

# Charakterisierung des CPEB3 Ribozyms

---

Studien zur Aufklärung des Mechanismus eines  
humanen Ribozyms

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
***Katharina Kulikov***  
aus  
Almalyk, Usbekistan

Bonn, September 2018

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Famulok

2. Gutachter: PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert

Tag der Promotion: 01.02.2019

Erscheinungsjahr 2019

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit sowohl ohne unerlaubte Hilfe Dritter als auch ohne die Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Daten, Konzepte und Ideen, die direkt oder indirekt aus Quellen übernommen wurden, sind entsprechend gekennzeichnet. Weder im In- noch Ausland wurde diese Arbeit in dieser oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Bonn, den 24. September 2018

---

Katharina Kulikov

*Per aspera ad astra.*

## Danksagung

Diese Arbeit entstand in dem Zeitraum von März 2014 bis Dezember 2017. An dieser Stelle möchte ich mich bei *Dr. Stephanie Kath-Schorr* für die interessante Themenstellung, die große wissenschaftliche Freiheit, die Geduld und die vielen Anregungen während meiner Promotionszeit bedanken. Ihre Motivation, Begeisterung, Fachkompetenz und Führungsqualität haben einen sehr großen Teil zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Ich bedanke mich ganz herzlich für ihre hervorragende Unterstützung während des gesamten Promotionsprozesses und meiner Zeit am LIMES-Institut.

Den Mitgliedern der Prüfungskommission danke ich für ihre Bemühungen und ihren zeitlichen Aufwand bei der Evaluierung der vorliegenden Arbeit. Bei PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats. Auch *Prof. Dr. Sven Burgdorf* und *Prof. Dr. Jochen Sautermeister* gilt mein Dank für die Komplettierung der Prüfungskommission als Dritt- und Viertprüfer. Ferner danke ich *Prof. Dr. Michael Famulok* und *Prof. Dr. Günter Mayer* für die Möglichkeit, in ihren Räumlichkeiten arbeiten zu dürfen.

Ebenso gilt mein aufrichtiger Dank an *Dr. Senada Nozinovic* für die erfolgreiche Kooperation im Bereich der NMR-Spektroskopie. Ihre Fachkenntnis und ihre Expertise hat die NMR-Spektroskopie von Oligonukleotiden erst ermöglicht und somit einen wichtigen Teil zu dieser Arbeit beigetragen. Auch bei ihren Mitarbeitern bedanke ich mich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Für die finanzielle Unterstützung und Förderung während der ersten 25 Monate des Promotionsstudiengangs bedanke ich mich beim Fonds der Chemischen Industrie.

Ferner bedanke ich mich bei *Svenja Wagener* und *Martha Porniece-Kumar* für Ihre Master- und Bachelorarbeit zu dem Thema der Erforschung des CPEB3 Ribozyms. Eure Ergebnisse haben mich zu weiteren, neuen Ansätzen, Ansichtsweisen und Interpretationen in der Untersuchung des CPEB3 Ribozyms geleitet und inspiriert.

An meine arbeitskreisinternen Kollegen *Christof Domnick* und *Frank Eggert* geht mein Dank für die Kooperation sowie die angenehme Atmosphäre im Labor. Ich danke euch für die vielen Anregungen, die Hilfe in fachlichen Fragen, die insgesamt großartige Organisation des Labors mit euch und den Austausch, sowohl auf der fachlichen als auch auf der zwischenmenschlichen Ebene. Ich werde immer an die vielen Schlemmereien mit kulinarischen Köstlichkeiten, eigens zubereitet in der Küche des 3. Stockwerks, zurückdenken.

Den gesamten Arbeitskreisen *Famulok* und *Mayer* danke ich für das angenehme, familiäre Klima, das sich durch mehrere Stockwerke durchzog. Ich kann nicht mehr die vielen Male zählen, bei denen ich die Hilfestellung in den verschiedensten Fragen sehr zu schätzen wusste - danke für diese Zeit. Ich wünsche euch allen viel Erfolg bei euren Doktorarbeiten, Projekten und Karrierewegen.

*Franziska Pfeiffer, Anna Maria Pyka und Julia Siegl* gilt mein tiefster Dank für die Übernahme des gewissenhaften Korrekturlesens dieser Arbeit. Ich weiß eure investierte Mühe, Zeit und Ratschläge sehr zu schätzen.

Ständige Unterstützung erfuhr ich von meinen Eltern, *Helene* und *Sergej Kulikov*, meiner kleinen Schwester *Julia*, meiner gesamten Familie sowie von meinen Freunden *Nisanthini Ravinthiranatan, Rupika Sivanesapillai, Jennifer Breitzkreuz* und *Natascha Riedel*. Ich bin euch so unendlich dankbar für alles, was ihr mich gelehrt und mir geschenkt habt. Ich wäre nicht die Person, die ich heute bin, wenn ihr mich nicht unermüdlich motiviert, aufgebaut und mit euren Ratschlägen und eurer Hilfe in allen Lebenslagen unterstützt hättet.

Auch wenn du nicht mehr in meinem Leben bist, so danke ich dir, *Erik Vogel*, für deine Unterstützung, deinen Glauben an mich, dein offenes Ohr zu jeder Zeit und deine Geduld mit mir. Ich wünsche dir alles Glück der Welt auf deinen weiteren Lebensweg.

Schließlich danke ich dir, *Sebastian Quandt*, für deine Unterstützung in den letzten zwei Jahren dieser Arbeit. Du hast mir viele neue Wege auf den verschiedensten Gebieten eröffnet und mir somit geholfen, endlich ehrlich zu mir zu sein und ein Stück von mir selbst zurück zu gewinnen. Du wurdest nicht müde, mich immer wieder zu motivieren, beabsichtigt oder nicht, mein bestes Ich zu sein. Ich danke dir von ganzem Herzen dafür, dass du in meinem Leben bist.

**Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:**

- ChemBioChem* K. Kulikov, S. Nozinovic, S. Kath-Schorr  
2017:18:969-73 *The 5'-AG<sub>5</sub>CC-3' fragment from the human CPEB3 ribozyme forms an ultrastable parallel RNA G-quadruplex*
- Methods* F. Eggert, K. Kulikov, C. Domnick, P. Leifels, S. Kath-Schorr  
2017:120:17-27 *Illuminated by foreign letters - Strategies for site-specific cyclopropene modification of large functional RNAs via in vitro transcription*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>14</b>
3.1	Funktionelle RNA.....	14
3.1.1	Ribozyme .....	15
3.1.2	Katalyse-Potential von RNA.....	17
3.1.3	Metall-Ionen in der Ribozym-Katalyse.....	21
3.2	HDV-ähnliche Ribozyme.....	22
3.2.1	Das HDV Ribozym als Modell-Ribozym .....	22
3.2.1.1	Strukturelle Eigenschaften des HDV Ribozyms und seines Spaltungsorts .....	23
3.2.1.2	Spaltungsmechanismus des HDV Ribozyms .....	25
3.2.2	Das CPEB3 Ribozym.....	29
3.2.2.1	Strukturelle Eigenschaften des CPEB3 Ribozyms .....	30
3.2.2.2	Bisherige Erkenntnisse zum Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms .....	32
3.3	Der G-Quadruplex als eine Alternative zum klassischen Watson-Crick-Basenpaarung.....	38
3.3.1	DNA und RNA G-Quadruplexe .....	38
3.3.2	Untersuchungsmethoden zur Aufklärung der Struktur von G-Quadruplexen .....	41
3.3.2.1	UV Spektroskopie und die Schmelztemperatur eines G-Quadruplexes.....	41
3.3.2.2	CD Spektroskopie.....	43
3.3.2.3	Elektrophoretische Methoden .....	44
3.3.2.4	NMR Spektroskopie.....	45
3.4	Untersuchung von Oligonukleotiden mithilfe von Fluoreszenz-basierten Methoden.....	48
3.4.1	Kombination von Aptameren und fluoreszenten Sonden .....	48
3.4.1.1	Anwendung des Brokkoli-Aptamers in der Erforschung des CPEB3 Ribozyms.....	50
3.4.2	Unnatürliche Basenpaare in der Oligonukleotid-Forschung .....	52
<b>4</b>	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>58</b>
5.1	Der Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms .....	58
5.1.1	Rekonstruktion eines aktiven CPEB3 RNA Moleküls aus kleineren Oligonukleotiden.....	58
5.1.2	Kinetische Aktivität des rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms...60	
5.1.3	Wiederherstellung der Spaltungsaktivität der CPEB3 Ribozym C <sub>57</sub> U Mutante63	
5.1.4	pH-Abhängigkeit des rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms .....	64
5.1.5	Metall-Promiskuität des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms .....	68
5.1.5.1	Mg <sup>2+</sup> -Abhängigkeit und der Effekt von K <sup>+</sup> -Ionen auf die Spaltungsreaktion ....	68
5.1.5.2	Effekt divalenter Metall-Ionen auf den Reaktionsweg des CPEB3 Ribozyms .....	70
5.1.5.2.1	Metall-Promiskuität der Ribozyme CPEB3 und HDV.....	70

5.1.5.2.2	Die Ionen $Mn^{2+}$ und $Zn^{2+}$ - relevante Faktoren im CPEB3 Ribozym Mechanismus? .....	72
5.1.6	Co-transkriptionale Spaltung des WT CPEB3 Ribozyms .....	78
5.1.6.1	Untersuchung der Spaltungsaktivität des nativen $^{32}P$ -markierten CPEB3 Ribozyms .....	78
5.1.6.2	Entwicklung eines co-transkriptionalen Spaltungsassays auf der Grundlage des UBP dNaM - TPT3 <sup>CP</sup> .....	80
5.1.6.3	Das unnatürliche Nukleosid TPT3 <sup>CP</sup> an der Spaltungsstelle des CPEB3 Ribozyms .....	86
5.2	Der G-Quadruplex als strukturelle Besonderheit in einem Ribozym .....	87
5.2.1	Entdeckung eines stabilen G-Quadruplexes: elektrophoretische Studien des Substratstrangs G <sub>5</sub> -16 aus dem CPEB3 Ribozym .....	87
5.2.2	Charakterisierung des G-Quadruplexes .....	90
5.2.2.1	UV Spektrometrie und CD Spektroskopie der Substratstränge .....	90
5.2.2.2	Effekte des Porphyrins TMPyP4 auf den G-Quadruplex .....	92
5.2.3	NMR Spektroskopie von CPEB3 Ribozym Fragmenten .....	96
5.2.3.1	Untersuchung des Grundmotivs 5'-AG <sub>5</sub> CC-3' .....	96
5.2.3.2	NMR-spektroskopischer Einblick in die Iminoregion eines gespaltenen CPEB3 Ribozyms .....	101
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick in zukünftige Studien .....</b>	<b>105</b>
6.1	Sammlung kinetischer Daten zum CPEB3 Ribozym .....	105
6.1.1	Untersuchung des Spaltungsmechanismus mit der Beteiligung des $Mg^{2+}$ und C <sub>57</sub> .....	105
6.2	Regulation oder nicht - die potentielle Rolle eines stabilen G-Quadruplexes im CPEB3 Ribozym .....	110
6.3	Die Aufgabe des CPEB3 Ribozyms - ein Forschungsfeld der Zukunft .....	112
<b>7</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>114</b>
7.1	Material .....	114
7.1.1	Chemikalien und Enzyme .....	114
7.1.2	Lösungen und Puffer .....	115
7.1.3	Ausrüstung .....	116
7.1.4	Software .....	118
7.1.5	Standards, Nukleotide und synthetische Oligonukleotide .....	118
7.2	Methoden .....	121
7.2.1	PCR .....	121
7.2.2	Agarose Gel Elektrophorese .....	121
7.2.3	Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung .....	121
7.2.4	Transkription eines PCR-Produkts .....	122
7.2.5	Elektroelution .....	122
7.2.6	EtOH-Fällung .....	122
7.2.7	DNase I Verdau .....	122
7.2.8	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	123

7.2.9	Dephosphorylierung des 5'-Endes von Oligonukleotiden .....	123
7.2.10	<sup>32</sup> P-Markierung von RNA Oligonukleotiden am 5'-Ende .....	123
7.2.11	Ribozym Spaltung .....	123
7.2.11.1	Drei-strängiges CPEB3 Ribozym .....	123
7.2.11.1.1	Rekonstruktion des Ribozyms aus den Strängen CPEB3 A, CPEB3 B und G <sub>5</sub> -16.....	123
7.2.11.1.2	Spaltungsassay des drei-strängigen CPEB3 Ribozyms .....	124
7.2.12	Zwei-strängiges Ribozym.....	124
7.2.12.1	Rekonstruktion des Ribozyms aus den Strängen CPEB3 SA und CPEB3 B124	
7.2.12.2	Allgemeiner Spaltungsassay des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms .....	124
7.2.12.3	Wiederherstellung der Spaltungsaktivität der rekonstruierten 2-Strang-CPEB3 Ribozym C <sub>57</sub> U Mutante .....	125
7.2.13	Natives Ribozym.....	125
7.2.13.1	Kinetische Untersuchung des CPEB3 Ribozyms in seiner nativen Struktur .125	
7.2.13.2	Allgemeine co-transkriptionale Fluoreszenz-basierte Spaltung des CPEB3 Ribozyms.....	125
7.2.13.3	TPT3 <sup>CP</sup> Inkorporation durch 3'-Extension im CPEB3 Transkript .....	126
7.2.14	RNase T1 Verdau der Substrat Stränge mit dem 5'-AG <sub>5</sub> CC-3'- bzw. 5'-AG <sub>2</sub> CG <sub>2</sub> CC-3'-Motiv.....	127
7.2.15	Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE).....	127
7.2.15.1	Allgemeine denaturierende PAGE .....	127
7.2.15.2	Allgemeine native PAGE .....	127
7.2.16	ThT-Färbung.....	128
7.2.17	Entsalzverfahren der RNA .....	128
7.2.17.1	HPLC.....	128
7.2.17.2	<i>Sep-Pak</i> Kartusche.....	128
7.2.17.3	<i>Amicon</i> <sup>®</sup> <i>Ultra</i> Zentrifugalfilter .....	128
7.2.17.4	G25-Spin Säule .....	128
7.2.17.5	Filtration von Partikeln in Oligonukleotidlösungen.....	129
7.2.18	CD Spektroskopie.....	129
7.2.18.1	Allgemeiner Versuchsablauf .....	129
7.2.18.2	CD Spektroskopie mit dem Porphyrin TMPyP4.....	129
7.2.19	NMR Spektroskopie.....	129
7.2.20	UV-Vis Spektroskopie.....	130
7.2.21	LC-MS .....	130
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>131</b>
8.1	Der Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms .....	131
8.1.1	Studien mit dem <i>in vitro</i> rekonstruierten Ribozym .....	131
8.1.1.1	Kinetische Aktivität des rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms.131	
8.1.1.2	Wiederherstellung der Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozym C <sub>57</sub> U Mutanten.....	133
8.1.1.3	pH-Abhängigkeit der rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms.....	134
8.1.1.4	Metall-Promiskuität des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms .....	143

8.1.1.4.1	Mg <sup>2+</sup> -Abhängigkeit und der Effekt von K <sup>+</sup> -Ionen auf die Spaltungsreaktion.....	143
8.1.1.4.2	Effekt divalenter Metall-Ionen auf den Reaktionsweg des CPEB3 Ribozyms.....	154
8.1.1.4.2.1	Metall-Promiskuität der Ribozyme CPEB3 und HDV.....	154
8.1.1.4.2.2	Die Ionen Mn <sup>2+</sup> und Zn <sup>2+</sup> - relevante Faktoren im CPEB3 Ribozym Mechanismus?.....	162
8.1.2	Studien mit dem CPEB3 Ribozym in seiner nativen Länge auf der Basis der BODIPY-Fluoreszenz .....	177
8.1.2.1	Untersuchung der Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozyms bei vorausgehender Generierung via T7 Transkription mit anschließender kinetischer Untersuchung .....	177
8.1.2.2	Entwicklung eines co-transkriptionalen Spaltungsassay auf der Grundlage des UBP dNaM - TPT3 <sup>CP</sup> .....	179
8.2	Der G-Quadruplex als strukturelle Besonderheit in einem Ribozym .....	183
8.2.1	Charakterisierung des G-Quadruplexes.....	183
8.2.1.1	Effekte des Porphyrins TMPyP4 auf den G-Quadruplex .....	183
8.2.2	NMR Spektroskopie von CPEB3 Ribozym Fragmenten.....	183
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	184
8.4	Tabellenverzeichnis .....	186
8.5	Abkürzungsverzeichnis.....	187
<b>9</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>190</b>

## 1 Zusammenfassung

Kurze RNA Stränge mit enzymatischer Aktivität sind als Ribozyme bekannt. Das HDV-ähnliche CPEB3 Ribozym ist eine wenig erforschte selbstspaltende RNA. Es existiert in einer einzelnen hochkonservierten Kopie in der Sequenz des zweiten Introns im *cpeb3* Gen einer Vielzahl von Säugern. Das primäre Ziel dieser Dissertation war die Charakterisierung des CPEB3 Ribozyms mittels der Untersuchung des Spaltungsmechanismus und der Regulation. Die Ergebnisse sollen zukünftige Studien zur Rolle des CPEB3 Ribozyms in der Genregulation bei Säugern und im Menschen unterstützen. Bisher wurde das für die Spaltung essentielle C<sub>57</sub> identifiziert. Höchstwahrscheinlich ist es an einem Säure-Base-Mechanismus mit C<sub>57</sub> als Säure und Mg<sup>2+</sup> als Base beteiligt.

Zwei Methoden sollten zur Charakterisierung der kinetischen Aktivität des CPEB3 Ribozyms eingesetzt werden. Das Ribozym sollte aus einem langen, Struktur-gebenden 5'-<sup>32</sup>P-markierten Strang mit der Spaltungsposition und einem kurzen Strang mit dem C<sub>57</sub> *in vitro* rekonstruiert werden. Diese Methode sollte in weiteren *in vitro* Studien eingesetzt werden. Das erstmals erfolgreich rekonstruierte CPEB3 Ribozym zeigte eine mit früheren Studien vergleichbare Aktivität. Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit bot in der Auftragung der Spaltungsraten bei pH 5 - 9 einen Glocken-ähnlichen Kurvenverlauf, der auf zwei ionisierbare Gruppen hindeutete. Zur Untersuchung der Ionen-Promiskuität wurden die Metall-Ionen K<sup>+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup> getestet. Besonders Mn<sup>2+</sup> rief eine ähnliche Aktivität wie Mg<sup>2+</sup> hervor. Ferner unterschieden sich die getesteten Ionen in der Fähigkeit, das Ribozym korrekt zu falten. Insbesondere Mn<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> wiesen anhand der gespaltenen Fraktion nach Reaktionsende eine eindeutige Unterstützung bis hin zu einer fast vollständigen Spaltung und somit Faltung des Ribozyms auf.

Aufgrund der langsamen *in vitro* Reaktivität des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms sollten co-transkriptionale Studien des vollständigen CPEB3 Ribozyms Einblicke in die reale Reaktionsgeschwindigkeit liefern. Durch ein unnatürliches Basenpaar sollte in einer Transkriptionsreaktion und einer Kopplungsreaktion eine Fluoreszenz-Sonde ortsspezifisch eingeführt werden. Das Reaktionsprofil entsprach den bisherigen Daten aus co-transkriptionalen Assays mit einer internen <sup>32</sup>P-Markierung.

Strukturelle Studien des CPEB3 Ribozyms fokussierten sich auf die hochkonservierte Guanin-reiche Sequenz in der P1 Helix. Bei der Ribozym-Rekonstruktion aus drei kurzen Strängen aggregierte der Substratstrang in der denaturierenden PAGE Analyse zu einer langsam migrierenden Bande einer Struktur, die in Verbindung mit einem K<sup>+</sup>-haltigen Puffer eine starke Stabilität aufwies. Studien mittels der nativen und denaturierenden PAGE Analyse, CD Spektrometrie, UV Spektroskopie sowie 1D und 2D <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie bestätigten eine enorm stabile tetramolekulare, parallele G-Quadruplex-Struktur.

Diese Arbeit bietet neue Einblicke in die Spaltung und Faltung des CPEB3 Ribozyms. Nebst den Indizien auf zwei ionisierbare Gruppen konnten erstmals Daten zur Involvierung weiterer Metall-Ionen in den Spaltungsmechanismus gesammelt werden. Zudem wurde in der CPEB3 Ribozym Sequenz ein potentiell *in vivo* relevantes Guanin-reiches Fragment identifiziert.

## 2 Abstract

Short RNA strands with an enzymatic activity are known as ribozymes. The HDV-like CPEB3 ribozyme remains a sparsely investigated self-cleaving RNA. It was discovered in a single highly conserved copy in the sequence of the second intron of the *cpeb3* gene in several mammalian genomes. The primary objective of this thesis was the characterisation of the CPEB3 ribozyme focussing on the cleavage mechanism and the regulation mechanism. The results shall support future studies concerning the role of the CPEB3 ribozyme in gene regulation in mammals and in the human genome. So far, the C<sub>57</sub> which is essential for the cleaving mechanism, was identified. It is most likely involved in an acid-base mechanism with C<sub>57</sub> acting as an acid and Mg<sup>2+</sup> acting as a base.

Two methods should be used to characterise the kinetic activity of CPEB3 ribozyme. The ribozyme should be reconstructed *in vitro* from a long 5'-<sup>32</sup>P-labelled strand with the cleavage position and a short strand with the C<sub>57</sub>. This method should be used in further *in vitro* studies. The CPEB3 ribozyme, which was successfully reconstructed for the first time, showed an activity comparable to previous studies. The studies of the pH-dependency gave a bell-shaped curve in the plot of the cleavage rates at pH 5 - 9, which indicated two ionisable groups. The metal ions K<sup>+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> were tested for metal promiscuity. Especially Mn<sup>2+</sup> showed an activity similar to Mg<sup>2+</sup>. Furthermore, the tested ions differed in their ability to fold the ribozyme correctly. Based on the cleaved fraction at the end of the reaction, particularly Mn<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> showed clear folding support up to an almost complete cleavage and thus folding of the ribozyme.

Due to the slow *in vitro* reactivity of the reconstructed CPEB3 ribozyme, co-transcriptional studies of the CPEB3 ribozyme should provide insights into the real reaction rate. An unnatural base pair should be used to introduce a site-specific fluorescent probe using a transcription reaction and a coupling reaction. The reaction profile corresponded to the previously reported data from co-transcriptional assays with an internally <sup>32</sup>P-labelled ribozyme.

Structural studies of CPEB3 ribozyme focused on the highly conserved guanine-rich sequence in the P1 helix. The ribozyme reconstruction from three short strands yielded in an aggregation of the substrate strand which could be observed in denaturing PAGE analysis as a slowly migrating band. This structure exhibited a strong stability after the addition of a K<sup>+</sup>-containing buffer. Studies using native and denaturing PAGE analysis, CD spectrometry, UV spectroscopy and 1D and 2D <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy confirmed an extremely stable tetramolecular, parallel G-quadruplex structure.

This thesis provides new insights into the cleavage and folding mechanism of the CPEB3 ribozyme. In addition to the indications of two ionisable groups, data on the involvement of further metal ions in the cleavage mechanism were obtained for the first time. In addition, a potentially *in vivo* relevant Guanine-rich fragment was identified in the CPEB3 ribozyme sequence.

## 3 Einleitung

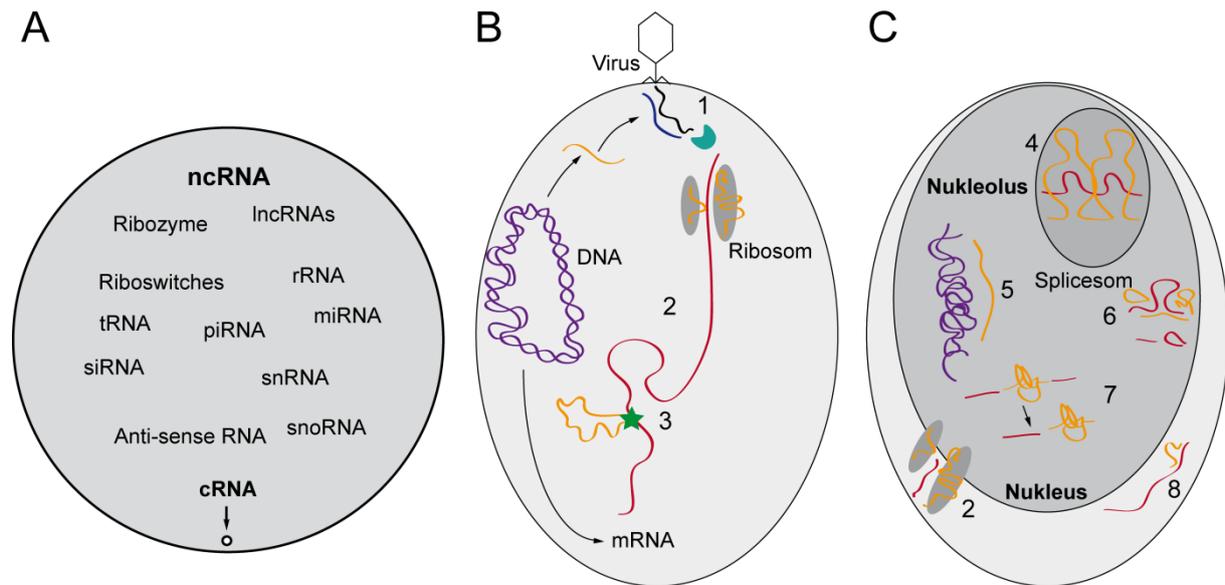
### 3.1 Funktionelle RNA

Die allgemeine Idee, dass das Leben auf der Erde ihren Ursprung in der auf RNA Replikation basierenden Evolution nahm, entwickelte sich in den 1960er Jahren.<sup>[1-3]</sup> Dieser zufolge übernimmt RNA neben der Aufgabe der Weitergabe der genetischen Information ähnlich eines DNA Moleküls, auch die katalytische Aufgabe eines Proteins. So entwickelte sich die These der "RNA Welt"<sup>[4]</sup>, die drei grundlegende Annahmen einbezog<sup>[5]</sup>:

- 1) An einem Punkt der Evolution des Lebens sicherte RNA Replikation die Kontinuität des Lebens.
- 2) Die Watson-Crick-Basenpaarung spielte eine zentrale Rolle in der Replikation.
- 3) Genetisch kodierte Proteine waren nicht an der Katalyse beteiligt.

Die Entdeckung der katalytischen Eigenschaften von RNA in Form von RNA-Enzymen, den sogenannten Ribozymen, in den 1980er Jahren untermauerte die Plausibilität einer RNA Welt.<sup>[6, 7]</sup> Auch wurde das heutige Verständnis der RNA als Übermittler einer genetischen Information (coding RNA, cRNA) durch die Entdeckung der funktionellen nichtkodierenden RNAs (ncRNAs) erweitert, sodass eine gleichzeitige Beteiligung in enzymatischen Reaktionen vermutet wurde.<sup>[8]</sup> Da einige RNA Moleküle in der Lage sind, sich in dreidimensionale Strukturen zu falten, können Enzym-ähnliche Bindungspositionen für andere Biomoleküle erzeugt und Interaktionen ermöglicht werden.<sup>[9]</sup> Seit dieser Entdeckung brachte die Forschung auf diesem Gebiet zahlreiche aktive RNAs zum Vorschein, allem voran die Ribozym-Moleküle. Zu den wichtigen Entdeckungen auf diesem Gebiet zählen unter anderem der glmS Riboswitch und das Hammerhead Ribozym.<sup>[10-14]</sup> Deren ubiquitäres Vorkommen in Zellen ebenso wie die Fülle an Variationen an aktiven RNAs unterstreicht deren Bedeutung sowohl in der urzeitlichen als auch in der modernen Biologie.

Die Entwicklung moderner Technologien auf dem Gebiet der Bioinformatik ermöglichte die Ermittlung einer Vielzahl ncRNA Familien mit diversen biologischen Funktionen in der Remodellierung des Genoms, der Genexpression und -regulation.<sup>[8]</sup> So konnten nun eine Vielzahl von Funktionen ncRNAs *in vivo* bestimmt werden. Schätzungsweise 98 % der transkriptionalen RNA Produktion im Menschen bringt ncRNAs hervor (Abbildung 3.1 A).<sup>[15]</sup> Die Erforschung dieser größtenteils immer noch bestehenden "Blackbox" ist bis heute ein großes Rätsel der Wissenschaft und eine enorme Aufgabe der Zukunft. Eine kurze Übersicht über die wichtigsten Aufgaben der funktionellen RNA sind in Abbildung 3.1 B und C aufgeführt.



**Abbildung 3.1: Diverse Funktionen von ncRNAs.** A: Das Verhältnis von ncRNA zur cRNA, obwohl beide durch Transkription produziert werden. B: Involvement funktioneller RNA in einer bakteriellen Zelle. Diese beteiligt sich in der Erkennung und beim Abbau viraler RNA über das CRISPR/Cas System (1). Ebenso ist funktionelle RNA verantwortlich für die Katalyse der Proteinbiosynthese im Ribosom (2). Schließlich beteiligen sich Riboswitches an der Regulation der Genexpression (3). C: Involvement funktioneller RNA in einer eukaryotischen Zelle. Auch hier katalysiert ribosomale RNA (rRNA) die Verknüpfung der Peptidbindung während der Proteinbiosynthese (2). Im Nukleolus wird rRNA durch funktionelle RNA modifiziert (4). Ferner ist funktionelle RNA bei Histonmodifikationen (5), im Splicen der prä-mRNA durch das Splicesom im Nukleus (6) und in Selbst-Splicing Vorgängen der RNA (Ribozyme; 7) beteiligt. Schließlich wird im Zytoplasma die Translation von mRNA über Inhibition mithilfe von miRNAs gesteuert (8). (Abbildung modifiziert aus<sup>[16]</sup>)

### 3.1.1 Ribozyme

Neben den Protein- und Metabolit-bindenden RNAs existieren auch vollkommen Protein-unabhängige katalytisch aktive RNAs. Diese sogenannten Ribozyme waren in der Vergangenheit in der Wissenschaft eher ein Vorkommnis in Viren, Prokaryoten und niederen Eukaryoten, weswegen eine eher untergeordnete Rolle in der Zelle in Betracht gezogen wurde. Die Entdeckung der weitreichenden Verbreitung von Ribozymen in allen Organismen jedoch suggerierte eine bisher unbekannte Rolle dieser Moleküle in der Natur.<sup>[17]</sup>

Aktuell sind vierzehn Klassen von Ribozymen, die in heutigen Organismen existieren, bekannt (Tabelle 3.1). Diese lassen sich in ihrem vorgeschlagenen Spaltungsmechanismus sowie in ihrer strukturellen Komplexität jeweils in drei Gruppen unterteilen. Die kleinen nukleolytischen Ribozyme spalten das Phosphodiesterückgrat durch den nukleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe der Ribose an den benachbarten 3',5'-Phosphodiester ohne die Beteiligung von Proteinen. Meist sind diese in der Replikation von RNA Viren sowie in der aus 3'-untranslatierten Regionen ausgehenden Genregulation involviert. Als Produkte dieser Reaktion resultieren die charakteristische 5'-OH-Gruppe und das 2'-3'-zyklische Phosphat. Typische Beispiele sind das HDV oder das glmS Ribozym. Auch große Ribozyme praktizieren Additions- und Verlagerungsreaktionen des Phosphodiesters, indem Sauerstoff-Nukleophile der 2'- und 3'-OH-Gruppen der Ribose oder Wassermoleküle aktiviert werden.

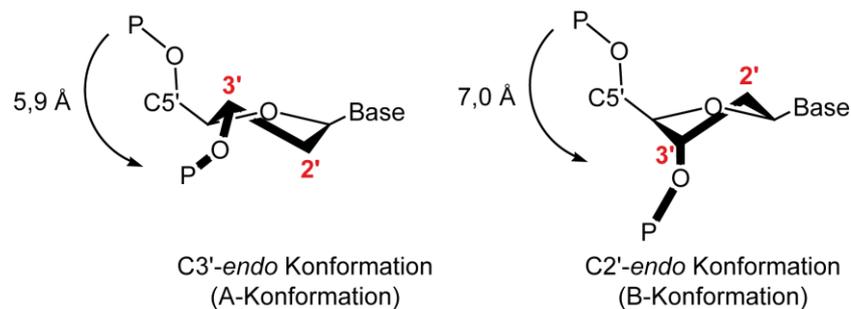
**Tabelle 3.1: Übersicht der bisher bekannten Ribozymklassen.** Die Einteilung erfolgt nach ihren vorgeschlagenen Spaltungsmechanismen. Die Gruppe i. zeigt die intramolekulare Hydrolyse der RNA über einen nukleophilen Angriff einer benachbarten 2'-OH-Gruppe. Diese Art der Katalyse findet sich in kleinen Ribozymen. Bei Gruppe ii. handelt es sich um einen intermolekularen Phosphoryl-Transfer, der in großen Ribozymen zu finden ist. Dabei repräsentieren die Gruppen R<sub>1</sub> die 2'- oder 3'-OH-Gruppe einer Ribose oder ein H<sub>2</sub>O Molekül. Gruppe iii. katalysiert die Amidolyse eines Aminosäure-Esters, die in einer Formation einer Peptidbindung endet. Diese Reaktion findet im Reaktionsort zur Peptidyl-Transferase im Ribosom statt. Die R<sub>1</sub>- und R<sub>2</sub>-Gruppen repräsentieren die 2'-OH-Gruppen der Aminoacyl-tRNAs in der ribosomalen A-Site und P-Site. (Tabelle modifiziert aus<sup>[18]</sup>)

<b>i. Kleine Ribozyme</b>		
Allgemeiner Mechanismus	Name	Referenz
	Hammerhead	[12]
	Ribozym	
	HDV Ribozym	[19]
	Hairpin	[20]
	Ribozym	
	VS Ribozym	[21]
	glmS Ribozym	[13]
	Twister	[22]
	Ribozym	
	Twister Sister	[23]
	Ribozym	
	Pistol Ribozym	[23]
Hatchet	[23]	
Ribozym		
<b>ii. Große Ribozyme</b>		
Allgemeiner Mechanismus	Name	Referenz
	Gruppe I	[24]
	selbst-splicendes	
	Intron	
	Gruppe II	[25]
	selbst-splicendes	
	Intron	
RNase P	[26]	
GIR1 Ribozym	[27]	
<b>iii. Ribosom</b>		
Allgemeiner Mechanismus	Name	Referenz
	rRNA	[28]

Letztendlich wird ein neuer 3',5'- oder 2',5'-Phosphodiester ausgebildet oder das Rückgrat, im Falle eines Wassermoleküls, gänzlich gespalten. Die dabei entstehenden Produkte sind ein 5'-Monophosphat und eine freie OH-Gruppe. Große Ribozyme umfassen die P RNA, die die katalytische Komponente der tRNA-prozessierenden Endonuklease RNase P darstellt, und zwei Klassen von selbst-splicenden Introns (Gruppe I und II). Bei der Gruppierung der RNase P muss zudem zwischen der RNase P bakteriellen und eukaryotischen Ursprungs unterschieden werden. Denn die RNA aus bakteriellen RNase Ps behält ihre katalytische Aktivität in Abwesenheit der Protein-Untereinheit, d.h. es handelt sich um ein vollständiges Ribozym. In Eukaryoten setzt sich die RNase P aus einem RNA Oligonukleotid sowie neun bis zehn assoziierten Proteinen (im Gegensatz zum einzelnen bakteriellen RNase P-Protein, C5) zusammen.<sup>[29, 30]</sup> Diese Protein-Untereinheiten von RNase P werden mit RNase MRP<sup>[31]</sup>, einem katalytischen Ribonukleoprotein, das an der Verarbeitung der ribosomalen RNA im Nukleolus beteiligt ist, geteilt.<sup>[32]</sup> RNase P aus Eukaryoten wurde erst kürzlich als Ribozym nachgewiesen.<sup>[33]</sup> Große Ribozyme katalysieren zwei aufeinanderfolgende ortsspezifische Umesterungsreaktionen. Schließlich verbleibt noch die ribosomale rRNA als der aktive Partner in der Reaktion des Peptidyl-Transfers im Ribosom als dritte Klasse. In der Zelle ist diese für die Synthese aller Proteine verantwortlich. Hierbei wird die Esterbindung zwischen der Aminosäure und der 3'-OH-Gruppe der tRNA durch einen Angriff eines primären Amins gespalten, sodass eine freie 3'-OH-Gruppe und eine Peptidbindung entstehen. Bei allen Gruppen der Ribozyme agiert RNA als die aktive Spaltungskomponente im Mechanismus. Proteine, die in den Gruppen ii. und iii. involviert sind, spielen dabei die Rolle eines Faltungshelfers um die katalytisch aktive Struktur des RNA Oligonukleotids zu erzielen.

### 3.1.2 Katalyse-Potential von RNA

Die Struktur der RNA als ein lineares Polymer aus vier ubiquitären Nukleotiden, die wiederum an einer Zucker-Phosphat-Kette gebunden sind, bestimmt deren Katalyse-Potential. Die Faltung des jeweiligen Oligonukleotids kann ferner eine Oligonukleotid-geförderte Katalyse begünstigen. Mit der klassischen Watson-Crick-Basenpaarung sind sowohl DNA als auch RNA Moleküle in der Lage, verschiedenen Strukturen auszubilden, unter anderem die antiparallele Doppelhelix. Die Faltung kann dabei in verschiedene Helix-Strukturen erfolgen. Die häufigsten Formen sind die A- und die B-Helix. Die Basis für die Helix-Konformation wird durch den sogenannten Zucker-Pucker bestimmt. Anders als Ringe mit sechs Komponenten sind Ringe mit fünf Atomen hochflexibel. Typischerweise ragt eines der Atome aus der planaren Ebene heraus, sodass in Cyclopentan-Ringen eine Reihe von *envelope*- und *half-chair*-Konformationen entstehen können. Diese Modi des Zucker-Puckerings werden durch die Verlagerung des 2'- und des 3'-Kohlenstoffs über die C1'-O4'-C4'-Atomebene definiert. Bei der Struktur, in die die Base und die C5'-Gruppe des Rings zeigen, handelt es sich um die *endo*-Konformation der Pentose (Abbildung 3.2). Ragt das C3'-Atom außerhalb der planaren Ebene des Zuckers, wird die Struktur C3'-*endo*-Konformation (A-Konformation) genannt. Bei einem Herausragen des C2'-Atoms handelt es sich um die C2'-*endo*-Konformation (B-Konformation). Die Konformation des Zucker-Puckers spielt eine entscheidende Rolle in der weiteren Faltung der Oligonukleotid-Helix. Aus der B- Konformation des Puckers resultiert die B-Form eines



**Abbildung 3.2: Zucker-Puckering des Pentoserings.** (Abbildung modifiziert aus<sup>[34]</sup>)

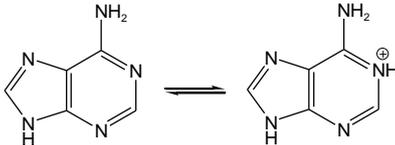
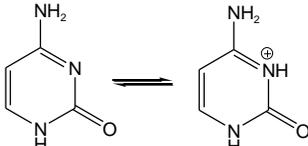
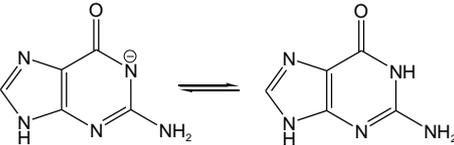
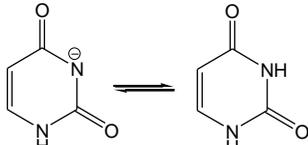
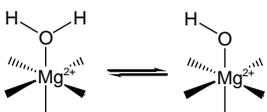
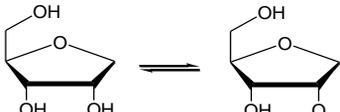
Oligonukleotids, die von DNA unter physiologischen Bedingungen in einem Doppelstrang ausbildet und so als die ubiquitäre Form angesehen wird.<sup>[35]</sup> Die A-Helix, die aus der C3'-endo-Konformation der Pentose resultiert, zeichnet sich durch ihren starren Charakter, der durch den Wasserverlust ausgehend von der B-Form entsteht, aus. Das C3'-Atom liegt über der Ebene aus den Atomen C4'-O4'-C1'. Daher wird von einer C3'-Konformation gesprochen. DNA ist in der Lage, beide Helix-Formen auszubilden, wohingegen RNA Doppelstränge bzw. DNA-RNA-Hybride vorzugsweise die A-Form einnehmen. Die C3'-endo-Konformation der Zuckereinheiten verhindert die sterische Hinderung, die durch die zusätzliche 2'-OH-Gruppe der RNA entsteht.

Einen weiteren Beitrag zur Flexibilität von Oligonukleotid-Strukturen leistet auch das Phosphodiesterückgrat. Hierbei handelt es sich um eine negativ geladene, flexible Struktur. Diese ist in der Lage, komplexe tertiäre Strukturen auch ohne die klassischen Watson-Crick-Basenpaare auszubilden. Dabei können innerhalb der Strukturen Reaktionsorte mit einem Potential für Katalyse entstehen. Die negative Ladung des Rückgrats begünstigt elektrostatische Wechselwirkungen und die Koordination von gelösten Kationen. Genauso tragen H-Brücken-Donatoren und -Akzeptoren innerhalb der Basen und der Ribose zur Stabilisierung einer übergeordneten tertiären Struktur sowie zur Positionierung des potentiellen Substrats am Reaktionsort bei.

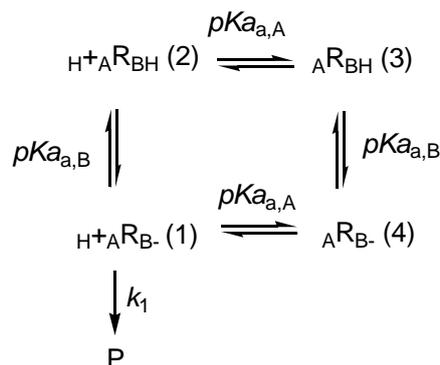
Für die Säure-Base-Katalyse durch die RNA ist die Verfügbarkeit der funktionellen Gruppen, die sich am Transfer von Protonen beteiligen können, entscheidend. Hierzu bietet der *pKa*-Wert der potentiellen Gruppen eine Übersicht über die Wahrscheinlichkeit der Teilnahme an einem Protonentransfer (Tabelle 3.2). Adenin und Cytosin besitzen den niedrigsten *pKa*-Wert. Folglich können diese einerseits bei einem neutralen pH-Wert als gute Säuren agieren. Dagegen bleibt für Guanin und Uracil aufgrund ihrer hohen *pKa*-Werte zu vermuten, dass diese als gute Basen dienen könnten. Jedoch ist die vorwiegende Form dieser Basen protoniert. Andererseits sind Adenin und Cytosin vorwiegend unprotoniert, was sie zu potentiellen Basen macht. Ihr niedriger *pKa*-Wert aber verringert die Wahrscheinlichkeit eines Protonentransfers bei einem neutralen pH-Wert. Genauso sind Guanin und Uracil in der Lage als H-Donoren zu handeln, was jedoch durch ihre hohen *pKa*-Werte verhindert wird. Trotzdem bleibt es zu berücksichtigen, dass durch strukturelle Veränderungen innerhalb eines RNA Moleküls *pKa*-Werte einzelner Basen verändert werden können.<sup>[36, 37]</sup> Tatsächlich konnten bereits Nukleobasen mit verändertem *pKa*-Wert in Modell-RNAs beobachtet werden.<sup>[38]</sup> Dabei

wurde die Bildung von Kopplungsstrukturen als ein Mittel, um die treibende Kraft für die  $pK_a$ -Verschiebung in der RNA zu liefern, betont. Die Sensitivität für den  $pK_a$ -Wert hängt ferner vom Brønsted  $p$ -Wert für die jeweilige Reaktion ab. Dies kann den Einfluss nicht optimaler  $pK_a$ -Werte auf die Reaktionsgeschwindigkeit vermindern.<sup>[39]</sup> Ebenso tritt die allgemeine Säure-Base-Katalyse auf, wenn eine große Verschiebung im  $pK_a$ -Wert der Reaktionsgruppe auftritt sowie der  $pK_a$ -Wert des Katalysators zwischen den Anfangs- und Endwerten des  $pK_a$ -Wertes der Substratgruppe liegt.<sup>[40]</sup> Beispielsweise durchläuft der  $pK_a$ -Wert des 2'-OH-Nukleophils eine sehr große Verschiebung von einem Wert von 12 für das Substrat 2'-OH bis zu einem Wert von 0 für die Protonierung des Produktesters. So liegen Nukleobase-Funktionsgruppen mit  $pK_a$ -Werten als nicht optimal ( $pK_a$ -Wert 3 - 4 oder 9,2) zwischen diesen Werten und können dennoch eine signifikante allgemeine Säure-Base-Katalyse liefern.

**Tabelle 3.2: Relevante ionisierbare funktionelle Gruppen in RNA.** (Tabelle modifiziert aus<sup>[18, 41]</sup>)

Funktionelle Gruppe	Struktur	$pK_a$
Adenin		3,5
Cytosin		4,2
Guanin		9,2
Uracil		9,2
Mg <sup>2+</sup>		11,4
Ribose		12

Für Ribozyme spielen sowohl funktionelle Flexibilität der RNA als auch die dadurch zustande kommende Verschiebung der  $pK_a$ -Werte der beteiligten funktionellen Gruppen eine große Rolle. Durch komplexe dreidimensionale Strukturen sind RNA Oligonukleotide in der Lage, Reaktionsorte, ähnlich denen der Proteinenzyme, zu schaffen, in denen die spaltungsbegünstigende Verschiebung des  $pK_a$ -Werts ermöglicht werden kann. Die treibende Kraft für die einzelnen beteiligten funktionellen Gruppen verbleibt dabei abhängig vom pH-Wert. Ein Großteil der detaillierten Betrachtung der RNA-Katalyse berücksichtigt die Analyse mechanistischer Details aus solchen Abhängigkeiten. Die beteiligten funktionellen Gruppen, die sowohl im protonierten Zustand (Säuren,  $HA^+$ ) als auch im unprotonierten Zustand (Basen,  $B^-$ ) aktiv sind, sind dabei typischerweise involviert (Abbildung 3.3).



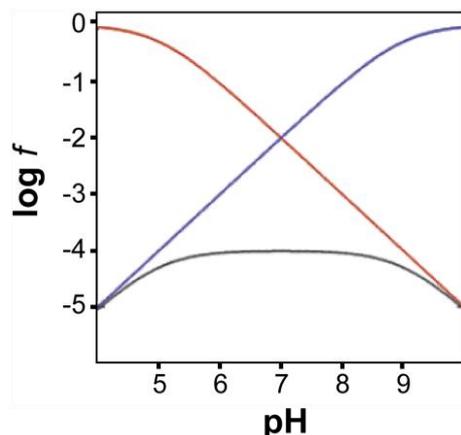
**Abbildung 3.3: Einfaches kinetisches Modell mit einer einzelnen Säure  $HA^+$  und einer Base  $B^-$ .** Protonen können an A oder  $B^-$  mit den  $pK_a$ -Werten der konjugierten Säuren  $pK_{a,A}$  und  $pK_{a,B}$  binden ohne einander zu beeinflussen. (Abbildung modifiziert aus<sup>[39]</sup>)

Die Anbindung an A oder  $B^-$  kann dabei mit den  $pK_a$ -Werten der konjugierten Säuren  $pK_{a,A}$  und  $pK_{a,B}$  vonstattengehen, wobei beide Protonen einander nicht beeinflussen. Außerdem sollte angenommen werden, dass lediglich die Ribozymform R(1), in der sowohl die Säure als auch die Base in ihrer funktionellen Form vorliegen, zu einer Katalyse zum Produkt P mit einer Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung  $k_1$  imstande ist. Aus diesen mechanistischen Überlegungen folgt die Gleichung 3.1 mit  $f_{HA^+}$  und  $f_{B^-}$ , nicht jedoch  $k_1$ , Funktionen des pH-Werts sind.<sup>[39]</sup>

Gleichung 3.1:  $\log k_{obs} = \log f_{HA^+} + \log k_{B^-} + \log k_1$

Eine solche Reaktion zeigt in einer logarithmischen Auftragung der aktiven Ribozymfraktion  $\log f_{R(1)}$  in Abhängigkeit des pH-Werts einen Glocken-ähnlichen Kurvenverlauf (Abbildung 3.4). Aus dieser Kurve lassen sich die  $pK_a$ -Werte der Säure und der Base ableiten. Im Falle des Hairpin-Ribozyms, das die Werte  $pK_{a,HA^+} = 5$  und  $pK_{a,HB} = 9$  für die protonierte Säure  $A_{38} N1$  und die deprotonierte Base  $G_8 N1$  aufweist<sup>[42]</sup>, flacht die Kurve für  $\log f_{HA^+}$  bei  $pH < 5$  ab, während für  $\log f_{B^-}$  die Kurve für  $pH > 9$  abflacht. Die Auftragung für  $\log f_{R(1)}$  ist zwischen den pH-Werten 5 und 9 nahezu unabhängig. Diesem Modell zufolge ist die beobachtete pH-Unabhängigkeit nicht auf die Abwesenheit von Protonierungsereignissen des Ribozyms zurückzuführen, sondern auf die Abnahme des Niveaus der funktionellen Form der Säure, die

durch die Zunahme der funktionellen Form der Base ausgeglichen wird. Bei pH-Werten von  $< 5$  und  $> 9$  wird das Glocken-förmige pH-Ratenprofil wiederhergestellt.



**Abbildung 3.4: Simulierte Abhängigkeit einer Selbstspaltungsreaktion des WT Hairpin Ribozyms von dem pH-Wert.** Hier gezeigt werden die Fraktion der protonierten Säure  $\log f_{HA^+}$  mit einem  $pK_{a,HA^+} = 5$  (rot) und die Fraktion der unprotonierten Base  $\log f_B$  mit einem  $pK_{a,HB} = 9$  (blau). Daraus ergibt sich die Ribozym-Fraktion in ihrem aktiven Zustand (schwarz). (Abbildung modifiziert aus<sup>[39]</sup>)

### 3.1.3 Metall-Ionen in der Ribozym-Katalyse

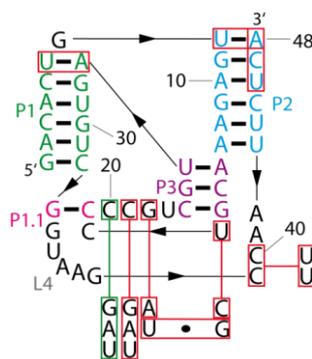
Die Einbindung ubiquitärer Metall-Ionen in der zellulären Katalyse ist ein gängiges Phänomen in der Biologie. In der RNA Katalyse spielen ubiquitäre Metall-Ionen wie  $Mg^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$  eine entscheidende Rolle, da diese Phosphoryl- und Carbonyl-Reaktionen fördern können. Diese Beteiligung kann direkt im katalytischen Zentrum erfolgen oder als eine Hilfestellung in der Stabilisierung einer katalytisch aktiven Struktur dienen. Die Relevanz eines Metall-Ions in der Reaktion kann, ebenso wie bei Säure-Base-Katalysen, durch die Analyse der Abhängigkeit der Reaktion von der Ionenkonzentration evaluiert werden. Zumeist besteht jedoch eine viel komplexere Abhängigkeit der RNA von Metall-Ionen, insbesondere, wenn es sich dabei um  $Mg^{2+}$  handelt. So tragen Metall-Ionen einen großen Beitrag zur Faltung und Stabilität von RNA Strukturen bei. Aufgrund dieser Art der Stabilisierung der aktiven RNA Konformation wird wiederum die Aktivität der RNA gefördert. Daraus folgend ist eine direkte Konzentrationsabhängigkeit für die beobachtete Ribozymreaktion denkbar.

Die Interaktion von Metall-Ionen mit RNA kann auf zweierlei Weisen erfolgen.<sup>[43]</sup> Bei der ersten Variante handelt es sich um eine diffuse Anbindung, die durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Phosphodiesterückgrat zustande kommt. Diese Art der Bindung stellt einen eher schwachen Kontakt her. Dennoch erfolgt diese in zahlreicher Weise und kann einen hohen thermodynamischen Beitrag zur Faltung und somit zur scheinbaren Aktivität leisten. In der zweiten Variante binden Metall-Ionen ortsspezifisch. Dabei entstehen direkte H-Brücken-Kontakte mit der RNA oder eine Bindung im Innenleben des Ribozyms. Diese sind zwar wichtig, können jedoch auch an bestimmten Zeitpunkten des Ribozymmechanismus auftreten oder zur Stabilisierung der Struktur beitragen. Somit können sie einen indirekten Bezug auf den Mechanismus haben. Die Fülle dieser Möglichkeiten der

Ioneninteraktionen erschwert die Interpretation der Titrationsexperimente und verbleibt ein wichtiger Punkt in der Entwicklung neuer Methoden zur Klärung dieser Wechselwirkungen.

### 3.2 HDV-ähnliche Ribozyme

Die Familie der HDV-ähnlichen Ribozyme gehört zu den kleinen selbst-spaltenden Ribozymen. Als ein bis dahin in niederen Lebewesen geglaubtes Vorkommnis fanden sich in dieser Gruppe Ribozyme, die in Verbindung mit dem menschlichen Organismus stehen. Die Einteilung in diese Familie erfolgt strukturell. Das besondere Merkmal dieser Gruppe ist ein zweifach ineinander geschachtelter Pseudoknoten. Angelehnt an das drz-Spur-3 Ribozym gelang es Lupták *et al.*, eine Minimalsequenz mit den jeweiligen Sequenzvariationen für HDV-ähnliche Ribozyme zu erstellen (Abbildung 3.5).<sup>[44]</sup> Mindestens drei Helices, nämlich P1 (grün), P1.1 (pink), P2 (hellblau) und P3 (lila) sind in dieser Struktur enthalten. Ferner wurde so eine Reihe von sowohl tolerierbaren als auch inhibitorischen Mutationen identifiziert. Die Grundlage dieser Struktur wird auch durch das HDV und das CPEB3 Ribozym, die im Folgenden genauer beschrieben werden, befolgt.



**Abbildung 3.5: Die Minimumstruktur eines HDV-ähnlichen Ribozyms.** Diese beinhaltet die Helices P1 (grün), P1.1 (pink), P2 (hellblau) und P3 (lila). Bei L4 handelt es sich um eine Wenderegion. Die Struktur wurde aus dem drz-Spur-3 Ribozym aus dem purpurnen Seeigel *S. purpuratus* hergeleitet. Miteinander verbundene Boxen stellen Mutationsvarianten dar. Grüne Boxen kennzeichnen tolerierbare Mutationen, die roten Boxen kennzeichnen inhibitorische Mutationen. (Abbildung modifiziert aus<sup>[44]</sup>)

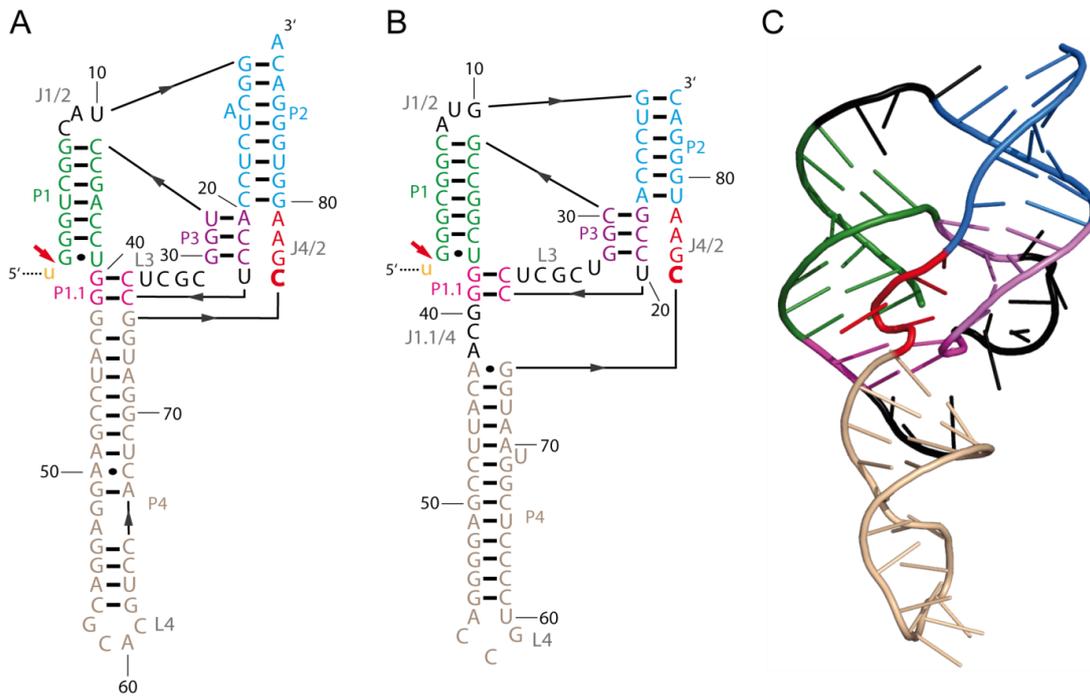
#### 3.2.1 Das HDV Ribozym als Modell-Ribozym

Bei dem Hepatitis Delta Virus (HDV) handelt es sich um einen begleitenden Virus des humanen Pathogens Hepatitis B. Liegt eine Koinfektionen vor, so werden die Symptome einer Hepatitis B Infektion gesteigert.<sup>[45]</sup> Das Genom des Virus besteht aus einer zirkulären einzelsträngigen RNA, die intermolekular Basenpaare ausbilden kann. Zudem trägt die Sequenz zwei kleine selbstspaltende Ribozyme, die eine entscheidende Rolle für die virale Replikation spielen. Bei der Transkription des Genoms wird eine multimerer antigenomische RNA erzeugt. Die darin kodierte HDV Ribozym Sequenz spaltet ortsspezifisch die RNA in lineare Produkte mit einer definierten Länge auf. Die dadurch erzeugten zirkulären kleineren Stränge werden wiederum als Template für die Synthese von linearen multimeren genomischen RNA Moleküle eingesetzt und schließlich durch das genomisch kodierte HDV Ribozym gespalten. Eine Ligation und Verpackung in neue virale Partikel schließen den

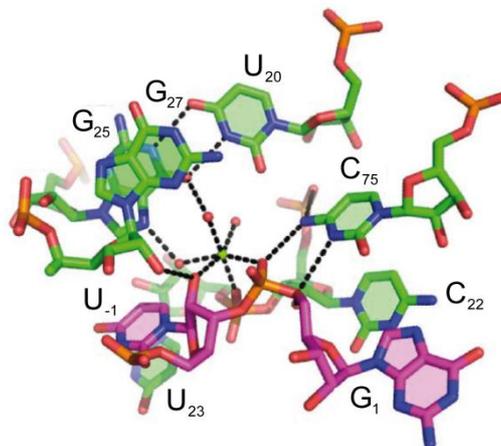
Vorgang ab. Somit sind sowohl das genomische als auch das antigenomische HDV Ribozym wichtig für die Replikation des RNA Genoms.

### 3.2.1.1 Strukturelle Eigenschaften des HDV Ribozyms und seines Spaltungsorts

Durch ihre Komplementarität im viralen Genom besitzen die genomische und die antigenomische Sequenz einen direkten Bezug zueinander. Die Ähnlichkeit zeichnet sich in ihren Sekundärstrukturen ab (Abbildung 3.6). Wie in der Arbeit von Doudna *et al.* beschrieben, besteht die Struktur des HDV Ribozyms im Allgemeinen aus fünf helikalen Segmenten.<sup>[46]</sup> Diese stehen sich in zwei parallelen Säulen, nämlich P1 (grün), P1.1 (pink) und P4 (beige) und P2 (hellblau) und P3 (lila), gegenüber. Die gesamte Struktur bildet einen zweifach ineinander geschachtelten Pseudoknoten. Dabei hält der für die Aktivität essentielle P1.1 Stamm als einer der Pseudoknoten die beiden Säulen zusammen.<sup>[47]</sup> Diese komplexe Faltungsstruktur verlagert das spaltbare Phosphat in eine Art Spalte mit einem definierten Umfeld, die als Spaltungsort des Ribozyms dient. Das zentrale Element im Reaktionsort des genomischen HDV Ribozyms ist das katalytische C<sub>75</sub> (Abbildung 3.7). Dieses ragt tief in den Kern des Ribozyms hinein und wird durch H-Brücken an N<sub>4</sub> und C<sub>22</sub>, durch Stapelungswechselwirkungen mit A<sub>77</sub> und A<sub>78</sub> und durch Interaktionen mit dem Phosphodiesterückgrat an seiner Position gehalten.<sup>[47]</sup> Die ungewöhnliche Kleeblatt-ähnliche Windung des J<sub>4/2</sub>, das das katalytische C<sub>75</sub> enthält, sorgt ebenso für dessen Positionierung im Reaktionsort. Währenddessen ragt das G<sub>76</sub> aus dem Reaktionsort heraus und ist trotz seiner räumlichen Nähe zum Spaltungsort eine variable Base.<sup>[48]</sup> Wichtig ist auch das G<sub>1</sub>·U<sub>37</sub>-Wobble-Paar am unteren Ende der Substrat-tragenden P1 Helix. Innerhalb dieses Stammes wurde lediglich das Wobble-Paar als essentiell für die Aktivität bestätigt.<sup>[49]</sup> Begründet wurde dies durch die natürlich zustande kommende Krümmung des Wobble-Paars, das eine weitere Verlagerung der 5'-OH-Gruppe des G<sub>1</sub> in das Innenleben des Ribozyms verursacht. Eine weiteres für die Spaltungsaktivität wichtiges Wobble-Paar ist das G<sub>25</sub>·U<sub>20</sub>-Paar, das durch seine Hydrathülle mit dem Metall am Spaltungsort interagiert. Mutationen zu G<sub>25</sub>A oder U<sub>20</sub>C aus früheren Untersuchungen hatten eine Reduktion der Spaltungsrate um ~ 10<sup>4</sup> zur Folge.<sup>[48]</sup><sup>50]</sup> Ferner wurde eine weitere für das genomische HDV Ribozym spezifische Gruppe von Basen, die einen Betrag zur Spaltung leisten, identifiziert. Es handelt sich hierbei um das Basentriplett C<sub>41</sub>-A<sub>42</sub>-A<sub>43</sub>, die sich zwischen den Helices P1.1 und P4 befinden.<sup>[51]</sup> Zwar hatte die Eliminierung dieser Basen keinen Spaltungsschwund zur Folge, jedoch wurde eine strukturelle Stabilisierung des Ribozyms durch das bei neutralem pH protonierte C<sub>41</sub> beobachtet. Diese führte zur einer Selbstspaltung des Ribozyms sogar in niedrigen pH-Werten und ohne Mg<sup>2+</sup>. Im Allgemeinen verursachte die Zusammensetzung des Reaktionsorts des HDV Ribozyms ein Umdenken der Rolle von Nukleobasen in Ribozymmechanismen. Die Beteiligung dieser galt nämlich zuvor wegen der scheinbar ungünstigen *pKa*-Werten als unwahrscheinlich.



**Abbildung 3.6: Allgemeine Strukturen des HDV Ribozyms.** Die Struktur des HDV Ribozyms besteht aus fünf helikalen Segmenten. Diese stehen sich in zwei parallelen Helices, nämlich P1 (grün), P1.1 (pink) und P4 (beige) und P2 (hellblau) und P3 (lila), gegenüber, sodass ein zweifach ineinander geschachtelter Pseudoknoten entsteht. Dabei hält der essentielle P1.1 Stamm als einer der Pseudoknoten die beiden Helices zusammen. Zwischen den Sekundärstrukturen des antigenomischen (A) und des genomischen HDV Ribozyms (B) besteht eine sehr starke Ähnlichkeit. Dabei wurden die Basen C<sub>75</sub> beim genomischen und C<sub>76</sub> beim antigenomischen Ribozyms als die katalytischen Basen identifiziert (rot und fett), die die RNA Sequenz zwischen den G<sub>1</sub> und U<sub>-1</sub> spalten (roter Pfeil). C: Kristallstruktur des genomischen HDV Ribozyms (Abbildung angepasst aus<sup>[47, 52]</sup>; PDB: 4PR6)



**Abbildung 3.7: Reaktionsort der Spaltung im genomischen HDV Ribozym.** Der Spaltungsort des HDV Ribozyms ist hier in grün und die Spaltungsstelle in pink gezeigt. Das zentrale Element im Reaktionsort des genomischen HDV Ribozyms ist das katalytische C<sub>75</sub>, das tief in den Kern des Ribozyms hineinragt. Die entscheidenden Atome des Spaltungsorts umfassen die 2'-OH-Gruppe aus U<sub>-1</sub>, das Pro-R<sub>p</sub>-O und die 5'-OH-Gruppe aus G<sub>1</sub> und werden durch mindestens zwei Wasserstoffbrückenbindungen oder durch Metall-Interaktionen an ihrer Position gehalten. (Abbildung modifiziert nach<sup>[53]</sup>; PDB: 3NKB)

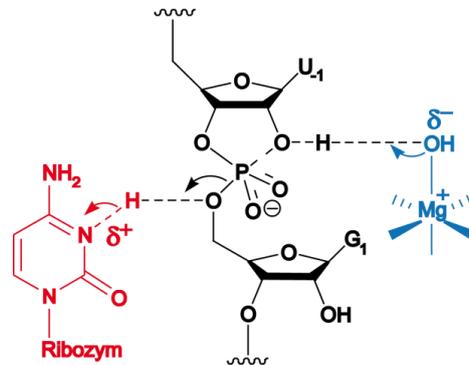
### 3.2.1.2 Spaltungsmechanismus des HDV Ribozyms

Das genomische und antigenomische HDV Ribozym generieren eine freie 5'-OH-Gruppe und ein 2',3'-zyklisches Phosphat als Produkte. Bei dem Spaltungsmechanismus greift die 2'-OH-Gruppe das benachbarte Phosphat an und bricht so die P-5'-O-Bindung auf. Hierbei handelt es sich um einen Säure-Base-Mechanismus mit einer Beteiligung eines Cytosins und eines  $Mg^{2+}$ -Ions am Spaltungsort.<sup>[54, 55]</sup> Die Klärung, welche dieser Komponenten als Säure und welche als Base fungiert, stellte lange Zeit eine experimentelle Herausforderung dar.

Grundsätzlich initiierte der Befund, dass funktionelle Gruppen von Nucleobasen trotz ihrer scheinbar ungünstigen  $pK_a$ -Werte Spaltungsreaktionen durchführen können, ein Umdenken im Ribozym-Katalyse-Modell. Aufgrund der Tatsache, dass nur eine kleine Population an Cytosin bei einem neutralen pH-Wert protoniert ist (siehe Tabelle 3.2), folgten detailliertere Untersuchungen des C<sub>75</sub> im genomischen und des C<sub>76</sub> im antigenomischen HDV Ribozym in ihren katalytischen Rollen. Mutationsexperimente bestärkten die entscheidende Rolle des C<sub>75</sub> bei der Spaltung. Wie durch seine Position erwartet wurde, konnte das katalytische Cytosin durch keine andere Nucleobase mutiert werden, ohne dass das HDV Ribozym in seiner katalytischen Aktivität eingeschränkt wurde bzw. diese vollständig verlor.<sup>[48]</sup> Lediglich die Zugabe von Imidazol in dem Reaktionspuffer in Experimenten mit C<sub>75</sub>U- und C<sub>76</sub>U-Mutanten konnte eine Aktivität wiederherstellen.<sup>[56, 57]</sup> Die Autoren interpretierten hierbei, dass die Aminogruppen des Imidazols die entscheidende Beteiligung des Cytosins in der Spaltungsreaktion imitieren konnte. Dieses Ergebnis deutete ebenfalls die potentiell wichtige Rolle einer Aminogruppe im Protonentransfer während der Spaltung an. Analog dazu kann N3 im Cytosin diese Rolle übernehmen.

Um eine potentielle Abhängigkeit von pH-Werten zu analysieren, wurde zunächst die Existenz von titrierbaren funktionellen Gruppen, die an dem Mechanismus beteiligt sind, erforscht. Das pH-Profil des antigenomischen HDV Ribozyms zeigte eine Glocken-ähnliche Kurve, die zwei Gruppen mit den scheinbaren  $pK_a$ -Werten von ~ 6,5 und 9 identifizierte.<sup>[57]</sup> Bei  $Mg^{2+}$ -freien Bedingungen stellte sich heraus, dass der scheinbare  $pK_a$ -Wert des C<sub>75</sub> im genomischen HDV Ribozym in einem neutralen Bereich liegt.<sup>[54]</sup> Genauere Untersuchungen mit der Raman Kristallographie bestätigten diesen Befund und berichteten von einem  $pK_a$ -Wert von ~ 6.<sup>[58]</sup> Dies legte nahe, dass der Reaktionsort des HDV Ribozyms eine Verschiebung des  $pK_a$ -Werts des katalytischen Cytosins um > 2 pH-Einheiten zur Folge hatte. Die Verschiebung des  $pK_a$ -Werts als ein besonderes Merkmal der Ribozymsspaltung konnte für das genomische HDV Ribozym durch elektrostatische Kalkulationen erklärt werden.<sup>[59]</sup> Insbesondere N3 des C<sub>75</sub> spielte dabei eine wichtige Rolle. Denn wenn es über eine H-Brücke mit dem 5'-O des G<sub>1</sub> verbunden war, wurde es neben dem negativ geladenen und leicht spaltbaren Phosphat positioniert. Die Protonierung des Cytosins hatte eine erhebliche positive Ladung auf N3 und den exozyklischen N4 zur Folge. Das Pro-R<sub>P</sub>-O des spaltbaren Phosphats bildete folglich eine H-Brücke zum N4 des C<sub>75</sub> aus. Diese wesentlichen Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Phosphat und der Nucleobase sorgten für eine Stabilisierung der positiven Ladung an dem protonierten C, was dann zu einer Verschiebung des  $pK_a$ -Werts führte.

Der endgültige Beweis, dass das katalytische Cytosin als Säure fungiert, kam durch Experimente mit einer chemisch modifizierten RNA, in der die 5'-O-Gruppe durch ein Schwefelatom ersetzt wurde. Dieses besitzt einen niedrigeren  $pK_a$ -Wert und stellt somit eine bessere Abgangsgruppe dar.<sup>[60]</sup> Das 5'-S-Substrat unterdrückte den Effekt einer C<sub>75</sub>-Mutation sowie von Modifikationen, die dessen  $pK_a$ -Wert veränderten. Somit konnte das in Abbildung 3.8 gezeigte Modell für den Spaltungsmechanismus endgültig etabliert werden.



**Abbildung 3.8: Spaltungsmechanismus des HDV Ribozyms.** Hierbei handelt es sich um einen Säure-Base-Mechanismus unter der Beteiligung eines C als Säure (rot) und eines Mg<sup>2+</sup>-Ions als Base (blau).

Die Eigenschaft von RNA Molekülen, komplexe und kompakte dreidimensionale Strukturen auszubilden, bringt die Schwierigkeit des Ausgleichs der starken negativen Ladung des Phosphodiesterückgrats mit sich. Um die enorme abstoßende Energie auszugleichen, dienen Kationen als Gegenspieler zur Neutralisierung und Komprimierung der Struktur. Bei der so ausgebildeten Ionenatmosphäre bestehen unter den Ionen unterschiedliche Bindungsaffinitäten. Die Bindung kann auf zweierlei Weisen erfolgen:

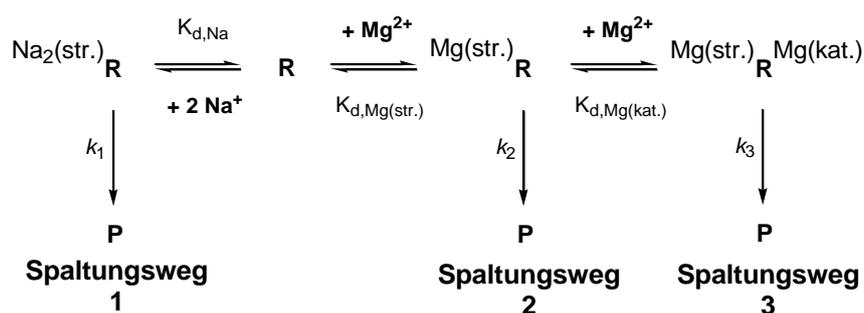
- 1) Es entsteht eine Bindung über die Hydrathülle der Ionen an spezifischen Positionen über H-Brücken (außer-sphärische Koordination).
- 2) Bei Verlust von Wassermolekülen kann auch eine direkte Interaktion mit Heteroatomen der RNA erfolgen (inner-sphärische Koordination).

Studien der Einflüsse einzelner Ionen aus der diffusen Masse verbleiben jedoch bis heute experimentell anspruchsvoll. Die Umsetzung von Standard-Methoden, die die Stöchiometrie und Ligand-Rezeptor-Interaktionen charakterisieren, erscheint nahezu unmöglich. Trotz der Schwierigkeiten der Untersuchung von Metall-Ion-RNA-Interaktionen an Spaltungsorten sollte diese Aufgabenstellung nicht vernachlässigt werden, da die gesammelten Daten wichtige Informationen zum Verständnis von Funktionsweisen von RNA liefern können. Für das HDV Ribozym und den Einfluss von Metall-Ionen auf diese implizierten die bisherigen Ergebnisse sowohl strukturelle als auch katalytische Rollen.

Ursprünglich wurden divalenten Metall-Ionen die Struktur-stabilisierende und katalytische Rolle zugesprochen. Die Entdeckung, dass das HDV Ribozym auch ohne divalente Metall-Ionen, jedoch bei einer hohen Konzentration an monovalenten Ionen wie Na<sup>+</sup> (1 M) katalytisch aktiv war, war ein großer Beitrag zum Verständnis der RNA Katalyse. Dieser Befund führte zur Schlussfolgerung, dass die hohe Konzentration an monovalenten Ionen die katalytisch aktive

Struktur stabilisierte und auch divalente Ionen in erster Linie zur strukturellen Stabilisierung beitragen können.<sup>[61]</sup> Kristallstrukturen des genomischen HDV Ribozyms zeigten eine Reihe von  $Mg^{2+}$ -Ionen am Phosphodiesterückgrat ebenso wie ein  $Mg^{2+}$ -Ion am Reaktionsort. Weitere Methoden entdeckten Hinweise auf Bereiche im Ribozym mit stark negativen elektrostatischen Potential sowie eine Konformationsänderung in  $Mg^{2+}$ -Titrationsexperimenten mit einem rekonstruierten drei-strängigen genomischen HDV Ribozym.<sup>[61-63]</sup> Diese Daten deuteten auf eine Vielzahl an Bindungsorten, ohne jedoch eine endgültige Klärung dieser oder der genauen Funktion am Spaltungsort zu liefern.

Der Versuch der Klärung eines genaueren Mechanismus mit der Involvierung von Metall-Ionen wurde in Studien von Nakano *et al.* unternommen.<sup>[61]</sup> Hierzu wurde die Katalyse-Reaktion des genomischen HDV Ribozyms in Verbindung mit mehreren unterschiedlichen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen sowie eines Puffersystems mit einer sehr hohen Konzentration an  $Na^+$  (1 M) beobachtet und Daten zur Bindung von  $Mg^{2+}$ -Ionen bei verschiedenen pH-Werten gesammelt. Die erhaltenen Ergebnisse unterstützten einen Mechanismus, bei dem unterschiedliche Spaltungswege mit der Beteiligung von  $Mg^{2+}$  möglich waren (Abbildung 3.9). Unter den Bedingungen im Experiment 1 (Spaltungsweg 1) war das HDV Ribozym R in der Lage ohne die Zugabe divalenter Kationen mit der Spaltungsgeschwindigkeit  $k_1$  zum Produkt P zu spalten, was zur Annahme führte, dass diese nicht essentiell für die Faltung oder die Spaltungsreaktion sind.<sup>[54, 61]</sup> Im Spaltungsweg 2 wurde  $Mg^{2+}$  eine entscheidende strukturelle Rolle im HDV Ribozym R zugeschrieben. Dabei wurde eine spaltungsaktive Form des Ribozyms ausgebildet, was letztlich zur Spaltung zum Produkt P mit einer Geschwindigkeit  $k_2$  führte. Schließlich waren im auf dem Spaltungsweg 3 Struktur-gebende sowie katalytische  $Mg^{2+}$ -Ionen im HDV Ribozym beteiligt. Auf diese Weise erfolgte sowohl die Faltung des Ribozyms zu einer spaltungsaktiven Struktur als auch die direkte Beteiligung von  $Mg^{2+}$  an der Spaltungsreaktion im aktiven Zentrum, was letztlich zu einer Spaltungsreaktion mit einer Geschwindigkeit  $k_3$  führte.



**Abbildung 3.9: Einfluss von Metall-Ionen auf den HDV Ribozym Mechanismus.** Dieser wurde in drei Spaltungswege eingeteilt. Unter den Bedingungen im Spaltungsweg 1 konnte eine Reaktion des HDV Ribozyms R ohne  $Mg^{2+}$  mit einer Spaltungsgeschwindigkeit  $k_1$  beobachtet werden. Der Spaltungsweg 2 ermöglicht strukturelle Beiträge von  $Mg^{2+}$ , sodass die spaltungsaktive Form des Ribozyms R gebildet wurde und so eine Reaktion möglich war. Im Spaltungsweg 3 spielte  $Mg^{2+}$  eine strukturelle Rolle und wies gleichzeitig eine direkte katalytische Beteiligung in der Spaltungsreaktion auf. (Abbildung angepasst aus<sup>[64]</sup>)

Die strukturellen und funktionellen Daten suggerierten, dass divalente Metall-Ionen direkt zur Katalyse beitragen. Im vorgeschlagenen Spaltungsmechanismus des HDV Ribozyms wurde

ein hydriertes  $Mg^{2+}$ -Ion, das als Base fungiert, vorgeschlagen (Abbildung 3.8). Dies wird auch durch den  $pK_a$ -Wert von derartigen Spezies bei neutralen pH begünstigt (Tabelle 3.2). Tatsächlich gelang es Golden *et al.* ein katalytisches  $Mg^{2+}$ -Ion am Reaktionsort des HDV Ribozyms zu identifizieren.<sup>[53, 65, 66]</sup> Für dieses Ion wurde eine Interaktion seiner Hydrathülle mit dem essentiellen reversen  $G_{25}\cdot U_{20}$  Wobble-Paar detektiert. Das pH-Profil der  $G_{25}A\cdot U_{20}C$ -Doppelmutante mit Beteiligung von  $Mg^{2+}$  ähnelte sehr dem eines Ribozyms, dem  $Mg^{2+}$  am Spaltungsort fehlte oder falsch positioniert war.<sup>[65]</sup> Diese Reaktionen wurden bei einer  $Mg^{2+}$ -Ionenkonzentration von 50 mM durchgeführt, weit über der  $Mg^{2+}$ -Ionenkonzentration, bei der die  $G_{25}A\cdot U_{20}C$ -Doppelmutante maximale Geschwindigkeit erreichte. Ähnlich wie bei der WT-Ribozymreaktion ohne  $Mg^{2+}$  nahm die Reaktionsgeschwindigkeit der  $G_{25}A\cdot U_{20}C$ -Doppelmutante mit dem pH-Wert ab, was darauf hindeutete, dass der  $Mg^{2+}$ -abhängige Protonentransfer im WT Ribozym fehlte. Diese Daten deuteten darauf hin, dass bei der  $G_{25}A\cdot U_{20}C$ -Doppelmutante die Interaktion zwischen dem aktiven  $Mg^{2+}$ -Ion und der Spaltstelle verloren ging. Obwohl die Tertiärstruktur des HDV Ribozyms dadurch nicht zerstört wird, so agierte die  $G_{25}A\cdot U_{20}C$  Mutante ähnlich dem WT Ribozym, das ohne  $Mg^{2+}$  jedoch bei einer hohen Konzentration von  $Na^+$  zustande kam. Diese Beobachtung unterstützte die These, dass  $Mg^{2+}$  zur Entwicklung der vollen Aktivität des Ribozyms (Spaltungsweg 3) als Base in der Spaltungsreaktion notwendig war.

Weitere Anstrengungen den Katalyse-Mechanismus zu untersuchen, insbesondere unter den Bedingungen auf dem Spaltungsweg 2 und 3, konzentrierten sich auf den Austausch des katalytischen  $Mg^{2+}$ -Ions durch andere mono-, di- und trivalente Ionen. Als Ergebnis wurde festgestellt, dass das HDV Ribozym ein promiskues Verhalten in Bezug auf andere Metall-Ionen zeigte (Tabelle 3.3).<sup>[64]</sup>

**Tabelle 3.3: Zusammenfassung der getesteten Metall-Ionen in kinetischen Studien mit dem genomischen HDV Ribozym.**<sup>[64]</sup>

Ion	$k_{obs}$ [ $min^{-1}$ ]
10 mM $Mg^{2+}$	$3,3 \pm 0,2$
10 mM $Ca^{2+}$	$7,0 \pm 0,4$
10 mM $Sr^{2+}$	$1,2 \pm 0,1$
10 mM $Ba^{2+}$	$0,068 \pm 0,002$
10 mM $Mn^{2+}$	$0,77 \pm 0,06$
10 $Cu^{2+}$	$< 0,00002$
1 mM $Zn^{2+}$	0,011
1 mM $Co(NH_3)_6^{3+}$	$< 0,00002$
1 M $Na^+$	$0,001 \pm 0,0002$

Tests mit anderen Erdalkalimetallen, nämlich  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  und  $Ba^{2+}$  resultierten in ähnlichen  $K_d$ -Werten, ohne einen offensichtlichen korrelierenden Zusammenhang mit dem Ionenradius. Die Spaltungsgeschwindigkeit für die getesteten Metalle entlarvten  $Ca^{2+}$  überraschenderweise als den Förderer der schnellsten Spaltungsreaktion. Weitere Experimente mit  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  sowie bei einer hohen Konzentration von  $Na^+$  zeigten alle eine Aktivität des Ribozyms. Währenddessen konnte für  $Cu^{2+}$  und  $Co(NH_3)_6^{3+}$  keine nennenswerte Aktivität festgestellt

werden. Dabei stellte  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  wegen seiner ähnlichen Größe und Geometrie wie  $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  einen Imitator zum außersphärischen  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion dar, war jedoch gleichzeitig inert gegen einen Austausch. So zeigte sich in Experimenten mit  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  in Verbindung mit  $\text{Mg}^{2+}$ , dass eine höhere Konzentration an  $\text{Mg}^{2+}$  nötig war, um eine Sättigung der Spaltungsrate zu erreichen. Dieser Effekt wurde von den Autoren auf die fehlende ionisierende Eigenschaft bei pH 7 zurückgeführt. Der genaue Grund für die beobachtete Metall-Promiskuität des HDV Ribozyms wurde bis heute nicht geklärt.

Auf der Grundlage der bisherigen Ergebnisse stellt das HDV Ribozym ein gut erforschtes kleines Ribozym dar. Bisherige Studien dazu bieten bereits eine große Bandbreite an Informationen zu strukturellen Eigenschaften von ncRNA, der RNA Katalyse ebenso wie ein breites Spektrum an Forschungsmethoden, die bei anderen kleinen Ribozymen zum Einsatz kommen, auf diesem Feld.

### 3.2.2 Das CPEB3 Ribozym

Eine humane katalytische RNA mit einer sehr engen strukturellen und biochemischen Verwandtschaft zum HDV Ribozym findet sich im CPEB3 Ribozym. Erstmals wurde dessen Sequenz in einer *in vitro* Selektion aus verschiedenen Säugetieren sowie aus dem humanen Genom isoliert.<sup>[67]</sup> Diese wurde als einzelne Kopie in zweiten Intron des *cpeb3* (*cytoplasmatic polyadenylation element-binding protein 3*) Gens entdeckt (~ 10 - 25 kbp aufwärts des dritten Exons; das humane Ribozym findet sich ca. 11,5 kbp von dem nächsten Exon entfernt). Ebenso wie das Gen ist die Ribozymsequenz unter Säugern hochkonserviert, besitzt jedoch in anderen Eukaryoten, die die Gene für die CPEB Proteinfamilie tragen, keinen analogen Gegenpart. CPEBs sind RNA-bindende Proteine, die die zytoplasmatische mRNA-Translation regulieren. Das Gen, in dem die Sequenz für das CPEB3 Ribozym entdeckt wurde, kodiert für das CPEB3 Protein, das in Verbindung mit der humanen Erinnerungsspeicherung steht.<sup>[68]</sup> Die genaue Funktion des CPEB3 Ribozyms innerhalb des Systems wird als ein Faktor in der Regulation der CPEB3 Proteinbiosynthese durch den Eingriff in Splicing-Mechanismen oder den Abbau der mRNA geschätzt, verbleibt jedoch in seinen Details bis heute ungeklärt.<sup>[9]</sup>

Ein weiteres Rätsel war seine relativ langsame beobachtete Spaltungsrate von ca.  $0,01 \text{ min}^{-1}$  ( $t_{1/2} \sim 1 \text{ h}$ ) *in vitro*.<sup>[67]</sup> Folglich erschien die Ribozymsspaltung in Abwesenheit von anderen Faktoren, die entweder die Aktivität steigern oder die abwärts gerichtete Transkription regulieren, als zu langsam um einen nennenswerten Effekt auf die Splicing-Reaktionen der Exone 2 und 3 zu haben. Aufgrund der Pol II RNA Polymerase, die mit einer Geschwindigkeit von  $\sim 1000 \text{ nt min}^{-1}$  transkribiert, würde ihre Bewegung vom Ribozym zum nächsten Intron-3'-Exon-Knotenpunkt  $\sim 10 \text{ min}$  in Anspruch nehmen. Somit würde eine normale Splicing-Reaktion der Ribozymsspaltung unter diesen Bedingungen vorgezogen. Trotzdem wurde in Experimenten mit RT-PCR in Hirngewebe eine Spaltungsaktivität beobachtet, was auf eine Aktivität *in vivo* hindeutete.<sup>[67]</sup> Tatsächlich implizierte die Studie zum Spaltungsmechanismus vom Bevilacqua *et al.*, dass das Ribozym eine schnellere Spaltungsrate, als die bisher *in vitro* beobachtete, haben kann.<sup>[69]</sup>

Insgesamt wurden mithilfe von *expressed sequence tags* (ESTs) Spaltungsprodukte des Ribozyms in Maus- Opossum- und humanen Gewebe gefunden.<sup>[67]</sup> Dabei wurden alle ESTs mit einem gemeinsamen 5'-Ende, das identisch zum Spaltungsort war, ausgestattet. Dies bekräftigte die Vermutung, dass das Ribozymprodukt abwärts des Spaltungsorts nicht augenblicklich durch eine 5' → 3'-Exonuklease abgebaut wurde, sondern eine schützende Stabilität des 5'-Endes aufwies. Weitere Fundorte für die Ribozymsequenz waren humanes Hoden- und Plazenta-Gewebe sowie Mausgehirn und -hoden. Ferner wurde mithilfe der RT-PCR-Analyse Spaltungseffizienzen von bis zu 50 % im Hirngewebe beobachtet.<sup>[67]</sup> Zudem gelangten Salehi-Ashtiani *et al.* zu der wichtigen Erkenntnis, dass die Ribozymtranskription Gewebe-spezifisch zu sein schien. Ein weiterer Hinweis auf eine Relevanz *in vivo* ist der Zusammenhang mit einem Einzel-Nukleotid-Polymorphismus im Ribozym und der Anzahl der verkürzten mRNAs. Eine Mutation C → U an der Position 36 in der Kernsequenz des CPEB3 Ribozyms führte zu einer gesteigerten Spaltungsrate<sup>[67]</sup>, was *in vivo* zu einer Reduktion der CPEB3 Proteinbiosynthese führen könnte. Als mögliche Folge dieser Reaktion wurde eine verzögerte verbale Erinnerungsabfrage genannt. Aus diesen Gründen wurde dem CPEB3 Ribozym eine Rolle in Erinnerungsprozessen, insbesondere in emotional beeinträchtigten Erinnerungen zugeschrieben. Vogler *et al.* schlugen daher eine Verbindung des Ribozyms mit neuronalen Prozessen und in den Verbindungen mit emotionalen Erinnerungen vor.<sup>[68]</sup>

### 3.2.2.1 Strukturelle Eigenschaften des CPEB3 Ribozyms

Die bisher bekannte strukturelle und biochemische Ähnlichkeit des CPEB3 und des HDV Ribozyms führte zur These, dass das HDV Ribozym und das Virus möglicherweise ihren Ursprung im humanen Genom haben.<sup>[67]</sup> Tatsächlich erinnert die vorgeschlagene Sekundärstruktur und die vermutete Faltung stark an die Struktur des HDV Ribozyms (Abbildung 3.10 A und B). Das CPEB3 Ribozym zeigt fünf helikale Segmente, die sich in zwei parallelen Säulen zusammenfalten (Abbildung 3.10 B). Dabei handelt es sich um die Helices P1 (grün) und P2 (hellblau), die beiden Haarschleifen-Strukturen P3 (lila) und P4 (beige), die Minihelix P1.1 (pink), zwei einzelsträngige Verbindungsregionen J1/2 und J4/2 (rot) und zwei Loop-Regionen L3 und L4. Die Helices P1 und P4 bilden einen Stamm, der dem Stamm aus den Helices P3 und P4 gegenübersteht. Kürzlich wurde die Sekundärstruktur der Helices P1, P2, P3 und P4 durch Zuordnung der Signale mittels eines  $J_{NN}$ -COSY Spektrums bestätigt.<sup>[70, 71]</sup> Die gesamte Struktur formt einen zweifach ineinander geschachtelten Pseudoknoten, nämlich den äußeren Knoten aus den P1 und P2 Helices und einen kleineren inneren Knoten aus der Helix P3 und der Loop-Region L3. Dabei hält die P1.1-Minihelix die beiden zueinander parallel stehenden Stämme zusammen. Ebenso befindet sich ein G-U-Wobble-Paar an der Spaltungsposition als Begrenzung der Helix P1 sowie ein Cytosin C<sub>57</sub> an einer analogen Stelle wie das beim HDV Ribozym katalytische C<sub>75</sub>.

Die Kartierung aller ermittelten Sequenzvariationen aus unterschiedlichen Säugetierorganismen zeigte, dass keine der bekannten Mutationen die HDV-ähnliche Struktur störte (Abbildung 3.10 B). Insgesamt unterstützen die Variationen in der CPEB3 Ribozymsequenz die Sekundärstruktur. Dabei tangierten sie lediglich einzelsträngige

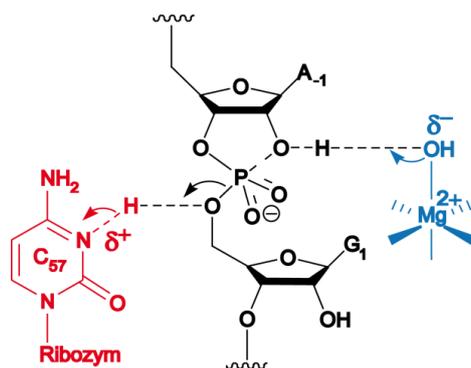


Rückgrat der Adenine und den P1 Stamm koordinieren und so die Abstoßung der Rückgräte von P1 und J4/2 ausgleichen. Ebenso wurde das G<sub>1</sub>-U<sub>36</sub>-Wobble-Paar als möglicher Stabilisator der P1.1-Minihelix und somit der Stapelwechselwirkungen mit der P1 Helix genannt (Abbildung 3.10 C, hellgrüne Nukleotide). Weitere potentielle Bindungsstellen befanden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Kernregion des Ribozyms, da dieser Bereich aufgrund der hohen Anzahl an ungepaarten Nukleotiden und der Nähe der Rückgrat-Segmente einer hohen Abstoßung ausgesetzt war (Abbildung 3.10 C orange und türkis markierte Nukleotide). Bei den übrigen Bindungsstellen handelte es sich vermutlich um stabilisierende Elemente der lokalen Struktur (Abbildung 3.10 C, dunkelgrüne, pinke, violette, dunkelblaue und gelbe Nukleotide). Mithilfe der Ionenzählung wurden jedoch lediglich vier gebundene Mg<sup>2+</sup>-Ionen detektiert. Die Schlussfolgerung aus dieser Reihe von Experimenten war für die Autoren, dass die starke Bindung der vier gezählten Mg<sup>2+</sup>-Ionen daher rührte, dass diese teilweise von der Lösungsumgebung isoliert waren oder eine vorteilhafte Geometrie für die Koordination von lokalen Strukturen boten. Diese Kriterien trafen auf die an den Bindungsstellen an den P1 und P4 Stämmen und an dem G<sub>1</sub>-U<sub>36</sub>-Wobble-Paar entdeckte Ionen nicht zu, da diese eine außersphärische Bindung eingehen und zugänglich für das Lösungsmittel waren. Es bestand auch die Möglichkeit, dass sich die gebundenen Ionen an den katalytischen C<sub>57</sub> und dem G<sub>25</sub>-U<sub>20</sub>-Wobble-Paar, an dem Phosphodiesterückgrat der J4/2-Wendung und im Kern des Ribozyms befanden.

Bemerkenswert ist ebenso eine Guanin-reiche Sektion im CPEB3 Ribozym. Es handelt sich dabei um eine hochkonservierte Sequenz auf fünf hintereinander liegenden Guaninbasen in dem P1 Stamm des Ribozyms. Guanin-reiche Sequenzen besitzen die Fähigkeit stabile sekundäre Strukturen, nämlich G-Quadruplexe, auszubilden (siehe Kapitel 3.3.1).<sup>[72]</sup> Im Gegensatz zum HDV Ribozym, in dem keine vergleichbare strukturelle Eigenschaft vorliegt, besitzt das CPEB3 Ribozym die Möglichkeit zur Ausbildung einer G-Quadruplex-Struktur. Ob es sich dabei um eine relevante Struktur handeln könnte, verbleibt bis heute mangels Forschungsbemühungen im Dunkeln.

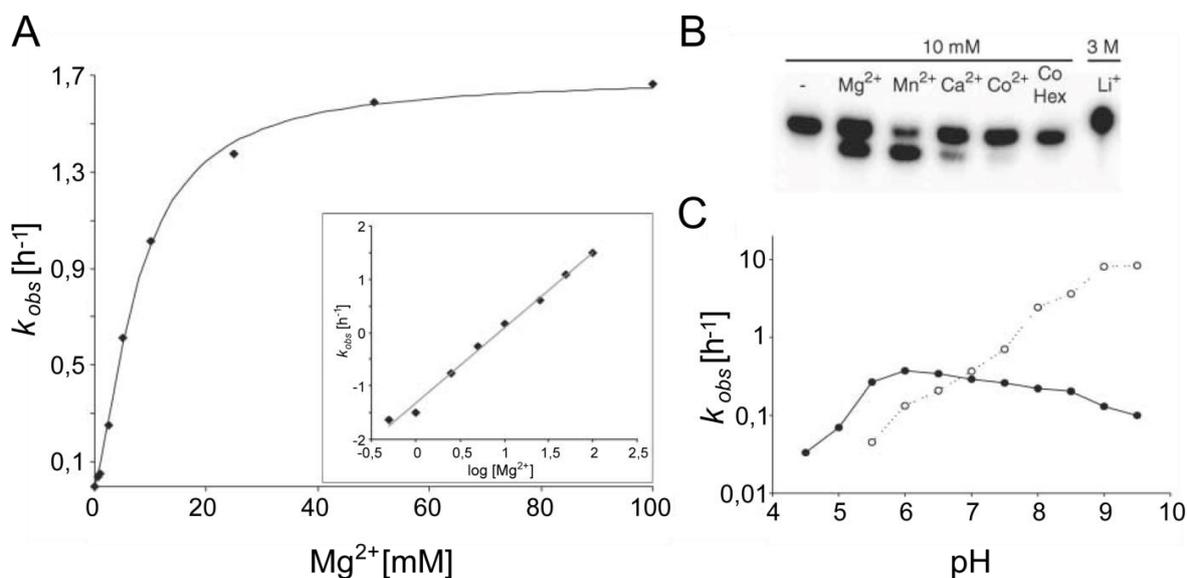
### **3.2.2.2 Bisherige Erkenntnisse zum Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms**

In der Kristallstruktur des genomischen HDV Ribozyms wurde im J4/2-Junction das katalytische Cytosin C<sub>75</sub> identifiziert. Verglichen mit einem freien oder gepaarten Cytosin besitzt es einen erhöhten *pKa*-Wert und wird als eine wichtige Komponente in der Protonenbewegung während der Umesterungsreaktion, die schließlich zur Spaltung führt, angesehen (Kapitel 3.2.1). Das CPEB3 Ribozym besitzt ebenfalls ein Cytosin an einer analogen Position, nämlich das C<sub>57</sub>. Die Mutation dieser Base zu C<sub>57</sub>U inhibiert jegliche katalytische Aktivität des CPEB3 Ribozyms. Diese Beobachtung suggeriert dieselbe Rolle des C<sub>57</sub> im Spaltungsmechanismus des Ribozyms wie das C<sub>75</sub> im genomischen HDV Ribozym. Die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Ribozyme lässt ebenso die Vermutung zu, dass auch der Spaltungsmechanismus auf denselben Grundlagen basiert. Daher liegt es nahe, dass es sich wieder um einen Säure-Base-Mechanismus mit der Beteiligung eines Metall-Ions als Base handelt (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11: Vorgeschlagener Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms.** Hierbei handelt es sich um einen Säure-Base-Mechanismus unter der Beteiligung des Cytosins C<sub>57</sub> als Säure (rot) und eines Mg<sup>2+</sup>-Ions als Base (blau).

Anfängliche Bemühungen, Informationen zum Spaltungsmechanismus zu sammeln, geschahen direkt nach der Entdeckung des Ribozyms.<sup>[67]</sup> Hierbei wurde eine Spaltungsrate von  $\sim 0,01 \text{ min}^{-1}$  ( $t_{1/2} \sim 1 \text{ h}$ ) mithilfe einer doppelt-exponentiellen Gleichung (Gleichung 5.2) ermittelt. Angelehnt an frühere Studien mit dem HDV Ribozym befasste sich die erste biochemische Charakterisierung eines 68 nt langen CPEB3-Konstrukts, das vor der Spaltungsposition 89 nt und nach der Ribozymsequenz 52 nt trug (-89/68/52-CPEB3-Konstrukt), mit der Abhängigkeit der Spaltung von verschiedenen Reaktionsbedingungen. Wegen der strukturellen Parallelen zum HDV Ribozym wurde eine Abhängigkeit der Umesterungsreaktion von der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration vermutet. Tatsächlich konnte ein Zusammenhang der Ionenkonzentration mit der Spaltungsrate gefunden werden. Der dabei entdeckte Sättigungspunkt lag bei einem relativ niedrigen Mg<sup>2+</sup>-Bedarf von  $\sim 7,8 \text{ mM}$  (Abbildung 3.12 A). Eine Interpretation dieser Daten war ein potentieller kooperativer Mecha-



**Abbildung 3.12: Biochemische Untersuchung des Mechanismus des CPEB3 Ribozym.** A: Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Kinetik der Selbstspaltung. Die Spaltungsrate erreichte ein Halb-Maximum bei einer Konzentration von  $\sim 7,8 \text{ mM Mg}^{2+}$ . B: Untersuchte Metall-Ionen und deren Effekte auf die Spaltungsaktivität des Ribozyms (Co Hex: Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>). C: pH-Profil des CPEB3 Ribozyms bei 22 °C und 10 mM Mg<sup>2+</sup> (gefüllte Kreise), verglichen mit einem Pool von *in vitro* selektierten selbstspaltenden Ribozymen (leere Kreise)<sup>[73]</sup>. (Abbildung modifiziert aus<sup>[67]</sup>)

nismus in der Metall-abhängigen Katalyse des Ribozyms. Ebenso wurde, wie zuvor bei dem HDV Ribozym, eine Promiskuität im Hinblick auf unterschiedliche Ionen festgestellt. Außer in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  konnte das Ribozym auch bei Bedingungen mit 10 mM  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Co^{2+}$  spalten. Dagegen blieb die Ribozympopulation in Anwesenheit von  $Co(NH_3)_6^{3+}$  und, anders als beim HDV Ribozym, in 3 M  $Li^+$  ungespalten (Abbildung 3.12 B).

Das pH-Profil des Konstrukts bei einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 5 mM erwies einen Plateau-Bereich zwischen pH 5,5 und 8,5 (Abbildung 3.12 C). Der Verlauf des Profils deutete eine Reaktion des Ribozyms an, in den zwei funktionellen Gruppen mit unterschiedlichen  $pK_a$ -Werten in den limitierenden Protontransfer involviert waren. Somit unterstützten diese Daten einen Säure-Base-Mechanismus (Abbildung 3.11).

Mit der bis dahin ermittelten Spaltungsrate reagierte das CPEB3 Ribozym verglichen mit dem WT HDV genomischen Ribozym *in vitro* 300-mal langsamer. Chadalavada *et al.* wiesen eine intrinsisch schnellere *in vitro* Spaltungsrate des CPEB3 Ribozyms nach.<sup>[69]</sup> Ferner konnte diese Studie die Bedeutung der flankierenden Sequenzen des Ribozyms und deren Auswirkungen auf dessen Reaktivität nachweisen, was zur Erkenntnis führte, dass die Mutation C<sub>2</sub>A zu einer schnelleren Spaltung führen konnte. Trotzdem wurde eine allgemeine Tendenz des CPEB3 Ribozyms zur Fehlfaltung beobachtet. Faktoren, die die Faltung ungünstig beeinflussen können, sind die Aufreinigungsmethoden der RNA, die Methode der kinetischen Untersuchung sowie die Sequenz des Ribozyms und die seiner flankierenden Sequenzen.

Untersuchungen der Auswirkungen der Aufreinigungsmethoden der CPEB3 Ribozymsequenz machten auf deren Schwierigkeiten aufmerksam.<sup>[69]</sup> Die erste Methode wählte den Weg der Transkription und denaturierende Aufreinigung der Ziel-RNA, gefolgt von einem Dephosphorylierungsschritt des 5'-Endes und seiner  $^{32}P$ -Markierung mit  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$  und der PNK ("Zwei-Schritt-Aufreinigung"). Die Spaltungsreaktion wurde hierbei schließlich durch die Zugabe von 10 mM  $Mg^{2+}$  gestartet. Der Schwerpunkt dabei lag auf der Beobachtung der Veränderungen in der gespaltenen Fraktion. Zwar bot diese Methode eine definierte Zusammensetzung der Faktoren der Spaltungsreaktion, beispielsweise pH-Wert, Salz-Art und -konzentration, jedoch wurde das Ribozym bei der Transkription und der Markierungsreaktion  $Mg^{2+}$  ausgesetzt. Als Ergebnis wurde eine relativ kleine Fraktion des reaktiven CPEB3 Ribozyms in seiner vollen Länge erhalten, während ein Teil des Ribozyms bereits vor dem Reaktionsstart gespalten vorlag. Die resultierenden kinetischen Daten zeigten ein biphasisches Verhaltensmuster.

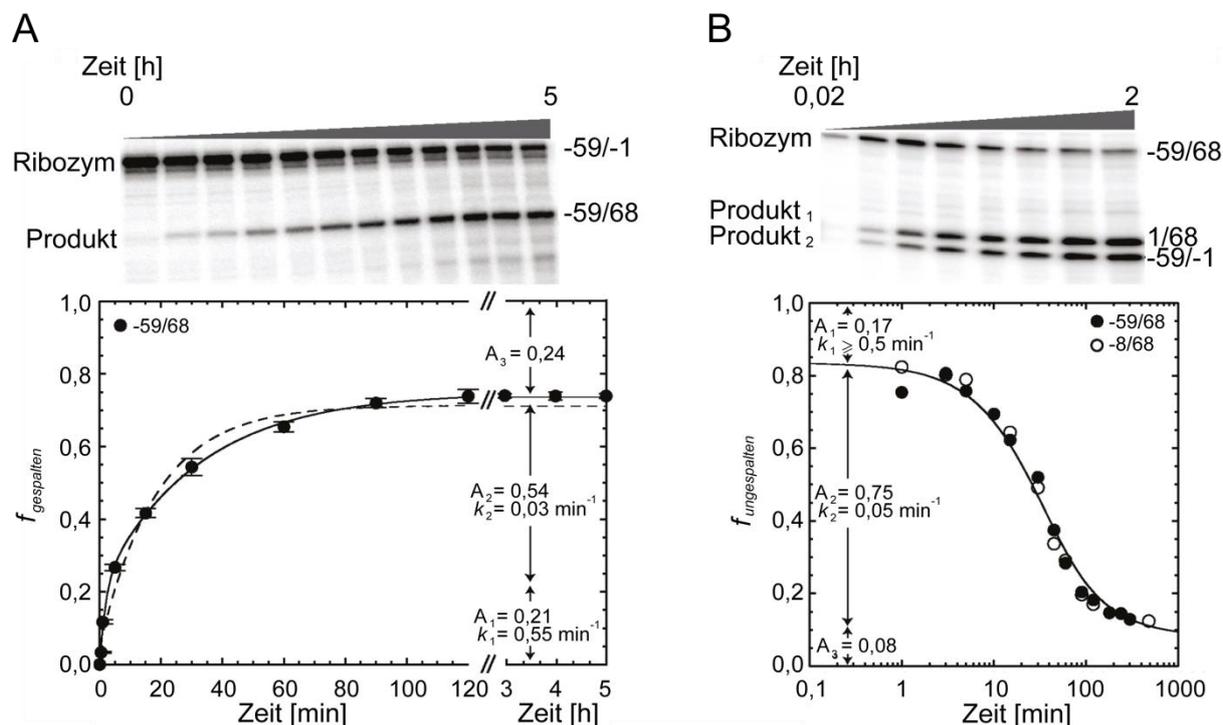
Ein Versuch dieses Verhalten des Ribozyms zu umgehen war die sog. "Ein-Schritt-Aufreinigung". Hierbei handelte es sich um eine Transkriptionsreaktion in Anwesenheit einer  $^{32}P$ -Markierungsagens (meist  $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{-GTP}$ ), sodass sowohl die Transkription der RNA als auch die Spaltung zur gleichen Zeit stattfand. Auf diese Weise wurden die Schritte der De- und Phosphorylierung umgangen und so die Ausbeute der RNA verbessert. Beobachtet wurden bei dieser Methode sowohl der Anstieg der Gesamt-RNA-Menge, die für diese Art der Kinetik linear verlaufen musste, als auch der Anteil der nicht gespaltenen Fraktion. Ein weiterer großer Vorteil dieser Methode war der verminderte Kontakt des Ribozyms mit  $Mg^{2+}$  vor der kinetischen

Untersuchung. Auf diese Weise gelang es Bevilacqua und seinen Mitarbeitern für die sehr schnell spaltende Fraktion der -59/68/- und -8/68-CPEB3-Ribozym-Konstrukte (Konstrukte bestehend aus jeweils 68 nt der Ribozymsequenz und 59 bzw. 8 nt vor der Spaltungsposition) erheblich höhere Spaltungsraten zu identifizieren (siehe Abbildung 3.13 und Tabelle 3.4).<sup>[69]</sup> Der höchste Wert für eine beobachtete Spaltungsrate betrug  $\geq 5 \text{ min}^{-1}$  für beide Konstrukte im co-transkriptionalen Assay. Im Vergleich dazu betrug die Raten in einem Standard-Assay für die schnell spaltende Fraktion jeweils für das  $0,55 \text{ min}^{-1}$  für das -59/68 WT Konstrukt und  $0,33 \text{ min}^{-1}$  für das -8/68 WT Konstrukt. Die Raten für die langsam spaltende Fraktion verblieben alle in einem ähnlichen Rahmen. Die Autoren schlussfolgerten, dass in kinetischen Assays mit dem CPEB3 Ribozym insgesamt drei Fraktionen zustande kamen. Die erste war die schnell spaltende Fraktion, die höchstwahrscheinlich dem *in vivo* Verhalten des Ribozyms nahekam. Jedoch spaltete diese in Standard-Assays sehr schnell und war somit schwer erfassbar. Bei der zweiten handelte es sich um die langsam spaltende Fraktion. Diese wurde bereits in früheren Studien beobachtet und stellt den Großteil der gesamten Ribozymmenge *in vitro* dar. Schließlich verblieb ein Teil der Ribozyme aufgrund von Fehlfaltung ungespalten (siehe Abbildung 3.13 und Tabelle 3.4).

Neben den Unterschieden in der Spaltungsaktivität der Phasen zwischen den beiden Methoden der Ribozymkinetik überraschte ebenfalls der Anteil der nicht reaktiven Phase. Während die Ribozymmenge, die schnell spaltete, vergleichbare Amplituden ergab, zeigten sich weniger Parallelen in der langsam und der unreaktiven Phase. In Standard-Assays spalteten rund 54 % des -59/68-Konstrukts und 55 % des -8/68-Konstrukts mit einer langsamen Reaktionsrate. Somit ergaben sich 26 % und 27 % als nicht spaltbar. Im Gegensatz dazu zeigte sich der Anteil der nicht spaltbaren Fraktion in co-transkriptionalen Assays als sehr gering (8 %). Dies bewies, dass die Faltung des Ribozyms zu einer spaltbaren Fraktion unter co-transkriptionalen Bedingungen effektiver ausfiel und unter Standard-Bedingungen die reaktive Phase verloren ging. Ferner wurde geschlussfolgert, dass das CPEB3 Ribozym entgegen früheren Studien sehr wohl eine schnelle Spaltung bewerkstelligen konnte, die durchaus eine *in vivo* Relevanz zeigen könnte. Die aktive Phase könnte dabei bereits während der Transkription des Ribozyms erfolgen.

**Tabelle 3.4: Übersicht der beobachteten Reaktionskonstanten bei unterschiedlichen Methoden der Ribozymkinetik.** Es konnten stets drei Phasen beobachtet werden. (reproduziert aus<sup>[69]</sup>)

RNA Konstrukt	Assay Daten nach der "Zwei-Schritt-Aufreinigung"		Co-transkriptionale Assay Daten nach der "Ein-Schritt-Aufreinigung"	
	$k_{obs}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	Amplitude [%]	$k_{obs}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	Amplitude [%]
Humanes -59/68 (WT)	$0,55 \pm 0,1$	$21 \pm 2$	$\geq 5$	$17 \pm 2$
	$0,03 \pm 0,003$	$54 \pm 2$	$0,05 \pm 0,004$	$75 \pm 2$
	Nicht reaktiv	$26 \pm 4$	Nicht reaktiv	$8 \pm 0,7$
Humanes -8/68 (WT)	$0,33 \pm 0,08$	$18 \pm 2$	$\geq 5$	$13 \pm 2$
	$0,03 \pm 0,005$	$55 \pm 4$	$0,06 \pm 0,004$	$79 \pm 2$
	Nicht reaktiv	$27 \pm 5$	Nicht reaktiv	$8 \pm 0,3$

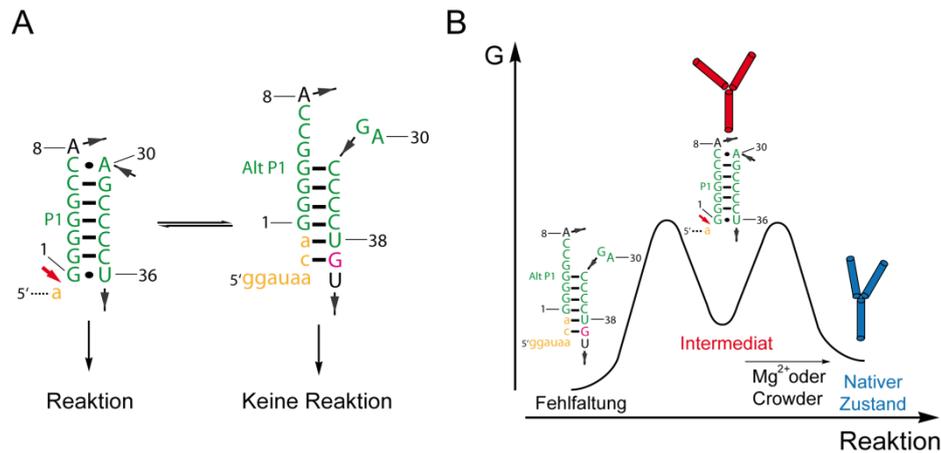


**Abbildung 3.13: Experimenteller Vergleich der beiden kinetischen Methoden zur Untersuchung der CPEB3-Ribozymspaltung.** A: Kinetische Untersuchung mit der Standard-Methode, die die gespaltene Fraktion beobachtete. Die aufgereinigte RNA wurde 5'-<sup>32</sup>P-markiert und die Reaktion durch die Zugabe von 10 mM MgCl<sub>2</sub> gestartet. Deutlich konnte mit der fortschreitenden Spaltungsreaktion die Abnahme der Intensität der Ribozym-Bande und die gleichzeitige Zunahme der Intensität der Produktbande beobachtet werden. Anschließend wurden die erhaltenen Daten für  $f_{\text{gespalten}}$  ( $f_{\text{gespalten}} = P / (R_1 + R_2 + P)$ ) gegen die Zeit aufgetragen und in eine doppelt-exponentielle Gleichung (siehe Gleichung 5.2) gefittet (durchgezogene Linie: R = 0,999; gestrichelte Linie: R = 0,993). B: Kinetische Untersuchung mit der co-transkriptionalen Methode, die die nicht gespaltene Fraktion beobachtete. Die Transkription wurde durch die Zugabe der RNA Polymerase in Anwesenheit von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP gestartet. Auch hier wurden eindeutige Intensitätsunterschiede in den Banden für das Ribozym und die Produktbanden 1 und 2 im Verlauf des Experiments detektiert. Die Daten für  $f_{\text{ungespalten}}$  ( $f_{\text{ungespalten}} = R / (R + P_1 + P_2)$ ) wurden gegen die Zeit aufgetragen und in einer angepassten Gleichung (Gleichung 5.5) gefittet. (Abbildung modifiziert aus<sup>[69]</sup>)

Auch die Länge und die Sequenz der benachbarten Regionen können Auswirkungen auf die Reaktivität eines Ribozyms haben. Diese Faktoren stellen potentielle Steuerungsmechanismen der Ribozymsequenz dar.<sup>[74]</sup> Für das HDV Ribozym wurden sowohl beschleunigende als auch inhibierende Effekte auf die Ribozymsspaltung beobachtet.<sup>[75]</sup> Die Studien von Bevilacqua *et al.* und Szóstak *et al.* mit längeren -250/68/250- und -59/68-Konstrukten (Konstrukte aus jeweils 68 nt der Ribozymsequenz, 250 bzw. 59 nt vor der Spaltungsposition und 250 nt nach der Ribozymsequenz) ergaben jedoch keinen Effekt auf die Leistung des Ribozyms.<sup>[67, 69]</sup>

Die Interpretation der Präsenz von unterschiedlich schnell spaltenden Fraktionen führte zum Schluss, dass die RNA fehlerhaften Faltungen, die die Spaltung inhibieren, unterworfen sein könnte. Tatsächlich schlugen Bevilacqua *et al.* eine potentielle alternative Struktur der P1 Helix vor, nämlich Alt P1 (Abbildung 3.14 A).<sup>[69, 76]</sup> In native Gelen wurden insgesamt zwei diffuse Ribozym-Banden, von denen jedoch lediglich eine zur Spaltung in der Lage war, entdeckt. Eine Fehlfaltung *in vitro* würde die Auftrennung der gesamten Ribozympopulation in drei Phasen erklären. Die Besonderheit der vorgeschlagenen Struktur der Fehlfaltung ist der Bruch der P1.1 Minihelix, die bei dem CPEB3 Ribozym lediglich aus einem Basenpaar besteht. Somit wäre die gesamte Ribozymstruktur gestört und vermutlich nicht mehr zur Spaltung in der Lage.

Ein Versuch das Problem der Fehlfaltung zu umgehen war die Simulation einer zellulären Umgebung.<sup>[76]</sup> Zwar boten *in vitro* Experimente einige Daten zum CPEB3 Ribozym, jedoch verbleibt das Verhalten dieses Moleküls in einer *in vivo* Umgebung bislang unerforscht. Insbesondere im Hinblick auf mögliche Interaktionspartner, seiner Regulation und der Spaltungsaktivität mit zellulären freien  $Mg^{2+}$ -Ionen, die *in vivo* in eukaryotischen Zellen auf ca. 0,2 - 1 mM geschätzt werden, sind die Charakteristika des CPEB3 Ribozyms von großer Bedeutung.<sup>[77, 78]</sup> Eine Möglichkeit für eine Simulation der räumlichen Verhältnisse *in cellulo* war die Zugabe von molekularen Crowdern. Tatsächlich hatten die molekularen Crowder PEG200, PEG8000 und Dextran10 einen positiven Effekt auf die Faltung des CPEB3 Ribozyms. Mittels SAXS ergaben sich experimentelle Daten, die eine kompaktere Faltung des Moleküls, das sogar in Anwesenheit einer niedrigeren *in vivo*-angelegten  $Mg^{2+}$ -Konzentration (0,5 mM) spaltete, bewiesen. Diese Studie verwies auf die weniger spezifischen Effekte, die für eine kompaktere, native Struktur des Ribozyms notwendig waren. Ferner deuteten die Daten aus Experimenten mit 0,5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,5 M Urea und einem C<sub>2</sub>A-Mutanten des Ribozyms, das die Alt P1 Helix destabilisierte, auf ein Gleichgewicht zwischen einem Intermediat und der nativen Struktur in der CPEB3 Ribozym-Faltung (Abbildung 3.14 B). Molekulare Crowder wurden in den Fall als begünstigend für die Bildung der nativen spaltungsaktiven Struktur bewertet.



**Abbildung 3.14: Die alternative Faltung mit der Alt P1 Helix im CPEB3 Ribozym.** A: Gleichgewicht zwischen der klassischen P1 Helix Faltung und der Alt P1 Fehlfaltung. Bei einer korrekten Faltung ist das Ribozym in der Lage zu spalten (roter Pfeil). B: Schematische Darstellung des potentiellen Einflusses der verschiedenen Zustände des CPEB3 Ribozyms unter Berücksichtigung der Alt P1 Helix als Fehlfaltungsmöglichkeit. (Abbildung reproduziert aus<sup>[69, 76]</sup>)

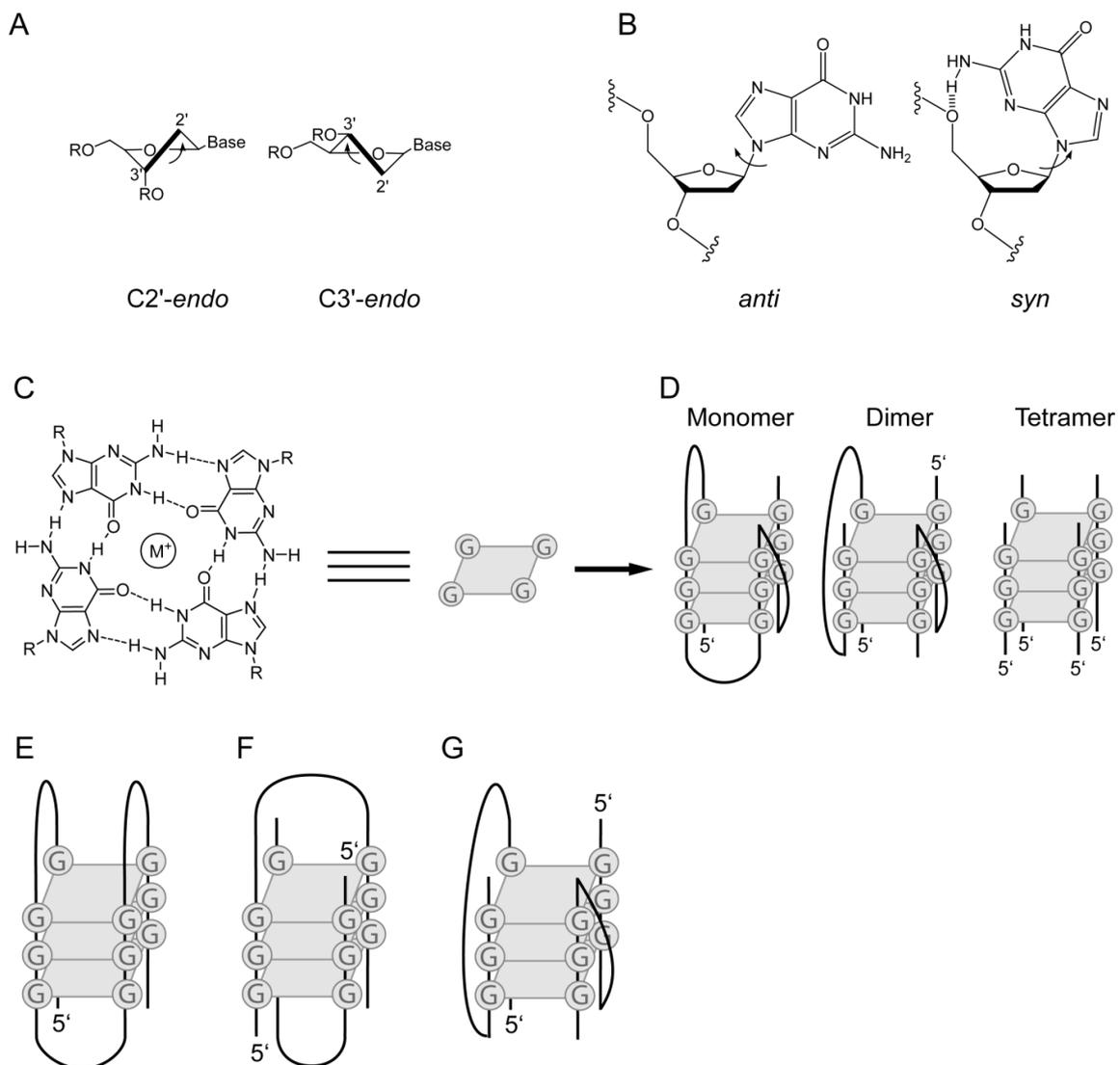
Insgesamt handelt es sich bei dem CPEB3 Ribozym um ein bisher wenig erforschtes Molekül. Aus diesem Grund ist eine individuelle Einschätzung der Charakteristika des CPEB3 Ribozyms ein großes Forschungsfeld für die Zukunft, wobei die Klärung des Mechanismus des CPEB3 Ribozyms einen Schwerpunkt darstellt. Die fortführende Forschung steht vor der Herausforderung einen geeigneten Assay zur Erfassung der realen Spaltungsaktivität des Ribozyms zu entwickeln. Zudem bleiben weitere Faktoren, die für die korrekte Faltung und Spaltung des Ribozyms von Bedeutung sind, ungeklärt.

### 3.3 Der G-Quadruplex als eine Alternative zum klassischen Watson-Crick-Basenpaarung

#### 3.3.1 DNA und RNA G-Quadruplexe

Eine einzigartige Struktur, die über Wasserstoffbrückenbindungen in Guanin-reichen Oligonukleotid-Sequenzen ausgebildet wird, stellt die G-Quadruplex-Struktur dar. Dabei werden vier Guaninbasen über Wasserstoffbrückenbindungen durch Ausbildung von Hoogsteen-Basenpaaren in einer planaren Anordnung gefaltet. Die nukleosidischen Zucker (Ribose oder Desoxyribose) können zahlreiche Konformationen einnehmen, wobei jedoch die C2'-endo (meist in DNA Strukturen) und die C3'-endo Konformationen (meist in RNA Strukturen) favorisiert werden (Abbildung 3.15 A).<sup>[79]</sup> Die Guaninbasen, die kovalent über eine glykosidische Bindung mit den Zuckern verbunden sind, können zwei unterschiedliche Torsionswinkel aufweisen: *syn* und *anti*. Die *anti* Konformation kann bei beliebiger Zuckerkonformation gebildet werden (C2'- oder C3'-endo), während die *syn* Position bei der C3'-endo Konformation ungünstig ist, da eine sterische Hinderung zwischen den Atomen O3' und C5' besteht (Abbildung 3.15 B). Trotzdem ist die Möglichkeit der *syn* Position für das Guanin wegen der Wasserstoffbrücke zwischen O5' und H2 des Amins gegeben. G-Quadruplexe werden nicht-kovalent durch monovalente Kationen stabilisiert (Abbildung 3.15

C).<sup>[80]</sup> Dabei handelt es sich zumeist um  $K^+$ -Ionen und, weniger häufig, um  $NH_4^+$ - und  $Na^+$ -Ionen. Diese Eigenschaft wurde dem starken negativ elektrostatischen Potential der O6-Sauerstoffatome der Guanine, die den zentralen Kanal der G-Tetrad-Stapel bilden, zugeschrieben.<sup>[81]</sup> Die exakte Lage der Kationen hängt von der Beschaffenheit des Ions ab. Handelt es sich um  $Na^+$ -Ionen, so finden sich diese auf der Ebene des G-Quadruplexes, während  $K^+$ - und  $NH_4^+$ -Ionen aufgrund ihrer Größe zwischen zwei hintereinander folgenden G-Tetraden stabilisiert werden. Drei planare, aufeinander gestapelte Anordnungen sind ein Minimum für eine stabil ausgebildete G-Quadruplex-Struktur. Üblicherweise bilden sich diese in einer Selbstfaltung in Lösungen mit einer ausreichenden Konzentration von monovalenten Kationen aus. Die Faltung kann dabei mit bis zu vier individuellen DNA oder RNA Strängen in unterschiedlichen Anordnungen vonstattengehen (Abbildung 3.15 D).<sup>[72]</sup>



**Abbildung 3.15: Strukturen in G-Quadruplexen.** A: Favorisierte Konformationen C2'- und C3'-endo im G-Quadruplex. B: Favorisierte Torsionswinkel der Guanin-glykosidischen Bindung. C: Schematische Darstellung einer Guanin-Tetrade. D: Beispiele für Faltungsmöglichkeiten: eine anti-parallele intramolekulare Struktur, die sich aus einem Monomer ergibt, eine bimolekulare anti-parallele Struktur, die als ein Dimer aus zwei voneinander unabhängigen Oligonukleotiden entsteht, und eine tetramolekulare parallele Struktur, die aus vier Oligonukleotiden zustande kommt. E-G: Schematische Darstellung möglicher Verbindungsloops. Diese können lateral (E), diagonal (F) oder in einem Propeller (G) angeordnet sein. (Abbildung angepasst aus<sup>[82, 83]</sup>)

G-Quadruplex-Strukturen können entweder parallel sein, nämlich wenn alle Stränge parallel zueinander angeordnet sind, oder auch in einer anti-parallelen Position zu den restlichen Strängen gefaltet werden. Eine parallele Struktur setzt die gleiche Konformation der glykosidischen Bindungen aller Nukleoside einer individuellen G-Tetrade voraus. Dagegen enthalten die G-Tetraden in anti-parallelen Quadruplexen jeweils zwei Guanosine in *syn* und *anti* Konformation. Schließlich zeigen hybride parallele-anti-parallele (3 + 1) G-Quadruplexe drei Guanosine in derselben Konformation. Die Verbindung der Guanine untereinander erfolgt in Loops verschiedener Längen und Sequenzen, wobei drei unterschiedliche Arten von Loops existieren (Abbildung 3.15 E, F und G). Laterale Loops verbinden zwei benachbarte anti-parallele Stränge, während diagonale Loops zwei entgegengesetzte anti-parallele Oligonukleotide zusammenfügen. Zudem findet sich der sogenannte Propellerloop, der nebeneinander liegende parallele Stränge miteinander verknüpft. Sowohl die Sequenz als auch die Länge der Loops, die die Quadruplexe miteinander verbinden, üben einen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität und die Topologie dieser aus.

Die oft beobachtete thermale Stabilität der G-Quadruplexe ist abhängig von deren Charakteristika, wie die Anzahl der G-Quartets innerhalb der Struktur und die Länge und Sequenz der Loops. Die Faltungskinetiken wurden bisher als ein eher langsames Verfahren beobachtet, mit Ausnahme von dem Einsatz von hohen Oligonukleotid-Konzentrationen. Nichtsdestotrotz verbleiben die Komplexe nach ihrer Ausbildung sehr stabil. Eine größere Verteilung der Guanine resultiert in einer schnelleren scheinbaren Assoziationskonstante und einer höheren Temperaturstabilität. Hinderlich für die Assoziation dagegen kann die Formation von eingefassten Intermediaten während der G-Quadruplex-Faltung ebenso wie destabilisierende Effekte ausgelöst durch flankierende Sequenzen sein. Jedoch ist die bisher beobachtete Stabilität der Komplexe *in vitro* kein Garant für ein ähnliches Verhalten *in vivo*. Ein weit verbreitetes Phänomen zeigt, dass nach der Ausbildung der DNA G-Quadruplexe diese thermodynamisch stabiler erscheinen als doppelsträngige DNA und deren Entfaltungskinetik langsamer verläuft als die der DNA oder RNA Hairpin Strukturen. Folglich besteht die Möglichkeit, dass Quadruplexe Metabolismusvorgänge der DNA oder RNA blockieren und daher *in vivo* einen Regulationsmechanismus bedürfen. Trotzdem fanden diese ungewöhnlichen Strukturen nach ihrer Entdeckung im Jahre 1962 durch kristallografische Methoden zunächst wenig Beachtung in seiner möglichen Rolle in biologischen Systemen.<sup>[84]</sup> Erst die Beobachtung, dass Oligonukleotide mit einer ähnlichen Sequenz zu der G-reichen telomerischen DNA ungewöhnlich hohe elektrophoretische Mobilität auf nativen PAGE Gelen besitzen, ließ die Vermutung zu, dass G-reiche Sequenzen in den Chromosomen der eukaryotischen Zellen, einschließlich die einzelsträngige 3'-Überhang der Telomere, eine viersträngige DNA Struktur ausbilden können.<sup>[85, 86]</sup> Das aktuelle Interesse an Quadruplexen entwickelte sich aus den Entdeckungen der Regulationsrelevanz in Transkriptions- und Translationsprozessen.<sup>[87-89]</sup> Ebenso lieferte die Identifikation von Helferproteinen, die die Faltung der Quadruplexe steuern, einen wichtigen Beitrag zur Verstärkung der Annahme, dass diese ungewöhnlichen Strukturen durchaus eine Relevanz *in vivo* besitzen.<sup>[90]</sup> Bioinformatische Studien entdeckten ca. 376.000 potentielle Quadruplex-Strukturen im menschlichen Genom und verstärkten somit die These, dass diese auch in humanen Zellen wichtige Aufgaben

übernehmen und steuern könnten. Somit besteht die Möglichkeit diese Prozesse gezielt manipulieren zu können und so neue Ansätze zur Wirkstoffentwicklung zu eröffnen.<sup>[91-94]</sup> Darüber hinaus stellen die Selbstassemblierung, die Stabilität und die Rigidität eines G-Quadruplexes entscheidende Charakteristika für die Anwendung dieser in den Feldern der Nano- und Biotechnologie dar.<sup>[95]</sup>

Ebenso wie in DNA ist die G-Quadruplex-Anordnung in RNA ein oft beobachtetes strukturelles Element.<sup>[96-98]</sup> Insbesondere tetramolekulare Strukturen zeigen eine höhere Stabilität als ihre DNA Gegenstücke. Diese resultiert aus der schnelleren Assoziation ( $10^3$ -fach) und der langsameren Dissoziation ( $10^{-3}$ -fach) der Quadruplexe.<sup>[99, 100]</sup> Diese strukturelle Stabilität ist das Ergebnis der 2'-OH-Gruppe, die mit den Phosphat- und Sauerstoffatomen des Strangrückrats, dem O4' Zuckersauerstoff und den Wasserstoffbrückenakzeptoren der N2-Gruppe der Guanine, interagiert, ebenso wie dem Beitrag des Uracils.<sup>[101, 102]</sup> Ein anderer erwähnenswerter Unterschied zu DNA G-Quadruplexen ist die Tatsache, dass diese intramolekular eine höchst polymorphe Struktur aufweisen.<sup>[103]</sup> Dagegen zeigen biophysikalische Daten, dass intramolekulare RNA G-Quadruplexe unabhängig von der Sequenz und des experimentellen Aufbaus eine parallele Konformation annehmen.<sup>[104, 105]</sup> Ein Beispiel für die Stabilität eines RNA G-Quadruplexes ist eine 19 nt-lange *E. coli* 5S RNA, die abhängig von einer UG<sub>4</sub>U Sequenz am 3'-Ende ein tetrameres K<sup>+</sup>-stabilisiertes Aggregat bildete.<sup>[106]</sup> Die Autoren kommentierten die ungewöhnliche Stabilität der Struktur mit der Wahrscheinlichkeit, dass auch ähnliche Strukturen ebenso *in vivo* auftreten müssten. Nach dieser frühen Einschätzung fanden sich tatsächlich zahlreiche Beispiele für weitere RNA G-Quadruplexe, insbesondere in nicht-kodierenden Sequenzen wie in Promotorregionen, intronischen Sequenzen oder in 5'- und 3'-untranslatierten (UTR) Regionen von mRNA.<sup>[107-109]</sup> Ein gut untersuchtes Beispiel sind die ~ 100 - 9.000 nt G-reichen telomerischen wiederholungsenthaltenden RNAs (TERRA), die aus der RNA Polymerase II Transkription der C-reichen humanen DNA Telomer Sequenz hervorgehen.<sup>[110]</sup> Obwohl für diese eine G-Quadruplex-Bildung in lebenden Zellen mithilfe von an die TERRA Sequenz angelegte synthetischen Oligonukleotiden nachgewiesen wurden, fehlen Daten zum nativen TERRA Transkript *in vivo* ebenso wie Informationen zur funktionellen Bedeutung eines potentiellen G-Quadruplexes.<sup>[111]</sup>

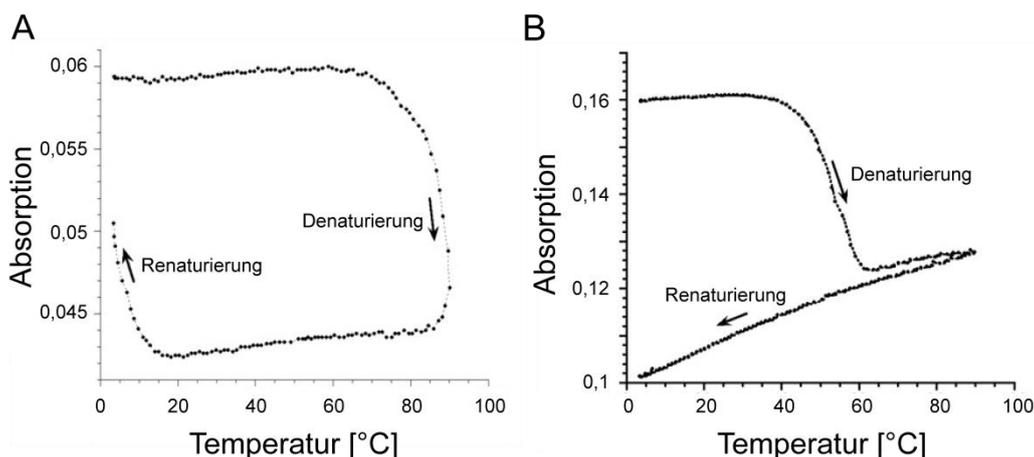
### **3.3.2 Untersuchungsmethoden zur Aufklärung der Struktur von G-Quadruplexen**

#### **3.3.2.1 UV Spektroskopie und die Schmelztemperatur eines G-Quadruplexes**

Die G-Quadruplex-Anordnung mit vier übereinander liegenden Schichten, die inter- oder intramolekular ausgebildet werden, wurde bereits umfassend untersucht.<sup>[83, 106]</sup> Zahlreiche spektroskopische und elektrophoretische Methoden geben Auskunft zur deren Eigenschaften, Verhalten und Stabilität. Als eine schnelle Methode zur Bestimmung von Quadruplex-Struktur-Formationen und zur Evaluation von deren strukturellen Stabilität kann die UV Spektroskopie genutzt werden. Typischerweise werden Messungen der Schmelztemperatur von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm als Funktion der Temperatur durchgeführt, da hier deren Absorptionsmaximum beobachtet wird. Für DNA und RNA Duplexe wird eine ca.

25 %-ige Differenz in der Absorption bei 260 nm zwischen dem vollständig gefalteten und dem entfalteten, sog. geschmolzenen Zustand, beobachtet. Für DNA und RNA G-Quadruplexe jedoch verbleiben die Differenzen in einem niedrigeren Bereich von ca. 4 %, was eine eindeutige Zuordnung erschwert.<sup>[112]</sup> Aus diesem Grund werden parallel ebenso Schmelzprofile bei unterschiedlichen Wellenlängen, zumeist bei 295 nm, bei denen die Absorption deutlich niedriger ausfällt, die Denaturierung der beobachteten Oligos sich in einem Absorptionswandel von 50 % zeigt, aufgenommen und evaluiert.<sup>[113]</sup> Die Bestätigung der Ausbildung einer G-Quadruplex-Struktur sowie die Ermittlung derer Schmelztemperatur  $T_m$  sind durch eine simple Analyse der UV Kurve möglich. Der Grund dafür ist der inverse sigmoide Verlauf des Schmelzprofils eines G-Quadruplexes bei 295 nm im Vergleich zu einem Profil einer Duplex-Struktur. G-Quadruplexe durchlaufen eine hypochrome Verschiebung, d.h. eine niedrigere Absorption bei 295 nm bei einem Schmelzvorgang. Die Beobachtung der Schmelzprofile bei variierenden Bedingungen ermöglichen eine Charakterisierung der Abhängigkeit der Stabilität und der Kinetik der Quadruplex-Faltungs- und der Entfaltungsprozesse.

Im Gegensatz zum Denaturierungsprozess von Proteinen ist die thermale Denaturierung von Oligonukleotiden zumeist ein reversibler Vorgang. Speziell für G-Quadruplexe werden zwei unterschiedliche Fälle beobachtet, nämlich eine reversible und irreversible Faltung (Abbildung 3.16). Im ersten Fall ist sowohl eine Denaturierung bei einer steigenden Temperatur als auch Renaturierung bei einer Kühlung der Struktur beobachtbar. Dieses Gleichgewicht erlaubt die Ermittlung der thermodynamischen Parameter der untersuchten Strukturformationen. Im zweiten Fall kann die Denaturierung als ein irreversibles Ereignis angesehen und die Renaturierungsprozesse somit vernachlässigt werden. Dieses Phänomen wird oft für intermolekulare, insbesondere tetramolekulare Gebilde beobachtet.



**Abbildung 3.16: Beispielkurven für G-Quadruplex-Schmelzprozesse.** A: Schmelzkurve bei 295 nm für einen reversiblen Schmelzprozess eines G-Quadruplexes mit einem r(UG<sub>4</sub>U)<sub>4</sub> Strang und einen B: irreversiblen Schmelzverlauf eines G-Quadruplexes mit einem d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> Strang. (Abbildung modifiziert aus<sup>[99]</sup>)

Zusätzlich zu dieser Charakterisierungstechnik sind weitere Daten aus anderen Methoden von Nöten. Denn die alleinige Existenz eines invertierten Absorptionsübergangs bei 295 nm stellt

keinen Garanten für die Formation eines G-Quadruplexes dar, da ebenso andere Strukturen, wie beispielsweise Pyrimidin-Triplexe oder Hoogsteen Duplexe, ein ähnliches Verhalten zeigen können. Andererseits deutet die Abwesenheit eines jeden Absorptionswandels auf eine Abwesenheit einer G-Quadruplex-Struktur. Ausgenommen davon sind jedoch sehr stabile G-Quadruplexe, die selbst bei Temperaturen nahe dem Siedepunkt keine Schmelzprozedur erfahren.

### 3.3.2.2 CD Spektroskopie

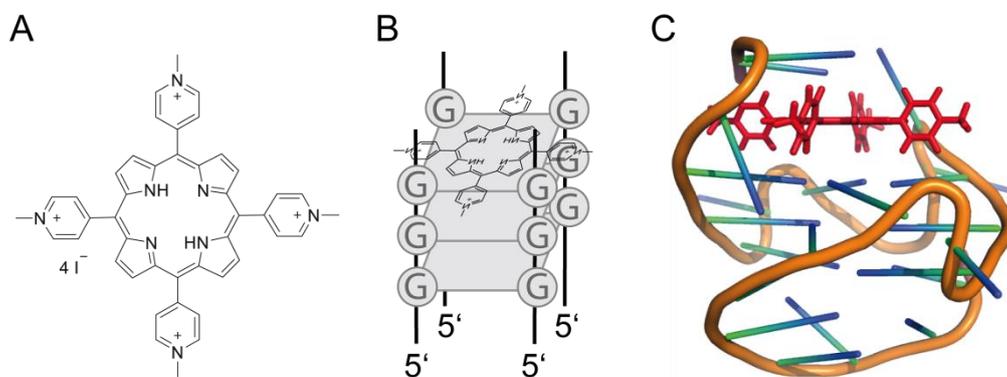
Eine weitere häufig für die Untersuchung von G-Quadruplexen genutzte Methode stellt die CD Spektroskopie dar. Diese Methode ist in der Lage, die Beschaffenheit der G-Quadruplex-Faltung zu charakterisieren und beruht auf den unterschiedlichen Absorptionen von chiralen Molekülen von rechts- und links-zirkulär-polarisiertem Licht.<sup>[114]</sup> CD Spektren von Nukleinsäuren sind sehr sensitiv für die Stapelwechselwirkung zwischen den Basen. Da in G-Quadruplexen drei unterschiedliche Topologien (parallel, antiparallel und Hybrid) mit den *syn* / *anti* Konformation der Guanosine korrelieren, werden unterschiedliche Stapelvarianten zwischen den benachbarten G-Tetraden beobachtet. Diese führen zu einzigartigen CD Signaturen für die jeweiligen Topologien (Tabelle 3.5).<sup>[115, 116]</sup> Allgemein zeigen CD Spektren von tetramolekularen parallelen Oligonukleotid-Quadruplexen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und ein Absorptionsminimum bei 240 nm. Das CD Spektrum eines parallelen G-Quadruplexes lässt sich anhand des zusätzlichen Maximums bei 290 nm von dem Spektrum eines einzelsträngigen und eines doppelsträngigen Quadruplexes unterscheiden.<sup>[117]</sup> Ebenso lässt sich auch das Spektrum eines A-Form-Duplexes durch den Ausschlag bei 210 nm ausschließen. Hierbei deutet ein negativer Peak auf einen A-Form-Duplex hin, während ein positiver Peak einen G-Quadruplex anzeigt.<sup>[118]</sup> Dagegen zeigt eine anti-parallele G-Quadruplex-Struktur ein Maximum bei 295 nm und ein Minimum bei 265 nm. Schließlich weist das Spektrum eines (3 + 1) Hybrid-Quadruplexes zusätzlich zu den positiven Peaks bei 265 und 295 nm einen negativen Ausschlag bei 240 nm.

**Tabelle 3.5:** Übersicht über die für die Zuordnung der G-Quadruplex-Topologien wichtigen Ausschläge in CD Spektren. (Tabelle modifiziert aus<sup>[82]</sup>)

G-Quadruplex	CD Profil [nm]			
	210	240	260	295
Tetramolekular parallel	+	-	+	
Bimolekular oder unimolekular parallel mit äußeren Loops	+	-	+	+
Antiparallel einzelsträngig	+	+	-	+
Hybrid (3 + 1)	+	-	+	+

Eine besondere Technik, ebenfalls in Benutzung der CD Spektroskopie, berücksichtigt den Effekt von Liganden auf den zu untersuchenden G-Quadruplex. Eine oft vermutete Variante der Interaktion eines Liganden mit einem G-Quadruplex findet stapelartig durch  $\pi$ - $\pi$  Interaktionen an den Strangenden statt.<sup>[119]</sup> Die organisch-chemischen Farbstoffgruppe der Porphyrine wurden bereits in früheren Studien als derartige Interaktionspartner für

Oligonukleotid-Strukturen identifiziert. Ein gut untersuchtes Beispielmolekül ist das kationische 5,10,15,20-tetra(*N*-methyl-4-pyridyl) Porphyrin (TMPyP4), das in seiner Größe und der planaren Geometrie dem Guanin-Quartett ähnelt (Abbildung 3.17). Seine Fähigkeit durch die Bindung an telomerische DNA Quadruplexe eine Inhibierung der Telomerase zu induzieren, rückte dieses Molekül in den Fokus als ein potentielles Antitumor-Therapeutikum.<sup>[120]</sup> Ebenso relevant erscheint auch die Fähigkeit des Porphyrins die Guanin-reichen Sequenzen im *c-Myc* Promoter zu stabilisieren.<sup>[121]</sup> Weitere Studien belegten ebenso, dass das Porphyrin als DNA G-Quadruplex-Stabilisator dienen kann.<sup>[122, 123]</sup> Jedoch verbleibt die Struktur der TMPyP4-Quadruplex-Komplexe und deren Bindungsstöcheometrie kontrovers, da die Anbindung der TMPyP4 Moleküle an G-Quadruplexe von der chemischen Beschaffenheit des Porphyrins, der Zusammensetzung der Oligonukleotide und den experimentellen Bedingungen abhängt. Erstaunlicherweise wurde für denselben Liganden ein destabilisierender Effekt in RNA G-Quadruplexen beobachtet.<sup>[94, 124]</sup> Nachgewiesen in Titrationsexperimenten mit sehr stabilen G-Quadruplex-Strukturen in MT3-MMP mRNA entfaltet das Porphyrin diese mit einer steigenden Konzentration. Im Allgemeinen stellen Porphyrine jedoch durch ihre einzigartigen elektronischen und geometrischen Charakteristika ein vielseitiges und starkes Werkzeug in CD-spektroskopischen Untersuchungen dar. Ein deutlicher Extinktionskoeffizient von  $\epsilon \sim 400.000$  in der sichtbaren Region bei  $\lambda_{\max} \sim 415$  nm sowie die Verschiebung der Soret-Region in einen Bereich von  $\lambda_{\max} \sim 420 - 440$  nm zusätzlich zu der Entwicklung der G-Quadruplex-spezifischen Minima und Maxima im CD Spektrum in Titrationsexperimenten erlaubt eine Beobachtung und Einschätzung von Porphyrin-G-Quadruplex-Interaktionen.<sup>[125, 126]</sup>

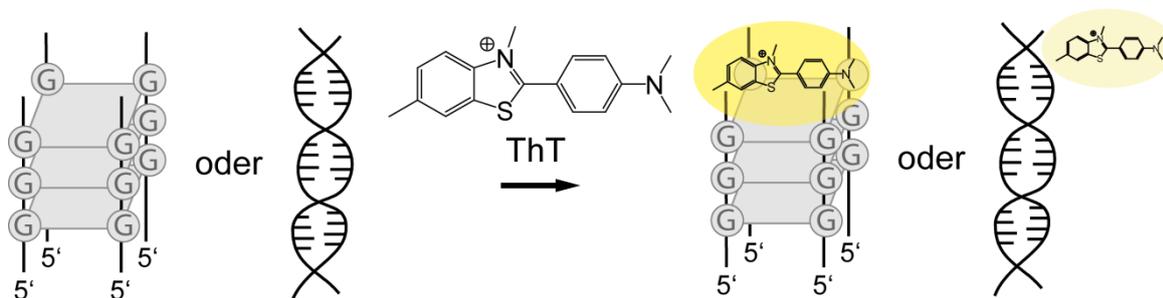


**Abbildung 3.17: Einfluss der TMPyP4 auf einen G-Quadruplex.** A: Struktur des kationischen Porphyrins TMPyP4. B: Stapelartige Anordnung des TMPyP4 an einen G-Quadruplex. C: Beispiel einer Stapelung des Porphyrins TMPyP4 (rot) im *c-Myc* Promoter. (Abbildung modifiziert aus<sup>[127]</sup>, PDB: 2A5R)

### 3.3.2.3 Elektrophoretische Methoden

Eine weitere simple und schnell durchzuführende Methode zur Demonstration der G4-Formation ist die native Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE). Das Prinzip dieser Methode ist die Annahme, dass die Ausbildung eines G-Quadruplexes in einer langsameren Mobilität der Strukturen resultiert und sich somit zuzüglich zu den Banden der Einzelstränge weitere Aggregatbanden ausbilden. Der Effekt von weiteren Faktoren, wie z.B. von

unterschiedlichen Annealing-Temperaturen, Puffersalzen ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  oder Cacodylat) und pH-Werten auf die G4-Formation kann ebenso einfach untersucht werden. Zusätzlich lassen sich in Verbindung mit dieser Standard-Methode weitere Anwendungen wählen und die Beschaffenheit der untersuchten Strukturen bewerten. Beispielsweise kann der Einsatz von Nukleasen Auskunft über die Stabilität der G4-Struktur geben. Denn bei einer stabilen Struktur ist die Nukleaseaktivität räumlich eingeschränkt und die G-Quadruplex-Struktur somit inert gegen den enzymatischen Abbau. Zusätzliche Mutationen innerhalb der Oligonukleotid-Sequenzen können die Minimalsequenz zur Ausbildung von G-Quadruplexen preisgeben. Auch der Einsatz von G-Quadruplex-spezifischen Liganden findet Anwendung in Verbindung mit Gelmobilitätsverschiebungen. Ein oft verwendetes Beispiel ist auch hier das kationische Porphyrin TMPyP4.<sup>[94, 124]</sup> Dabei kann eine steigende Konzentration des Liganden einen sichtbaren Effekt im Vergleich zu einer Probe ohne das Porphyrin hervorrufen und somit Hinweise auf die Existenz eines G-Quadruplexes geben. Schließlich existieren auch fluoreszente Sonden, die die Anwesenheit von G-Quadruplexen direkt nachweisen. Ein Beispiel ist das Benzothiazol Thioflavin T (ThT).<sup>[128]</sup> Entdeckt als eine Erkennungssonde für das humane telomerische Motiv, wurde es seither als ein Ligand zur Bestätigung von G-Quadruplexen und Ausschluss von Duplex- und Einzelstrangstrukturen eingesetzt.<sup>[129]</sup> Die Grundlage dafür ist die Tatsache, dass eine verstärkte Fluoreszenz in der Wechselwirkung mit einer G4-Struktur im Vergleich zu der Wechselwirkung mit einem Einzel- oder Doppelstrang auftritt (Abbildung 3.18).

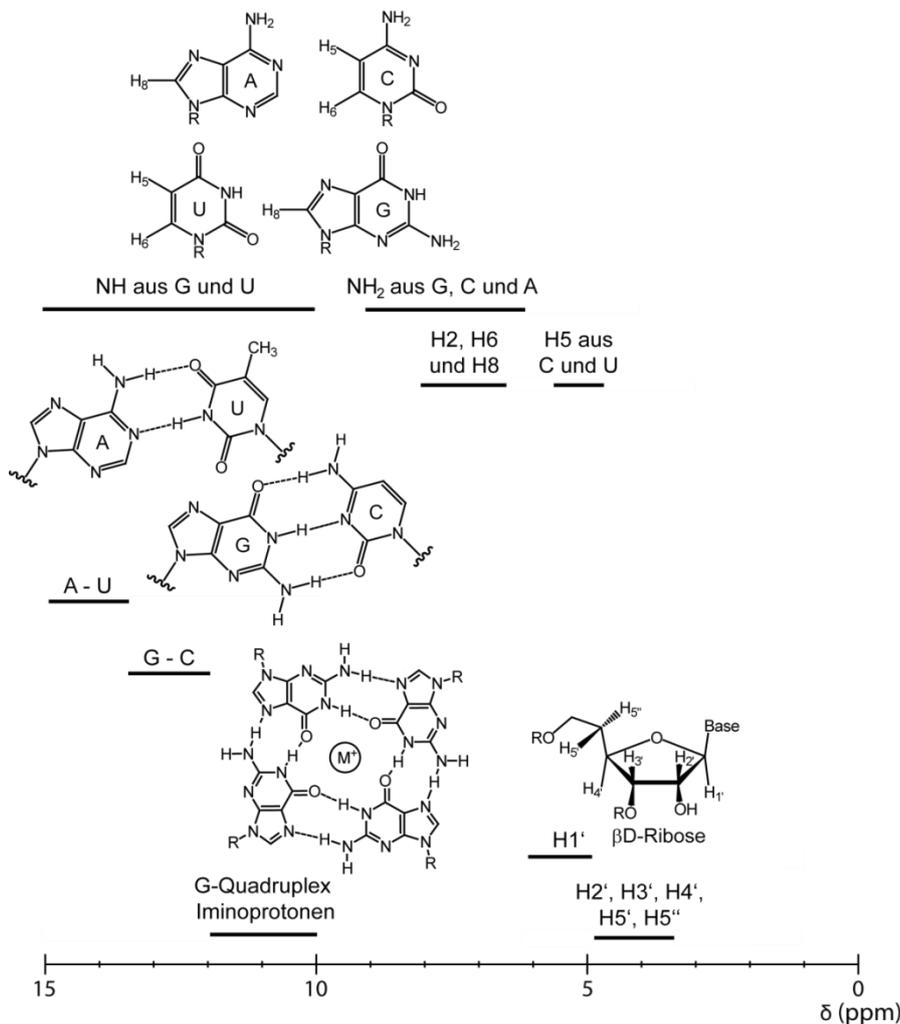


**Abbildung 3.18: Prinzip der ThT Assays.** Zunächst werden die Strukturen in einem native PAGE Gel aufgetrennt und anschließend mit einer ThT-Lösung gefärbt. Eine G-Quadruplex-Struktur bindet das ThT, sodass eine starke Fluoreszenz entsteht (gelb). Auch Duplex- und Einzelstrukturen binden ThT, jedoch verbleibt die erzeugte Fluoreszenz deutlich schwächer (helles gelb). (Abbildung reproduziert aus<sup>[128]</sup>)

### 3.3.2.4 NMR Spektroskopie

Neben den groben Einschätzungen zu den Charakteristika eines G-Quadruplexes mittels der bisher beschriebenen Methoden besteht die Möglichkeit einer hochauflösenden NMR Spektroskopie. Auf diese Weise ist die Auflösung der Struktur auf atomarer Ebene in der nativen Molekülbedingung möglich. G-Quadruplex-Strukturen resultieren in charakteristischen  $^1\text{H}$ -NMR Spektren.<sup>[130]</sup> Die Resonanz, die zu den Iminoprotonen der in der G-Tetrad-Formation involvierten Guaninreste korrespondiert, erscheint mit charakteristischen chemischen Verschiebungen bei 10,5 - 12 ppm im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (Abbildung 3.19). Diese spektrale Region, die typisch für Hoogsteen-Interaktionen ist, ist von der Iminoregion für Watson-Crick-

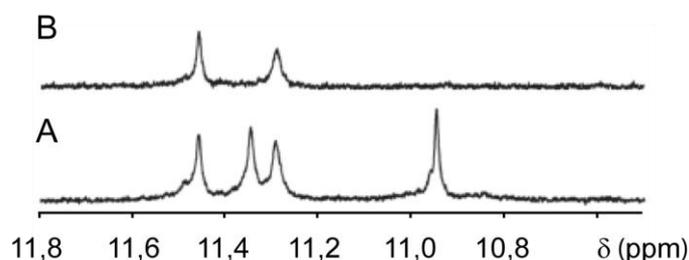
Interaktionen, die bei 13 - 14 ppm zu finden sind, getrennt. Üblicherweise korreliert die Nummer der Iminoprotonresonanzen mit der Anzahl der Guanosinreste, die bei der G-Tetrad-Formation beteiligt sind. Diese spektrale Region ist getrennt von anderen Regionen, wie für Duplexe, Einzelstränge, Helices oder andere Sekundärstrukturen. Daher eignet sich die Beobachtung dieser Region nicht nur zur Untersuchung der Formation von G-Quadruplexen, sondern auch zur Einschätzung von Ligand-Interaktionen.<sup>[131]</sup>



**Abbildung 3.19: Erwartete Regionen für die chemische Verschiebung bei der <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie mit G-Quadruplex-Strukturen.** Die charakteristische G-Quadruplex-Iminoregion findet sich im Bereich von 10 - 12 ppm. Diese spektrale Region, die typisch für Hoogsteen-Interaktionen ist, ist von der Iminoregion für Watson-Crick-Interaktionen, die bei 13 - 14 ppm zu finden sind, getrennt.

Eine weitere Besonderheit von NMR Spektren von G-Quadruplexen ist der sehr langsame Austausch der Guanin-Iminoprotonen mit deuterierten Lösungsmitteln. Beispielsweise verursacht der Austausch der Lösungsmittels von H<sub>2</sub>O zu D<sub>2</sub>O einen sofortigen Verlust der austauschbaren Imino- und Aminoprotonensignale für Duplexformen, während in Quadruplexen der vollständige Ersatz der in den Wasserstoffbrückenbindungen involvierten Protonen mit Deuterium einige Stunden bis hin zu Wochen oder Monaten in Anspruch nehmen kann (Abbildung 3.20). Diese Beobachtung wird wiederum oft genutzt um eine G-Quadruplex-

Formation nachzuweisen. Die Struktur hängt nicht nur allein von der Nukleotid-Sequenz, sondern ebenso von der Probenvorbereitung und den Lösungsmittelbedingungen ab. Faktoren wie das Probenannealing und Quenching, die Oligonukleotid-Konzentration, die Temperatur, das Salz und dessen Konzentration, der benutzte Puffer sowie die Nutzung eines Ko-Lösungsmittels können ebenso Effekte im NMR Spektrum eines G-Quadruplexes zeigen.<sup>[132-135]</sup>



**Abbildung 3.20:**  $^1\text{H}$ -NMR-Iminoregion des  $r(\text{AGGAGGA})_4$  Quadruplexes in 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  (A) und nach 12 h in 100 %  $\text{D}_2\text{O}$  (B). Der Protonenaustausch mit deuterierten Lösungsmitteln zeigt sich in der Reduktion der Signale für Guanin-Iminprotonen. (Abbildung modifiziert aus<sup>[82]</sup>)

Zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines G-Quadruplexes durch die NMR Spektroskopie wird der Gebrauch von multidimensionalen Methoden herangezogen um die Zuschreibung der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Resonanzen zu ermöglichen. Insbesondere die partielle oder die vollständige  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung in Kombination mit heteronuklearen NMR-Techniken verbessert die spektrale Trennung der Protonenresonanzen, erleichtert Sequenz-spezifische Resonanzzuweisungen und ermöglicht Messungen von sonst unzugänglichen skalaren Kopplungskonstanten. Die daraus resultierende erhöhte Anzahl von Konformationszuständen ist für Nukleinsäuren von besonderem Interesse und führt zu einer Verbesserung der Qualität der NMR-Strukturen. Die effiziente Präparation von  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -doppelt-markierter RNA ermöglichte so bereits die Untersuchung größerer RNA Moleküle sowie von G-Quadruplexen.<sup>[136-141]</sup> Die Isotopenmarkierung kann synthetisch oder enzymatisch vorgenommen werden. Nach einer vollständigen spektralen Zuordnung wird die Faltungstopologie des G-Quadruplexes bestimmt, gefolgt von der Konstruktion der dreidimensionalen Struktur durch die NMR-abgeleitete Abstandsbeschränkung in Verbindung mit der Kalkulation der molekularen Dynamiken. Die Isotopenmarkierung birgt jedoch einige Herausforderungen. Der klassische Weg zur Anreicherung eines Teststrangs verläuft über die oft anspruchsvolle Synthese von isotopenmarkierten Nukleotid-Triphosphaten, die wiederum in einer Oligonukleotid-Festphasensynthese eingesetzt werden können.<sup>[141]</sup> Enzymatisch kann die Isotopenmarkierung durch das Wachstum eines geeigneten Plasmids, das mehrere Kopien des gewünschten Oligonukleotids in einem  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -angereicherten Nährmedium enthält, erfolgen. Alternativ kann eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit  $^{15}\text{N}$ - und/oder  $^{13}\text{C}$ -markierten Desoxynukleosidtriphosphaten zur Erzeugung von DNA Oligonukleotiden eingesetzt werden. Zur Synthese von RNA kann eine *in vitro* Transkription in Gegenwart von  $^{15}\text{N}$ - und/oder  $^{13}\text{C}$ -markierten Triphosphaten dienen. Bei allen diesen Methoden handelt es

sich jedoch um aufwändige Prozeduren, denn für eine NMR spektroskopische Messung erfordert für eine hohe Auflösung eine hochkonzentrierte Probe.

Trotz allem muss beachtet werden, dass eine vollständige Lösung der Struktur mithilfe der NMR Spektroskopie lediglich für Moleküle mit einer vorwiegend stabilen Form mit guten NMR-spektren Eigenschaften in Lösung, wie scharfe, gut aufgelöste Signale, möglich ist. Im Gegensatz zur X-ray-Kristallographie, die eine Struktur lediglich im kristallinen und somit oftmals nicht im realen Zustand auflöst, gibt die NMR Spektroskopie einen Einblick in die flexiblere Struktur im gelösten Zustand. Die Koexistenz von unterschiedlichen Formen in Lösung jedoch kann den Informationsgewinn zu der Struktur verhindern und macht diese Methode somit nicht geeignet für heterogene Strukturgemische. Zur Verbesserung der Qualität der NMR Spektren und Vereinfachung der strukturellen Analyse wurden unterschiedliche Ansätze zur Generierung einer homogenen G-Quadruplex-Konformation in Lösung beschrieben. Beispielsweise können Veränderungen in der Oligonukleotid-Sequenz entweder am 5'- oder 3'-Ende eine Verbesserung der Qualität der Spektren herbeiführen.<sup>[142]</sup> In Studien mit G-Quadruplexen ist die Betrachtung mehrerer Oligonukleotid-Sequenzen bis zur Bestimmung einer Sequenz mit einem auswertbarem NMR Spektrum eine weit verbreitete Praxis.<sup>[139]</sup> Jedoch besteht die Möglichkeit, dass diese Art der Modifikation in Veränderungen in der G-Quadruplex-Topologie zu resultieren vermag. Alternativ dazu kann der Tausch einiger Guanosinreste mit Inosin oder 8-Bromoguanosin zu einer homogenen Konformation führen.<sup>[143, 144]</sup> Ein weiterer Nachteil der NMR Spektroskopie von G-Quadruplexen ist der Bedarf an einer sehr reinen und sehr hochkonzentrierten Probe (ca. 200  $\mu$ M - 1 mM) für die Messung. Neben dem damit verbundenen Aufwand und Kosten, kann dies wiederum zu Aggregationen der Moleküle führen und eine Interpretation der Spektren erschweren.

### **3.4 Untersuchung von Oligonukleotiden mithilfe von Fluoreszenz-basierten Methoden**

#### **3.4.1 Kombination von Aptameren und fluoreszenten Sonden**

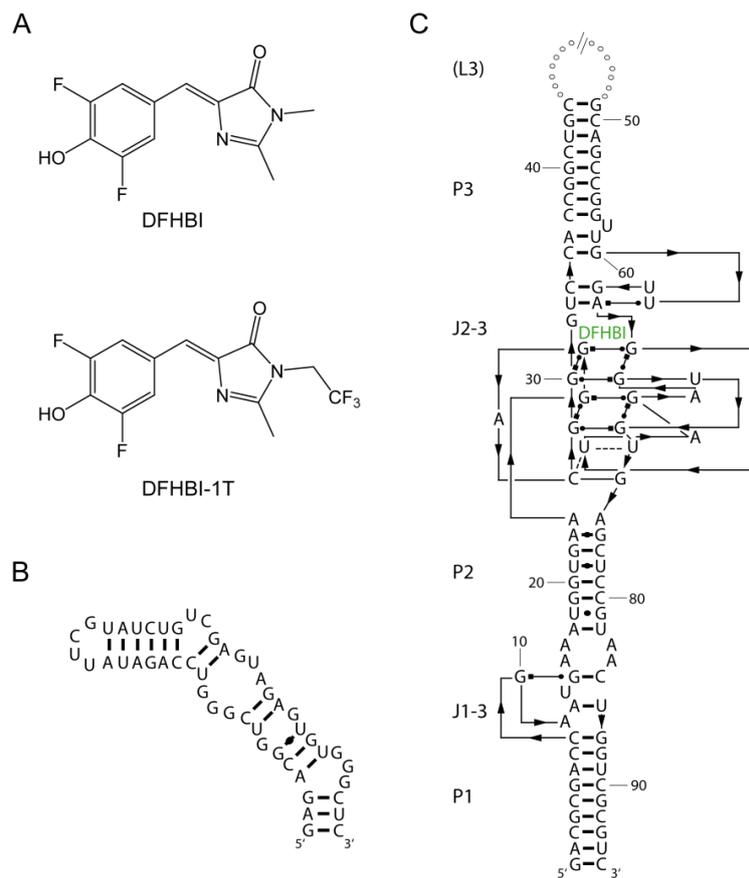
Ähnlich wie Proteine, sind Nukleinsäuremoleküle dazu befähigt, definierte und vielfältige Strukturen auszubilden. Dabei spielt die Basensequenz eine entscheidende Rolle. Die entstehenden dreidimensionalen Strukturen sind in der Lage Proteine und weitere zelluläre Bestandteile ebenso wie Viren zu binden. Als kurze einzelsträngige DNA oder RNA Oligonukleotide mit einer Basenzahl von 25 - 70 nt gelten sogenannte Aptamere als präzise Bindungspartner an spezifische Zielmoleküle. Die Bindung erfolgt adaptiv über die dreidimensionale Struktur des Bindungspartners, zumeist über Wasserstoffbrückenbindungen, Basenstapelung und elektrostatische Wechselwirkungen.<sup>[145]</sup> Diese werden *in vitro* über die "Systematische Evolution von Liganden durch EXponentielle Anreicherung" (SELEX) nach einer möglichst hohen Bindungsaffinität zum Zielmolekül selektiert.<sup>[146]</sup> Ausgehend von einer synthetischen, kombinatorischen Bibliothek aus bis zu  $10^{16}$  individuellen Sequenzen werden durch den sich wiederholenden Kreislauf aus der Selektion bindender Oligonukleotid-Sequenzen an das Zielmolekül, der Trennung von nicht bindenden Sequenzen und der enzymatischen Amplifikation der mit den Zielmolekül interagierenden

Oligonukleotid-Liganden Sequenzen, die eine sehr hohe Stabilität, Spezifität und Bindungsaffinität zum Zielmolekül besitzen, angereichert.

In erster Linie verbleiben Aptamere zurzeit von großem Interesse für die Grundlagenforschung, insbesondere für die Detektion und die Abbildung von Ziel-Oligonukleotiden *in cellulo*. Bisherige Bemühungen diese nützlichen Werkzeuge einzusetzen zielen auf die räumlichen und zeitlichen Muster der Expression, Lokalisation, die Aufbewahrung und den Abbau von Oligonukleotiden, um deren mögliche Involvierung in den Zellvorgängen zu klären.<sup>[147]</sup> Die Bandbreite der dabei verwendeten Strategien erstreckt sich von der direkten Inkorporation von modifizierten Nukleosiden, bis hin zu genetisch eingebetteten Sonden.<sup>[147, 148]</sup> Nichtsdestotrotz bleibt die spezifische Markierung von einzelnen Oligonukleotiden oder einzelner spezifischer Sequenzen eine Herausforderung. Dieses Problem kann durch den Einsatz von Fluorophor-bindenden Aptameren umgangen werden. Eingespeist in das Wirtsgenom und somit produziert durch die zelluläre Maschinerie können auf diese Weise Spezifitäts- und Zustellungsprobleme umgangen werden.

Als ein Aptamer, das als fluoreszente Inkorporierungsmarkierung für RNA diente, wurde das Spinach-Aptamer, das eine Länge von 98 nt besitzt, selektiert (Abbildung 3.21 C).<sup>[149]</sup> Basierend darauf wurde eine Reihe neuer Aptamere mit einer kürzeren Sequenz entwickelt und getestet.<sup>[150]</sup> Das Besondere an dieser neuen Klasse der Spinach-Aptamere ist der Imitationscharakter nach dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP), nachdem der Bindung des Substrats 4-Hydroxy-Benzyliden-Imidazolinon (HBI) oder seiner Derivate erfolgt ist. Als die vorteilhaftesten HBI Derivate wurden 3'5'-Difluoro-4-Hydroxy-Benzyliden-Imidazolinon (DFHBI) und (Z)-4-(3,5-Difluoro-4-Hydroxy-Benzyliden-Imidazolinon (DFHBI-1T) identifiziert (Abbildung 3.21 A, und B).

Das Spinach2, und ebenso das Brokkoli-Aptamer können auch in Säugetierzellen eingesetzt werden. Diese besitzen den Vorteil, dass sie genetisch an die Ziel-RNA Sequenz angeschlossen werden und somit über die Fluorophoranbindung detektierbar sind. Die Anbindung dieser verkürzten Sequenz an eine Ziel-RNA erlaubt eine Verfolgung der Fluoreszenz *in vitro* und *in vivo*. Jedoch müssen die unterschiedlichen Expressionsbedingungen, der Einfluss des Aptamers auf das Zellwachstum sowie die Fluoreszenz-Intensität beachtet werden. So beobachteten Okuda *et al.* einen deutlichen Unterschied im Fluoreszenz-Verhalten des Brokkoli-Aptamers *in vitro* und transkribiert in 16S rRNA in *E. coli*.<sup>[150]</sup> Ferner zeigte diese Studie, dass das Zellwachstum zwar beeinträchtigt wird, jedoch eine sehr starke Fluoreszenz detektiert werden kann. Insofern muss bei dem Einsatz des Brokkoli-Aptamers der Einzelfall betrachtet werden.

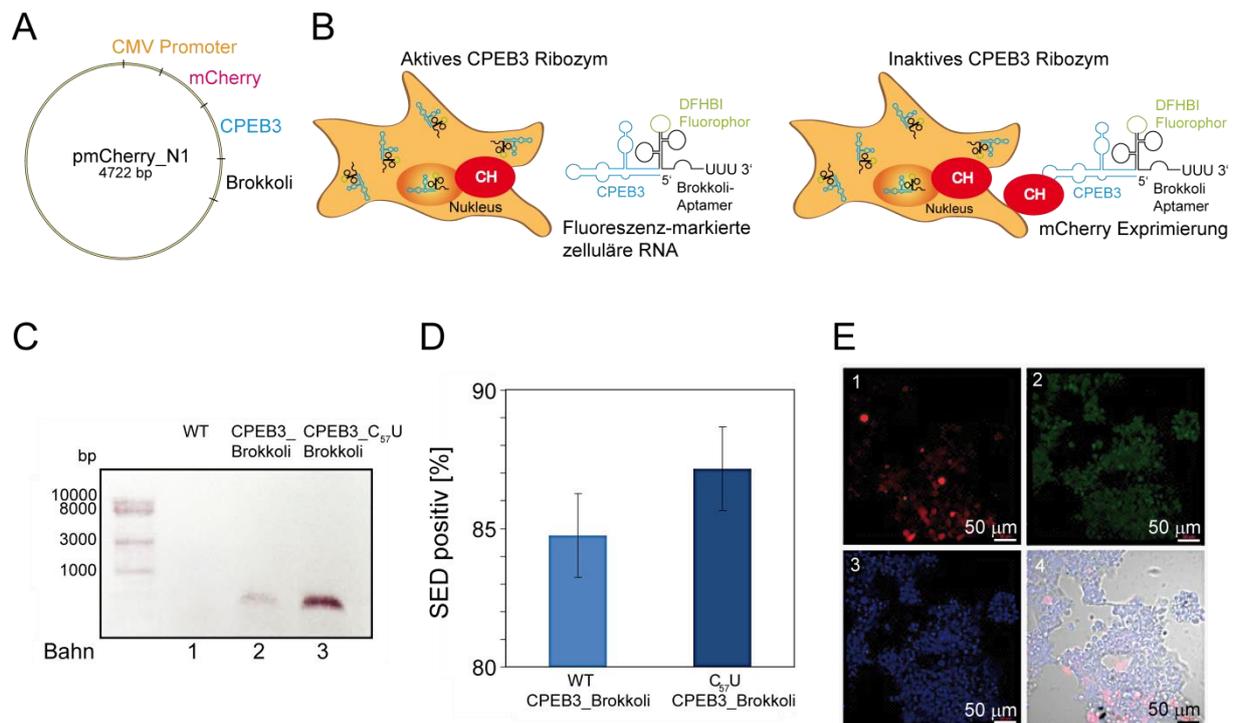


**Abbildung 3.21: Fluorophor-bindende Aptamere auf Spinach-Basis.** A: Chemische Struktur des HBI Derivats DFHBI mit zwei Fluoratomen am Benzylring und des DFHBI-1T mit seinem 1,1,1-Trifluorethyl-Substituenten am Imidazolionring. B: Sekundärstruktur des Brokkoli-Aptamers. (reproduziert aus<sup>[150]</sup>) C: Sekundärstruktur des Spinach-Aptamers mit einer G-Quadruplex-Struktur, in der das DFHBI (grün) gebunden wird. (Abbildung reproduziert aus<sup>[151]</sup>)

### 3.4.1.1 Anwendung des Brokkoli-Aptamers in der Erforschung des CPEB3 Ribozyms

Eine herausfordernde Aufgabe auf dem Gebiet der CPEB3 Ribozym Forschung stellte bisher die Erforschung der Spaltungsaktivität *in cellulo* dar. Bisherige Studien fokussierten sich auf das isolierte Spaltungssystem, dessen Charakterisierung und die Detektion von Spaltungsprodukten *in vivo*. Die potentielle Rolle von regulierenden Elementen oder anderen Beteiligungspartnern im Mechanismus des CPEB3 Ribozyms wurden dabei vernachlässigt. Nicht zuletzt geschah dies aufgrund von bisher fehlenden Techniken um eine Ribozym-Spaltungsaktivität *in vivo* zu detektieren.

Daher stellte die Entwicklung einer Methode bei der Nutzung des Brokkoli-Aptamers in der Detektion der CPEB3 Ribozymsspaltung einen großen Fortschritt in dessen Untersuchung dar. Durch Svenja Wagener wurden im Arbeitskreis von Dr. Stephanie Kath-Schorr zwei Konstrukte des CPEB3 Ribozyms für die zelluläre Expression entworfen (unveröffentlichte Arbeit).<sup>[16]</sup> Die Sequenz des Ribozyms bestand dabei entweder aus der spaltungsaktiven WT Sequenz oder einer inaktiven C<sub>57</sub>U Mutation. Daran angeschlossen fand sich eine Verbindungssequenz zur Brokkoli-Aptamer-Sequenz. Diese Konstrukte wurden jeweils über eine InFusion HD



**Abbildung 3.22: Fluoreszenz-basierte Detektion der CPEB3 Ribozym Spaltung *in cellulo*.** Das Konzept wurde von Svenja Wagener und den Arbeitskreis Kath-Schorr entwickelt und basiert auf der Visualisierung des Ribozyms mithilfe des fluoreszenten Aptamers Brokkoli und des DFHBI-Fluorophors. A: Konstruktion des Plasmids für die Expression des Konstrukts mit einer für das rot fluoreszierende Protein mCherry kodierenden Sequenz. Daran angeschlossen wurde die Sequenz für das CPEB3 Ribozym und das grün fluoreszierende Brokkoli-Aptamer.<sup>[152]</sup> B: Prinzip des durchgeführten Experimente *in cellulo*. Die Visualisierung der Spaltungsaktivität des Ribozyms sollte über die mCherry Expression erfolgen. C: *In cellulo* Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozyms. Die gesamte Menge an RNA wurde aus nicht transfizierten (WT), mit CPEB3-Brokkoli transfizierten oder mutierten C<sub>57</sub>U-CPEB3\_Brokkoli transfizierten Zellen isoliert und revers spezifisch für die CPEB3 Ribozym Sequenz mit einer darauffolgenden PCR-Amplifizierung transkribiert. D: Durchschnittliche mCherry-Fluoreszenz der aktiven (hellblau) und inaktiven (dunkelblau) Zellpopulation. Die mCherry-Fluoreszenz wurde über Durchflusszytometrie gemessen und mit der Fluoreszenz nicht transfizierter Zellen für jede Zellpopulation verglichen. E: Fluoreszenz-*Imaging* des CPEB3-Brokkoli Konstrukts in HEK Zellen. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 200 µM DFHBI aus einer DMSO Stammlösung inkubiert (10 mM Mg<sup>2+</sup> und Hoechst). 1: mCherry Expression in HEK Zellen. 2: Brokkoli-Fluoreszenz. 3: Hoechst Gegenfärbung der Zellkerne. 4: verbundene Kanäle. (Abbildung modifiziert aus<sup>[16]</sup>)

Klonierungsprozedur in einen pmCherry Zielvektor eingefügt. Durch die Anbindung des Aptamer an die Ribozym-Sequenz sollte diese in Verbindung mit DFHBI(-1T) durch die entstehende Fluoreszenz *in cellulo* detektiert werden. Zusätzlich beinhaltet der Vektor die Sequenz des Proteins mCherry, das bei Expression eine rote Fluoreszenz aufweist, vor der Position des eingebauten Konstrukts (Abbildung 3.22 A). Dadurch sollte die Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozyms direkt in Verbindung mit der detektierten Fluoreszenz gebracht werden. Im Falle eines aktiven Ribozyms wäre die mCherry mRNA Sequenz vor dem Abbaumechanismus des zellulären Maschinerie nicht durch einen Poly-A-Rest geschützt, was dann wiederum zu einer Abwesenheit der mCherry Fluoreszenz führen sollte (Abbildung 3.22 B links). Bei einer inaktiven Version des CPEB3 Ribozyms sollte die mCherry mRNA translatiert werden, sodass eine entsprechende Fluoreszenz detektierbar sein sollte (Abbildung 3.22 B rechts). Auf diese Weise sollte die mCherry Fluoreszenz als Markierung für

die Spaltungsaktivität dienen. Die Evaluierung der Expression beider Konstrukte in Säugerzellen wurde über eine Isolierung und Analyse der cDNA erreicht (Abbildung 3.22 C). Gleichzeitig konnte auf diese Weise die Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozyms kontrolliert werden. Denn lediglich das aktive CPEB3 Ribozym fabrizierte eine schwache cDNA Bande, während die Intensität der inaktiven C<sub>57</sub>U Mutante aufgrund der abwesenden Spaltung gesteigert wurde. Ferner trug die mCherry Fluoreszenz als direkte Markierung für die Durchflusszytometrie transfizierter Zellen zur Detektion der tatsächlichen Spaltungsaktivität des Ribozyms bei (Abbildung 3.22 D). Schließlich eignete sich diese Methode ebenfalls zur *live* Detektion und Lokalisierung der Ribozym-Moleküle mittels der Inkubation der Zellen mit DFHBI in HEK293 Zellen (Abbildung 3.22 E).

Diese Experimente bewiesen direkt die Aktivität des CPEB3 Ribozyms *in cellulo*. Durch die Mutation des spaltungsaktiven C<sub>57</sub> zu U konnte die Spaltung unterbunden werden, was wieder die essentielle Rolle des C<sub>57</sub> unter Beweis stellte.

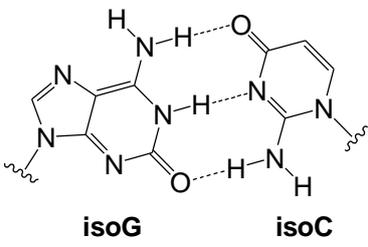
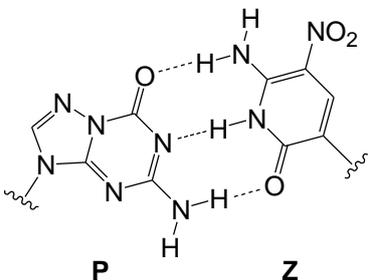
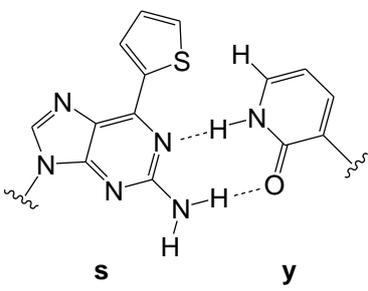
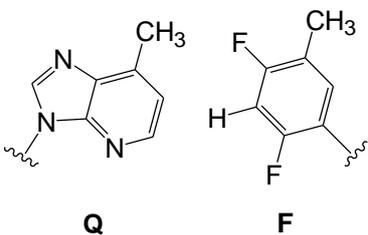
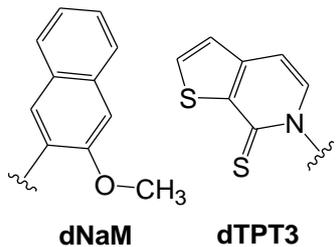
### 3.4.2 Unnatürliche Basenpaare in der Oligonukleotid-Forschung

Die Untersuchung von RNA Dynamiken, der Faltung dieser sowie der Verteilung von funktionellen RNA Molekülen verbleibt bis heute eine experimentelle Herausforderung. Besonders die Inkorporation ortsspezifischer Markierungen in große zu untersuchende RNA Moleküle und Komplexe verlangt einige wichtige Charakteristika. Von großer Bedeutung für eine geeignete Methode zur Detektion der Ziel-RNA *in vitro* und *in vivo* ist idealerweise kein oder nur ein sehr geringer Einfluss auf die dreidimensionale Struktur der RNA, da diese häufig deren Funktionalität bestimmt.<sup>[153]</sup> Zur Erforschung von RNA Molekülen mittels einer Markierung *in vitro* wurden bereits zahlreiche Systeme entwickelt. Viele davon involvieren Reportergruppen wie beispielsweise Fluorophore, die in die Sequenz in einer chemischen Festphasensynthese der RNA eingespeist werden.<sup>[154]</sup> Diese Methoden sind aufgrund der sequenziellen Grenzen der Oligonukleotid-Festphasensynthese nur für kurze RNA Sequenzen anwendbar. Chemisch bietet sich die Möglichkeit, zunächst eine reaktive Gruppe in die Ziel-RNA einzuführen und diese zur posttranskriptionalen Kopplung der Reportermoleküle über bioorthogonale Click-Chemie zu nutzen. Auf diese Weise wird eine Sonde erschaffen, die nur eine geringe Auswirkung auf die Struktur besitzt.<sup>[155-157]</sup>

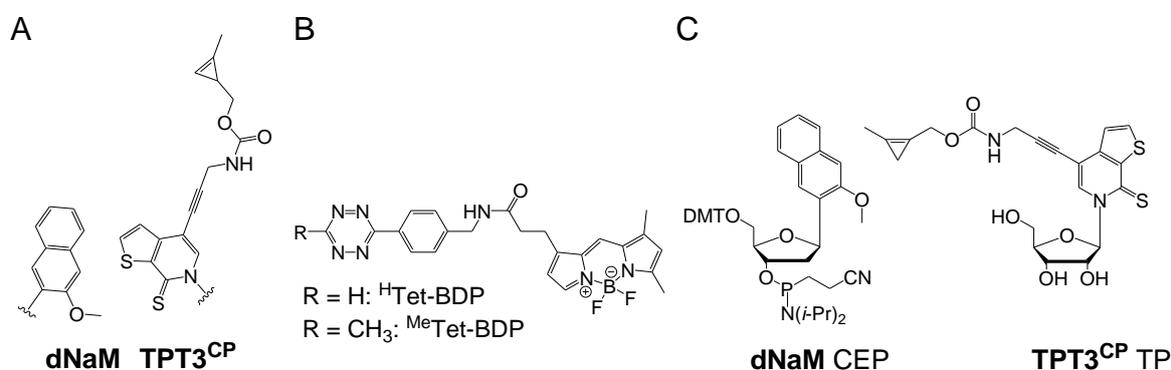
Die Ligation von individuell ortsspezifisch modifizierten synthetischen Oligonukleotiden ist eine oft verwendete Methode zur Generierung langer RNAs.<sup>[158, 159]</sup> Jedoch verbleibt deren Ausbeute niedrig, insbesondere wenn diese Zielsequenz ein hohes Maß an strukturellen Gegebenheiten besitzt.<sup>[160]</sup> Die *in vitro* Transkription dagegen erlaubt die Herstellung von langen RNAs mit Sequenzen von mehreren Tausend Nukleotiden. Durch die Kombination von einem erweiterten genetischen Alphabet und der *in vitro* Transkription wird eine Lösung des Problems dargeboten, bei dem das Einfügen ortsspezifische Modifikationen bisher nicht möglich war. Bereits durch Hirao *et al.* entwickelt, ermöglicht die Nutzung eines dritten kanonischen Basenpaars im DNA Templat die Einführung der essentiellen sequenziellen Information zur Inkorporation eines unnatürlichen RNA Nukleotids an einer spezifischen Stelle während der *in vitro* Transkription.<sup>[161-164]</sup>

Bisherige Bemühungen um ein unnatürliches drittes Basenpaar (UBP) brachte bereits einige positive Ergebnisse. Die Tabelle 3.6 zeigt eine Reihe von bisher verwendeten unnatürlichen Basenpaaren.

**Tabelle 3.6:** Liste einiger bisher entwickelter UBPs und deren Eigenschaften. (angelehnt an<sup>[165]</sup>)

UBP	Struktur	Design Konzept	Referenz
isoG - isoC	 <p style="text-align: center;"><b>isoG</b>                  <b>isoC</b></p>	Angelehnt an das Prinzip der H-Brückenbindungen im natürlichen G-C-Paar	[166]
P - Z	 <p style="text-align: center;"><b>P</b>                          <b>Z</b></p>	Angelehnt an das Prinzip der H-Brückenbindungen	[167]
s - y	 <p style="text-align: center;"><b>s</b>                              <b>y</b></p>	Angelehnt an H-Brückenbindungen, in Verbindung mit sterischer Hinderung	[168]
Q - F	 <p style="text-align: center;"><b>Q</b>                              <b>F</b></p>	Sterische Isostere des A-T Paares	[169]
dNaM - dTPT3	 <p style="text-align: center;"><b>dNaM</b>                      <b>dTPT3</b></p>	hydrophob	[170]

Anfängliche Versuche ein UBP für den *in vivo* Gebrauch zu entwickeln lehnten sich an das natürliche Beispiel der Wasserstoffbrückenbindungen. So entwickelten Benner und Kollegen das **isoG - isoC** UBP.<sup>[166]</sup> Dieses UBP wies jedoch einige Schwachpunkte auf, wie die chemische Instabilität des **isoC**, die Anfälligkeit des **isoG** zur Tautomerisierung sowie die eher niedrige Selektivität von 93 % während der PCR. Eine Weiterentwicklung war das **P - Z** UBP, das eine Selektivität von 99,8 % zeigte und nicht mehr der chemischen Instabilität und einer Tautomerisierungstendenz unterlag.<sup>[167]</sup> Weitere Bemühungen um eine Verbesserung der UBP-Konzepts beschritten den Weg über die Hydrophobizität, zunächst in Verbindung mit zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen und sterischer Hinderung, so wie in dem UBP **s - y** aufgeführt.<sup>[168]</sup> Jedoch wurde eine niedrige Selektivität für **s** entdeckt, was den Gebrauch dieses UBPs erschwerte. Das **Q - F** UBP wurde als ein sterisch isosteres Basenpaar zu A - T entwickelt.<sup>[169]</sup> Dabei wurde das Konzept der Notwendigkeit von Wasserstoffbrückenbindungen in der Baseninteraktion als nicht notwendig für ein UBP erklärt. Schließlich entwickelten Romesberg und Kollegen das Basenpaar **dNaM - dTPT3**, mit denen eine hohe PCR-Selektivität und eine erfolgreiche Inkorporation der entsprechenden Triphosphate **NaM** und **TPT3** während der Transkription erzielt werden konnte.<sup>[170, 171]</sup> Auf dieser Grundlage sind weitere Anwendungen denkbar. Die Arbeitsgruppe von Kath-Schorr entwickelte das Methyl-Cyclopropen-modifizierte unnatürliches Triphosphat **TPT3<sup>CP</sup>** TP, das für die ortsspezifische RNA Markierung verwendet werden kann (Abbildung 3.23).<sup>[172]</sup> Dieses Nukleotid stellte ein ideales Werkzeug zur Sequenz-spezifischen Markierung von langen nicht-kodierenden RNAs mit einer Länge von über 200 nt (lncRNAs) dar. In den meisten Fällen sind die Sequenzen dank der enormen Entwicklung in den Sequenzierungstechnologien in den letzten Jahren bekannt. Trotzdem verbleibt die Funktion vieler lncRNAs im Dunklen. Mit der Nutzung der reaktiven Cyclopropen-Reste zur ortsspezifischen Einführung von fluoreszenten Sonden über die Alkin-Tetrazin-Ligation (*inverse electron demand* Diels-Alder [iEDDA]) wurde eine bioorthogonale, Katalysator-freie Methode eröffnet, die nachweislich detektierbare Fluoreszenz nach der Reaktion mit den entsprechenden Tetrazin-Fluorophor-Konjugaten hervorbringt.<sup>[155, 173-175]</sup> Auf diese Weise können selbst Rohprodukte nach der Transkription per Click-Reaktion fluoreszent markiert und detektiert werden.



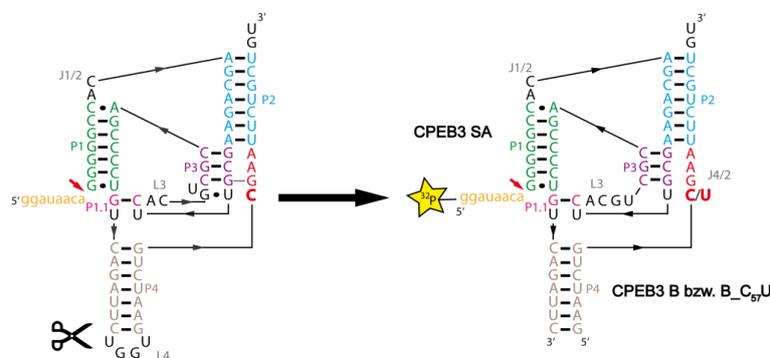
**Abbildung 3.23: Detektionssystem auf der Grundlage des dNaM - dTPT3 UBPs.** A: Das **dNaM - TPT3<sup>CP</sup>** UBP für die ortsspezifische Inkorporation des **TPT3<sup>CP</sup>** in einer *in vitro* Transkription. B: Fluoreszierendes Tetrazin-BODIPY Konjugat, das zur Visualisierung von Cyclopropen-modifizierten RNAs über die iEDDA-Reaktion dient. C: Kommerziell erhältliches **dNaM CEP** und das **TPT3<sup>CP</sup>**, das von Kath-Schorr und Mitarbeitern entwickelt wurde.<sup>[175]</sup> (Abbildung modifiziert aus<sup>[175]</sup>)

Bisherige Bemühungen das native CPEB3 Ribozym, insbesondere in co-transkriptionaler Umgebung, in der sowohl die Generierung der RNA Sequenz als auch die Ribozymsspaltung gleichzeitig ablaufen, zu untersuchen, basierten auf der Inkorporation von radioaktiv markierten [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-GTP Nukleotiden und einer rechnerischen Rückermittlung der Ribozymphasen. Die Nutzung einer fluoreszenten Markierung mittels eines unnatürlichen Basenpaars vereinfacht den experimentellen Aufwand und ermöglicht eine gezielte Markierung am 5'-Ende des Ribozyms.

## 4 Ziel der Arbeit

Die Rolle des CPEB3 Ribozyms verbleibt bis heute ungeklärt. Bisherige Studien konnten aufgrund fehlender Daten zum Ribozym nicht klären, ob es eine wichtige Funktion in der Genregulation in Säugern und im Menschen übernimmt oder es sich um ein evolutionäres Überbleibsel handelt. Daher soll das CPEB3 Ribozym in der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden. In verschiedenen Teilen der Studien sollen dabei sowohl der Spaltungsmechanismus als auch die strukturellen Besonderheiten des CPEB3 Ribozyms berücksichtigt werden.

Zur Untersuchung der *in vitro* Spaltung werden zwei Methoden eingesetzt. Aus vorherigen Studien mit dem CPEB3 Ribozym ist eine Spaltung aufgrund des Kontaktes mit  $Mg^{2+}$  bei der Transkription sowie den Aufreinigungsmethoden und die Tendenz zur Fehlfaltung bekannt. Eine Lösung ist die Aufteilung des *intramolekular* spaltenden Ribozyms in kürzere Stränge und die Rekonstruktion eines *intermolekular* spaltenden Ribozyms (transspaltendes Ribozym). Diese Methode wurde in früheren Studien des HDV Ribozyms erfolgreich eingesetzt.<sup>[55, 65]</sup> Basierend auf der Eliminierung der L4 Wenderegion wird das Ribozym in zwei Stränge, nämlich einen langen Substratstrang (CPEB3 SA) und einen kurzen Strang CPEB3 B aufgeteilt (Abbildung 4.1). Durch eine  $^{32}P$ -Markierung am 5'-Ende des CPEB3 SA Strangs und einem Hybridisierungsschritt soll *in vitro* eine Rekonstruktion des transspaltenden CPEB3 Ribozyms erfolgen. Durch die Entwicklung geeigneter Bedingungen soll diese neue Methode zu einem einfach zugänglichen Ansatz zur Untersuchung des CPEB3 Ribozyms werden.

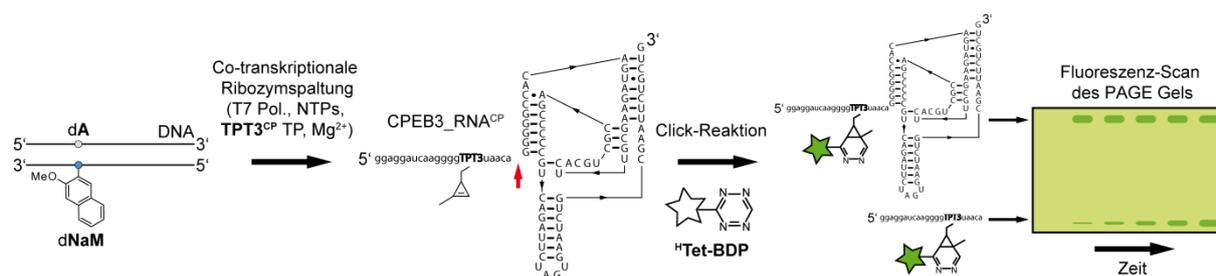


**Abbildung 4.1: Aufspaltung des CPEB3 Ribozyms in zwei Stränge.** Durch die Eliminierung der L4 Wenderegion soll der kurze Strang CPEB3 B mit dem  $C_{57}$  und der lange Substratstrang CPEB3 SA, der gleichzeitig Strukturgebend agieren soll, entstehen. Der CPEB3 SA Strang wird am 5'-Ende  $^{32}P$ -markiert, das Ribozym aus den beiden Strängen durch einen Hybridisierungsschritt *in vitro* rekonstruiert und untersucht.

Der erste Schritt der Untersuchung des Spaltungsmechanismus mittels der an das CPEB3 Ribozym angepassten Rekonstruktionsmethode soll der Vergleich der Reaktion mit einer  $C_{57}U$ -Mutante erfolgen. Dies soll nochmals beweisen, dass das Cytosin  $C_{57}$  essentiell für die Spaltung ist. Mithilfe von Imidazol soll die Spaltungsreaktion wiederhergestellt und die Auswirkungen auf die Spaltung beobachtet werden. Ferner wird der Effekt wechselnder Reaktionsbedingungen beobachtet. Aufgrund des in früheren Studien vorgeschlagenen Mechanismus soll ein pH-Profil der Reaktion erstellt und die entsprechenden  $pKa$ -Werte bestimmt werden. Außerdem wird die bereits im HDV Ribozym beobachtete Ionen-

Promiskuität auch im CPEB3 Ribozym überprüft. Das Spaltungsverhalten des CPEB3 Ribozyms soll in Gegenwart der Testionen  $K^+$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Cu^{2+}$  untersucht werden. Schließlich wird auch der Effekt des Einsatzes von unterschiedlichen Ionen gleichzeitig evaluiert. Diese experimentelle Reihe soll erstmals eine potentielle Relevanz der gewählten Ionen in dem Mechanismus und der Faltung des CPEB3 Ribozyms bewerten.

Die Analyse der Spaltungsaktivität soll durch die gezielte Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende des CPEB3 Ribozyms erfolgen. Der ortsspezifische Einbau der fluoreszenten Sonde wird durch das UBP **dNaM - TPT3<sup>CP</sup>** mit **dNaM** im DNA Templat und **TPT3<sup>CP</sup>** in der Reaktionslösung in einer T7 Transkriptionsreaktion erfolgen. Die Spaltung des CPEB3 Ribozyms soll auf diese Weise co-transkriptional verlaufen. Das am **TPT3<sup>CP</sup>** sitzende Cyclopropen wird daraufhin für eine Alkin-Tetrazin-Ligation genutzt. Über eine Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf wird ein Fluoreszenzfarbstoff als Tetrazinkonjugat (**<sup>H</sup>Tet-BDP**) bioorthogonal und Katalysator-frei in die Ribozymsequenz eingefügt (Abbildung 4.2). Nach einer elektrophoretischen Auftrennung der entnommenen Proben werden die Intensitäten der Banden des ungespaltenen Ribozyms und des 5'-Endes evaluiert. Essentiell für die Auswertung der co-transkriptionalen Spaltung ist der lineare Anstieg der gesamten RNA Menge in der Reaktionslösung. Die gewonnenen Daten sollen mit dem Spaltungsverhalten des zwei-strängigen Ribozym evaluiert und verglichen werden.



**Abbildung 4.2: Co-transkriptionaler Spaltungsassay auf der Grundlage des UBPs dNaM - TPT3<sup>CP</sup> mit anschließender Click-Reaktion.** Für die Transkriptionsreaktion sollen zwei DNA Stränge mit einem dNaM an gewünschter Position hybridisiert und zur T7 Transkription mit TPT3<sup>CP</sup> und Mg<sup>2+</sup> gegeben werden. Dadurch soll das CPEB3 Ribozym erzeugt und *in situ* gespalten (roter Pfeil). Die Produkte, nämlich das ungespaltene CPEB3 Ribozym und das gespaltene 5'-Ende, werden durch eine Click-Reaktion mit einem <sup>H</sup>Tet-BDP visualisiert und elektrophoretisch aufgetrennt. (Abbildung modifiziert aus<sup>[175]</sup>)

Bei den strukturellen Untersuchungen des CPEB3 Ribozyms wird der Fokus auf die hochkonservierte Guanin-reiche Sequenz aus fünf hintereinander liegenden Guaninbasen in der P1 Helix gelegt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird diese Sequenz auf die Existenz eines G-Quadruplexes untersucht. Mithilfe elektrophoretischer Methoden, einschließlich des Einsatzes der Liganden ThT und TMPyP4, der CD und UV Spektroskopie wird der potentielle G-Quadruplex charakterisiert. Die Struktur des G-Quadruplexes soll mittels der 1D und 2D <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie vollständig aufgeklärt werden. Auf der Grundlage der gewonnenen Daten soll eine Relevanz des potentiellen G-Quadruplexes für die Funktion und Regulation evaluiert werden.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Der Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms

Bis dato existieren keine Daten zur potentiellen Relevanz des CPEB3 Ribozyms in der Genregulation bei Säugern und im Menschen. Nicht zuletzt ist dieses fehlende Verständnis eine Folge fehlender Daten zum Spaltungsmechanismus des Ribozyms, seiner Regulation, seiner möglichen Interaktionspartner sowie seiner Faltung. Daher widmet sich die vorliegende Arbeit der Charakterisierung des CPEB3 Ribozyms mittels der Untersuchung des Spaltungsmechanismus und der potentiellen Regulationsmechanismen. Die Ergebnisse sollen zukünftige Studien zur Rolle des CPEB3 Ribozyms in der Genregulation bei Säugern und im Menschen unterstützen. Zur Untersuchung der *in vitro* Spaltung soll basierend auf der Eliminierung der L4 Wenderegion das CPEB3 Ribozym in die Stränge CPEB3 SA und CPEB3 B aufgeteilt werden. Durch eine <sup>32</sup>P-Markierung am 5'-Ende des CPEB3 SA Strangs und einem Hybridisierungsschritt soll *in vitro* eine Rekonstruktion des transspaltenden CPEB3 Ribozyms erfolgen. Ferner sollen geeignete Bedingungen für einen neuen Assay zur Untersuchung der CPEB3-Ribozymsspaltung entwickelt werden. Mittels eines co-transkriptionalen Assays mithilfe des **dNaM - TPT3<sup>CP</sup>** UBPs soll ein Vergleich der Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozyms erfolgen.

#### 5.1.1 Rekonstruktion eines aktiven CPEB3 RNA Moleküls aus kleineren Oligonukleotiden

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozyms. Dazu sollte die *in vitro* Kinetik des Ribozyms untersucht werden. Zur Umgehung der Transkriptionsreaktion, die Mg<sup>2+</sup> zur Generierung der CPEB3 RNA Strangs benötigt, bot sich die *in vitro* Rekonstruktion eines aktiven transspaltenden CPEB3 Ribozyms aus zwei oder mehreren kürzeren Oligonukleotid-Strängen an. Diese Methodik wurde für andere Ribozyme bereits erfolgreich eingesetzt. Für das Hammerhead Ribozym und das Hairpin Ribozym existieren bereits erfolgreich durchgeführte Studien mit spaltungsaktiven zwei-strängigen Konstrukten.<sup>[176, 177]</sup> Das genomische HDV Ribozym konnte ebenfalls bereits aus kürzeren Strängen rekonstruiert werden. Chen *et al.* gelang es, das genomische HDV Ribozym aus zwei kürzeren Strängen für eine katalytische Untersuchung der Metall-Ionen-Interaktion des G<sub>1</sub>-U<sub>37</sub>-Wobble-Paars zu rekonstruieren.<sup>[55]</sup> Durch die Entfernung der J1/2 Wenderegion entstand ein langer Struktur-gebender Strang mit dem katalytisch essentiellen C<sub>75</sub> (70 nt) sowie ein kurzer Substratstrang (9 nt). Auch die Einteilung des HDV Ribozyms in drei Stränge wurde bereits erfolgreich durchgeführt. Die Rekonstruktion aus einem Substratstrang (8 nt) und den Ribozym-Strängen (16 und 35 nt) ermöglichte eine Untersuchung der Eigenschaften des Ribozyms einschließlich der Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationsabhängigkeit, der pH-Abhängigkeit der Reaktion und der Effekte der Temperatur.<sup>[178, 179]</sup> Für das CPEB3 Ribozym existieren bis dato keine vergleichbaren Rekonstruktionsmethoden.

Der erste Schritt dieser Arbeit war die Ermittlung einer geeigneten Unterteilung des CPEB3 Ribozyms in kürzere Stränge. Zu diesem Zweck wurden die folgenden Überlegungen festgelegt:

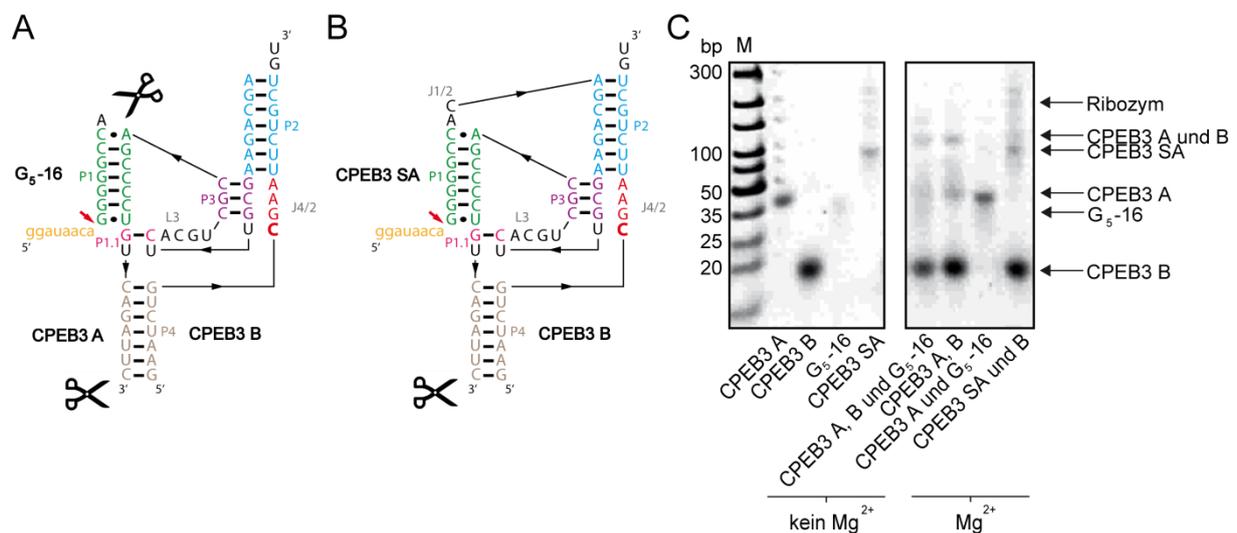
1) Die Stränge sollten eine durch die Oligonukleotid-Synthese tolerierbare Länge aufweisen um die Oligonukleotide in einer möglichst reinen Qualität zu erhalten. Trotz der Möglichkeit der Synthese von Oligonukleotiden mit einer Länge von über 100 Nucleobasen, setzt das vermehrte Vorkommen von Nebenreaktionen eine praktische Grenze für die Größe der synthetischen Oligonukleotide.<sup>[180]</sup> Gleichzeitig ist für das CPEB3 Ribozym eine Tendenz zur Fehlfaltung bekannt.<sup>[69, 76]</sup> Daher sollte die gewählte Sequenzlänge der kurzen Stränge sowohl fehlerfrei synthetisierbar sein (maximal 60 nt) als auch genügend Struktur-stabilisierende und fehlfaltungsmeidende Elemente enthalten.

2) Eine klare Trennung der potentiellen Reaktanten innerhalb des CPEB3 Ribozyms sollte gewährleistet sein. C<sub>57</sub> wurde bereits als essentiell für die Spaltung bewiesen.<sup>[16, 67]</sup> Daher erschien die Trennung dieser Base von der Sequenz, die den Spaltungsort A<sub>-1</sub> zwischen G<sub>1</sub> beinhaltet, als ein wichtiges Kriterium für die Wahl der geeigneten Aufteilung der CPEB3 Sequenz. Ferner sollten die gewählten kurzen Stränge keine Spaltungsaktivität vor der Rekonstruktion aufweisen.

3) Es sollte kein Kontakt des Ribozyms mit Mg<sup>2+</sup> vor dem Kinetik-Assay stattfinden um eine Spaltung zu verhindern.

Zunächst wurde eine Rekonstruktion eines transspaltenden CPEB3 Ribozyms aus drei Stränge getestet (Abbildung 5.1 A). Dabei entstanden nach der Entfernung der Wenderegion J1/2 und des L4 Loops der Substratstrang G<sub>5</sub>-16 (16 nt) und die Stränge CPEB3 A (37 nt) und CPEB3 B (20 nt). Die Kürze der Stränge erschien als ein Vorteil in der Synthese dieser. Insbesondere in Charakterisierungsstudien des HDV Ribozyms wurde die drei-strängige Aufteilung der Sequenz erfolgreich eingesetzt. Die Rekonstruktionsexperimente wurden über die native PAGE, die die gebildeten Strukturen nach der Hybridisierung nicht stören sollte, evaluiert (Abbildung 5.1 C). Jedoch wurde auf diese Weise kein transspaltendes CPEB3 Ribozym generiert, obwohl die Stränge CPEB3 A und B zusammen eine Faltung zeigten (Abbildung 5.1 C, Bahn 5 und 6). Statt der erwarteten G-C-Basenpaarung in der P1 Helix bildete dieser aufgrund der G-reichen Region im G<sub>5</sub>-16 Substratstrang ein stabiles Aggregat mit sich selbst, was detailliertere Untersuchungen dieses Komplexes veranlasste (siehe Kapitel 5.2). Eine analoge G-reiche Sequenz existiert nicht im HDV Ribozym, weswegen sich diese Problematik als spezifisch für das CPEB3 Ribozym herausstellte. Zur Vermeidung einer erneuten Komplexbildung musste eine alternative Unterteilung die native Faltung der P1 Helix unterstützen. Somit eignete sich die Einteilung in zwei Stränge, die nach der Entfernung der J1/2-Verbindungsregion entstehen würden, ebenfalls nicht. Obwohl diese Aufteilung für das HDV Ribozym Erfolge erzielte<sup>[65]</sup>, war in diesem Fall für das CPEB3 Ribozym eine erneute Aggregation des Substratstrang G<sub>5</sub>-16 zu erwarten. Alternativ dazu bestand die Möglichkeit der Einteilung des CPEB3 Ribozyms in zwei Stränge durch die Entfernung des L4 Loops (Abbildung 5.1 B). Dieser befand sich in einer angemessenen Distanz zur Pseudo-Knoten-Struktur und zum Spaltungsort, was die Wahrscheinlichkeit zu einer korrekten Faltung des Ribozyms erhöhte. So kam die Unterteilung des Ribozyms in die Stränge CPEB3 SA (53 nt) und CPEB3 B (20 nt) zustande. Dabei diente der lange CPEB3 SA Strang als Struktur-gebendes Element und verhinderte eine Aggregation der G-reichen Sequenz. Dieser Strang

wurde über eine Transkription eines entsprechenden PCR-Produkts mit anschließender Aufreinigung generiert (siehe Kapitel 7.2.1, 7.2.4 - 7.2.6). Der CPEB3 B Strang dagegen beinhaltet das für die Spaltungsreaktion essentielle C<sub>57</sub>. Das Bandenmuster des Rekonstruktionsexperiments mit dem Strang CPEB3 SA und CPEB3 B zeigte eine starke Ähnlichkeit mit dem des CPEB3 SA Strangs (Abbildung 5.1 C, Bahn 4). Lediglich eine schwache Verstärkung einer Bande im Bandenmuster deutete eine Assemblierung des CPEB3 Ribozyms an (Abbildung 5.1 C, Bahn 8). Die schwache Färbung der Bande konnte als eine allgemeine Trägheit zur *in vitro* Assemblierung des Ribozyms gedeutet werden, sodass nur ein kleiner Anteil des CPEB3 Ribozyms unter den verwendeten Bedingungen entstand. Des Weiteren wurde in der vorliegenden experimentellen Reihe auf eine <sup>32</sup>P-Markierung verzichtet, was die Sensitivität der Banden verringerte. Dies unterstrich die Notwendigkeit eines Nachweises einer Spaltungsreaktion unter Zuhilfenahme einer <sup>32</sup>P-Markierung für einen endgültigen Beweis einer nativen und somit spaltungsaktiven Struktur des rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms (siehe Kapitel 5.1.2).



**Abbildung 5.1: Rekonstruktion eines transspaltenden CPEB3 Ribozyms.** A: Zunächst sollte das CPEB3 Ribozym aus den drei kurzen Strängen CPEB3 A, CPEB3 B und G<sub>5</sub>-16 rekonstruiert werden, was durch die Entfernung des L4 Loops und J1/2-Verbindungsregion vonstattengehen sollte. B: Durch die Entfernung des L4 Loops entstand die Einteilung des Ribozyms in die zwei kurzen Stränge CPEB3 SA und CPEB3 B. C: Native PAGE (20 %) zur Kontrolle der Hybridisierung.

### 5.1.2 Kinetische Aktivität des rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms

Mittels der nativen PAGE konnte eine Assemblierung des CPEB3 Ribozyms nachgewiesen werden. Der nächste Schritt bestand in dem Nachweis einer Spaltungsaktivität des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms. Die Voraussetzung für eine Spaltungsreaktion war die korrekte Faltung, bei der das spaltungsessentielle C<sub>57</sub> in der Tertiärstruktur des Ribozyms räumlich erreichbar an die Basen A<sub>-1</sub> und G<sub>1</sub> angeordnet wurde. Frühere Studien begegneten bereits der Problematik des Fehlfaltung und somit der langsamen Spaltung oder einer Inaktivität des Ribozyms.<sup>[69]</sup> Die Methode der Rekonstruktion sollte, neben der Spaltung mithilfe von Mg<sup>2+</sup>, ebenso die Fehlfaltung minimieren um die Untersuchung des Spaltungsmechanismus zu vereinfachen. Für eine sensitivere Detektion wurde der kommerziell erworbene Strang CPEB3

SA am 5'-Ende mit einer  $^{32}\text{P}$ -Markierung versehen und das zwei-strängige Ribozym hybridisiert (siehe Kapitel 7.2.10 und 7.2.12.1). Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Reaktion mit FA-EDTA gestoppt und in einem denaturierenden PAGE Gel aufgetrennt. Das erwartete Bild nach dem *Phosphoimaging* des Gels sollte ein noch nicht gespaltenes CPEB3 Ribozym und ein 8 nt langes Spaltungsprodukt beinhalten. Die Intensität der Bande des Ribozyms sollte dabei über den Messzeitraum sinken, während für die Menge des Spaltungsprodukts eine Zunahme erwartet wurde.

Tatsächlich konnte dieses Verhalten in den kinetischen Experimenten detektiert werden. Das in der Abbildung 5.2 aufgeführte 20 % denaturierende PAGE Gel zeigte mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$  deutlich die Bande des CPEB3 Ribozyms, die über den Messzeitraum in ihrer Intensität abnahm, sowie eine Bande des Spaltungsprodukts, deren Intensität wiederum aufgrund der vermehrten Spaltung zunahm. Im Vergleich dazu konnten Kontrollexperimente ohne  $\text{MgCl}_2$  (schwarze Kreise) und mit dem Strang CPEB3 SA allein (weiße Quadrate) keine Spaltungsreaktion über den beobachteten Zeitraum hervorrufen. Ebenso verblieb die  $\text{C}_{57}\text{U}$  CPEB3 Ribozym Mutante inaktiv (weiße Kreise). Szosták und Mitarbeiter beobachteten zuvor bereits eine Verringerung der Spaltungsaktivität um einen Faktor von 200 bei einem Austausch des  $\text{C}_{57}$  durch ein U oder G.<sup>[67]</sup>

Zur Auswertung der Intensitäten der Banden wurde *Phosphoimaging* genutzt. Die erhaltenen Daten in Standard-Assays mit zwei Banden, nämlich dem Spaltungsprodukt (hier CPEB3 Ribozym) und dem kurzen 8 nt langem Spaltungsprodukt, können in einer Auftragung der Fraktionsprodukte gegen die Zeit in zwei Gleichungen genutzt werden um die beobachtbare Spaltungsrate  $k_{obs}$  (engl. *observed*) bzw. die zwei Spaltungsraten  $k_{obs1}$  und  $k_{obs2}$  zu bestimmen. Bei der ersten Gleichung handelt es sich um eine einzeln-exponentielle Gleichung (Gleichung 5.1) mit  $f_{gespalten}$  als die gespaltene Fraktion,  $t$  als Zeit,  $A$  als die Amplitude der beobachtbaren Phase,  $B$  als die gespaltene Fraktion nach Reaktionsende und  $k_{obs}$  als die beobachtete Spaltungsrate der 1. Ordnung.

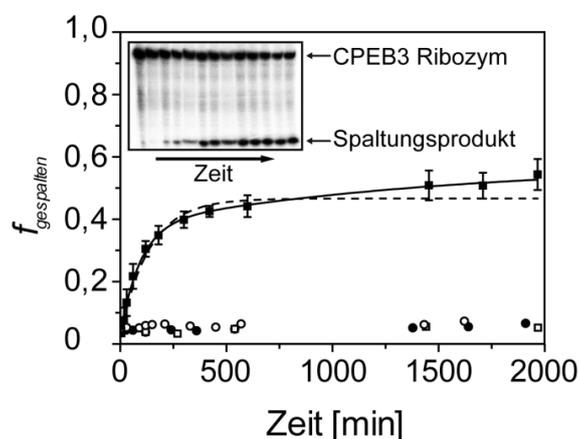
Gleichung 5.1: 
$$f_{gespalten} = -Ae^{-k_{obs}t} + B$$

In einer doppelt-exponentiellen Gleichung 5.2 können die gesammelten Daten zur Ermittlung der Spaltungsraten  $k_{obs1}$  und  $k_{obs2}$  genutzt werden. Dabei stellt  $f_{gespalten}$  die gespaltene Fraktion,  $t$  die Zeit,  $A_1$  und  $A_2$  die Amplituden der beobachtbaren Phasen,  $B$  die gespaltene Fraktion nach Reaktionsende und  $k_{obs1}$  und  $k_{obs2}$  die beobachteten Spaltungsraten der 1. Ordnung dar.

Gleichung 5.2: 
$$f_{gespalten} = -A_1e^{-k_{obs1}t} - A_2e^{-k_{obs2}t} + B$$

Nach der Evaluierung der Intensitäten der Banden per *Phosphoimaging* wurden die Daten in beide Gleichungen gefittet. Dabei entstand jeweils eine typische Sättigungskurve, die die maximale Spaltung nach ca. 600 min erreichte. Spätere Proben ergaben keine weitere Veränderung in der Intensität. Jedoch konnte mit einer doppelt-exponentiellen Auftragung ( $R^2 = 0,998$ ) ein besserer Fit erreicht werden als mit einer einzeln-exponentiellen Auftragung ( $R^2 = 0,992$ ). Dieser Effekt ist auf das biphasische Verhalten des CPEB3 Ribozyms zurückzuführen, nach dem das Ribozym entweder in eine schnelle oder aber eine langsame

Spaltung vollzieht bzw. die Spaltung abwesend verbleibt, wobei unterschiedliche Spaltungsgeschwindigkeiten beobachtet werden können.<sup>[69]</sup> Aus diesem Grund eignete sich in dieser Arbeit die Nutzung der doppelt-exponentiellen Auftragung. Die schnell spaltende Fraktion  $A_1$  betrug im Durchschnitt  $25,3 \pm 6,2 \%$  und zeigte eine Rate  $k_{obs1}$  von durchschnittlich  $0,014 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$ . Einen ähnlichen Wert von  $0,04 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  ermittelten zuvor Bevilacqua und Mitarbeiter für das Ribozym in seiner vollen Länge bei Standard-Bedingungen.<sup>[76]</sup> Somit konnte bestätigt werden, dass das aus zwei RNA Strängen rekonstruierte CPEB3 Ribozym zu einer Spaltung fähig war. Für die in dieser Arbeit beobachteten langsam spaltenden Fraktion  $A_2$  konnte ein Anteil von durchschnittlich  $36,1 \pm 18,2 \%$  berechnet werden. Für die dazugehörige Rate  $k_{obs2}$  errechnete sich ein durchschnittlicher Wert von  $0,002 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ , der in allen Messungen unabhängig von den Bedingungen konstant blieb, was der fehlgefalteten Fraktion des Ribozyms zugesprochen wurde. Somit verblieb dieser Wert für die weiteren Untersuchungen nicht von Bedeutung. Durch die ermittelten Daten wurde bestätigt, dass eine Fraktion innerhalb der kinetischen Situation nicht korrekt faltete und somit nicht spaltete. Beispielsweise konnte in der in Abbildung 5.2 aufgeführten kinetischen Auswertung festgestellt werden, dass sich für  $f_{gespalten}$  lediglich ein Anteil von ca.  $54,3 \pm 5 \%$  zeigte, obwohl die Spaltungskurve ihre Sättigung erreichte. Dieser Effekt konnte in allen experimentellen Durchführungen beobachtet werden, was darauf hinwies, dass das Ribozym trotz der Rekonstruktion in der getesteten *in vitro* Bedingung anfällig für eine Fehlfaltung verblieb, die schließlich die vollständige Spaltung des Ribozyms verhinderte.

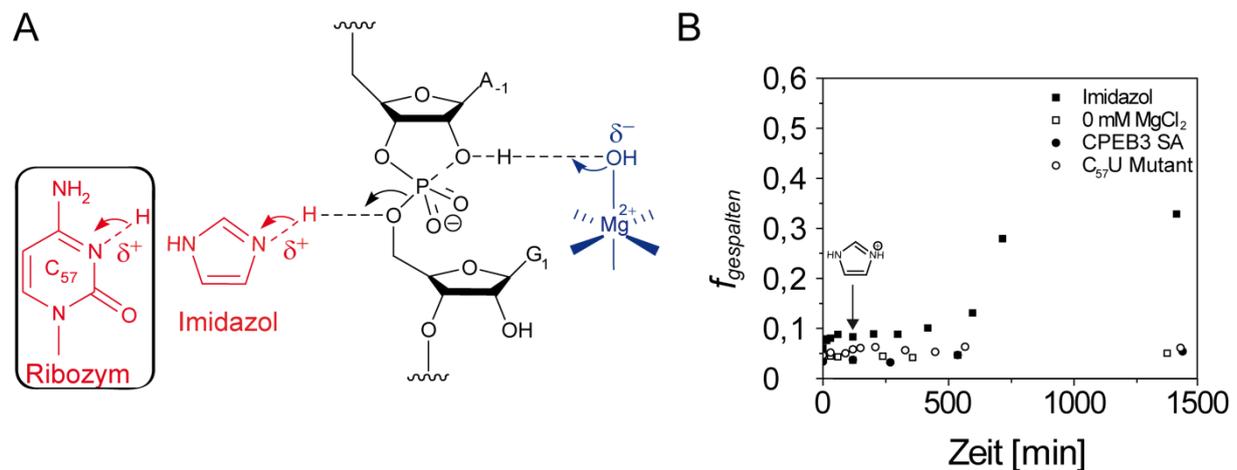


**Abbildung 5.2: Etablierung der kinetischen Untersuchung des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms.** Hier aufgeführt ist ein Beispiel eines angepassten kinetischen Experiments bei einem pH-Wert von 7,5 (1x HEPES Puffer) mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$  als Spaltungsinitiator ( $n = 3$ ). Nach dem kinetischen Experiment wurden alle Proben in einem 20 % denaturierenden PAGE Gel aufgetrennt (eingefügte Abbildung). Deutlich war das ungespaltene CPEB3 Ribozym ( $E$ ) sowie das Spaltungsprodukt ( $P$ ) zu erkennen. Die Intensitäten der Banden dienen als Grundlage für die Ermittlung von  $f_{gespalten}$ . Durch die Auftragung der ermittelten Daten für  $f_{gespalten}$ , die durch die Formel  $P / (E + P)$  repräsentiert wurden, gegen die Zeit in min (schwarze Quadrate) konnte ein Spaltungsverlauf des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms mit einer sättigenden Wirkung beobachtet werden (gestrichelte Linie: einzeln-exponentielle Auftragung,  $R^2 = 0,992$ ; durchgezogene Linie: doppelt-exponentielle Auftragung,  $R^2 = 0,998$ ). Als Kontrolle dazu wurde parallel eine kinetische Untersuchung ohne  $\text{MgCl}_2$  (schwarze Kreise) und der Strang CPEB3 SA allein (weiße Quadrate) genutzt. Schließlich konnte durch die Mutation  $C_{57}U$  in Anwesenheit von 10 mM  $\text{MgCl}_2$  die katalytische Notwendigkeit dieser Base bestätigt werden (weiße Kreise).

Trotz der  $Mg^{2+}$ -freien *in vitro* Rekonstruktion des CPEB3 Ribozyms konnte somit weder die Spaltungsrate beschleunigt noch der Anteil der fehlgefalteten Fraktion reduziert werden. Nichtsdestotrotz konnte durch die Einteilung des CPEB3 Ribozyms in zwei Strängen eine simple und leicht zugängliche Methode zur dessen Untersuchung etabliert werden.

### 5.1.3 Wiederherstellung der Spaltungsaktivität der CPEB3 Ribozym C<sub>57</sub>U Mutante

Im Rahmen der Etablierung der Standards für den Spaltungsassay eines aus zwei Strängen rekonstruierten CPEB3 Ribozyms wurde in dieser Arbeit bereits die essentielle Rolle des C<sub>57</sub>, wie sie auch in der Literatur berichtet wurde<sup>[67]</sup>, bestätigt (Abbildung 5.2). Parallel dazu führte die Mutation der essentiellen Base C<sub>76</sub> im antigenomischen HDV Ribozym ebenfalls zu einer Inhibierung der Spaltungsaktivität. Durch die Zugabe des strukturell verwandten, jedoch einfacher aufgebauten Imidazols als alternativen Lieferanten der für den Spaltungsmechanismus erforderlichen N3-Gruppe im Cytosin konnte die Spaltungsreaktion wiederhergestellt werden.<sup>[57]</sup> Somit wurde der Verdacht der Involvierung der N3-Gruppe im C<sub>76</sub> unterstützt und trug zur Etablierung der aktuellen Vorstellung des Spaltungsmechanismus des HDV Ribozyms bei. Für das CPEB3 Ribozym wurde ein vergleichbares Phänomen bisher nicht untersucht. Daher wurde dem Nachweis der Wiederherstellung der Spaltungsaktivität einer zwei-strängigen C<sub>57</sub>U Mutante eine experimentelle Untersuchung in dieser Arbeit gewidmet. Dafür wurden die Standard-Bedingungen des etablierten Assays mit einer finalen Konzentration von 200 mM Imidazol komplettiert. Die Kontrollreaktionen enthielten entweder kein  $MgCl_2$  oder lediglich das mutierte zwei-strängige Ribozym in 10 mM  $MgCl_2$ . Wie der Abbildung 5.3 B entnommen werden kann, verblieb das Verhalten des mutierten Ribozyms anfänglich vergleichbar mit der Reaktionsentwicklung der Kontrollreaktionen. Nach der Zugabe des Imidazols nach 200 min nach dem Reaktionsstart konnte jedoch eine deutliche Steigerung der gespaltenen Fraktion detektiert werden. Der Anstieg bewies die wiederhergestellte Wirkung, die das Imidazol auf die Spaltungsreaktion hatte. Diese Wiederherstellung setzte ca. 2 h nach der Zugabe des Imidazols ein. Vermutlich ersetzte eine der NH-Gruppen des Imidazols die Funktion der N3-Gruppe des Cytosins C<sub>57</sub>, die als Säure agierte (Abbildung 5.3 A). Imidazol besitzt einen höheren *pKa*-Wert von 6,95 als das freie Cytosin, das einen *pKa*-Wert von 4,2 vorweist.<sup>[181]</sup> Jedoch muss eine Verschiebung des *pKa*-Werts des spaltungsessentiellen Cytosins in Betracht gezogen werden. Für das HDV Ribozym wurde bereits in früheren Studien eine Verschiebung des *pKa*-Werts des spaltungsessentiellen Cytosins um etwa zwei pH-Einheiten nachgewiesen.<sup>[58]</sup> Durch die strukturellen und reaktionsbedingten Parallelen zwischen dem HDV und dem CPEB3 Ribozym wäre auch hier ein vergleichbarer Mechanismus möglich, wonach sich der *pKa*-Wert des C<sub>57</sub> durch die elektrostatischen Wechselwirkungen in die Säure-agierende Rolle verschiebt. Das Imidazol würde somit den verschobenen *pKa*-Wert des C<sub>57</sub> imitieren (Abbildung 5.3 A). Unter diesen Bedingungen war ein Beitrag des Imidazols zur Spaltung der rekonstruierten C<sub>57</sub>U CPEB3 Mutante denkbar.



**Abbildung 5.3: Wiederherstellung der Spaltungsaktivität des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms mit der C<sub>57</sub>U Mutation** (n = 1). A: Vorgeschlagerener Mechanismus der Restaurierung der Spaltungsaktivität mithilfe des Imidazols, welches vermutlich als Säure agiert. B: Einfluss des Imidazols auf die Spaltungsaktivität des mutierten CPEB3 Ribozyms C<sub>57</sub>U. Im Vergleich dazu zeigten die kinetischen Verläufe mit der C<sub>57</sub>U Mutante, ohne MgCl<sub>2</sub> in der Lösung und mit dem Strang CPEB3 SA allein keine Änderung in der Aktivität.

Für das HDV Ribozym wurde der Aktivitäts-wiederherstellende Effekt des Imidazols umfassend untersucht. Eindeutig konnte sich ein Zusammenhang zwischen der Spaltungsrate  $k_{obs}$  des antigenomischen HDV Ribozyms, der Imidazol-Konzentration und dem pH-Wert der Reaktion herauskristallisieren. Bei einer steigenden Imidazol-Konzentration sowie einem steigenden pH-Wert verbesserte sich die beobachtete Spaltungsrate in einem linearen Verhältnis.<sup>[57]</sup> Dies unterstützte die ersetzende Rolle des Imidazols in der Spaltungsreaktion. Für das CPEB3 Ribozym fehlten bis dato vergleichbare Datensätze trotz der strukturellen Parallelen der beiden Ribozyme. In dieser Arbeit konnte erstmals eine Wiederherstellung der Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozyms, das aus zwei Strängen rekonstruiert worden war, beobachtet werden. Zur Evaluierung des Spaltungsverhaltens konnte in diesem Fall die erhaltenen Daten nicht gefittet werden. Außerdem wurden lediglich 32,9 % des Ribozyms bei diesem Experiment gespalten. Im Vergleich dazu erreichte das zwei-strängige CPEB3 Ribozym in den übrigen Untersuchungen mit Mg<sup>2+</sup> gespaltenen Fraktionen von 45 - 86 % (siehe Kapitel 5.1.4). Dieses Ergebnis deutete auf eine sehr langsame Spaltung hin. Die beobachteten Komplikationen waren vermutlich die Folge einer Fehlfaltung des CPEB3 Ribozyms.

#### 5.1.4 pH-Abhängigkeit des rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms

Für das CPEB3 Ribozym existiert nur eine einzige pH-abhängige kinetische Studie, die sich an dem Ribozym-Molekül in seiner vollen Länge orientiert.<sup>[67]</sup> Während der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Spaltungsreaktion des vollständigen CPEB3 Ribozyms mit 5 mM MgCl<sub>2</sub> beobachteten Salehi-Ashtiani *et al.* einen Plateau-Bereich zwischen pH 5,5 und 8,5 (siehe Abbildung 3.12 C). Diese Ergebnisse legten nahe, dass der Säure-Base-Mechanismus der Spaltung von zwei funktionellen Gruppen mit unterschiedlichen  $pK_a$ -Werten ausgehen musste, wobei C<sub>57</sub> als eine funktionelle Gruppe beteiligt ist. Durch den Plateau-Charakter der

pH-Kurve konnten jedoch bisher keine  $pKa$ -Werte der beteiligten funktionellen Gruppen ermittelt werden.

Daher widmete sich ein Teil dieser Arbeit der Untersuchung der pH-Abhängigkeit des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms. Unter dem Einbezug der Säure  $C_{57}$  in einem Spaltungsmechanismus war bei einer pH-abhängigen Auftragung der erhaltenen auswertbaren Messwerte  $k_{obs1}$  eine Abnahme seiner Fraktion  $f_A$  in ihrer protonierten Form zu erwarten (Abbildung 5.4 A). Bei der alleinigen Beteiligung einer Base dagegen würde dessen Deprotonierung eine lineare Steigerung der Fraktion  $f_B$  in einer pH-abhängigen Auftragung bedeuten. Schließlich würde ein Zusammenspiel aus einer Säure und einer Base mit den Fraktionen  $f_A$  für die Säure in ihrer protonierten Form und  $f_B$  für die Base in ihrer deprotonierten Form zusammen mit  $k_{kat}$  als die Ribozym-Spaltungsrate mit einer Säure und einer Base in ihren notwendigen Formen die beobachtbare Spaltungsrate  $k_{obs}$  ergeben<sup>[182]</sup>:

$$\text{Gleichung 5.3:} \quad k_{obs} = k_{kat} \times f_A \times f_B$$

Die Steigung der Spaltungsrate angefangen bei einem niedrigem pH-Wert wird in diesem Modell durch die Deprotonierung der Base erklärt, was durch die Steigung von  $f_B$  repräsentiert wird. Die Formation eines Plateaus setzt dann mit der Deprotonierung der Säure ein (i.e. Reduktion von  $f_A$ ), was die Steigung von  $f_B$  ausgleicht. Auf diese Weise kommt ein Glocken-ähnlicher Kurvenverlauf zustande. In diesem Fall sind auch zwei  $pKa$ -Werte zu erwarten. Diese können durch die Auswertung der pH-Abhängigkeit der beobachteten Spaltungsraten sowie einem Fit nach einem doppelten Ionisierungsmodell nach Bevilacqua evaluiert werden (siehe Kapitel 3.1.2).<sup>[39]</sup> Dabei können die beobachteten Spaltungsraten in Abhängigkeit zu einer pH-Wertskala gesetzt werden um nach Gleichung 5.4 die beiden Konstanten der Säure-Dissoziation von zwei titrierbaren funktionellen Gruppen,  $pKa_1$  und  $pKa_2$ , zu erhalten. Bei  $k_{gespalten}$  handelt es sich um die intrinsische Rate der Spaltungsreaktion.

$$\text{Gleichung 5.4:} \quad k_{obs} = \frac{k_{gespalten}}{1 + 10^{pKa_2 - pH} + 10^{pKa_2 - pKa_1} + 10^{pH - pKa_1}}$$

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit entsprach in dieser Arbeit jeder Datenpunkt einem Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Messungen mit jeweils dem besten Fit bei den pH-Werten 5, 5,5, 5,75, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5 und 9.

Bei der alleinigen Beteiligung der Säure  $C_{57}$  sollte die Kurve der pH-abhängigen Auftragung dem Verlauf von  $f_A$  folgen. Stattdessen wurde ein Glocken-ähnlicher Kurvenverlauf im pH-Profil des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms verzeichnet (Abbildung 5.4 B). Anders als mit dem CPEB3 Ribozym in seiner vollen Länge verblieb die Aktivität des rekonstruierten Ribozyms zwischen den pH-Werten 5,5 und 8,5 nicht in einem Plateau (siehe Abbildung 3.12). In dieser experimentellen Reihe jedoch war ein Hoch zwischen den pH-Werten von 5,5 und 6 zu beobachten. Dieser Bereich zeigte niedrige Schwankungen innerhalb der Messungen, wohingegen in den übrigen kinetischen pH-abhängigen Messungen hohe Schwankungen beobachtet wurden. Diese Vorkommnisse waren durch die Faltungsproblematik des CPEB3 Ribozyms zu erklären. Nichtsdestotrotz ließ sich aus diesen Daten schlussfolgern, dass das rekonstruierte CPEB3 Ribozym ein pH-Optimum besaß, dieses jedoch schmaler ausfiel, als

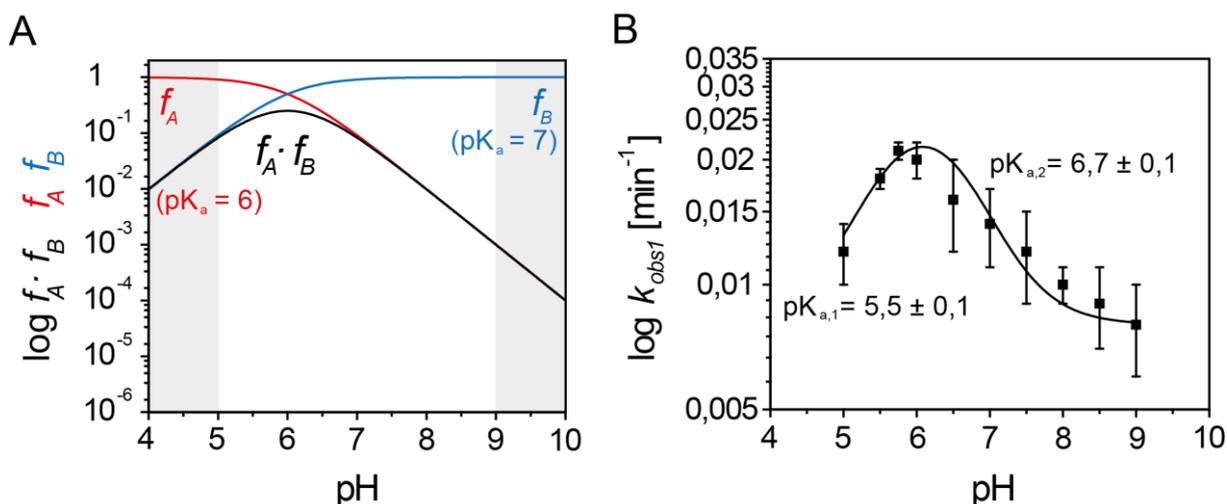
bisher vermutet wurde. Überraschend waren auch die relativ niedrigen Schwankungen der beobachteten Spaltungsraten  $k_{obs}$  im pH-Profil des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms. In einer früheren Studie von Kath-Schorr *et al.* wurde bereits ein ähnlicher Effekt mit dem Hairpin Ribozym beobachtet.<sup>[182]</sup> Dabei spaltete das aus vier Strängen rekonstruierte Hairpin Ribozym den Substrat-Strang, bei dem das Phosphat an der Spaltungsposition durch ein 5'-Phosphorothiolat (5'-PS) ersetzt wurde, mit konstanten Spaltungsraten, die im pH-Profil keine Schwankungen zeigten. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Spaltung des modifizierten Substrat-Strangs entweder pH-unabhängig stattfand oder aber die Spaltungsreaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend unter den angewandten Bedingungen war. Die niedrigen Schwankungen im pH-Profil des CPEB3 Ribozyms sprachen gegen eine pH-Unabhängigkeit der Spaltungsreaktion. Jedoch deutete die allgemeine Tendenz zu niedrigen  $k_{obs}$ -Schwankungen darauf hin, dass die Spaltungsreaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend war. Eine weitere Besonderheit im beobachteten pH-Profil waren die Kurvenverläufe für  $f_A$  bei  $pH > 7$  und  $f_B$  bei  $pH < 5,5$ . Hier konnten keine monoton linearen Verläufe bestätigt werden. In dem Modell von Bevilacqua *et al.* verlaufen der Abfall in  $f_A$  und der Anstieg in  $f_B$  linear, wenn die Spaltungsreaktion des beobachteten Ribozyms streng einem Säure-Base-Mechanismus folgt.<sup>[39]</sup> Die Abweichung von der Linearität in diesen Bereichen deutete auf mögliche zusätzliche pH-unabhängige Reaktionswege, die zu der Katalyse-Reaktion bei diesen pH-Werten beitragen. Auch für das vier-strängige Hairpin Ribozym wurde bei der Spaltung des 5'-PS Substrats eine nicht-lineare Steigung der Auftragung im pH-Profil bei  $pH < 6$  in  $f_B$  beobachtet.<sup>[182]</sup> Als Erklärung dafür wurde eine Deprotonierung des 2'-OH-Nukleophils durch das *pro-R* nicht-brückenbindende Sauerstoffatom des Phosphats an der Spaltungsposition oder die Protonierung einer am Spaltungsort nah gelegenen Nukleobase, beispielsweise A<sub>10</sub>, genannt.<sup>[183, 184]</sup> Auch für das CPEB3 Ribozym ist eine ähnliche Beteiligung einer benachbarten funktionellen Gruppe oder Base möglich. Da jedoch bis dato keine detaillierten strukturellen Studien des Spaltungsorts des CPEB3 Ribozyms existieren, verbleibt dieses Phänomen eine weitere Stufe auf dem Weg zur vollständigen Klärung des Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms.

Durch den Glocken-ähnlichen Kurvenverlauf wurden für  $pKa_1$  und  $pKa_2$  die Werte  $5,5 \pm 0,1$  für die Säure und  $6,7 \pm 0,1$  für die Base beobachtet. Dieses kinetische pH-Profil unterstütze das katalytische Model, in dem der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt mindestens einen Protonenaustausch beinhaltet. Jedoch deutete der ermittelte Datensatz anders als vermutet auf zwei ionisierbare Gruppen innerhalb des CPEB3 Ribozyms hin. Ferner konnte eine Verschiebung des  $pKa$ -Werts des C<sub>57</sub> im Vergleich zum freien Cytosin, das einen  $pKa = 4,2$  besitzt<sup>[18, 41]</sup>, innerhalb der CPEB3 Ribozym Struktur beobachtet werden. Dieser Wandel um  $\sim 1$  pH-Einheit entsprach den experimentellen Datensätzen mit dem HDV Ribozym in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ , nach denen die strukturellen Gegebenheiten um die für die Spaltung essentielle Nukleobase für eine Verschiebung des  $pKa$ -Werts sorgten. Auffälligerweise lag der Wert für  $pKa_1$  näher an dem  $pKa$ -Wert des freien Cytosins. Dies hätte eine erleichterte Protonierung des Cytosins und somit eine schnellere Spaltung zur Folge. Dieser Effekt würde die vergleichbar hohe Spaltungsrate mit den niedrigen Abweichungen im Kurvenverlauf im pH-Profil erklären. Aufgrund des pH-Optimums wäre C<sub>57</sub> als primär aktive Spezies an der Reaktion beteiligt. Bei einer Steigerung des pH-Werts entfiel dieses Optimum, was sich auch in den

allgemein sinkenden Spaltungsraten und deren Abweichungen zeigte.  $pK_{a2}$  entsprach eher den experimentell ermittelten  $pK_a$  für das HDV Ribozym, wonach dieser durch die Verschiebung in einen neutraleren Bereich zu einem Protonentransfer und somit dem vorgeschlagenen Mechanismus entsprechen würde.

**Tabelle 5.1:** Ermittelte Spaltungsdaten  $k_{obs1}$  und  $k_{obs2}$  und  $f_{gespalten}$  zur Evaluierung der pH-Abhängigkeit einer  $Mg^{2+}$ -induzierten CPEB3 RNA Spaltung ( $n = 3$ ).

pH	$f_{gespalten}$	$k_{obs1}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k_{obs2}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]
5	$0,53 \pm 0,02$	$0,012 \pm 0,002$	$0,003 \pm 0,002$
5,5	$0,64 \pm 0,12$	$0,018 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$
5,75	$0,81 \pm 0,08$	$0,021 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,002$
6	$0,62 \pm 0,10$	$0,020 \pm 0,002$	$0,002 \pm 0,001$
6,5	$0,45 \pm 0,07$	$0,016 \pm 0,004$	$0,002 \pm 0,001$
7	$0,50 \pm 0,02$	$0,014 \pm 0,003$	$0,002 \pm 0,001$
7,5	$0,56 \pm 0,04$	$0,012 \pm 0,003$	$0,005 \pm 0,005$
8	$0,51 \pm 0,03$	$0,010 \pm 0,001$	$0,001 \pm 0,001$
8,5	$0,60 \pm 0,02$	$0,009 \pm 0,002$	$0,001 \pm 0$
9	$0,86 \pm 0,02$	$0,008 \pm 0,002$	$0,002 \pm 0$



**Abbildung 5.4: pH-Raten-Profil des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms.** A: Simulation der Reaktionsraten als eine Funktion des pH-Werts für eine allgemeine Säure mit dem  $pK_a = 6$  (rot) und einer Base mit einem  $pK_a = 7$  (blau) im gemessenen Bereich. In grau gezeigt werden die experimentell nicht messbaren pH-Bereiche. Die Fraktionen der protonierten Säure ( $f_A$ ), die unprotonierte Base ( $f_B$ ) und  $f_A \cdot f_B$  sind als Funktionen des pH-Werts gefittet. Bei einer Abwesenheit einer Basen-Katalyse sollte die pH-Abhängigkeit dem Kurvenverlauf  $f_A$  folgen, während bei fehlender Säure-Katalyse die pH-Abhängigkeit dem Kurvenverlauf von  $f_B$  entsprechen würde. (Abbildung modifiziert aus<sup>[182]</sup>) B: Experimentelle Spaltungsraten  $k_{obs1}$  in Abhängigkeit des pH-Werts. Deutlich konnte ein Glocken-ähnlicher Kurvenverlauf nachgewiesen werden, was die Ermittlung der Werte für  $pK_{a1} = 5,5 \pm 0,1$  und  $pK_{a2} = 6,7 \pm 0,1$  ermöglichte ( $n = 3$ ,  $R^2 = 0,96$ ).

Anders als bei den beiden HDV Ribozymen in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  erreichten die Raten beim CPEB3 Ribozym somit kein Plateau bei höheren pH-Werten. Vielmehr ähnelte das ermittelte pH-Profil dem des Hairpin Ribozyms, bei dem die Ionisierung der beiden Nukleotide  $A_{38}$  als Säure und einem modifizierten  $G_8$  ( $G_8$ -2,6-Diaminopurin) als Base eine entscheidende

Rolle spielte ( $pK_a$ -Werte:  $5,1 \pm 0,1$  und  $7,3 \pm 0,1$ ).<sup>[182]</sup> Auch in Experimenten mit dem genomischen HDV Ribozym konnte eine RNA Spaltung ohne  $Mg^{2+}$ , jedoch mit 1 M NaCl und 1 mM EDTA detektiert werden, wobei das pH-Profil einen Glocken-ähnlichen Verlauf ergab.<sup>[61]</sup> Das dabei vermutete Zusammenspiel der Nukleobasen  $C_{75}$  und  $C_{41}$  wurde als die Hauptursache vorgeschlagen. Für das CPEB3 Ribozym dagegen existieren keine vergleichbaren Parallelen. Zwar existiert eine analoge Base zum  $C_{41}$  im genomischen HDV Ribozym in der Struktur des CPEB3 Ribozyms, nämlich  $C_{39}$ . Jedoch fehlten bisher Studien, die eine vergleichbare Wirkung auf die Spaltungsaktivität des Ribozyms untersuchten. Ebenso wurde diese Base in Mutationsexperimenten bisher nicht berücksichtigt.

Insgesamt ließ sich schlussfolgern, dass das CPEB3 Ribozym neben dem bisher als essentiell angenommenen  $C_{57}$  eine weitere ionisierbare Gruppe, die die Rolle der Base einnahm, beherbergte. Diese Information widerspricht dem bisher angenommenen Mechanismus für das CPEB3 Ribozym mit  $Mg^{2+}$  als Base. Die zweite ionisierbare Gruppe verbleibt bis heute unbekannt.

### 5.1.5 Metall-Promiskuität des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms

#### 5.1.5.1 $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit und der Effekt von $K^+$ -Ionen auf die Spaltungsreaktion

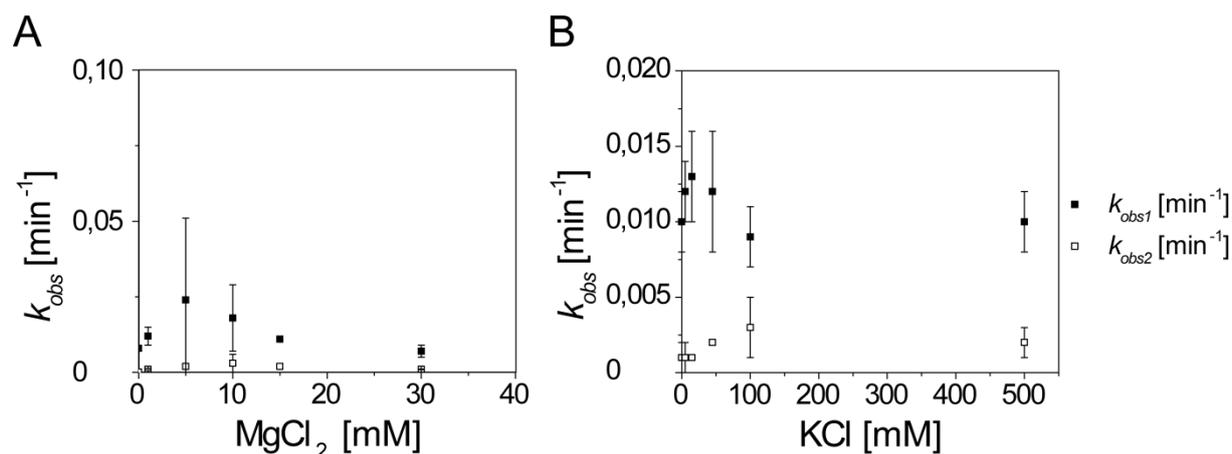
Da in der Vergangenheit bereits ein schnelleres Spaltungsverhalten des CPEB3 Ribozyms in co-transkriptionalen Studien nachgewiesen wurde<sup>[69]</sup>, sollte auch in der vorliegenden Arbeit eine Verbesserung der Spaltungsaktivität erzielt werden. Auf der Grundlage der Untersuchung der Faktoren, die die Spaltungsgeschwindigkeit beeinflussen können, können wichtige Informationen zur potentiellen Relevanz des Ribozyms *in vivo* gesammelt werden. In mechanistischen Studien von Ribozymen spielte  $Mg^{2+}$  stets eine entscheidende Rolle. Mit einer ubiquitären Konzentration von  $\sim 0,2 - 1$  mM nimmt dieses Kation an einer Vielzahl an Reaktion *in cellulo* teil.<sup>[77, 78]</sup> Auch für das CPEB3 Ribozym wurde eine Reduktion des hydrodynamischen Radius bei Zugabe von  $Mg^{2+}$  und  $K^+$  detektiert. Diese Daten deuteten darauf hin, dass für die Erzeugung eines aktiven transspaltenden Ribozyms vermutlich ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren von Bedeutung sein könnte. Speziell die Rolle mehrerer Ionen und deren Auswirkung auf die Spaltungsaktivität des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms verdiente in dieser Arbeit ein besonderes Interesse. Denn in einer *in cellulo* Umgebung stellt möglicherweise das Zusammenspiel von diversen Ionen, beispielsweise in Cofaktoren oder prosthetischen Gruppen, eine relevante Involvierung in die Funktion des Ribozyms dar.

Zunächst wurden hierfür eine Reihe von kinetischen Experimenten durchgeführt, um die Abhängigkeit der Spaltung von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration zu evaluieren. Anschließend sollte der Effekt von unterschiedlichen  $K^+$ -Konzentrationen auf die gespaltene Fraktion betrachtet werden (siehe Kapitel 7.2.12.2). Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der  $Mg^{2+}$ -Konzentration und den Spaltungsraten festgestellt werden (Abbildung 5.5 A). Ohne  $Mg^{2+}$  ergab sich, wie erwartet, keinerlei Spaltungsaktivität. Bei einer Zugabe von  $Mg^{2+}$  stieg zwar die Durchschnittsrate bis zu einer Konzentration von 5 mM stetig an, verblieb jedoch trotzdem in einem zuvor in dieser Arbeit berichteten vergleichbar niedrigen Rahmen von maximal  $0,024 \pm 0,027 \text{ min}^{-1}$ . Hinzu kam die große Abweichung der ermittelten Rate, die wieder auf

Faltungprobleme des CPEB3 Ribozyms hindeutete. Eine Verbesserung der Spaltungsrate oder der Abweichung von dieser konnte nicht mit einer Steigerung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration erzielt werden. Auch in den Verläufen der Kurven der kinetischen Untersuchungen konnte keine enorme Änderung festgestellt werden. Somit deuteten diese Daten abgesehen von der Spaltungsreaktionsbeteiligung weder auf eine Konzentrationsabhängigkeit noch auf eine relevante Faltungshilfe hin. Vielmehr verstärkte sich die Vermutung, dass bei der Reaktion des CPEB3 Ribozyms mehrere Ionen beteiligt sind.

**Tabelle 5.2:** Ermittelte Spaltungsraten  $k_{obs1}$  und  $k_{obs2}$  zur Evaluierung der  $Mg^{2+}$ - und  $K^+$ -Konzentrationsabhängigkeit ( $n = 3$ ).

Mg <sup>2+</sup> -Konzentrationsabhängigkeit		
Konzentration [mM]	$k_{obs1}$ [min <sup>-1</sup> ]	$k_{obs2}$ [min <sup>-1</sup> ]
0	0,008 ± 0	0,0001 ± 0
1	0,012 ± 0,003	0,001 ± 0,0003
5	0,024 ± 0,027	0,002 ± 0,001
10	0,018 ± 0,011	0,003 ± 0,003
15	0,011 ± 0,001	0,002 ± 0,001
30	0,007 ± 0,002	0,001 ± 0,0001
K <sup>+</sup> -Konzentrationsabhängigkeit		
Konzentration [mM]	$k_{obs1}$ [min <sup>-1</sup> ]	$k_{obs2}$ [min <sup>-1</sup> ]
0	0,010 ± 0,002	0,001 ± 0,001
5	0,012 ± 0,002	0,001 ± 0,001
15	0,013 ± 0,003	0,001 ± 0
45	0,012 ± 0,004	0,002 ± 0
100	0,009 ± 0,002	0,003 ± 0,002
500	0,010 ± 0,002	0,002 ± 0,001



**Abbildung 5.5:** Kinetische Untersuchungen des Effekts von  $Mg^{2+}$ - und  $K^+$ -Ionen auf die Spaltungsaktivität des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms ( $n = 3$ ). A: Einfluss einer steigenden  $MgCl_2$ -Konzentration. Der Graph zeigt deutlich keine gravierende Wirkung auf die Spaltungsaktivität des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms. B: Effekt der unterschiedlichen  $KCl$ -Konzentration. Der Standard-Reaktion wurde hierbei lediglich  $KCl$  in den Konzentrationen 0, 5, 15, 45, 100 und 500 mM zugesetzt, was jedoch keinen Effekt auf die Spaltung zeigte.

Skilandat *et. al* berichteten neben den faltungsfördernden Eigenschaften von  $Mg^{2+}$ -Ionen ebenfalls von einem positiven Effekt von  $K^+$  auf die Struktur des CPEB3 Ribozyms.<sup>[71]</sup> Bei einem Zusatz beider Ionen konnte eine Reduktion des hygroskopischen Radius beobachtet werden. Die Autoren schlussfolgerten eine kompaktere Faltung des Ribozyms durch das Zusammenspiel dieser beiden Ionen. Die Untersuchung dieses Effekts in einer kinetischen Situation fehlte jedoch bisher. Zur Klärung eines potentiellen Effekts eignete sich der in dieser Arbeit entwickelte kinetische Assay mit einem zwei-strängigen Ribozym. Zu diesem Zweck wurde zu der Reaktionslösung jeweils KCl in Endkonzentrationen von 0, 5, 15, 45, 100 und 500 mM zugesetzt. Nach der Auswertung der Daten konnte für die Rate der schnellspaltenden Fraktion des Ribozyms keine signifikante Veränderung festgestellt werden (Abbildung 5.5 B). Die ermittelten Werte ähnelten mit  $k_{obs1} = 0,011 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$  und  $k_{obs2} = 0,002 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$  den bereits ermittelten Durchschnittsraten. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass  $K^+$  unter kinetischen Bedingungen keinen Effekt auf die schnell spaltende Fraktion hatte. Dagegen schien der  $K^+$ -Zusatz in der Reaktionslösung der langsam spaltenden Fraktion zu einer leicht erhöhten Aktivität zu verhelfen. Möglicherweise verdankte das zwei-strängige CPEB3 Ribozym  $K^+$  der Ausbildung einer spaltungsfördernden Struktur. Somit konnte keine schnellere Spaltung des Ribozyms gefördert werden, was die Vermutung nahelegt, dass weitere Faktoren eine entscheidende Rolle in der Regulation des CPEB3 Ribozyms spielen könnten.

### 5.1.5.2 Effekt divalenter Metall-Ionen auf den Reaktionsweg des CPEB3 Ribozyms

#### 5.1.5.2.1 Metall-Promiskuität der Ribozyme CPEB3 und HDV

Dass  $Mg^{2+}$  nicht für die Spaltung des CPEB3 Ribozyms essentiell war, sondern auch durch  $Ca^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  in einer Spaltungsreaktion ersetzt werden konnte, bewiesen Szosták und seine Mitarbeiter.<sup>[67]</sup> Jedoch wurde diese Charaktereigenschaft des CPEB3 Ribozyms nicht weiter untersucht. In der vorliegenden Arbeit jedoch gewann die potentielle Rolle von alternativen Ionen bei der korrekten Funktionsweise des CPEB3 Ribozyms an Bedeutung. Schließlich ist der Kontakt mit einer Vielzahl an Ionen in freier oder gebundener Form *in cellulo* ein realistisches Szenario. Die anfänglichen Studien dieser Thematik durch Skilandat *et al.* bewiesen bereits einen positiven Effekt auf die Faltung des CPEB3 Ribozyms mithilfe von  $Mg^{2+}$  und  $K^+$ .<sup>[71]</sup>

Für die vergleichende Untersuchung wurden die divalenten Ionen  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  ausgewählt. Das HDV Ribozym wurde bereits auf seine Spaltungsfunktion in Anwesenheit dieser Ionen untersucht (siehe Tabelle 3.3 und Abbildung 5.6).<sup>[64]</sup> Trotz der Bedeutung von  $Mg^{2+}$  als eines der wichtigsten Metalle in der Spaltung von RNA stellte sich dessen Spaltungsrate ( $3,3 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$ ) nicht als die höchste heraus. Stattdessen ging die Spaltung mit  $Ca^{2+}$  beim HDV Ribozym mit einer Rate von  $7,0 \pm 0,4 \text{ min}^{-1}$  doppelt so schnell vonstatten. Der Einsatz der übrigen divalenten Ionen zeigte zwar ebenfalls eine Spaltung, lieferte jedoch niedrigere Spaltungsraten im Vergleich zu  $Mg^{2+}$  ( $Sr^{2+}$ :  $1,2 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ ;  $Ba^{2+}$ :  $0,068 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ ;  $Mn^{2+}$ :  $0,77 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$ ;  $Zn^{2+}$ :  $0,011 \text{ min}^{-1}$ ). Lediglich die Zugabe von  $Cu^{2+}$  lieferte keine relevante Spaltungsrate.

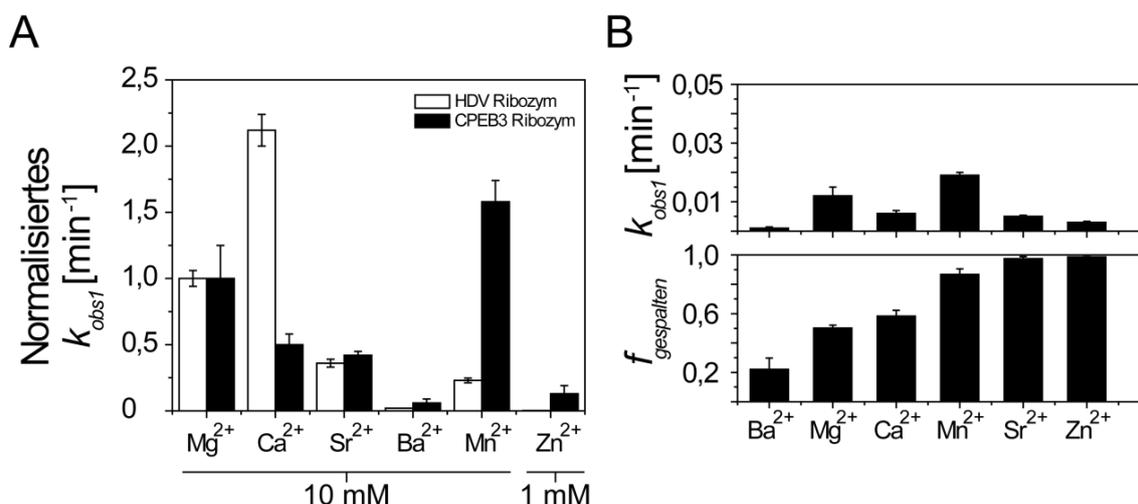
Bei dem in dieser Arbeit rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozym lieferte im Vergleich dazu die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  mit einer Rate von  $0,006 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$  keine Steigerung der Spaltungsgeschwindigkeit. Dagegen wies  $\text{Mg}^{2+}$  eine schnellere Spaltung auf ( $k_{obs1} = 0,014 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ ; Tabelle 5.3 und Abbildung 5.6 B). Auch die Zugabe von  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Sr}^{2+}$  lieferte relativ niedrige Spaltungsraten ( $k_{obs1} = 0,001 \pm 0,0004 \text{ min}^{-1}$  und  $0,003 \pm 0,0004 \text{ min}^{-1}$ ). Bei  $\text{Zn}^{2+}$  wurde eine vergleichsweise niedrige Rate von  $0,005 \text{ min}^{-1}$  ermittelt, wobei schließlich die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  keine Reaktion des Ribozyms hervorrief. Dagegen überraschte die Spaltungsrate für  $\text{Mn}^{2+}$  mit dem höchsten Wert von  $0,019 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ . Somit unterschied sich das Verhalten des CPEB3 Ribozyms in Bezug auf den Einsatz unterschiedlicher divalenter Ionen deutlich von dem des HDV Ribozyms. Zwar weisen beide Moleküle eine Spaltung bei dem Austausch des Metalls in der Reaktion auf (Abbildung 5.6 A). Die Ionen  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  initiierten dabei eine Spaltung in einem sehr geringen Ausmaß. Jedoch unterschied sich die Präferenz in der Anwesenheit der Ionen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ .

Als einen weiteren Faktor der Spaltungseffektivität des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms wurde die gespaltete Fraktion nach Beendigung der Reaktion herangezogen. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede einiger divalenter Metall-Ionen im Hinblick auf die Vollständigkeit der Ribozymsspaltung (Abbildung 5.6 B). Aufgrund der Spaltungseffizienz war es möglich, den positiven Effekt eines Metalls auf die Faltung zu bewerten. Trotz der deutlich höheren Spaltungsrate von  $\text{Mg}^{2+}$  und besonders  $\text{Mn}^{2+}$  gestaltete sich deren gespaltene Fraktion  $f_{gespalten}$  auf unterschiedliche Weise. Dabei wurden in Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$   $50 \pm 2 \%$  des Ribozyms gespalten. Der Einsatz von  $\text{Ba}^{2+}$  lieferte die niedrigste gespaltene Fraktion im Rahmen dieser Arbeit ( $22 \pm 8 \%$ ). Zusammen mit der niedrigen Spaltungsrate konnte hierfür geschlossen werden, dass  $\text{Ba}^{2+}$  die Spaltungsreaktion zwar nicht inhibierte, diese dennoch nicht optimal zu fördern vermochte. Dagegen steigerten  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  und besonders  $\text{Zn}^{2+}$  den Anteil der gespaltenen Fraktion auf jeweils  $87 \pm 4 \%$ ,  $97 \pm 1 \%$  und bis zu  $97 \pm 0,2 \%$ . Diese Daten bewiesen eine deutlich günstigere Auswirkung dieser Ionen auf die Faltung des Ribozyms. Dennoch verblieb der Grund für eine verbesserte Faltung des Ribozyms bei einer gleichzeitigen Unabhängigkeit von der Spaltungsgeschwindigkeit weiter ungeklärt, wobei ein simpler Zusammenhang mit der Ionengröße allein ausgeschlossen werden konnte (siehe Tabelle 5.3).

Die vorliegenden Ergebnisse deuteten an, dass  $\text{Mg}^{2+}$ , obwohl es in zahlreichen Ribozymen, unter anderem im HDV Ribozym, eine wichtige Komponente für die Spaltung darstellt, bei dem rekonstruierten CPEB3 Ribozym nicht die optimale Spaltung hervorrief. Bei der Zugabe der divalenten Ionen  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  stellte sich heraus, dass  $\text{Mn}^{2+}$  zu einer höheren Spaltungsrate  $k_{obs1}$  führte, als es für  $\text{Mg}^{2+}$  beobachtet wurde. Hinzu kam der faltungsfördernde Effekt von  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  und insbesondere  $\text{Zn}^{2+}$ . Hier zeigte sich eine nahezu vollständige Spaltung der Ribozym-Fraktion.

**Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Spaltungsdaten  $f_{\text{gespalten}}$ ,  $k_{\text{obs1}}$  und  $k_{\text{obs2}}$  des rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms.** Es bestand keinerlei Zusammenhang der getesteten Ionen mit dem jeweiligen Radius ( $n = 3$ ; n.b.: nicht bestimmbar).

Ion	$f_{\text{gespalten}}$	$k_{\text{obs1}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k_{\text{obs2}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	Radius [ $\text{pm}$ ] <sup>[185]</sup>
10 mM Ba <sup>2+</sup>	0,22 ± 0,08	0,001 ± 0,0004	n.b.	135
10 mM Mg <sup>2+</sup>	0,50 ± 0,02	0,014 ± 0,003	0,002 ± 0,001	72
10 mM Ca <sup>2+</sup>	0,58 ± 0,04	0,006 ± 0,001	0,001 ± 0	100
10 mM Mn <sup>2+</sup>	0,87 ± 0,04	0,019 ± 0,002	0,001 ± 0,001	65
10 mM Sr <sup>2+</sup>	0,97 ± 0,01	0,003 ± 0,0004	n.b.	118
10 mM Zn <sup>2+</sup>	0,97 ± 0,002	0,005 ± 0	n.b.	74
10 mM Cu <sup>2+</sup>	0,36 ± 0,11	n.b.	n.b.	73



**Abbildung 5.6: Metall-Promiskuität der Ribozyme HDV und CPEB3.** A: Normalisierte Werte für die Spaltungsaktivität des HDV Ribozyms<sup>[64]</sup> und des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms. Die Werte orientieren sich für einen besseren Vergleich an der durchschnittlichen Spaltungsrate bei den Standard-Bedingungen mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>, deren Werte für beide Ribozyme auf 1 gesetzt wurden. Trotz der starken Ähnlichkeit in der Sekundärstruktur der Ribozyme zeigt sich ein unterschiedlicher Effekt in der Zugabe weiterer divalenter Ionen. B: Vergleich der Spaltungsaktivitäten  $k_{\text{obs1}}$  für das CPEB3 Ribozym bei der Zugabe von Ba<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> oder Zn<sup>2+</sup> ( $n = 3$ ). Neben Mg<sup>2+</sup> zeigt Mn<sup>2+</sup> eine spaltungsfördernde Aktivität. Dagegen konnte bei Gebrauch von Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> kein nennenswerter spaltungsfördernder Effekt festgestellt werden. C: Vergleich der gespaltenen Fraktion  $f_{\text{gespalten}}$  nach Beendigung der kinetischen Experimente mit dem zwei-strängigen CPEB3 Ribozym. Insbesondere die Verwendung von Mn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> resultierte in einem hohen Anteil der gespaltenen Fraktion  $f_{\text{gespalten}}$ .

#### 5.1.5.2.2 Die Ionen Mn<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> - relevante Faktoren im CPEB3 Ribozym Mechanismus?

Auf der Grundlage der faltungsfördernden Auswirkung von Mn<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> auf das rekonstruierte zwei-strängige CPEB3 Ribozym wurde der Effekt dieser beiden Ionen im Detail untersucht. Schließlich spielen beide Ionen in der Erhaltung des Systems einer Zelle *in vivo* wichtige Rollen.<sup>[186, 187]</sup> Zunächst wurde eine potentielle pH-Abhängigkeit des Reaktion mit 10 mM MnCl<sub>2</sub> getestet. Es stellte sich kein Zusammenhang zwischen den beiden Spaltungsraten  $k_{\text{obs1}}$  oder  $k_{\text{obs2}}$  und dem pH-Wert des Reaktionspuffers heraus (Tabelle 5.4 und Abbildung 5.7 A). Die Werte verblieben stattdessen relativ konstant in der Bandbreite des

getesteten Werte zwischen pH 5 und 8 und ergaben somit kein pH-Optimum für die Ribozymspaltung, wie es für  $Mg^{2+}$  zu beobachten war (siehe Kapitel 5.1.4). Dennoch wurden große Abweichungen von den ermittelten Werten beobachtet. Insgesamt wurde eine schnellere Spaltung des Ribozyms ermittelt, was sich in den Werten für  $k_{obs1}$  widerspiegelte.

Ferner konnte bei Messungen mit  $Mn^{2+}$  in den finalen Konzentrationen 0, 1, 10 und 100 mM eine Konzentrationsabhängigkeit der Spaltung der CPEB3 RNA beobachtet werden (Abbildung 5.7 B). Hier entwickelte sich im Gegensatz zum Kontrollexperiment ohne die Zugabe eines Metalls eine Aktivität bei bereits 1 mM  $Mn^{2+}$ . Dabei stieg die Aktivität und die Fraktion  $f_{gespalten}$  mit der Zugabe einer höheren  $MnCl_2$ -Konzentration. Jedoch erreichte sie eine Sättigung bei 10 mM und stieg nicht weiter bei einer Konzentration von 100 mM  $MnCl_2$ . Diese Daten deuteten darauf hin, dass  $Mn^{2+}$  die Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozym unterstützte und sogar zu einer besseren Faltung des Ribozyms und folglich zu einer höheren gespaltenen Fraktion  $f_{gespalten}$  führte. Auf diese Weise konnte eine erfolgreiche Substitution von  $Mg^{2+}$  durch  $Mn^{2+}$  nachgewiesen werden.

Aus früheren Studien war dieses Phänomen bereits bekannt. Dabei war eine Spaltung sowohl mit  $Mg^{2+}$  als auch mit  $Mn^{2+}$  sowie eine  $Mn^{2+}$ -abhängige RNA Hydrolyse mit einem 5'-OH und einem 2',3'-zyklischen Phosphat als Produkte möglich.<sup>[64, 188-190]</sup> Die Ähnlichkeit der Spaltungsinduzierung von  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  beruht auf den ähnlichen chemischen Eigenschaften dieser beiden Ionen.<sup>[191]</sup> Beispielsweise zeigten deren Hydrate ähnliche  $pKa$ -Werte von 10,6 für  $Mn^{2+}$  und 11,4 für  $Mg^{2+}$ , einen ähnlichen Ionenradius (siehe Tabelle 5.3) sowie dieselbe Koordination der Wassermoleküle.<sup>[192]</sup> Aus diesem Grund ist  $Mn^{2+}$  in der Lage  $Mg^{2+}$  in einigen Reaktionen zu ersetzen. Dabei kann die Aktivität weitgehend erhalten<sup>[56]</sup>, verringert<sup>[193]</sup> oder gänzlich inhibiert werden<sup>[194]</sup>. Auch die Daten in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass  $Mn^{2+}$  in der Lage war, das fehlende  $Mg^{2+}$  zu ersetzen, *in vitro* die Struktur besser zu stabilisieren und so zu einer Reaktion der CPEB3 Ribozym RNA zu führen. Die beobachteten Spaltungsraten  $k_{obs1}$  und  $k_{obs2}$  deuteten stets auf eine mit  $Mg^{2+}$  vergleichbare Spaltung hin (Tabelle 5.4). Der deutliche Unterschied zu  $Mg^{2+}$  bestand in der gespaltenen Fraktion  $f_{gespalten}$ , wobei eine bis zu 93 %-ige Spaltung bei pH 8 erreicht werden konnte. Des Weiteren konnte kein Zusammenhang der Spaltungsrate  $k_{obs1}$  und dem pH-Wert der Reaktion nachgewiesen werden (Abbildung 5.7 A). Dagegen konnte eine  $Mn^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit der Spaltungsreaktion nachgewiesen werden (Tabelle 5.5 und Abbildung 5.7 B). Bei einer Konzentration von 1 mM  $MnCl_2$  konnten lediglich  $40 \pm 3$  % der Ribozymfraktion mit einer Spaltungsrate von  $0,004 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$  zur Reaktion gebracht werden. Bei 10 sowie 100 mM  $MnCl_2$  zeigten sich ähnliche Werte für die gespaltenen Fraktion  $f_{gespalten}$  (10 mM:  $85 \pm 3$  %; 100 mM:  $84 \pm 4$  %) und die Spaltungsrate  $k_{obs1}$  (10 mM:  $0,017 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ ; 100 mM:  $0,017 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ ). Somit trat bei einer Konzentration von 10 mM  $MnCl_2$  bereits eine sättigende Wirkung auf die Spaltungsreaktion, die nicht weiter durch eine höhere Ionenkonzentration gesteigert werden konnte, ein. Insgesamt deuteten diese Daten auf eine allgemeine Förderung der Spaltungsreaktion des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms hin. Dennoch konnte ein simpler Austausch von  $Mg^{2+}$  durch  $Mn^{2+}$  in der Spaltungsreaktion nicht ausreichend nachgewiesen werden. Vielmehr hatte  $Mn^{2+}$  vermutlich einen begünstigenden

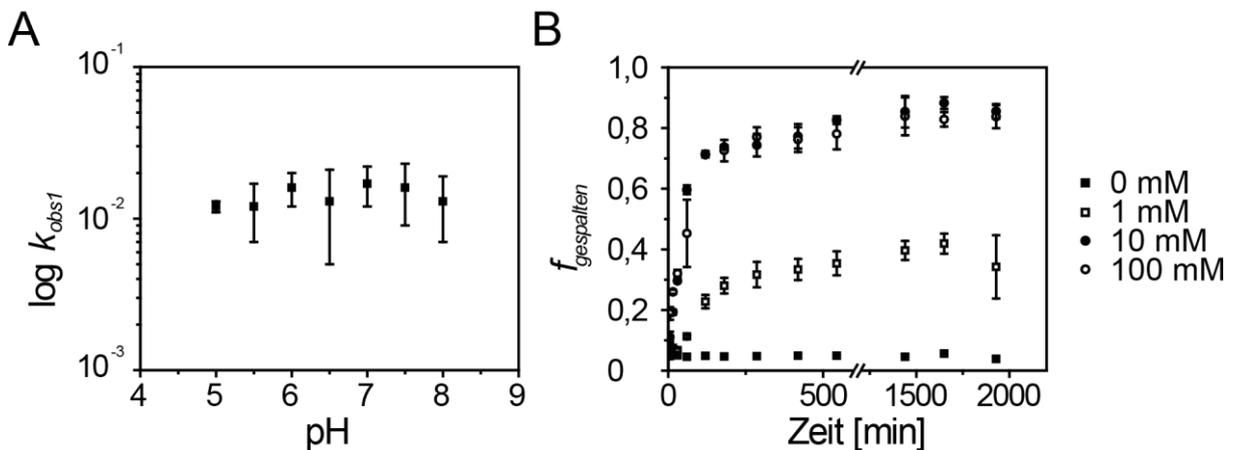
Effekt auf die Faltung der CPEB3 RNA, sodass die Spaltungsreaktion erleichtert werden konnte.

**Tabelle 5.4: Evaluierung der pH-Abhängigkeit einer  $Mn^{2+}$ -induzierten CPEB3 RNA Spaltung** ( $n = 3$ ). Zwischen dem pH-Wert und den Spaltungsraten  $k_{obs1}$  und  $k_{obs2}$  konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

pH	$f_{gespalten}$	$k_{obs1}$ [ $min^{-1}$ ]	$k_{obs2}$ [ $min^{-1}$ ]
5	$0,88 \pm 0,10$	$0,012 \pm 0,001$	$0,001 \pm 0$
5,5	$0,92 \pm 0,05$	$0,012 \pm 0,005$	$0,006 \pm 0$
6	$0,85 \pm 0,10$	$0,016 \pm 0,004$	$0,004 \pm 0$
6,5	$0,81 \pm 0,02$	$0,013 \pm 0,008$	$0,001 \pm 0$
7	$0,87 \pm 0,04$	$0,017 \pm 0,005$	$0,001 \pm 0$
7,5	$0,88 \pm 0,06$	$0,016 \pm 0,007$	$0,004 \pm 0$
8	$0,93 \pm 0,07$	$0,013 \pm 0,006$	$0,001 \pm 0$

**Tabelle 5.5:  $Mn^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms** ( $n = 3$ ; n.b.: nicht bestimmbar).

$Mn^{2+}$ -Konzentration [mM]	$f_{gespalten}$	$k_{obs1}$ [ $min^{-1}$ ]	$k_{obs2}$ [ $min^{-1}$ ]
1	$0,40 \pm 0,03$	$0,004 \pm 0,001$	n.b.
10	$0,85 \pm 0,03$	$0,017 \pm 0,002$	$0,001 \pm 0$
100	$0,84 \pm 0,04$	$0,017 \pm 0,001$	n.b.



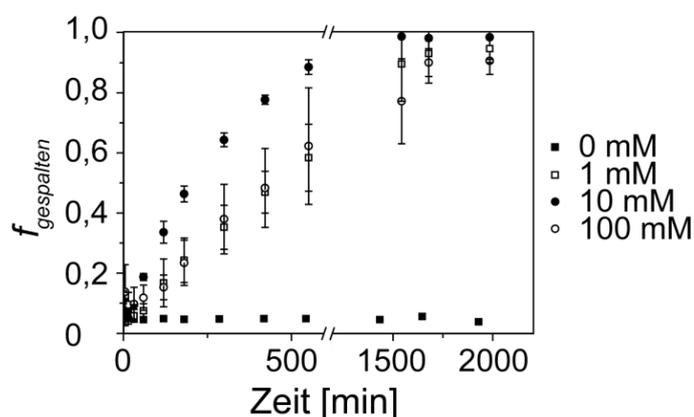
**Abbildung 5.7: Effekt von  $Mn^{2+}$  auf die Spaltung des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms** ( $n = 3$ ). A: Fehlende pH-Abhängigkeit der Ribozymsspaltung bei der Zugabe von 10 mM  $Mn^{2+}$ . Ein vergleichbarer Effekt wie bei den Studien mit 10 mM  $Mg^{2+}$  konnte nicht bestätigt werden. B:  $Mn^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms. Eine Konzentration von 10 mM  $Mn^{2+}$  schien bereits eine effiziente Faltung des Ribozyms zu ermöglichen.

$Zn^{2+}$  stellte in dieser Arbeit ein weiteres Ion mit faltungsfördernden Eigenschaften dar (siehe Kapitel 5.1.5.2.1). Diese wurden in einer Reihe von Titrationsexperimenten im Detail untersucht (Tabelle 5.6 und Abbildung 5.8). Dabei stellte sich heraus, dass eine Sättigung mit  $Zn^{2+}$  bei einer Konzentration von 10 mM eintrat. Eine weitere Steigerung der  $Zn^{2+}$ -Konzentration (100 mM) führte nicht weiter zu einer Verbesserung von  $f_{gespalten}$ . Im Gegensatz zu  $Mn^{2+}$  entfaltete eine Konzentration von 1 mM  $Zn^{2+}$  eine bessere Förderung der korrekten Faltung des CPEB3 Ribozyms. Eine langsame Spaltung wurde auch für das HDV Ribozym

beobachtet.<sup>[64]</sup> Nakano und seine Mitarbeiter beobachteten nämlich eine Spaltungsrate von  $k_{obs1} = 0,001 \text{ min}^{-1}$  für das genomischen HDV Ribozym in Gegenwart von 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$ . Dieser Wert jedoch fiel verglichen mit  $k_{obs1} = 3,3 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$  für 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  sehr niedrig aus. Bei der Zugabe von 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  zeigte sich in dieser Arbeit ein deutlicher Unterschied zwischen dem HDV und dem CPEB3 Ribozym, da das Ion auf die Spaltung des CPEB3 Ribozyms eine deutlich positivere Wirkung hatte (Abbildung 5.6). Auch in früheren Studien zeichnete sich  $\text{Zn}^{2+}$  durchaus als ein potenter Spaltungsinitiator aus.<sup>[190]</sup> Im Hammerhead Ribozym wurde eine  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängige Spaltungsposition zwischen den Basen  $\text{G}_8$  und  $\text{A}_9$  identifiziert. Diese Erkenntnisse deuteten auf eine potentielle Relevanz von  $\text{Zn}^{2+}$  in der Ribozymspaltung. Die vorliegenden erstmals ermittelten Daten für  $\text{Zn}^{2+}$  in Bezug auf das CPEB3 Ribozym suggerierten ebenfalls auf eine Rolle dieses Metalls in der Spaltung. Anders als  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  koordinieren  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen sowohl tetraedrisch als auch oktaedrisch. Zudem besitzen diese *in vivo* eine Präferenz für die Bindung an Stickstoff- und Schwefelatome. Daher interagieren  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen vorzugsweise mit N7 Atomen in den Guaninen.<sup>[195]</sup> Ferner verhält sich der Komplex  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  schwach sauer mit einem  $pK_a$ -Wert von 9,8.<sup>[185]</sup> Durch diese Eigenschaften unterscheidet sich das  $\text{Zn}^{2+}$  von den vorausgegangen untersuchten  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen, was mutmaßlich die langsamere Spaltung der CPEB3 Ribozym RNA zur Folge hatte. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass vermutlich in einer direkten Beteiligung an dem Spaltungsmechanismus nicht das  $\text{Mg}^{2+}$  ersetzt werden konnte. Vielmehr begünstigte  $\text{Zn}^{2+}$  die korrekte Faltung des CPEB3 Ribozyms bei den angewandten Reaktionsbedingungen, sodass beinahe die gesamte Fraktion der RNA gespalten werden konnte. Trotzdem verblieb die Spaltungsgeschwindigkeit niedrig.

**Tabelle 5.6:  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms** (n = 3, n.b.: nicht bestimmbar).

$\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration [mM]	$f_{\text{gespalten}}$	$k_{obs1}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k_{obs2}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]
1	$0,95 \pm 0,09$	$0,001 \pm 0$	n.b.
10	$0,99 \pm 0$	$0,003 \pm 0$	n.b.
100	$0,90 \pm 0,01$	$0,003 \pm 0,001$	n.b.



**Abbildung 5.8: Einfluss von  $\text{Zn}^{2+}$  auf die Spaltung des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms** (n = 3). Mit einer Konzentration von 10 mM  $\text{Zn}^{2+}$  erreichte das rekonstruierte CPEB3 Ribozym eine 99%-ig gespaltenen Fraktion  $f_{\text{gespalten}}$ . Diese wiederum ist nur bei einer korrekten Faltung des Ribozyms möglich. Somit zeigte  $\text{Zn}^{2+}$  von allen in dieser Arbeit untersuchten divalenten Ionen den größten faltungsfördernden Effekt.

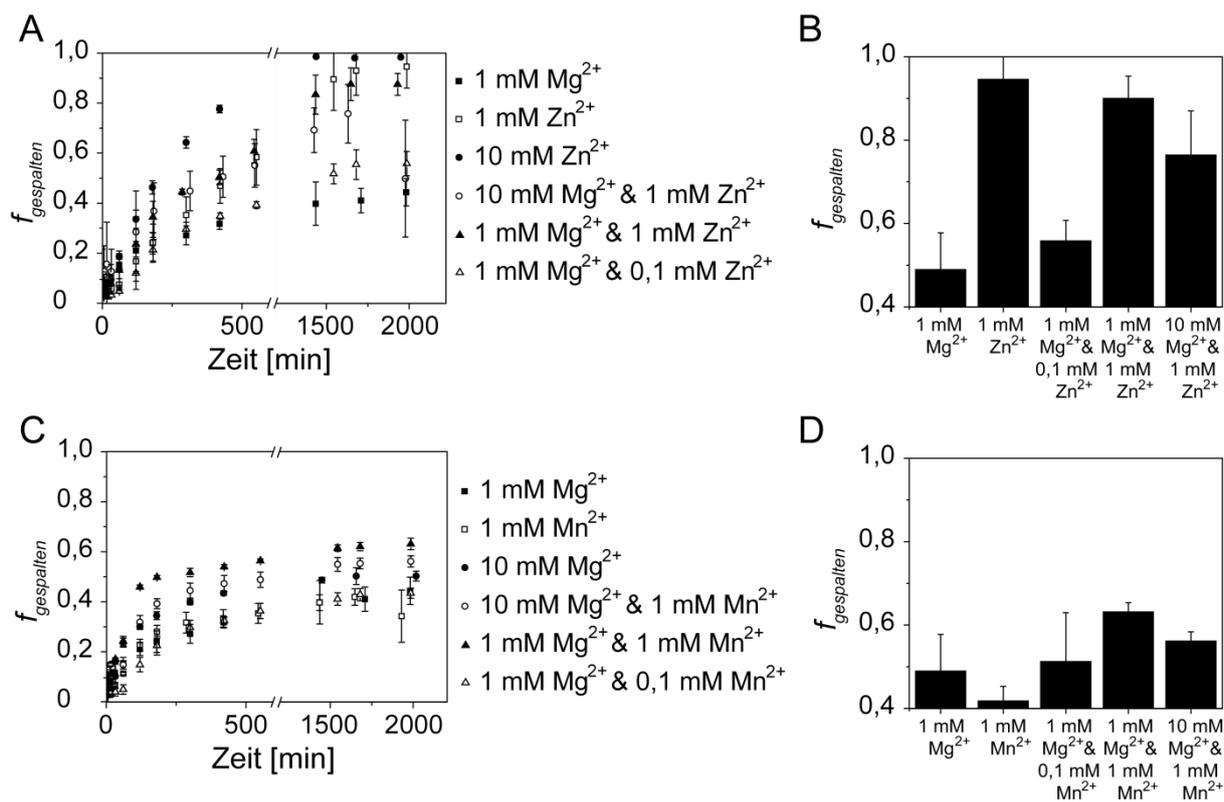
Eine Zusammenarbeit mehrerer Ionen in Form von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen stellt eine denkbare Ergänzung in dem Mechanismus des CPEB3 Ribozyms dar. Diese These und die Rolle von anderen divalenten Ionen, speziell von  $Zn^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ , insbesondere wegen ihres geringen Vorkommens *in cellulo*<sup>[186, 187]</sup>, erfuhr jedoch bisher keine besondere Aufmerksamkeit. Aufgrund der Parallelen zum HDV Ribozym sowie der mit einer ubiquitären Konzentration von 0,2 - 1 mM  $Mg^{2+}$  *in cellulo*<sup>[77, 78]</sup> wurde eine aktive Beteiligung des  $Mg^{2+}$  an der Spaltung am Reaktionsort angenommen. Für einen fördernden Effekt der Faltung wurde zu den kinetischen Untersuchungen verschiedene Konzentrationen von  $Zn^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  hinzugefügt (Tabelle 5.7 und Abbildung 5.9). Bei einem Zusatz von  $Zn^{2+}$  stellte sich hierbei ein gut beobachtbarer Effekt heraus (Abbildung 5.9 A und B). Der größte Anteil der gespaltenen Fraktion  $f_{gespalten}$  wurde mit 99 % bei den Messungen mit 10 mM  $Zn^{2+}$  erzielt. Selbst mit 1 mM  $Zn^{2+}$  konnte ein relativ hoher Wert für  $f_{gespalten}$  beobachtet werden ( $95 \pm 9\%$ ). Dagegen wurde der niedrigste Wert in dieser experimentellen Reihe mit 1 mM  $Mg^{2+}$  gemessen. Mit  $49 \pm 9\%$  der gespaltenen Fraktion wurde die Reaktivität des CPEB3 Ribozyms unter diesen Bedingungen am wenigsten gefördert. Die Zugabe einer Ionen-Mischung zeigte deutliche Unterschiede. In Anwesenheit von 1 mM  $Mg^{2+}$  und 0,1 mM  $Zn^{2+}$  wurde die niedrigste Rate für  $f_{gespalten}$  nach Reaktionsende aufgezeichnet ( $56 \pm 5\%$ ). Der Wert stieg auf  $87 \pm 4\%$ , wenn in der Reaktion äquimolare Mengen an  $Zn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  (jeweils 1 mM) vertreten waren. Bei einer Steigerung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration auf 10 mM sank  $f_{gespalten}$  auf  $76 \pm 12\%$ . Diese Ergebnisse deuteten auf eine aktive Faltungshilfe durch  $Zn^{2+}$ . Trotzdem konnte der beste Effekt auf die Spaltung und somit indirekt auf die korrekte Faltung des Ribozyms bei der Zugabe von 1 mM  $Zn^{2+}$  erzielt werden.

Zusätzliches  $Mn^{2+}$  dagegen überraschte mit einem vergleichbar niedrigeren Einfluss auf die Spaltung des CPEB3 Ribozyms. Tatsächlich erfolgte die niedrigste Fraktion  $f_{gespalten}$  aus den Messungen mit 1 mM  $Mn^{2+}$  (Abbildung 5.9 D). Mit 1 mM  $Mg^{2+}$  erzielte das rekonstruierte Ribozym eine Spaltung von lediglich  $41 \pm 4\%$ . Dagegen stieg der Anteil von  $f_{gespalten}$  bei Zusatz von 0,1 mM  $Mn^{2+}$  leicht an. Die Zugabe von äquimolaren Mengen der beiden Metalle (je 1 mM) erbrachte die höchste gespalte Fraktion mit  $f_{gespalten} = 64\%$ . Eine Steigerung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration mit einem zehnfachen Überschuss gegenüber  $Mn^{2+}$  brachte keine weitere Verbesserung in der Spaltungsaktivität mit sich.

Insgesamt konnte die Untersuchung des Effekts der Ionen  $Mn^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  auf das Spaltungsverhalten des CPEB3 Ribozyms einige neue Erkenntnisse bergen. Beide Ionen stellte sich als exzellente Faltungshilfe heraus. Insbesondere  $Zn^{2+}$  förderte die nahezu komplette Spaltung des CPEB3 Ribozyms, obwohl die Spaltungsgeschwindigkeit hierbei nicht weiter anstieg. Dagegen wurde eine höhere Spaltungsgeschwindigkeit verglichen mit den Werten aus den Messungen mit  $Mg^{2+}$  in den kinetischen Untersuchungen mit  $Mn^{2+}$  festgestellt. Gleichzeitig wurde die Faltung des zwei-strängigen Ribozyms nur geringfügig gefördert, was sich in einer niedrigeren gespaltenen Fraktion nach Beendigung der Reaktion widerspiegelte. Diese Daten deuteten auf ein mögliches Zusammenspiel mehrerer Faktoren in dem Mechanismus des CPEB3 Ribozyms *in vivo*. Schließlich erfuhr das Ribozym *in vitro* bisher große Faltungsschwierigkeiten, die in einer niedrigen Spaltungsgeschwindigkeit resultierten. Die Beteiligung von  $Zn^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  *in vivo* wäre in Form von Cofaktoren oder prosthetischen

**Tabelle 5.7: Evaluierung des Effekts von  $Mg^{2+}$ - $Zn^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ - $Mn^{2+}$ -Mischungen auf die Spaltung des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms ( $n = 3$ ; n.b.: nicht bestimmbar).**

Ionenkonzentration [mM]	$f_{\text{gespalten}}$	$k_{\text{obs1}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k_{\text{obs2}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]
<b>i. <math>Zn^{2+}</math>-Messungen</b>			
1 mM $Mg^{2+}$	$0,49 \pm 0,09$	$0,009 \pm 0,001$	$0,001 \pm 0$
1 mM $Zn^{2+}$	$0,95 \pm 0,09$	$0,001 \pm 0$	n.b.
10 mM $Zn^{2+}$	$0,99 \pm 0$	$0,003 \pm 0$	n.b.
10 mM $Mg^{2+}$ und 1 mM $Zn^{2+}$	$0,76 \pm 0,12$	$0,002 \pm 0$	n.b.
1 mM $Mg^{2+}$ und 1 mM $Zn^{2+}$	$0,87 \pm 0,04$	$0,002 \pm 0$	n.b.
1 mM $Mg^{2+}$ und 0,1 mM $Zn^{2+}$	$0,56 \pm 0,05$	$0,004 \pm 0,001$	$0,001 \pm 0$
<b>ii. <math>Mn^{2+}</math>-Messungen</b>			
1 mM $Mg^{2+}$	$0,41 \pm 0,04$	$0,005 \pm 0,001$	n.b.
1 mM $Mn^{2+}$	$0,40 \pm 0,03$	$0,004 \pm 0,001$	n.b.
10 mM $Mg^{2+}$	$0,49 \pm 0,01$	$0,011 \pm 0,001$	$0,001 \pm 0$
10 mM $Mg^{2+}$ und 1 mM $Mn^{2+}$	$0,56 \pm 0,02$	$0,006 \pm 0,002$	$0,001 \pm 0$
1 mM $Mg^{2+}$ und 1 mM $Mn^{2+}$	$0,64 \pm 0,00$	$0,011 \pm 0,002$	$0,001 \pm 0$
1 mM $Mg^{2+}$ und 0,1 mM $Mn^{2+}$	$0,55 \pm 0,13$	$0,007 \pm 0,002$	$0,001 \pm 0$



**Abbildung 5.9: Effekt einer  $Mg^{2+}$ - $Zn^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ - $Mn^{2+}$ -Mischung auf die Spaltungsaktivität des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms ( $n = 3$ ).** A: Spaltungskurven mit  $Mg^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  in unterschiedlichen Konzentrationen. B: Gespaltene Fraktion  $f_{\text{gespalten}}$  mit den jeweils eingesetzten Ionenmischungen von  $Mg^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  nach Beendigung der Reaktion. Die höchste gespaltene Fraktion wurde nach wie vor mit 1 mM  $Zn^{2+}$  erreicht, dicht gefolgt von einer äquimolaren Mischung aus 1 mM  $Mg^{2+}$  und  $Zn^{2+}$ . C: Spaltungskurven mit  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  in unterschiedlichen Konzentrationen. D: Gespaltene Fraktion  $f_{\text{gespalten}}$  mit den jeweils eingesetzten Ionenmischungen von  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  nach Beendigung der Reaktion. Die äquimolare Mischung aus je 1 mM  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  brachte den größten Effekt auf  $f_{\text{gespalten}}$  hervor.

Gruppen möglich. Diese Thesen verbleiben jedoch bisher höchst spekulativ und bedürfen weitere Untersuchungen in detaillierten *in vivo* Studien.

### 5.1.6 Co-transkriptionale Spaltung des WT CPEB3 Ribozyms

Zwar lieferten die Studien mit dem rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozym im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse. Jedoch konnte das Problem der trägen Spaltungsaktivität auf diese Weise nicht gänzlich gelöst werden. Aus einer Studie von Chadalavada *et al.* war eine Steigerung der Spaltungsgeschwindigkeit in einem co-transkriptionalen System, bei dem sowohl die RNA Transkription als auch die Spaltungsreaktion in einer Reaktionslösung vonstattengingen, bekannt.<sup>[69]</sup> Zur Visualisierung wurde dabei eine <sup>32</sup>P-Markierung mithilfe von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP eingesetzt, sodass bei der Transkription das CPEB3 Ribozym intern markiert wurde. Anders als ein Standard-Assay verlangt ein co-transkriptionales System keine zusätzlichen Schritte für die Generierung, Aufreinigung sowie Markierung der RNA. Diese Vereinfachung des Systems minimierte den Verlust der reaktiven Spezies des nativen CPEB3 Ribozyms. Jedoch handelte es sich hierbei um eine unspezifische Markierung des Ribozyms, denn diese verlief während der *in vitro* Transkription abhängig von der Ribozym-Sequenz und resultierte in einer ungleichen Verteilung der markierten Positionen. Aus diesem Grund sollten ergänzend zu den Studien mit dem zwei-strängigen CPEB3 Ribozym auf der Grundlage des UBP **dNaM - TPT3<sup>CP</sup>** nach Kath-Schorr *et al.* ein *in vitro* Assay zur ortsspezifischen Markierung des 5'-Endes der nativen CPEB3 Ribozym RNA als alternatives co-transkriptionales System entwickelt werden.<sup>[172, 175]</sup> Auf diese Weise der Effekt der co-transkriptionalen Bedingungen auf die Spaltungsgeschwindigkeit untersucht werden.

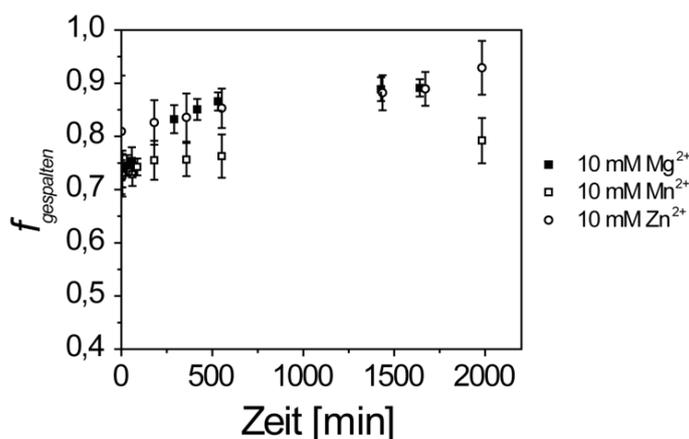
#### 5.1.6.1 Untersuchung der Spaltungsaktivität des nativen <sup>32</sup>P-markierten CPEB3 Ribozyms

Für eine Bewertung der Spaltungsaktivität des nativen CPEB3 Ribozyms nach einer Transkription in Anwesenheit von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP sowie einer Aufreinigung sollte zunächst diese für einen Vergleich mit einer co-transkriptionalen Fluoreszenz-basierten Methode evaluiert werden. Dazu wurde die RNA in einer T7 Transkription mit einem PCR-Produkt als Templat generiert (siehe Kapitel 7.2.13.1). Die Abbildung 5.10 und die Tabelle 5.8 zeigen die Ergebnisse einer kinetischen Untersuchung nach der Transkription mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP. Mit 10 mM Mg<sup>2+</sup> wurde eine sehr niedrige Spaltungsrate von  $k_{obs} = 0,003 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$  erzielt. Hinzu kam die Tatsache, dass der Anteil der gespaltenen Fraktion am Reaktionsbeginn bereits bei  $74 \pm 3 \%$  lag. Die Reaktion steigerte diesen schließlich auf  $89 \pm 2 \%$ . Dieses Phänomen wurde in früheren Studien beschrieben.<sup>[67, 69]</sup> Das CPEB3 Ribozym besitzt die Tendenz zur Spaltung während der T7 Transkription, die ebenfalls Mg<sup>2+</sup> benötigt. Dadurch verblieb die reaktive Spezies des Ribozyms nicht detektierbar. Als Folge davon wurde in dieser Arbeit lediglich die unreaktive Spezies nach der Aufreinigung gewonnen. Selbst der Zusatz von 10 mM Mg<sup>2+</sup> konnte nur geringfügig zu einer weiteren korrekten Faltung und somit Spaltung führen. Die dennoch beobachtete Spaltung entsprach eher der Geschwindigkeit der langsam spaltenden

Fraktion  $k_{obs2}$  (siehe Kapitel 5.1.2). Die Zugabe von  $Mn^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  wurde aufgrund des in dieser Arbeit beobachteten faltungsfördernden Effekts ebenfalls untersucht.  $Zn^{2+}$  brachte mit  $k_{obs} = 0,006 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$  und  $f_{gespalten} = 74 \pm 3 \%$  ein ähnliches Ergebnis wie  $Mg^{2+}$  und hatte somit keinen positiven Effekt auf die CPEB3 Ribozym Spaltung. Dagegen resultierte der Einsatz von  $Mn^{2+}$  in einer Spaltungsaktivität  $k_{obs} = 0,011 \pm 0,011 \text{ min}^{-1}$ , welche der in dieser Arbeit beobachteten Spaltungsrate  $k_{obs1}$  mit dem zwei-strängigen rekonstruierten CPEB3 Ribozym entsprach. Dennoch deutete die starke Abweichung von der Spaltungsrate auf deutliche Faltungsprobleme des Ribozyms unter den angewandten Bedingungen. Somit konnte nochmals nachgewiesen werden, dass die Untersuchung der Spaltung des nativen CPEB3 Ribozyms in seiner vollen Länge, das mittels der T7 Transkription und einem anschließenden Aufreinigungsschritt zur Entfernung der nicht eingebauten Triphosphate, insbesondere  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ , nicht die optimale Lösung darstellen konnte. Denn aufgrund des Kontakts mit  $Mg^{2+}$  während der Transkriptionsreaktion ging die reaktive Spezies des Ribozyms verloren.

**Tabelle 5.8: Effekt von  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  auf das CPEB3 Ribozym** (n = 3). Die Ribozym RNA wurde zuvor transkribiert und aufgereinigt (siehe Kapitel 7.2.13.1).

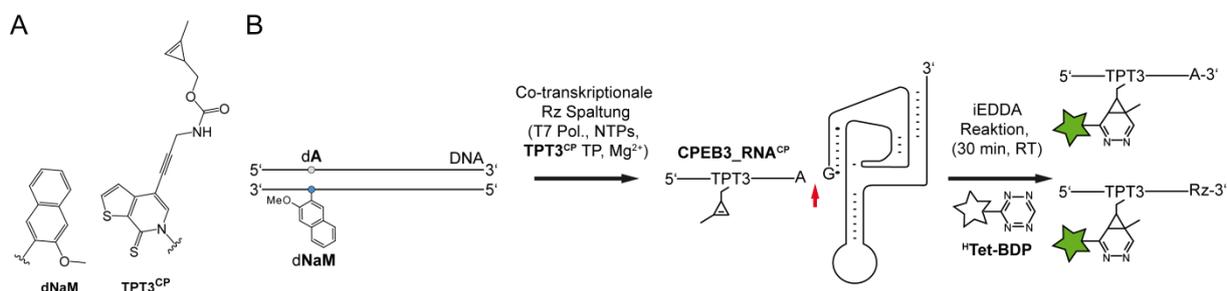
Metall-Ion [10 mM]	$k_{obs}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$f_{gespalten}$ (Reaktionsbeginn)	$f_{gespalten}$ (Reaktionsende)
$Mg^{2+}$	$0,003 \pm 0,0001$	$0,74 \pm 0,03$	$0,89 \pm 0,02$
$Mn^{2+}$	$0,011 \pm 0,011$	$0,72 \pm 0,03$	$0,79 \pm 0,04$
$Zn^{2+}$	$0,006 \pm 0,001$	$0,81 \pm 0,10$	$0,93 \pm 0,05$



**Abbildung 5.10: Effekt von  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  auf das CPEB3 Ribozym** (n = 3, 10 mM  $Mg^{2+}$ : schwarze Quadrate; 10 mM  $Mn^{2+}$ : weiße Quadrate; 10 mM  $Zn^{2+}$ : weiße Kreise). Bereits zu Beginn der Untersuchungen konnte stets eine hohe gespaltenen Fraktion  $f_{gespalten}$  detektiert werden. Dieses Phänomen war darauf zurückzuführen, dass durch den Kontakt zu  $Mg^{2+}$  während der Transkriptionsreaktion die reaktive Spezies des CPEB3 Ribozyms bereits gespalten worden war.

### 5.1.6.2 Entwicklung eines co-transkriptionalen Spaltungsassays auf der Grundlage des UBP dNaM - TPT3<sup>CP</sup>

Frühere Studien berichteten bereits über den Verlust der reaktiven Spezies des CPEB3 Ribozyms nach einer vorangegangenen Transkription und einem Aufreinigungsschritt, da diese Mg<sup>2+</sup> benötigten.<sup>[69]</sup> Als Lösung des Problems wurde ein co-transkriptionaler Assay, bei dem sowohl die T7 Transkription der RNA als auch die Ribozymsspaltung gleichzeitig vorstattengehen, vorgeschlagen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein neues Fluoreszenz-basiertes System zur Untersuchung der co-transkriptionalen Spaltungsaktivität entwickelt werden. Diese Methode wurde im Arbeitskreis von Dr. Stephanie Kath-Schorr entwickelt.<sup>[172, 175]</sup> Auf der Grundlage des unnatürlichen Basenpaars **dNaM - TPT3<sup>CP</sup>** sollte ortsspezifisch am 5'-Ende des Ribozyms eine Cyclopropen-Gruppe eingeführt werden, die in einer späteren iEDDA-Cycloaddition mit <sup>H</sup>Tet-BDP versehen werden sollte (Abbildung 5.11). Durch eine *in vitro* Transkription anhand eines **dNaM**-tragenden doppelsträngigen DNA Templats in Gegenwart von **TPT3<sup>CP</sup>** TP und den kanonischen Triphosphaten sollte das **TPT3<sup>CP</sup>**-modifizierte CPEB3 Ribozym generiert werden. Durch eine Ribozym-Selbstspaltung während der *in vitro* Transkription sollte ein Methyl-Cyclopropen-modifizierter 5'-Terminus entstehen. Das Ribozym in seiner vollen Länge (Rz) und das 5'-Produkt (P) sollten anschließend mit <sup>H</sup>Tet-BDP reagieren. Durch eine Auftrennung der Reaktionsprodukte ohne einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt sowie der Evaluierung der Fluoreszenzintensitäten sollte die co-transkriptionale Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozyms bewertet werden.

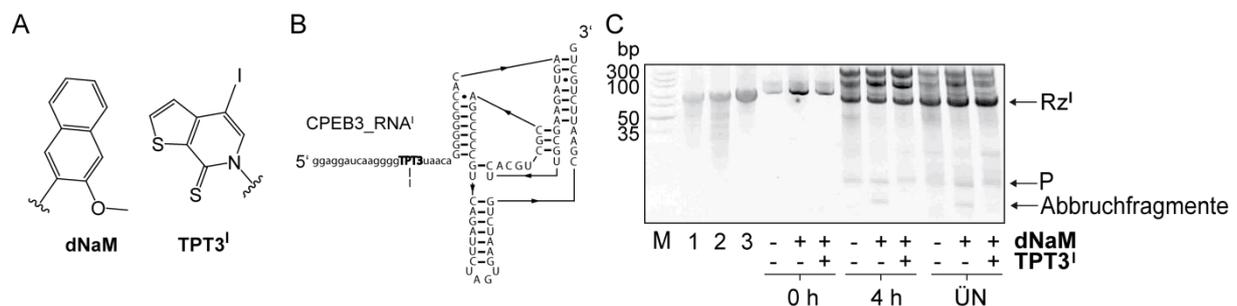


**Abbildung 5.11: Co-transkriptionaler CPEB3 Ribozym Spaltungsassay auf der Grundlage eines fluoreszenten Evaluierungssystems.** A: Unnatürliches Basenpaar **dNaM - TPT3<sup>CP</sup>**. Das Triphosphat **TPT3<sup>CP</sup>** wurde von Frank Eggert synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.<sup>[172]</sup> B: Co-transkriptionales System zur Evaluierung der Spaltung des CPEB3 Ribozyms. Der Einbau des **TPT3<sup>CP</sup>** TP an das 5'-Ende des Ribozyms sollte die anschließende iEDDA-Cycloaddition mit <sup>H</sup>Tet-BDP ermöglichen. Das **TPT3<sup>CP</sup>**-modifizierte CPEB3 Ribozym sollte durch eine *in vitro* Transkription anhand eines **dNaM**-tragenden doppelsträngigen DNA Templats in Gegenwart von **TPT3<sup>CP</sup>** TP und den kanonischen Triphosphaten generiert werden. Das Ribozym sollte eine Selbstspaltung während der *in vitro* Transkription (roter Pfeil) durchlaufen, wobei ein Methyl-Cyclopropen-modifizierter 5'-Terminus entstehen sollte. Das Ribozym in seiner vollen Länge (Rz) und das 5'-Produkt (P) sollten anschließend mit <sup>H</sup>Tet-BDP reagieren. (Abbildung modifiziert aus<sup>[175]</sup>)

Zur Entwicklung des Fluoreszenz-basierten co-transkriptionalen Systems wurden die zwei DNA Templatstränge 20 nt Überhang<sub>ungespalten</sub> CPEB3\_FW und 20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten</sub>\_RV\_dNaM kommerziell erworben. Der FW Strang trug den T7 Promoter mit einem zusätzlichen G, um die Transkription für die Polymerase zu optimieren. Die Länge des Überhands vor der Spaltungsposition wurde auf 20 nt festgelegt, um ein gut sichtbares

Spaltungsprodukt mit genügend Raum für die Fluoreszenz-Sonde zu generieren. Der RV Strang beinhaltet das unnatürliche Nukleotid **dNaM**, sodass **TPT3<sup>CP</sup>** TP an der Position -6 vor der Spaltungsstelle eingebaut werden sollte. Zusätzlich beinhaltet der so generierte Strang CPEB3\_RNA<sup>CP</sup> die Mutationen C<sub>12</sub>U, U<sub>36</sub>C, G<sub>47</sub>A. Als Kontrolle sollte auch der DNA Templatstrang 20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten</sub>\_RV, dem das **dNaM** fehlte, getestet werden.

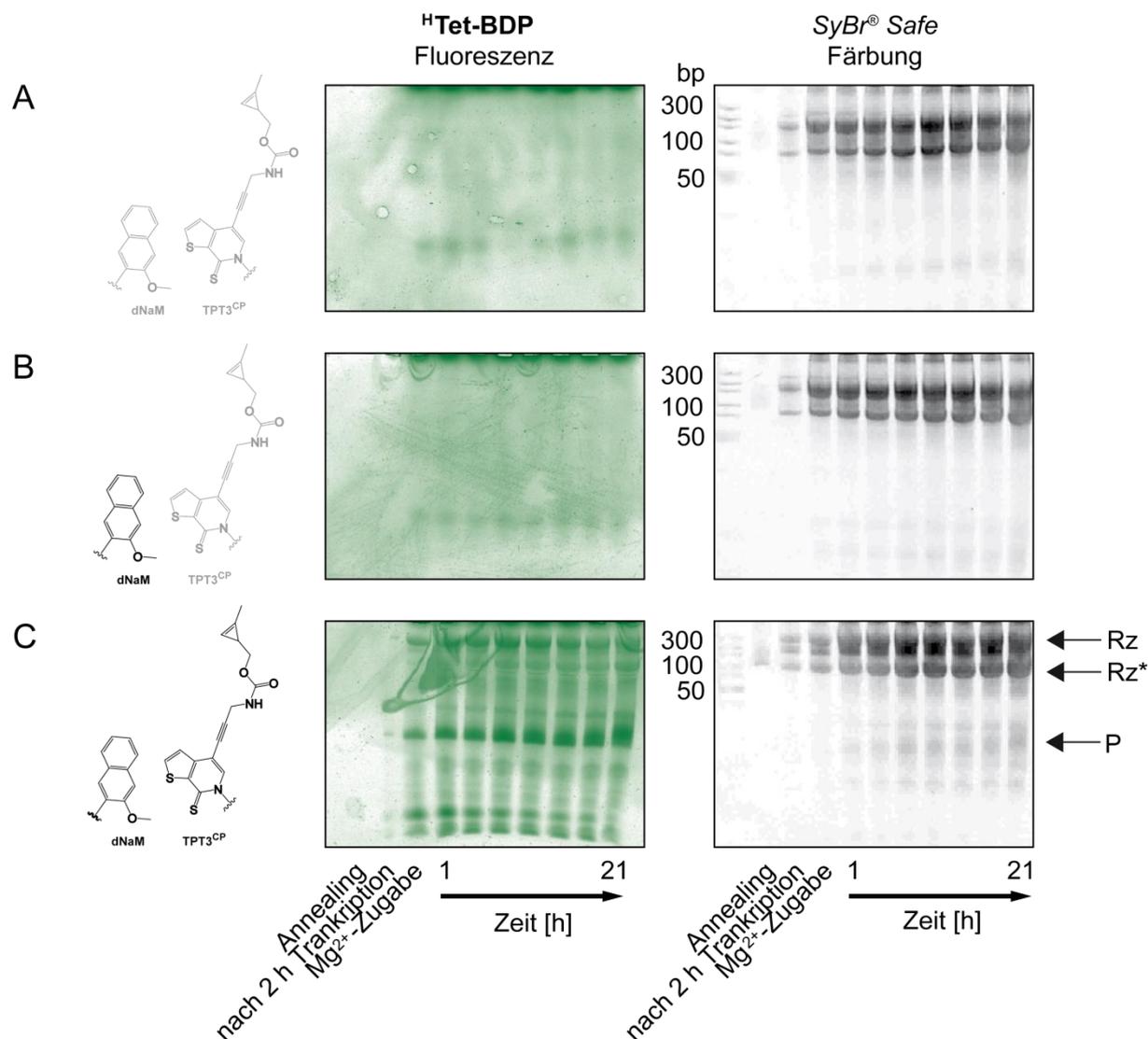
Die Entwicklung des Assays startete mit einer Reihe von Transkriptionsreaktionen ohne einen anschließenden Schritt der Click-Reaktion (Abbildung 5.12). Um den Einbau eines unnatürlichen Nukleotids durch die T7 RNA Polymerase erstmals zu testen, wurde das iodidierte **TPT3<sup>I</sup>** ausgewählt, wodurch das iodidierte CPEB3 Ribozym CPEB3\_RNA<sup>I</sup> entstehen sollte (Abbildung 5.12 A und B). Auf diese Weise sollte die Tolerierbarkeit der unnatürlichen Base durch die T7 Polymerase getestet werden. Auch sollte die Entstehung von Abbruchfragmenten evaluiert werden (Abbildung 5.12 C, Bahn 9). Die Zusammensetzung der entnommenen Proben änderte sich auch nicht nach einer Inkubation ÜN (Bahnen 10, 11 und 12). Somit konnte demonstriert werden, dass die Inkorporation des unnatürlichen Nukleotids **TPT3<sup>I</sup>** TP erfolgreich verlief und die Transkriptionsreaktion nicht behinderte.



**Abbildung 5.12: Entwicklung eines Transkriptionssystems bei Nutzung des UBP dNaM - TPT3<sup>I</sup>.**<sup>[175]</sup> A: Unnatürliches Basenpaar **dNaM - TPT3<sup>I</sup>**. B: Sequenz und sekundäre Struktur des iodidierten -20/69 CPEB3 Ribozyms (CPEB3\_RNA<sup>CP</sup>), das durch die *in vitro* T7 Transkription in Gegenwart von **TPT3<sup>I</sup>** TP generiert werden sollte. C: Überprüfung der Toleranz des UBPs **dNaM - TPT3<sup>I</sup>** durch die T7 RNA Polymerase in einem 20 % denaturierenden PAGE Gel. Zunächst wurden die kommerziell erworbenen DNA Templatstränge 20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten</sub>\_FW (Bahn 1), 20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten</sub>\_RV (Bahn 2) und 20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten</sub>\_RV\_dNam (Bahn 3) auf ihre Intaktheit überprüft. Die Transkriptionsreaktion wurde in drei Ansätzen getestet, wobei das UBP **dNaM - TPT3<sup>I</sup>** in verschiedenen Zusammensetzungen betrachtet wurde. Zur Kontrolle des Transkriptionserfolgs wurden Proben vor der Zugabe der T7 Transkription, nach 4 h und schließlich nach einer Inkubation ÜN entnommen und analysiert. Es entstanden sowohl das CPEB3 Ribozym in seiner vollen Länge (CPEB3\_RNA<sup>I</sup> = Rz<sup>I</sup>) als auch das erwartete 20 nt lange 5'-Produkt (P).

Der nächste Schritt befasste sich mit der Zugabe des **TPT3<sup>CP</sup>** TP für eine iEDDA-Reaktion. Wieder wurde dazu die Transkriptionsreaktion dreierlei getestet, nämlich eine Kontrollreaktion ohne das UBP **dNaM - TPT3<sup>CP</sup>**, eine Kontrollreaktion mit **dNaM** und eine Transkriptionsreaktion mit dem vollständigen UBP **dNaM - TPT3<sup>CP</sup>** (siehe Kapitel 7.2.13.2). Die Abbildung 5.13 zeigt die danach entstandenen denaturierenden 20 % PAGE Gele. Es konnten keine fluoreszenten Banden weder in der Reaktion gänzlich ohne das UBP noch in der Kontrolle mit **dNaM** ermittelt werden. Nach der *SyBr<sup>®</sup> Safe* Färbung waren jedoch Banden erkennbar (Abbildung 5.13 A und B). Lediglich die Zugabe von **TPT3<sup>CP</sup>** TP generierte in Verbindung mit <sup>H</sup>Tet-BDP deutlich beobachtbare Banden sowohl in der Fluoreszenz als auch nach der *SyBr<sup>®</sup> Safe* Färbung

(Abbildung 5.13 C). Dabei konnten die beiden erwarteten Banden für das Spaltungsprodukt CPEB3\_RNA<sup>CP</sup> und das 20 nt Spaltungsprodukt identifiziert werden. Diese Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass die Methode der co-transkriptionalen Spaltung des CPEB3 Ribozyms das System des UBPs **dNaM - TPT3<sup>CP</sup>** mit einer anschließender iEDDA-Cycloaddition des Tetrazins **<sup>3</sup>H-Tet-BDP** nach Kath-Schorr *et al.* genutzt werden konnte.<sup>[172, 175]</sup>



**Abbildung 5.13: Anschluss der iEDDA-Cycloaddition an das generierte Transkriptionsprodukt zur Anbringung der fluoreszenten Sonde <sup>3</sup>H-Tet-BDP.** A: Kontrollreaktion ohne UBP im Templat. B: Kontrollreaktion mit **dNaM** allein im Templat, jedoch ohne **TPT3<sup>CP</sup>**. C: Transkriptionsreaktion mit dem vollständigen UBP **dNaM - TPT3<sup>CP</sup>**. Zur Kontrolle wurden jeweils Proben nach dem Annealing der Stränge und nach 2 h Transkription mit 25 mM Mg<sup>2+</sup> entnommen. Zur zusätzlichen Förderung der Reaktion wurden weitere 10 mM Mg<sup>2+</sup> zugesetzt und die Spaltungsreaktion über 21 h beobachtet. Dabei konnten die folgenden Produkte generiert werden: das CPEB3 Ribozym in seiner vollen Länge (CPEB3\_RNA<sup>CP</sup> = Rz), der 3'-Terminus (Rz\*) und das 20 nt lange 5'-Produkt (P).

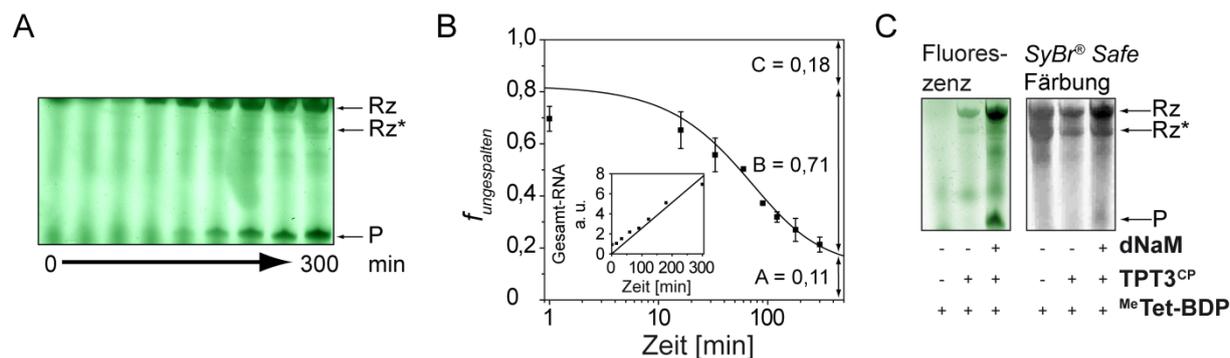
Der nun entwickelte *in vitro* Assay konnte zur Untersuchung der co-transkriptionalen Spaltung des CPEB3 Ribozyms eingesetzt werden. Diese Methode vermied nicht nur die radioaktive Markierung der Ziel-RNA, sondern erlaubte eine Markierungsselektivität für das Edukt der Reaktion (*i.e.* das Ribozym in seiner vollen Länge) und das 5'-Produkt mit jeweils einem

Fluorophor an einer spezifischen Position. Dies vereinfachte die Quantifizierung der Edukt- und Produktbanden, die in einer anschließenden Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Sowohl die Bande des Ribozyms als auch die Bande für das 5'-Produkt zeigten dieselbe Fluoreszenz-Intensität, da beide lediglich ein Fluorophor-Molekül beinhalten. Im Gegensatz dazu resultierte die radioaktive Markierung mithilfe von [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-GTP TP während der *in vitro* Transkription abhängig von der Ribozym-Sequenz in einer ungleichen Verteilung der markierten Positionen. Während der *in vitro* Transkriptionsreaktion wurden Proben an definierten Zeitpunkten entnommen und mit  $^{\text{H}}\text{Tet-BDP}$  zur Reaktion gebracht, in einer denaturierenden PAGE aufgetrennt und über die Fluoreszenz visualisiert (Abbildung 5.14 A). Das CPEB3 Ribozym in seiner vollen Länge sowie der gespaltene 5'-Terminus ergaben gut detektierbare intensive fluoreszente Banden. Für lange Reaktionszeiten wurde eine zusätzliche schwach fluoreszente Bande, die dem unspezifisch markiertem 3'-Kern des Ribozyms nach deren Spaltung entsprach, beobachtet ( $\text{Rz}^*$ ). Um eine unspezifische Markierung, die mit der Analyse der Daten der Spaltung möglicherweise behindernd interagiert, auszuschließen, erfolgte eine Kontrolltranskription mit einem unmodifizierten DNA Templat (20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten</sub>\_RV Templat) in der Gegenwart von  $\text{TPT3}^{\text{CP}}$  TP und einer anschließenden iEDDA-Markierung mit  $^{\text{Me}}\text{Tet-BDP}$  (Abbildung 5.14 C). Das 5'-Produkt der Spaltungsreaktion verblieb nicht fluoreszent. Daraus konnte geschlossen werden, dass der unspezifische Einbau von  $\text{TPT3}^{\text{CP}}$  TP im 3'-Kern des Ribozyms als nicht-templierte 3'-Verlängerung auftrat. Dieser Effekt wurde bereits als übliche Nebenreaktion in T7 *in vitro* Transkriptionsreaktionen von langen DNA Templaten bei langen Reaktionszeiten berichtet.<sup>[196]</sup> Für die Analyse der Daten in dieser Arbeit wurde die Menge des unspezifisch markierten 3'-gespaltenen Ribozyms über die relativen Intensitäten für das 5'- und 3'-Produkt ( $\text{Rz}^*$  gespalten, Abbildung 5.14 B) bestimmt und für eine Korrektur der Werte der Intensitäten, die für das Ribozym in seiner vollen Länge erhalten wurden, genutzt.

Das co-transkriptionale Reaktionsprofil des Fluoreszenz-markierten CPEB3 Ribozyms ergab sich aus dem Fit der Intensitäten in die Gleichung 5.5 mit  $f_{\text{ungespalten}}$  als die ungespaltene Ribozymfraktion,  $t$  als die Zeit,  $k_{\text{obs}}$  als die beobachtete Ribozymsspaltungskonstante der beobachteten Fraktion,  $A$  als die ungespaltene Fraktion am Reaktionsende und  $B$  als die Amplitude der beobachtbaren Fraktion.<sup>[69]</sup>

Gleichung 5.5: 
$$f_{\text{ungespalten}} = A + B \left( \frac{1 - e^{-k_{\text{obs}} t}}{k_{\text{obs}} t} \right)$$

Es zeigten sich drei Phasen: eine schnell-reagierende Phase, dessen Rate zu schnell für eine Beobachtung war (C, 18 %), eine langsam-reagierende Phase (B, 71 %) mit einer beobachtbaren Spaltungsrate von  $k_{\text{obs}}$  von  $0,024 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$  und eine nicht-reaktive Fraktion (A, 11 %). Diese Werte entsprachen den zuvor berichteten Daten aus co-transkriptionalen Assays mit dem  $^{32}\text{P}$ -intern markierten CPEB3 Ribozym von Bevilacqua und seinen Mitarbeitern.<sup>[69, 76]</sup>

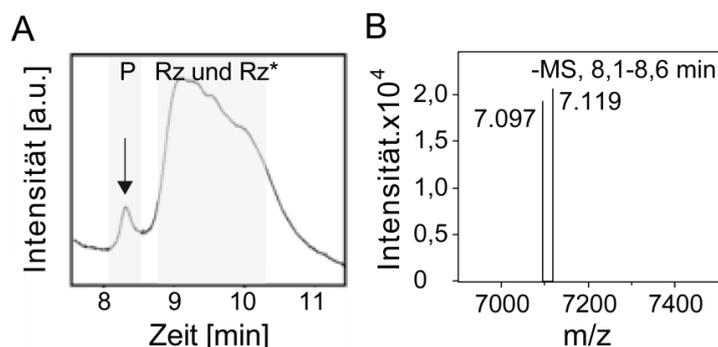


**Abbildung 5.14: Analyse der co-transkriptionalen Selbstspaltung des CPEB3 Ribozyms.** A: Fluoreszenz-Scan einer 20 %-igen denaturierenden PAGE. Deutlich konnten die Banden für das *in situ* generierte Ribozym sowie die Spaltungsprodukte Rz\* und P identifiziert werden. B: Selbstspaltung des ortsspezifisch Fluoreszenzmarkierten CPEB3 Ribozyms. Die ungespaltene Fraktion  $f_{\text{ungespalten}}$  wurde gegen die Zeit aufgetragen und die dabei erhaltenen Daten in einer doppelt-exponentiellen Funktion gefittet. Die Voraussetzung dafür bestand in einer konstanten Transkriptionsrate während der gesamten Reaktion (siehe eingefügter Graph).<sup>[69]</sup> Diese Berechnungen resultierten in einer beobachtbaren Spaltungsrate  $k_{\text{obs}} = 0,024 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$  ( $n = 3$ ). Die gespaltene Fraktion bei Beendigung der Reaktion (A) wurde aus den experimentellen Rohdaten erstellt und in der Gleichung 5.5 gefittet. C: Nicht-templierte 3'-Verlängerung in CPEB3 Transkripten. Hier erfolgte die iEDDA-Reaktion mit <sup>Me</sup>Tet-BDP. Der unspezifische Einbau des **TPT3<sup>CP</sup>** in den 3'-Kern des Ribozyms resultierte in einer schwachen Bande im Fluoreszenz-Scan (Rz\*). Das 5'-Produkt der Reaktion verblieb jedoch nicht-fluoreszent. Dieses Bandenmuster verwies auf einen Einbau des **TPT3<sup>CP</sup>** in den 3'-Teil des Ribozyms. (Abbildung modifiziert aus<sup>[175]</sup>)

Zusätzlich wurde für die Analyse des gespaltenen 5'-Spaltungsprodukts ein HPL-Chromatogramm gekoppelt mit einer ESI Massenspektrometrie eingesetzt (Abbildung 5.15). Zu erwarten waren sowohl das Transkriptionsprodukt Rz als auch die Spaltungsprodukte Rz\* (3'-Ribozymkern) und P (5'-Produkt). Außerdem musste berücksichtigt werden, dass der Einbau des **TPT3<sup>CP</sup>** TP nicht immer gewährleistet werden könnte, was in unmodifizierten RNA Produkten resultieren würde. Die entstandenen RNA Stränge Rz und P konnten entweder eine OH-Gruppe oder ein, zwei oder drei Phosphate tragen. Des Weiteren ist ein Komplex mit  $\text{Na}^+$  für alle erzeugten RNA Stränge durch die Reaktionsbedingungen möglich. Diese Effekte konnten sich auf die Masse der gesuchten Transkriptions- und Spaltungsprodukte Rz, Rz\* und P auswirken und mussten in der Detektion der Massen berücksichtigt werden. So konnten die in der Tabelle 5.9 aufgeführten Massen  $M_{\text{berechnet}}$  ermittelt werden. Tatsächlich konnte jedoch für die Konstrukte Rz und Rz\* keine der errechneten Massen identifiziert werden (Abbildung 5.15). Dagegen konnten als Konstrukte mit einer korrekten Sequenz-Zusammenstellung mit einem eingebauten **TPT3<sup>CP</sup>** die Massen der Spaltungsprodukte 5'-PPP mit jeweils 2 und 3  $\text{Na}^+$ -Ionen detektiert werden. Dieser Befund demonstrierte noch einmal den ortsspezifischen Einbau des **TPT3<sup>CP</sup>** TP in das gespaltene 5'-Produkt des Ribozyms.

**Tabelle 5.9: Ermittelte erwartete Massen  $M_{\text{berechnet}}$  für die Produkte nach der Spaltungsreaktion.** Die Massen ergaben sich aus den folgenden Überlegungen: das 5'-Ende der Produkte konnte entweder eine OH-Gruppe oder ein, zwei oder drei Phosphat-Gruppen tragen; durch die  $\text{Na}^+$ -reichen Reaktionsbedingungen musste ein Effekt auf die Masse berücksichtigt werden; das **TPT3<sup>CP</sup>** konnte vermutlich nicht stets eingebaut werden. Lediglich die Produkte 5'-PPP + 2  $\text{Na}^+$  und 5'-PPP + 3  $\text{Na}^+$  konnten detektiert werden (fett). (P: 5'-Spaltungsprodukt; Rz: transkribiertes ungespaltenes CPEB3 Ribozym; Rz\*: gespaltenes 3'-Kern des CPEB3 Ribozyms).

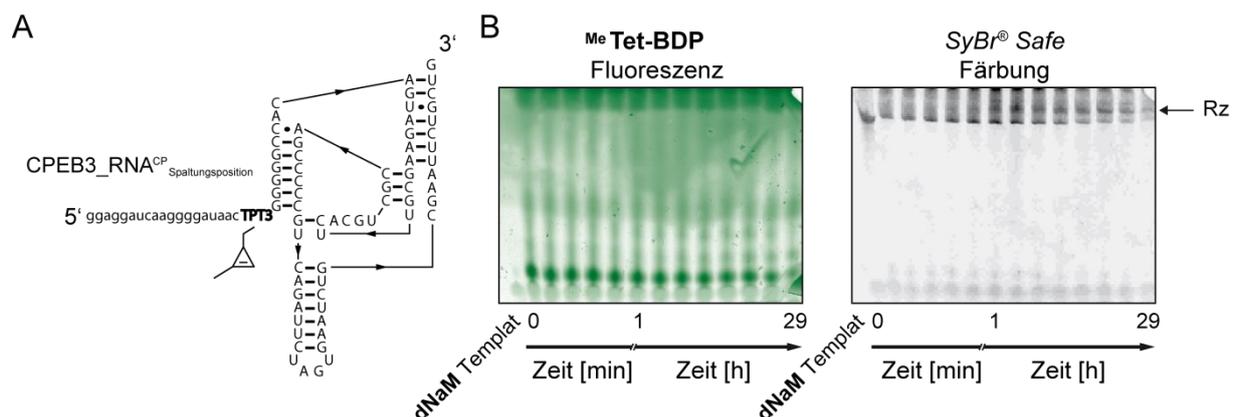
	Fragment	$M_{\text{berechnet}}$ des P ohne TPT3 <sup>CP</sup>	$M_{\text{berechnet}}$ des P mit TPT3 <sup>CP</sup>	$M_{\text{berechnet}}$ des Rz ohne TPT3 <sup>CP</sup>	$M_{\text{berechnet}}$ des Rz mit TPT3 <sup>CP</sup>
Vollständiges Konstrukt	5'-OH	6.618	6.812	28.788	28.983
	5'-P	6.698	6.892	28.808	29.063
	5'-PP	6.778	6.972	28.948	29.143
	5'-PPP	6.858	7.052	29.028	29.223
	5'-OH + $\text{Na}^+$	6.641	6.835	28.811	29.006
	5'-P + $\text{Na}^+$	6.721	6.915	28.891	29.086
	5'-PP + $\text{Na}^+$	6.801	6.995	28.971	29.166
	5'-PPP + $\text{Na}^+$	6.881	7.075	29.051	29.246
	5'-OH + 2 $\text{Na}^+$	6.664	6.858	28.834	29.029
	5'-P + 2 $\text{Na}^+$	6.744	6.938	28.914	29.109
	5'-PP + 2 $\text{Na}^+$	6.824	7.018	28.994	29.189
	5'-PPP + 2 $\text{Na}^+$	6.904	<b>7.098</b>	29.074	29.269
	5'-OH + 3 $\text{Na}^+$	6.687	6.881	28.857	29.052
	5'-P + 3 $\text{Na}^+$	6.767	6.961	28.937	29.132
	5'-PP + 3 $\text{Na}^+$	6.847	7.041	29.017	29.212
	5'-PPP + 3 $\text{Na}^+$	6.927	<b>7.121</b>	29.097	29.292
Gespalte- nes Konstrukt Rz*	5'-OH	-	-	22.170	-
	5'-OH + $\text{Na}^+$	-	-	22.193	-
	5'-OH + 2 $\text{Na}^+$	-	-	22.216	-
	5'-OH + 3 $\text{Na}^+$	-	-	22.239	-



**Abbildung 5.15: HPL-Chromatogramm gekoppelt mit einer ESI massenspektrometrischen Analyse der Transkriptionsprodukte nach der T7 *in vitro* Transkription.** A: Für das ESI Spektrum (B) korrespondierende HPL-Chromatogramm. Das Fragment des 5'-Terminus des Ribozyms nach der Spaltung wird durch einen Pfeil angedeutet. B: ESI massenspektrometrische Analyse des 5'-Terminus nach der Selbstspaltung zwischen 8,1 - 8,6 min. Hier gezeigt wird das dekonvolutierte ESI<sup>-</sup> MS Spektrum des gespaltenen Produkts:  $M_{\text{berechnet}} = 7.098$  (5'-PPP + 2  $\text{Na}^+$ ) und  $M_{\text{berechnet}} = 7.121$  (5'-PPP + 3  $\text{Na}^+$ ). Die Parameter für die Dekonvolution waren die folgenden: max. Ladung = 15, max. Nummer an Verbindungen = 10, mind. 6 Peaks pro Verbindung und eine neutrale Massenreichweite = 5.000 - 8.000 m/z. (Abbildung modifiziert aus<sup>[175]</sup>)

### 5.1.6.3 Das unnatürliche Nucleosid TPT3<sup>CP</sup> an der Spaltungsstelle des CPEB3 Ribozyms

Nach der Etablierung des co-transkriptionalen Assays sollte dieses Verfahren zur Untersuchung des Einbaus von TPT3<sup>CP</sup> an der -1-Position des CPEB3 Ribozyms genutzt werden. Auf der Grundlage der erhaltenen Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf die Ortspezifität der Reaktion gezogen werden. Durch einen ortsspezifischen Einbau von TPT3<sup>CP</sup> würde die Nähe zum katalytischen Zentrum des CPEB3 Ribozyms und dessen räumliche Beschaffenheit die sterisch anspruchsvolle iEDDA-Cycloaddition verhindern, sodass im Fluoreszenz-Scan keine Banden sichtbar sein würden (P und Rz = CPEB3\_RNA<sup>CP</sup><sub>Spaltungsposition</sub>). Bei einem unspezifischen Einbau im 3'-Spaltungsprodukt (Rz\*) von TPT3<sup>CP</sup> jedoch würde eine Bande im Fluoreszenz-Scan erscheinen. In beiden Fällen waren bei einer Ribozymsspaltung die Banden für alle Produkte zu erwarten (Rz, Rz\* und P), während bei einem inaktiven CPEB3 Ribozym lediglich die Bande für das generierte Ribozym (Rz) erzeugt werden sollte. Für dieses Experiment wurden die DNA Templatstränge 20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten</sub> CPEB3\_FW Templat und 20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten</sub>\_RV\_dNaM<sub>Spaltungsposition</sub> Templat wie in Kapitel 7.2.13.2 beschrieben generiert (Abbildung 5.16 A). Nach der Probenentnahme erfolgte die iEDDA-Reaktion mit MeTet-BDP. Jedoch zeigte sich im Fluoreszenz-Scan nach der denaturierenden PAGE Analyse weder eine Bande für das 5'-Produkt (P) oder den 3'-Kern (Rz\*) noch für das Edukt der Spaltung (Rz). Nach der SyBr<sup>®</sup> Safe Färbung zeigte sich lediglich eine Bande für Rz. Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass die Transkriptionsreaktion zwar erfolgreich verlief und Rz transkribiert wurde. Jedoch entwickelte die entsprechende Bande keine Fluoreszenz, wie die Abbildung 5.16 B zeigt. Hinzu kam die Abwesenheit der Banden der Spaltungsprodukte Rz\* und P. Bei Betrachtung des Gels nach der SyBr<sup>®</sup> Safe Färbung konnten auch hier keine entsprechenden Oligonukleotid-Stränge detektiert werden.



**Abbildung 5.16: Einbau des TPT3<sup>CP</sup> TP an der Position -1 im co-transkriptionalen *in vitro* CPEB3 Ribozym Spaltungsassay.** A: Einbau des Nucleotids TPT3<sup>CP</sup> an der Spaltungsposition -1 zu dem finalen RNA Strang CPEB3\_RNA<sup>CP</sup><sub>Spaltungsposition</sub>. B: Co-transkriptionaler Spaltungsassay mit dem *in situ* generierten Transkript CPEB3\_RNA<sup>CP</sup><sub>Spaltungsposition</sub>. Trotz der erfolgreichen Generierung der CPEB3\_RNA<sup>CP</sup><sub>Spaltungsposition</sub> (Rz) wurde keine Bande für das Spaltungsprodukt beobachtet.

Diese Beobachtungen ließen die Schlussfolgerung zu, dass keine Ribozymsspaltung stattfand. Durch die strukturelle Störung im aktiven Zentrum konnte das Tetrazin <sup>Me</sup>Tet-BDP vermutlich nicht eine iEDDA-Cycloaddition initiieren. Dies erklärte die vollkommene Abwesenheit aller Produkte im Fluoreszenz-Scan, während das ungespaltene Ribozym Rz generiert und mittels der SyBr<sup>®</sup> Safe Färbung visualisiert wurde. Dieses Ergebnis zeigte den ortsspezifischen TPT3<sup>CP</sup>-Einbau an der Position -1.

## **5.2 Der G-Quadruplex als strukturelle Besonderheit in einem Ribozym**

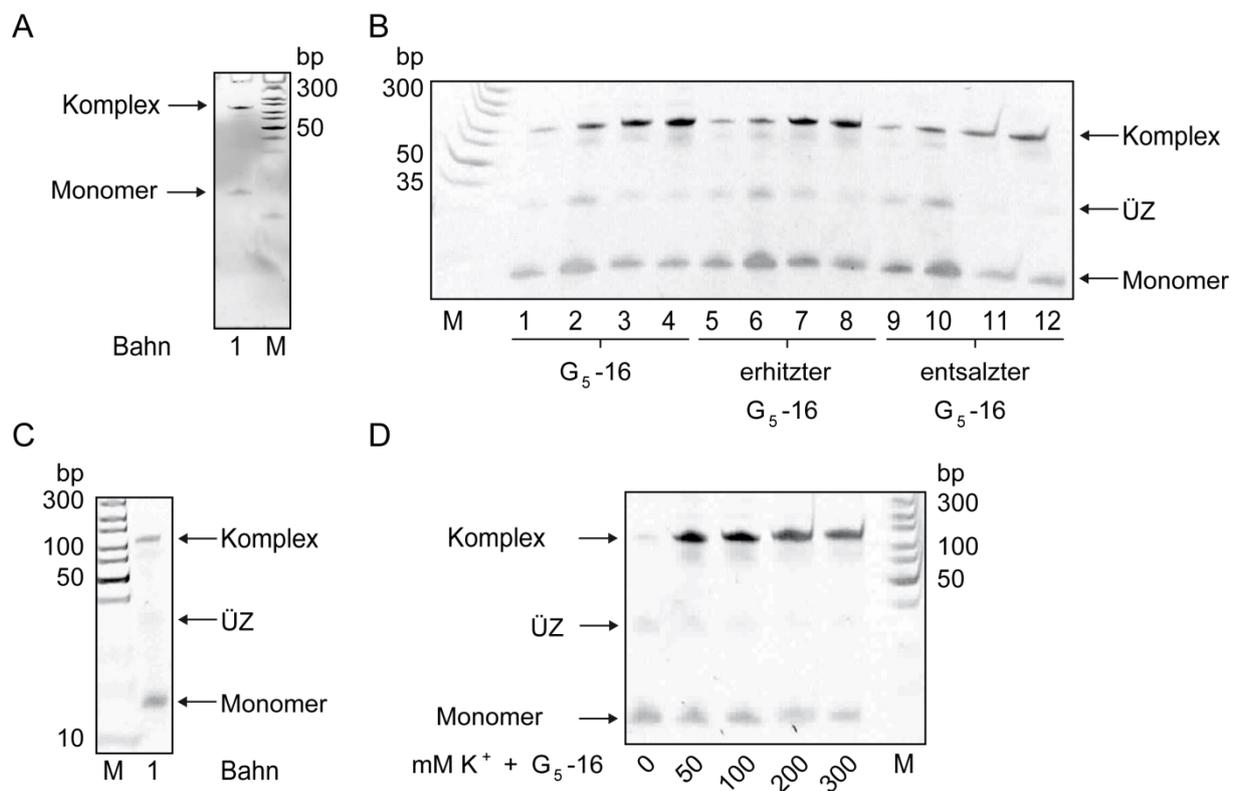
### **5.2.1 Entdeckung eines stabilen G-Quadruplexes: elektrophoretische Studien des Substratstrangs G<sub>5-16</sub> aus dem CPEB3 Ribozym**

Erste Bemühungen ein transspaltendes CPEB3 Ribozym zu rekonstruieren basierten auf der Aufteilung der RNA in die drei Stränge CPEB3 A, CPEB3 B und den Substratstrang G<sub>5-16</sub>. Stattdessen aggregierte der G<sub>5-16</sub> Strang unter Spaltungsbedingungen (10 mM Mg<sup>2+</sup> in Tris-Puffer mit NaCl bei pH 7,5, siehe Kapitel 5.1.1) zu einem stabilen Komplex, der in einem 20 %-igen PAGE Gel eine stark verringerte Mobilität zeigte (Abbildung 5.17 A). Diese wurde im Folgenden untersucht.<sup>[197]</sup> Durch die Bemühungen das Aggregat aufzulösen, wurde eine Reihe von Experimenten mit verschiedenen Bedingungen gestartet. Zum einen sollte der Effekt von unterschiedlichen RNA Konzentrationen und Puffern untersucht werden. Hierzu wurden Konzentrationen von 17 und 51 pmol gewählt. Als Puffer wurden 50 mM NH<sub>4</sub>OAc und 50 mM KCl genutzt. Ferner sollte festgestellt werden, ob ein Heizschritt das Aggregat aufzulösen vermochte. Schließlich sollte die Wirkung eines Entsalzschrittes mit G25-Spin Säulen bewertet werden (Abbildung 5.17 B). Deutlich konnte im denaturierenden 20 % PAGE Gel das Monomer mit einer Länge von 16 nt bei jeder dieser Bedingung identifiziert werden. Ebenso wurde eine stärkere Bande mit einer ungefähren Größe von 100 nt für die jeweils höheren Konzentrationen beobachtet. Zusätzlich bildete sich jeweils eine mittlere schwache Bande mit einer Größe von ca. 25 nt.

Die Anwesenheit von mehreren Banden deutete auf einen Zusammenhang zwischen Konzentration und Aggregationsgeschwindigkeiten hin. Vermutlich war dieses Verhalten auf einen kooperativen Effekt zurückzuführen, bei dem eine steigende Konzentration die Geschwindigkeit der Aggregatausbildung beschleunigte. Dabei könnte es sich bei der mittleren schwachen Bande um einen Duplex-ähnlichen Übergangszustand handeln. Einen ähnlichen konzentrationsabhängigen Effekt beobachteten bereits Borbone und Mitarbeiter in ihren Studien mit einem DNA Oktamer.<sup>[198]</sup> Die Wahl des Puffers zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Ausbildung des Aggregats. Ebenso wirklos verblieben der Heizschritt auf 95 °C für 2 min sowie der Gebrauch von G25-Spin Säulen als simple Methode zum Entsalzen des G<sub>5-16</sub> Strangs. Wie in der Abbildung 5.17 B zu sehen ist, bevorzugte der Komplex keine bestimmte Bedingung. Vielmehr hatten diese einen Effekt auf die schwache mittlere Bande, die bei der Zugabe von K<sup>+</sup>- und NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-haltigen Puffern verschwanden. Diese Beobachtung bestärkte die Vermutung eines Übergangszustands für das Aggregat als Endprodukt. Schließlich hatte eine HPLC Aufreinigung zur Isolation des G<sub>5-16</sub> Monomers nicht den gewünschten Effekt. Wie in Abbildung 5.17 C zu beobachten ist, hatte diese Entsalzmethode

keinerlei Auswirkungen auf die Komplexbildung. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass es sich um einen sehr stabilen Komplex handelte, der sich bei Kontakt mit stabilisierenden Ionen augenblicklich ausbildete und nicht mehr gelöst werden konnte.

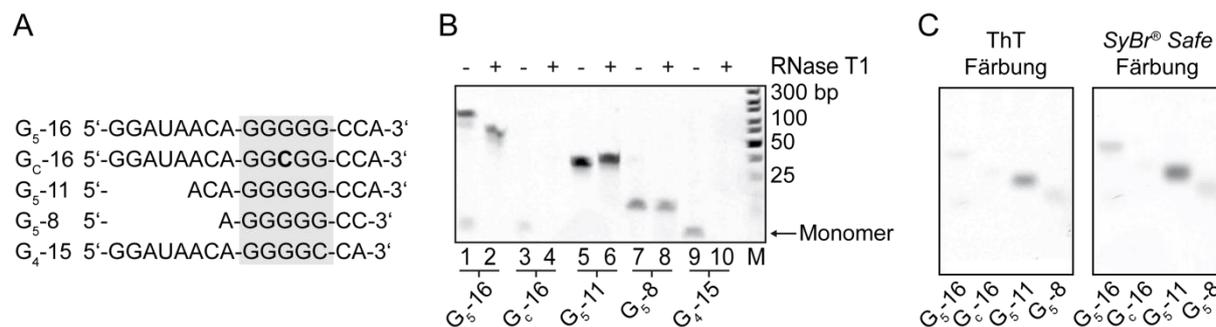
Aufgrund des positiven Effekts der Puffer galt die nächste Untersuchung der Abhängigkeit der Komplexbildung von der Salzkonzentration. Wegen seines stark stabilisierenden Effekts auf die G-Quadruplex-Bildung wurden  $K^+$ -Ionen in den Konzentrationen 0, 50, 100, 200 und 300 mM gewählt. Die Abbildung 5.17 D zeigt das PAGE Gel des  $G_5$ -16 Strangs in Verbindung mit unterschiedlichen  $K^+$ -Konzentrationen. Obwohl die Monomer-Bande durchwegs deutlich sichtbar blieb, verlor sie bei steigender  $K^+$ -Konzentration an Intensität. Ebenso konnte wieder eine Bande für einen Übergangszustand identifiziert werden. Auch diese wurde in ihrer Intensität mit einer steigenden  $K^+$ -Konzentration reduziert. Dagegen intensivierte sich die Komplex-Bande, die bereits schwach sogar im Experiment ohne  $K^+$  vertreten war, mit steigender  $K^+$ -Konzentration, was eine klare Abhängigkeit der Komplexstabilität von der  $K^+$ -Konzentration verdeutlichte.



**Abbildung 5.17: Aggregation des  $G_5$ -16 Strangs zu einem stabilen Komplex.** A: Denaturierende 20 % PAGE Analyse des unbehandelten  $G_5$ -16 Strangs. B:  $G_5$ -16 Strang Aggregation bei unterschiedlichen Bedingungen. Die Proben 1 - 4 wurden vor der PAGE Analyse nicht erwärmt. Die Proben 5 - 9 wurden auf 95 °C für 2 min erhitzt, während die Proben 9 - 12 mittels  $G_25$ -Spin Säulen nach Herstellerangaben vor der Pufferzugabe entsalzt wurden. Die Proben 1, 5 und 9 enthielten 17 pmol RNA, die übrigen Proben dagegen 51 pmol (vor allen weiteren Prozeduren des Heizens oder Entsalzens). Die Proben 3, 7 und 11 wurden mit 50 mM  $NH_4OAc$  und die Proben 4, 8 und 12 mit 50 mM  $KCl$  vor weiteren Prozeduren versetzt. C: Denaturierende 20 %-ige PAGE Analyse des entsalzten  $G_5$ -16 Strangs nach der HPLC Aufreinigung. D: Denaturierende 20 %-ige PAGE Analyse, das den Einfluss der  $K^+$ -Konzentration auf den  $G_5$ -16 Strang (17 pmol RNA) zeigt. Bei Kontakt mit  $K^+$  bildete sich der Komplex unabhängig von der  $K^+$ -Konzentration. (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)

Der nächste Schritt in der Untersuchung des 5'-AG<sub>5</sub>CC-3' Motivs war die Betrachtung dessen 5'-flankierender Sequenz. Die Oligonukleotide G<sub>5</sub>-16 und die verkürzten Oligonukleotide G<sub>5</sub>-11 und G<sub>5</sub>-8 enthielten alle dieses Motiv, das möglicherweise für die Aggregation verantwortlich war (Abbildung 5.18 A). Die Banden der Komplexe konnten für diese Stränge in einen denaturierenden PAGE Gel visualisiert werden (Abbildung 5.18 B, Bahn 1, 5 und 7). Die spezifischen Banden der RNA Komplexe, die ein überraschend niedriges Migrationsverhalten zeigten, wurden hier detektiert, insbesondere für die Stränge G<sub>5</sub>-16 und G<sub>5</sub>-11. In diesen beiden Fällen konnte eine Formation von stabilen Komplexen aus mehr als vier individuellen Strängen nicht ausgeschlossen werden. Von einer 5'-5'-Stapelung von zwei tetramolekularen DNA G-Quadruplexen, die sich in eine oktamerische Struktur faltet, berichteten bereits Borbone und seine Mitarbeiter.<sup>[198]</sup> Es bestand folglich auch die Möglichkeit einer ähnlichen Struktur, die durch die herausragenden 5'-Enden von acht bzw. drei Nukleotiden sogar bei denaturierenden Bedingungen begünstigt wurde, für die Stränge G<sub>5</sub>-16 und G<sub>5</sub>-11. Eben diese Komplexe werden durch den *SyBr*<sup>®</sup> *Safe* Farbstoff, der interkalierend und somit sensitiv für die vorhandene Struktur der Oligonukleotide agierte, gefärbt. Insgesamt werden RNA Duplexe und weitere Komplexe, beispielsweise G-Quadruplexe, verglichen mit monomeren RNA Strängen mit einer höheren Effizienz gefärbt. Der Ersatz des zentralen Guanins mit einem Cytosin oder eine verkürzte Guanin-Sequenz zu vier aufeinanderfolgenden Guaninen mit konstant bleibenden 5'- und 3'-Enden (G<sub>4</sub>-15) verhindert die Formation des Komplexes bei den eingesetzten Bedingungen (siehe Abbildung 5.18 B, Bahn 3 und 9). Nach dem Verdau durch die RNase T1, die spezifisch für G-reiche Sequenzen ist<sup>[199]</sup>, konnte für alle monomeren Oligonukleotide ein Abbau beobachtet werden, während die Aggregate der Stränge G<sub>5</sub>-16, G<sub>5</sub>-11 und G<sub>5</sub>-8 von dem Nuklease-Verdau verschont blieben (Abbildung 5.18 B, Bahn 2, 6 und 8). Dieser Effekt war vermutlich der Komplex-Struktur zu verdanken. Ferner konnte für den G<sub>5</sub>-16 Strang eine schnellere Migration nach dem RNase T1 Verdau im denaturierenden PAGE Gel beobachtet werden. Dieses Verhalten war auf die partielle Spaltung des 5'-GG-Endes zurückzuführen.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der G-Quadruplex-Formation ist die In-Gelfärbung der Oligonukleotide mit Thioflavin T (ThT) nach einer nativen PAGE Analyse.<sup>[128, 129]</sup> Speziell G-Quadruplex-Strukturen erhalten so eine hohe Bandenintensität gegenüber einer unspezifischen Duplex-Färbung (Abbildung 3.18). In der Tat konnte eine Färbung der genannten Stränge im Gel beobachtet werden (Abbildung 5.18 C). Dabei unterschieden sich jedoch die Intensitäten der beobachteten Banden. Insbesondere der Komplex des Stranges G<sub>5</sub>-11 zeigte eine verstärkte Bande gegenüber der schwachen Färbung der Stränge G<sub>5</sub>-16 und G<sub>5</sub>-8. Lediglich für den Strang G<sub>C</sub>-16 konnte keine ThT-Färbung beobachtet werden, was die Schlussfolgerung verstärkte, dass dieser Strang möglicherweise keinen stabilen G-Quadruplex aufgrund der Unterbrechung des konsekutiven G<sub>5</sub>-Motivs bilden konnte.



**Abbildung 5.18: Untersuchung der flankierenden Sequenzen des 5'-AG<sub>5</sub>CC-3'-Motivs.** A: RNA Oligonukleotide mit multiplen konsekutiven Guaninen. Diese Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit zur Untersuchung des stabilen Komplexes verwendet. B: RNase T1 Verdau der gewählten Substratstränge, die in ihrer Länge variierten. Alle Stränge mit dem 5'-AG<sub>5</sub>CC-3'-Motiv waren resistent gegenüber dem RNase Verdau. C: Native PAGE Gel Analyse der gewählten Substratstränge mit anschließender ThT-Färbung. Das ThT färbte auch hier deutlich die Stränge mit der G-Quadruplex-ausbildenden Sequenz. (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)

Insgesamt deuteten alle diese Ergebnisse darauf, dass es sich bei dem stabilen Komplex um einen G-Quadruplex handeln könnte. Dieser wurde vermutlich aus vier Strängen ausgebildet, sodass insgesamt fünf Tetraden für einen stabilen Komplex übereinandergestapelt wurden. Der Kontakt mit K<sup>+</sup> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> stabilisierte diesen Komplex, sodass kein klassisches Entsalzverfahren die Wechselwirkungen in dem Komplex und somit die alternative Faltungsstruktur auflösen konnte.

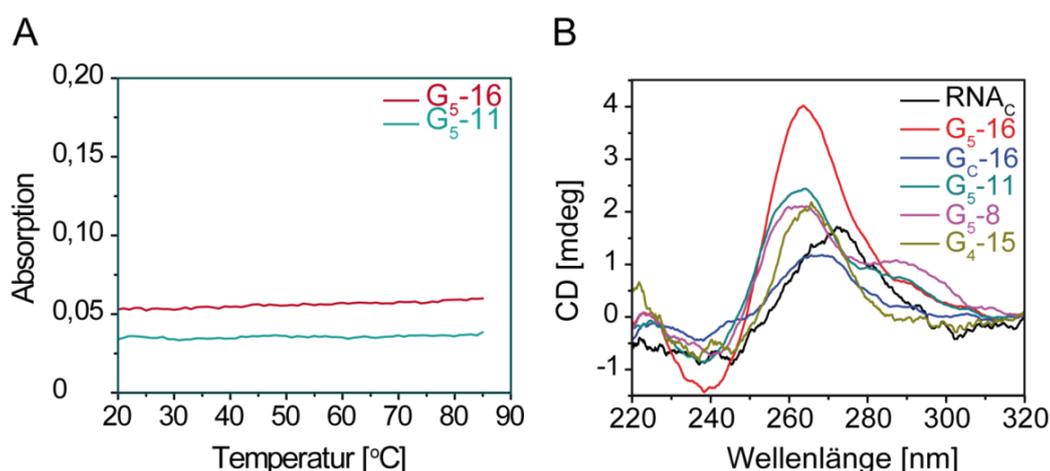
## 5.2.2 Charakterisierung des G-Quadruplexes

### 5.2.2.1 UV Spektrometrie und CD Spektroskopie der Substratstränge

Die Entdeckung einer Sequenz im CPEB3 Ribozym, die das Potential zur Ausbildung von stabilen vermeintlichen G-Quadruplexen barg, leitete eine Reihe weiterer Untersuchungen dieses Komplexes ein. Zur weiteren Charakterisierung dieses Aggregats wurde zunächst eine Temperatur-abhängige UV Spektroskopie im Bereich von 20 - 80 °C bei einer Wellenlänge von 295 nm betrieben (siehe Kapitel 7.2.20). Diese Wellenlänge wurde aufgrund der Vermutung auf eine RNA G-Quadruplex-Struktur gewählt, bei der bei einer Wellenlänge von 260 nm die Differenzen in einem niedrigeren Bereich von ca. 4 % verbleiben, was eine eindeutige Zuordnung erschwert.<sup>[112]</sup> Der sigmoidale UV Kurvenverlauf ermöglicht sowohl den Nachweis einer Quadruplex-Struktur als auch die Ermittlung der Schmelztemperatur T<sub>m</sub>. Für diese Analyse wurden die Stränge G<sub>5</sub>-16 und G<sub>5</sub>-11 eingesetzt (Abbildung 5.19 A). Als Pufferlösung wurde 10 mM LiSO<sub>4</sub> mit 100 mM KCl, pH 7,4, gewählt. Es konnte bei einer Temperatursteigerung für beide Stränge keinerlei Veränderung in der UV Spur beobachtet werden. Die Nutzung der unterschiedlichen Puffer ergab ebenso wenig eine Änderung in der Absorptionsmessung. Dieser Verlauf deutete zunächst auf die Abwesenheit von Quadruplex-Strukturen.<sup>[113]</sup>

Als unterstützende Methode wurde auch die CD Spektroskopie eingesetzt.<sup>[115, 116]</sup> Diese Vorgehensweise erlaubt neben dem Nachweis einer G-Quadruplex-Struktur auch die

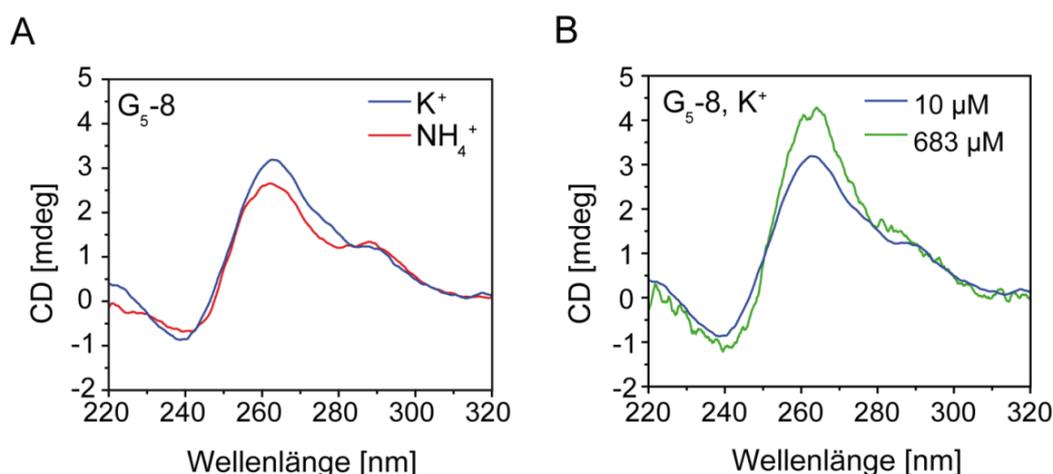
Kategorisierung seiner Faltung in einen parallelen oder einen antiparallelen G-Quadruplex (siehe Kapitel 3.3.2.2). Für diese Analyse wurden die G-reichen Stränge  $G_5-16$  und die verkürzten Gegenparts  $G_5-11$  und  $G_5-8$  gewählt. Ebenso sollten die Spektren der RNA Stränge  $G_C-16$  und  $G_4-15$  aufgenommen und evaluiert werden. Als Kontrolle diente die einzelsträngige  $RNA_C$ , dessen Sequenz keine G-Quadruplex-Struktur ausbildete (Abbildung 5.19 B). Alle Oligonukleotide wurden zuvor in 150 mM  $NH_4OAc$  bei pH 7 auf 95 °C für eine Faltung der Strukturen erwärmt und anschließend bei 25 °C in der CD Spektroskopie verwendet. Der Oligonukleotid  $G_5-16$  zeigte einen deutlichen positiven Höchstwert bei etwa 260 nm und ein Minimum bei ungefähr 240 nm. Diese spektrale Charakteristika deuteten auf einem parallelen G-Quadruplex hin.<sup>[115]</sup> Für die kürzeren Sequenzen mit dem  $G_5$ -Motiv ( $G_5-11$  und  $G_5-8$ ) und dem  $G_4$ -Motiv ( $G_4-15$ ) konnte ein ähnlicher spektraler Verlauf mit weniger intensiv ausgebildeten Maxima und Minima beobachtet werden. Somit unterstützten die aufgenommenen Spektren die Präsenz einer parallelen Struktur in der Lösung. Dagegen wies der Strang  $RNA_C$  einen positiven Höchstwert bei 270 nm auf, während der Bereich um 240 nm keine Änderung im Spektrum zeigte. Ein solcher Verlauf eines CD Spektrums wurde bereits der A-Form der RNA zugeordnet.<sup>[200]</sup> Eine bemerkenswerte Eigenschaft in dem Verlauf des CD Spektrums der verkürzten Stränge mit dem  $G_5$ -Motiv war die Präsenz einer sogenannten Schulter mit einem Maximum bei ca. 295 nm, was auf die Existenz weiterer oligomerer Strukturen hindeutete. Möglicherweise entstehen diese durch Stapelwechselwirkungen von mehreren G-Quadruplexen in Anwesenheit von  $NH_4^+$ - und  $K^+$ -haltigen Puffern. Die erhaltenen CD Spektren ließen den Schluss zu, dass eine Formation von G-Quadruplex-Strukturen aus den Strängen mit dem  $G_5$ - und  $G_4$ -Motiv in  $NH_4^+$ -haltigem Puffer stattfand. Dagegen bot das  $G_2CG_2$ -Motiv nicht die nötige Stabilität für eine G-Quadruplex-Faltung und zeigte somit keine für G-Quadruplex-Strukturen typische Absorptionsmaxima oder -minima. In Verbindung mit dem in Kapitel 5.2.1 beschriebenen elektrophoretischen Studien konnte eine enorme



**Abbildung 5.19: Spektroskopische Untersuchungen der Substratstränge.** A: UV Schmelzkurven der Oligonukleotide  $G_5-16$  und  $G_5-11$ . Beide Oligonukleotide (1  $\mu$ M in  $LiSO_4$ -Puffer) zeigten bei einer Temperatursteigerung (20 - 85 °C) keinerlei Schmelzcharakter. B: CD Spektroskopie der in Abbildung 5.18 A aufgeführten Substratstränge. Der Strang  $G_5-16$  zeigte den für G-Quadruplexe typischen Kurvenverlauf mit einem Maximum bei 260 nm und einem Minimum bei 240 nm (rot). Die Stränge  $G_5-11$  und  $G_5-8$  erhielten zusätzlich eine Schulter bei 290 nm, was auf eine Strukturmischung hindeutete (grün und lila). Dagegen bildeten die Kontrollstränge  $RNA_C$ ,  $G_C-16$  und  $G_4-15$  deutlich weniger charakteristische Kurvenverläufe aus (schwarz, blau und braun). (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)

Stabilitätssteigerung des G<sub>5</sub>-Motivs gegenüber dem G<sub>4</sub>-Motiv, das bei den verwendeten stark denaturierenden Bedingungen nicht aufrechterhalten werden konnte, festgestellt werden.

Wie in den CD Spektren der RNA G<sub>5</sub>-8 zu beobachten war (Abbildung 5.19 B), handelte es sich mutmaßlich um ein Gemisch oligomerer Strukturen, die durch die Verkürzung des Substratstrangs begünstigt wurden. Hierbei wurde auch ein Puffer- und Konzentrationsherbeigeführter Effekt in Betracht gezogen. So wurde der Strang G<sub>5</sub>-8 erneuter CD Spektroskopie mit einem K<sup>+</sup>-haltigen Puffer in den Konzentrationen von 10 und 683 μM RNA unterzogen. Die Abbildung 5.20 zeigt, dass weder die Nutzung eines alternativen Puffers noch die Steigerung der RNA Konzentration das mutmaßliche Strukturgemisch aufzulösen vermochte. Diese Beobachtung verstärkte weiter die Vermutung oligomerer Strukturen. In einer ESI-MS Messung konnte weder ein intakter Komplex des Strangs noch weitere Strukturen identifiziert werden. Die dabei ermittelten Massen bestätigten lediglich die Präsenz eines Monomers, das sowohl allein als auch in Verbindung mit K<sup>+</sup> auftritt. Dies unterstützte den stark K<sup>+</sup>-bindenden Effekt, der bereits in den zuvor durchgeführten elektrophoretischen Studien dokumentiert wurde (Abbildung 5.17 C und D).



**Abbildung 5.20: CD Spektroskopie von G<sub>5</sub>-8 in K<sup>+</sup>- (25 mM, NMR Puffer, blaue Linie) oder NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-haltigen (150 mM, rote Linie) Puffern.** A: Die G-Quadruplex-Struktur wurde in einem K<sup>+</sup>- und in einem NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-haltigen Puffer gleichermaßen ausgebildet. B: CD Spektroskopie der RNA G<sub>5</sub>-8 in K<sup>+</sup>-haltigem (25 mM) Puffer in einer Konzentration von 10 μM (blaue Linie) oder 683 μM G<sub>5</sub>-8 (grüne Linie). Durch eine Steigerung der Konzentration konnte die oligomere Struktur nicht aufgelöst werden. (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)

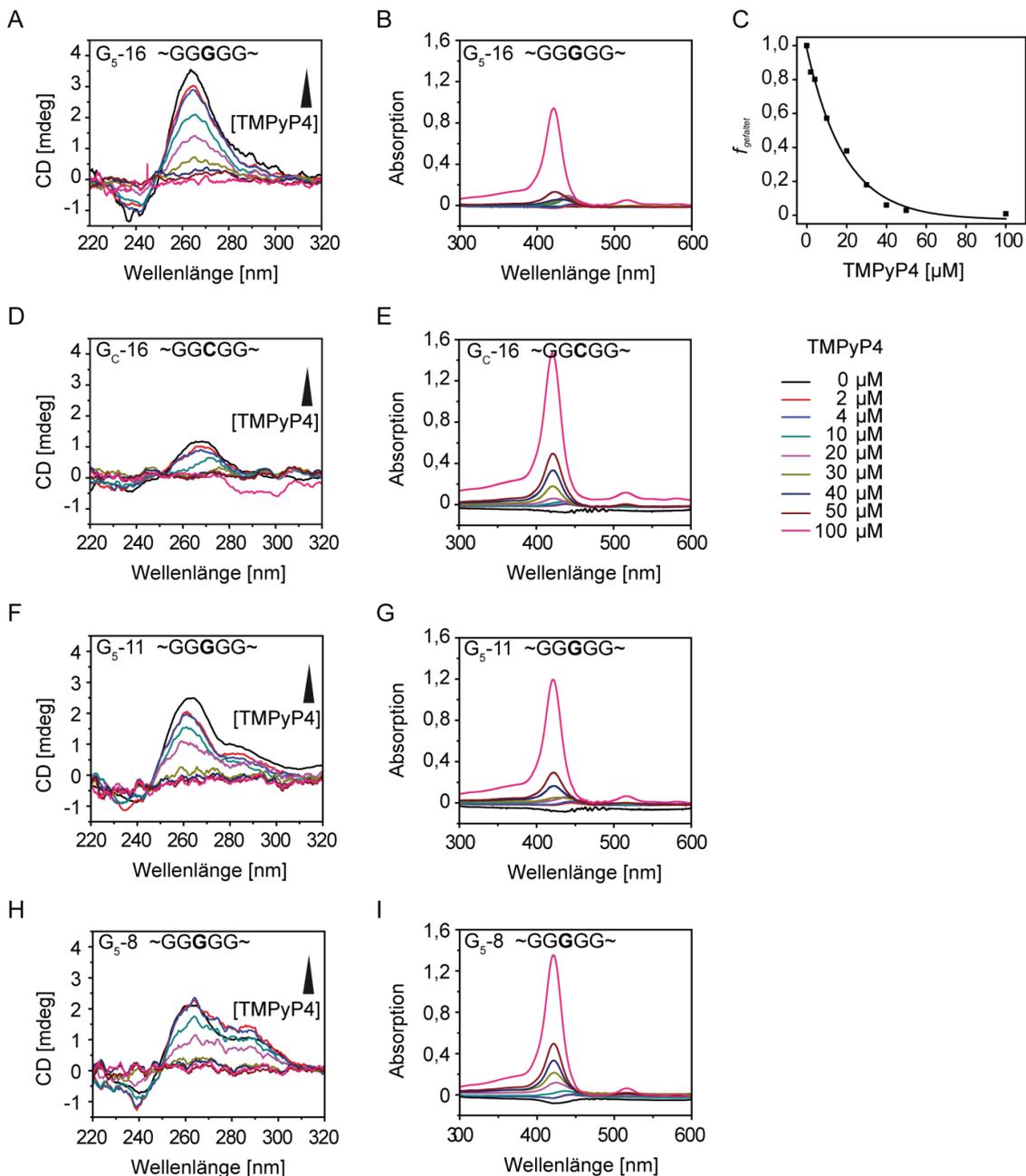
### 5.2.2.2 Effekte des Porphyrins TMPyP4 auf den G-Quadruplex

Das kationische Porphyrin TMPyP4, das typischerweise DNA G-Quadruplexe stabilisiert<sup>[120, 121]</sup>, ist in der Lage, parallele RNA G-Quadruplexe zu binden und zu destabilisieren.<sup>[94]</sup> Da die zuvor beschriebenen Ergebnisse keine vollständige Entfaltung des G<sub>5</sub>-Motivs mit Entsalzmethoden oder Denaturierung durch Hitze zeigten, wurde das Porphyrin TMPyP4 auf seine Fähigkeit als entfaltender Ligand für den durch den Strang G<sub>5</sub>-16 gebildeten Komplex getestet. Bei einer steigenden eingesetzten Konzentration des Porphyrins TMPyP4 sollte ein Entfaltungseffekt beobachtet werden.<sup>[124]</sup> Begleitend dazu sollten die entsprechenden UV-Vis Spektren Auskunft über die Präsenz des freien Porphyrins geben. Tatsächlich konnte eine

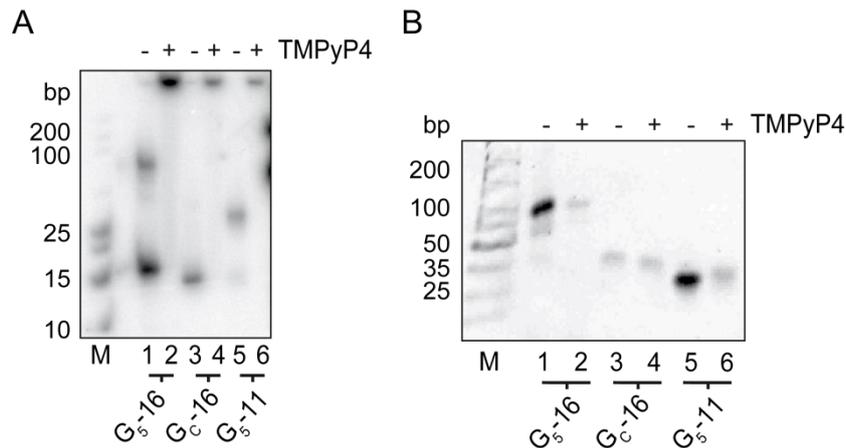
deutliche Verschiebung der Soret-Bande von 455 nm bei 0,2 Äq. TMPyP4 zu 422 nm bei einem zehnfachen Überschuss an TMPyP4 beobachtet werden (Abbildung 5.21 B, E, G und I). Die bathochrome Verschiebung bei einer niedrigen TMPyP4-Konzentration hat vermutlich ihren Ursprung in der Bindung des Porphyrins an die Quadruplex RNA.<sup>[120]</sup> Dagegen konnte für den Strang G<sub>C</sub>-16 ein ähnlicher Effekt nicht beobachtet werden, was durch die fehlende Fähigkeit zur G-Quadruplex-Ausbildung hervorgerufen wurde (Abbildung 5.21 D und E). In CD-spektroskopischen Messungen führte der Zusatz von TMPyP4 zu einer Reduktion der Intensitäten der für parallele G-Quadruplex-Strukturen typischen Maxima und Minima bei 260 nm und 240 nm. Dieses Verhalten deutete auf eine Entfaltung der Komplex-Struktur hin. Eine detailliertere Betrachtung der berechneten gefalteten RNA Fraktion und den Effekt der entsprechenden TMPyP4-Konzentration auf die Entfaltung enthüllte die Konzentration vom 12,5 µM, die zu 50 % der Entfaltung des Komplexes führte (Abbildung 5.21 C). Diese Beobachtung unterstützte bereits zuvor durchgeführte ähnliche Untersuchungen.<sup>[124]</sup> In den Kontrollexperimenten mit dem G<sub>C</sub>-16 Strang konnte eine schwächere Interaktion mit TMPyP4 aufgezeichnet werden (Abbildung 5.21 D und E). Ähnliche CD-spektroskopisch beobachtbare Effekte wurden mit den verkürzten Strängen G<sub>5</sub>-11 und G<sub>5</sub>-8 aufgezeichnet. Hierbei reduzierte sich sowohl die Intensität des Maximums bei 260 nm als auch die der Schulter bei 290 nm bei Zugabe einer steigenden Konzentration an TMPyP4 (Abbildung 5.21 F und H).

Die Ergebnisse der Spektroskopie entsprachen dem Migrationsverhalten der Oligonukleotide mit dem G<sub>5</sub>-Motiv in nativen PAGE Gelen. Zur Analyse dessen wurden die Stränge G<sub>5</sub>-16, G<sub>C</sub>-16 und G<sub>5</sub>-11 mit einer <sup>32</sup>P-Markierung versehen, mit 1.000 Äq. TMPyP4 inkubiert und zur nativen PAGE Analyse gegeben. Durch die Zugabe des Porphyrins konnte ein entfaltender Effekt auf den Quadruplex ebenso wie die Ausbildung von neuen langsam migrierenden RNA-TMPyP4-Addukten bestätigt werden (Abbildung 5.22 A, Bahnen 2 und 6). Eine native PAGE Analyse bei einer niedrigeren TMPyP4-Konzentration von 0,4 Äq. mit nicht markierter RNA wurden ebenfalls getestet. Eine Färbung des Gels mit SyBr<sup>®</sup> Safe Farbstoff, der G-Quadruplex-Strukturen mit einer hohen Intensität anfärbt, zeigte einen auflösenden Effekt. Die Reduktion der Bandenintensität der Komplexe bewies, dass bereits eine niedrige TMPyP4-Konzentration, die weit unter den äquimolaren Verhältnissen lag, den G<sub>5</sub>-Motiv-Quadruplex aufzulösen vermochte (Abbildung 5.22 B, Bahnen 2 und 6). Der Nachweis des entfaltenden Effekts von TMPyP4 auf den sehr stabilen G-Quadruplex führte zur Annahme, dass durch die Porphyrin-Zugabe der inhibitorische Effekt, der durch G-Quadruplex-Formation ausgelöst wird, möglicherweise umgekehrt werden konnte. Tatsächlich wurde von einer Aufhebung inhibitorischer Effekte bereits in früheren Studien von Zamiri *et al.* und Morris *et al.* berichtet.<sup>[94,</sup>

124]

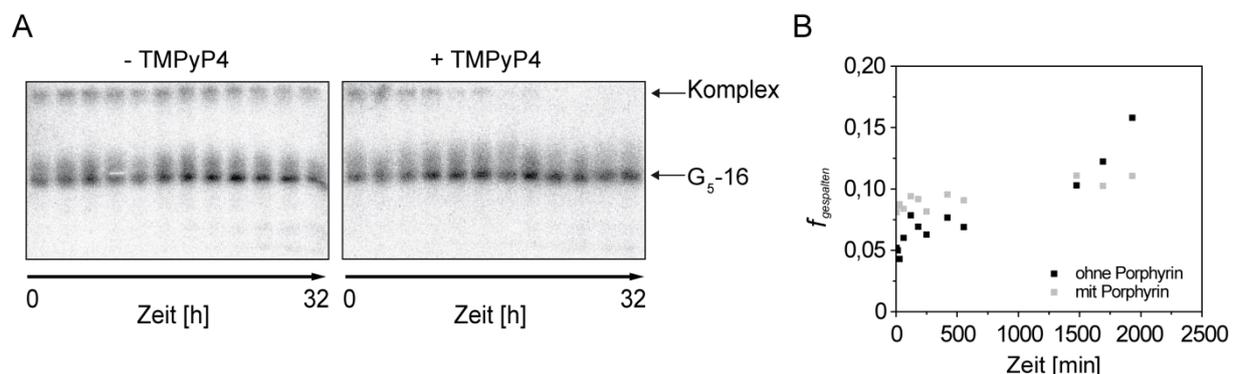


**Abbildung 5.21: CD Spektroskopie der ausgewählter Substratstränge bei einer steigenden Konzentration des Porphyrins TMPyP4<sup>[124]</sup>.** A: CD Spektren des Strangs G<sub>5</sub>-16. Das Porphyrin löst die G-Quadruplex-Struktur mit einer steigender TMPyP4-Konzentration. B: Absorption des freien TMPyP4 bei den Messungen mit dem Strang G<sub>5</sub>-16. C: Entfaltung der G-Quadruplex-bildenden RNA G<sub>5</sub>-16 durch TMPyP4. Die gefaltete Fraktion der RNA G<sub>5</sub>-16 wurde aus dem CD Signal bei 263 nm aus A entnommen und gegen die TMPyP4-Konzentration aufgetragen. Dabei wurde vorausgesetzt, dass die RNA in der Abwesenheit von TMPyP4 vollständig gefaltet war. Die erhaltenen Daten wurden zu einer exponentiellen Funktion gefittet. So erhielt sich die Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  TMPyP4 für eine 50 %-ige Entfaltung des Komplexes. D: CD Spektren des Strangs G<sub>c</sub>-16 als Kontrollstrang. Aufgrund der Strukturschwächung, die durch die Mutation eines G zu einem C verursacht wurde, bildete sich kein G-Quadruplex aus. E: Absorption des freien Porphyrins TMPyP4 bei den Messungen mit dem Strang G<sub>c</sub>-16. Hier war eine deutlich höhere Konzentration des freien Porphyrins TMPyP4 zu beobachten. F: CD Spektren des Strangs G<sub>5</sub>-11. G: Absorption des freien Porphyrins TMPyP4 bei den Messungen mit dem Strang G<sub>5</sub>-11. H: CD Spektren des Strangs G<sub>5</sub>-8. I: Absorption des freien Porphyrins TMPyP4 bei den Messungen mit dem Strang G<sub>5</sub>-8. In beiden Fällen wurde ein G-Quadruplex vermutet. Jedoch führte die Verkürzung der flankierenden Sequenzen zu einem Strukturgemisch. (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)



**Abbildung 5.22: Native PAGE Analyse des Effekts des Porphyrins TMPyP4 auf den G-Quadruplex.** A: 20 % native PAGE der 5'-<sup>32</sup>P-markierten Substratstränge G<sub>5</sub>-16, G<sub>C</sub>-16 und G<sub>5</sub>-11 ohne und mit 1.000 Äq. TMPyP4. B: 20 % native PAGE der Stränge G<sub>5</sub>-16, G<sub>C</sub>-16 und G<sub>5</sub>-11 ohne und mit 0,4 Äq. TMPyP4 (SyBr® Safe Farbstoff). TMPyP4 konnte erfolgreich die G-Quadruplex-Struktur der Stränge G<sub>5</sub>-16 und G<sub>5</sub>-11 auflösen. (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)

Die Beobachtung, dass TMPyP4 den G-Quadruplex im Substratstrang G<sub>5</sub>-16 aufzulösen vermochte, führte zur Schlussfolgerung, dass durch die Zugabe von TMPyP4 der inhibierende Effekt auf die Faltung eines aktiven, transspaltenden CPEB3 Ribozyms *in vitro* umgekehrt werden konnte. Damit wären Spaltungsassays eines aus drei Strängen rekonstruierten Ribozyms möglich. Aus diesem Grund wurde das CPEB3 Ribozym aus den Strängen CPEB3 A, CPEB3 B und dem 5'-<sup>32</sup>P-markierten Substratstrang G<sub>5</sub>-16 rekonstruiert und ein *in vitro* Spaltungsassay mit 10 µM TMPyP4 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt (siehe Kapitel 7.2.11.1). Die Abbildung 5.23 A zeigt ein langsam migrierendes Aggregat, das in Gegenwart von TMPyP4 nach einer Inkubationszeit von 32 h vollständig aufgelöst wurde. Trotzdem wurde aus den erhaltenen Daten kein Spaltungsprodukt in Form einer Bande von 8 nt im denaturierenden Gel detektiert, was ebenso eine Auswertung der erhaltenen Intensitäten zur Ermittlung einer



**Abbildung 5.23: CPEB3 Ribozym Spaltungsassay aus einem rekonstruierten drei-strängigem Ribozym mit TMPyP4 (10 µM).** A: Denaturierende PAGE der entnommenen Proben. Der Komplex, der eine langsamere Migration als das Monomer G<sub>5</sub>-16 im Gel zeigte, wurde durch die Zugabe von TMPyP4 aufgelöst. B: Auftragung der aus den Intensitäten erhaltenen Daten für die Reaktionen ohne TMPyP4 (schwarz) und mit TMPyP4 (grau). Es wurde kein kinetisches Spaltungsverhalten des rekonstruierten drei-strängigen CPEB3 Ribozyms festgestellt. (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)

Spaltungsrate unmöglich machte (Abbildung 5.23 B). Somit wurde nachgewiesen, dass trotz der Zugabe des G-Quadruplex-auflösenden Liganden TMPyP4 keine Verbesserung der Spaltungsreaktion des G<sub>5</sub>-16 Substratstrangs herbeigeführt wurde. Als Grundlage dieses Effekts wurde der stark Sekundärstruktur-auflösende Charakter des Porphyrins in Betracht gezogen. Vermutlich wurde dabei jegliche Form von Duplex-Formation durch die stabile RNA-Porphyrin-Interaktion verhindert und somit auch die Ausbildung eines aktiven, transspaltenden CPEB3 Ribozyms inhibiert.

Zusammenfassend konnte durch die Studien mittels der PAGE Analyse, der UV-Vis Spektrometrie und CD Spektroskopie die Existenz eines durch das G<sub>5</sub>-Motiv gebildeten parallelen G-Quadruplex nachgewiesen werden. Dieser wurde aus vier individuellen RNA Strängen ausgebildet und besaß eine außergewöhnliche Stabilität.

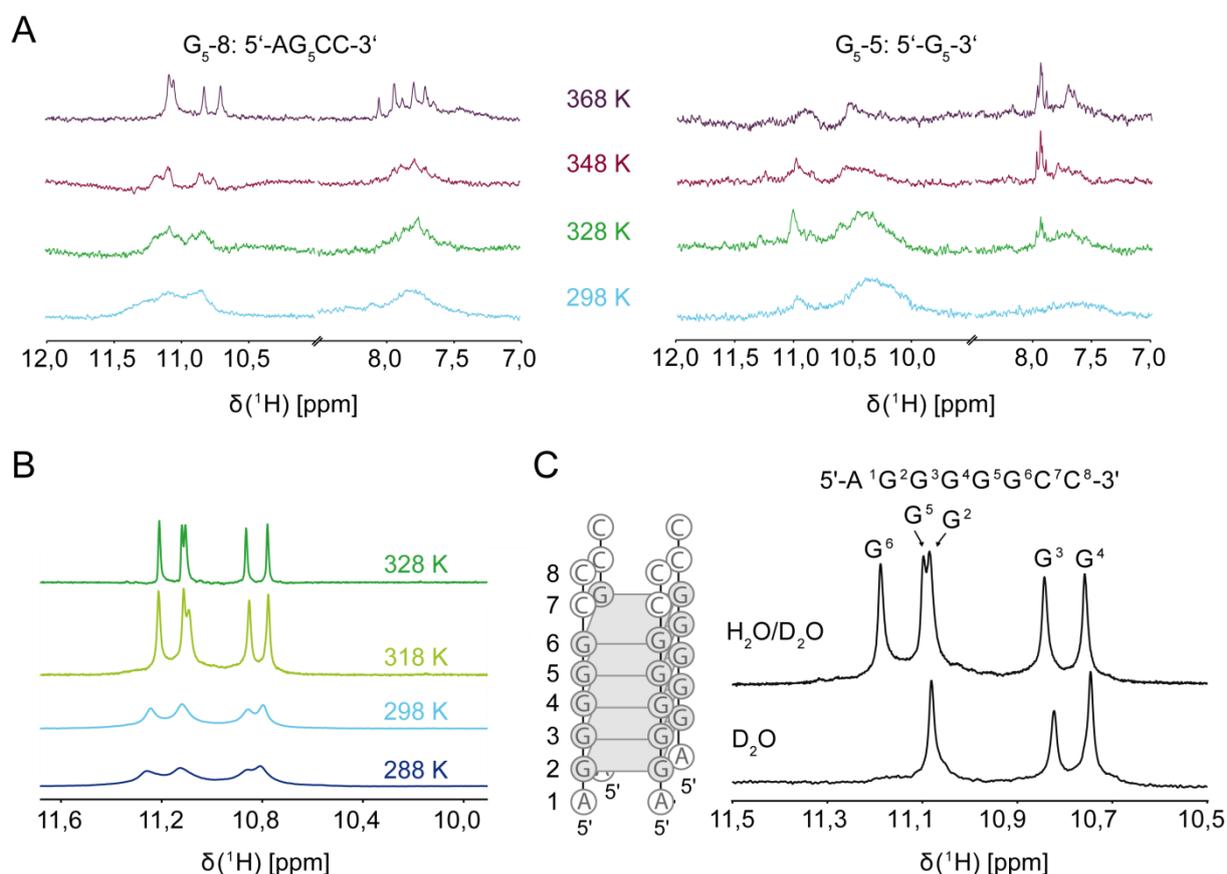
### **5.2.3 NMR Spektroskopie von CPEB3 Ribozym Fragmenten**

#### **5.2.3.1 Untersuchung des Grundmotivs 5'-AG<sub>5</sub>CC-3'**

Die Entdeckung eines stabilen Komplexes, der bereits mit einem einfachen G<sub>5</sub>-Motiv in einen stabilen G-Quadruplex falten konnte, leitete detailliertere Studien zu dessen Struktur ein. Somit wurde der Strang G<sub>5</sub>-8 für NMR-spektroskopische Untersuchungen ausgewählt. Aufgrund der vorausgegangenen Studien konnte dieser verkürzte Substratstrang mit dem Grundmotiv 5'-AG<sub>5</sub>CC-3' bereits eine G-Quadruplex-Struktur ausbilden, wobei CD spektroskopische Untersuchungen oligomere Strukturen, die durch den Strang gebildet wurden, andeuteten (Abbildung 5.19 B). Weder der Einsatz eines alternativen Puffers (25 mM Kaliumphosphat, 50 mM KCl, pH 6,2) noch eine gesteigerte Konzentration der RNA (683 µM) vermochten es, die oligomeren Strukturen zu einheitlichen Signalen aufzulösen (Abbildung 5.20). Trotzdem erschien die Wahl des G<sub>5</sub>-8 Strangs aufgrund seiner Kürze und somit einer besseren Zuordnung der Signale und der Notwendigkeit einer hohen RNA Konzentration für die NMR-spektroskopische Messung als eine angemessene Stellvertretung für alle in dieser Arbeit getesteten Substratstränge mit dem 5'-AG<sub>5</sub>CC-3'-Motiv. Von einer <sup>13</sup>C- sowie einer <sup>15</sup>N-Markierung der RNA wurde zunächst abgesehen, da ein Nachweis der Iminoprotonen sowie später der parallelen tetramolekularen Struktur ausreichend sein sollte.

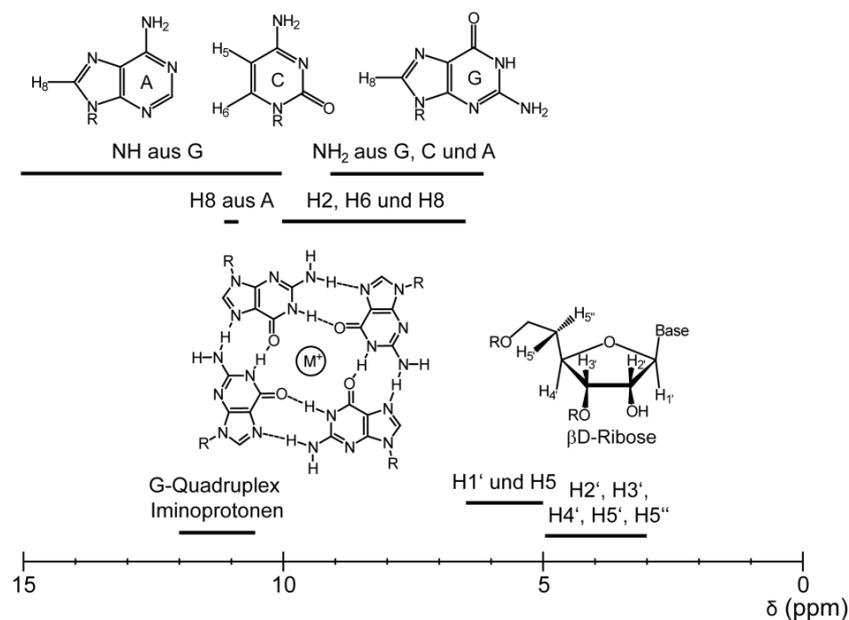
Zum Zweck der Klärung der Struktur des G-Quadruplexes wurden 1D und 2D <sup>1</sup>H-NMR spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Formation einer symmetrischen G-Quadruplex-Struktur sollte sich in der charakteristischen Verschiebung in der Region der Iminoprotonen widerspiegeln.<sup>[198]</sup> Bekanntlich erzeugen die Iminoprotonen der Hoogsteen-Basenpaarungen zwischen Guaninen einer Tetrade eines G-Quadruplexes deutliche Peaks im Bereich von 10 - 12 ppm.<sup>[84]</sup> <sup>1</sup>H-NMR-Messungen des G<sub>5</sub>-8 Strangs bei RT ergaben breite Signale im für Iminoprotonen typischen Bereich (Abbildung 5.24 A und B). Ein solcher Effekt ergab sich möglicherweise aufgrund der Ausbildung polymerer Strukturen zwischen der multiplen individuellen G-Quadruplexen. Jedoch lösten sich diese Peaks bei einer Steigerung der Messtemperatur anders als erwartet nicht auf. Stattdessen entwickelten sich diese zu hoch aufgelösten Signalen in einem Temperaturbereich von 288 - 368 K. Die beobachteten fünf Signale im Bereich von 11 - 12 ppm konnten den fünf unterschiedlichen Iminoprotonen der

Quadruplex-Struktur zugeordnet werden (Abbildung 5.24 C). Die Anzahl der Signale der Iminoprotonen entsprach der Anzahl der existierenden Iminoprotonen der Guanine in einem einzelnen Strang. Dieser Befund unterstützte die bereits aufgestellte Vermutung, dass es sich hier um einen höchst-symmetrischen parallelen G-Quadruplex handelte. Ferner konnte mit der Aufnahme eines 1D  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums des  $\text{G}_5$ -5 Strangs nachgewiesen werden, dass die flankierenden Sequenzen im  $5'$ - $\text{AG}_5\text{CC}$ - $3'$ -Motiv die Faltung zu einem symmetrischen Komplex begünstigen. Denn statt der erwarteten hoch aufgelösten Imino peaks zeigten sich hier lediglich unscharfe, schwer definierbare Signale, die sich über das ganze Temperaturspektrum erstreckten (Abbildung 5.24 A). In einer Messung der Probe in  $\text{D}_2\text{O}$  verschwanden die Signale für die äußeren Iminoprotonen (Zuordnung siehe Abbildung 5.26 A und B)  $\text{G}^2$  und  $\text{G}^6$  des G-Quadruplexes ( $\text{G}_5$ -8) $_4$ , während die übrigen, inneren Iminoprotonen (Zuordnung siehe Abbildung 5.26 A und B) selbst nach einer Inkubationszeit von 5 h in  $\text{D}_2\text{O}$  bei einer Temperatur von 348 K verblieben.



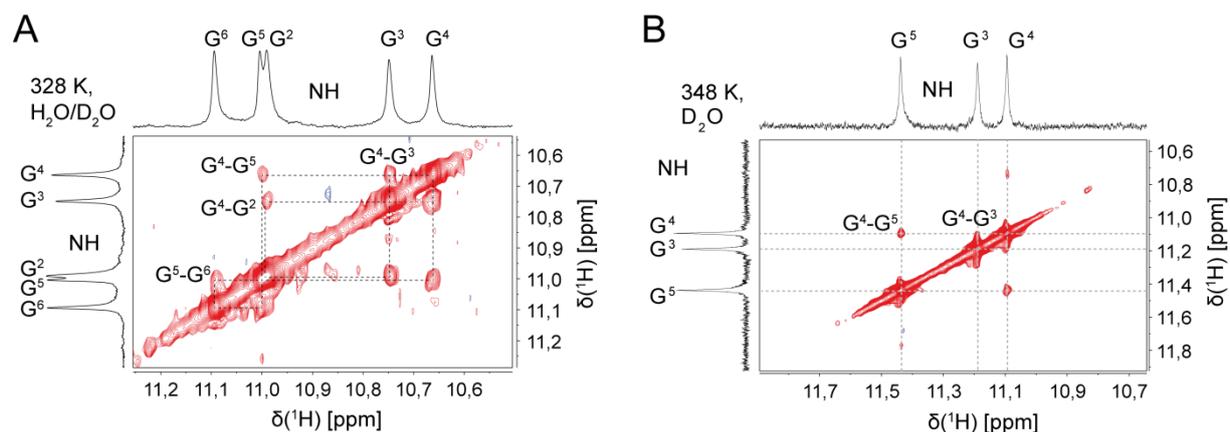
**Abbildung 5.24: Temperaturabhängige 1D  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopische Messungen des  $\text{G}_5$ -8 Substratstrangs in der Iminoregion.** A. 1D  $^1\text{H}$ -NMR Spektren der RNA Stränge  $\text{G}_5$ -8 (500  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{G}_5$ -5 (200  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich bei einer steigenden Temperatur (500 MHz). Die ersten Experimente resultierten statt der erwarteten Auflösung der Signale der Iminoprotonen bei einer Steigerung der Temperatur in einer schärferen Auflösung der Peaks. Dieselben Signale konnten im NMR-Spektrum mit einem  $\text{G}_5$ -Element nicht beobachtet werden. B: 1D  $^1\text{H}$ -NMR Spektren des  $\text{G}_5$ -8 Strangs (700 MHz, 683  $\mu\text{M}$ ). Mit der Steigerung der Temperatur war eine deutliche Verbesserung der Auflösung der Signale der Iminoprotonen zu beobachten. C: Vergleich der Iminoregionen bei einer Messung in 10 % und 100 %  $\text{D}_2\text{O}$  bei 328 K. Durch die äußere Lage der Iminoprotonen von  $\text{G}^2$  und  $\text{G}^6$  (Zuordnung siehe Abbildung 5.26) sind diese anfälliger für den Austausch mit den Protonen des Lösungsmittels, was wiederum in der Reduktion der Signale der entsprechenden Protonen resultierte. (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)

Für eine vollständige Zuordnung der Signale wurde eine 2D NOESY des G-Quadruplexes ( $G_5-8$ )<sub>4</sub> eingesetzt. Die folgenden Signale wurden unter der Annahme, dass es sich um einen parallelen und symmetrischen Komplex handelt, erwartet:



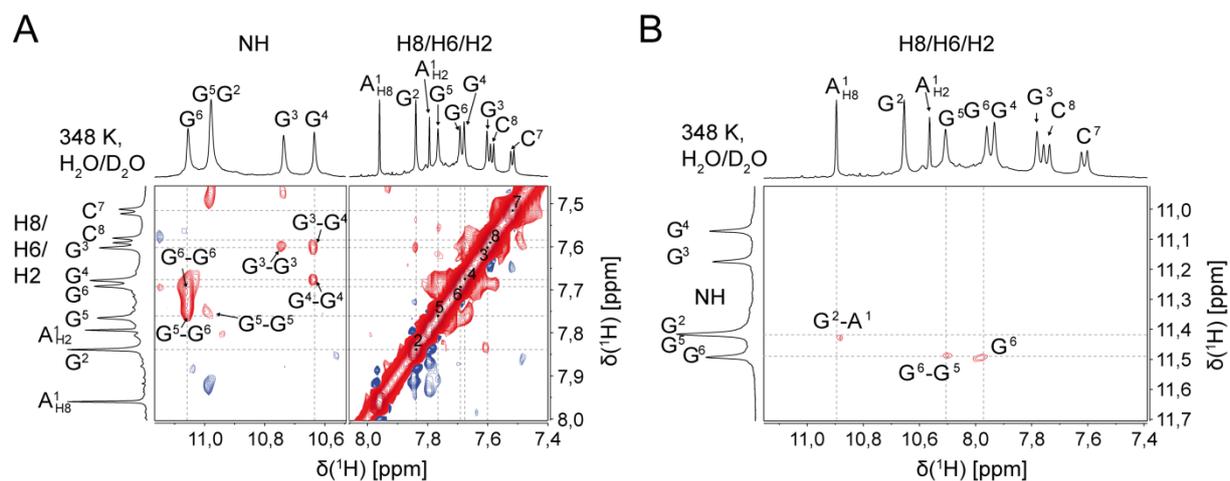
**Abbildung 5.25:** Erwartete Verschiebungen der Protonen bei der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie des Strangs G<sub>5-8</sub>.

Auch in den 2D <sup>1</sup>H-NMR Spektren waren die Signale der Iminoprotonen selbst bei einer Messtemperatur von 328 K deutlich zu erkennen. Somit war eine Zuordnung der Verschiebungen der Iminoprotonen möglich (Abbildung 5.26 A). Dabei basierte die Zuordnung des Signals für G<sup>4</sup> auf dem Austausch mit allen anderen Signalen der Iminoprotonen, da bei der <sup>1</sup>H-NOESY Spektroskopie nur Signale der Protonen mit einer Entfernung von < 6 Å beobachtet werden können.<sup>[201]</sup> Bemerkenswert erschien ebenso der Vergleich der Signale der Iminoprotonen in einer Messung in 100 % D<sub>2</sub>O (Abbildung 5.26 B). Hierbei verschwanden wie erwartet die Signale für G<sup>2</sup> und G<sup>6</sup> aufgrund ihres Protonenaustauschs mit dem Lösungsmittel. Die übrigen Signale für G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> und G<sup>5</sup> verblieben selbst nach 5 h Inkubation bei 348 K. Dies unterstrich wieder die außergewöhnliche Stabilität des Komplexes in D<sub>2</sub>O.



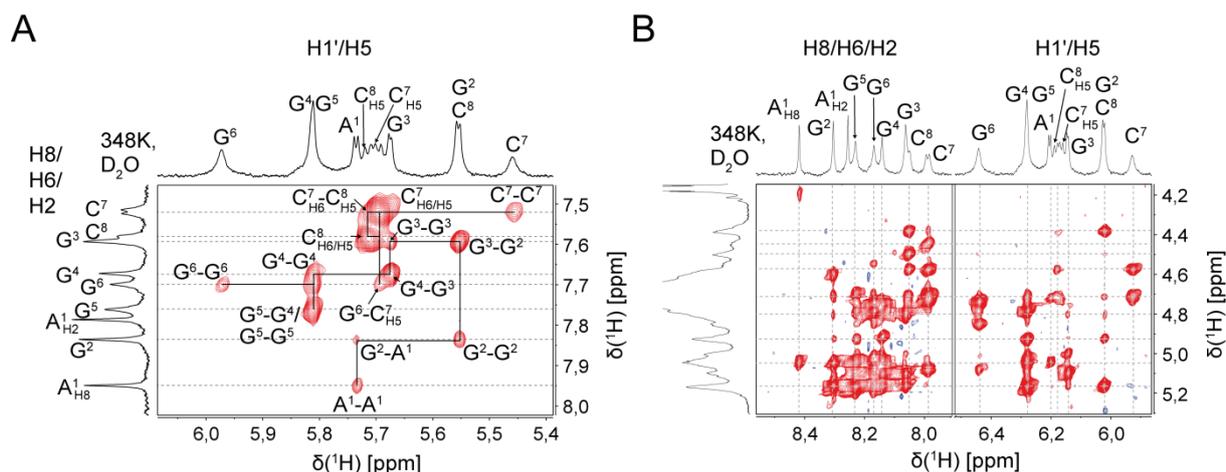
**Abbildung 5.26: 2D  $^1\text{H}$ -NOESY Spektroskopie der Iminoprotonen des  $(\text{G}_5\text{-8})_4$  G-Quadruplexes (683  $\mu\text{M}$ ).** A: Messung der Imino-Region in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9 : 1) mit den fünf Imino-Imino NOE Kreuzpeaks des G-Quadruplexes bei 328 K. B: Imino-Region der NOE Korrelation in  $\text{D}_2\text{O}$  bei 348 K. Die Zuordnung der Signale für  $\text{G}^2$ ,  $\text{G}^3$ ,  $\text{G}^5$  und  $\text{G}^6$  war erst unter der Zuhilfenahme der Spektren aus Abbildung 5.27 möglich. (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)

Der nächste Schritt in der Zuordnung der  $^1\text{H}$ -NOE Kreuzpeaks der Signale der Imino- und aromatischen Protonen zu den aromatischen Signalen der Protonen H6, H8 und H2 der Basen (Abbildung 5.27). Der Austausch der Iminoprotonen mit den Protonen H6/H8/H2 kann entweder innerhalb des Quartets oder mit den Protonen der benachbarten Basen stattfinden. Der Ausgangspunkt war hierbei das bereits für  $\text{G}^4$  bekannte Signal (siehe Abbildung 5.26), wohingegen für die anderen vier Signale der Iminoprotonen eine alternative Zuordnung möglich war. Ausgehend davon wurde auch die Zuordnung des Signals für das  $\text{G}^3$  Iminoproton möglich, da der Protonenaustausch in  $3'-5'$ -Richtung stattfindet (Abbildung 5.27 A).<sup>[198, 202]</sup> Entscheidend war hier der Austausch des  $\text{G}^4$  Iminoprotons mit dem H8 Proton des  $\text{G}^3$ . Denn eine alternative Interaktion mit  $\text{G}^5$  konnte an dieser Stelle ausgeschlossen werden. Ferner konnten Kreuzpeaks für die folgenden Austauschreaktionen erwartet werden: die Selbstaustausche  $\text{G}^6$  NH - H8 ( $\text{G}^6 - \text{G}^6$ ),  $\text{G}^5$  NH - H8 ( $\text{G}^5 - \text{G}^5$ ),  $\text{G}^4$  NH - H8 ( $\text{G}^4 - \text{G}^4$ ),  $\text{G}^3$  NH - H8 ( $\text{G}^3 - \text{G}^3$ ) und  $\text{G}^2$  NH - H8 ( $\text{G}^2 - \text{G}^2$ ) und die benachbarten Austausche  $\text{G}^6$  NH -  $\text{G}^5$  H8 ( $\text{G}^6 - \text{G}^5$ ),  $\text{G}^5$  NH -  $\text{G}^4$  H8,  $\text{G}^4$  NH -  $\text{G}^3$  H8,  $\text{G}^3$  NH -  $\text{G}^2$  H8,  $\text{G}^2$  NH -  $\text{A}^1$  H8. Durch die Kreuzrelationen der Selbstaustausche konnten die Signale der H6/H8/H2 Protonen der Basen  $\text{G}^6$ ,  $\text{G}^5$ ,  $\text{G}^4$  und  $\text{G}^3$  zugeordnet werden (Abbildung 5.27 A,  $\text{G}^6 - \text{G}^6$ ,  $\text{G}^5 - \text{G}^5$ ,  $\text{G}^4 - \text{G}^4$ ,  $\text{G}^3 - \text{G}^3$ ), während keine Kreuzpeaks für den Selbstaustausch von  $\text{G}^2$  gefunden wurden. Die Signale für die benachbarten Austausche  $\text{G}^6$  NH -  $\text{G}^5$  H8 ( $\text{G}^6 - \text{G}^5$ ),  $\text{G}^2$  NH -  $\text{A}^1$  H8 ( $\text{G}^2 - \text{A}^1$ ) sowie  $\text{G}^3$  H8 -  $\text{G}^4$  NH ( $\text{G}^3 - \text{G}^4$ ) und  $\text{G}^5$  H8 -  $\text{G}^6$  NH ( $\text{G}^5 - \text{G}^6$ ) waren gut im  $^1\text{H}$ -NOESY Spektrum erkennbar. Dagegen wurden keine NOE Kreuzpeaks für die Austausche  $\text{G}^5$  NH -  $\text{G}^4$  H8 und  $\text{G}^3$  NH -  $\text{G}^2$  H8 gefunden.



**Abbildung 5.27:** 2D  $^1\text{H}$ -NOESY Spektroskopie der Protonen des aromatischen Bereichs des  $(\text{G}_5\text{-}_8)_4$  G-Quadruplexes ( $683 \mu\text{M}$ ). A und B: NOE Kreuzpeaks der Imino- und aromatischen (H6/H8/H2) Signale bei 348 K. Die Zuordnung der Signale für  $\text{C}^7$  und  $\text{C}^8$  war erst unter der Zuhilfenahme der Spektren aus Abbildung 5.28 möglich. (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)

Die nächste Zuordnung der Signale galt dem Austausch der H6/H8/H2 Protonen mit den H1' der Zuckermoleküle bzw. den H5/H6 Protonen der  $\text{C}^7$  und  $\text{C}^8$  (Abbildung 5.28 A). Ausgehend von dem Kreuzpeak für  $\text{A}^1 \text{H}1' - \text{A}^1 \text{H}8$  konnte der *sequential walk* für die Austauschreaktion der H1' Protonen und den H8 Protonen der benachbarten Base begonnen werden, wobei alle erwarteten Kreuzpeaks gefunden und somit die Signale der H1' Protonen im Bereich zwischen 5,4 und 6 ppm zugeordnet werden konnten. Schließlich erfolgte hier die finale Zuordnung der Signale für  $\text{C}^7$  und  $\text{C}^8$ . Bis dahin war ihre Signalzugehörigkeit ungeklärt. Denn bisherige Spektren konnten sowohl der einen als auch der anderen Gruppe zugeordnet werden. Der Austausch der Gruppen  $\text{G}^6 \text{H}8$  und  $\text{C}^7 \text{H}5$  spielte dabei die entscheidende Rolle. Angefangen mit dem Kreuzpeak für  $\text{G}^6 \text{H}8 - \text{C}^7 \text{H}5$  startete der *sequential walk* in der folgenden Reihenfolge:  $\text{G}^6 \text{H}8 - \text{C}^7 \text{H}5$ ,  $\text{C}^7 \text{H}6 - \text{C}^7 \text{H}5$ ,  $\text{C}^7 \text{H}6 - \text{C}^8 \text{H}5$  und  $\text{C}^8 \text{H}6 - \text{C}^8 \text{H}5$  (Abbildung 5.28 A). Auf der Grundlage der Reihenfolge der Kreuzpeaks konnten selbst in der relativ schwach aufgelösten Region der H1'/H5 Protonen alle Peaks zugeordnet werden. Das Signal für den Selbstaustausch von  $\text{C}^7 \text{H}6 - \text{C}^7 \text{H}1'$  ( $\text{C}^7 - \text{C}^7$ ) komplettierte die Signalzuordnung.



**Abbildung 5.28: 2D  $^1\text{H}$ -NOESY Spektroskopie der  $\text{H}1'$ -Protonen der Zuckermoleküle und der Protonen des aromatischen Bereichs des  $(\text{G}_5\text{-8})_4$  G-Quadruplexes (683  $\mu\text{M}$ ).** A: 2D  $^1\text{H}$ -NOESY Spektrum des  $\text{G}_5\text{-8}$  Strangs in 100 %  $\text{D}_2\text{O}$  bei 348 K. Hier wurden die Korrelationen der aromatischen (H6/H8/H2) und der  $\text{H}1'$  bzw.  $\text{H}5$  Signale gezeigt und zugeordnet. B: Aromatische und  $\text{H}1'$  NOE Korrelation zur Zuckerregion in 100 %  $\text{D}_2\text{O}$  bei 348 K. (Abbildung modifiziert aus<sup>[197]</sup>)

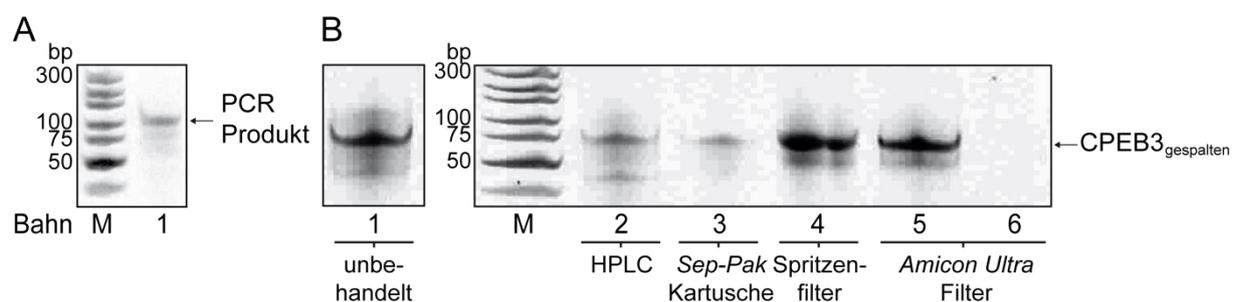
Insgesamt bestätigte sich die vermutete  $(\text{G}_5\text{-8})_4$  G-Quadruplex-Struktur. Diese war selbst bei einer Inkubation bei 348 K während der NOESY Spektrometrie über 5 h stabil und lieferte hoch aufgelöste evaluierbare Signale.

### 5.2.3.2 NMR-spektroskopischer Einblick in die Iminoregion eines gespaltenen CPEB3 Ribozyms

Trotz der außergewöhnlichen Stabilität des Komplexes bleibt die Relevanz dieser Struktur in einem Ribozym in seiner vollen Länge ungeklärt. Um die potentielle Bedeutung eines G-Quadruplexes zu untersuchen, wurde ein Vergleich der 1D  $^1\text{H}$ -NMR Spektren des  $(\text{G}_5\text{-8})_4$  G-Quadruplexes mit dem 1D  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum einer CPEB3 Ribozymsequenz in ihrem bereits gespaltenen Zustand herangezogen ( $\text{CPEB3}_{\text{gespalten}}$ ). Auf diese Weise sollten potentielle G-Quadruplex-Protonen beobachtet werden und somit die Relevanz der G-Quadruplex-Struktur bewertet werden. Zu diesem Zweck musste zunächst eine geeignete Menge an RNA angereichert werden. Die allgemeine Herstellung der RNA Sequenz  $\text{CPEB3}_{\text{gespalten}}$  startete über eine PCR mit den DNA Strängen  $\text{CPEB3}_{\text{gespalten\_FW}}$  und  $\text{CPEB3}_{\text{gespalten\_RV}}$  als Template und  $\text{CPEB3}_{\text{gespalten\_FW}}$  und  $\text{RV}$  Primer (siehe Kapitel 7.2.1). Der PCR-Erfolg wurde mit einer denaturierenden PAGE Analyse in einem 20 % Gel dokumentiert (Abbildung 5.29 A). Der nächste Schritt bestand in der Generierung einer CPEB3 RNA mittels der Transkription mit einer T7 Polymerase (siehe Kapitel 7.2.4). Zur unmittelbar darauf folgenden Aufreinigung des gewünschten Strangs wurde die präparative PAGE Gel Elektrophorese, die Elektroelution und die EtOH-Fällung herangezogen (siehe Kapitel 7.2.15.1, 7.2.5 und 7.2.6). Die schließlich in autoklaviertem MilliQ aufgelösten und vereinigten RNA Pellets zeigten einen deutlichen Niederschlag innerhalb der Lösung. Aufgrund der hohen Salzkonzentration, die für die Elektroelution notwendig ist, wurde vermutet, dass es sich bei dem weißen Niederschlag um

$\text{NH}_4\text{OAc}$  handelt, das der Übersättigung zur Folge in der Lösung wieder ausfiel. Dieser konnte trotz der weiteren Verdünnung nicht aufgelöst werden.

Da eine klare, hochkonzentrierte Probe mit einer Konzentration von mindestens  $200 \mu\text{M}$  für die 1D  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie die Voraussetzung für eine NMR-spektroskopische Messung war, wurden eine Reihe von Filter- bzw. Entsalzmethoden herangezogen. Zunächst wurden alle diese Methoden parallel zueinander getestet und miteinander verglichen (Abbildung 5.29 B). Zur Entfernung grober Partikel in Oligonukleotid-Lösungen wurde eine mit Glaswolle versehene 1 ml Spritze benutzt (siehe Kapitel 7.2.17.5). Die Filtration erfolgte mit autoklaviertem MilliQ und wurde anschließend im Vakuum eingengt. Zur Erhaltung einer möglichst reinen, Salz-freien Lösung für die 1D  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie wurden ferner zum einen die HPLC und zum anderen *Sep-Pak*-Kartuschen und *Amicon*<sup>®</sup> *Ultra* Filter (10 K) (siehe Kapitel 7.2.17.1, 7.2.17.2 und 7.2.17.3) eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Methoden wurden in einer PAGE Analyse in einem denaturierenden 20 % Gel dokumentiert und mit einer nicht behandelten Probe des  $\text{CPEB3}_{\text{gespalten}}$  Strangs verglichen. In der Abbildung 5.29 B ist in allen Fällen deutlich eine Bande mit einer Länge zwischen 75 und 50 nt zu erkennen, was der erwarteten Länge der gewünschten RNA von 68 nt entsprach. Vorteilhaft war ferner die Beobachtung, dass der Spritzen-Filter zur Entfernung grober Partikel in einer Oligonukleotid-Lösung nicht mit einem großen Verlust an RNA einherging. Doch obwohl diese Methode eine weitgehend klare Lösung lieferte, enthielt diese einen hohen im Absorptionsspektrum sichtbaren Salzanteil. Aus diesem Grund bestand der nächste Schritt in einer Entsalzung mittels eines *Amicon*<sup>®</sup> *Ultra* Filters (Bahn 5 und 6) und lieferte im Vergleich zur Aufreinigung mittels der HPLC oder einer *Sep-Pak* Kartusche eine erhöhte Bandenintensität in der PAGE Analyse. Zwar bot die HPLC den Vorteil einer gründlichen Entsalzung der  $\text{CPEB3}_{\text{gespalten}}$  RNA. Die PAGE Analyse zeigte jedoch einen deutlichen Verlust an RNA nach der Prozedur (Bahn 2). Demnach wäre die HPLC als Methode zur Anreicherung von RNA mit einem hohen Schwinden der Endausbeute verbunden gewesen. Hinzu kam die Ausbildung einer heterogenen Struktur, die sich in zwei Banden zeigte, innerhalb der Probe nach einer HPLC Aufreinigung. Die *Sep-Pak* Kartusche zeigte eine einheitliche Struktur innerhalb der Probe (Bahn 3), ging jedoch ebenfalls mit einem hohen Verlust an RNA einher. In der Nutzung der

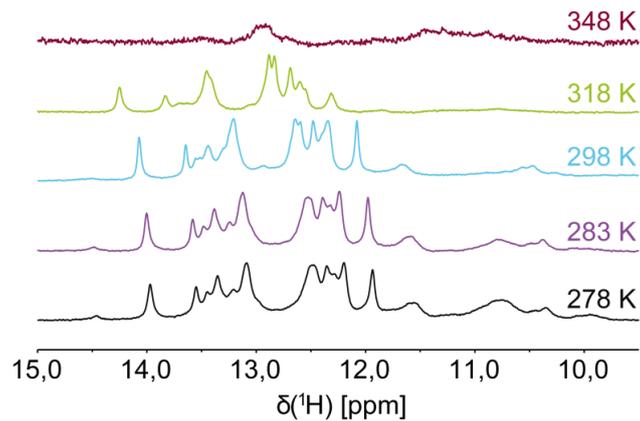


**Abbildung 5.29: Anreicherung des RNA Strangs  $\text{CPEB3}_{\text{gespalten}}$ .** A: Kontrolle des PCR-Produkts zur Erzeugung eines Templatstrangs zur Synthese der RNA  $\text{CPEB3}_{\text{gespalten}}$  über eine T7 Transkriptionsreaktion. B: Ermittlung einer geeigneten Entsalz-Prozedur des  $\text{CPEB3}_{\text{gespalten}}$  Strangs nach der EtOH Fällung. Als Methoden wurden die HPLC (Bahn 2), eine *Sep-Pak* Kartusche (Bahn 3), ein Spritzenfilter (Bahn 4) und ein dazu anschließender Schritt mit einem *Amicon*<sup>®</sup> *Ultra* Filter (Bahn 5) mit dem unbehandelten  $\text{CPEB3}_{\text{gespalten}}$  Strang verglichen. Zur Kontrolle des Schrittes mit dem *Amicon*<sup>®</sup> *Ultra* Filter wurde ebenso das Filtrat getestet (Bahn 6).

HPLC und einer *Sep-Pak* Kartusche würde die Menge der RNA CPEB3<sub>gespalten</sub> für die NMR Spektroskopie nicht ausreichen. Daher wurde für das weitere Verfahren nach der EtOH Fällung die Filtration der groben Partikel aus der RNA Lösung mit einer anschließenden Entsalz-Prozedur mit einem *Amicon*<sup>®</sup> *Ultra* Filter gewählt. Auf diese Weise wurden insgesamt 110 nmol an RNA angereichert, was für eine Probe mit einer finalen Konzentration von 440 µM für eine 1D <sup>1</sup>H-NMR Messung ausreichend war.

Schließlich wurde die Probe für die 1D <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie in der üblichen, zuvor mit dem Strang G<sub>5-8</sub> genutzten Pufferkonzentration gemischt und für 30 min bei 95 °C inkubiert um eine möglichst homogene Faltung von möglichen Strukturen zu erlauben (siehe Kapitel 7.2.19). In einer Reihe von temperaturabhängigen 1D <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen sollten Hinweise auf eine potentielle alternative Faltung in Form eines G-Quadruplexes in Kontrast zur klassischen Assemblierung des aktiven transspaltenden CPEB3 Ribozyms gesammelt werden. Erste 1D <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden bei 298 K aufgenommen und evaluiert (Abbildung 5.30, hellblau). Das 1D <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigte wie erwartet Signale in der Region der Watson-Crick-Basenpaarung (12 und 14 ppm). Diese blieben bei den niedrigeren Temperaturen von 283 und 278 K (lila und schwarz) unverändert. Dagegen verhielten sich diese bei einer Steigerung der Messtemperatur von 318 und 348 K (hellgrün und rot) instabil. Deutlich war eine Rückentwicklung der Protonensignale in den besagten <sup>1</sup>H-NMR-Spektren zu beobachten, was auf die Entfaltung der vorherrschenden Struktur von CPEB3<sub>gespalten</sub> hindeutete. Dieser Effekt wurde als die Folge einer Hitzedenaturierung der Watson-Crick-Basenpaarungen gedeutet. Bei der Betrachtung der Iminoprotonen-typischen Region zwischen 10 und 12 ppm konnten keine deutlichen Peaks beobachtet werden. Zwar waren breite Signale bei von Temperaturen 278, 283 und 298 K detektierbar. Jedoch waren diese im Vergleich zu den Signalen der Watson-Crick-Basenpaarungen undefinierbar und schwach. Diese Beobachtung deutete eher auf die vorherrschende Präsenz einer klassischen Faltung des CPEB3 Ribozyms. Auch bei einer Steigerung der Messtemperatur zu 318 und 348 K (hellgrün und rot) konnte kein Effekt der Struktur-Einheit beobachtet werden, wie es zuvor mit dem G<sub>5-8</sub> Strang der Fall gewesen war (siehe Kapitel 5.2.3.1). Stattdessen verschwanden die Signale zusammen mit den Verschiebungen der Watson-Crick-Basenpaarungen, was ebenso den Effekt der Hitzedenaturierung zugeschrieben wurde.

Folglich konnte hiermit keine relevante G-Quadruplex-ähnliche Faltung im CPEB3<sub>gespalten</sub> Strang nachgewiesen werden. Innerhalb seiner nativen Sequenz favorisiert das CPEB3 Ribozym vermutlich seine Watson-Crick-Basenpaar-basierte Struktur. Eine G-Quadruplex-Struktur aus vier CPEB3<sub>gespalten</sub> Strängen, wie sie in dem außergewöhnlich stabilen (G<sub>5-8</sub>)<sub>4</sub> Komplex beobachtet wurde, konnte vermutlich aufgrund der sterischen Hinderung der Sequenzreste nach dem G<sub>5</sub>-Fragment nicht ausgebildet werden. Höchstwahrscheinlich entspricht dieser Effekt ebenso der Situation *in vivo*. Eine Faltung in eine spaltungsaktive doppelte Pseudoknoten-Struktur wurde aufgrund des Fundes von Spaltungsprodukten bestätigt, während für eine G-Quadruplex-Struktur im CPEB3 Ribozym in bisherigen Studien keinerlei Hinweise gefunden wurden.<sup>[67, 70, 71]</sup>



**Abbildung 5.30: 1D <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchung des RNA Strangs CPEB3<sub>gespalten</sub>.** Die Spektren wurden mit einer RNA Konzentration von 200 μM in 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM KCl, pH 6,2 in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9 : 1) gemessenen (500 MHz). Mit einer steigenden Temperatur verringerte sich die Peak-Intensität, was als eine Entfaltung jeglicher Struktur der RNA durch Hitzedenaturierung gedeutet wurde.

Insgesamt lieferten diese neuen Einblicke in die Struktur des CPEB3 Ribozyms neue Erkenntnisse zu potentiellen bisher nicht berücksichtigten strukturellen Eigenschaften des CPEB3 Ribozyms. Aufgrund der außergewöhnlichen Stabilität der G-Quadruplex-Struktur legen die Untersuchungen in dieser Arbeit nahe, dass der untersuchte G-Quadruplex möglicherweise eine Rolle in der Funktionsweise des CPEB3 Ribozyms übernimmt.

## 6 Schlussfolgerungen und Ausblick in zukünftige Studien

### 6.1 Sammlung kinetischer Daten zum CPEB3 Ribozym

#### 6.1.1 Untersuchung des Spaltungsmechanismus mit der Beteiligung des Mg<sup>2+</sup> und C<sub>57</sub>

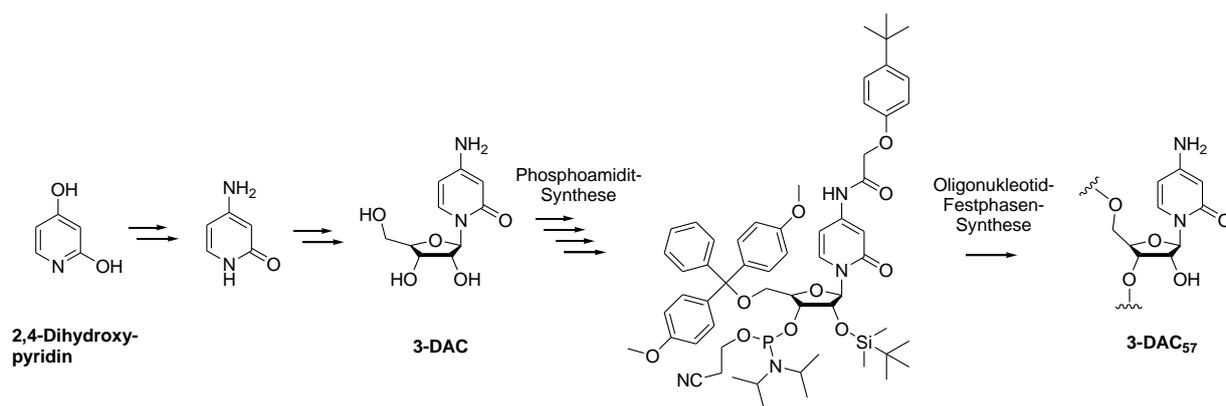
Trotz der Einzigartigkeit des CPEB3 Ribozyms in einer Vielzahl von Säugern bleibt dessen Funktion im Organismus und damit die Beteiligung von Ribozymen an der Genregulation in Säugern bzw. auch dem Menschen bis heute ungeklärt. Frühere Studien befassten sich mit Untersuchungen des Spaltungsmechanismus, der Strukturaufklärung und der potentiellen Rolle *in vivo*.<sup>[67-71, 76]</sup> Nichtsdestotrotz verblieb die Klärung einiger dieser wichtigen Gesichtspunkte bis heute eine experimentelle Aufgabe für die Zukunft. Um dieser den Weg zu ebneten, diente diese Arbeit der Sammlung von charakterisierenden *in vitro* Daten zum Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms. Diese Aufgabe stand bisher vor dem Problem, dass die Erfassung der realen Spaltungsaktivität aufgrund des Kontakts mit Mg<sup>2+</sup>, das für alle Schritte der Gewinnung einer reinen RNA für eine Untersuchung notwendig ist, nur bedingt möglich war.<sup>[69]</sup> Jedoch bestand bereits für das HDV Ribozym die Möglichkeit, die Ribozym-Sequenz in drei<sup>[178, 179, 203]</sup> oder zwei kürzere<sup>[55, 65]</sup> Stränge aufzuteilen und ein transspaltendes Ribozym *in vitro* zu rekonstruieren. Für das CPEB3 Ribozym sollte diese Methode in dieser Arbeit als eine alternative Route ohne den Kontakt des Ribozyms mit Mg<sup>2+</sup> eingesetzt werden. Dabei handelte es sich um eine Aufspaltung in zwei RNA Stränge, die sich *in vitro* zum transspaltenden Ribozym rekonstruieren lassen. Tatsächlich gelang eine erfolgreiche Etablierung dieser Methode, was ebenfalls eine mit den Literaturwerten vergleichbare Spaltungsrate des Ribozyms zeigte. Jedoch konnte auf diese Weise die Problematik der Anfälligkeit des CPEB3 Ribozyms zur Fehlfaltung *in vitro* nicht überwunden werden. Trotz der Eliminierung der Spaltungsaktivität vor der kinetischen Untersuchung verblieb eine große nicht spaltbare Fraktion nach der Zugabe von Mg<sup>2+</sup> (siehe Kapitel 5.1.2). Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass das CPEB3 Ribozym unter den genutzten Bedingungen nicht vollständig die optimale spaltungsrelevante Faltung erreichte. Diese konnte mithilfe alternativer Ionen Mn<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> erfolgen (siehe Kapitel 5.1.5.2.2). Somit stellte die Entwicklung des Spaltungsassays mit einem rekonstruierten transspaltenden CPEB3 Ribozym im Rahmen dieser Arbeit einen wichtigen Beitrag in dessen Erforschung dar. Denn auf diese Weise gelang der Zugang zur Charakterisierung des Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms im Hinblick auf Mutationsexperimente, die pH-Abhängigkeit der Spaltungsreaktion und das Verhalten des Ribozyms in Gegenwart von alternativen Ionen bis hin zu seiner fast vollständigen Faltung.

Aus früheren Studien gab es bereits den Nachweis des C<sub>57</sub> als essentielle spaltungsaktive Base im Mechanismus.<sup>[16, 67]</sup> Für das CPEB3 Ribozym existierten bisher keinerlei Studien mit einer C<sub>57</sub>U Mutante und einer erfolgreich nachgewiesenen Wiederherstellung der Spaltungsaktivität durch Imidazol, wie es bereits für das antigenomische HDV Ribozym erfolgreich demonstriert wurde.<sup>[57]</sup> Das mit Cytosin strukturell verwandte, jedoch einfachere aufgebaute Imidazol stellte den alternativen Lieferanten der für den Spaltungsmechanismus erforderlichen N3-Gruppe im Cytosin dar. Die Wiederherstellung der Aktivität der

spaltungsinaktiven C<sub>76</sub>U HDV Mutante bestärkte den Verdacht der Involvierung der N3-Gruppe im C<sub>76</sub>. Auch für die zwei-strängige C<sub>57</sub>U CPEB3 Ribozym Mutante wurde in dieser Arbeit erstmals eine Wiederherstellung der Spaltungsaktivität bei einem Imidazol-Überschuss (200 mM) ermittelt (siehe Kapitel 5.1.3). Diese Eigenschaft bestärkte die Beteiligung der N3-Gruppe an dem Spaltungsmechanismus. In zukünftigen Bemühungen können Experimente mit freiem Cytosin bei wechselnden pH-Werten, die möglicherweise eine Auswirkung auf die korrekte Faltung des CPEB3 Ribozyms haben, zur weiteren Bestätigung des Mechanismus der Wiederherstellung der Spaltungsaktivität beitragen.

Weiter war auch die Untersuchung der pH-Abhängigkeit in dieser Arbeit ein Schwerpunkt in der Charakterisierung des CPEB3 Ribozyms. Da ein Säure-Base-Mechanismus für Spaltung vermutet wird, kann die Steigung der Spaltungsraten im pH-Profil des Ribozyms angefangen bei einem niedrigem pH in diesem Modell durch die Deprotonierung der Base erklärt werden (siehe Kapitel 5.1.4). Die Formation eines Plateaus setzt dann mit der Deprotonierung der Säure ein. Auf diese Weise kommt ein Glocken-ähnlicher Kurvenverlauf zustande. In diesem Fall werden für die Reaktion zwei ionisierbare Gruppen vermutet und zwei *pKa*-Werte beobachtet. Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Spaltungsreaktion ergab tatsächlich eine Glocken-ähnliche Kurve mit den zwei *pKa*-Werten  $5,5 \pm 0,1$  für die Säure und  $6,7 \pm 0,1$  für die Base. Offensichtlich handelte es sich also hierbei um zwei ionisierbare Gruppen, bei der C<sub>57</sub> beteiligt ist. Die weitere ionisierbare Gruppe bleibt, wie beim HDV Ribozym, unbekannt. Das HDV Ribozym besitzt eine weitere pH-abhängige Gruppe, C<sub>41</sub>, dessen Protonierung indirekt mit dem Spaltungsmechanismus gebracht wurde. Auch das CPEB3 Ribozym besitzt ein C an einer analogen Position (C<sub>39</sub>). Trotzdem konnte im Rahmen dieser Arbeit keine derartige Rolle des C<sub>39</sub> nachgewiesen werden. Für zukünftige Studien stellt die Ermittlung der zweiten ionisierbaren Gruppe im CPEB3 Ribozym eine wichtige Information in der Klärung des Spaltungsmechanismus dar. In einer Reihe von Mutationsexperimenten mit unnatürlichen Nucleosiden mit unterschiedlichen *pKa* um die Spaltungsposition bei gleichzeitiger Beobachtung des Spaltungsverhaltens bei den pH-Werten von 5 bis 9 können weitere Daten zu einer potentiellen weiteren ionisierbaren Gruppe gesammelt werden.

Ebenso verblieb die atomare Auflösung des Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms als Charakteristikum ein ungeklärtes Phänomen. Insbesondere die Proton-akzeptierende Rolle von N3 im C<sub>57</sub> muss bis heute geklärt werden. Diesem Ansatz können wichtige essentielle Informationen zur Bestätigung und endgültigen Klärung des Spaltungsmechanismus entnommen werden. Eine Möglichkeit die Involvierung des Stickstoffatoms in den Mechanismus des Ribozyms zu belegen, ist der Einsatz einer unnatürlichen Nucleobase an der Position 57. Hierbei handelt es sich um 3-Deaza-Cytosin (3-DAC), das an der Ringposition 3, anders als Cytosin, kein Stickstoffatom aufweist (Abbildung 6.1). Das 3-DAC kann ausgehend von 2,4-Dihydropyridin synthetisiert werden. Dabei wird durch ein Benzylamin die Einführung einer Aminogruppe an Position 4 erzielt. Die Nucleosid-Erzeugung kann durch eine Vorbrücken-Reaktion vonstattengehen.<sup>[172, 204]</sup> Über mehrere Schritte kann ein Phosphoamidit-Baustein, der über die automatisierte Festphasensynthese zur Generierung eines CPEB3 Ribozym RNA Oligonucleotids genutzt werden kann, erzeugt werden.



**Abbildung 6.1: Synthese der unnatürlichen Base 3-DAC<sub>57</sub> ausgehend von 2,4-Dihydroxypyridin.** Das Fehlen des Stickstoffatoms im spaltungsessentiellen Cytosin kann in zukünftigen Studien dessen Involvierung im Spaltungsmechanismus belegen. Die Einführung einer Aminogruppe kann durch ein Benzylamin erfolgen. Die Nukleosid-Synthese zu 3-DAC ist durch die Vorbrücken-Reaktion möglich.<sup>[172, 204]</sup> Nach einer Phosphoamidit-Synthese kann 3-DAC in einer automatisierten Oligonukleotid-Festphasensynthese in das CPEB3 Ribozym eingebaut werden.

In zukünftigen Studien können mit dem eingebauten 3-DAC<sub>57</sub> mehr Informationen zum Einbezug des N3 in den Spaltungsmechanismus gewonnen werden. Des Weiteren können mit dem 3-DAC<sub>57</sub> modifizierten CPEB3 Ribozym die Mg<sup>2+</sup>- und pH-Abhängigkeit neu bewertet und mit dem rekonstruierten WT Ribozym verglichen werden. Die gesammelten Daten können zur Klärung des Säure-Base-Mechanismus beitragen sowie die Rolle des C<sub>57</sub> als Säure im Mechanismus festigen. Zusätzlich kann die Synthese für weitere Modifikation von C<sub>57</sub> sowie weiteren Basen innerhalb der Ribozym-Sequenz eingesetzt werden. Durch die Unterteilung des Ribozyms in zwei kurze Stränge und der Rekonstruktion eines transspaltenden CPEB3 Ribozyms ist der automatisierte Einbau modifizierter Basen in die Sequenz ein realistisches Unterfangen voller Möglichkeiten zum Informationsgewinn zur Funktionsweise des CPEB3 Ribozyms.

Aus der früheren Charakterisierung des HDV Ribozyms wurde auch eine Spaltungsaktivität ohne Mg<sup>2+</sup> beobachtet. Ebenso ließ sich Mg<sup>2+</sup> als Metall durch alternative divalente Ionen, wie Ba<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> Cu<sup>2+</sup> und insbesondere Ca<sup>2+</sup> in der Spaltungsreaktion ersetzen.<sup>[64]</sup> Auch für das CPEB3 Ribozym stellte sich die Frage, ob ein ähnliches Verhalten bei dem Gebrauch anderer Ionen als Mg<sup>2+</sup> in der Reaktion aufkommen würde. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Ionen und deren spaltungsinitierender Effekt auf das rekonstruierte zwei-strängige Ribozym *in vitro* getestet. Es konnte kein Mg<sup>2+</sup>-konzentrationsabhängiger Effekt auf die Spaltungsgeschwindigkeit festgestellt werden. Der nächste Schritt war die Evaluierung des Ribozyms auf seine Aktivität in Gegenwart von K<sup>+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup> im Vergleich zu Mg<sup>2+</sup>. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass Sr<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> eine höhere gespaltene Fraktion erzeugten als Mg<sup>2+</sup>, obwohl sie nicht die Spaltungsgeschwindigkeit verbesserten. Insbesondere Mn<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> erweckten aufgrund ihres Vorkommens *in cellulo* in Form von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen Interesse. Beiden Ionen wurde aufgrund des überraschend hohen Anteils an gespaltener Fraktion ein besonders faltungsfördernden Effekt zugesprochen. Dieser Befund veranlasste weitere Untersuchungen mit diesen Ionen.

Anders als bei  $Mg^{2+}$ , konnte in pH-abhängigen Messungen kein Zusammenhang identifiziert werden. Dagegen zeigte sich sowohl für  $Mn^{2+}$  als auch  $Zn^{2+}$  ein konzentrationsabhängiger Effekt mit einer Sättigung. Aufgrund dieser Informationen konnten erste Vermutungen zu den Ursachen der beobachteten Phänomene aufgestellt werden. Da weder  $Mn^{2+}$  noch  $Zn^{2+}$  eine Geschwindigkeitssteigerung *in vitro* aufwiesen, erschien eine Substitution von  $Mg^{2+}$  am Spaltungsort als unwahrscheinlich. Eher wurde die Möglichkeit eines faltungsfördernden Subjekts mit der Beteiligung von  $Mn^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$  in gebundener Form als Cofaktoren oder prosthetische Gruppen *in vivo* in Betracht gezogen. Unter diesem Aspekt verbliebe  $Mg^{2+}$  essentiell für die Spaltung, würde jedoch mithilfe von weiteren Faktoren, die die korrekte Faltung steigern würden, zur Optimierung der Reaktion führen. Eine solche Möglichkeit wurde weder für das HDV Ribozym noch für das CPEB3 Ribozym in Betracht gezogen.

Um dieser Möglichkeit nachzugehen diente in dieser Arbeit eine Reihe von Experimenten mit Ionen-Mixturen. Derartige Experimente fehlen in bisherigen Ribozym Studien. Zur Simulation von gebundenen Ionen wurden  $Mn^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  in einem Überschuss im Vergleich zu einer *in cellulo* Situation (0,1 - 10 mM) eingesetzt und mit der Aktivität zu den isolierten Ionen verglichen. Lediglich die äquimolaren Mengen des Gemisches an  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  führten zu einer Steigerung der gespaltenen Fraktion. Bei  $Zn^{2+}$  jedoch konnte keine Verbesserung des Anteils der gesamten gespaltenen Fraktion herbeigeführt werden. Insgesamt führte also  $Zn^{2+}$  allein zu dem höchsten Anteil der gespaltenen Fraktion. Diese Beobachtungen schürten wieder die Vermutung, dass das CPEB3 Ribozym möglicherweise die Spaltung aufgrund einer zweiten ionisierbaren Gruppe innerhalb seiner Sequenz auf der Grundlage der korrekten räumlichen Faltung bewerkstelligen kann. In zukünftigen Studien muss dieser These dringend nachgegangen werden. Zum einen können auch hier Mutationsexperimente verschiedener Basen in der CPEB3 Ribozym Sequenz in Verbindung mit der Bewertung der Reaktivität mit  $Mn^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  einen großen Beitrag zu dieser Fragestellung leisten. Zum anderen bräuchte die Klärung der Kristallstruktur sowohl in strukturellen als auch in mechanistischen Fragen Licht in Dunkel der Charakterisierung des CPEB3 Ribozyms. Erste Versuche zur Kristallisierung der gespaltenen Version des CPEB3 Ribozyms wurden im Rahmen dieser Arbeit unternommen, lieferten jedoch keine Kristalle, mutmaßlich aufgrund der heterogenen Struktur und der allgemeinen Faltungsproblematik des Strangs. Zu einer Stabilisierung der tertiären Struktur könnten auch hier Mutationen dienen. Beispielsweise könnte der Austausch  $U_{36}C$  zu einer Stabilisierung des Stammes P1 beitragen. Weitere Mutationen mit Stabilisierungscharakter müssen in einer experimentellen Reihe ermittelt werden.

Nach einer abgeschlossenen Charakterisierung des CPEB3 Ribozyms stellt sich für zukünftige Studien die Frage nach der Funktionsweise des CPEB3 Ribozyms *in vivo*. Trotz der Trägheit der korrekten Faltung und somit Spaltung des Ribozyms *in vitro* sprechen die Ergebnisse aus bisherigen Studien für eine Spaltung *in vivo* und eine Relevanz der Spaltungsgeschwindigkeit für zelluläre Prozesse. Mithilfe von ESTs wurden in einer früheren Studie von Salehi-Ashtiani *et al.* Spaltungsprodukte des Ribozyms in Maus- Opossum- und humanen Gewebe gefunden. Ferner wurde mithilfe der RT-PCR-Analyse Spaltungseffizienzen von bis zu 50 % im Hirngewebe beobachtet.<sup>[67]</sup> Warum also spaltet das Ribozym *in vivo*, obwohl die *in vitro* ermittelte Spaltung für zelluläre Verhältnisse eine vernachlässigbare Geschwindigkeit

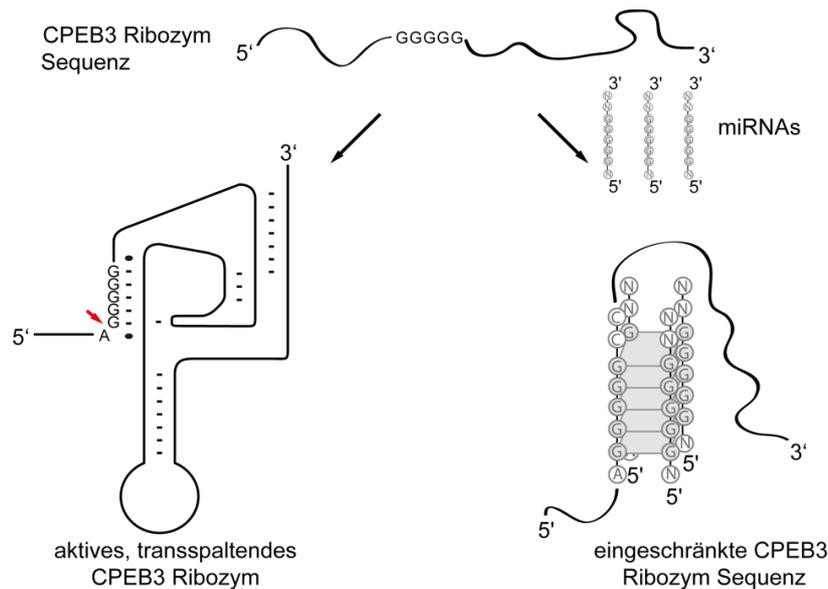
demonstrierte? Unter diesem Gesichtspunkt musste der gesamte regulatorische Charakter innerhalb des Ribozyms selbst, die Existenz weiterer regulatorischer Elemente sowie die Bedingungen innerhalb einer Zelle in Betracht gezogen werden. Nach dem heutigen Wissenstand ist das CPEB3 Ribozym in der Lage eine schnelle Spaltung durchzuführen. Diese Eigenschaft wird in co-transkriptionalen Studien von Bevilacqua<sup>[69, 175]</sup> ebenso wie innerhalb der vorliegenden Arbeit demonstriert. Ein Großteil des Ribozyms jedoch verbleibt *in vitro* in einer spaltungsungünstigen oder gar -unfähigen Faltung. Ferner konnte der reaktionsfördernde Effekt von einer kompakteren Umgebung bereits in Studien mit molekularen Crowdern nachgewiesen werden. Bevilacqua *et al.* wiesen dabei den reaktionsfördernden Effekt einer kompakteren Umgebung, die durch Polymere mit einem hohen Molekulargewicht, beispielsweise PEG200, PEG8000 und Dextran, entsteht und somit die Situation *in cellulo* nachahmt, nach.<sup>[76]</sup> Weitere regulatorische Elemente innerhalb eines zellulären Systems waren bisher kein Gegenstand der Erforschung des CPEB3 Ribozyms. Aus diesem Grund wurde sich in der vorliegenden Arbeit um eine Involvierung weiterer spaltungsfördernder Faktoren als potentielle Beiträge zum Gesamtmechanismus bemüht. Die Grundlage dafür lieferte die in dieser Arbeit entdeckte Fähigkeit des CPEB3 Ribozyms in Gegenwart von anderen divalenten Metall-Ionen zu spalten (siehe Kapitel 5.1.5). Insbesondere die Bereitschaft des Ribozyms sich in Gegenwart von  $Mn^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  in eine spaltungsfördernde Konformation zu begeben, sodass nahezu eine vollständige Spaltung der Ribozymfraktion beobachtet wurde, überraschte positiv. Die entscheidende Rolle von  $Mg^{2+}$  jedoch wurde nicht in Frage gestellt, da die Reaktionsgeschwindigkeit bei diesen beiden Ionen sich nicht signifikant verbesserte. Eine weitere Möglichkeit zur Involvierung dieses Phänomens ist die Teilnahme mehrerer Agenten mit den genannten Ionen in Form von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen. Die in dieser Arbeit ausgewerteten Experimente mit den Ionenmischungen aus  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  bzw.  $Mg^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  lieferten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Diese These verbleibt jedoch ein Forschungsfeld mit einem großen Potential für zukünftige Experimente und Herangehensweisen zur weiteren Charakterisierung des CPEB3 Ribozyms. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass auch *in vivo* natürliche RNA Modifikationen ein oft beobachtetes Phänomen darstellt und auch für das CPEB3 Ribozym durchaus eine Rolle spielen kann.

Ferner besteht die Herausforderung der Klärung der faltungsfördernden zellulären Elemente für künftige Studien weiterhin. Um diesen Umstand auf den Grund zu gehen, besteht die Möglichkeit zur Extraktion der unbekanntenen Elemente. Bei potentiellen Bildungspartnern kann eine Verbindung einer kinetischen Untersuchung des *in vitro* generierten zwei-strängigen Ribozyms mit einem Zellysat, in dem vor der Reaktion die RNase-Aktivität eliminiert werden muss, Auskunft über die Effekte der Mischung auf die Aktivität geben. Im nächsten Schritt können an das CPEB3 Ribozym gebundenen Elemente identifiziert werden. Dazu steht eine Bandbreite der Standard-Methoden zur Identifizierung von Proteinen und Oligonukleotiden zur Verfügung. Auf diese Weise könnten weitere Informationen zum Ribozym gesammelt und eine Grundlage zur Klärung der Frage nach dessen potentieller Bedeutung geschaffen werden.

## 6.2 Regulation oder nicht - die potentielle Rolle eines stabilen G-Quadruplexes im CPEB3 Ribozym

Ebenso wie die Involvierung anderer Faktoren in den Mechanismus des CPEB3 Ribozyms fehlen bis heute Hinweise auf regulatorische Elemente. Im CPEB3 Ribozym existiert eine G-reiche Sequenz mit fünf aufeinander folgenden Guaninen in der P1 Helix. Bisherige strukturelle Studien berichten nicht über den Effekt dieser Sequenz auf das CPEB3 Ribozym.

Die ausgeprägte Stabilität des G<sub>5</sub>-16-Aggregats veranlasste eine Reihe von Studien zur Klärung der Existenz eines G-Quadruplexes in der CPEB3 Ribozym Sequenz. Mittels einer Bandbreite von Methoden wurde die G-Quadruplex-Struktur detailliert untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass das 5'-AG<sub>5</sub>CC-3'-Motiv ein symmetrisches, parallel-strängiges Tetramer auszubilden vermag. Dieser Komplex konnte, sofern er in Berührung mit K<sup>+</sup>- oder NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen in Kontakt trat, nur schwer mit herkömmlichen Mitteln wie denaturierende PAGE, RNase T1 Verdau oder diverse Entsalzmethoden aufgelöst werden (siehe Kapitel 5.2.1 und 5.2.2). Die Notwendigkeit von fünf konsekutiven Guaninen wurde in den CD spektroskopischen Aufnahmen und PAGE Gel Experimenten nachgewiesen (siehe Kapitel 5.2.2 und 5.2.3). NMR-spektroskopische Experimente wiesen eindeutig die Bildung eines parallelen tetramolekularen G-Quadruplexes bestehend aus dem 5'-AG<sub>5</sub>CC-3'-Motiv nach (siehe Kapitel 5.2.3.1). Mittels der 1D und 2D <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie war die vollständige Zuordnung der Signale möglich. Außergewöhnlich war ferner nochmals die Stabilität des G-Quadruplexes aus vier G<sub>5</sub>-8 Strängen, denn sogar bei Temperaturen von 95 °C zeigten sich die charakteristischen Signale der Iminoprotonen, die die Anwesenheit eines G-Quadruplexes belegten. In 1D <sup>1</sup>H-NMR Spektren des gespaltenen CPEB3 Ribozyms in seiner vollen Länge jedoch konnten keine für G-Quadruplex-Strukturen typischen Signale der Iminoprotonen detektiert werden. Die parallele, tetramolekulare Struktur, die durch den G<sub>5</sub>-8 Strang gebildet wurde, konnte in Studien mit dem CPEB3 Ribozym demnach nicht reproduziert werden. Dies erschien jedoch nicht überraschend, da ein G-Quadruplex aus vier CPEB3 Ribozym Sequenzen einer enormen sterischen Behinderung begegnen würde. Frühere strukturelle Studien mit der Hauptstämmen P1, P2 und P4 konnten im P1 Stamm keine Hinweise auf einen G-Quadruplex identifizieren.<sup>[70]</sup><sup>71)</sup> Zusammen mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen sprach nichts für eine stabile alternative G-Quadruplex-haltige Struktur aus CPEB3 Ribozym Sequenzen allein *in vivo*. Vielmehr konnte davon ausgegangen werden, dass die klassische Faltung des spaltungsaktiven CPEB3 Ribozyms mit einer G-C-Basenpaarung in der P1 Helix einherging. Gleichzeitig wurden in dieser Arbeit Hinweise auf eine Faltungsspezies, bei der eine Spaltung des CPEB3 Ribozyms nicht möglich war, bestärkt.<sup>[69]</sup> Insgesamt erschien die Sequenz des Ribozyms als anfällig für Fehlfaltung in Experimenten *in vitro*. Daher lag eine Existenz von regulierenden Einheiten *in vivo* nahe. Die Aggregation von vier voneinander unabhängigen CPEB3 Ribozym Sequenzen zu einem G-Quadruplex konnte in dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz war eine Involvierung des G-Quadruplexes in einen Regulationsmechanismus des Ribozyms in Form von kurzen RNA Sequenzen wie beispielsweise miRNAs, die zusammen mit dem Ribozymstrang einen Komplex bilden könnten, denkbar (Abbildung 6.2). Diese Vermutungen erweisen sich jedoch nach dem aktuellen Stand der Dinge als hochspekulativ und bedürfen weitere Studien mit einer vollen



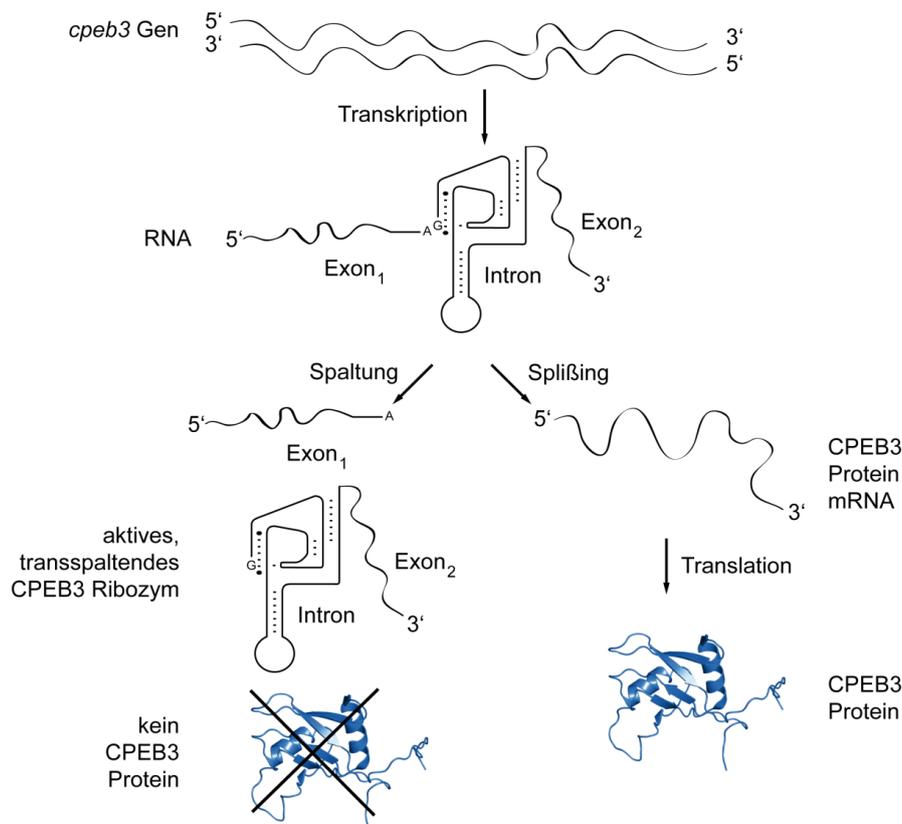
**Abbildung 6.2: Potentieller Regulationsmechanismus des CPEB3 Ribozyms auf der Grundlage eines G-Quadruplexes.** Die CPEB3 Ribozym Sequenz kann entweder in eine aktive, transspaltende Form gefaltet werden. Alternativ dazu kann die CPEB3 Sequenz zusammen mit kurzen G-reichen Sequenzen zu einem stabilen G-Quadruplex ausgebildet. Dieser Mechanismus verbleibt jedoch hochspekulativ und muss detailliert untersucht werden.

CPEB3 Ribozym Sequenz. Um diese Möglichkeit zur Regulation des Ribozyms zu untersuchen, steht eine Reihe von Herangehensweisen zur Verfügung. Ein erster Schritt zur Klärung wäre die Hybridisierung des G<sub>5-8</sub> Strangs mit einer Sequenz des P1 Stamms. Die dabei gebildeten potentiellen Komplexe könnten anhand von denaturierender und nativer PAGE, der CD und NMR Spektroskopie identifiziert und charakterisiert werden. Bei Hinweisen auf eine Existenz eines G-Quadruplexes zwischen der Sequenz der P1 Helix und dem G<sub>5-8</sub> Strang könnte die Ausbildung eines intermolekularen G-Quadruplexes mit einer vollständigen Sequenz des CPEB3 Ribozyms erfolgen.

Neben einer potentiell biologischen Relevanz des G-Quadruplexes in der Wirkung des CPEB3 Ribozyms handelte es sich um einen ultrastabilen parallelen RNA G-Quadruplex. Dieser bietet einen neuen Einblick in die Sequenz-Anforderungen, die für das rationale Design von thermostabilen RNA Nanostrukturen auf der Grundlage der G-Quadruplex-Formation vorteilhaft sind. Für DNA G-Quadruplexe existieren bereits zahlreiche Nanostrukturen, die in ihrem Aufbau viele Möglichkeiten zur Anwendung dienen. Dazu gehören G-Wires<sup>[205]</sup>, Frayed Wires<sup>[206]</sup> und "synapsable" DNA<sup>[207]</sup>. Anders als DNA G-Quadruplexe, besitzen ihre RNA Gegenspieler aufgrund der zusätzlichen 2'-OH-Gruppe eine höhere Stabilität in der Struktur. Speziell für das in dieser Arbeit untersuchte hoch-symmetrische, parallele, sich selbst assemblierende Tetramer aus vier G<sub>5-8</sub> Strängen, wurde eine hohe Stabilität gegenüber gewöhnlichen Denaturierungsmethoden und Temperaturen nahe dem Siedepunkt beobachtet. Somit könnte dieser leicht zugängliche G-Quadruplex ein Grundbaustein für höhere komplexere Strukturen darstellen. Daher sind weitere Untersuchungen in der Anwendung des G<sub>5-8</sub> Strangs in der Nanotechnologie notwendig.

### 6.3 Die Aufgabe des CPEB3 Ribozyms - ein Forschungsfeld der Zukunft

Worin besteht nun die Funktion des CPEB3 Ribozyms? Handelt es sich hierbei um ein wichtiges Element in dem Mechanismus des *cpeb3* Gens oder lediglich um ein evolutionäres Überbleibsel im Genom? Diesen Fragen entgingen bisherige Bemühungen zu dessen Charakterisierung. Tatsächlich existiert diese RNA Sequenz lediglich in einer einzelnen Kopie in einer Vielzahl von Säugetier-Genomen im *cpeb3* Gen, das wiederum für das CPEB3 Protein kodiert.<sup>[67]</sup> Aufgrund dessen ist eine Involvierung des CPEB3 Ribozyms in den Regulationsmechanismus des CPEB3 Proteins denkbar. Die Abbildung 6.3 zeigt einen potentiellen Zusammenhang des CPEB3 Ribozyms mit der CPEB3 Protein Expression. Nach der Transkription des Gens wären für die genannte Sequenz zwei Schritte zum weiteren Vorgehen möglich. Einerseits kann sich das CPEB3 Ribozym im Intron des Gens zu einem selbstspaltenden Molekül korrekt falten und spalten. Aktivitätsregulierende Elemente, sowohl intern als auch extern, wären bei diesem Reaktionsablauf denkbar. Unter diesen Umständen würde die RNA durch die zelluläre Maschinerie abgebaut und folglich das CPEB3 Protein nicht produziert werden. Dagegen könnte der Prozess des Splicings die Intron-Sequenz mit dem Ribozym eliminieren, sodass die flankierenden Exons innerhalb des Gens zu einer kodierenden CPEB3 Protein mRNA zusammengesetzt werden und zur Translation dienen kann. Bis heute handelt es sich jedoch um eine in dieser Arbeit aufgestellten These, die eine genaue Untersuchung und unterstützende Evidenz bedarf.



**Abbildung 6.3: Potentieller Regulationsmechanismus des *cpeb3* Gens unter der Berücksichtigung des CPEB3 Ribozyms.** Nach der Transkription des *cpeb3* Gens kann das CPEB3 Ribozym entweder in einen aktiven, transspaltenden Komplex korrekt falten und somit spalten. In diesem Fall wird das Gen nicht in eine kodierende mRNA übersetzt und die Proteinexpression somit inhibiert. Wenn das CPEB3 Ribozym nicht spaltet, wird es in einem Splicing-Prozess herausgeschnitten und eine CPEB3 Protein kodierende mRNA gebildet. (PDB: 2DNL)

Insgesamt handelt es sich bei der Charakterisierung des CPEB3 Ribozyms sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, um ein relativ junges Forschungsfeld mit einem großen Potential. Die in dieser Arbeit gesammelten Daten zu dem Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms zeichnen ein Bild einer RNA, die durchaus eine schnelle Spaltung zu bewerkstelligen vermag, jedoch dabei Unterstützung bedarf. Potentielle Elemente dafür könnten die Ionen  $Mn^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$  in gebundener Form in zellulären Proteinen bieten. Des Weiteren ist die Erforschung der Involvierung des Ribozyms in den Mechanismus des *cpeb3* Gens ein erstrebenswertes und wichtiges Kapitel in der Klärung der potentiellen Funktion des CPEB3 Ribozyms. Ebenso verbleibt die allgemeine Frage nach der Genregulation in Säugern und somit auch im Menschen durch Ribozyme von besonderem Interesse.

## 7 Materialien und Methoden

### 7.1 Material

#### 7.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril (MeCN)	Fisher
Agarose	Roth
Ammoniumacetat (NH <sub>4</sub> OAc)	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS) > 98 %	Merck
Anorganische Pyrophosphatase (iPP)	New England Biolabs
Bariumchlorid Dihydrat (BaCl <sub>2</sub> x2 H <sub>2</sub> O)	Sigma
Bis-Acrylamid, Rotiphorese	Roth
Borsäure	Alfa Aesar
Bromphenolblau (BPB)	Roth
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	VWR
CIAP Puffer, 10x	Promega
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	Promega
	New England Biolabs
Chlorophorm	Fisher
Deuteriumoxid (99,9 %)	Roth
Dextransulfat	Alfa Aesar
Dichlormethan (DCM)	Acros Organics
3-[[1,3-Dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]propan-1-sulfonsäure (TAPS)	Alfa Aesar
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Alfa Aesar
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DNase I	New England Biolabs
	Roche
DNase I Puffer, 10x	New England Biolabs
	Roche
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
	Fisher
Ethanol abs. (EtOH)	VWR
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth
Ficoll® 400	Sigma
Formamid (FA)	Fluka
Glycogen	Roth
Harnstoff bzw. Urea	Roth
Hexaammincobald(III)chlorid (Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> Cl <sub>3</sub> )	Alfa Aesar
Hexafluoroisopropanol (HFIP)	Fluka
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, 99,5 %)	Appllichem
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	VWR
Kupferchlorid Hydrat (CuCl <sub>2</sub> xH <sub>2</sub> O)	Alfa Aesar
Lithiumsulfat (LiSO <sub>4</sub> )	Sigma

Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> x6 H <sub>2</sub> O)	Acros
Manganchlorid Tetrahydrat (MnCl <sub>2</sub> x4 H <sub>2</sub> O)	Alfa Aesar
6-Methyl-Tetrazin-BODIPY ( <sup>Me</sup> Tet-BDP)	Jena Bioscience
Mineralöl	Sigma
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) Hydrat	Sigma
Natriumacetat (NaOAc)	VWR
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Phenol	Roth
RNase T1	Promega
RNasin	New England Biolabs
Strontiumchlorid Hexahydrat (SrCl <sub>2</sub> x6 H <sub>2</sub> O)	Alfa Aesar
Sudan III	Alfa Aesar
SyBr <sup>®</sup> Safe Gel Farbstoff	Life Technologies
Taq Polymerase	Freundlicherweise bereitgestellt durch Nicole Krämer von der Universität Bonn
Taq Polymerase Puffer, 10x	Freundlicherweise bereitgestellt durch Nicole Krämer von der Universität Bonn
Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin (H <sub>2</sub> TMPyP4)	Freundlicherweise bereitgestellt durch PD. Dr. Ulrich Hennecke von der Universität Münster
T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK)	New England Biolabs
T4 Polynukleotid Kinase Puffer, 10x (T4 PNK Puffer)	New England Biolabs
T7 Polymerase	Freundlicherweise bereitgestellt durch Nicole Krämer von der Universität Bonn
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Tetrazin-BODIPY ( <sup>H</sup> Tet-BDP)	Jena Bioscience
Thioflavin T (ThT)	Sigma
Triethylamin (TEA), HPLC Grade	Fisher
Tris	Roth
Xylencyanol	Applichem
Zinkchlorid (ZnCl <sub>2</sub> )	Alfa Aesar

### 7.1.2 Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Lösungen und Puffer in den folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Puffer	Zusammensetzung
Agarose Gel Ladepuffer, 6x	50 mM Tris-HCl, 15 % (w/v) Ficoll <sup>®</sup> 400, 6 mM EDTA, 0,25 % (w/v) BPB, pH 8,3
CIAP Puffer, 10x	500 mM Tris-HCl, pH 9,3, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM ZnCl <sub>2</sub> , 10 mM Spermidin
DNase I Puffer, 10x	100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,6
FA-EDTA Ladepuffer	Formamid/8,3 M Urea (95/5, v/v), 20 mM EDTA, BPB
Ficoll Puffer, 6x	15 % (w/v) Ficoll <sup>®</sup> 400
HEPES Puffer, 10x	250 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7,5

LiSO <sub>4</sub> Puffer, 10x	100 mM LiSO <sub>4</sub> , 1 M KCl, pH 7,4
NH <sub>4</sub> OAc Puffer, 2x	300 mM NH <sub>4</sub> OAc, pH 7
NMR Puffer, 10x	500 mM KCl, 250 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,2
pH 5 OAc <sup>-</sup> Puffer, 1x	50 mM OAc <sup>-</sup> , 50 mM NaCl
pH 5,5 OAc <sup>-</sup> Puffer, 1x	50 mM MES, 50 mM NaCl
pH 5,75 OAc <sup>-</sup> , 1x	50 mM MES, 50 mM NaCl
pH 6 MES Puffer, 1x	50 mM MES, 50 mM NaCl
pH 6,5 MES Puffer, 1x	50 mM MES, 50 mM NaCl
pH 7 Tris Puffer, 1x	50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl
pH 7,5 Tris Puffer, 1x	50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl
pH 8 Tris Puffer, 1x	50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl
pH 8,5 TAPS Puffer, 1x	50 mM TAPS, 50 mM NaCl
pH 9 TAPS Puffer, 1x	50 mM TAPS, 50 mM NaCl
PNK Puffer, 10x	700 mM, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT, pH 7,6
Taq PCR Puffer, 10x	100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,3
TB Puffer, 1x	89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 25 mM NaCl
TB Puffer, 10x	890 mM Tris-HCl, 890 mM Borsäure, 250 mM NaCl
TBE Laufpuffer, 1x	89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8
Tris Puffer, 10x	500 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5
Tris-HCl Puffer (Transkription)	200 mM Tris-HCl, pH 7,9

### 7.1.3 Ausrüstung

Ausrüstung	Hersteller
-80 °C, -20 °C Gefrier- und 4 °C Kühlschränke	AEG Heraeus
Agarose Gel Apparatur	Konstruktion des Hauses
Agarose Gel Dokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories GmbH
Autoklav (D65)	SysTec GmbH
CD Spektropolarimeter (JASCO J-810)	JASCO Labor- u. Datentechnik GmbH
Counter für Radioaktivität	Berthold
Elektroelutionsapparatur	Konstruktion des Hauses
Eppi Racks	Heathrow Scientific
ESI Säule (Zorbax Stable Bond (80 Å C <sub>18</sub> , 2.1 x 50 mm, 5 µm))	Macherei-Nagel
Falkon Tubes (konisch, 15 und 50 ml)	Sarstedt
Feinwaagen (AT261 Delta Range®; BL 1500S)	Mettler Toledo GmbH Sartorius AG
G25-Spin Säulen (Illustra MicroSpin)	GE Healthcare
Gefriertrockner (Christ LCG Lyo Chamber Guard)	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Gel und PCR Clean-Up Kit	Macherey-Nagel
Glaspipetten	Brand
Glasplatten für PAGE Gele	Biotep GmbH
Glaswolle	Hecht GmbH

Handschuhe	<i>SemperGuard</i>
	<i>EcoComfort</i>
Heizblock	<i>HLC BioTech</i>
HPLC Säule ( <i>EC 150/4,6 Nucleodur 100-5 C18ec</i> )	<i>Macherei-Nagel</i>
HPLC System ( <i>Agilent 1100 Series</i> )	<i>Agilent Technologies</i>
Inkubationsshaker	<i>Innova</i>
Inkubator	<i>WTC binder</i>
LC-MS Säule ( <i>XTerra® MS (2.1×100 mm, 5 µm) C<sub>18</sub></i> )	<i>Waters</i>
LC-MS System ( <i>HTC esquire von mit vorgeschaltetem Agilent 1100 Series HPLC System</i> )	<i>Bruker Daltonic</i>
Magnetrührer ( <i>MR3001</i> )	<i>Agilent Technologies</i>
<i>NanoDrop 2000c</i>	<i>Heidolph Instruments</i>
NMR-Röhrchen ( <i>Shigemi, BMS-005B</i> )	<i>Thermo Scientific</i>
NMR Spektrometer ( <i>Bruker AV III HD NMR Spektrometer (700 MHz) und Bruker AV III HD Prodigy NMR Spektrometer (500 MHz)</i> )	<i>Deutero GmbH</i>
	<i>Bruker Corporation</i>
PAGE Gel Dokumentationssystem ( <i>Genoplex</i> )	<i>VWR</i>
PAGE Kammer und Gießvorrichtung	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i>
PAGE Kammer für präparative Gele	<i>Konstruktion des Hauses</i>
Parafilm	<i>Parafilm "M"</i>
PCR-Thermocycler ( <i>LifeECO, Bioer; Biometra T3; Mastercycler gradient</i> )	<i>Biozym Scientific GmbH</i>
	<i>Biometra GmbH</i>
	<i>Eppendorf AG</i>
pH-Meter ( <i>Inolab®</i> )	<i>Xylem Analytics Germany Sales GmbH &amp; Co. KG</i>
	<i>WTW</i>
Phosphoimager ( <i>FLA-3000</i> )	<i>Fujifilm</i>
Phosphoimager Entwicklungsplatten und Kassetten	<i>Fuji</i>
Pipetten	<i>Eppendorf AG</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt</i>
Quarzglas-Küvette ( <i>110-QS</i> )	<i>Hellma Analytics</i>
Radioaktivität Schutzvorrichtung (Schilder, Bankvorleger etc.)	<i>Amersham pharmacia biotech</i>
Reaktionsgefäße (1,5 (klar und schwarz), 2 und 0,2 ml)	<i>Eppendorf AG</i>
<i>Sep-Pak</i> Kartuschen ( <i>Classic C-18</i> )	<i>Waters GmbH</i>
Skalpell Klängen	<i>Bayha</i>
Spannungsquelle für PAGE	<i>Consort</i>
	<i>Biometra GmbH</i>
Spritzen	<i>B. Braun OEM Division</i>
Sterilfilter	<i>VWR</i>
Thermomixer ( <i>comfort, 1,5 ml</i> )	<i>Eppendorf AG</i>
UV Lampe	<i>Herolab GmbH</i>
UV Spektrometer ( <i>JASCO V-630</i> )	<i>JASCO Labor- u. Datentechnik GmbH</i>
	<i>LMS</i>
Vortex Mixer ( <i>Mixer Uzusio, VTX-3000L</i> )	<i>Roth</i>
Wägeschalen	<i>GK Sondermaschinenbau GmbH,</i>
Wasserbad	<i>Labortechnik Medingen</i>

Wasserreinigungsanlage	<i>Thermo Scientific</i>
Zentrifugalfilter ( <i>Amicon® Ultra</i> , 10 K)	<i>Merck Millipore Ltd.</i>
Zentrifugen ( <i>Hettich Micro 2000 Hettich Micro 2000, Sorvall® fresco</i> , 5427R, SN 1304 1508)	<i>Andreas Hettich GmbH &amp; Co.KG</i> <i>Thermo Fisher Scientific</i> <i>Eppendorf AG</i> <i>Sigma</i> <i>Labnet</i>

### 7.1.4 Software

Software	Hersteller
<i>Adobe Design Premium CS3</i>	<i>Adobe Systems Incorporated</i>
<i>AIDA</i> , v4.27.039	<i>raytest</i>
<i>ChemOffice 2002</i> , v7.0.1	<i>PerkinElmer Informatics</i>
<i>MestReNova</i> , v8.01	<i>MestReLab Research</i>
<i>Microsoft Office 2007</i>	<i>Microsoft Corporation</i>
<i>Mongo Oligo Mass Calculator</i> , v2.08	<a href="http://mods.rna.albany.edu/masspec/Mongo-Oligo">http://mods.rna.albany.edu/masspec/Mongo-Oligo</a>
<i>OligoCalc</i> , v3.27	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html">http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html</a>
<i>Origin8Pro</i> , v8.0773	<i>OriginLab</i>

### 7.1.5 Standards, Nukleotide und synthetische Oligonukleotide

Tabelle 7.1: DNA Ladder.

Typ	Länge	Hersteller
<i>DNA Ultra Low Ladder</i>	300 - 10 bp	<i>PeqLab</i>
<i>Low Molecular Weight Marker</i>	100 - 10 nt	<i>Affymetrix</i>

Tabelle 7.2: Nukleotide und Radiochemikalien.

Nukleotide/Radiochemikalien	Hersteller
dNTP-Set	<i>Jena Bioscience</i>
NTP-Set	<i>Jena Bioscience</i>
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP, 10 mCi ml <sup>-1</sup>	<i>PerkinElmer</i>
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-GTP, 10 mCi ml <sup>-1</sup>	<i>PerkinElmer</i>

Tabelle 7.3: Synthetische DNA Oligonukleotide. Nach Erhalt der Oligonukleotide wurden diese in bidistilliertem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

Name	Sequenz (5' - 3')	Hersteller
8 nt Überhang CPEB3 <sub>ungespalten</sub> _FW Templat	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT AAC AGG GGG CCA CAG CAG AAG CGT TCA CGT CGC AGC C	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>
8 nt Überhang CPEB3 <sub>ungespalten</sub> _FW Primer	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT AAC AGG GG	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>

20 nt Überhang CPEB3 <sub>ungespalten</sub> CPEB3_FW Templat	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG GAT CAA GGG GAT AAC AGG GGG CCA CAG TAG AAG CGT TCA CGT CGC AGC CCC CGT CAG ATT CTA GTG AAT CTG CGA ATT CTG CTC T	<i>Ella</i> <i>Biotech</i> <i>GmbH</i>
20 nt Überhang CPEB3 <sub>ungespalten_RV</sub> Templat	AGA GCA GAA TTC GCA GAT TCA CTA GAA TCT GAC GGG GGC TGC GAC GTG AAC GCT TCT ACT GTG GCC CCC TGT TAT CCC CTT GAT CCT CCT ATA GTG AGT CGT ATT A	<i>Ella</i> <i>Biotech</i> <i>GmbH</i>
20 nt Überhang CPEB3 <sub>ungespalten_RV_dNaM</sub> Templat	AGA GCA GAA TTC GCA GAT TCA CTA GAA TCT GAC GGG GGC TGC GAC GTG AAC GCT TCT ACT GTG GCC CCC TGT TAdNaM CCC CTT GAT CCT CCT ATA GTG AGT CGT ATT A	<i>Ella</i> <i>Biotech</i> <i>GmbH</i>
20 nt Überhang CPEB3 <sub>ungespalten_RV_dNaM</sub> Spaltungsposition Templat	AGA GCA GAA TTC GCA GAT TCA CTA GAA TCT GAC GGG GGC TGC GAC GTG AAC GCT TCT ACT GTG GCC CCC dNaMGT TAT CCC CTT GAT CCT CCT ATA GTG AGT CGT ATT A	<i>Ella</i> <i>Biotech</i> <i>GmbH</i>
CPEB3 <sub>gespalten_FW</sub> Templat	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GCC ACA GCA GAA GCG TTC ACG TCG CAG CC	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>
CPEB3 <sub>gespalten_FW</sub> Primer	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GCC AC	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>
CPEB3 <sub>gespalten_RV</sub> Templat	CAG CAG AAT TCG CAG ATT CAC CAG AAT CTG ACA GGG GCT GCG ACG TGA ACG CTT CT	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>
CPEB3 <sub>gespalten_RV</sub> Primer	CAG CAG AAT TCG CAG ATT CAC CAG AAT C	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>
SA_CPEB3 <sub>ungespalten_FW</sub> Template	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT AAC AGG CGG CCA CAG CAG AAG CGT	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>
SA_CPEB3 <sub>ungespalten_FW</sub> Primer	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT AAC AGG CG	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>
SA_CPEB3 <sub>ungespalten_RV</sub> Templat	GAA TCT GAC AGC GGC TGC GAC GTG AAC GCT TCT GCT GTG GCC GCC	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>
SA_CPEB3 <sub>ungespalten_RV_C39U</sub> Templat	GAA TCT GAC AGC GGC TGC GAC GTG AAC GCT TCT GCT GTG GCC CCC	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>
SA_CPEB3 <sub>ungespalten_RV</sub> Primer	GAA TCT GAC AGC GGC TGC GAC	<i>Metabion</i> <i>GmbH</i>

---

**Tabelle 7.4:** Synthetische RNA Oligonukleotide. Nach Erhalt der Oligonukleotide wurden diese in bidistilliertem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' - 3')</b>	<b>Hersteller</b>
G <sub>4</sub> -15	GGA UAA CAG GGG CCA	Metabion GmbH
G <sub>5</sub> -5	GGG GG	Metabion GmbH
G <sub>5</sub> -8	AGG GGG CC	Metabion GmbH
G <sub>5</sub> -11	ACA GGG GGC CA	Metabion GmbH
G <sub>5</sub> -16	GGA UAA CAG GGG GCC A	Metabion GmbH
G <sub>C</sub> -16	GAA UAA CAG GCG GCC A	Metabion GmbH
CPEB3 A	CAG CAG AAG CGU UCA CGU CGC AGC CCC UGU CAG AUU C	Metabion GmbH
CPEB3 B	GAA UCU GCG AAU UCU GCU GU	Metabion GmbH
CPEB3 B_C <sub>57</sub> U	GAA UCU GUG AAU UCU GCU GU	Metabion GmbH
CPEB3 SA	GGA UAA CAG GGG GCC ACA GCA GAA GCG UUC ACG UCG CAG CCC CUG UCA GAU UC	Metabion GmbH
RNA <sub>C</sub>	UCU GAU GCU GCU	Metabion GmbH

**Tabelle 7.5:** In der Arbeit verwendete selbst-hergestellte RNA Transkripte. Nach der Transkription und der Aufreinigung der Oligonukleotide wurden diese in bidistilliertem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' - 3')</b>
CPEB3 <sub>gespalten</sub>	GGG GGC CAC AGC AGA AGC GUU CAC GUC GCA GCC CCU GUC AGA UUC UGG UGA AUC UGC GAA UUC UGC UGU
CPEB3 <sub>ungespalten</sub>	GGA UAA CAG GGG GCC ACA GCA GAA GCG UUC ACG UCG CAG CCC CUG UCA GAU UCU GGU GAA UCU GCG AAU UCU GCU GU
CPEB3 <sub>ungespalten</sub> SA	GGA UAA CAG GGG GCC ACA GCA GAA GCG UUC ACG UCG CAG CCC CUG UCA GAU UC

**Tabelle 7.6: Co-transkriptional *in situ* generierte RNA Stränge.** Diese wurden innerhalb der Transkriptionsreaktionen *in situ* gefaltet und gespalten ohne Zwischenschritte für Aufreinigungen zu nutzen.

Name	Sequenz (5' - 3')
CPEB3_RNA <sup>CP</sup>	GGA GGA UCA AGG GGTPT3 <sup>CP</sup> UAA CAG GGG GCC ACA GUA GAA GCG UUC ACG UCG CAG CCC CCG UCA GAU UCU AGU GAA UCU GCG AAU UCU GCU G
CPEB3_RNA <sup>CP</sup> <sub>Spaltungsposition</sub>	GGA GGA UCA AGG GGA UAA CTPT3 <sup>CP</sup> G GGG GCC ACA GUA GAA GCG UUC ACG UCG CAG CCC CCG UCA GAU UCU AGU GAA UCU GCG AAU UCU GCU G

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 PCR

Eine typische PCR Reaktion wurde im 100 µl Maßstab angesetzt und enthielt 10 mM Tris, pH 9, 50 mM KCl, 0,1 Triton x 100, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 375 µM von jedem natürlichen NTP, 0,5 µM der jeweiligen FW und RV Primer und 1 µM der jeweiligen FW und RV Templatstränge. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Denaturierung: 95 °C für 1 min

Anlagerung: 50 - 60 °C für 1 min

Amplifizierung: 72 °C für 1 min (20 - 35°Zyklen)

Elongation: 72 °C für 3 min

Hierbei wurde die Zyklenzahl an die gewünschte Ausbeutenmenge angepasst. Nach der Reaktion wurden die so generierten PCR-Produkte bei -20 °C gelagert. Der Erfolg der PCR wurde über die PAGE Analyse oder mit der Agarose Gel Elektrophorese dokumentiert (siehe Kapitel 7.2.15.1 oder 7.2.2).

### 7.2.2 Agarose Gel Elektrophorese

Für ein typisches Agarose Gel (2 %) wurde zuvor die Agarose in dem entsprechenden Volumen an 1x TBE gelöst und mit EtBr versetzt (0,02 %) und ein 5 cm x 7 cm Gel gegossen. Die zu analysierenden Proben enthielten üblicherweise je 2,5 µl des PCR-Produkts und 5 µl 6x DNA Agarose Ladepuffer. Als Referenz zur Bestimmung der Stranglänge wurde die *Ultra Low Range DNA Ladder*, 300 – 10 bp eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 17 min in 1x TBE-Puffer. Anschließend wurde das Gel in einem Agarose Gel Dokumentationssystem (*Bio-Rad Laboratories GmbH*) dokumentiert.

### 7.2.3 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Oligonukleotiden wurde die OD der Lösung bei 260 nm herangezogen. Dazu wurde 1 µl auf die Linse des *NanoDrops* (*Thermo Scientific*) aufgetragen.

Bei bekanntem Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) und bekannter Schichtdicke ( $d$ ) lässt sich die Konzentration ( $c$ ) folgendermaßen berechnen:

$$OD_{260} = c * d * \epsilon$$

Die erhaltene  $OD_{260}$  wurde genutzt, um mithilfe der online Plattform *OligoCalc* die Konzentration zu berechnen (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>).

#### **7.2.4 Transkription eines PCR-Produkts**

Typische Transkriptionsreaktionen wurden im 100  $\mu$ l- bzw. 1 ml-Maßstab angesetzt. Die Komponenten waren wie folgt: 40 mM Tris-HCl, pH 7,9, 25 mM  $MgCl_2$ , 5 mM DTT, 2,5 mM eines jeden NTPs, 30  $\mu$ l des rohen PCR-Produkts, 4  $10^{-3}$  U  $\mu$ l<sup>-1</sup> iPP, 0,5 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> RNasin und 2,5 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> T7 RNA Polymerase. Die Reaktionslösung wurde bei 37 °C für 5 h inkubiert.

#### **7.2.5 Elektroelution**

Die Elektroelution wurde eingesetzt, um aufgetrennte Oligonukleotide nach einer präparativen 20 %-igen PAGE zu isolieren. Dazu wurden die Banden, die zuvor unter UV-Licht sichtbar gemacht und entsprechend markiert wurden, aus dem Gel ausgeschnitten und die RNA aus den Gelstücken in 8 M  $NH_4OAc$ -Lösung bei 150 V für 90 min in einer Elektroelutionsapparatur eluiert. Dabei wurde 1x TBE Puffer verwendet.

#### **7.2.6 EtOH-Fällung**

Zur EtOH-Fällung wurde die RNA enthaltende  $NH_4OAc$ -Lösung aus der Elektroelutionsapparatur entnommen und mit 10 % 8 M  $NH_4OAc$ , 1  $\mu$ l Glykogen und 1 ml 100 % EtOH über Nacht bei -20 °C gefällt. Bei EtOH-Fällungen nach der Phenol-Chlorophorm-Extraktion wurden 10 % 3 M NaOAc als Fällungssalz eingesetzt. Die Proben wurden daraufhin bei 4 °C und 13.000 rpm für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das RNA Pellet mit 70 % EtOH vorsichtig gewaschen, der Überstand abermals abdekantiert und das Pellet getrocknet. Schließlich wurde die RNA mit dem gewünschten Volumen an autoklavierten, bidistillierten Wassers gelöst und bei -20 °C gelagert.

#### **7.2.7 DNase I Verdau**

Für einen DNase I Verdau wurde zum bestehenden Volumen an der zu testenden bzw. aufzureinigenden Lösung 10x DNase I Puffer zu einer 1x Endkonzentration und die DNase I in einer Endaktivität von 0,002 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> hinzugesetzt. Die Mischung wurde 10 min bei RT inkubiert und mit EDTA in einer Endkonzentration von 8 mM versetzt um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 75 °C inkubiert und über G25-Spin Säulen (*GE Healthcare*) aufgereinigt.

## **7.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Hierzu wurde zu der in Wasser gelösten RNA dasselbe Volumen an Phenol (1/1, v/v) hinzugegeben und die Reaktionslösung durchmischt. Danach wurde die Emulsion bei 13.000 rpm für 3 min zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von dem doppelten Volumen an Chloroform wurde die Emulsion erneut bei 13.000 rpm für 3 min zentrifugiert und die wässrige Phase wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Lösung wurde daraufhin zur EtOH-Fällung weiterverwendet (siehe Kapitel 7.2.6).

## **7.2.9 Dephosphorylierung des 5'-Endes von Oligonukleotiden**

Für eine Dephosphorylierungsreaktion wurde die alkaline Phosphatase CIAP eingesetzt. Eine typische Reaktionslösung von 50 µl enthielt 1,5 µM RNA, 50 mM Tris-HCl, pH 9,3, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM Spermidin, 1,6 U µl<sup>-1</sup> RNasin und 1 U µl<sup>-1</sup> CIAP. Die Mischung wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert und über eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender EtOH-Fällung gereinigt (siehe Kapitel 7.2.8 und 7.2.6). Anschließend wurde der dephosphorylierte Oligonukleotid mithilfe einer Konzentrationsmessung und einer PAGE Analyse evaluiert (siehe Kapitel 7.2.3 und 7.2.15).

## **7.2.10 <sup>32</sup>P-Markierung von RNA Oligonukleotiden am 5'-Ende**

RNA Stränge wurden am 5'-Ende mithilfe der T4 PNK <sup>32</sup>P-markiert. Eine typische Reaktion enthielt 1 µM RNA, 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,6, 1 U µl<sup>-1</sup> T4 PNK, 0,9 µl RNasin (40 U µl<sup>-1</sup>) und 1 µl [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (0,5 µCi µl<sup>-1</sup>). Die Reaktionslösung wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert und mithilfe von G25-Spin Säulen nach dem Protokoll des Herstellers (*GE Healthcare*) aufgereinigt.

## **7.2.11 Ribozym Spaltung**

### **7.2.11.1 Drei-strängiges CPEB3 Ribozym**

#### **7.2.11.1.1 Rekonstruktion des Ribozyms aus den Strängen CPEB3 A, CPEB3 B und G<sub>5</sub>-16**

Aus den RNA Strängen CPEB3 A und CPEB3 B und dem 5'-<sup>32</sup>P-gelabelten Substratstrang G<sub>5</sub>-16 wurde das drei-strängige CPEB3 Ribozym rekonstruiert. 19 µM des Strangs A, 24 µM des Strangs B und 84 nM des Substratstrangs G<sub>5</sub>-16 (1 : 226 : 286) wurden in 25 mM HEPES mit 50 mM NaCl, pH 7,5, durch einen Heizschritt bei 95 °C für 4 min und sofortiges Abkühlen der Strangmischung auf -20 °C hybridisiert. Die Reaktionslösung wurde bis zu ihrem Einsatz bei -20 °C gelagert.

### 7.2.11.1.2 Spaltungsassay des drei-strängigen CPEB3 Ribozyms

Die Spaltungsreaktion wurde mit ca. 6 nM hybridisierten Ribozyms (bezogen auf den Substratstrang G<sub>5</sub>-16) mit einem Überschuss des Ribozyms gegenüber dem Substrat in 50 mM Tris-HCl Puffer mit 50 mM NaCl, pH 7,5, durchgeführt. Die Spaltungsreaktion wurde durch die Zugabe von MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 10 mM gestartet und bei 37 °C inkubiert. Aliquots von 4 µl wurden an spezifischen Zeitpunkten entnommen und die Spaltungsreaktion durch Zugabe von 10 µl FA-EDTA gequencht. Die Proben wurden anschließend durch denaturierende 20 %-ige PAGE aufgetrennt und durch *Phosphoimaging* quantifiziert.

Für die Kontrolle des Effektes des Porphyrins TMPyP4 auf die Aggregation des Substratstrangs G<sub>5</sub>-16 wurde es der Reaktionslösung zusätzlich in einer Endkonzentration von 10 µM zugesetzt und danach die Reaktion mit MgCl<sub>2</sub> gestartet.

## 7.2.12 Zwei-strängiges Ribozym

### 7.2.12.1 Rekonstruktion des Ribozyms aus den Strängen CPEB3 SA und CPEB3 B

Zur Untersuchung des Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms wurde es aus zwei Strängen rekonstruiert, nämlich dem CPEB3 Strang B und dem 5'-<sup>32</sup>P-markierten CPEB3 SA Strang. Dazu wurden die Stränge in den Endkonzentrationen von 22,5 µM Strang CPEB3 B und ca. 0,225 µM Strang CPEB3 SA in 50 mM Puffer mit 50 mM NaCl gemischt und durch einen Heizschritt bei 95 °C für 4 min und ein sofortiges Abkühlen der Strangmischung auf -20 °C hybridisiert. Die Ribozymlösung wurde bis zu ihrem Einsatz bei -20 °C gelagert.

### 7.2.12.2 Allgemeiner Spaltungsassay des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms

Die Spaltungsreaktion wurde mit ca. 15 nM des rekonstruierten Ribozyms (bezogen auf das Oligonukleotid CPEB3 SA) durchgeführt. Dabei wurde für das entsprechende Experiment ein geeigneter Puffer mit dem gewünschten pH-Wert und den entsprechenden zu testenden Metall-Ionen gewählt und die Reaktionslösung gemischt. Die Reaktion darin wurde durch Zugabe der Metall-Salze im konstant bleibenden Volumen in unterschiedlichen Konzentrationen und/oder Zusammensetzungen gestartet und bei 37 °C inkubiert. Zur Vermeidung der Evaporation wurde die Reaktionslösung mit je 80 µl mit Sudan III gefärbten Mineralöl überschichtet. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots (4 µl) entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl FA-EDTA gestoppt. Die gequenchten Proben wurden anschließend durch denaturierende 20 %-ige PAGE aufgetrennt und die Intensitäten der erhaltenen Banden durch *Phosphoimaging* quantifiziert. Die gesammelten Daten wurden dann in einer einzeln-exponentiellen (siehe Gleichung 5.1 in Kapitel 5.1.2) oder einer doppelt-exponentiellen Gleichung (siehe Gleichung 5.2 in Kapitel 5.1.2) zur Ermittlung der beobachtbaren Spaltungsraten  $k_{obs}$  bzw.  $k_{obs1}$  und  $k_{obs2}$  genutzt (obs.: engl. *observable*). Dabei stellte  $f_{gespalten}$  die gespaltene Fraktion,  $t$  die Zeit,  $A$  bzw.  $A_1$  und  $A_2$  die Amplituden der beobachtbaren Phasen und  $B$  die gespaltene Fraktion nach Reaktionsende dar.

$$f_{\text{gespalten}} = -Ae^{-k_{\text{obs}}t} + B$$

$$f_{\text{gespalten}} = -A_1e^{-k_{\text{obs}1}t} - A_2e^{-k_{\text{obs}2}t} + B$$

Die pH-Abhängigkeit der beobachteten Spaltungsrate wurde durch den Fit nach einem doppelten Ionisierungsmodell nach Bevilacqua evaluiert (siehe Gleichung 5.4 in Kapitel 5.1.4).<sup>[39]</sup> Dabei handelte es sich bei  $k_{\text{gespalten}}$  um die intrinsische Rate der Spaltungsreaktion und bei  $pK_{a1}$  und  $pK_{a2}$  um die Konstanten der Säure-Dissoziation von zwei titrierenden funktionellen Gruppen.

$$k_{\text{obs}1} = \frac{k_{\text{gespalten}}}{1 + 10^{pK_{a2}-pH} + 10^{pK_{a2}-pK_{a1}} + 10^{pH-pK_{a1}}}$$

### 7.2.12.3 Wiederherstellung der Spaltungsaktivität der rekonstruierten 2-Strang-CPEB3 Ribozym C<sub>57</sub>U Mutante

Für diese experimentelle Reihe wurde zunächst ein zwei-strängiges Ribozym, in dem das katalytische Cytosin C<sub>57</sub> durch ein Uridin ersetzt wurde, rekonstruiert. Dazu wurde der Strang CPEB3 B\_C<sub>57</sub>U in einer typischen Rekonstruktion des Ribozyms statt des nativen CPEB3 B Strangs verwendet (siehe Kapitel 7.2.12.1). Die Reaktion fand unter den üblichen Bedingungen in 1x HEPES Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> bei 37 °C für 34 h statt. Zur Reaktionskontrolle wurden zu definierten Zeitpunkten Aliquots (4 µl) entnommen und darin die Spaltungsreaktion mithilfe von FA-EDTA gequencht. Nach 200 min wurde Imidazol in einer Endkonzentration von 200 mM hinzugegeben und die Reaktion weiter mit der Aliquot-Entnahme dokumentiert. Die gesammelten Proben wurden anhand einer anschließenden 20 %-igen PAGE aufgetrennt und durch *Phosphoimaging* quantifiziert.

## 7.2.13 Natives Ribozym

### 7.2.13.1 Kinetische Untersuchung des CPEB3 Ribozyms in seiner nativen Struktur

Zur Generierung des CPEB3 Ribozyms in seiner vollen Form wurde die PCR und eine interne <sup>32</sup>P-radioaktive Markierung während einer Transkriptionsreaktion eingesetzt. Hierzu wurde das Standard-Protokoll einer T7 Transkription in einem Endvolumen von 60 µl mit der Zugabe von 2 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP (0,17 µCi µl<sup>-1</sup>) genutzt (siehe Kapitel 7.2.1 und 7.2.4) und das Transkript anschließend mithilfe eines Gel und PCR *Clean-Up* Kits nach Angaben des Herstellers (*Macherey-Nage*) aufgereinigt. Die Spaltungsreaktion wurde in Tris-HCl Puffer, pH 7, mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. 10 mM MnCl<sub>2</sub> oder 10 mM ZnCl<sub>2</sub> als Spaltungsinitiatoren durchgeführt.

### 7.2.13.2 Allgemeine co-transkriptionale Fluoreszenz-basierte Spaltung des CPEB3 Ribozyms

Für co-transkriptionale Spaltungsassays wurde das CPEB3 Ribozym *in situ* mithilfe der DNA Stränge 20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten</sub>\_FW und 20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten</sub>\_RV\_dNaM

(bzw. 20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten\_RV</sub>\_dNaM<sub>Spaltungsposition</sub>) in einem 100 µl-Maßstab generiert. 40 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM KCl und 1 µM eines jeden Templatstrangs wurden in einem PCR-Thermocycler auf 95 °C für 5 min erhitzt und auf 37 °C in 2 °C-Schritten abgekühlt um eine Anlagerung der beiden Templatstränge zu ermöglichen. Ferner wurden 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 2,5 mM eines jeden natürlichen Triphosphats, 0,25 - 0,5 mM **TPT3<sup>CP</sup>** TP, 4·10<sup>-3</sup> U µl<sup>-1</sup> iPP, 0,5 U µl<sup>-1</sup> RNasin und zuletzt 2,5 U µl<sup>-1</sup> T7 RNA Polymerase hinzugefügt und die Reaktionslösung bei 37 °C inkubiert. Aliquots (7 µl) wurden zu definierten Zeitpunkten entnommen und 10 µl FA-EDTA Ladepuffer hinzugesetzt, um die Reaktion zu stoppen. Kontrollreaktionen wurden ohne **TPT3<sup>CP</sup>** TP und/oder mit einem unmodifizierten DNA Templatstrang (20 nt Überhang CPEB3<sub>ungespalten\_RV</sub>) durchgeführt. Die entnommenen Proben wurden mit mindestens 5 Äq. <sup>H</sup>**Tet-BDP** versetzt und für 30 min unter Ausschluss von Licht bei RT inkubiert, um eine iEDDA-Reaktion zu erlauben. Die Produkte wurden über ein 20 %-iges denaturierendes PAGE Gel aufgetrennt und über eine Fluoreszenz-Auslesung quantifiziert. Die erhaltenen Daten wurden in einer angepassten doppelt-exponentiellen Gleichung (siehe Gleichung 5.5 in Kapitel 5.1.6.2) gefittet. Dabei stellte  $f_{ungespalten}$  die ungespaltene Ribozymfraktion,  $t$  die Zeit,  $k_{obs}$  die beobachtete Ribozymsspaltungskonstante der beobachteten Fraktion,  $A$  die ungespaltene Fraktion am Reaktionsende und  $B$  die Amplitude der beobachtbaren Fraktion dar.

$$f_{ungespalten} = A + B \left( \frac{1 - e^{k_{obs} t}}{k_{obs} t} \right)$$

### 7.2.13.3 TPT3<sup>CP</sup> Inkorporation durch 3'-Extension im CPEB3 Transkript

Transkriptionsreaktionen wurden in 100 µl-Maßstab in drei Variationen wie zuvor beschrieben durchgeführt (siehe Kapitel 7.2.13.2):

- i. ohne **dNaM** und **TPT3<sup>CP</sup>** TP
- ii. ohne **dNaM**, aber mit **TPT3<sup>CP</sup>** TP
- iii. mit **dNaM** DNA Templat und **TPT3<sup>CP</sup>** TP

Um die DNA Template und nicht eingebaute **TPT3<sup>CP</sup>** TP zu entfernen, wurde das rohe Transkriptionsprodukt mit DNase I verdaut und über G25-Spin Säulen gereinigt. Hierfür wurde der Transkriptionslösung 12 µl 10x DNase I Reaktionspuffer und 5 µl DNase I (10 U µl<sup>-1</sup>) zu einem Endvolumen von 120 µl zugesetzt. Der Verdau wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert und durch Erhitzen der Reaktionslösung für 10 min bei 75 °C gestoppt. Nach der Aufreinigung über eine G25-Spin Säule wurde die Konzentration über eine OD<sub>260</sub> Messung bestimmt. Die Proben wurden mit 2 Äq. <sup>Me</sup>**Tet-BDP** (500 µM in DMSO) zur iEDDA-Reaktion über 30 min bei RT unter Ausschluss von Licht gebracht. Über eine denaturierende 20 %-ige PAGE Analyse wurden die Reaktionsprodukte aufgetrennt und durch Fluoreszenz-Erfassung und eine anschließende Färbung mit SyBr<sup>®</sup> Safe Farbstoff visualisiert.

### **7.2.14 RNase T1 Verdau der Substrat Stränge mit dem 5'-AG<sub>5</sub>CC-3'- bzw. 5'-AG<sub>2</sub>CG<sub>2</sub>CC-3'-Motiv**

Vor dem Verdau wurde die RNA mit bidistilliertem Wasser und Puffer zu einer finalen Konzentration von 10 µM RNA und 150 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 7 gemischt und zu einem Zusammenbau der Stränge in einem PCR-Cycler wie zuvor beschrieben erhitzt (siehe Kapitel 7.2.1). Die Stränge wurden anschließend bei 4 °C über Nacht gelagert. Zu den hybridisierten RNA Strängen wurde RNase T1 in einer finalen Aktivität von 67 U µl<sup>-1</sup> gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Zur Deaktivierung der RNase wurden die Proben für 2 min auf 95 °C geheizt, für 30 min bei -20 °C gelagert und über PAGE analysiert.

### **7.2.15 Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE)**

#### **7.2.15.1 Allgemeine denaturierende PAGE**

Zur Herstellung von 20 %-igen denaturierenden Gelen wurden 25 %-iges PAA, 8,3 M Urea und 8,3 M Urea in 10x TBE genutzt. Zur Polymerisierung von 15 ml Gellösung wurden 6 µl TEMED und 120 µl APS zugesetzt, in die Gelgießapparatur gegeben und für 1 h bei RT polymerisiert.

Als Ladepuffer für die analytische (ca. 5 ml Gelvolumen) sowie die präparative (ca. 50 ml Gelvolumen) PAGE Auftrennung wurde eine Lösung aus Formamid/8,3 M Urea (95/5, v/v) mit Zusatz von 20 mM EDTA in mindestens einem 1/1 (v/v) Verhältnis mit der zu testenden Probe genutzt. Vor der Elektrophorese wurden die Proben bei 95 °C für 2 min erhitzt. Der Lauf für analytische Gele verlief bei 300 V für 1 h mit 5 µl *Ultra Low Ladder* als Referenz, während die Trennung in präparativen Gelen bei 400 V nach 5 h erreicht wurde. Als Laufpuffer wurde eine 1x TBE Lösung eingesetzt. Analytische PAA-Gele wurden anschließend entweder durch eine Fluoreszenz-Erfassung in einem *Phosphorimager FLA3000 (Fujifilm)* mit den Wellenlängen von  $\lambda_{Anregung} = 473 \text{ nm}$  und  $\lambda_{Emission} = 520 \text{ nm}$  visualisiert oder mit 4 µl *SyBr<sup>®</sup> Safe* Farbstoff in 1x TBE gefärbt und durch UV-Bestrahlung in einem Gel Dokumentationssystem betrachtet. Präparative Gele wurden wie in Kapitel 7.2.5 und 7.2.6 beschrieben weiterbehandelt.

#### **7.2.15.2 Allgemeine native PAGE**

Ein natives 20 %-iges Polyacrylamid-Gel enthielt 89 mM Tris, 89 mM Borsäure und 25 mM NaCl und wurde mit 10 % APS und TEMED zur Polymerisation gebracht (für 15 ml Gellösung 120 µl APS und 6 µl TEMED) und bei RT in einer Gelgießapparatur polymerisiert. Nach einem Vorlauf des leeren Gels bei 4 °C für 1 h wurden die Proben, die zuvor mit 6x Ficol<sup>®</sup> Ladepuffer in einem Mindestverhältnis von 1/1 (v/v) vereinigt wurden, beladen und diese bei 10 V, 4 °C über Nacht aufgetrennt. Das Auslesen erfolgte nach dem Anfärben mit *SyBr<sup>®</sup> Safe* Gel Farbstoff oder mit Thioflavin T (ThT) durch UV-Bestrahlung in einem Gel Dokumentationssystem.

### **7.2.16 ThT-Färbung**

Zur ThT-Färbung wurden native Gele nach dem Lauf für 10 min in einer Lösung von 2 mM ThT geschwenkt und durch Fluoreszenz-Erfassung im *Phosphoimager* visualisiert. Anschließend wurde dasselbe Gel mit *SyBr<sup>®</sup> Safe* Gel Farbstoff gefärbt und zur nochmaligen Gel-Visualisierung in einem Gel Dokumentationssystem gegeben.

### **7.2.17 Entsalzverfahren der RNA**

#### **7.2.17.1 HPLC**

Die Entsalzprozedur der RNA erfolgte in einem *Agilent 1100 Series* HPLC System (*Agilent Technologies*) mit einer *EC 150/4.6 Nucleodur 100-5 C18ec* Säule (*Macherey-Nagel*) mit bidistilliertem Wasser als Lösungsmittel A und MeCN als Lösungsmittel B (Gradient: 0 - 40 % in 40 min). Die gesammelten Fraktionen wurden im Vakuum getrocknet und im autoklavierten, bidistillierten Wasser in einem gewünschten Volumen gelöst. Der Erfolg der HPLC wurde mithilfe der Konzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 7.2.3) und einer PAGE Analyse (siehe Kapitel 7.2.15) der entsalzten Stränge dokumentiert.

#### **7.2.17.2 Sep-Pak Kartusche**

Die Kartuschen wurden zunächst mit absolutem MeCN und bidistilliertem Wasser (je 10 ml) gespült. Die Oligonukleotid-Lösung wurde auf eine Spritze aufgezogen und zweimal durch eine so vorbereitete *Sep-Pak* Kartusche durchgezogen, um ein Anbinden des Oligonukleotids zu ermöglichen. Daraufhin wurde die Kartusche mit ca. 10 ml bidistilliertem Wasser gespült (Entsalzschrift). Anschließend wurden die Oligonukleotide mit 2 ml 70 % MeCN ausgewaschen. Die Lösung wurde getrocknet und in einem gewünschten Volumen in autoklaviertem, bidistilliertem Wasser gelöst.

#### **7.2.17.3 Amicon<sup>®</sup> Ultra Zentrifugalfilter**

Für eine Entsalzprozedur mit einem zuvor mit bidistilliertem Wasser gewaschenen *Amicon<sup>®</sup> Ultra* Zentrifugalfilter (*Merck Millipore Ltd.*) wurde die Lösung in den Filter geladen und bei 13.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurde die Lösung mit autoklaviertem, bidistillierten Wasser gewaschen (Entsalzschrift) und wieder wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurde der Filter umgekehrt in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 2.000 rpm für 2 min.

#### **7.2.17.4 G25-Spin Säule**

G25-Spin Säulen wurden sowohl für Entsalzprozeduren als auch zur Reinigung von Oligonukleotiden eingesetzt. Hierzu wurde die Säule bei 720 rcf für 1 min zentrifugiert und die zu entsalzende bzw. aufzureinigende Lösung auf die Säule geladen. Anschließend wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt und bei 720 rcf für 2 min zentrifugiert.

### 7.2.17.5 Filtration von Partikeln in Oligonukleotidlösungen

Zur zusätzlichen Filtration von grob verunreinigten Oligonukleotid-Lösungen wurde eine 1 ml-Spritze mit Glaswolle versehen und mit 500 µl bidistilliertem Wasser gespült. Nach der Beladung des so konstruierten Filters mit der zu filternden Oligonukleotid-Lösung wurde diese mit 1 ml bidistilliertem Wasser gewaschen. Die aufgefangene Lösung wurde lyophilisiert und in einem gewünschten Volumen von bidistilliertem und autoklaviertem Wasser gelöst.

### 7.2.18 CD Spektroskopie

#### 7.2.18.1 Allgemeiner Versuchsablauf

RNA Oligonukleotide (10 µM) wurden in 150 mM NH<sub>4</sub>OAc (pH 7) Puffer oder in NMR Puffer (50 mM KCl, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,2) durch einen Heizschritt bei 95 °C für 5 min und ein langsames Abkühlen (1 °C min<sup>-1</sup>) auf RT hybridisiert. CD Spektren wurden in einer 0,1 cm Quarzglas-Küvette bei RT in dem Bereich von 220 nm - 340 nm und/oder von 200 nm - 600 nm mit einer Messgeschwindigkeit von 100 nm min<sup>-1</sup> und mit einer Antwortzeit von 0,1 s aufgenommen. Dabei wurden zehn CD Scans für eine finale Messkurve gemittelt. Die Spektren der verwendeten Puffer wurden von den Spektren der Oligonukleotide subtrahiert.

#### 7.2.18.2 CD Spektroskopie mit dem Porphyrin TMPyP4

Für Spektren zur Untersuchung des Porphyrins TMPyP4 auf RNA Oligonukleotid-Strukturen wurden die RNA (10 µM) und TMPyP4 (2 - 100 µM) in einem Puffer zu einer finalen Salzkonzentration von 150 mM NH<sub>4</sub>OAc (pH 7) gemischt und hybridisiert (siehe Kapitel 7.2.14). Die CD Spektroskopie erfolgte wie zuvor beschrieben.

### 7.2.19 NMR Spektroskopie

1D <sup>1</sup>H-NMR Spektren wurden in einem Bruker Avance I 500 MHz (*Oxford Magnet*) oder einem Bruker Avance III HD Ascend 700 MHz NMR Spektrometer mit einem *jump-return*-Echo bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen. Der Strang G<sub>5-8</sub> wurde in einer Endkonzentration von 500 µM und 680 µM in einem H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-Gemisch (9/1, v/v) mit den folgenden Pufferbedingungen gemischt: 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,2 und 50 mM KCl. Die Stränge G<sub>5-5</sub> und das gespaltene Ribozym CPEB3<sub>gespalten</sub> wurden in einer Endkonzentration von 200 µM analysiert. Zur Hybridisierung wurde die RNA bei 95 °C für 30 min geheizt, auf RT abgekühlt und anschließend in einem *Shigemi* NMR Röhrchen (*Deutero GmbH*) zur NMR Spektroskopie-Messung gegeben. Für darauffolgende Messungen in 100 % D<sub>2</sub>O wurde die Probe über mindestens 3 Tage lyophilisiert und unmittelbar vor der NMR Messung in frischem und reinem D<sub>2</sub>O gelöst.

Alle NMR Spektren wurden an die chemische Verschiebung des H<sub>2</sub>O als internen Standard bei den unterschiedlichen Temperatur-abhängigen Messungen geeicht.<sup>[208, 209]</sup> Die folgenden

Wasserprotonen-Verschiebungen wurden dazu eingesetzt: 298 K: 4,70 ppm, 328 K: 4,43 ppm, 348 K: 4,26 ppm.

### 7.2.20 UV-Vis Spektroskopie

Die Stränge G<sub>5</sub>-16 und G<sub>5</sub>-11 wurden in LiSO<sub>4</sub> Puffer in den folgenden Endkonzentrationen gelöst: 1 µM RNA, 10 mM LiSO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, pH 7,4. Vor der Messung wurde die Probe mit 30 µM mit Sudan III gefärbten Mineralöl überschichtet um eine Evaporation der Probe zu vermeiden. Die Messungen wurden bei 295 nm in einer Temperaturspanne von 20 – 85 °C in 0,1 °C min<sup>-1</sup>-Schritten gemessen.

### 7.2.21 LC-MS

HPLC-ESI Massenspektrometrie von RNA Strängen wurde an einer *HTC esquire* von *Bruker Daltonic* mit einem vorgeschaltetem *Agilent 1100* Series HPLC System mit 10 mM TEA/100 mM HFIP als Lösungsmittel A und MeCN als Lösungsmittel B (Gradient: 5 - 20 % in 20 min) und einer *Zorbax Stable Bond C<sub>18</sub>* Säule durchgeführt. Üblicherweise wurden Proben von 10 pmol zur LC-MS Analyse gegeben, die zuvor bei Bedarf über G25-Spin Säulen entsalzt wurden (siehe Kapitel 7.2.17.4). Zur Auswertung wurden die theoretischen Massen der Produkte unter der Verwendung der online Plattform *Mongo Oligo Mass Calculator* (<http://mods.rna.albany.edu/masspec/Mongo-Oligo>) berechnet und mit den Massen im dekonvolutiertem ESI<sup>-</sup> MS Spektrum verglichen. Die dabei verwendeten Parameter für die Dekonvolutierung waren wie folgt: max. Ladung = 15, max. Anzahl der Verbindungen = 10, mind. sechs Peaks pro Verbindung und eine Neutralmassenreichweite von 5.000 - 8.000 m/z.

## 8 Anhang

### 8.1 Der Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms

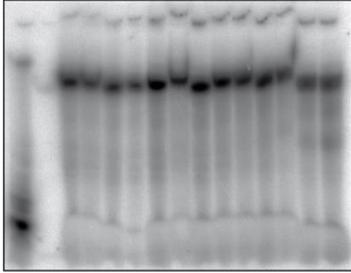
#### 8.1.1 Studien mit dem *in vitro* rekonstruierten Ribozym

##### 8.1.1.1 Kinetische Aktivität des rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms

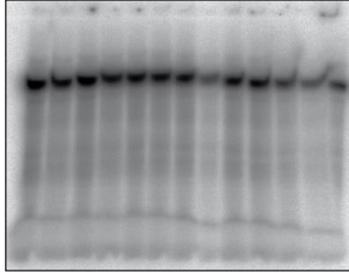
Rekonstruiertes CPEB3 Ribozym mit 0 mM MgCl <sub>2</sub>		CPEB3 SA		Rekonstruiertes CPEB3 Ribozym C <sub>57</sub> U Mutante		Rekonstruiertes CPEB3 Ribozym mit 10 mM MgCl <sub>2</sub> bei pH 7,5		
Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Error
0	0,04029	0	0,03426	0	0,04632	0	0,03362	0,00393
15	0,04525	120	0,03742	30	0,05195	5	0,03724	0,01293
30	0,04518	270	0,03253	90	0,05064	17	0,07435	0,04170
60	0,04331	540	0,04714	120	0,05837	30	0,13176	0,04296
120	0,03690	1.442	0,05417	150	0,06123	60	0,21624	0,03976
240	0,04477	1.970	0,05145	210	0,06280	120	0,30444	0,02504
360	0,04189			330	0,05689	180	0,34844	0,02999
540	0,04689			450	0,05334	300	0,39820	0,02607
1.380	0,05070			570	0,06345	420	0,42496	0,01757
1.642	0,05465			1.434	0,06157	600	0,44158	0,03500
1.912	0,06548			1.623	0,07204	1.456	0,50825	0,04779
				2.037	0,08306	1.710	0,50749	0,04162
						1.968	0,54311	0,04976

10 mM MgCl <sub>2</sub> bei pH 7,5	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$
	0	0,03804	0	0,03230	0	0,02479
	5	0,05063	5	0,02483	5	0,03030
	15	0,08058	15	0,02989	15	0,03827
	30	0,15660	30	0,08215	30	0,05046
	60	0,24492	60	0,17086	60	0,16114
	120	0,32971	120	0,27963	122	0,28879
	180	0,37847	180	0,31848	180	0,31935
	300	0,41843	300	0,36879	300	0,40805
	420	0,44511	420	0,41701	420	0,43509
	600	0,47537	600	0,40549	600	0,46633
	1.438	0,56286	1.493	0,47402	1.456	0,54316
	1.739	0,55285	1.662	0,47106	1.725	0,53580
	2.030	0,52502	1.838	0,59939	2.035	0,55110

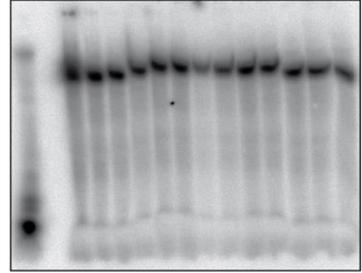
Rekonstruiertes CPEB3 Ribozym  
mit 0 mM  $MgCl_2$



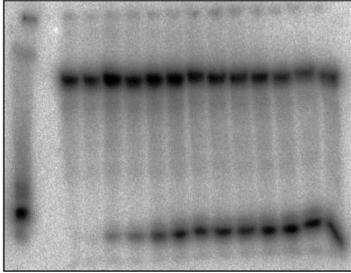
CPEB3 SA



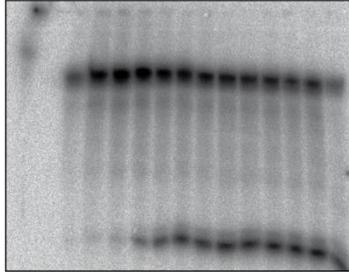
Rekonstruiertes CPEB3 Ribozym  
mit 10 mM  $MgCl_2$



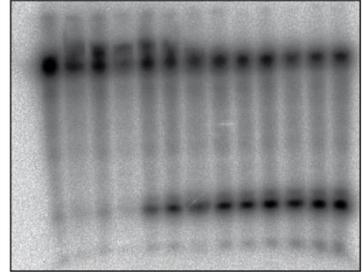
pH 7,5 Messung 1



pH 7,5 Messung 2

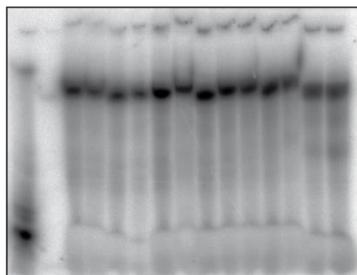


pH 7,5 Messung 3

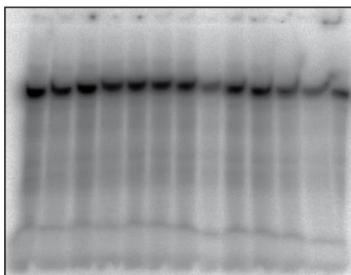
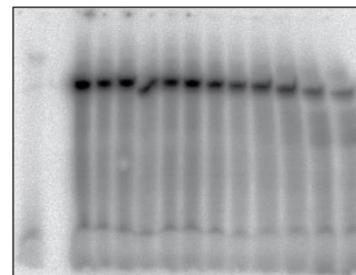


### 8.1.1.2 Wiederherstellung der Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozym C<sub>57</sub>U Mutanten

Rekonstruiertes CPEB3 Ribozym mit 0 mM MgCl <sub>2</sub>		CPEB3 SA		Rekonstruierte CPEB3 Ribozym C <sub>57</sub> U Mutante		Rekonstruierte CPEB3 Ribozym C <sub>57</sub> U Mutante mit 10 mM MgCl <sub>2</sub> und 200 mM Imidazol	
Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
0	0,04029	0	0,03426	0	0,04632	0	0,06098
15	0,04525	120	0,03742	30	0,05195	5	0,07911
30	0,04518	270	0,03253	90	0,05064	15	0,07632
60	0,04331	540	0,04714	120	0,05837	30	0,08053
120	0,03690	1.442	0,05417	150	0,06123	60	0,08832
240	0,04477	1.970	0,05145	210	0,06280	120	0,08352
360	0,04189			330	0,05689	203	0,08935
540	0,04689			450	0,05334	300	0,08850
1.380	0,05070			570	0,06345	420	0,10122
1.642	0,05465			1.434	0,06157	600	0,13128
1.912	0,06548			1.623	0,07204	720	0,27961
				2.037	0,08306	1.418	0,32865

Rekonstruiertes CPEB3 Ribozym mit 0 mM MgCl<sub>2</sub>

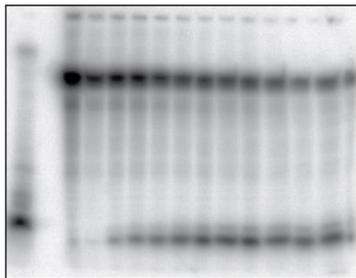
CPEB3 SA

Rekonstruierte CPEB3 Ribozym C<sub>57</sub>U Mutante mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 mM Imidazol

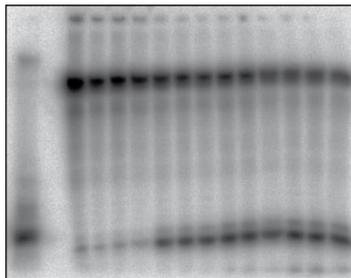
**8.1.1.3 pH-Abhängigkeit der rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms**

pH 5	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$
	0	0,01275	0	0,02362	0	0,02000
	5	0,01586	5	0,03132	5	0,02621
	15	0,05643	15	0,03564	15	0,06902
	32	0,11085	30	0,04888	30	0,12176
	60	0,17608	90	0,21788	60	0,23591
	120	0,28863	121	0,26989	120	0,32735
	180	0,34790	180	0,31422	180	0,41086
	301	0,39889	301	0,38537	301	0,47751
	420	0,4217	422	0,39588	420	0,52334
	600	0,43838	600	0,41384	600	0,54557
	1.422	0,51900	1.449	0,50118	1.511	0,71212
	1.727	0,51703	1.744	0,49929	1.703	0,63134
			2.043	0,52449	1.815	0,56215

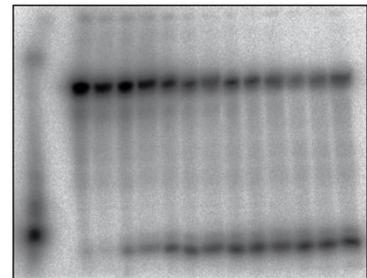
pH 5 Messung 1



pH 5 Messung 2

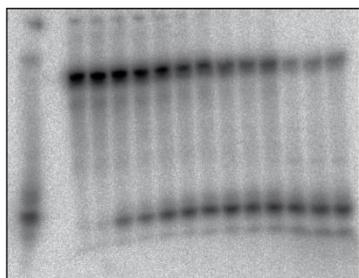


pH 5 Messung 3

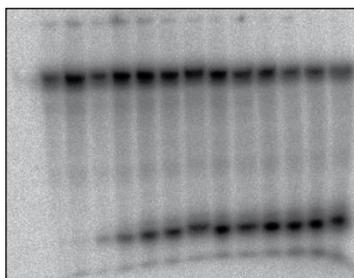


pH 5,5	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,03126	0	0,06158	0	0,04290
	5	0,03649	5	0,03765	5	0,05620
	20	0,11260	15	0,11072	15	0,12557
	30	0,16947	30	0,19868	30	0,17111
	60	0,25791	78	0,31375	78	0,27990
	120	0,35453	122	0,37713	122	0,33684
	180	0,39180	180	0,43330	180	0,33744
	300	0,52591	304	0,47498	304	0,39355
	420	0,58642	420	0,51135	420	0,41382
	600	0,59884	600	0,56815	600	0,41829
	1.436	0,81058	1.519	0,66359	1.519	0,50400
	1.728	0,80199	1.747	0,66305	1.747	0,50576
	2.037	0,76377	2.000	0,64850	2.000	0,52209

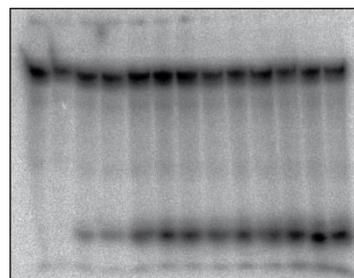
pH 5,5 Messung 1



pH 5,5 Messung 2

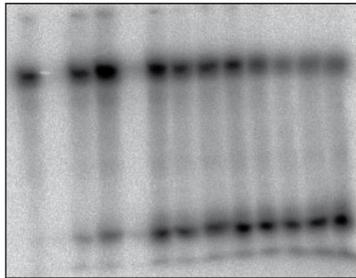


pH 5,5 Messung 3

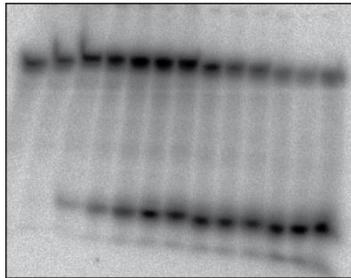


pH 5,75	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,05081	0	0,06728	0	0,08834
	5	0,19276	5	0,05154	5	0,08807
	15	0,10768	15	0,12233	15	0,14187
	30	0,13797	30	0,21246	30	0,19867
	60	0,34628	60	0,31764	60	0,27121
	60	0,34628	60	0,42828	60	0,36176
	180	0,41573	180	0,45939	180	0,43355
	302	0,50684	302	0,52159	302	0,54165
	420	0,57103	420	0,61868	420	0,59421
	600	0,59862	600	0,66151	600	0,71376
	1.471	0,72023	1.471	0,74903	1.471	0,85601
	1.734	0,71928	1.734	0,82051	1.734	0,86566
	1.991	0,74719	1.991	0,79790	1.991	0,89677

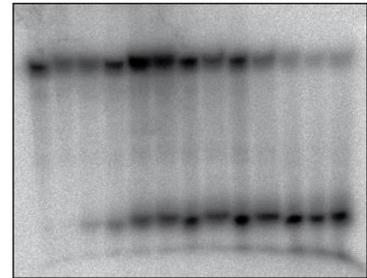
pH 5,75 Messung 1



pH 5,75 Messung 2

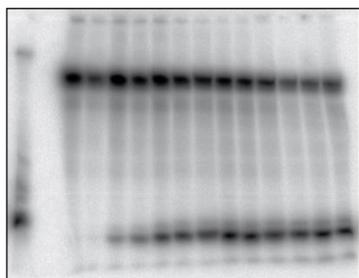


pH 5,75 Messung 3

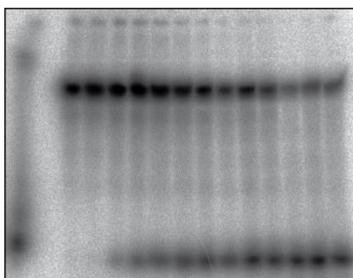


pH 6	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,01131	0	0,01995	0	0,03289
	5	0,01585	5	0,02336	5	0,03260
	15	0,06814	15	0,07031	15	0,10009
	32	0,14987	30	0,14379	30	0,09367
	60	0,24315	60	0,22354	60	0,22497
	120	0,30515	120	0,31011	122	0,32617
	180	0,34291	180	0,35605	180	0,41120
	301	0,41193	301	0,43566	300	0,49132
	420	0,42078	420	0,46677	420	0,56873
	600	0,44956	600	0,53557	600	0,56116
	1.422	0,54577	1.511	0,71872	1.456	0,73405
	1.727	0,56729	1.703	0,68664	1.725	0,68622
	2.027	0,49844	1.815	0,66880	2.035	0,68122

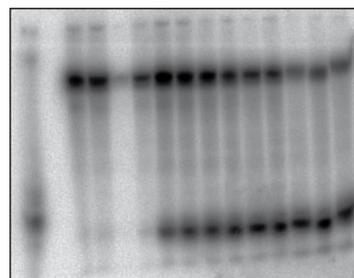
pH 6 Messung 1



pH 6 Messung 2

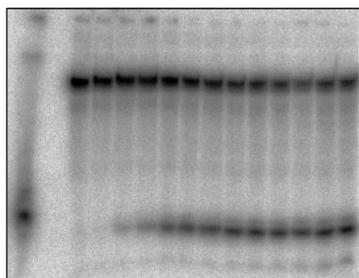


pH 6 Messung 3

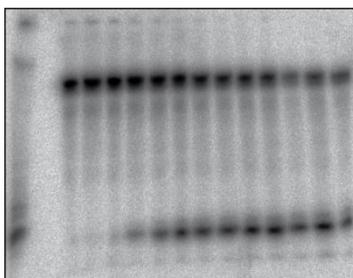


pH 6,5	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,03507	0	0,04906	0	0,03615
	5	0,05001	5	0,04121	5	0,02622
	15	0,07602	15	0,06426	20	0,11025
	30	0,13222	30	0,12467	30	0,15597
	60	0,20889	60	0,24124	60	0,22857
	120	0,27515	120	0,33962	120	0,33275
	180	0,31779	180	0,38276	180	0,35780
	300	0,39647	300	0,44097	300	0,38847
	420	0,40980	420	0,45455	420	0,41981
	600	0,41157	600	0,50675	600	0,44030
	1.438	0,47191	1.493	0,57403	1.436	0,48979
	1.739	0,45233	1.662	0,55684	1.728	0,50696
	2.030	0,47498	1.838	0,36597	2.037	0,50832

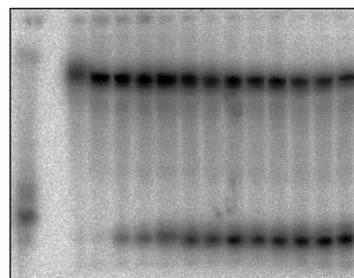
pH 6,5 Messung 1



pH 6,5 Messung 2

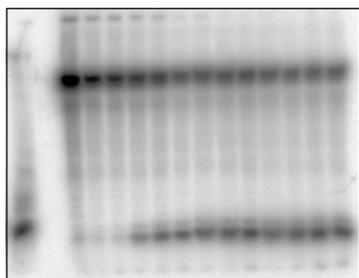


pH 6,5 Messung 3

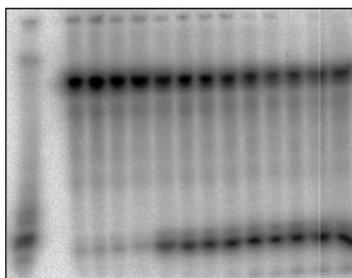


pH 7	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,01798	0	0,02633	0	0,02614
	5	0,02367	5	0,02628	5	0,03061
	15	0,02585	15	0,03388	15	0,07286
	32	0,12400	30	0,04667	30	0,13594
	60	0,21775	90	0,25391	60	0,23854
	120	0,30418	121	0,28798	120	0,31038
	180	0,35281	180	0,32668	180	0,35474
	300	0,38742	301	0,40059	301	0,40741
	420	0,44336	422	0,42638	420	0,43379
	600	0,42771	600	0,45557	600	0,44596
	1.453	0,49435	1.449	0,49183	1.511	0,47395
	1.658	0,49567	1.744	0,53916	1.703	0,47310
	2.016	0,50106	2.043	0,52270	1.815	0,48342

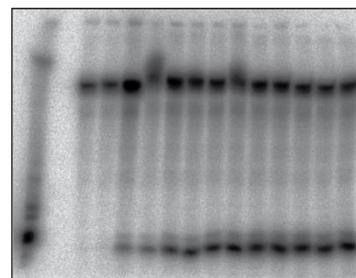
pH 7 Messung 1



pH 7 Messung 2



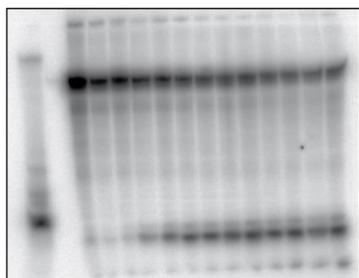
pH 7 Messung 3



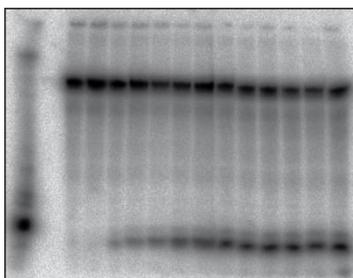
pH 7,5 siehe Kapitel 8.1.1.1.

pH 8	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,01935	0	0,03829	0	0,03869
	5	0,01973	5	0,03117	5	0,04286
	15	0,03105	15	0,04264	15	0,06690
	32	0,09713	30	0,04905	30	0,08700
	60	0,16481	60	0,15754	62	0,16615
	120	0,26604	122	0,27173	122	0,26887
	180	0,31215	180	0,32823	183	0,31800
	300	0,36082	300	0,38299	249	0,36939
	420	0,39382	420	0,42427	420	0,39195
	600	0,40927	600	0,45837	555	0,41006
	1.453	0,47362	1.456	0,52347	1.476	0,51000
	1.658	0,44181	1.725	0,54762	1.691	0,52949
	2.016	0,47612	2.035	0,53968	1.932	0,50766

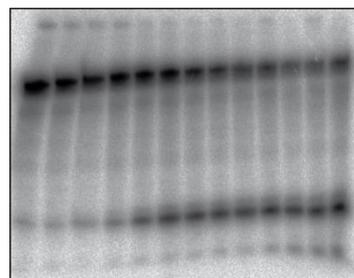
pH 8 Messung 1



pH 8 Messung 2

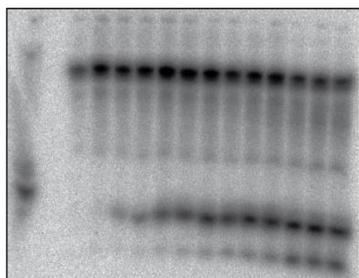


pH 8 Messung 3

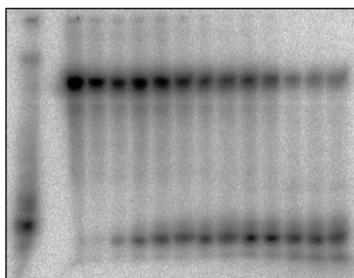


pH 8,5	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,06185	0	0,02663	0	0,05196
	5	0,04104	6	0,03399	5	0,06758
	20	0,11035	30	0,03685	15	0,09860
	30	0,15058	30	0,04484	30	0,16052
	60	0,18405	60	0,12029	62	0,16052
	120	0,28793	120	0,22567	122	0,25895
	180	0,35780	180	0,30121	183	0,32943
	300	0,39730	300	0,36300	249	0,40162
	420	0,42107	420	0,39873	420	0,41449
	600	0,46242	600	0,44129	555	0,47691
	1.436	0,57752	1.459	0,53738	1.476	0,59949
	1.728	0,59725	1.749	0,57268	1.691	0,58852
	2.037	0,62113	2.041	0,57484	1.932	0,61263

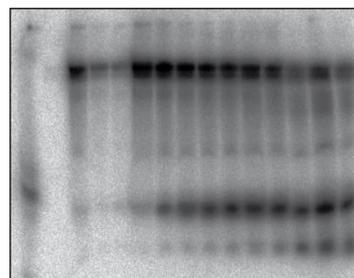
pH 8,5 Messung 1



pH 8,5 Messung 2

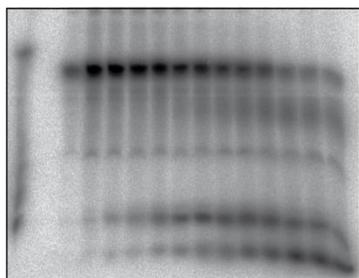


pH 8,5 Messung 3

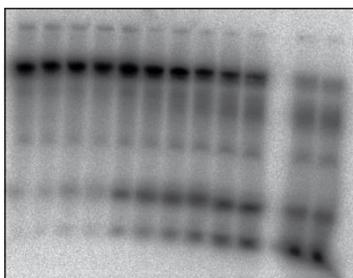


pH 9	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,02940	0	0,05013	0	0,05581
	5	0,03348	5	0,04892	5	0,04829
	15	0,03675	15	0,07466	15	0,06993
	30	0,05530	30	0,07912	30	0,08090
	90	0,18695	62	0,15221	62	0,14523
	121	0,25166	122	0,24035	122	0,24262
	180	0,32396	183	0,32402	183	0,33372
	301	0,45219	249	0,40298	249	0,40646
	422	0,55479	420	0,50299	420	0,49632
	600	0,65198	555	0,60657	555	0,55878
	1.449	0,85209	1.476	0,86264	1.476	0,80054
	1.744	0,83477	1.932	0,87877	1.691	0,84030
	2.043	0,52449			1.932	0,86225

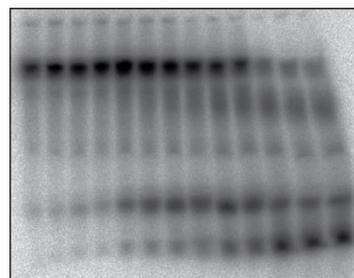
pH 9 Messung 1



pH 9 Messung 2



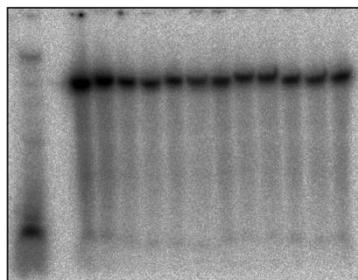
pH 9 Messung 3



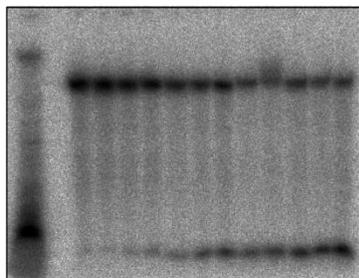
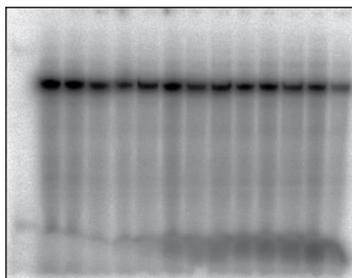
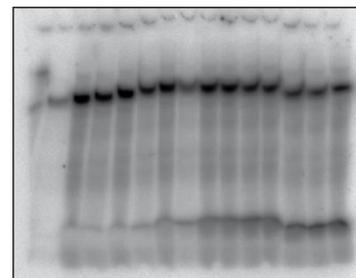
### 8.1.1.4 Metall-Promiskuität des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms

#### 8.1.1.4.1 $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit und der Effekt von $K^+$ -Ionen auf die Spaltungsreaktion

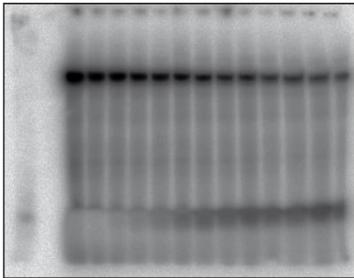
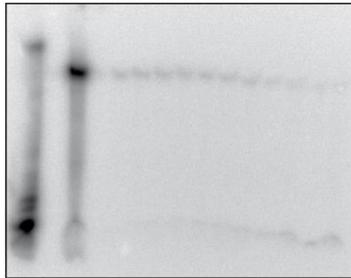
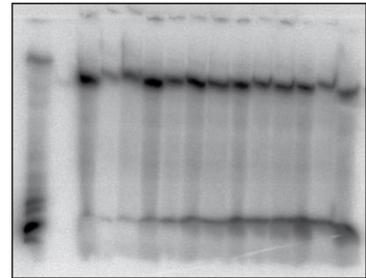
0 mM $MgCl_2$	Messung 1	
	Zeit [min]	$f_{gespalten}$
	0	0,04049
	5	0,04105
	15	0,04643
	30	0,04582
	60	0,03813
	120	0,05676
	180	0,04307
	300	0,03955
	420	0,04621
	540	0,05935
	1.320	0,04356
	1.907	0,06095

0 mM  $MgCl_2$ 

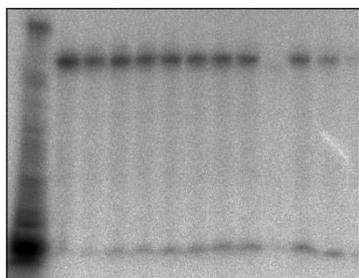
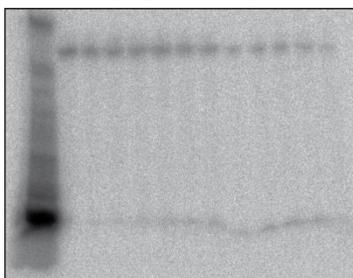
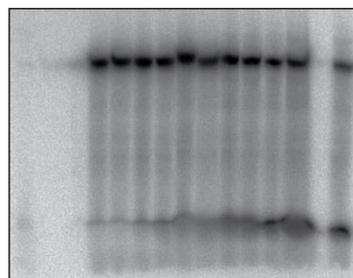
1 mM $MgCl_2$	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	$f_{gespalten}$	Zeit [min]	$f_{gespalten}$	Zeit [min]	$f_{gespalten}$
	0	0,04990	0	0,09156	0	0,05670
	5	0,04141	5	0,09798	15	0,06210
	15	0,07085	15	0,10461	30	0,06051
	30	0,11053	30	0,14349	60	0,08922
	60	0,15275	60	0,17072	120	0,13837
	120	0,27012	120	0,22855	240	0,19313
	180	0,29080	180	0,27094	360	0,20976
	300	0,37398	300	0,29816	540	0,24499
	420	0,37306	420	0,33333	1380	0,30191
	540	0,41398	600	0,34405	1.642	0,31278
	1.320	0,53934	1.440	0,45923	1.912	0,33713
	1.907	0,58110	1.710	0,44517	2.793	0,37651
			1.980	0,48235	3.405	0,40535

1 mM  $MgCl_2$  Messung 11 mM  $MgCl_2$  Messung 21 mM  $MgCl_2$  Messung 3

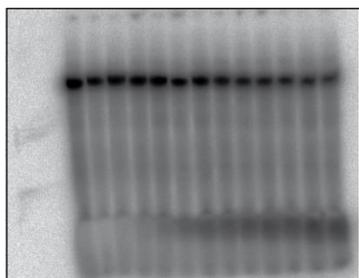
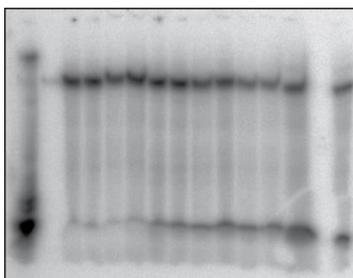
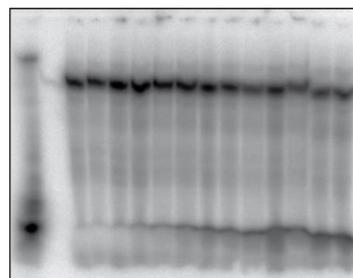
5 mM MgCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,06341	0	0,12372	0	0,11617
	5	0,06313	15	0,29718	5	0,10895
	15	0,08164	30	0,35345	15	0,08412
	30	0,11493	68	0,40954	30	0,15077
	60	0,18350	120	0,37067	68	0,22501
	120	0,24227	180	0,42619	120	0,26331
	203	0,31687	300	0,51705	180	0,31215
	300	0,36541	420	0,40961	300	0,41140
	420	0,40755	600	0,43957	420	0,40139
	600	0,43991	1484	0,64854	600	0,44699
	720	0,45241	1.697	0,60270	1.484	0,54498
	1.410	0,54744	1.952	0,68597	1.697	0,56708
	1.690	0,46889			1.952	0,61807

5 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 15 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 25 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 3

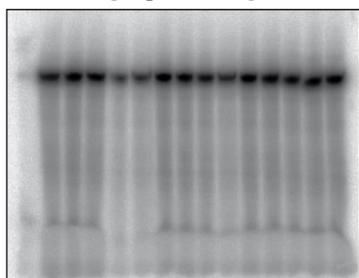
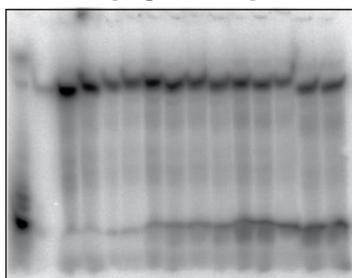
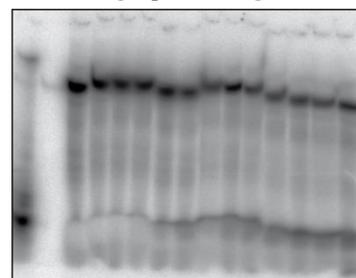
10 mM MgCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,09230	0	0,00000	5	0,10122
	15	0,02997	15	0,05041	15	0,11983
	30	0,09461	30	0,12613	30	0,13991
	45	0,12743	60	0,18254	68	0,23038
	60	0,12972	90	0,20879	120	0,23571
	90	0,14668	120	0,28524	180	0,27474
	120	0,19204	180	0,32156	300	0,32073
	150	0,22640	240	0,29270	420	0,34129
	265	0,31745	360	0,33891	600	0,45466
	300	0,25200	480	0,44127	1.480	0,53260
			600	0,41243	1.952	0,55863
			1.482	0,60417		

10 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 110 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 210 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 3

15 mM MgCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,06682	0	0,11741	0	0,04635
	5	0,06941	5	0,12273	15	0,05145
	15	0,07471	15	0,11848	30	0,05671
	30	0,11193	30	0,13422	60	0,08884
	60	0,14500	68	0,25208	120	0,16588
	120	0,27249	120	0,25795	240	0,19858
	203	0,28221	180	0,32685	360	0,25151
	300	0,32791	300	0,39449	540	0,28181
	420	0,38548	420	0,43631	1.380	0,36541
	600	0,45141	600	0,47902	1.642	0,41820
	720	0,48028	1.484	0,60920	1.912	0,41408
	1.410	0,53584	1.952	0,48436	2.793	0,41632
	1.690	0,57244			3.405	0,48390

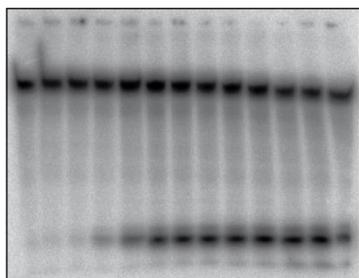
15 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 115 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 215 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 3

30 mM MgCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,07436	0	0,05634	0	0,05841
	5	0,09516	15	0,06612	15	0,06028
	15	0,10955	30	0,10258	30	0,07716
	30	0,15846	60	0,09703	60	0,10074
	60	0,19439	120	0,15195	120	0,14481
	120	0,26371	240	0,20490	240	0,23951
	180	0,31391	360	0,29031	360	0,24193
	300	0,36189	540	0,30164	540	0,25290
	420	0,43089	1380	0,42542	1.380	0,36467
	600	0,47801	1642	0,44083	1.642	0,39640
	1.440	0,62519	1.912	0,45768	1.912	0,44337
	1.710	0,63117	2.793	0,48596	2.793	0,43859
	1.980	0,67154	3.405	0,44446	3.405	0,38349

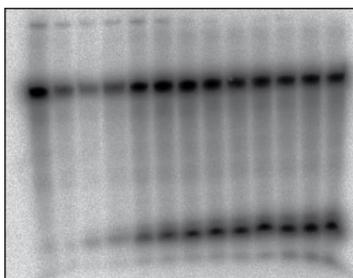
30 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 130 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 230 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 3

0 mM KCl	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,03387	0	0,01750	0	0,02607
	5	0,03389	5	0,03367	5	0,02770
	15	0,03923	20	0,10513	18	0,05140
	31	0,09821	30	0,13308	30	0,06395
	60	0,18239	60	0,18512	60	0,16456
	120	0,28161	120	0,24266	124	0,30272
	180	0,35062	181	0,30279	180	0,32964
	302	0,38713	300	0,35668	300	0,39498
	420	0,40615	424	0,41059	421	0,39307
	600	0,44268	601	0,40240	602	0,40264
	1.491	0,49485	1.428	0,47915	1.451	0,43603
	1.688	0,50022	1.742	0,46901	1.631	0,43857
	1.886	0,27059	2.042	0,47771	1.853	0,45315

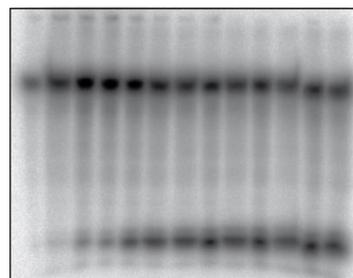
0 mM KCl Messung 1



0 mM KCl Messung 2

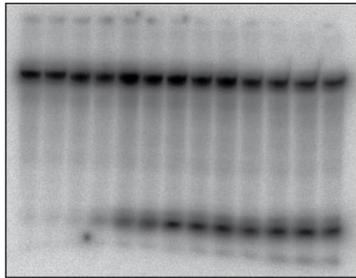


0 mM KCl Messung 3

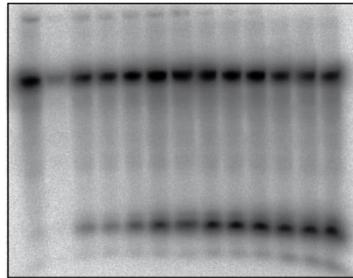


5 mM KCl	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,02989	0	0,01992	0	0,02428
	5	0,03686	5	0,05109	5	0,02474
	15	0,03829	20	0,09844	18	0,05721
	31	0,10629	30	0,11530	30	0,06252
	60	0,18156	60	0,17989	60	0,17269
	120	0,32138	120	0,25986	124	0,29611
	180	0,34031	181	0,27810	180	0,32719
	302	0,38813	300	0,36997	300	0,37229
	420	0,41843	424	0,39222	421	0,38672
	600	0,44363	601	0,39785	602	0,38510
	1.491	0,49073	1.428	0,45610	1.451	0,43297
	1.688	0,46344	1.742	0,48233	1.631	0,43211
	1.886	0,51753	2.042	0,47505	1.853	0,46108

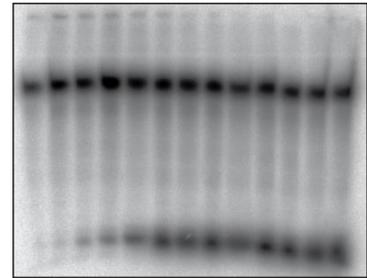
5 mM KCl Messung 1



5 mM KCl Messung 2

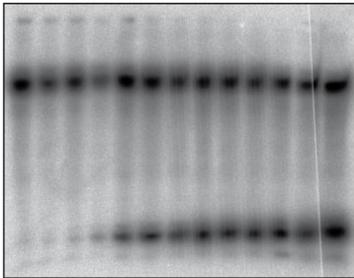


5 mM KCl Messung 3

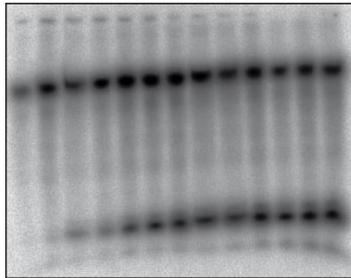


15 mM KCl	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,02545	0	0,04682	0	0,03472
	5	0,03321	5	0,02758	5	0,03240
	15	0,05711	20	0,10622	18	0,12308
	31	0,12214	30	0,11235	30	0,13537
	60	0,18247	60	0,18823	60	0,23351
	120	0,26453	120	0,28431	124	0,31007
	180	0,32473	181	0,32484	180	0,36685
	302	0,37418	300	0,35162	300	0,39244
	420	0,38344	424	0,40611	421	0,42141
	600	0,40960	601	0,41204	602	0,43432
	1.491	0,45361	1.428	0,46493	1.451	0,47700
	1.688	0,48195	1.742	0,49169	1.631	0,49164
	1.886	0,43467	2.042	0,49350	1.853	0,50831

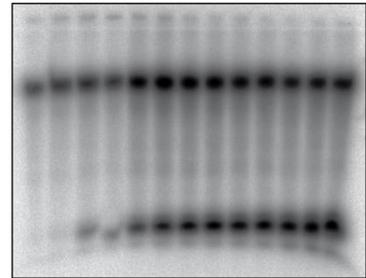
15 mM KCl Messung 1



15 mM KCl Messung 2

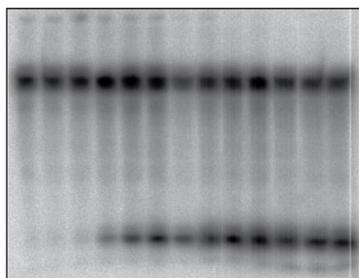


15 mM KCl Messung 3

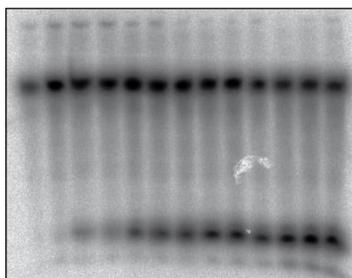


45 mM KCl	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,03275	0	0,03839	0	0,04696
	5	0,03287	5	0,02814	5	0,02851
	15	0,04205	20	0,08615	18	0,08456
	31	0,09410	30	0,10454	30	0,10105
	60	0,17983	60	0,21788	60	0,18832
	120	0,29290	120	0,27528	124	0,27307
	180	0,32975	181	0,31890	180	0,31506
	302	0,37995	300	0,36931	300	0,36819
	420	0,42798	424	0,39650	421	0,38279
	600	0,41915	601	0,40842	602	0,37816
	1.491	0,49680	1.428	0,48688	1.451	0,44689
	1.688	0,49565	1.742	0,51361	1.631	0,45439
	1.886	0,50313	2.042	0,50815	1.853	0,44093

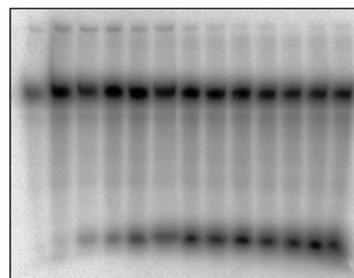
45 mM KCl Messung 1



45 mM KCl Messung 2

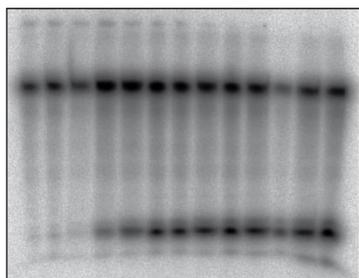


45 mM KCl Messung 3

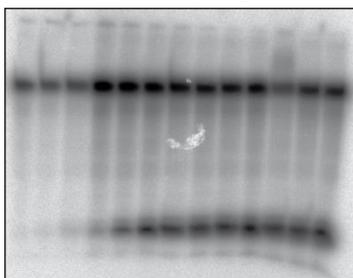


100 mM KCl	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,02827	0	0,02938	0	0,03454
	5	0,02492	5	0,04244	5	0,03388
	15	0,02929	20	0,05791	18	0,05000
	31	0,06266	30	0,05548	30	0,05912
	60	0,18885	60	0,14252	60	0,14374
	120	0,29370	120	0,27168	124	0,28151
	180	0,34053	181	0,31700	180	0,30089
	302	0,37132	300	0,35667	300	0,39250
	420	0,39528	424	0,37640	421	0,38211
	600	0,41479	601	0,40728	602	0,39276
	1.491	0,45628	1.428	0,47723	1.451	0,42402
	1.688	0,46685	1.742	0,42862	1.631	0,40885
	1.886	0,48082	2.042	0,43720	1.853	0,41494

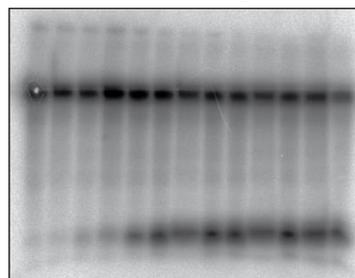
100 mM KCl Messung 1



100 mM KCl Messung 2

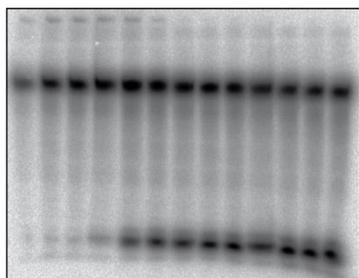


100 mM KCl Messung 3

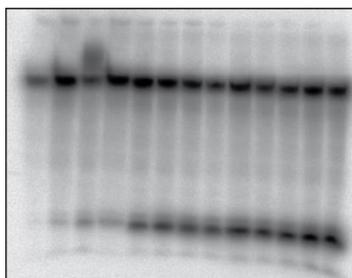


500 mM KCl	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,02205	0	0,04250	0	0,02241
	5	0,02595	5	0,03164	5	0,02704
	15	0,04191	20	0,06860	18	0,04916
	31	0,09972	30	0,07932	30	0,05274
	60	0,19064	60	0,16480	60	0,15192
	120	0,29947	120	0,27778	124	0,24404
	180	0,33755	181	0,31407	180	0,32282
	302	0,38636	300	0,37633	300	0,33890
	420	0,42738	424	0,39128	421	0,37754
	600	0,43047	601	0,39049	602	0,38653
	1.491	0,48732	1.428	0,43100	1.451	0,42235
	1.688	0,48960	1.742	0,44398	1.631	0,39257
	1.886	0,48426	2.042	0,44958	1.853	0,40708

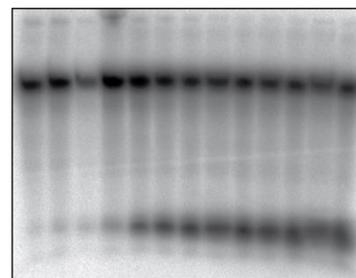
500 mM KCl Messung 1



500 mM KCl Messung 2



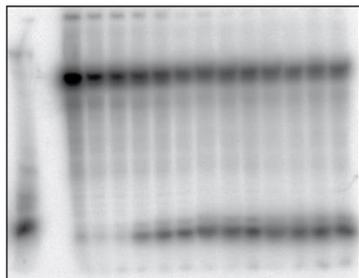
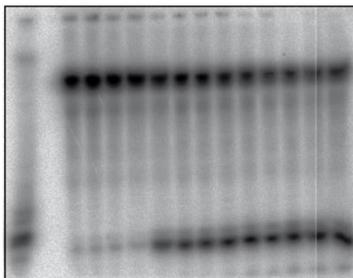
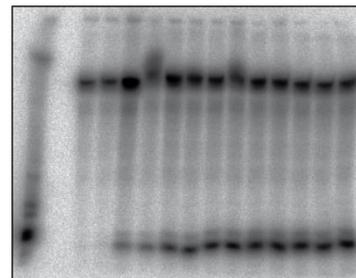
500 mM KCl Messung 3



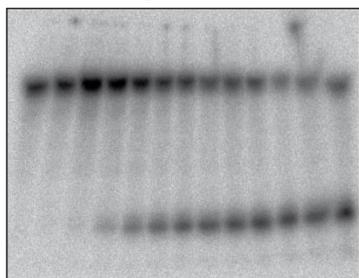
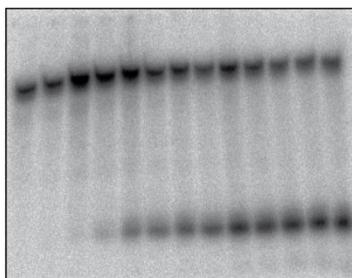
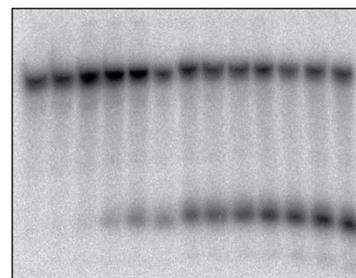
### 8.1.1.4.2 Effekt divalenter Metall-Ionen auf den Reaktionsweg des CPEB3 Ribozyms

#### 8.1.1.4.2.1 Metall-Promiskuität der Ribozyme CPEB3 und HDV

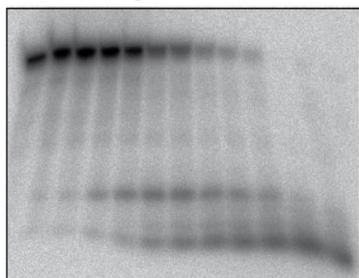
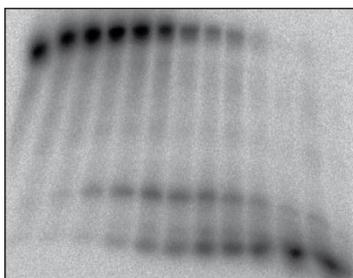
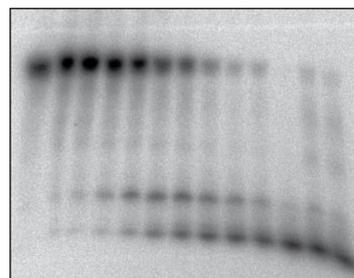
10 mM MgCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
0	0,01798	0,01798	0	0,02633	0	0,02614
5	0,02367	0,02367	5	0,02628	5	0,03061
15	0,02585	0,02585	15	0,03388	15	0,07286
32	0,12400	0,12400	30	0,04667	30	0,13594
60	0,21775	0,21775	90	0,25391	60	0,23854
120	0,30418	0,30418	121	0,28798	120	0,31038
180	0,35281	0,35281	180	0,32668	180	0,35474
300	0,38742	0,38742	301	0,40059	301	0,40741
420	0,44336	0,44336	422	0,42638	420	0,43379
600	0,42771	0,42771	600	0,45557	600	0,44596
1.453	0,49435	0,49435	1.449	0,49183	1.511	0,47395
1.658	0,49567	0,49567	1.744	0,53916	1.703	0,47310
2.016	0,50106	0,50106	2.043	0,52270	1.815	0,48342

10 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 110 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 210 mM MgCl<sub>2</sub> Messung 3

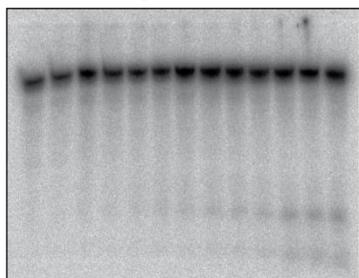
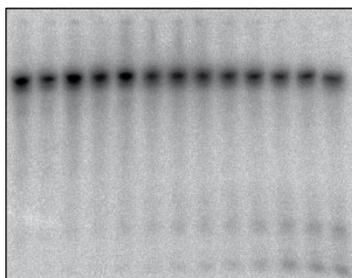
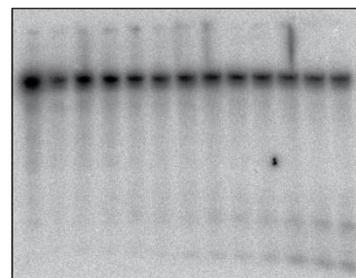
10 mM CaCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,00000	0	0,00000	0	0,00000
	5	0,00000	5	0,00463	5	0,00147
	15	0,01298	15	0,01462	15	0,01440
	30	0,06032	30	0,05686	30	0,06288
	63	0,15418	63	0,15699	63	0,14435
	121	0,25786	121	0,25621	121	0,21258
	181	0,33628	181	0,32526	181	0,32593
	300	0,41852	300	0,41134	300	0,38234
	420	0,44184	420	0,44482	420	0,43570
	600	0,53178	600	0,49727	600	0,46857
	1.453	0,65363	1.453	0,59078	1.453	0,55775
	1.673	0,60232	1.673	0,59264	1.673	0,55391
	1.978	0,61747	1.978	0,57422	1.978	0,53837

10 mM CaCl<sub>2</sub> Messung 110 mM CaCl<sub>2</sub> Messung 210 mM CaCl<sub>2</sub> Messung 3

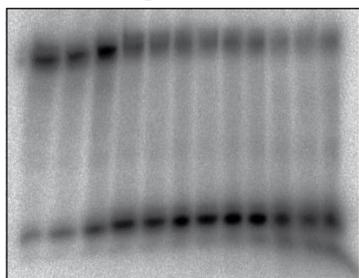
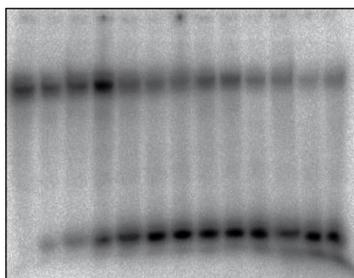
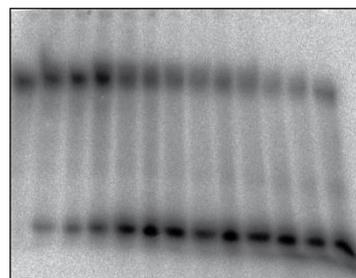
10 mM SrCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,05640	0	0,05697	0	0,12206
	5	0,06617	5	0,08001	5	0,09208
	15	0,06712	15	0,07799	15	0,09443
	31	0,10977	31	0,12399	31	0,15369
	60	0,18919	60	0,19954	60	0,25780
	120	0,38543	120	0,38076	120	0,44846
	179	0,55383	179	0,58442	179	0,58334
	300	0,74910	300	0,79136	300	0,77163
	420	0,84821	420	0,83264	420	0,87528
	600	0,91258	600	0,93198	600	0,89533
	1.442	0,97622	1.442	0,98316	1.442	0,96061
	1.673	0,97124	1.673	0,97733	1.673	0,93809
			1.948	0,98651	1.948	0,95826

10 mM SrCl<sub>2</sub> Messung 110 mM SrCl<sub>2</sub> Messung 210 mM SrCl<sub>2</sub> Messung 3

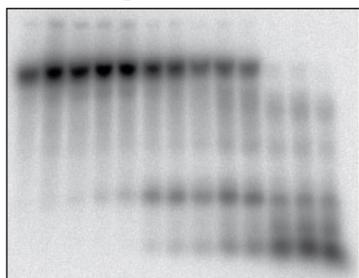
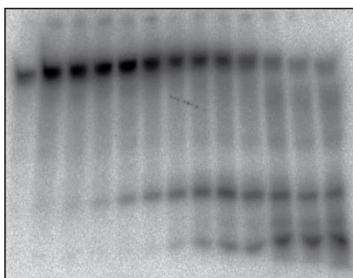
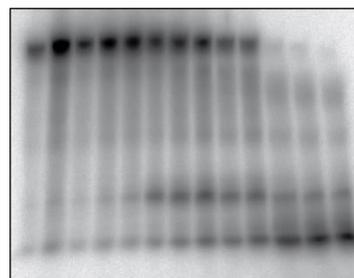
10 mM BaCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,06868	0	0,06374	0	0,05558
	5	0,06394	5	0,07482	5	0,08891
	15	0,05494	15	0,06259	15	0,07250
	30	0,05966	30	0,07885	30	0,08516
	63	0,07175	63	0,08602	63	0,10681
	121	0,07611	121	0,11272	121	0,11831
	181	0,06100	181	0,10864	181	0,10752
	300	0,06887	300	0,13521	300	0,12032
	420	0,07966	420	0,15317	420	0,13506
	600	0,08997	600	0,17178	600	0,15607
	1.453	0,11684	1.453	0,24712	1.453	0,21026
	1.673	0,12687	1.673	0,26086	1.673	0,24212
	1.978	0,13246	1.978	0,26479	1.978	0,26549

10 mM BaCl<sub>2</sub> Messung 110 mM BaCl<sub>2</sub> Messung 210 mM BaCl<sub>2</sub> Messung 3

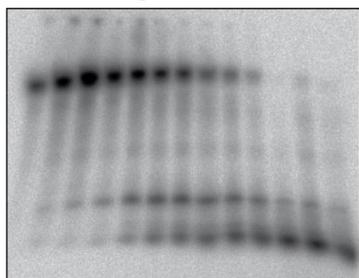
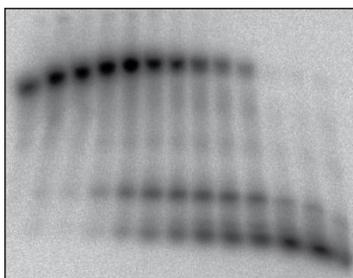
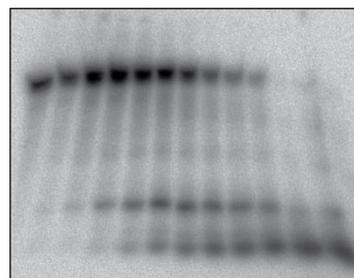
10 mM MnCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,13331	0	0,02967	0	0,01601
	6	0,08981	6	0,12458	6	0,11677
	15	0,20217	15	0,19187	15	0,18533
	30	0,30194	30	0,29378	30	0,29345
	61	0,61292	61	0,58502	61	0,59130
	120	0,71523	120	0,70266	120	0,72443
	183	0,73137	183	0,74534	183	0,73505
	300	0,76716	300	0,76309	300	0,70094
	420	0,79294	420	0,79922	420	0,72654
	558	0,81446	558	0,82474	558	0,84049
	1.457	0,86936	1.457	0,89658	1.457	0,79604
	1.661	0,86353	1.661	0,88300	1.661	0,90227
	1.976	0,82728	1.976	0,87275	1.976	0,86536

10 mM MnCl<sub>2</sub> Messung 110 mM MnCl<sub>2</sub> Messung 210 mM MnCl<sub>2</sub> Messung 3

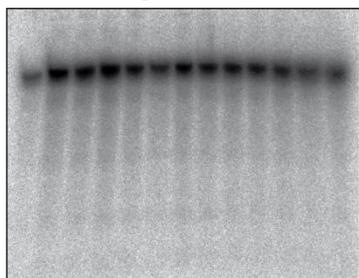
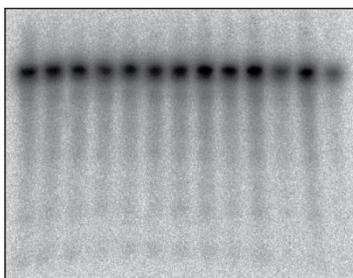
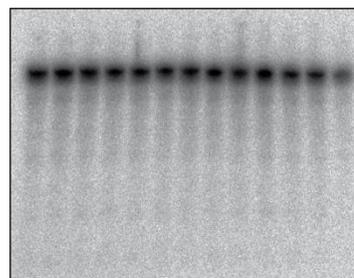
1 mM ZnCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,06980	0	0,04939	0	0,10031
	5	0,04378	6	0,02843	6	0,07279
	15	0,04718	15	0,03648	15	0,08309
	32	0,05019	31	0,04274	31	0,08243
	60	0,06754	60	0,05598	60	0,10190
	120	0,18309	122	0,08203	120	0,23883
	181	0,25669	179	0,16356	182	0,30936
	300	0,36706	252	0,27338	302	0,41723
	422	0,49615	420	0,39043	422	0,52119
	552	0,62376	556	0,45827	600	0,66891
	1.547	0,96836	1.422	0,75160	1.481	0,96430
	1.681	0,98694	1.732	0,81567	1.703	0,98528
	1.984	0,99737	1.980	0,84670	1.980	0,99262

1 mM ZnCl<sub>2</sub> Messung 11 mM ZnCl<sub>2</sub> Messung 21 mM ZnCl<sub>2</sub> Messung 3

10 mM ZnCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,05955	0	0,05554	0	0,05244
	5	0,04859	5	0,05216	5	0,07537
	15	0,04619	15	0,05281	15	0,05313
	31	0,09453	31	0,09274	31	0,09604
	60	0,20067	60	0,18159	60	0,17948
	120	0,37466	120	0,33171	120	0,30213
	179	0,48709	179	0,46754	179	0,43495
	300	0,66685	300	0,62095	300	0,64067
	420	0,79277	420	0,77224	420	0,76361
	600	0,91260	600	0,87153	600	0,86959
	1.442	0,99125	1.442	0,98187	1.442	0,98302
	1.673	0,98065	1.673	0,98784	1.673	0,97303
	1.948	0,98596	1.948	0,98048	1.948	0,05244

10 mM ZnCl<sub>2</sub> Messung 110 mM ZnCl<sub>2</sub> Messung 210 mM ZnCl<sub>2</sub> Messung 3

10 mM CuCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,01453	0	0,00609	0	0,00481
	5	0,02692	5	0,01014	5	0,01973
	15	0,02075	15	0,01138	15	0,01199
	30	0,01436	30	0,01058	30	0,01880
	62	0,01513	62	0,01519	62	0,01559
	121	0,01841	121	0,01476	121	0,01356
	182	0,03718	182	0,03152	182	0,01859
	302	0,05429	302	0,05637	302	0,03476
	418	0,07535	418	0,08349	418	0,05176
	551	0,08727	551	0,13597	551	0,11194
	1.486	0,24331	1.486	0,56959	1.486	0,04941
	1.634	0,72804	1.634	0,46377		
	1.922	0,24898	1.922	0,76626		

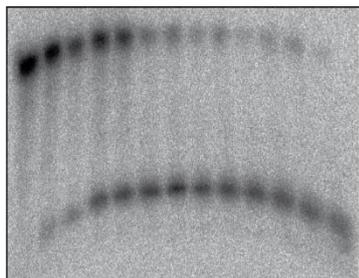
10 mM CuCl<sub>2</sub> Messung 110 mM CuCl<sub>2</sub> Messung 210 mM CuCl<sub>2</sub> Messung 3

### 8.1.1.4.2.2 Die Ionen $Mn^{2+}$ und $Zn^{2+}$ - relevante Faktoren im CPEB3 Ribozym Mechanismus?

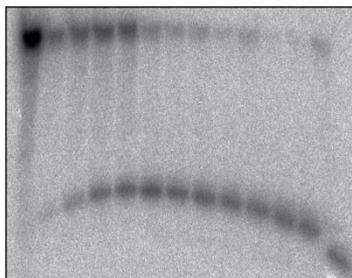
#### 8.1.1.4.2.2.1 $Mn^{2+}$ -Messungen

pH 5	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$
	0	0,09764	0	0,05119	0	0,01015
	5	0,17284	5	0,18521	5	0,06159
	15	0,28198	15	0,25844	15	0,13587
	32	0,36392	35	0,3424	30	0,20487
	60	0,45549	60	0,41545	60	0,31976
	120	0,71259	124	0,70315	120	0,58514
	184	0,75261	180	0,7627	184	0,69049
	314	0,82894	304	0,80532	300	0,69478
	432	0,81887	422	0,86763	427	0,75047
	546	0,90796	547	0,82565	557	0,75717
	1.430	0,86745	1.493	0,92557	1.483	0,78012
	1.633	0,85189	1.665	0,92536	1.757	0,75859
	1.975	0,94746	1.987	0,82333	1.967	0,70949

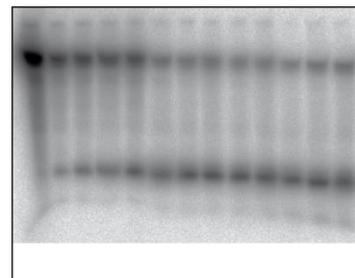
pH 5 Messung 1



pH 5 Messung 2

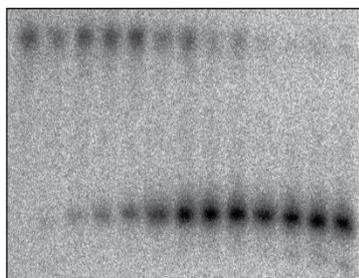


pH 5 Messung 3

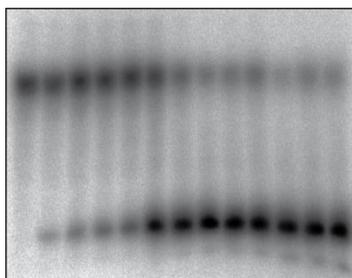


pH 5,5	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,33932	0	0,01712	0	0,04731
	5	0,46764	5	0,08815	5	0,11479
	15	0,41428	15	0,13958	15	0,17778
	35	0,46162	30	0,20531	30	0,25300
	60	0,52133	60	0,28003	61	0,63538
	124	0,76741	120	0,61561	118	0,75947
	180	0,79765	184	0,77566	184	0,81213
	304	0,89555	557	0,83843	316	0,84105
	422	0,89764	1.483	0,90209	415	0,84941
	547	0,93949	1.757	0,87423	545	0,83717
	1.493	0,96811	1.967	0,88454	1.493	0,88572
	1.665	0,95955				
	1.987	0,97628				

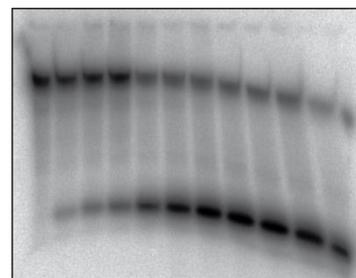
pH 5,5 Messung 1



pH 5,5 Messung 2

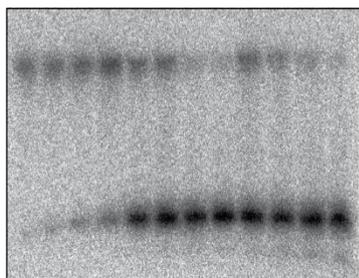


pH 5,5 Messung 3

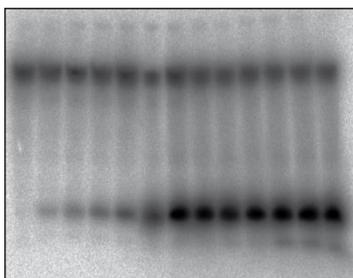


pH 6	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,31778	0	0,01415	0	0,03167
	5	0,36470	5	0,07269	5	0,09859
	15	0,38986	15	0,13319	15	0,15810
	35	0,43516	30	0,20163	30	0,22569
	60	0,75401	60	0,28360	61	0,58387
	124	0,79110	120	0,62570	118	0,65232
	180	0,91612	184	0,70853	180	0,71294
	304	0,94138	300	0,72918	316	0,74679
	422	0,81047	427	0,72641	415	0,79316
	547	0,87071	557	0,73809	1.433	0,80571
	1.493	0,92245	1.483	0,77704	1.700	0,79968
	1.665	0,96213	1.757	0,77801	1.848	0,78807
			1.967	0,77964		

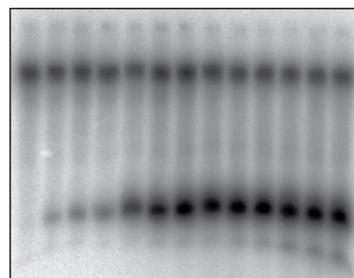
pH 6 Messung 1



pH 6 Messung 2

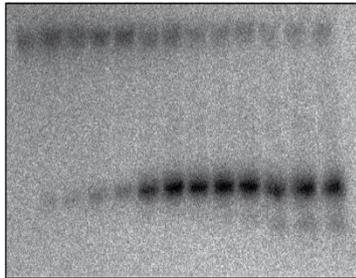


pH 6 Messung 3

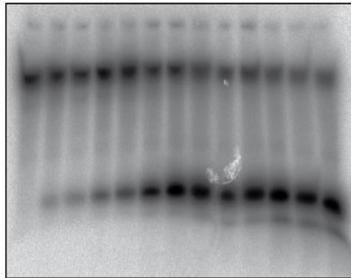


pH 6,5	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>	Zeit [min]	<i>f</i> <sub>gespalten</sub>
	0	0,42698	0	0,02996	0	0,03113
	5	0,34765	5	0,08319	5	0,10130
	15	0,38340	15	0,12730	15	0,16588
	60	0,41798	30	0,18872	30	0,25300
	124	0,63976	60	0,27248	61	0,58711
	180	0,70708	120	0,57878	118	0,70441
	304	0,74748	184	0,70240	180	0,63822
	422	0,79111	300	0,72297	316	0,68243
	547	0,79270	427	0,71690	415	0,71694
	1.493	0,80379	557	0,75190	545	0,70366
	1.665	0,82823	1.483	0,82430	1.433	0,78482
	1.987	0,81727	1.757	0,83128	1.700	0,78556
			1.967	0,83488		

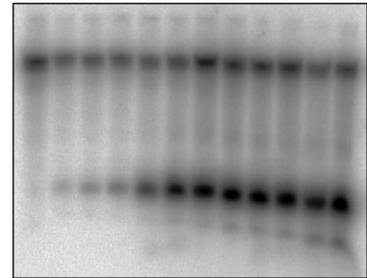
pH 6,5 Messung 1



pH 6,5 Messung 2



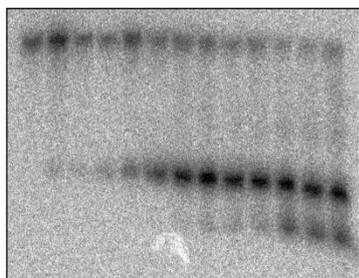
pH 6,5 Messung 3



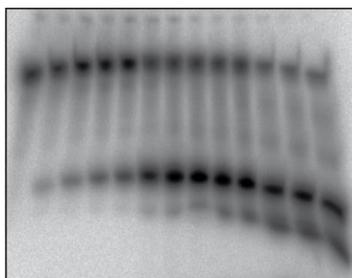
pH 7 siehe Kapitel 8.1.1.4.2.1.

pH 7,5	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,05070	0	0,22706	0	0,03159
	5	0,12768	5	0,20299	5	0,12330
	15	0,16994	15	0,34652	15	0,18554
	30	0,22038	35	0,44692	30	0,25477
	60	0,31405	60	0,44984	61	0,55560
	120	0,63844	124	0,69320	180	0,59406
	184	0,73965	180	0,76074	316	0,65937
	300	0,77384	304	0,80958	415	0,67060
	427	0,78948	422	0,84615	545	0,70298
	557	0,79910	547	0,85241	1.433	0,80290
	1.483	0,88307	1.493	0,92413	1.700	0,80808
	1.757	0,90802	1.665	0,92404	1.848	0,80815
	1.967	0,90982	1.987	0,89392		

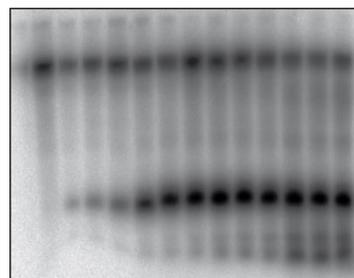
pH 7,5 Messung 1



pH 7,5 Messung 2

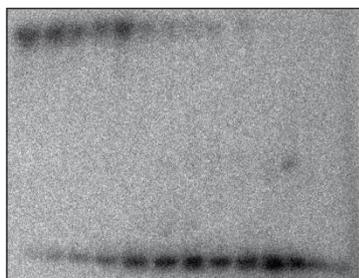


pH 7,5 Messung 3

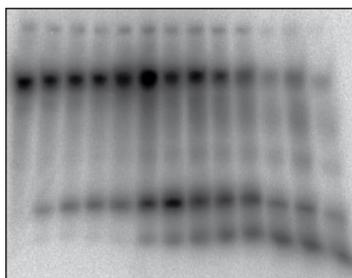


pH 8	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,08024	0	0,02475	0	0,03259
	5	0,16672	5	0,07638	5	0,10753
	15	0,29746	15	0,12313	15	0,18567
	35	0,44974	30	0,15702	30	0,23551
	60	0,63381	60	0,15657	61	0,55785
	124	0,82208	120	0,23898	118	0,77842
	180	0,88808	184	0,50510	180	0,78188
	304	0,89838	300	0,44737	316	0,84286
	422	0,91706	427	0,56320	415	0,87802
	547	0,94544	557	0,64300	545	0,90479
	1.493	0,95448	1.483	0,81350	1.433	0,98116
	1.665	0,92924	1.757	0,78137	1.700	0,98658
	1.987	0,90861	1.967	0,86082	1.848	0,98762

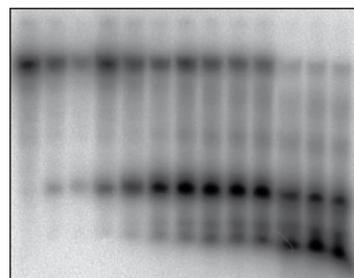
pH 8 Messung 1



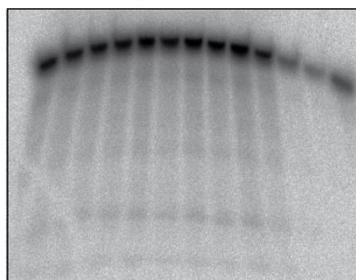
pH 8 Messung 2



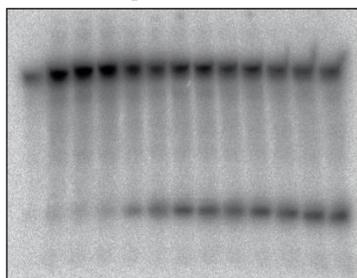
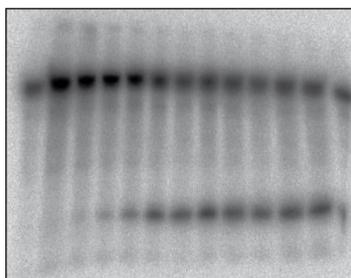
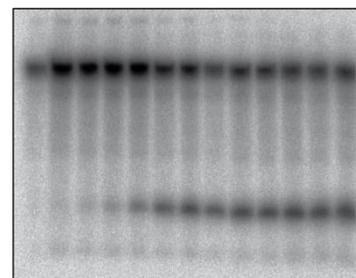
pH 8 Messung 3



0 mM		Messung 1	
MnCl <sub>2</sub>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	
	0	0,05406	
	5	0,10600	
	15	0,07479	
	30	0,05070	
	60	0,04541	
	120	0,04915	
	181	0,04674	
	286	0,04797	
	419	0,04936	
	544	0,04935	
	1.439	0,04576	
	1.649	0,05632	
	1.929	0,03881	

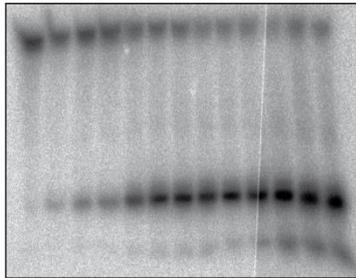
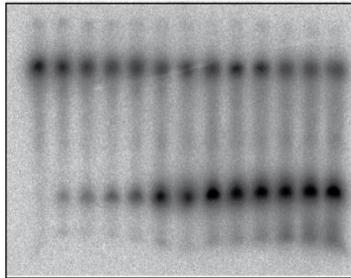
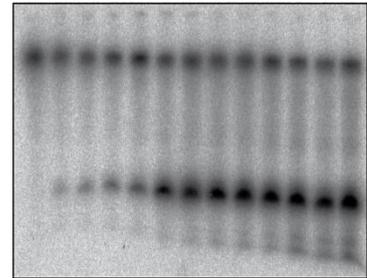
0 mM MnCl<sub>2</sub>

1 mM		Messung 1		Messung 2		Messung 3	
MnCl <sub>2</sub>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,09116	0	0,07716	0	0,08266	
	5	0,04689	5	0,04730	5	0,04918	
	15	0,04843	15	0,05568	15	0,05586	
	30	0,06148	30	0,07055	30	0,07068	
	60	0,11281	57	0,11776	57	0,10789	
	120	0,20502	124	0,24950	124	0,22916	
	181	0,25383	185	0,30508	185	0,28244	
	286	0,27099	256	0,35274	256	0,32658	
	419	0,29431	424	0,36078	424	0,34621	
	544	0,30896	554	0,38399	554	0,36811	
	1.439	0,36017	1.447	0,41631	1.447	0,41305	
	1.649	0,38479	1.757	0,45080	1.757	0,42200	
	1.929	0,38113	2.040	0,22425	2.040	0,42196	

1 mM MnCl<sub>2</sub> Messung 11 mM MnCl<sub>2</sub> Messung 21 mM MnCl<sub>2</sub> Messung 3

10 mM MnCl<sub>2</sub> siehe Kapitel 8.1.1.4.2.1.

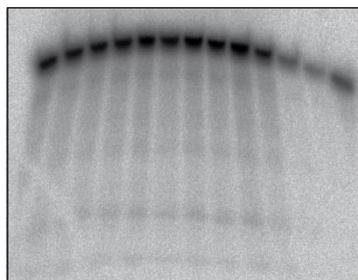
100 mM MnCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,09580	0	0,09577	0	0,09770
	5	0,20912	5	0,16720	5	0,19099
	15	0,25972	15	0,25327	15	0,26669
	30	0,30860	30	0,33207	30	0,32106
	60	0,58030	57	0,39997	57	0,37848
	120	0,71138	124	0,71322	124	0,71227
	181	0,76697	185	0,70185	185	0,70903
	286	0,80716	256	0,75826	256	0,74603
	419	0,80812	424	0,73043	424	0,74679
	544	0,83941	554	0,75549	554	0,74779
	1.439	0,91055	1.447	0,80068	1.447	0,80448
	1.649	0,85601	1.757	0,81519	1.757	0,81389
	1.929	0,88078	2.040	0,82492	2.040	0,80763

100 mM MnCl<sub>2</sub> Messung 1100 mM MnCl<sub>2</sub> Messung 2100 mM MnCl<sub>2</sub> Messung 3

8.1.1.4.2.2.2 Zn<sup>2+</sup>-Messungen

Ohne Metall	Messung 1	
	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$
	0	0,05406
	5	0,10600
	15	0,07479
	30	0,05070
	60	0,04541
	120	0,04915
	181	0,04674
	286	0,04797
	419	0,04936
	544	0,04935
	1.439	0,04576
	1.649	0,05632
	1.929	0,03881

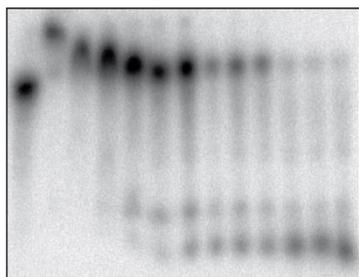
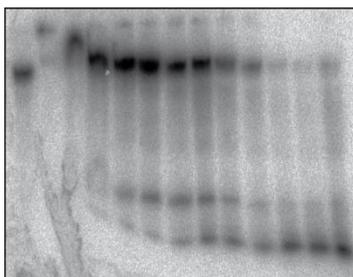
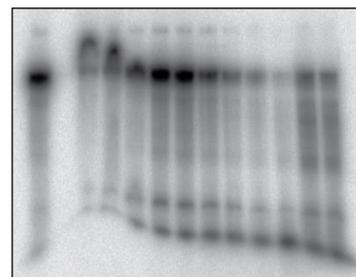
Ohne Metall



0 mM ZnCl<sub>2</sub> siehe Kapitel 8.1.1.4.2.2.1.

1 und 10 mM ZnCl<sub>2</sub> siehe Kapitel 8.1.1.4.2.1.

100 mM ZnCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$
	0	0,06636	0	0,14748	0	0,08352
	5	0,10237	6	0,24104	15	0,07080
	15	0,07265	15	0,14282	31	0,07152
	32	0,06278	31	0,06907	60	0,16202
	60	0,10139	60	0,08815	120	0,16649
	120	0,14157	122	0,11909	182	0,19864
	181	0,18043	179	0,20291	302	0,32010
	300	0,41138	252	0,25177	422	0,47623
	422	0,39828	420	0,41741	600	0,63383
	552	0,48296	556	0,54017	1.481	0,84322
	1.547	0,81108	1.422	0,88767	1.703	0,61439
	1.681	0,86654	1.732	0,93227		
	1.984	0,90874	1.980	0,90111		

100 mM ZnCl<sub>2</sub> Messung 1100 mM ZnCl<sub>2</sub> Messung 2100 mM ZnCl<sub>2</sub> Messung 3

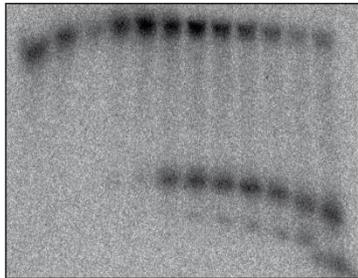
### 8.1.1.4.2.3 Kinetiken mit Ionenmischungen

1 mM  $\text{MgCl}_2$  siehe Kapitel 8.1.1.4.1.

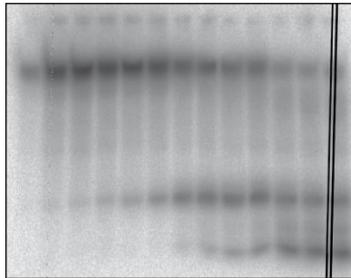
1 und 10 mM  $\text{ZnCl}_2$  siehe Kapitel 8.1.1.4.2.1.

10 mM $\text{MgCl}_2$ und 1 mM $\text{ZnCl}_2$	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$
	0	0,22945	0	0,05944	0	0,09093
	5	0,24432	6	0,05443	5	0,08710
	15	0,34724	15	0,03063	15	0,09221
	32	0,22107	31	0,04568	31	0,11679
	60	0,21097	60	0,06174	60	0,13128
	120	0,40641	122	0,09801	120	0,35091
	184	0,46241	179	0,24332	182	0,39988
	314	0,52707	252	0,36878	302	0,45136
	432	0,59997	420	0,44735	422	0,46977
	546	0,65118	556	0,50036	600	0,50128
	1.430	0,76169	1.422	0,72309	1.481	0,59149
	1.633	0,85833	1.732	0,78516	1.703	0,62903
	1.975	0,22945	1.980	0,61622	1.980	0,64908

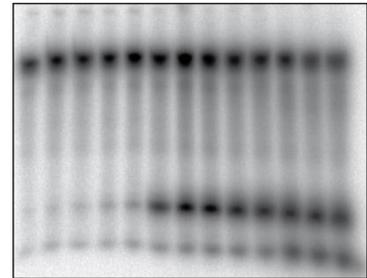
10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 mM  $\text{ZnCl}_2$   
Messung 1



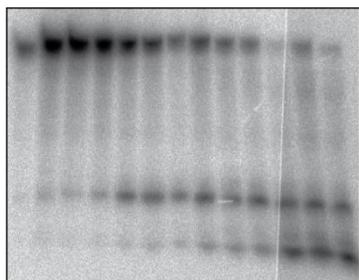
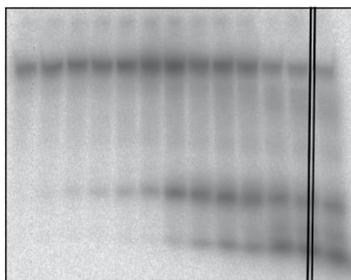
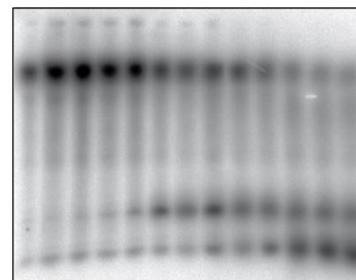
10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 mM  $\text{ZnCl}_2$   
Messung 2



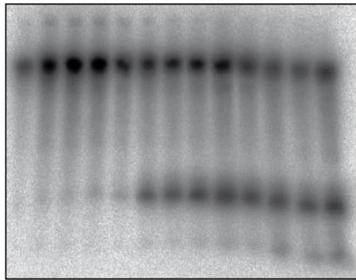
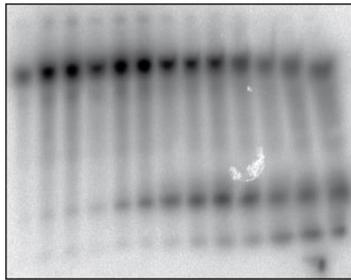
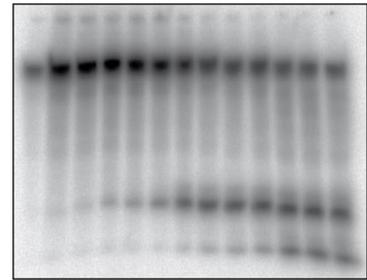
10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 mM  $\text{ZnCl}_2$   
Messung 3



1 mM MgCl <sub>2</sub> und 1 mM ZnCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,12780	0	0,07437	0	0,09429
	5	0,06400	6	0,05542	5	0,07070
	15	0,06489	15	0,05814	15	0,07363
	30	0,08601	31	0,06808	31	0,08550
	60	0,19979	60	0,08293	60	0,11408
	120	0,29887	122	0,11010	120	0,30125
	181	0,39904	179	0,27512	182	0,35913
	286	0,43214	252	0,44933	302	0,45384
	419	0,51970	420	0,52041	422	0,46959
	544	0,66219	556	0,58729	600	0,57497
	1.439	0,92291	1.422	0,80372	1.481	0,77506
	1.649	0,84821	1.732	0,95043	1.703	0,82859
	1.929	0,90582	1.980	0,27776	1.980	0,84387

1 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM ZnCl<sub>2</sub>  
Messung 11 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM ZnCl<sub>2</sub>  
Messung 21 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM ZnCl<sub>2</sub>  
Messung 3

1 mM MgCl <sub>2</sub> und 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,03630	0	0,06439	0	0,05062
	5	0,02333	6	0,03152	6	0,02333
	15	0,02236	15	0,03128	15	0,02454
	32	0,02471	31	0,04114	31	0,03384
	60	0,04024	60	0,05395	60	0,05132
	120	0,19547	122	0,08267	122	0,08388
	181	0,27075	179	0,17689	179	0,19495
	300	0,32502	252	0,27177	252	0,29412
	422	0,34270	420	0,34087	420	0,36329
	552	0,39123	556	0,37982	556	0,40718
	1.547	0,47226	1.422	0,53376	1.422	0,54703
	1.681	0,48617	1.732	0,59093	1.732	0,58666
	1.984	0,50197	1.980	0,58480	1.980	0,58883

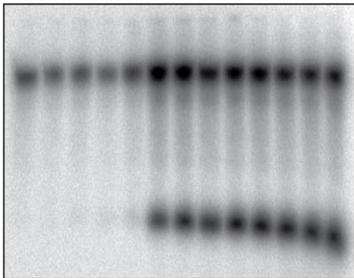
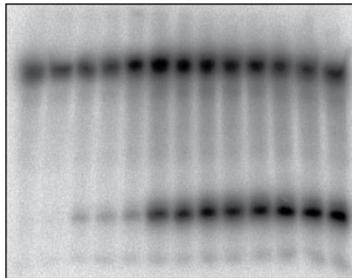
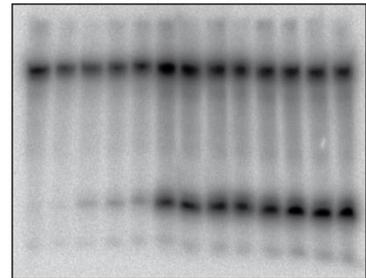
1 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>  
Messung 11 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>  
Messung 21 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>  
Messung 3

1 mM MgCl<sub>2</sub> siehe Kapitel 8.1.1.4.1.

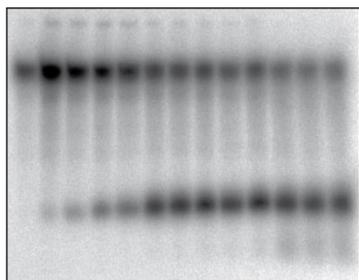
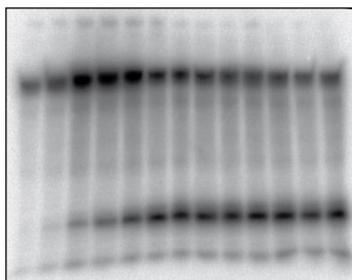
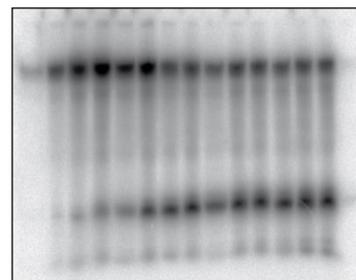
1 mM MnCl<sub>2</sub> siehe Kapitel 8.1.1.4.2.2.1.

10 mM MgCl<sub>2</sub> siehe Kapitel 8.1.1.4.2.1.

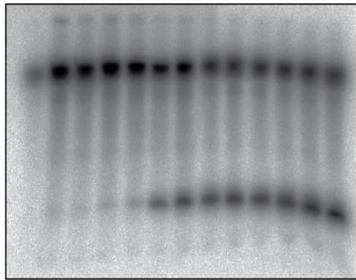
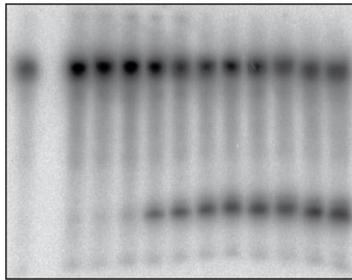
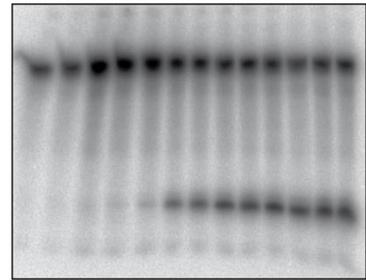
10 mM MgCl <sub>2</sub> und 1 mM MnCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,11813	0	0,10955	0	0,08362
	5	0,15531	5	0,10377	5	0,12438
	15	0,14322	15	0,15348	15	0,15357
	32	0,16921	32	0,15876	32	0,16456
	60	0,13261	60	0,14497	60	0,16583
	120	0,28902	120	0,32524	120	0,34110
	181	0,36987	183	0,39670	183	0,40934
	300	0,41478	316	0,44426	316	0,47503
	422	0,43962	430	0,47312	430	0,50424
	552	0,45718	600	0,48888	600	0,51862
	1.547	0,51967	1.521	0,55490	1.521	0,57390
	1.681	0,52822	1.710	0,56627	1.710	0,56409
	1.984	0,53594	2.040	0,57628	2.040	0,57221

10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM MnCl<sub>2</sub>  
Messung 110 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM MnCl<sub>2</sub>  
Messung 210 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM MnCl<sub>2</sub>  
Messung 3

1 mM MgCl <sub>2</sub> und 1 mM MnCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,07305	0	0,09756	0	0,09000
	5	0,04137	5	0,09232	5	0,10053
	15	0,09003	15	0,11696	15	0,12495
	32	0,16450	31	0,17487	31	0,17238
	60	0,22266	60	0,26140	60	0,24306
	120	0,45035	120	0,46658	120	0,46006
	181	0,50577	182	0,49328	182	0,49443
	300	0,52348	302	0,52931	302	0,49797
	422	0,53618	422	0,55014	422	0,53318
	552	0,55674	600	0,57024	600	0,56514
	1.547	0,62930	1.481	0,60923	1.481	0,60618
	1.681	0,63778	1.703	0,61763	1.703	0,60606
	1.984	0,64714	1.980	0,64152	1.980	0,60489

1 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM MnCl<sub>2</sub>  
Messung 11 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM MnCl<sub>2</sub>  
Messung 21 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM MnCl<sub>2</sub>  
Messung 3

1 mM MgCl <sub>2</sub> und 0,1 mM MnCl <sub>2</sub>	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>	Zeit [min]	<i>f<sub>gespalten</sub></i>
	0	0,03227	0	0,09195	0	0,06177
	5	0,01767	5	0,00000	5	0,06061
	15	0,01914	15	0,04708	15	0,04218
	32	0,02121	32	0,04914	32	0,04857
	60	0,02788	60	0,06193	60	0,05953
	120	0,11580	120	0,16398	120	0,16692
	181	0,18680	183	0,26183	183	0,22672
	300	0,26471	316	0,32086	316	0,30631
	422	0,31014	430	0,33547	430	0,33007
	552	0,32793	600	0,38157	600	0,38026
	1.547	0,38263	1.521	0,42426	1.521	0,42714
	1.681	0,40250	1.710	0,45042	1.710	0,43336
	1.984	0,42761	2.040	0,45693	2.040	0,41801

1 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>  
Messung 11 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>  
Messung 21 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>  
Messung 3

## 8.1.2 Studien mit dem CPEB3 Ribozym in seiner nativen Länge auf der Basis der BODIPY-Fluoreszenz

### 8.1.2.1 Untersuchung der Spaltungsaktivität des CPEB3 Ribozyms bei vorausgehender Generierung via T7 Transkription mit anschließender kinetischer Untersuchung

10 mM MgCl <sub>2</sub>	Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$	$f_{\text{gespalten}}$	$f_{\text{gespalten}}$	$\bar{\varnothing} f_{\text{gespalten}}$	Error
	0	0,75739	0,72546	0,88213	0,78833	0,08279
	5	0,73595	0,70560	0,77434	0,73863	0,03445
	16	0,72851	0,71647	0,76599	0,73699	0,02582
	30	0,73554	0,73222	0,76783	0,74520	0,01967
	58	0,74552	0,73276	0,78282	0,75370	0,02602
	117	0,74323	0,74673	0,76627	0,75208	0,01241
	189	0,76619	0,79804	0,78053	0,78159	0,01595
	290	0,83485	0,80458	0,85748	0,83230	0,02654
	417	0,83025	0,85187	0,87001	0,85071	0,01991
	532	0,86319	0,85017	0,88402	0,86579	0,01707
	1.428	0,90168	0,86282	0,90145	0,88865	0,02237
	1.641	0,89034	0,87534	0,90776	0,89115	0,01623
	1.857	0,80561	0,88138	0,86922	0,85207	0,04069

10 mM MnCl <sub>2</sub>	Zeit [min]	Messung 1 $f_{\text{gespalten}}$	Messung 2 $f_{\text{gespalten}}$	Messung 3 $f_{\text{gespalten}}$	$\bar{\varnothing} f_{\text{gespalten}}$	Error
	0	0,69109	0,72381	0,75530	0,72340	0,03211
	5	0,69692	0,71156	0,77246	0,72698	0,04006
	15	0,71220	0,68135	0,75176	0,71510	0,03530
	31	0,70749	0,68513	0,72006	0,70423	0,01769
	61	0,75242	0,72400	0,70943	0,72862	0,02186
	87	0,72975	0,76049	0,73738	0,74254	0,01600
	181	0,71493	0,76419	0,78640	0,75517	0,03658
	358	0,73138	0,74649	0,79126	0,75638	0,03114
	416	0,71708	0,77010	0,51782	0,66834	0,13301
	552	0,72313	0,76148	0,80441	0,76301	0,04066
	1.436	0,70563	0,71919	0,78494	0,73658	0,04242
	1.671	0,69579	0,70628	0,79199	0,73135	0,05277
	1.983	0,81474	0,74319	0,81838	0,79210	0,04240

---

<b>10 mM ZnCl<sub>2</sub></b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Messung 1 <i>f<sub>gespalten</sub></i></b>	<b>Messung 2 <i>f<sub>gespalten</sub></i></b>	<b>Messung 3 <i>f<sub>gespalten</sub></i></b>	<b>Ø <i>f<sub>gespalten</sub></i></b>	<b>Error</b>
	0	0,68851	0,86515	0,87433	0,80933	0,10474
	5	0,76236	0,90187	0,89784	0,85402	0,07941
	15	0,74579	0,89143	0,88881	0,84201	0,08334
	31	0,78247	0,90704	0,89162	0,86038	0,06790
	61	0,80008	0,97340	0,89464	0,88938	0,08678
	87	0,78436	0,86439	0,88141	0,84339	0,05182
	181	0,78389	0,82698	0,86786	0,82624	0,04199
	358	0,78341	0,85869	0,86444	0,83551	0,04522
	416	0,80516	0,91318	0,85432	0,85755	0,05409
	552	0,81251	0,88493	0,86131	0,85292	0,03693
	1.436	0,84556	0,91028	0,89002	0,88195	0,03311
	1.671	0,85307	0,91187	0,90319	0,88938	0,03174
	1.983	0,87254	0,94380	0,97058	0,92898	0,05068

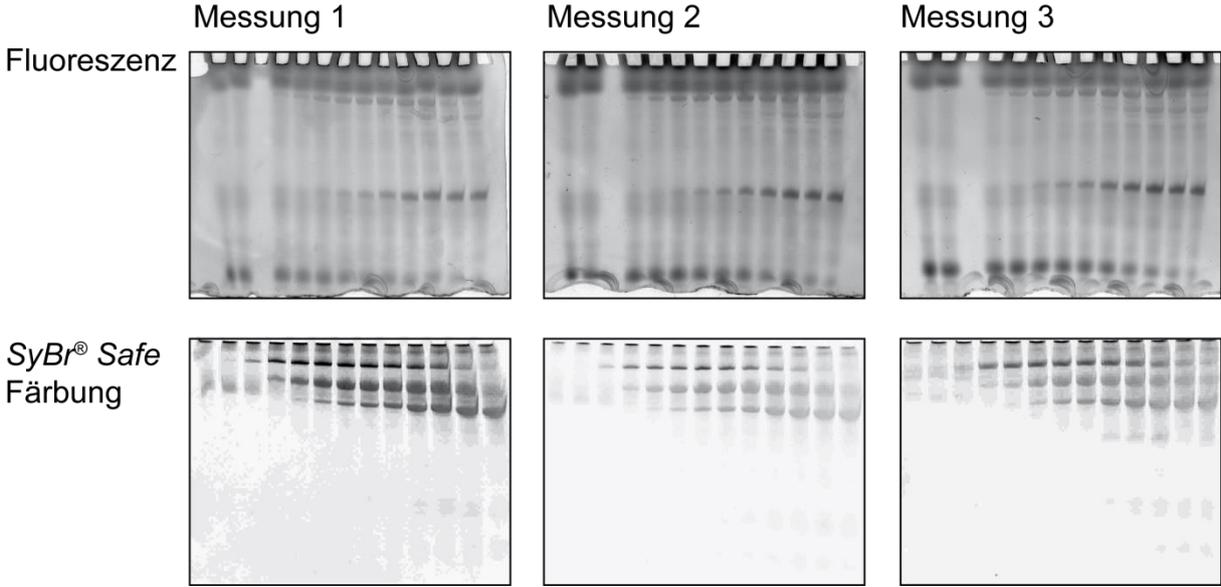
---

8.1.2.2 Entwicklung eines co-transkriptionalen Spaltungssassay auf der Grundlage des UBP dNaM - TPT3<sup>cP</sup>

Messung 1												
Zeit [min]	Rz	Rz*	5'-Produkt	B	Rz - B	Rz* - B	5'-Produkt - B	Faktor $I_{Rz}/I_{5'-Produkt}$	Faktor Rz - B	Korrigierter $I_{Rz}$	$f_{ungespalten}$	Intensität
1	169,3	148,7	185,3	131,7	37,6	17,0	53,6	$1,0^{-03}$	0,06	56,34	0,6688	84,24
16	195,8	171,4	196,6		64,1	39,7	64,9	$1,6^{-02}$	1,06	65,14	0,6108	106,64
33	225,9	180,8	168,8		94,2	49,1	37,1	$3,3^{-02}$	2,58	75,72	0,5175	146,32
60	276,0	236,1	226,7		144,3	104,4	95,0	$6,0^{-02}$	6,20	97,20	0,4962	195,90
90	229,1	173,6	253,0		97,4	41,9	121,3	$9,0^{-02}$	7,98	80,72	0,3662	220,42
122	193,7	160,9	282,8		62,0	29,2	151,1	$1,2^{-01}$	13,59	97,81	0,3192	306,41
180	213,5	168,3	383,9		81,8	36,6	252,2	$1,8^{-01}$	25,20	114,80	0,2797	410,50
300	256,0	197,5	594,0		124,3	65,8	462,3	$3,0^{-01}$	45,39	105,91	0,2030	523,81

Messung 2												
Zeit [min]	Rz	Rz*	5'-Pro- dukt	B	Rz - B	Rz* - B	5'- Produ kt - B	Faktor $I_{Rz}/I_{5'-Produkt}$	Faktor Rz - B	Korrigi erter $I_{Rz}$	$f_{ungespalten}$	Intensi tät
1	137,8	132,1	109,3	81,4	56,4	50,7	27,9	$3,3^{-04}$	0,02	56,38	0,669	84,28
16	147,6	132,6	122,9		66,2	51,2	41,5	$5,3^{-03}$	0,35	65,85	0,6134	107,35
33	159,7	149,6	152,0		78,3	68,2	70,6	$1,1^{-02}$	0,85	77,45	0,5231	148,05
60	184,8	160,4	180,1		103,4	79,0	98,7	$2,0^{-02}$	2,05	101,35	0,5066	200,05
90	170,1	151,8	221,1		88,7	70,4	139,7	$3,0^{-02}$	2,63	86,07	0,3812	225,77
122	192,8	171,3	290,0		111,4	89,9	208,6	$4,0^{-02}$	4,48	106,92	0,3389	315,52
180	221,4	188,0	377,1		140,0	106,6	295,7	$5,9^{-02}$	8,32	131,68	0,3081	427,38
300	232,7	192,2	499,3		151,3	110,8	417,9	$9,9^{-02}$	14,98	136,32	0,2460	554,22

Messung 3												
Zeit [min]	Rz	Rz*	5'-Pro- dukt	B	Rz - B	Rz* - B	5'- Produ kt - B	Faktor $I_{Rz}/I_{5'-Produkt}$	Faktor Rz - B	Korrigi erter $I_{Rz}$	$f_{ungespalten}$	Intensi tät
1	200,2	132,1	183,1	117,8	82,4	65,3	27,2	$6,6^{-04}$	0,05	82,35	0,7517	109,55
16	193,2	132,6	174,0		75,4	56,2	27,0	$1,1^{-02}$	0,80	74,60	0,7343	101,60
33	220,8	149,6	197,8		103,0	80,0	58,6	$2,2^{-02}$	2,24	100,76	0,6323	159,36
60	255,4	160,4	247,4		137,6	129,6	128,5	$4,0^{-02}$	5,45	132,15	0,5070	260,65
90	245,6	151,8	222,3		127,8	104,5	205,8	$5,9^{-02}$	7,59	120,21	0,3687	326,01
122	253,7	171,3	223,4		135,9	105,6	293,3	$8,1^{-02}$	10,94	124,96	0,2988	418,26
180	292,4	188,0	252,6		174,6	134,8	540,0	$1,2^{-01}$	20,74	153,86	0,2217	693,86



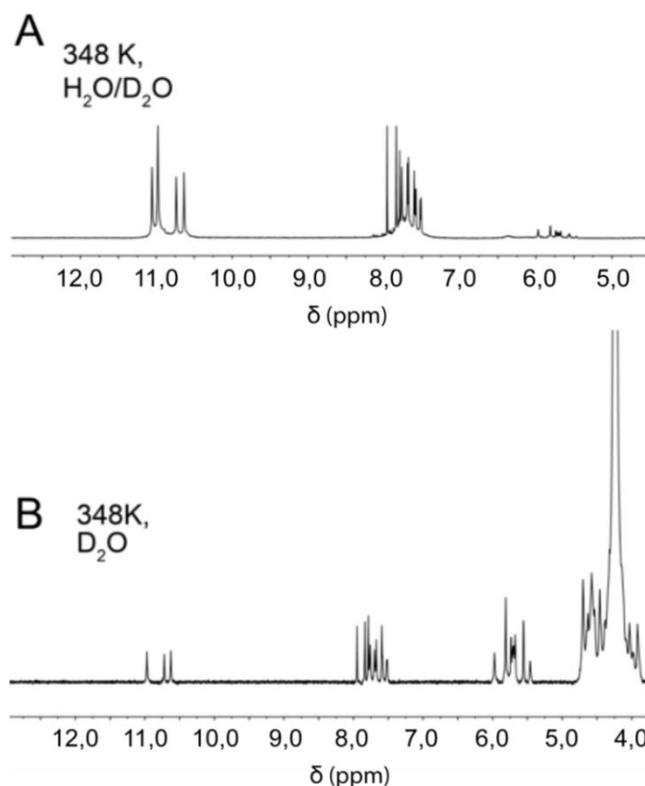
## 8.2 Der G-Quadruplex als strukturelle Besonderheit in einem Ribozym

### 8.2.1 Charakterisierung des G-Quadruplexes

#### 8.2.1.1 Effekte des Porphyrins TMPyP4 auf den G-Quadruplex

Zeit [min]	$f_{\text{gespalten}}$ ohne Porphyrin	$f_{\text{gespalten}}$ mit Porphyrin
5	0,05195	0,08096
15	0,04989	0,08636
30	0,04291	0,08746
62	0,06013	0,08383
122	0,07846	0,09410
183	0,06910	0,09163
249	0,06275	0,08165
420	0,07666	0,09549
555	0,06889	0,09083
1.476	0,10288	0,11086
1.691	0,12232	0,10247
1.932	0,15800	0,11063

### 8.2.2 NMR Spektroskopie von CPEB3 Ribozym Fragmenten



**Abbildung 8.1:** 1D <sup>1</sup>H-NMR Spektren des 5'-AG<sub>5</sub>C<sub>2</sub>-3' (G<sub>5</sub>-8, 680  $\mu$ M RNA, in 50 mM KCl, 25 mM Kaliumphosphat, pH 6,2) in 10 % D<sub>2</sub>O / 90 % H<sub>2</sub>O bei 348 K (A) und 100 % D<sub>2</sub>O bei 348 K (B).

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Diverse Funktionen von ncRNAs .....	15
Abbildung 3.2: Zucker-Puckering des Pentoserings .....	18
Abbildung 3.3: Einfaches kinetisches Modell mit einer einzelnen Säure HA <sup>+</sup> und einer Base B <sup>-</sup> .....	20
Abbildung 3.4: Simulierte Abhängigkeit einer Selbstspaltungsreaktion des WT Hairpin Ribozyms von dem pH-Wert .....	21
Abbildung 3.5: Die Minimumstruktur eines HDV-ähnlichen Ribozyms.....	22
Abbildung 3.6: Allgemeine Strukturen des HDV Ribozyms.....	24
Abbildung 3.7: Reaktionsort der Spaltung im genomischen HDV Ribozym.....	24
Abbildung 3.8: Spaltungsmechanismus des HDV Ribozyms.....	26
Abbildung 3.9: Einfluss von Metall-Ionen auf den HDV Ribozym Mechanismus.....	27
Abbildung 3.10: Sekundärstrukturähnlichkeit zwischen dem HDV und dem Säugetier-CPEB3 Ribozym .....	31
Abbildung 3.11: Vorgeschlagener Spaltungsmechanismus des CPEB3 Ribozyms. ....	33
Abbildung 3.12: Biochemische Untersuchung des Mechanismus des CPEB3 Ribozym .....	33
Abbildung 3.13: Experimenteller Vergleich der beiden kinetischen Methoden zur Untersuchung der CPEB3-Ribozymsspaltung .....	36
Abbildung 3.14: Die alternative Faltung mit der Alt P1 Helix im CPEB3 Ribozym .....	38
Abbildung 3.15: Strukturen in G-Quadruplexen .....	39
Abbildung 3.16: Beispielkurven für G-Quadruplex-Schmelzprozesse .....	42
Abbildung 3.17: Einfluss der TMPyP4 auf einen G-Quadruplex .....	44
Abbildung 3.18: Prinzip der ThT Assays .....	45
Abbildung 3.19: Erwartete Regionen für die chemische Verschiebung bei der <sup>1</sup> H-NMR Spektroskopie mit G-Quadruplex-Strukturen .....	46
Abbildung 3.20: <sup>1</sup> H-NMR-Iminoregion des r(AGGAGGA) <sub>4</sub> Quadruplexes in 10 % D <sub>2</sub> O und nach 12 h in 100 % D <sub>2</sub> O.....	47
Abbildung 3.21: Fluorophor-bindende Aptamere auf Spinach-Basis .....	50
Abbildung 3.22: Fluoreszenz-basierte Detektion der CPEB3 Ribozym Spaltung <i>in cellulose</i> .....	51
Abbildung 3.23: Detektionssystem auf der Grundlage des dNaM - dTPT3 UBPs .....	54
Abbildung 4.1: Aufspaltung des CPEB3 Ribozyms in zwei Stränge .....	56
Abbildung 4.2: Co-transkriptionaler Spaltungsassay auf der Grundlage des UBPs dNaM - TPT3 <sup>CP</sup> mit anschließender Click-Reaktion.....	57
Abbildung 5.1: Rekonstruktion eines transspaltenden CPEB3 Ribozyms .....	60
Abbildung 5.2: Etablierung der kinetischen Untersuchung des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms. ...	62
Abbildung 5.3: Wiederherstellung der Spaltungsaktivität des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms mit der C <sub>57</sub> U Mutation. ....	64
Abbildung 5.4: pH-Raten-Profil des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms.....	67
Abbildung 5.5: Kinetische Untersuchungen des Effekts von Mg <sup>2+</sup> - und K <sup>+</sup> -Ionen auf die Spaltungsaktivität des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms .....	69

Abbildung 5.6: Metall-Promiskuität der Ribozyme HDV und CPEB3 .....	72
Abbildung 5.7: Effekt von $Mn^{2+}$ auf die Spaltung des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms.....	74
Abbildung 5.8: Einfluss von $Zn^{2+}$ auf die Spaltung des zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms .....	75
Abbildung 5.9: Effekt einer $Mg^{2+}$ - $Zn^{2+}$ - und $Mg^{2+}$ - $Zn^{2+}$ -Mischung auf die Spaltungsaktivität des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms. ....	77
Abbildung 5.10: Effekt von $Mg^{2+}$ , $Mn^{2+}$ und $Zn^{2+}$ auf das CPEB3 Ribozym .....	79
Abbildung 5.11: Co-transkriptionaler CPEB3 Ribozym Spaltungsassay auf der Grundlage eines fluoreszenten Evaluierungssystems .....	80
Abbildung 5.12: Entwicklung eines Transkriptionssystems bei Nutzung des UBP dNaM - TPT3!.....	81
Abbildung 5.13: Anschluss der iEDDA-Cycloaddition an das generierte Transkriptionsprodukt zur Anbringung der fluoreszenten Sonde $^3H$ Tet-BDP. ....	82
Abbildung 5.14: Analyse der co-transkriptionalen Selbstspaltung des CPEB3 Ribozyms .....	84
Abbildung 5.15: HPL-Chromatogramm gekoppelt mit einer ESI massenspektrometrischen Analyse der Transkriptionsprodukte nach der T7 <i>in vitro</i> Transkription .....	85
Abbildung 5.16: Einbau des TPT3 <sup>CP</sup> TP an der Position -1 im co-transkriptionalen <i>in vitro</i> CPEB3 Ribozym Spaltungsassay. ....	86
Abbildung 5.17: Aggregation des G <sub>5</sub> -16 Strangs zu einem stabilen Komplex .....	88
Abbildung 5.18: Untersuchung der flankierenden Sequenzen des 5'-AG <sub>5</sub> CC-3'-Motivs.....	90
Abbildung 5.19: Spektroskopische Untersuchungen der Substratstränge.....	91
Abbildung 5.20: CD Spektroskopie von G <sub>5</sub> -8 in K <sup>+</sup> - oder NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -haltigen Puffern.....	92
Abbildung 5.21: CD Spektroskopie der ausgewählter Substratstränge bei einer steigenden Konzentration des Porphyrins TMPyP4 .....	94
Abbildung 5.22: Native PAGE Analyse des Effekts des Porphyrins TMPyP4 auf den G-Quadruplex..	95
Abbildung 5.23: CPEB3 Ribozym Spaltungsassay aus einem rekonstruierten drei-strängigem Ribozym in Anwesenheit des TMPyP4.....	95
Abbildung 5.24: Temperaturabhängige 1D $^1H$ -NMR-spektroskopische Messungen des G <sub>5</sub> -8 Substratstrangs in der Iminoregion .....	97
Abbildung 5.25: Erwartete Verschiebungen der Protonen bei der $^1H$ -NMR-Spektroskopie des Strangs G <sub>5</sub> -8.....	98
Abbildung 5.26: 2D $^1H$ -NOESY Spektroskopie der Iminoprotonen des (G <sub>5</sub> -8) <sub>4</sub> G-Quadruplexes .....	99
Abbildung 5.27: 2D $^1H$ -NOESY Spektroskopie der Protonen des aromatischen Bereichs des (G <sub>5</sub> -8) <sub>4</sub> G-Quadruplexes .....	100
Abbildung 5.28: 2D $^1H$ -NOESY Spektroskopie der H <sup>1'</sup> -Protonen der Zuckermoleküle und der Protonen des aromatischen Bereichs des (G <sub>5</sub> -8) <sub>4</sub> G-Quadruplexes.....	101
Abbildung 5.29: Anreicherung des RNA Strangs CPEB3 <sub>gespalten</sub> .....	102
Abbildung 5.30: 1D $^1H$ -NMR-spektroskopische Untersuchung des RNA Strangs CPEB3 <sub>gespalten</sub> .....	104
Abbildung 6.1: Synthese der unnatürlichen Base 3-DAC <sub>57</sub> ausgehend von 2,4-Dihydroxypyridin .....	107
Abbildung 6.2: Potentieller Regulationsmechanismus des CPEB3 Ribozyms auf der Grundlage eines G-Quadruplexes. ....	111
Abbildung 6.3: Potentieller Regulationsmechanismus des <i>cepb3</i> Genes unter der Berücksichtigung des CPEB3 Ribozyms .....	112

Abbildung 8.1: 1D $^1\text{H-NMR}$ Spektren des 5'-AG <sub>5</sub> C <sub>2</sub> -3' in 10 % D <sub>2</sub> O / 90 % H <sub>2</sub> O bei 348 K und 100 % D <sub>2</sub> O bei 348 K.....	183
--	-----

## 8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Übersicht der bisher bekannten Ribozymklassen .....	16
Tabelle 3.2: Relevante ionisierbare funktionelle Gruppen in RNA .....	19
Tabelle 3.3: Zusammenfassung der getesteten Metall-Ionen in kinetischen Studien mit dem genomischen HDV Ribozym.....	28
Tabelle 3.4: Übersicht der beobachteten Reaktionskonstanten bei unterschiedlichen Methoden der Ribozymkinetik.....	36
Tabelle 3.5: Übersicht über die für die Zuordnung der G-Quadruplex-Topologien wichtigen Ausschläge in CD Spektren .....	43
Tabelle 3.6: Liste einiger bisher entwickelter UBPs und deren Eigenschaften.....	53
Tabelle 5.1: Ermittelte Spaltungsdaten $k_{obs1}$ und $k_{obs2}$ und $f_{gespalten}$ zur Evaluierung der pH-Abhängigkeit einer Mg <sup>2+</sup> -induzierten CPEB3 RNA Spaltung. ....	67
Tabelle 5.2: Ermittelte Spaltungsraten $k_{obs1}$ und $k_{obs2}$ zur Evaluierung der Mg <sup>2+</sup> - und K <sup>+</sup> -Konzentrationsabhängigkeit .....	69
Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Spaltungsdaten $f_{gespalten}$ , $k_{obs1}$ und $k_{obs2}$ des rekonstruierten zwei-strängigen CPEB3 Ribozyms .....	72
Tabelle 5.4: Evaluierung der pH-Abhängigkeit einer Mn <sup>2+</sup> -induzierten CPEB3 RNA Spaltung .....	74
Tabelle 5.5: Mn <sup>2+</sup> -Konzentrationsabhängigkeit des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms. ....	74
Tabelle 5.6: Zn <sup>2+</sup> -Konzentrationsabhängigkeit des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms. ....	75
Tabelle 5.7: Evaluierung des Effekts von Mg <sup>2+</sup> -Zn <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -Mn <sup>2+</sup> -Mischungen auf die Spaltung des rekonstruierten CPEB3 Ribozyms.....	77
Tabelle 5.8: Effekt von Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> und Zn <sup>2+</sup> auf das CPEB3 Ribozym.....	79
Tabelle 5.9: Ermittelte erwartete Massen $M_{berechnet}$ für die Produkte nach der Spaltungsreaktion.....	85
Tabelle 7.1: DNA Ladder.....	118
Tabelle 7.2: Nukleotide und Radiochemikalien. ....	118
Tabelle 7.3: Synthetische DNA Oligonukleotide.....	118
Tabelle 7.4: Synthetische RNA Oligonukleotide.....	120
Tabelle 7.5: In der Arbeit verwendete selbst-hergestellte RNA Transkripte. ....	120
Tabelle 7.6: Co-transkriptional <i>in situ</i> generierte RNA Stränge .....	121

**8.5 Abkürzungsverzeichnis**

APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalent(-e)
ATP	Adenosintriphosphat
BaCl <sub>2</sub>	Bariumchlorid
bp	Basenpaar(-e)
BPB	Bromphenolblau
C	Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> (alkaline Phosphatase)
CD	Circulardichroismus
CEP	3'-O-Cyanoethylphosphoramidit
cm	Zentimeter
Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> Cl <sub>3</sub>	Hexaamincobalt(III)chlorid
CPEB3	<i>Cytoplasmatic polyadenylation element binding protein 3</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTP	Cytosintriphosphat
CuCl <sub>2</sub>	Kupferchlorid
DAC	Deazacytosin
DFHBI	3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzyliden Imidazolinon
DFHBI-1T	(3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzylidene)-2-Methyl-1-(2,2,2 Trifluoroethyl)Imidazol-5-on
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESTs	<i>Expressed sequence tag</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FA	Formamid
FACS	<i>Fluorescence-activated cell scanning</i> (Durchflusszytometrie)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FW	<i>forward</i>
g	Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HBI	4-Hydroxy-Benzyliden-Imidazololonon
HCV	Hepatitis C Virus
HDMS	Hexamethyldisilazan
HDV	Hepatitis Delta Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	<i>High throughput liquid chromatography</i> (Hochdurchsatzflüssigkeitschromatographie)
HPV	Humanes Papilom-Virus

---

HQS	8-Hydroxy-Quinolin-5-Sulfonsäure
<sup>H</sup> Tet-BDP	Tetrazin-BODIPY (Cat.No.: CLK-036-05)
iEDDA	<i>Inverse electron-demand Diels-Alder reaction</i>
iPP	Inorganische Pyrophosphatase
KCl	Kaliumchlorid
LC-MS	<i>Liquid chromatography mass spectrometry</i> (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)
lncRNAs	<i>Long non-coding RNAs</i> (lange nicht-kodierende RNAs)
M	Molar
MAG	Malachitgrün
Me	Methyl-
MeCN	Acetonitril
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
<sup>Me</sup> Tet-BDP	6-Methyl-Tetrazin-BODIPY (Cat.No.: CLK-037-1)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHz	Megahertz
min	Minute
mind.	mindestens
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mg	Milligramm
miRNA	Micro RNA
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
NaCl	Natriumchlorid
ncRNA	<i>non-coding RNA</i> (Nicht-kodierende RNA)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
nt	Nukleotide
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (Relative Zentrifugalkraft)
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
RNasin	RNase Inhibitor
rpm	Runden pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
RV	<i>reverse</i>
s	Sekunde
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
SrCl <sub>2</sub>	Strontiumchlorid
T4 PNK	T4 Polynucleotid Kinase
TAPS	3-[[1,3-Dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]propan-1-sulfonsäure
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEA	Triethylamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFMSA	Trifluoromethylsulfonsäure
TMR	Tetramethylrosamin
TMS(-Cl)	Trimethylsilyl-(Chlorid)
ThT	Thioflavin T
U	<i>Unit</i>
ÜN	Über Nacht
UTP	Uraciltriphosphat
ÜZ	Übergangszustand
V	Volt
VS	<i>Varkud satellite</i>
WT	Wildtyp
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid

## 9 Literatur

1. Crick FH, *The origin of the genetic code*. J. Mol. Biol., 1968:38(3):367-79
2. Orgel LE, *Evolution of the genetic apparatus*. J. Mol. Biol., 1968:38(3):381-93
3. Woese C, *The genetic code: the molecular basis for genetic expression*. 1967: Harper & Row, New York. 179-95
4. Gilbert W, *Origin of life: the RNA world*. Nature, 1986:319(6055):618
5. Robertson MP und Joyce GF, *The origins of the RNA world*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2012:4(5):a003608
6. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, et al., *Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena*. Cell, 1982:31(1):147-57
7. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, et al., *The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme*. Cell, 1983:35(3 Pt 2):849-57
8. Cech TR und Steitz JA, *The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones*. Cell, 2014:157(1):77-94
9. Serganov A und Patel DJ, *Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins*. Nat. Rev. Genet., 2007:8(10):776-90
10. Walter NG und Engelke DR, *Ribozymes: catalytic RNAs that cut things, make things, and do odd and useful jobs*. Biologist, 2002:49(5):199-203
11. Forster AC und Symons RH, *Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites*. Cell, 1986:49(2):211-20
12. Prody GA, Bakos JT, Buzayan JM, et al., *Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA*. Science, 1986:231(4745):1577-80
13. Barrick JE, Corbino KA, Winkler WC, et al., *New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2004:101(17):6421-6
14. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, et al., *Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme*. Nature, 2004:428(6980):281-6
15. Mattick JS, *Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity*. EMBO Rep., 2001:2(11):986-91
16. Wagener S, *Expression of a functional CPEB3 ribozyme construct in mammalian cells*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 2015, Rheinische- Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
17. Webb CH, Riccitelli NJ, Ruminski DJ, et al., *Widespread occurrence of self-cleaving ribozymes*. Science, 2009:326(5955):953
18. Harris ME und Begley TP, *Catalytic modes in natural ribozymes*, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. 2007, John Wiley & Sons, Inc.
19. Kuo MY, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G, et al., *Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus*. J. Virol., 1988:62(12):4439-44
20. Berzal-Herranz A, Joseph S, Chowrira BM, et al., *Essential nucleotide sequences and secondary structure elements of the hairpin ribozyme*. EMBO J., 1993:12(6):2567-73
21. Lilley DM, *The Varkud satellite ribozyme*. RNA, 2004:10(2):151-8
22. Eiler D, Wang J und Steitz TA, *Structural basis for the fast self-cleavage reaction catalyzed by the twister ribozyme*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2014:111(36):13028-33

23. Weinberg Z, Kim PB, Chen TH, et al., *New classes of self-cleaving ribozymes revealed by comparative genomics analysis*. Nat. Chem. Biol., 2015;11(8):606-10
24. Cech TR, *Self-splicing of group I introns*. Annu. Rev. Biochem., 1990;59:543-68
25. Bonen L und Vogel J, *The ins and outs of group II introns*. TIG, 2001;17(6):322-31
26. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, et al., *The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme*. Cell, 1983;35(3):849-57
27. Johansen S, Einvik C und Nielsen H, *DiGIR1 and NaGIR1: naturally occurring group I-like ribozymes with unique core organization and evolved biological role*. Biochimie, 2002;84(9):905-12
28. Nissen P, Hansen J, Ban N, et al., *The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis*. Science, 2000;289(5481):920-30
29. Chamberlain JR, Lee Y, Lane WS, et al., *Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP*. Genes Dev., 1998;12(11):1678-90
30. Jarrous N und Reiner R, *Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor*. Nucleic Acids Res., 2007;35(11):3519-24
31. Welting TJ, Kikkert BJ, van Venrooij WJ, et al., *Differential association of protein subunits with the human RNase MRP and RNase P complexes*. RNA, 2006;12(7):1373-82
32. Clayton DA, *A big development for a small RNA*. Nature, 2001;410:29
33. Kikovska E, Svard SG und Kirsebom LA, *Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2007;104(7):2062-7
34. Peng CG und Damha MJ, *Synthesis and hybridization studies of oligonucleotides containing 1-(2-deoxy-2-alpha-C-hydroxymethyl-beta-D-ribofuranosyl)thymine (2'-alpha-hm-dT)*. Nucleic Acids Res., 2005;33(22):7019-28
35. Boyer AS, Grgurevic S, Cazaux C, et al., *The human specialized DNA polymerases and non-B DNA: vital relationships to preserve genome integrity*. J. Mol. Biol., 2013;425(23):4767-81
36. Bevilacqua PC, Brown TS, Chadalavada D, et al., *Linkage between proton binding and folding in RNA: implications for RNA catalysis*. Biochem. Soc. Trans., 2005;33(3):466-70
37. Smith MD und Collins RA, *Evidence for proton transfer in the rate-limiting step of a fast-cleaving Varkud satellite ribozyme*. Proc. Natl. Acad. Sci., 2007;104(14):5818-23
38. Ravindranathan S, Butcher SE und Feigon J, *Adenine protonation in domain B of the hairpin ribozyme*. Biochemistry, 2000;39(51):16026-32
39. Bevilacqua PC, *Mechanistic considerations for general acid-base catalysis by RNA: revisiting the mechanism of the hairpin ribozyme*. Biochemistry, 2003;42(8):2259-65
40. Jencks WP, *Catalysis in chemistry and enzymology*. 1987, New York: Dover Publications
41. Wilcox JL, Ahluwalia AK und Bevilacqua PC, *Charged nucleobases and their potential for RNA catalysis*. Acc. Chem. Res., 2011;44(12):1270-9
42. Nesbitt S, Hegg LA und Fedor MJ, *An unusual pH-independent and metal-ion-independent mechanism for hairpin ribozyme catalysis*. Chem Biol;4(8):619-30
43. Draper DE, Grilley D und Soto AM, *Ions and RNA folding*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2005;34:221-43
44. Riccitelli NJ, Delwart E und Luptak A, *Identification of minimal HDV-like ribozymes with unique divalent metal ion dependence in the human microbiome*. Biochemistry, 2014;53(10):1616-26
45. Lai MM, *The molecular biology of hepatitis delta virus*. Annu. Rev. Biochem., 1995;64:259-86

46. Webb CH und Luptak A, *HDV-like self-cleaving ribozymes*. RNA Biol., 2011;8(5):719-27
47. Ferre-D'Amare AR, Zhou K und Doudna JA, *Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme*. Nature, 1998;395(6702):567-74
48. Tanner NK, Schaff S, Thill G, et al., *A three-dimensional model of hepatitis delta virus ribozyme based on biochemical and mutational analyses*. Curr. Biol., 1994;4(6):488-98
49. Been MD und Wickham GS, *Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA*. Eur. J. Biochem., 1997;247(3):741-53
50. Perrotta AT und Been MD, *Core sequences and a cleavage site wobble pair required for HDV antigenomic ribozyme self-cleavage*. Nucleic Acids Res, 1996;24(7):1314-21
51. Wadkins TS, Shih I, Perrotta AT, et al., *A pH-sensitive RNA tertiary interaction affects self-cleavage activity of the HDV ribozymes in the absence of added divalent metal ion*. J. Mol. Biol., 2001;305(5):1045-55
52. Lilley DM und Eckstein F, *Ribozymes and RNA Catalysis*. 2008: Royal Society of Chemistry. 318
53. Golden BL, *Two distinct catalytic strategies in the hepatitis delta virus ribozyme cleavage reaction*. Biochemistry, 2011;50(44):9424-33
54. Nakano S, Chadalavada DM und Bevilacqua PC, *General acid-base catalysis in the mechanism of a hepatitis delta virus ribozyme*. Science, 2000;287(5457):1493-7
55. Chen JH, Gong B, Bevilacqua PC, et al., *A catalytic metal ion interacts with the cleavage Site G.U wobble in the HDV ribozyme*. Biochemistry, 2009;48(7):1498-507
56. Ke A, Zhou K, Ding F, et al., *A conformational switch controls hepatitis delta virus ribozyme catalysis*. Nature, 2004;429(6988):201-5
57. Perrotta AT, Shih I und Been MD, *Imidazole rescue of a cytosine mutation in a self-cleaving ribozyme*. Science, 1999;286(5437):123-6
58. Gong B, Chen JH, Chase E, et al., *Direct measurement of a pKa near neutrality for the catalytic cytosine in the genomic HDV ribozyme using Raman crystallography*. J. Am. Chem. Soc., 2007;129(43):13335-42
59. Tang CL, Alexov E, Pyle AM, et al., *Calculation of pKas in RNA: on the structural origins and functional roles of protonated nucleotides*. J. Mol. Biol., 2007;366(5):1475-96
60. Das SR und Piccirilli JA, *General acid catalysis by the hepatitis delta virus ribozyme*. Nat. Chem. Biol., 2005;1(1):45-52
61. Nakano S, Proctor DJ und Bevilacqua PC, *Mechanistic characterization of the HDV genomic ribozyme: assessing the catalytic and structural contributions of divalent metal ions within a multichannel reaction mechanism*. Biochemistry, 2001;40(40):12022-38
62. Chin K, Sharp KA, Honig B, et al., *Calculating the electrostatic properties of RNA provides new insights into molecular interactions and function*. Nat. Struct. Biol., 1999;6(11):1055-61
63. Tanaka Y, Tagaya M, Hori T, et al., *Cleavage reaction of HDV ribozymes in the presence of Mg<sup>2+</sup> is accompanied by a conformational change*. Genes Cells, 2002;7(6):567-79
64. Nakano S, Cerrone AL und Bevilacqua PC, *Mechanistic characterization of the HDV genomic ribozyme: classifying the catalytic and structural metal ion sites within a multichannel reaction mechanism*. Biochemistry, 2003;42(10):2982-94
65. Chen J, Ganguly A, Miswan Z, et al., *Identification of the catalytic Mg<sup>2+</sup> ion in the hepatitis delta virus ribozyme*. Biochemistry, 2013;52(3):557-67
66. Chen JH, Yajima R, Chadalavada DM, et al., *A 1.9 Å crystal structure of the HDV ribozyme precleavage suggests both Lewis acid and general acid mechanisms contribute to phosphodiester cleavage*. Biochemistry, 2010;49(31):6508-18

67. Salehi-Ashtiani K, Luptak A, Litovchick A, et al., *A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene*. *Science*, 2006;313(5794):1788-92
68. Vogler C, Spalek K, Aerni A, et al., *CPEB3 is associated with human episodic memory*. *Front. Behav. Neurosci.*, 2009;3:4
69. Chadalavada DM, Gratton EA und Bevilacqua PC, *The human HDV-like CPEB3 ribozyme is intrinsically fast-reacting*. *Biochemistry*, 2010;49(25):5321-30
70. Skilandat M, Rowinska-Zyrek M und Sigel RK, *Solution structure and metal ion binding sites of the human CPEB3 ribozyme's P4 domain*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2014;19(6):903-12
71. Skilandat M, Rowinska-Zyrek M und Sigel RK, *Secondary structure confirmation and localization of Mg<sup>2+</sup> ions in the mammalian CPEB3 ribozyme*. *RNA*, 2016;22(5):750-63
72. Burge S, Parkinson GN, Hazel P, et al., *Quadruplex DNA: sequence, topology and structure*. *Nucleic Acids Res.*, 2006;34(19):5402-15
73. Salehi-Ashtiani K und Szostak JW, *In vitro evolution suggests multiple origins for the hammerhead ribozyme*. *Nature*, 2001;414(6859):82-4
74. Cao Y und Woodson SA, *Destabilizing effect of an rRNA stem-loop on an attenuator hairpin in the 5' exon of the Tetrahymena pre-rRNA*. *RNA*, 1998;4(8):901-14
75. Chadalavada DM, Knudsen SM, Nakano S, et al., *A role for upstream RNA structure in facilitating the catalytic fold of the genomic hepatitis delta virus ribozyme*. *J. Mol. Biol.*, 2000;301(2):349-67
76. Strulson CA, Yennawar NH, Rambo RP, et al., *Molecular crowding favors reactivity of a human ribozyme under physiological ionic conditions*. *Biochemistry*, 2013;52(46):8187-97
77. Feig AL und Uhlenbeck OC, *The role of metal ions in RNA biochemistry*. 1999. 1999, Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 287-319
78. Grubbs RD, *Intracellular magnesium and magnesium buffering*. *Biometals*, 2002;15(3):251-9
79. Smith FW, Lau FW und Feigon J, *d(G<sub>3</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>) forms an asymmetric diagonally looped dimeric quadruplex with guanosine 5'-syn-syn-anti and 5'-syn-anti-anti N-glycosidic conformations*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994;91(22):10546-50
80. Hud NV und Plavec J, *Quadruplex Nucleic Acids*. Neidle S, Balasubramanian S ed. 2006: The Royal Society of Chemistry. 100-30
81. Clay EH und Gould IR, *A combined QM and MM investigation into guanine quadruplexes*. *J. Mol. Graph. Model.*, 2005;24(2):138-46
82. Małgowska M, Gudanis D, Teubert A, et al., *How to study G-quadruplex structures*. *BioTechnologia*, 2014;93(4):381-90
83. Tran PL, De Cian A, Gros J, et al., *Tetramolecular quadruplex stability and assembly*. *Top. Curr. Chem.*, 2013;330:243-73
84. Gellert M, Lipsett MN und Davies DR, *Helix formation by guanylic acid*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1962;48:2013-8
85. Granotier C, Pennarun G, Riou L, et al., *Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends*. *Nucleic Acids Res.*, 2005;33(13):4182-90
86. Salvati E, Leonetti C, Rizzo A, et al., *Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHPS4 has an antitumor effect*. *J. Clin. Invest.*, 2007;117(11):3236-47
87. Lopes J, Piazza A, Bermejo R, et al., *G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication*. *EMBO J.*, 2011;30(19):4033-46
88. De Cian A, Grellier P, Mouray E, et al., *Plasmodium telomeric sequences: structure, stability and quadruplex targeting by small compounds*. *ChemBiochem.*, 2008;9(16):2730-9

89. Gomez D, Guedin A, Mergny JL, et al., *A G-quadruplex structure within the 5'-UTR of TRF2 mRNA represses translation in human cells*. Nucleic Acids Res., 2010;38(20):7187-98
90. Paeschke K, Simonsson T, Postberg J, et al., *Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo*. Nat. Struct. Mol. Biol., 2005;12(10):847-54
91. Huppert JL und Balasubramanian S, *Prevalence of quadruplexes in the human genome*. Nucleic Acids Res., 2005;33(9):2908-16
92. Drygin D, Siddiqui-Jain A, O'Brien S, et al., *Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis*. Cancer Res., 2009;69(19):7653-61
93. Rodriguez R, Miller KM, Forment JV, et al., *Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes*. Nat. Chem. Biol., 2012;8(3):301-10
94. Zamiri B, Reddy K, Macgregor RB, Jr., et al., *TMPyP4 porphyrin distorts RNA G-quadruplex structures of the disease-associated r(GGGGCC)*n* repeat of the C9orf72 gene and blocks interaction of RNA-binding proteins*. J. Biol. Chem., 2014;289(8):4653-9
95. Agarwala P, Pandey S und Maiti S, *The tale of RNA G-quadruplex*. Org. Biomol. Chem., 2015;13(20):5570-85
96. Kumari S, Bugaut A, Huppert JL, et al., *An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation*. Nat. Chem. Biol., 2007;3(4):218-21
97. Biffi G, Di Antonio M, Tannahill D, et al., *Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells*. Nat. Chem., 2014;6(1):75-80
98. Morris MJ, Negishi Y, Pázsint C, et al., *An RNA G-quadruplex is essential for cap-independent translation initiation in human VEGF IRES*. J. Am. Chem. Soc., 2010;132(50):17831-9
99. Mergny JL, De Cian A, Ghelab A, et al., *Kinetics of tetramolecular quadruplexes*. Nucleic Acids Res., 2005;33(1):81-94
100. Sacca B, Lacroix L und Mergny JL, *The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides*. Nucleic Acids Res., 2005;33(4):1182-92
101. Collie GW, Haider SM, Neidle S, et al., *A crystallographic and modelling study of a human telomeric RNA (TERRA) quadruplex*. Nucleic Acids Res., 2010;38(16):5569-80
102. Cheong C und Moore PB, *Solution structure of an unusually stable RNA tetraplex containing G- and U-quartet structures*. Biochemistry, 1992;31(36):8406-14
103. Patel DJ, Phan AT und Kuryavyi V, *Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics*. Nucleic Acids Res., 2007;35(22):7429-55
104. Zhang DH und Zhi GY, *Structure monomorphism of RNA G-quadruplex that is independent of surrounding condition*. J. Biotechnol., 2010;150(1):6-10
105. Arora A und Maiti S, *Differential biophysical behavior of human telomeric RNA and DNA quadruplex*. J. Phys. Chem. B., 2009;113(30):10515-20
106. Kim J, Cheong C und Moore PB, *Tetramerization of an RNA oligonucleotide containing a GGGG sequence*. Nature, 1991;351(6324):331-2
107. Shahid R, Bugaut A und Balasubramanian S, *The BCL-2 5' untranslated region contains an RNA G-quadruplex-forming motif that modulates protein expression*. Biochemistry, 2010;49(38):8300-6
108. Marcel V, Tran PL, Sagne C, et al., *G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms*. Carcinogenesis, 2011;32(3):271-8
109. Arora A, Dutkiewicz M, Scaria V, et al., *Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif*. RNA, 2008;14(7):1290-6

110. Schoeftner S und Blasco MA, *Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II*. Nat. Cell Biol., 2008;10(2):228-36
111. Xu Y, Suzuki Y, Ito K, et al., *Telomeric repeat-containing RNA structure in living cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2010;107(33):14579-84
112. Mergny JL, Phan AT und Lacroix L, *Following G-quartet formation by UV-spectroscopy*. FEBS Lett., 1998;435(1):74-8
113. Mergny JL und Lacroix L, *UV melting of G-quadruplexes*. Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem., 2009:Chapter 17:Unit 17 1
114. Pingoud A und Urbanke C, *Arbeitsmethoden der Biochemie*. 1999: Walter de Gruyter. 254
115. Randazzo A, Spada GP und da Silva MW, *Circular dichroism of quadruplex structures*. Top. Curr. Chem., 2013;330:67-86
116. Karsisiotis AI, Hessari NM, Novellino E, et al., *Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2011;50(45):10645-8
117. Paramasivan S, Rujan I und Bolton PH, *Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding*. Methods, 2007;43(4):324-31
118. Kypr J, Kejnovska I, Renciuik D, et al., *Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA*. Nucleic Acids Res., 2009;37(6):1713-25
119. Han H, Langley DR, Rangan A, et al., *Selective interactions of cationic porphyrins with G-quadruplex structures*. J. Am. Chem. Soc., 2001;123(37):8902-13
120. Wheelhouse RT, Sun D, Han H, et al., *Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: the interaction of tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine with quadruplex DNA*. J. Am. Chem. Soc., 1998;120:3261-62
121. Grand CL, Han H, Munoz RM, et al., *The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo*. Mol. Cancer Ther., 2002;1(8):565-73
122. Weisman-Shomer P, Cohen E, Hershco I, et al., *The cationic porphyrin TMPyP4 destabilizes the tetraplex form of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)<sub>n</sub>*. Nucleic Acids Res., 2003;31(14):3963-70
123. Han FX, Wheelhouse TT und Hurley LH, *Interaction of TMPyP4 and TMPyP2 with quadruplex DNA: structural basis for the differential effects on telomerase inhibition*. J. Am. Chem. Soc., 1999;121:3561-70
124. Morris MJ, Wingate KL, Silwal J, et al., *The porphyrin TMPyP4 unfolds the extremely stable G-quadruplex in MT3-MMT mRNA and alleviates its repressive effect to enhance translation in eukaryotic cells*. Nucleic Acids Res., 2011:1-9
125. Pescitelli G, Gabriel S, Wang Y, et al., *Theoretical analysis of the porphyrin-porphyrin exciton interaction in circular dichroism spectra of dimeric tetraarylporphyrins*. J. Am. Chem. Soc., 2003;125(25):7613-28
126. Balaz M, Bitsch-Jensen K, Mammana A, et al., *Porphyrins as spectroscopic sensors for conformational studies of DNA*. Pure. Appl. Chem., 2007;78(4):801-9
127. Le HT, Miller MC, Buscaglia R, et al., *Not all G-quadruplexes are created equally: an investigation of the structural polymorphism of the c-Myc G-quadruplex-forming sequence and its interaction with the porphyrin meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine*. Org. Biomol. Chem., 2012;10(47):9393-404
128. Renaud de la Faverie A, Guedin A, Bedrat A, et al., *Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation*. Nucleic Acids Res., 2014;42(8):e65
129. Mohanty J, Barooah N, Dhamodharan V, et al., *Thioflavin T as an efficient inducer and selective fluorescent sensor for the human telomeric G-quadruplex DNA*. J. Am. Chem. Soc., 2013;135(1):367-76
130. Webba da Silva M, *NMR methods for studying quadruplex nucleic acids*. Methods, 2007;43(4):264-77

131. Phan AT, Kuryavii V, Gaw HY, et al., *Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter*. Nat. Chem. Biol., 2005;1(3):167-73
132. Trajkovski M, da Silva MW und Plavec J, *Unique structural features of interconverting monomeric and dimeric G-quadruplexes adopted by a sequence from the intron of the N-myc gene*. J. Am. Chem. Soc., 2012;134(9):4132-41
133. Phan AT und Patel DJ, *Two-repeat human telomeric d(TAGGGTTAGGGT) sequence forms interconverting parallel and antiparallel G-quadruplexes in solution: distinct topologies, thermodynamic properties, and folding/unfolding kinetics*. J. Am. Chem. Soc., 2003;125(49):15021-7
134. Phan AT, *Human telomeric G-quadruplex: structures of DNA and RNA sequences*. FEBS J., 2010;277(5):1107-17
135. Vorlickova M, Bednarova K, Kejnovska I, et al., *Intramolecular and intermolecular guanine quadruplexes of DNA in aqueous salt and ethanol solutions*. Biopolymers, 2007;86(1):1-10
136. Allain FH, Gubser CC, Howe PW, et al., *Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formulation*. Nature, 1996;380(6575):646-50
137. Puglisi JD, Chen L, Blanchard S, et al., *Solution structure of a bovine immunodeficiency virus Tat-TAR peptide-RNA complex*. Science, 1995;270(5239):1200-3
138. Ambrus A, Chen D, Dai J, et al., *Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution*. Nucleic Acids Res, 2006;34(9):2723-35
139. Ambrus A, Chen D, Dai J, et al., *Solution structure of the biologically relevant G-quadruplex element in the human c-MYC promoter. Implications for G-quadruplex stabilization*. Biochemistry, 2005;44(6):2048-58
140. Dai J, Chen D, Jones RA, et al., *NMR solution structure of the major G-quadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region*. Nucleic Acids Res, 2006;34(18):5133-44
141. Fernandez C, Szyperski T, Ono A, et al., *NMR with <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-doubly-labeled DNA: the Antennapedia homeodomain complex with a 14-mer DNA duplex*. J Biomol NMR, 1998;12(1):25-37
142. Phan AT, Kuryavii V, Luu KN, et al., *Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K<sup>+</sup> solution*. Nucleic Acids Res., 2007;35(19):6517-25
143. Lim KW, Amrane S, Bouaziz S, et al., *Structure of the human telomere in K<sup>+</sup> solution: a stable basket-type G-quadruplex with only two G-tetrad layers*. J. Am. Chem. Soc., 2009;131(12):4301-9
144. Lim KW, Lacroix L, Yue DJ, et al., *Coexistence of two distinct G-quadruplex conformations in the hTERT promoter*. J. Am. Chem. Soc., 2010;132(35):12331-42
145. Ellington AD und Szostak JW, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990;346(6287):818-22
146. Kang KN und Lee YS, *RNA aptamers: a review of recent trends and applications*. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2013;131:153-69
147. Bao G, Rhee WJ und Tsourkas A, *Fluorescent probes for live-cell RNA detection*. Annu. Rev. Biomed. Eng., 2009;11:25-47
148. Rath AK und Rentmeister A, *Genetically encoded tools for RNA imaging in living cells*. Curr. Opin Biotechnol., 2015;31:42-9
149. Paige JS, Wu KY und Jaffrey SR, *RNA mimics of green fluorescent protein*. Science, 2011;333(6042):642-6
150. Okuda M, Fourmy D und Yoshizawa S, *Use of baby spinach and broccoli for imaging of structured cellular RNAs*. Nucleic Acids Res., 2017;45(3):1404-15
151. Warner KD, Chen MC, Song W, et al., *Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein*. Nat. Struct. Mol. Biol., 2014;21(8):658-63

152. Filonov GS, Moon JD, Svensen N, et al., *Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution*. J. Am. Chem. Soc., 2014;136(46):16299-308
153. Johnsson P, Lipovich L, Grander D, et al., *Evolutionary conservation of long non-coding RNAs: sequence, structure, function*. Biochim. Biophys. Acta., 2014;1840(3):1063-71
154. Wachowius F und Hobartner C, *Chemical RNA modifications for studies of RNA structure and dynamics*. Chembiochem., 2010;11(4):469-80
155. Schoch J, Ameta S und Jaschke A, *Inverse electron-demand Diels-Alder reactions for the selective and efficient labeling of RNA*. Chem. Commun., 2011;47(46):12536-7
156. Buskamp H, Batroff E, Niederwieser A, et al., *Efficient labelling of enzymatically synthesized vinyl-modified DNA by an inverse-electron-demand Diels-Alder reaction*. Chem. Commun., 2014;50(74):10827-9
157. Schulz D und Rentmeister A, *Current approaches for RNA labeling in vitro and in cells based on click reactions*. Chembiochem., 2014;15(16):2342-7
158. Paredes E und Das SR, *Click chemistry for rapid labeling and ligation of RNA*. Chembiochem., 2011;12(1):125-31
159. Stark MR, Pleiss JA, Deras M, et al., *An RNA ligase-mediated method for the efficient creation of large, synthetic RNAs*. RNA, 2006;12(11):2014-9
160. Morris KV und Mattick JS, *The rise of regulatory RNA*. Nat. Rev. Genet., 2014;15(6):423-37
161. Malyshev DA und Romesberg FE, *The expanded genetic alphabet*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2015;54(41):11930-44
162. Morohashi N, Kimoto M, Sato A, et al., *Site-specific incorporation of functional components into RNA by an unnatural base pair transcription system*. Molecules, 2012;17(3):2855-76
163. Hirao I, *Synthetic genetic polymers functioning to store and propagate information by genetic alphabet expansion*, in *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. 2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
164. Hirao I, Kimoto M, Mitsui T, et al., *An unnatural hydrophobic base pair system: site-specific incorporation of nucleotide analogs into DNA and RNA*. Nat. Methods, 2006;3:729
165. Hirao I und Kimoto M, *Unnatural base pair systems toward the expansion of the genetic alphabet in the central dogma*. Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci., 2012;88(7):345-67
166. Switzer C, Moroney SE und Benner SA, *Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA*. J. Am. Chem. Soc., 1989;111(21):8322-3
167. Sismour AM und Benner SA, *The use of thymidine analogs to improve the replication of an extra DNA base pair: a synthetic biological system*. Nucleic Acids Res., 2005;33(17):5640-6
168. Fujiwara T, Kimoto M, Sugiyama H, et al., *Synthesis of 6-(2-thienyl)purine nucleoside derivatives that form unnatural base pairs with pyridin-2-one nucleosides*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2001;11(16):2221-3
169. Morales JC und Kool ET, *Minor groove interactions between polymerase and DNA: more essential to replication than Watson-Crick hydrogen bonds?* J. Am. Chem. Soc., 1999;121(10):2323-4
170. Li L, Degardin M, Lavergne T, et al., *Natural-like replication of an unnatural base pair for the expansion of the genetic alphabet and biotechnology applications*. J. Am. Chem. Soc., 2014;136(3):826-9
171. Malyshev DA, Seo YJ, Ordoukhanian P, et al., *PCR with an expanded genetic alphabet*. J Am Chem Soc, 2009;131(41):14620-1
172. Eggert F und Kath-Schorr S, *A cyclopropene-modified nucleotide for site-specific RNA labeling using genetic alphabet expansion transcription*. Chem. Commun., 2016;52(45):7284-7
173. Schoch J, Wiessler M und Jaschke A, *Post-synthetic modification of DNA by inverse-electron-demand Diels-Alder reaction*. J. Am. Chem. Soc., 2010;132(26):8846-7

174. Pyka AM, Domnick C, Braun F, et al., *Diels-Alder cycloadditions on synthetic RNA in mammalian cells*. *Bioconjug. Chem.*, 2014;25(8):1438-43
175. Eggert F, Kulikov K, Domnick C, et al., *Illuminated by foreign letters - strategies for site-specific cyclopropene modification of large functional RNAs via in vitro transcription*. *Methods*, 2017;120:17-27
176. Carbonell A, Flores R und Gago S, *Trans-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs: in vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA*. *Nucleic Acids Res*, 2011;39(6):2432-44
177. Chowrira BM, Berzal-Herranz A, Keller CF, et al., *Four ribose 2'-hydroxyl groups essential for catalytic function of the hairpin ribozyme*. *J Biol Chem*, 1993;268(26):19458-62
178. Sakamoto T, Tanaka Y, Kuwabara T, et al., *Properties of hepatitis delta virus ribozyme, which consists of three RNA oligomer strands*. *J Biochem*, 1997;121(6):1123-8
179. Tanaka Y, Sakamoto T, Sasa K, et al., *Structure-activity correlation for an HDV ribozyme composed of three RNA strands*. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1997(37):309-10
180. Beaucage SL und Iyer RP, *Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach*. *Tetrahedron*, 1992;48(12):2223-311
181. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/288-32-4>. [cited 2017 13.07.2017];
182. Kath-Schorr S, Wilson TJ, Li NS, et al., *General acid-base catalysis mediated by nucleobases in the hairpin ribozyme*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012;134(40):16717-24
183. Mlýnský V, Banáš P, Walter NG, et al., *QM/MM studies of hairpin ribozyme self-cleavage suggest the feasibility of multiple competing reaction mechanisms*. *J Phys Chem B*, 2011;115(47):13911-24
184. Suydam IT, Levandoski SD und Strobel SA, *Catalytic importance of a protonated adenosine in the hairpin ribozyme active site*. *Biochemistry*, 2010;49(17):3723-32
185. Riedel E und Janiak C, *Anorganische Chemie*. 2007, Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG
186. Cotzias GC, *Manganese in health and disease*. *Physiol. Rev.*, 1958;38(3):503-32
187. King JC, *Zinc: an essential but elusive nutrient*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2011;94(2):679S-84S
188. Kolev NG, Hartland EI und Huber PW, *A manganese-dependent ribozyme in the 3'-untranslated region of Xenopus Vg1 mRNA*. *Nucleic Acids Res.*, 2008;36(17):5530-9
189. Dahm SC und Uhlenbeck OC, *Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction*. *Biochemistry*, 1991;30(39):9464-9
190. Borda EJ, Markley JC und Sigurdsson ST, *Zinc-dependent cleavage in the catalytic core of the hammerhead ribozyme: evidence for a pH-dependent conformational change*. *Nucleic Acids Res.*, 2003;31(10):2595-600
191. Frausto da Silva JJR und Williams RJP, *The biological chemistry of the elements*. 2nd Edition ed. 2001: Oxford University Press. 600
192. Burgess J, *Metal ions in solution*. 1978, Chichester, UK: Ellis Horwood Ltd. 264-70
193. Roychowdhury-Saha M und Burke DH, *Extraordinary rates of transition metal ion-mediated ribozyme catalysis*. *RNA*, 2006;12(10):1846-52
194. Young KJ, Gill F und Grasby JA, *Metal ions play a passive role in the hairpin ribozyme catalysed reaction*. *Nucleic Acids Res.*, 1997;25(19):3760-6
195. Rulíšek L und Šponer J, *Outer-shell and inner-shell coordination of phosphate group to hydrated metal ions (Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>) in the presence and absence of nucleobase: the role of nonelectrostatic effects*. *J. Phys. Chem B.*, 2003;107(8):1913-23
196. Mörl M, Lizano E, Willkomm DK, et al., *Handbook of RNA biochemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH

197. Kulikov K, Nozinovic S und Kath-Schorr S, *The 5'-AG5 CC-3' fragment from the human CPEB3 ribozyme forms an ultrastable parallel RNA G-quadruplex*. Chembiochem., 2017
198. Borbone N, Amato J, Oliviero G, et al., *d(CGGTGGT) forms an octameric parallel G-quadruplex via stacking of unusual G(:C):G(:C):G(:C):G(:C) octads*. Nucleic Acids Res., 2011;39(17):7848-57
199. Pace CN, Heinemann U, Hahn U, et al., *Ribonuclease T1: structure, function, and stability*. Angew. Chem. Int. Ed., 1991;30(4):343-60
200. Reddy K, Zamiri B, Stanley SY, et al., *The disease-associated r(GGGGCC)<sub>n</sub> repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures*. J. Biol. Chem., 2013;288(14):9860-6
201. Fürtig B, Richter C, Wöhnert J, et al., *NMR spectroscopy of RNA*. ChemBioChem, 2003;4(10):936-62
202. Hosur RV, G. G und Miles HT, *Application of two-dimensional NMR spectroscopy in the determination of solution conformation of nucleic acids*. Magn. Reson. Chem., 1988;26(10):927-44
203. Sakamoto T, Kuwabara T, Tanaka Y, et al., *Characterization of an HDV ribozyme which consists of three RNA oligomer strands*. Nucleic Acids Symp Ser, 1995(34):131-2
204. Niedballa U und Vorbruggen H, *A general synthesis of N-glycosides. 6. On the mechanism of the stannic chloride catalyzed silyl Hilbert-Johnson reaction*. J. Org. Chem., 1976;41(12):2084-6
205. Ilc T, Šket P, Plavec J, et al., *Formation of G-wires: the role of G:C-base pairing and G-quartet stacking*. J. Phys. Chem. C., 2013;117(44):23208-15
206. Protozanova E und Macgregor RB, *Frayed wires: a thermally stable form of DNA with two distinct structural domains*. Biochemistry, 1996;35(51):16638-45
207. Venczel EA und Sen D, *Synapsable DNA*. J. Mol. Biol., 1996;257(2):219-24
208. Hartel AJ, Lankhorst PP und Altona C, *Thermodynamics of stacking and of self-association of the dinucleoside monophosphate m<sup>2</sup>(6)A-U from proton NMR chemical shifts: differential concentration temperature profile method*. Eur. J. Biochem., 1982;129(2):343-57
209. Hoffman RE, *Standardization of chemical shifts of TMS and solvent signals in NMR solvents*. Magn. Reson. Chem., 2006;44(6):606-16