

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

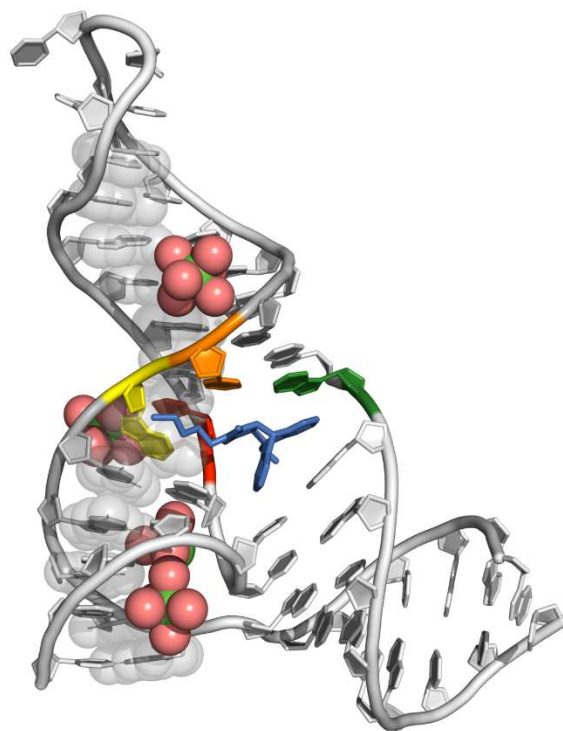
vorgelegt von

Diplom-Lebensmittelchemikerin Stefanie Kraut

geboren in Heilbronn

Tag der mündlichen Prüfung:

Kinetische und Mechanistische Charakterisierung eines Diels-Alderase-Ribozyms



Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke
Prof. Dr. Stefan Wölfel

Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Andres Jäschke danken – für die Möglichkeit an dem für mich neuen Thema des Diels-Alderase-Ribozyms arbeiten zu können, der Betreuung und Unterstützung, für das Vertrauen und seine Geduld.

Prof. Dr. Stefan Wölfl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Atmosphäre in der Gruppe und neben wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen für die gegenseitige Unterstützung. Dr. Dirk Bebenroth, Dr. Alexander Nierth und Dr. Richard Wombacher danke ich für die intensive Einführung zu Beginn meiner Arbeit in das Gebiet des Diels-Alderase-Ribozyms. Dr. Armine Hayrapetyan möchte ich für die Erlernung der Technik des chemischen Probing danken. Juliane Schoch danke ich für die Einführung in unsere neue LC-MS und für ihre Anregungen zu Durchführung und Auswertung. Sandra Suhm danke ich für die Synthese der Substrate, Heiko Rudy und Tobias Timmermann für die Unterstützung bei MS-Messungen, bei der Hilfe mit Computern und Software und allen sonstigen technischen Problemchen. Bei Dr. Natalija Kisseleva und Prof. Dr. Olav Schiemann bedanke ich mich für die Bestimmung der divalenten Ionen mittels EPR-Spektroskopie. Dr. Alexander Nierth, Dr. Andrei Y. Kobitski und Prof. G. Ulrich Nienhaus danke ich für die Durchführung der smFRET-Messungen der Ribozyme.

Ich danke allen, die mich mit Korrekturen, Diskussionen und Anregungen zu dieser Arbeit unterstützt haben: Marie Winz, Juliane Schoch, Dr. Benjamin Strauß, Ece Gaffarogullari, André Krause, Dr. Ayan Samanta, Miriam Riedel, Christian Färber und Sue.

Karin Weiß und Viola Funk danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung bei organisatorischen, bürokratischen und sonstigen Dingen und für ihre optimistische, positive und fröhliche Stimmung.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich auch für die gemeinsamen Aktivitäten außerhalb des anstrengenden und manchmal frustrierenden Laboralltags, wie Abendessen, grillen, Filmabende, Kneiptouren, den Hüttenwochenenden und für die schönen Silvestertage in Wien danken.

A huge thank you to all the friends and great people I met in AEGEE (Association des Etats Généreaux des Etudiants de l'Europe), for all the special international experiences we shared and for all the positive feedback and energy you gave me.

Vielen Dank an all die anderen lieben Menschen für die schönen Erlebnisse, Gespräche, aufmunternden Worte und das Verständnis. Ein besonderer Dank an Éva, die von einer Mitbewohnerin zu einer guten Freundin wurde, für all die schönen Momente, alle Situationen, die wir zusammen gemeistert haben und die gegenseitige Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich für all ihre Unterstützung, den Rückhalt und dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben. Meinen Geschwistern Alexandra und Tobias danke ich für den Zusammenhalt und die schönen, lustigen Gespräche und Emails.

Kinetische und Mechanistische Charakterisierung eines Diels-Alderase-Ribozyms

1. Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke, 2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wölfl

Mit der Entdeckung der Ribozyme als katalytisch-aktive RNAs entstand mit der „RNA-Welt“-Hypothese ein neues Verständnis über die Entstehung des Lebens. RNA kann demnach genetische Information codieren und speichern, sowie katalytische Funktionen in Zellen übernehmen. Die Entwicklung von *in vitro*-Selektionstechniken ermöglichte die Selektion synthetischer Ribozyme mit großem katalytischem Potential. Das in unserer Gruppe selektierte Diels-Alderase-Ribozym katalysiert stereoselektiv neue Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen zwischen einem Anthracen und einem Maleimid. In der vorliegenden Arbeit wurde das Diels-Alderase-Ribozym auf seine kinetische und mechanistische Funktionsweise untersucht.

In der Kristallstruktur des Diels-Alderase-Ribozyms wurden divalente Ionenbindungsstellen identifiziert. Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss divalenter Ionen auf die katalytische Ribozym-Aktivität mit einem UV/VIS-spektroskopischen Assay quantitativ untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass für die vollständige katalytische Aktivität eine größere Anzahl an divalenten Ionen neben denen zur Besetzung der hochaffinen Bindungsstellen erforderlich sind. Mn^{2+} -Ionen als Substitution von Mg^{2+} -Ionen führten zur Reduktion der katalytischen Ribozym-Aktivität auf die Hälfte. Obwohl Cd^{2+} -Ionen die höchste Bindungsaffinität aufwiesen, trat keinerlei Ribozym-Aktivität auf.

Die quantifizierende Analyse der Diels-Alder-Reaktionen mittels HPLC (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie) zeigte, dass etwa die Hälfte des konsumierten Anthracen-Substrats nicht zu Diels-Alder-Produkt reagierte. Zur Aufklärung möglicher Nebenreaktionen wurde die sensitive, hochauflösende Molekülmassen-Bestimmung mittels LC-MS (HPLC-Massenspektrometrie) für die Diels-Alder-Reaktion etabliert. Sauerstoff-Addukte und Dimere der Anthracen-Komponente konnten identifiziert werden, die auch eine Bedeutung in Nebenreaktionen haben könnten. In weiterführenden Studien sollte dies noch genauer untersucht werden.

Wasserstoff-Brücken-Bindungen (H-Brücken) wurden aus der Kristallstruktur innerhalb der katalytischen Tasche des Ribozyms und zwischen der katalytischen Tasche und dem Diels-Alder-Produkt abgeleitet. Ein Teil dieser Arbeit umfasste die Aufklärung der Bedeutung der H-Brücken zur Stabilität, katalytischen Ribozym-Aktivität und hohen Produkt-Inhibition. Durch atomare Mutagenese eingeführte Nukleotid-Modifikationen im Ribozym wurden zur Störung der H-Brücken eingesetzt. Die Effekte dieser Störungen wurden mit dem chemischen Blei-Ionen Probing und einem radioaktiven gelelektrophoretischen Assay analysiert. Die strukturelle Analyse zwischen dem Wildtyp und einem modifizierten Ribozym mit gestörter H-Brücke, die die Verbindung zwischen „Dach“ und „Rückgrat“ der katalytischen Tasche bildet, ergab eine ähnliche Gesamtstruktur der Ribozyme. Das modifizierte Ribozym konnte jedoch in Anwesenheit von Diels-Alder-Produkt und Mg^{2+} -Ionen keine Strukturstabilisierung ausbilden. Aus diesem Verhalten konnte die hohe Relevanz dieser einen H-Brücke und deren nötige präzise Positionierung zur Ausbildung der intakten katalytischen Tasche abgeleitet werden. Die Doppelmutanten wiesen nur 4-5% der Wildtyp-Aktivität auf, was die hohe Relevanz der H-Brücken zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt für die katalytische Aktivität indizierte. Aus dem Vergleich der Einzel- und Doppelmutanten wurde der additive Beitrag beider H-Brücken zur katalytischen Aktivität des Ribozyms abgeleitet. Die Ribozym - Produkt H-Brücken konnten mittels UV/VIS-Spektroskopie als Verursacher der hohen Produkt-Inhibition identifiziert werden.

Diese Arbeit konnte das Verständnis der Funktionsweise des Diels-Alderase-Ribozyms in Bezug der H-Brücken und divalenten Ionen auf die Stabilität und die katalytische Aktivität vertiefen. Mit der Etablierung der LC-MS-Methode für Diels-Alder-Reaktionen wurde die Grundlage zur hochauflösenden massenspektrometrischen Analyse der Reaktionen gelegt.

Kinetic and mechanistic characterization of a Diels-Alderase ribozyme**1st Referee: Prof. Dr. Andres Jäschke, 2nd Referee: Prof. Dr. Stefan Wölfl**

RNA is capable of coding and storing genetic information, as well as functioning as catalytic molecules in the cells. The discovery of such catalytically active RNAs (ribozymes) led the development of the 'RNA-World' hypothesis and fundamentally changed our understanding of the origin of life. The development of in vitro evolution techniques allowed the selection of ribozymes having diverse catalytic abilities. The Diels-Alderase ribozyme, which was selected in our group, catalyzes the carbon-carbon bond-formation between an anthracene and a maleimide to a Diels-Alder product stereoselectively. In this thesis, the kinetics and the mechanism of the Diels Alderase ribozyme's catalytic activity was investigated in detail.

The crystal structure of the Diels-Alder ribozyme showed divalent ion binding sites. Thus, in the first part of the thesis, the influence of the divalent ions on the catalytic activity of the ribozyme was determined quantitatively using UV/vis-spectroscopy. It was shown that more divalent ions, besides the ones occupying the high-affinity binding sites, are required to obtain full catalytic activity. The Diels-Alderase ribozyme showed half of the catalytical activity when Mn^{2+} ions were used instead of Mg^{2+} ions. Although Cd^{2+} ions had the highest binding affinity these didn't support any catalytic activity.

Quantitative analysis using HPLC (High performance liquid chromatography) based assays showed that about half of the anthracene substrate was consumed but not converted to the Diels-Alder product. To date, it was not understood whether the ribozyme was catalyzing any side reactions besides Diels-Alder reaction. Therefore in the second part of the thesis, background or catalyzed side reactions were investigated using LC-MS (HPLC-mass spectrometry) analysis with high sensitivity and high mass accuracy. Oxygen-adducts and dimers of the anthracene substrate were detected, which might play a role in side reactions and should be investigated further.

Hydrogen bonds (H-bonds), deduced from the crystal structure, are formed inside the catalytic pocket of the ribozyme and between the catalytic pocket and the Diels-Alder product. The third part of the thesis, elucidated the role of these H-bonds for the stability, catalytic activity of the ribozyme and the strong product inhibition to the ribozyme. Modified nucleotides were incorporated into the ribozyme using atomic mutagenesis to disturb the H-bond interactions. The effects of these disruptions on the structure and the catalytic activity were investigated systematically using chemical probing with lead ions and radioactive gel electrophoresis assays, respectively. Structural analysis between the wildtype and the modified ribozyme with one disturbed H-bond, connecting 'roof' and 'backbone' of the catalytic pocket, revealed an overall similar structure. However, this modified ribozyme failed to form structural stabilization upon the addition of Diels-Alder product and Mg^{2+} ions. Ergo the high relevance of this one single H-bond and its necessity of precise positioning for the fine-tuned interaction to keep the catalytic pocket intact were concluded. Ribozymes with double mutations showed only 4-5% of the wildtype activity; hence both of the H-bonds between the catalytic pocket and the Diels-Alder product are highly important for the catalysis in an additive manner, as was concluded comparing single and double mutants' activity. Furthermore, kinetic studies using UV/Vis-spectroscopy showed that both of the H-bonds were responsible for the strong product inhibition.

This research has further improved the understanding of the Diels-Alderase ribozyme's stability and catalytic activity. Establishing the LC-MS method for the analysis of the Diels-Alder reaction provides a basis to analyze the catalyzed Diels-Alder reactions with high sensitivity and high mass accuracy.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ribozyme	1
1.2 Die Diels-Alder-Reaktion und ihre enzymatische Katalyse	2
1.2.1 Natürliche Diels-Alder-Katalysatoren	4
1.2.2 Synthetische Diels-Alder-Katalysatoren	5
1.3 Das Diels-Alderase-Ribozym	8
1.3.1 Sekundärstrukturelemente	8
1.3.2 Tertiärstrukturelemente	10
1.3.3 Funktionen mono- und divalenter Ionen	12
1.3.4 Die katalytische Tasche und intramolekulare Wechselwirkungen	14
1.3.5 Interaktionen der katalytischen Tasche mit Diels-Alder-Produkt	16
1.4 Strukturelle Untersuchung von RNA durch Probing	18
1.5 Massenspektrometrie	20
1.5.1 Massenspektrometrie und Elektrospray-Ionisierung	20
1.5.2 Kopplung mit Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie	21
1.6 Anthracen und Reaktionen mit Sauerstoff	22
2. Zielsetzung	27
3. Ergebnisse und Diskussion	29
3.1 Ribozym-Aktivität in Abhängigkeit divalenter Ionen	29
3.1.1 Quantifizierung der Ribozym-Aktivitäten	30
3.1.2 Korrelation der divalenten Ionenbindungsstellen mit kristallographischen Daten	31
3.1.3 Korrelation der katalytischen Aktivitäten mit den Ionenbindungsstellen	33
3.2 Quantifizierung der Diels-Alder-Reaktionen mittels HPLC	37
3.3 Massenspektrometrische Analyse der Diels-Alder-Reaktionen	40
3.3.1 Edukte und Produkte der Diels-Alder-Reaktionen	40
3.3.2 Katalysierte und unkatalysierte Diels-Alder-Reaktionen	47
3.3.3 Einfluss des Ribozyms auf AHEG und Diels-Alder-Produkt	54
3.3.4 Einfluss von UV-Bestrahlung	55
3.3.5 Fazit und Ausblick	58
3.4 Wasserstoff-Brücken-Bindungen innerhalb der katalytischen Tasche	60
3.4.1 Strukturelle Untersuchung des Diels-Alderase-Ribozyms durch Pb^{2+} -Probing	61
3.4.2 Untersuchung der Wasserstoff-Brücken-Bindung von C10 und U17 durch Pb^{2+} -Probing ..	62

3.4.3	Interpretation der Pb ²⁺ -Probing Ergebnisse	69
3.5	Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt...77	
3.5.1	Interaktionen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt	77
3.5.2	Quantifizierung des Einflusses der Wasserstoff-Brücken-Bindungen auf die katalytische Aktivität.....	78
3.5.3	Die Produkt-Inhibition des Diels-Alderase-Ribozyms.....	83
3.5.4	Bestimmung der Produkt-Inhibition in Abhängigkeit der Wasserstoff-Brücken-Bindungen	84
3.5.5	Interpretation der Ergebnisse über den Einfluss der Wasserstoff-Brücken-Bindungen.....	86
3.6	Fazit und Ausblick.....93	
3.6.1	Massenspektrometrische Analyse der Diels-Alder-Reaktionen	93
3.6.3	Das Diels-Alderase-Ribozym und divalente Ionen.....	93
3.6.2	Die Wasserstoff-Brücken-Bindungen der katalytischen Tasche und zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt.....	94
4.	Material und Methoden.....96	
4.1	Standardmethoden und Reagenzien.....96	
4.2	Molekularbiologische Methoden.....97	
4.2.1	Nukleinsäuresequenzen	97
4.2.2	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit ³² P	98
4.2.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	100
4.2.4	Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden	102
4.3	UV/VIS-Spektroskopie zur Bestimmung der katalytischen Ribozym-Aktivität....103	
4.3.1	Bestimmung der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion	103
4.3.2	Auswertung.....	104
4.4	UV/VIS-Spektroskopie: Bestimmung der Ribozym-Aktivität mit divalenten Ionen	105
4.4.1	Bestimmung und Auswertung der Diels-Alder-Reaktionen	105
4.5	UV/VIS-Spektroskopie: Bestimmung der Produkt-Inhibition	106
4.5.1	Reaktion mit Substraten und Diels-Alder Produkten	106
4.5.2	Auswertung.....	107
4.6	Gelelektrophoretischer Assay.....108	
4.6.1	3'-radioaktive Markierung des 10mer-AHEGs durch Ligation	109
4.6.2	Reaktion mit Substraten	110
4.6.3	Trennung und Auswertung von Edukt und Produkt	113
4.7	Chemisches Probing mit Pb²⁺-Ionen.....115	
4.7.1	5'-radioaktive Markierung der RNA durch Kinasierung	116
4.7.2	Spaltungsreaktion mit Pb ²⁺ -Ionen und Trennung der Reaktionsprodukte.....	116

4.7.3	Identifizierung der Nukleotidpositionen: Ribonuklease T1 Leiter und alkalische Hydrolyseleiter	117
4.7.4	Analyse der Probing-Muster auf Sequenziergelen.....	117
4.8	HPLC-Methode	118
4.8.1	Reaktion mit Substrat	118
4.8.2	Trennung der Moleküle.....	119
4.8.3	Analyse und Auswertung.....	119
4.9	LC-MS-Methode.....	120
4.9.1	HPLC-MS-Methode	121
4.9.2	Analyse der einzelnen Edukte und Produkte	122
4.9.3	Analyse von katalysierter und unkatalysierter Diels-Alder-Reaktion.....	124
4.9.4	UV-Bestrahlung	125
4.9.5	Auswertung.....	125
5.	Anhang	127
5.1	Geräte und Software	127
5.2	Material	128
5.3	LC-MS-Spektren	129
5.3.1	AHEG und Diels-Alder-Produkt als Einzelkomponenten.....	129
5.3.2	Katalysierte und unkatalysierte Diels-Alder-Reaktion	130
5.3.3	Verlängerte Reaktionszeit der Diels-Alder-Reaktionen.....	131
5.3.4	Einfluss von UV-Bestrahlung.....	136
5.3.5	Übersicht der m/z-Signale, Summenformeln und Molekül-Ionen.....	138
5.4	Abkürzungsverzeichnis	140
5.5	Publikationen.....	144
5.6	Eidesstattliche Erklärung	145
6.	Referenzen	146

1. Einleitung

1.1 Ribozyme

Über einen langen Zeitraum wurde angenommen, dass alle Biokatalysatoren in Form von Enzymen aus Proteinen aufgebaut sind. Die Funktionen von Ribonukleinsäuren (RNA) begrenzten sich dabei auf „messenger“ RNA (mRNA) als Übermittler genetischer Information, ribosomale RNA (rRNA) als Bestandteil des Ribosoms und transfer RNA (tRNA) als Adaptermolekül der Aminosäure in der Proteinbiosynthese. Die Entdeckung katalytisch-aktiver RNA-Spezies, die als Ribozyme¹ bezeichnet werden, änderte diese Annahme grundlegend. 1982 entdeckte T. Cech die Spaltung des Gruppe-I-Introns, einer RNA Sequenz aus *Tetrahymena thermophila*.⁽¹⁾ S. Altman identifizierte die durch die RNA-Komponente bedingte katalytische Funktion von Ribonuklease P, einem aus RNA- und Protein-Untereinheiten aufgebauten Riboprotein.⁽²⁻³⁾ Für die Entdeckung katalytisch-aktiver RNA wurde Cech und Altman 1989 der Nobelpreis für Chemie verliehen.⁽⁴⁾ In den folgenden Jahren wurden zahlreiche weitere Ribozyme entdeckt. Bedeutende Beispiele sind Ribozyme aus Viren- oder Viroiden, wie das „Hammerhead“-Ribozym aus Pflanzenviroiden⁽⁵⁾, das HDV-Ribozym aus dem Hepatitis Delta Virus⁽⁶⁾ und das „Hairpin“-Ribozym aus dem Tabak-Ringspot Virus.⁽⁷⁾

Für das Ribosom, das zu etwa zwei Dritteln aus rRNA und zu einem Drittel aus Protein aufgebaut ist, wurde schließlich die rRNA als die katalytisch-aktive Komponente identifiziert und somit die Annahme der ausschließlich strukturellen Funktion der ribosomalen RNA im Ribosom revidiert.⁽⁸⁻¹¹⁾

Durch die Entdeckung biokatalytisch-aktiver RNA änderte sich somit das Verständnis der Funktion von RNA als reinem „Informationsträger“ fundamental. Das „RNA-Welt Modell“⁽¹²⁾ prägte die Vorstellung einer proteinfreien, RNA-dominierten Biosphäre als Vorgänger der heutigen. Demnach könnte ursprünglich selbstreplizierende RNA die Funktion der katalytischen Aktivität, der Vervielfältigung und des Informationsträgers vereint haben. DNA als stabilerer Informationsträger als RNA und Proteine zur Erweiterung des katalytischen Potentials könnten somit auch erst später im Laufe der Evolution entstanden sein.

¹ Bezeichnung aus Ribonukleinsäure und Enzym zusammengesetzt

Neben den natürlichen Ribozymen wurden synthetische, katalytisch-aktive RNA-Moleküle entdeckt, die aus der Selektion kombinatorischer Nukleinsäure-Bibliotheken erhalten wurden. Die *in vitro* Selektion, als „Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment“, kurz als SELEX bezeichnet, beruht auf Isolierung und Amplifizierung von Molekülen der gewünschten Eigenschaften.⁽¹³⁻¹⁴⁾ An synthetischen Ribozymen werden in dieser Arbeit speziell nur Diels-Alderase-Ribozyme in Abschnitt 1.2.2 näher vorgestellt.

1.2 Die Diels-Alder-Reaktion und ihre enzymatische Katalyse

Die Diels-Alder-Reaktion, eine konzertierte [4+2] Cycloaddition eines Diens mit einem Dienophil, ist eine der bedeutendsten und am Besten untersuchten Reaktionen zur Bildung stereoselektiver Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen vor allem in der Naturstoffsynthese und der Herstellung physiologisch wirksamer Verbindungen.⁽¹⁵⁾ Entdeckt wurde die Reaktion 1928 von Otto Diels und Kurt Alder, wofür ihnen 1950 der Nobelpreis für Chemie verliehen wurde.⁽⁴⁾ Bei der pericyclischen Reaktion entstehen aus drei Kohlenstoff-Kohlenstoff π -Bindungen zwei neue σ -Bindungen und eine π -Bindung bei gleichzeitiger Bildung von bis zu vier neuen Stereozentren. Abb. 1 zeigt das Beispiel einer Diels-Alder-Reaktion von Butadien und einem vierfach substituierten Ethen zu einem vierfach substituierten Cyclohexen.

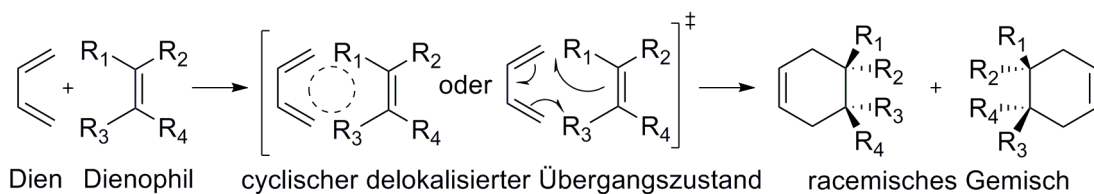


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Diels-Alder-Reaktion eines Diens (Butadien) mit einem Dienophil (vierfach substituiertes Ethen) über einen cyclischen delokalisierten Übergangszustand zu einem racemischen Gemisch von vierfach substituiertem Cyclohexen. Adaptiert aus⁽¹⁶⁻¹⁷⁾.

Eine Diels-Alder-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf beinhaltet ein elektronenreiches Dien und ein elektronenarmes Dienophil, wobei die Effizienz der Reaktion von der Überlappung der Orbitale abhängig ist. Was zu einer verbesserten Überlappung der Grenzorbitale und daraus resultierend zu erhöhter Reaktivität führt.⁽¹⁸⁾

Die Einführung elektronenreicher Substituenten am Dien erhöht die Energie des HOMO², elektronenziehende Substituenten am Dienophil erniedrigen die Energie des LUMO³, was zu einer verbesserten Überlappung der Grenzorbitale und daraus resultierend zu erhöhter Reaktivität führt.⁽¹⁸⁾ Das Schema der beteiligten Orbitale nach Woodward und Hoffman (Woodward-Hoffman-Regeln über die Erhaltung der Orbitalsymmetrie) der in Abb. 1 gezeigten Reaktion, ist in Abb. 2 dargestellt.⁽¹⁸⁾ Zur verbesserten Übersichtlichkeit werden nur die Grenzorbitale gezeigt.

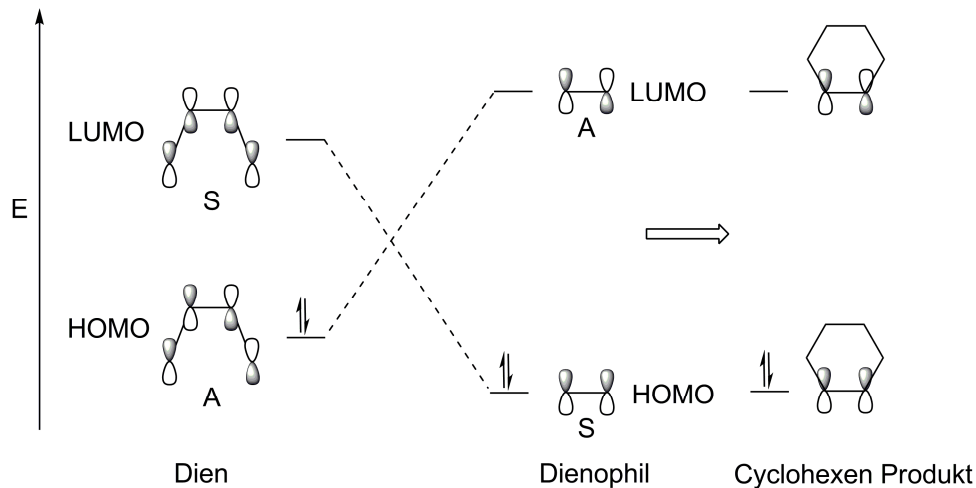


Abb. 2: Woodward-Hoffmann-Schema der Grenzorbitale der Diels-Alder-Reaktion von Butadien als Dien und Ethen als Dienophil zu Cyclohexen. A: asymmetrisches Molekülorbital, S: symmetrisches Molekülorbital. E: Energieachse. Adaptiert aus Tarasow *et al.*⁽¹⁹⁾.

Die Entdeckung der Diels-Alder-Reaktion in Wasser durch den hydrophoben Effekt, der Tendenz zur Aggregation hydrophober Moleküle in hydrophilen Lösungsmitteln, zeigte die Möglichkeit der Existenz der Diels-Alder-Reaktion in biologischen Systemen auf.⁽²⁰⁻²¹⁾ Dies ermöglichte auch die Anwendung der Diels-Alder-Reaktion zur Einführung von Modifikationen in Oligonukleotiden wie für RNA⁽²²⁾ und Peptid-Oligonukleotid-Konjugate beschrieben.⁽²³⁾ Die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf⁽²⁴⁾ erlangte kürzlich Bedeutung zur kovalenten und irreversiblen Derivatisierung von Oligonukleotiden.⁽²⁵⁻²⁶⁾

² Höchstes besetztes Molekülorbital; Abkürzung aus: Highest Occupied Molecular Orbital

³ Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital; Abkürzung aus: Lowest Unoccupied Molecular Orbital

1.2.1 Natürliche Diels-Alder-Katalysatoren

Obwohl die Diels-Alder-Reaktion in der Biosynthese von Cyclohexen-Ringen in Metaboliten postuliert und Indizien für ihre Existenz gefunden wurden⁽²⁷⁻²⁹⁾, konnten bisher nur wenige enzymkatalysierte Reaktionen mit einem möglichen Diels-Alder-Mechanismus erklärt werden. Dazu zählen die Solanapyron-Synthase⁽³⁰⁻³³⁾, die Lovastatin-Nonaketid-Synthase⁽³⁴⁻³⁵⁾, die Riboflavin-Synthase⁽³⁶⁻³⁷⁾ und die Macrophomat-Synthase⁽³⁸⁻³⁹⁾. Die Macrophomat-Synthase katalysiert die Reaktion von Pyruvat (in der Enolform) zu Macrophomat. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich dabei um einen sequentiellen Michael-Aldol-Reaktionsmechanismus und nicht um einen Diels-Alder-Mechanismus handelt.⁽⁴⁰⁾ Für alle fünf Synthesen wurden jeweils weitere katalysierte Reaktionsmechanismen neben der Diels-Alder-Reaktion identifiziert.⁽⁴¹⁻⁴²⁾ Kürzlich wurde eine weitere enzymkatalysierte [4+2] Cycloaddition in der Biosynthese von Spinosyn A beschrieben.⁽⁴³⁻⁴⁴⁾ Spinosyn A ist ein tetracyclisches, polyketidähnliches Insektizid aus *Saccharopolyspora spinosa*⁴.⁽⁴⁵⁾ Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Cyclase SpnF eine intramolekulare [4+2] Cycloaddition eines 1,3-Diens und eines Ethylens zu Cyclohexen in Spinosyn A katalysiert. Abb. 3 zeigt den Reaktionsschritt des Pentaens **1** zum tricyclischen Produkt **4**. Die Reaktion scheint dem Mechanismus der Diels-Alder-Reaktion mit Übergangszustand **2** zu entsprechen, allerdings ist dazu die exakte Aufklärung des Übergangszustandes der Reaktion von **1** zu **4** zur Bestätigung des Mechanismus' über einen einzigen pericyclischen Übergangszustand erforderlich. Bisher kann eine Reaktion über ein dipolares Intermediat wie in **3** dargestellt nicht ausgeschlossen werden. In der nicht-enzymatischen Totalsynthese wurde die Diels-Alder-Reaktion erfolgreich angewandt.⁽⁴⁶⁾ Das Enzym SpnF könnte, falls die Reaktion über einen Diels-Alder-Reaktionsmechanismus bestätigt werden würde, als erste natürlich vorkommende Diels-Alderase⁵ identifiziert werden. Die Reaktionsbeschleunigung von 500-fach ist allerdings nur gering, wie der Vergleich zu dem in unserer Gruppe entwickelten Diels-Alderase-Ribozym mit einer Reaktionsbeschleunigung bis zu 20000-fach aufzeigt, siehe Abschnitt 1.3.

⁴ Im Boden lebendes Bakterium der Actinomyceten

⁵ Enzyme, die eine Diels-Alder-Reaktion katalysieren, werden als Diels-Alderasen bezeichnet

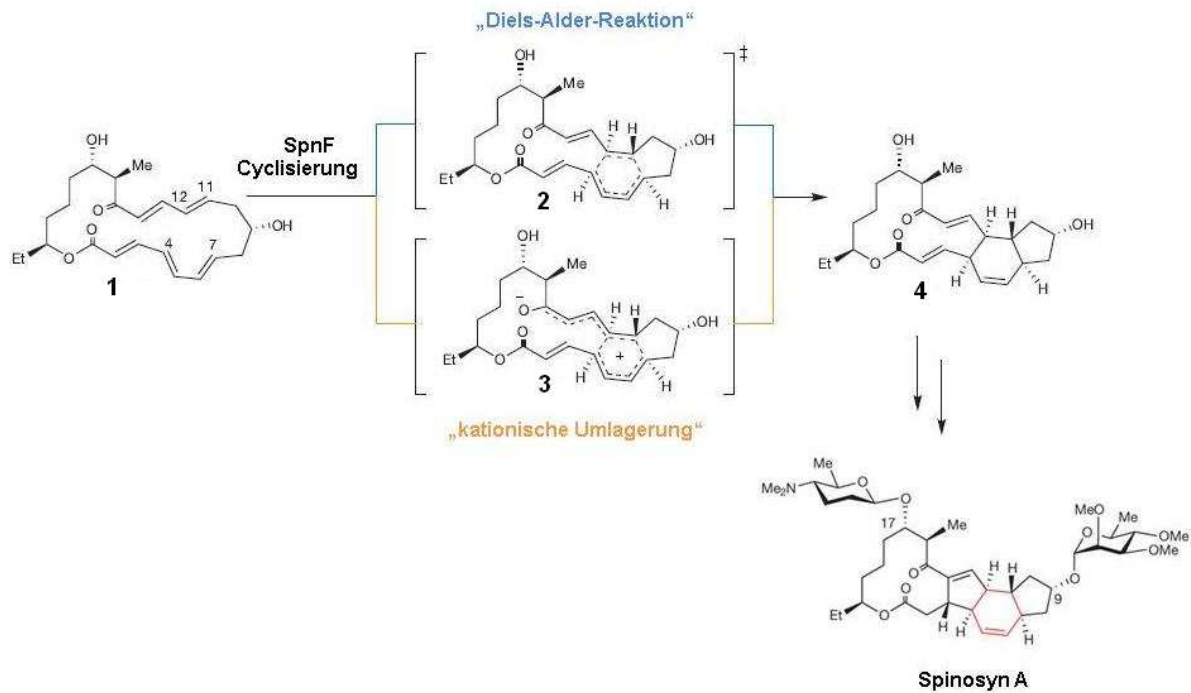


Abb. 3: Reaktionsschema der [4+2] Cycloadditionsreaktion von SpnF im Spinosyn A Syntheseweg. Reaktion von einem Pentaen (monocyclisches Makrolacton) (1) zu einem tricyclischen Cycloadditionsprodukt (4) über einen pericyclischen Übergangszustand als Diels-Alder-Reaktion oder einen Übergangszustand der kationischen Umlagerung (2 und 3). Adaptiert aus Kim *et al.*⁽⁴³⁾.

Möglicherweise ist die Katalyse von Diels-Alder-Reaktionen durch Enzyme nur unter relativ geringer Reaktionsbeschleunigung möglich, aber trotzdem zur Synthese von sekundären Stoffwechselprodukten ausreichend.⁽⁴²⁾ Neben den natürlichen Diels-Alderase-Ribozymen wurden, wie in Abschnitt 1.1 allgemein erwähnt, auch synthetische Diels-Alderase-Ribozyme entdeckt. Diese werden im nachfolgenden Abschnitt vorgestellt.

1.2.2 Synthetische Diels-Alder-Katalysatoren

Die Fähigkeit zur Katalyse von Diels-Alder-Reaktionen durch synthetisch hergestellte Biomoleküle wurde erstmals an einem Abzym⁶, einem katalytischen Antikörper mit der Bezeichnung 1E9 gezeigt.⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾ Dieser Antikörper katalysiert, wie in Abb. 4 gezeigt, die Reaktion eines Tetrachlorthiophendioxids **5** und *N*-Ethylmaleimid **6** zu dem tricyclischen Additionsprodukt **7**. Unter Abspaltung von SO₂ entsteht aus **7** das Dihydrophthalimid-Derivat **8**, womit eine Produkt-Inhibition des Antikörpers ausgeschlossen wird.

⁶ Zusammengesetzte Bezeichnung aus Antikörper und Enzym

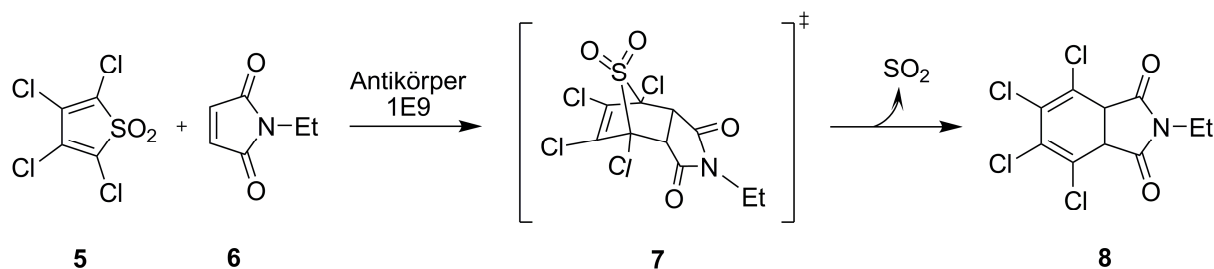


Abb. 4: Katalysierte Reaktion des Antikörpers 1E9 von Tetrachlorothiophenoxid (5) und N-Ethylmaleimid (6) zum tricyclischen Additionsprodukt (7). Das instabile Additionsprodukt (7) reagiert unter Abspaltung von SO_2 zum Produkt (8).

Die umgekehrte Reaktion, in Form einer Retro-Diels-Alder-Reaktion, kann ebenfalls durch Antikörper katalysiert werden, wie die Bildung eines Anthracen-Derivats unter HNO Abspaltung aus einem tricyclischen Molekül durch Abzyme zeigte.⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾

Mit computergestützten Simulationen konnten weitere Enzyme, die die Diels-Alder-Reaktion-Aktivität als bimolekulare Reaktionen mit hoher Stereoselektivität katalysieren, entwickelt werden.⁽⁵²⁾ Vor kurzem konnte so ein Enzym, das die Reaktion von 4-Carboxybenzyl-*trans*-1,3-butadien-1-carbamat **9** als Dien und von *N,N*-Dimethylacrylamid **10** als Dienophil katalysiert, theoretisch simuliert und experimentell untersucht werden, siehe Abb. 5.⁽⁵³⁾

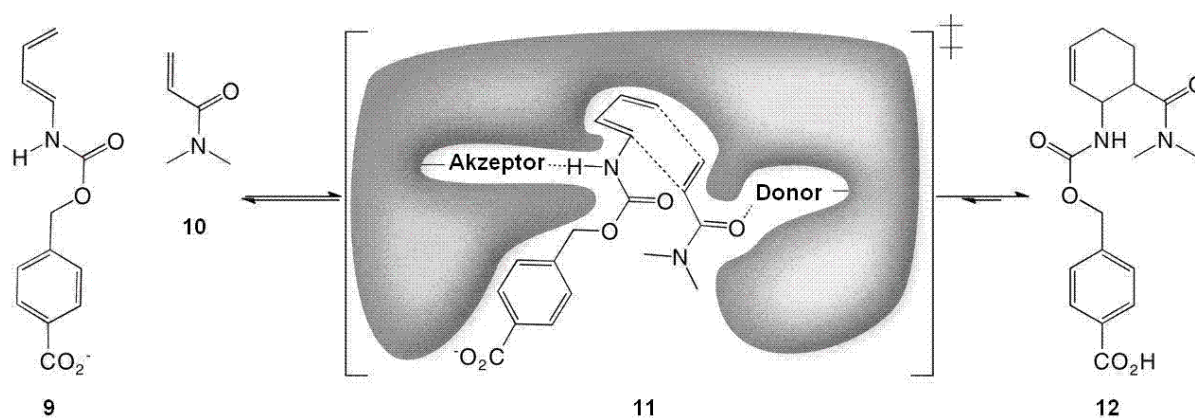


Abb. 5: Katalysierte Diels-Alder-Reaktion zur Bildung eines chiralen Cyclohexens (12) aus 4-Carboxybenzyl-*trans*-1,3-butadien-1-carbamat (9) und *N,N*-Dimethylacrylamid (10). (11) zeigt schematisch die Enzym-Bindungstasche mit Wasserstoff-Brücken-Akzeptor und -Donor zur Aktivierung von Dien und Dienophil. Adaptiert aus Siegel *et al.*⁽⁵³⁾.

84 Strukturen aus der Simulation wurden zur experimentellen Validierung ausgewählt, die codierenden Gene synthetisiert und in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert. Daraus wurden zwei Strukturen nach Bestimmung der Diels-Alder-Reaktivität zur weiteren Optimierung mittels Modifizierung ausgewählt. In der unkatalysierten Reaktion wurden von acht prinzipiell möglichen Isomeren vier experimentell isoliert.⁽⁵⁴⁾

Das entwickelte Enzym synthetisierte hingegen, analog zur Simulation, nur ein Isomer, womit es sich prinzipiell als Katalysator zur Produktion in der chemischen Synthese eignet. Neueste Entwicklungen der computergestützten Simulation mit „semirationalem Screening“ für die in Abb. 5 dargestellte Reaktion beinhalteten zusätzlich Mutagenese, analysierten die Bindungsausbildung und die Übergangszustände und führten somit zu verbesserten Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Substraten. Damit führten sie letztendlich zu einem erhöhten Reaktionsumsatz. Die Ergebnisse zeigten K_M -Werte⁷ im millimolaren Bereich mit guter Übereinstimmung mit den zuvor publizierten experimentellen Daten. Die experimentelle Evaluierung der neuen Simulation steht noch aus.⁽⁵³⁾

Das erste artifizielle Diels-Alderase-Ribozym wurde von Tarasow und Eaton⁽⁵⁵⁾ entwickelt, wobei modifizierte Pyridine und Kupfer-Ionen zur katalytischen Aktivität mit 800-facher Reaktionsbeschleunigung relativ zur unkatalysierten Reaktion erforderlich sind. Wegen der Notwendigkeit der kovalenten Bindung eines Substrats ist dieses Ribozym kein echter Katalysator⁸.⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾

Das echte erste Diels-Alderase-Ribozym wurde von Jäschke und Mitarbeitern selektiert.⁽⁵⁷⁾ Dieses Ribozym wird als Basis für die vorliegende Arbeit, im nächsten Kapitel 1.3 ausführlicher vorgestellt. Analog zum Diels-Alderase-Ribozym der Jäschke-Gruppe wurde aus DNA ein „DNAzym“⁹ mit ähnlicher Diels-Alder-Reaktivität entwickelt.⁽⁵⁸⁾

Die vorgestellten Antikörper und Oligonukleotide zeigen, dass Amino- und Nucleinsäure-Polymere Diels-Alder-Reaktionen katalysieren können, auch wenn von der Natur scheinbar andere Synthesewege bevorzugt werden.

⁷ K_M : Michaelis-Konstante als Angabe der Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit

⁸ Katalysator: Ein Katalysator ist eine Substanz, die eine chemische Reaktion beschleunigt und selbst unverändert aus der Reaktion hervorgeht.

⁹ Zusammengesetzte Bezeichnung aus DNA und Enzym

1.3 Das Diels-Alderase-Ribozym

Das Diels-Alderase-Ribozym wurde von Seelig und Jäschke durch *in vitro* Selektion (SELEX) entdeckt.⁽⁵⁷⁾ Das Ribozym beschleunigt dabei die Reaktion eines RNA-gekoppelten Anthracen-Derivats (Dien) mit einem Maleimid-Derivats (Dienophil) mit bis zu 20000-facher Beschleunigung und hoher Enantioselektivität ($ee > 95\%$).⁽⁵⁹⁾ Ein 49mer konnte als Minimalmotiv identifiziert werden, das die Reaktion von freien Substraten mit multiplem Reaktionsumsatz („multiple turnover“) und hoher Enantioselektivität katalysiert. Die schematische Reaktion für die Substrate 9-Hydroxymethylantracen **13** und *N*-Pentylmaleimid **14** zu Diels-Alder-Produkt **15** zeigt Abb. 6.⁽⁵⁹⁾

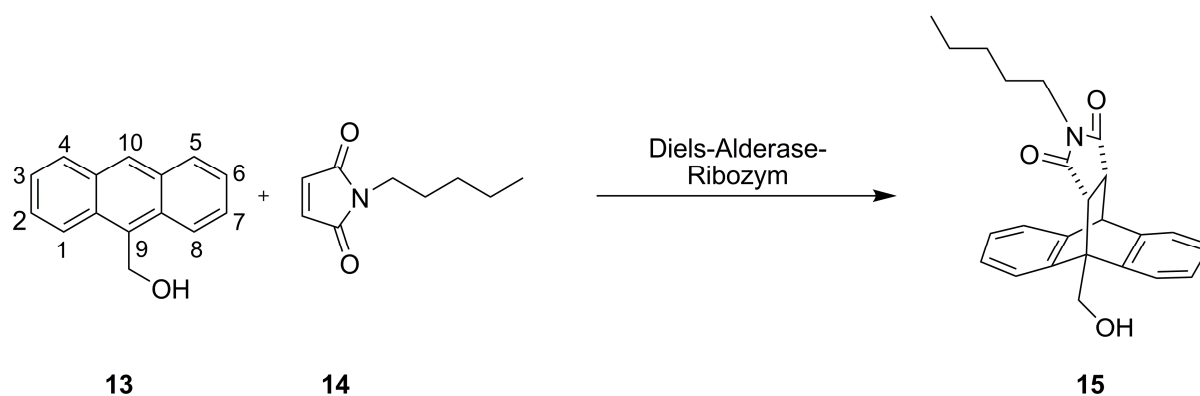


Abb. 6: Katalysierte Reaktion des 49mer Diels-Alderase-Ribozyms zwischen 9-Hydroxymethylantracen (**13**) mit Nummerierung des Anthracen-Gerüsts und *N*-Pentylmaleimid (**14**) als Maleimid-Derivat zu Diels-Alder-Produkt (**15**).

1.3.1 Sekundärstrukturelemente

Das 49mer Minimalmotiv ist aus drei Helices (I, II und III), die durch zwei Schleifen („loops“) (L1 und L2) verbunden sind, aufgebaut. Den zentralen Teil bilden zwei einzelsträngige Bereiche, die eine asymmetrische Ausbuchtung („asymmetric bulge“) aus den Sequenzen UGCCA und AAUACU formen. Ein weiterer formal einzelsträngiger Bereich liegt am 5'-Terminus in Form der GGAG-Sequenz vor, an den für einfachen Reaktionsumsatz („single turnover“) das Anthracen-Substrat über den Polyethylenglykol-Linker gebunden ist. Neben dem einsträngigen 49mer Minimalmotiv (Abb. 7 (A)) konnte auch ein zwei- (38nt + 11nt) und ein dreisträngiges Ribozym (24nt + 18 nt + 11nt) mit linker gebundenem Anthracen durch Hybridisierung der einzelnen Stränge erhalten werden.

Das dreisträngige Ribozym mit verlängerten Helices I und II, siehe Abb. 7 (B), wurde aufgrund der Möglichkeit Änderungen in der Sequenz einfacher vornehmen zu können für Mutationsstudien⁽⁶⁰⁾ auch in dieser Arbeit verwendet.

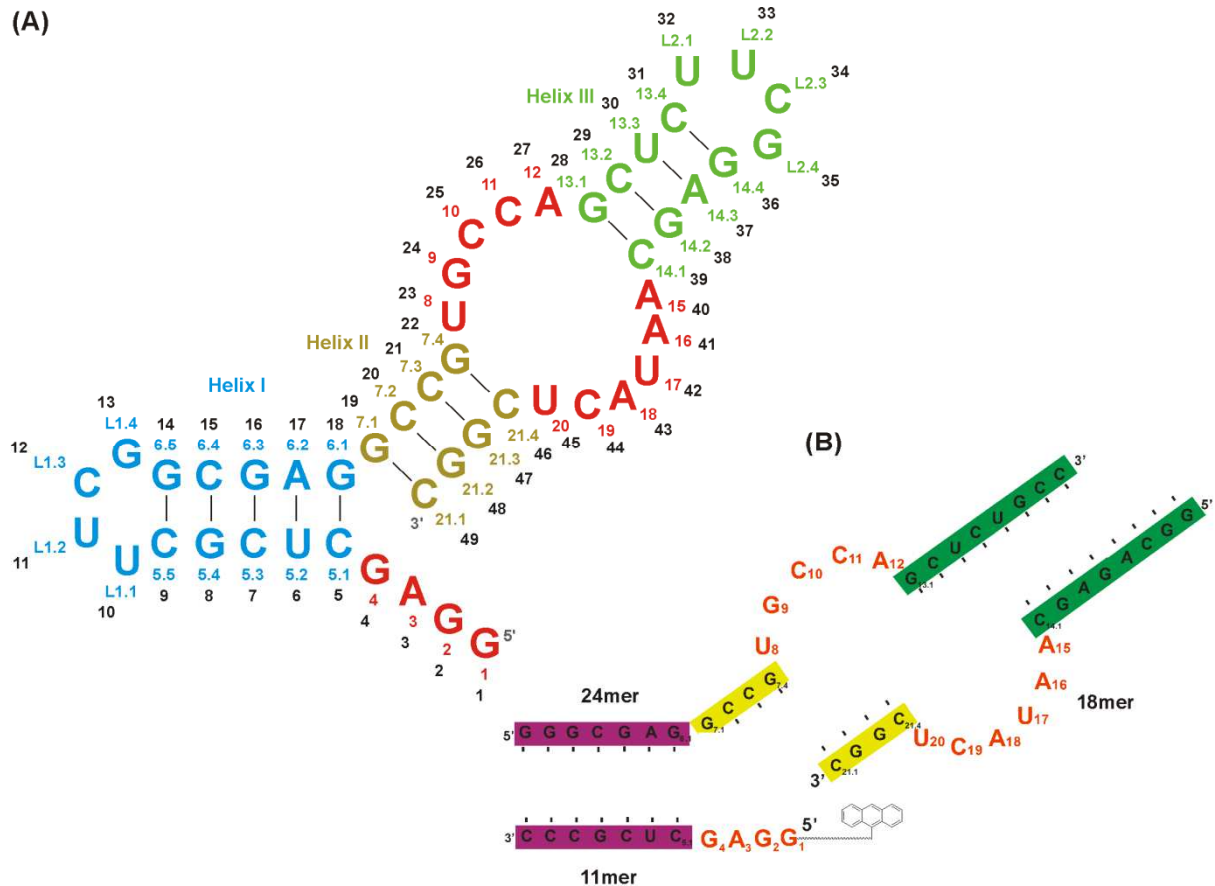


Abb. 7: (A): Die Sekundärstruktur des 49mer Diels-Alderase-Ribozyms mit dem in dieser Arbeit verwendeten, ursprünglichen Nummerierungssystem in farbigen Ziffern und einem fortlaufenden Nummerierungssystem aus Serganov *et al.*⁽⁶¹⁾. (B): Tripartites Diels-Alderase-Ribozym mit linkergebundenem Anthracen für einfachen Reaktionsumsatz („single turnover“). Die Helices I, II, III sind in lila, gelb und grün unterlegt. Rot markierte Nukleotide zeigen die einzelsträngigen Bereiche. Adaptiert aus Keiper *et al.*⁽⁶⁰⁾.

In Mutationsstudien, die dieser Arbeit vorangingen, wurden die einzelsträngigen Bereiche auf ihre katalytische Aktivität untersucht. Dabei zeigte sich ein insgesamt hoher Konservierungsgrad in dem Substitutionen von Nukleotiden zum nahezu oder kompletten Verlust der katalytischen Aktivität führten, dargestellt in Abb. 8. Sechs Nukleotide von G1, G2, U8, C10, C11 und U20 wurden als streng konserviert („conserved“) mit einer Aktivität von < 0.01 der Wildtyp-Aktivität, A3 und G4 als nahezu konserviert mit einer Aktivität < 0.02 bestimmt. Insbesondere der 5'-Terminus zeigt somit einen hohen Konservierungsgrad. Alle streng und nahezu konservierten Nukleotide wurden als in tertiären Wechselwirkungen involviert identifiziert, worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

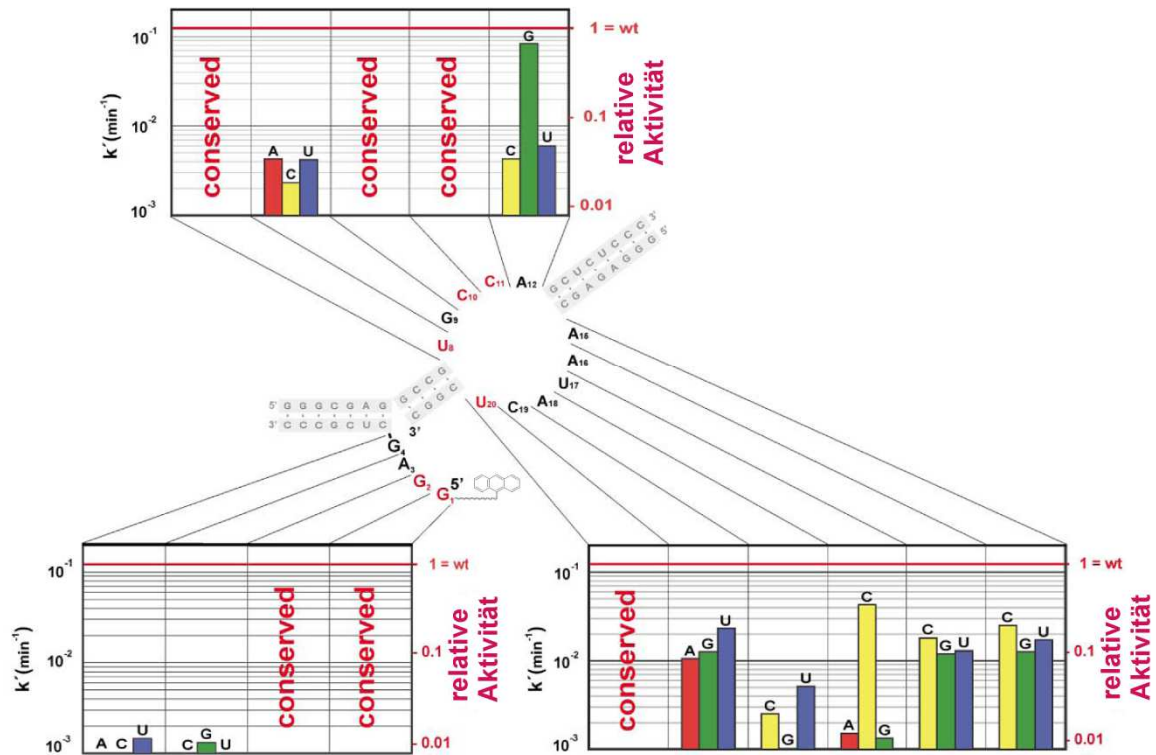


Abb. 8: Bestimmung des Grads der Konservierung der einzelsträngigen Bereiche. Ergebnisse in logarithmischer Skala: rechte Abszisse als relative Aktivität zum Wildtyp, linke Abszisse: Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung ($k'(\text{min}^{-1})$). Adaptiert aus^(60, 62).

1.3.2 Tertiärstrukturelemente

Mit der Aufklärung der Kristallstruktur von freiem und produktgebundenem Ribozym konnte erstmals die dreidimensionale Struktur, deren Form dem griechischen Buchstaben Lambda ähnelt, gezeigt werden.⁽⁶¹⁾ Experimentell bestätigt⁽⁶⁰⁾ wurden zahlreiche postulierte Interaktionen und Eigenschaften des Ribozyms, wie zum Beispiel die vorgeformte katalytische Tasche. Die Kristallstruktur mit gebundenem Diels-Alder-Produkt und einige wichtige strukturelle Elemente, die in den nächsten Abschnitten detaillierter erklärt werden, zeigt Abb. 9. Auffallend ist die Komplementarität der Formen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt, was die hohe Stereoselektivität der Reaktion erklärt. Helix I und III als externe Gerüsthelices liegen etwa in einem Winkel von 100° zueinander, während Helix II als interne Gerüsthelix den unteren Teil der Stapelung („stacking“) mit Helix III bildet. Eine zentrale Rolle bilden die Interaktionen des 5'-Terminus (GGAG-Sequenz), die die Minihelices G1-C11 mit G2-C10 und A3-U20 mit G4-C19 bilden. Sie „umklammern“ die katalytische Tasche und formen somit die als „Dach“ („roof“) und „Boden“ („bottom“) bezeichneten Elemente der katalytischen Tasche.

Die Struktur der beiden Minihelices wird als verschränkter Pseudoknoten^{10, (63)} bezeichnet.

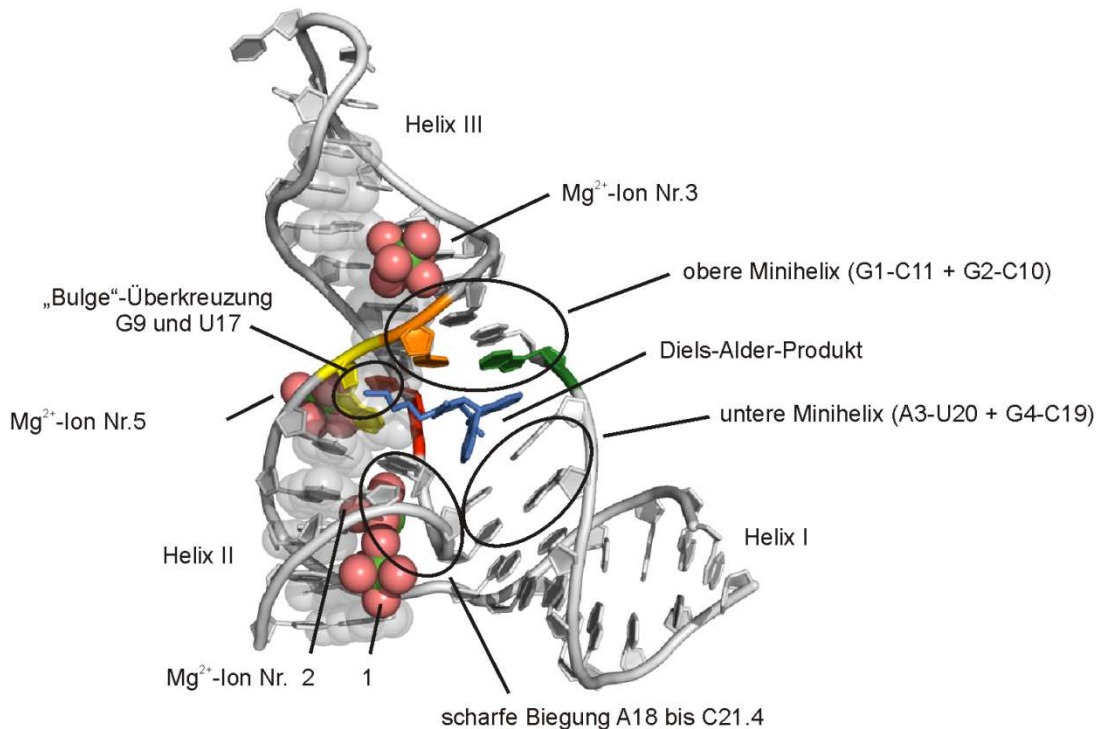


Abb. 9: Tertiärstrukturmodell der Kristallstruktur⁽⁶¹⁾ des Diels-Alderase-Ribozyms mit gebundenem Diels-Alder-Produkt und Darstellung wichtiger struktureller Elemente.

Ein zentrales Element der Tertiärstruktur bildet das „Rückgrat“ („spine“) in Form der Stapelung von Basenpaaren durch hydrophobe Wechselwirkungen, in Abb. 9 als graue Sphären dargestellt. Das „Rückgrat“ durchläuft das gesamte Molekül vom unteren Teil der Helix II durch die Überkreuzung des „Bulges“ an den Nukleotiden G9 und U17 bis zum oberen Ende von Helix III. Beteiligte Nukleotide am Rückgrat aus Helix II sind G7.1 bis G7.4 und aus Helix III in Folge der Überkreuzung C14.1 bis G14.4. Ein weiteres signifikantes strukturelles Element ist die scharfe Biegung gebildet aus den Nukleotiden A18 bis C21.4, die eine fast komplette 360°-Biegung der Sequenz formen. Die benachbarten Nukleotide G7.4 und U8 bilden das Standard-Watson-Crick-Basenpaar G7.4-C21.4 und das reverse Hoogsteen-Basenpaar⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾ U8-A18, welches die Helix II formal um ein Basenpaar verlängert.

In der scharfen Biegung sind die beiden Nukleotide C19 und U20 nach außen gedreht und bilden die beschriebene untere Pseudoknoten-Minihelix, stabilisiert durch Wechselwirkungen der beiden Magnesium-Ionen Nr.1 und 2.

¹⁰ Ein Pseudoknoten besteht minimal aus zwei helikalen Bereichen die durch eine Ausbuchtung oder eine Schleife verbunden sind. Diese Ausbuchtung oder Schleife hybridisiert mit einem anderen komplementären Sequenzabschnitt.

Untersuchungen zur strukturellen Dynamik mittels Einzelmolekül-Förster-Resonanz-Energietransfer (smFRET) und kernmagnetischer Resonanz-Spektroskopie (NMR) offenbarten eine hohe Dynamik des Ribozyms in wässriger Lösung bei Raumtemperatur.⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾

1.3.3 Funktionen mono- und divalenter Ionen

Monovalente Ionen, hauptsächlich in Form von Natriumchlorid eingesetzt, kompensieren die negativen Ladungen der Phosphatgruppen des Phosphatrückgrats von Oligonukleotiden und ermöglichen eine größere Nähe der Phosphatgruppen zueinander. Infolgedessen können tertiäre Oligonukleotid-Strukturen mit hoher räumlicher Nähe ausgebildet werden.⁽⁶⁸⁻⁶⁹⁾ Um die vollständige katalytische Aktivität zu erreichen, benötigen katalytisch-aktive RNAs zusätzlich divalente Metall-Ionen. Diese können direkt an der Katalyse beteiligt sein, wie das erste von Tarasow und Eaton entwickelte synthetische Ribozym, das Kupfer-Ionen zur Katalyse benötigt.⁽⁷⁰⁾ Divalente Ionen können aber auch für die korrekte Faltung und Stabilisierung der Tertiärstruktur benötigt werden ohne direkt in die Katalyse involviert zu sein, wie für Mg^{2+} -Ionen im „Hammerhead“- und im „Hairpin“-Ribozym gezeigt.⁽⁷¹⁻⁷²⁾ Am bedeutendsten unter den divalenten Kationen sind die Mg^{2+} -Ionen, die als frei verfügbare Ionen in einer Konzentration von etwa 1 mM in allen Zellen vorkommen.⁽⁷³⁻⁷⁵⁾ Mg^{2+} -Ionen können spezifisch ohne direkten Kontakt zur RNA, als Magnesium-Hexahydrat über Wasser-Liganden „outersphere“¹¹, oder „innersphere“¹² in direkter Interaktion zwischen Mg^{2+} -Ionen und RNA gebunden sein.⁽⁷⁶⁻⁷⁹⁾ Die exakte Bestimmung von gebundenen Mg^{2+} -Ionen in Oligonukleotiden in Lösung erfordert hochauflösende Methoden, wie zum Beispiel die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie EPR¹³. Bei der EPR werden Elektronenspins ausgerichtet, so dass paramagnetische Ionen in RNA lokalisiert werden können.⁽⁸⁰⁻⁸¹⁾ In der EPR „unsichtbare“ diamagnetische Mg^{2+} -Ionen werden durch paramagnetische Mn^{2+} -Ionen mit ähnlichen Parametern wie Radius, Lewis-Acidität und Koordinationschemie substituiert und führen somit höchstens zu geringfügigen Änderungen in biologischen und chemischen Funktionen.⁽⁸²⁾ Allerdings liegen die Aktivitätsmaxima nicht für alle Ribozyme mit denselben divalenten Ionen vor.

¹¹ „outersphere“: Interaktion der Wasser-Liganden des hydratisierten Metallkomplexes z.B. $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ mit der RNA

¹² „innersphere“: direkte Interaktion des Metall-Ions mit der RNA

¹³ EPR aus „Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy“

Das „Minimal-Hammerhead“-Ribozym zum Beispiel erreicht die höchste katalytische Aktivität nicht analog dem „Hammerhead“-Ribozym mit Mg^{2+} -Ionen, sondern mit Mn^{2+} -Ionen.^(73, 83) Entscheidend für die Stabilität ist die Ladungsdichte der divalenten Ionen, wie für das Tetrahymena-Ribozym in dem die zunehmende Stabilität des gefalteten Zustands mit der zunehmenden Ladungsdichte divalenter Ionen der Erdalkalimetalle einhergeht.⁽⁸⁴⁾ Diese Befunde zeigen die Erfordernis der Bindungs- und Aktivitätsuntersuchungen für jedes einzelne Ribozym auf.

Für einige Ribozyme wurde mit monovalenten Ionen in molarer Konzentration katalytische Aktivität beschrieben. Demzufolge scheinen monovalente Ionen in hoher Konzentration divalente Ionen ersetzen zu können. Für das „Hammerhead-“, das „Hairpin-“ und das „Varkud-Satellite“-Ribozym wurden in Anwesenheit von ausschließlich monovalenten Ionen in Konzentrationen von 1-4 M Li^+ , Na^+ und NH_4^+ -Ionen katalytische Aktivitäten nachgewiesen. Allerdings war die Aktivität um 10-1000-fach verringert im Vergleich zur Aktivität mit divalenten Ionen in millimolaren Konzentrationen. Diese Ergebnisse entsprechen der Erkenntnis, dass monovalente Ionen ein teilweiser Ersatz für divalente Ionen sein können, allerdings ohne die höchste katalytische Aktivität mit divalenten Ionen zu erreichen.^(75, 85-86)

In der Kristallstruktur des Diels-Alderase-Ribozyms wurden 8 Mg^{2+} -Bindungsstellen identifiziert. Die beiden Mg^{2+} -Ionen Nr.7 und 8 sind an intermolekularen Wechselwirkungen im Kristallgitter beteiligt und sollten für die Tertiärstruktur in Lösung nicht relevant sein.⁽⁶¹⁾ Die Mg^{2+} -Ionen Nr.1 und 2 liegen nebeneinander in Helix II in der großen Furche, koordinieren mit dem Phosphodiester-Rückgrat der Nukleotide C19 und U20 und sind an der Kompaktierung von Helix I und II und der Stabilisierung des scharfen Turns beteiligt. Das Mg^{2+} -Ion Nr.3, am Übergang von katalytischer Tasche und Helix III lokalisiert, interagiert mit den Phosphatgruppen der Nukleotide C10 und C11 und stabilisiert somit die obere Pseudoknoten-Minihelix. Das Mg^{2+} -Ion Nr.4 scheint unspezifisch in Helix III gebunden zu sein, Nr.5 interagiert mit G9 und U17, welche die „Bulge-Überkreuzung“ bilden.⁽⁶¹⁻⁶²⁾ Die Konzentration an Mg^{2+} -Ionen konnte als Hauptfaktor der Dynamik und der unterschiedlichen Faltungszustände von ungefaltetem, intermediärem und gefaltetem Zustand bestimmt werden.⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾

In unmittelbarer Nähe der katalytischen Tasche befinden sich keine Mg^{2+} -Ionen, so dass es keine Hinweise für eine direkte Beteiligung an der katalytischen Reaktion gibt.

Zur Lokalisation der Mg^{2+} -Ionen in der Struktur des Diels-Alderase-Ribozym, siehe Abb. 9. Um die Bindungsstellen von Mg^{2+} -Ionen nicht nur in der statischen Kristallstruktur des Ribozyms, sondern auch im katalytisch-aktiven Ribozym in Lösung zu untersuchen, wurden EPR-Messungen mit Mn^{2+} -Ionen als Substitution von in der EPR „unsichtbaren“ diamagnetischen Mg^{2+} -Ionen in einer Kooperation¹⁴ durchgeführt. Da die katalytischen Aktivitäten in Abhängigkeit unterschiedlicher divalenter Ionen abweichen können, wie oben für andere RNA-Moleküle beschrieben, wurden in dieser Arbeit die einzelnen katalytischen Aktivitäten bestimmt. Dazu erfolgte die Bestimmung der katalytischen Ribozym-Aktivitäten mit den divalenten Ionen Mn^{2+} -, Cd^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen konzentrationsabhängig mittels UV/VIS-Spektroskopie, analog den in den EPR-Messungen eingesetzten divalenten Ionen. Die Ergebnisse werden in Kapitel 3.1 beschrieben.

1.3.4 Die katalytische Tasche und intramolekulare Wechselwirkungen

Die spaltenförmige („wedge-shaped“) katalytische Tasche wird von der oberen - (G1-C11 und G2-C10) und der unteren Pseudoknoten-Minihelix (A3-U20 und G4-C19) als „Dach“ und „Boden“ begrenzt. Experimentell wurden für A3-U20 als Basenpaar des „Bodens“ paarweise komplementäre Substitutionen toleriert.⁽⁶⁰⁾ Fast vollständiger Aktivitätsverlust der Modifikation C11isoC¹⁵ mit 0.3% Aktivität und partielle Wiederherstellungs-Experimente („rescue“) der Pseudoknoten-Minihelix durch G1isoG–C11isoC mit 3.1% Wildtyp-Aktivität untermauerten das Bestehen der G1-C11 Interaktion auch in wässriger Lösung.⁽⁶²⁾ Die Verbindung von „Dach“ und „Rückgrat“, als „Aufhängung“ bezeichnet, wird gemäß der Kristallstruktur durch eine einzige Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen dem exocyclischen 4-NH₂ des C10 und dem Carbonyl-Sauerstoff 2-O des U17 gebildet, siehe Abb. 10 (A).^(17, 62) Die wichtige Funktion dieser Interaktionen verdeutlichten Ergebnisse von Substitutions-Experimenten worin G2-C10 durch G2isoG–C10isoC ersetzt wurde. Die Interaktion zu U17 war somit zerstört und führte zu fast völligem Aktivitätsverlust mit nur 0.3% Wildtyp-Aktivität im Vergleich zu den Einzelmutationen von G2isoG von 8% - und C10isoC zu 0.8% Wildtyp-Aktivität.⁽⁶²⁾

¹⁴ Die EPR-Messungen wurden in der Gruppe von Prof. Dr. Schiemann an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main durchgeführt

¹⁵ iso: iso-Nukleotide liegen mit invertierten Seitengruppen der C1 und C4-Position im Vergleich zu ihrem korrespondierenden Nukleotid vor.⁽⁸⁷⁾

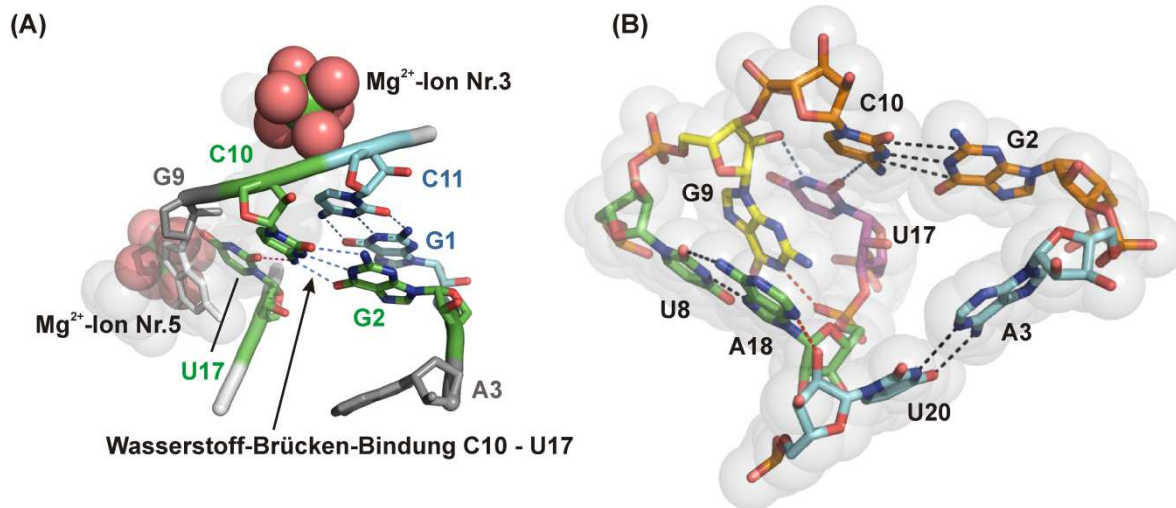


Abb. 10: (A): Interaktionen zwischen U17 - C10 - G2. Die Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen 4-NH₂ des C10 und dem Carbonyl-Sauerstoff 2-O des U17 bildet die Verbindung von „Dach“ (G1-C11 und G2-C10) und „Rückgrat“ (graue Sphären). (B): Katalytische Tasche mit Standard-Watson-Crick-Basenpaarungen und dem reversen Hoogsteen-Basenpaar (schwarz), Wasserstoff-Brücken-Bindungen (blau) und postulierten Interaktionen ohne experimentellen Nachweis (rot).

Weiterhin konnte auch für die Eliminierung dieser Interaktion mittels Substitution von U17 durch isoC17 in atomaren Mutationsstudien völliger Aktivitätsverlust nachgewiesen werden.⁽⁶²⁾ Diese experimentellen Ergebnisse deuten auf die hohe Bedeutung dieser einen Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen C10 und U17 auf die katalytische Aktivität des Ribozyms hin. Die Bedeutung dieser Interaktion auf die strukturellen Eigenschaften des Diels-Alderase-Ribozyms inklusive der Fähigkeit der strukturellen Stabilisierung mit Mg²⁺-Ionen und Diels-Alder-Produkt wurden in dieser Arbeit experimentell mit der Methode des chemischen Probing mit Blei-Ionen untersucht. Mit der Methode des chemischen Probing wird generelle Zugänglichkeit der Phosphodiester-Bindungen und spezifische Metall-Ionen-Koordinationen detektiert, zu detaillierten Erklärungen siehe Abschnitt 1.4.⁽⁸⁸⁻⁹¹⁾

Die Begrenzung der Tasche zu dem Stacking-Bereich von Helix II und III wird durch das reverse Hoogsteen-Basenpaar U8-A18 als „Rückwand“ gebildet, siehe Abb. 10 (B). Das ungepaarte G9 ist zwischen U8 und U17 geschichtet und bildet mit seinem 2'-OH zu 3-NH von U17 eine Wasserstoff-Brücken-Bindung an der „Bulge“-Überkreuzung, siehe Abb. 10 (B). Insgesamt wird die katalytische Tasche somit über ein komplexes Wasserstoff-Brücken-Netzwerk aus acht Nukleotiden gebildet, die in ihrer Form typischen Aktivitätszentren von Enzymen ähnelt.⁽⁶¹⁾

1.3.5 Interaktionen der katalytischen Tasche mit Diels-Alder-Produkt

Alle acht Nukleotide, die das Wasserstoff-Brücken-Netzwerk der katalytischen Tasche bilden, haben direkten Kontakt zum Diels-Alder-Produkt. Aus Substitutions-Experimenten der beiden Watson-Crick-Basenpaarungen G2-C10 und A3-U20^(60, 62) wurde die Funktion des unteren Basenpaares als Stapel-Interaktionen mit dem Dien abgeleitet, während das obere Basenpaar mit beiden Substraten interagiert.

Zwischen dem Ribozym und der Maleimid-Gruppe des Diels-Alder-Produkts wurden drei Wasserstoff-Brücken-Bindungen aus der Kristallstruktur abgeleitet, siehe Abb. 11.

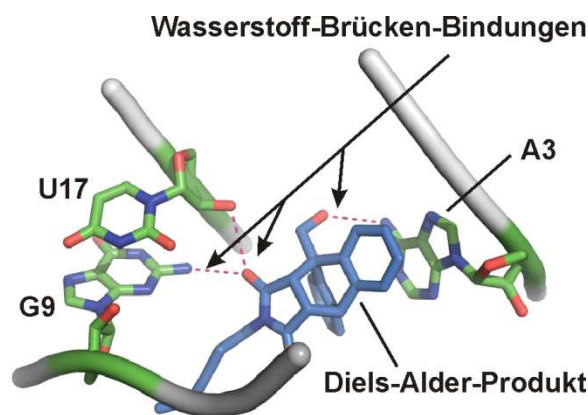


Abb. 11: Wasserstoff-Brücken-Bindungen (aus der Kristallstruktur⁽⁶¹⁾ abgeleitet) zwischen RNA und Diels-Alder-Produkt, in gestrichelten Linien dargestellt: 2-NH₂-Gruppe von G9 und 2'-OH von U17 mit dem Carbonyl-Sauerstoff der Maleimid-Gruppe des Diels-Alder-Produkts und die 6-NH₂-Gruppe des A3 mit erstem Ethersauerstoff des Polyethylenglykol-Linkers des Diels-Alder-Produkts.

Einer der Carbonyl-Sauerstoffe der Maleimid-Gruppe bildet zwei Wasserstoff-Brücken-Bindungen und zwar mit der exocyclischen 2-NH₂-Gruppe des G9 und der 2'-OH-Gruppe des U17. Da die Kristallstruktur nur die Zustände mit und ohne Diels-Alder-Produkt im Kristall, aber nicht mit Substraten und nicht als natives Diels-Alderase-Ribozym in Lösung abbildet, wurden die Interaktionen experimentell mittels atomarer Mutagenese auf ihre katalytische Aktivität untersucht. Im Rahmen kombinatorischer atomarer Mutagenese-Studien mit NAIM^{16 (92)} konnte mit der Deletion der 2-NH₂-Gruppe von G9 durch Inosin-Substitution eine Aktivitätsminderung auf 13% Wildtyp-Aktivität gezeigt werden.

¹⁶ NAIM aus „Nucleotide Analog Interference Mapping“. Thio-Nukleosidtriphosphat-Analoga mit modifizierten Nukleosiden werden statistisch eingebaut, um die Auswirkung atomarer Mutagenese simultan im gesamten Molekül zu untersuchen.

Eine partielle Wiederherstellung durch Substitution mit 2-Aminopurin und Purin zeigte in der semi-quantitativen Aktivitätsbestimmung als Einpunktbestimmung 80% Wildtyp-Aktivität für 2-Aminopurin und 60% für Purin.⁽⁶²⁾ Quantitative, systematische Bestimmungen mit Einzel- und Doppelmутanten für G9 und U17 wurden in dieser Arbeit durchgeführt. Eine weitere Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen der 6-NH₂-Gruppe des A3 mit dem ersten Ethersauerstoff des Polyethylenglykol-Linkers des Diels-Alder-Produkts wurde experimentell als nicht essentiell identifiziert.^(60, 93-94)

Als Substrate werden das Dien in Form eines Anthracen-Grundgerüsts und das Dienophil als *N*-alkyliertes Maleimid mit unsubstituierter Doppelbindung erkannt. Die hydrophobe Seitenkette leistet den Hauptbeitrag der Bindung des Dienophils in der katalytischen Tasche. An der Anthracen-Komponente werden Seitenketten an den Positionen 1, 4, 5, 8, 9 und 10 toleriert, während Substitutionen an den Seiten an 2, 3, 6 und 7 aus sterischen Gründen eine Aktivitäts-Hemmung aufwiesen, dargestellt in Abb. 6.⁽⁹³⁾ Ein Polyethylenglykol-Linker an Position 9 des Anthracens erhöht die Wasserlöslichkeit. Als Standardsubstrate des Diels-Alderase-Ribozyms werden deshalb (9-Anthracenylmethyl)hexaethylenglykol (AHEG) (16) und *N*-Pentylmaleimid (NPM) (17) eingesetzt, siehe Abb. 12.



Abb. 12: Katalysierte Reaktion des 49mer Diels-Alderase-Ribozyms zwischen (9-Anthracenylmethyl)hexaethylenglykol (AHEG) (16) und *N*-Pentylmaleimid (NPM) (17) als Maleimid-Derivat zu Diels-Alder-Produkt (18).

Für das Ribozym mit linker-gebundenem Anthracen wurde je nach Linker-Länge ein Eintritt in die katalytische Tasche durch die „Vorder“¹⁷- oder „Hintertür“ nachgewiesen.⁽⁹⁴⁾

¹⁷ „Vorder“-, „Hintertür“: neben der Öffnung der katalytischen Tasche für den Substratein- und Produktaustritt durch die „Vordertür“, wurde eine kleinere Öffnung auf der „Rückseite“ des Ribozyms experimentell als weitere mögliche Eintrittsöffnung identifiziert und als „Hintertür“ bezeichnet.

Die Katalyse weist eine starke Produkt-Inhibition des Ribozyms auf, wobei die Inhibitionskonstanten aufgrund der hohen Enantioselektivität für die beiden Stereoisomere stark unterschiedliche IC_{50} -Werte¹⁸ von 11 μM für das *R,R*-Produkt und 270 μM für das *S,S*-Produkt ergaben. Die Entfernung der Pentyl-Kette am Maleimid führte zur starken Erhöhung des IC_{50} auf 1300 μM .⁽⁹³⁾ Die noch offene Frage inwiefern die Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt die hohe Produkt-Inhibition verursachen, wurde mittels Aktivitätsstudien in Abhängigkeit der Diels-Alder-Produkt-Konzentration einer Ribozym-Mutante mit beiden zerstörten Interaktionen von G9 und U17 zum Produkt in dieser Arbeit untersucht.

1.4 Strukturelle Untersuchung von RNA durch Probing

Das Prinzip der Untersuchung der strukturellen Eigenschaften von RNA-Molekülen durch chemische Reagenzien oder Enzyme beruht auf der Sensibilität von Nukleotiden und deren Bausteinen gegenüber den eingesetzten Reagenzien und Enzymen. Je nach Reaktionsweise des Reagenz können Rückschlüsse auf die strukturellen Merkmale der zu untersuchenden RNA gezogen werden. Native Bedingungen der RNA verringern durch Ausbildung der intakten Tertiärstruktur meist die Sensibilität. Umgekehrt wird die Sensibilität durch Störung der Tertiärstruktur-Ausbildung erhöht. Dies kann zum Beispiel durch Verringerung oder völlige Abwesenheit von erforderlichen Ionen, meist in Form divalenter Magnesium-Ionen geschehen. Zur enzymatischen Strukturuntersuchung werden Enzyme mit Nukleaseaktivität eingesetzt. RNasen des Typs S1, T1, T2, U2, CL3 und Nuklease von *Neurospora crassa* induzieren Spaltung in ungepaarten Regionen. Die RNase V1 spaltet helikale Strukturen. Je nach Enzymtyp erfolgt die Spaltung basenspezifisch, wie für die RNase T1, die spezifisch einzelsträngige Guanosin-Nukleotide spaltet.⁽⁹⁵⁾ Chemische Reagenzien geben Auskunft über Wasserstoff-Brücken-Bindungen und Basenstapelungen. Dabei modifizieren Agenzien wie CMCT¹⁹ und Kethoxal²⁰ Basen an der Watson-Crick Seite während Diethylpyrocarbonat (DEPC) und Dimethylsulfat (DMS) an der Hoogsteen Seite und Bisulfat am Cytosin modifizieren, siehe Abb. 13 (A).⁽⁹⁵⁾

¹⁸ IC_{50} : mittlere inhibitorische Konzentration; Abkürzung aus: „inhibitory concentration“

¹⁹ CMCT: 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat

²⁰ Kethoxal: β -Ethoxy- α -Ketobutyraldehyd

Eine weitere Methode ist das Probing mit Hydroxylradikalen aus H_2O_2 oder Fe(II)-EDTA , die das RNA-Rückgrat durch Protonenabstraktion an der Ribose spalten und somit die Zugänglichkeit des Rückgrats für das Reagenz aufklären.⁽⁹⁶⁾ Informationen über die Flexibilität der Nukleotide durch spontane, basenkatalysierte Spaltung durch Angriff an der 2'-OH-Gruppe unter Bildung eines 2',3'-cyclischen Phosphats, werden mit der Methode des In-line Probings untersucht, wozu die RNA-Sequenz bei einem schwach alkalischen pH-Wert über viele Stunden inkubiert wird.⁽⁹⁷⁾ In-line Probing ist außerdem eine geeignete Methode zur direkten Struktur-Analyse, für die RNA mit fluoreszenten Farbstoffen modifiziert wurde, wie in unserem Labor gezeigt wurde.⁽⁹⁸⁾ Eine erst vor kurzem entwickelte Methode ist das SHAPE-Probing („Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension“) womit die Flexibilität der Nukleotide und die Dynamik von RNA untersucht werden. Nukleotide mit erhöhter Flexibilität werden dabei durch elektrophile Reagenzien am 2'-OH der Ribose modifiziert, was zu einem Abbruch der reversen Transkription führt und in automatisierten Sequenzierungen analysiert werden kann.⁽⁹⁹⁻¹⁰³⁾

Zur Identifizierung von divalenten Ionenbindungsstellen und Einzelstrang-Regionen, wie Schleifen und Ausbuchtungen oder Regionen mit sterisch hoher Zugänglichkeit eignet sich das chemische Probing mit divalenten Ionen, insbesondere mit Blei(II)-Acetat. Bindungsstellen für zweiwertige Metall-Ionen führen zu intensiver Spaltung, die Einzelstrang-Bereiche zu schwächeren Spaltungen, wobei die Bedingungen so gewählt werden, dass pro Molekül statistisch weniger als eine Spaltung auftritt.⁽⁹⁵⁾ Spaltungen in Doppelsträngen treten hierbei weniger häufig auf.^(88, 95, 104) Die Spaltung erfolgt indem das Metall-Ion in hydratisierter Form als Brönstedt Base reagiert und ein Proton der 2'-OH-Gruppe der Ribose abstrahiert, Abb. 13 (B).

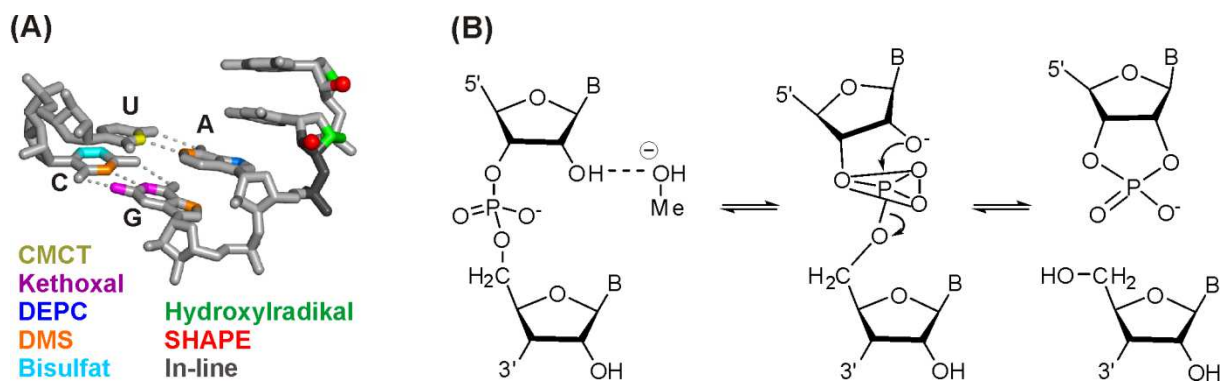


Abb. 13: (A): Probing: Modifikationsstellen der Probing-Methoden an den Nukleobasen und am Rückgrat. Adaptiert aus Weeks⁽¹⁰¹⁾. (B): Mechanismus der RNA-Spaltung durch zweiwertige Metall-Ionen (Me), B: Nukleobase.⁽¹⁰⁴⁾

Das entstandene 2'-O⁻ greift das Phosphoratom unter Bildung eines penta-koordinierten Intermediats an, was zur Spaltung der Phosphatgruppe unter Bildung der Spaltungsprodukte - 2',3'-cyclischem Phosphat und einer 5'-OH-Gruppe - führt, aufgezeigt in.⁽¹⁰⁴⁾

Umgekehrt könnte das Metall-Ion auch als Lewis-Säure Elektronen des 2'-OH aufnehmen, was zu einem nukleophilen Angriff des Phosphoratoms und zur Spaltung führen würde. Die Reaktivität ist abhängig vom pKa-Wert²¹ der Metallhydrate. Pb²⁺-Ionen mit einem pKa 7.2 spalten effizienter als Ionen mit höherem pKa wie z.B. Mg²⁺-Ionen mit einem pKa von 11.4, das nur bei erhöhter Temperatur als Spaltungsagens fungieren kann.⁽¹⁰⁴⁾

1.5 Massenspektrometrie

1.5.1 Massenspektrometrie und Elektrospray-Ionisierung

Das Prinzip der Massenspektrometrie (MS) beruht auf der Generierung von Ionen aus Molekülen, der Trennung der erhaltenen Ionen anhand des „Masse-zu-Ladung“-Verhältnisses (m/z) sowie der Detektion über beispielsweise einen TOF-Detektor²².⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁶⁾

Die Elektrospray-Ionisierung (ESI) zeichnet sich durch hohe Sensitivität, hohe Präzision und eine sehr sanfte Ionisierung für polare Moleküle bei Atmosphärendruck aus und hat aufgrund dessen ein großes Anwendungsgebiet bei Biomolekülen.⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁶⁾ Für die Entwicklung der Elektrospray-Ionisierung als chemische Analysemethode biologischer Makromoleküle wurde John Bennett Fenn 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.^(4, 107) Generell ist die ESI für Analyten mit einem m/z -Verhältnis von ungefähr 50 - 20000⁽¹⁰⁸⁾ geeignet, die durch Protonierung, Deprotonierung und Kationen- oder Anionenlagerung in Lösung in eine ionische Form überführt werden. Insbesondere zur Analyse polarer, großer, nicht-flüchtiger, ionisierbarer Biomoleküle, wie Oligonukleotide und Proteine ist die Elektrospray-Ionisierung eine der am häufigsten eingesetzten Ionisierungsmethoden.⁽¹⁰⁹⁻¹¹²⁾

²¹ Der pKa-Wert ist der Säureexponent des negativen dekadischen Logarithmus der Dissoziationskonstante K_a einer Säure

²² TOF: Abkürzung aus „Time of flight“ Detektor

Neben großen Biomolekülen können auch kleine, polare Moleküle, ionische Metallkomplexe und andere lösliche, anorganische Verbindungen analysiert werden, womit die ESI-Methode ein großes Anwendungsspektrum aufzeigt.^(106, 113-116) Die Ionisierung kann im Positivmodus durch Zugabe von Säure oder im Negativmodus durch Zugabe von Base verbessert werden. Die Erzeugung positiv geladener Ionen zur Bildung von „Quasimolekül-Ionen“ $[M + H]^+$ führt abhängig von Eluent- und Pufferkomponenten zu Addukt-Ionen wie $[M + \text{Alkalielement}]^+$ und $[M + \text{NH}_4]^+$. Vor allem bei größeren Molekülen tritt auch die Bildung mehrfach geladenen Ionen $[M + nH]^{n+}$ auf. Messungen im negativen Modus führen zur Detektion von $[M - H]^-$ und bei Anwesenheit von Anionen zu $[M + \text{Anion}]^-$. Aufgrund ihres Phosphatrückgrats werden DNA- und RNA-Oligonukleotide vorzugsweise im Negativmodus unter Bildung mehrfach geladener $[M - nH]^{n-}$ gemessen.^(106, 117-119)

1.5.2 Kopplung mit Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie

Um mittels Massenspektrometrie (MS) auch komplexe Substanzgemische analysieren zu können, wurden Kopplungen mit Trennungsverfahren entwickelt. Eine weitverbreitete Methode ist die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie - Massenspektrometrie HPLC-MS, in welcher Substanzgemische zuerst flüssigchromatographisch in die Einzelsubstanzen aufgetrennt und diese dann massenspektrometrisch analysiert werden.^(118, 120) Angewandt wird die Methode zur Analyse einer Vielzahl von „kleinen“ Molekülen, wie für Biomoleküle und Biomarker⁽¹²¹⁻¹²³⁾, Toxine⁽¹²⁴⁾, sowie zum Nachweis psychoaktiver Substanzen⁽¹²⁵⁾, zudem zur Analyse von Verunreinigungen wie für Pharmazeutika.⁽¹²³⁾ Für die Molekülgruppe der Proteine hat die LC-MS-Analyse ein etabliertes Anwendungsgebiet und ermöglicht die Analyse und Diagnose bakterieller human-letaler Proteintoxine wie für *Bacillus anthracis* und *Clostridium botulinum*.⁽¹²⁶⁾

Oligonukleotide mit ihrer hohen negativen Ladung werden mittels Ionenpaarreagenzien zur HPLC-Trennung und ESI in der LC-MS analysiert^(120, 127). Möglich ist auch die Analyse modifizierter Oligonukleotide, wie für NAD-gebundener RNA nach Nukleaseverdau.⁽¹²⁸⁾

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die ribozym-katalysierte und unkatalysierte Diels-Alder-Reaktionen mittels LC-MS untersucht werden. Das Augenmerk sollte hierbei insbesondere darauf gelegt werden Produkte welche auf Nebenreaktionen schließen lassen zu identifizieren.

Dazu sollte die LC-MS geeignet sein, da sie in hoher Präzision und Sensitivität sowohl Ergebnisse über die Reinheit von Substanzen sowie über Moleküle von Nebenreaktionen erzeugen kann. Die LC-MS ist insbesondere auch für Moleküle, die nicht UV/VIS-aktiv sind und somit nicht über die Standard-HPLC detektiert werden können, eine geeignete Methode. Für AHEG als Anthracen mit hydrophilem Hexaethylenglykol-Linker wurde die direkte Ionisierbarkeit, ähnlich der für die OH-PAHs beschriebenen, erwartet. Zur Detektion der Edukte und Produkte ohne Interferenz mit Ribozym-Signalen sollte die Methode zur Detektion der Moleküle der Diels-Alder-Reaktion allerdings im positiven Ionisierungsmodus entwickelt werden.

1.6 Anthracen und Reaktionen mit Sauerstoff

Für Anthracen und dessen Derivate sind Reaktionen mit Sauerstoff in der Literatur beschrieben. Solche Reaktionsprodukte könnten zur in mehreren vorhergehenden Experimenten²³ festgestellten Diskrepanz der AHEG-Abnahme und Diels-Alder-Produkt-Zunahme der Diels-Alder-Reaktion als Nebenreaktionsprodukte beitragen und sollten deshalb in dieser Arbeit mittels LC-MS-Analyse untersucht werden. Interessant sind dabei Reaktionen mit Luftsauerstoff und mögliche Reaktionen durch UV-Bestrahlung, die durch Tageslicht und im Rahmen von UV/VIS-spektroskopischen Untersuchungen auftreten könnten.

Polynukleare aromatische Moleküle wie Anthracen werden durch hohe Absorption von UV-Licht in den angeregten Zustand versetzt und wandeln Sauerstoff aus dem Triplett- in den Singulett-Zustand um. Wie in Abb. 15 dargestellt, reagieren diese Singulett-Sauerstoffatome mit dem Anthracen **23** zu Endoperoxid **25**. Bestrahlung mit $\lambda > 340$ nm führte zur Bildung von Anthrachinon **26**, die Bestrahlung von Anthracen-Dimeren unter Zerstörung der Dimere zur Bildung von Endoperoxiden und Anthrachinonen. Es wurde gezeigt, dass die Dimerisierung durch Substitutionen an den Positionen 9 und 10 wie in 9,10-Dimethylantracen verhindert ist.⁽¹²⁹⁾ Seitengruppen an den Positionen 9 und 10 wie für 1,4-Dimethoxy-9,10-diphenylantracen **19** verminderten, aber verhinderten die Endoperoxid-Bildung nicht. Das 1,4-Endoperoxid **20** dieses Moleküls zeigte eine hohe Sensitivität gegenüber Säuren und führte durch intramolekulare Umlagerung zur Bildung von Dioxetan **21** und final zu Aldehydestern **22**, wie in Abb. 14.⁽¹³⁰⁾

²³ Unpublizierte Daten

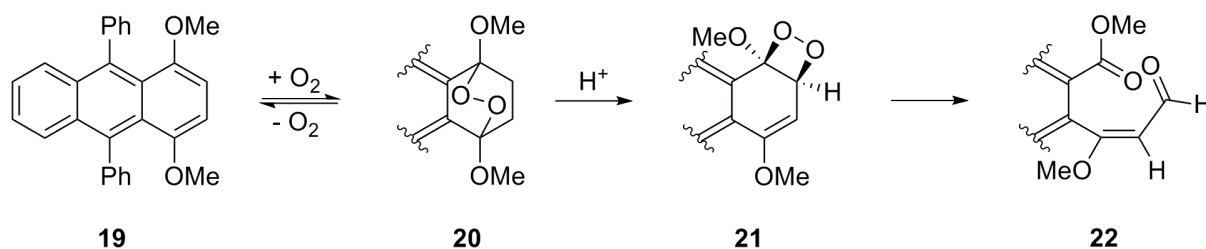


Abb. 14: Reaktion von 1,4-Dimethoxy-9,10-diphenylanthracen (**19**) zu dem korrespondierenden 1,4-Endoperoxid (**20**) und die säurekatalysierte Umlagerung zum Dioxetan (**21**) und final zum Aldehydester (**22**).⁽¹³⁰⁾

Reaktionen von Endoperoxiden unter aciden Bedingungen waren für diese Arbeit von Interesse, da bei der LC-MS-Analyse im Eluent-System mit Zusatz von Ameisensäure zur Verbesserung der Ionisierung leicht acide Bedingungen vorlagen.

Aus Anthracen **23**, siehe Abb. 15, wurden durch UV-Absorption bei 365 nm mit O_2 unter erhöhtem Druck durch photochemische Reaktionen die Hauptprodukte 9,10-Endoperoxid (*endo*-9,10-Epidioxyanthracen) **25**, 9,10-Anthracen-Dimer **24** und 9,10-Anthrachinon **26** gebildet.⁽¹³¹⁾ In mit Sauerstoff angereicherterem Wasser reagierte Anthracen **23** in einer Konzentration von 300 nM durch die Photolyse bei 350 nm zu den primären Hauptprodukten Endoperoxid **25** und 9,10-Anthrachinon **26**. Die Konzentration von Anthracen entsprach dabei einer um 330-fach verringerten Konzentration zu in dieser Arbeit eingesetztem 100 μ M AHEG.

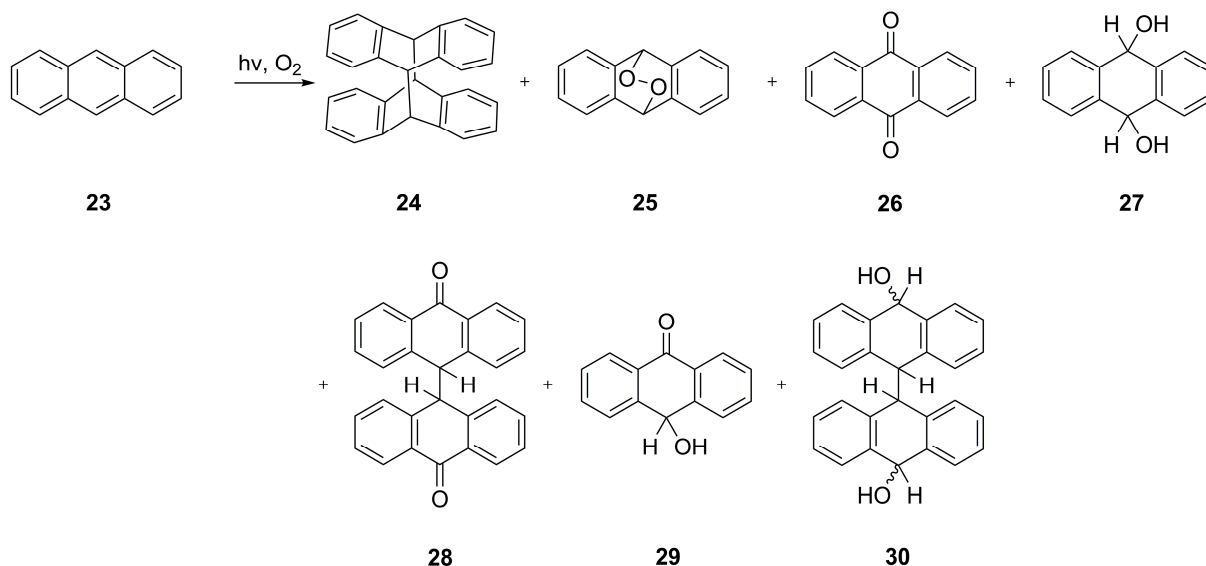


Abb. 15: Bildung der Reaktionsprodukte aus Anthracen (**23**). Unter UV-Bestrahlung bei 365 nm und mit O_2 entstanden 9,10-Endoperoxid (**25**); 9,10-Anthracen-Dimer (**24**) und 9,10-Anthrachinon (**26**). Bestrahlung bei 350 nm in sauerstoffangereicherterem Wasser lieferte 9,10-Endoperoxid (**25**), 9,10-Anthrachinon (**26**), 9,10-Dihydro-9,10-Dihydroxyanthracen (**27**) und 9-Hydroxyanthron (**29**). In wässriger, entgaster Lösung entstand das Dimer 10,10'-Dihydroxy-9,9',10,10'-Tetrahydro-9,9'-Bianthryl (**30**). Thermolyse des Endoperoxid (**25**) führte zur Bildung von (**26**), (**27**), Bianthronyl (**28**), (**29**) und (**30**). Adaptiert aus Sigman *et al.*⁽¹³²⁾.

Als weitere Produkte wurden 9,10-Dihydro-9,10-Dihydroxyanthracen **27** und 9-Hydroxyanthron **29** als Reaktionsprodukte identifiziert. In wässriger, entgaster Lösung führte die Photolyse von Anthracen **23** zur Bildung der Anthracen-Dimere 1,10'-Dihydroxy-9,9',10,10'-Tetrahydro-9,9'-Bianthryl **30**. Der Vergleich der Photolyse bei 350 nm in Luft- und entgaster Atmosphäre mit oberflächengebundenem Anthracen **23** wies in der entgasten Atmosphäre als einziges Produkt das Anthracen-9,10-Dimer **24** auf. Unter Luftatmosphäre traten die Photooxidation als Haupt- und die Photodimerisierung als Nebenreaktion mit dem Hauptprodukt von Anthracen-9,10-Endoperoxid **25** auf. Für **25** wurde eine langsame thermale Umwandlung bei Raumtemperatur in 9,10-Anthrachinon **26**, 9,10-Dihydro-9,10-Dihydroxyanthracen **27**, Bianthronyl **28**, 9-Hydroxyanthron **29** und 10,10'-Dihydroxy-9,9'-10,10'-Tetrahydro-9,9'-Bianthryl **30** als sekundäre Produkte beschrieben.⁽¹³³⁾ Die letztgenannte Verbindung ist identisch zu dem in Sigman *et al.*⁽¹³²⁾ beschriebenen Produkt durch Photolyse aus Anthracen in wässriger, entgaster Lösung, was die Möglichkeit der Entstehung dieser Moleküle auch aus AHEG in den Experimenten für diese Arbeit indizierte.

Das Auftreten der Hydroxylierung an der C9-substituierten Position, wurde für eine C9-Benzyl-Substitution beschrieben. Dabei wurde die Oxidationsreaktion der modifizierten Anthracene 9-Ethyl- und 9-Benzylanthracen **31** mit $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ in einer Lösung aus Acetonitril und H_2O über einen kationischen Radikalmechanismus unter Bildung von 10-Ethyl- bzw. 10-Benzyl-10-Hydroxy-9-(10H)-Anthracenon **32** nachgewiesen, siehe Abb. 16.⁽¹³⁴⁾ Übertragen auf das AHEG als Anthracen mit Hexaethylenglykol-Substitution in Position 9 zeigte diese Reaktion die Möglichkeit der zusätzlichen Hydroxylierung an dieser Position auf.

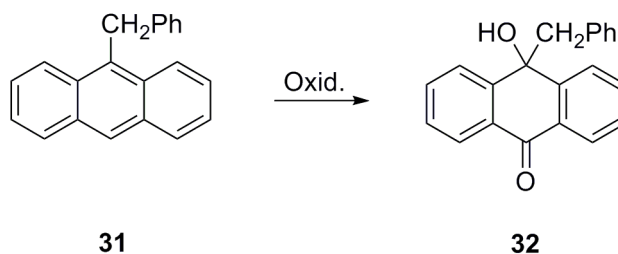


Abb. 16: Reaktion von 9-Benzylanthracen (**31**) in einer Oxidationsreaktion mit $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ zu 10-Benzyl-10-Hydroxy-9-(10H)-Anthracenon (**32**). Adaptiert aus Fukuzumi *et al.*⁽¹³⁴⁾.

Fragmentation von Endoperoxiden durch Photo- und Thermolyse

Zur Aufklärung von Nebenreaktionen sind auch Reaktionen von Endoperoxiden in wässrigen Lösungen und photochemische Reaktionen durch UV-Bestrahlung insbesondere an den Absorptionsmaxima von AHEG bei 254 und 365 nm relevant. Eine Übersicht der Reaktionsprodukte gibt Abb. 17. Die Rückreaktion des Endoperoxid **33** zu Anthracen **34** und molekularem Singulett-Sauerstoff wurde erstmals durch Thermolyse bei hohen Temperaturen um 100°C auf Festphasen und später auch durch Photolyse mittels photochemischer Reaktion eines biradikalischen Mechanismus beschrieben.⁽¹³⁵⁻¹³⁸⁾ Es wurde gezeigt, dass wellenlängenabhängig unterschiedliche Produkte aus Endoperoxiden **33** entstehen. 254 nm führten zur Cycloreversion, Bestrahlung bei 350 nm erzeugte Produkte durch homolytische O-O-Spaltung wie Diepoxide **35** und daraus abgeleitete Produkte.⁽¹³⁹⁻¹⁴⁰⁾

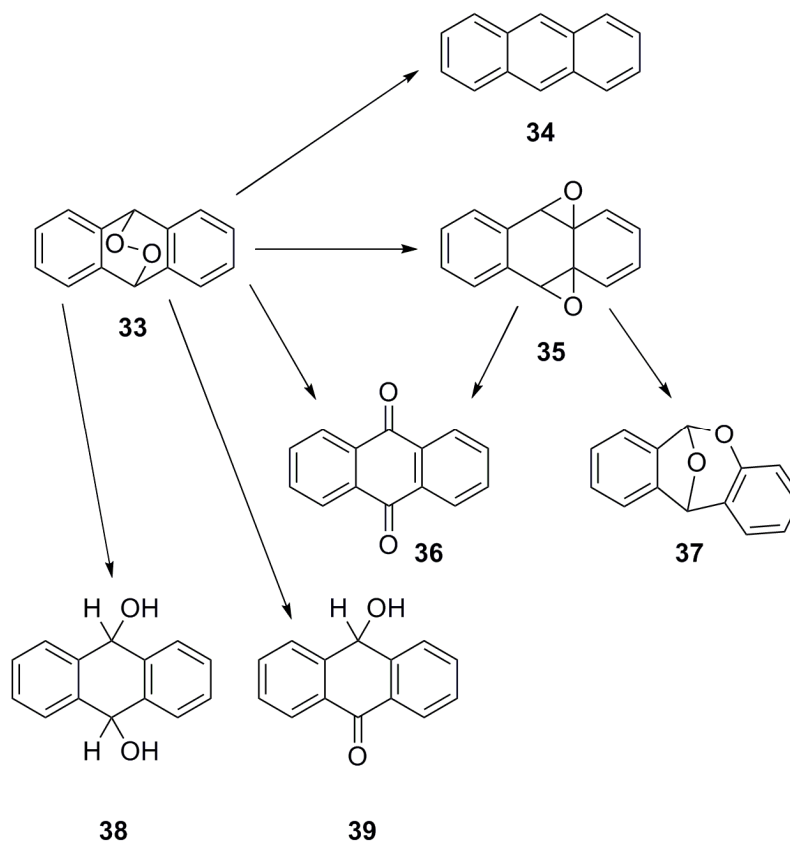


Abb. 17: Reaktionen von Endoperoxiden (**33**) durch Photo- und Thermolyse. Die Cycloreversions-Reaktion erzeugte Anthracen (**34**). Unterschiedliche Bedingungen führten zur Bildung von Diepoxid (**35**), Anthrachinon (**36**), bicyclischem Acetal (**37**), 9,10-Dihydro-9,10-Dihydroxyanthracen (**38**) und 9-Hydroxyanthron (**39**). Adaptiert aus Fidler *et al.*⁽¹⁴¹⁾.

Endoperoxide aus 9,10-Diphenyl- und 9,10-Dimethyl-9,10-Epidioxyanthracen reagierten unter reduzierenden Bedingungen zu den korrespondierenden 9,10-Dihydroxyanthracenen **38** und unter ausreichend reduzierenden Eigenschaften final zu 9-Phenoxy-10-Phenylanthracen.⁽¹⁴⁰⁾ Aus Anthracen-9,10-Endoperoxid **33** in Acetonitril entstand unter Bestrahlung von 240-450 nm das Diepoxid **35** als primäres Hauptphotoprodukt. Anthracen **34** wurde nur durch Bestrahlung von Wellenlängen kleiner 320 nm in der Cycloreversions-Reaktion gebildet.

Als sekundäre Hauptprodukte entstanden Anthrachinon **36** und ein bicyclisches Acetal **37**. Thermolyse bei Raumtemperatur von Anthracen-9,10-Endoperoxid **33** führte im Zeitraum von 1-2 Wochen nur zur Bildung von Anthrachinon **36**. Die Bildung von Anthrachinon aus Diepoxid **35** und Endoperoxid **33** als sekundäres Minorprodukt erfolgte durch Bestrahlung bei 360 nm. Das Diepoxid isomerisierte bei $\lambda \leq 310$ nm zu bicyclischem Acetal **37**. Die Bestrahlung von Endoperoxid in hoher Konzentration von 5 mM bei 350 und 360 nm führte zur Bildung weiterer Produkte wie 9,10-Dihydroxy-9,10-Dihydroxyanthracen **38** und 9-Hydroxyanthron **39**.⁽¹⁴¹⁾

2. Zielsetzung

Eine Aufgabe dieser Arbeit besteht in der Aufklärung der Bedeutung von Wasserstoff-Brücken-Bindungen (H-Brücke) innerhalb der katalytischen Tasche des Diels-Alderase-Ribozyms sowie zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt. Insbesondere sollen deren Einflüsse auf die strukturellen Eigenschaften, die katalytische Aktivität und die hohe Produkt-Inhibition auf das Ribozym im nativen Zustand in Lösung bestimmt werden. Dazu sollen mittels atomarer Mutagenese Ribozym-Mutanten ohne diese H-Brücken-Bindungen im Vergleich zum Wildtyp-Ribozym eingesetzt werden. Die Bedeutung der H-Brücken-Bindung, die die einzige Verbindung zwischen „Dach“ und „Rückgrat“ der katalytischen Tasche bildet, soll auf ihre strukturelle Relevanz mit der Methode des chemischen Probing mit Blei-Ionen untersucht werden. Eine Ribozym-Mutante ohne diese H-Brücke zeigte in einer früheren Arbeit völligen Verlust der katalytischen Aktivität.

In Bezug auf die H-Brücken-Bindungen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt von G9 und U17 mit der Maleimid-Komponente des Produkts soll deren Bedeutung auf die katalytische Aktivität quantitativ ermittelt werden. Erste halb-quantitative Bestimmungen einer früheren Arbeit mit Ribozym-Mutanten ohne diese beiden H-Brücken zeigten verminderte katalytische Aktivitäten. Zur quantitativen Bestimmung der katalytischen Aktivitäten sollen radioaktiv-markierte Ribozym-Mutanten ohne eine der zwei H-Brücken oder ohne beide H-Brücken als Einzel- und Doppelmутanten im Vergleich zum Wildtyp-Ribozym in einem gelelektrophoretischen Assay untersucht werden.

Für die beiden H-Brücken zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt wird der Zusammenhang mit der hohen Produkt-Inhibition des Diels-Alderase-Ribozyms vermutet. Bisher wurde diese nur für das Wildtyp-Ribozym nachgewiesen und bestimmt. Der Einfluß dieser beiden H-Brücken auf die Produkt-Inhibition des Ribozyms soll mit einer Ribozym-Mutante ohne beide H-Brücken im Vergleich zum Wildtyp-Ribozym quantitativ mittels einem UV/VIS-spektroskopischen Assay ermittelt werden.

Die katalytische Aktivität des Ribozyms in Abhängigkeit von Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und Cd^{2+} -Ionen soll mit einem UV/VIS-spektroskopischen Assay quantifiziert werden. Diese Ergebnisse sollen Studien zum Bindungsverhalten dieser Ionen mit dem Ribozym, die von der Gruppe von Prof. Dr. Olav Schiemann an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main durchgeführt werden, ergänzen. Somit soll der Zusammenhang der Bindungsaffinität der Ionen und der katalytischen Aktivität aufgeklärt werden.

Eine weitere Aufgabe besteht in der Untersuchung der Diels-Alder-Reaktion auf Nebenreaktionen. In früheren Arbeiten wurden qualitative Hinweise auf Nebenreaktionen des Anthracen-Substrats gefunden, indem das Anthracen-Edukt eine stärkere Abnahme im Vergleich zur Zunahme des Diels-Alder-Produkts zeigte. Bisher konnten allerdings keine Nebenreaktionsprodukte identifiziert werden. In dieser Arbeit sollen die Abnahme des Anthracen-Edukts und die Zunahme des Diels-Alder-Produkts mittels HPLC-Analyse quantifiziert und die ribozym-katalysierte Reaktion von der Hintergrundreaktion differenziert werden. Bei einer quantifizierten Diskrepanz der Edukt-Abnahme und Produkt-Zunahme sollen Nebenreaktionsprodukte mittels HPLC oder LC-MS-Analyse identifiziert und somit Nebenreaktionen aufgeklärt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ribozym-Aktivität in Abhängigkeit divalenter Ionen

Das Diels-Alderase-Ribozym benötigt zur hohen katalytischen Aktivität mono- und divalente Ionen.⁽⁵⁷⁾ Im Standard-Assay werden 300 mM Na⁺- und 80 mM Mg²⁺-Ionen, entsprechend ungefähr 43000 und 11500 Äquivalenten an Ionen zu RNA, zum Erreichen der maximalen katalytischen Aktivität eingesetzt. Um die Bindungsstellen divalenter Ionen nicht nur in der statischen Kristallstruktur des Ribozyms, sondern auch im katalytisch-aktiven Ribozym in Lösung aufklären zu können, wurden in einer Kooperation²⁴ Messungen mittels Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (EPR) durchgeführt. In der EPR-Spektroskopie werden Elektronenspins angeregt, womit die Bindungsstellen paramagnetischer Ionen in Proteinen und Oligonukleotiden in Lösung bestimmt werden können.^(80-81, 83, 142) Zur Substitution von diamagnetischen und daher in der EPR „unsichtbaren“ Mg²⁺-Ionen wurden Mn²⁺-Ionen eingesetzt. Der Zusatz von ebenfalls diamagnetischen Cd²⁺-Ionen mit höherer Affinität zu RNA als Mn²⁺-Ionen erfolgte zur spektroskopischen Charakterisierung jeder einzelnen Metall-Ionen-Bindungsstelle der verbliebenen gebunden Mn²⁺-Ionen.⁽¹⁴³⁾ In früheren Aktivitätsstudien des Diels-Alderase-Ribozyms mit einfachem Reaktionsumsatz trat in Anwesenheit von Mn²⁺-Ionen keine Änderung der katalytischen Aktivität auf.⁽⁵⁷⁾ Die Relevanz der divalenten Ionen für die katalytische Aktivität des Diels-Alderase-Ribozyms als Einstrang 49mer mit multipltem Reaktionsumsatz in Abhängigkeit der drei divalenten Ionen und ihrer Konzentrationen wurde in dieser Arbeit mittels UV/VIS-spektroskopischem Aktivitätsassay untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse über die Ionen-Bindung und die katalytische Aktivität wurden zur Aufklärung ihrer Bedeutung in Bezug zueinander gesetzt.

²⁴ Die EPR-Messungen wurden in der Gruppe von Prof. Dr. Schiemann an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main durchgeführt

3.1.1 Quantifizierung der Ribozym-Aktivitäten

Die Ribozym-Aktivität in Abhängigkeit der divalenten Ionen Magnesium Mg^{2+} -, Mangan Mn^{2+} - und Cadmium Cd^{2+} -Ionen wurden als Reaktionen mit multipltem Reaktionsumsatz mit (9-Anthracenylmethyl)hexaethylenglykol (AHEG) **16** als Dien und *N*-Pentylmaleimid (NPM) **17** als Dienophil zum Diels-Alder-Produkt **18** durchgeführt. Die Reaktion zeigt schematisch Abb. 12.

Bestimmt wurde die Abnahme der AHEG-Konzentration photometrisch bei 365 nm innerhalb der linearen Absorptionsabnahme. Aus den ersten 5% Reaktionsumsatz wurde die Geschwindigkeitskonstante $k [M^{-1} s^{-1}]$ der Reaktion zweiter Ordnung aus Doppelbestimmungen ermittelt. Die Übersicht der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit der drei divalenten Ionen und Ionen-Kombinationen stellt Abb. 18 dar.

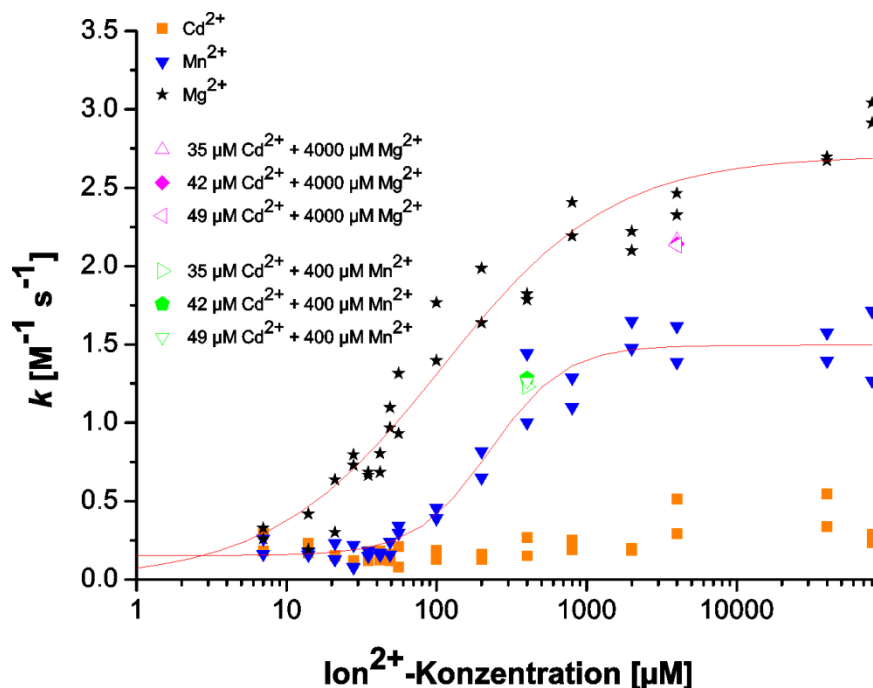


Abb. 18: Übersicht der photometrischen Aktivitätsbestimmung als Auftragung der Geschwindigkeitskonstante $k [M^{-1} s^{-1}]$ in Abhängigkeit divalenter Ionen von 0-80 mM mit Mg^{2+} - (schwarz), Mn^{2+} - (blau) und Cd^{2+} -Ionen (orange) aus Doppelbestimmungen mit beiden ermittelten aufgetragenen Werten, Gemische aus 35, 42 und 49 $\mu M Cd^{2+} + 4000 \mu M Mg^{2+}$ (magenta), 35, 42 und 49 $\mu M Cd^{2+} + 400 \mu M Mn^{2+}$ (grün). Der sigmoidale Kurvenfit (rote Linie) wurde für die Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Bestimmungen erstellt und daraus $K_M [\mu M]$ ermittelt. Publiziert in⁽¹⁴³⁾.

In Abhängigkeit der Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen wurde jeweils aus dem sigmoidalen Kurvenverlauf für $k [M^{-1} s^{-1}]$ für jedes Ion dessen Konzentration der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit, $K_M [\mu M]$ ²⁵ berechnet.

²⁵ K_M : Michaelis-Konstante als Angabe der Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit

K_M [μM] wurde in Kisseleva *et al.*⁽¹⁴³⁾ als $K_{1/2}$ [μM] bezeichnet.

Für Mg^{2+} -Ionen wurde K_M zu 150 μM ermittelt, korrespondierend zu 21 Mg^{2+} -Ionen pro RNA-Molekül. Mn^{2+} -Ionen reduzierten die Ribozym-Aktivität um die Hälfte und führten zur Erhöhung von K_M auf 200 μM , 29 Mn^{2+} -Ionen pro Ribozym entsprechend. Cd^{2+} -Ionen als alleinige eingesetzte divalente Ionen führten zur Inaktivierung des Diels-Alderase-Ribozyms. 5, 6 und 7 Äquivalente Cd^{2+} -Ionen (entsprechend den Konzentrationen von 35, 42 und 49 μM) in Kombination mit 571 Äquivalenten Mg^{2+} -Ionen oder 57 Äquivalenten Mn^{2+} -Ionen führten nur zu einer minimalen Aktivitätsminderung des Diels-Alderase-Ribozyms.

Die Ergebnisse der Verminderung der Ribozym-Aktivität um die Hälfte in Folge der Substitution von Mg^{2+} - durch Mn^{2+} -Ionen und der Aktivitätsverlust durch Cd^{2+} -Ionen indizierten, dass eine Bindung von Ionen mit hoher Affinität nicht alleine für die katalytische Aktivität ausreichend ist, sondern weitere Interaktionen zwischen RNA und Metall-Ionen erforderlich sind. Die nur minimal verringerte katalytische Aktivität in den Gemischen von Cd^{2+} -Ionen + Mg^{2+} -Ionen und Cd^{2+} -Ionen + Mn^{2+} -Ionen bestätigten, dass die Verwendung von Cd^{2+} -Ionen in Kombination mit anderen divalenten Ionen nicht zu katalytisch inaktiven Ribozym-Strukturen führte. Folglich konnten Cd^{2+} -Ionen in den EPR-Experimenten zur Bestimmung von Metall-Ionen-Bindungsstellen in der intakten Ribozym-Struktur eingesetzt werden und ermöglichten somit die Methode zur Bestimmung multipler Metall-Ionen-RNA-Interaktionen.⁽¹⁴³⁾ Die Ergebnisse wurden in⁽¹⁴³⁾ publiziert.

3.1.2 Korrelation der divalenten Ionenbindungsstellen mit kristallographischen Daten

Die EPR-Messungen des Diels-Alderase-Ribozyms mit paramagnetischen Mn^{2+} -Ionen als Ersatz von Mg^{2+} -Ionen ergab fünf Bindungsstellen divalenter Ionen von hoher Affinität zum Ribozym mit einer Dissoziationskonstante von $K_d \leq 0.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$, geordnet nach den Positionen anhand der Affinität von $1 > 2 \cong 3 > 4 > 5$. Diese fünf Bindungsstellen sollten den fünf Bindungsstellen, die für das Ribozym in Lösung aus den acht in der Kristallstruktur identifizierten Mg^{2+} -Ionen-Bindungsstellen abgeleitet wurden, entsprechen, siehe Abb. 19. Von den drei anderen wurden die beiden Mg^{2+} -Ionen Nr.7 und 8 intermolekulare Wechselwirkungen im Kristallgitter und das Mg^{2+} -Ion Nr.4 als unspezifisch in Helix III gebunden zugeordnet und sollten somit für die Tertiärstruktur in Lösung keine Relevanz besitzen.⁽⁶¹⁾

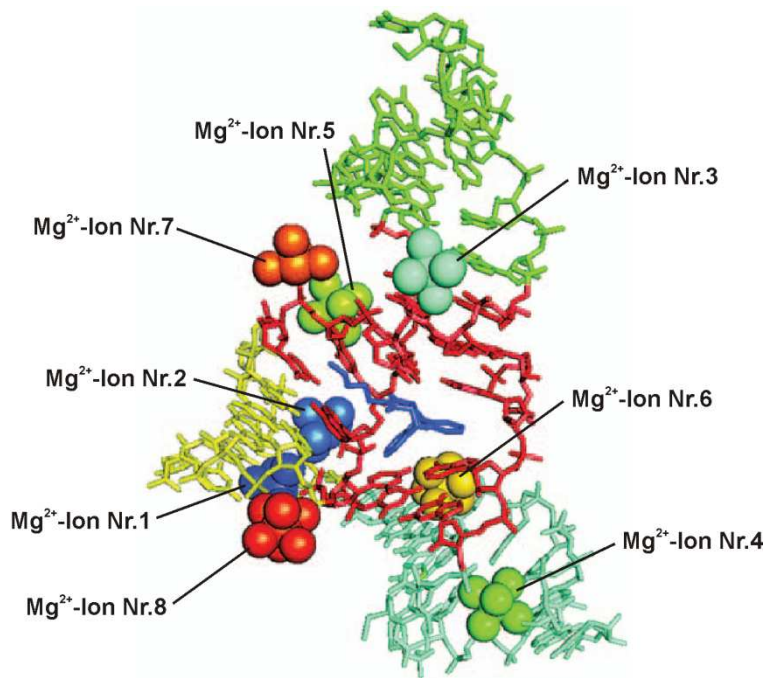


Abb. 19: Tertiärstruktur des Diels-Alderase-Ribozyms aus der Kristallstruktur mit den Mg^{2+} -Ionen Nr.1 – Nr.8 als Sphären mit koordinierten Wassermolekülen dargestellt. Adaptiert aus Kisseleva *et al.*⁽¹⁴³⁾.

Cd^{2+} -Ionen sind in der EPR-Methode unsichtbar. Aufgrund ihrer im Vergleich zu Mn^{2+} -Ionen festgestellten höheren Affinität zum Ribozym konnten sie zur Charakterisierung der einzelnen Bindungsstellen eingesetzt werden, indem sie Bindungsstellen höherer Affinität einzeln durch Titration besetzten. Bindungsstellen geringerer Affinität konnten anschließend mit Mn^{2+} -Ionen im Überschuss besetzt werden.

Die Ergebnisse der Substitutions-Experimente mit Cd^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen ließen auf ein Dimer, gebildet aus dem ersten und dem vierten gebundenen Ion mit einem Abstand von ungefähr 6 Å schließen. Das Mn^{2+} -Dimer wurde den beiden Mg^{2+} -Ionen Nr.1 und 2 der Kristallstruktur zugeordnet, die beide „innersphere“ in direkter Interaktion mit Phosphatsauerstoff koordiniert, mit einem Abstand von nur 7.4 Å in der Kristallstruktur identifiziert wurden.⁽⁶¹⁾

Durch die EPR-Messungen konnten die Bindungsstellen eins, zwei und drei als direkte Interaktionen der Metall-Ionen mit der RNA als „innersphere“ koordiniert und vier und fünf als „outersphere“ durch die H_2O -Liganden koordiniert mit der RNA identifiziert werden.⁽¹⁴³⁾ In der Kristallstruktur wurden die beiden Mg^{2+} -Ionen Nr.1 und 2 als „innersphere“ koordiniert, die Ionen Nr.3, 5 und 6 als „outersphere“ koordiniert, bestimmt.⁽⁶¹⁾

Im Vergleich der EPR-Messungen und der Kristallstruktur müssen die Verwendung von Mn^{2+} -Ionen beziehungsweise Mg^{2+} -Ionen und deren geringe Unterschiede der Eigenschaften beachtet werden, was zu Diskrepanzen durch die nachfolgend beschriebenen Effekte führen kann. Für Mn^{2+} -Ionen wurde das Auftreten der Verschiebung der Ionen innerhalb der Bindungsstelle beschrieben⁽¹⁴⁴⁻¹⁴⁶⁾, was die Zuordnung der Ionen und Bindungsart erschwert. Zusätzlich liegt in der Auflösung der Kristallstruktur von 3.0 Å eine gewisse Ungenauigkeit vor. Aufgrund dieser Faktoren ist das Auftreten der Diskrepanz in der Anzahl von „innersphere“ und „outersphere“ koordinierten divalenten Metall-Ionen der EPR- und Kristallstrukturergebnisse erklärbar.⁽¹⁴³⁾

3.1.3 Korrelation der katalytischen Aktivitäten mit den Ionenbindungsstellen

Die aus den Aktivitätsbestimmungen ermittelten Ionen-Konzentrationen zu K_M [μM] von 150 μM für Mg^{2+} -Ionen und 200 μM für Mn^{2+} -Ionen, 21 und 29 Ionen pro Molekül entsprechend, zeigten, dass die Besetzung der fünf divalenten Ionenbindungsstellen hoher Affinität zum Erreichen der vollen katalytischen Aktivität nicht ausreichend ist. Weitere Interaktionen zwischen divalenten Ionen und dem Ribozym sind zur maximalen katalytischen Aktivität erforderlich. Mn^{2+} -Ionen wiesen im Vergleich zu Mg^{2+} -Ionen neben der Erhöhung von K_M [μM], auch die deutliche Verminderung der maximalen Geschwindigkeitskonstante k [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] auf.

Eine höhere Mn^{2+} -Ionen-Konzentration kann somit die Mg^{2+} -Ionen zum Erreichen der vollen maximalen Geschwindigkeitskonstante nicht substituieren. Cd^{2+} -Ionen als alleinige divalente Ionen führten nicht zur katalytischen Aktivität des Ribozyms, verminderten in Addition zu Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen die katalytische Aktivität allerdings nur geringfügig. Daraus wurde gefolgert, dass Cd^{2+} -Ionen somit nicht zur Bildung einer katalytisch inaktiven Ribozym-Struktur führten.

Alleine die hochaffine Ionen-Bindung, mit höchster Affinität für Cd^{2+} -Ionen gegenüber Mn^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen, kann auch in hohen Ionen-Konzentrationen bis 80 mM folglich nicht die katalytischen Aktivität erzeugen.

Die im Diels-Alderase-Ribozym ermittelten verschiedenen Affinitäten unterschiedlicher divalenter Ionen sind übereinstimmend mit in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Stabilitäten von Nukleotiden und Ribozymen: Für Mono- und Dinukleotide wurde eine Stabilitätserhöhung von Mg^{2+} < Mn^{2+} < Cd^{2+} -Ionen beschrieben⁽⁷³⁾, analog zu der Williams-Irving-Reihe über die Stabilitäten von Übergangsmetallkomplexen⁽¹⁴⁷⁾ und der höheren Stabilität mit Metall-Ionen höherer Elektronenaffinität.⁽¹⁴⁸⁾ Das analoge Verhalten der Stabilitäten wurde für RNA mit Cd^{2+} -Ionen mit hoher Affinität zu Stickstoff und als selektiver Substituent von Mg^{2+} -Ionen erklärt.⁽⁷³⁾ Über das Tetrahymena Ribozym wurde die Stabilitätserhöhung der gefalteten Ribozym-Struktur mit der Zunahme der Ladungsdichte des Kations publiziert, womit die RNA-Stabilität auf einer Kombination der Ladung der Kationen und der ‚Packungsdichte‘ der Kationen beruhte und kleinere Metall-Ionen höherer Ladungsdichte favorisierter mit der RNA interagierten.⁽⁸⁴⁾

Die Ergebnisse des katalytisch inaktiven Diels-Alderase-Ribozyms mit Cd^{2+} -Ionen verdeutlichen, dass zur katalytischen Aktivität nicht nur die in der Literatur beschriebenen hohen Affinitäten und Stabilitäten entscheidend sind. Im Diels-Alderase-Ribozym basiert die katalytische Aktivität somit auf anderen Faktoren.

Die Bindung von bis zu 7 Äquivalenten Cd^{2+} -Ionen an die Bindungsstellen höchster Aktivität und der Zusatz von Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen mit nur geringer Aktivitätsminderung indizierte die fundamental wichtige Funktion weiterer divalenter Ionen zusätzlich zu den hochaffinen Bindungsstellen für die katalytische Ribozymfunktion mit anderen relevanten Eigenschaften als der Bindungsaffinität. Möglicherweise sind hier die im HSAB²⁶-Konzept beschriebenen Eigenschaften von Ionen und deren Einordnung in harte und weiche Säuren und Basen mit unterschiedlichen Eigenschaften entscheidend. Laut dem HSAB-Prinzip, das eine Einordnung von Atomen, Ionen und Molekülen nach den in Tab. 1 aufgeführten charakteristischen Kriterien vornimmt, werden Na^{+} - und Mg^{2+} -Ionen den harten Lewis-Säuren zugeordnet, Mn^{2+} -Ionen dem Übergangsbereich der harten Lewis-Säuren und Cd^{2+} -Ionen den weichen Lewis-Säuren.

²⁶ HSAB: Prinzip der harten und weichen Säuren und Basen, Abkürzung aus „The principle of Hard and Soft Acids and Bases“

Tab. 1: Übersicht der HSAB-Zuordnung qualitativer Eigenschaften mit Einteilung der Eigenschaften in Bezug zueinander.

	Säuren		Basen	
	Hart	Weich	Hart	Weich
Elektronen	Akzeptor	Akzeptor	Donator	Donator
Radius	klein	groß	klein	groß
Ladung	positiv, hoch	positiv, niedrig	negativ, hoch	negativ, niedrig
Elektronegativität	hoch	niedrig	hoch	niedrig
Polarisierbarkeit	niedrig	hoch	niedrig	hoch

Lösungsmittel können ebenfalls in die HSAB-Klassifizierung eingeordnet werden, wobei harte Lösungsmittel harte Säuren und harte Basen lösen und weiche Lösungsmittel weiche Säuren und weiche Basen lösen. H₂O wird den sehr harten Basen zugeordnet.⁽¹⁴⁹⁻¹⁵²⁾ Harte Säuren bilden mit harten Basen bevorzugt ionische Bindungen, weiche Säure und weiche Basen kovalente Bindungen.

Die Ionenradien der divalenten Ionen in [Å] betragen für Mg²⁺-Ionen: 0.86 Å, Mn²⁺-Ionen: 0.81 Å, Cd²⁺-Ionen: 1.09 Å und Na⁺-Ionen: 1.16 Å jeweils in der Koordinationszahl sechs.⁽¹⁵³⁾ Hydratisiert liegen die Ionen als Hexahydrate koordiniert in oktahedraler Symmetrie für die divalenten Ionen als [M(H₂O)₆]²⁺ mit M für Mg²⁺, Mn²⁺ und Cd²⁺ und für monovalente Na⁺-Ionen als [Na(H₂O)₆]⁺ vor.⁽¹⁵³⁾

Die in den beiden Mg²⁺- und Mn²⁺-Ionen vorliegenden höheren Elektronegativitäten und kleineren Ionenradien im Vergleich zu Cd²⁺-Ionen könnten für die Koordination der divalenten Ionen und für die Ausbildung der katalytisch aktiven Ribozym-Struktur entscheidend sein. Einen weiteren wichtigen Einfluss könnten Unterschiede in der Hydratisierung der divalenten Ionen haben.

Die Interaktionen der kleineren divalenten Ionen (Mg²⁺-Ionen und Mn²⁺-Ionen) würden, unter Berücksichtigung der Zuordnung der HSAB-Einordnung, für Mg²⁺-Ionen zu einer höheren RNA-Stabilität führen als für Mn²⁺- und Cd²⁺-Ionen. Dies würde mit den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der drei divalenten Ionen des Diels-Alderase-Ribozyms übereinstimmen. In Bezug auf die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen mit Cd²⁺-Ionen in Kombination mit Mg²⁺-Ionen oder Mn²⁺-Ionen könnten die fünf hochaffinen Bindungsstellen der divalenten Ionen mit Cd²⁺-Ionen besetzt sein.

Zwei weitere Cd^{2+} -Ionen würden noch in Wechselwirkungen mit dem Ribozym treten und die Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen könnten die weiteren relevanten Funktionen zur finalen katalytischen Ribozym-Aktivität erfüllen. Cd^{2+} -Ionen können aufgrund ihrer weichen Eigenschaften möglicherweise nicht zur vollständigen Faltung des Ribozyms beitragen. Abhängig von der Konzentration wurden Mg^{2+} -Ionen für das Diels-Alderase-Ribozym als Hauptfaktor der Dynamik und der unterschiedlichen Faltungszustände von ungefaltetem, intermediärem und gefaltetem Zustand bestimmt.⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾

Eine weitere wichtige Funktion konnte in der Stabilisierung der aktiven, geöffneten Konformation der katalytischen Tasche mit 24 erforderlichen Äquivalenten an Mg^{2+} -Ionen simuliert werden.⁽¹⁵⁴⁾ Diese 24 Äquivalente entsprechen in Bezug zu den hier ermittelten katalytischen Aktivitäten ungefähr den 21 Äquivalenten zum Erreichen der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit K_M . Zur vollen katalytischen Aktivität des Diels-Alderase-Ribozyms sind somit neben den fünf divalenten Ionenbindungsstellen hoher Affinität und den insgesamt 24 divalenten Ionen zur Stabilisierung der aktiven Konformation der katalytischen Tasche noch weitere divalente Ionen erforderlich. Die konzentrationsabhängige Funktion der Mg^{2+} -Ionen für die vollständige Ausbildung der katalytisch-aktiven Diels-Alderase-Ribozym-Struktur wird im Kontext des Wasserstoff-Brücken-Netzwerks in Kapitel 3.4-3.5 diskutiert.

3.2 Quantifizierung der Diels-Alder-Reaktionen mittels HPLC

Zur gleichzeitigen Quantifizierung der AHEG-Abnahme und der Produkt-Zunahme der ribozym-katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktionen ist die Analyse mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) eine geeignete Methode.⁽⁹³⁾ Die gleichzeitige Analyse von Edukten und Produkten ermöglichte die genaue Analyse der Reaktionen, im Gegensatz zur in Kapitel 3.1 beschriebenen UV/VIS-spektroskopischen Methode, in der nur die Messung der AHEG-Abnahme möglich war. Frühere Arbeiten ergaben Hinweise über eine geringere Zunahme an Diels-Alder-Produkt im Vergleich zur AHEG-Abnahme, was zur Vermutung von parallel ablaufenden Nebenreaktionen der Diels-Alder-Reaktionen führte.²⁷ Zur Aufklärung möglicher Einflussfaktoren durchgeführte Experimente über Sauerstoffmoleküle und deren Entfernung durch Entgasen und Einsatz von Molekülen als Sauerstoff-Fänger ergaben jedoch keine eindeutigen Ergebnisse.²⁸ Gelelektrophoretische Aktivitäts-Assays mit einfachem Reaktionsumsatz führten zu Plateaus der Diels-Alder-Produkt-Bildung, die teilweise deutlich unterhalb des Reaktionsumsatzes von 100% lagen.⁽⁶²⁾ Untersuchungen zu kovalenten Modifikationen ergaben keine Hinweise auf kovalente, stabile Nebenreaktionsprodukte - sichtbar waren allerdings schwache, unreaktive Nebenbanden des 11mer mit linkergebundenem AHEG⁽⁶²⁾ Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte und in Abschnitt 3.6 beschriebene gelelektrophoretische Aktivitätsbestimmungen zeigten ebenfalls das Auftreten unreaktiver 11mer-AHEG Nebenbanden. Der Zusatz von Trolox²⁹ als Sauerstoff-Fänger⁽¹⁵⁵⁾ und das Entgasen der wässrigen Lösungen zeigte keine Änderung in den Reaktionen und wurde nicht weiter verfolgt.

In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung der Diels-Alder-Reaktionen mittels HPLC zur Bestimmung der Diskrepanz aus AHEG-Abnahme und Diels-Alder-Produkt-Zunahme durchgeführt. Die katalysierte Diels-Alder-Reaktion des einsträngigen 49mer Diels-Alderase-Ribozyms erfolgte als Reaktion mit multiplem Umsatz der Substrate AHEG (9-Anthracenylmethyl)hexaethylenglykol und NPM (N-Pentylmaleimid) im Vergleich zur unkatalysierten Hintergrundreaktion.

²⁷ Unpublizierte Daten

²⁸ Unpublizierte Daten

²⁹ Trolox: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure

Die Reaktion wurde nach definierten Reaktionszeiten mit β -Mercaptoethanol abgestoppt und jeweils analysiert, siehe Abb. 20 (A).

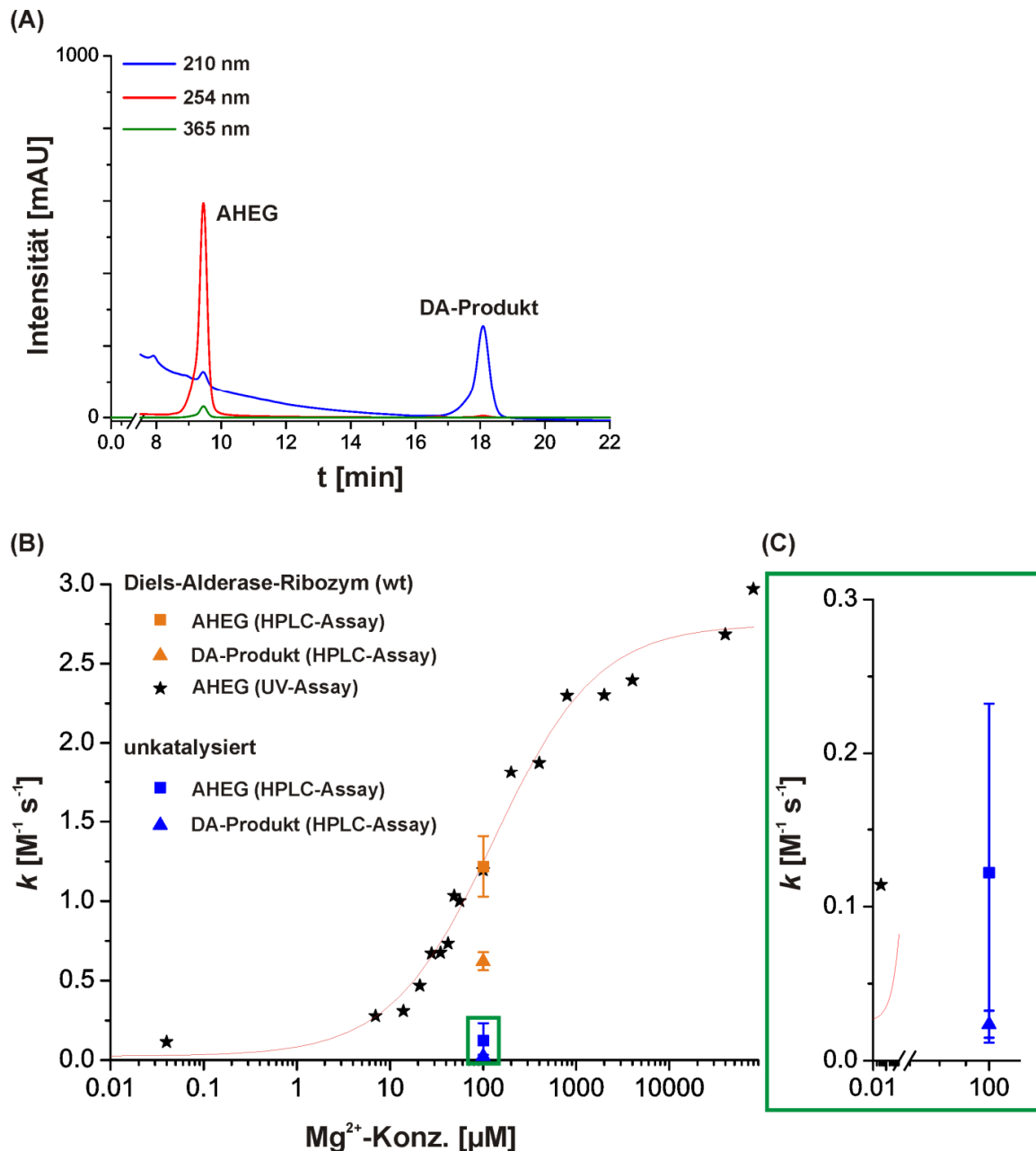


Abb. 20: HPLC-Analyse der Diels-Alder-Reaktionen. (A): HPLC-Chromatogramm der katalysierten Diels-Alder-Reaktion nach einer Reaktionszeit von 3,5 min mit AHEG $t = 9,5$ min bei 365 nm (grün) und Diels-Alder-Produkt (DA-Produkt) $t = 18$ min bei 210 nm (blau). Mit einer Retentionszeit < 7 min eluierten: RNA, Ionen, das Reaktionsprodukt aus β -Mercaptoethanol und NPM und freies β -Mercaptoethanol. (B): Geschwindigkeitskonstante k [$M^{-1} s^{-1}$] mit der ribozym-katalysierten Reaktion (Wildtyp, wt) (orange) und der unkatalysierten Hintergrundreaktion (blau) mit $100 \mu M$ Mg^{2+} -Ionen und 300 mM Na^{+} -Ionen, jeweils als Geschwindigkeitskonstante der AHEG-Abnahme (Quadrat) und der Diels-Alder-Produkt-Zunahme (Dreieck). Die einzelnen Werte wurden als Mittelwerte aus Triplikatmessungen mit den Standardabweichungen für die katalysierte - und aus vier Bestimmungen für die unkatalysierte Reaktion dargestellt. Im Vergleich dazu ist die AHEG-Abnahme des UV/VIS-spektroskopischen Assays in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Ionen Konzentration (schwarze Sterne), mit sigmoidealem Kurvenfit (rote Kurve), siehe Kapitel 3.1.1 und Abb. 18 gezeigt. Der Ausschnitt mit der unkatalysierten Reaktion im grünen Rahmen ist in (C) vergrößert dargestellt.

Die Ergebnisse der katalysierten und unkatalysierten Reaktion als Auftragungen der Geschwindigkeitskonstante k [$M^{-1} s^{-1}$] gegen die Konzentration an Mg^{2+} -Ionen sind in Abb. 20 (B)+(C) dargestellt.

Die Konzentration der Mg^{2+} -Ionen wurde mit $100 \mu M$ so gewählt, dass sie etwa im Bereich der zuvor in der UV/VIS-spektroskopischen Methode ermittelten Konzentration der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $K_M = 150 \mu M$ lag. An Na^+ -Ionen wurde die Standardkonzentration von $300 mM$ eingesetzt.

Für die ribozym-katalysierte Reaktion wurde die Geschwindigkeitskonstante k [$M^{-1} s^{-1}$] für AHEG auf 1.21 ± 0.19 [$M^{-1} s^{-1}$] und das Diels-Alder-Produkt zu 0.62 ± 0.06 [$M^{-1} s^{-1}$] als Mittelwert aus Triplikatmessungen mit der Standardabweichung $\pm 15\%$ der Mittelwerte entsprechend bestimmt. Folglich ist die AHEG-Abnahme der katalysierten Reaktion doppelt so hoch wie die Zunahme an Diels-Alder-Produkt und bestätigte die bisherigen Hinweise auf eine oder mehrere Nebenreaktionen mit Beteiligung von AHEG. Anhand dieser Ergebnisse müssten ungefähr 50% des AHEG in Nebenreaktionen reagieren.

Die Geschwindigkeitskonstanten der unkatalysierten Hintergrundreaktion wurden aus vier Messungen zu 0.12 ± 0.11 [$M^{-1} s^{-1}$] für die AHEG-Abnahme und auf 0.0237 ± 0.01 [$M^{-1} s^{-1}$] für das Diels-Alder-Produkt, mit großer Standardabweichung bestimmt, siehe Abb. 20 (C). Aufgrund der hohen Standardabweichung, war die separate Quantifizierung von AHEG und Diels-Alder-Produkt der unkatalysierten Reaktion nicht möglich. Bezogen auf die Mittelwerte als grobe Abschätzung, wäre die AHEG-Abnahme zur Produktbildung der unkatalysierten Reaktion ungefähr 5-fach erhöht. Dies könnte auf eine unkatalysierte Nebenreaktion des AHEG hindeuten, die in der katalysierten Reaktion durch die höhere Produktbildungsrate in geringerem Maß ablaufen sollte. Jedoch lieferte ein Screening der HPLC-Chromatogramme in Darstellung des kompletten Absorptionsspektrums von 200-700 nm über den gesamten Retentionszeitraum in 3-D-Chromatogrammen keinerlei Hinweise auf Nebenreaktionen. Eine mögliche Erklärung könnte die nicht ausreichende Sensitivität der HPLC-Analyse sein, oder die nicht ausreichende UV/VIS-Absorption der Nebenreaktionsprodukte, die deshalb mittels UV/VIS-Detektor nicht hinreichend detektierbar waren. Als eine sensitivere Methode, die auch UV/VIS-inaktive Moleküle detektieren kann, wurde eine LC-MS-Methode mit Trennung der Moleküle und anschließender hochauflösender massenspektrometrischer Analyse der Diels-Alder-Reaktion etabliert. Diese wird im nächsten Kapitel beschrieben.

3.3 Massenspektrometrische Analyse der Diels-Alder-Reaktionen

Wie im vorherigen Abschnitt in der Analyse mittels HPLC beschrieben, wurde die Diskrepanz der Edukt-Abnahme und Produkt-Zunahme aus der Quantifizierung der katalysierten Diels-Alder-Reaktion als Hinweis auf Nebenreaktionen gedeutet. Bisher konnte allerdings weder eine Differenzierung zwischen katalysierter und unkatalysierter Reaktion getroffen werden, noch wurden konkrete Hinweise auf die Entstehung von Nebenreaktionsprodukten erhalten. Zur Aufklärung von in Nebenreaktionen entstehenden Molekülen auf molekularer Ebene wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methode der LC-MS als Trenn- und Analysenmethode eingesetzt und für die Analyse der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktionen optimiert und etabliert.

3.3.1 Edukte und Produkte der Diels-Alder-Reaktionen

Um Nebenreaktionen identifizieren zu können, war es zunächst erforderlich die beiden Edukte AHEG ((9-Anthracenylmethyl)hexaethylenglykol) und NPM (*N*-Pentylmaleimid) sowie das Diels-Alder-Produkt aus AHEG und NPM jeweils als Einzelkomponenten zu analysieren und die m/z -Signale Molekül-Ionen zuzuordnen, siehe Abb. 21.

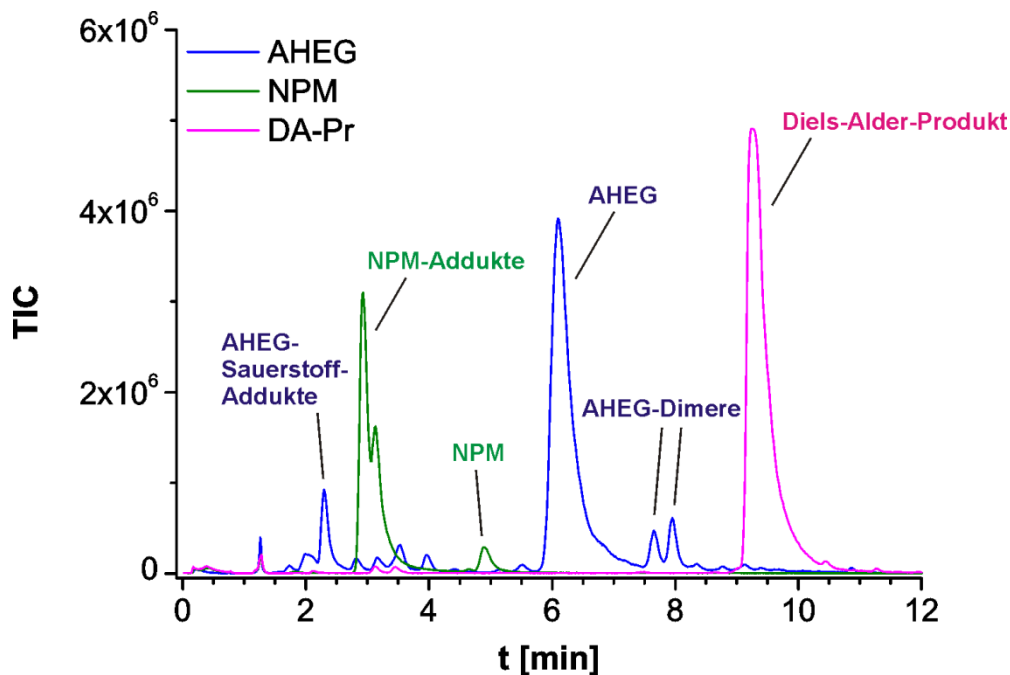


Abb. 21: Intensität der Totalionenströme (TIC) der LC-MS-Analyse für AHEG (1000 pmol, blau), NPM (20 nmol, grün) und Diels-Alder-Produkt (DA-Pr, 2000 pmol, magenta) mit Zuordnung der einzelnen Peaks.

Hierzu wurde ein LC-Eluentengemisch zur Trennung und Detektion der einzelnen Komponenten optimiert und aus dem Totalionenstrom (TIC) die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) Molekül-Ionen zugeordnet.

Ausgewählte Spektren werden nachfolgend dargestellt, weitere Spektren und eine komplette Übersicht der m/z -Verhältnisse mit deren zugeordneten Molekül-Ionen und Summenformeln befinden sich im Anhang in Abschnitt 5.3.

AHEG ((9-Anthracenylmethyl)hexaethylenglykol)

In der LC-MS-Analyse des AHEGs sind sowohl Signale des AHEGs (5.8-6.6 min), von AHEG-Sauerstoff-Addukten (2.2-2.5 min), als auch von AHEG-Dimeren (7.5-8.1 min) ersichtlich, siehe Abb. 22 (A)-(D) und Tab. 2 über die Zuordnung der m/z -Verhältnisse zu Molekül-Ionen. Weitere m/z -Spektren, siehe Anhang in Abschnitt 5.3.1.

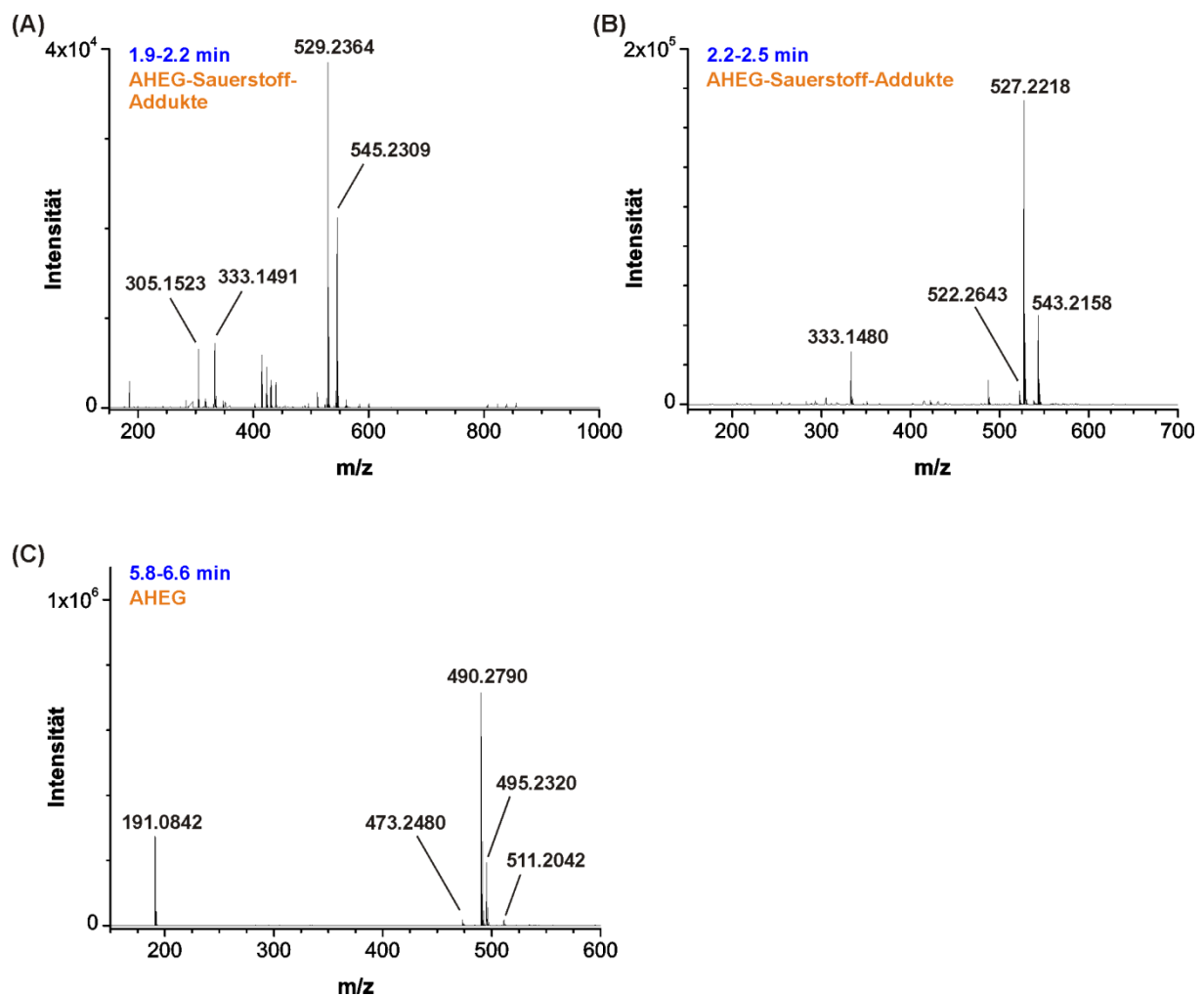


Abb. 22: (A)-(C): M/z -Spektren von AHEG (1000 pmol) mit den Retentionszeiten (blau) und der Zuordnung (orange). (D)+(E): Siehe nächste Seite.

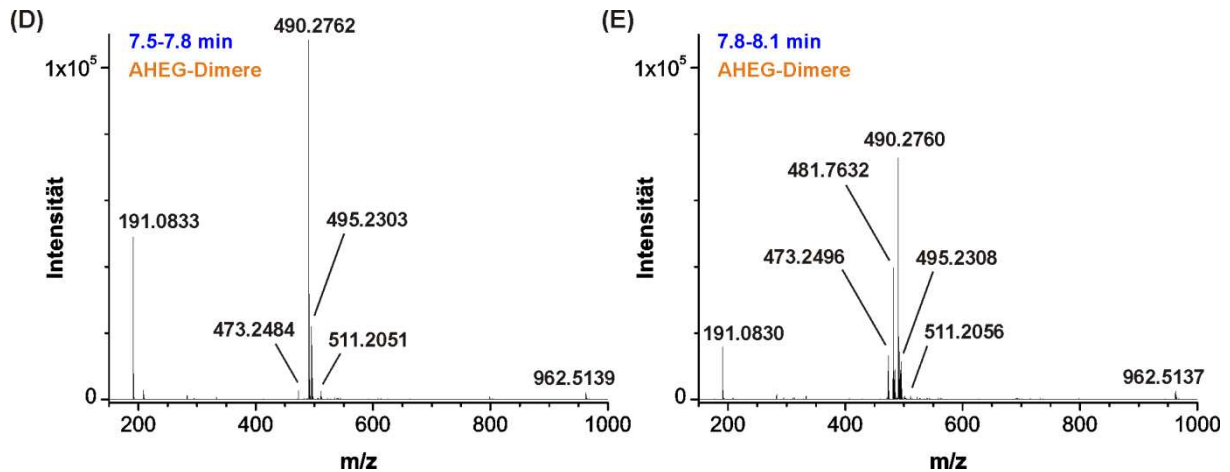


Abb. 22: Fortsetzung der m/z-Spektren von AHEG (D)+(E): M/z-Spektren von AHEG (1000 pmol) mit den Retentionszeiten (blau) und der Zuordnung (orange).

Tab. 2: LC-MS-Analyse: Übersicht der m/z-Signale für AHEG.

Retentionszeit	m/z-Signal gemessen	m/z-Signal berechnet	Molekül-Ion
1.9-2.2 min	305.1523	333.1571	[HEG+Na] ⁺
	333.1491	333.1520	[HEG+O+Na] ⁺
	529.2364	529.2408	[AHEG+2O+2H+Na] ⁺
	545.2309	545.2357	[AHEG+3O+2H+Na] ⁺
2.2-2.5 min	522.2643	522.2698	[AHEG+2O+NH ₄] ⁺
	527.2218	527.2252	[AHEG+2O+Na] ⁺
	543.2158	543.2201	[AHEG+3O+Na] ⁺
	+ Signal analog 1.9-2.2 min		
5.8-6.6 min	191.0842	191.0855	[Anthracen+CH ₂] ⁺
	473.2790	473.2534	[AHEG+H] ⁺
	490.2790	490.2799	[AHEG+NH ₄] ⁺
	495.2320	495.2353	[AHEG+Na] ⁺
	511.2042	511.2093	[AHEG+K] ⁺
7.5-7.8 min	481.7632	481.7667	[2AHEG+NH ₄ +H] ²⁺
	962.5139	962.5260	[2AHEG+NH ₄] ⁺
	+ Signale analog 5.8-6.6 min		
7.8-8.1 min	962.5137	962.5260	[2AHEG+NH ₄] ⁺
+ Signale analog 5.8-6.6 min			

Die Hauptfraktion des AHEG bei **5.8-6.6 min** konnte Molekül-Ionen von AHEG als Addukt mit Kationen $[\text{AHEG}+\text{H}/+\text{NH}_4/+\text{Na}/+\text{K}]^+$, wie in Tab. 2 aufgelistet, zugeordnet werden. Das Molekül-Ion $[\text{Anthracen}+\text{CH}_2]^+$ wurde als stabiles Fragment-Ion des AHEG während der MS-Fragmentierungsexperimente identifiziert (Ergebnisse nicht dargestellt). Den Peaks der Retentionszeiten von **1.9-2.2 min** konnten AHEG-Sauerstoff-Addukte von $[\text{AHEG}+2\text{H}+2\text{O}/+3\text{O}/+\text{Na}/+\text{NH}_4]^+$ und von **2.2-2.5 min** $[\text{AHEG}+2\text{O}/+3\text{O}/+\text{Na}/+\text{NH}_4]^+$ zugeordnet werden, siehe Tab. 2. Die AHEG-Sauerstoff-Addukte $[\text{AHEG}+2\text{O}/+\text{Na}/+\text{NH}_4]^+$ und $[\text{AHEG}+2\text{O}+2\text{H}/+\text{Na}/+\text{NH}_4]^+$ könnten dabei als Endoperoxid wie Molekül **40** vorliegen, oder in Form eines HydroxyanthrachinonHEG **41** mit demselben m/z-Verhältnis. Bei den Addukten von $[\text{AHEG}+2\text{O}+2\text{H}/+\text{Na}/+\text{NH}_4]^+$ könnte es sich um 9,10-DihydroxyanthracenHEG **42** handeln, siehe Abb. 23. Aus diesen Molekülen könnten durch Addition eines weiteren Sauerstoff-Atoms die AHEG-Addukte $[\text{AHEG}+3\text{O}/+\text{Na}/+\text{NH}_4]^+$ und $[\text{AHEG}+2\text{H}+3\text{O}/+\text{Na}/+\text{NH}_4]^+$ entstanden sein.

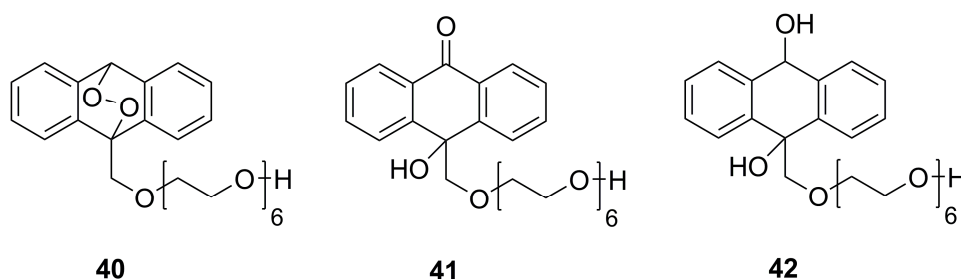


Abb. 23: Reaktionsprodukte aus AHEG mit Sauerstoff als Endoperoxid **40**, HydroxyanthrachinonHEG **41** und DihydroxyanthracenHEG **42**.

Wie für Endoperoxide und Hydroxyanthrachinone von Sigman *et al.*⁽¹³²⁾ und Fidler *et al.*^(132, 141) und in Abschnitt 1.6 beschrieben, entstehen sie aus Anthracen und Anthracen-Derivaten unter UV-Bestrahlung mit O_2 . Hydroxyanthrachinone können auch durch Thermolyse bei Raumtemperatur aus dem Endoperoxid gebildet werden.⁽¹⁴¹⁾ Übertragen auf die Bildung der AHEG-Sauerstoff-Addukte $[\text{AHEG}+2\text{O}/+3\text{O}/+\text{Na}/+\text{NH}_4]^+$ und $[\text{AHEG}+2\text{H}+2\text{O}/+3\text{O}/+\text{Na}/+\text{NH}_4]^+$ waren die Raumtemperatur und der vorhandene Sauerstoff in den nichtentgasten Reaktionslösungen offensichtlich ausreichend. Addukte von AHEG und Sauerstoff lagen folglich schon in der reinen AHEG-Komponente vor. Beide Peaks der Retentionszeiten **7.5-7.8** und **7.8-8.1 min** wiesen die m/z-Signale für $[\text{2AHEG}+\text{NH}_4]^+$ auf, einem AHEG-Dimer entsprechend. Die Moleküle könnten wie die Moleküle **43a** und **43b** aufgebaut und durch Einstrahlung von Tageslicht gebildet worden sein, siehe Abb. 24.

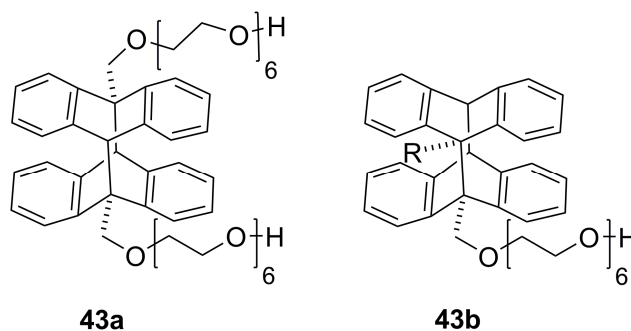


Abb. 24: Reaktionsprodukte aus AHEG mit Sauerstoff als AHEG-Dimere mit dem möglichen strukturellen Aufbau wie mit den Molekülen 43a und 43b dargestellt. R: Linker analog den anderen Linkern am AHEG aus (CH₂Ohexaethylenglykol).

Deren Entstehung könnte ähnlich den in der Literatur beschriebenen Anthracen-Dimeren erfolgt sein, deren Bildung bei UV-Bestrahlung mit 365 nm und O₂ von Nowakowska *et al.*⁽¹³¹⁾ und in entgaster Lösung nach Bestrahlung bei 350 nm von Debestani *et al.*⁽¹³³⁾ beschrieben wurde. Die in der Literatur beschriebenen durch eine C-C-Bindung verknüpften Dimere **28** und **30** aus Anthrachinonen und Hydroxyanthracenen können hier aufgrund des m/z-Verhältnisses und der daraus ermittelten Summenformel nicht vorliegen. Das Auftreten des Dimers in zwei getrennten Peaks wäre durch das Vorliegen von zwei Isomeren wie den Molekülen **43a** und **43b** erklärbar.

NPM (*N*-Pentylmaleimid)

Das NPM-Edukt wies einen Hauptpeak von 2.8-3.0 min mit kleinerem Nebenpeak von 3.0-3.5 min aus NPM-Addukten und einen kleineren Peak bei 4.8-5.1 min aus NPM-Molekül-Ionen auf, siehe Abb. 21 und Abb. 25 (A)-(D). Der Vergleich von TIC- und UV-Intensität bei 210 nm in Abb. 25 (A) zeigte deutlich die niedrige TIC-Intensität des Peaks 4.8-5.1 min und die im Vergleich dazu höhere UV-Intensität zu 2.8-3.5 min, was einerseits eine höhere UV-Absorption und gleichzeitig eine stark verminderte Ionisierbarkeit der NPM-Molekül-Ionen aufzeigte.

Die m/z-Signale (Tab. 3) bei **2.8-3.0 min**, Abb. 25 (B), wurden als NPM-Molekül-Ion und NPM-Addukte von [N-pentyl-M+H]⁺³⁰, [N-pentyl-M+2H+O+H]⁺ und [N-pentyl-M+2H+O+Na]⁺ identifiziert. Für **3.0-3.5 min**, Abb. 25 (C), wurden zusätzlich NPM-Addukte von [N-pentyl-M+2C+6H+O+H]⁺ und [N-pentyl-M+2C+6H+O+Na]⁺ zugeordnet. Im kleinen TIC-Peak von **4.8-5.1 min**, Abb. 25 (D), konnte das NPM-Molekül-Ion [N-pentyl-M+H]⁺ identifiziert werden.

³⁰ [N-pentyl-M]: Abkürzung aus *N*-Pentylmaleimid

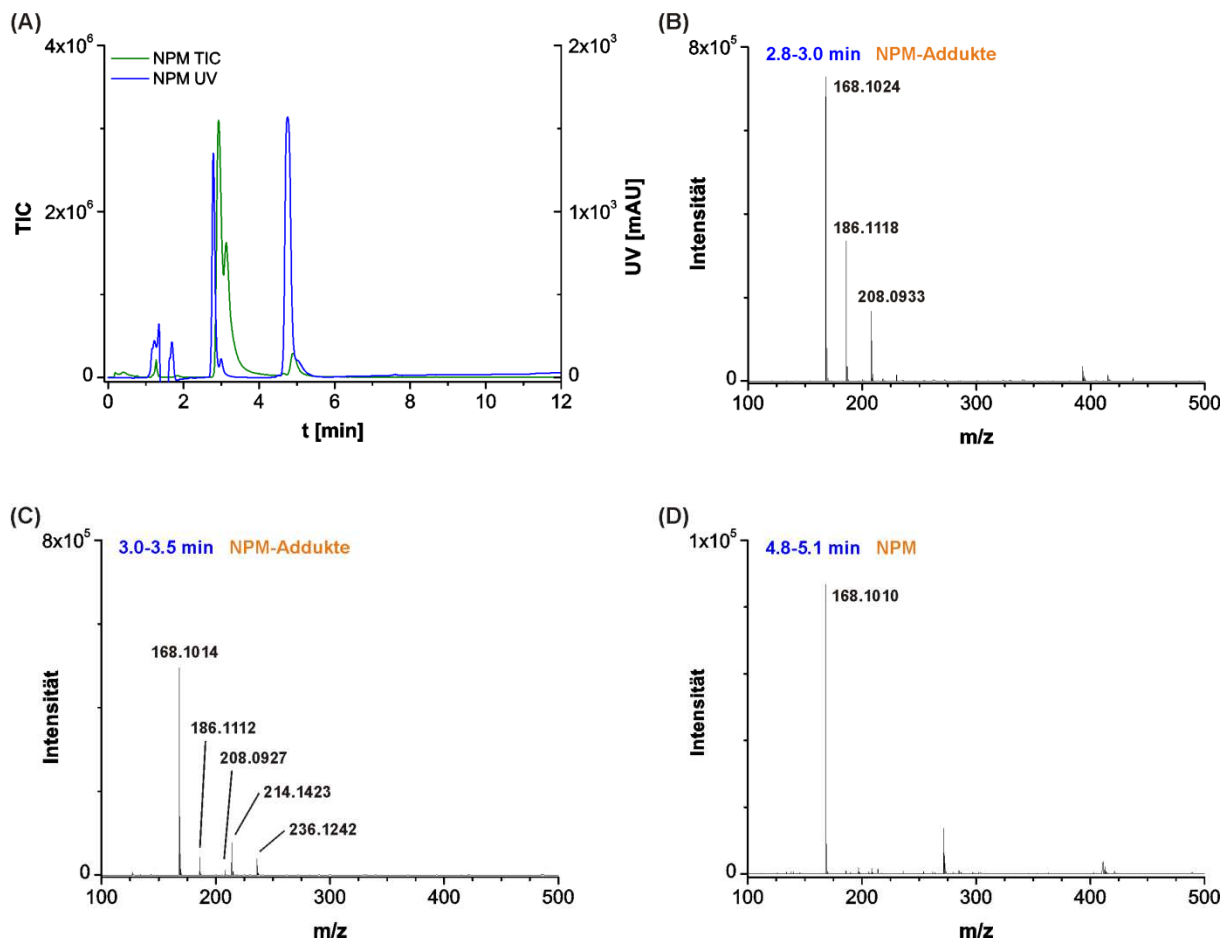


Abb. 25: TIC-, UV-Chromatogramm und m/z -Spektren für NPM. (A): TIC-(grün) und UV-(blau) Intensität für 20 nmol NPM. (B)-(D): m/z -Spektren für ausgewählte Peaks mit den Retentionszeiten (blau) und der Zuordnung (orange). Weitere m/z -Signale anderer Retentionszeiten: siehe Anhang in Abschnitt 5.3.1.

Tab. 3: LC-MS-Analyse: Übersicht der m/z -Signale für NPM.

Retentionszeit	m/z -Signal gemessen	m/z -Signal berechnet	Molekül-Ion
2.8-3.0 min	168.1024	168.1019	$[\text{N-pentyl-M+H}]^+$
	186.1118	186.1125	$[\text{N-pentyl-M+2H+O+H}]^+$
	208.0933	208.0944	$[\text{N-pentyl-M+2H+O+Na}]^+$
3.0-3.5 min	214.1423	214.1438	$[\text{N-pentyl-M+2C+6H+O+H}]^+$
	236.1242	236.1257	$[\text{N-pentyl-M+2C+6H+O+Na}]^+$
+ Signale analog 2.8-3.0 min			
4.8-5.1 min	168.1010	168.1019	$[\text{N-pentyl-M+H}]^+$

Die NPM-Addukte in den beiden TIC-Peaks 2.8-3.5 min könnten Addukten mit H₂O und EtOH entsprechen, die in der wässrigen Reaktionslösung mit 10% EtOH in pH 7.5 entstanden sein könnten. Für *N*-Ethylmaleimid wurde pH-Wert-abhängig ein Abbau in zunehmend alkalischer Pufferlösung ab pH 7.0 beschrieben.⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁷⁾ Die Hydrolyse durch nukleophilen Angriff des Hydroxid-Ions am Carbonyl-C führte unter Ringöffnung zur Bildung von *N*-Alkylmaleimidsäure.⁽¹⁵⁷⁾ Übertragen auf das NPM in der Reaktionslösung wäre eine Hydrolysereaktion mit H₂O zu *N*-Pentylmaleimidsäure und mit EtOH zu *N*-Pentylmaleimidethylester möglich. Eine wie für das β -Mercaptoethanol erfolgende Michael-Addition an die Doppelbindung des NPM unter Zerstörung der Doppelbindung scheint aufgrund der geringeren Acidität⁽¹⁵⁸⁻¹⁵⁹⁾ und Nukleophilie von Hydroxid-Ionen und Ethanol unwahrscheinlich. Nach Zerstörung der Doppelbindung würde das NPM zur Diels-Alder-Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Um die Anwesenheit der Doppelbindung zu testen, wurde β -Mercaptoethanol im 4-fachen Überschuß zugesetzt und die Lösung mittels LC-MS analysiert (Spektren nicht gezeigt). Dabei wurde nur ein m/z-Signal geringer Intensität eines Adduktes aus NPM, Ethanol und β -Mercaptoethanol detektiert. Die m/z-Signale höchster Intensität wurden Reaktionsprodukten aus NPM und β -Mercaptoethanol zugeordnet, was eine hohe Konzentration an freiem NPM und die geringe Ionisierbarkeit des NPMs im Vergleich der NPM-Addukte aufzeigte. Die Bildung von NPM-Addukten mit H₂O und EtOH sollten aufgrund des für die Diels-Alder-Reaktionen eingesetzten 10-fachen Überschusses an NPM und der hohen Konzentration an freiem NPM keinen Einfluss auf die Diels-Alder-Reaktion haben.

Diels-Alder-Produkt aus AHEG und NPM

Das aus AHEG und NPM synthetisierte Diels-Alder-Produkt wurde in einem Peak der Retentionszeit 9.0-11.6 min detektiert, siehe Abb. 21. Die m/z-Signale konnten alle als Diels-Alder-Produkt-Molekül-Ionen aus [AHEG+NPM+H/+NH₄/+Na/+K]⁺ identifiziert werden, siehe Abb. 26 und Tab. 4. Für weitere m/z-Signale, siehe Anhang Abschnitt 5.3.1.

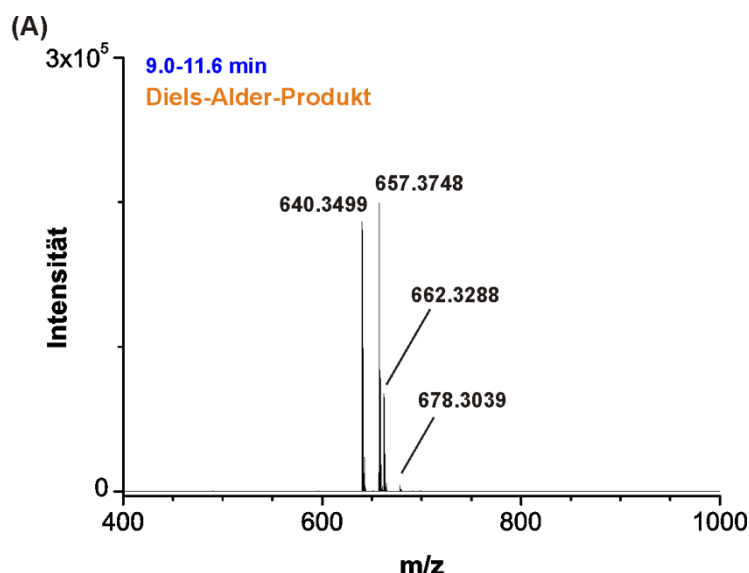


Abb. 26: M/z-Spektren für das Diels-Alder-Produkt (2000 pmol) aus dem TIC-Peak für das Diels-Alder-Produkt (Abb. 21) mit Retentionszeit in blau.

Tab. 4: LC-MS-Analyse: Übersicht der m/z-Signale 9.0-11.6 min für Diels-Alder-Produkt.

Retentionszeit	m/z-Signal gemessen	m/z-Signal berechnet	Molekül-Ion
9.0-11.6 min	640.3499	640.3480	[AHEG+NPM+H] ⁺
	657.3748	657.3746	[AHEG+NPM+NH ₄] ⁺
	662.3288	662.3300	[AHEG+NPM+Na] ⁺
	678.3039	678.3039	[AHEG+NPM+K] ⁺

3.3.2 Katalysierte und unkatalysierte Diels-Alder-Reaktionen

Zur Untersuchung und Differenzierung von ribozym-katalysierter zu unkatalysierter Diels-Alder-Reaktion wurden beide Reaktionen parallel durchgeführt und nach einer Reaktionszeit von 8 h ohne Abstoppen der Reaktionen mittels LC-MS analysiert. Die Totalionenströme wurden direkt auf Peak- und Intensitätsunterschiede untersucht, siehe Abb. 27.

Der Vergleich der ribozym-katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktionen wies eine hohe Ähnlichkeit der TIC-Chromatogramme der beiden Reaktionen ohne Entstehung neuer Peaks auf. Somit ergab die Auswertung der TIC-Chromatogramme folglich keine Hinweise auf die Entstehung neuer Moleküle durch Nebenreaktionen, neben denen für die Einzelsubstanzen identifizierten Moleküle.

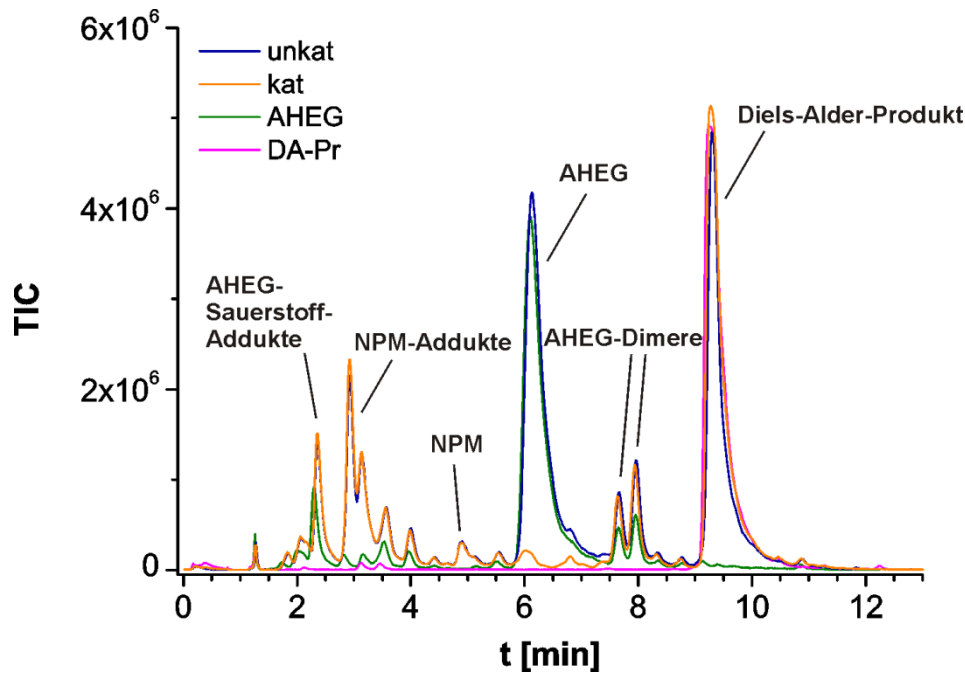


Abb. 27: TIC-Intensität der LC-MS-Analyse für die katalysierte (orange) - und unkatalysierte (blau) Diels-Alder-Reaktion nach Reaktionszeit von 8 h, entsprechend den Reaktionsansätzen aus 2000 pmol AHEG, 20 nmol NPM und für die ribozym-katalysierte Reaktion mit 140 pmol Ribozym, im Vergleich zu 2000 pmol Diels-Alder-Produkt (magenta) und 1000 pmol AHEG (grün).

Die TIC-Intensitäten der beiden Reaktionen waren, ausgenommen derer für AHEG- und Diels-Alder-Produkt, sehr ähnlich mit nur minimalen Intensitätsunterschieden. AHEG als Einzelkomponente wurde nur in der Hälfte der Menge eingesetzt und deshalb, eine lineare Intensitätszunahme annehmend, entsprechend hochgerechnet. Für AHEG (5.9-6.9 min) war in der ribozym-katalysierten Reaktion nach 8 h kein Peak mehr vorhanden, folglich hatte alles AHEG reagiert. In der unkatalysierten Reaktion hingegen wies der AHEG-Peak noch eine Intensität entsprechend ungefähr 50% AHEG auf. Der Vergleich von Diels-Alder-Produkt (Retentionszeit 9.1-10.0 min) zeigte jedoch nur einen geringen Intensitätsunterschied der beiden Reaktionen, siehe Abb. 27. Die aufgenommenen UV-Absorptionsspektren bei 210 nm für das Diels-Alder-Produkt wiesen höhere Intensitätsdifferenzen der Reaktionen auf, siehe Abb. 28 (A)+(B). Die höhere Differenz in den UV-Absorptionen deutet auf eine konzentrationsabhängige, nichtlineare Zunahme der Diels-Alder-Produkt Molekülen hin.

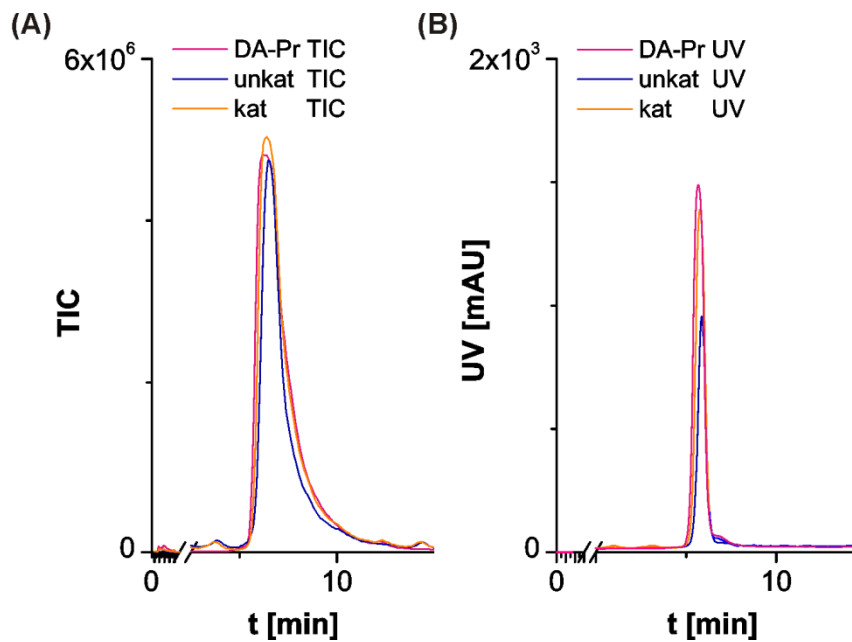


Abb. 28: TIC-Intensität und UV-Absorption der Diels-Alder-Produkte der katalysierten (orange) - und unkatalysierten (blau) Diels-Alder-Reaktion und 2000 pmol Diels-Alder-Produkt (magenta) aus Abb. 27. (A): TIC-Intensität der Diels-Alder-Produkte. (B): UV-Absorption der Diels-Alder-Produkte.

Analog den Einzelkomponenten wurden die gesamten TIC-Chromatogramme auf zusätzliche auftretende und bisher unbekannte m/z -Signale analysiert, wobei keine Signale die Nebenreaktionen indizieren könnten, entdeckt wurden. Es gab folglich auch in den m/z -Signalen keinerlei Hinweise auf die Bildung zusätzlicher Moleküle. Möglich wären noch Nebenreaktionen, die durch Intensitätserhöhungen von in den Einzelkomponenten schon identifizierten m/z -Signalen auftreten könnten. Dies wurde mittels Intensitäts-Vergleich der m/z -Signale der ribozym-katalysierten zur unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion und zu den Einzelkomponenten untersucht. Die interessantesten m/z -Spektren werden in den folgenden Abbildungen gezeigt. Weitere m/z -Spektren wurden im Anhang unter Abschnitt 5.3.2 hinzugefügt.

Die ribozym-katalysierte Reaktion zeigte, wie durch das Verschwinden des TIC-Peaks erwartet, die vollständige Reaktion der AHEG-Signale und höhere Intensitäten der m/z -Signale für das Diels-Alder-Produkt im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion, siehe Abb. 29 (A)-(D).

Auch die m/z -Signale des Diels-Alder-Produkts zeigten wie die TIC-Peaks ähnliche Intensitäten des Diels-Alder-Produkts für beide Diels-Alder-Reaktionen auf, obwohl in der unkatalysierten Reaktion noch hohe Signalintensitäten für AHEG detektiert wurden.

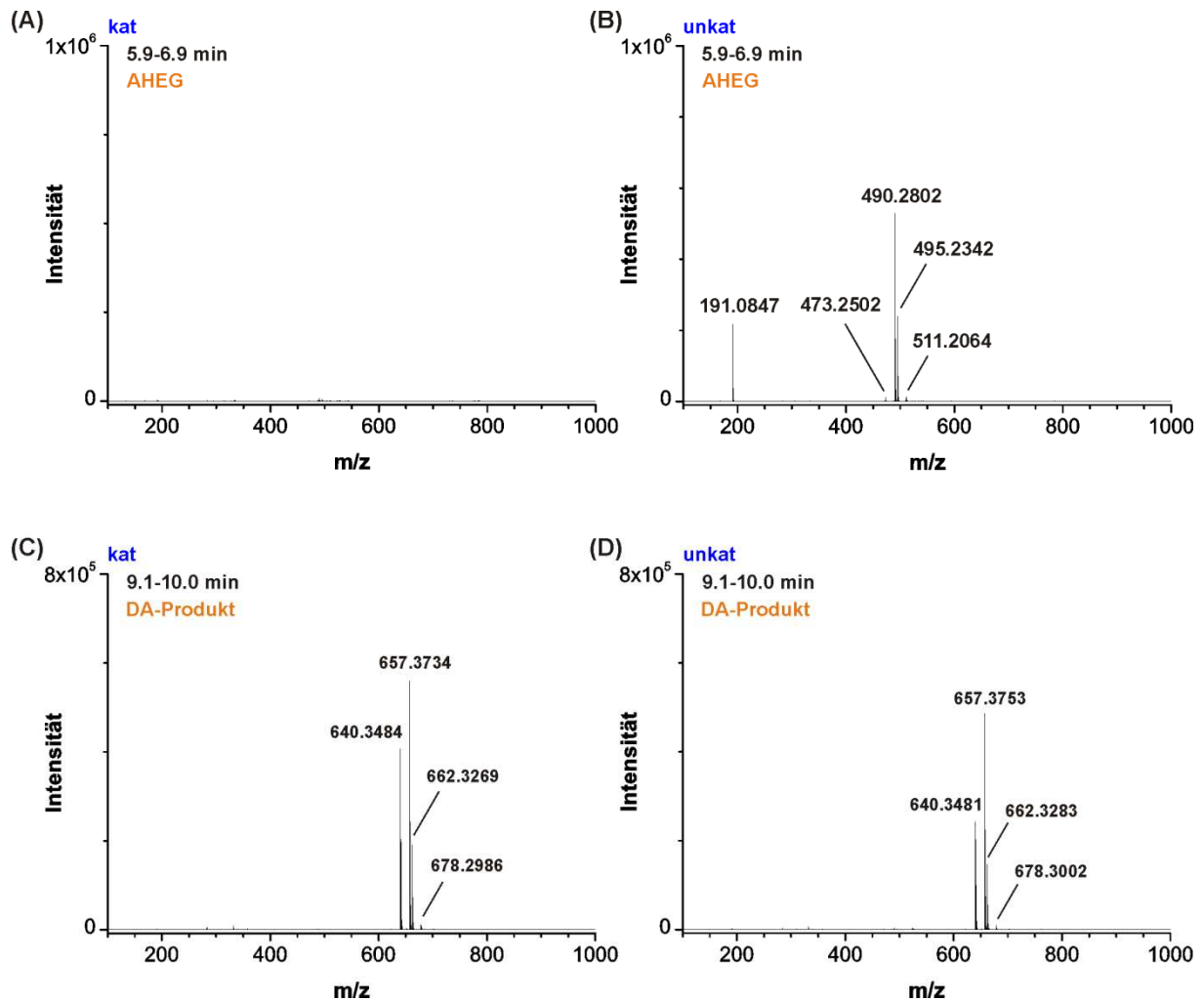


Abb. 29: M/z-Spektren für die ribozym-katalysierte (kat) - und unkatalysierte (unkat) Diels-Alder-Reaktion. (A)+(B): M/z-Signale des AHEG-Peak der Retentionszeit 5.9-6.9 min, (C)+(D): M/z-Signale des Diels-Alder-Produkts der Retentionszeit 9.1-10.0 min.

Ein Plateau der Diels-Alder-Produkt Signalintensitäten war in diesen Experimenten noch nicht erreicht, wie Einzelbestimmungen an Diels-Alder-Produkt höherer Stoffmengen zeigten (Experimente hier nicht gezeigt). Der Vergleich der TIC- und m/z-Signal-Intensitäten der ribozym-katalysierten zur unkatalysierten Reaktion würde auf eine ribozymbasierte Nebenreaktion des AHEG hindeuten. Unter Berücksichtigung der UV-Intensitäten des Diels-Alder-Produkts ist der Unterschied allerdings vermindert. Die Ergebnisse des HPLC-Assays der katalysierten Reaktion, die eine Nebenreaktion von 50% des AHEGs indizierten, wiesen auf eine wesentlich stärkere Nebenreaktion hin.

Zu berücksichtigen ist dabei, dass die HPLC-Quantifizierung nur auf Basis der UV-Absorptionsänderung und für die ersten 5% Reaktionsumsatz, einer Reaktionszeit von 2 min entsprechend, berechnet wurde.

Um eine exakte Bestimmung der LC-MS-Analyse durchzuführen wäre eine Quantifizierung nach definierten Zeitpunkten der Diels-Alder-Reaktionen mittels Kalibriergeraden der Einzelsubstanzen erforderlich.

Die Analyse der AHEG-Sauerstoff-Addukte von katalysierter - und unkatalysierter Reaktion zeigte Intensitätsunterschiede, wie in Abb. 30 (A)+(B) dargestellt. Jedoch wurden die einzelnen LC-MS-Analysen nicht über einen internen Standard kalibriert wodurch keine exakte Quantifizierung, sondern nur eine tendenzielle Auswertung möglich war.

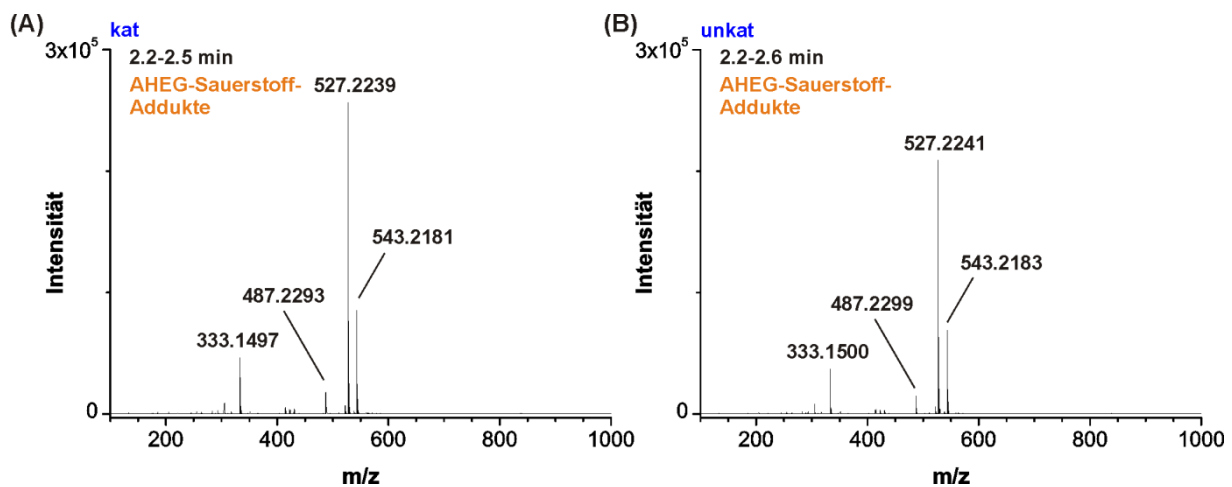


Abb. 30: M/z-Spektren der AHEG-Sauerstoff-Addukte der Retentionszeit von 2.2-2.6 min. (A): M/z-Signale für die ribozym-katalysierte (kat) Diels-Alder-Reaktion. (B): M/z-Signale für die unkatalysierte (unkat) Diels-Alder-Reaktion.

Im direkten visuellen Vergleich ist die höhere Intensität der m/z-Signale von 527.2252 und 543.2201 als $[AHEG+2O+Na]^+$ und $[AHEG+3O+Na]^+$ identifiziert, in der katalysierten Reaktion auffallend. Erwartet worden war eine niedrigere Intensität aufgrund der schnellen Abnahme des AHEGs in der ribozym-katalysierten Reaktion, was die Reaktion zwischen AHEG und Sauerstoff im Vergleich zur unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion vermindern sollte. Die Intensitätsunterschiede von $[AHEG+2O+Na]^+$ und $[AHEG+3O+Na]^+$ wurden zu 20% Intensitätserhöhung in der ribozym-katalysierten Reaktion bestimmt. Um die Intensitätserhöhung näher zu untersuchen wurden weitere Analysen durchgeführt, die im nächsten Abschnitt beschrieben werden.

Ein Vergleich der AHEG-Dimere, siehe Abb. 31 (A)-(D), zeigte für die unkatalysierte Reaktion als Summe der Intensitäten aus AHEG-Dimer- und den AHEG-Signalen um 12% (7.5-7.8 min) und 9% (7.8-8.1 min) höhere Intensitäten als für die ribozym-katalysierte Reaktion.

Die somit um ungefähr 10% verminderte Dimer-Intensität der katalysierten Reaktion ist aufgrund der hohen Katalyserate des Diels-Alderase-Ribozyms und der daraus resultierenden verminderten Verfügbarkeit des AHEG zur Dimerbildung erklärbar. M/z-Spektren anderer Retentionszeiten zeigten im Vergleich nur sehr kleine Intensitätsdifferenzen von <5%. Für NPM und die NPM-Addukte wurden für beide Reaktionen erwartungsgemäß nur minimale Intensitätsdifferenzen ermittelt, aufgrund des 10-fachen NPM Überschusses und somit annähernd konstanter NPM-Konzentration.

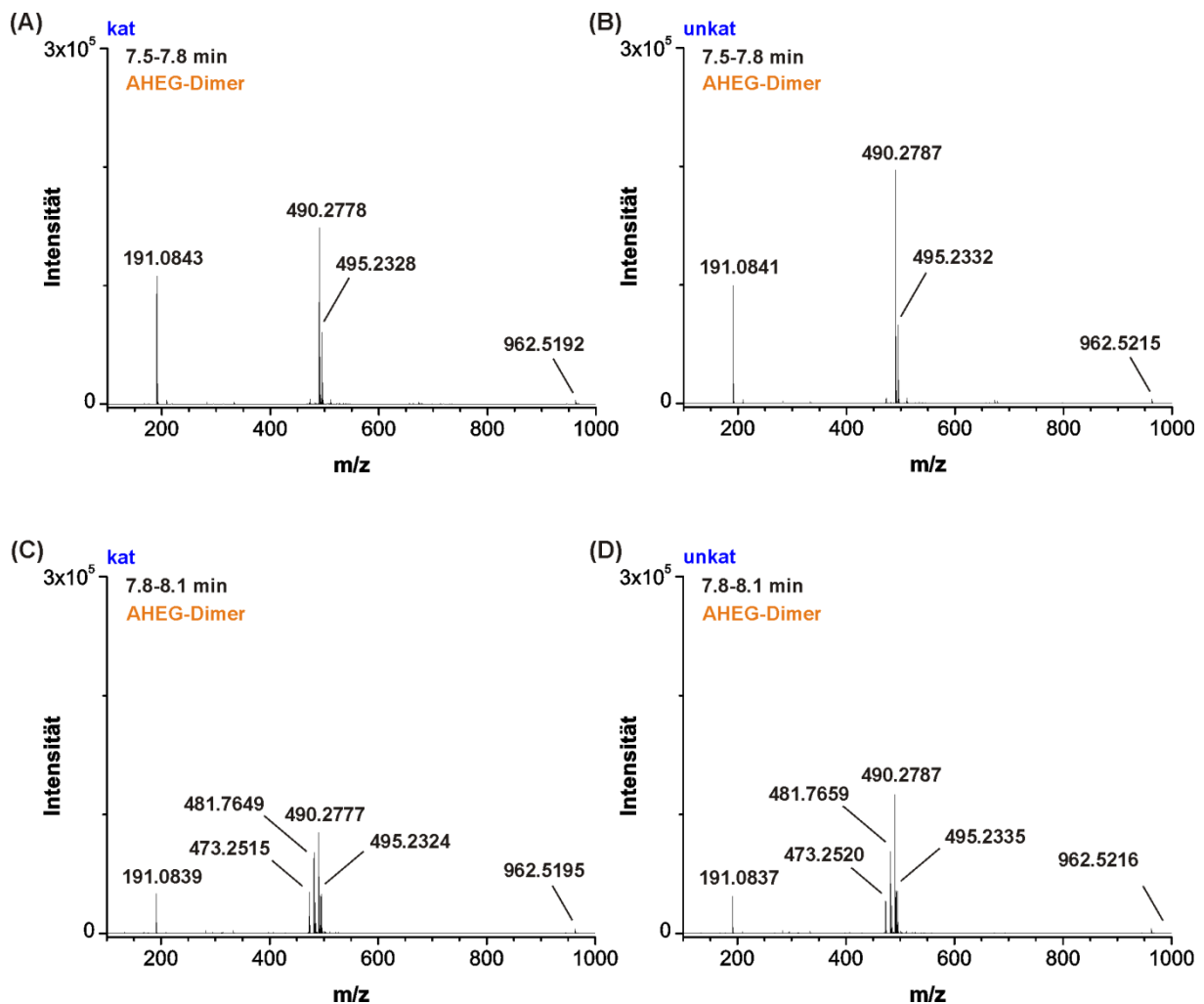


Abb. 31: M/z-Spektren des AHEG-Dimers der Retentionszeiten 7.5-7.8 min und 7.8-8.1 min. (A)+(C): M/z-Signale der ribozym-katalysierten Diels-Alder-Reaktion (kat), (B)+(D): M/z-Signale der unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion (unkat).

Um möglicherweise langsam ablaufende Nebenreaktionen der unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion detektieren und identifizieren zu können und um die Bildung der AHEG-Sauerstoff-Addukte genauer aufklären zu können, wurde die katalysierte – und die unkatalysierte Diels-Alder-Reaktion nach einer Reaktionszeit von 6 h und 24 h Stunden untersucht.

Verlängerte Reaktionszeit der Diels-Alder-Reaktionen

Nach einer Reaktionszeit von 24 h wurden keine neuen, zusätzlich entstandenen TIC-Peaks und m/z-Signale detektiert. Somit gab es auch nach 24-stündiger Reaktionszeit keine Hinweise auf Nebenreaktionen unter Bildung neuer, ionisierbarer Moleküle, siehe Abb. 32 (A)+(B).

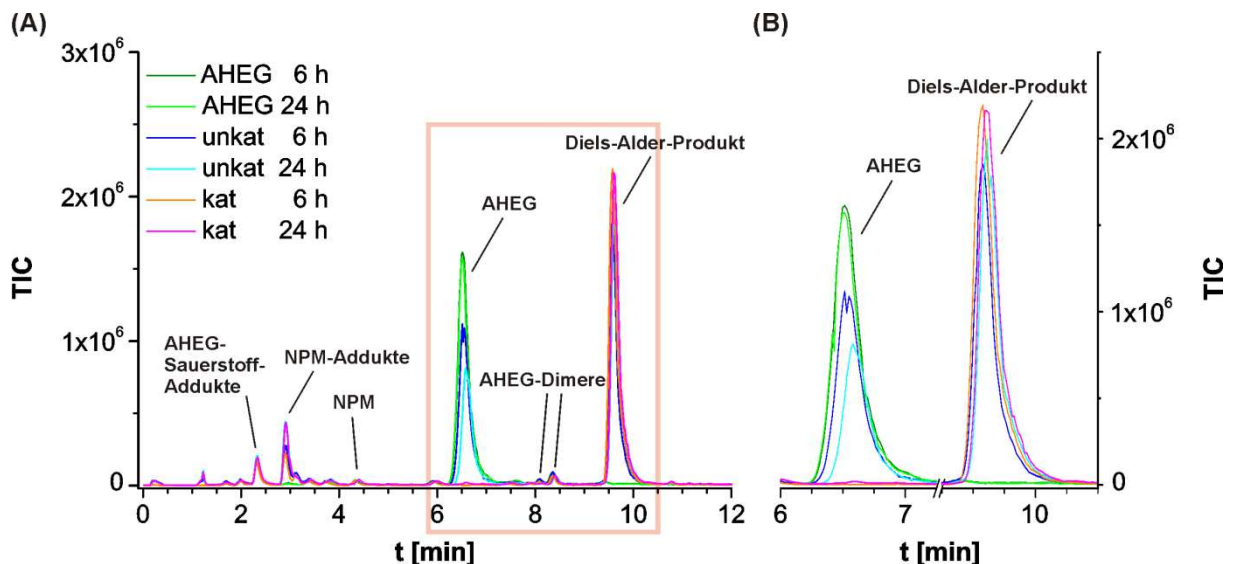


Abb. 32: LC-MS-Analyse der ribozym-katalysierten - und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion nach 6 h und 24 h im Vergleich zu AHEG (1000 pmol), entsprechend dem Reaktionsansatz aus 1000 pmol AHEG, 10 nmol NPM und für die katalysierte Reaktion mit 70 pmol Ribozym. (A): Übersicht der TIC-Intensität der Retentionszeit bis 12 min. Der Ausschnitt im rosa Rahmen ist in (B) vergrößert dargestellt. (B): Vergrößerter Ausschnitt von 6-12 min für AHEG und Diels-Alder-Produkt.

Der Intensitätsvergleich der m/z-Signale war insbesondere für die AHEG-Sauerstoff-Addukte von Interesse, aufgrund der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Intensitätszunahme in der ribozym-katalysierten Diels-Alder-Reaktion. Der Intensitätsvergleich wurde hier im Vergleich zu AHEG als Einzelsubstanz in äquivalenter Anfangs-Konzentration untersucht. Die m/z-Spektren der Retentionszeit von 2.2-2.5 min sind im Anhang in Abb. 61 (A)-(F), sowie weitere m/z-Spektren in Abschnitt 5.3.3 dargestellt.

Die AHEG-Sauerstoff-Addukte (2.2-2.5 min)

Im Vergleich der Intensitätsdifferenzen der AHEG-Sauerstoff-Addukte mit den m/z-Signalen von m/z 522.2698 [AHEG+2O+NH₄]⁺, 527.2252 [AHEG+2O+Na]⁺ und 543.2201 [AHEG+3O+Na]⁺ wurden die Addukte für die katalysierte Reaktion zu um 8% erhöht zur unkatalysierten Reaktion und um 19% erhöht zur AHEG-Einzelkomponente nach 6 h ermittelt.

Nach 24 h waren die Intensitäten aller drei Reaktionslösungen gegenüber 6 h erhöht: um 15% für die katalysierte Reaktion, um 40% für die unkatalysierte - und um 10% für die AHEG-Einzelkomponente. Nach der Reaktionszeit von 24 h waren daraus folgernd die Intensitäten der unkatalysierten Reaktion um 15% zur katalysierten Reaktion und um 40% zu AHEG erhöht.

Die ermittelten Intensitätsunterschiede der AHEG-Sauerstoff-Addukte waren somit relativ gering, so dass keine signifikante Differenzierung über deren Bildung in der katalysierten zur unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion und zu AHEG als Einzelkomponente möglich war. Die Intensitätsverhältnisse nach 6 h könnten auf die Bildung von AHEG-Sauerstoff-Addukten in der Diels-Alder-Reaktion und auf einen zusätzlichen positiven Einfluss des Diels-Alderase-Ribozyms hindeuten. Die höhere Zunahme des Addukts in der unkatalysierten Reaktion über 24 h wurde durch das noch frei vorhandene AHEG, im Gegensatz zur katalysierten Reaktion, erklärt. Die höhere Intensität im Vergleich zur AHEG-Einzelkomponente wäre nur durch die Entstehung der Addukte im Verlauf neben der Diels-Alder-Reaktion möglich. Die Zunahme der AHEG-Sauerstoff-Addukte der katalysierten Reaktion von 6 h zu 24 h könnte aus der Intensitätsabnahme der AHEG-Dimere (siehe Abb. 64 in Abschnitt 5.3.3) von 6 h zu 24 h resultieren. Vorstellbar wäre dabei eine langsame Zerfallsreaktion der AHEG-Dimere, aufgrund verminderter Stabilität, in zwei AHEG-Moleküle. Diese AHEG-Moleküle könnten mit den Sauerstoff-Molekülen der Lösung reagieren und somit die Intensitätserhöhung der AHEG-Sauerstoff-Addukte in der katalysierten Reaktion von 6 h zu 24 h erklären, siehe Abb. 61 im Anhang unter 5.3.3.

Um zu untersuchen, ob die nur relativ geringe Intensitätserhöhung der ribozym-katalysierten Reaktion auf der schnellen Abnahme an freiem AHEG basiert, wurden LC-MS Messungen von AHEG und Diels-Alder-Produkt in An- und Abwesenheit des Diels-Alderase-Ribozyms durchgeführt.

3.3.3 Einfluss des Ribozyms auf AHEG und Diels-Alder-Produkt

Um einen direkten Einfluss des Ribozyms auf die Bildung von AHEG-Sauerstoff-Addukte und die Intensitäten des AHEGs und Diels-Alder-Produkts zu untersuchen, wurden jeweils Analysen von AHEG und Diels-Alder-Produkt in An- und Abwesenheit von Ribozym, Puffer und Na^+ - und Mg^{2+} -Ionen durchgeführt.

Die Bedingungen waren analog denen der Diels-Alder-Reaktionen. Die TIC-Intensitäten sind in Abb. 33 dargestellt.

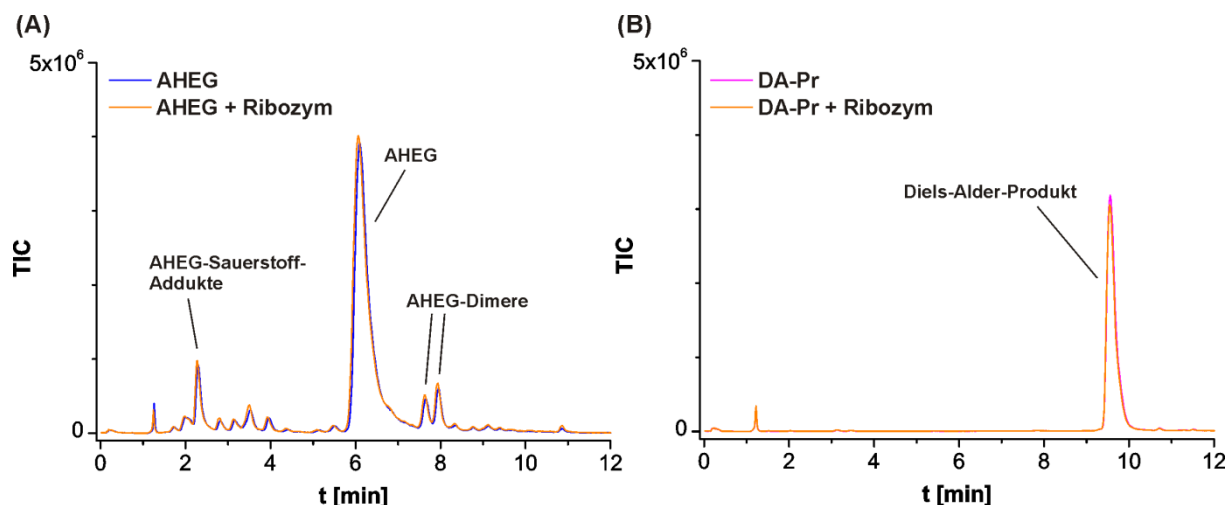


Abb. 33: TIC-Intensitäten von AHEG und Diels-Alder-Produkt mit und ohne Diels-Alderase-Ribozym. AHEG und Diels-Alder-Produkt wurden zu 1000 pmol, das Ribozym zu 70 pmol eingesetzt. (A): AHEG (blau), AHEG + Ribozym (orange). (B): Diels-Alder-Produkt (DA-Pr) (magenta), DA-Pr + Oligo (orange).

Für beide Moleküle führte die Anwesenheit von Ribozym nur zu minimalen Unterschieden der TIC-Intensitäten. Folglich gab es keine Indizien für eine ribozymbasierte Bildung von AHEG-Sauerstoff-Addukten und auch keine Änderungen der Intensitäten, Ionisierbarkeiten und Konzentrationen von AHEG und Diels-Alder-Produkt durch das Ribozym. Einen Einfluss des Ribozyms auf die Bildung von AHEG-Sauerstoff-Addukten wäre nur noch in Anwesenheit von NPM und Diels-Alder-Produkt möglich, erscheint aber aufgrund der schnell abnehmenden AHEG-Konzentration als sehr unwahrscheinlich.

3.3.4 Einfluss von UV-Bestrahlung

Zur Untersuchung des Einflusses von UV-Bestrahlung auf die Diels-Alder-Reaktionen wurden die Reaktionslösungen mit einer UV-Lampe bei 254 nm und 365 nm, den Absorptionsmaxima von Anthracen, bestrahlt und die Reaktionslösungen anschließend mittels LC-MS analysiert.

Analyse der einzelnen Edukte und des Diels-Alder-Produkts

Einzelanalysen der Edukte und des Diels-Alder-Produkts wurden durchgeführt um das Verhalten der einzelnen Moleküle getrennt zu detektieren und um Reaktionsprodukte der Diels-Alder-Reaktionen von denen der Einzelkomponenten differenzieren zu können.

Die TIC-Chromatogramme sind für AHEG in Abb. 34 und für NPM und Diels-Alder-Produkt im Anhang unter 5.3.4 in Abb. 65 dargestellt.

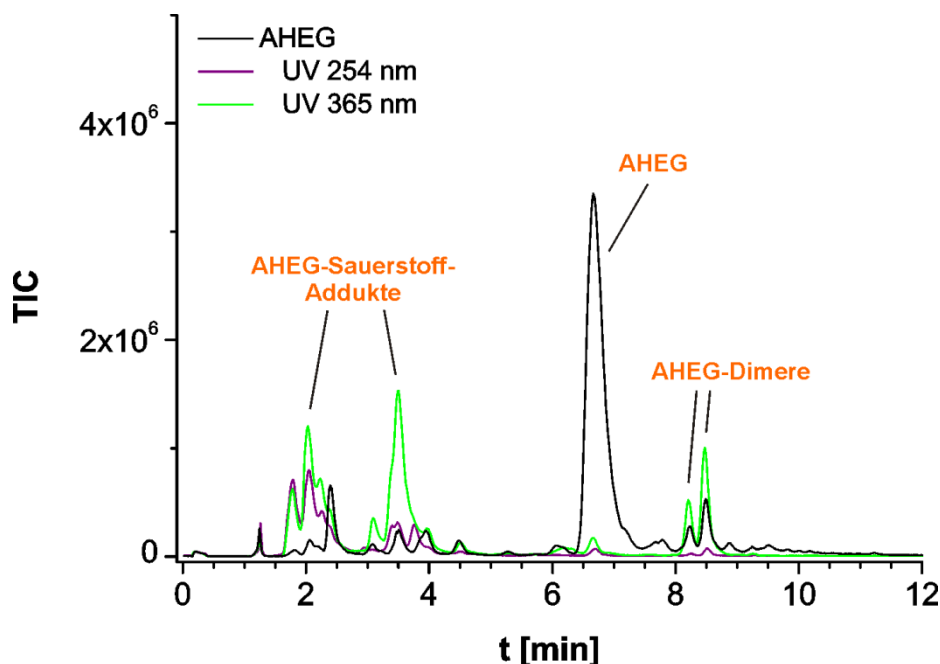


Abb. 34: TIC-Intensität für AHEG (2000 pmol) unbestrahlt (schwarz), nach 2 h Bestrahlung bei 254 nm (violett) und 365 nm (hellgrün).

Für das AHEG wurde nach UV-Bestrahlung beider Wellenlängen das fast vollständige Verschwinden des TIC-Peaks der AHEG-Molekül-Ionen (6.4-7.3 min) detektiert. Die größte Änderung der Peak-Intensitäten trat nach Bestrahlung bei 365 nm auf, als Zunahme der AHEG-Sauerstoff-Addukte (1.6-2.5 min und 2.7-4.1 min) und der AHEG-Dimere (8.1-8.6 min), m/z -Spektren: siehe Anhang 5.3.4, Abb. 66 und 67).

Der Vergleich der m/z -Spektren von bestrahlter und unbestrahlter AHEG-Einzelkomponente für **1.6-2.5 min** und **2.7-4.1 min** wies für beide Wellenlängen jeweils ein sehr ähnliches m/z -Signalmuster mit denselben Molekül-Ionen auf. Die höchsten Intensitäten der Molekül-Ionen traten bei Bestrahlung mit 365 nm auf. Insgesamt entstanden durch die UV-Bestrahlung AHEG-Sauerstoff-Molekül-Ionen mit zwei und drei O-Atomen. Für **1.6-2.5 min** wurde auch eine Zunahme von m/z 545.2342 $[AHEG+3O+2H+Na]^+$ und m/z 540.2803 $[AHEG+3O+2H+NH_4]^+$ detektiert.

Diese Zunahme im Vergleich zu unbestrahltem AHEG könnte aus Endoperoxiden oder deren Reaktionsprodukten in einer weiteren Reaktion durch Sauerstoffaddition entstehen.

Als weitere Molekül-Ionen wurde die Zunahme von m/z 529.2387 $[\text{AHEG}+2\text{O}+2\text{H}+\text{Na}]^+$, das wie für AHEG beschrieben als DihydroxyanthracenHEG Molekül **42** vorliegen könnte, beobachtet, siehe Abb. 23. Die Zunahme des Signals m/z 305.1546 $[\text{HEG}+\text{Na}]^+$ zeigte die erhöhte Spaltung des AHEG durch UV-Bestrahlung auf.

Bestrahlung bei 365 nm führte zur starken Intensitätserhöhung von m/z 522.2674 $[\text{AHEG}+2\text{O}+\text{NH}_4]^+$ und m/z 527.2224 $[\text{AHEG}+2\text{O}+\text{Na}]^+$ (**2.7-4.1 min**), die als Endoperoxide oder den daraus entstandenen Produkten aufgebaut sein könnten, wie in Abschnitt 3.3.1 für das AHEG beschrieben. Ausserdem wurden m/z 568.3086 $[\text{AHEG}+3\text{O}+6\text{H}+2\text{C}+\text{NH}_4]^+$ und m/z 573.2640 $[\text{AHEG}+3\text{O}+6\text{H}+2\text{C}+\text{Na}]^+$ gebildet, die möglicherweise durch Reaktion mit dem in der Reaktionslösung enthaltenen Ethanol und durch zusätzliche Sauerstoff-Addition und Hydrierung entstanden sein könnten. Für die Dimer-Signale (**8.1-8.6 min**) wurden ebenfalls Intensitätserhöhungen mit 365 nm > 254 nm > unbestrahlt detektiert. Diese Wellenlängenabhängigkeit entspricht der in der Literatur beschriebenen Abhängigkeit der Bildung von Endoperoxiden und deren Reaktionsprodukten aus homolytischen O-O-Spaltungen von der Wellenlänge mit den höchsten Bildungsraten bei 340-365 nm.^(129, 131-133) Bei 254 nm wurde keine Zunahme der AHEG-Signale detektiert, entgegen der in der Literatur beschriebenen Cycloreversion von Anthracen-Endoperoxid zu Anthracen.⁽¹⁴⁰⁾ Möglicherweise könnte die Reaktion anstatt zu AHEG zur Bildung nicht-ionisierbarer Moleküle, oder durch Spaltungsreaktionen zu kleineren nicht-detektierbaren Fragmenten führen.

Das NPM zeigte nach UV-Bestrahlung bei 365 nm eine starke Abnahme der NPM-Addukte mit Hydroxid-Ionen und Ethanol ohne signifikante Peakzunahme anderer Retentionszeiten. Für das Diels-Alder-Produkt wurde nur ein geringer Einfluss von UV-Bestrahlung mit einer leichten Zunahme an Abbauprodukten bei 254 nm detektiert. Die Bestrahlung sollte somit für diese beiden Moleküle keinen Einfluss auf die Diels-Alder-Reaktion haben.

UV-Bestrahlung der katalysierten - und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion ergab in der LC-MS-Analyse keine Hinweise auf durch UV-Bestrahlung generierte Nebenreaktionen (TIC-Chromatogramm nicht gezeigt).

3.3.5 Fazit und Ausblick

Die Aufklärung von vermuteten Nebenreaktionen der ribozym-katalysierten - und der unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion mittels LC-MS ergab keine Hinweise auf neugebildete Moleküle, neben denen der für die Einzelmoleküle identifizierten Moleküle.

Detektiert und identifiziert werden konnten neben einzelnen Edukten und dem Diels-Alder-Produkt auch deren Addukte mit zum Teil nur geringen m/z-Differenzen der Moleküle. Somit konnten unterschiedliche AHEG-Sauerstoff-Addukte getrennt und deren m/z-Signale Molekül-Ionen zugeordnet werden. Die Sensitivität der Methode war folglich ausreichend. Zur Aufklärung der beiden Diels-Alder-Reaktionen in Bezug auf Substrat-Abnahme, Produkt-Zunahme und die Bildung von Nebenreaktionsprodukten sind also weitere Untersuchungen erforderlich. Einige weiterfolgende Experimente und Methoden werden nachfolgend vorgestellt.

Um für die beiden Diels-Alder-Reaktionen die Molekül-Ionen der AHEG-Abnahme und der Diels-Alder-Produkt-Zunahme genau bestimmen zu können, sollten quantifizierende Analysen mit definierten Reaktionszeiten durch Abstoppen der Reaktionen mit β -Mercaptoethanol durchgeführt werden. Die Quantifizierung sollte über Kalibriergeraden der Edukte und Produkte, ähnlich denen der HPLC-Analyse, erfolgen. Im Vergleich zur HPLC würden neben den quantitativen Ergebnissen der UV-Absorption auch quantitative m/z-Signale erzeugt werden. Die Quantifizierung der katalysierten - und der unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion mittels LC-MS würde die exakte Auswertung kleiner Intensitätsunterschiede der detektierten Molekül-Ionen ermöglichen und könnte somit zur Aufklärung der Reaktionen beitragen.

Weitere Experimente mit erhöhter mehrmaliger AHEG-Zugabe in die ribozym-katalysierte Diels-Alder-Reaktion könnten aufzeigen, ob die Bildung von AHEG-Sauerstoff-Addukten im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion und zu AHEG als Einzelkomponente tatsächlich erhöht ist.

Möglicherweise könnten nichtionisierbare Nebenreaktionsprodukte gebildet werden, die wie unpolare polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe PAHs³¹, Komplexbildungen mit Silber- oder Tropyliumkationen in einer Nachsäulenderivatisierung eingehen könnten und so ionisiert und detektiert werden könnten.⁽¹⁶⁰⁻¹⁶¹⁾

³¹ PAH aus „polycyclic aromatic hydrocarbons“

Elektrochemische Ionisierungen, die zur Ionisierung von PAHs von van Leeuwen *et al.*⁽¹⁶²⁾ beschrieben wurden, scheinen zur Detektion von Nebenreaktionen ungeeignet. Aufgrund der in der Literatur⁽¹⁶²⁾ beschriebenen Bildung unterschiedlicher PAH-Sauerstoff-Addukte und reaktiver Radikale mit dieser Ionisierungsmethode würde die Aufklärung von Reaktionen durch die Entstehung einer Vielzahl an neu gebildeten Molekülen verkompliziert werden. Gleiches wird für intensivere Ionisierungsbedingungen vermutet, die die Anzahl von Fragment-Ionen erhöhen würden.

Die Ionisierung mittels APCI „Atmospheric Pressure Chemical Ionization“, die im Gegensatz zur ESI auch Ionen aus unpolareneren Molekülen erzeugen kann, könnte bisher in der ESI nicht detektierbare unpolare oder nur schwer ionisierbare Moleküle detektierbar machen und so zur Aufklärung von Nebenreaktionen führen.⁽¹⁰⁶⁾

3.4 Wasserstoff-Brücken-Bindungen innerhalb der katalytischen Tasche

Das aus der Kristallstruktur abgeleitete Wasserstoff-Brücken-Netzwerk der katalytischen Tasche des Diels-Alderase-Ribozyms enthält als wichtiges Element das Basentripel G2-C10-U17, worin das Basepaar G2-C10 über eine Wasserstoffbrücke des 4-NH₂ von C10 mit dem 2-O des U17 verbunden ist. Diese eine Wasserstoff-Brücken-Bindung bildet strukturell die Verbindung des „Daches“ und des „Rückgrats“ der katalytischen Tasche, siehe Abb. 35 (A). Eine weitere Wasserstoff-Brücken-Bindung ist zwischen dem 3-NH von U17 und dem 2'-OH von G9 ausgebildet. Beide Nukleotide bilden weitere Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen dem Ribozym und dem Diels-Alder-Produkt von 2-NH₂ des G9 und 2'-OH des U17 zum Maleimid-Carbonyl-Sauerstoff des Diels-Alder-Produkts aus, siehe Abb. 35 (B). Diese drei Interaktionen besitzen eine zentrale Rolle mit wichtigen strukturellen und katalytischen Funktionen in der katalytischen Tasche, wie in früheren Mutationsstudien gezeigt wurde.^(60, 62) Die Bedeutung der Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen C10 und U17 und den beiden zwischen G9 und U17 zum Diels-Alder-Produkt werden in diesem und dem nächsten Kapitel auf ihren strukturellen und katalytischen Einfluss hin untersucht.

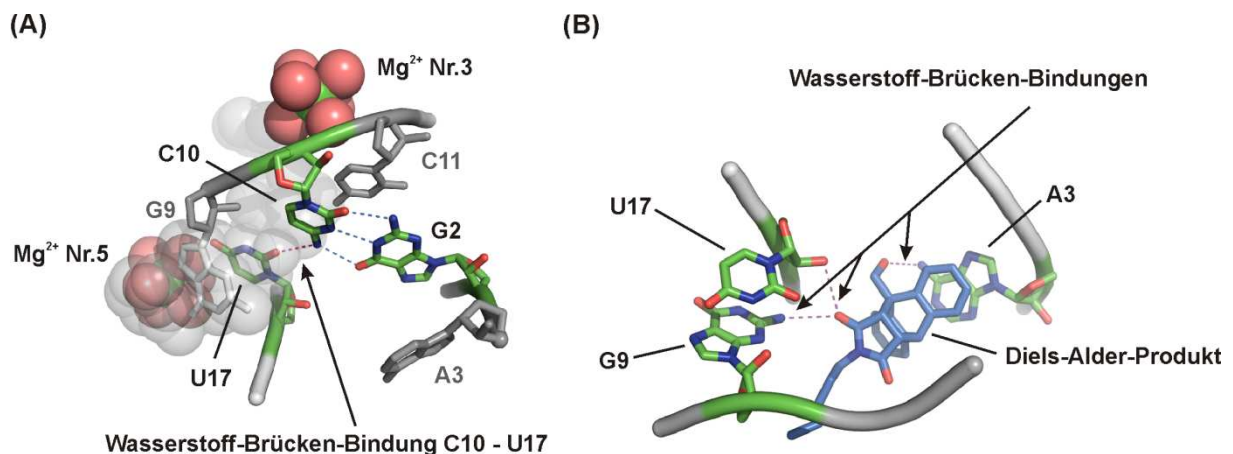


Abb. 35: Wasserstoff-Brücken-Bindungen (aus der Kristallstruktur abgeleitet). (A): Interaktionen zwischen U17-C10-G2 als Verbindung des „Daches“ und „Rückgrats“ der katalytischen Tasche durch die Wasserstoff-Brücken-Bindung von 4-NH₂ des C10 zum Carbonyl-Sauerstoff 2-O des U17 (violett). (B): Interaktion zwischen RNA und Diels-Alder-Produkt: 2-NH₂-Gruppe von G9 und 2'-OH von U17 mit dem Carbonyl-Sauerstoff der Maleimid-Gruppe des Diels-Alder-Produkts (violett). Die Wasserstoff-Brücken-Bindung der 6-NH₂-Gruppe des A3 mit dem erstem Ethersauerstoff des Polyethylenglykollinkers des Diels-Alder-Produkts (violett), wurde als nicht essentiell identifiziert.^(60, 93-94)

In einer früheren Arbeit wurde die Relevanz der Wasserstoff-Brücken-Bindung (H-Brücke) zwischen dem 3-NH von U17 und dem 2'-OH von G9 in atomaren Mutagenese-Studien bezogen auf die relative Reaktivität k_{rel} [%] untersucht.³² Die Substitution von G9 durch 2'-desoxy-G9 mit k_{rel} von nur 4% und 2'-OMe-G9 mit k_{rel} von 1.5% demonstrierten die Sensitivität der Interaktion.⁽⁶²⁾ 2'-OMe als Wasserstoff-Brücken-Akzeptor anstatt 2'-OH mit Akzeptor- und Donor-Funktion, sollte mit 3-NH als Donor eine intakte H-Brücken-Bindung bilden. Sterische Hinderung oder Abschirmung der negativen Partiaalladung des Akzeptor-Sauerstoffs könnte die festgestellte geringe Aktivität begründen. Die doppelte Modifikation 2'-OMe-G9 und U17C zu zwei H-Brücken-Akzeptoren ohne Ausbildung der Wasserstoff-Brücken-Bindung führte zu völliger Inaktivität, was die wichtige Funktion dieser Interaktion unterstreicht.

Die detailliertere Relevanz und Funktion der Wasserstoff-Brücken-Bindungen in Bezug auf Stabilität, Aktivität und Interaktion mit dem Diels-Alder-Produkt wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der atomaren Mutagenese in Kombination mit verschiedenen Methoden genauer bestimmt. Die Ergebnisse werden in den Kapiteln 3.4 und 3.5 vorgestellt und diskutiert. Funktionelle Gruppen wurden entfernt, hinzugefügt, durch andere Funktionen ersetzt und als Einzel-Modifikationen oder kombinatorisch in Doppelmутanten auf deren Einfluss auf die katalytische Aktivität und Stabilität der Ribozym-Struktur hin analysiert.

3.4.1 Strukturelle Untersuchung des Diels-Alderase-Ribozyms durch Pb²⁺-Probing

Frühere Probing-Experimente mit Pb²⁺-Ionen für das 49mer Wildtyp-Ribozym³³ führten zu folgenden Erkenntnissen: unter nativen Bedingungen (10 mM Mg²⁺-Ionen) trat im unteren Teil der Ausbuchtung (A15 bis U20) stärkere Spaltung als im oberen Teil (U8 bis A12) auf. Intensive Spaltung wurde bei U17 und C19 bei Spaltungs-Verringerung mit steigender Mg²⁺-Ionen Konzentration und etwas weniger intensiv für A15 und A16 unabhängig von der Mg²⁺-Ionen Konzentration beobachtet. Für A18 wurde nur sehr geringe Spaltung detektiert. In den beiden Schleifen L1 und L2 trat nur moderate Spaltung auf. Zur Darstellung dieser Ergebnisse, siehe Abb. 36.

³² Mutationsstudien von Dr. Dirk Bebenroth durchgeführt

³³ Probing-Experimente von Dr. Sonja Keiper durchgeführt

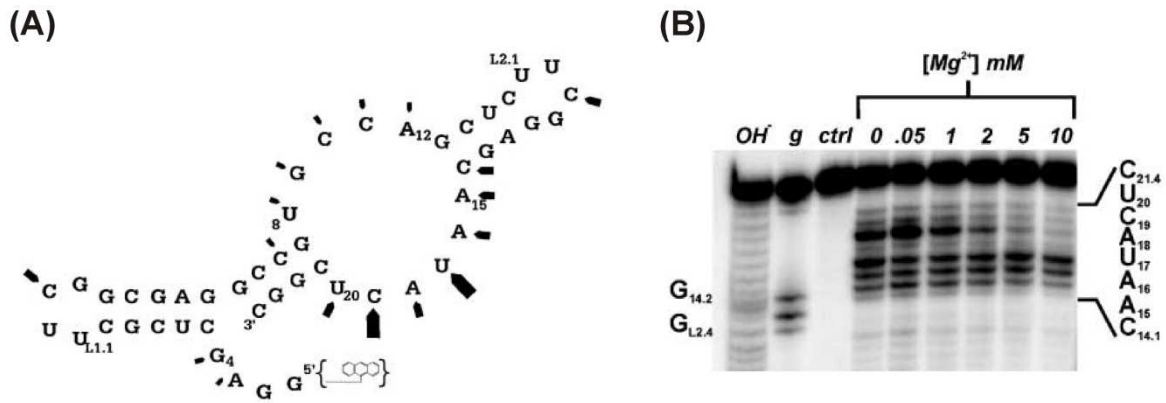


Abb. 36: Frühere Pb²⁺-Probing Ergebnisse des Wildtyp Diels-Alderase-Ribozyms. (A): 49mer Ribozym-Struktur. Die Pfeilgröße symbolisiert die Spaltungsintensität. (B): Pb²⁺-Probing in Abhängigkeit der Mg²⁺-Ionen Konzentration (0-10 mM) mit „OH⁻“, „g“ und „ctrl“ für alkalische Hydrolyseleiter, RNase T1 Leiter und der Kontrollinkubation ohne Pb²⁺-Ionen in 15% PAGE. Adaptiert aus Keiper *et al.*⁽⁶⁰⁾.

Die Anwesenheit von am 5'-Ende gebundenem AHEG oder von freien Substraten und Produkt führten im Probing nur zu geringen Unterschieden. Für Pb²⁺-Probing mit Anthracen-Konjugat wurde für C19 eine geringe Abhängigkeit der Spaltung in Bezug auf die Mg²⁺-Ionen Konzentration detektiert. Eine hohe AHEG-Konzentration von 0.5 mM führte im unteren Teil der Ausbuchtung (A15 bis U20) zu einer leichten Stabilisierung, wohingegen freies Dienophil oder Diels-Alder-Produkt auch in hohen Konzentrationen von 5 mM keinen Einfluss zeigte.^(60, 163)

3.4.2 Untersuchung der Wasserstoff-Brücken-Bindung von C10 und U17 durch Pb²⁺-Probing

In dieser Arbeit wurden zur Aufklärung der funktionellen Relevanz der H-Brücken-Bindung zwischen 4-NH₂ des C10 und 2-O des U17 chemische Probing-Experimente mit Pb²⁺-Ionen durchgeführt. Hierzu wurde die Wildtyp-Sequenz mit U in Position 17, eine Sequenz mit U17C-Modifikation mit k_{rel} 33% und die komplett inaktive U17isoC-Mutante verwendet.⁽⁶²⁾ Während in der U17C-Mutante die Wasserstoff-Brücke C10 – U17 noch intakt ist, ist sie in der U17isoC-Mutante gestört (siehe Abb. 37).

Zur Bewertung des Einflusses der Mg²⁺-Ionen und des Diels-Alder-Produktes auf die Ribozym-Stabilität im Vergleich von intakter und gestörter Wasserstoff-Brücken-Interaktion, erfolgte die Probing-Reaktion mit variabler Mg²⁺-Ionen Konzentration (0 - 10 mM) und in An- bzw. Abwesenheit von Diels-Alder-Produkt (1 mM, Molekül 18, Abb. 12).

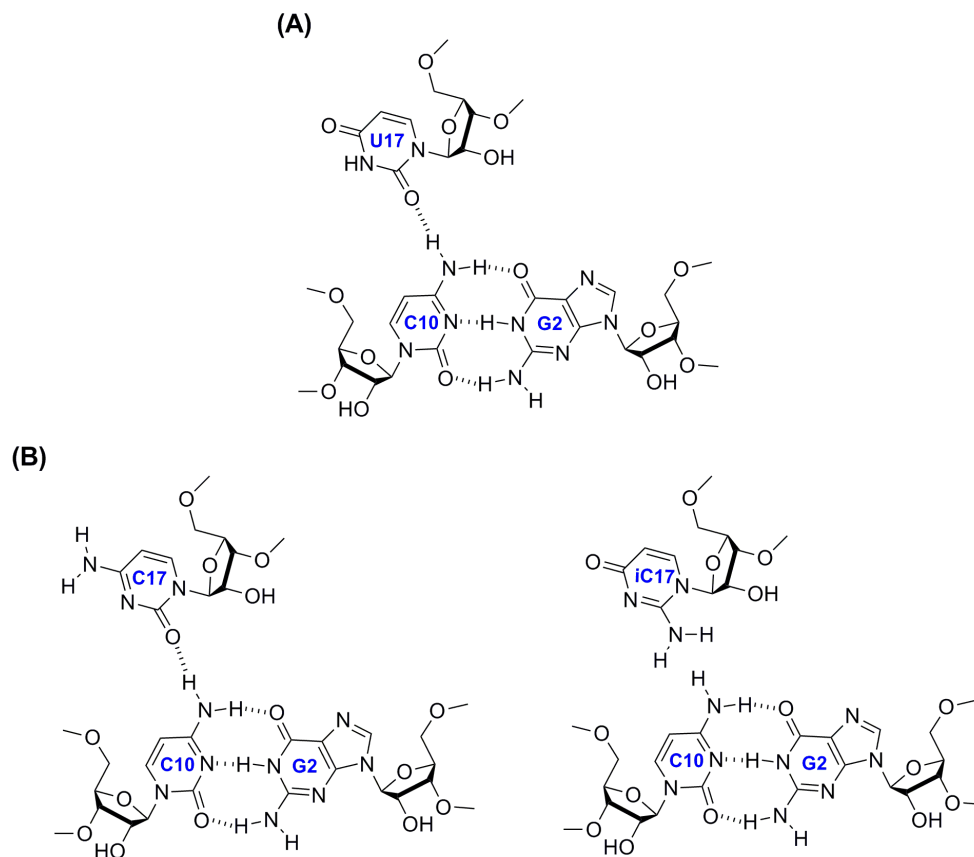


Abb. 37: Wasserstoff-Brücken-Bindungen von U17 - C10 - G2. (A): Wildtyp mit C10 und U17, (B): Modifikationen C10 und C17 mit intakter Wasserstoff-Brücke (linke Grafik) und ohne Wasserstoff-Brücke zwischen C10 und iC17 (Abkürzung für isoC17) (rechte Grafik).

Die Zuordnung der Probing-Banden erfolgte anhand einer alkalischen Hydrolyseleiter und RNase T1 Leiter nach gelelektrophoretischer Auftrennung (denaturierende PAGE) und Detektion per Radiographie.

Pb²⁺-Probing in Abhängigkeit der Mg²⁺-Ionen Konzentration

Eine Übersicht der Probing-Banden der drei Sequenzen in Abhängigkeit der Mg²⁺-Ionen Konzentration ist in Abb. 38 dargestellt. Alle drei Sequenzen zeigten für die untere Hälfte der katalytischen Tasche (A15 bis U20), in Abb. 38 als untere Ausbuchtung bezeichnet, die höchste Intensität der Probing-Banden. Im oberen Teil der katalytischen Tasche (U8 bis A12) entstanden nur Spaltungsbanden schwacher Intensität.

Während die Probing-Muster insgesamt im Vergleich der drei Sequenzen sehr ähnlich waren, was auf eine ähnliche Gesamtstruktur („overall structure“) schließen lässt, zeigte die untere Hälfte der katalytischen Tasche (A15 bis U20) signifikante Unterschiede.

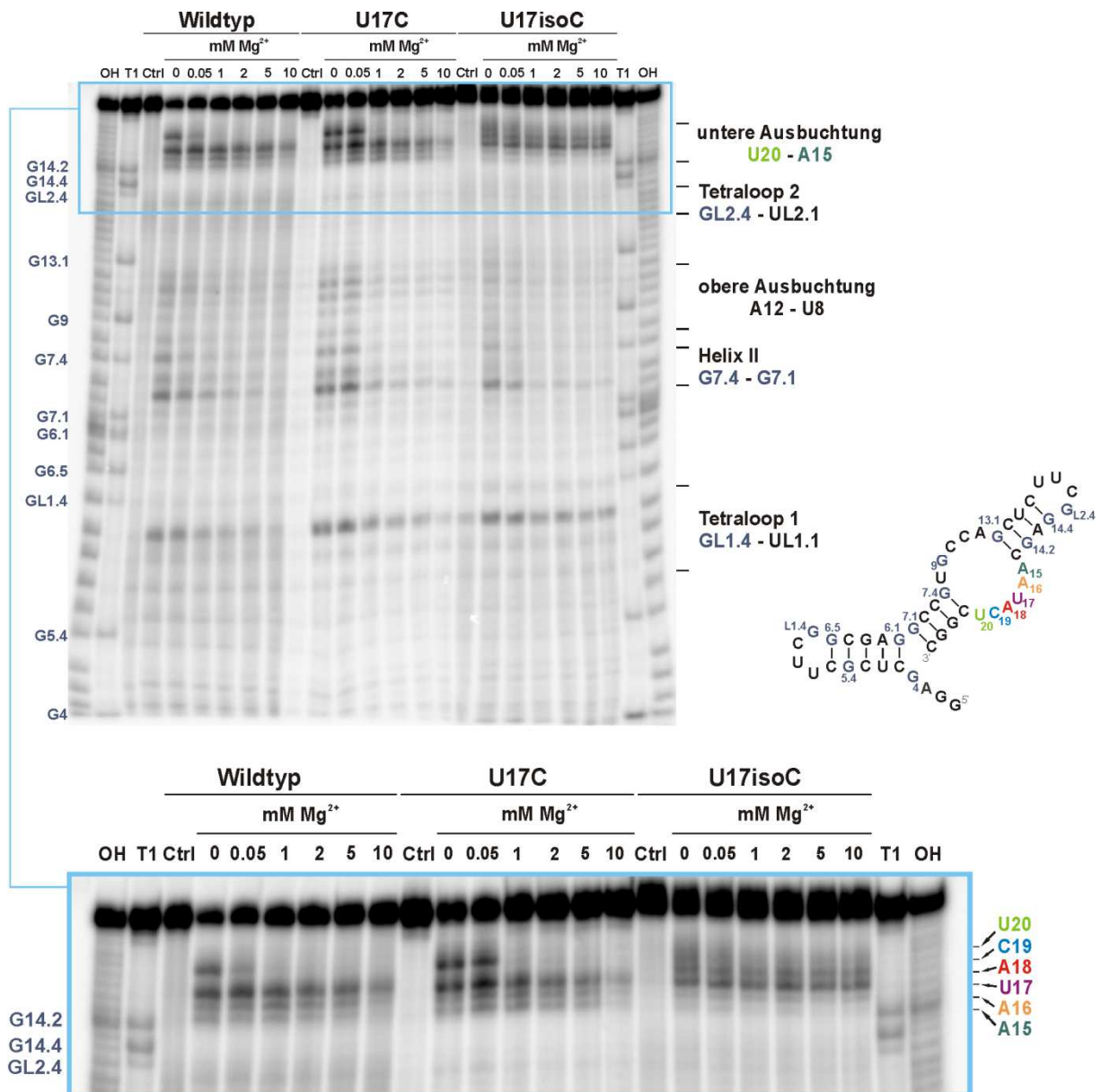


Abb. 38: Gelelektrophoretische Auftrennung (PAGE-Gel) des Pb^{2+} -Probing für 5'- ^{32}P -markiertes Wildtyp-Ribozym, die U17C- und U17isoC-Mutante in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Ionenkonzentration (0-10 mM). OH: alkalische Hydrolyseleiter, T1: RNase T1 Leiter, Ctrl: Kontrollinkubation ohne Pb^{2+} -Ionen. Die linke Beschriftung (marineblau) zeigt G-Banden der T1 Leiter. Die rechte Beschriftung zeigt die zugeordneten Bereiche und Nucleobasen im Diels-Alderase-Ribozym mit Ausrichtung auf die U17isoC-Mutante, unter Nichtberücksichtigung der höhenverzerrten rechten OH-Leiter. Das untere Gel (publiziert in Kraut *et al.*⁽¹⁶⁴⁾) stellt den hellblau markierten vergrößerten Ausschnitt des kompletten PAGE-Gels dar.

Probing im unteren Bereich der katalytischen Tasche

Das Nucleotid A18, als direkter Nachbar von U17, war im Wildtyp-Ribozym und in der U17C-Modifikation komplett vor der Hydrolyse der Probing-Reaktion geschützt, wohingegen es in der U17isoC-Mutante effizient und unabhängig von der Mg^{2+} -Ionenkonzentration gespalten wurde. A18 ist in eine Reihe von Interaktionen involviert, z.B. in die Bildung des reversen Hoogsteen-Basenpaars A18-U8 als formale Verlängerung der Helix II um ein Basenpaar.

Als Teil des scharfen Biegung (A18 bis C21.4) stapelt es mit C21.4, siehe Abb. 39 (A). Im Wildtyp scheinen diese Wechselwirkungen das A18 vor der Spaltung durch Hydrolyse zu schützen, obwohl es sich formal einzelsträngig im unteren Teil der katalytischen Tasche und als Nukleotid im scharfen Turn unter Stabilisierung der Mg^{2+} -Ionen Nr.1 und 2 befindet. Eigentlich sollten Mg^{2+} -Ionen als Bindungsstellen divalenter Ionen die Hydrolyse in diesem Bereich verstärken. Die Spaltung des A18 in der U17isoC-Mutante unabhängig von der Mg^{2+} -Ionen Konzentration deutet auf eine verringerte Stabilisierung des A18 durch Interaktionen und eine bessere Zugänglichkeit des 2'-OH hin. Erklärbar wäre dies infolge verringerter Kompaktheit der Ribozym-Struktur bei gleicher Gesamtstruktur über den kompletten Konzentrationsbereich der Mg^{2+} -Ionen Konzentration.

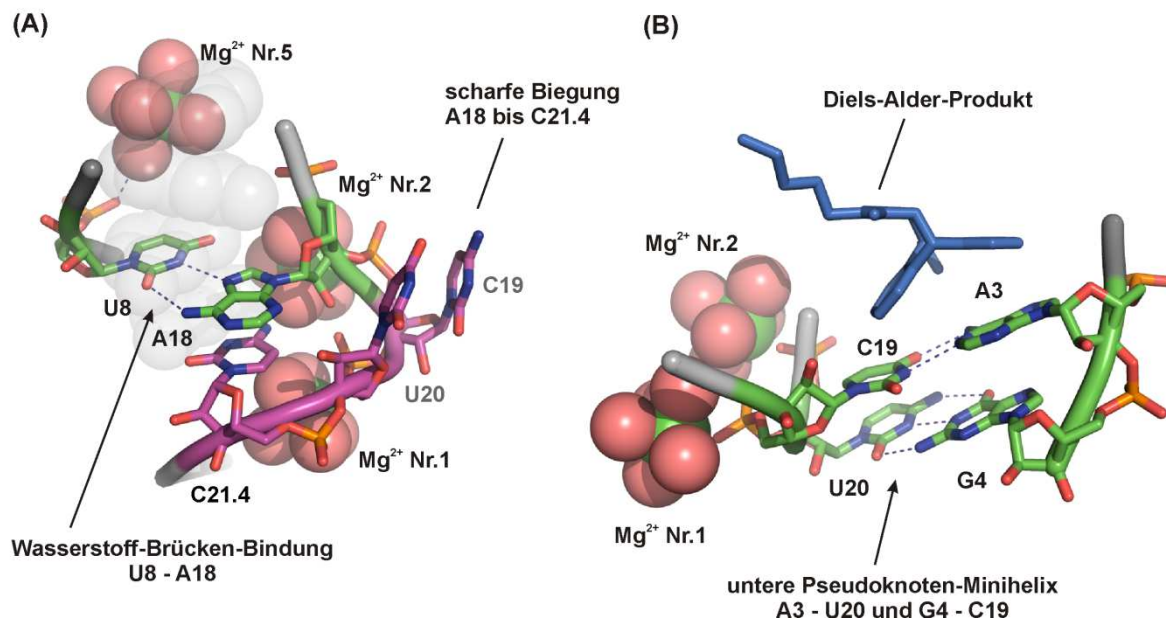


Abb. 39: (A): Interaktionen des A18 als Hoogsteen-Basenpaar mit U8, Stacking mit C21.4 als Teil der scharfen Biegung („sharp turn“) und Nähe zu Mg^{2+} -Ion Nr.1+2. (B): Untere Pseudoknoten-Minihelix A3 – C19 und G4 – U20 als untere Begrenzung der katalytischen Tasche.

Zunehmende Mg^{2+} -Ionen Konzentration verringerte über die gesamte Sequenz für den Wildtyp und die U17C-Mutante die Bandenintensität, führte folglich zur Stabilisierung der Sequenzen im nativen Zustand und ließ auf eine durch Erhöhung der Mg^{2+} -Ionen Konzentration zunehmende Ausbildung der intakten und kompakten Tertiärstruktur des Diels-Alderase-Ribozyms schließen. Im Gegensatz dazu zeigte das Probing-Muster der U17isoC-Mutante keine Änderung, also keinen Einfluss von divalenten Ionen (bis 10 mM) im nativen Ribozym-Zustand.

Das dem Wildtyp-Ribozym ähnliche Gesamt-Probing-Muster und die Unabhängigkeit von divalenten Ionen über den gesamten Konzentrationsbereich von 0 – 10 mM Mg^{2+} -Ionen deuten auf die Ausbildung einer Tertiärstruktur hin, allerdings ohne eine völlig kompakte, mit dem Wildtyp-Ribozym identische Struktur auszubilden.

Die intensivsten Hydrolyse-Banden im Wildtyp und der U17C-Mutante entstanden für C19 und U17/C17. C19 als Teil der unteren Minihelix, siehe Abb. 39 (B), wurde ab einer Konzentration von 1 mM Mg^{2+} -Ionen nahezu vollständig vor der Spaltung durch Hydrolyse geschützt. U17/C17 zeigte zwar ebenfalls Stabilisierung durch Zunahme der Mg^{2+} -Ionen Konzentration, aber selbst mit 10 mM Mg^{2+} -Ionen trat noch Spaltung auf. Die Wechselwirkung und somit räumliche Nähe des U17 zu Mg^{2+} -Ion Nr.5 könnte die intensive Spaltung des Nukleotids 17 im Probing erklären, trotz der stabilisierenden Wasserstoff-Brücken-Bindungen von U17 zu G9 (3-NH von U17 mit 2'-OH des G9) und U17 zu C10 (2-O des U17 mit 4-NH₂ des C10, siehe Abb. 37) und der weiter unten beschriebenen Wechselwirkungen mit dem Diels-Alder-Produkt.

Probing im oberen Bereich der katalytischen Tasche

Im oberen Teil der katalytischen Tasche (U8 bis A12, in Abb. 38 als obere Ausbuchtung bezeichnet) entstanden nur schwache Hydrolyse-Banden, die durch Erhöhung der Mg^{2+} -Ionen Konzentration vermindert wurden, womit also Stabilisierung der Ribozym-Strukturen auftrat. Für die U17isoC-Modifikation war sie etwas geringer als für den Wildtyp und für die U17C-Modifikation, vermutlich in Folge der verminderten Stabilisierung und Kompaktheit der Tertiärstruktur des U17isoC-modifizierten Ribozyms im nativen Zustand. Die Nukleotide der oberen Ausbuchtung als formal einzelsträngiger Bereich und Wechselwirkungen von A12, C11 und C10 mit Mg^{2+} -Ion Nr.3, ließen eigentlich eine höhere Sensibilität gegenüber Pb^{2+} -Ionen erwarten. Allerdings sind diese Nukleotide in wichtige Wasserstoff-Brücken-Bindungen involviert, die zur Stabilisierung der Ribozym-Struktur beitragen, wie die Basenpaarungen von C10 und C11 mit G1 und G2 zur Bildung der oberen Minihelix, des „Dachs“ der katalytischen Tasche. Aufgrund dieser Interaktion wurde für diese Nukleotide die nur geringe Spaltungsintensität erklärt. Die Nukleotide U8 und G9, zum oberen Teil der katalytischen Tasche gehörend, sind ebenfalls in Wechselwirkungen involviert. U8 bildet mit A18 das reverse Hoogsteen-Basenpaar, wie in Mutationsexperimenten bestätigt wurde⁽⁶²⁾ und G9 bildet im Wildtyp mit seinem 2'-OH die oben beschriebene Wechselwirkung zu U17 aus.

Die Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen G9 und U17 scheint keine Auswirkung auf die Hydrolyse von G9 zu haben, da in den U17C- und U17isoC-Modifikationen trotz der zerstörten Wechselwirkung von G9 und C17 beziehungsweise G9 und isoC17 keine verstärktes Hydrolyse durch Probing für G9 festgestellt wurde. Analog dazu verhielt sich auch die in der U17isoC-Mutante zusätzlich zerstörte Wechselwirkung U17 - C10, die nicht zu erhöhtem Probing von U8 und G9 führte.

Probing in den Schleifen und der Helix II

Beide Schleifen („Loops“) zeigten für alle drei Sequenzen die für Einzelstrangbereiche erwarteten, schwachen Probing-Banden, mit der intensivsten Bande für C_{L1.3} als Teil von Schleife 1. Durch Erhöhung der Mg²⁺-Ionen Konzentration trat für den Wildtyp und die U17C-Mutante Stabilisierung auf, während für U17isoC nur minimale Stabilisierung gezeigt wurde. Sequenzspaltungen durch Probing traten weiterhin im Bereich der gesamten oberen Helix II (G7.1 bis G7.4) mit höchster Intensität für C7.2 in Abhängigkeit steigender Mg²⁺-Ionen Konzentration unter Stabilisierung aller drei Sequenzen auf. Helikale Bereiche sollten infolge der Stabilisierung durch Basenpaarungen mit Pb²⁺-Probing nicht gespalten werden. Die Helix II, als Teil des zentralen Gerüstelements, wird durch Wechselwirkungen mit den beiden Mg²⁺-Ionen Nr.1 und 2 stabilisiert, was durch hohe Affinität zu Pb²⁺-Ionen die intensive Spaltung des Bereiches der oberen Helix II durch Probing begründet.

Pb²⁺-Probing in Abhängigkeit von Diels-Alder-Produkt

Ein weiterer bemerkenswerter Unterschied ist die Änderung der Probing-Muster durch Zugabe von Diels-Alder-Produkt, wie in Abb. 40 für alle drei Sequenzen gezeigt. Dargestellt wird der Sequenz-Bereich des unteren Teils der katalytischen Tasche (Nukleotide A15 bis U20) im oberen Bereich der Probing-Gele.

Der Wildtyp und die U17C-Mutante zeigten in Anwesenheit von Diels-Alder-Produkt und bei steigender Mg²⁺-Ionen Konzentration erhöhte Stabilisierung im Vergleich zur Abwesenheit von Produkt. Der einzige Unterschied der beiden Sequenzen war nur ganz ohne oder im niedrigen Mg²⁺-Ionen Konzentrationsbereich sichtbar, in dem das Wildtyp-Ribozym durch das Diels-Alder-Produkt alleine stabilisiert wurde, während für die Mutante erst ab 1 mM Mg²⁺-Ionen Stabilisierung erkennbar wurde.

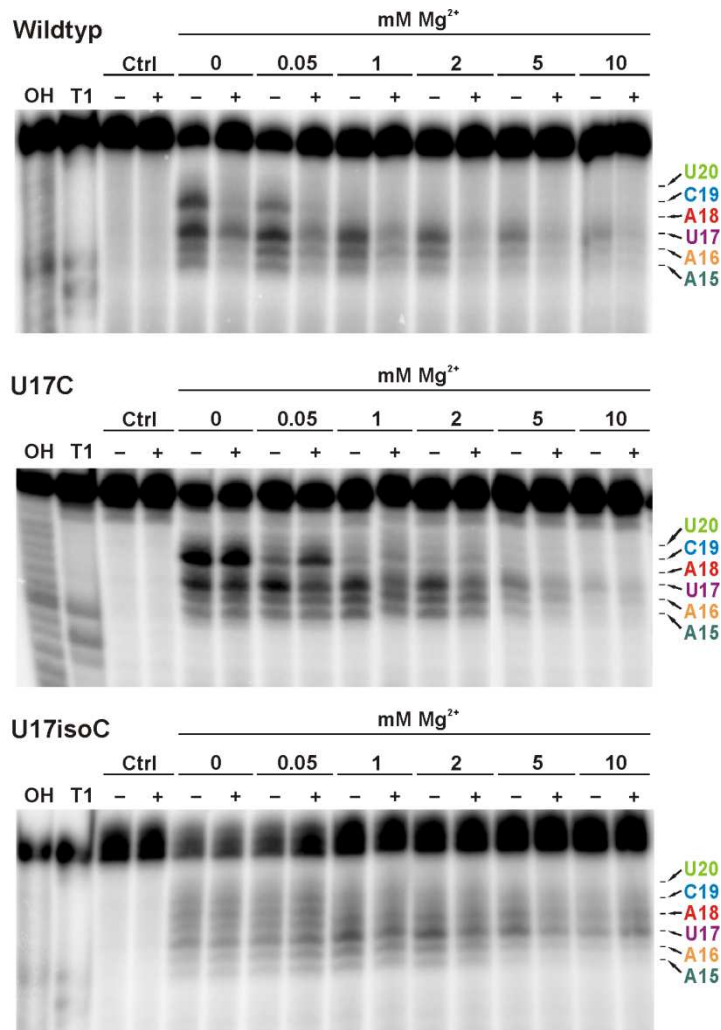


Abb. 40: PAGE-Gele des Pb^{2+} -Probings für $5'$ - ^{32}P -markierten Wildtyp, U17C- und U17isoC-Mutante in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Ionen Konzentration (0-10 mM) und des Diels-Alder-Produkts. +: mit 1 mM Diels-Alder-Produkt, -: ohne Diels-Alder-Produkt. OH, T1, Ctrl: analog Abb. 38. Publiziert in Kraut *et al.*⁽¹⁶⁴⁾.

Die zerstörte Wasserstoff-Brücken-Bindung in der U17C-Mutante zwischen G9 und C17 (intakt: 2'-OH von G9 zu 3-NH von U17) könnte für die zusätzliche Erforderlichkeit von Mg^{2+} -Ionen zur Struktur-Stabilisierung und somit Kompaktierung der Tertiärstruktur mit Diels-Alder-Produkt verantwortlich sein. Im Gegensatz zum Wildtyp-Ribozym und zur U17C-Mutante trat für die U17isoC-Mutante keinerlei Struktur-Stabilisierung mit Diels-Alder-Produkt über den gesamten Mg^{2+} -Ionen Konzentrationsbereich auf, was auf eine stark reduzierte Affinität für das Diels-Alder-Produkt hinwies. Interessanterweise ist in allen drei Sequenzen die Wechselwirkung zwischen dem Nukleotid 17 und dem Diels-Alder-Produkt (von 2'-OH zum Carbonyl-O der Maleimid-Gruppe) prinzipiell intakt, genauso wie die Interaktion von 2-NH₂ des G9 mit demselben Carbonyl-Sauerstoff des Produkts (Vergleich mit Abb. 35 zur Interaktion von G9 und U17 mit Diels-Alder-Produkt).

Fazit des Probing der U17isoC-Mutante

Die signifikantesten Unterschiede der U17isoC-modifizierten Ribozym-Struktur mit der zerstörten Wasserstoff-Brücken-Bindung zu C10 wurden als fehlende Struktur-Stabilisierung im nativen Zustand bis 10 mM Mg^{2+} -Ionen vor allem in unteren Teil der katalytischen Tasche, in der Spaltung von A18 und dem aber insgesamt zu den zum Wildtyp und der U17C-Modifikation ähnlichen Probingmuster identifiziert. In Kombination dieser Ergebnisse mit der zuvor ermittelten katalytischen Inaktivität der U17isoC-Mutante wurde folgendes Fazit abgeleitet: die Ausbildung einer ähnlichen Tertiärstruktur, allerdings ohne völlig intakt ausgebildete Kompaktheit der Ribozym-Struktur. Die Ergebnisse der Probing-Experimente wurden in Kraut *et al.*⁽¹⁶⁴⁾ publiziert.

3.4.3 Interpretation der Pb^{2+} -Probing Ergebnisse

Das wichtige Element der Verbindung des „Daches“ aus dem Basenpaar G2-C10 zum „Rückgrat“ durch eine einzelne Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen dem 4-NH₂ des C10 und dem 2-O des U17 und dessen Bedeutung wurde wie in 3.4.2 beschrieben, untersucht. Hier soll nun näher auf die einzelnen Elemente, auch im Zusammenhang mit Ergebnissen aus weiteren Arbeiten eingegangen werden.

Das Wildtyp-Ribozym

Die für das Wildtyp-Ribozym festgestellte Verminderung der Nukleotid-Spaltungen mit steigender Mg^{2+} -Ionen Konzentration wurde als zunehmende Kompaktierung der Struktur interpretiert. Übereinstimmendes Verhalten der Ausbildung der kompakten Ribozym-Struktur mit Mg^{2+} -Ionen wurde in der Kristallstruktur⁽⁶¹⁾, in AFM^{34 (165)} und Voltametrie-Experimenten⁽¹⁶⁵⁾ beschrieben. Darüberhinaus könnte die aus den Probing-Experimenten abgeleitete Kompaktierung der Ribozym-Struktur der in smFRET-Experimenten^{35, (66)} und in Photoaffinitäts-Crosslinking-Experimenten⁽¹⁶⁶⁾ festgestellten Kompaktierung des intermediären Faltungszustands mit ausgebildeter Pseudoknoten-Struktur entsprechen. Bei steigender Mg^{2+} -Ionen Konzentration tritt daraus der Übergang zum gefalteten Zustand ein.^(66, 166)

³⁴ AFM: Atomkraftmikroskopie aus „atomic force microscopy“

³⁵ smFRET: Einzelmolekül Förster-Radius-Energie-Transfer aus „single-molecule Förster (oder fluorescence) resonance energy transfer“

Die Faltung der Pseudoknoten-Struktur scheint relativ unempfindlich gegenüber Störungen zu sein, wie Experimente mit „Caging“-Gruppen von NPE³⁶ an den Nukleotiden C10 und U17 mittels FRET-Messungen zeigten. Darin festgestellte geringe Unterschiede wurden entgegen einer permanenten Öffnung der Pseudoknoten-Struktur gedeutet.⁽¹⁶⁷⁾ Die verminderte Spaltung des Wildtyp-Ribozyms in Anwesenheit von Diels-Alder-Produkt auch ohne Mg²⁺-Ionen zeigt, dass auch in diesem Zustand die Strukturstabilisierung des Wildtyp-Ribozyms durch Interaktionen zum Diels-Alder-Produkt vorhanden ist. Struktur-Stabilisierung scheint folglich vor der Ausbildung des intermediären Faltungszustands vorhanden zu sein. Zur Ausbildung des intermediären Faltungszustands mit Affinität zum Diels-Alder-Produkt werden Mg²⁺-Ionen benötigt, wie smFRET- und Photoaffinitäts-Quervernetzungs-Experimente („photoaffinity crosslinking“) zeigten.^(66, 166)

Die Modifikation U17C mit intakter C10 – U17 H-Brücken-Bindung

Die U17C-Modifikation zeigte dabei ein Verhalten analog zum Wildtyp-Ribozym das mit einer ähnlichen Gesamtstruktur interpretiert wurde. Im Unterschied zum Wildtyp-Ribozym trat die Struktur-Stabilisierung mit Diels-Alder-Produkt erst ab einer Konzentration von 1 mM Mg²⁺-Ionen ein und nicht wie im Wildtyp-Ribozym auch schon in Abwesenheit von Mg²⁺-Ionen. Entscheidend könnte die vermutete verminderte Wechselwirkung von C17 zu Mg²⁺-Ion Nr.5⁽⁶²⁾, aufgrund der Substitution der 4-Oxo- durch die 4-Amino-Gruppe sein, siehe Abb. 41. Das könnte dazu führen, dass Interaktionen zu weiteren Mg²⁺-Ionen zur Stabilisierung der Struktur und Ausbildung der Wasserstoff-Brücken-Bindungen zum Diels-Alder-Produkt erforderlich sind, die durch eine höhere Mg²⁺-Ionen Konzentration ab 1 mM erreicht wird.

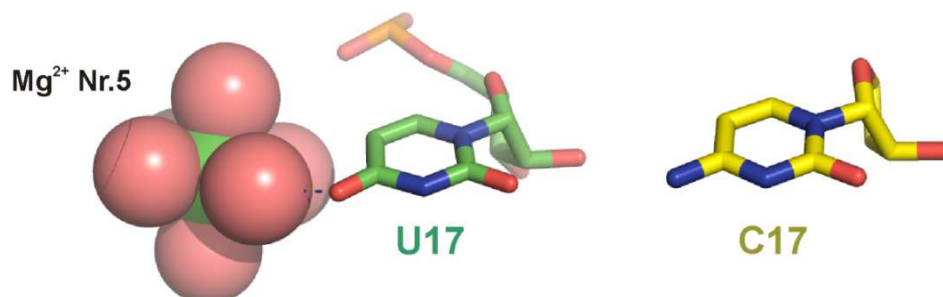


Abb. 41: Interaktion von U17 (4-Oxo-Gruppe) zu Mg²⁺-Ion Nr.5 als blaue Linie dargestellt, Substitution von C17: Substitution durch 4-Amino-Gruppe.

³⁶ NPE: (S)-1-(2-nitrophenyl)ethyl

Obwohl die Ribozym-Struktur der U17C-Mutante mit Mg^{2+} -Ionen und Diels-Alder-Produkt im Pb^{2+} -Probing eine sehr ähnliche Stabilität wie das Wildtyp-Ribozym aufwies, wurde die relative katalytische Aktivität k_{rel} bezogen auf den Wildtyp nur auf 33%⁽⁶²⁾ bestimmt. Vermutet wird dabei die Ausbildung der intakten Gesamtstruktur der U17C-Mutante allerdings mit etwas geringerer, aber entscheidend verminderter Kompaktheit der Struktur was die verminderte katalytische Aktivität erklären würde. Damit stimmen weitere Ergebnisse aus Schmelzkurven-Experimenten überein, die für die U17C-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp mit einer Mg^{2+} -Ionen Konzentration von ≥ 5 mM keine weitere Struktur-Stabilisierung zeigten.⁽¹⁶⁸⁾

Die U17isoC-Mutante: Relevanz der C10 – U17 H-Brücken-Bindung

Die in der U17isoC-Modifikation signifikanten Unterschiede zum Wildtyp wurden als erhöhtes Probing im unteren Teil der katalytischen Tasche insbesondere für A18 und eine nicht vorhandene Struktur-Stabilisierung durch Mg^{2+} -Ionen und Diels-Alder-Produkt aus den Probing-Experimenten identifiziert. Dieses Verhalten wurde in Kombination mit dem zum Wildtyp-Ribozym ähnlichen Probing-Bandenmuster als Faltung der intakten Gesamtstruktur bei verhinderter Ausbildung der vollständigen Kompaktierung der Struktur interpretiert. Auch in smFRET-Experimenten³⁷ wurden für die U17isoC-Mutante und das Wildtyp-Ribozym die selbe Gesamtstruktur ermittelt. Allerdings war für den Übergang der Mutanten-Struktur vom intermediären in den gefalteten Zustand eine höhere Mg^{2+} -Ionen Konzentration erforderlich.⁽¹⁶⁴⁾ Die fehlende Kompaktheit der U17isoC-Mutante könnte ebenfalls die in früheren Arbeiten ermittelte nahezu vollständige katalytische Inaktivität von $k_{rel} < 0.1\%$ erklären.^(62, 167) Die in der U17isoC-Mutante aufgrund der fehlenden Struktur-Stabilisierung nicht ausgebildeten oder nicht vollständig intakten Interaktionen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt könnten eine entscheidende Rolle für die fast vollständige katalytische Inaktivität der Mutante spielen.

Die gestörte C10 – U17 Interaktion im Wasserstoff-Brücken-Netzwerk

Insgesamt scheinen die Interaktionen für Störungen sehr anfällig zu sein, wie die fast vollständige Inaktivität einer Mutante mit Substitutionen zur Wiederherstellung der Interaktionen mit U17isoC-C10isoC-G2isoG von $k_{rel} < 0.1\%$ zeigte, siehe Abb. 42.⁽⁶²⁾

³⁷ smFRET-Experimente von Dr. Alexander Nierth und Dr. Andrei Y. Kobitski durchgeführt

Die Beteiligung der Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen C10 und U17 am Wasserstoff-Brücken-Netzwerk der katalytischen Tasche mit Beteiligung der Nukleotide G2, C10, U17, G9, U8, A18, U20 und A3 könnte dabei eine Erklärung für die hohe Sensibilität auf Substitutionen sein, siehe Abb. 43.

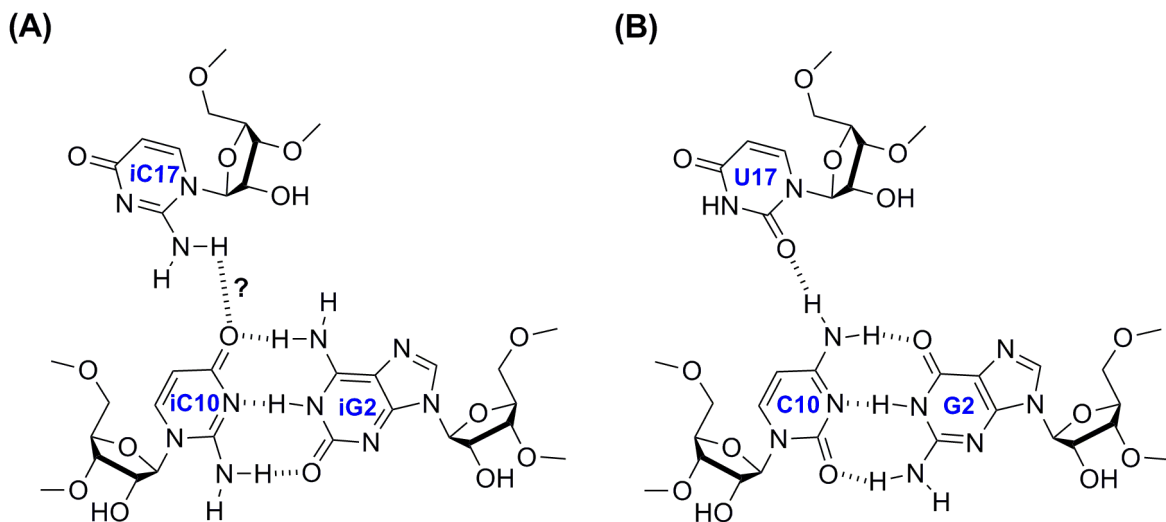


Abb. 42: Wasserstoff-Brücken-Netzwerk der Nukleotide 17 - 10 - 2. (A): Modifikationen iC17 – iC10 – iG2 (i Abkürzung für iso). (B): Wildtyp mit U17 – C10 – G2.

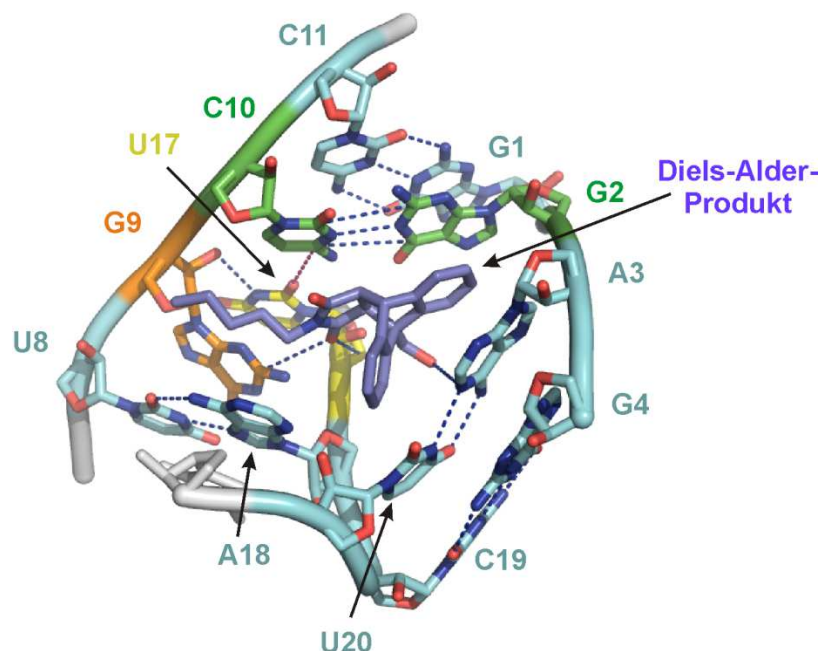


Abb. 43: Katalytische Tasche. Wasserstoff-Brücken-Bindungen in blauen Linien angezeigt. Rote Linie: H-Brücken-Bindung zwischen U17 und C10, als Verbindung des „Daches“ G2 – C10 zum Rückgrat der katalytischen Tasche U8 bis U17.

Der direkte Kontakt aller acht Nukleotide zum Diels-Alder-Produkt, der aus der Kristallstruktur⁽⁶¹⁾ abgeleitet und durch Ergebnisse aus Substitutions-Experimenten^(60, 62) unterstützt wurde, könnte ebenfalls eine Erklärung für die hohe Sensitivität der katalytischen Aktivität auf Störungen liefern.

Aufgrund der entscheidenden Funktion des Wasserstoff-Brücken-Netzwerks, siehe Abb. 43, für die Form und Stabilität der katalytischen Tasche, das dem typischer katalytischer Zentren von Enzymen ähnelt, sind gravierende Auswirkungen durch Störung einer Interaktion wie der Wasserstoff-Brücken-Bindung von C10 und U17 vorstellbar.

Die U17isoC-Mutante könnte dabei dem in molekulardynamischen Simulationen⁽¹⁵⁴⁾ ermittelten Zustand der katalytischen Tasche im inaktiven, geschlossenen Zustand entsprechen, worin die Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen C10 und U17 ebenfalls nicht ausgebildet war. Die Simulationen basierten auf dem Wildtyp-Ribozym bei unterschiedlichen Mg^{2+} -Ionen Konzentrationen. Erst ab 24 Mg^{2+} -Ionen pro Ribozym lag die katalytische Tasche in der geöffneten, aktiven Form und in hoher Dynamik vor, siehe Abb. 44.

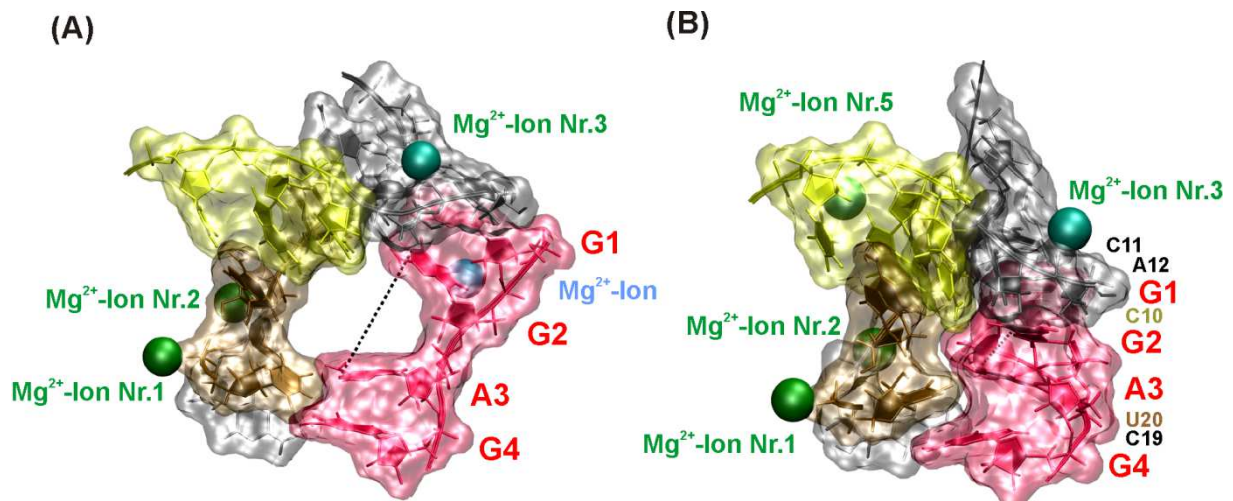


Abb. 44: Katalytische Tasche des Wildtyp-Diels-Alderase-Ribozyms aus molekulardynamischen Simulationen. (A): Geöffnete katalytische Tasche mit 24 Mg^{2+} -Ionen pro Ribozym mit zusätzlich zur Kristallstruktur das Rückgrat von G1 und G2 stabilisierendem Mg^{2+} -Ion (blau). Schwarze Linie repräsentiert die Höhe der katalytischen Tasche mit 11.2 Å. (B): Geschlossene katalytische Tasche mit 8 Mg^{2+} -Ionen pro Ribozym. (A)+(B): adaptiert aus Bereźniak *et al.*⁽¹⁵⁴⁾.

Möglicherweise führt in der U17isoC-Mutante die zerstörte Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen C10 und U17 als fehlende Verbindung des „Daches“ (G2 – C10) der katalytischen Tasche zum „Rückgrat“ (U8 - U17) zum selben Zustand. Dabei wäre die Pseudoknoten-Struktur noch intakt, die Basenpaarung der oberen Pseudoknoten-Minihelix aber von G2-C10 zu G2-C11 und G1-C11 zu G1-A12 verschoben. Dies führt zur direkten Stapelung „stacking“ von G2 mit A3 und zum Zusammenbruch der katalytischen Tasche.⁽¹⁵⁴⁾

Die für das Wildtyp-Ribozym beschriebene Stabilisierung durch eine Reihe von wichtigen Interaktionen zu Elementen außerhalb der katalytischen Tasche, wie den Interaktionen zu Mg^{2+} -Ionen, wären daraus folgernd zur Stabilisierung der U17isoC-Mutante nicht ausreichend. In Mg^{2+} -Ionen Interaktionen involviert sind: C10 zu Mg^{2+} -Ion Nr.3, U17, G9, U8 zu Mg^{2+} -Ion Nr.5 und C19, U20 zu Mg^{2+} -Ion Nr.1 und 2, siehe Abb. 45 (A-D).

Somit sind alle die katalytische Tasche bildenden Nukleotide, außer G2, A3 und A18 in Interaktionen zu Mg^{2+} -Ionen involviert. Die Interaktionen wurden aus der Kristallstruktur⁽⁶¹⁾ abgeleitet und in verschiedenen Experimenten am Ribozym in Lösung untersucht.^(62, 164)

Auswirkungen auf A18 als Teil der scharfen Biegung

Die beschriebenen strukturellen Änderungen könnten zu weiteren Änderungen der Wasserstoff-Brücken-Bindungen und Stabilitäten führen und so auch zur verminderten Stabilität des A18 im Probing beitragen. Strukturelle Änderungen könnten hierbei zu Störungen in der reversen Hoogsteen-Basenpaarung U8 und A18 führen, siehe Abb. 39 und 43, oder aufgrund von Verschiebungen in der scharfen Biegung zur Störung der Basen-Stapelung von A18 und C21.4 führen, siehe Abb. 45 (A). Aufgrund dieser Änderungen könnte die Spaltung an A18 im Gegensatz zum Wildtyp und zur U17C-Mutante erklärt werden. Interessant ist im Kontext der scharfen Biegung die in der Literatur beschriebene Ähnlichkeit zum T-Loop Motiv in tRNA, die auch in ribosomaler RNA und anderen großen RNAs beschrieben wurde.⁽¹⁶⁹⁻¹⁷¹⁾ In einer nativen tRNA, die unter hohem Druck eine Diels-Alder-Reaktion katalysiert, wurde ebenfalls ein Einfluss des T-Loops vermutet.⁽¹⁷²⁾ Ergebnisse könnten auf eine Zerstörung der T-Loop – D-Loop Interaktion durch den hohen Druck, der Öffnung der tRNA-Struktur und der aufgrunddessen möglichen Stapel-Interaktionen „stacking“ des Diens hinweisen.⁽¹⁷²⁾

Für das Diels-Alderase-Ribozym könnte die hohe Konservierung der einzelnen Nukleotide der scharfen Biegung weniger entscheidend sein als die hohe Sensitivität der scharfen Biegung auf strukturelle Änderungen im Ribozym, wie in der U17isoC-Mutante und dessen Probing-Verhalten vermutet. Stapel-Interaktionen wurden auch in molekulardynamischen Simulationen⁽¹⁷³⁾ als elementar für das Diels-Alderase-Ribozym beschrieben und werden in Abschnitt 3.5.5 detaillierter beschrieben und diskutiert.

Strukturelle Änderungen könnten im Diels-Alderase-Ribozym auch zu einer direkten höheren räumlichen Zugänglichkeit des 2'-OH von A18 führen. Im Wildtyp-Ribozym scheint dieses durch die sterische Nähe zu U20 wenig zugänglich zu sein, wie durch eine sterisch anspruchsvollere Modifikation einer 2'-O-Methyl-Gruppe mit einer hohen Aktivitätsverminderung auf 2.5% demonstriert wurde.⁽⁶²⁾

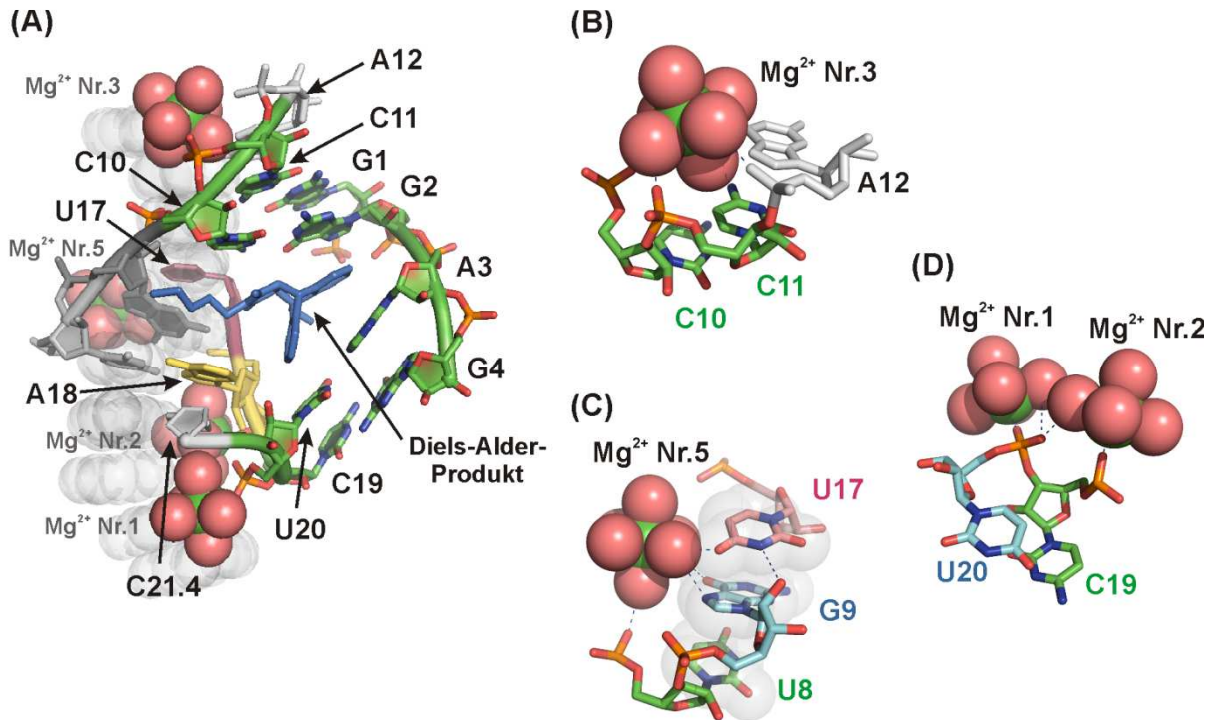


Abb. 45: (A): Katalytische Tasche des Wildtyp-Diels-Alderase-Ribozyms aus der Kristallstruktur mit Diels-Alder-Produkt. U17 (violett) als modifiziertes Nukleotid und A18 (gelb) als gespaltenes Nukleotid im Probing der U17isoC-Mutante. (B): Interaktionen zu Mg²⁺-Ion Nr.3 des Phosphatrückgrats von C10 und C11 „outersphere“³⁸ (blaue Linien). (C): Interaktionen von U17, G9 und U8 zu Mg²⁺-Ion Nr.5 „outersphere“ (blaue Linien) (D): Interaktionen von C19 zu Mg²⁺-Ion Nr.2 „innersphere“³⁹, U20 zu Mg²⁺-Ion Nr.1 und 2 „inner- und outersphere“.

Insgesamt scheint das reverse Hoogsteen-Basenpaar A18–U8 sensitiv gegenüber Modifikationen zu sein für die nahezu oder komplette Inaktivität festgestellt wurde, was durch direkte Produkt-Interaktionen erklärt wurde.⁽⁶⁰⁾ Geringe Änderungen dieser Interaktion oder dieser Nukleotide scheinen große Einflüsse auf die katalytische Aktivität zu haben, wodurch vorstellbar wird, dass Änderungen auch zur stark verminderten Stabilität des A18 in der U17isoC-Mutante führen könnten.

³⁸ „outersphere“-Koordination: Interaktion mit den H₂O-Liganden des Mg²⁺-Ions

³⁹ „innersphere“-Koordination: direkte Interaktion mit dem Mg²⁺-Ion

Strukturelle Relevanz der C10 – U17 H-Brücken-Bindung

Folglich wäre die C10-U17 Wasserstoff-Brücken-Bindung die einzige strukturstabilisierende Interaktion in diesem Ribozym-Bereich, die präzise Positionierung für die Ausbildung ihrer Interaktionen benötigt. Zerstörung dieser einen H-Brücken-Bindung könnte entweder wie oben beschrieben zum Kollaps der katalytischen Tasche führen, oder die obere Minihelix, also das „Dach“, könnte vom „Rückgrat“ getrennt werden und die katalytische Tasche so teilweise zerstört sein.

Dabei zeigt die U17isoC-Mutante, in der die Gesamt- und die Pseudoknoten-Struktur ausgebildet sind, aber nicht die vollständige Kompaktheit erreicht wird, die die katalytische Tasche nicht stabilisieren kann und katalytisch völlig inaktiv ist, eindeutig die hohe Relevanz der Formkomplementarität aus intakter katalytischer Tasche und Diels-Alder-Produkt. Der Prozess der Störung oder teilweisen Zerstörung der katalytischen Tasche durch Zerstörung einer einzigen Wasserstoff-Brücken-Bindung könnte für den multiplen Reaktionsumsatz^(59, 93) des Ribozyms relevant sein. Diese Störung und Wiederherstellung der tertiären Struktur könnte dem Übergang der Zustände der gefalteten und intermediären Konformation innerhalb von 100 ms entsprechen, die in der smFRET-Bestimmung⁽⁶⁶⁾ und mittels NMR-Spektroskopie⁽⁶⁷⁾ festgestellt wurden. Weitere Relevanz könnte die Störung der katalytischen Tasche für die Reaktion durch die „Hintertür“ haben, die den Substrateintritt durch eine enge Öffnung erfordert.⁽⁹⁴⁾ Neueste molekulardynamische Untersuchungen ließen für den Eintritt der Anthracen-Komponente durch die „Hintertür“ auf eine Öffnung der katalytischen Tasche durch vorübergehende Trennung der Basenpaarung G2-C10 als Öffnung des „Daches“ schließen.⁽¹⁷³⁾

3.5 Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt

3.5.1 Interaktionen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt

Zur quantitativen Untersuchung der zwei aus der Kristallstruktur abgeleiteten, relevanten Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen dem Diels-Alderase-Ribozym und dem Diels-Alder-Produkt wurden individuelle RNA-Sequenzen mit Modifikationen eingesetzt, siehe Abb. 47 (A). Dabei wurden die beiden H-Brücken-Bindungen zwischen 2-NH₂ des G9 und 2'-OH des U17 mit demselben Carbonyl-Sauerstoff der Maleimid-Gruppe im Diels-Alder-Produkt, siehe Abb. 35 (B), zerstört. Eine dritte aus der Kristallstruktur abgeleitete H-Brücken-Bindung der 6-NH₂-Gruppe des A3 mit dem ersten Ethersauerstoff des Polyethylenglykol-Linkers im Diels-Alder-Produkt wurde experimentell als nicht essentiell identifiziert^(60, 93-94) und deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter quantitativ untersucht.

Erste semi-quantitative Ergebnisse der relativen Aktivitäten⁴⁰, unter Zerstörung der Interaktionen mittels Modifikationen an Position 17 durch desoxy-Uridin, wurden aus Einzelzeitpunkt-Bestimmungen mittels gelelektrophoretischen Assays für eine Reaktionszeit von 30 min erhalten.^(60, 62) Die Entfernung des 2'-OH von Uridin 17 (U17) durch Substitution mit desoxy-Uridin 17 (dU17) zeigte nach 30 min Reaktionszeit 90% Aktivität bezogen auf 100% Wildtyp-Aktivität.⁽⁶²⁾ Der Einfluss von Modifikationen von Guanosin 9 (G9), ermittelt durch „Nucleotide Analog Interference Mapping“ (NAIM), ergab für eine Einzelzeitpunkt-Bestimmung mit einem Reaktionsumsatz von 25-33% die relativen Aktivitäten für Inosin von ~16%, Purin ~60% und 2-Aminopurin ~78%.⁽⁶²⁾

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Linearität des Reaktionsumsatzes quantitative gelelektrophoretische Bestimmungen mit der tripartiten Ribozymvariante und linkergebundenem Anthracen mit einfachem Reaktionsumsatz eingesetzt. Das Prinzip und die Bedeutung des gelelektrophoretischen Assays werden im nächsten Abschnitt näher erläutert. In ersten Aktivitätstests in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Reaktionsumsatz für das Wildtyp-Ribozym (wt) und die U17dU-Mutante (dU17) nur für die ersten 15% Reaktionsumsatz eine Linearität der Reaktion aufwiesen.

⁴⁰ Untersuchungen von Dr. Dirk Bebenroth durchgeführt

Mit fortschreitendem Reaktionsumsatz nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit ab, siehe Abb. 46.

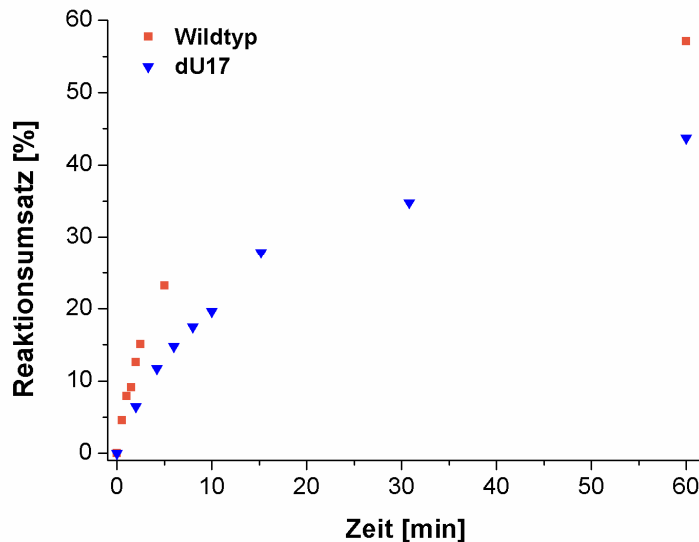


Abb. 46: Gelelektrophoretischer Assay. Erste Messungen zur Untersuchung der Linearität der katalysierten Reaktion des Wildtyp-Ribozyms (wt) und der desoxy-U17-Mutante (dU17).

Folglich ist eine echte quantitative Bestimmung der relativen Aktivitäten der Ribozyme mit einfachem Reaktionsumsatz nur im linearen Bereich innerhalb der ersten 15% des Reaktionsumsatzes möglich und führt bei höherem Reaktionsumsatz zu falschen quantitativen Werten der katalysierten Reaktion im Vergleich zum Wildtyp-Diels-Alderase-Ribozym.

3.5.2 Quantifizierung des Einflusses der Wasserstoff-Brücken-Bindungen auf die katalytische Aktivität

Zur einfachen Kombination unterschiedlicher Modifikationen wurde die dreisträngige Ribozymvariante bestehend aus 24mer, 18mer und radioaktiv markiertem 11mer mit linkergebundenem AHEG als Reaktion mit einfachem Reaktionsumsatz („single turnover“) eingesetzt. Die drei Ribozym-Stränge, als Ribozym-System in unserem Labor etabliert, hybridisieren spontan und besitzen 70% der Aktivität des einsträngigen Wildtyp-Ribozyms mit einfachem Reaktionsumsatz.⁽⁶⁰⁾ Der gelelektrophoretische Assay eignet sich insbesondere zur Trennung des 11mer-Produktes vom Edukt 11mer-AHEG mit ausreichendem „Mobilitäts-Shift“ unter Verwendung von Biotinmaleimid (Molekül, siehe Abb. 47 (C)) als Maleimid-Komponente.

Der Einsatz radioaktiv markierter RNA, die gelelektrophoretische Trennung und die Detektion mittels Radiographie ermöglichen durch hohe Sensitivität den Einsatz geringer RNA-Mengen im Femtomol-Bereich.

An Modifikationen für Guanosin 9 (G9) wurden Purin (Pu9), Inosin (Ino9) und 2-Aminopurin (2AP9) eingesetzt. Uridin 17 (U17) wurde mit desoxy-Uridin (dU17) substituiert und in Einzel- und Doppelmodifikationen kombiniert (Abb. 47 (B)).

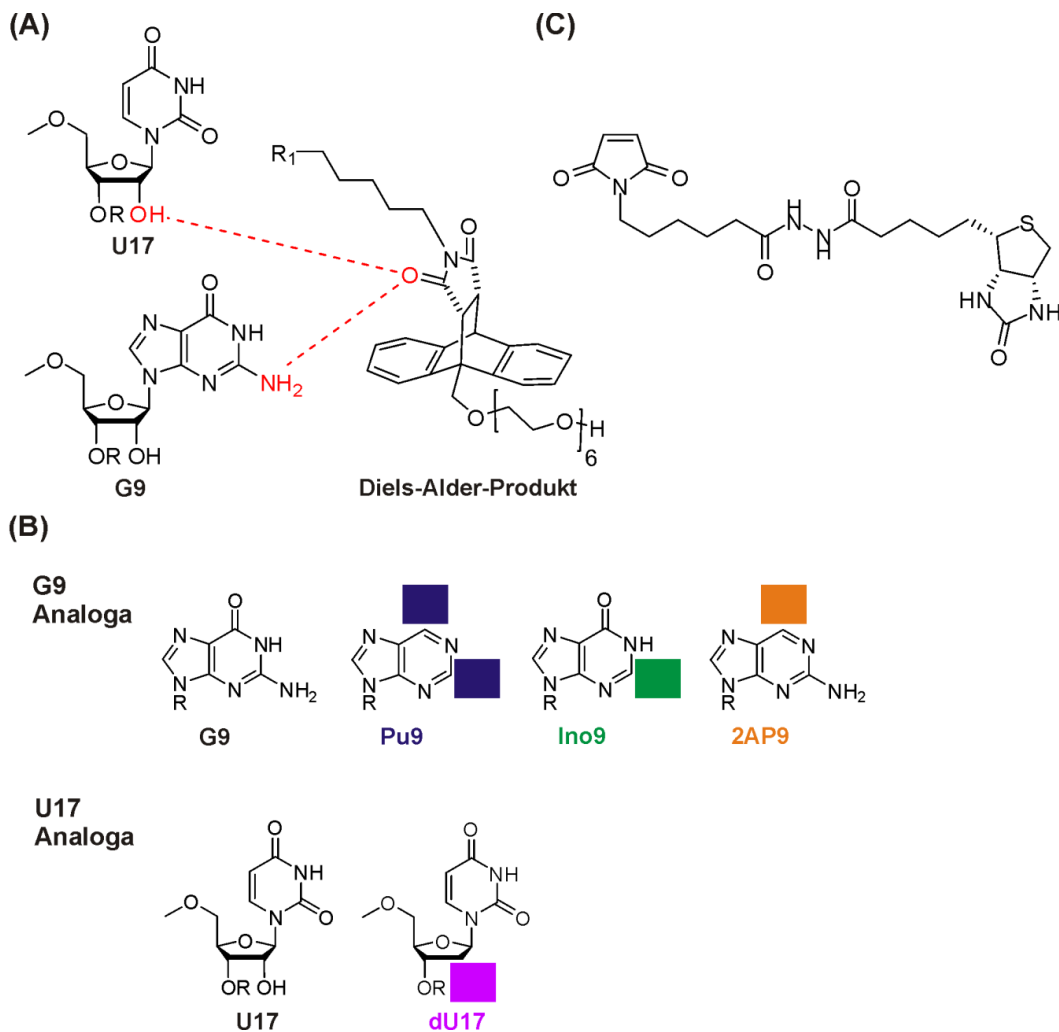


Abb. 47: Moleküle des gelelektrophoretischen Assays. (A): Gelelektrophoretisch untersuchte Wasserstoff-Brücken-Bindungen (rote Linien) von 2'-OH des U17 und 2-NH₂ des G9 mit dem Carbonyl-Sauerstoff der Maleimid-Gruppe des Diels-Alder-Produkts, beteiligte Seitengruppen: rot markiert. R₁ des Diels-Alder-Produkts: symbolisiert Biotin-Rest, siehe Molekül in (C). (B): Eingesetzte G9- (Guanosin) und U17-Analoga (Uridin): Pu9 (Purin), Ino9 (Inosin), 2AP9 (2-Aminopurin), Modifikationen sind in Farbe hervorgehoben. (C): Biotinmaleimid (N-Biotinoyl-N'-C6-Maleimidohexanoyl)-Hydrazid als eingesetztes Maleimid-Substrat.

Diese Modifikationen wurden ausgewählt, um für die G9 Position den Einfluss von 2-NH₂ und des 6-O in alle möglichen Kombinationen zu untersuchen und zusätzlich in den Doppelmutanten den Effekt beider zerstörter Wasserstoff-Brücken mit unterschiedlichen Seitengruppen bestimmen zu können.

In allen Modifikationen blieb die Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen dem 2'-OH des G9 und 3-NH des U17, als Bestandteil des in Abb. 10 (B) und 43 gezeigten zentralen Wasserstoff-Brücken-Netzwerks intakt.

Die Ergebnisse nach zeitabhängiger Reaktion mit Biotinmaleimid, gelelektrophoretischer Trennung, Detektion mittels Radiographie und quantitativer Auswertung werden in Abb. 48 dargestellt. Abb. 48 (A) zeigt die relativen Aktivitäten für die Reaktion pseudo-erster Ordnung als Säulendiagramm und Abb. 48 (B) die Aktivitätsänderung im Kontext der Sekundärstruktur.

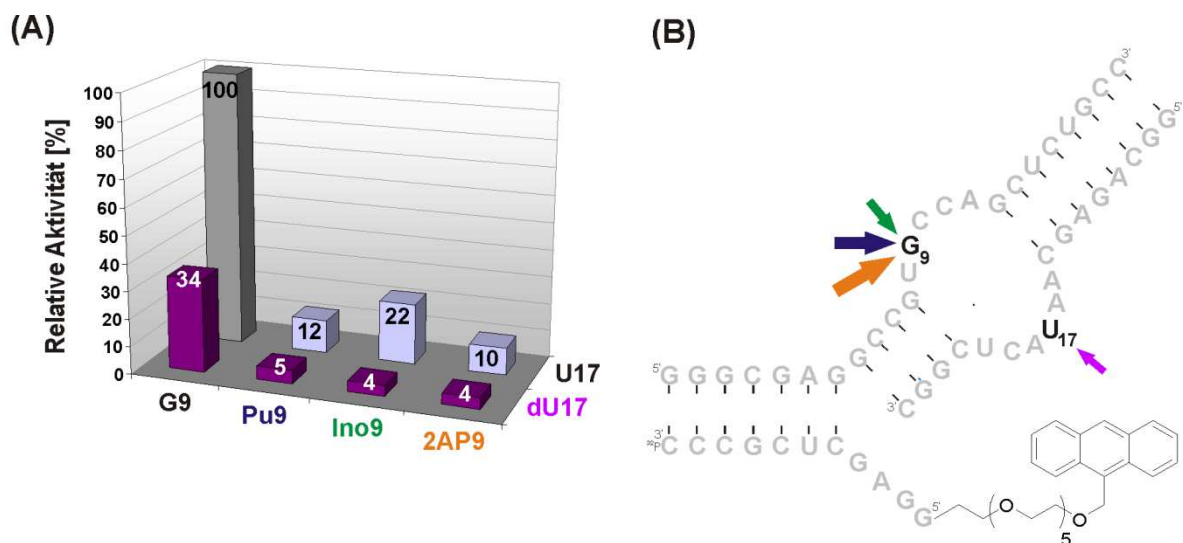


Abb. 48: Ergebnisse des gelelektrophoretischen Assays. (A): Relative Aktivität [%] der Einzel- und Doppelmutanten bezogen auf 100% Wildtyp-Aktivität (graue Säule) der Reaktion pseudo-erster Ordnung als Mittelwert aus unabhängigen Triplikatmessungen in Ziffern auf den Säulen, Farbcode entsprechend den Modifikationen in Abb. 47. Relative Aktivität [%] mit Standardabweichungen: Einzelmutanten: Pu9: 12 ± 1.7 ; Ino9: 22 ± 2.5 ; 2AP9: 10 ± 1.0 ; dU17: 34 ± 2.0 ; Doppelmutanten (je mit dU17): Pu9: 5 ± 1.5 ; Ino9: 4 ± 1.2 ; 2AP9: 4 ± 0.6 . (A): Publiziert in Kraut *et al.*⁽¹⁶⁴⁾. (B): Ribozym-Sekundärstruktur mit Einfluss der jeweiligen Modifikation als Pfeile mit Farbcode (analog (A)) symbolisieren den Einfluss der jeweiligen Modifikation, je größer die Aktivitätsänderung, desto größer der Pfeil.

Die Ergebnisse der quantitativen Messungen ergaben relative Aktivitäten [%] der Mutanten, bezogen auf die Wildtyp-Aktivität von 100% mit der Standardabweichung gebildet aus unabhängigen Triplikatbestimmungen, wie in Tab. 5 aufgelistet.

Tab. 5: Übersicht der relativen Aktivitäten \pm Standardabweichung [%] der Einzel- und Doppelmutanten aus Triplikatbestimmungen im Vergleich zum Wildtyp-Ribozym zu 100%.

Relative Aktivitäten [%]	U17	dU17
G9	100	34 \pm 2.0
Pu9	12 \pm 1.7	5 \pm 1.5
Ino9	22 \pm 2.5	4 \pm 1.2
2AP9	10 \pm 1.0	4 \pm 0.6

Aus dem Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeiten von katalysierter zu unkatalysierter Reaktion der Reaktion pseudo-erster Ordnung wurden die Reaktionsbeschleunigungen der katalysierten Reaktionen zu den in Tab. 6 enthaltenen Werten mit den Standardabweichungen ermittelt. Die komplette Berechnung wird in Abschnitt 4.6.3 erklärt.

Tab. 6: Übersicht der Reaktionsbeschleunigung \pm Standardabweichung berechnet aus dem Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeiten [%/min] von katalysierter und unkatalysierter Reaktion.

Reaktions- beschleunigung	U17	dU17
G9	11000 \pm 600	3700 \pm 200
Pu9	1300 \pm 200	550 \pm 150
Ino9	2400 \pm 300	450 \pm 150
2AP9	1100 \pm 100	450 \pm 50

Wie die Ergebnisse zeigten, führte die Entfernung der 2'-OH-Gruppe durch die Substitution mit dU17 also nur zu einer moderaten Verringerung der katalytischen Aktivität auf ungefähr 1/3 der Wildtyp-Aktivität, wohingegen die Entfernung der 2-NH₂-Gruppe am G9 durch Substitution mit Inosin und Purin zu 5- und 8-facher Verminderung der Aktivität führte. Der Vergleich der Substitutionen von Purin und Inosin, beide ohne 2-NH₂-Gruppe, wies für das Inosin mit der 6-O-Gruppe annähernd die doppelte Aktivität im Vergleich zu Purin, als Molekül ohne Seitengruppen auf.

Interessanterweise zeigte die Substitution durch 2-Aminopurin mit intakter 2-NH₂-Gruppe, aber ohne 6-O die höchste Aktivitätsabnahme aller Einzelmutanten um das 10-fache, obwohl hier beide H-Brücken-Bindungen zum Produkt noch intakt sind.

Entscheidend für die Interaktionen scheinen also nicht nur die direkt an der Interaktion zum Diels-Alder-Produkt beteiligten Gruppen zu sein. Das Nukleotid 9 befindet sich in direkter Nähe zu Mg^{2+} -Ion Nr.5 und wird durch dieses über eine Wasserstoff-Brücken-Bindung mit seiner 6-O-Gruppe stabilisiert, siehe Abb. 49.

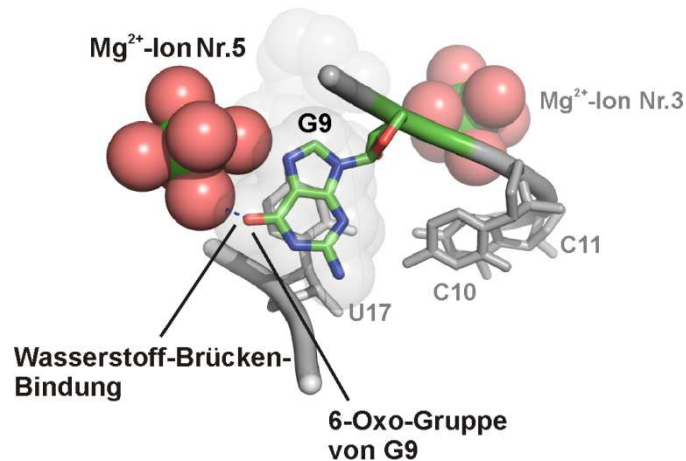


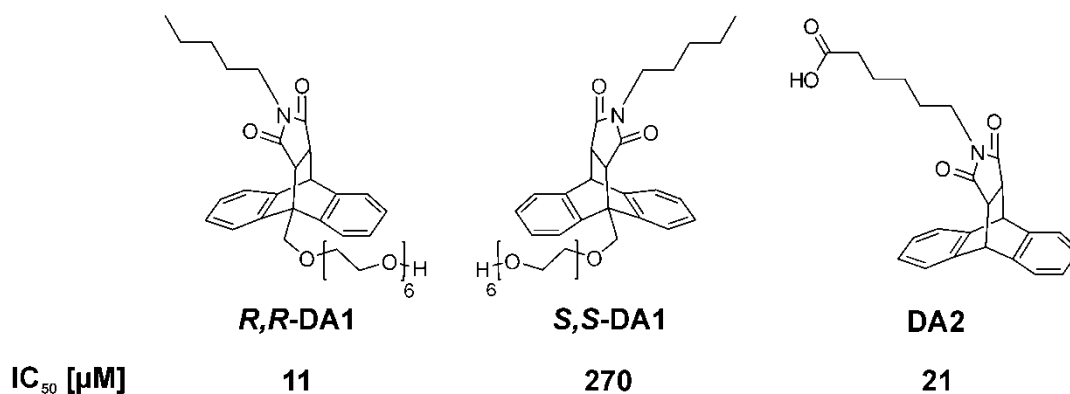
Abb. 49: G9 und Mg^{2+} -Ion Nr.5: H-Brücken-Bindung zwischen der 6-Oxo-Gruppe des G9 des Wildtyp-Ribozyms und dem Mg^{2+} -Ion Nr.5, aus der Kristallstruktur⁽⁶¹⁾ abgeleitet.

Dem Ribozym mit Pu9-Modifikation fehlt diese Interaktion zusätzlich zur Wasserstoff-Brücken-Bindung, was eine Erklärung für die geringere Aktivität des Pu9 im Vergleich zu Ino9 und ebenfalls für die unerwartet geringe Aktivität des 2AP9 sein könnte. Somit zeigen die Ergebnisse, dass neben den Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt auch andere Effekte, wie elektronische Einflüsse und Wechselwirkungen, Einfluss auf die katalytische Aktivität haben.

Alle drei Doppelmutanten zeigten eine katalytische Restaktivität von 4-5%, obwohl bei den beiden Doppelmutanten Pu9 + dU17 und Ino9 + dU17 beide Wasserstoff-Brücken-Bindungen zerstört sind. Für die Doppelmutante von 2AP9 + dU17 mit intakter Wasserstoff-Brücken-Bindung der 2-NH₂-Gruppe des 2AP9 zum Diels-Alder-Produkt, war eine höhere Restaktivität im Vergleich zu den beiden anderen Doppelmutanten erwartet worden. Im Vergleich der relativen Aktivitäten der Einzelmodifikationen mit der geringsten Aktivität für die 2AP9-Modifikation trat für diese Modifikation nur eine Verminderung der relativen Aktivität um den Faktor 2.5 auf, ähnlich dem der Mutante Pu9. Die höchste Verminderung um den Faktor 5.5 zeigte die Ino9-Modifikation. Die unterschiedlichen Raten der Aktivitätsminderung führten dann für alle drei Doppelmutanten zu ähnlichen Restaktivitäten. Die Ergebnisse sind in Kraut *et al.*⁽¹⁶⁴⁾ publiziert.

3.5.3 Die Produkt-Inhibition des Diels-Alderase-Ribozyms

Für das Diels-Alderase-Ribozym ist aus früheren Untersuchungen⁴¹ eine starke Produkt-Inhibition der katalytischen Aktivität bekannt. Die mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50} [μM] des Diels-Alder-Produkts aus AHEG und NPM (DA1) der Enantiomere wurde für das *R,R*-Produkt auf 11 μM und das *S,S*-Produkt zu 270 μM bestimmt. Das *R,R*-Produkt, das mit über 95% ee in der natürlichen D-Form des Ribozyms gebildet wird, zeigte hier eine ungefähr 20-fach stärkere Produktinhibition als das *S,S*-Produkt. siehe Abb. 50. Umgekehrtes Verhalten konnte für die unnatürliche L-Ribozymvariante mit einer Inhibition von 30 μM für das *S,S*- und 370 μM für das *R,R*-Produkt festgestellt werden. Ein achirales Produkt gebildet aus Anthracen und Maleimidocapronsäure (DA2) wies mit 21 μM einen ähnlich hohen IC_{50} -Wert wie das *R,R*-Produkt auf, was auf eine geringe Beteiligung der Polyethylenglykol-Seitenkette des Anthracens in der Produkt-Inhibition hindeutete.⁽⁹³⁾



3.5.4 Bestimmung der Produkt-Inhibition in Abhängigkeit der Wasserstoff-Brücken-Bindungen

Zur Untersuchung des Einflusses der Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt auf die Produkt-Inhibition wurde die Doppelmutante G9Pu + U17dU als Mutante eingesetzt bei der beide H-Brücken-Bindungen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt zerstört sind. Dafür wurde das Diels-Alderase-Ribozym als einsträngiges 49mer mit freien Substraten unter multiplem Reaktionsumsatz verwendet. Der UV/VIS-spektroskopische Assay erfolgte analog den beschriebenen Standardbedingungen⁽⁹³⁾ mit AHEG, NPM und Ribozym unter Messung der AHEG-Abnahme in den Reaktionen, siehe Abb. 51 (B). Zur Produkt-Inhibition wurden die in Abb. 51 (A) dargestellten Diels-Alder-Produkte DA1 und DA2 verwendet. Das Produkt aus AHEG und NPM (DA1) wurde dabei als Enantiomerengemisch aus *R,R*- und *S,S*-Produkt eingesetzt, wodurch sich der IC_{50} -Wert auf ungefähr das doppelte des *R,R*-Wertes erhöhen sollte. Die Inhibition der Produkte wurde bis zur Löslichkeitsgrenze der Produkte, für DA1 bis 200 μM und DA2 bis 500 μM , eingesetzt. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k [$\text{M}^{-1} \text{h}^{-1}$] der Reaktion zweiter Ordnung erfolgte aus der Absorptionsabnahme des AHEG-Substrats in Korrelation zur zugesetzten Diels-Alder-Produkt-Konzentration aus Triplikatmessungen mit Angabe der Standardabweichung, siehe Abb. 51 (C). Aufgrund der geringen Ribozym-Aktivität der Doppelmutante wurde die 4-fache Ribozym-Konzentration der Doppelmutante im Gegensatz zum Wildtyp-Ribozym zugesetzt. Für das Wildtyp-Ribozym mit der starken Produkt-Inhibition konnte die mittlere inhibitorische Produkt-Konzentration IC_{50} [μM] aus dem sigmoidalen Fit der Triplikatmessungen ermittelt werden, siehe Abb. 51 (D).

Für die Doppelmutante ohne Zusatz an Diels-Alder-Produkt wurde die Geschwindigkeitskonstante k zu 850 ± 30 [$\text{M}^{-1} \text{h}^{-1}$] und für das Wildtyp-Ribozym zu 15500 ± 1100 [$\text{M}^{-1} \text{h}^{-1}$] bestimmt. Unter Berücksichtigung der 4-fachen Ribozym-Konzentration der Doppelmutante bedeutete dies eine ~ 70 -fach reduzierte Geschwindigkeitskonstante, beziehungsweise eine Restaktivität von ~ 1 -2%. Aufgrund des Erreichens der Löslichkeitsgrenze des Produkts DA1 vor Eintreten der vollständigen Produkt-Inhibition wurde der IC_{50} -Wert für DA1 nicht exakt ermittelt, sondern nur auf ungefähr 10 μM angenähert und für DA2, für das annähernd vollständige Produkt-Inhibition auftrat, auf 7 μM bestimmt.

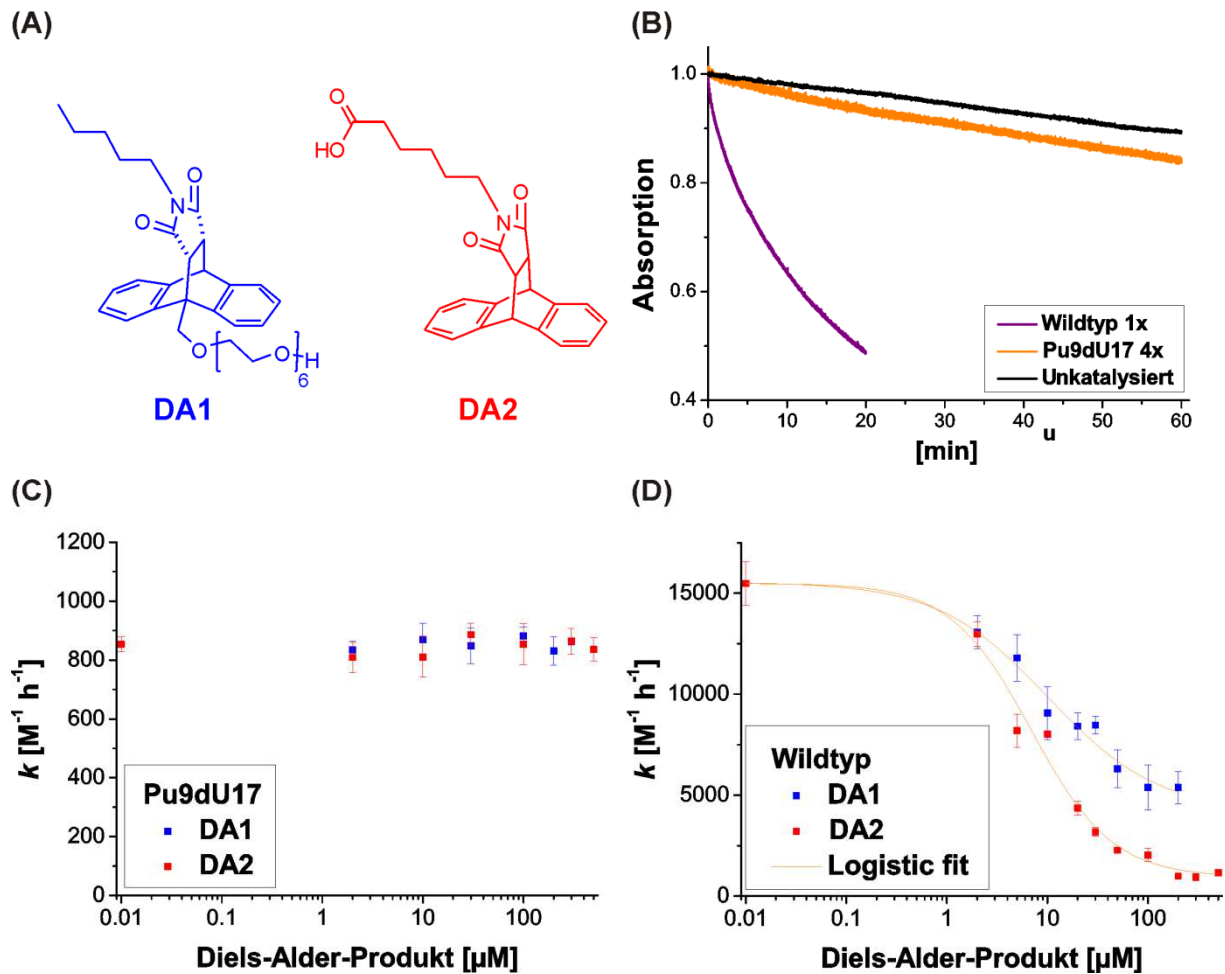


Abb. 51: Produkt-Inhibition für die Doppelmutante Pu9dU17 (Kombination von G9Pu + U17dU) und Wildtyp mit Diels-Alder-Produkten bis zur Löslichkeitsgrenze von DA1 bis zu 200 μM und DA2 bis zu 500 μM zugesetzt. (A): Diels-Alder-Produkte, DA1 als Enantiomergemisch von *R,R*- und *S,S*-Produkt, symbolisiert durch gestrichelte Linien. DA2 als achirales Produkt. (B): UV/VIS-spektroskopischer Assay: AHEG-Abnahme bei 365 nm im Vergleich für den Wildtyp mit 1-facher (1x) Ribozym-Konzentration (7 μM Ribozym), für die Pu9dU17-Doppelmutante mit 4-facher (4x) Ribozym-Konzentration (28 μM Ribozym) und für die unkat. Hintergrundreaktion mit je 500 μM AHEG und 5 mM NPM. (C): Geschwindigkeitskonstante k [$M^{-1} h^{-1}$] der Doppelmutante Pu9dU17 in 4-facher Ribozym-Konzentration in Abhängigkeit der Diels-Alder-Produkt-Konzentrationen aus Triplikatabmessungen mit Standardabweichungen bestimmt. (C)+(D): In der logarithmischen Darstellung, wurde 0 [μM] als 0.01 [μM] aufgetragen. (D): Geschwindigkeitskonstante der Produkt-Inhibition für Wildtyp (1-fache Ribozym-Konzentration) mit sigmoidalem Fit zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50} für DA1 zu $\sim 10 \mu M$ und DA2 $\sim 7 \mu M$. (C): Publiziert in Kraut *et al.*⁽¹⁶⁴⁾.

Die Doppelmutante als Ribozym ohne die beiden Wasserstoff-Brücken-Bindungen von G9 und U17 zum Diels-Alder-Produkt zeigte keinerlei Verringerung der Geschwindigkeitskonstante über den gesamten Konzentrationsbereich an zugesetzten Diels-Alder-Produkten. Somit demonstrierte das Ribozym ohne die beiden H-Brücken-Bindungen völlige Unabhängigkeit vom Diels-Alder-Produkt.

Die Berücksichtigung der gleichzeitig ermittelten Restaktivität der Doppelmutante Pu9dU17 von nur 1-2% untermauerte zusätzlich die Hypothese der hohen Relevanz beider Wasserstoff-Brücken-Bindungen im Wildtyp-Ribozym mit freien Substraten und multiplem Reaktionsumsatz für die katalytische Aktivität, die Erzeugung der hohen Affinität zum Diels-Alder-Produkt und folglich auch zur hohen Produkt-Inhibition.

Diese Ergebnisse bestätigten somit den vermuteten Zusammenhang der katalytischen Aktivität und der hohen Produkt-Inhibition durch die beiden Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen G9 und U17 des Ribozyms und dem Diels-Alder-Produkt. Die Ergebnisse sind in Kraut *et al.*⁽¹⁶⁴⁾ publiziert.

3.5.5 Interpretation der Ergebnisse über den Einfluss der Wasserstoff-Brücken-Bindungen

Der Einfluss von Interaktionen zu Mg²⁺-Ion Nr.5

Die unterschiedlichen relativen Aktivitäten der Einzelmutanten im gelelektrophoretischen Assay deuten auf den Einfluss der Interaktion zwischen dem Nukleotid G9 und dem Mg²⁺-Ion Nr.5 auf die katalytische Aktivität hin, siehe Abb. 52. Neben den Interaktionen des G9 durch 6-O und N7 mit dem Mg²⁺-Ion Nr.5 und U17 durch 4-O wurden auch für die beiden Nukleotide U8 und A16 Interaktionen zum Mg²⁺-Ion Nr.5 aus der Kristallstruktur und aus Substitutions-Experimenten abgeleitet.⁽⁶¹⁻⁶²⁾

Im Gegensatz zur Substitution von U17 durch dU17 ohne Störung der Interaktion zum Mg²⁺-Ion führten Substitutionen von G9 zu Änderungen. Die Entfernung der 6-Oxo-Gruppe des G9 durch Substitution mit G9Pu oder G92AP führte, im Vergleich zu G9Ino, zur Halbierung der katalytischen Aktivität. Für G9Pu und G92AP ist nur noch die Wasserstoff-Brücken-Bindung von N7 zum Mg²⁺-Ion intakt. Die Interaktion des G9 zum Mg²⁺-Ion Nr.5 scheint folglich einen signifikanten Einfluss auf die katalytische Aktivität zu haben.

Diese Ergebnisse ergänzen die aus früheren Studien erhaltenen Kenntnisse über den Einfluss von Nukleotid-Interaktionen zu Mg²⁺-Ion Nr.5 auf die katalytische Aktivität. Dabei wurde für U17 die Interaktion des 4-O mit dem Mg²⁺-Ion mittels Substitution der Carbonyl-Sauerstoffatome durch Aminogruppen unter Aktivitätsverminderung um das 3-fache in Aktivitätsstudien abgeleitet.⁽⁶²⁾

Die Interaktion von U17 zum Mg^{2+} -Ion scheint wichtig, aber nicht essentiell zu sein, wie aus FRET-Experimenten mit einer sterisch anspruchsvollen „Caging-Gruppe“ am 4-O mit noch 55% Restaktivität gefolgert wurde.^(167, 174) Die Interaktion des 5'-Phosphatsauerstoffs des U8 mit dem Mg^{2+} -Ion wurde aus der Aktivitätsminderung um ungefähr 50% aus dem Phosphorothioateffekt mittels NAIM abgeleitet.

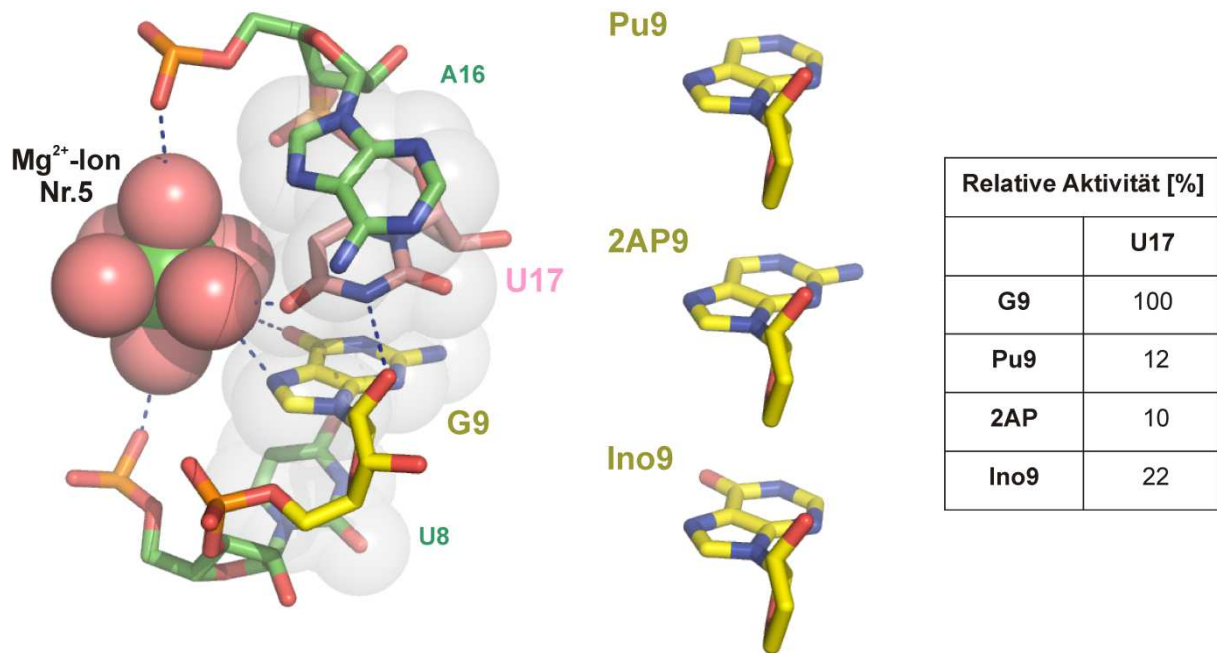


Abb. 52: Interaktion der Nukleotide U8, G9, U17 und A16 mit dem Mg^{2+} -Ion Nr.5. Interaktion von G9 und U17 mit dem Mg^{2+} -Ion: 6-O und N7 des G9 und 4-O des U17. Die grauen Sphären symbolisieren die Beteiligung der Nukleotide am „Rückgrat“. Die Interaktionen zum Mg^{2+} -Ion sind in blauen Linien dargestellt, analog die Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen G9 und U17. Alle Interaktionen wurden aus der Kristallstruktur abgeleitet. Mitte und rechts: Substitutionen für G9 mit den relativen Aktivitäten [%] der Einzelmodifikationen.

Alle diese Ergebnisse bestätigen die signifikante Stabilisierungsfunktion und den Einfluss auf die katalytische Aktivität der Wechselwirkungen zum Mg^{2+} -Ion Nr.5. Sie bestätigen auch die aus der Kristallstruktur abgeleitete wichtige Stabilisierung insbesondere der die Bulge-Überkreuzung bildenden Nukleotide G9 und U17 als Teil des „Rückgrats“, das durch Basenstapelungen einen elementaren Einfluss auf die Form der Gesamtstruktur hat und sie stützt.⁽⁶¹⁾

Die Interaktion zu Mg^{2+} -Ion Nr.5 wurde somit, aufgrund der noch vorhandenen Aktivitäten nach Störung einer Interaktion, als signifikant, aber nicht essentiell identifiziert. Im Gegensatz dazu führte die Zerstörung der H-Brücken-Bindung zwischen G9 und U17 in Substitutions-Experimenten zur fast völligen Inaktivität und durch Substitution zweier H-Brücken-Akzeptoren zu vollständigem Aktivitätsverlust.⁽⁶²⁾

Die Zerstörung der Interaktion zwischen G9 und U17 hat offensichtlich einen entscheidenden Einfluss auf die katalytische Aktivität und könnte das „Rückgrat“ des Ribozyms zerstören, während der Einfluss der Interaktionen zu Mg^{2+} -Ion Nr.5 einen weniger dramatischen Effekt aufweist. Somit könnte bei der Stabilisierung der Bulge-Überkreuzung eine synergistische Kombination der H-Brücken-Bindungen zwischen G9 und U17 und zu Mg^{2+} -Ion Nr.5 vorliegen. Möglicherweise führt die Zerstörung einer Wechselwirkung wie in 2AP9 aufgrund der noch intakten weiteren Interaktionen nur zur verminderten Aktivität unter Erhalt der Gesamtstruktur. Möglicherweise haben auch elektronische Effekte einen entscheidenden Einfluss, wie der in der 6-Oxo-Gruppe wirkende –M-Effekt^{42 (175)}, der zur Verminderung der Elektronendichte im Ring führt oder die umgekehrt wirkende 2-NH₂-Gruppe, die mit ihrem +M-Effekt die Elektronendichte im Ring erhöht. Das Zusammenwirken der Effekte der unterschiedlichen Seitengruppen könnte dabei entscheidend sein.

RNA-Produkt-Interaktionen und deren Einfluss auf die katalytische Aktivität

Einzelmodifikationen

Bemerkenswert ist das Ergebnis der U17dU-Modifikation mit zerstörter Wasserstoff-Brücken-Bindung von dU17 zum Diels-Alder-Produkt mit der hohen Restaktivität von $34 \pm 2.0\%$, die durch die Aktivitätsminderung um ungefähr 2/3 den großen Einfluss dieser Wasserstoff-Brücken-Bindung aufzeigt. Die hohe Restaktivität beschreibt allerdings auch die effektive Kompensation dieser einen fehlenden H-Brücken-Bindung durch andere Interaktionen. Der Einfluss auf die katalytische Aktivität der Modifikationen von G9 mit Aktivitäten von 10-22% wurde somit als viel größer als die Modifikation von U17 identifiziert. Insbesondere die niedrige katalytische Aktivität der 2AP9-Modifikation von nur 10% trotz beider intakter H-Brücken-Bindungen zum Diels-Alder-Produkt war zunächst überraschend. Eine Erklärung dafür könnten elektronische Effekte, wie im Abschnitt zuvor beschrieben, sein. Diese sollten in den Modifikationen innerhalb des G9 eine größere Auswirkung auf die Nukleobase und deren Wechselwirkungen mit dem Mg^{2+} -Ion Nr.5 haben als die fehlende 2'-OH-Gruppe der Ribose des dU17.

⁴² M-Effekt: Abkürzung von: Mesomerer Effekt. Ein Substituent mit –M-Effekt entzieht einem mesomeren System aufgrund seiner Doppel- oder Dreifach-Bindung Elektronendichte. Ein Substituent mit +M-Effekt erhöht durch ein freies Elektronenpaar die Elektronendichte des mesomeren Systems.

Daraus könnte die geringere Verminderung der katalytischen Aktivität der U17dU-Mutante und die stärkere Verminderung der G9-Modifikationen erklärt werden.

Doppelmodifikationen

Die sehr ähnlichen Restaktivitäten von 4-5% der drei Doppelmutanten, weisen auf die Unabhängigkeit dieser katalytischen Restaktivitäten von den Einflüssen der Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt und zu Mg^{2+} -Ion Nr.5 hin.

Die Diskrepanz der Restaktivität der Doppelmutante Pu9dU17 von 1-2% im UV/VIS-spektroskopischen Assay und 5% im gelelektrophoretischen Assay könnte aus der Vervierfachung der Pu9dU17-Ribozym-Konzentration in der Produkt-Inhibitions-Bestimmung resultieren. Die Erhöhung der Ribozym-Konzentration war aufgrund der sehr geringen Geschwindigkeitskonstante zur Differenzierung der ribozym-katalysierten von der unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion der Mutante erforderlich, wie in Abb. 51 (B) dargestellt. Das Äquivalentverhältnis von Ribozym zu AHEG wurde dadurch von 1:71 zu 1:18 verändert. In der Pu9dU17-Mutante wurde somit die für das Wildtyp-Diels-Alderase-Ribozym ermittelte Konzentration K_M^{43} von AHEG 370 μM mit 7 μM Ribozym nicht erreicht.⁽⁵⁹⁾ Die generell verringerte katalytische Aktivität des Dreistrang-Wildtyp-Ribozyms mit einfachem Reaktionsumsatz auf 70% der Aktivität des Einstrang-Ribozyms⁽⁶⁰⁾ sollte hier aufgrund der Bestimmung der relativen Aktivitäten in Bezug auf das Wildtyp-Ribozym nivelliert sein.

Aus der Restaktivität der Doppelmutanten von 4-5% wurde der entsprechende Energiebeitrag beider Wasserstoff-Brücken-Bindungen, als freie Reaktionsenergie mit nachfolgender Formel, die aus der Arrhenius-Gleichung abgeleitet wurde, berechnet.^(66, 176)

$$\Delta G [kJ \cdot mol^{-1}] = -RT \cdot \ln [relative\ Aktivität]$$

Mit: ΔG [kJ/mol]: freie Reaktionsenergie; R: allgemeine Gaskonstante: 0.008314 $kJ \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$; T: absolute Temperatur: 298 K

⁴³ K_M : Substratkonzentration der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit

Der Energiebeitrag der beiden Wasserstoff-Brücken-Bindungen, aus der Restaktivität berechnet, trägt mit 7-8 kJ/mol zur Stabilisierung des Übergangszustandes bei. In Bezug auf die 450-550-fache Reaktionsbeschleunigung der Doppelmutanten im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion, entspricht die Differenz des Energiebeitrags $\Delta\Delta G$ ungefähr 15 kJ/mol. Folglich basiert ein größerer Energiebeitrag auf anderen Interaktionen als auf den beiden H-Brücken-Bindungen.

Mögliche andere relevante Interaktionen werden im Kontext der Produkt-Inhibition im übernächsten Abschnitt diskutiert.

Einzel- und Doppelmutanten im Vergleich

Im Vergleich der Restaktivität der Doppel- zu den Einzelmutanten ergeben die Ergebnisse der Doppelmutanten den Beitrag beider postulierter Wasserstoff-Brücken-Bindungen zur katalytischen Reaktionsbeschleunigung in einer additiven Weise. Diese Additivität lässt darauf schließen, dass die Energien zweier Interaktionen moderater Stärke einen signifikanten Beitrag zur katalytischen Aktivität leisten, wie in der Literatur als Kombination energetischer Effekte von Wasserstoff-Brücken-Bindungen zur Stabilisierung des Übergangszustands beschrieben.⁽¹⁷⁶⁾

Die Verminderung der gemessenen katalytischen Aktivitäten in den Einzel- und den Doppelmodifikationen des Ribozyms mit zerstörten H-Brücken-Bindungen entspricht darüber hinaus der von Woodward *et al.*⁽¹⁸⁾ beschriebenen Reaktivitätserhöhung des Dienophils einer Diels-Alder-Reaktion durch Verminderung der Elektronendichte durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen. Dieser Effekt wurde in katalytischen Antikörpern nachgewiesen.⁽¹⁷⁷⁻¹⁷⁸⁾

Produkt-Inhibition

Die Doppelmutante G9Pu + U17dU, bei der beide H-Brücken-Bindungen von G9 und U17 zum Diels-Alder-Produkt zerstört sind, zeigte, im Gegensatz zum Wildtyp-Ribozym, keinerlei Inhibition durch Diels-Alder-Produkt bis zum Erreichen der Löslichkeitsgrenze. Dieses Resultat unterstützt frühere Ergebnisse die aus der hohen Produkt-Inhibition des Wildtyp-Ribozyms den großen Einfluss der beiden H-Brücken-Bindungen auf die hohe Affinität zwischen Produkt und Ribozym und die damit im Zusammenhang stehende hohe Produkt-Inhibition ableiteten.⁽⁹³⁾

Die Größenordnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des RNA-Produkt-Komplexes^(93, 174) von ungefähr 10 μM , einem ΔG -Wert von ungefähr 30 kJ/mol entsprechend, weist auf die ausreichende erforderliche Aktivierungsenergie aus nichtkovalenten Interaktionen zwischen dem Übergangszustand und der katalytischen Tasche hin. Die für die Doppelmutante ermittelte katalytische Restaktivität ist somit von den beiden Wasserstoff-Brücken-Bindungen und von der Produkt-Inhibition völlig unabhängig.

In Anbetracht der großen Ähnlichkeit der Form der katalytischen Tasche zum Reaktionsprodukt und dessen Übergangszustand, die aus der Kristallstruktur⁽⁶¹⁾ abgeleitet wurde, scheint der Einfluss der H-Brücken-Bindungen auf die Reaktionsrate und die Produkt-Inhibition im Zusammenhang einleuchtend. Die große Formenähnlichkeit könnte gleichzeitig die noch vorhandene Restaktivität trotz beider fehlenden H-Brücken-Bindungen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt durch weitere Wechselwirkungen erklären. Neueste molekulardynamische Simulationen beschrieben Interaktionen der Substrate und des Produkts mit der katalytischen Tasche durch Stapel-Interaktionen „stacking“.⁽¹⁷³⁾

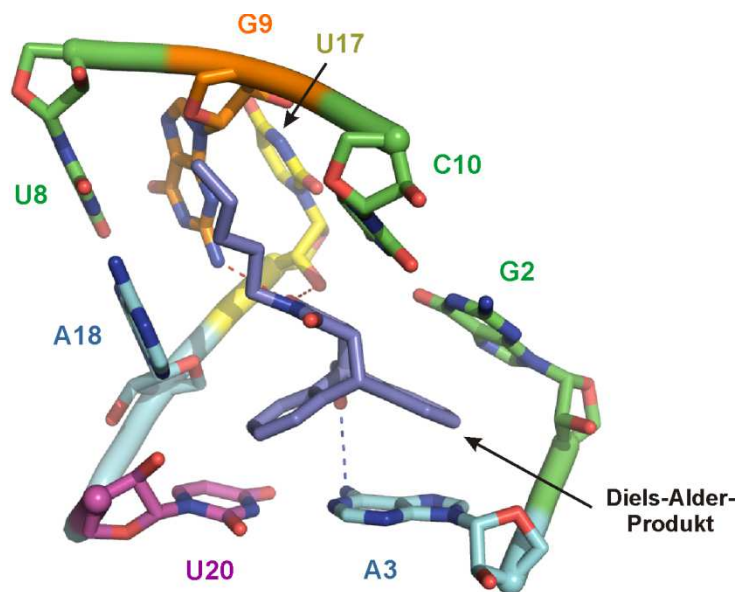


Abb. 53: Katalytische Tasche des Diels-Alderase-Ribozyms aus der Kristallstruktur mit Diels-Alder-Produkt. Rote Linien: H-Brücken-Bindungen zwischen G9 und U17 zum Diels-Alder-Produkt, blaue Linie: H-Brücken-Bindung zwischen A3 und Diels-Alder-Produkt.

In der katalytischen Tasche mit beiden gebundenen Substraten, stapelt „stackt“ das NPM zwischen den Anthracenringen und C10. Die Anthracenringe des AHEGs stapeln zwischen A18 und U20 und zwischen G2 und A3. Die Simulationen ergaben die selben Interaktionen für das Diels-Alder-Produkt, siehe Abb. 53.⁽¹⁷³⁾

Diese Interaktionen haben vermutlich in der Stabilisierung der präreaktiven Konformation eine wichtige Funktion und tragen somit auch zur katalytischen Aktivität bei.⁽¹⁷³⁾ Die Ausbildung der Interaktionen beruht vermutlich auf der Präferenz der hydrophoben Molekülteile der Substrate und des Diels-Alder-Produkts für die hydrophobe Umgebung der katalytischen Tasche und auf der Formenkomplementarität zwischen den Molekülen und der katalytischen Tasche.⁽¹⁷³⁾ Die Restaktivität der Einzel- und Doppelmутanten mit den nicht ausgebildeten Wasserstoff-Brücken-Bindungen könnte auf solchen teilweise noch ausgebildeten „Stapel“-Interaktionen basieren.

3.6 Fazit und Ausblick

3.6.1 Massenspektrometrische Analyse der Diels-Alder-Reaktionen

Die Quantifizierung des AHEG und Diels-Alder-Produkts in der ribozym-katalysierten Diels-Alder-Reaktion durch HPLC-Analyse ergab, dass etwa die Hälfte des konsumierten Anthracen-Substrats nicht zu Diels-Alder-Produkt reagierte. Zur sensitiven Untersuchung der Diels-Alder-Reaktionen wurde eine LC-MS-Methode zur hochauflösenden, qualitativen Detektion der einzelnen Substrate und Reaktionsprodukte etabliert, siehe Kapitel 3.2 und 3.3. AHEG-Sauerstoff-Addukte und AHEG-Dimere konnten in der AHEG-Einzelkomponente und den Diels-Alder-Reaktionen identifiziert werden. Diese Moleküle könnten an Nebenreaktionen der Diels-Alder-Reaktionen beteiligt sein, was in weiterführenden Analysen genauer untersucht werden sollte. Für Moleküle, die nicht in den Analysen der Einzelsubstrate und des Diels-Alder-Produkts, sondern nur in den Diels-Alder-Reaktionen auftreten und somit in einer Nebenreaktion entstanden sein müssen, wurden keine Hinweise gefunden. Die hohe Sensitivität der LC-MS-Analyse wurde in der Differenzierung von Molekülen mit nur geringen Unterschieden in der Summenformel, wie der Identifizierung der unterschiedlichen Sauerstoff-Addukte des AHEG demonstriert. Zum Verständnis der genauen Funktionsweise des Ribozyms ist die Aufklärung von Nebenreaktionen in der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion entscheidend. Dazu könnten die in Kapitel 3.3.5 zur weiteren Analyse mittels LC-MS vorgeschlagenen Experimente und Methoden erfolgreich beitragen. Identifizierte Nebenreaktionen des Diels-Alderase-Ribozyms könnten dabei interessante, völlig neue Erkenntnisse über dieses Ribozym ergeben.

3.6.3 Das Diels-Alderase-Ribozym und divalente Ionen

Die Untersuchung der katalytischen Aktivität des Ribozyms mittels UV/VIS-spektroskopischem Assay mit den divalenten Ionen Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und Cd^{2+} -Ionen zeigte die Relevanz der divalenten Ionen für die Ribozym-Aktivität, siehe Kapitel 3.1. Die höchste katalytische Aktivität des Diels-Alderase-Ribozyms konnte nur mit Mg^{2+} -Ionen erreicht werden.

Die Aktivitäts-Analysen ergaben dabei, dass zum Erreichen der vollständigen katalytischen Aktivität mit Mg^{2+} -Ionen eine höhere Anzahl von Ionen als die aus der Kristallstruktur⁽⁶¹⁾ und EPR-Messungen⁽¹⁴³⁾ abgeleiteten Bindungsstellen divalenter Ionen hoher Affinität nötig sind. Mit Mn^{2+} -Ionen verringerte sich die katalytische Ribozym-Aktivität auf etwa die Hälfte im Vergleich zu Mg^{2+} -Ionen. In Anwesenheit von Cd^{2+} -Ionen als einzige divalente Ionen trat keinerlei Ribozym-Aktivität auf, obwohl Cd^{2+} -Ionen die höchste Bindungsaffinität der untersuchten divalenten Ionen aufwies, wie die EPR-Messungen ergaben. Cd^{2+} -Ionen führten nicht zu einer inaktiven Ribozym-Struktur, wie aus der Zugabe von Mg^{2+} -Ionen beziehungsweise Mn^{2+} -Ionen unter Wiederherstellung der Ribozym-Aktivität festgestellt werden konnte. Im Vergleich der Ribozym-Aktivitäten mit den drei verschiedenen divalenten Ionen zur in den EPR-Messungen ermittelten Bindungsaffinität konnte die Intensität der Bindungsaffinität somit als nicht entscheidend für die katalytische Ribozym-Aktivität aufgezeigt werden. Daraus wurde gefolgert, dass andere Einflussfaktoren, wie z.B. die Härte und Weichheit der Ionen entscheidend für die katalytische Aktivität des Diels-Alderase-Ribozyms sind, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben.

3.6.2 Die Wasserstoff-Brücken-Bindungen der katalytischen Tasche und zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt

Mittels chemischem Probing mit Pb^{2+} -Ionen, dem gelelektrophoretischen Assay und den Produkt-Inhibitions-Studien von nukleotid-modifizierten Ribozymen im Vergleich zum Wildtyp-Ribozym wurde die Bedeutung der Wasserstoff-Brücken-Bindungen (H-Brücke) innerhalb der katalytischen Tasche und zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt untersucht. Dabei konnte ihre Relevanz auf die Stabilität des Ribozyms, die katalytische Aktivität und der Einfluß auf die Produkt-Inhibition aufgeklärt werden, wie in den Kapiteln 3.4 und 3.5 beschrieben. Insbesondere die H-Brücke als Verbindung von „Dach“ und „Rückgrat“ der katalytischen Tasche zwischen den Nukleotiden C10 und U17 wurde mit elementarer Relevanz und nötiger präziser Positionierung für die kompakte Faltung des Ribozyms identifiziert. Interessant wäre dabei weiterhin noch die Aufklärung über die genauen strukturellen Auswirkungen dieser zerstörten Interaktion auf die Form der katalytischen Tasche.

Wie in den Probing-Studien gezeigt wurde, erfolgte in der Ribozym-Mutante U17isoC keine Stabilisierung der Struktur durch Mg^{2+} -Ionen und Diels-Alder-Produkt.

Außerdem trat für die Ribozym-Mutante, im Gegensatz zum Wildtyp-Ribozym, Probing-Spaltung in der scharfen Biegung an Nukleotid A18 auf.

Für die beiden H-Brücken des Ribozyms der Nukleotide G9 und U17 zur Maleimid-Komponente des Diels-Alder-Produkts konnte deren großer Einfluss auf die katalytische Aktivität durch die auf 4-5% der Wildtyp-Aktivität verminderte Aktivität von Ribozym-Mutanten mit den beiden gestörten H-Brücken bestimmt werden. Mittels Vergleich der katalytischen Aktivitäten von Einzel- und Doppelmutanten wurde die additive Weise beider H-Brücken aufgezeigt. Beide H-Brücken wurden außerdem als Verursacher der hohen Produkt-Inhibition des Ribozyms identifiziert.

Zur genaueren strukturellen Aufklärung könnte der detaillierte Vergleich der experimentellen Daten mit molekulardynamischen Studien führen, insbesondere wären dafür molekulardynamische Simulationen über die strukturellen Eigenschaften der experimentell untersuchten Ribozym-Mutanten sehr interessant. Die Kombination experimenteller Daten und molekulardynamischer Simulationen könnte dabei genauere Hinweise zu strukturellen Änderungen an den einzelnen Nukleotiden ergeben und konkrete Hinweise auf noch hilfreiche Experimente liefern.

Die Rolle weiterer Elemente innerhalb des Diels-Alderase-Ribozyms, wie die Funktion der scharfen Biegung, die Ähnlichkeit mit dem T-Loop Motiv von tRNA^(169, 179) aufweist und für die katalytische Aktivität von entscheidendem Einfluß zu sein scheint, sind noch ungeklärt. Unklar sind auch nach wie vor noch die molekularen Details der Faltung der Pseudoknoten-Struktur, die Konformationsänderungen während des Reaktionszyklus und die Reihenfolge der Substratbindung. Neueste molekulardynamische Simulationen ergaben Hinweise für die Bindung der Maleimid-Komponente vor der Bindung der Anthracen-Komponente.⁽¹⁷³⁾

Die Aufklärung dieser Elemente könnte entscheidend zum Verständnis über die Funktionsweise des Diels-Alderase-Ribozyms beitragen. Durch gezielte Modifikationen an den Wasserstoff-Brücken-Bindungen könnten z.B. die Ribozym-Aktivitäten von unterschiedlichen Substraten und das Enantiomeren-Verhältnis des Diels-Alder-Produkts beeinflusst werden und so die katalytische Reaktion gezielt verändert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Standardmethoden und Reagenzien

Alle molekularbiologischen und analytischen Reaktionen wurden mit reinstem Wasser aus der Milli-Q Synthesis A10-Anlage (Millipore) durchgeführt.

Die verwendeten Feinchemikalien wurden in der höchsten, kommerziell erhältlichen Reinheit (Sigma-Aldrich oder Acros Organics) eingesetzt.

Das freie Substrat für die Diels-Alder Reaktion (9-Anthracenylmethyl)hexaethylenglykol (AHEG)^(93, 180) wurde als 1 mM Stammlösung in H₂O hergestellt und eine Woche lang verwendet. Die Konzentration wurde jeweils UV/VIS-spektroskopisch bestimmt und auf 500 µM eingestellt. *N*-Pentylmaleimid⁽¹⁸¹⁾ wurde als 1 M ethanolische Stammlösung für eine Woche eingesetzt. Die Diels-Alder Produkte aus AHEG und NPM als Racemat⁽⁹³⁾ und aus Anthracen und Maleimidocaprinsäure⁽¹⁸²⁾ wurden ebenfalls in Ethanol gelöst.

Folgende Enzyme wurden für molekularbiologische Methoden eingesetzt: T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK) und T4-RNA-Ligase (Fermentas) und RNase T1 (Industrial Research Ltd.).

TBE-Puffer, für alle Gelelektrophoresen verwendet, als 10x Konzentrat mit 1.0 M Tris-HCl/Borat-Puffer pH 8.3, 20 mM EDTA (Carl Roth) wurde zur Verwendung mit reinstem Wasser auf die 1-fache Konzentration verdünnt. Die Polyacrylamid-Gele wurden aus Rotiphorese Fertiglösungen aus Konzentrat, Verdünner und TBE-Puffer gemischt. Zur Polymerisation wurden APS als 10%ige Lösung (1 mL / 150 mL Acrylamidlösung) und TEMED (100 µL / 150 mL Acrylamidlösung) verwendet. Die Glasplatten wurden vor Benutzung silanisiert (2%ige Dichlor-dimethylsilan-Lösung in Chloroform).

Für Diels-Alderase-Reaktionen wurden die Standard-Konzentrationen der Komponenten von 300 mM NaCl, 80 mM MgCl₂, 30 mM Tris-HCl mit pH 7.4 verwendet. Bei Analysen in Abhängigkeit der Ionenkonzentration wurden entsprechende Ionen und Konzentrationen variiert.

Alle Arbeiten mit RNA erfolgten unter spezieller Vorsicht zur Vermeidung von Kontaminationen mit ubiquitären Nukleasen. Die Arbeitsbereiche wurden regelmäßig mit 30%iger H₂O₂-Lösung gereinigt.

Um Nukleinsäure-Verluste zu minimieren, wurden silanisierte Reaktionsgefäße (1.7 und 2.0 mL, Carl Roth) und für kleine Reaktionsansätze der UV-Kinetiken nicht-silanisierte PCR-Gefäße (0.2 mL, Carl Roth) verwendet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Nukleinsäuresequenzen

Die eingesetzten Oligonukleotid-Sequenzen wurden von der IBA GmbH erworben, oder in unserer Gruppe synthetisiert^{44, (62)}. Das unmodifizierte 49mer Diels-Alderase-Ribozym wurde von CSS Chemical Synthesis Services als HPLC gereinigter - und entsalzter Feststoff mit Na⁺-Ionen als Gegenion erhalten und zur Verwendung als 100 µM Stammlösung mit reinstem Wasser gelöst. Reaktionszusätze von tRNA (totale *E. coli* tRNA) wurde von Roche bezogen. Alle Oligonukleotid-Konzentrationen wurden mittels Nanodrop (PepLab) bestimmt und eingestellt, siehe unter 4.2.4. Die verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen werden nachfolgend aufgelistet. Von der Wildtyp-Sequenz abweichende Nukleotide wurden blau unterlegt. Die Nummerierung der Basenposition bezieht sich auf die Basenpositionen in Abb. 7. Alle Basenmodifikationen liegen im Bereich der asymmetrischen Ausbuchtung.

Verwendete Diels-Alderase-Ribozym-Sequenzen:

■ Modifiziert im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz

49mer Wildtyp

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

49mer mit C in Position 17

5'-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GCC GUG CCA GCU CUU CGG AGC AAC C ACU CGG C-3'

49mer mit isoC in Position 17

5'-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GCC GUG CCA GCU CUU CGG AGC AA isoC ACU CGG C-3'

49mer mit rPurin (rPu) in Position 9 und dU in Position 17

5'-GGA GCU CGC UUC GGC GAG GCC GU rPu CCA GCU CUU CGG AGC AA dU ACU CGG C-3'

24mer Wildtyp für tripartites Diels-Alderase-Ribozym

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

⁴⁴ Von Dr. Dirk Bebenroth synthetisiert

24mer mit rPurin (rPu) in Position 9

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

24mer mit 2-Amino-Purin (2AP) in Position 9

5'-GGG CGA GGC CGU 2APCC AGC UCU GCC-3'

24mer mit rInosin (rIno) in Position 9

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

18mer Wildtyp für tripartites Diels-Alderase-Ribozym

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

18mer mit dU in Position 17

5'-GGC AGA GCA AdUA CUC GGC-3'

10mer-AHEG Wildtyp für tripartites Diels-Alderase-Ribozym

5'-AHEG-GGA GCU CGC C-3'

„Faltung“ und Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur kontrollierten, korrekten „Faltung“ oder Hybridisierung wurden die RNA-Sequenzen in wässriger Lösung langsam aufgetaut und nach Zugabe von Puffer (pH 7.5) und monovalenten Ionen kurz erhitzt (75 °C für 2 min), kontrolliert im Thermoschüttler innerhalb von 20 min auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt und divalente Ionen zugegeben.

4.2.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit ³²P**3'-Markierung durch Ligation**

Mittels Ligation durch das Enzym T4-RNA-Ligase wird das 3'-OH einer RNA mit einer 5'-Phosphatgruppe eines Ribonukleotids verknüpft. ATP ist dabei in der Reaktionslösung erforderlich. Mit dieser Methode wurde die 10mer-AHEG Nukleotidsequenz am 3'-Terminus durch ³²P-pCp ([5'-³²P]-Cytidin-3',5'-biphosphat) radioaktiv markiert und um ein C-Nukleotid zum 11mer-AHEG verlängert.⁽¹⁸³⁻¹⁸⁴⁾ Die Ligation wurde bei 16 °C im Thermoschüttler über 4 h mit den in Tab. 7 aufgeführten Komponenten und Konzentrationen durchgeführt. Die T4-RNA-Ligase (Fermentas) wird als Lösung mit 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.03% Detergenz und 50% (v/v) Glycerol eingesetzt.

Der verwendete 10x Ligase-Puffer (Fermentas) besteht aus 500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT und 10 mM ATP. Das Konzentrationsverhältnis von Oligonukleotid und ³²P-pCp wurde auf 1:1 gewählt. Der Reaktionsansatz wurde nach der Ligation wie unter 4.2.3 und den folgenden Abschnitten beschrieben, aufgereinigt.

Die radioaktiv markierte Nukleotidsequenz wurde zur Ribozym-Aktivitätsbestimmung im elektrophoretischen Assay zur Detektion der Trennung von Edukt- und Produktsequenz eingesetzt.

Tab. 7: 3'-Markierung mit ³²P-pCp

Komponente	[μ L]	Finale Konzentration
10 mer-AHEG (10 pmol/ μ L)	2.8	0.7 μ M
DMSO	2	10% (v/v)
Ligase Puffer 10x	2	1x
ATP (10 mM)	1	1 mM
³² P-pCp (4 pmol/ μ L)	7	0.7 μ M
T4-RNA-Ligase (10 U/ μ L)	2	1 U/ μ L
H ₂ O	auf 20 μ L aufgefüllt	

5'-Markierung durch Kinasierung

Der 5'-Terminus von RNA wird mittels Kinasierung durch den Einbau einer ³²P-Gruppe phosphoryliert. Das Enzym T4-Polynukleotidkinase (PNK) überträgt dabei die γ -³²P-Gruppe aus ATP auf das 5'-OH des Oligonukleotids. Mit dieser Methode wurde das 49mer Ribozym am 5'-Terminus radioaktiv mit γ -³²P-ATP markiert. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 1 h im Thermoschüttler.⁽¹⁸³⁻¹⁸⁴⁾ Die T4-PNK-Lösung beinhaltet 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT und 50% (v/v) Glycerol, siehe Tab. 8. Der verwendete 10x Kinase-Puffer A (Fermentas) setzt sich aus 500 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT und 1 mM Spermidin zusammen. Die Aufreinigung des Reaktionsansatzes erfolgte wie unter 4.2.3 und den folgenden Abschnitten beschrieben. Das radioaktiv markierte 49mer Ribozym wurde zur strukturellen Untersuchung mittels chemischen Probing mit Pb²⁺-Ionen eingesetzt.

Tab. 8: 5'-Markerierung mit γ - 32 P-ATP

Komponente	[μ L]	Finale Konzentration
49mer RNA (19 pmol/ μ L)	10	9.5 μ M
Kinase-Puffer A 10x	2	1x
γ - 32 P-ATP (2 pmol/ μ L)	3	0.3 μ M
T4-RNA-Kinase (10 U/ μ L)	2	1 U/ μ L
H ₂ O	auf 20 μ L aufgefüllt	

4.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die PAGE wurde zur elektrophoretischen Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren mit Polyacrylamid-Gelen verschiedener Größe, Schichtdicke und Vernetzungsgrad verwendet. Die Gele wurden aus Rotiphorese-Fertigkonzentraten aus Konzentrat, Verdünner und Puffer hergestellt unter Zugabe von den Polymerisationsstartern aus 10% iger Ammoniumperoxodisulfat Lösung 10% (APS) und *N,N,N',N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin Lösung (TEMED). Der Vernetzungsgrad wurde durch das Verhältnis von quervernetzendem Methylenbisacrylamid zu Acrylamid variiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit 7.0 M Harnstoff im Medium der Gele. Präparative Gele zur Aufreinigung von Nukleinsäuren wurden mit einer Schichtdicke von 1.0 mm, analytische Gele mit einer Schichtdicke von 0.4 mm verwendet. Die Gele wurden in der Elektrophoresekammer unter 1x konzentriertem TBE-Puffer (Verdünnung aus 10x TBE pH 7.5, 1 M Tris-Borat und 20 mM EDTA) mit 15-20 W für 20 min equilibriert. Die Probenlösung wurde mit dem 1-2-fachem Volumen denaturierender Lösung aus 90% Formamid in 1x TBE-Puffer versetzt. Zur Kontrolle wurden die äußeren Gelkammern mit denaturierender Lösung und zwei Farbstoffmarkern aus hellblauem Xylencyanol FF und blauem Bromphenolblau gefüllt. Für die analytischen Gele des chemischen Probings mit Pb²⁺-Ionen, erfolgte die Zugabe der Farbstoffmarker direkt in die Probenlösung. Die Elektrophorese wurde abhängig von Gelgröße, Schichtdicke und Vernetzungsgrad bei 40-65 W, falls nötig unter Ventilator Kühlung durchgeführt.

Probenlokalisierung auf PAGE-Gelen

Radiographie mittels Phosphorimager

Radioaktiv markierte Oligonukleotide wurden durch das „Phosphorimaging“-Verfahren mittels lichtempfindlicher Folie („Screen“) und einem Typhoon 9400 Gelscanner (GE Healthcare) lokalisiert. Eine Glasplatte wurde vom Gel entfernt, mit einer Plastikfolie abgedeckt und die lichtempfindliche Folie zur Exposition aufgelegt. Die lichtempfindliche Folie enthält kleine Kristalle mit BaFBr:Eu^{2+} -Ionen. Die hochenergetische β -Strahlung der ^{32}P -markierten Oligonukleotide, oxidieren das Eu^{2+} zu Eu^{3+} und reduzieren BaFBr zu BaFBr^- . Die Ionen verbleiben in dieser Oxidationsstufe und „speichern“ somit die Energie der radioaktiven Strahlung. Durch Bestrahlung mit dem roten Lasern der Wellenlänge von 633 nm wird ein Elektron aus BaFBr^- freigesetzt und Eu^{3+} zu Eu^{2+*} reduziert. Mit dem Übergang von Eu^{2+*} aus dem angeregten in den Grundzustand zu Eu^{2+} , wird Energie in Form von blauem Licht freigesetzt. Die Lichtmenge ist zur Menge der radioaktiven Strahlung proportional und wird detektiert.⁽¹⁸⁵⁾

Färbung von Oligonukleotiden mit SybrGold

„SYBR[®]Gold nucleic acid gel stain“ (Invitrogen) ist ein unsymmetrischer Cyan-Fluoreszenzfarbstoff zur Färbung und Detektion mit hoher Sensitivität für Einzel- und Doppelstrang-DNA oder -RNA in PAGE-Gelen. Bindung an DNA oder RNA führt zu mehr als 1000-facher Fluoreszenzverstärkung mit einem Anregungsmaximum von 495 nm und Emissionsmaximum von 537 nm und kann mit dem Typhoon 9400 (GE Healthcare) detektiert werden.⁽¹⁸⁶⁾ Die Färbung eines PAGE-Gels erfolgte für 30 min unter Schütteln in einer Lösung aus 20 μL SYBR[®]Gold Lösung in 200 mL 1x TBE-Puffer.

Elution von Oligonukleotiden aus Polyacrylamid-Gelen

Die Banden wurden aus den PAGE-Gelen als kleine Stücke ausgeschnitten und mit 400 μL 0.5 M Ammoniumacetat bei 20 °C über Nacht unter Schütteln im Thermoschüttler inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit einem Spinfilter (VWR) zentrifugiert. Die Gelrückstände wurden nochmals mit 250 μL 0.5 M NH_4OAc -Lösung versetzt und 20 min bei 40 °C inkubiert und filtriert.⁽¹⁸³⁻¹⁸⁴⁾

Ethanol­fällung von Oligonukleotiden

Zur Isolation und Reinigung von Oligonukleotiden aus wässrigen, salzhaltigen Lösungen wird die Ethanol­fällung als häufig angewandte Methode eingesetzt. Der Probenlösung wurde NH_4OAc -Lösung bis zur finalen Konzentration von 0.5 M NH_4OAc zugesetzt. Zur Probenlösung wurde das doppelte Volumen an $-80\text{ }^\circ\text{C}$ kalten EtOH abs. zugegeben und mit dem Schüttler Vortex Genie (Bender & Hobein) gründlich gemischt. Die Lösung wurde für 1 h auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und anschließend bei $-5\text{ }^\circ\text{C}$ mit 13900 rpm für 40 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstands wurden die Pellets aus gefällter RNA mit 70%igem EtOH (v/v) gewaschen, für 10 min luftgetrocknet und anschließend in H_2O gelöst.⁽¹⁸³⁻¹⁸⁴⁾

4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden

Photometrische Bestimmung

Nukleinsäuren können photometrisch am Absorptionsmaximum von 260 nm in wässriger Lösung quantifiziert werden. Die Bestimmung von RNA-Konzentrationen wurde mit einem NanoDrop ND-1000 (PeqLab) mit einem Probenvolumen von 2.0 μL durchgeführt. Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem Lambert-Beerschen Gesetz aus der gemessenen Absorption, dem theoretischen Extinktionskoeffizienten⁽¹⁸⁷⁾ der RNA-Sequenz, der Weglänge des Lichts und dem Verdünnungsfaktor.

Bestimmung der Radioaktivität

Die Mengenbestimmung radioaktiver ^{32}P -markierter Nukleotide wurde mit einem Szintillationszähler LS 6500 (Beckman Coulter) im Cherenkov-Modus durchgeführt. Die Einbaueffizienz von ^{32}P der verwendeten Nukleotide $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ und $^{32}\text{P}\text{-pCp}$ (Hartmann Analytic) wurde mit folgender Formel unter Berücksichtigung der verwendeten Gesamtradioaktivität berechnet. Die Radioaktivität der RNA und die Gesamtradioaktivität wurden als „counts per minute“ [cpm] in die Formel eingesetzt. Für Bestimmungen nach mehreren Tagen, wurde die Abklingrate für ^{32}P berücksichtigt.

$$\text{Einbaurrate von } ^{32}\text{P} = \frac{\text{Radioaktivität der RNA [cpm]}}{\text{eingesetzte Gesamtradioaktivität [cpm]}}$$

4.3 UV/VIS-Spektroskopie zur Bestimmung der katalytischen Ribozym-Aktivität

4.3.1 Bestimmung der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion

Mit der UV/VIS-Spektroskopie zur Ribozym-Aktivitätsbestimmung wurde die Konzentrationsabnahme des Anthracen-Derivats bei einer Wellenlänge von 365 nm, einem der Absorptionsmaxima von Anthracen, bestimmt. Abb. 54 (A) zeigt das Absorptionsspektrum von Anthracen für 100 μM AHEG.

Alle Bestimmungen wurden mit dem 49mer Diels-Alderase-Ribozym als Reaktion mit multiplem Reaktionsumsatz mit AHEG (9-Anthracenylmethyl)hexaethylenglykol als Dien und NPM (*N*-Pentylmaleimid) als Dienophil durchgeführt.

Die Absorptionsbestimmungen erfolgten im 10 μL Maßstab in einer 10 μL Küvette (Hellma) mit einem Cary 50 Photometer (Varian) bei Raumtemperatur. Die Standard-Assaybedingungen, siehe Tab. 9, wurden analog Stuhlmann *et al.*⁽⁹³⁾ verwendet. Alle Substanzen wurden in reinstem Wasser gelöst, *N*-Pentylmaleimid in reinem Ethanol. Die Komponenten wurden in folgender Reihenfolge pipettiert: Tris-Puffer, NaCl, Ribozym, MgCl_2 , AHEG und zuletzt NPM um die Reaktion zu starten. Der Messzeitraum betrug 15 min.

Tab. 9: Standard-Assay zur Bestimmung der Ribozym-Aktivität mittels photometrischem Assay. Bedingungen adaptiert aus⁽⁹³⁾.

Komponente	[μL]	Finale Konzentration
Tris-Puffer pH 7.4 (300 mM)	1	30 mM
NaCl (3 M)	1	300 mM
MgCl_2 (800 mM)	1	80 mM
Ribozym (70 μM)	1	7 μM
AHEG (500 μM)	2	100 μM
NPM in EtOH (10 mM)	1	1 mM
EtOH		10%
H_2O	aufgefüllt auf 10 μL	

Die Messung der Absorptionsabnahme der katalysierten und unkatalysierten Reaktion wurde als Absorption gegen die Zeit aufgetragen und die Absorptionsabnahme der ersten linearen 5% Reaktionsumsatz zur weiteren Auswertung eingesetzt. Abb. 54 (B) zeigt die Absorption bei 365 nm des Wildtyp-Ribozyms und der unkatalysierten Hintergrundreaktion über 15 min.

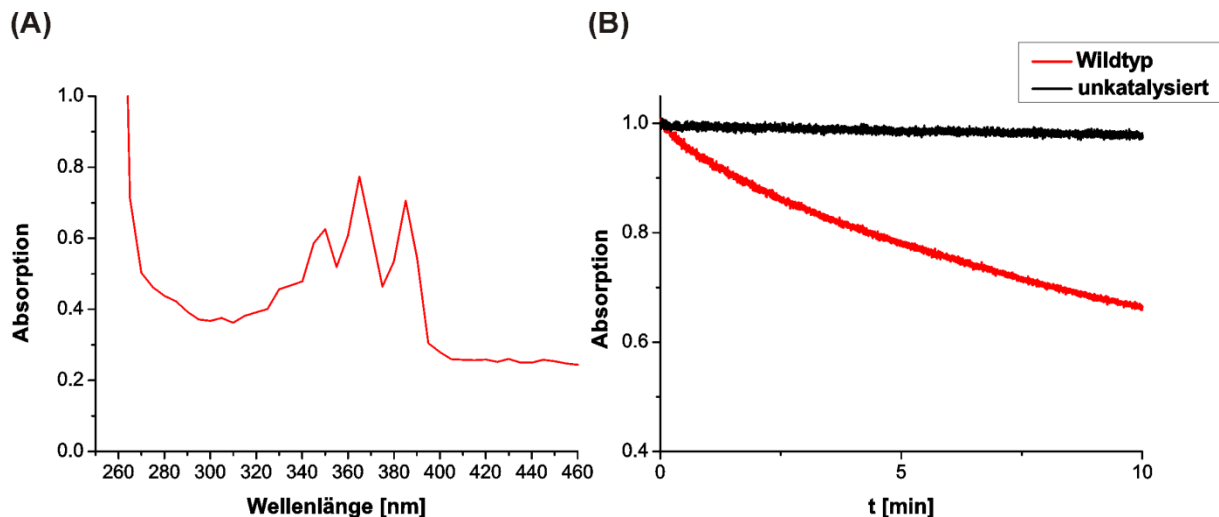


Abb. 54: UV/VIS-spektroskopischer Assay. (A): Absorptionsspektrum von Anthracen, gemessen mit $100 \mu\text{M}$ AHEG in 10% EtOH. (B): AHEG-Abnahme mit auf 1.0 normalisierter Absorption bei 365 nm im Vergleich von Wildtyp-Ribozym (rot) und unkatalysierter Reaktion (schwarz) über 15 min.

4.3.2 Auswertung

Zur Auswertung mittels linearer Regression, wurden für die ersten 5% Reaktionsumsatz die Geradengleichung erstellt, der Umsatz der unkatalysierten Hintergrundreaktion (BG-Reaktion) subtrahiert und mittels einer Kalibriergeraden die Anfangsgeschwindigkeit v_{ini} [$\mu\text{M}/\text{min}$] berechnet. Die Reaktion wurde als Reaktion zweiter Ordnung angenommen und die Geschwindigkeitskonstante k [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] über die nachfolgende Formel berechnet.

$$k [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}] = \frac{v_{ini} [\text{M s}^{-1}]}{Ant_0 [\text{M}] \cdot \text{NPM}_0 [\text{M}]}$$

Mit Hilfe einer sigmoidalen Kurve, „gefittet“ an die Messwerte, wurde die Michaeliskonstante K_M [μM] als Konzentration der divalenten Ionen bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt.

4.4 UV/VIS-Spektroskopie: Bestimmung der Ribozym-Aktivität mit divalenten Ionen

4.4.1 Bestimmung und Auswertung der Diels-Alder-Reaktionen

Zur Bestimmung der Ribozym-Aktivität in Abhängigkeit divalenter Ionen, wurde derselbe Assay wie in Abschnitt 4.3. beschrieben, verwendet. Die Konzentration der divalenten Ionen wurde variiert und die Reaktions-Umsätze gemessen, wie in Tab. 10 aufgelistet.

Die Salze wurden in hochreiner Form eingesetzt (Reinheitsangabe in Klammern) mit: Tris-Puffer (99.9%), NaCl (99.999%), MgCl₂ (≥ 99%), MnCl₂ (99.99%) und CdCl₂ (99.999%). Die maximale Kontamination in der Reaktionslösung mit 300 mM NaCl, ohne divalente Ionen betrug laut Herstellerangaben maximal für Mg²⁺-Ionen 1.5*10⁻⁶ µM, für Mn²⁺-Ionen 1.5*10⁻⁶ µM und für Cd²⁺-Ionen 1.3*10⁻⁷ µM.

Tab. 10: Photometrischer Assay zur Bestimmung der Ribozym-Aktivität in Abhängigkeit divalenter Ionen

Komponente	[µL]	Finale Konzentration
Tris-Puffer pH 7.4 (300 mM)	1	30 mM
NaCl (3 M)	1	300 mM
Mg ²⁺ /Mn ²⁺ /Cd ²⁺ - Cl ₂ ⁻	variabel	0 – 80 mM
Ribozym (70 µM)	1	7 µM
AHEG (500 µM)	2	100 µM
NPM in EtOH (10 mM)	1	1 mM
EtOH	1	10%
H ₂ O	aufgefüllt auf 10 µL	

Die Kinetiken wurden aus jeweils zwei Messwerten wie in Abschnitt 4.3 beschrieben berechnet.

Für die Titrationsversuche wurde eine Lösung von 35, 42 oder 49 µM Cd²⁺-Ionen vorgelegt und anschließend 4000 µM Mg²⁺- oder 400 µM Mn²⁺-Ionen zugegeben. Die weitere Durchführung und Auswertung erfolgte analog wie in 4.3 beschrieben.

4.5 UV/VIS-Spektroskopie: Bestimmung der Produkt-Inhibition

Die UV/VIS-spektroskopische Bestimmung der Produkt-Inhibition wurde analog zur UV/VIS-spektroskopischen Methode zur Aktivitätsbestimmung des Ribozyms, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, durchgeführt.

Zur Ermittlung des Einflusses der H-Brücken-Bindungen zwischen Ribozym und Diels-Alder-Produkt auf die Produkt-Inhibition wurden Diels-Alder-Produkte in unterschiedlichen Konzentrationen zur Aktivitätsbestimmung für eine Doppelmutante mit zerstörten relevanten H-Brücken zwischen dem 49mer Ribozym (Nukleotid-Positionen 9 und 17) und Diels-Alder-Produkt durch die Modifikationen von U17dU und G9Pu im Vergleich zur Produkt-Inhibition des Wildtyps eingesetzt.

4.5.1 Reaktion mit Substraten und Diels-Alder Produkten

Um die Produkt-Inhibition der Doppelmutante mit der im gelelektrophoretischen Assay zuvor bestimmten geringen relativen Aktivität von 5% in Bezug auf die Wildtyp-Aktivität untersuchen zu können und um das Konzentrationsverhältnis von Ribozym zu Substraten zu erhöhen, wurde die *n*-Pentylmaleimid-Konzentration auf 500 μM halbiert und die Ribozym-Konzentration der Doppelmutante 4-fach erhöht. Beide Ribozyme wurden als 49mer Einstrangsequenzen mit freien Substraten zur Reaktion mit multipltem Umsatz verwendet. Puffer- und Ionen-Konzentrationen wurden analog zu den für das Wildtyp-Ribozym beschriebenen optimalen Standardbedingungen eingesetzt.⁽⁹³⁾ Das Diels-Alder-Produkt DA1 aus AHEG und NPM als racemisches Gemisch und das Produkt DA2 aus Anthracen und Maleimidocaprinsäure als achirales Produkt wurden in Konzentrationen bis zur jeweiligen ermittelten Löslichkeitsgrenze zugesetzt. Einen Überblick über die Komponenten und deren finale Konzentrationen gibt Tab. 11.

Finale Konzentrationen der zugesetzten Diels-Alder-Produkte im Assay:

DA1: 0 – 2 – 5 – 10 – 20 – 30 – 50 – 100 – 200 [μM]

DA2: 0 – 2 – 5 – 10 – 20 – 30 – 50 – 100 – 200 – 300 – 500 [μM]

Tab. 11: Photometrischer Assay zur Bestimmung der Produkt-Inhibition

Komponente	[μL]	Finale Konzentration
Tris-Puffer pH 7.4 (10x)	1	30 mM
NaCl (3 M)	1	300 mM
MgCl ₂ (800 mM)	1	80 mM
Ribozyme		
• Wt (70 μM)	1	7 μM
• G9Pu+U17dU (140 μM)	2	28 μM
AHEG (500 μM)	2	100 μM
Diels-Alder-Produkte in EtOH	variabel	0 μM – 500 μM
NPM in 50% EtOH (5 mM)	1	500 μM
EtOH	variabel	10%
H ₂ O	auf 10 μL aufgefüllt	

Die Messung der Absorption bei 365 nm zur Bestimmung der Abnahme des Anthracen-Substrats erfolgte bei Raumtemperatur für die Doppelmutante über 60 min und für den Wildtyp über 20 min in mit Pipettenspitzen verschlossenen Küvetten unter derselben wie in Kapitel 4.3 beschriebenen Vorgehensweise. Es wurden jeweils Triplikatmessungen für beide Ribozyme in Abhängigkeit je eines Diels-Alder-Produkts durchgeführt. Die Bestimmung der unkatalysierten Hintergrundreaktionen erfolgte analog, allerdings ohne Ribozym in der Reaktionslösung.

4.5.2 Auswertung

Aus den ersten 5% des linearen Reaktionsumsatzes von AHEG wurde die Anfangsgeschwindigkeit $v_{\text{ini}} [\text{M s}^{-1}]$ ermittelt und daraus die Geschwindigkeitskonstante $k [\text{M}^{-1} \text{h}^{-1}]$ der Reaktion zweiter Ordnung berechnet.

Berechnung der Geschwindigkeitskonstante:

Aus der Absorptionsabnahme (Abs) von 0-5% wurde $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ als Differenz von katalysierter und unkatalysierter Reaktion bestimmt.

Die Kalibriergerade für AHEG wurde im Bereich der Absorption von 0.1-1.0 [Abs] ermittelt und die nachfolgende Gleichung erstellt.⁴⁵

$$y[\text{Abs}] = 0.00722x[\mu\text{M}] - 0.0041$$

Die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit v_{ini} [M h^{-1}] aus $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ und der Kalibriergeraden:

$$v_{ini} [\text{M h}^{-1}] = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} + 0.0041}{0.00722} \times 6 \cdot 10^{-5}$$

Der Faktor $6 \cdot 10^{-5}$ beinhaltet die Umrechnung der Einheiten von $[\mu\text{M}]$ in $[\text{M}]$ und $[\text{min}^{-1}]$ in $[\text{h}^{-1}]$.

Die Geschwindigkeitskonstante k [$\text{M}^{-1} \text{h}^{-1}$] berechnete sich als Reaktion zweiter Ordnung mit den Substratkonzentrationen in $[\text{M}]$.

$$k [\text{M}^{-1} \text{h}^{-1}] = \frac{v_{ini} [\text{M}^{-1} \text{h}^{-1}]}{0.0001 \times 0.0005 [\text{M}^2]}$$

Aus der Auftragung von k [$\text{M}^{-1} \text{h}^{-1}$] gegen die Konzentration des Diels-Alder-Produkts $[\mu\text{M}]$ für Triplikatbestimmungen wurde mit einem „Logistic Fit“ die mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50} $[\mu\text{M}]$ ermittelt.

4.6 Gelelektrophoretischer Assay

Die Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten der Bildung von Diels-Alder-Produkt kann UV/VIS-spektroskopisch, wie in Abschnitt 4.3, oder als gelelektrophoretischer Assay, wie in *Keiper et al.*⁽⁶⁰⁾ beschrieben, durchgeführt werden. Insbesondere zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten mehrfacher Modifikationen in derselben Ribozym-Sequenz ist der gelelektrophoretische Assay wegen der Verwendung des Dreistrang-Ribozyms (Sequenz siehe Abb. 7(B)) bevorzugt geeignet. Neben der vereinfachten Kombination modifizierter Sequenzen ist die hohe Sensitivität aufgrund radioaktiver Markierung ein entscheidender Vorteil dieser Methode.

⁴⁵ Kalibriergerade erstellt von Dr. Roberto Fiammengo, unpubliziert

Außerdem sind hohe Reaktionszeiten ohne Einstrahlung von UV/VIS-Licht bei konstanter Temperatur unter Schütteln im Vergleich zum UV/VIS-spektroskopischen Assay möglich. Ein methodischer Nachteil, aufgrund der erforderlichen gelelektrophoretischen Trennung von Substrat und Produkt, ist die ausschließliche Verwendbarkeit von Anthracensubstrat, das über einen Linker an das Ribozym gebunden ist und somit die Anwendbarkeit auf Reaktionen mit einfachem Reaktionsumsatz begrenzt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Modifikationen zur Störung der Wechselwirkungen mit Diels-Alder-Produkt auf die katalytische Aktivität bestimmt. Modifikationen erfolgten an Position G9 durch Substitution mit ribo-Purin, ribo-2-Aminopurin und ribo-Inosin und durch Substitution von U17 durch desoxy-U17 in Kombination aus Einzel- und Doppelmutanten. Das Prinzip des Assays beruht auf radioaktiver Markierung des 10mers mit linkergebundenem AHEG, der Hybridisierung der drei Sequenzen zum Ribozym und der Reaktion mit der Maleimid-Komponente unter definierter Reaktionszeit. 10mer-Produkt wird gelelektrophoretisch von nicht-reagiertem 10mer-AHEG getrennt und über radioaktive Markierung detektiert und quantifiziert. Zur Kontrolle von Intensitätsabweichungen durch den Reaktions- und Trennungsprozess wurde ein radioaktiv markierter interner Standard (24mer DNA) zugesetzt. Die Anfangsgeschwindigkeit wurde über die ersten 15% Reaktionsumsatz ermittelt und die Aktivität im Vergleich zur Wildtyp-Aktivität in [%] bestimmt. Um in der gelelektrophoretischen Trennung eine ausreichend große Trennung von 10mer-AHEG und 10mer-Produkt zu erhalten, wurde Biotinmaleimid als Substrat eingesetzt.

4.6.1 3'-radioaktive Markierung des 10mer-AHEGs durch Ligation

Die radioaktive Markierung mit ^{32}P erfolgte als 3'-Markierung durch Ligation mit ^{32}P -pCp, womit das 10mer-AHEG somit am 3'-Ende um ein C auf ein 11mer-AHEG verlängert wurde, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben. Zur anschließenden Berechnung der Menge des markierten Oligonukleotids wurden die Konzentrationen an Oligonukleotid und ^{32}P -pCp im Verhältnis 1:1 gewählt, analog der Übersicht der 3'-Markierungsreaktion in Tab. 7. Die weitere Aufreinigung erfolgte wie in Abschnitt 4.2.3 mit nachfolgend beschriebenen Änderungen.

Zur Verbesserung an Ausbeute und Reinheit der markierten Sequenz wurde ein Zweiphasengel PAGE-Gel mit 20%igem im oberen und 10%igem PAGE-Gel im unteren Gel-Abschnitt verwendet.

Um die Ausbeute der Fällung des sehr kurzen 11mer-AHEGs zu maximieren wurden 100 µg tRNA zugesetzt, deren Zusatz die katalytischen Eigenschaften des Ribozyms nicht beeinflusste, wie Untersuchungen zuvor in⁽⁶²⁾ gezeigt hatten.

5'-radioaktive Markierung des internen Standards

Die als interner Standard verwendete 24mer DNA-Sequenz (IBA) mit nachfolgender Sequenz wurde zur Detektion am 5'-Ende, analog Abschnitt 4.2.2, radioaktiv markiert und aufgearbeitet.

24mer DNA-Sequenz als interner Standard:

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

4.6.2 Reaktion mit Substraten

Die katalysierte Reaktion mit Biotinmaleimid wurde wie in Tab. 12 aufgelistet durchgeführt. Zur Bestimmung der unkatalysierten Hintergrundreaktion erfolgte die Durchführung analog, allerdings ohne Zusatz von 24- und 18mer.

Verwendet wurden folgende Oligonukleotid-Sequenzen in Kombination mit dem radioaktiv markierten 11mer-AHEG, deren Sequenzen in Abschnitt 4.2.1 aufgelistet sind.

18mer:

- Wildtyp
- 18mer mit desoxyU in Position 17

24mer:

- Wildtyp
- 24mer mit rPurin (Pu) in Position 9
- 24mer mit rInosin (Ino) in Position 9
- 24mer mit 2-Amino-Purin (2AP) in Position 9

Um RNA-Verluste durch Adsorption an die Gefäßwände zu verhindern wurde zum Reaktionsansatz *n*-Dodecyl-β-D-Maltosid als nichtionisches Detergenz hinzugefügt, das keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität aufwies (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Nukleotid-Sequenzen wurden, wie in unserem Labor als optimales Verhältnis etabliert⁽⁶⁰⁾, im Konzentrationsverhältnis 11mer-AHEG : 18mer : 24mer von 1 : 1000 : 500 eingesetzt.

Tab. 12: Reaktionsschema des gelelektrophoretischen Assays

Komponente	[μL]	Finale Konzentration
11 mer-AHEG (10 fmol/ μL)	5.0	1 nM
18mer (10 pmol/ μL)	5.0	1 μM
24mer (5 pmol/ μL)	5.0	500 nM
Tris-NaCl pH 7.4	5.0	30 mM
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-Maltosid	5.0	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
H ₂ O	14	
----- 65°C für 2.0 min, abkühlen auf 20 °C innerhalb von 20 min -----		
Interner Standard (ISTD) (2 pmol/ μL)	1.0	40 nM
MgCl ₂	5.0	80 mM
Reaktionszeit t = 0 min:	4.5 μL Reaktionslösung in Stopmix + 0.5 μL Biotinmaleimid-Lösung	
Reaktionsansatz für t > 0 min:		
Biotinmaleimid (250 μM in DMSO // 1/5 in H ₂ O)*	4.5	5 μM
Gesamtvolumen: 50 μL Reaktionslösung in 2% DMSO		

* Die 50 μM Biotinmaleimid-Lösung in 20% DMSO / 80% H₂O wurde frisch aus der 250 μM Stammlösung (in wasserfreiem DMSO) hergestellt und sofort eingesetzt.

Nach definierter Reaktionszeit erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit einer denaturierend wirkenden Lösung, dem „Stopmix“. Das enthaltene β -Mercaptoethanol reagiert dabei in einer Michael-Addition mit der Doppelbindung des Maleimids und inaktivierte somit das noch vorhandene Maleimid. Zur Zusammensetzung des Stopmix, siehe Tab. 13.

5 μL Reaktionslösung wurden in 10 μL Stopmix gegeben.

Tab. 13: Zusammensetzung des Stopmix.

Komponente	[μ L]	Finale Konzentration
Formamid	78	78%
Na ₂ EDTA (100 mM)	19	19 mM
β -Mercaptoethanol	1.0	1%
Farbmarker*	2.0	2%
Final	100	

* Farbmarker bestehend aus: 0.5% Xylencyanol FF, 0.05% Bromphenolblau und 50% Formamid in 1x TBE-Puffer.

Die Reaktionszeit-Schemata wurden anhand der katalytischen Reaktivität der jeweiligen Sequenzen zur Auswertung der ersten 15% Reaktionsumsatz festgelegt, siehe Tab. 14.

Tab. 14: Reaktionszeitschema für Wildtyp-Ribozym, Einzel- und Doppelmutanten und die unkatalysierte Hintergrundreaktion. dU17: desoxyU, Pu9: Purin, Ino: Inosin, 2AP: 2-Amino-Purin. 9 und 17 gibt die jeweilige Position der Modifikation an.

Modifikation	t [min]
Wildtyp-Ribozym	0 / 0.5 / 1 / 1.5 / 2 / 2.5 / 5 / 60
dU17	0 / 1 / 2 / 4 / 6 / 8 / 10 / 60
Pu9	0 / 4 / 8 / 12 / 16 / 20 / 24 / 60
Ino9	0 / 2 / 4 / 6 / 8 / 10 / 12 / 60
2AP9	0 / 5 / 10 / 15 / 20 / 25 / 30 / 60
Pu9 + dU17	0 / 10 / 20 / 30 / 45 / 60 / 120
Ino9 + dU17	0 / 10 / 20 / 30 / 45 / 60 / 120
2AP9 + dU17	0 / 10 / 20 / 30 / 45 / 60 / 120
unkatalysiert	0 / 270 / 390 / 510 / 1590

4.6.3 Trennung und Auswertung von Edukt und Produkt

Alle Reaktionen wurden als Triplikat durchgeführt.

Die abgestoppten Reaktionslösungen wurden über ein 20%iges, denaturierendes PAGE-Gel in 11mer-Produkt und nicht-reagiertes 11mer-AHEG getrennt und die Banden durch Radiographie, analog zu Abschnitt 4.2.3, detektiert.

Zur quantitativen Auswertung wurde für jede Reaktion ein Linienchromatogramm aus der Intensität („Counts“) erstellt und die Quantifizierung durch Integration der Peaks im Chromatogramm durchgeführt, wie in nachfolgender Abb. 55 dargestellt.

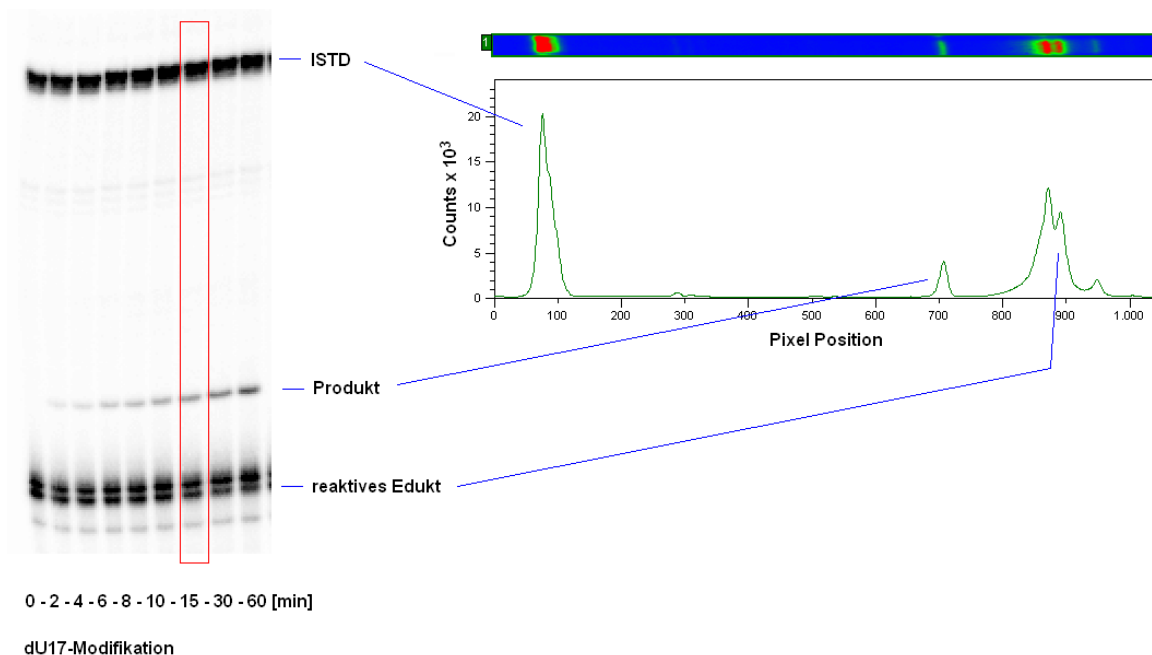


Abb. 55: Auswertung des gelelectrophoretischen Assays. Linke Seite: PAGE-Gel mit Trennung von Produkt und Edukt für die dU17-Modifikation mit den Reaktionszeiten 0-60 min, ISTD interner Standard als Kontrolle. Bande oberhalb des reaktiven Edukt: unreaktive Nebenbande. Die rechte Seite zeigt das Linienchromatogramm für die links rot eingerahmte Bandenspur (dU17 für 15 min Reaktionszeit) zur Quantifizierung mittels Integration der einzelnen Banden im Linienchromatogramm.

Aus den ersten 15% Reaktionsumsatz der Reaktion pseudo-erster Ordnung wurde aus dem Verhältnis von Produkt zur Summe aus Produkt und Edukt eine Geradengleichung erstellt und aus der Steigung die Anfangsgeschwindigkeit v_{ini} [%/min] ermittelt. Die Auftragung der Reaktionsumsätze gegen die Zeit und die Geradengleichungen für die Einzelmutanten und das Wildtyp-Ribozym, zeigt Abb. 56. Die Bestimmung der Doppelmutanten erfolgte analog.

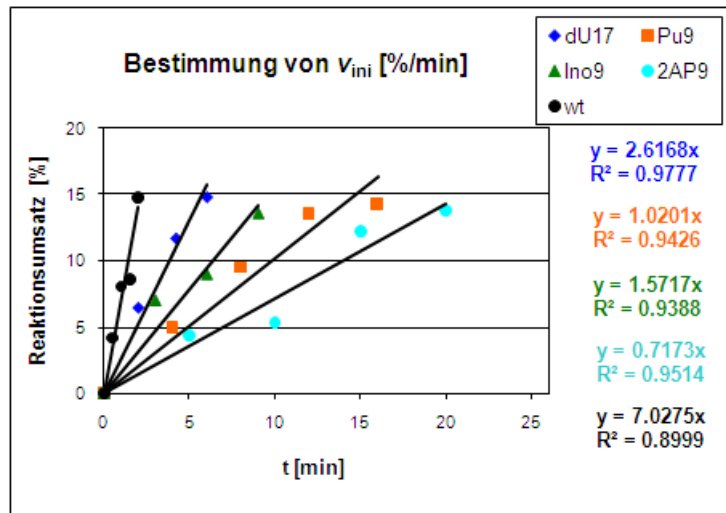


Abb. 56: Auftragung des Reaktionsumsatzes [%] für die Einzelmutanten und das Wildtyp-Ribozym berechnet aus dem Verhältnis von Produkt/(Produkt + Edukt) gegen die Zeit t [min] aus Einzelbestimmungen. Die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit v_{ini} [%/min] erfolgte aus den ermittelten Geradengleichungen.

Die Anfangsgeschwindigkeit v_{ini} [%/min] wurde aus dem Verhältnis von Produkt/(Produkt + Edukt) bestimmt. Die relative Aktivität der Mutante, bezogen auf die Wildtypaktivität von 100%, berechnete sich aus dem Aktivitäts-Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeiten der Mutanten zum Wildtyp. Die Reaktionsbeschleunigung der ribozym-katalysierten Reaktion errechnete sich aus dem Quotient von v_{ini} [%/min] von katalysierter - zu unkatalysierter Reaktion.

$$\text{Anfangsgeschwindigkeit } v_{ini} \text{ [\%/min]} = \frac{\text{Intensität Produkt}}{\text{Intensität (Produkt + Edukt)}}$$

$$\text{relative Aktivität [\%]} = \frac{v_{ini} \text{ Mutante [\%/min]}}{v_{ini} \text{ Wildtyp [\%/min]}} \cdot 100 \text{ [\%]}$$

$$\text{Reaktionsbeschleunigung} = \frac{v_{ini} \text{ katalysierte Reaktion [\%/min]}}{v_{ini} \text{ unkatalysierte Reaktion [\%/min]}}$$

Die Werte der relativen Aktivität [%] wurden zur Elimination von Ausreißern einem Ausreißertest nach Nalimov mit 95% Signifikanzniveau unterzogen.⁽¹⁸⁸⁾ Voraussetzung ist eine normalverteilte Stichprobe mit ≥ 3 Messwerten. Aus dem Stichprobenmittelwert (\bar{x}) und der Standardabweichung (s) der Stichprobe wird die Prüfgröße (PG) nach folgender Formel ermittelt:

$$PG = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

Mit: PG: Prüfgröße, x^* : zu prüfender Wert, \bar{x} : Stichprobenmittelwert, s : Standardabweichung, n : Anzahl der Messungen.

Falls der Prüfgrößenwert Tabellenwerte für das Signifikanzniveau von 95% überstieg, wurde der Wert als wahrscheinlicher Ausreißer angenommen und in der Auswertung nicht berücksichtigt.

4.7 Chemisches Probing mit Pb^{2+} -Ionen

Zur Untersuchung der strukturellen Relevanz der Interaktion zwischen dem exocyclischen 4-NH₂ des C10 und dem Carbonyl-Sauerstoff 2-O des U17 und der Auswirkung deren Störung wurde das chemische Probing mit Pb(II)-Acetat durchgeführt. Zur Bewertung des Einflusses der Mg²⁺-Ionen und des Diels-Alder-Produktes auf die Stabilität im Vergleich von intakter und gestörter Interaktion, erfolgte die Probing-Reaktion unter Variation der Mg²⁺-Ionen Konzentration und in An- und Abwesenheit von Diels-Alder-Produkt (aus AHEG und NPM, Molekül 18, Abb. 12).

Zur Störung der Interaktionen wurden modifizierte 49mer Ribozym-Sequenzen mit Substitution von Position U17 mit C17 und isoC17 eingesetzt und das Probing parallel zur 49mer Wildtyp-Sequenz durchgeführt. Für die Sequenzen: siehe in 4.2.1.

Die Durchführung erfolgte analog einer in unserem Labor^(60, 163) für das 49mer Wildtyp-Ribozym etablierten Methode. Optimiert wurden daraus, im Rahmen dieser Arbeit, das Konzentrations-Verhältnis von radioaktiv markiertem 49mer Ribozym zu tRNA, die Pb(II)-Acetat-Konzentration, die Temperatur und die Reaktionszeit.

Die Bedingungen werden so gewählt, dass statistisch weniger als eine Spaltung pro Molekül auftrat.⁽⁹⁵⁾

4.7.1 5'-radioaktive Markierung der RNA durch Kinasierung

Zur Detektion der einzelnen Nukleotid-Banden im chemischen Probing mit Pb^{2+} -Ionen wurden die 49mer Ribozyme am 5'-Terminus mit ^{32}P radioaktiv wie unter Abschnitt 4.2.2 beschrieben, markiert. Alle drei 49mer Sequenzen wurden über jeweils zwei PAGE-Gele zur Abtrennung von γ - ^{32}P -ATP, Nebenreaktionsprodukten und Verunreinigungen aus der Oligonukleotidsynthese aufgetrennt. Die Sequenzbanden wurden jeweils eng begrenzt ausgeschnitten.

4.7.2 Spaltungsreaktion mit Pb^{2+} -Ionen und Trennung der Reaktionsprodukte

Die 5'-markierte RNA mit 50000 cpm pro Ansatz, einer RNA-Menge im fmol-Bereich entsprechend, wurde durch nicht radioaktiv markierten tRNA-Zusatz auf eine RNA-Gesamtmenge von 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ eingestellt, die Lösung für 2 min auf 60 °C erwärmt und zur Renaturierung unter Schütteln innerhalb von 20 min auf 20 °C abgekühlt.

In diese RNA-Lösung erfolgte dann die Zugabe in finaler Konzentration von: 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 40 mM NaCl, 0-10 mM $MgCl_2$, in An- oder Abwesenheit von 1 mM Diels-Alder-Produkt und 5% Ethanol. Die eigentliche Probing-Reaktion wurde durch Addition einer frisch hergestellten 0.75 mM Pb(II)-Acetat-Lösung und Inkubation bei 20 °C im Thermoschüttler über 45 min durchgeführt. Die Bedingungen wurden, wie in der Literatur von Brunel *et al.*⁽⁹⁵⁾ beschrieben, so gewählt, dass statistisch weniger als eine Spaltung pro Molekül auftrat.

Der Reaktionsstopp erfolgte mit einer 1:1 Mischung aus 7 M Harnstoff, Bromphenolblau und Xylencyanol in 10 mM EDTA („Pb-Stop-Lösung“). Die cpm der Probenlösungen wurden, wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, bestimmt und auf die gleiche cpm-Konzentration gebracht. Zur Reaktionskontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne Pb^{2+} -Ionen unter denselben Bedingungen parallel durchgeführt. Die elektrophoretische Trennung der Sequenzen erfolgte mit einem analytischen 15%igen denaturierenden PAGE-Gel bei 60 W über 3 h.

4.7.3 Identifizierung der Nukleotidpositionen: Ribonuklease T1 Leiter und alkalische Hydrolyseleiter

Die Zuordnung der Ribozym-Spaltprodukte auf dem PAGE-Gel erfolgte parallel durch Auftragung von RNA-Spaltprodukten als Sequenzleitern aus 49mer Wildtyp-RNA nach einer alkalischen Hydrolyse und limitierter RNase T1 Reaktion. Bei der alkalischen Hydrolyse tritt die Spaltung statistisch in der gesamten Oligonukleotidsequenz auf und erzeugt somit eine Bandenleiter mit der Differenz je eines Nukleotids. Die RNase T1 spaltet spezifisch Phosphordiesterbindungen an der 3'-Position von Guanodinukleotiden und ergibt somit eine „Guanodin-Leiter“. Für beide Leitern wurden die Bedingungen so gewählt, dass die Sequenz statistisch nur jeweils einmal gespalten wird.⁽¹⁸³⁻¹⁸⁴⁾

Für die alkalische Hydrolyseleiter wurden 2 pmol radioaktiv markierte RNA mit 1 µg/µL tRNA versetzt, die Reaktion mit 40 mM Natriumhydrogencarbonat in 10 µL Reaktionlösung bei 90 °C für 7 min inkubiert und die Hydrolyse mit Zugabe von „Pb-Stop-Lösung“ im Verhältnis 1:1 unter Eiskühlung gestoppt.

Die Sequenzleiter aus limitierter RNase T1-Spaltung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in 8 µL Puffer aus 12.5 mM Natriumcitrat, 0.5 mM EDTA und 3.5 mM Harnstoff, mit 2 pmol radioaktiv-markierter RNA und 1 µg/µL tRNA in 10 µL Lösung. Diese Lösung wurde für 10 min auf 55 °C erwärmt, die Spaltung mit 2 µL 0.05 U RNase T1 gestartet, für 10 min auf 55 °C inkubiert und die Reaktion analog der alkalischen Hydrolyse unter Zugabe von „Pb-Stop-Lösung“ im Verhältnis 1:1 gestoppt.

4.7.4 Analyse der Probing-Muster auf Sequenziergelen

Die Detektion der Banden erfolgte mittels Radiographie mit dem Phosphorimager, analog dem Abschnitt 4.2.3. Durch Vergleich zu den Leitern wurden die Probing-Banden Nukleotid-Positionen zugeordnet. Die Auswertung erfolgte qualitativ durch Vergleich der Bandenmuster und Intensitäten der beiden modifizierten 49mer Sequenzen im Vergleich zum Wildtyp-Ribozym. Verglichen wurden die Bandenmuster in Abhängigkeit der Mg²⁺-Ionen Konzentration und der An- und Abwesenheit von Diels-Alder-Produkt.

4.8 HPLC-Methode

Zur quantitativen Analyse der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion wurde die HPLC-Methode, wegen der getrennten Bestimmung der AHEG-Abnahme und Produkt-Zunahme gegenüber der UV/VIS-spektroskopischen Untersuchung, in der nur die AHEG-Abnahme untersucht werden kann, angewendet. Der Dioden-Array-Detektor zur Aufzeichnung des kompletten Absorptionsspektrums über die Zeit ermöglichte die eindeutige Zuordnung der Peaks zu einzelnen Komponenten. Ein Nachteil der HPLC-Methode ist der 10-fach erhöhte Probenbedarf im Vergleich zu dem UV/VIS-spektroskopischen Assay. Die ribozym-katalysierte und unkatalysierte Diels-Alder-Reaktion wurde nach definierten Reaktionszeiten mit einer β -Mercaptoethanol Lösung gestoppt und getrennt analysiert. Das β -Mercaptoethanol reagiert in einer Michael-Addition mit der Doppelbindung des Maleimid und verhindert somit die weitere Diels-Alder-Reaktion.

HPLC-Methode

- Anlage: Agilent 1100 Series, DAD-Detektor, aufgezeichnet: 210 nm, 254 nm, 365 nm
- Säule: Luna C18-Umkehrphasensäule 250*4.6 mm, 5 μ m Partikelgröße (Phenomenex)
- Säulentemperatur: 25°C
- Injektion: 90 μ L aus 100 μ L Lösung
- Flußrate: 1.0 mL/min
- Eluent: H₂O/CH₃CN, Lösungsmittel mit HPLC Reinheitsgrad, Reinst-Wasser

4.8.1 Reaktion mit Substrat

Der HPLC-Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Quantifizierung der AHEG-Abnahme und der Produkt-Zunahme der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion eingesetzt. Die Durchführung wurde aus Stuhlmann *et al.*⁽⁹³⁾ adaptiert und modifiziert. Die Zusammensetzung des katalysierten Assays ist in Tab. 15 aufgelistet. Die Durchführung der unkatalysierten Hintergrundreaktion erfolgte analog der katalysierten Reaktion, aber unter Substitution der RNA-Komponente durch H₂O.

Tab. 15: HPLC-Assay zur Quantifizierung der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion.

Komponente	[μL]	Finale Konzentration
Tris-Puffer pH 7.4 (20x)	3.5	30 mM
NaCl (3 M)	7.0	300 mM
MgCl ₂ (0 - 800 mM)	variabel	0 - 80 mM
Ribozym (140 μM)	3.5	7 μM
AHEG (500 μM)	14.0	100 μM
NPM (10 mM)	7.0	1 mM
EtOH	variabel	10%
H ₂ O	auf 70 μL aufgefüllt	

Nach unterschiedlichen Reaktionszeiten wurde die Reaktionslösung zu 20 μL Stopplösung (Stopplösung: 25% β -Mercaptoethanol in 7.5% EtOH und 67.5% H₂O, adaptiert aus Schlatterer⁽¹⁸⁹⁾) gegeben, das Reaktionsgefäß mit 10 μL EtOH gespült und 90 μL der vereinigten Lösung in die HPLC injiziert.

Der Reaktionsstopp erfolgte nach den folgenden Reaktionszeiten:

Reaktionszeiten: 0 – 0.5 – 1.0 – 1.5 – 2.0 – 2.5 – 3.5 – 5.0 - 7.5 – 10 [min]

4.8.2 Trennung der Moleküle

Die Trennung von freiem AHEG und Diels-Alder-Produkt erfolgte mit dem Eluentensystem: H₂O/Acetonitril (48/52 v/v) als Eluent bei einer Flußrate von 1 mL/min mit der Säulentemperatur von 25°C. Die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) bei 254 nm und 365 nm (AHEG) und 210 nm (Diels-Alder-Produkt). Die Quantifizierung des AHEGs erfolgte bei 365 nm.

4.8.3 Analyse und Auswertung

Aus den ersten 5% Reaktionsumsatz wurde über die Kalibriergerade für AHEG und DA-Produkt, Abb. 57, die Anfangsgeschwindigkeit v_{ini} [M s^{-1}] und die Geschwindigkeitskonstante k [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] ermittelt. Für die katalysierte Reaktion wurde $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ als Differenz von katalysierter zu unkatalysierter Reaktion bestimmt und zur Berechnung eingesetzt.

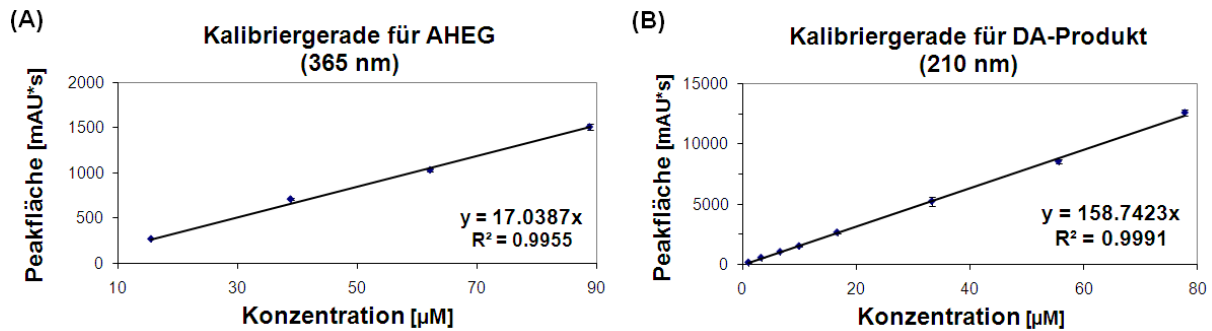


Abb. 57: Kalibriergeraden für AHEG und DA-Produkt (Diels-Alder-Produkt). (A): AHEG (365 nm). (B): DA-Produkt (210 nm). (A)+(B): Mittelwerte aus jeweils drei Einzelbestimmungen \pm Standardabweichung mit dem Schnittpunkt 0/0 aufgetragen, Formel und Bestimmtheitsmaß wurden aus der Trendlinie der Mittelwerte berechnet.

Die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit v_{ini} [$M s^{-1}$] aus der Differenz von $\Delta Abs/min$ und der Kalibriergeraden erfolgte mit folgender Formel:

$$v_{ini} [M s^{-1}] = \frac{\Delta Abs/min}{17.0387 \text{ für AHEG}; 158.7423 \text{ für DA - Produkt}} \cdot \frac{1}{6 \cdot 10^7}$$

Die Geschwindigkeitskonstanten k [$M^{-1} s^{-1}$] berechneten sich mit nachfolgender Formel und wurden als Mittelwerte aus Triplikatbestimmungen mit den Standardabweichungen gegen die Mg^{2+} -Ionen Konzentration aufgetragen.

$$k [M^{-1} s^{-1}] = \frac{v_{ini} [M^{-1} s^{-1}]}{0.0001 \times 0.0001 [M^2]}$$

4.9 LC-MS-Methode

Die LC-MS-Methode (LC: Serie 1200 von Agilent Technologies, MS: microTOFQ-II ESI von Bruker) wurde zur qualitativen Analyse der einzelnen Moleküle der ribozym-katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion als sensitive Methode eingesetzt. Zuerst wurde die LC-MS als Methode auf die Eignung zur Analyse der Diels-Alder-Reaktion und deren Edukte und Produkte getestet. Zur Trennung der Moleküle wurde ein geeigneter Gradient eines Eluentgemisches entwickelt und die Parameter der Ionisierung und Detektion in der MS-Einheit optimiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung nach möglichen Nebenreaktionen der einzelnen Moleküle, der unkatalysierten und der katalysierten Reaktion.

Um Auswirkungen von UV/VIS-Bestrahlung zu ermitteln, die in den UV/VIS-spektroskopischen Methoden auftreten könnten, wurden LC-MS-Analysen nach Bestrahlung der Reaktionslösungen durchgeführt. Alle LC-MS Untersuchungen erfolgten qualitativ, da die Diels-Alder-Reaktionen nicht durch Zusätze von β -Mercaptoethanol gestoppt wurden um Nebenreaktionen ausgelöst durch die Stopp-Lösung zu vermeiden.

4.9.1 HPLC-MS-Methode

HPLC-Methode

- Anlage: Agilent 1200 Series, Multiwellenlängen-Detektor, aufgezeichnet: 210 nm, 254 nm, 365 nm
- Säule: Kinetex C18-Umkehrphasen-Säule 2.6 μ m, 2.1 x 100 mm (Phenomenex)
- Säulentemperatur: 30°C
- Injektion: 10 μ L aus 20 μ L Lösung
- Flußrate: 0.2 mL/min
- Eluent: H₂O/CH₃CN + 0.1% HCOOH, Lösungsmittel mit LC-MS Reinheitsgrad, Reinst-Wasser

Tab. 16: HPLC-Gradient aus H₂O/CH₃CN + 0.1% HCOOH zur LC-MS-Analyse

t [min]	CH ₃ CN [%]
0	40
12.5	90
17.5	90
20	40
35	40

MS-Methode

Anlage: microTOFQ-II ESI (Bruker Daltonics), Messsoftware: MicroTOF control Version 3.0

Zur Aufnahme hochauflösender Massenspektren wurde ein interner Kalibrant aus Na-formiat 10 mM in 0.1% Ameisensäure in H₂O/i-PrOH (Isopropanol) (50/50 v/v) eingesetzt, welcher jeweils zu Beginn eines LC-Laufes injiziert wurde. Die interne Kalibrierung erfolgte im „quadratic mode“. Die Parameter der MS für die LC-MS-Analyse wurden auf nachfolgende Werte, siehe Tab. 17 gesetzt.

Tab. 17: MS-Parameter zur LC-MS-Analyse

MS-Parameter			
Scan (m/z)	50 – 1200 m/z	Funnel 1 RF + Funnel 2 RF	200.0 Vpp
Ion Polarity	Positiv	Hexapole RF	100.0 Vpp
Capillary	4500 V	Ion Energy	3.0 eV
End Plate Offset	-500 V	Low Mass	100.00 m/z
Collision Cell RF	150.0 Vpp	Collision Energy	8.0 eV
Nebulizer	1.2 bar	Collision RF	100.0 Vpp
Dry Temp	190 °C	Transfer Time	70.0 µs
Dry Gas	8.0 L/min	Pre Puls Storage	5.0 µs

Die Auswertung wurde mit der Software Hyphenation Star PP (Version 3.2.44.0), DataAnalysis (Version 4.0, SP4) und MetaboliteDetect (Version 2.0 SR1) von Bruker Daltonics durchgeführt:

4.9.2 Analyse der einzelnen Edukte und Produkte

Allgemein

AHEG, NPM und das Diels-Alder-Produkt wurden unter denselben Assay-Bedingungen wie die katalysierte Reaktion jeweils als Einzelkomponenten eingesetzt, siehe Tab. 18.

Tab. 18: LC-MS Assay zur Analyse der einzelnen Edukte und Produkte.

Komponente	[μL]	Finale Konzentration
Tris-Puffer pH 7.4 (10x)	2	30 mM
NaCl (3 M)	2	300 mM
MgCl ₂ (800 mM)	2	80 mM
AHEG (500 μM)	4	100 μM
NPM (10 mM, EtOH)	2	1 mM
Diels-Alder-Produkt (1 mM, EtOH)	2	100 μM
EtOH	variabel	10%
H ₂ O	auf 20 μL aufgefüllt	

Die Zeitspanne nach pipettieren der Reaktionslösungen bis zur Injektion wurde gemessen. Injiziert wurden 10 μL aus 20 μL Lösung. Zur Erhöhung der Analysenkonzentration wurden die Reaktionsansätze und Injektionsvolumen [μL] entsprechend erhöht.

Analyse des *N*-Pentylmaleimid \pm β -Mercaptoethanol

Zur Analyse der detektierten NPM-Addukte wurden Analysen in An- und Abwesenheit von β -Mercaptoethanol (final 21.4 mM) im Verhältnis von β -Mercaptoethanol (5 mM / 1 mM) : NPM zu 4.3 : 1 und 21 : 1 zur differenzierten Analyse der jeweiligen Addukt-Bildung durchgeführt, siehe Tab. 19. Als Referenz wurde β -Mercaptoethanol im Assay ohne NPM injiziert.

Tab. 19: LC-MS Assay zur Analyse von *N*-Pentylmaleimid-Addukten.

Komponente	NPM 1 mM / 5 mM ± β-Mercaptoethanol [μL]	Finale Konzentration
Tris-Puffer pH 7.4 (10x)	4	30 mM
NaCl (3 M)	4	300 mM
MgCl ₂ (800 mM)	4	80 mM
NPM (10 mM / 50 mM in EtOH)	4	100 μM
β-Mercaptoethanol (1% in H ₂ O/EtOH 89/10%)	± 3.5	0.15%
H ₂ O	+: auf 23.5 μL aufgefüllt -: auf 20 μL aufgefüllt	

Injiziert wurden von NPM ohne β-Mercaptoethanol: 10 μL aus 20 μL und von NPM + β-Mercaptoethanol 11.76 μL.

4.9.3 Analyse von katalysierter und unkatalysierter Diels-Alder-Reaktion

Die ribozym-katalysierte und unkatalysierte Diels-Alder-Reaktionen wurden unter Standard-Assay Bedingungen, wie im UV/VIS-spektroskopischen Assay, durchgeführt, siehe Tab. 20. Die Reaktionen wurden nicht abgestoppt, bis zur LC-MS-Analyse dunkel bei Raumtemperatur aufbewahrt und die Reaktionszeit jeweils konstant gehalten. Injiziert wurden 10 μL aus 20 μL oder 20 μL aus 30 μL Reaktionslösung.

Tab. 20: LC-MS Assay zur Analyse von katalysierter und unkatalysierter Diels-Alder-Reaktion.

Komponente	kat* [μL]	unkat* [μL]	Finale Konzentration
Tris-Puffer pH 7.4 (10x)	3	3	30 mM
NaCl (3 M)	3	3	300 mM
MgCl ₂ (800 mM)	3	3	80 mM
49mer RNA (57 μM)	2.45	-	7 μM
AHEG (500 μM)	6	6	100 μM
NPM (10 mM in EtOH)	3	3	1 mM
EtOH	-	-	10%
H ₂ O	auf 30 μL aufgefüllt		

*: kat: katalysiert; unkat: unkatalysiert

4.9.4 UV-Bestrahlung

Die UV-Bestrahlung bei 254 nm und 365 nm erfolgte jeweils mit den Reaktionslösungen der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion direkt nach Reaktionsstart durch Zugabe der NPM-Lösung. Bestrahlt wurde in geöffneten, silanisierten Reaktionsgefäßen (Carl Roth) bei Raumtemperatur von oben auf die Reaktionslösung über 120 min mit einer UV-Lampe (NU-8 KL, 8 W, Intensität: 680 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ bei 254 nm, 950 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ für 365 nm für 15 cm Abstand, Benda). Die Konzentrationen der Komponenten entsprachen den oben aufgeführten für die Analysen ohne Bestrahlung. Allerdings wurde die Menge der Reaktionslösungen zur Bestrahlung auf 40 μL erhöht und davon das entsprechende Aliquot injiziert.

4.9.5 Auswertung

Die Substraktion der Signale von Puffer und Ionen des Assay als TIC- (Totalionenstrom, „Total Ion Current“)-Chromatogramm erfolgte mit der Software MetaboliteDetect (Bruker Daltonics) aus separater Injektion von Puffer und Ionen. Zur Substraktion wurden die Settings in den „Options“, „Calculate Difference“ und „Detected Masses Dialog“ Parameter mit den Werten der nachfolgenden Tabelle 21 angewandt.

Tab. 21: Parameter zur Subtraktion der Hintergrund-Signale.

Parameter (MetaboliteDetect)			
Mass Width	0.01	Trace Width	± 0.01 m/z
Ratio	5.00	Delta RT (Sample-Diff)	0.2 min
Delta Time	± 0.5 min	Skim ratio	3.00
Delta Mass	± 0.5 m/z	Smoothing width	3
Interval	0.0-35 min	Mass Spectrum Parameters:	
Peak detection	Total ion	Intensity threshold (rel.)	10%
Peak detection mode	with Peak Integration	Max. Number of Peaks	16

Die m/z-Spektren der einzelnen MS-Peaks wurden in DataAnalysis angezeigt und ausgewertet.

Die Zuordnung der m/z-Signale zu Summenformeln von Molekül-Ionen erfolgte mit der „SmartFormula Manually“ Funktion im DataAnalysis Programm.

Normalisierung der Retentionszeiten

Verschiebungen der Retentionszeiten t [min] unterschiedlicher Analysen wurden durch Normalisierung der Retentionszeit angeglichen. Die Intensität des Totalionenstroms (TIC) wurde dadurch nicht verändert.

5. Anhang

5.1 Geräte und Software

Geräte

Elektrophorese	Amersham Biosciences, Electrophoresis Power Supply – EPS 3501 XL
Elektrophoresekammern	Gibco-BRL, S2; Armin Baak Labortechnik
HPLC-Anlage	Agilent Technologies, Serie 1100
Lyophilisator	Ismatec, VirTis
LC-MS-Anlage	LC: Agilent Technologies, Serie 1200 MS: Bruker, microTOFQ-II ESI
Massenspektrometer	Bruker, BIFLEX III (MALDI)
NMR-Spektroskopie	Varian, 300 MHz Mercury Plus
pH-Meter	Knick, Calimatic 765
Phosphorimager	GE Healthcare, Typhoon 9400, Image Eraser, Storage Phosphor Screen
Pipetten	Abimed, Labmate P2, P20, P200, P1000 Hamilton Bonaduz AG, Microliter™ Syringes 1, 25, 100, 500 [µL]
Reinst-Wasser-Anlage	Millipore, Milli-Q®, Synthesis A10
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein
Szintillationszähler	Beckman-Coulter, LS 6500
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer comfort
UV-Lampe (254+365 nm)	Benda, NU-8 KL
UV-VIS Spektrometer	Varian, Cary 50 und Cary 100 Bio; Peqlab, Nanodrop ND-1000; Amersham, Ultrospec 2100 pro
Vakuumzentrifuge	Eppendorf, Concentrator 5301
Waagen	Mettler Toledo, AX105 und AX204
Zentrifugen	Hettich, Mikro 120 und Mikro 200R

Software

Phosphorimager	Image Quant v5.2 (GE Healthcare Life Sciences)
HPLC	Agilent ChemStation Revision B01.01 (Agilent Technologies)
LC-MS	MicrOTOF control v3.0, DataAnalysis v4.0 SP4, Hyphenation Star PP v3.2.44.0, MetaboliteDetect v2.0 SR1 (Bruker Daltonics)
Literaturverwaltung	EndNote X4 (Thomson Scientific)
NMR	MestReC v4.9.9.9 (Mestrelab Research)
Spektren und Diagramme	Excel 2007, (Microsoft Corporation); OriginPro v8.5.1 (OriginLab Corporation)
Strukturformeln	ChemBioOffice Ultra v11.0 (CambridgeSoft)
Kristallstrukturen	PyMOL v1.1beta4 ⁽¹⁹⁰⁾ (De Lano Scientific LLC)

5.2 Material

Greiner-Gefäße	Carl Roth (15 mL, 50 mL)
Größenausschlußfilter	GE-Healthcare, NAP-5 und NAP-10
Küvetten	Hellma, Quarzglas Suprasil® (10 µL und 70 µL)
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One Filter Tips FT 10, 20, 200, 1000 [µL]
Reaktionsgefäße, silanisiert	Carl Roth, Mµlulti®-Reaktionsgefäße (1.7 mL und 2.0 mL)
Reaktionsgefäße (UV-Kinetiken)	Carl Roth, Mµlulti Ultra Tubes, (0.2 mL)
Sequenziergele	Carl Roth, Rotiphorese®-Fertigkonzentrate
Spinfilter	VWR, Centrifugal Filter, modified Nylon (0.45 µm)
Spritzenfilter	Millipore, Millex-GS (0.22 µm)
Sterilfiltration	Millipore, Steritop, GP Express™ PLUS (0.22 µm) und Steriflip, Express™ PLUS (0.22 µm)
Zip Tips	Millipore

5.3 LC-MS-Spektren

5.3.1 AHEG und Diels-Alder-Produkt als Einzelkomponenten

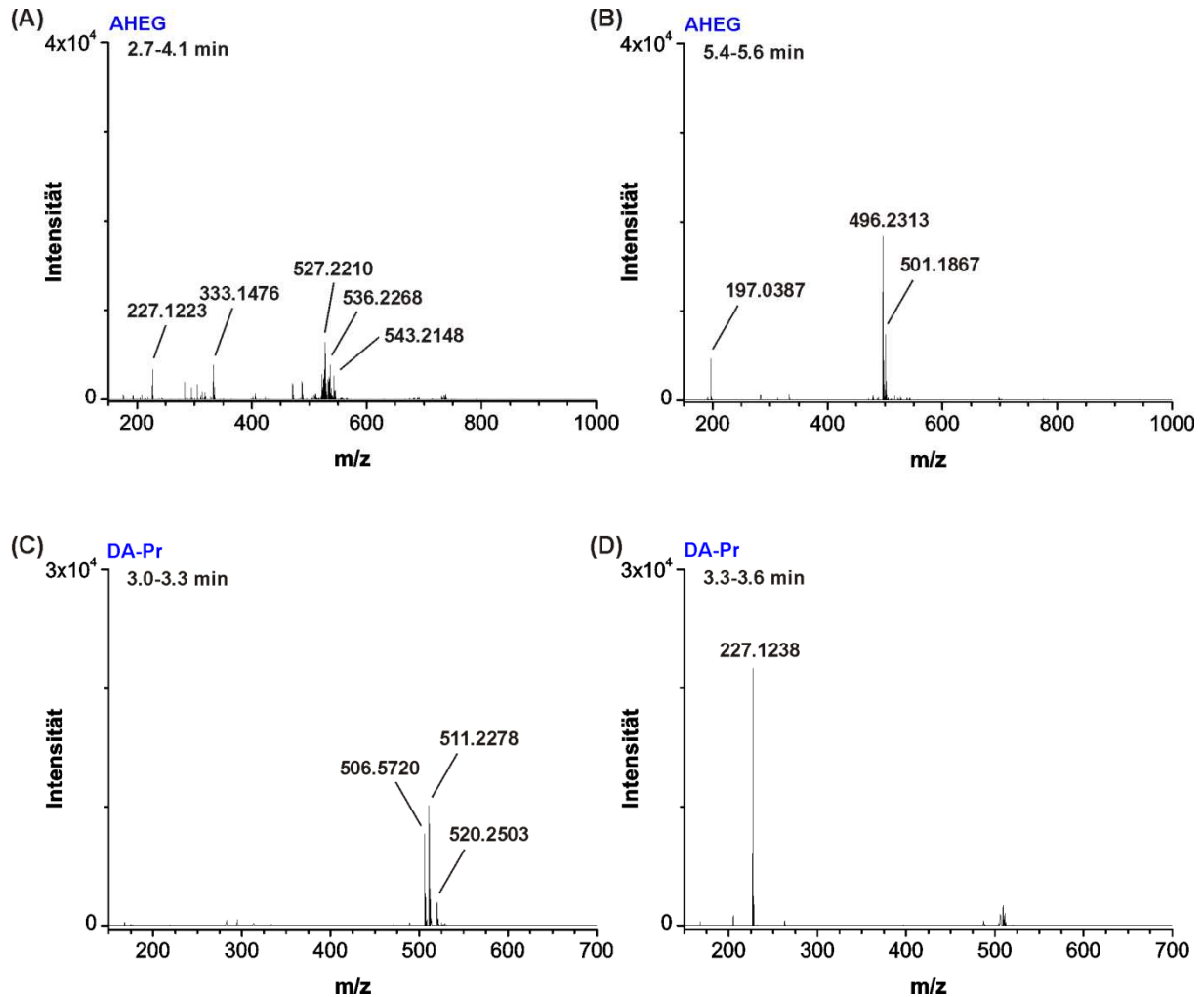


Abb. 58: (A)+(B): m/z-Spektren von AHEG 1000 pmol. (C)+(D): m/z-Spektren von Diels-Alder-Produkt 2000 pmol.

5.3.2 Katalysierte und unkatalysierte Diels-Alder-Reaktion

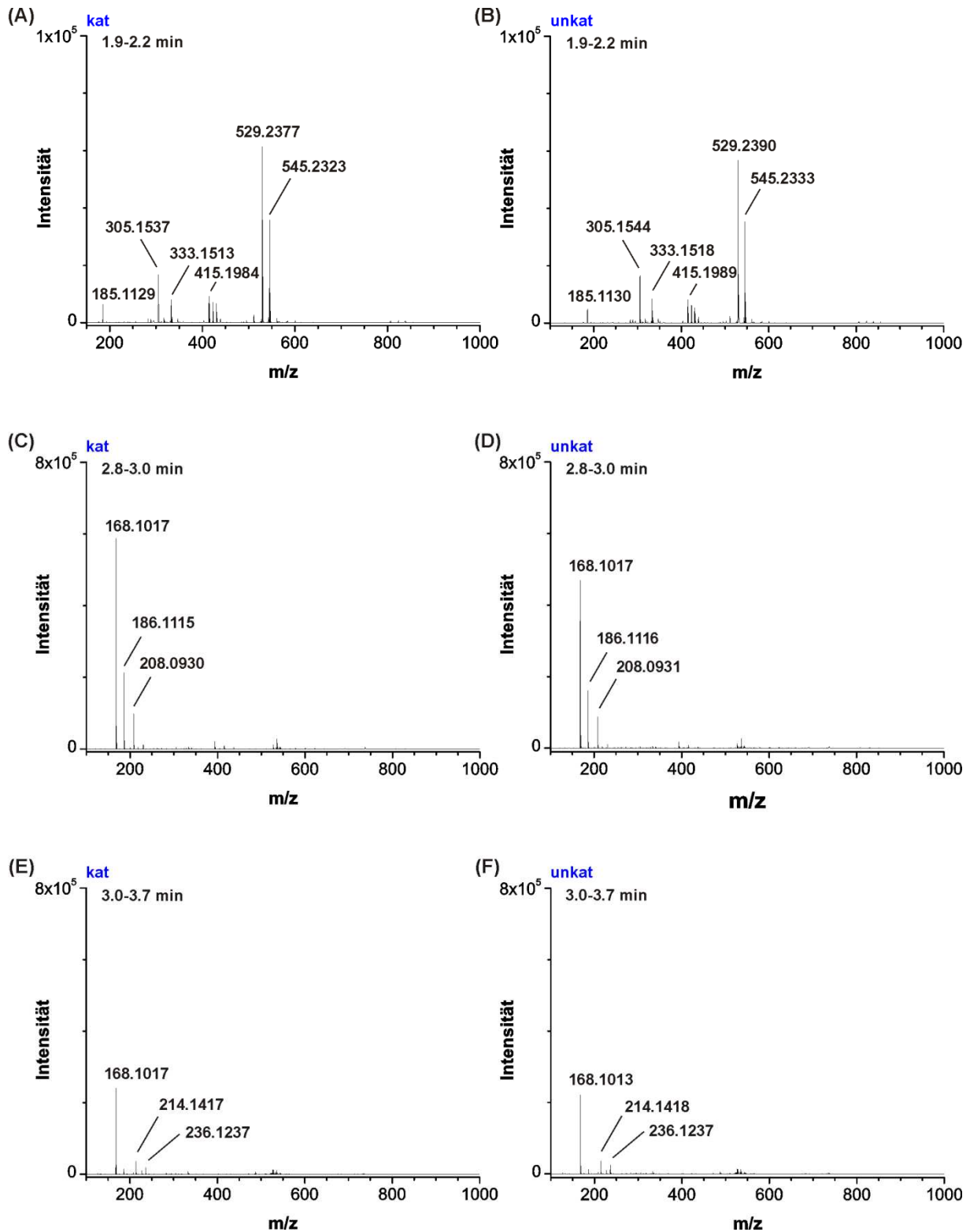


Abb. 59: (A)-(F): m/z-Spektren von katalysierter und unkatalysierter Diels-Alder-Reaktion. Reaktionszeit: 8 h, Konzentration: 2000 pmol AHEG, 20 nmol NPM und 140 pmol Ribozym.

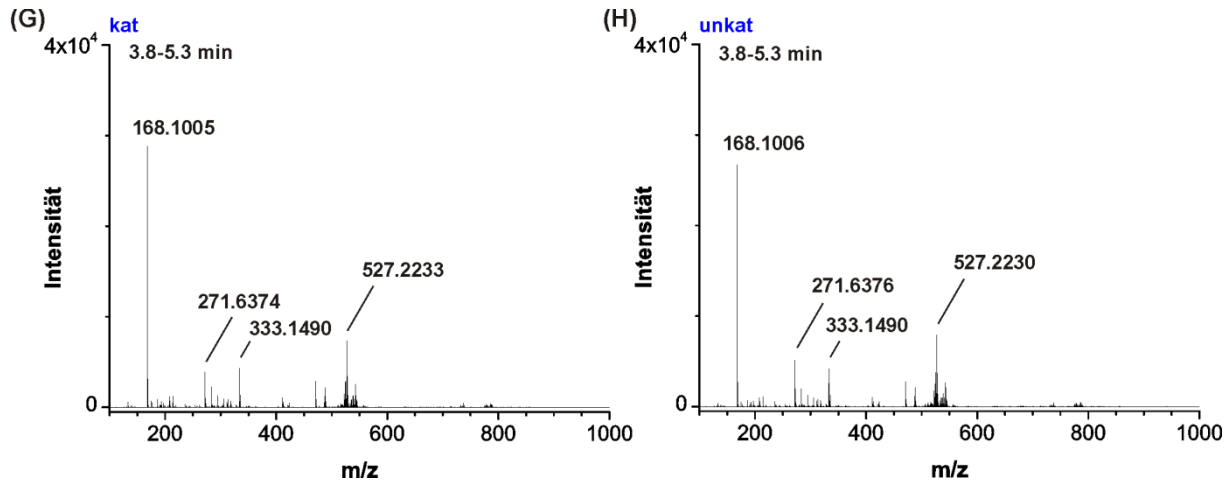


Abb. 59: Fortsetzung von Abb. 59.

5.3.3 Verlängerte Reaktionszeit der Diels-Alder-Reaktionen

Retentionzeit: 9.4-10.0 min

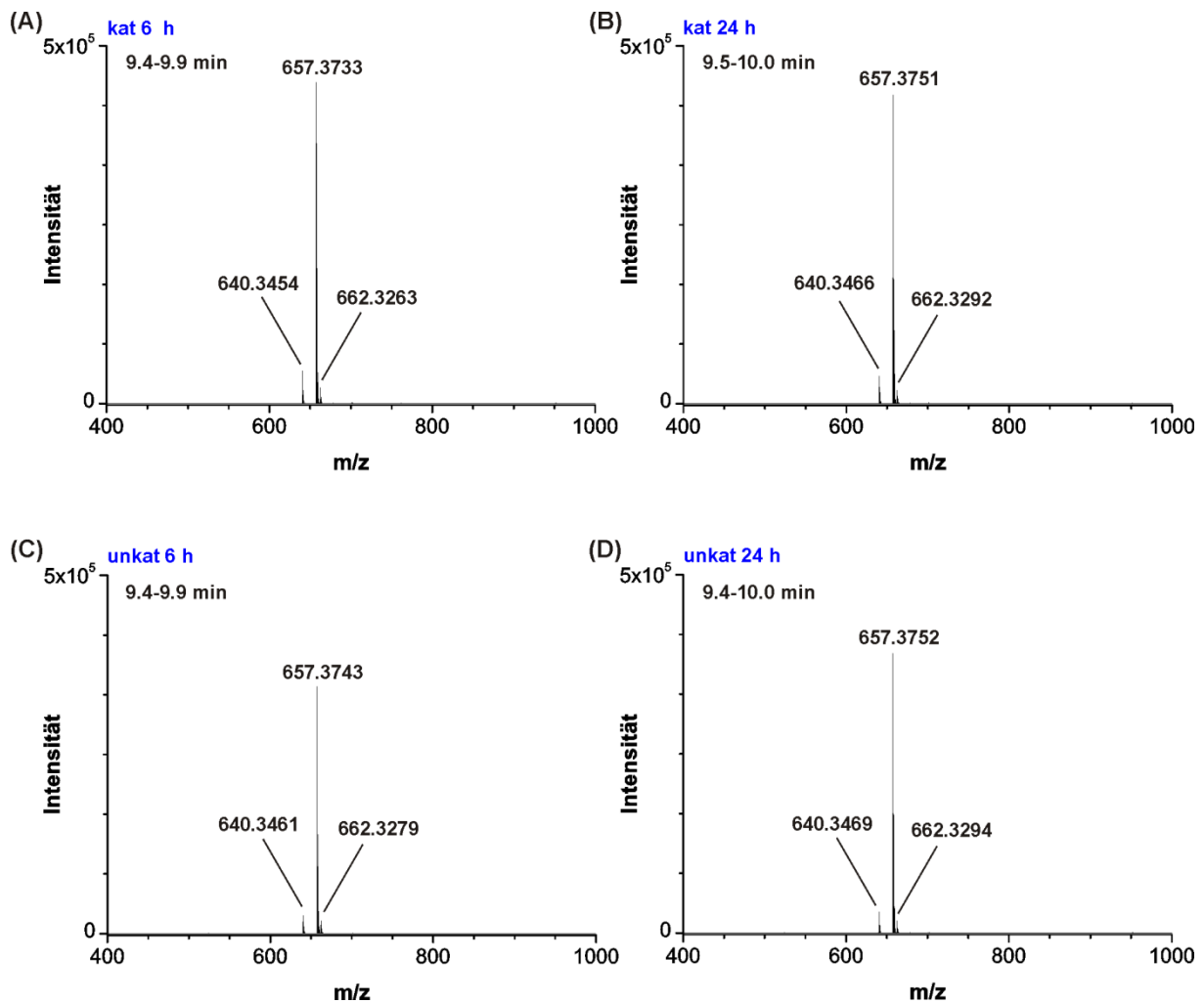


Abb. 60: M/z-Spektren des Diels-Alder-Produkts (Retentionzeit: 9.4-10.0 min) der Reaktionszeiten 6 h und 24 h. (A)+(B): m/z-Spektren der katalysierten Reaktion. (C)+(D): m/z-Spektren der unkatalysierten Reaktion.

Retentionzeit: 2.2-2.5 min

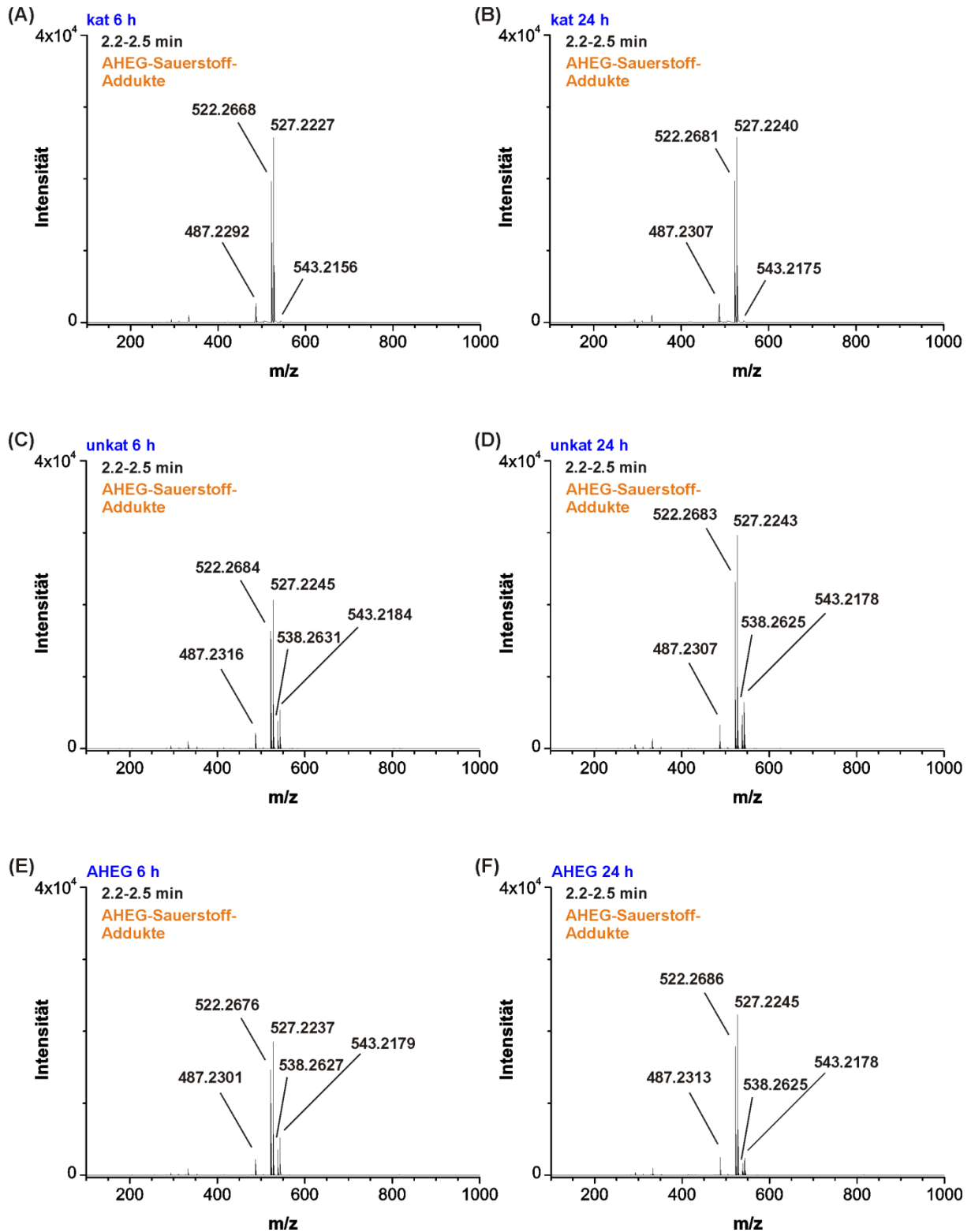


Abb. 61: M/z-Spektren der AHEG-Sauerstoff-Addukte (2.2-2.5 min) für die katalysierte- und unkatalysierte Diels-Alder-Reaktion und AHEG als Einzelkomponente nach 6 h und 24 h. (A)+(B): m/z-Spektren der ribozym-katalysierten Reaktion. (C)+(D): m/z-Spektren der unkatalysierten Reaktion. (E)+(F): m/z-Spektren von AHEG als Einzelkomponente.

Retentionzeit: 2.8-3.3 min

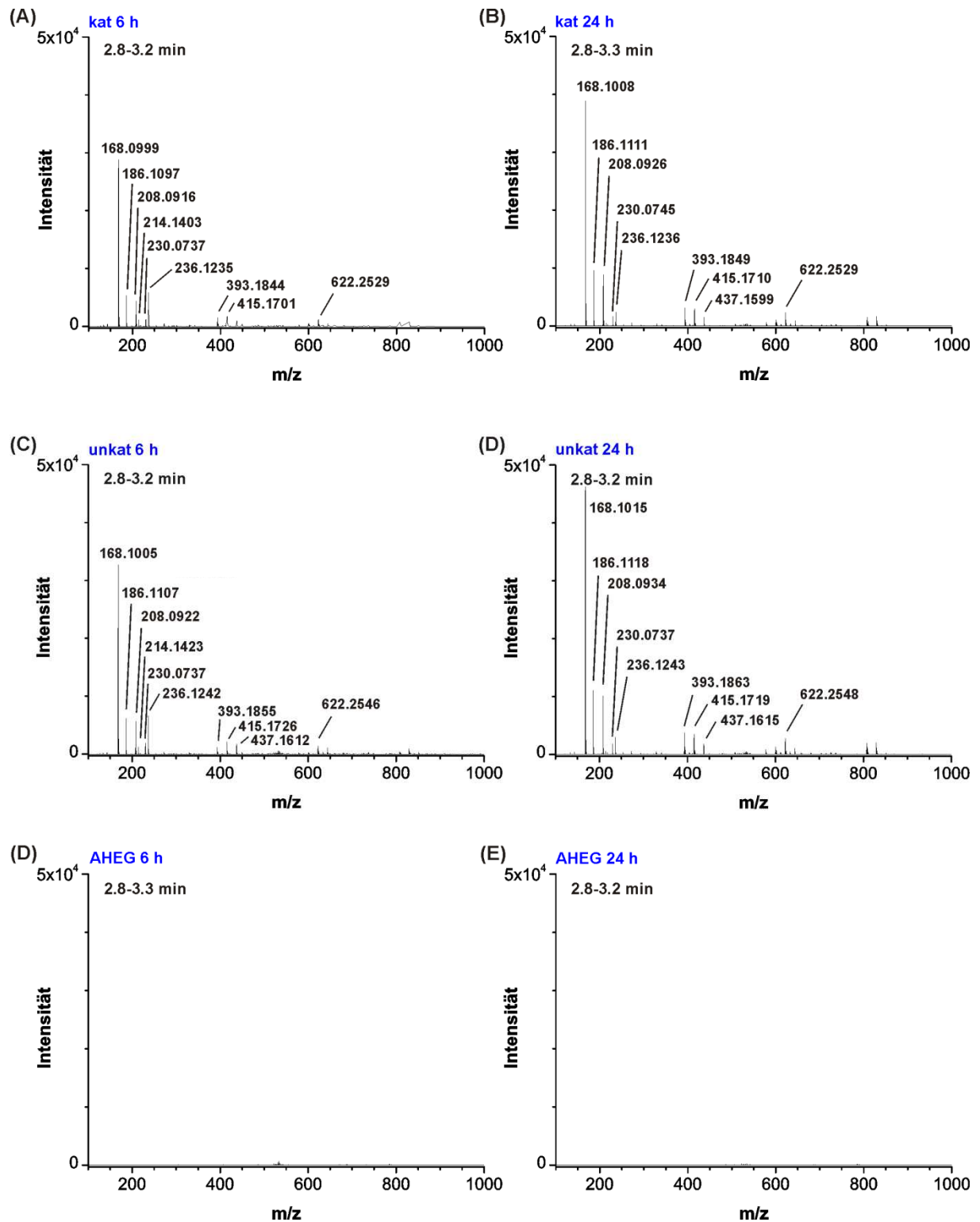


Abb. 62: M/z-Spektren der NPM-Addukte (Retentionszeit 2.8-3.3 min) der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion und AHEG als Einzelkomponente nach 6 h und 24 h Reaktionszeit. (A)+(B): ribozym-katalysierte Reaktion. (C)+(D): unkatalysierte Reaktion. (E)+(F): AHEG als Einzelkomponente.

Retentionzeit: 6.2-7.1 min

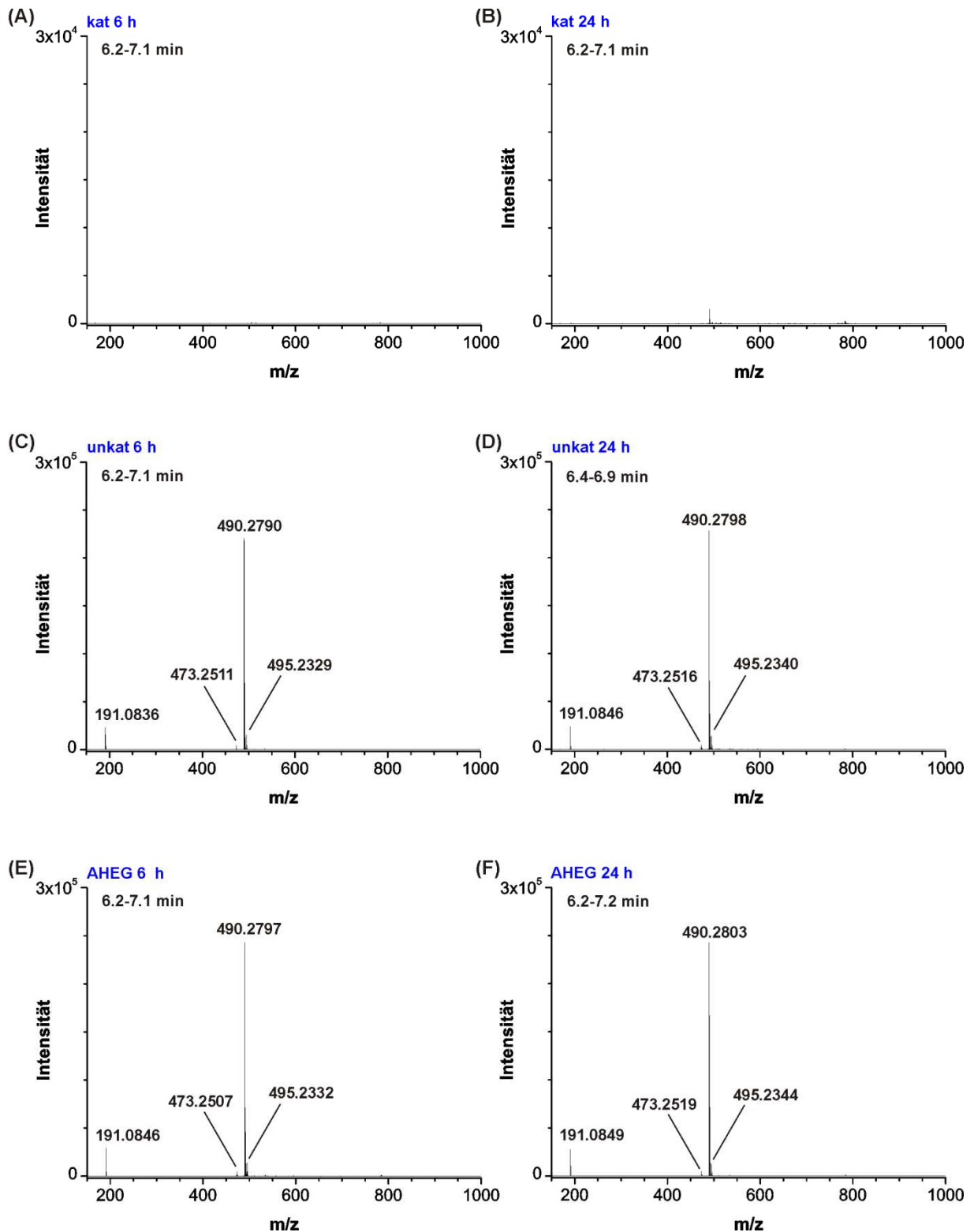


Abb. 63: M/z-Spektren der AHEG-Molekül-Ionen (Retentionzeit 6.2-7.1 min) der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion und AHEG als Einzelkomponente der Reaktionszeiten von 6 h und 24 h. (A)+(B): ribozym-katalysierte Reaktion im Vergleich zu (C)-(F) in 10-fach vergrößert dargestellter TIC-Skala. (C)+(D): unkatalysierte Reaktion. (E)+(F): AHEG als Einzelkomponente.

Retentionszeit: 7.6-8.5 min

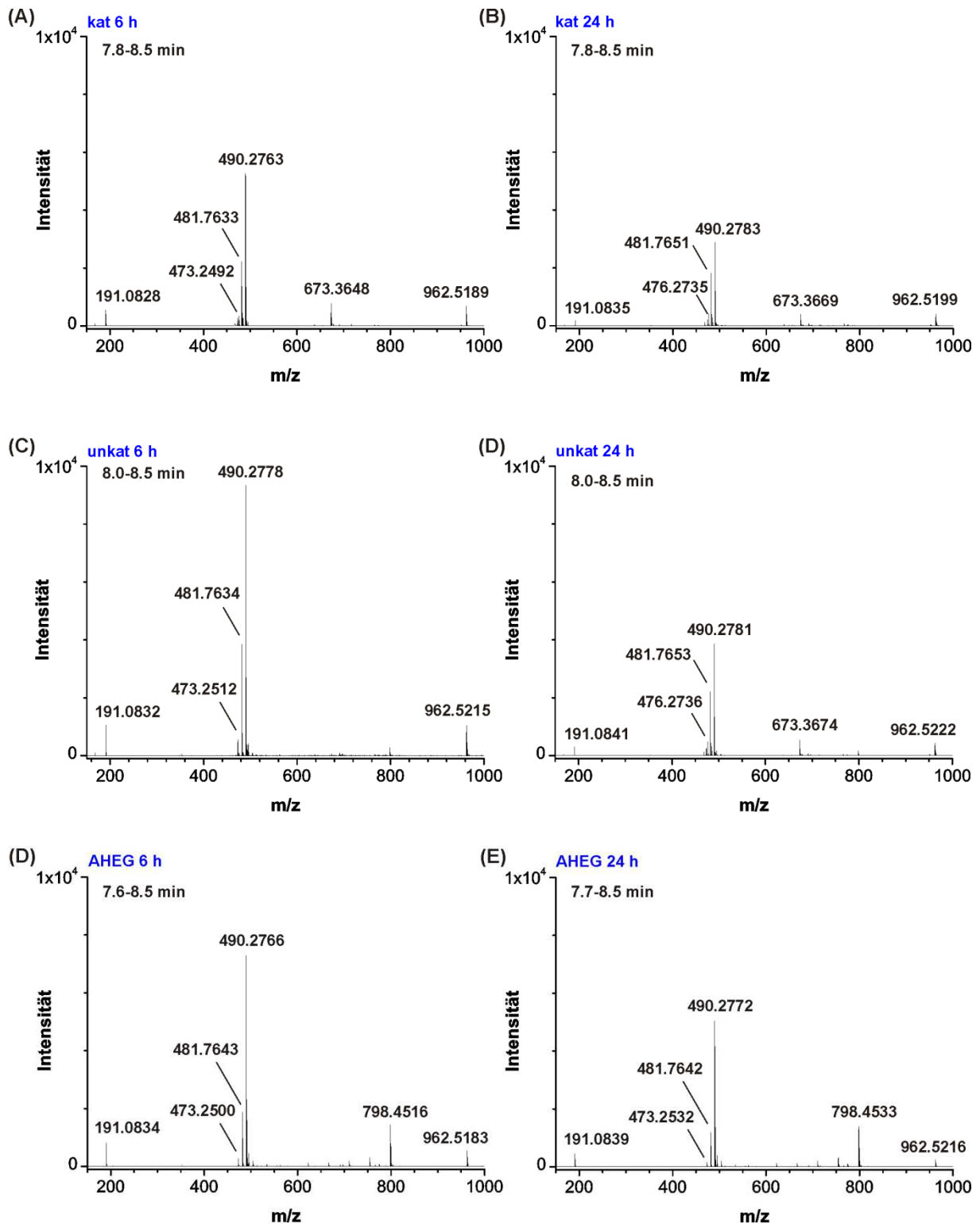


Abb. 64: M/z-Spektren der AHEG-Dimere (Retentionszeit 7.6-8.5 min) der katalysierten und unkatalysierten Diels-Alder-Reaktion und AHEG als Einzelkomponente der Reaktionszeiten von 6 h und 24 h. (A)+(B): ribozym-katalysierte Reaktion. (C)+(D): unkatalysierte Reaktion. (E)+(F): AHEG als Einzelkomponente.

5.3.4 Einfluss von UV-Bestrahlung

TIC von NPM und Diels-Alder-Produkt

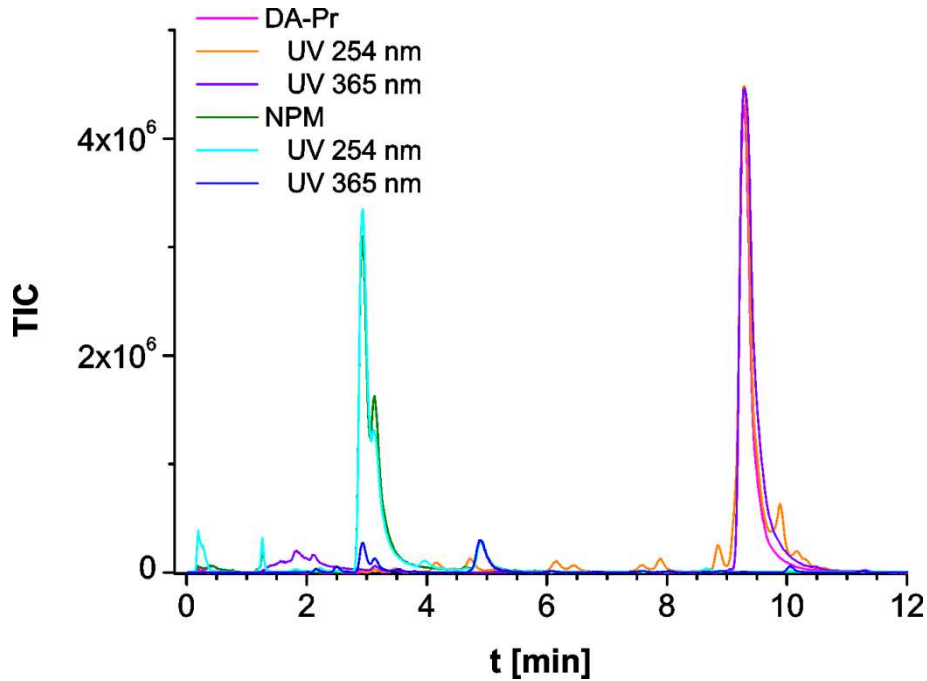


Abb. 65: TIC-Intensität für NPM (20 nmol) und Diels-Alder-Produkt (2000 pmol) unbestrahlt (grün und magenta), nach 2 h Bestrahlung bei 254 nm (hellblau und orange) und 365 nm (blau und violett). Die TIC-Signale des Puffer-Ionen-Gemisches wurden jeweils subtrahiert.

M/z-Spektren von AHEG unbestrahlt und bestrahlt

Retentionszeit: 8.1-8.6 min

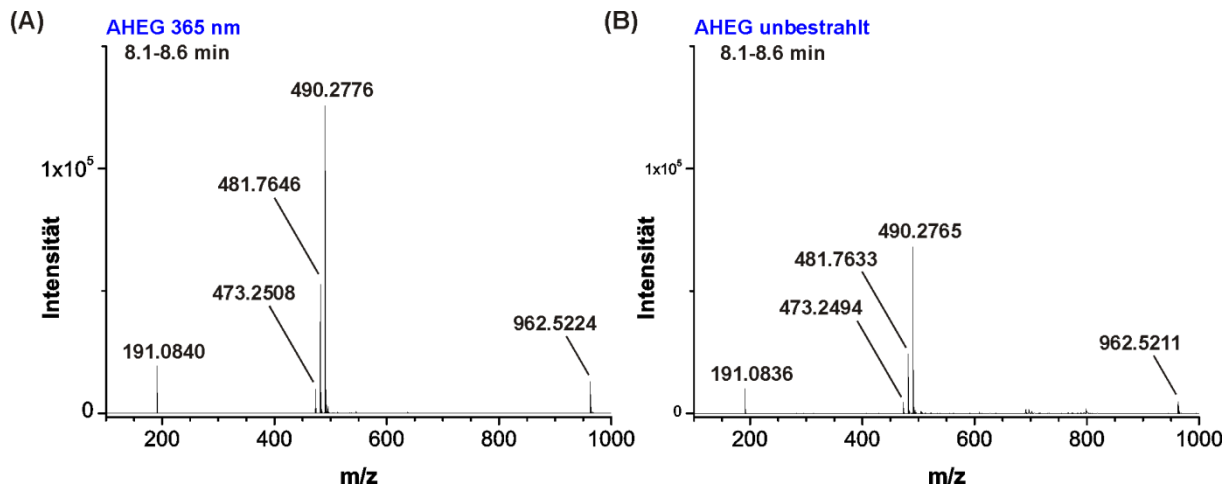


Abb. 66: M/z-Spektren der AHEG-Dimere von AHEG als Einzelkomponente unbestrahlt und bestrahlt mit 365 nm. (A): AHEG nach Bestrahlung von 365 nm. (B): AHEG unbestrahlt.

Retentionszeit: 1.6-2.5 min und 2.7-4.1 min

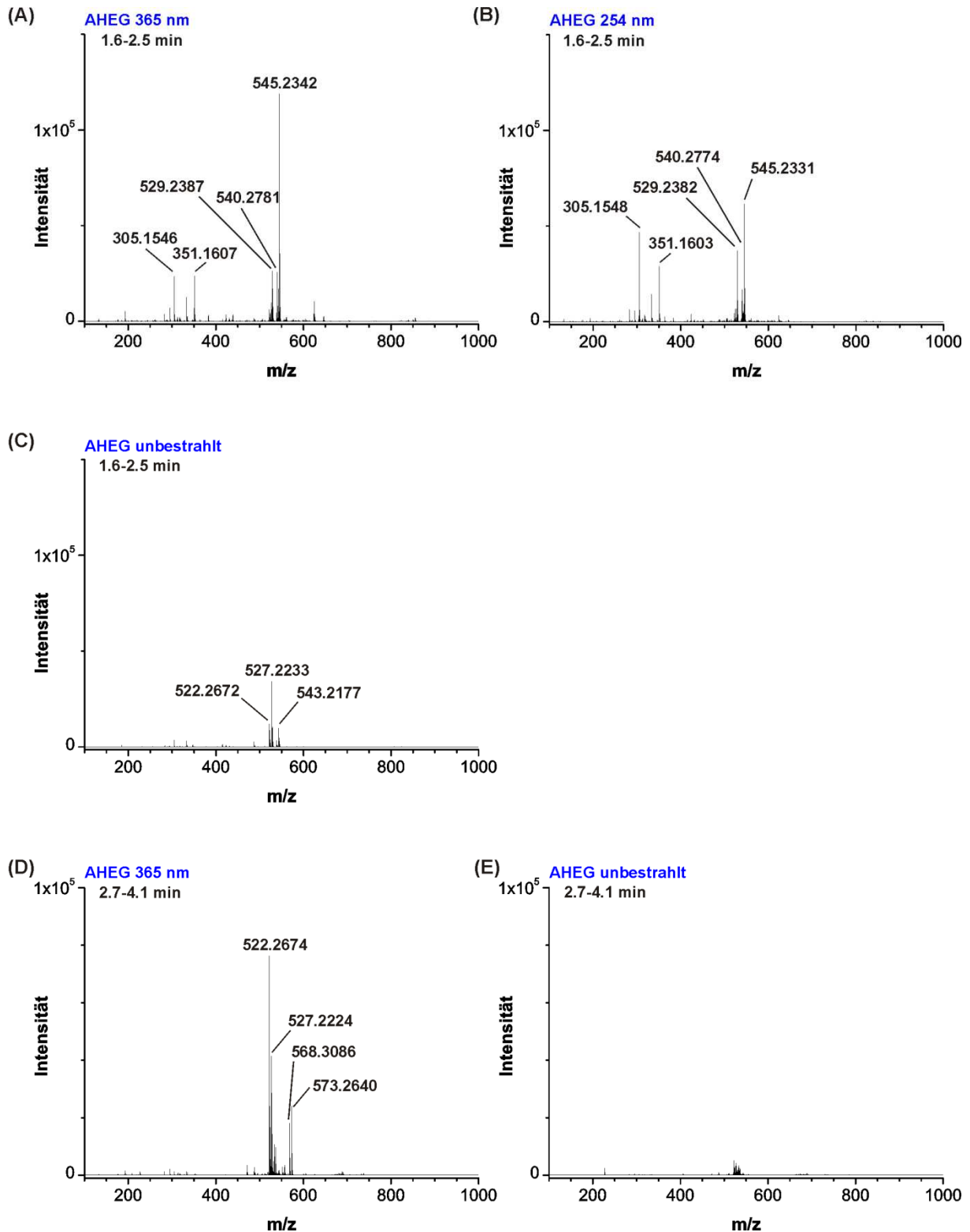


Abb. 67: M/z-Spektren von AHEG als Einzelkomponente unbestrahlt und bestrahlt mit 254 nm oder 365 nm. (A)-(C): Retentionszeit von 1.9-2.5 min. (D)+(E): Retentionszeit von 2.7-4.1 min.

5.3.5 Übersicht der m/z-Signale, Summenformeln und Molekül-Ionen

Tab. 22: Übersicht der mittels LC-MS-Analyse identifizierten Summenformeln und Molekül-Ionen mit deren berechneten m/z-Signalen. Die m/z-Werte wurden mit der SmartFormula Funktion der DataAnalysis Software (Bruker) berechnet.

m/z-Signal	Summenformel	Molekül-Ion
berechnet		
(9-Anthracenylmethyl)hexaethylenglykol (AHEG)		
191.0855	C ₁₅ H ₁₁	[Anthracen+CH ₂] ⁺
305.1571	C ₁₂ H ₂₆ O ₇ Na	[HEG+Na] ⁺
333.1520	C ₁₈ H ₂₆ O ₈ Na	[HEG+O+Na] ⁺
473.2534	C ₂₇ H ₃₇ O ₇	[AHEG+H] ⁺
481.7667	C ₅₄ H ₇₇ O ₁₄ N	[2AHEG+NH ₄ +H] ²⁺
490.2799	C ₂₇ H ₄₀ O ₇ N	[AHEG+NH ₄] ⁺
495.2353	C ₂₇ H ₃₆ O ₇ Na	[AHEG+Na] ⁺
511.2093	C ₂₇ H ₃₆ O ₇ K	[AHEG+K] ⁺
522.2698	C ₂₇ H ₄₀ O ₉ N	[AHEG+2O+NH ₄] ⁺
527.2252	C ₂₇ H ₃₆ O ₉ Na	[AHEG+2O+Na] ⁺
529.2408	C ₂₇ H ₃₈ O ₉ Na	[AHEG+2O+2H+Na] ⁺
540.2803	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₀ N	[AHEG+3O+2H+NH ₄] ⁺
543.1988	C ₂₇ H ₃₆ O ₉ K	[AHEG+2O+K] ⁺
543.2201	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₀ Na	[AHEG+3O+Na] ⁺
545.2357	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₀ Na	[AHEG+3O+2H+Na] ⁺
568.3116	C ₂₉ H ₄₆ O ₁₀ N	[AHEG+3O+2C+10H+N] ⁺
573.2670	C ₂₉ H ₄₂ O ₁₀ Na	[AHEG+3O+2C+6H+Na] ⁺
945.4995	C ₅₄ H ₇₃ O ₁₄	[2AHEG+H] ⁺
962.5260	C ₅₄ H ₇₆ O ₁₄ N	[2AHEG+NH ₄] ⁺
967.4814	C ₅₄ H ₇₂ O ₁₄ Na	[2AHEG+Na] ⁺
983.4554	C ₅₄ H ₇₂ O ₁₄ K	[2AHEG+K] ⁺

m/z-Signal berechnet	Summenformel	Molekül-Ion
N-Pentylmaleimid (NPM)		
168.1019	C ₉ H ₁₄ NO ₂	[N-pentyl-M+H] ⁺
186.1125	C ₉ H ₁₆ NO ₃	[N-pentyl-M+2H+O+H] ⁺
208.0944	C ₉ H ₁₅ NO ₃ Na	[N-pentyl-M+2H+O+Na] ⁺
214.1438	C ₁₁ H ₂₀ NO ₃	[N-pentyl-M+2C+6H+O+H] ⁺
236.1257	C ₁₁ H ₁₉ NO ₃ Na	[N-pentyl-M+2C+6H+O+Na] ⁺
Diels-Alder-Produkt aus AHEG + NPM (DA-Pr)		
640.3480	C ₃₆ H ₅₀ NO ₉	[AHEG+NPM+H] ⁺
657.3746	C ₃₆ H ₅₃ N ₂ O ₉	[AHEG+NPM+NH ₄] ⁺
662.3300	C ₃₆ H ₄₉ NO ₉ Na	[AHEG+NPM+Na] ⁺
678.3039	C ₃₆ H ₄₉ NO ₉ K	[AHEG+NPM+K] ⁺

5.4 Abkürzungsverzeichnis

. in Zahlen	Substitution von , in Zahlen durch .
°	Grad
10-/18-/	Nukleotidsequenz aus 10 oder 18 Nukleotiden
24-/49mer	Nukleotidsequenz aus 24 oder 49 Nukleotiden
2-AP	2-Aminopurin
abs	absolut
Abs	Absorption
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AHEG	(9-Anthracenylmethyl)hexaethylenglykol
APCI	Ionisierungsmethode aus („Atmospheric Pressure Chemical Ionization“)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BG	unkatalysierte Hintergrundreaktion („Background reaction“)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
CMCT	1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat
cpm	Zählimpulse pro Minute („Counts per minute“)
DA1	Diels-Alder-Produkt aus AHEG und NPM als racemisches Gemisch
DA2	Diels-Alder-Produkt aus Anthracen und Maleimidocapronsäure
DAD	Diodenarray-Detektor
DA-Pr	Diels-Alder-Produkt aus AHEG und NPM
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

dU	desoxyUridin
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie („Electron paramagnetic resonance Spectroscopy“)
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ESI-MS	Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer („Förster resonance energy transfer“)
G	Guanosin
H-Brücke	Wasserstoff-Brücke / Wasserstoff-Brücken-Bindung
HEG	Hexaethylenglykol
HOMO	Höchstes besetztes Molekülorbital („Highest occupied molecular orbital“)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie („High pressure liquid chromatography“)
HPLC-MS	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie - Massenspektrometrie („High performance liquid chromatography - mass spectrometry“)
iC	<i>iso</i> Cytidin
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration („inhibitory concentration“)
i-PrOH	Isopropanol
isoC	<i>iso</i> Cytidin
ISTD	interner Standard
k [M ⁻¹ s ⁻¹]	Geschwindigkeitskonstante
K_M [μM]	Michaelis-Konstante, Konzentration der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit
$K_{1/2}$ [μM]	Bezeichnung für K_M [μM]
k_{rel} [%]	relative Aktivität
kat	katalysierte Reaktion

L1, L2	Schleife 1 und 2 („Loop“ 1 und 2)
LC-MS	kurz für HPLC-MS
Lsg	Lösung
LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital („Lowest unoccupied molecular orbital“)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis aus („mass-to-charge“ ratio)
NMR	Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie („Nuclear magnetic resonance“)
NPE	(S-)-1-(2-nitrophenyl)ethyl
NPM	<i>N</i> -Pentylmaleimid
N-pentyl-M	<i>N</i> -Pentylmaleimid
nt	Nukleotide
OAc	Acetat
Oxid	Oxidation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAH	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
Ph	Phenyl-Gruppe
PNK	Polynukleotidkinase
³² P-pCp	[5'- ³² P]-Cytidin-3',5'-biphosphat
R	organischer Rest
rIno	<i>ribo</i> Inosin
rPu	<i>ribo</i> Purin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

SELEX	in vitro Selektion, Abkürzung für: „Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment“
smFRET	Einzelmolekül-Förster-Resonanz-Energietransfer („Single molecule förster resonance energy transfer“)
TIC	Totalionenstrom, von „Total Ion Current“
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
T4-PNK	T4-Polynukleotid-Kinase
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
tRNA	transfer RNA
TOF	„Time of flight“-Detektor
U	Uridin
unkat	unkatalysierte Hintergrundreaktion
UV	Ultraviolett
VIS	Sichtbares Lichtspektrum („Visible“)
v/v	Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

5.5 Publikationen

Artikel

- Kraut, S.; Bebenroth, D.; Nierth, A.; Kobitski, A. Y.; Nienhaus, G. U.; Jäschke, A., Three critical hydrogen bonds determine the catalytic activity of the Diels–Alderase ribozyme. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (3), 1318-1330.
- Kisseleva, N.; Kraut, S.; Jäschke, A.; Schiemann, O., Characterizing multiple metal ion binding sites within a ribozyme by cadmium-induced EPR silencing. *HFSP J.* **2007**, *1* (2), 127-36.

Posterpräsentationen

- S. Kraut, D. Bebenroth, A. Jäschke: Structural and mechanistic insight into ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation.
 - *5. Nukleinsäurechemie-Treffen*, Frankfurt am Main, 29 – 30.09.**2011**
 - *19th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, Lyon, Frankreich, 29.08 – 03.09.**2010**
- S. Kraut, D. Bebenroth, A. Jäschke: Structure-functional investigations on a RNA-catalysed Diels-Alder reaction. *3rd European Conference on Chemistry for Life Sciences*, Frankfurt am Main, 02.09 – 05.09.**2009**
- S. Kraut, D. Bebenroth, A. Jäschke: Structure-functional investigations on a RNA-catalysed Diels-Alder reaction. *RIGHT NAC summer school*, Sesimbra, Portugal, 17.06 – 20.06.**2008**

5.6 Eidesstattliche Erklärung

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

Stefanie Kraut

Heidelberg, den 17.07.2012

6. Referenzen

- (1) 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), 147-157.
- (2) 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, Part 2), 849-857.
- (3) Guerrier-Takada, C.; Altman, S., Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro. *Science* **1984**, *223* (4633), 285-286.
- (4) www.nobelprize.org.
- (5) Buzayan, J. M.; Gerlach, W. L.; Bruening, G., Satellite tobacco ringspot virus RNA: A subset of the RNA sequence is sufficient for autolytic processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83* (23), 8859-8862.
- (6) 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), 4439-4444.
- (7) Hampel, A.; Tritz, R.; Hicks, M.; Cruz, P., 'Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18* (2), 299-304.
- (8) 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), 841-847.
- (9) 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), 905-920.
- (10) 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), 920-930.
- (11) Steitz, T. A.; Moore, P. B., RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28* (8), 411-418.
- (12) Gilbert, W., Origin of life: The RNA world. *Nature* **1986**, *319* (6055), 618.
- (13) Tuerk, C.; Gold, L., Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505-510.
- (14) Wilson, D. S.; Szostak, J. W., In Vitro Selection Of Functional Nucleic Acids. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68* (1), 611-647.
- (15) Houk, K. N.; Gonzalez, J.; Li, Y., Pericyclic Reaction Transition States: Passions and Punctilios, 1935-1995. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28* (2), 81-90.
- (16) Vollhardt, K. P. C., Organische Chemie. 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH **1990**.
- (17) Nierth, A., *Inaugural-Dissertation: Untersuchung eines Diels-Alderase-Ribozyms mit Fluoreszenzsonden.* Universität Heidelberg, **2010**.
- (18) Woodward, R. B.; Hoffmann, R., The Conservation of Orbital Symmetry. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1969**, *8* (11), 781-853.
- (19) Tarasow, T. M.; Eaton, B. E., The Diels-Alder reaction and biopolymer catalysis. *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *55* (11), 1463-1472.
- (20) Rideout, D. C.; Breslow, R., Hydrophobic acceleration of Diels-Alder reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (26), 7816-7817.
- (21) Lindström, U. M., Stereoselective Organic Reactions in Water. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (8), 2751-2772.
- (22) Seelig, B.; Jäschke, A., Site-specific modification of enzymatically synthesized RNA: Transcription initiation and Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (44), 7729-7732.
- (23) Marchán, V.; Ortega, S.; Pulido, D.; Pedroso, E.; Grandas, A., Diels-Alder cycloadditions in water for the straightforward preparation of peptide-oligonucleotide conjugates. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (3), e24.

- (24) Sauer, J., Diels-Alder-Reactions Part I: New Preparative Aspects. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1966**, 5 (2), 211-230.
- (25) Schoch, J.; Wiessler, M.; Jäschke, A., Post-synthetic modification of DNA by inverse-electron-demand Diels-Alder reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (26), 8846-8847.
- (26) Schoch, J.; Ameta, S.; Jäschke, A., Inverse electron-demand Diels-Alder reactions for the selective and efficient labeling of RNA. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (46), 12536-12537.
- (27) Stocking, E. M.; Williams, R. M., Chemistry and Biology of Biosynthetic Diels–Alder Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2003**, 42 (27), 3078-3115.
- (28) Kelly, W. L., Intramolecular cyclizations of polyketide biosynthesis: mining for a "Diels-Alderase"? *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6 (24), 4483-4493.
- (29) Pohnert, G., Diels–Alderase. *Chembiochem* **2001**, 2 (12), 873-875.
- (30) Oikawa, H.; Katayama, K.; Suzuki, Y.; Ichihara, A., Enzymatic activity catalysing exo-selective Diels-Alder reaction in solanapyrone biosynthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1995**, (13), 1321-1322.
- (31) Katayama, K.; Kobayashi, T.; Oikawa, H.; Honma, M.; Ichihara, A., Enzymatic activity and partial purification of solanapyrone synthase: first enzyme catalyzing Diels–Alder reaction. *BBA-Protein Struct. M.* **1998**, 1384 (2), 387-395.
- (32) Oikawa, H.; Kobayashi, T.; Katayama, K.; Suzuki, Y.; Ichihara, A., Total Synthesis of (–)-Solanapyrone A via Enzymatic Diels–Alder Reaction of Prosolanapyrone. *J. Org. Chem.* **1998**, 63 (24), 8748-8756.
- (33) Kasahara, K.; Miyamoto, T.; Fujimoto, T.; Oguri, H.; Tokiwano, T.; Oikawa, H.; Ebizuka, Y.; Fujii, I., Solanapyrone Synthase, a Possible Diels–Alderase and Iterative Type I Polyketide Synthase Encoded in a Biosynthetic Gene Cluster from *Alternaria solani*. *Chembiochem* **2010**, 11 (9), 1245-1252.
- (34) 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 Intramolecular Diels–Alder Reaction of a Substrate Analogue. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122 (46), 11519-11520.
- (35) Ma, S. M.; Li, J. W.-H.; Choi, J. W.; Zhou, H.; Lee, K. K. M.; Moorthie, V. A.; Xie, X.; Kealey, J. T.; Da Silva, N. A.; Vederas, J. C.; Tang, Y., Complete Reconstitution of a Highly Reducing Iterative Polyketide Synthase. *Science* **2009**, 326 (5952), 589-592.
- (36) Eberhardt, S.; Zingler, N.; Kemter, K.; Richter, G.; Cushman, M.; Bacher, A., Domain structure of riboflavin synthase. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268 (15), 4315-4323.
- (37) Kim, R.-R.; Illarionov, B.; Joshi, M.; Cushman, M.; Lee, C. Y.; Eisenreich, W.; Fischer, M.; Bacher, A., Mechanistic Insights on Riboflavin Synthase Inspired by Selective Binding of the 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine Exomethylene Anion. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (9), 2983-2990.
- (38) 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), 185-189.
- (39) Ose, T.; Watanabe, K.; Yao, M.; Honma, M.; Oikawa, H.; Tanaka, I., Structure of macrophomate synthase. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **2004**, 60 (7), 1187-1197.
- (40) Serafimov, J. M.; Gillingham, D.; Kuster, S.; Hilvert, D., The Putative Diels–Alderase Macrophomate Synthase is an Efficient Aldolase. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (25), 7798-7799.
- (41) Campbell, C. D.; Vederas, J. C., Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. *Biopolymers* **2010**, 93 (9), 755-763.
- (42) Townsend, C. A., A "Diels-Alderase" at Last. *Chembiochem* **2011**, 12 (15), 2267-2269.
- (43) Kim, H. J.; Rusczycky, M. W.; Choi, S.-h.; Liu, Y.-n.; Liu, H.-w., Enzyme-catalysed [4+2] cycloaddition is a key step in the biosynthesis of spinosyn A. *Nature* **2011**, 473 (7345), 109-112.
- (44) Isiorho, E. A.; Liu, H.-w.; Keatinge-Clay, A. T., Structural Studies of the Spinosyn Rhamnosyltransferase, SpnG. *Biochemistry* **2012**, 51 (6), 1213-1222.

- (45) Kirst, H. A., The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J. Antibiot.* **2010**, *63* (3), 101-111.
- (46) Mergott, D. J.; Frank, S. A.; Roush, W. R., Total synthesis of (-)-spinosyn A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (33), 11955-11959.
- (47) Hilvert, D.; Hill, K. W.; Nared, K. D.; Auditor, M. T. M., Antibody catalysis of the Diels-Alder reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (26), 9261-9262.
- (48) Hilvert, D., Antibody catalysis of carbon-carbon bond formation and cleavage. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26* (10), 552-558.
- (49) Bahr, N.; Güller, R.; Reymond, J.-L.; Lerner, R. A., A Nitroxyl Synthase Catalytic Antibody. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (15), 3550-3555.
- (50) Bensel, N.; Bahr, N.; Reymond, M. T.; Schenkels, C.; Reymond, J.-L., Catalytic Antibodies by Fluorescence Screening. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82* (1), 44-52.
- (51) 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), 9674-9678.
- (52) Linder, M.; Hermansson, A.; Liebeschuetz, J.; Brinck, T., Computational design of a lipase for catalysis of the Diels-Alder reaction. *J. Mol. Model.* **2011**, *17* (4), 833-849.
- (53) Siegel, J. B.; Zanghellini, A.; Lovick, H. M.; Kiss, G.; Lambert, A. R.; St.Clair, J. L.; Gallaher, J. L.; Hilvert, D.; Gelb, M. H.; Stoddard, B. L.; Houk, K. N.; Michael, F. E.; Baker, D., Computational Design of an Enzyme Catalyst for a Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction. *Science* **2010**, *329* (5989), 309-313.
- (54) Blake, J. F.; Lim, D.; Jorgensen, W. L., Enhanced Hydrogen Bonding of Water to Diels-Alder Transition States. Ab Initio Evidence. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (4), 803-805.
- (55) Linder, M.; Johansson, A. J.; Olsson, T. S. G.; Liebeschuetz, J.; Brinck, T., Designing a New Diels-Alderase: A Combinatorial, Semirational Approach Including Dynamic Optimization. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51* (8), 1906-1917.
- (56) Ertl, G., Wilhelm Ostwald: Begründer der physikalischen Chemie und Nobelpreisträger 1909. *Angew. Chem.* **2009**, *121* (36), 6724-6730.
- (57) Seelig, B.; Jäschke, A., A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity. *Chem. Biol.* **1999**, *6* (3), 167-176.
- (58) Chandra, M.; Silverman, S. K., DNA and RNA Can Be Equally Efficient Catalysts for Carbon-Carbon Bond Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (10), 2936-2937.
- (59) 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.
- (60) 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.
- (61) 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.
- (62) Bebenroth, D., *Inaugural-Dissertation: Über Struktur-Funktions-Beziehungen zur Architektur von Ribozymen für eine Diels-Alder-Reaktion.* Universität Heidelberg, **2007**.
- (63) Staple, D. W.; Butcher, S. E., Pseudoknots: RNA Structures with Diverse Functions. *PLoS Biol.* **2005**, *3* (6), e213.
- (64) Leontis, N. B.; Westhof, E., Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA* **2001**, *7* (4), 499-512.
- (65) Leontis, N. B.; Stombaugh, J.; Westhof, E., The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (16), 3497-3531.
- (66) Kobitski, A. Y.; Nierth, A.; Helm, M.; Jäschke, A.; Nienhaus, G. U., Mg²⁺-dependent folding of a Diels-Alderase ribozyme probed by single-molecule FRET analysis. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (6), 2047-59.

- (67) Manoharan, V.; Fürtig, B.; Jäschke, A.; Schwalbe, H., Metal-induced folding of Diels-Alderase ribozymes studied by static and time-resolved NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (17), 6261-70.
- (68) Shiman, R.; Draper, D. E., Stabilization of RNA tertiary structure by monovalent cations. *J. Mol. Biol.* **2000**, *302* (1), 79-91.
- (69) Sigel, R. K. O.; Pyle, A. M., Alternative roles for metal ions in enzyme catalysis and the implications for ribozyme chemistry. *Chem. Rev.* **2006**, *107* (1), 97-113.
- (70) Tarasow, T. M.; Tarasow, S. L.; Eaton, B. E., RNA-catalysed carbon-carbon bond formation. *Nature* **1997**, *389* (6646), 54-57.
- (71) Martick, M.; Scott, W. G., Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* **2006**, *126* (2), 309-320.
- (72) Bevilacqua, P. C.; Yajima, R., Nucleobase catalysis in ribozyme mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10* (5), 455-464.
- (73) Freisinger, E.; Sigel, R. K. O., From nucleotides to ribozymes—A comparison of their metal ion binding properties. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251* (13-14), 1834-1851.
- (74) Fraústo da Silva, J. J. R.; Williams R. J. P., The biological chemistry of the elements. 2nd Edition, *Oxford University Press* **2001**.
- (75) Murray, J. B.; Seyhan, A. A.; Walter, N. G.; Burke, J. M.; Scott, W. G., The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem. Biol.* **1998**, *5* (10), 587-595.
- (76) Batey, R. T.; Rambo, R. P.; Lucast, L.; Rha, B.; Doudna, J. A., Crystal structure of the ribonucleoprotein core of the signal recognition particle. *Science* **2000**, *287* (5456), 1232-1239.
- (77) Misra, V. K.; Draper, D. E., On the role of magnesium ions in RNA stability. *Biopolymers* **1998**, *48* (2-3), 113-135.
- (78) Cate, J. H.; Hanna, R. L.; Doudna, J. A., A magnesium ion core at the heart of a ribozyme domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1997**, *4* (7), 553-558.
- (79) Pyle, A., Metal ions in the structure and function of RNA. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, *7* (7), 679-690.
- (80) Vogt, M.; Lahiri, S.; Hoogstraten, C. G.; Britt, R. D.; DeRose, V. J., Coordination Environment of a Site-Bound Metal Ion in the Hammerhead Ribozyme Determined by ¹⁵N and ²H ESEEM Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (51), 16764-16770.
- (81) Schiemann, O.; Fritscher, J.; Kisseleva, N.; Sigurdsson, S. T.; Prisner, T. F., Structural Investigation of a High-Affinity Mn^{II} Binding Site in the Hammerhead Ribozyme by EPR Spectroscopy and DFT Calculations. Effects of Neomycin B on Metal-Ion Binding. *ChemBiochem* **2003**, *4* (10), 1057-1065.
- (82) Reed, G. H.; Poyner, R. R., Mn²⁺ as a probe of divalent metal ion binding and function in enzymes and other proteins. *Met. Ions Biol. Syst.* **2000**, *37*, 183-207.
- (83) Kisseleva, N.; Khvorova, A.; Westhof, E.; Schiemann, O., Binding of manganese(II) to a tertiary stabilized hammerhead ribozyme as studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *RNA* **2005**, *11* (1), 1-6.
- (84) Koculi, E.; Hyeon, C.; Thirumalai, D.; Woodson, S. A., Charge Density of Divalent Metal Cations Determines RNA Stability. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (9), 2676-2682.
- (85) Perrotta, A. T.; Been, M. D., HDV Ribozyme Activity in Monovalent Cations. *Biochemistry* **2006**, *45* (38), 11357-11365.
- (86) Ke, A.; Ding, F.; Batchelor, J. D.; Doudna, J. A., Structural Roles of Monovalent Cations in the HDV Ribozyme. *Structure* **2007**, *15* (3), 281-287.
- (87) Switzer, C.; Moroney, S. E.; Benner, S. A., Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (21), 8322-8323.
- (88) Lindell, M.; Brännvall, M.; Wagner, E. G. H.; Kirsebom, L. A., Lead(II) cleavage analysis of RNase P RNA in vivo. *RNA* **2005**, *11* (9), 1348-1354.
- (89) Brown, R. S.; Dewan, J. C.; Klug, A., Crystallographic and biochemical investigation of the lead(II)-catalyzed hydrolysis of yeast phenylalanine tRNA. *Biochemistry* **1985**, *24* (18), 4785-4801.

- (90) Giege, R., Helm, M., and Florentz, C., Chemical and enzymatic probing of RNA structure. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Pergamon Press **1999**, 6, 63-80.
- (91) Soukup, G. A.; Breaker, R. R., Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA. *RNA* **1999**, 5 (10), 1308-1325.
- (92) Ryder, S. P.; Strobel, S. A., Nucleotide Analog Interference Mapping. *Methods* **1999**, 18 (1), 38-50.
- (93) Stuhlmann, F.; Jäschke, A., Characterization of an RNA active site: interactions between a Diels-Alderase ribozyme and its substrates and products. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (13), 3238-44.
- (94) Wombacher, R.; Keiper, S.; Suhm, S.; Serganov, A.; Patel, D. J.; Jäschke, A., Control of stereoselectivity in an enzymatic reaction by backdoor access. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45 (15), 2469-72.
- (95) Brunel, C.; Romby, P., Probing RNA structure and RNA-ligand complexes with chemical probes. In *Methods Enzymol.*, Academic Press **2000**, 318, 3-21.
- (96) Tullius, T. D.; Greenbaum, J. A., Mapping nucleic acid structure by hydroxyl radical cleavage. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9 (2), 127-134.
- (97) Regulski, E. E.; Breaker, R. R., In-line probing analysis of riboswitches. *Methods Mol. Biol.* **2008**, 419, 53-67.
- (98) Strauss, B.; Nierth, A.; Singer, M.; Jäschke, A., Direct structural analysis of modified RNA by fluorescent in-line probing. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40 (2), 861-870.
- (99) Merino, E. J.; Wilkinson, K. A.; Coughlan, J. L.; Weeks, K. M., RNA Structure Analysis at Single Nucleotide Resolution by Selective 2'-Hydroxyl Acylation and Primer Extension (SHAPE). *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (12), 4223-4231.
- (100) Mortimer, S. A.; Weeks, K. M., Time-Resolved RNA SHAPE Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (48), 16178-16180.
- (101) Weeks, K. M., Advances in RNA structure analysis by chemical probing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 20 (3), 295-304.
- (102) Watts, J. M.; Dang, K. K.; Gorelick, R. J.; Leonard, C. W.; Bess Jr, J. W.; Swanstrom, R.; Burch, C. L.; Weeks, K. M., Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* **2009**, 460 (7256), 711-716.
- (103) Steen, K.-A.; Malhotra, A.; Weeks, K. M., Selective 2'-Hydroxyl Acylation Analyzed by Protection from Exoribonuclease. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (29), 9940-9943.
- (104) Kirsebom, L. A.; Ciesiolka, J., Pb²⁺-induced Cleavage of RNA. In *Handbook of RNA Biochemistry*, Wiley-VCH **2008**.
- (105) Kienitz, H., Einführung in Massenspektrometrie. *VCH* **1968**.
- (106) Gross, J. H., Mass Spectrometry. 2nd Edition, *Springer* **2011**.
- (107) Fenn, J.; Mann, M.; Meng, C.; Wong, S.; Whitehouse, C., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, 246 (4926), 64-71.
- (108) www.bdal.com.
- (109) Amad, M. H.; Cech, N. B.; Jackson, G. S.; Enke, C. G., Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35 (7), 784-789.
- (110) Christoph A, S., Supramolecular chemistry goes gas phase: the mass spectrometric examination of noncovalent interactions in host-guest chemistry and molecular recognition. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, 194 (1), 11-39.
- (111) Cristoni, S.; Bernardi, L. R., Development of new methodologies for the mass spectrometry study of bioorganic macromolecules. *Mass Spectrom. Rev.* **2003**, 22 (6), 369-406.
- (112) Heck, A. J. R.; van den Heuvel, R. H. H., Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, 23 (5), 368-389.
- (113) Colton, R.; D'Agostino, A.; Traeger, J. C., Electrospray mass spectrometry applied to inorganic and organometallic chemistry. *Mass Spectrom. Rev.* **1995**, 14 (2), 79-106.
- (114) Traeger, J. C., Electrospray mass spectrometry of organometallic compounds. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, 200 (1-3), 387-401.

- (115) Henderson, W.; McIndoe, S. J., *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds*. 1st Edition, *Wiley* **2005**.
- (116) Poon, G. K.; Bisset, G. G. F.; Prakash, M., Electrospray ionization mass spectrometry for analysis of low-molecular-weight anticancer drugs and their analogues. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4* (7), 588-595.
- (117) Gaskell, S. J., Electrospray: Principles and Practice. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32* (7), 677-688.
- (118) Castleberry, C. M.; Rodicio, L. P.; Limbach, P. A., Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Oligonucleotides. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2008**, *35*, 10.2.1-10.2.19.
- (119) Sannes-Lowery, K. A.; Mack, D. P.; Hu, P.; Mei, H.-Y.; Loo, J. A., Positive ion electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8* (1), 90-95.
- (120) Apffel, A.; Chakel, J. A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W. S., Analysis of Oligonucleotides by HPLC–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (7), 1320-1325.
- (121) Haynes, C. A., Analysis of mammalian fatty acyl-coenzyme A species by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *BBA-Mol. Cell Biol.* **2011**, *1811* (11), 663-668.
- (122) Gamagedara, S.; Ma, Y., Biomarker analysis for prostate cancer diagnosis using LC–MS and CE–MS. *Bioanalysis* **2011**, *3* (18), 2129-2142.
- (123) Sisu, E.; Flangea, C.; Serb, A.; Zamfir, A., Modern developments in mass spectrometry of chondroitin and dermatan sulfate glycosaminoglycans. *Amino Acids* **2011**, *41* (2), 235-256.
- (124) Suzuki, T.; Quilliam, M. A., LC-MS/MS Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) Toxins, Okadaic Acid and Dinophysistoxin Analogues, and Other Lipophilic Toxins. *Anal. Sci.* **2011**, *27*, 571.
- (125) Zuba, D., Identification of cathinones and other active components of 'legal highs' by mass spectrometric methods. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2012**, *32* (0), 15-30.
- (126) Boyer, A. E.; Gallegos-Candela, M.; Lins, R. C.; Kuklennyik, Z.; Woolfitt, A.; Moura, H.; Kalb, S.; Quinn, C. P.; Barr, J. R., Quantitative Mass Spectrometry for Bacterial Protein Toxins — A Sensitive, Specific, High-Throughput Tool for Detection and Diagnosis. *Molecules* **2011**, *16* (3), 2391-2413.
- (127) Bleicher, K.; Bayer, E., Analysis of oligonucleotides using coupled high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Chromatographia* **1994**, *39* (7), 405-408.
- (128) Chen, Y. G.; Kowtoniuk, W. E.; Agarwal, I.; Shen, Y.; Liu, D. R., LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5* (12), 879-881.
- (129) Aspler, J.; Carlsson, D. J.; Wiles, D. M., Initiation of Polypropylene Photooxidation. 1. Polynuclear Aromatic Compounds. *Macromolecules* **1976**, *9* (5), 691-695.
- (130) Catalani, L. H.; Wilson, T., Electron transfer and chemiluminescence. Two inefficient systems: 1,4-dimethoxy-9,10-diphenylanthracene peroxide and diphenoyl peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (7), 2633-2639.
- (131) Nowakowska, M., Anthracene sensitized photooxidation of polystyrene, 1. Photochemical reactivity of anthracene in hexane solution. *Makromol. Chem.* **1978**, *179* (12), 2953-2958.
- (132) Sigman, M. E.; Zingg, S. P.; Pagni, R. M.; Burns, J. H., Photochemistry of anthracene in water. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (41), 5737-5740.
- (133) Dabestani, R.; Ellis, K. J.; Sigman, M. E., Photodecomposition of anthracene on dry surfaces: products and mechanism. *J. Photochem. Photobiol., A* **1995**, *86* (1-3), 231-239.
- (134) Fukuzumi, S.; Nakanishi, I.; Tanaka, K., Multielectron Oxidation of Anthracenes with a One-Electron Oxidant via Water-Accelerated Electron-Transfer Disproportionation of the Radical Cations as the Rate-Determining Step. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103* (50), 11212-11220.

- (135) Turro, N. J.; Chow, M. F., Mechanism of thermolysis of endoperoxides of aromatic compounds. Activation parameters, magnetic field, and magnetic isotope effects. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (24), 7218-7224.
- (136) Schmidt, R.; Brauer, H. D., Comparison of the photochemical and thermal rearrangement reaction of endoperoxides. *J. Photochem.* **1986**, *34* (1), 1-12.
- (137) Rigaudy, J.; Sparfel, D., Transformations thermiques des photooxydes meso des acenes—IV: Cas du photooxyde de naphtacene. *Tetrahedron* **1978**, *34* (1), 113-121.
- (138) Jesse, K.; Comes, F. J., Rate parameters for the two-step photofragmentation of aromatic endoperoxides in solution. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95* (3), 1311-1315.
- (139) Rigaudy, J.; Breliere, C.; Scribe, P., Photochemistry of 9,10-diphenylanthracene endoperoxide. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19* (7), 687-690.
- (140) Donkers, R. L.; Workentin, M. S., Elucidation of the Electron Transfer Reduction Mechanism of Anthracene Endoperoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (6), 1688-1698.
- (141) Fidler, H.; Lauer, A.; Freyer, W.; Koeppe, B.; Heyne, K., Photochemistry of Anthracene-9,10-endoperoxide. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (22), 6289-6296.
- (142) Reed, G. H.; Markham, G. D., EPR of Mn(II) complexes with enzymes and other proteins. *Biol. Magn. Reson.* **1984**, *6*, 73-142.
- (143) Kisseleva, N.; Kraut, S.; Jäschke, A.; Schiemann, O., Characterizing multiple metal ion binding sites within a ribozyme by cadmium-induced EPR silencing. *HFSP J.* **2007**, *1* (2), 127-36.
- (144) Pley, H. W.; Flaherty, K. M.; McKay, D. B., Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* **1994**, *372* (6501), 68-74.
- (145) Scott, W. G.; Finch, J. T.; Klug, A., The crystal structure of an All-RNA hammerhead ribozyme: A proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell* **1995**, *81* (7), 991-1002.
- (146) Scott, W. G.; Murray, J. B.; Arnold, J. R. P.; Stoddard, B. L.; Klug, A., Capturing the Structure of a Catalytic RNA Intermediate: The Hammerhead Ribozyme. *Science* **1996**, *274* (5295), 2065-2069.
- (147) Irving, H.; Williams, R. J. P., 637. The stability of transition-metal complexes. *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1953**, 3192-3210.
- (148) Martin, B. R., Metal ion stabilities correlate with electron affinity rather than hardness or softness. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *283* (1), 30-36.
- (149) Pearson, R. G., Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (22), 3533-3539.
- (150) Pearson, R. G., Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. *J. Chem. Educ.* **1968**, *45* (9), 581.
- (151) Pearson, R. G., Hard and soft acids and bases, HSAB, part II: Underlying theories. *J. Chem. Educ.* **1968**, *45* (10), 643.
- (152) Parr, R. G.; Pearson, R. G., Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (26), 7512-7516.
- (153) Holleman, A. F.; Wiberg, E.; Wiberg, N., Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 101. Auflage, *Walter de Gruyter* **1995**.
- (154) Bereźniak, T.; Zahran, M.; Imhof, P.; Jäschke, A.; Smith, J. C., Magnesium-dependent active-site conformational selection in the Diels-Alderase ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (36), 12587-96.
- (155) Vogelsang, J.; Kasper, R.; Steinhauer, C.; Person, B.; Heilemann, M.; Sauer, M.; Tinnefeld, P., A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2008**, *47* (29), 5465-5469.
- (156) Gregory, J. D., The Stability of N-Ethylmaleimide and its Reaction with Sulfhydryl Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (14), 3922-3923.
- (157) Matsui, S.; Aida, H., Hydrolysis of some N-alkylmaleimides. *J. Chem. Soc. Perk. T. 2* **1978**, (12), 1277-1280.
- (158) Edsall, J. T.; Wyman, J., Biophysical chemistry. 1st Edition, *Academic Press Inc.* **1958**.

- (159) Ballinger, P.; Long, F. A., Acid Ionization Constants of Alcohols. II. Acidities of Some Substituted Methanols and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (4), 795-798.
- (160) Takino, M.; Daishima, S.; Yamaguchi, K.; Nakahara, T., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using silver nitrate as a post-column reagent. *J. Chromatogr. A* **2001**, *928* (1), 53-61.
- (161) Lien, G.-W.; Chen, C.-Y.; Wu, C.-F., Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization or electrospray ionization with tropylium post-column derivatization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21* (22), 3694-3700.
- (162) van Leeuwen, S. M.; Hayen, H.; Karst, U., Liquid chromatography–electrochemistry–mass spectrometry of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378* (4), 917-925.
- (163) Keiper, S., *Inaugural-Dissertation: Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von Ribozymen für eine Diels-Alder-Reaktion*. Universität Heidelberg, **2003**.
- (164) Kraut, S.; Bebenroth, D.; Nierth, A.; Kobitski, A. Y.; Nienhaus, G. U.; Jäschke, A., Three critical hydrogen bonds determine the catalytic activity of the Diels–Alderase ribozyme. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (3), 1318-1330.
- (165) Chiorcea-Paquim, A. M.; Piedade, J. A.; Wombacher, R.; Jäschke, A.; Oliveira-Brett, A. M., Atomic force microscopy and anodic voltammetry characterization of a 49-mer diels-alderase ribozyme. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (24), 8256-8264.
- (166) Wombacher, R.; Jäschke, A., Probing the active site of a diels-alderase ribozyme by photoaffinity cross-linking. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (27), 8594-8595.
- (167) Nierth, A.; Singer, M.; Jäschke, A., Efficient photoactivation of a Diels-Alderase ribozyme. *Chem. Commun. (Camb.)* **2010**, *46* (42), 7975-7957.
- (168) Wahl, F., *Inaugural-Dissertation: Modified Oligonucleotides: Investigations and Applications of the Diels-Alderase Ribozyme.*, Universität Heidelberg, **2011**.
- (169) Jaeger, L.; Verzemnieks, E. J.; Geary, C., The UA_handle: a versatile submotif in stable RNA architectures. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (1), 215-230.
- (170) Krasilnikov, A. S.; Mondragón, A., On the occurrence of the T-loop RNA folding motif in large RNA molecules. *RNA* **2003**, *9* (6), 640-643.
- (171) Nagaswamy, U.; Fox, G. E., Frequent occurrence of the T-loop RNA folding motif in ribosomal RNAs. *RNA* **2002**, *8* (9), 1112-1119.
- (172) Mielcarek, M.; Barciszewska, M. Z.; Sałanski, P.; Stobiecki, M.; Jurczak, J.; Barciszewski, J., Native transfer RNA catalyzes Diels–Alder reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *294* (1), 145-148.
- (173) Bereźniak, T.; Jäschke, A.; Smith, J. C.; Imhof, P., Stereoselection in the Diels–Alderase ribozyme: A molecular dynamics study. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33* (19), 1603-1614.
- (174) Nierth, A.; Kobitski, A. Y.; Nienhaus, G. U.; Jäschke, A., Anthracene-BODIPY dyads as fluorescent sensors for biocatalytic Diels-Alder reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (8), 2646-2654.
- (175) McNaught, A. D.; Wilkinson, A., IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. 2nd Edition, *Blackwell Scientific Publications* **1997**.
- (176) Shan, S.; Herschlag, D., Energetic Effects of Multiple Hydrogen Bonds. Implications for Enzymatic Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (24), 5515-5518.
- (177) 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), 1934-1940.
- (178) 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), 1929-1933.
- (179) Zagryadskaya, E. I.; Doyon, F. R.; Steinberg, S. V., Importance of the reverse Hoogsteen base pair 54-58 for tRNA function. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (14), 3946-3953.

-
- (180) Fiammengo, R.; Musilek, K.; Jäschke, A., Efficient preparation of organic substrate-RNA conjugates via in vitro transcription. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (25), 9271-9276.
- (181) Heitz, J. R.; Anderson, C. D.; Anderson, B. M., Inactivation of yeast alcohol dehydrogenase by N-alkylmaleimides. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *127* (0), 627-636.
- (182) Stuhlmann, F., Unpublizierte Daten.
- (183) Nichols, N. M.; Tabor, S.; McReynolds, L. A., RNA Ligases. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2009**, *84*, 3.15.1-3.15.4.
- (184) Sambrook, J. F.; Russel, D. W., Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **2001**.
- (185) Typhoon User's Guide v3.0. *Amersham Biosciences* **2002**.
- (186) Tuma, R. S.; Beaudet, M. P.; Jin, X.; Jones, L. J.; Cheung, C.-Y.; Yue, S.; Singer, V. L., Characterization of SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain: A Dye Optimized for Use with 300-nm Ultraviolet Transilluminators. *Anal. Biochem.* **1999**, *268* (2), 278-288.
- (187) <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.
- (188) Gottwald, W., Statistik für Anwender. 1. Auflage, *Wiley-VCH* **2000**.
- (189) Schlatterer, J. C., *Inaugural-Dissertation: Funktionalisierte Nukleinsäuren: Studien & Selektion von Ribozymen*. Universität Heidelberg, **2003**.
- (190) DeLano, W. L., The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.1beta4. Schrödinger, Ed. LLC. <http://www.pymol.org> **2002**.