64, 74.494, 72.57, 72.17, 72.059, 71.55, 66.69, 62.94 ppm

FAB MS: m/z [M+Na]⁺ 671.8 (berechnet für [C₃₅H₅₂O₁₁+Na]⁺ 671.34), 648.8 [M]⁺ 648.8 (berechnet für [C₃₅H₅₂O₁₁]⁺ 648.35)

Synthese von 29-(9-anthrhylmethoxy)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosan-1-O-(β-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit (50)



0,486 g (0,749 mmol) 29-(9-anthrilmethoxy)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosan-1-ol (**49b**) werden für 12 h am Vacuum mit 3 x 5 ml Toluol koevaporiert und in 4ml säurefreiem CH₂Cl₂ unter Argon und Zugabe von 0,39 ml (2,2 mmol) Hünig Base (Diispropylethylamin DIPEA) unter Lichtausschluss gelöst. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt und 0,20 ml (0,9 mmol) 2-Cyanoethyl-N,N'-diisopropylchlorophosphoramidit zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 1 h gerührt, während die Temperatur langsam auf RT gebracht wird. Die Lösung färbt sich braun und wird Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt, bis im Dünnschichtchromatogramm kein Edukt mehr detektiert wird (Laufmittel: Ethylacetat/TEA 100:1, R_{f, Ed}: 0,15; R_{f, Prod}: 0,6). Das Reaktionsgemisch wird im Anschluß direkt über Kieselgelchromatographie aufgereinigt (Laufmittel Ethylacetat/TEA 95:5) und man erhält als Produkt 0,621 g (0,731 mmol, 98%) eines hellgelben Öls.

³¹P NMR (121.5 MHz, (CD₃)₂CO): δ 148.70 ppm

FAB: m/z [M+H₂O]⁺ 866.0 (calculated for [C₄₄H₆₉N₂O₁₂P+H₂O]⁺ 866.47)

4 Ergebnisse

Künstliche Ribozyme, generiert durch *in vitro* Selektionsmethoden, sind seit geraumer Zeit bekannt. Deren Mechanismen und katalytische Funktionsweisen hingegen liegen bis heute weitgehend im Dunklen. Ziel dieser Arbeit bestand darin, das Minimalmotiv eines mittels *in vitro* Selektion gewonnenen Diels-Alder Ribozyms auf eben diese mechanistischen, strukturellen und katalytische Eigenschaften zu untersuchen. Dazu wurde eine Vielzahl von experimentellen Techniken angewendet, wie Organisch-Chemische Synthese, Festphasensynthese von Oligonukleotiden, UV-Spektroskopie, HPLC an normal-, umkehr- und chiralen Phasen, sowie molekularbiologische Methoden und Röntgenkristallographie.

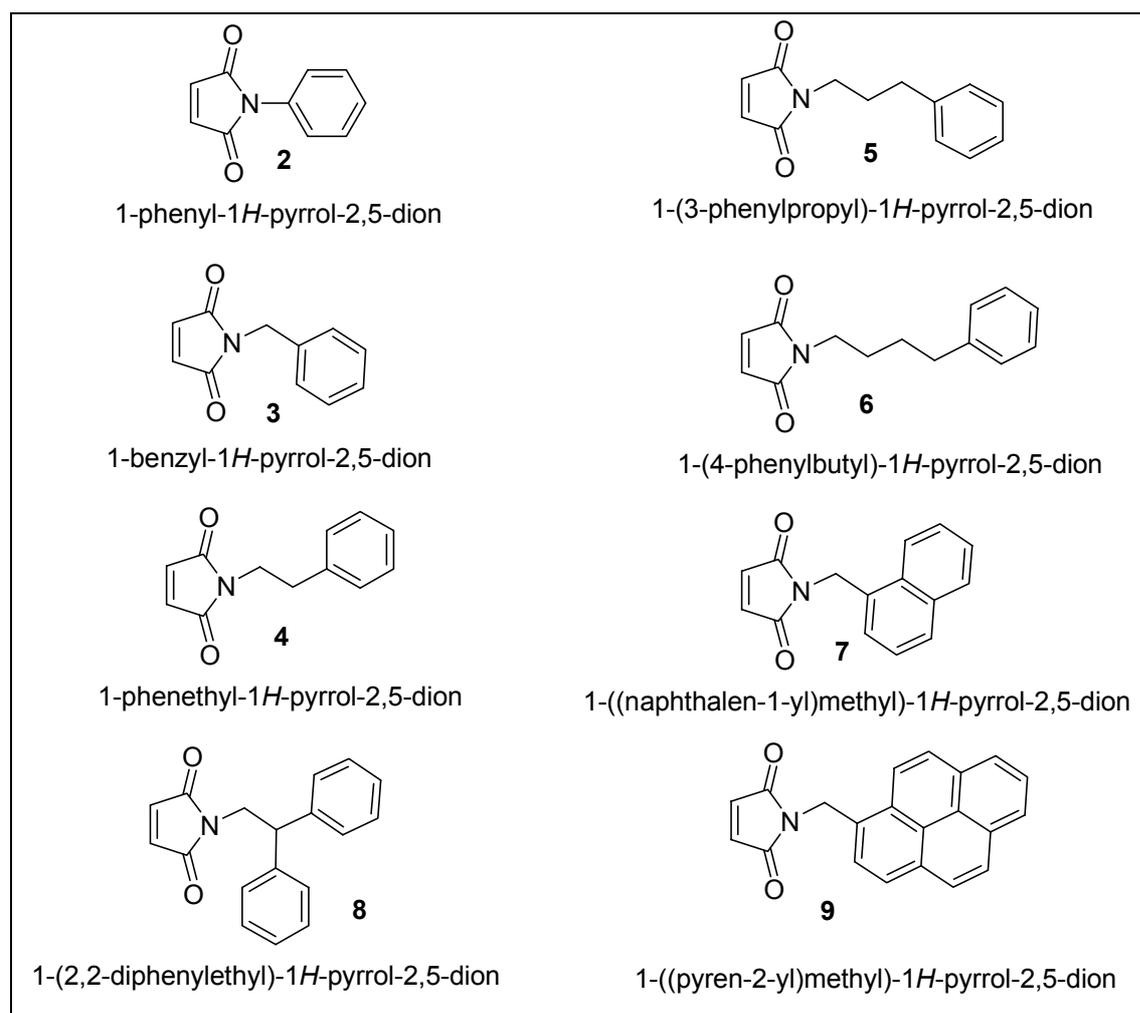
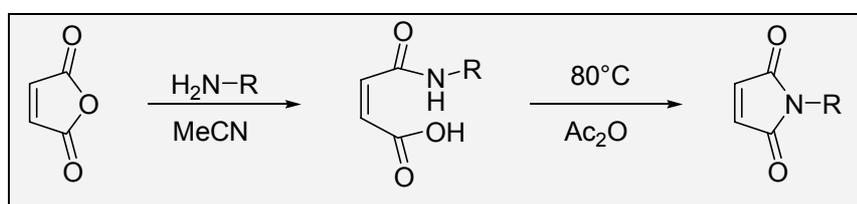
4.1 Substratspezifität des Diels-Alder Ribozyms

Ein prinzipielles Kriterium für Biokatalysatoren ist neben der Reaktionsbeschleunigung die Substratspezifität. In der Natur ist diese häufig von großer Bedeutung. So spielt zum Beispiel die Spezifität eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung der Aminosäuren mit der entsprechenden tRNA durch die jeweilige Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Hier ist die hohe Substratspezifität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ein wichtiger Aspekt für die Genauigkeit der Proteinsynthese und somit von grundlegender Bedeutung für jeden Organismus. Andere Enzyme wie zum Beispiel einige Lipasen haben geringere Spezifität, um eine große Anzahl verschiedener Verbindungen als Substrate zu akzeptieren.

Für die Anwendung von Enzymen zu Synthesezwecken kann eine geringe Spezifität von Vorteil sein, um ein breites Spektrum verschiedener Derivate umzusetzen. Die Substratspezifität des Diels-Alder Ribozyms wurde bereits teilweise von Fritz Stuhlmann in der Arbeitsgruppe von Prof. Jäschke untersucht. In diesen Arbeiten konnte die Modifizierbarkeit des Diens sehr ausführlich beschrieben werden. Die hier präsentierten Ergebnisse konzentrieren sich auf die Substratvariationstoleranzen des Ribozyms gegenüber dem Dienophil. Diese sind gerade von besonderem Interesse unter dem Aspekt der Stereoselektivität des Ribozyms, das eine definierte Positionierung des Dienophils zum Dien im aktiven Zentrum voraussetzt.

4.1.1 Synthese von Maleimidsubstraten

Für die Synthese der Maleimidsubstrate galt der Variation des Substituenten am Stickstoff besonderes Interesse. Hierzu wurden Maleinsäureanhydrid **1** und ein Amin zum jeweiligen Maleinsäureimid nach literaturbekannter Vorschrift von Cava *et al.* umgesetzt⁹³. Lediglich Lösungsmittel und Reaktionsdauer wurden je nach eingesetztem Amin variiert.



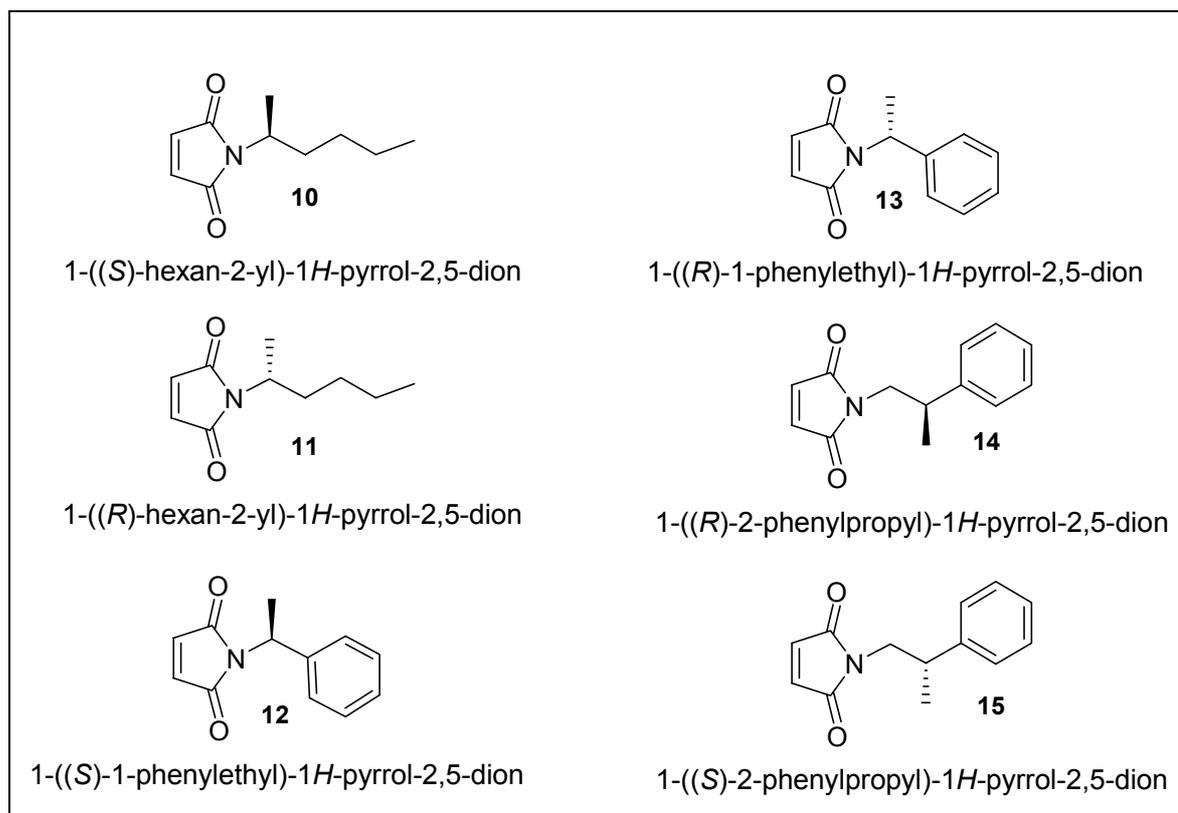


Abb. 7 Syntheschema zur Herstellung von Maleimidderivaten (grau unterlegt) und synthetisierte Maleimidderivate.

Auf diese Weise konnte eine große Anzahl von Substraten mit verschiedenen Maleimidseitenkettenresten synthetisiert werden.

Zum einen interessierte die Frage, inwieweit sterisch anspruchsvolle Substituenten akzeptiert würden und zum anderen gab es ein besonderes Interesse an der Konformation des Substituenten im gebundenen Zustand. Aus diesen Informationen sollte ermöglicht werden ein Bild von Dimension und Architektur der Bindungstasche zu entwerfen. Ein weiteres Interesse neben der Konformation galt der Konfiguration. Durch die Synthese von Maleimidsubstraten mit Stereozentren sollte eine Stereoselektivität bezüglich des Maleimidseitenkettenrestes untersucht werden⁹⁴. Unterschiedliche Akzeptanz der Enantiomere als Substrate für das Ribozym sollten räumliche Informationen über die Bindungstasche liefern.

Zusätzlich eröffneten diese Synthesen die Möglichkeit über Maleimide Gruppen in das Molekül einzuführen, die für Struktur- und Dynamikuntersuchungen von Nutzen sind. Unter anderem bestand ein besonderes Interesse an der Einführung von Schweratomen. Solche mit Schweratomen modifizierte Maleimide können durch die *in cis* Umsetzung in ein Ribozym-Produkt-Konjugat überführt werden. Solche Konstrukte wurden in Kristallisationsexperimenten eingesetzt, wobei die Schweratome hilfreich bei der Lösung des Phasenproblems sind.

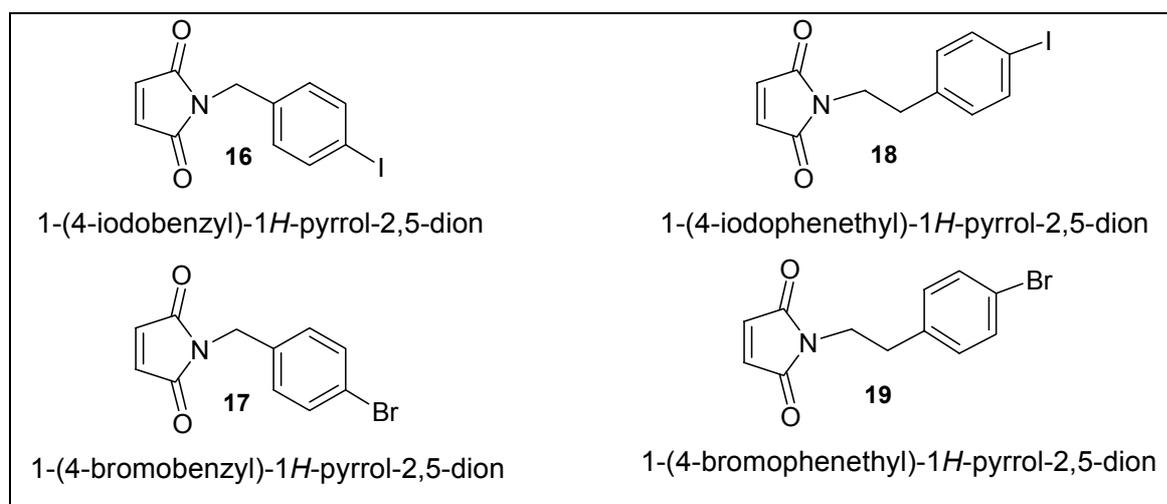


Abb. 8 Synthetisierte Maleimidderivate mit Schweratommodifikation.

4.1.2 Substratvariationstoleranz

Die im Kapitel 4.1.1 beschriebenen Derivate wurden auf Ihre Substrateigenschaften untersucht. Dabei wurden verschiedene Assays verwendet. Abhängig von der Löslichkeit des Substrates im zu verwendenden Reaktionspuffer des Ribozyms wurde ein *in trans* UV-spektroskopisches kinetisches Assay, ein *in trans* HPLC-Assay oder ein *in cis* HPLC-Assay verwendet. Die spektroskopischen Eigenschaften des Anthracens mit einem Absorptionsmaximum bei 365 nm, lassen sich dabei für die Analytik nutzen. Für das UV-spektroskopische Assay musste die Konzentration des Anthracens im Assay der lokalen Konzentration des linkergekoppelten Anthracens angepasst werden, was das Arbeiten in Mikroküvetten erforderlich machte. Stark lipophile Seitenketten des jeweiligen Maleimids verringern die Löslichkeit in wässrigem Puffer. Für schwer lösliche

Maleimide ist das UV-Assay nicht zu verwenden, da Perturbation, Precipitation oder Aggregation die Messung stören können. Diese Effekte treten besonders verstärkt bei der Verwendung von Mikroküvetten auf. Hier scheint die im Vergleich zum Gesamtvolumen große Kontaktfläche zur Küvette eine Rolle zu spielen. Das *in trans* HPLC-Assay ist sehr viel unempfindlicher gegenüber solchen Phänomenen. Während im UV-Assay direkt die Abnahme des Anthracens durch Messung der Absorption über die Zeit verfolgt wird, muss im *in trans* HPLC-Assay zu verschiedenen Zeitpunkten die Produktbildung über Auftrennung des Gemisches auf C18-Umkehrphasen Säulen bestimmt werden. Somit kann die Produktbildung (bzw. respektive Eduktabnahme) nicht wie im UV-Assay direkt bestimmt werden. Das *in cis* HPLC-Assay ist verwendet worden um eine lediglich qualitative Bestimmung durchzuführen, um zu bestimmen, ob das Substrat vom Ribozym umgesetzt wird oder nicht. Dabei wird im *in cis* Assay das zwei-stränge Ribozymkonstrukt bestehend aus 38-mer und 11-mer-Hexaethylglykol-Anthracen (11-mer-Heg-A) eingesetzt und nach 10 min. Reaktionszeit mit dem zu untersuchenden Substrat unter den entsprechenden Pufferbedingungen mittels Umkehrphasen-HPLC auf Produktbildung hin untersucht.

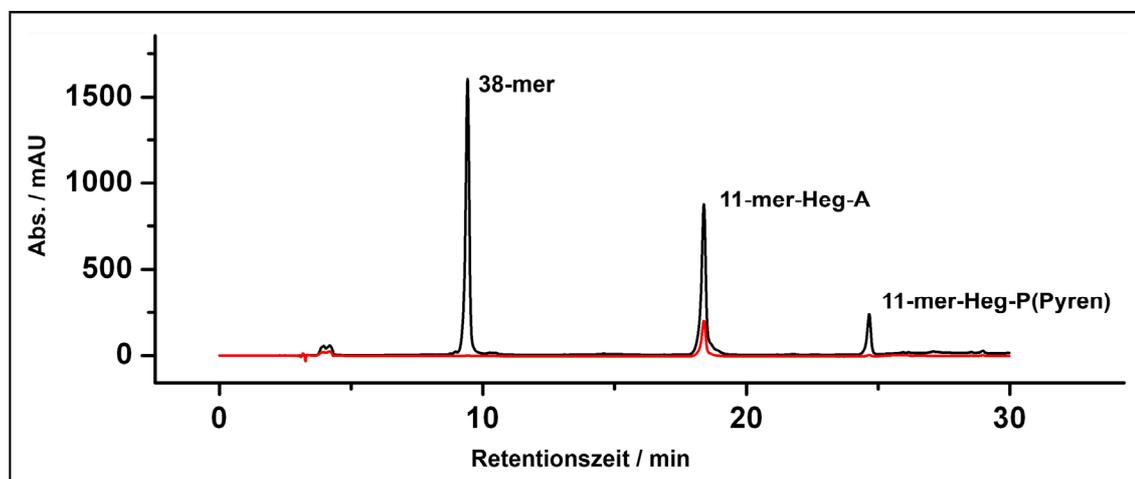


Abb. 9 HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von Verbindung 9 im *in cis* Assay (UV-Detektion bei 260 nm (schwarz) und 365 nm (rot)).

Die Chromatogramme werden bei den Detektionswellenlängen 260 nm (in Abb. 8 schwarz) und 365 nm (in Abb. 8 rot) aufgezeichnet und das Produkt als 11-mer-Heg-Produkt detektiert. In Abbildung 8 ist ein solches Chromatogramm für die Reaktion mit

Maleimidderivat **9** dargestellt. In diesem Fall lassen sich die Peaks von 11-mer-Heg-A und 11-mer-Heg-Produkt (11-mer-Heg-P) sehr gut über die Absorptionsspektren der jeweiligen Konjugate zuordnen. Während das 11-mer-Heg-A Konjugat mit einer Retentionszeit von 18,4 min das charakteristische Anthracenspektrum aufweist, zeigt das 11-mer-Heg-P bei 24,6 min das charakteristische Spektrum für die Pyrenmodifikation im Produkt (312, 326, 343 nm)^{95, 96}.

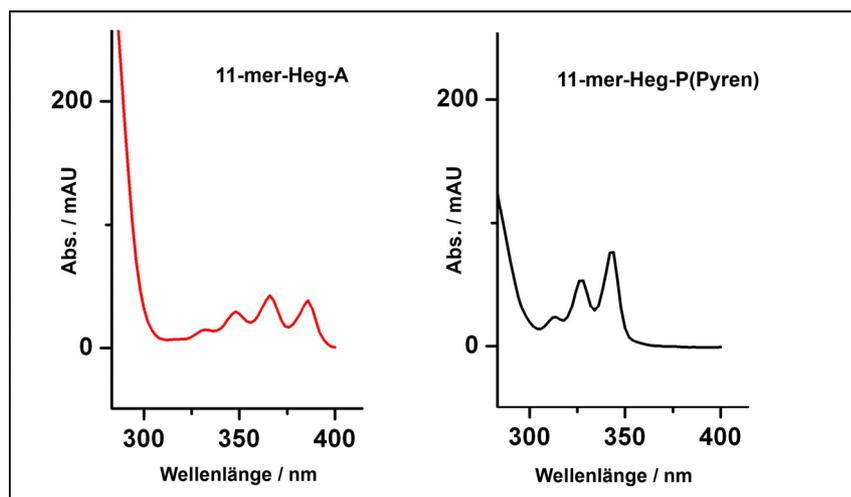


Abb. 10 UV-Spektrum des 11-mer-Hexaethylenglykol-Anthracen Konjugates von 275 bis 400 nm (links; rot) mit charakteristischen Absorptionsbanden bei 345, 365 und 385 nm. UV-Spektrum des 11-mer-Hexaethylenglykol-Diels-Alder-Produkt Konjugates von 275 bis 400 nm (schwarz; rechts) mit charakteristischen Absorptionsbanden bei 312, 326 und 345 nm.

Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen **3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 18** und **19** alle vom Ribozym als Substrate akzeptiert werden. Dabei nimmt die Akzeptanz der Substrate mit der Länge der Alkylkette in den Verbindungen **3** bis **6** ab. Die Verbindungen **7** und **9** sind weniger gute Substrate werden aber vom Ribozym umgesetzt. Die aromatischen Sustainenten in **7** (Naphtalensubstituent) und **9** (Pyrensubstituent) sind dabei von besonderem interessant durch ihren hohen sterischen Anspruch. Auch die Verbindungen **8, 14** und **15** mit Verzweigungen in β -Position werden ähnlich gut vom Ribozym als Substrat akzeptiert. Alle anderen Verbindungen (**2, 10, 11, 12** und **13**) werden nicht als Substrate akzeptiert. Dabei ist zu bemerken, dass diese Verbindungen alle eine Verzweigung in der α -Position aufweisen. Diese Ergebnisse

lassen sich anhand der Kristallstruktur erklären und diskutieren. Eine detailliertere Betrachtung der Substratakzeptanz durch das Ribozym und der Bindungstasche werden im Diskussionsteil dieser Arbeit vorgenommen.

4.2 Photoaffinitätsmarkierung des aktiven Zentrums

Photoaktive Reagenzien finden in der Biochemie breite Anwendung⁹⁷. Ihre Eigenschaft, durch Bestrahlung mit Licht einer definierten Wellenlänge, sich in kurzlebige hochreaktive Spezies umzuwandeln, macht sie zu interessanten Verbindungen für strukturbiochemische Untersuchungsmethoden und biotechnologische Anwendungen⁹⁸⁻¹⁰⁰. In der Literatur sind eine Vielzahl verschiedener photoreaktiver Gruppen und deren Einsatz in strukturbiochemischen Untersuchungen beschrieben.

Eine besondere Verwendung solcher photoaktiver Gruppen ist das Photoaffinitätsmarkieren^{101, 102}. Bei dieser Methode wird der Ligand, z.B. ein Enzymsubstrat, ein Rezeptoragonist oder -antagonist, in der Weise derivatisiert, dass er eine durch Licht aktivierbare Gruppe enthält. Die Affinität des Liganden trägt diesen zum Bindungsort. Durch die Photoaktivierung lässt sich der Zeitpunkt und damit zumindest teilweise auch der Ort der Reaktion bestimmen. Die Anwendungen reichen von einfachen Markierungen bestimmter Proteine in einem Proteingemisch bis zur Kartierung von Bindungsstellen durch Identifizierung von Aminosäureresten, die mit dem Photoaffinitätsreagenz reagieren.



Abb. 11 Schematische Darstellung der Photoaffinitätsmarkierung.

Heute werden sehr unterschiedliche Typen von Photoreagenzien in der Strukturuntersuchung von Biopolymeren eingesetzt¹⁰³. Eine häufig verwendete photoreaktive Gruppe ist das Phenylazid (**20**) oder dessen Derivate. Phenylazide benötigen zur Photoaktivierung relativ viel Energie im Vergleich zu anderen photoaktiven Gruppen wie Ben-

zophenon¹⁰⁴ oder Diazirin, dafür ist die Stoffklasse der Azide präparativ leicht zugänglich und handhabbar. Bei der Verwendung von Arylaziden (**20**) können auch Wellenlängen oberhalb 300 nm für die Bestrahlung gewählt werden, die die meisten Protein- sowie Nukleinsäurestrukturen unbeschädigt lassen. Durch Bestrahlung mit Licht entsteht aus den Arylaziden (**20**) ein Singulett-Nitren (**21**) welches eine mittlere Lebensdauer von 1 ns bei Raumtemperatur aufweist, bevor sie sich über ein Benzazirin (**22**) zum Dehydroazepin (Ketenimin) (**23**) umlagern. Von Nachteil bei Verwendung von Aziden ist die Lebensdauer der entstehenden Nitrene, was nicht-spezifische oder multiple Insertionen zur Folge haben kann. So kann das zuerst entstehende Singulett-Nitren (**21**) zu Triplett-Nitren umformen, das dazu neigt, Protonen aus CH-Bindungen abziehen. Des Weiteren können Dehydroazepine (**23**) neben Insertionsreaktionen zu geringem Anteil auch mit dem Lösungsmittel (z.B. Wasser) reagieren. Somit ist die Insertionsausbeute in der Regel gering¹⁰⁵.

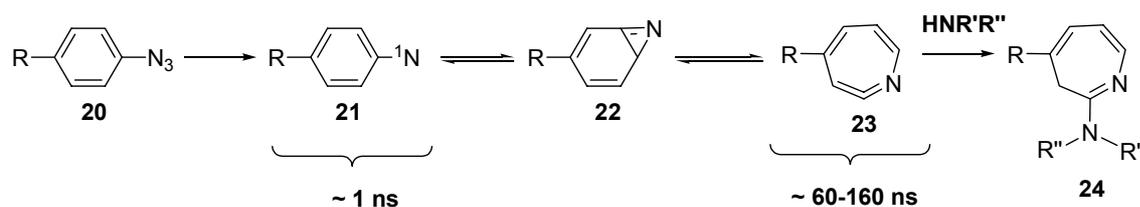


Abb. 12 Reaktionskaskade nach Photoaktivierung von Phenylazid. Neben dem Dehydroazepin (**23**) kann auch das Singulett-Nitren (**21**) bereits mit Nucleophilen reagieren. Dieses ist jedoch nur sehr kurzzeitig stabil und kann sich auch in Triplett-Nitren umwandeln¹⁰⁵.

In der letzten Zeit finden diese Photoreaktiven Verbindungen und im speziellen das Phenylazid immer mehr Anwendung in der Strukturuntersuchungen von DNA-Protein- und RNA-Protein-Wechselwirkung. Auch in der Strukturaufklärung von Ribozymen haben Phenylazide vermehrt Einsatz als Quervernetzungsreagenzien gefunden¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Ziel war es, Substrate für das Diels-Alder Ribozym zu synthetisieren, die eine solche photoreaktive Phenylazidgruppe enthalten und als Substrat akzeptiert werden, um erstmals photoreaktive Verbindungen auch in Photoaffinitätsstudien an Ribozymen einzusetzen. Besonders die hohe Affinität des Produkts zum Ribozym sollte eine gute Mög-

lichkeit darstellen, das aktive Zentrum mittels Photoaffinitätsmarkierung experimentell zu lokalisieren.

4.2.1 Synthese von photoreaktiven Verbindungen

Für die Synthese von photolabilen Verbindungen ist die Herstellung und Umsetzung unter Lichtausschluss durchzuführen. Dazu wurden sämtliche Reaktionen und Aufreinigungen mit Reaktionsgefäßen und Chromatographiesäulen aus Braunglas durchgeführt. In der Regel werden Phenylazide aus dem Phenylamin mittels Diazotierung mit anschließender Zugabe von Natriumazid hergestellt. Als universeller Baustein wurde N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalizylsäure (**27**) synthetisiert¹⁰⁹.

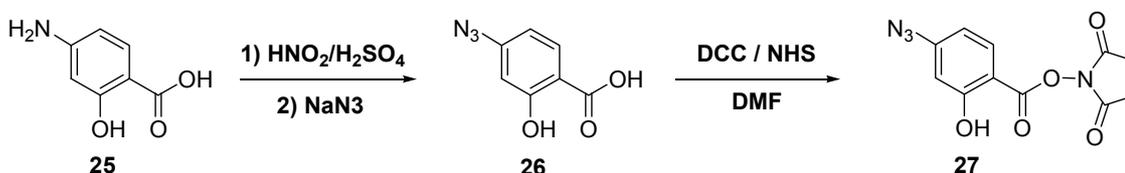


Abb. 13 Syntheschema des bifunktionalen, photoreaktiven NHS-Esters **27**.

Ausgehend von 4-Aminosalizylsäure (**25**) wurde zuerst das Amin in ein Azid überführt und anschließend die Carbonsäurefunktion als N-Hydroxysuccinimidylester (NHS-Ester) aktiviert.

Die erhaltene N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalizylsäure (**27**) ist ein bifunktionales Quervernetzungsreagenz. Zum einen kann es über den NHS-Ester an Amine gekoppelt werden und zum anderen enthält es das Phenylazid als photoreaktive Gruppe. Diese Verbindung wurde zur Synthese eines Phenylazidderivats des Maleimids eingesetzt und lässt sich auch in Photoquervernetzungsexperimenten zur Strukturaufklärung verwenden.

4.2.2 Synthese von Photoreaktiven Substraten

Für die Markierung eines Substrates mit einer photoreaktiven Gruppe bot sich das Dienophil an. Das Maleimid lässt Modifikationen in der Seitenkette mit Ausnahme der α -

Position im bestimmten Rahmen zu. Zwei Maleimidderivate mit Phenylazidgruppen in der Seitenkette wurden synthetisiert. Ausgehend von Hexan-1,6-diamin (**28**), welches mittels Standard Schutzgruppenchemie einfach mit einer Boc-Gruppe geschützt wurde¹¹⁰, wurde über den in *Kapitel 4.1.1* bereits beschriebenen Syntheseweg das 1-(6-aminohexyl)-1H-pyrrole-2,5-dion (**31**) hergestellt. Dieses wurde mit Verbindung **27** bei Raumtemperatur in DMF unter Zugabe von TEA zum Zielprodukt 4-azido-2-hydroxy-N-(6-(2,5-dioxo-2H-pyrrol-1(5H)-yl)hexyl)-benzamid (**32**) umgesetzt.

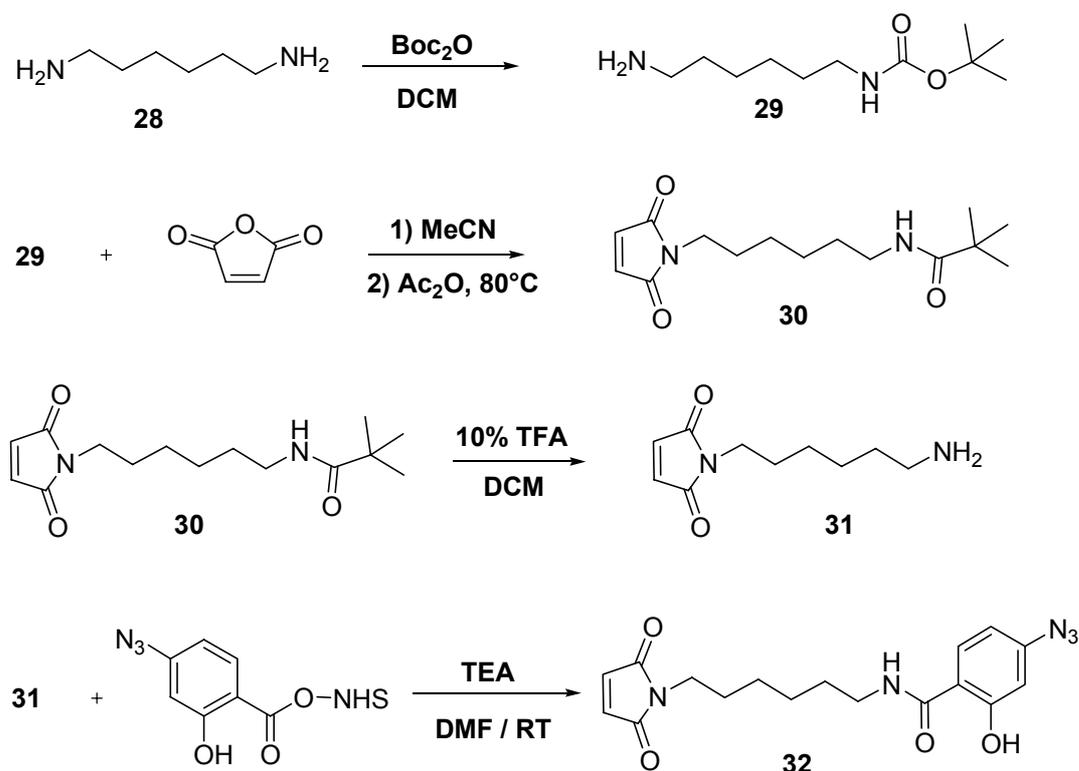


Abb. 14 Syntheschema zur Synthese eines photoreaktiven Maleimidderivates (**32**).

Alternativ zu Verbindung **32** wurde ein Maleimidderivat hergestellt, welches mit der photoreaktiven Gruppe des Phenylazids über die kurzstmögliche Seitenkette markiert ist. Unter Berücksichtigung der in *Kapitel 4.1.2* beschriebenen Substratvariationstoleranz, die zeigte, dass Verzweigungen der Seitenkette in der α -Position durch das Ribozym nicht toleriert werden, sollte das 1-(4-azidobenzyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (**38**) (4-Azidobenzyl-maleimid) als Maleimidderivat synthetisiert werden. Dazu wurde, ausgehend von *p*-Toluidin (**33**), das 1-Azido-4-methylbenzol (**34**) synthetisiert, was anschlie-

ßend mit N-Bromsuccinimid zu 4-Azidobenzylbromid (**35**) umgesetzt wurde¹¹¹. Über eine Gabriel Synthese wurde **35** zu 4-Azidobenzylamin (**37**) weiter umgesetzt. Die anschließende Umsetzung von **37** mit Maleinsäureanhydrid (**1**) konnte nicht nach der in 4.1.1 beschriebenen Synthese von Maleimiden durchgeführt werden. Azide reagieren bei höheren Temperaturen mit Maleinsäureanhydrid in einer 1,3-Dipolaren Cycloaddition zu Triazolen. Weiterhin lässt die geringe Stabilität der Azidfunktion bei höheren Temperaturen eine Umsetzung nach der Synthesevorschrift von Cava *et al.* nicht zu. Es war also nötig die Umwandlung zu **38** unter milderer Bedingungen durchzuführen. Dazu wurde die Cyclisierung zum Maleimid **38** mit 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBT) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) bei 0 °C durchgeführt¹¹². So konnte Verbindung **38** in guter Ausbeute gewonnen werden.

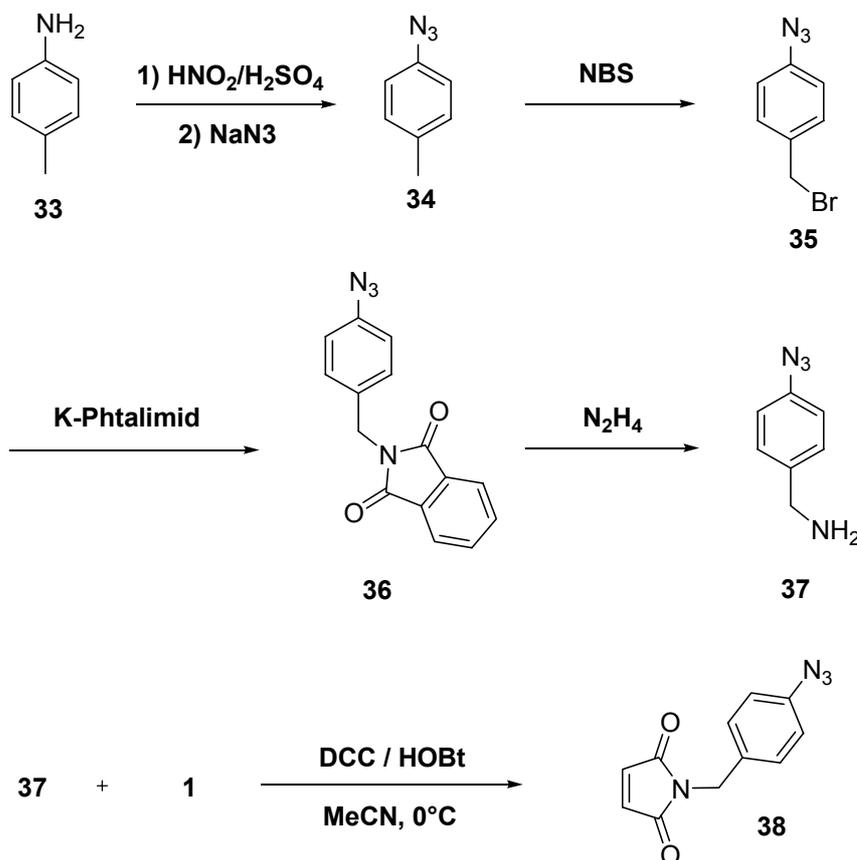


Abb. 14 Syntheschema zur Synthese eines photoreaktiven Maleimidderivates (**38**). Die Umsetzung von **37** mit Maleinsäureanhydrid muss unter den angegebenen milden Bedingungen durchgeführt werden.

Im Anschluss wurde die Photoreaktivität der Verbindungen **32** und **38** unter UV-Bestrahlung untersucht. Dazu wurde das UV-Spektrum von 200 bis 450 nm einer 1 mM ethanolischen Lösung der Verbindungen aufgenommen. Das Spektrum der Verbindung **32** zeigt Absorptionsbanden bei 210 und 250 nm. Verbindung **38** hingegen zeigt ein Absorptionsmaximum bei 270 nm, sowie eine zusätzliche Absorptionsbande bei 307 nm. Diese Verschiebung der Absorptionsmaxima ist auf die zusätzliche Hydroxylgruppe am Phenylring der Verbindung **38** zurückzuführen. Diese wurde durch Verwendung der 4-Aminosalicylsäure anstelle von 4-Aminobenzoesäure gezielt in Verbindung **38** eingebaut. Zum einen soll sie die Löslichkeit des Substrates in polaren Lösungsmitteln verbessern und zum anderen die spektralen Eigenschaften leicht verändern. Die Verschiebung des Spektrums zu höheren Wellenlängen ermöglicht eine höhere Quantenausbeute bezüglich der Anregung der photoreaktiven Gruppe bei Wellenlängen über 300 nm. Die Anregung der photoreaktiven Gruppe in Gegenwart von RNA sollte nicht mit UV-Licht der Wellenlängen ≤ 290 nm durchgeführt werden, da die Energie des kurzwelligen Lichtes Schädigungen an der RNA verursachen kann. Nach Aufnahme des Spektrums wurden die jeweiligen Proben für 20 Sekunden mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm aus einem Abstand von 1cm bestrahlt. Erneut wurde ein UV-Spektrum der Verbindung aufgenommen. Diese Vorgehensweise wurde 20-mal wiederholt. Die aufgenommenen UV-Spektren in Abbildung 15 und in Abbildung 16 zeigen deutlich die Abnahme der Absorption nach Bestrahlung. Die Abnahme ist zurückzuführen auf die Ringerweiterung des Phenylazids zum Dihydroazepin durch die UV-Bestrahlung. Die UV-Spektren der Messungen nach den jeweils 20 Sekunden dauernden Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm zeigen somit, dass die Verbindungen **32** und **38** photoreaktive Eigenschaften besitzen. In Abbildung 15 ist zusätzlich die Abhängigkeit der Absorption bei 250 nm von der Dauer der Bestrahlungszeit dargestellt. Die Intensität der Absorption bei 250 nm zeigt eine einfach exponentielle Abhängigkeit zur Bestrahlungsdauer bei Bestrahlung der Proben mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

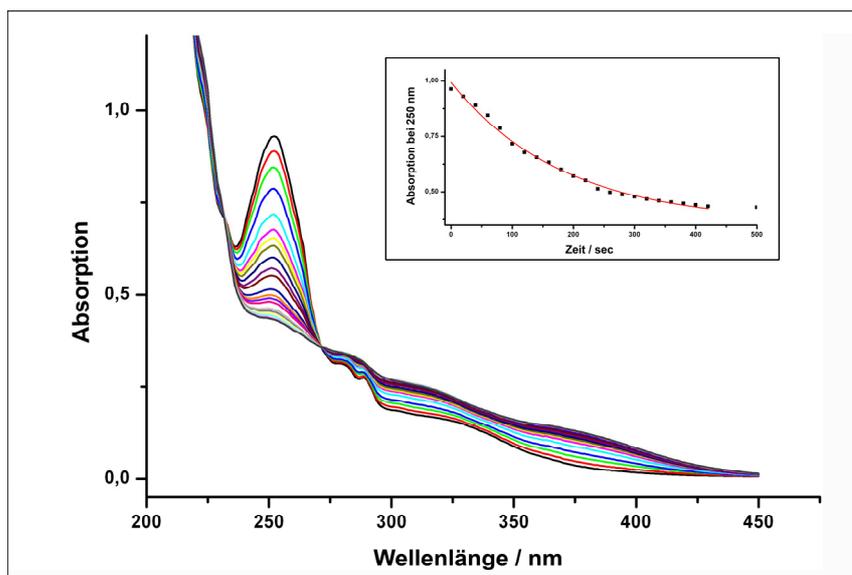


Abb. 15 UV-Spektren einer 1 mM ethanolischen Lösung der Verbindung **38** vor und nach Bestrahlung der Lösung mit Licht der Wellenlänge 254 nm. Spektren wurden jeweils nach 20 sec. Bestrahlung aufgenommen. Die innere Grafik zeigt die exponentielle Abnahme der Absorption der Lösung bei 250 nm.

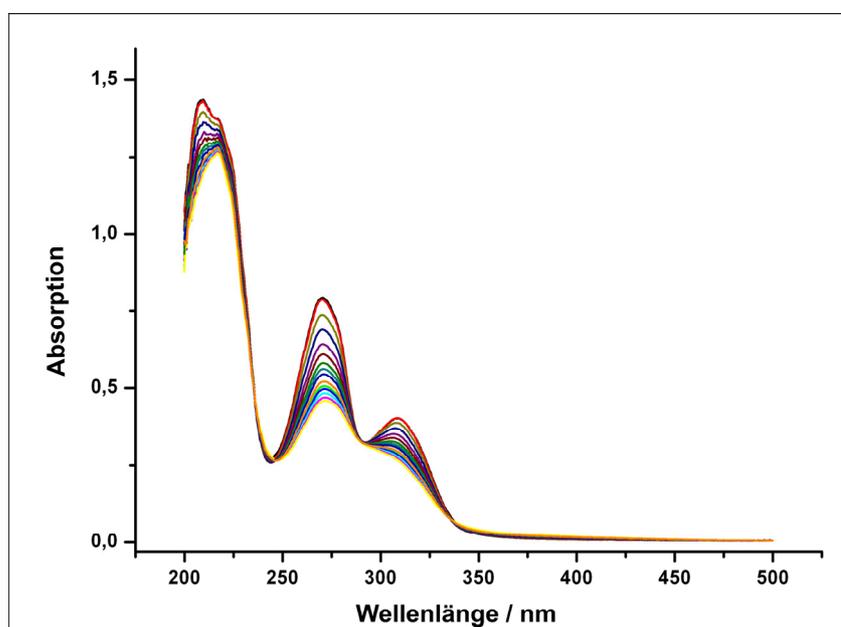


Abb. 16 UV-Spektren einer 1 mM ethanolischen Lösung der Verbindung **32** vor und nach Bestrahlung der Lösung mit Licht der Wellenlänge 254 nm. Spektren wurden jeweils nach 20 sec. Bestrahlung aufgenommen.

Um weiterhin die Verbindungen auf ihre Verwendbarkeit in Photomarkierungsexperimenten mit RNA zu untersuchen, wurde die Bestrahlung von einer 1 mM ethanolischen Lösung bei einer Wellenlänge von 302 nm untersucht. Die Versuche wurden mit und ohne Verwendung eines Polystyrenfilters durchgeführt. Polystyren ist nur für UV-Licht mit Wellenlängen größer als 290 nm durchlässig¹⁰⁸. Kürzere Wellenlängen werden absorbiert. Somit ist ein Polystyren gut als Filter zu verwenden, um sicherzustellen, dass die RNA bei Bestrahlung nicht geschädigt wird. Abbildung 7 zeigt die UV-Spektren einer 1 mM ethanolischen Lösung der Verbindung **38** vor und nach 5 Minuten Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm jeweils mit und ohne Polystyrenfilter. Die Spektren zeigen deutlich, dass durch Verwendung des Polystyrenfilters die Quantenausbeute bezüglich der Anregung der Photoreaktiven Gruppe zwar vermindert wird, aber die Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm mit Verwendung eines Polystyrenfilters noch eine ausreichende Aktivierung der Photoreaktiven Gruppe in Verbindung **38** gewährleistet.

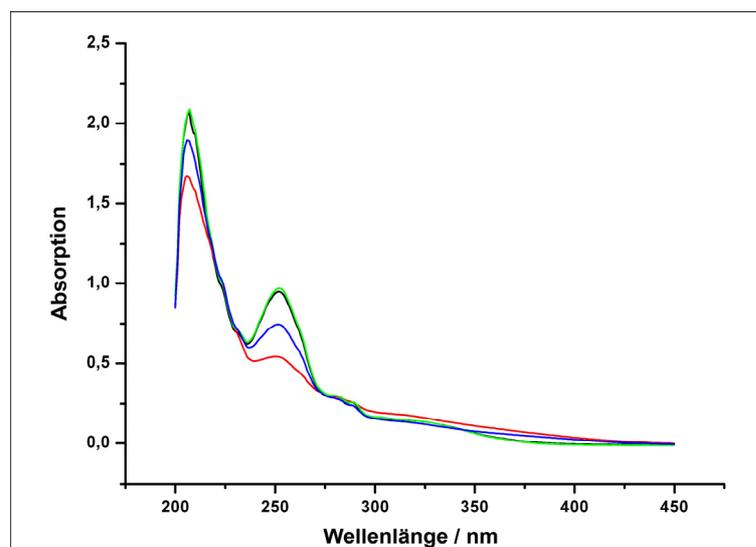


Abb. 17 UV-Spektrum der Verbindung **38** vor und nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 302 nm mit (blau) und ohne Polystyrenfilter (rot).

4.2.3 Photoaffinitätsmarkierungsexperimente

Das Diels-Alder Ribozym besitzt eine relativ hohe Affinität zum Produkt der Diels-Alder Reaktion zwischen Anthracen und Maleimid. Diese Produktinhibitorin wurde für

die Photoaffinitätsmarkierung genutzt. Der K_m -Wert von Maleimidsubstrate liegt im millimolaren Bereich, was auf eine schwache Bindungskonstante hinweist⁷⁶. Der IC_{50} -Wert des „richtigen“ Produktstereoisomers liegt bei $10 \mu M$ ⁷⁷. Die hohe Affinität des Produktes zum Ribozym und die sehr hohe lokale Konzentration des Produktes im cis-Assay sind gute Voraussetzungen um Photoaffinitätsmarkierungsexperimente mit diesem System durchzuführen¹¹³. Das Maleimidderivat **38** wurde in der zweisträngigen Ribozymvariante mit 11-mer-Anthracen und 38-mer zu 11-mer-Diels-Alder-Produkt in einer 2:1 Stöchiometrie umgesetzt, wie zuvor in *Kapitel 4.1.2* beschrieben. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur für eine Reaktionszeit von 10 min. Dadurch wurde gewährleistet, dass sich ausschließlich das bei der Ribozymkatalysierten Reaktion entstehende und somit „richtige“ Enantiomer bildet. Das Chromatogramm in Abb. 18 zeigt die Auftrennung des Reaktionsgemisches mit Umkehrphasen-HPLC. Nach einer Retentionszeit von 22 min wird das 11-mer-Diels-Alder-Produkt detektiert. Die HPLC-Detektion wurde mittels Radioaktivitätsdetektion vorgenommen, wobei das 3'-Ende der 11-mer-Heg-Anthracen sowie das 5'-Ende der 38-mer-RNA zuvor radioaktiv markiert wurden. Somit ließ sich jeglicher Lichteinfluss durch UV-Detektion verhindern. Die Verbindung **38** wurde als Substrat vom Ribozym akzeptiert, womit auch das Produkt die erwartete hohe Affinität zum Ribozym besitzen sollte.

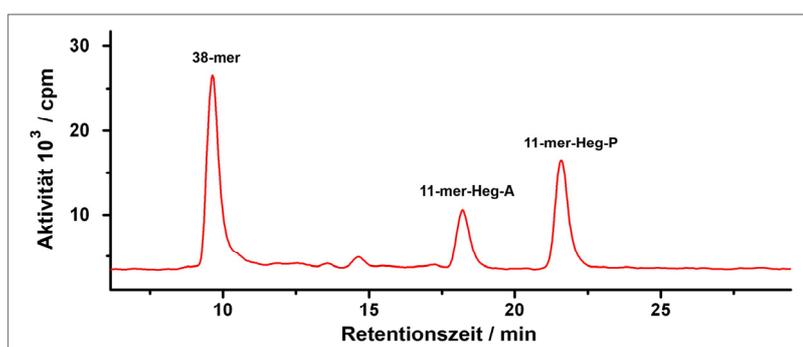


Abb. 18 HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von Verbindung **9** im in cis Assay. Detektion über HPLC-Radioaktivitätsdetektor.

Für die Photoaffinitätsmarkierung wurde Verbindung **38** im cis-Assay eingesetzt. Zur Detektion wurde entweder am 5'-Terminus ^{32}P -markiertes 38-mer oder über Ligation mit Cytidin-3'-(5'- ^{32}P)-diphosphat (pCp) am 3'-Terminus markiertes 11-mer-Anthracen

verwendet. Nach 10 Minuten Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch über eine kleine Gelchromatographiesäule (DyeEx®, Amersham) gegeben um Substratüberschuß abzutrennen. Das 38-mer und das 11-mer-Produkt wurden erneut im Reaktionspuffer gelöst und für 20 Minuten mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm bestrahlt. Die Bestrahlung wurde durch einen Polystyrenfilter aus einem Abstand von 1 cm auf die Probe angewendet. Anschließend an die Bestrahlung wurde die Photoreaktion mit Dithiothreitol (DTT) abgestoppt und das Reaktionsgemisch auf einem 15% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

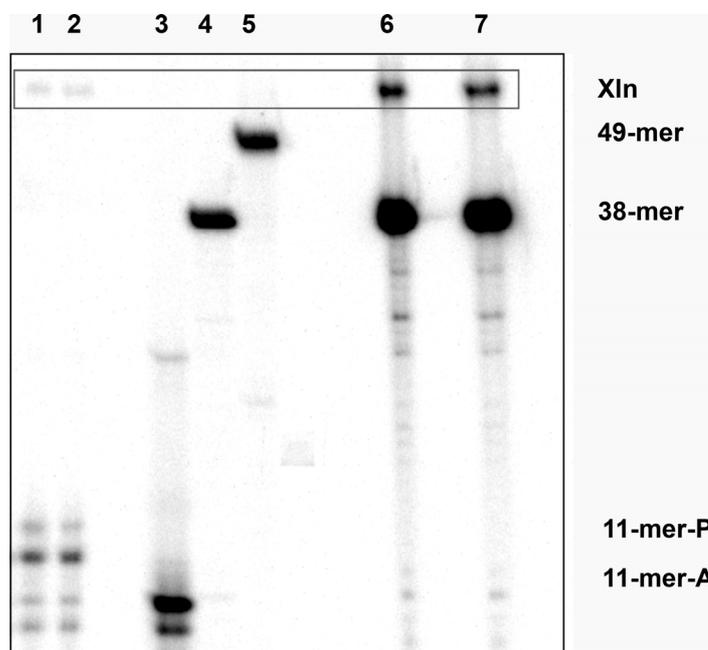


Abb. 19 Nachweis der Photoaffinitätsmarkierung mittels geelektrophoretischer Auftrennung (PAGE). Spuren 1 und 2: *11-mer-A, 38-mer nach 10 min Umsetzung mit Verbindung **38** und anschließender 20 minütiger Bestrahlung (302 nm; Polystyrenfilter); Spur 3: *11-mer-A Vergleich; Spur 4: *38-mer Vergleich; Spur 5: *49-mer Vergleich; Spur 6 und 7: 11-mer-A, *38-mer nach 10 min Umsetzung mit **38** und anschließender 20 minütiger Bestrahlung (302 nm; Polystyrenfilter); * = Radiomarkierung mit ^{32}P . (11mer-Anthracen und 11-mer-Produkt in Spur 1 und 2 zeigen nicht charakterisierte Banden analog zur Kontrolle in Spur 3); Photoaffinitätsproduktbanden (Xln) in Spuren 1, 2, 6 und 7 sind mit einem grauen Kasten gekennzeichnet. Aufnahme des Radiogramms mit Phosphorimager.

Abbildung 19 zeigt das für 3'-markiertes 11-mer (Linie 1 und 2) sowie für 5'-markiertes 38-mer (Linie 6 und 7) Photoaffinitätsvernetzte Produkte (Xln gekennzeichnet durch grauen Rahmen) zu identifizieren sind. Das Laufverhalten ist dem des kompletten 49-mer Ribozyms ähnlich. Die Tatsache, dass in beiden Markierungsansätzen Produktbanden mit gleichen Mobilitätseigenschaften bestimmt werden können, zeigt, dass es sich bei der Bande um ein Produkt aus photoaktivierten Vernetzungen zwischen 11-mer und 38-mer handelt. Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der Photoaffinitätsmarkierung von der Magnesiumionenkonzentration untersucht. Das Ribozym benötigt zum Ausbilden der aktiven Struktur Magnesiumionen. In Abwesenheit dieser liegt keine aktive Struktur vor, was bedeutet, dass die Bindung des photoreaktiven Diels-Alder-Produktes im aktiven Zentrum nicht möglich ist. Abbildung 20 zeigt die Abhängigkeit der Photoaffinitätsmarkierung von der Magnesiumionenkonzentration bei Verwendung von 3'-markiertem 11-mer-Anthracen im Photoaffinitätsmarkierungsassay. In der Abwesenheit von Magnesiumionen (Linie 1) ist keine Produktbande zu detektieren und mit zunehmender Magnesiumionenkonzentration wird die Intensität der Bande größer (Spur 2-5). Das Experiment zeigt deutlich den Zusammenhang zwischen aktiver Struktur und Photoaffinitätsmarkierung und ist ein deutlicher Beweis für die Spezifität dieser.



Abb. 20 Nachweis der Abhängigkeit der Photoaffinitätsmarkierung von der Magnesiumkonzentration. Alle Spuren: *11-mer-A, 38-mer nach 10 min Umsetzung mit Verbindung 38 und anschließender 20 min Bestrahlung (302 nm; Polystyrenfilter) mit Spur 1: $[Mg^{2+}]$ 0 mM, Spur 2: $[Mg^{2+}]$ 25 mM, Spur 3: $[Mg^{2+}]$ 50 mM; Spur 4: $[Mg^{2+}]$ 75 mM; Spur 5: $[Mg^{2+}]$ 100 mM. Aufnahme des Radiogramms mit Phosphorimager.

Um die Position der Photoaffinitätsmarkierung zu bestimmen muss die Photoaffinitätsproduktbande (Xln) des 5'-Terminal markierte 38-mer Ansatzes ausgeschnitten und isoliert werden. Nach Isolation wird die Probe einer partiellen alkalischen Hydrolyse unterzogen. Die Hydrolyseleiter sollte an der Photomarkierten Position einen Sprung

aufweisen wodurch die markierte Base genau zu bestimmen ist. Abbildung XX zeigt die Hydrolyseleiter des Photomarkierungsproduktes, die Hydrolyseleiter des 38-mers sowie einen enzymatischen Verdau des denaturierten 38-mers mit RNase T1 auf einem 15%igen Sequenziergel. Die RNase T1 spaltet Phosphordiesterbindungen ungepaarter Guanosenreste in RNA, wobei Fragmente mit einem 3'-Phosphat entstehen. Die Banden des RNase T1-Verdaus sind den Guanosenresten der Sequenz zuzuordnen. Die Hydrolyseleiter des Photoproduktes zeigt einen deutlichen Sprung, der der Photoaffinitätsmarkierung von Uridin 42 zuzuordnen ist.

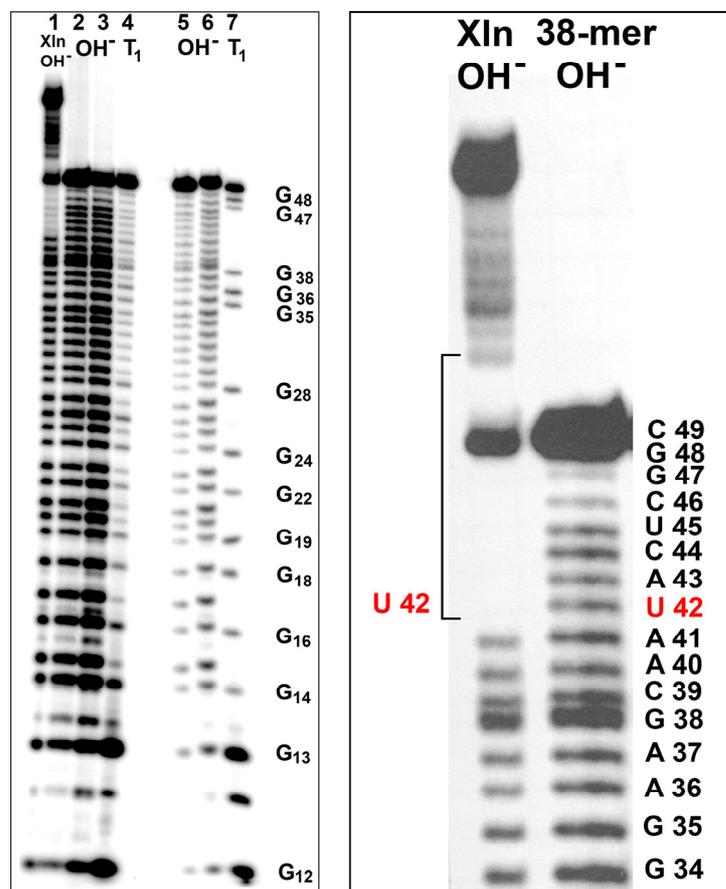


Abb. 21 Sequenzanalyse des Photoaffinitätsmarkierungsproduktes. Spur 1: isoliertes Photoaffinitätsmarkierungsprodukt mit markiertem *38-mer nach partieller Hydrolyse; Spuren 2,3,5 und 6: 38-mer nach partieller Hydrolyse; Spuren 4 und 7: *38-mer nach Verdau mit RNase T1 (links); Vergrößerter Ausschnitt des Sequenziergels mit Zuordnung der photoaffinitätsmarkierten Base U42 (rechts). Aufnahme des Radiogramms mit Phosphorimager.

Mit diesen Photoaffinitätsexperimenten konnte erstmals das aktive Zentrum des Diels-Alder Ribozyms lokalisiert werden. Die Sekundärstruktur des Diels-Alder Ribozyms weist neben den 3 helikalen Bereichen eine „Bulge“-Region auf. Die Photoaffinitätsmarkierte Base U42 liegt in diesem „Bulge“-Bereich. Die Experimente bestätigen was bisher vermutet wurde: dieser „Bulge“-Bereich spielt eine wichtige Rolle für die Ausbildung einer katalytischen Tasche in der Tertiärstruktur.

Photoaffinitätsexperimente mit Verbindung **32** führten nicht zu Photoaffinitätsmarkierungsprodukten. Es ist anzunehmen, dass die relativ lange Alkylkette im Maleimidsubstituenten der Verbindung **32** keine direkte Positionierung des photoreaktiven Phenylazids im aktiven Zentrum gewährleistet.

4.3 Schweratomderivate für Kristallisationsexperimente

Die Röntgenstrukturkristallographie ist wohl das stärkste Instrument zur Aufklärung biologischer Strukturen¹¹⁴. Auch für Nukleinsäuren bietet sie einen Zugang zu vollständigen Strukturen und liefert die höchste gegenwärtig verfügbare Auflösung¹¹⁵. In den letzten Jahren konnten Kristallstrukturen von einigen natürlichen Ribozymen bestimmt werden (Gruppe I-¹¹⁶ und Gruppe II-Intron Ribozyme¹¹⁷, RNase P, Hammerhead^{118, 119}, Hairpin¹²⁰ und Hepatitis Delta Virus-Ribozym¹²¹). Dabei besteht, neben der Herstellung von brauchbaren Einkristallen mit ausreichender Größe, eine besondere Schwierigkeit in der anschließenden Lösung des Phasenproblems um eine Elektronendichtekarte zu erstellen. Ein üblicher Lösungsansatz ist die Verwendung von Schweratomen. Hierbei können die Phasen von den gut verstandenen Beugungsmustern von Schweratomreferenzmarkern, die sich an spezifischen Positionen des Kristalls befinden, abgeleitet werden. Schweratomderivate können auf unterschiedlichen Wegen erhalten werden. Die gängigste Methode ist die so genannte „soak“-Methode („Saug-Methode“). Schweratome können in bereits gewachsene Kristalle gesogen oder während der Kristallisation cokrystallisiert werden. Existieren Bindungsstellen für Schweratome, können diese spezifisch koordiniert werden und man erhält brauchbare Derivate für die Lösung des Phasenproblems. Die Anwendung dieser Methode eignet sich jedoch nicht für die RNA-Kristallisation. Zwar ist RNA ein polyanionisches Biomolekül und kann somit in Wechselwirkung mit Schweratomkationen treten, doch sind diese Wechselwirkungen meist

unspezifisch. Hinzukommt, dass die Struktur von RNA häufig stark von der Gegenwart von zweiwertigen Metallionen, üblicherweise Magnesium, abhängig ist. Die Schweratom- und Magnesiumionen können daher um Bindungsstellen konkurrieren. Weiterhin sind im Fall der RNA keine funktionellen Gruppen vorhanden, die bevorzugt als Bindungsstellen für Schweratome dienen könnten, wie es bei Proteinen der Fall ist (z.B.: Thiolgruppen von Cysteinen). Trotzdem konnten mit dieser Methode erfolgreich Kristallstrukturen gelöst werden, wie im Fall der P4-P6-Domäne¹¹⁶ oder der 5S rRNA¹²².
thor<<Year>1999</Year><RecNum>15</RecNum><record><rec-number>15</rec-number><ref-type name='Journal Article'>17</ref-type><contri, die im Anschluss als Grundlage zur Lösung der Kristallstruktur dienten. Die Alternative zu einer solchen „soak“-Methode ist die Möglichkeit Schweratome oder Schweratombindungsstellen kovalent in die RNA-Struktur einzuführen. Dabei sollte die Änderung an der RNA minimal gehalten werden, so dass die Struktur nicht von der Modifikation beeinflusst wird. Ein besonderer Vorteil dieser Methode liegt auch in der definierten Stöchiometrie der Modifikation. Jedes Molekül ist mit einer definierten Anzahl Schweratomreferenz markiert, wobei die Position der Modifikation bezüglich der Primärstruktur bekannt ist. Der einfachste Weg auf diese Weise Schweratome einzuführen ist der Einbau von halogenierten Pyrimidinbasen. Brom oder Iod als Substituenten in 5-Position von Uracil oder Cytosin ist eine Modifikation welche bereits in der Untersuchung von tRNA Strukturen häufig Anwendung fand¹²³. Auf diese Weise gelang es in der letzten Dekade, eine Vielzahl von RNA-Strukturen aufzuklären (Hammerhead Ribozym¹¹⁸, eine Pseudoknoten Struktur¹²⁴, mehrere RNA-Duplex Strukturen¹²⁵).

Für das Diels-Alder Ribozym war es gelungen geeignete Kristallisationsbedingungen für unmodifizierte RNA-Konstrukte und unmodifizierte RNA-Konstrukte in Gegenwart von Schwermetallsalzen wie BaCl₂, CdCl₂, SrCl₂, MnCl₂ zu entwickeln. Solche zweiwertigen Schwermetallionen sollten durch Co-Kristallisation isomorph in das Kristallgitter eingebaut werden und beispielsweise Bindungsplätze von Magnesiumionen besetzen. Trotz befriedigender Auflösungen von 3,3 Å gelang keine rechnerische Lösung der Struktur. Somit bestand die Aufgabe darin Schweratommodifizierte RNA-Konstrukte für das Diels-Alder Ribozym herzustellen. Als eine besonders vielversprechende Strategie stellte sich die Verwendung von Schweratommodifizierten Substraten dar. Bisherige Kristallisationsexperimente hatten gezeigt, dass ein besonders gutes Kristallwachstum

für Konstrukte mit am 5'-Ende via Hexaethylenglykol kovalent gebundenem Diels-Alder Produkt vorlag. Diese Eigenschaft bot sich als besonders praktikable Möglichkeit zur Einführung des Schweratoms über das Dienophil-Substrat an. In der Einleitung und in *Kapitel 4.1.2* wurde bereits beschrieben, dass das Diels-Alder Ribozym eine breite Anzahl von Derivaten ohne bedeutenden Aktivitätsverlust als Substrate akzeptiert, und das Produkt gleichzeitig ein relativ guter Inhibitor ist. Ein Maleimidderivat welches vom Ribozym als Substrat akzeptiert wird, sollte auch als das daraus hervorgehende Diels-Alder Produkt Affinität zur aktiven Ribozymstruktur aufweisen. Ziel war es, schweratommarkierte Substratderivate herzustellen, die anschließend in der *in cis* Reaktion zum stereochemisch „korrekten“ Produkt umgesetzt und isoliert werden. Die resultierenden RNA-Konjugate sollten nach erfolgreicher Kristallisation zur Lösung des Phasenproblems beitragen. Die Synthese von schweratommarkierten Substraten konzentrierte sich auf Derivate des Dienophils. Hier bot sich die Modifikation der Seitenkette des Maleimids an, von der ihre Variationsmöglichkeit bereits in *Kap. 4.1.2* beschrieben wurde. Verbindungen **16** und **17** wurden in der *in cis* Reaktion mit 38-mer und 11-mer-Heg-Anthracen zu dem 11-mer-Heg-Diels-Alder-Produkt-Konjugat umgesetzt und über HPLC isoliert.

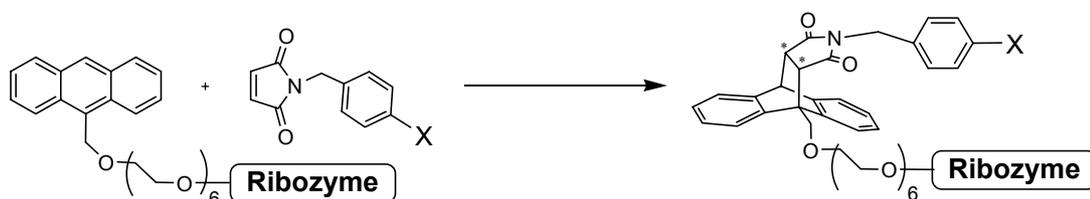


Abb. 22 Umsetzung eines schweratommarkierten Maleimidderivates mit Diels-Alder Ribozym im *in cis* Assay. Dies ermöglicht die Einführung von Schweratomen in das Ribozym-Produkt-Konjugat; $X = \text{Br}, \text{I}$.

Eine weitere Modifikationsvariante ist die Substitution des Wasserstoffs bzw. beider Wasserstoffe an der Doppelbindung des Dienophils. Diese Derivate wurden im UV-Assay auf ihre Substrateigenschaften für das Diels-Alder Ribozym getestet. Durch den elektronenziehenden Effekt der Halogensubstituenten wird das LUMO des Dienophils weiter abgesenkt, wodurch die Reaktion beschleunigt wird.

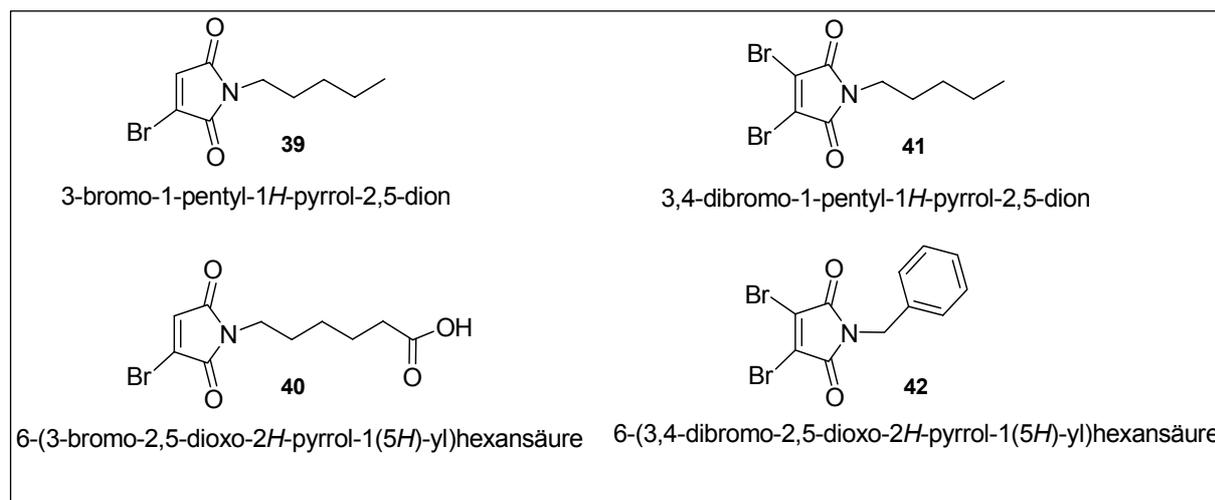


Abb. 23 Maleimidderivate mit Schweratommodifikation an der Doppelbindung.

Im UV-Assay zeigen die Verbindungen **39**, **40**, **41** und **42** eine sehr hohe Hintergrundrate. In Gegenwart des 49-mer Ribozym wird die Reaktion nicht beschleunigt. Solch modifizierte Dienophile sind keine Substrate für das Diels-Alder Ribozym. Das Ribozym lässt Substituenten in den möglichen Positionen an der Doppelbindung des Dienophils nicht zu. Die Möglichkeit mit diesen Substraten, über die Produktaffinität, Schweratome im aktiven Zentrum zu positionieren ist somit nicht möglich.

Vor kurzem gelang es den Kooperationspartnern in der Arbeitsgruppe von Dinshaw Patel in New York Elektronendichtekarten von Kristallen des Ribozym-Produkt-Komplexes mit Diels-Alder Produkt aus der Umsetzung mit Verbindung **16** zu erstellen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Ronald Micura in Innsbruck wurde ein anderer Ansatz verfolgt. Dieses Labor entwickelte Synthese und Methode zur Einführung von 2'-Selenomodifikationen in RNA¹²⁶⁻¹²⁸. Es wurde 11-mer-Anthracen und 38-mer mit insgesamt 6 modifizierten Cytidinen bzw. Uridin synthetisiert und mit N-Pentylmaleimid in der ribozymkatalysierten Reaktion zum Produktkonjugat umgesetzt. Mit dieser modifizierten Variante gelang es Kristalle zu erhalten, und letztendlich erstmalig das Phasenproblem zu lösen.

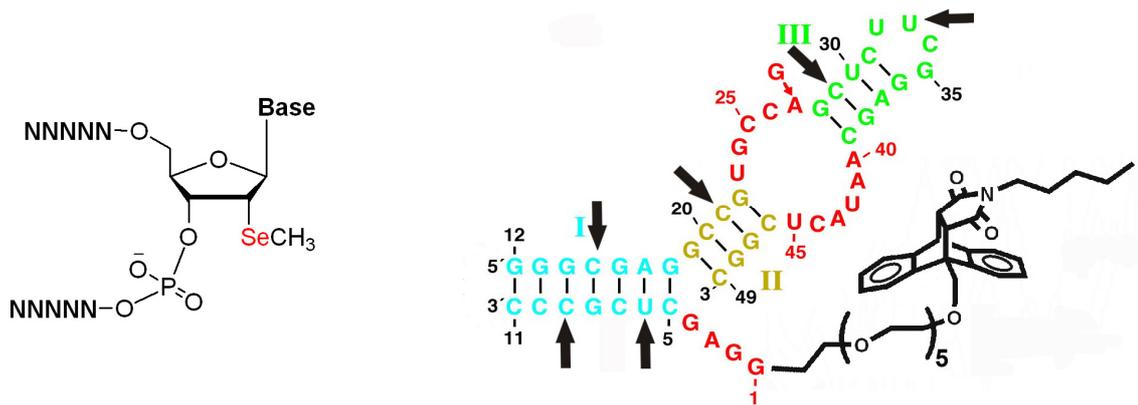


Abb. 24 2'-Selenomodifikation als Schweratommodifikation in RNA (links). Positionen im zweisträngigen Sekundärstrukturmotiv, die mit Selenomodifikationen versehen wurden (mit Pfeilen markiert). Für Kristalle dieses modifizierten Ribozym-Produkt-Konjugats konnte das Phasenproblem gelöst werden (rechts).

4.4 Kristallstruktur des Diels-Alder Ribozyms

Die Lösung der Kristallstruktur ist eine zentrale Aufgabe bei der Aufklärung von Funktion und Mechanismus von Biokatalysatoren. Die Kristallstruktur des Diels-Alder Ribozyms konnte nach unzähligen Versuchen verschiedenster Ansätze gelöst werden¹²⁹. Dieses wurde nur möglich durch Kooperation der Arbeitsgruppe von Andres Jäschke mit den Arbeitsgruppen von Dinshaw Patel und Ronald Micura. Die hier vorgestellte Kristallstruktur ist das Ergebnis einer langen Zusammenarbeit, zu deren Erfolg die vorliegende Arbeit einen Teil beitragen konnte.

Die gelöste Kristallstruktur basiert auf dem zweisträngigen Ribozym-Konstrukt des minimalen Motivs. Dieses aus einem 38-mer und 11-mer RNA Strang bestehende System ergab die besten Kristalle. Dabei war am 5'-Terminus des 11-mers das Diels-Alder-Produkt über Hexaethylenglykol kovalent gebunden. Zusätzlich zeigten sich bessere Kristallisationseigenschaften für eine Mutante in der das Guanin in Position 27 durch Adenin ersetzt wurde. Die Seleniummodifizierte Variante dieses Systems ermöglichte es anschließend anhand der Schweratome das Phasenproblem bei einer Auflösung des Kristalls von 3Å zu lösen. Mit Hilfe dieser Struktur ließ sich auch die Struktur des Ribozym-Produkt-Komplexes ohne Schweratommodifikationen und die Struktur des

„freien“ Ribozym bestimmen¹²⁹. Diese nahezu identischen Strukturen geben Einsicht in die Details des aktiven Zentrums mit und ohne gebundenes Produkt, sowie in die gesamten strukturellen Eigenschaften des Ribozyms. Auch die Frage nach der Rolle der Magnesiumionen für die Struktur und den Mechanismus können mit den Informationen aus der Kristallstruktur genauer beleuchtet werden. Das Ribozym nimmt in der Tertiärstruktur eine λ -förmige Topologie ein, wobei die Helices II und III über eine asymmetrisch zusammengezogene Blase („Bulge“-Bereich) aufeinander stehen. Die Helix I wird durch zwei Basenpaarungen der Bulgenukleotide verlängert und ist in unmittelbarer Nähe zur Helix II, so dass ihr Phosphatrückrat in deren „major groove“ (grosse Furche) liegt. Die durch diese Position der Helices ausgebildete λ -Form bildet in ihrem Zentrum, wo die drei Helices über den zusammengezogenen „Bulge“-Bereich aufeinander treffen, das aktive Zentrum aus. In der Struktur finden sich 8 hydratisierte Magnesiumionen, von denen zwei nachweislich an der Strukturbildung des Ribozyms beteiligt sind. Andere könnten für die Stabilisierung der Struktur und der Kristallpackung eine wichtige Rolle spielen. Bemerkenswert ist auch, dass alle Reste bis auf G24 an Basenpaarungs- oder Basentripelinteraktionen beteiligt sind. Dadurch entsteht eine sehr kompakte stabile Struktur (Abb. 25).

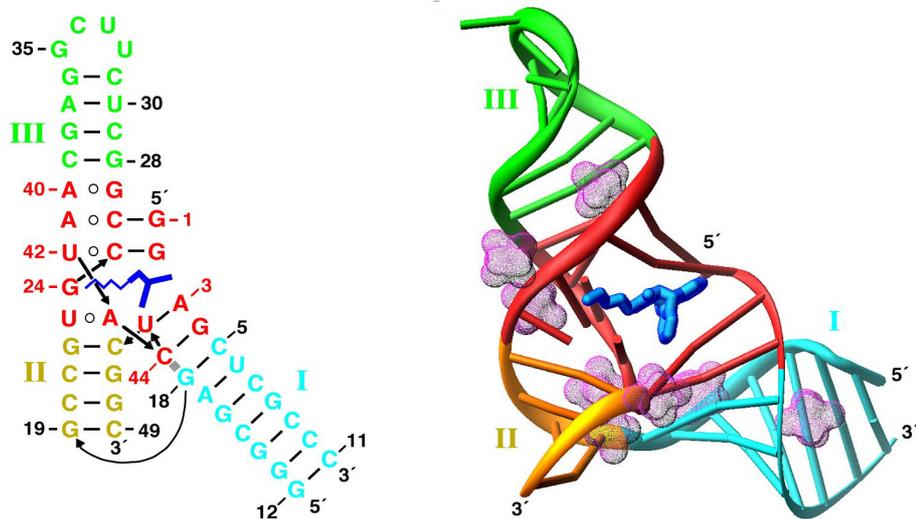


Abb. 25 Tertiärstruktur des Diels-Alder Ribozyms. In der schematischen Darstellung (links), und in der dreidimensionalen Darstellung (rechts) sind Helix I–III durch blau, gelb und grün gekennzeichnet. In der dreidimensionalen Ribbon-Darstellung sind zusätzlich die hydratisierten Magnesiumionen in magenta dargestellt. Das Diels-Alder Produkt ist in beiden Darstellungen im aktiven Zentrum blau dargestellt.

Basenpaarung A3-U45, das reverse Hoogsteen Paar U23•A43 und das Basentripel U42•(C25-G2) umrahmt. Die hydrophobe Tasche wird auf der „Rückseite“ durch G24 und C25 geschlossen, während von der Vorderseite Raum für den Produktzugang ist. Dabei bilden die Pyrimidinbase U45 und die Purinbasen A3 und G2 ideale Plateaus um über Stapelwechselwirkungen mit Phenylringen das Produkt zu binden. Die Base C25 ist so im aktiven Zentrum positioniert, dass die Bindung des 5-Ringes des Maleimids ausschließlich die Bildung eines der beiden Produktisomere ermöglicht. Zusätzlich bilden U23, A43 und G24 eine hydrophobe Furche aus, in dem die Pentylkette des Produktes liegt.

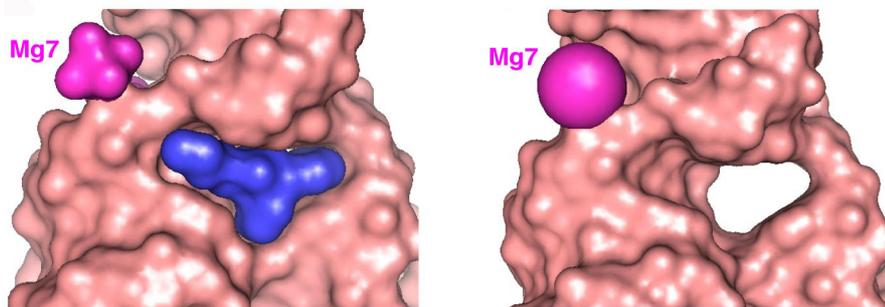


Abb. 27 *Vergleich der Diels-Alderase Ribozym Kristallstrukturen des Ribozym-Produkt-Komplexes und des freien Ribozyms. Die Darstellung zeigt die katalytische Bindungstasche des Diels-Alderase Ribozyms in einer „Surface“-Darstellung mit gebundenem Produkt (links; Auflösung der Struktur 3.0 Å) und ohne gebundenes Produkt als freies Ribozym (rechts; Auflösung der Struktur 3.5 Å) betrachtet von der „Vorderseite“. Beide Strukturen sind fast identisch. Das freie Ribozym besitzt eine vorgeformte Bindungstasche. Die Magnesiumionen sind magentafarben mit Hydrathülle dargestellt, wobei für das Kristall mit freiem Ribozym aufgrund der schlechteren Auflösung das hydratisierte Magnesiumion nur wie gezeigt dargestellt werden kann.*

Die hydrophobe katalytische Bindungstasche ist maßgeschneidert für die Bindung der Substrate sowie des Produktes. Die Kristallstruktur des freien Ribozyms weist eine identische Struktur auf, was zeigt, dass die Ausbildung der Struktur unabhängig von der Bindung des Substrats oder Produkts zu sein scheint. Es liegt eine vorgeformte hydrophobe Bindungstasche vor, deren Ausbildung ausschließlich die Gegenwart von zwei-

wertigen Kationen benötigt. Diese Magnesiumionen scheinen ausschließlich für die Ausbildung der Struktur benötigt zu werden, im aktiven Zentrum direkt jedoch finden sich keine Kationen die an der Katalyse beteiligt sein könnten. Abbildung 27 zeigt eine Oberflächendarstellung des Ribozym-Produkt-Komplexes und des freien Ribozyms. Deutlich zu sehen ist die vorgeformte Bindungstasche, die passgenau für das Produkt ist. Ebenso konnte für die Ribozym-Produkt Kristalle mit bromodermivatisiertem Produkt eine Elektronendichtekarte erstellt werden. Auch hier sind nur minimale Änderungen in der Struktur des Ribozyms zu erkennen (Abb. 28). Mit Hilfe dieser Struktur lässt sich die Position des Maleimidrestes im hydrophoben Kanal genauer beleuchten. Durch die hohe Elektronendichte des Bromatoms im Maleimidrest ließ sich dessen Konformation erstmals genau bestimmen.

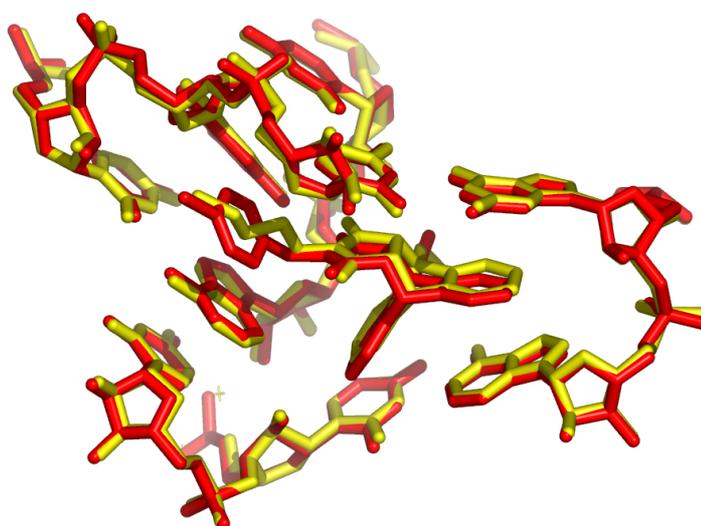


Abb. 28 Vergleich der Ribozymstrukturen unterschiedlicher Ribozym-Produkt-Komplexe. Katalytisches Zentrum und Konformation des gebundenen Produktes in der Kristallstruktur mit schweratommodifiziertem Produkt (rot). Katalytisches Zentrum mit gebundenem Produkt ohne Schweratommodifikation und die postulierte Konformation des Maleimidrestes (gelb)

4.5 Enantioselektivität des Diels-Alder Ribozyms

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, können bei der Diels-Alder-Reaktion bis zu vier Stereozentren aufgebaut werden. Im Fall der Reaktion eines symmetrisch substitu-

ierten Maleimids mit einem in 9-Position substituierten Anthracen, wie sie als Substrate für das Diels-Alder Ribozym verwendet werden, können zwei Produktenantiomere gebildet werden.

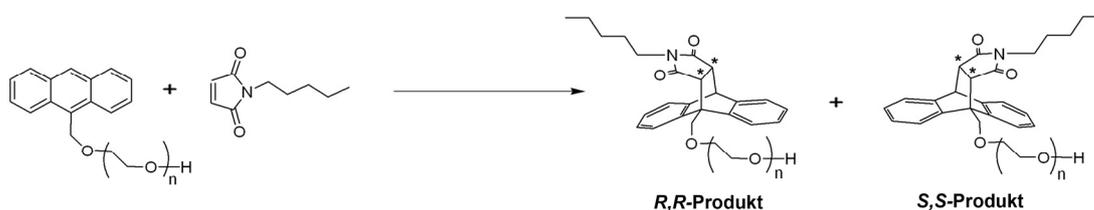


Abb. 29 Diels-Alder-Reaktion zwischen 9-Methylhexaethylglykolanthracen und N-Pentylmaleimid und das entstehende racemische Gemisch aus R,R- und S,S-Produktenantiomer.

Bisherige Untersuchungen im *in trans*-Assay konnten zeigen, dass das Diels-Alder Ribozym die Reaktion enantioselektiv katalysiert, also bevorzugt eines der beiden Enantiomere liefert⁷⁶. In der Kristallstruktur wurden bereits die besonderen Eigenschaften der katalytischen Tasche beschrieben, deren sterische Beschaffenheit eine wichtige Voraussetzung dafür darstellt.

Aufgrund der Studien zur Enantioselektivität wurden zwei möglichen Bindungsmodi des Anthracens postuliert, die als „Head first“- bzw. „Tail first“- Bindungsmodi bezeichnet wurden. In Abbildung 30 ist ein einfaches Modell des aktiven Zentrums mit den postulierten Bindungsmodi dargestellt. Während das Maleimid in einer definierten Position gebunden ist, kann das Anthracen auf zwei mögliche Arten in der katalytischen Tasche binden. Diese Bindungsmodi erklären die Abhängigkeit der Enantioselektivität vom Substituenten in 9-Position des Anthracens. Je sterisch anspruchsvoller dieser ist, desto höher ist der Enantiomerenüberschuß (ee) des entstehenden Produktes. Für 9-Hydroxymethylantracen liegt der ee-Wert der ribozymkatalysierten Reaktion bei 16%. Beide Bindungsmodi sind sterisch möglich, wodurch sich nur ein geringer Enantiomerenüberschuß bilden kann. Für 9-Methylhexaethylglykolanthracen hingegen liegt der ee-Wert bei 95 %. Durch den sterischen Anspruch des Substituenten wird der „Head-first“-Bindungsmodus stark bevorzugt, was zu einem hohen Enantiomerenüberschuß führt.

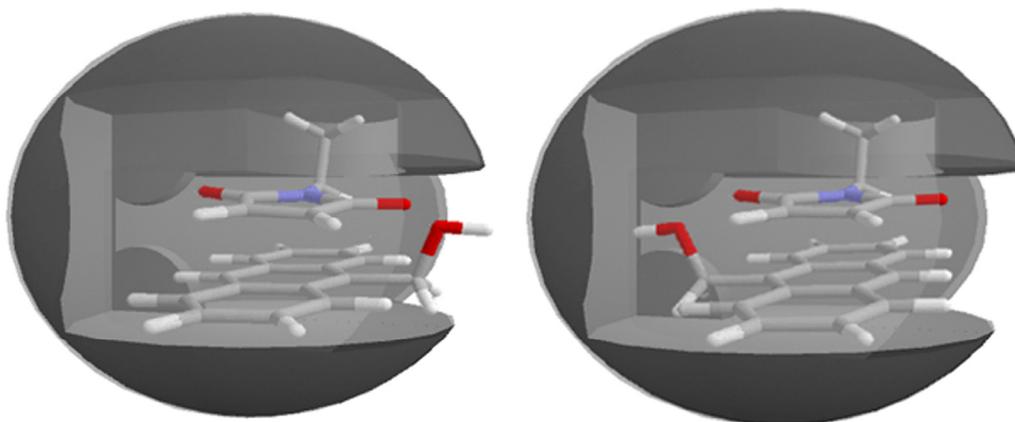


Abb. 30 Modell zur Erklärung der Enantioselektivität des Diels-Alder Ribozyms für die *in trans* Reaktion. Bevorzugte Substratorientierung „Head first“ (links); ungünstige Substratorientierung „Tail first“ (rechts)⁷⁷.

Dieses war eine erste vereinfachte Modellvorstellung zu einem Zeitpunkt an dem noch keine Kristallstrukturdaten zur Verfügung standen. Nach Lösung der Kristallstruktur, bestand nun die Möglichkeit die Frage nach der Enantioselektivität genauer zu betrachten, und das bestehende Modell mit der Kristallstruktur abzugleichen.

In der Kristallstruktur wurde überraschendes festgestellt. Zum einen konnte das erste Modell bestätigt werden, indem die Ribozymstruktur eine Tasche aufweist die auf den ersten Augenschein nur von einer Seite zugänglich ist und die sterische Beschaffenheit des katalytischen Zentrums nur eine Möglichkeit zur Bindung des Maleimids zulässt. Für die Kristalle des Ribozym-Produkt-Komplexes wurde das Ribozym-Produkt-Konjugat der *in cis* Reaktion eingesetzt. Obwohl der Hexaethylenglykollinker wegen seiner Flexibilität in der Elektronendichtekarte nur sehr schwer zu lokalisieren ist, kann deutlich die Orientierung des Linkers bestimmt werden. Dieser zeigt in der Kristallstruktur des Ribozym-Produkt-Komplexes durch eine kleine Öffnung auf der Rückseite der katalytischen Tasche. Dies steht jedoch vollständig im Gegensatz zu der für das *in trans*-Ribozym postulierte „Head-First“-Bindungsverhalten. Das würde bedeuten, dass in der *in cis*-Variante des Ribozyms, die bisher als ungünstigere Bindung des Anthracensubstrates angenommene Variante einer „Tail first“ Bindung vorliegt. Dies ließ vermuten, dass für das Ribozym in *in trans*-Reaktion durchaus die „Head first“ Bindung

bevorzugt ist, für die *in cis*-Variante jedoch andere Bindungs- oder Faltungsfaktoren eine Rolle spielen und somit die „Tail first“ Bindung bevorzugt wird. Alternativ musste auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Kristallstruktur nicht die tatsächliche aktive Struktur des Ribozyms darstellt. Die Orientierung des Anthracens in der Bindungstasche legt je nach Bindungsmodus „Head-first“ oder „Tail-first“ auch die Stereochemie des Produktes fest. „Head-first“-Orientierung resultiert in der Bildung des einen Enantiomers, „Tail-first“-Orientierung in der Bildung des anderen Enantiomers. Ist also in der aktiven Struktur des *in cis* Ribozym-Produkt-Komplexes das Produkt tatsächlich in einer „Tail-first“-Orientierung gebunden, sollte die Untersuchung der Enantioselektivität der Reaktion im *in cis*-Reaktionsformat eine umgekehrte Enantioselektivität zu der im *in trans* Reaktionsformat aufweisen.

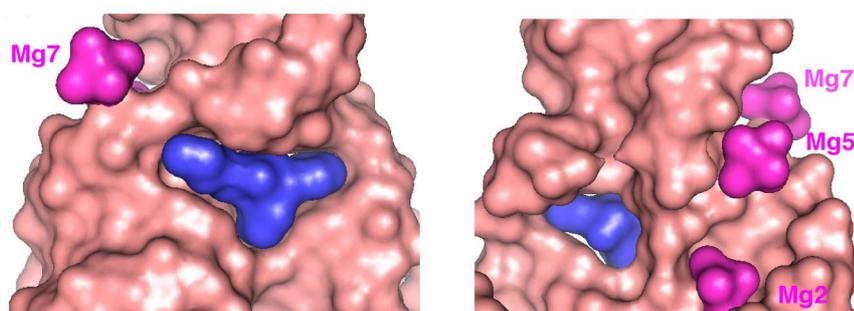


Abb. 31 Aktives Zentrum des Ribozym-Produkt-Komplexes in einer „Surface“-Darstellung von der Vorderseite (links) und der Rückseite (rechts). Deutlich ist die Orientierung des Linkers, der für das *in cis* Ribozym durch eine Öffnung auf der Hinterseite der Bindungstasche zeigt, zu erkennen.

Für die Vergleichbarkeit der Produkte aus *in cis*- und *in trans*-Assay, musste die RNA nach der Reaktion im *in cis*-Assay vom Produkt getrennt werden. Nur dann ist es möglich, Verbindungen gleicher Konstitution miteinander zu vergleichen. Dazu wurde nach der Reaktion des Anthracens im zweisträngigen *in cis*-Assay mit N-Pentylmaleimid (1-pentyl-1*H*-pyrrol-2,5-dion) und Aufreinigung mittels HPL-Chromatographie das 11-mer-Produkt mit Phosphodiesterase I (PDE I von *crocutus adamanteus*) verdaut. Dadurch erhält man die 5'-Phosphat Nukleotide und das Diels-Alder-Produkt in gleicher Konstitution wie in der *in trans*-Reaktion (Abb. 32)¹³⁰.

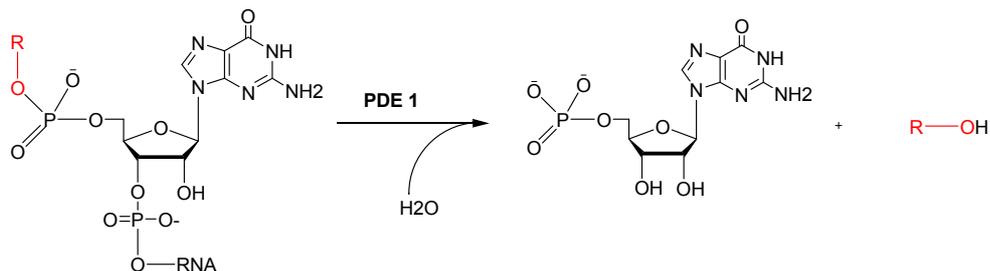


Abb. 32 Verdau von RNA durch PDE I (Phosphodiesterase I) und Freilassung des Diels-Alder-Produktes mit Linker vom 5'-Terminus (R-OH).

Damit war es möglich die Enantioselectivität der *in cis*- und der *in trans*-Reaktion zu vergleichen. Dazu wurden die Produktenantiomere nach dem Verdau der RNA und anschließender Abtrennung der Phosphodiesterase I mittels „cut off“ Filter (3000D, Microcon YM-3, Millipore), auf einer chiralen NEA (R) Säule (YMC Europe, 250 x 4.6 mm) analysiert. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Enantioselectivität abhängig ist von dem verwendeten Reaktionsformat. In der *in trans*-Reaktion bildet sich für 9-Methylhexaethylglykolanthracen und N-Pentylmaleimid das R,R-Produkt mit einem Enantiomerenüberschuß von über 90 %. In der *in cis*-Reaktion bildet sich das andere, das S,S-Produktenantiomer mit einem Enantiomerenüberschuß von 85 %. Abbildung 33 zeigt die Chromatogramme der chiralen HPLC-Analyse der jeweiligen Reaktionsprodukte. Das rote Chromatogramm zeigt die unkatalysierte Hintergrundreaktion (BG). In dieser bilden sich erwartungsgemäß beide Enantiomere zu gleichen Teilen. Das racemische Gemisch liefert zwei Peaks identischer Intensität bei einer Retentionszeit von 127 min und 136 min. Für die *in trans*-Reaktion erhält man einen ersten Elutionspeak bei 128 min mit hoher Intensität gefolgt von einem zweiten geringerer Intensität (137 min). In der *in cis*-Reaktion verhält es sich genau umgekehrt. Der erste Peak (127 min) besitzt schwache Intensität und der zweite ist der Hauptpeak bei einer Retentionszeit von 136 min. Die Zuordnung der Peaks zu R,R-Produkt (127 min) und S,S-Produkt (136 min) erfolgt aus der Kenntnis, dass das Produkt in der Kristallstruktur (*in cis*) in S,S-Konfiguration vorliegt.

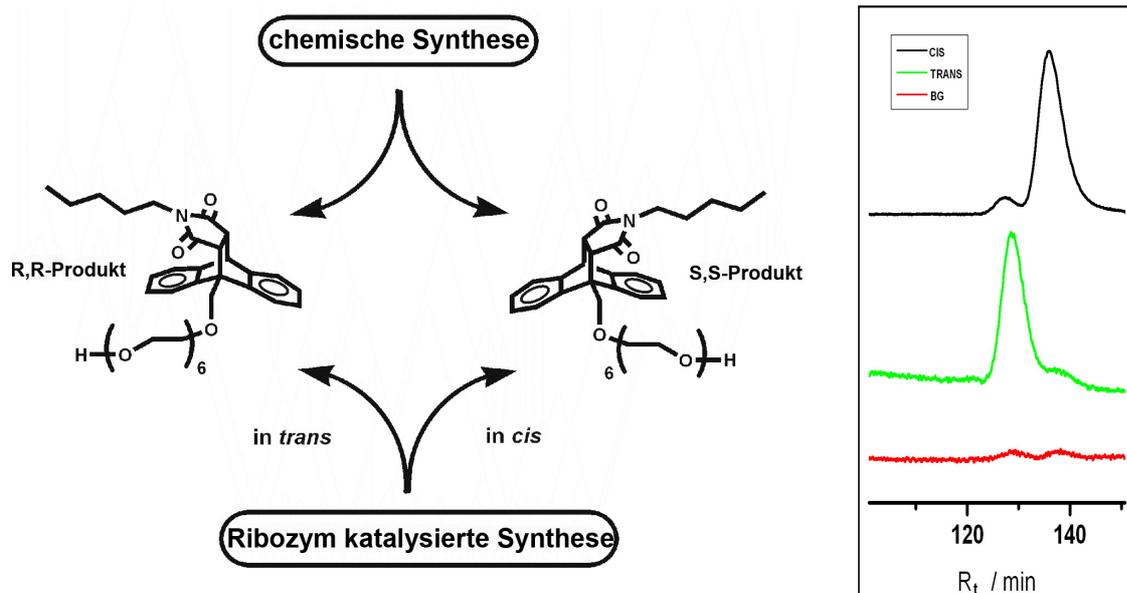


Abb. 33 *Enantioselectivität des Diels-Alder Ribozyms. Das Chromatogramm der chiralen HPLC-Analyse zeigt die Peaks für die Produktenantiomere unter verschiedenen Reaktionsbedingungen. Die chemische Reaktion liefert das racemische Gemisch beider Produktenantiomere (rot). In der in trans ribozymkatalysierten Reaktion entsteht das R,R-Produktenantiomer mit einem Enantiomerenüberschuß von 90% (grün). Eine Umkehrung der Enantioselectivität erhält man bei der in cis ribozymkatalysierten Reaktion. Der Enantiomerenüberschuß liegt in der in cis Reaktion bei 85% (schwarz).*

Damit konnte gezeigt werden, dass die Kristallstruktur die aktive Struktur darstellt und, dass die Enantioselectivität des Ribozyms abhängig ist vom verwendeten Reaktionsformat. Im Fall der ribozymkatalysierten Reaktion zwischen freien Substraten (*in trans*) wird das Anthracensubstrat ausschließlich von der „Vorderseite“ gebunden. Im Fall der linkergekoppelten Katalyse (*in cis*) wird das Produkt ausschließlich von der „Rückseite“ des Ribozyms gebunden.

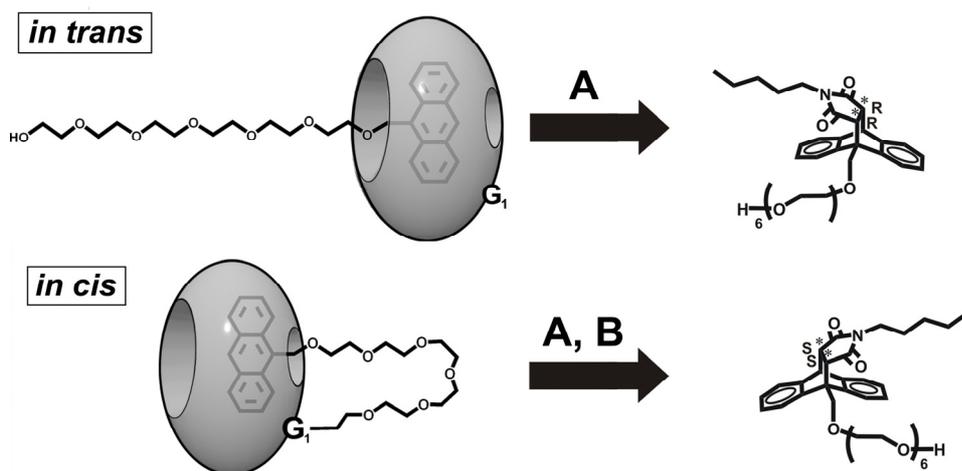


Abb. 34 Schematische Darstellung der Substratbindung und Umsetzung zum Produkt in *in cis* und *in trans* Reaktion. (A steht für Umsetzung mit N-Pentylmaleimid; B für Verdau mit PDE I)

Durch diese Ergebnisse werden weitere Fragen aufgeworfen. Was sind die Ursachen dafür, dass die freien Substrate ausschließlich von der „Vorderseite“ binden und die linkergekoppelten Substrate ausschließlich von der „Rückseite“? Für die *in cis* Reaktion könnte eine Antwort auf die Selektivität der Bindungsart in der Länge des Linkers liegen. Aus den Kristallstrukturdaten lässt sich die Distanz zwischen 5'-Terminus und der Vorderseite der Bindungstasche berechnen. Diese liegt bei 35 Å, unter Berücksichtigung, dass der Linker sich um das Rückrat herum falten muss, um zur Vorderseite zu gelangen. Der Hexaethylenglykollinker ist mit 21 Å zu kurz, um eine Bindung des Anthracens von der Vorderseite zu ermöglichen. Die Selektivität der Bindung von der Rückseite für die *in cis*-Reaktion mit Hexaethylenglykollinker könnte somit rein geometrisch bedingt sein. Es musste untersucht werden, ob eine Änderung der Länge des Ethylenglykollinkers Einfluss auf die Enantioselektivität der *in cis*-Reaktion hat.

4.5.1 Einfluss der Länge des Ethylenglykollinkers auf die Enantioselektivität

Um den Einfluss der Ethylenglykollinkerlänge auf die Enantioselektivität in der *in cis*-Reaktion zu untersuchen, mussten zunächst Ethylenglykole unterschiedlicher Länge synthetisiert werden. Während Di-, Tri-, Tetra-, Penta- und Hexaethylenglykol kommerziell erhältlich sind, müssen längere aus Kombination dieser hergestellt werden¹³¹.

Diese wurden anschließend zu den jeweiligen in 9-Position substituierten Anthracenen umgesetzt. Das daraus hergestellte Phosphoramidit wurde in der Festphasensynthese zur Synthese der 11-mer-Linker-Anthracen Konjugate eingesetzt. Auf diese Weise wurden Konjugate mit Di-, Tri-, Tetra-, Octa-, Deca- und Dodecaethylenglykollinkern hergestellt.

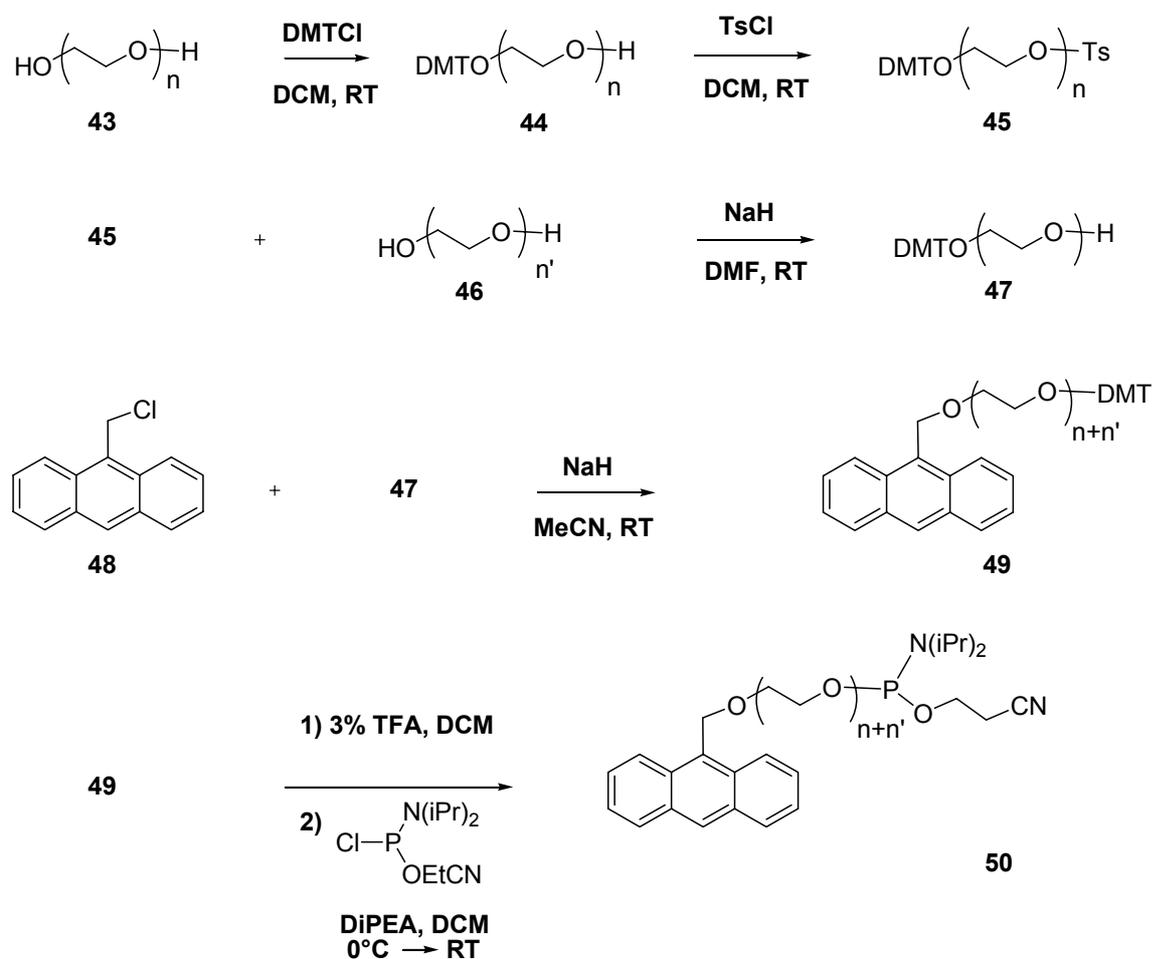


Abb. 35 Syntheschema zur Herstellung von Anthracenphosphoramiditen mit unterschiedlich langen Ethylenglykollinkerlängen. ($n = 4, 6$; $n' = 4, 6$; $n+n' = 8, 10, 12$)

Diese 11-mer-Linker-Anthracen-Konjugate wurden jeweils in der *in cis*-Reaktion eingesetzt und genau wie zuvor das Hexaethylenglykollinkerkonjugat zum Produkt umgesetzt, mit Phosphordiesterase verdaut und anschließend über chirale HPL-Chromatographie analysiert. Umsetzung, Verdau und Analyse wurden mit Ausnahme des Laufmittelverhältnisses unter identischen Bedingungen durchgeführt. Abbildung 36 zeigt die erhaltenen Chrommatogramme.

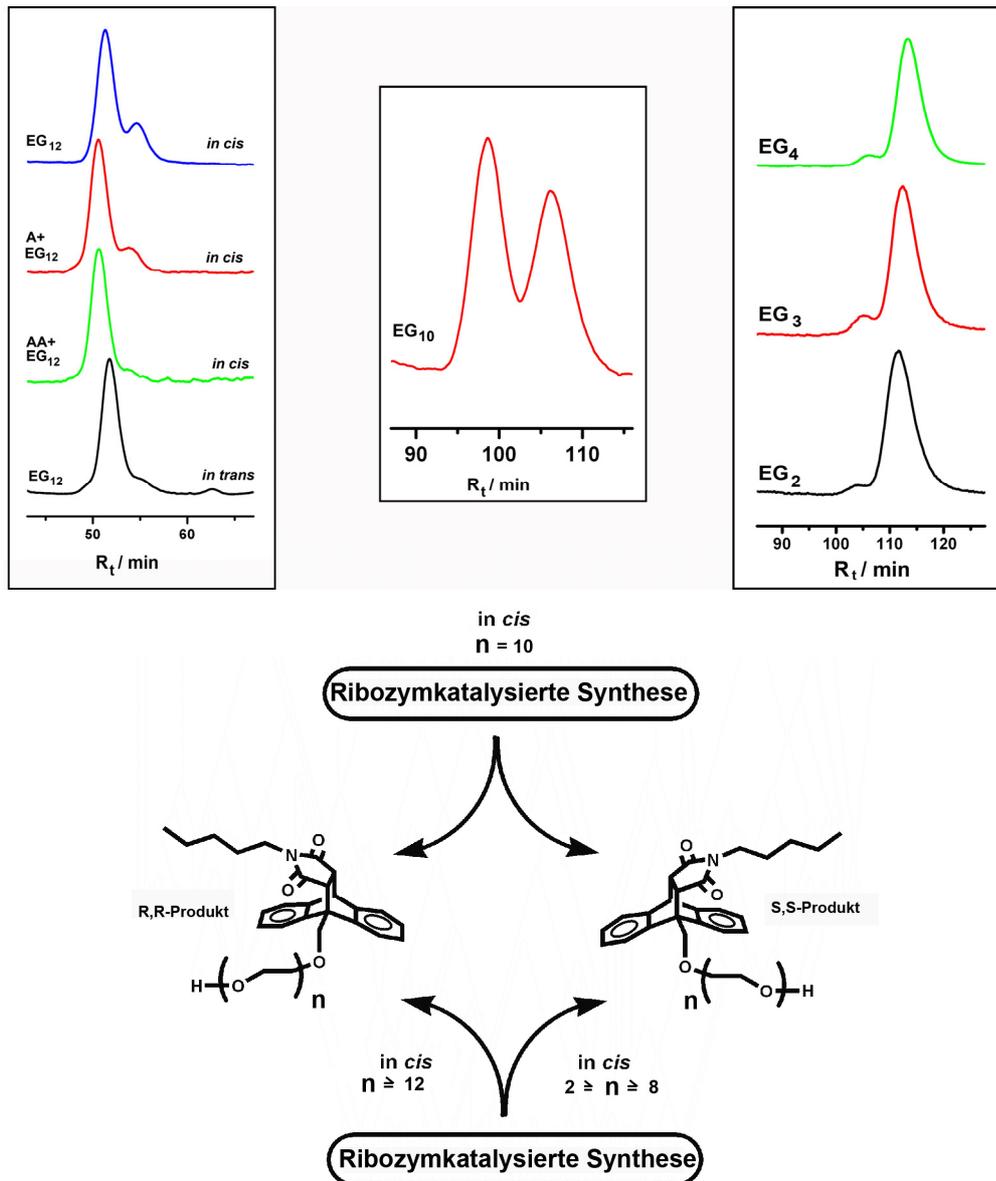


Abb. 36 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Enantioselektivität des Diels-Alder Ribozyms. Für *in cis* Ribozyme mit Ethylenglykol(EG)linker mit 2 bis 8 Ethylenglykol Einheiten erhält man Bildung des *S,S*-Produktes mit hohem Enantiomerenüberschuß (oben rechts). Mit 10 Ethylenglykoleinheiten als Linker erhält man Verlust der Enantioselektivität (oben Mitte). Bei weiterer Verlängerung des Linkers erhält man eine Umkehrung der Enantioselektivität mit Bildung des *R,R*-Produktes (oben links).

Es zeigt sich, dass Linker mit 8 Ethylenglykoleinheiten und kürzere Linker hohe Enantioselektivität bezüglich der Bildung des *S,S*-Produkts aufweisen. Dieses steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Enantioselektivitätsstudien mit Hexaethylenglykollinker. Für das Konjugat mit Decaethylenglykol als Linker erhält man einen fast vollständigen Verlust der Enantioselektivität. Für Dodecaethylenglykollinker hingegen besteht eine hohe Enantioselektivität bezüglich der Bildung des *R,R*-Produktes mit einem Enantiomerenüberschuß von 51 %. Somit erhält man nicht nur einen Verlust der Enantioselektivität bei Verlängerung des Linkers auf 10 Ethylenglykoleinheiten, sondern kehrt diese im *in cis*-Assay bei weiterer Verlängerung des Linkers gar um. Zusätzlich wurden 11-mere mit Dodecaethylenglykollinker eingesetzt, die um ein Adenosin (12-mer) und zwei Adenosine (13-mer) am 5'-Terminus verlängert sind. Beide sind ebenso wie die 11-mer Konjugate aktiv und die Enantioselektivität für diese nimmt mit der Verlängerung der 11-mer Sequenz zusätzlich zu. Die Verlängerung um ein Adenosin zeigt eine weitere Zunahme der Enantioselektivität für das *R,R*-Produkt (ee = 74 %). Mit zwei zusätzlichen Adenosinen am 5'-Terminus erhält man einen Enantiomerenüberschuß von 93 %, was vergleichbar mit dem Enantiomerenüberschuß für die *in-trans*-Reaktion mit 9-Methyl-dodecaethylenglykolanthracen ist (ee = 89 %). Abbildung 36 zeigt eine Zusammenfassung der Enantioselektivitätsstudien in einem Schema.

5 Diskussion

Das Forschungsgebiet der Ribozyme hat sich seit der Entdeckung der katalytischen RNA enorm entwickelt. Im Besonderen mit der Entwicklung der SELEX-Methode, mit der die Herstellung künstlicher RNA-Katalysatoren ermöglicht wurde, hat sich die Anzahl von Arbeiten über katalytische RNA vervielfacht. Eine Vielzahl solcher künstlicher Katalysatoren für die unterschiedlichsten Reaktionen konnten bisher entwickelt werden. Dennoch ist das Verständnis über die Funktionsweise dieser Biokatalysatoren bisher noch gering. Besonders im Hinblick auf das Potential von katalytischer RNA als Alternative zu Enzymen^{132, 133}, ist die Frage nach strukturellen und mechanistischen Aspekten der Ribozyme von enormer Bedeutung. So besteht nicht nur ein Interesse aus evolutionsbiologischer Sicht, sondern auch für die Nutzung des katalytischen Potentials von RNA für synthetische Zwecke ist die Kenntnis über Zusammenhänge zwischen räumlicher Struktur und Funktionsmechanismus des Katalysators von entscheidender Bedeutung.

Das Diels-Alder Ribozym ist mit seinen Eigenschaften ein besonders interessanter Untersuchungsgegenstand. Zum einen weist es als einziges künstlich generierte Ribozym eine *in trans* Aktivität auf und zum anderen stellt die Enantioselektivität des Ribozyms ein eindrucksvolles Beispiel für stereoselektive Eigenschaften von Nukleinsäuren dar. Dabei ist auch der Reaktionstypus der Diels-Alder Reaktion von besonderem Interesse. Auf dem Gebiet der Enzymforschung ist man aktuell bestrebt mehr über die wenigen existierenden Diels-Alder Enzyme und deren Struktur-Funktionsbeziehung zu erfahren.

5.1 Strukturelle und Mechanistische Eigenschaften des Diels-Alder Ribozyms

Das Verständnis struktureller und mechanistischer Eigenschaften ist die Grundlage zum Verständnis der Funktionsweise eines Katalysators. Um dieses Verständnis zu erlangen, müssen unterschiedliche Experimente durchgeführt werden, aus deren Auswertung ein

Gesamtbild zusammengefügt werden kann. In dieser Arbeit wurde die Durchführung von chemischer Substitutionsanalyse und Photoaffinitätsmarkierung beschrieben, sowie die Kristallstruktur des Diels-Alder Ribozyms vorgestellt, zu deren Lösung diese Arbeit beitragen konnte. Zusätzlich wurde die Enantioselektivität verschiedener Diels-Alder Ribozymkonstrukte untersucht. In der Diskussion der Ergebnisse wird versucht die Resultate zu einem Gesamtbild von Struktur und Mechanismus des Ribozyms zusammenzufügen. Ein Großteil der durchgeführten Experimente bezüglich der Substratvariationstoleranz und der Photoaffinitätsmarkierung wurden zu einem Zeitpunkt durchgeführt, zu dem keine Kristallstrukturdaten vorlagen. Die Ergebnisse dieser Experimente werden zuerst diskutiert und später mit der Kristallstruktur aufgegriffen und erneut im Kontext mit dieser behandelt.

5.1.2 Substratvariationstoleranz und Photoaffinitätsmarkierung

Untersuchungen der Substratvariationstoleranz sollen Aufschluss über die Eigenschaften einer Bindungstasche liefern. Dabei können Substrate mit besonderen elektronischen, sterischen oder polaren bzw. unpolaren Eigenschaften eingesetzt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass nicht direkt zwischen polaren, sterischen und elektronischen Ursachen für die Nichtumsetzung durch das Ribozym unterschieden werden kann.

In den durchgeführten Studien zur Substratvariationstoleranz konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Verbindungen, mit Ausnahme der in α -Position verzweigten, vom Ribozym als Substrate akzeptiert werden. Diese Restriktion der Substratstruktur war bereits zuvor bekannt und wurde hier noch zusätzlich anhand der Stereoisomere **10**, **12**, **13** und **14** belegt. Die anderen Maleimidderivate zeigen, dass die Toleranz gegenüber Modifikationen in den weiteren Positionen (β , γ , δ etc.) sehr hoch ist. Die Maleimide mit den Alkylphenylresten, Verbindungen **2** bis **6**, deuten bereits an, dass die sterische Beschränkung ausgenommen der α -Position sehr gering ist. Der planare Benzolring hat zumindest in einer Ebene einen relativ hohen sterischen Anspruch im Vergleich zu einer Alkylkette, wie sie unter Selektionsbedingungen verwendet wurde. Wird ein sterisch anspruchsvollerer Substituend als Phenyl eingesetzt, wie Naphtyl (**7**) oder gar Pyrenyl (**9**) ist die Akzeptanz durch das Ribozym schwächer, jedoch immer noch vorhanden. Das weist darauf hin, dass auch für größere aromatische Systeme in der Bin-

dungstasche ausreichend Raum vorhanden ist. Das Biphenylderivat (**8**) ist in diesem Zusammenhang besonders interessant. Durch seine Verzweigung in β -Position unterscheidet es sich insofern von den oben aufgeführten Verbindungen (**3, 4, 5, 6, 7, 9**), dass die Phenylringe sich nicht in derselben Ebene befinden. Der räumliche Anspruch dieser Verbindung unterscheidet sich damit erheblich von den anderen. Dass auch dieses Derivat ein Substrat für das Diels-Alder Ribozym ist, zeigt, dass selbst sterisch sehr anspruchsvolle hydrophobe Substrate vom Ribozym als Substrat akzeptiert werden. Die Verbindungen **10, 12, 13** und **14** mit chiralen Zentren in der α -Position sollten weiteren Aufschluss über die Variationsrestriktion in α -Position geben. Dazu wurden die beiden möglichen Stereoisomere, die mit einer zusätzlichen Methylgruppe in α -Position entstehen, für N-Benzylmaleimid (1-benzyl-1*H*-pyrrol-2,5-dion) und N-Pentylmaleimid (1-pentyl-1*H*-pyrrol-2,5-dion) hergestellt. Da die Möglichkeit besteht, dass die Stickstoffsubstituenten des N-Benzylmaleimids und N-Pentylmaleimids unterschiedlich vom Ribozym gebunden werden, wurden von beiden Verbindungen die Stereoisomere hergestellt. Keine der vier Verbindungen wird als Substrat akzeptiert. Auf die Besonderheit der α -Position soll später noch anhand der Kristallstruktur und den Ergebnissen der Photoaffinitätsmarkierung eingegangen werden.

Die untersuchten und vom Ribozym akzeptierten Substratderivate (**3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 18** und **19**) sind von hydrophobem Charakter. Dies weist auf eine Bindungstasche mit hydrophoben Eigenschaften hin. Für die Substrate, die einen Phenylring, Naphtalen oder Pyren enthalten, muss in Betracht gezogen werden, dass die Bindung durch „stacking“-Effekte mit Nukleotiden im Bereich des aktiven Zentrums stabilisiert werden kann. Unter dieser Berücksichtigung ist auch eine Aussage über die sterischen Verhältnisse in der Bindungstasche aus den Ergebnissen den Substratvariationstoleranzstudien nur bedingt möglich. Auch die Experimente mit dem Photoaffinitätssubstrat (**38**) geben einen Einblick in die Bindungskonformation des Maleimidrestes im aktiven Zentrum. Erstmals konnte die Bindungstasche über Photoaffinitätsmarkierungsexperimente genauer lokalisiert werden. Die Experimente liefern einen experimentelle Belege dafür, dass der Bulgebereich des 49-mer Sekundärmotivs an der Ausbildung einer solchen Bindungstasche beteiligt ist. Das verwendete photoreaktive Diels-Alder Produkt konnte mit dem Nukleotid U42 aus dem kürzeren Bulgestrang photoverknüpft werden. Die Strukturabhängigkeit dieser Photomarkierung konnte eindeutig über die Magnesi-

umabhängigkeit nachgewiesen werden. In der Kristallstruktur wird die wichtige Rolle dieses Bereiches für den Ausbau des aktiven Zentrums bestätigt. Die möglichen Aussagen über Bindungskonformationen der Substrate und des Photoaffinitätssubstrats werden im folgenden Kapitel noch eingehend diskutiert.

5.1.3 Die Kristallstruktur

Einen sehr detaillierten Einblick in die strukturellen Details der Bindungstasche und der gesamten Struktur liefert die Kristallstruktur. Das Diels-Alder Ribozym ist das erste künstliche Ribozym, von dem es gelang die Röntgenkristallstruktur zu lösen.

Die katalytische Bindungstasche liegt im Zentrum einer λ -förmigen, aus drei Helices und einem zusammengezogenen Bulgebereich bestehenden Gesamtstruktur des Ribozyms. Sie unterscheidet sich grundlegend von anderen bisher gelösten RNA-Strukturen. Die helikalen Bereiche grenzen direkt an die katalytische Tasche, wobei alle Basen der nichthelikalen Bereiche, mit Ausnahme von G24, in strukturelevante Interaktionen involviert sind. Dadurch entsteht eine sehr kompakte Struktur, die man als verschlungene Pseudoknoten bezeichnen kann.

Die Kristallstruktur zeigt eine hydrophobe Bindungstasche, die eine perfekte Formkompatibilität zum Diels-Alder Produkt aufzeigt. Aus dem Vergleich der Kristallstrukturen des „freien“ Ribozyms und des Ribozym-Produkt Komplexes lässt sich ableiten, dass die katalytische Tasche auch in Abwesenheit des Produktes ausgebildet ist. Dadurch lässt sich auf eine preformierte Bindungstasche schließen, was in Kontrast zum bisherigen Wissen über adaptive Erkennung in Liganden-RNA-Komplexen ist^{134, 135}. Die Ausbildung einer preformierten Bindungstasche in Abwesenheit von Substraten oder Produkt ist auch in Übereinstimmung mit Probing-Experimenten und ersten NMR-Studien⁷⁵.

In der Kristallstruktur mit kokristallisiertem Diels-Alder Produkt aus Anthracen und N-Pentylmaleimid ist deutlich zu sehen, dass die Struktur einen hydrophoben Kanal beinhaltet, in welchem der Pentylrest des Maleimids gebunden ist (Abb. 37).

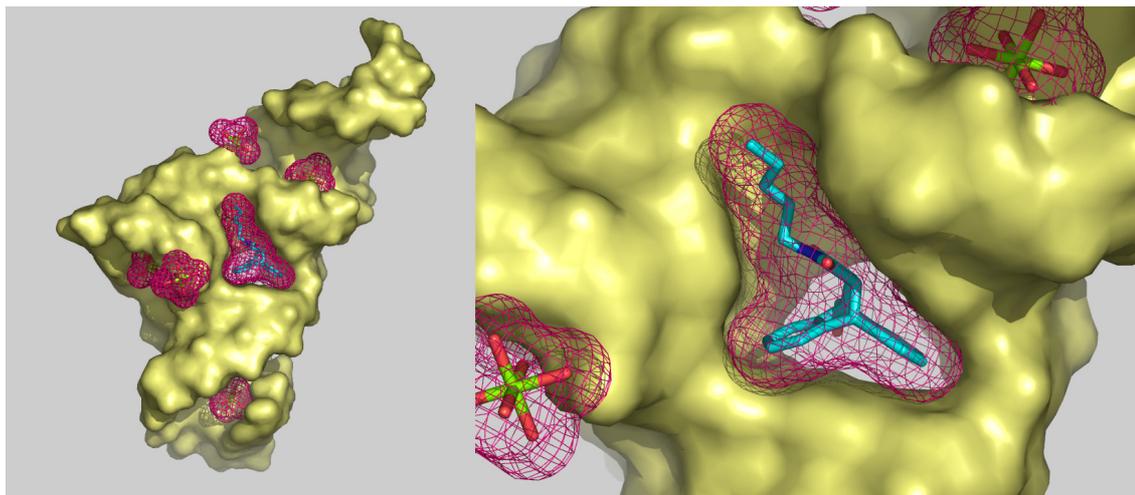


Abb. 37 Struktur des 49-mer Ribozym-Produkt-Komplexes in einer „Surface“-Darstellung (links). Struktur der Bindungstasche mit gebundenem Produkt des Ribozym-Produkt-Komplexes (rechts). Produkt und hydratisierte Magnesiumionen sind in einer „Stick“- und „Mesh“-Darstellung abgebildet.

Diese Struktur unterscheidet sich nur geringfügig von der Kristallstruktur mit cokrystallisiertem Diels-Alder Produkt aus Anthracen und N-*para*-Bromobenzylmaleimid (Abb. 28). Besonders interessant ist der Vergleich dieser Kristallstruktur mit dem Ergebnis aus dem Photoaffinitätsmarkierungsexperiment. Die dabei eingesetzten Ribozym-Konstrukte unterscheiden sich lediglich im Substituenten in *para*-Position des Benzylrestes. Während sich in der Kristallstruktur der Bromsubstituent in *para*-Position befindet, ist im Photoaffinitätsexperiment die Azidofunktion als photoreaktive Gruppe in dieser Position. In Abbildung 38 ist die Kristallstruktur des Ribozyms mit dem Photoaffinitätsprodukt dargestellt. Dabei wurde das Photoaffinitätsprodukt so in die Struktur eingepasst, wie das mit Brom substituierte Produkt aus dem Ribozym-Produkt-Komplex im Kristall vorliegt. Durch Rotationen um die Bindung zwischen dem Stickstoff- und dem α -Kohlenstoffatom lässt sich eine Konformation darstellen, die eine Verknüpfung des photoaktiven Produktes mit dem Nukleotid U42 erklärt.

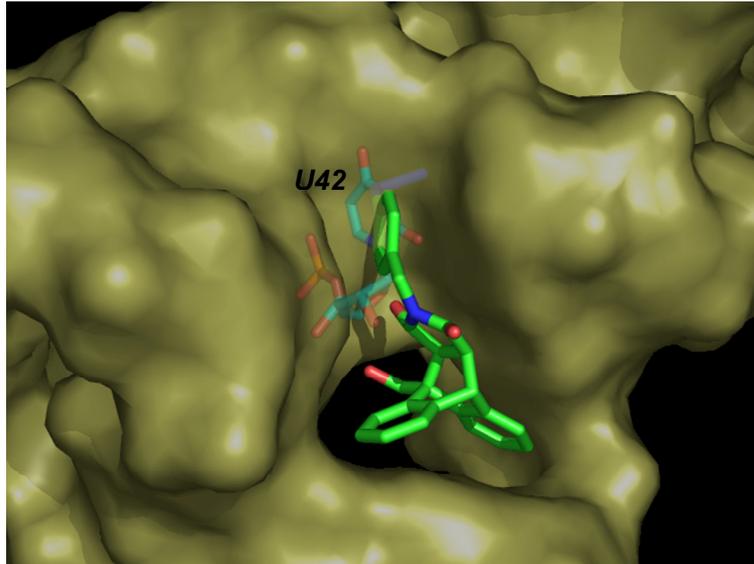


Abb. 38 *Photoreaktives Produkt, eingepasst in die Ribozym-Produkt-Struktur. Die Darstellung zeigt die nötige Konformation zur Photomarkierung der Base U42. Aktives Zentrum in einer „Surface“-Darstellung.*

Photoaffinitätsexperimente werden in Lösung durchgeführt, während Röntgenstrukturanalyse lediglich die strukturellen Verhältnisse im kristallinen Zustand darlegen kann. Häufig ist der Informationsgewinn aus der Röntgenstrukturanalyse enorm im Vergleich zu anderen Methoden zur Strukturuntersuchung. Jedoch muss stets bedacht werden, dass Experimente in Lösung immer „näher“ an der wirklich aktiven Struktur sind.

Die Ergebnisse aus der Photoaffinitätsmarkierung zeigen, dass alternative Konformationen des gebundenen Produktes zu der im Kristall vorliegenden möglich sind. Vorstellbar wäre, dass unterschiedliche Bindungsmodi für unterschiedliche Substrate existieren. So kann die in Abbildung 39 dargestellte Konformation für das Photoaffinitätsprodukt durchaus in Betracht gezogen werden als eine mögliche Konformation des Produktes im gebundenen Zustand. Eine zusätzliche Stabilisierung der Bindung in dieser Konformation wäre durch „stacking“-Wechselwirkungen zwischen den Basen G24 und C25 vorstellbar¹³⁶.

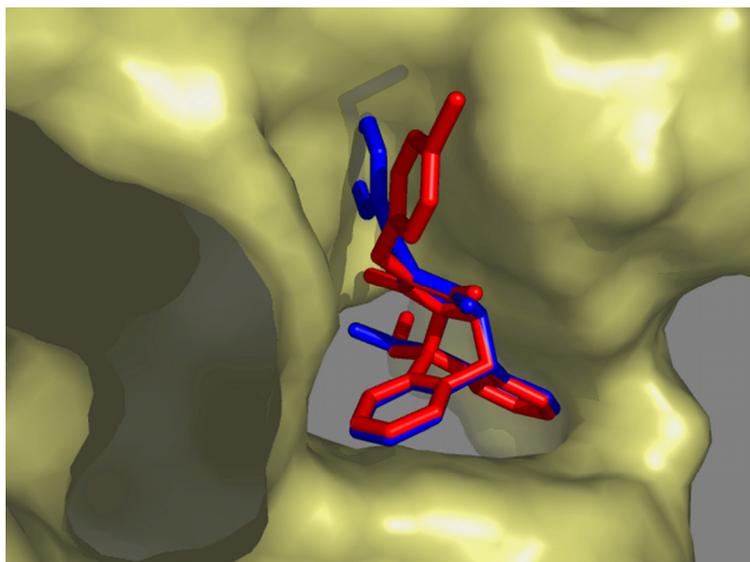


Abb. 39 *Vergleich der Produktkonformation des gebundenen Brombenzylderivats und der postulierten Konformation des Photomarkierungsproduktes. Aktives Zentrum in einer „Surface“-Darstellung wiedergegeben.*

Für das Verständnis der Substratbindung und dessen Konformation ist es wichtig, ausgehend von der Produktbindung, auch eine Überlegung zu ES-Komplex (Enzym-Substrat-Komplex) sowie zu einem Übergangszustand anzustellen. Bisherige Ergebnisse zeigen, dass das Ribozym die Substrate in einer definiert orientierten Position in der katalytischen Bindungstasche bindet. Dabei kann der Ablauf der Reaktion durch den Verlust an Rotations- und Translationsfreiheitsgrade erleichtert werden. Das Anthracen wird durch „stacking“-Wechselwirkungen zwischen G2 und A3-U45 (orange) gebunden. Das Maleimid muss, um die für die [4+2]-Cycloaddition nötige LUMO-HOMO-Orbitalwechselwirkung zu ermöglichen^{57, 137}, parallel planar in einem Abstand von ~ 3.5 Å auf dem Anthracen „stacken“¹³⁸. Der Pentylrest des Maleimids wird in einem hydrophoben Kanal gebunden, womit durch die orientierende Bindung des Maleimids eine wichtige Voraussetzung für Enantioselektivität geschaffen ist (Abb.XX). Der Übergangszustand wurde unter Berücksichtigung bekannter Daten ähnlicher Reaktanden^{138, 139} mit Hilfe der Software MOPAC kalkuliert¹⁴⁰. Zwei neue Einfachbindungen sind teilweise ausgebildet mit einer Bindungslänge von $\sim 2,2$ Å. Das Anthracenringsystem ist aus seiner planaren Ebene gebogen in einem Winkel von 154° . Dabei zeigt der Übergangszustand nahezu perfekte Formkomplementarität mit der Form der Bindungstasche. Dies lässt durchaus darauf schließen, dass die Beschleunigung der Reaktion mitunter

durch eine Übergangszustandstabilisation erreicht wird. Inwiefern elektronische Effekte durch Wasserstoffbrückenbindungen an der Stabilisierung beteiligt sind lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht detailliert beantworten. Während aus der Kristallstruktur eine Interaktion zwischen dem Carbonylsauerstoff und der 2'OH-Gruppe von U42 (gelb) sowie der exocyclischen Aminogruppe von G24 (grün) postuliert wurde, konnten diese nicht in chemischen Experimenten belegt werden¹⁴¹. Auch für das Anthracen könnten elektronische Effekte eine Rolle spielen. Das „stacking“ zwischen A3 und G45 kann zu einer Erhöhung der Elektronendichte des Diens führen, wodurch die HOMO-Energie angehoben wird. Dies führt zu einer Beschleunigung der Reaktion. Es scheint, dass die ribozymbasierte Katalyse der Diels-Alder Reaktion ein Zusammenspiel aus verschiedenen Effekten ist. Ein Effekt, der mit Sicherheit eine wichtige Rolle für die Beschleunigung der Diels-Alder-Reaktion durch das Diels-Alder Ribozym spielt, ist der „proximity“-Effekt. Das Zueinanderbringen der Substrate im aktiven Zentrum wird hierbei durch die Hydrophobizität der Bindungstasche erreicht. Hinzu kommt die hohe Formkomplementarität und der damit verbundene „proximity“-Effekt zur Stabilisierung des Übergangszustandes. Ebenso sind energetische Effekte mit Einfluss auf Elektronendichteverteilung in den Substraten vorstellbar. Ein anderer möglicher katalytischer Anteil könnte in der Destabilisierung des Anthracensubstrates liegen. Solche Substrat-„strain“-Effekte sind im Besonderen für „stacking“-Wechselwirkungen bekannt⁶³. Es ist offensichtlich, dass zwischen diesen Effekten keine scharfe Grenze gezogen werden kann, und die Diels-Alder Ribozymkatalyse nicht auf einen der genannten Effekte reduziert werden kann. Somit ist das Diels-Alder Ribozym auch ein Beispiel dafür, dass RNA-Katalyse sich ein ähnlich komplexes Wechselspiel von Effekten zu nutze macht, wie es von Enzymen bekannt ist.

Die Betrachtung des ES-Komplexes ist auch für die Substratakzeptanz eine hilfreiche Darstellung. Hier erkennt man deutlich die sterische Beschränkung der α -Position, was für den Übergangszustands- und Produkt-Komplex nicht so eindeutig erscheint. Das deutet darauf hin, dass die α -substituierten Maleimide nicht in der Lage sind den notwendigen ES-Komplex mit dem Ribozym auszubilden, was für die Umsetzung notwendig ist. Auch das sterisch bedingte Verbot für Substituenten an der Doppelbindung erklärt sich deutlich über die Struktur der Bindungstasche.

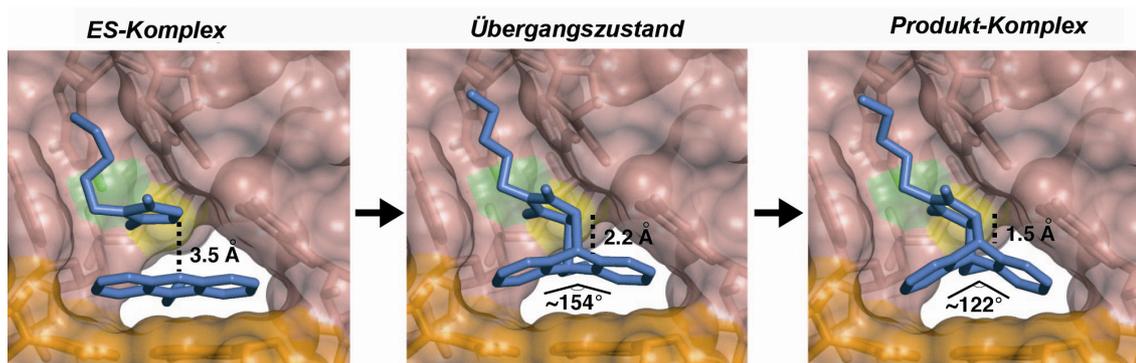


Abb. 40 Vorgeschlagenes Modell für den katalytischen Mechanismus des Diels Alder Ribozyms. Enzym-Substrat Komplex und Übergangszustand wurden manuell in der Bindungstasche positioniert. Der Übergangszustand wurde berechnet mit dem Programm MOPAC¹⁴⁰. Die Kristallstruktur des Ribozym-Produkt-Komplexes wurde als Grundlage für das Modell verwendet.

5.1.4 Enantioselektivität

Die [4+2] Cycloaddition zwischen Anthracen und Maleimid ist eine Reaktion mit normalem Elektronenbedarf. Es gelten die Woodward-Hoffmann-Regeln für pericyclische Reaktionen⁵⁶. Diels-Alder Reaktionen können bei der Knüpfung von zwei neuen C-C-Bindungen bis zu 4 neue Stereozentren ausbilden. In den hier untersuchten Reaktionen können zwei Enantiomere entstehen. In der chemischen Synthese des Diels-Alder-Produktes entstehen diese zu gleichem Anteil. Es entsteht ein racemisches Gemisch. In bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Ribozym diese Reaktion enantioselektiv beschleunigt. Diese enantioselektive Eigenschaft des Ribozyms liegt in seiner Struktur begründet. Die Bindungstasche lässt bezüglich der Bindung des Maleimids nur eine Orientierung zu. Um tatsächlich die Reaktion enantioselektiv zu beschleunigen, muss jedoch auch das Anthracen bevorzugt in einer von zwei möglichen Orientierungen gebunden werden⁷⁷. Diese Orientierung des Anthracens findet statt, doch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Orientierung abhängig von dem verwendeten Reaktionsformat ist. So zeigt in der *in trans*-Reaktion das Anthracen eine bevorzugte Bindung in einer „Head-first“-Orientierung, was zu einer enantioselektiven Formation des *R,R*-Stereoisomers führt. In der *in cis*-Reaktion wird das Anthracen je-

doch in der umgekehrten Orientierung, der „Tail-first“-Orientierung gebunden, was zu der bevorzugten Bildung des *S,S*-Stereoisomer führt.

Für die *in trans*-Reaktion war ein vorläufiges Modell postuliert worden⁷⁷ (Abb. 41). Es beinhaltet die Annahme einer vorgeformten Bindungstasche, die man aufgrund von Probingexperimenten und ersten NMR-Studien vermutete⁷⁵. Eine Head-first-Orientierung wird hier durch den sterischen Anspruch des Anthracensubstituenten bevorzugt. Mit zunehmender Größe des Substituenten nimmt in der *in trans*-Reaktion die Enantioselektivität des Ribozyms zu, was durch das Modell erklärt werden kann.

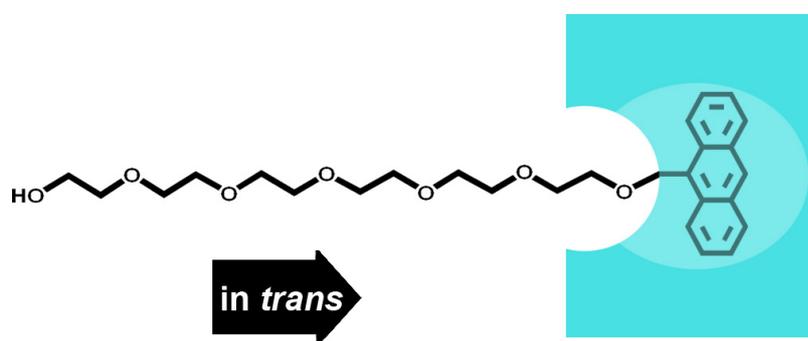


Abb. 41 Erstes Modell zur Erklärung der Enantioselektivität des *in trans* Ribozyms.

Nach den Enantioselektivitätsuntersuchungen in der *in cis*-Reaktion musste dieses Modell renoviert werden, um die neuen Ergebnisse mit einem Modell vereinbaren zu können. Das neue Modell beinhaltet ein aktives Zentrum, dass von der Vorder- und Hinterseite zugänglich ist.

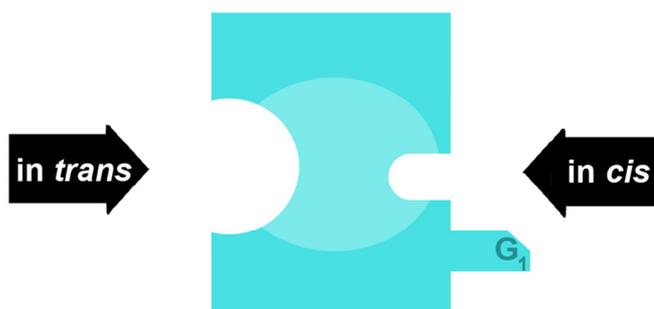


Abb. 42 Erweitertes Modell: Abhängigkeit der Bindungsorientierung vom Reaktionsformat als Erklärung der gegensätzlichen Enantioselektivität des *in trans* - und *in cis* Ribozyms.

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die jeweiligen Zugänge zum aktiven Zentrum nur in dem jeweiligen Reaktionsformat zugänglich sind, was in Abbildung 42 durch die Pfeile angedeutet ist. Auf der „Rückseite“ des Ribozyms ist der 5'-Terminus in Form des G1 Nukleotids dargestellt. Es besteht die Frage warum der *in trans* Bindungsweg nicht für das über einen Linker am 5'-Terminus gebundenen Substrat zugänglich ist. Die einfachste Erklärung dafür ist, dass die Distanz von ~ 35 Å zwischen der Vorderseite des Ribozyms und dem 5'-Terminus für kürzere Linker zu groß ist, um die Bindung des Substrats zu ermöglichen. Die Selektivität der *in cis*-Reaktion kann zurückgeführt werden auf die Länge des Hexaethylglykollinkers, der ausschließlich eine Bindung von der Rückseite zulässt. Dies konnte bewiesen werden durch die Verwendung unterschiedlicher Linkerlängen. Es konnte demonstriert werden, dass die Verwendung eines Decaethylglykollinkers zu einem fast vollständigen Verlust der Enantioselektivität führt. Mit einer Länge von $\sim 3,5$ Å pro Ethylglykoleinheit ermöglicht er die Bindung des Anthracens von der „Vorderseite“. Für das *in cis* System mit Decaethylglykol sind die beiden Bindungswege gleichermaßen möglich. Bei Verwendung eines Dodecaethylglykollinkers wird gar die Bindung von der „Vorderseite“ der Bindung von der „Rückseite“ stark bevorzugt. Man erhält bevorzugt die gleiche Orientierung des Anthracensubstrates in der Bindungstasche, wie für die *in trans*-Reaktion. In Abbildung 43 ist eine schematische Zusammenfassung der *in trans*- und *in cis*-Bindungspräferenzen.

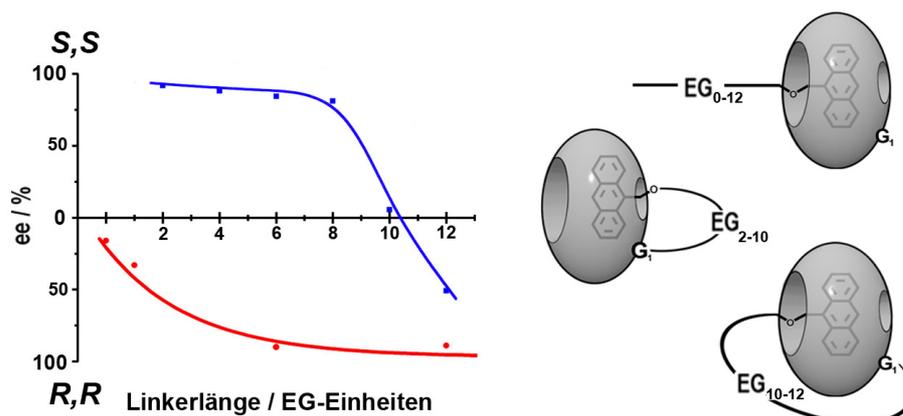


Abb. 43 Darstellung der Abhängigkeit der Enantioselektivität von der Länge des Ethylglykollinkers für das *in trans* (rot) und *in cis* (blau) Ribozym (links). Schematische Darstellung der bevorzugten Substratbindung bei unterschiedlichen Linkerlängen (rechts).

Die Enantioselektivität steht direkt im Zusammenhang mit der Orientierung des Anthracens in der Bindungstasche. Die Orientierung wiederum wird festgelegt durch die Richtung von der das Anthracen gebunden wird. Die katalytische Bindungstasche ist auf zwei unterschiedlichen Wegen zugänglich. Die „Vorderseite“ ist zugänglich für „freie“ Substrate in *in trans* Reaktion und für über Ethylenglykollinker von 10 Ethylenglykoleinheiten und länger kovalent gebundene Substrate in *in cis*-Ribozymkonstrukten. Die „Rückseite“ hingegen ist ausschließlich zugänglich für Substrate in *in cis*-Ribozymkonstrukten mit Ethylenglykollinker von 10 Ethylenglykoleinheiten und kürzer.

Das enantioselektive Verhalten kann wie folgt zusammengefasst werden:

- In der *in trans* Reaktion bindet das Dien in die Bindungstasche mit der sterisch weniger anspruchsvollen Seite von der „Vorderseite“ (weite der Vordertür: ~ 10 Å), was in der Bildung des R,R-Stereoisomers resultiert^{76,77}.
- In der *in cis* Reaktion mit kurzem Linker, gelangt das Dien durch eine kleine Hintertür (weiteste Dimension ~ 6 Å) von der „Rückseite“ in die Bindungstasche, was in der Bildung des S,S-Stereoisomers resultiert. Der Mechanismus, nach dem das Anthracen (kürzeste mögliche Linkerlänge ~ 7) durch die schmale Öffnung in die Bindungstasche gelangt, ist bisher noch weitgehend ungeklärt; man kann vermuten, dass dynamisches Öffnen und Schließen der tertiären Basenpaarungen die Hintertür erweitert und den Bindungsvorgang erleichtert¹⁴².
- Besitzt der Ethylenglykollinker ausreichende Länge (mindeste Linkerlänge ~ 35 Å), kann er um das Ribozym herum die Bindung wie in der *in trans*-Reaktion von der „Vorderseite“ ermöglichen. Es ist bekannt aus Studien mit Rezeptor-Ligandenpaaren, dass selbst nahezu vollständig gestreckte Linkerkonformationen zu erfolgreichen Bindungsereignissen führen können¹⁴³.

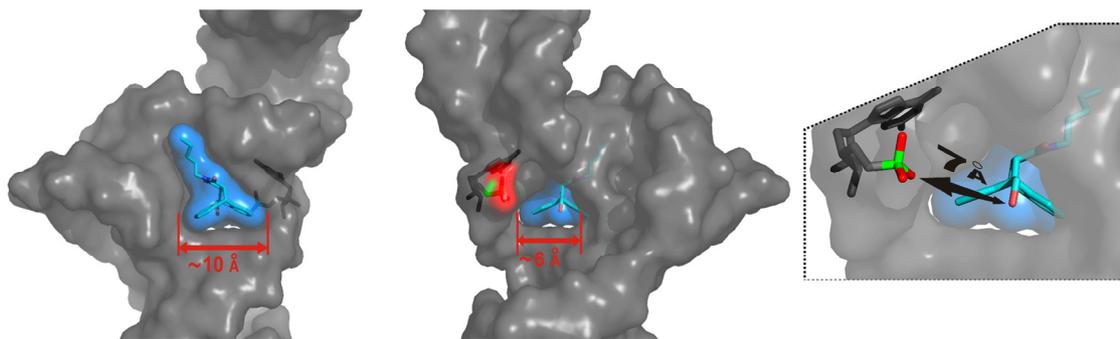


Abb. 44 „Surface“-Darstellung des Diels-Alder Ribozyms von der „Vorderseite“ (links) und der „Rückseite“ (Mitte) mit Angaben zur Dimension der „Vordertür“ und der „Hintertür“. Vergrößerung der Rückseitenansicht mit Hintertür (rechts) und Angabe der Distanz zwischen 5'-Terminus-Phosphat und Produktenantiomer in der Bindungstasche (7Å).

Die besonderen enantioselektiven Eigenschaften des Diels-Alder Ribozyms berühren auch die prinzipielle Frage nach den natürlichen Konzepten Enantioselektivität in Biokatalysatoren zu erzeugen.

Die Fähigkeit von Proteinen zwischen zwei Enantiomeren zu unterscheiden ist eines der wichtigsten Konzepte in lebenden Systemen¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Protein-Substrat Wechselwirkungen in enzymatischen, neurologischen und immunologischen Systemen stehen häufig im Zusammenhang mit einem hohen Grad von Stereoselektivität gegenüber den Substraten. Seit der Entdeckung der stereochemischen Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat durch Emil Fischer¹⁴⁸ wurden eine Reihe von Modellen entwickelt, die die strukturellen Notwendigkeiten für enantioselektive Erkennung zu erklären versuchen. Das gegenwärtig gängigste Modell, zu finden in den meisten aktuellen Lehrbüchern, ist das 3-Punkt-Modell (TPA – „three-point attachment“) nach Ogston¹⁴⁶. In diesem Modell binden drei Gruppen (A, B und C) eines Enantiomers, auf der Proteinoberfläche an den spezifischen Stellen A', B' und C'. Wie Abbildung 45 zeigt ist es nicht möglich das spiegelbildliche Enantiomer auf der gleichen Oberfläche erfolgreich zu binden. Dabei ist zu bemerken, dass zusätzlich zu solchen „attachment points“, resultierend aus bindenden Wechselwirkungen, sterische und andere nichtbindende oder gar abstoßende Wechselwirkungen zu enantioselektiver Erkennung beitragen können. Unter dieser Be-

trachtung erfüllt die Proteinoberfläche im 3-Punkt Modell eine wichtige Voraussetzung für Stereoselektivität, da es die Bindung von nur einer Seite zulässt^{149, 150}.

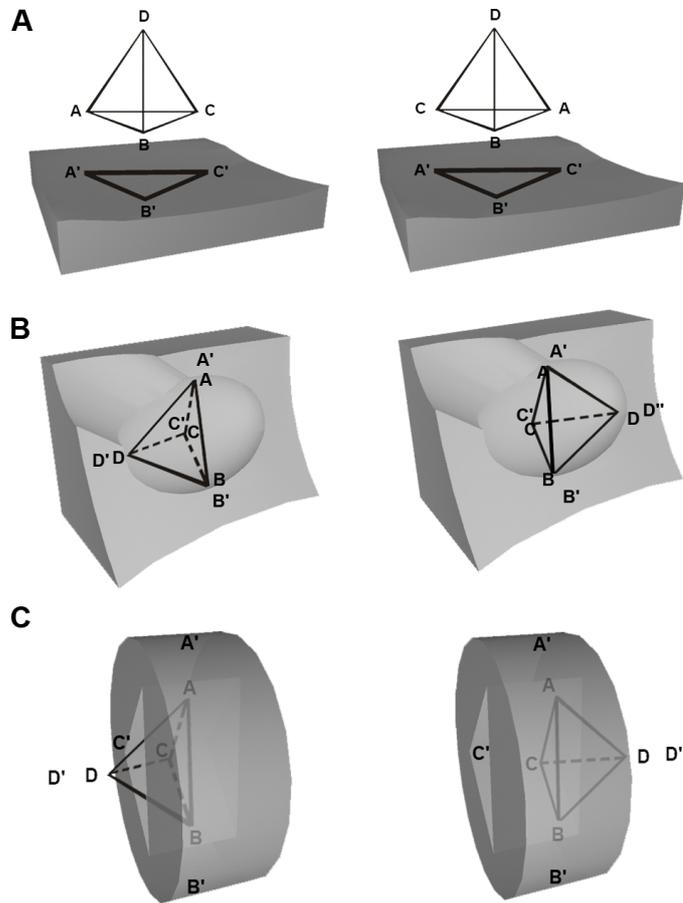


Abb. 45 Modelle zur enantioselektiven Erkennung von Liganden durch Proteine. **(A)** Das 3-Punkt-Modell nach Ogston. Das linke Bild zeigt einen chiralen Liganden, der mit den Gruppen A, B und C über die „attachment“-Punkte A', B' und C' auf der Proteinoberfläche gebunden ist. Das rechte Bild zeigt die enantiomere Konfiguration des Liganden, dessen Gruppen A, B und C nicht mehr mit A', B' und C' zugleich in Wechselwirkung treten können. **(B)** 4-Punkt-Modell von Mesecar und Koshland. In einem Proteinhohlraum existieren zwei Möglichkeiten für Bindung durch einen zusätzlichen „attachment“-Punkt D' bzw. D''. Die Bevorzugung einer der beiden Bindungsmöglichkeiten (links, D'; rechts, D'') führt zu Enantioselektivität. **(C)** 4-Punkt-Modell für ein ringförmiges aktives Zentrum mit Zugang von beiden Seiten. Bindungsrichtung von Richtung D' führt zur Bindung des einen Enantiomers (links) und Bindungsrichtung D'' zur Bindung des spiegelbildlichen Enantiomer (rechts). Kontrolle der Bindungsrichtung führt zu Enantioselektivität.

Mesecar und Koshland präsentierten 2000 ein erweitertes Modell^{151, 152}. Dieses so genannte 4-Punkt Modell basiert auf der Notwendigkeit von vier Wechselwirkungspunkten. Dies konnten sie am Beispiel der Bindung von Isocitrat durch das Enzym IDH (Isocitratdehydrogenase) demonstrieren. Das Enzym hat die besondere Eigenschaft, dass das Apoenzym in Abwesenheit von Magnesiumionen das inaktive L-Enantiomer bindet, während das Enzym mit Magnesiumionen selektiv das physiologisch aktive D-Enantiomer bindet. Sie konnten zeigen, dass das im aktiven Zentrum koordinierte Magnesiumion neben drei bereits existierenden „attachment points“ als vierte Bindungsstelle in der Bindungstasche fungiert (D’). Daraus resultierte die Notwendigkeit der Einführung eines 4 Punkt Modells, um die Stereoselektivität der Isocitratdehydrogenase zu erklären. Dabei ist anzumerken, dass diese vierte Bindungsstelle eben nicht notwendigerweise ein „attachment point“ sein muss. Eben so gut kann es sich dabei um eine Festlegung der Orientierung handeln. Das Diels-Alder Ribozym ist dafür ein ideales Beispiel. Während die Bindungstasche die Punkte A’, B’ und C’ festlegt, wird die Enantioselektivität durch die Orientierung (D’ oder D’’) des Substrats bestimmt (Abb. XXc). Diese kann unter bestimmten Bedingungen vom Ribozym kontrolliert werden. Man kann für das Diels-Alder Ribozym von einem 3-Punkt-1-Orientierung Modell sprechen.

5.2 Vergleich mit anderen Diels-Alderasen

Aus katalytisch mechanistischem Gesichtspunkt ist es interessant, das Diels-Alder Ribozym und seine strukturellen und mechanistischen Eigenschaften mit anderen bekannten Diels-Alderasen zu vergleichen. Seit geraumer Zeit besteht ein größeres Interesse an der Identifizierung natürlicher Diels-Alderase Enzyme und der Charakterisierung derer katalytischen Eigenschaften. Nur wenige Enzyme aus der Natur sind bis heute als Diels-Alderasen identifiziert worden und nur von einer, der Makrophomatsynthase ist es bisher gelungen eine Kristallstruktur zu erhalten. Während von den wenigen bekannten Diels-Alderase Enzymen mechanistisch und zum Grossteil auch strukturell sehr wenig bekannt ist, kennt man von den katalytischen Antikörpern für die Diels-Alder¹⁵³⁻¹⁵⁵ bzw. Retro-Diels-Alder⁷¹ Reaktion weitgehend die strukturellen Details. Verschiedene dieser katalytischen Antikörper sind mit Produkt oder Übergangszustandsanalogon kristalli-

siert worden. Gemeinsam ist auch diesen Strukturen eine hydrophobe Bindungstasche, an deren Aufbau meist Phenylalanin-, Tyrosin-, Valin- und Tryptophanaminosäurereste beteiligt sind. Genau wie für das Diels-Alder Ribozym besitzt diese Bindungstasche eine hohe Formkompatibilität zum entsprechenden Übergangszustandsanalogon. In allen Fällen ist jeweils einer der Reaktanden über „stacking“-Wechselwirkungen, meist über einen Tryptophanrest, gebunden. Der Antikörper 1E9 hat ebenso ein Maleimid als Substrat, welches über „ π -stacking“-Interaktion mit Tryptophan positioniert ist. Zusätzlich ist der Carbonylsauerstoff über eine Wasserstoffbrückenbindung gebunden, was durch den elektronenziehenden Effekt auch zur Reaktionsbeschleunigung beiträgt^{69, 153}. Ähnliches findet man in der Struktur des 39-11 Diels-Alderase Antikörpers, der auch ein Maleimid als Substrat hat¹⁵⁴. Der Antikörper für die Retro-Diels-Alder Reaktion 10F11 ist der einzige der wie das Diels-Alder Ribozym ein Anthracensubstrat als Dien aufweist. Interessanterweise ist die Form seiner hydrophoben Bindungstasche der des Diels-Alder Ribozyms relativ ähnlich (Abb. 46). Auch in dieser Bindungstasche wird das Anthracen über „stacking“-Wechselwirkungen durch den Tryptophanrest gebunden, ähnlich wie im Ribozym über das A3.

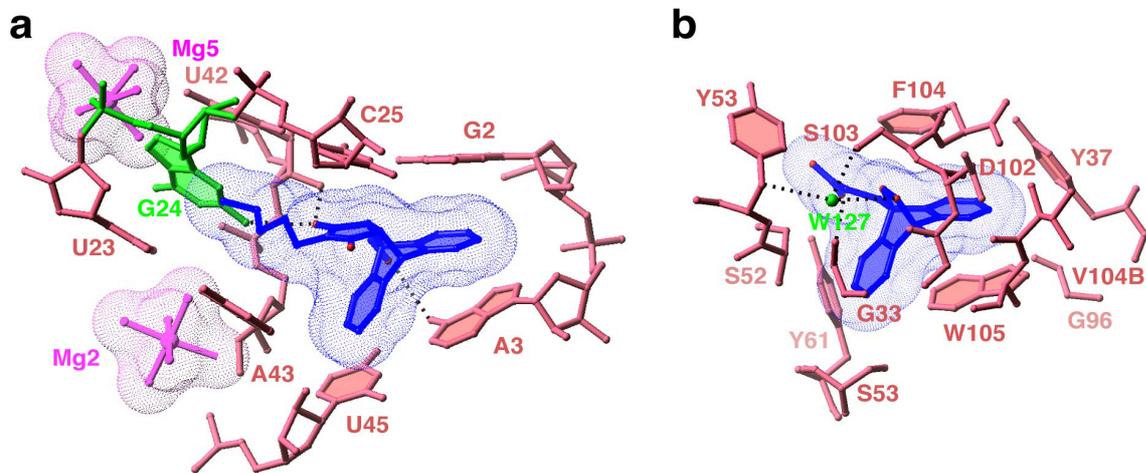


Abb. 46 Vergleich der aktiven Zentren von Diels-Alder Ribozym und eines katalytischen Antikörpers für die Diels-Alder Reaktion. **(a)** Katalytische Bindungstasche des Ribozym-Produkt Komplexes. **(b)** Katalytische Bindungstasche des Retro-Diels-Alder Reaktion katalysierenden Antikörper 10F11⁷¹.

Auch das bisher einzige strukturaufgeklärte Diels-Alder Enzym, die Makrophomatsynthase weist in der Kristallstruktur eine hydrophobe Bindungstasche auf⁶⁷. In diesem Enzym liegt jedoch im Gegensatz zum Ribozym ein Magnesiumkation direkt im aktiven Zentrum vor und koordiniert mit dem Carbonylsauerstoff des Dienophils. Man vermutet, dass diese strukturelle Besonderheit einen Lewis Säure ähnlichen Effekt mit sich bringt. Damit unterscheidet sich das mechanistische Konzept von dem des Ribozyms, zumal auch „stacking“-Wechselwirkungen im Enzym eine geringere Rolle zu spielen scheinen. Genauso ist das Diels-Alder Ribozym von Tarasow et al. angewiesen auf die Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen für die katalytische Aktivität⁷³. Auch hier scheint ein prinzipiell anderer katalytischer Mechanismus vorzuliegen. Für das Diels-Alder Ribozym ist die Beteiligung von Magnesium- oder anderen zweiwertigen Ionen am katalytischen Mechanismus auszuschließen. In der Kristallstruktur zeigt sich, dass keine Magnesiumionen in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums koordiniert. Ebenso findet sich keine Phosphatgruppe des Phosphatrückrats im Bereich des aktiven Zentrums. Die Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen an der Bindung der Substrate oder am katalytischen Mechanismus, wie sie für einige katalytische Antikörper beschrieben wird, ist für das Diels-Alder Ribozym bisher nicht zu belegen. Zwar lassen sich aus der Kristallstruktur einige Wasserstoffbrückenbindungen, wie z.B. zwischen dem Carbonylsauerstoff und der 2'-Hydroxylgruppe des U42-Zuckers postulieren, doch ließen diese sich bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht direkt belegen.

Ein Untersuchung von Kim *et. al.*, in dem das Diels-Alder Ribozym mit 6 weiteren katalytischen Diels-Alderase Antikörpern auf der Basis der katalytischen Konstanten verglichen wurden, zeigte sich eine sehr ähnliche „catalytic performance“ der einzelnen Katalysatoren als Diels-Alderasen. Die offensichtliche Ähnlichkeit des Diels-Alder Ribozyms mit dem Konzept der katalytischen Antikörper lässt vermuten, dass ähnliche strukturelle und mechanistische Konzepte für durch Makromoleküle vermittelte Katalyse der Diels-Alder Reaktion zugrunde liegen.

5.3 Vergleich mit anderen Ribozymstrukturen

Seit ihrer Entdeckung in den frühen 80er Jahren sind mehr und mehr Erkenntnisse über katalytische RNA gewonnen worden. Ähnlich wie für Enzyme gilt es, die wiederkehrenden strukturellen Motive und die damit verbundenen funktionellen Möglichkeiten zu erkennen. Dieses Verständnis der Funktions-Struktur-Zusammenhänge ist nicht nur für die Erforschung der Ribozyme von Bedeutung. Heute ist man weitgehend davon überzeugt, dass RNA noch weit mehr funktionelle Eigenschaften als die weitgehend bekannten Eigenschaften von mRNA, tRNA und rRNA besitzt. Neben den katalytischen Eigenschaften hat sich in letzter Zeit eine Vielzahl regulatorischer Eigenschaften auf der Basis von RNA offenbart, bei denen insbesondere die strukturellen Eigenschaften eine wichtige Rolle spielen^{24, 25, 156-158}. Im Fall des Diels-Alder Ribozyms können insbesondere die strukturellen Besonderheiten eines künstlichen Ribozyms, auch im Vergleich zu anderen Ribozymen, das Verständnis der strukturellen motivischen Vielfalt erweitern. Das Hammerhead Ribozym basiert ebenfalls auf einer aus drei Helices aufgebauten Struktur, die jedoch Y-förmig zueinander angeordnet sind¹¹⁸. Das Varkud-Satellit Ribozym hingegen baut sein aktives Zentrum mittels zweier „two-way junctions“ auf¹⁵⁹. Das Diels-Alder Ribozym weist hierbei also Ähnlichkeiten auf, doch ist die Komplexität der Struktur durch den entstehenden verschlungenen Pseudoknoten größer. Das Strukturmotiv des Pseudoknotens ist häufiger in RNA-Strukturen zu finden. Häufig sind Pseudoknotenstrukturen von Bedeutung für die Funktionalität einer RNA. So findet man beispielsweise Pseudoknotenstrukturen in Telomerase-RNA, wobei aktuelle Untersuchungen zeigen konnten, dass diese strukturelle Besonderheit der RNA ein wichtiger Aspekt für die Erkennung durch die Telomerasen ist¹⁶⁰. Eine so genannte doppelte Pseudoknotenstruktur weist das Hepatitis Delta Virus Ribozym auf (HDV)¹²¹. Trotz der Unterschiede in der Art des Pseudoknotens und des katalysierten Reaktionstyps haben das HDV-Ribozym und das Diels-Alder Ribozym bemerkenswerte Gemeinsamkeiten. Beide Ribozyme weisen Preorganisation eines aktiven Zentrums auf, und beide zeigen bedingt durch die Pseudoknotenstruktur eine starke Verschlungenheit, was zu einer sehr dichten und stabilen dreidimensionalen Architektur führt. Es ist bemerkenswert, dass das HDV- wie das Diels-Alder Ribozym (zwei der schnellsten katalytischen Ribozyme), beide Architekturen mit verschlungenen Pseudoknotenstrukturen besitzen.

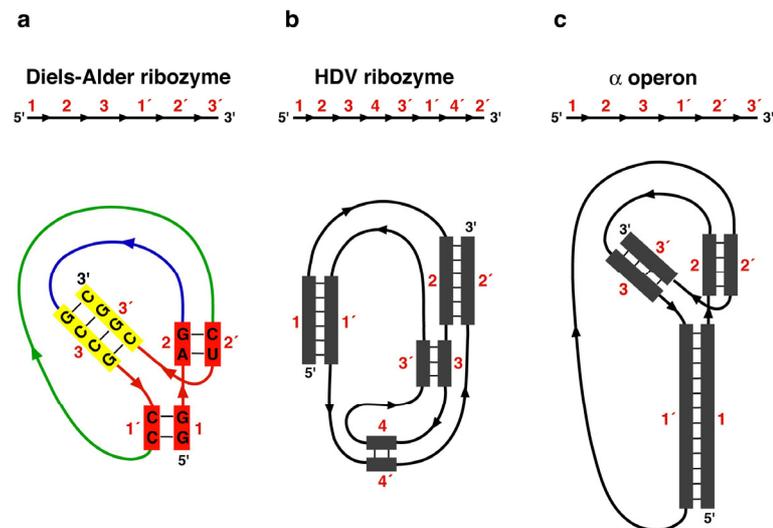


Abb. 47 Schematische Darstellung von unterschiedlichen RNA Pseudoknoten Architekturen. (a) Das Diels-Alder Ribozym mit einer 1-2-3-1'-2'-3'- Topologie (Farbschema entspricht dem des Sekundärmotivs). (b) Das HDV-Ribozym mit einer 1-2-3-4-3'-1'-4'-2'-3'-Topologie. (c) Die regulatorische Region des *E. coli* α -Operons mit einer dem Diels-Alder Ribozym identischen 1-2-3-1'-2'-3'-Topologie. Nur die für den Pseudoknoten relevanten Bereiche sind als Doppelstrang dargestellt.

Eine identische Form eines verschlungenen Pseudoknotens, wie für das Diels-Alder Ribozym, findet sich auch im regulatorischen Bereich des *Escherichia coli* α -Operons, welches für die spezifische Erkennung und Bindung durch das ribosomale Protein S4 eine wichtige Rolle spielt¹⁶¹. Dies zeigt, dass die in der Diels-Alder Ribozymstruktur vorliegende Architektur ein RNA-Strukturmotiv enthält, welches auch über die Ribozymkatalyse hinaus Bedeutung haben kann, jedoch in einem biologisch anderen Kontext¹⁶².

Das Diels-Alder Ribozym gewährt einen weiteren Einblick in die katalytischen Strategien der Ribozyme. Es zeigt, dass auch in der Beschleunigung chemischer Reaktionen durch RNA Katalysatoren eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren eine Rolle spielen. Trotz seiner, im Vergleich zu Enzymen begrenzten Anzahl unterschiedlicher funktioneller Gruppen, spielen wie für enzymatische Katalyse, „proximity“-Effekte und Stabilisierung des Übergangszustands eine entscheidende Rolle¹⁶³. Eine Besonderheit der Diels-Alder Reaktion ist die notwendige Positionierung der Substrate, um eine reaktive

coplanare Anordnung zu gewährleisten. Hierbei scheinen „ π -stacking“-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle zu spielen. Diese „ π -stacking“-Wechselwirkungen können häufig „strain“-Effekte zur Destabilisierung des Substrats ermöglichen. Die Bildung des ES-Komplexes kann das planare Anthracen durch „stacking“ auf A3-U45 aus seiner Planarität verzerren. Damit ist die Bildung des weiter stabilisierten Übergangszustandes und der Ablauf der Diels-Alder Reaktion energetisch begünstigt^{63, 164}. Es ist offensichtlich, dass zwischen diesen Effekten keine scharfe Grenze gezogen werden kann, und die Diels-Alder Ribozymkatalyse nicht auf einen der genannten Effekte reduziert werden kann. Somit ist das Diels-Alder Ribozym auch ein Beispiel dafür, dass RNA-Katalyse sich ein ähnlich komplexes Wechselspiel von Effekten zu nutze macht, wie es von Enzymen bekannt ist. Auch wenn eine endgültige Beurteilung des katalytischen Potentials von RNA nicht vorgenommen werden kann, so ist das Diels-Alder Ribozym ein interessantes Beispiel, nicht nur für Ribozymkatalyse, sondern auch für Katalyse unter allgemeinen Gesichtspunkten.

6 Zusammenfassung

Das Forschungsgebiet der katalytischen RNA hat sich seit der Entdeckung der natürlichen Ribozyme stark weiterentwickelt. Neben der Erforschung der natürlichen Ribozyme hat sich mit der SELEX-Technik (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, künstliche Ribozyme herzustellen. Damit gelang es, die Bandbreite der durch Ribozyme katalysierbare Reaktionen enorm zu erweitern. Unter anderem konnte ein künstlicher RNA Katalysator generiert werden, der eine C-C-Bindungsknüpfung in einer [4+2]-Cycloaddition, eine sogenannten Diels-Alder Reaktion, katalysiert. Dieser künstliche RNA-Katalysator beschleunigt die Reaktion zwischen Anthracen- und Maleimidderivaten als erstes künstliches Ribozym in einer echten enzymatischen Katalyse. Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Aufklärung von Struktur und Mechanismus dieses Diels-Alder Ribozyms.

Mit der Synthese verschiedener Maleimidderivate und der Untersuchung derer Substrateigenschaften für das Diels-Alder Ribozym konnte die räumliche Struktur und Beschaffenheit des aktiven Zentrums charakterisiert werden. Die Synthese von photoreaktiven Maleimidsubstraten, und der Einsatz dieser in Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten erlaubten eine erstmalige genaue Lokalisierung des aktiven Zentrums des Ribozyms. Mit der Herstellung schweratommodifizierter Ribozym-Produkt-Konstrukte für die Lösung des Phasenproblems, konnte ein Beitrag zur Lösung der Kristallstruktur geleistet werden. Die Kristallstrukturen des Ribozym-Produkt-Komplexes und des „freien“ Ribozyms zeigten sich in guter Übereinstimmung mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen aus Substratvariationstoleranzuntersuchungen und Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten. Aus dem Kontext dieser Ergebnisse konnte ein konkretes Bild der Struktur-Funktionsbeziehung des Diels-Alder Ribozyms entworfen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die RNA eine λ -förmige verschlungene Pseudoknoten Struktur mit einer vorgeformten Bindungstasche besitzt. Diese Struktur ermöglicht die Katalyse über „proximity“-Effekte im aktiven Zentrum und durch Stabilisierung des Übergangszustandes. In Untersuchungen der Enantioselektivität des Ribozyms konnte eine Abhängigkeit der Enantioselektivität vom verwendeten Reaktionsformat gezeigt werden. In der intramolekularen Katalyse (*in cis*-Format) erhält man eine genau umgekehrte Enantioselektivität zu der in intermolekularer Katalyse (*in trans*-Format) erhaltenen Enantioselektivität. Zur Erklärung dieser außergewöhnlichen stereoselektiven Eigenschaft wurde ein kontrollierter Zugang zum aktiven Zentrum durch eine „Vordertür“ oder eine „Hintertür“ postuliert. Die Existenz eines solchen kontrollierten „Hintertürzugangs“ zum aktiven Zentrum konnte in weiteren Untersuchungen zur Enantioselektivität unter Verwendung unterschiedlicher Ethylenglykollinkerlängen in der intramolekularen Katalyse (*in cis*-Format) untermauert werden. Auf der Basis dieser Ergebnisse konnte ein Modell zur stereoselektiven Erkennung erstellt werden, welches als „3-Punkt-1-Orientierung“ Modell bezeichnet werden kann.

7 Summary

Since its discovery twenty years ago, the research field of catalytic ribonucleic acids has developed rapidly. Apart the investigation of naturally occurring ribozymes, the development of the SELEX method made it possible to generate artificial ribozymes with custom made properties. It has been demonstrated that nucleic acids can catalyze a broad range of chemical reactions.

Ribozymes from a combinatorial RNA library have previously been isolated that catalyze the formation of carbon-carbon bonds by the Diels-Alder reaction, a [4+2] cycloaddition. This Diels-Alder Ribozyme is able to accelerate the reaction of an aromatic diene (anthracene) with a dienophile (maleimide) in aqueous solution. The goal of this work was to shed light on the structural and mechanistic properties of this Diels-Alder Ribozyme. Therefore various maleimid derivatives were synthesized and tested as substrates for the Diels-Alder Ribozyme. From these results the spatial structure and functional features of the active site could be characterized. Synthesized photoreactive substrates were used in photoaffinity crosslinking experiments to localize the active site of the Ribozyme. With the preparation of heavy atom modified Ribozyme-product complexes this work could contribute to the solution of the Diels-Alder ribozyme crystal structure. It could be shown that the RNA adopts a λ -shaped nested pseudoknot architecture whose preformed binding pocket is precisely complementary in shape to the reaction product. The obtained X-ray structures of the ribozyme-product complex and the “free”-ribozyme are in agreement with the structural investigations of substrate acceptance and photoaffinity experiments presented in this work. From the combination of structural data and biochemical experiments a picture was drawn of the structure-function relationship for Ribozyme catalyzed Diels-Alder reactions. It could be shown that catalysis is apparently achieved by a combination of proximity and complementarity to a proposed transition state.

This work also presents extensive studies on the stereoselectivity of the Diels-Alder ribozyme. Experiments could show that the enantioselectivity of the Diels Alder Ribozyme depends on the ribozym's reaction format. Intriguingly the intramolecular catalysis (*in cis*-format) led predominantly to the formation of the *S,S*-enantiomer product, whereas the product of the intermolecular catalysis (*in trans*-format) was found to yield in the opposite *R,R*-configuration. This experimental observation led to the postulation of a “front door” and a “back door” entrance to the active site. The hypothesis of a restricted “back door” access was supported by experiments including tethers of varying length. On the basis of these results an improved model for stereoselective recognition, namely a “3-point-1-direction” model was proposed.

8 Anhang

Abkürzungen und Einheiten

A	Adenosin
Å	Ångstrom
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
BTT	5-Benzylmercaptotetrazol
c	Konzentration
C	Cytidin
Ci	Curie, 1Ci = 37 MBq
cpm	Zählimpulse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CPG	Controlled Pore Glass
CTP	Cytidintriphosphat
DCC	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Ethylenglykol
ES-Komplex	Enzym-Substrat-Komplex
ee	enantiomeric excess
equiv.	equivalente
EtOH	Ethanol
FMO	Frontier Molecular Orbital
g	Gramm
G	Guanosin
GMP, GTP	Guanosinmonophosphat, -triphosphat
h	Stunde
HEG	Hexaethylenglycol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HDV	Hepatitis Delta Virus
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IDH	Isocitratdehydrogenase

l	Liter
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
λ	Wellenlänge
μ	Mikro (10^{-6})
m	Meter, Milli (10^{-3})
M	mol/l, molar
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
n	Nano (10^{-9})
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimidylester
NTP	Nucleosidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDE	Phosphodiesterase
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
t	Zeit
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
T	Thymin
TEA	Triethylamin
TEAAc	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
TsCl	Tosylchlorid
TPA-Modell	Three Point Attachment-Modell
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Units, Uridin
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
w/v	<i>weight per volume</i>
Xln	Photoaffinitätsvernetzungsprodukt

Reagenzien für Oligonukleotidsynthese

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

Enzyme

T4-RNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-Polynucleotidkinase	MBI Fermentas
T7-RNA-Polymerase	Stratagene
RNase T1	Industrial Research Ltd.
PDE I	Sigma

Geräte

DNA/RNA Synthesizer	Expedite 8909 Applied Biosystems
Elektrophoresekammern	S2, Gibco-BRL, Eigenbau für PAGE
Expositionskassetten	Kodak X-Omatic
Filter cut off 3000 MW	Microcon YM-3, Millipore
Fluoreszenzspektrometer	BioLogic, Jasco FP 6500
Fluoreszenzküvette	Quarzglas SUPRASIL, HELLMA
Geldokumentationsanlage	Alphaimager 2200, Alphainnotec
HPLC-Anlage	Agilent Technologies, Serie 1100
HPLC-Säulen	Ultrasphere ODS C ₁₈ , 5 µm, 250x4.6 mm, Beckman
	Luna 80 C ₁₈ , 5µm, 250x4.6 mm, Phenomenex
HPLC-Radioflowdetektor	Berthold LB 509
Ölpumpe	Heraeus, DS1
pH-Meter	Knick, Calimatic 761
Phosphorimager	Typhoon 9400, Molecular Dynamics
Pipetten	Abimed P2, P20, P200, P1000
Reaktionsgefäße, silikonisiert	Biozym
Reinstwasseranlage	Milli-Q, Millipore
Rotationsverdampfer	Büchi, Rotavapor R
Röntgenfilme	Fuji, Medical X-ray Film RXOG (Safety)
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein
Spannungsgeber	Pharmacia, ECPS 3000/150 und 500/400
Sterilfiltrationsanlage	Schleicher & Schuell; Steriflip Millipore
Szintillationszähler	Beckman LS 6500
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer 5436
UV-Küvetten	Quarzglas SUPRASIL, HELLMA
UV-Lampe 254 nm	Benda NU-8 KL
UV-Lampe 302 nm	Alphainnotec
UV-Spektrometer	Varian Cary 50, Varian Cary 100
Vakuumentrifuge	Savant, Speed Vac Concentrator
Waagen	Mettler AE 163 und AC 88; Sartorius
Wasserbäder	Thermo Haake; Heidolph HBR 2
Zentrifugen	Hettich Mikro 120, Eppendorf 5804R

Koordinaten der Kristallstruktur

Die Koordinaten für die Kristallstruktur sind zugänglich in der Protein Data Bank (PDB) unter folgenden Zugangscodes:

Diels-Alder Ribozym-Produkt (Selenmodifikation und A27G Substitution)	1YLS
Diels-Alder Ribozym-Produkt (unmodifiziert)	1YKV
„Freies“ Ribozym	1YKQ

Die Grafiken wurden mit folgenden Programmen erstellt:

Ribbon (<http://sgce.cbse.uab.edu/ribbons/>)

PyMOL (DeLano Scientific; <http://pymol.sourceforge.net/>)

Publikationen

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

Serganov, Alexander; Keiper, Sonja; Malinina, Lucy; Tereshko, Valentina; Skripkin, Eugene; Höbartner, Claudia; Polonskaia, Anna; Phan, Anh Tuân; **Wombacher, Richard**; Micura, Ronald; Dauter, Zbigniew; Jäschke, Andres; Patel, Dinshaw J., Structural basis for Diels-Alder ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, 12, (3), 218-24.

Kurschat, Wolfram C.; Müller, Julius; **Wombacher, Richard**; Helm, Mark, Optimizing splinted ligation of highly structured small RNA's, *RNA, im Druck*.

Wombacher, Richard; Keiper, Sonja; Suhm, Sandra; Serganov, Alexander; Patel, Dinshaw J.; Jäschke, Andres, Control of stereoselectivity in an enzymatic reaction by back-door access, *eingereicht*.

Poster

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

Jäschke, Andres, Serganov, Alexander; Keiper, Sonja; Malinina, Lucy; Tereshko, Valentina; Skripkin, Eugene; Höbartner, Claudia; Polonskaia, Anna; Phan, Anh Tuân; **Wombacher, Richard**; Micura, Ronald; Dauter, Zbigniew and Patel, Dinshaw J., Structural basis for Diels-Alder ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation. Heidelberg Forum of Molecular Catalysis, Heidelberg, 2005.

Vorträge

Wombacher, Richard: “Inversion of stereoselectivity in ribozyme-catalyzed Diels-Alder reactions.” 10th Annual meeting of the RNA society, Banff, Canada, 24.-29. Mai 2005.

Wombacher, Richard; “A Diels-Alder Ribozyme”, EMBO Practical Course: “Transient Kinetics Applied to Biological Macromolecules”, Department of Bioscience, University of Kent at Canterbury, UK; 23.-29. Juni 2002.

9 Literatur

1. Bartel, D. P.; Unrau, P. J., Constructing an RNA world. *Trends Cell Biol* **1999**, 9, (12), M9-M13.
2. Gilbert, W., Origin of life - the RNA world. *Nature (London, United Kingdom)* **1986**, 319, 618.
3. Cech, T. R.; Zaug, A. J.; Grabowski, P. J., In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **1981**, 27, (3 Pt 2), 487-96.
4. Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E.; Cech, T. R., Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **1982**, 31, (1), 147-57.
5. Guerrier-Takada, C.; Altman, S., Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro. *Science* **1984**, 223, (4633), 285-6.
6. Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S., The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **1983**, 35, (3 Pt 2), 849-57.
7. Ferat, J. L.; Michel, F., Group II self-splicing introns in bacteria. *Nature* **1993**, 364, (6435), 358-61.
8. Michel, F.; Ferat, J. L., Structure and activities of group II introns. *Annu Rev Biochem* **1995**, 64, 435-61.
9. Buzayan, J. M.; Gerlach, W. L.; Bruening, G., Nonenzymic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature (London, United Kingdom)* **1986**, 323, (6086), 349-53.
10. Prody, G. A.; Bakos, J. T.; Buzayan, J. M.; Schneider, I. R.; Bruening, G., Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science (Washington, DC, United States)* **1986**, 231, (4745), 1577-80.
11. Been, M. D., Cis- and trans-acting ribozymes from a human pathogen, hepatitis delta virus. *Trends Biochem Sci* **1994**, 19, (6), 251-6.

12. Kuo, M. Y.; Sharmeen, L.; Dinter-Gottlieb, G.; Taylor, J., Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol* **1988**, 62, (12), 4439-44.
13. Sharmeen, L.; Kuo, M. Y.; Dinter-Gottlieb, G.; Taylor, J., Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. *J Virol* **1988**, 62, (8), 2674-9.
14. Feldstein, P. A.; Buzayan, J. M.; van Tol, H.; deBear, J.; Gough, G. R.; Gilham, P. T.; Bruening, G., Specific association between an endoribonucleolytic sequence from a satellite RNA and a substrate analogue containing a 2'-5' phosphodiester. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, 87, (7), 2623-7.
15. Guo, H. C.; Collins, R. A., Efficient trans-cleavage of a stem-loop RNA substrate by a ribozyme derived from neurospora VS RNA. *Embo J* **1995**, 14, (2), 368-76.
16. Batey, R. T.; Rambo, R. P.; Doudna, J. A., Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding. *Angew Chem Int Ed Engl* **1999**, 38, (16), 2326-2343.
17. Lilley, D. M. J., Structure, folding and catalysis of the small nucleolytic ribozymes. *Current Opinion in Structural Biology* **1999**, 9, (3), 330-338.
18. Westhof, E.; Fritsch, V., RNA folding: beyond Watson-crick pairs. *Structure (London)* **2000**, 8, (3), R55-R65.
19. Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Capel, M.; Moore, P. B.; Steitz, T. A., Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* **1999**, 400, (6747), 841-7.
20. Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P. B.; Steitz, T. A., The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **2000**, 289, (5481), 905-20.
21. Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B.; Steitz, T. A., The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **2000**, 289, (5481), 920-30.
22. Leontis, N. B.; Stombaugh, J.; Westhof, E., The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res* **2002**, 30, (16), 3497-531.
23. Werstuck, G.; Green, M. R., Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science* **1998**, 282, (5387), 296-8.
24. Winkler, W.; Nahvi, A.; Breaker, R. R., Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **2002**, 419, (6910), 952-6.

25. Winkler, W. C.; Nahvi, A.; Roth, A.; Collins, J. A.; Breaker, R. R., Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* **2004**, 428, (6980), 281-6.
26. Tuerk, C.; Gold, L., Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **1990**, 249, (4968), 505-10.
27. Ellington, A. D.; Szostak, J. W., In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, 346, (6287), 818-22.
28. Tarasow, T. M.; Eaton, B. E., The Diels-Alder reaction and biopolymer catalysis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **1999**, 55, (11), 1463-1472.
29. Seelig, B.; Jäschke, A., A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity. *Chem Biol* **1999**, 6, (3), 167-76.
30. Fusz, S.; Eisenführ, A.; Srivatsan, S. G.; Heckel, A.; Famulok, M., A ribozyme for the aldol reaction. *Chem Biol* **2005**, 12, (8), 941-50.
31. Wiegand, T. W.; Janssen, R. C.; Eaton, B. E., Selection of RNA amide synthases. *Chem Biol* **1997**, 4, (9), 675-83.
32. Zhang, B.; Cech, T. R., Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes. *Nature* **1997**, 390, (6655), 96-100.
33. Baskerville, S.; Bartel, D. P., A ribozyme that ligates RNA to protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, (14), 9154-9.
34. Unrau, P. J.; Bartel, D. P., RNA-catalysed nucleotide synthesis. *Nature* **1998**, 395, (6699), 260-3.
35. Chapple, K. E.; Bartel, D. P.; Unrau, P. J., Combinatorial minimization and secondary structure determination of a nucleotide synthase ribozyme. *Rna* **2003**, 9, (10), 1208-20.
36. Sengle, G.; Eisenführ, A.; Arora, P. S.; Nowick, J. S.; Famulok, M., Novel RNA catalysts for the Michael reaction. *Chem Biol* **2001**, 8, (5), 459-73.
37. Jadhav, V. R.; Yarus, M., Acyl-CoAs from coenzyme ribozymes. *Biochemistry* **2002**, 41, (3), 723-9.
38. Illangasekare, M.; Sanchez, G.; Nickles, T.; Yarus, M., Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science* **1995**, 267, (5198), 643-7.

39. Illangasekare, M.; Yarus, M., A tiny RNA that catalyzes both aminoacyl-RNA and peptidyl-RNA synthesis. *Rna* **1999**, 5, (11), 1482-9.
40. Lohse, P. A.; Szostak, J. W., Ribozyme-catalysed amino-acid transfer reactions. *Nature* **1996**, 381, (6581), 442-4.
41. Jenne, A.; Famulok, M., A novel ribozyme with ester transferase activity. *Chem Biol* **1998**, 5, (1), 23-34.
42. Chun, S.-M.; Jeong, S.; Kim, J.-M.; Chong, B.-O.; Park, Y.-K.; Park, H.; Yu, J., Cholesterol Esterase Activity by in Vitro Selection of RNA against a Phosphate Transition-State Analogue. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, (46), 10844-10845.
43. Li, Y.; Breaker, R. R., Phosphorylating DNA with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, (6), 2746-51.
44. Li, Y.; Liu, Y.; Breaker, R. R., Capping DNA with DNA. *Biochemistry* **2000**, 39, (11), 3106-14.
45. Ekland, E. H.; Szostak, J. W.; Bartel, D. P., Structurally complex and highly active RNA ligases derived from random RNA sequences. *Science* **1995**, 269, (5222), 364-70.
46. Johnston, W. K.; Unrau, P. J.; Lawrence, M. S.; Glasner, M. E.; Bartel, D. P., RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **2001**, 292, (5520), 1319-25.
47. McGinness, K. E.; Joyce, G. F., RNA-catalyzed RNA ligation on an external RNA template. *Chem Biol* **2002**, 9, (3), 297-307.
48. Rogers, J.; Joyce, G. F., A ribozyme that lacks cytidine. *Nature* **1999**, 402, (6759), 323-5.
49. Conn, M. M.; Prudent, J. R.; Schultz, P. G., Porphyrin Metalation Catalyzed by a Small RNA Molecule. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, (29), 7012-7013.
50. Tsukiji, S.; Pattnaik, S. B.; Suga, H., An alcohol dehydrogenase ribozyme. *Nat Struct Biol* **2003**, 10, (9), 713-7.
51. Tsukiji, S.; Pattnaik, S. B.; Suga, H., Reduction of an aldehyde by a NADH/Zn²⁺-dependent redox active ribozyme. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, (16), 5044-5.

52. Diels, O.; Alder, K., Syntheses in the hydroaromatic series. I. Addition of "diene" hydrocarbons. *Ann.* **1928**, 460, 98-122.
53. Corey, E. J., Catalytic enantioselective Diels-Alder reactions: Methods, mechanistic fundamentals, pathways, and applications. *Angewandte Chemie, International Edition* **2002**, 41, (10), 1650-1667.
54. Corey, E. J.; Guzman-Perez, A., The catalytic enantioselective construction of molecules with quaternary carbon stereocenters. *Angewandte Chemie, International Edition* **1998**, 37, (4), 389-401.
55. Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Montagnon, T.; Vassilikogiannakis, G., The Diels-Alder reaction in total synthesis. *Angewandte Chemie, International Edition* **2002**, 41, (10), 1668-1698.
56. Woodward, R. B.; Hoffmann, R., Stereochemistry of electrocyclic reactions. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, 87, (2), 395-7.
57. Sauer, J.; Sustmann, R., Mechanistic aspects of the Diels-Alder reaction: a critical review. *Angewandte Chemie* **1980**, 92, (10), 773-801.
58. Yates, P.; Eaton, P., Acceleration of the Diels-Alder Reaction by Aluminium Chloride. *J. Am. Chem Soc.* **1960**, 82, 4436-4437.
59. Kang, J.; Rebek, J., Jr., Acceleration of a Diels-Alder reaction by a self-assembled molecular capsule. *Nature* **1997**, 385, (6611), 50-2.
60. Rebek, J., Jr., Simultaneous encapsulation: molecules held at close range. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, 44, (14), 2068-78.
61. Pauling, L., Molecular architecture and biological reactions. *Chemical & Engineering News* **1946**, 24, 1375-7.
62. Haldane, J. B. S., In: *Enzymes*. Longmans Green, London **1930**.
63. Jencks, W. P., In: *Catalysis in chemistry and enzymology*. McGraw-Hill, New York **1969**.
64. Stocking, E. M.; Williams, R. M., Chemistry and biology of biosynthetic Diels-Alder reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, 42, (27), 3078-115.
65. Auclair, K.; Sutherland, A.; Kennedy, J.; Witter, D. J.; Van den Heever, J. P.; Hutchinson, C. R.; Vederas, J. C., Lovastatin Nonaketide Synthase Catalyzes an In-

tramolecular Diels-Alder Reaction of a Substrate Analogue. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, (46), 11519-11520.

66. Watanabe, K.; Mie, T.; Ichihara, A.; Oikawa, H.; Honma, M., Detailed reaction mechanism of macrophomate synthase. Extraordinary enzyme catalyzing five-step transformation from 2-pyrones to benzoates. *J Biol Chem* **2000**, 275, (49), 38393-401.

67. Ose, T.; Watanabe, K.; Mie, T.; Honma, M.; Watanabe, H.; Yao, M.; Oikawa, H.; Tanaka, I., Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase. *Nature* **2003**, 422, (6928), 185-9.

68. Schultz, P. G.; Lerner, R. A., Antibody catalysis: Completing the circle. *Nature (London, United Kingdom)* **2002**, 418, (6897), 485.

69. Hilvert, D.; Hill, K. W.; Nared, K. D.; Auditor, M. T. M., Antibody catalysis of the Diels-Alder reaction. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, (26), 9261-2.

70. Gouverneur, V. E.; Houk, K. N.; de Pascual-Teresa, B.; Beno, B.; Janda, K. D.; Lerner, R. A., Control of the exo and endo pathways of the Diels-Alder reaction by antibody catalysis. *Science* **1993**, 262, (5131), 204-8.

71. Hugot, M.; Bensel, N.; Vogel, M.; Reymond, M. T.; Stadler, B.; Reymond, J. L.; Baumann, U., A structural basis for the activity of retro-Diels-Alder catalytic antibodies: evidence for a catalytic aromatic residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, (15), 9674-8.

72. Morris, K. N.; Tarasow, T. M.; Julin, C. M.; Simons, S. L.; Hilvert, D.; Gold, L., Enrichment for RNA molecules that bind a Diels-Alder transition state analog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91, (26), 13028-32.

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

74. Brückner, R., Reaktionsmechanismen: organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden 1.Aufl. *Spektrum, Akad. Verl.* **1996**, Heidelberg; Berlin; Oxford.

75. Keiper, S.; Bebenroth, D.; Seelig, B.; Westhof, E.; Jäschke, A., Architecture of a Diels-Alderase ribozyme with a preformed catalytic pocket. *Chem. Biol.* **2004**, 11, (9), 1217-27.

76. Seelig, B.; Keiper, S.; Stuhlmann, F.; Jäschke, A., Enantioselective Ribozyme Catalysis of a Bimolecular Cycloaddition Reaction. *Angew Chem Int Ed Engl* **2000**, 39, (24), 4576-4579.

77. Stuhlmann, F.; Jäschke, A., Characterization of an RNA Active Site: Interactions between a Diels-Alderase Ribozyme and Its Substrates and Products. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (13), 3238-3244.
78. Klussmann, S.; Nolte, A.; Bald, R.; Erdmann, V. A.; Furste, J. P., Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol* **1996**, 14, (9), 1112-5.
79. Nolte, A.; Klussmann, S.; Bald, R.; Erdmann, V. A.; Furste, J. P., Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat Biotechnol* **1996**, 14, (9), 1116-9.
80. Scaringe, S. A.; Wincott, F. E.; Caruthers, M. H., Novel RNA synthesis method using 5'-O-Silyl-2'-O-orthoester protecting groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11820-11821.
81. Milligan, J. F.; Groebe, D. R.; Witherell, G. W.; Uhlenbeck, O. C., Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, (21), 8783-8798.
82. Milligan, J. F.; Uhlenbeck, O. C., Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol* **1989**, 180, 51-62.
83. Pitulle, C.; Kleineidam, R. G.; Sproat, B.; Krupp, G., Initiator oligonucleotides for the combination of chemical and enzymatic RNA synthesis. *Gene* **1992**, 112, (1), 101-105.
84. Seelig, B.; Jäschke, A., Site-specific modification of enzymatically synthesized RNA: transcription initiation and Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7729-7732.
85. Seelig, B.; Jäschke, A., Ternary conjugates of guanosine monophosphate as initiator nucleotides for the enzymatic synthesis of 5'-modified RNAs. *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, (3), 371-378.
86. Sambrook, J.; E.F., F.; Maniatis, T., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Second Edition ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.
87. Pingoud, A.; Urbanke, C., *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Walter de Gruyter; Berlin, New York: 1997.
88. Welz, R.; Muller, S., 5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazole as activator for 2'-O-TBDMS phosphoramidite building blocks in RNA synthesis. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, (5), 795-797.

89. Wincott, F.; DiRenzo, A.; Shaffer, C.; Grimm, S.; Tracz, D.; Workman, C.; Sweedler, D.; Gonzalez, C.; Scaringe, S.; Usman, N., Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. *Nucleic Acids Res* **1995**, *23*, (14), 2677-2684.
90. Westman, E.; Strömberg, R., Removal of t-butyldimethylsilyl protection in RNA synthesis. Triethylamine trihydrofluoride (TEA, 3HF) is a more reliable alternative to tetrabutylammonium fluoride (TBAF). *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2430-2431.
91. England, T. E.; Bruce, A. G.; Uhlenbeck, O. C., Specific labeling of 3' termini of RNA with T4 RNA ligase. *Methods Enzymol* **1980**, *65*, (1), 65-74.
92. Ehresmann, C.; Baudin, F.; Mougél, M.; Romby, P.; Ebel, J. P.; Ehresmann, B., Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, (22), 9109-28.
93. Cava, M. P.; Deana, A. A.; Muth, K.; Mitchell, M. j., N-Phenylmaleimide. *Organic Syntheses* **1961**, *41*, 93-5.
94. Chirale Ausgangsverbindungen wurden von ChiPros™ der BASF AG zur Verfügung gestellt.
95. Misra, A.; Mishra, S.; Misra, K., Synthesis and fluorescence studies of multiple labeled oligonucleotides containing dansyl fluorophore covalently attached at 2'-terminus of cytidine via carbamate linkage. *Bioconjug Chem* **2004**, *15*, (3), 638-46.
96. Yamana, K.; Iwase, R.; Furutani, S.; Tsuchida, H.; Zako, H.; Yamaoka, T.; Murakami, A., 2'-Pyrene modified oligonucleotide provides a highly sensitive fluorescent probe of RNA. *Nucleic Acids Res* **1999**, *27*, (11), 2387-92.
97. Lottspeich, F.; Zorbas, H., Bioanalytik, 1. Aufl. *Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg; Berlin* **1998**.
98. Chen, Y.; Ebright, Y. W.; Ebright, R. H., Identification of the target of a transcription activator protein by protein-protein photocrosslinking. *Science* **1994**, *265*, (5168), 90-2.
99. Podar, M.; Perlman, P. S., Photocrosslinking of 4-thio uracil-containing RNAs supports a side-by-side arrangement of domains 5 and 6 of a group II intron. *Rna* **1999**, *5*, (2), 318-329.
100. Willis, M. C.; Hicke, B. J.; Uhlenbeck, O. C.; Cech, T. R.; Koch, T. H., Photocrosslinking of 5-iodouracil-substituted RNA and DNA to proteins. *Science* **1993**, *262*, (5137), 1255-7.

101. Van der Horst, G. T. J.; Rose, U.; Brossmer, R.; Verheijen, F. W., Photoaffinity labeling of the lysosomal neuraminidase from bovine testis. *FEBS Letters* **1990**, *277*, (1-2), 42-4.
102. Hasinoff, B. B.; Chee, G. L.; Day, B. W.; Avor, K. S.; Barnabe, N.; Thampatty, P.; Yalowich, J. C., Synthesis and Biological Activity of a Photoaffinity Etoposide Probe. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, *9*, (7), 1765-1771.
103. Brunner, J., New photolabeling and crosslinking methods. *Annu Rev Biochem* **1993**, *62*, 483-514.
104. Dorman, G.; Prestwich, G. D., Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* **1994**, *33*, (19), 5661-73.
105. Buchmueller, K. L.; Hill, B. T.; Platz, M. S.; Weeks, K. M., RNA-tethered phenyl azide photocrosslinking via a short-lived indiscriminant electrophile. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, (36), 10850-61.
106. Buchmueller, K. L.; Weeks, K. M., Near native structure in an RNA collapsed state. *Biochemistry* **2003**, *42*, (47), 13869-78.
107. Oh, B. K.; Pace, N. R., Interaction of the 3'-end of tRNA with ribonuclease P RNA. *Nucleic Acids Res* **1994**, *22*, (20), 4087-94.
108. Pinard, R.; Heckman, J. E.; Burke, J. M., Alignment of the two domains of the hairpin ribozyme-substrate complex defined by interdomain photoaffinity crosslinking. *J Mol Biol* **1999**, *287*, (2), 239-51.
109. Gano, K. W.; Monbouquette, H. G.; Myles, D. C., An efficient synthesis of a class of heterobifunctional photo-reactive crosslinkers, labels, and probes. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, (12), 2249-2251.
110. Burkett, B. A.; Chan, T. H., An expedient synthesis of monodispersed oligo(ethylene glycols). *Synthesis* **2004**, (7), 1007-1010.
111. Klapötke, T. M.; Krumm, B.; Piotrowski, H.; Polborn, K.; Holl, G., Synthesis and structures of trifluoromethyl-, fluoro-, and azido-substituted hexabenzyl-hexaazaisowurtzitanes and isolation of a novel hexaazaisowurtzitane-based polycycle. *Chemistry--A European Journal* **2003**, *9*, (3), 687-694.
112. Trommer, W.; Hendrick, M., Formation of maleimides by a new mild cyclization procedure. *Synthesis* **1973**, (8), 484-5.
113. Burgin, A. B.; Pace, N. R., Mapping the active site of ribonuclease P RNA using a substrate containing a photoaffinity agent. *Embo J* **1990**, *9*, (12), 4111-8.

114. Glusker, J. P., X-ray crystallography of proteins. *Methods Biochem Anal* **1994**, 37, 1-72.
115. Golden, B. L.; Kundrot, C. E., RNA crystallization. *J Struct Biol* **2003**, 142, (1), 98-107.
116. Cate, J. H.; Gooding, A. R.; Podell, E.; Zhou, K.; Golden, B. L.; Kundrot, C. E.; Cech, T. R.; Doudna, J. A., Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing. *Science* **1996**, 273, (5282), 1678-85.
117. Wedekind, J. E.; McKay, D. B., Purification, crystallization, and X-ray diffraction analysis of small ribozymes. *Methods Enzymol* **2000**, 317, 149-68.
118. Pley, H. W.; Flaherty, K. M.; McKay, D. B., Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* **1994**, 372, (6501), 68-74.
119. Wedekind, J. E.; McKay, D. B., Crystallographic structures of the hammerhead ribozyme: relationship to ribozyme folding and catalysis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1998**, 27, 475-502.
120. Ferre-D'Amare A, R.; Rupert, P. B., The hairpin ribozyme: from crystal structure to function. *Biochem Soc Trans* **2002**, 30, (Pt 6), 1105-9.
121. Ferre-D'Amare, A. R.; Zhou, K.; Doudna, J. A., Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature* **1998**, 395, (6702), 567-74.
122. Correll, C. C.; Freeborn, B.; Moore, P. B.; Steitz, T. A., Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. *Cell* **1997**, 91, (5), 705-12.
123. Pasek, M.; Venkatappa, M. P.; Sigler, P. B., Enzymatic synthesis and crystallographic characterization of an isomorphous derivative of yeast formylatable methionine transfer ribonucleic acid containing iodocytidine. *Biochemistry* **1973**, 12, (24), 4834-40.
124. Jones, J. T.; Barnes, C. L.; Lietzke, S. E.; Weichenrieder, O.; Doudna, J. A.; Kundrot, C. E., Preliminary X-ray diffraction studies of an RNA pseudoknot that inhibits HIV-1 reverse transcriptase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1996**, 52, (Pt 5), 1018-20.
125. Lietzke, S. E.; Barnes, C. L.; Berglund, J. A.; Kundrot, C. E., The structure of an RNA dodecamer shows how tandem U-U base pairs increase the range of stable RNA structures and the diversity of recognition sites. *Structure* **1996**, 4, (8), 917-30.
126. Du, Q.; Carrasco, N.; Teplova, M.; Wilds, C. J.; Egli, M.; Huang, Z., Internal derivatization of oligonucleotides with selenium for X-ray crystallography using MAD. *J Am Chem Soc* **2002**, 124, (1), 24-5.

127. Höbartner, C.; Micura, R., Chemical synthesis of selenium-modified oligoribonucleotides and their enzymatic ligation leading to an U6 SnRNA stem-loop segment. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, (4), 1141-9.
128. Höbartner, C.; Rieder, R.; Kreutz, C.; Puffer, B.; Lang, K.; Polonskaia, A.; Serganov, A.; Micura, R., Syntheses of RNAs with up to 100 nucleotides containing site-specific 2'-methylseleno labels for use in X-ray crystallography. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, (34), 12035-45.
129. Serganov, A.; Keiper, S.; Malinina, L.; Tereshko, V.; Skripkin, E.; Höbartner, C.; Polonskaia, A.; Phan, A. T.; Wombacher, R.; Micura, R.; Dauter, Z.; Jäschke, A.; Patel, D. J., Structural basis for Diels-Alder ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation. *Nat Struct Mol Biol* **2005**, 12, (3), 218-24.
130. Razzell, W. E.; Khorana, H. G., Studies on polynucleotides. III. Enzymic degradation; substrate specificity and properties of snake venom phosphodiesterase. *J Biol Chem* **1959**, 234, (8), 2105-13.
131. Fiammengo, R.; Musilek, K.; Jäschke, A., Efficient Preparation of Organic Substrate-RNA Conjugates via in Vitro Transcription. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, (25), 9271-6.
132. Narlikar, G. J.; Herschlag, D., Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Annu Rev Biochem* **1997**, 66, 19-59.
133. Doudna, J. A.; Lorsch, J. R., Ribozyme catalysis: not different, just worse. *Nat Struct Mol Biol* **2005**, 12, (5), 395-402.
134. Hermann, T.; Patel, D. J., Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* **2000**, 287, (5454), 820-5.
135. Majerfeld, I.; Yarus, M., An RNA pocket for an aliphatic hydrophobe. *Nat Struct Biol* **1994**, 1, (5), 287-92.
136. Westhof, E., *persönliche Mitteilung*.
137. Mielert, A.; Braig, C.; Sauer, J.; Martelli, J.; Sustmann, R., A kinetic study of reactions of substituted anthracenes with maleic anhydride. *Liebigs Annalen der Chemie* **1980**, (6), 954-70.
138. Wise, K. E.; Wheeler, R. A., Donor-Acceptor-Assisted Diels-Alder Reaction of Anthracene and Tetracyanoethylene. *Journal of Physical Chemistry A* **1999**, 103, (41), 8279-8287.

139. Manoharan, M.; De Proft, F.; Geerlings, P., Aromaticity Interplay between Quinodimethanes and C60 in Diels-Alder Reactions: Insights from a Theoretical Study. *Journal of Organic Chemistry* **2000**, 65, (19), 6132-6137.
140. MOPAC, *semiempirical molecular orbital package for the study of solid state and molecular structures and reactions*.
141. Bebenroth, D., *persönliche Mitteilung*.
142. Hermann, T.; Auffinger, P.; Westhof, E., Molecular dynamics investigations of hammerhead ribozyme RNA. *Eur Biophys J* **1998**, 27, (2), 153-65.
143. Jeppesen, C.; Wong, J. Y.; Kuhl, T. L.; Israelachvili, J. N.; Mullah, N.; Zalipsky, S.; Marques, C. M., Impact of polymer tether length on multiple ligand-receptor bond formation. *Science* **2001**, 293, (5529), 465-8.
144. Easson, L. H.; Stedman, E., Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. V. Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochemical Journal* **1933**, 27, 1257-66.
145. Koshland, D. E., Jr., Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1958**, 44, 98-105.
146. Ogston, A. G., Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. *Nature (London, United Kingdom)* **1948**, 162, 963.
147. Shallenberger, R. S.; Acree, T. E., Molecular theory of sweet taste. *Nature* **1967**, 216, (114), 480-2.
148. Fischer, E., Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985.
149. Sundaresan, V.; Abrol, R., Towards a general model for protein-substrate stereoselectivity. *Protein Sci* **2002**, 11, (6), 1330-9.
150. Sundaresan, V.; Abrol, R., Biological chiral recognition: the substrate's perspective. *Chirality* **2005**, 17 Suppl, S30-9.
151. Mesecar, A. D.; Koshland, D. E., Jr., Sites of binding and orientation in a four-location model for protein stereospecificity. *IUBMB Life* **2000**, 49, (5), 457-66.
152. Mesecar, A. D.; Koshland, D. E., Jr., A new model for protein stereospecificity. *Nature* **2000**, 403, (6770), 614-5.

153. Xu, J.; Deng, Q.; Chen, J.; Houk, K. N.; Bartek, J.; Hilvert, D.; Wilson, I. A., Evolution of shape complementarity and catalytic efficiency from a primordial antibody template. *Science* **1999**, 286, (5448), 2345-8.
154. Romesberg, F. E.; Spiller, B.; Schultz, P. G.; Stevens, R. C., Immunological origins of binding and catalysis in a Diels-Alderase antibody. *Science* **1998**, 279, (5358), 1929-33.
155. Heine, A.; Stura, E. A.; Yli-Kauhaluoma, J. T.; Gao, C.; Deng, Q.; Beno, B. R.; Houk, K. N.; Janda, K. D.; Wilson, I. A., An antibody exo Diels-Alderase inhibitor complex at 1.95 angstrom resolution. *Science* **1998**, 279, (5358), 1934-40.
156. Winkler, W. C.; Breaker, R. R., Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBiochem* **2003**, 4, (10), 1024-32.
157. Tuschl, T., Functional genomics: RNA sets the standard. *Nature* **2003**, 421, (6920), 220-1.
158. Tuschl, T.; Borkhardt, A., Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* **2002**, 2, (3), 158-67.
159. Lilley, D. M., The Varkud satellite ribozyme. *Rna* **2004**, 10, (2), 151-8.
160. Theimer, C. A.; Blois, C. A.; Feigon, J., Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Molecular Cell* **2005**, 17, (5), 671-682.
161. Schlax, P. J.; Xavier, K. A.; Gluick, T. C.; Draper, D. E., Translational repression of the Escherichia coli alpha operon mRNA: importance of an mRNA conformational switch and a ternary entrapment complex. *J Biol Chem* **2001**, 276, (42), 38494-501.
162. Staple, D. W.; Butcher, S. E., Pseudoknots: RNA structures with diverse functions. *PLoS Biology* **2005**, 3, (6), 956-959.
163. Rupert, P. B.; Massey, A. P.; Sigurdsson, S. T.; Ferre-D'Amare, A. R., Transition state stabilization by a catalytic RNA. *Science* **2002**, 298, (5597), 1421-4.
164. Colter, A. K.; Clemens, L. M., Catalysis of 1,1'-binaphthyl racemisation by 9,10-dihydro-3,4,5,6-dibenzophenanthren. *J Am Chem Soc* **1965**, 87, 847.