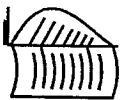


# Studien zur Biophysikalischen Chemie

Band 1:

**Marcus Menger**  
**2-Aminopurin als Fluoreszenzindikator**  
**zur Analyse der Struktur und Dynamik**  
**von Oligoribonukleinsäuren**  
**und Hammerhead-Ribozymen**



Hainholz Verlag · Göttingen  
1999

2-Aminopurin als Fluoreszenzindikator zur  
Analyse der Struktur und Dynamik von  
Oligoribonukleinsäuren und  
Hammerhead-Ribozymen

Dissertation  
zur Erlangung eines Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Marcus Menger**  
aus  
**Helmarshausen**

Göttingen 1999



Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

Menger, Marcus:

2-Aminopurin als Fluoreszenzindikator zur Analyse der Struktur und Dynamik von Oligoribonukleinsäuren und Hammerhead-Ribozymen / Marcus Menger. – Göttingen : Hainholz, 1999 (Studien zur Biophysikalischen Chemie ; Bd. 1)  
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss. 1999  
ISBN 3-932622-58-8

D 7

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Heinz Georg Wagner

Prof. Dr. Axel Zeecck

24. Juni 1999

Für

Sylvia

© 1999 by Hainholz Ltd., Göttingen · London

Hainholz Verlag · Hainholzweg 32 · D-37085 Göttingen

<http://www.hainholz.de>

Alle Rechte vorbehalten. Dieses Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist – wenn sie ohne Zustimmung des Verlages erfolgt – unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen sowie für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Druck und Bindung: Druckerei Wirtchen, Nörren-Hardenberg  
Gedruckt auf säurefreiem Papier – alterungsbeständig

Printed in Germany

ISBN 3-932622-58-8

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Allgemeine Einleitung	1
1.2	Aufgabenstellung	4
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>7</b>
2.1	RNA-Strukturen	7
2.1.1	Allgemeines	7
2.1.2	Struktur von Haarnadelschleifen	9
2.1.3	Struktur des <i>Hammerhead</i> -Ribozyms	11
2.1.3.1	Die Konsensus-Sekundärstruktur	11
2.1.3.2	Die Tertiärstruktur	13
2.1.3.3	Kinetik und Mechanismus der Spaltungsreaktion	15
2.2	Fluoreszenz-Spektroskopie	19
2.2.1	Allgemeines	19
2.2.2	2-Aminopurin-Ribonukleosid als chromophore Gruppe	21
2.3	Relaxationsmethoden	24
2.3.1	Die Temperatursprung-Methode	24
2.3.2	Relaxationszeit in einstufigen Systemen	25
2.3.3	Relaxationszeiten in mehrstufigen Systemen	26
2.3.4	Modelle von Reaktionsmechanismen	27
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>29</b>
3.1	Chemikalien	29
3.2	Nukleinsäuren	30

3.2.1	Umgang mit Ribonukleinsäuren	30	5.2.3	Kinetik des 2-Aminopurin-Ribonukleosids	88
3.2.2	Ribonukleinsäuren (RNA)	31	5.2.4	Kinetik der Oligoriboadenylnsäure (OH3)	89
3.2.3	DNA-Molekulargewichtsstandards	33	5.2.4.1	Kinetik der Oligoriboadenylnsäure in Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen	89
3.3	Puffer und Stammlösungen	34	5.2.4.2	Mg <sup>2+</sup> -Ion <i>Inner-Sphere</i> -Komplex in der 2AP-substituierten Oligoriboadenylnsäure	89
3.4	Geräte	36	5.2.5	<i>Hairpin</i> -Struktur der 2AP-substituierten Oligouridylnsäure	94
3.5	Kunststoffmaterial	37	5.2.6	Dimerisierung der heterogenen Oligoribonukleinsäuren zu RNA-Doppelhelices	95
<b>4 Methoden</b>		<b>39</b>	5.2.7	Verschiedene Konformationszustände bei den <i>Hairpin</i> -Ribonukleinsäuren	98
4.1	Konzentrationsbestimmungen	39	5.2.7.1	Die Ribonukleinsäure HP1	99
4.2	Gelelektrophoretische Methoden	40	5.2.7.2	Die Ribonukleinsäure HP2	102
4.2.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	41	5.2.8	Kinetik bei den <i>Hammerhead</i> -Ribozymen	108
4.3	<i>Annealing</i> der Ribonukleinsäuren	43	5.2.8.1	Die <i>Hammerhead</i> -Ribozyme mit dem 2AP an der Spaltstelle	109
4.4	Schmelzkurvenanalyse	43	5.2.8.2	Das <i>Hammerhead</i> -Ribozyme HH3	112
4.5	Fluoreszenz-Titrationsmessungen	45	5.2.8.3	Das <i>Hammerhead</i> -Ribozym HH4 mit dem 2AP im <i>Loop 3</i>	113
4.5.1	Aufbau des Spektrofluorimeters	45			
4.5.2	Titrationsmessungen	48	<b>6 Diskussion</b>		<b>115</b>
4.6	Temperatursprung-Experimente	50	<b>7 Zusammenfassung</b>		<b>131</b>
4.6.1	Aufbau der Temperatursprungapparatur	50	<b>Anhang</b>		<b>135</b>
4.6.2	Temperatursprungmessungen	55	<b>A Basenpaarungen</b>		<b>135</b>
4.7	<i>Stopped-Flow</i> -Experimente	58	A.1	<i>Watson-Crick</i> -Basenpaare	135
4.7.1	Aufbau der <i>Stopped-Flow</i> -Apparatur	58	A.2	<i>Wobble</i> -Basenpaare	136
4.7.2	Messungen am <i>Stopped-Flow</i>	61	<b>B Parameter der Fluoreszenztitrationsmessungen</b>		<b>137</b>
<b>5 Experimentelle Ergebnisse</b>		<b>63</b>	B.1	Gesamtbindungskonstante der Metallbindung	137
5.1	Bindungsgleichgewichte mit den Me <sup>2+</sup> -Kationen	64	B.2	Gesamtfluoreszenzfaktor der Metallbindung	138
5.1.1	Oligoribonukleinsäuren ohne Sekundärstruktur	68			
5.1.2	Oligoribonukleinsäuren mit Sekundärstruktur	71			
5.1.3	Die <i>Hairpin</i> -Ribonukleinsäuren	73			
5.1.4	Die <i>Hammerhead</i> -Ribozyme	80			
5.2	Kinetik der Bindungsgleichgewichte	86			

C	Abkürzungen	141
	Literaturverzeichnis	147
	Abbildungsverzeichnis	165
	Tabellenverzeichnis	167
	Danksagung	169
	Persönliche Daten	171

## Kapitel 1

### Einleitung

#### 1.1 Allgemeine Einleitung

Die Ribonukleinsäuren (RNAs) gehören neben den Desoxyribonukleinsäuren (DNAs) und den Proteinen zu den wichtigsten Makromolekülen in biologischen Organismen. Die zentrale biologische Bedeutung der Ribonukleinsäuren ist in den letzten Jahren durch die Entdeckung neuer Funktionen der RNAs erkannt worden und hat daher ein reges Interesse an der Aufklärung der RNA-Strukturen und der Reaktionsmechanismen in diesen RNA-Systemen ausgelöst.

Bis zum Anfang der achtziger Jahre ist die Hauptfunktion der zellulären Ribonukleinsäuren, deren Synthese (Transkription) durch RNA-Polymerasen unter der Verwendung von DNA-Matrizen erfolgt, der Proteinsynthese zugeordnet worden. In diesem schon 1961 von JACOB und MONOD [72] beschriebenen Prozeß (Translation) wird eine sog. *messenger*-RNA (mRNA) als Matrize für die Übertragung der genetischen Information benutzt. Die an die sog. *transfer*-RNA (tRNA) gebundenen Einzelbausteine der Proteine (Aminosäuren) gelangen durch Diffusion zu den Ribosomen (Ribonukleoproteinpripartikel), die zu einem großen Teil aus sog. *ribosomaler*-RNA (rRNA) bestehen, und werden dort über Peptidbindungen zu einem Protein verknüpft. In eukaryotischen Zellen werden noch weitere, geringe Mengen von kleineren Ribonukleinsäuren gefunden, zu denen auch die *small nuclear*-RNAs (snRNAs) gehören. Sie sind z. B. sowohl am Spleißen der RNA-Exons als

auch am Proteintransport im Cytosol beteiligt [155].

Die bekanntesten Funktionen der Ribonukleinsäuren als Adapter (tRNA), Informationsträger (mRNA) und Komponente der Genexpressionsmaschinerie (rRNA) bei der Proteinsynthese sind durch die Entdeckung von katalytisch wirksamen RNA-Molekülen, den sog. Ribozymen, wesentlich erweitert worden. Erstmals ist 1982 von Cech und Mitarbeitern [75] beobachtet worden, daß sich die Vorstufe einer ribosomalen RNA in dem Ciliaten *Tetrahymena* in Gegenwart von Nukleosidtriphosphaten und in Abwesenheit von Proteinen *in vitro* selbst spaltete. Aus dem abgespaltenen Intron der Gruppe I entsteht durch zwei weitere Spaltreaktionen die L19-RNA, welche die Überführung von Pentacytidylat (C<sub>5</sub>) in kürzere und längere Oligomere (C<sub>4</sub> und C<sub>6</sub>) katalysiert [7, 20, 21, 173]. Bei einigen nuklearen Introns der Gruppe II sind ebenfalls *in vitro* Autospaltreaktionen durch Umesterungen in einer an eine LassoSchlinge erinnernden „*Lariat*“-Struktur beobachtet worden [102]. In dem gleichen Zeitraum ist von Altman und Mitarbeitern [54] in Abwesenheit der Proteinuntereinheit die katalytische Freisetzung des aminoacylierbaren 3'-Endes aus tRNA-Vorläufern durch die RNA-Komponente des Enzyms RNase P von *E. coli* entdeckt worden. Neben diesen recht großen Ribozymen (mehrere hundert Nucleotide) sind in den letzten Jahren weitere kleine, 30–100 Nucleotide lange Ribozyme gefunden worden. Dazu gehören das *Hepatitis-delta*-Ribozym, das aus dem mit Hepatitis-B-Virus assoziierten Satellitenvirus stammt [9, 105], sowie ein Pb<sup>2+</sup>-abhängiges Ribozym (*Leadzyme*), das 1992 bei *in vitro*-Selektionen von RNAs nachgewiesen worden ist [96, 97]. Von größerem Interesse sind jedoch das *Hairyin*-Ribozym und das *Hammerhead*-Ribozym, die an der Replikation von mit Pflanzenviren assoziierten Satelliten-RNAs beteiligt sind [18, 71, 124].

Die revolutionäre Entdeckung der Ribozyme führte 1989 nicht nur zur Verleihung des Nobelpreises für Chemie an T. R. Cech und S. Altman, sondern hat auch neue Horizonte für die molekulare Evolution und ein neues Feld an therapeutischen Reagenzien in der Medizin eröffnet. Die bis dahin ausschließlich den Proteinen zugeschriebene Fähigkeit zur Katalyse ermöglicht die Vorstellung einer „RNA-Welt“ ohne DNA und Proteine in einer frühen Phase der Evolution, in der RNA-Moleküle ihre eigene Replikation katalysierten [22, 50, 133]. In der biomedizinischen Forschung werden Ribozyme aufgrund ihrer Fähigkeit der katalytischen

und sequenzspezifischen Spaltung anderer RNA-Moleküle überwiegend zur Inhibition der Genexpression eingesetzt [13, 15, 28, 38, 134]. Es ist jedoch noch ein weiterer Weg bis zur Entwicklung von Ribozymen, die es ermöglichen könnten, Krankheiten wie z. B. AIDS oder Krebs zu therapieren.

Die Funktion einer Nukleinsäure und ihre Wechselwirkungen mit anderen Molekülen werden durch ihre Sequenz und die daraus resultierende Struktur bestimmt [138]. Bei der katalytischen Aktivität von Ribozymen spielen nicht nur die Struktur, sondern auch die Anwesenheit von Metallionen eine entscheidende Rolle. Die Metallionen besitzen zwei Hauptfunktionen, denn sie sind einerseits für die Ausbildung und Stabilität der katalysierfähigen RNA-Struktur mitverantwortlich und andererseits direkt an der RNA-katalysierten Reaktion beteiligt [127]. Die Bindung von zweiwertigen Kationen (besonders Mg<sup>2+</sup>) ist für die katalytische Aktivität von RNAs, wie dem *Hammerhead*-Ribozym, essentiell [16, 23, 126, 157]. Im Gegensatz dazu ist beim *Hairyin*-Ribozym auch eine katalytische Aktivität in Abwesenheit eines zweiwertigen Metallions beobachtet worden [25, 37, 172]. Die Metallionen scheinen hier keine direkte katalytische, sondern nur eine Struktur-stabilisierende Funktion zu besitzen, die auch von anderen Molekülen, wie z. B. dem Polyamin Spermin, übernommen werden kann.

Die Wechselwirkungen zwischen den zweiwertigen Metallionen und dem *Hammerhead*-Ribozym sind überwiegend durch die Messung der Spaltungsrate in Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration bestimmt worden [104, 33, 52]. Durch den Austausch eines Sauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom in einer Nukleinsäure läßt sich selektiv eine bestimmte Bindungsstelle besonders mit „weichen“ Metallionen (wie z. B. Hg<sup>2+</sup> oder Pt<sup>2+</sup>) nach dem Konzept der harten und weichen Säuren und Basen (HSAB, *hard and soft acids and bases*) von Pearson [98] gut untersuchen. Die Substitution von Phosphorthioaten ist sowohl am aktiven Zentrum als auch an anderen Positionen des *Hammerhead*-Ribozyms vielfach durchgeführt worden [32, 136, 152], wobei mit Hilfe der CD-Spektroskopie eine globale Mg<sup>2+</sup>-Bindungskonstante von ca. 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> bestimmt worden ist [74].

Die detaillierte Analyse lokaler Bindungsstellen für Metallionen wie Mg<sup>2+</sup> an eine RNA kann erst durch den selektiven Einbau einer sensitiven Reportergruppe erreicht werden. Ein klassisches Beispiel ist die Entdeckung des *Inner-Sphere*-Komplexes ei-

nes  $Mg^{2+}$ -Ions mit Hilfe der natürlichen Y-Base als Reportergruppe in tRNA<sup>Phe</sup> [77, 121]. Das 2-Aminopurin-Ribonukleosid (2AP) eignet sich hervorragend als sensibler Indikator von strukturellen Veränderungen in Nukleinsäuren, denn das 2AP besitzt eine fluoreszierende Gruppe, deren Fluoreszenz auf Veränderungen in den Wechselwirkungen der Basenstapelung (*base stacking*) von Nukleinsäuren sehr empfindlich reagiert [87, 168]. Aufgrund seiner geringen Unterschiede zu den natürlichen Nukleosiden läßt sich 2AP ohne wesentliche Einschränkungen der natürlichen Funktion an beliebigen Positionen des *Hammerhead*-Ribozyms einbauen [91, 162].

## 1.2 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit liegt im wesentlichen in der Erforschung zweier Themen. Einerseits sollte die Struktur und die Dynamik des *Hammerhead*-Ribozyms weiter aufgeklärt, andererseits die Natur der Magnesiumbindung an das *Hammerhead*-Ribozym bestimmt werden. Nach dem Einbau des 2-Aminopurin-Ribonukleosids an verschiedenen Stellen des RNA-Moleküls sollten vorwiegend Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden. Die Reportergruppe 2AP sollte auch in kürzere und einfachere Ribonukleinsäuren eingebaut werden, um die Eigenschaften und den Einfluß der Reportergruppe 2AP zunächst an einfacheren RNA-Strukturen zu untersuchen und zu verstehen. Die dazu durchgeführten Experimente lassen sich in zwei verschiedene Schwerpunkte gliedern:

1. Durch die Fluoreszenztitrations sollten die Bindungskonstanten ( $K$ ) der zu untersuchenden Ribonukleinsäuren mit den zweiwertigen Kationen Magnesium und Calcium bestimmt werden. Weiterhin sollten aus der jeweiligen Zu- oder Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Zugabe eines Metallions die entsprechenden relativen Quantenausbeuten ( $q$ ) ermittelt werden. Da die Fluoreszenzlöschung (*Quenching*) ein Maß für die Basenstapelung der Reportergruppe 2AP innerhalb eines RNA-Moleküls ist, sollten aus dem Vergleich der normierten Fluoreszenzintensitäten der RNA-Moleküle vor der Metallionenzugabe und aus den Quantenausbeuten bei den Titrationsmessungen qualitative Aussagen über die jeweilige RNA-Struktur ermittelt werden.
2. Mit Hilfe von Kinetikmessungen an Temperatursprung- und *Stopped-Flow*-

Apparaturen sollten neben der Struktur und der Dynamik der Ribonukleinsäuren auch die Art der Magnesium-Komplexbindung näher untersucht werden. Dabei sollte die Messung von  $n$  Relaxationszeiten ( $\tau$ ) der Ribonukleinsäuren vor der Metallionenzugabe die quantitative Bestimmung von  $n+1$  verschiedenen Konformationen eines RNA-Moleküls ermöglichen. Die Titrationsmessungen mit  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen sollten am Temperatursprung durchgeführt werden, um einen *Inner-Sphere*-Komplex des Magnesiums an RNA-Molekülen nachzuweisen. Sowohl die Geschwindigkeitkonstanten als auch die möglichen Reaktionsmechanismen sollten durch die Anpassung von Reaktionsmodellen an die kinetischen Meßdaten ermittelt werden.

# Kapitel 2

## Grundlagen

### 2.1 RNA-Strukturen

#### 2.1.1 Allgemeines

Die Entdeckung der Doppelhelixstruktur von komplementären Desoxyribonukleinsäuren (DNA) im Jahre 1953 ist der grundlegende Beitrag zur Aufklärung der Funktion der Nukleinsäuren gewesen [169]. Die Ribonukleinsäure ist wie die DNA ein Polynukleotid, wobei jedes Nukleotid einer RNA aus einem Zucker (D-Ribose), einem Phosphat und einer Purinbase (Guanin oder Adenin) oder einer Pyrimidinbase (Cytosin oder Uracil) besteht [159].

Die RNA ist in der Natur fast immer — außer in einigen Viren — einzelsträngig. Jedoch entstehen durch intramolekulare Rückfaltungen in einer RNA-Struktur doppelhelikale Bereiche, die aufgrund der 2'-Hydroxylgruppe an der Ribose der A-DNA entsprechende, rechtsgängige Doppelhelices sind. Im Unterschied zu der in wässrigen Lösungen bevorzugten B-DNA-Doppelhelix (*Watson-Crick-Helix*) besitzen die Desoxyriboseseinheiten in der A-DNA wegen ihrer Faltung (*puckering*) eine *C<sub>3'</sub>-endo*-Konformation.

Die Struktur einer Ribonukleinsäure wird in erster Linie durch ihre Primärstruktur bestimmt, die durch die Sequenzfolge der Nukleotide in der konventionellen 5' → 3'-Richtung gekennzeichnet ist. Die Sekundärstruktur entsteht unter Ausbildung von stabilen doppelhelikalen Bereichen durch die zweidimensionale Faltung einer RNA.



Schließlich werden bei der Tertiärstruktur die räumlichen Wechselwirkungen von interagierenden Sekundärstrukturelementen berücksichtigt. Diese Sekundärstrukturelemente (s. Abb. 2.1) sind sowohl einzel- und doppelsträngige Bereiche als auch Haarnadeln (*hairpin*), Ausbuchtungen (*bulge*), innere Schleifen (*internal loop*) und Kreuzungen (*junction*) [24]. Eine symmetrische innere Schleife mit einem oder zwei ungepaarten Nucleotiden (keine *Watson-Crick*-Basenpaare) je Strang wird auch als Basenfehlpaar oder Tandembasenfehlpaar bezeichnet.

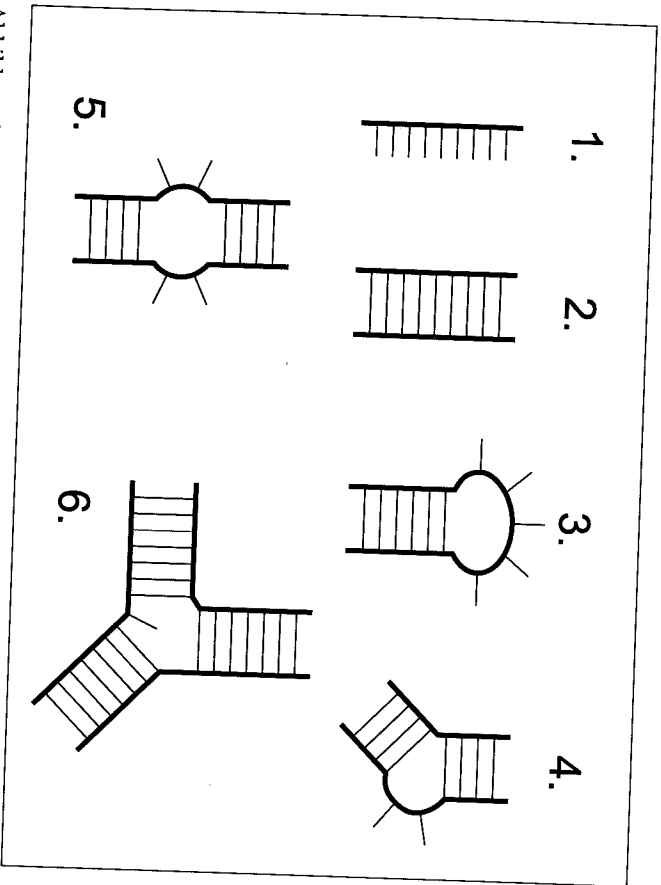


Abbildung 2.1: Sekundärstrukturelemente einer RNA [24]: 1. Einzelstrang, 2. Doppelseitiger Strang, 3. Haarnadel (*hairpin*) aus Haarnadelschleife und Haarnadelschleife, 4. Ausbuchtung (*bulge*): Ungepaarte Nucleotide innerhalb einer Doppelhelix, 5. Innere Schleife (*internal loop*), 6. Kreuzungen (*junction*): Mehrsträngige Struktur.

Die Wechselwirkungen innerhalb einer RNA-Struktur bestehen im wesentlichen aus den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen, den Basenstapelungen (*base stacking*) und den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Phosphatgruppen. Bei der thermodynamisch bedingten Rückfaltung einer RNA zur Se-

kundärstruktur werden neben den kanonischen *Watson-Crick*-Basenpaaren G·C und A·U häufig auch G·U Basenpaare (*Wobble*-Basenpaare) gefunden (s. Anhang A). Außerdem den *Watson-Crick*-Basenpaaren gibt es zuweilen auch die *Hoogsteen*-Basenpaare sowie deren reversen Basenpaare. Weitere Wechselwirkungen zwischen einzelnen Basen, wie z. B. die Ausbildung von Basentriplets und Pseudoknoten, sowie zwischen den Gruppen einzelner Nucleotidbausteine, wie z. B. Base und Ribose, bestimmen letztendlich die Tertiärstruktur. Die tRNA-Struktur veranschaulicht die Komplexität ausgezeichnet, denn während die Sekundärstruktur einen Kleblatt ähnelt, ist die Tertiärstruktur L-förmig [19a].

### 2.1.2 Struktur von Haarnadelschleifen

Die RNA-Struktur einer Haarnadel (*hairpin*) entsteht durch die Ausbildung eines antiparallelen Doppelstrangs [63]. Ihre Sekundärstruktur (s. Abb. 2.1) enthält einen basengepaarten, doppelsträngigen, helicalen Abschnitt, den sog. Stamm (*stem*), und eine am einen Ende aus ungepaarten Nucleotiden bestehende Schleife (*loop*). Die Umkehrung des Strangverlaufs bedingt eine Änderung der Struktur des RNA-Rückgrats im Verlauf der Schleifennucleotidkette. Die Sequenz und die Anzahl der Schleifennucleotide bestimmen schließlich die Struktur. Für die Ausbildung einer Haarnadelschleife wird die Anwesenheit von mindestens drei Schleifennucleotiden angenommen, weil einerseits die Distanz zwischen den zu verknüpfenden 3'- und 5'-Sauerstoffatomen am Ende eines RNA-Duplexes ca. 16 Å beträgt und andererseits die Entfernung benachbarter Phosphoratomme einer Internucleotidbindung in Abhängigkeit von der RNA-Konformation zwischen 6 und 8 Å liegt.

Thermodynamische Studien an Haarnadelschleifen mit den Sequenzen (A)<sub>n</sub>, (C)<sub>n</sub> und (U)<sub>n</sub> für n = 3–9 haben gezeigt, daß die stabilsten Schleifen 4 oder 5 Nucleotide enthalten [53]. Diese Ergebnisse sind mit den am häufigsten, natürlich vorkommenden Haarnadelschleifen konsistent, denn die Haarnadelschleifen bestehen z. B. in ribosomaler RNA zu ca. 40–60 % aus Tetranucleotidschleifen und zu ca. 10–25 % aus Pentanucleotidschleifen. Die Tetranucleotidschleifen der rRNA lassen sich in drei Sequenzklassen einteilen: C(GNRA)G, C(UNCG)G und C(CUUG)G mit N ≙ beliebiges Nucleotid und R ≙ G oder A. Bei allen drei Sequenzklassen schließt ein

G-C Basenpaar die Schleife ab, wobei die C(GNRA)G-Tetranukleotidschleife mit ca. 53% am häufigsten vorkommt [171].

Die Struktur des GNRA-*Tetraloops* ist an C(GNAA)G-Haarnadelschleifen mit  $N \triangleq C$ , A oder U sowohl durch NMR-Studien [62] als auch an Kristallstrukturen [108, 145] von *Hammerhead*-Ribozymen erfolgreich untersucht worden. Die Abbildung 2.2 zeigt die Struktur der C(GAAA)G-Haarnadelschleife in der Helix II eines *Hammerhead*-Ribozyms [170]. Das Guanosin an der Position L2.1 (G<sub>L2.1</sub>) bildet insgesamt drei Wasserstoffbrücken zu den gegenüberliegenden Ribonukleotiden aus. Diese sind zwischen der 2'-Hydroxylgruppe von G<sub>L2.1</sub> und N7 von A<sub>L2.3</sub> und zwischen der außercyclischen Aminogruppe von G<sub>L2.1</sub> und N7 von A<sub>L2.4</sub> sowie der *pro*-R<sub>p</sub>-Hydroxylgruppe eines Phosphats lokalisiert. Starke Basenstapelungswechselwirkungen zwischen den drei Adenosinen stabilisieren zusätzlich die *Loop*-Struktur.

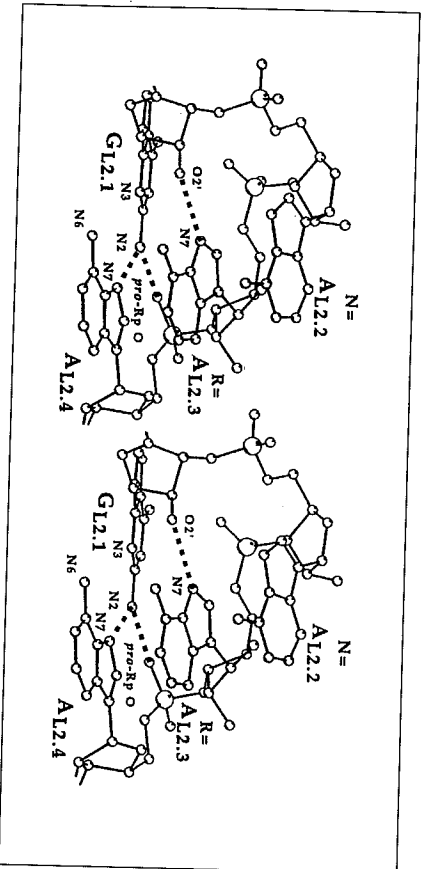


Abbildung 2.2: Stereobild der GAAA-Tetranukleotid-Haarnadelschleife im *Hammerhead*-Ribozym [170].

Die Haarnadelschleifen des GNRA-Typs scheinen auch bei Proteinbindungsstellen [176] und bei der Ausbildung von RNA-Tertiärstrukturen [88] eine wichtige Rolle zu spielen. Die in Modellrechnungen [73, 86] vorhergesagten Wechselwirkungen von Tetranukleotidschleifen in RNA-Tertiärstrukturen sind in kristallographischen Untersuchungen bestätigt worden [109]. Dabei sind Wechselwirkungen zwischen einem GAAA-*Tetraloop* und einer benachbarten Doppelhelixregion gefunden worden, die

aus mehreren Wasserstoffbrückenbindungen unter Beteiligung von 2'-Hydroxylgruppen bestehen.

### 2.1.3 Struktur des *Hammerhead*-Ribozyms

Das *Hammerhead*-Ribozym-Motiv ist 1986 in einigen kleinen Satelliten-RNAs identifiziert worden, die als molekulare Parasiten, immer assoziiert mit bestimmten RNA-Pflanzenviren, wie z. B. dem *Tobacco Ringspot*-Virus, vorkommen [18]. Diese in multimeren Formen auftretenden Satelliten-RNAs können sich selbst *in vivo* und *in vitro* zu linearen, biologisch aktiven RNA-Monomeren spalten [124]. Sequenzen des gleichen Typs sind auch in Transkripten einer repetitiven Molch-DNA [42] und in der (+) - und (-)-RNA des *Avocado Sunblotch Viroids* [71] entdeckt worden.

#### 2.1.3.1 Die Konsensus-Sekundärstruktur

Die Primär- und Sekundärstruktur des *Hammerhead*-Ribozyms ist durch Sequenzvergleich der spaltenden Regionen bekannter pathogener Satelliten- und Viroid-RNAs bestimmt worden [17, 148]. Der charakteristischen T-Form der zweidimensionalen Struktur des katalytischen Zentrums hat das *Hammerhead*-Ribozym seinen Namen zu verdanken. Die Sekundärstruktur ist eine Kreuzung (s. Abb. 2.1) aus drei aufeinander zulaufenden, basengepaarten Helices, die im Kern (*core*) durch einzelne, hochkonservierte Nukleotidschleifen verknüpft sind. Der Kern enthält insgesamt 14 konservierte Positionen. Mit Hilfe eines einheitlichen Nummerierungssystem [58] ist 1992 die Konsensus-Struktur des *Hammerhead*-Ribozyms eingeführt worden (s. Abb. 2.3).

Die aus Mutagenese-Studien abgeleitete Sekundärstruktur ist durch thermodynamische Kalkulationen [48, 26] und NMR-Studien [60, 61, 93, 99] bestätigt worden. Aus 2D-NOE-Spektren von <sup>1</sup>H-NMR-Studien sind die postulierten Doppelhelices nachgewiesen worden. Mit neueren heteronuklearen (<sup>13</sup>C oder <sup>15</sup>N)-NMR-Studien sind auch Konformationsänderungen im katalytischen Kern bei der Spaltung des RNA-Substrates festgestellt worden [151].

Die natürlichen *Hammerhead*-Ribozyme bestehen vor der Spaltung aus einem einzigen langen RNA-Molekül. Es sind jedoch aus kurzen, synthetisch hergestellten

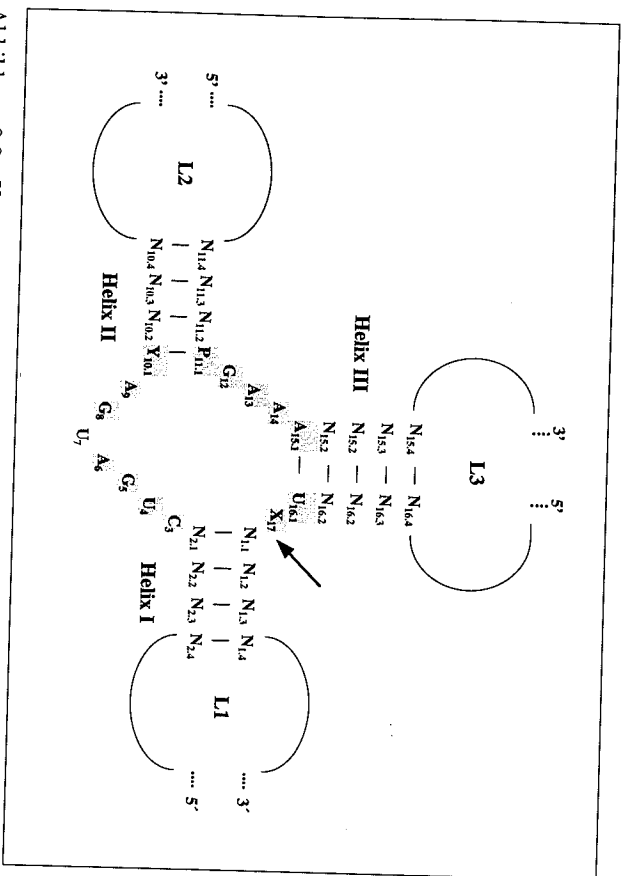


Abbildung 2.3: *Konsensus-Struktur des Hammerhead-Ribozyms. Grau hinterlegte Bereiche kennzeichnen konservierte Nucleotide. Die Basenpaare in den helixalen Bereichen sind durch Striche angedeutet. Der Pfeil zeigt die Spaltstelle, und die möglichen Loops (L1-3) können in Sequenz und Länge variieren. Die Nummerierung der Helices und Nucleotide ist gemäß HERTZEL [58].*

$A \triangleq$  Adenosin,  $C \triangleq$  Cytidin,  $G \triangleq$  Guanosin,  $U \triangleq$  Uridin,  $P \triangleq$  Purinribonucleosid,  $Y \triangleq$  Pyrimidinribonucleosid,  $N \triangleq$  beliebiges Nucleosid,  $X \triangleq N$  außer  $G$ .

Oligonucleotiden katalytisch aktive *Hammerhead*-Ribozyme hergestellt worden, in denen die Konsensus-Struktur zwar erhalten blieb, aber nur eine oder keine Schleife vorhanden war [57, 165]. Diese *Hammerhead*-Strukturen arbeiten wie klassische Enzyme, weil sie mehrere Spaltungen (*multiple-turnover cleavage*) hintereinander katalysieren können. Dadurch ergibt sich eine Einteilung in zwei Arten von Spaltungsreaktionen:

- **cis-Spaltung:** Intramolekulare Spaltung oder Selbstspaltung, bei der die *Hammerhead*-Konsensus-Sequenz aus nur einem RNA-Strang besteht.

- **trans-Spaltung:** Intermolekulare Spaltung nach Bildung eines Ribozym-Substrat-Komplexes, bei der die entsprechende *Hammerhead*-Konsensus-Sequenz aus zwei oder drei separaten RNA-Strängen besteht. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß alle Helices durch eine genügend große Anzahl von Basen stabilisiert werden. Eine Unterteilung in katalytisch wirkende Enzym-RNA (Ribozym) und spaltbare Substrat-RNA ist die Folge.

Kinetische Studien an modifizierten *Hammerhead*-Ribozymen unter Austausch von einzelnen Basen oder begrenztem Austausch von Basenpaaren [135, 147] haben die Sequenz von konservierten Nucleotiden bestätigt. Mit Ausnahme von Substitutionen am  $U_7$  reduziert ein Basenaustausch im Kern die katalytische Aktivität, wobei Substitutionen am  $G_5$  oder  $A_{14}$  die Spaltungsaktivität völlig zerstören [81]. Der Einfluß von selektiv modifizierten funktionellen Gruppen einzelner Basen ist ebenfalls durch zahlreiche kinetische Studien untersucht worden [76, 81]. Dabei ist die Anwesenheit der 2'-Hydroxygruppe an der Ribose des  $X_{17}$  für eine katalytische Ribozymaktivität absolut erforderlich [31]. In Abhängigkeit von der Sequenz und der Spaltungsart (*cis* oder *trans*) sind für das Spaltungstriplett ( $UX^1N$ ) (s. Abb. 2.3) Aktivitätsreihen bestimmt worden [149, 174].

### 2.1.3.2 Die Tertiärstruktur

Die unabhängige Anwendung von vier verschiedenen biophysikalischen Techniken hat das bestehende dreidimensionale Bild des *Hammerhead*-Ribozyms wesentlich geprägt. Mit den Techniken der elektrischen Doppelbrechung [2], der elektrophoretischen Mobilität [8] und des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) [163] ist die räumliche Positionierung der drei Doppelhelices des *Hammerhead*-Ribozyms bestimmt worden. Die Röntgenstrukturanalyse [108, 145, 146] hat jedoch zusätzlich auch die atomare Auflösung der Kernstruktur ermöglicht. Trotz vieler Gemeinsamkeiten hat es zwischen der Kristallstruktur und dem FRET-Modell Unterschiede in der relativen Orientierung von den Helices I und II gegeben. Allerdings ist die Kristallstruktur durch interhelikales *Cross-linking* in zwei *Hammerhead*-Ribozymen und anschließenden Aktivitätsmessungen [150] bestätigt worden.

In Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen besitzt die Tertiärstruktur des *Hammerhead*-

Ribozym (s. Abb. 2.4) eine Y-förmige (*Y-shaped*) Gestalt, in der die Helices I und II die Arme und Helix III die Basis der Y-Form bilden. Dabei sind die Helices II und III beinahe kollinear. Die  $Mg^{2+}$ -Ionen haben hier eine große stabilisierende Wirkung auf die Struktur. Eine leicht veränderte Tertiärstruktur ist in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen gefunden worden, denn in diesem Fall liegt ein kollineare Anordnung der Helices I und II vor [2, 8].

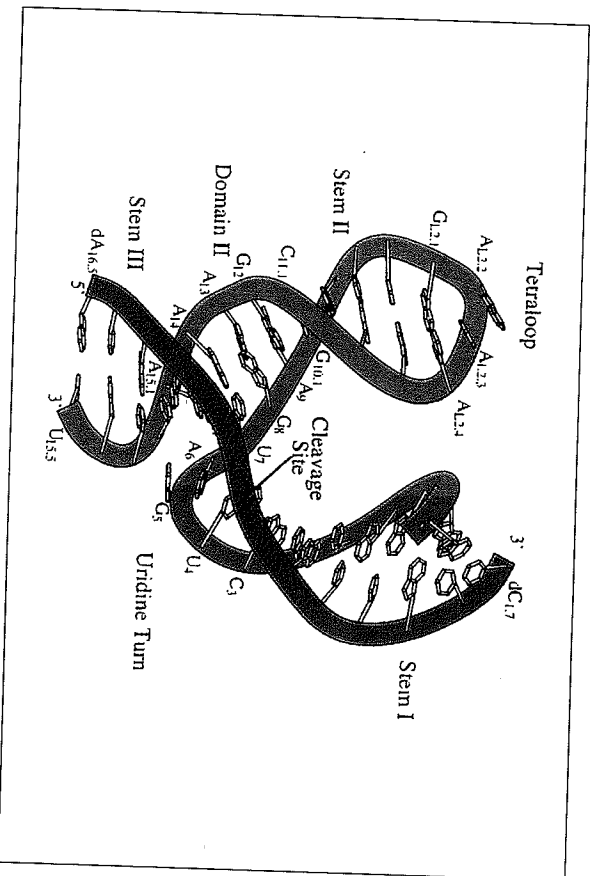


Abbildung 2.4: Tertiärstruktur des Hammerhead-Ribozyms [108].

Während PLEY und MCKAY [108] für die Röntgenstrukturanalyse ein DNA-Substrat verwendet haben, sind von SCOTT und KRUG sowohl ein RNA-Substrat mit einem 2'-O-Methylcytidin an der Position 17 [145] zur Unterdrückung der Spaltungsreaktion [31] als auch ein unmodifiziertes *Hammerhead*-Ribozym [146] benutzt worden. Neben den A-RNA-Helices I, II und III besitzt der katalytische Kern zwei weitere strukturelle Domänen. Die Domäne I (C<sub>3</sub>-A<sub>6</sub>) ist der sog. *U-turn* (*sharp turn*), dessen Struktur auch in vielen tRNAs vorhanden ist [128]. Stabilisiert wird der *U-turn* durch zwei Wasserstoffbrücken, die zwischen der 2'-Hydroxylgruppe

vom U<sub>4</sub> und dem N<sub>7</sub> von A<sub>6</sub> sowie zwischen dem N<sub>3</sub> von U<sub>4</sub> und der *pro*-S<sub>p</sub>-Phosphatgruppe des U<sub>7</sub> liegen. Die Domäne II (U<sub>7</sub>-A<sub>9</sub> und G<sub>12</sub>-A<sub>14</sub>) besitzt ein G/A-Tandembasenfehlpaar (*tandem G-A mismatch*), das schon aus NMR-Studien von Doppelhelices kurzer Oligonukleotide bekannt ist [140]. In die stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen ist bei beiden Basenfehlpaares immer die Ribose eines Nucleotids mit eingebunden. Beide Kristallstrukturen zeigten nur geringe Unterschiede im Bereich der Spaltregion und der Domäne II [81, 170]. Außerdem ist in beiden Strukturen die Bindung eines zweiwertigen Metalls am N<sub>7</sub> von G<sub>9</sub> und der *pro*-R<sub>p</sub>-Phosphatgruppe von A<sub>9</sub> identifiziert worden.

### 2.1.3.3 Kinetik und Mechanismus der Spaltungsreaktion

Zur Charakterisierung der Kinetik der RNA-Spaltungsreaktion des *Hammerhead*-Ribozym sind zunächst Messungen im stationären Zustand (*steady state*) unter *Michaëlis-Menten*-Bedingungen durchgeführt worden [45, 103]. Dabei erfolgt die Untersuchung des Spaltungsmechanismus (s. Abb. 2.5) entweder unter *Multiple-Turnover*- oder *Single-Turnover*-Bedingungen. Im ersten Fall liegt das Substrat im Überschuss vor, und das Ribozym ist in der Lage, mehrere Substratmoleküle zu spalten. Wenn diese Bedingungen ungeeignet sind, wie z. B. bei der Spaltung von mehrere tausend Nucleotide langen RNA-Transkripten, werden *Single-Turnover*-Bedingungen gewählt, d. h., das Ribozym liegt — relativ zum Substrat — im Überschuss vor. Spätere Messungen im vorstationären Zustand (*pre-steady state*) haben die Erstellung eines minimalen Mechanismus der ribozymkatalysierten Substratspaltung (s. Abb. 2.5) ermöglicht [46, 59].

Das *Hammerhead*-Ribozym katalysiert eine Phosphordiester-Umesterung, wobei durch eine 3', 5'-Phosphordiester-spaltung zwei Fragmente, eine 5'-Hydroxyl-RNA und eine 2', 3'-zyklische Phosphat-RNA, entstehen [165]. Die ribozymkatalysierte RNA-Spaltung ist nur in Anwesenheit von zweiwertigen Metallionen (wie  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  und andere) beobachtet worden [32, 33, 57, 74]. Die Verwendung von alternativen Gegenionen, wie dem Polyanion Spermidin oder dem Alkalimetallkation  $Na^+$ , hat die zur Spaltung erforderliche Konzentration von zweiwertigen Kationen zwar drastisch gesenkt, aber immer noch deren Anwesenheit erfordert

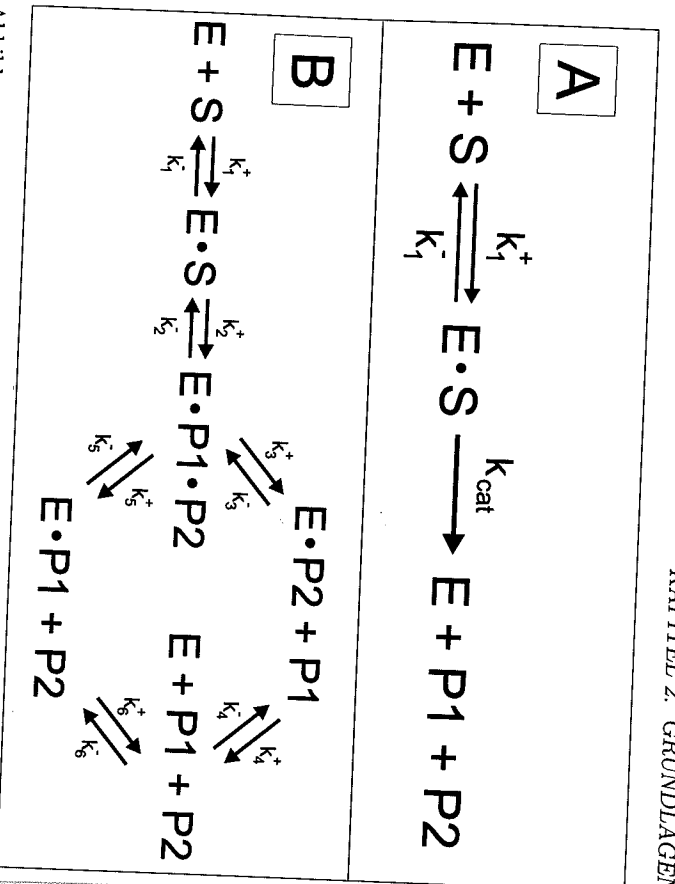


Abbildung 2.5: Reaktionsmechanismen des Hammerhead-Ribozyms: A. Reaktionsschema einer einfachen Michaelis-Menten-Enzymkatalyse, B. Minimaler Mechanismus einer internmolekularen Hammerhead-Ribozymkatalyse nach UHLENBECK und Mitarbeiter [46, 59].

[32]. Demnach sind zweiwertige Metallionen nicht nur an der Stabilisierung der RNA-Tertiärstruktur, sondern auch direkt an der Spaltungsreaktion beteiligt. Weiterhin wird die lineare Korrelation der pH-abhängigen Reaktionsgeschwindigkeit mit den  $pK_a$ -Werten der verwendeten solvatisierten Metallionen als ein Indiz dafür gewertet, daß koordinierte Metallionen-hydroxo-aqua-Komplexe in die Protonierungs- und Deprotonierungsschritte involviert sind [33]. Jedoch wird auch eine direkte Wechselwirkung der Metallionen mit den Sauerstoffatomen vermutet [141]. Allerdings hat die Kristallstruktur durch den Nachweis von Lösungsmittelclustern nur einen indirekten Beweis für die Metallionenbindung an der Spaltstelle geliefert [145]. Die Substitution des Phosphats an der Spaltstelle XpN durch die diastereomeren R<sub>p</sub>- und S<sub>p</sub>-Phosphorothioate und die anschließende Analyse der Spaltprodukte ha-

ben einen Beleg für ein koordiniertes Metallion am *pro*-R<sub>p</sub>-Phosphatsauerstoffatom der Spaltstelle erbracht und somit die stereochemische Aufklärung des Reaktionsmechanismus ermöglicht. Beim Austausch des *pro*-R<sub>p</sub>-O gegen ein Schwefelatom ist in Gegenwart der Mg<sup>2+</sup>-Ionen eine starke, jedoch bei Mn<sup>2+</sup>-Ionen nur eine schwache Reduzierung der Spaltungsreaktion beobachtet worden. Im Gegensatz dazu ist sowohl beim Austausch des *pro*-S<sub>p</sub>-O gegen S als auch bei den unmodifizierten Substraten im wesentlichen kein Unterschied zwischen der Spaltungsreaktionsgeschwindigkeit unter Verwendung der Metallionen Mg<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> entdeckt worden [32, 74, 152, 166]. Weil das harte Mg<sup>2+</sup>-Ion bevorzugt an Sauerstoff und das weiche Mn<sup>2+</sup>-Ion bevorzugt an Schwefel nach dem HSAB-Konzept der harten und weichen Säuren und Basen von PEARSON [98] bindet [101], kann die veränderte Metallionenspezifität nach dem Austausch von *pro*-R<sub>p</sub>-O gegen S als Nachweis für eine Metallionenbindungsstelle dienen. Unter Berücksichtigung der stereochemisch definierten phosphorothioathaltigen Substrate verläuft die Spaltung nach einem klassischen S<sub>N</sub>2(P)-Mechanismus [85], wobei die 2-Hydroxylgruppe das Phosphoratom unter Inversion der Konfiguration angreift (s. Abb. 2.6).

Ein ähnlicher stereochemischer Reaktionsverlauf ist auch in den durch Ribonuklease (RNase) A katalysierten Reaktionen festgelegt worden [14, 137]. Zur Stabilisierung der Abgangsgruppe ist auch die Anwesenheit eines zweiten Metallions vorgeschlagen worden [141]. Dieser *in-line-attack*-Mechanismus bedingt jedoch eine Konformationsänderung des Grundzustandes (A-RNA), um den Angriff des 2'-O am Phosphoratom der Base X<sub>17</sub> zu ermöglichen. SCOTT und Mitarbeiter haben kürzlich ein Ribozym mit einem 5'-Methyladenosin an der Position 1.1 kristallographisch untersucht, dessen Struktur den für diesen Mechanismus erforderlichen Übergangszustand beschreiben könnte [89].

Einen interessanten Aspekt haben die Untersuchungen der Funktion zweiwertiger Metallionen an der Spaltungsreaktion des *Hairyin*-Ribozyms geliefert. Im Gegensatz zum *Hammerhead*-Ribozym ist beim *Hairyin*-Ribozym in Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen unter Verwendung von alternativen Gegenionen, wie den Polyanionen Spermidin [25] und Spermin [37] und inerten Co(III)-Komplexen [172], eine Spaltungsaktivität beobachtet worden, die in den beiden letzten Fällen mit der bei Mg<sup>2+</sup>-Präsenz gefundenen Spaltungsaktivität vergleichbar war. Im Gegensatz

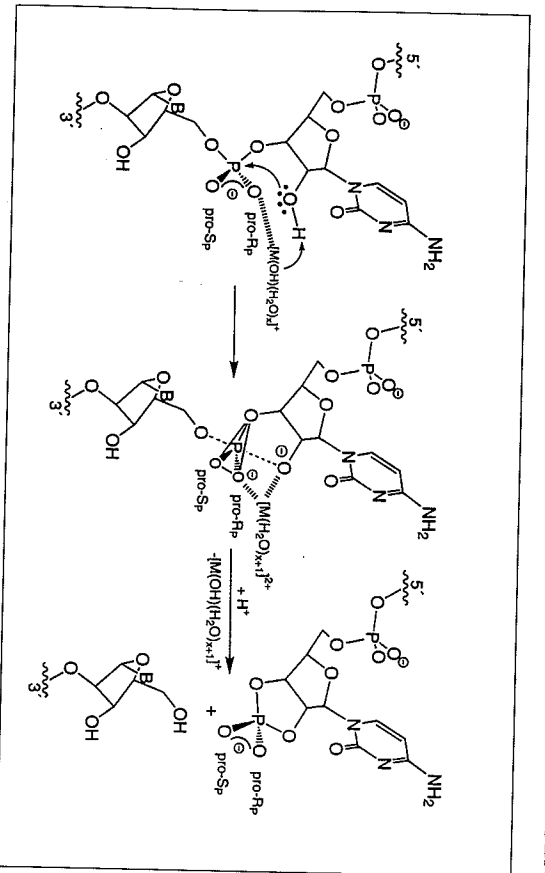


Abbildung 2.6: Stereochemischer Verlauf der Phosphatdiesterpaltung beim Hammerhead-Ribozym. *5P* und *3P* kennzeichnen die Stereochemie am Phosphoratom. Ein am pro-*R\_p*-O koordiniertes Metallion (hier dargestellt) oder ein zusätzliches zweites Metallion in Form eines solvatisierten Hydroxokomplexes können das Proton der 2'-Hydroxylgruppe abstrahieren [39, 152].

zum Hammerhead-Ribozym scheinen die Metallionen beim Hairpin-Ribozym nur eine passive Rolle in Form einer strukturstabilisierenden Funktion zu besitzen.

## 2.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

### 2.2.1 Allgemeines

Spektroskopische Methoden ermöglichen die Untersuchung von Atomen, Molekülen oder Festkörpern durch deren Wechselwirkungen mit elektromagnetischer Strahlung. Mit der Fluoreszenz-Spektroskopie können viele Eigenschaften, wie z. B. Konformationen, Bindungen von Liganden oder Wechselwirkungen mit Solventen, von Biomolekülen bestimmt werden [6, 19b].

Die Fluoreszenz-Spektroskopie ist durch die relativ lange Lebensdauer der angeregten Moleküle viel empfindlicher und selektiver als die Absorptionsspektroskopie. Während dieser relativ langen Lebensdauer können viele Prozesse, wie Konformationsänderungen oder Reaktionen infolge von Translation oder Rotation der Moleküle, ablaufen. Die empfindliche Reaktion auf Veränderungen in der Umgebung des Chromophors erlaubt die Verfolgung kinetischer Prozesse, wie Faltung einer RNA oder Bindung eines Liganden. Die Fluoreszenzintensität einiger Moleküle wird in wässrigen Lösungen stark gelöscht, während die Fluoreszenz in unpolaren bzw. 'starrer' Umgebung meist um mehr als den Faktor 20 erhöht wird.

Nach der Anregung durch die Absorption von Photonen (Photolumineszenz) kann ein elektronisch angeregtes Molekül durch verschiedene photophysikalische Prozesse wieder in den Grundzustand ( $S_0$ ) überführt werden. Durch einige strahlungslose Prozesse, wie Schwingungsrelaxation oder interne Umwandlung (*internal conversion*), erfolgt zunächst eine Desaktivierung zum niedrigsten Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustandes ( $S_1$ ). Unter Emission von Licht wird der Übergang von diesem angeregten Zustand in den Grundzustand als Fluoreszenz bezeichnet. Die Energie dieses Singulett-Singulett-Übergangs ist theoretisch im Grenzfall genauso groß (Resonanzfluoreszenz), in der Praxis aber kleiner als die der Anregung, d. h., die Fluoreszenz ist längerwelliger als die absorbierte Strahlung. Die Absorptions- und Fluoreszenzbanden verhalten sich annähernd wie Bild und Spiegelbild, wenn die Schwingungsniveaus des Grund- und des ersten elektronisch angeregten Zustandes ähnlich sind. Das Fluoreszenzlicht wird im wesentlichen durch folgende Parameter charakterisiert:

1. Die spektrale Zusammensetzung des Lichtes (Fluoreszenzspektrum) wird für die Identifizierung und Strukturklärung einer fluoreszierenden Substanz benutzt.
2. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute ( $\phi_F$ ) ist definiert als der Anteil der angeregten Zustände, der durch Fluoreszenz in den Grundzustand überführt wird und ist somit gleich dem Verhältnis der durch Fluoreszenz emittierten Photonen zu den absorbierten Photonen eines Systems. Die Abklingzeit der Fluoreszenz ( $\tau_F$ ) kann durch direkte zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität nach einem kurzen Anregungspuls bestimmt werden und ist gleich dem Produkt der Emissionszeitkonstante ( $\tau_E$ ) und der Fluoreszenz-Quantenausbeute ( $\phi_F$ ):

$$\phi_F = \frac{k_E}{k_E + k_{IC} + k_{ISC} + k_Q \cdot [Q]} = \frac{\tau_F}{\tau_E} \quad (2.1)$$

$$\Rightarrow \tau_F = \frac{1}{k_E + k_{IC} + k_{ISC} + k_Q \cdot [Q]} \quad (2.2)$$

mit  $k_E$  = Geschwindigkeitskonstante der Emission

$k_{IC}$  = Geschwindigkeitskonstante der internen Umwandlung

$[Q]$  = Konzentration gelöster Stoffe (*Quencher*)

$k_{ISC}$  = Geschwindigkeitskonstante der Umwandlung vom angeregten

Singulett-Zustand in den angeregten Triplett-Zustand

(*intersystem crossing*)

3. Die Fluoreszenzintensität ( $F(\lambda)$ ) wird zur Konzentrationsbestimmung einer fluoreszierenden Substanz verwendet, wobei aufgrund konzentrationsabhängiger Desaktivierungsprozesse für die quantitative Bestimmung Eichkurven erforderlich sind. Es gilt:

$$F(\lambda) = 2.303 \cdot \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \cdot I_0 \cdot \phi_F \cdot f(\lambda) \cdot \delta \quad (2.3)$$

mit  $\epsilon(\lambda)$  = Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$  (Anregung)

$c$  = Konzentration der fluoreszierenden Substanz

$d$  = optische Schichtdicke

## 2.2. FLUORESCENZ-SPEKTROSKOPIE

$I_0$  = Lichtintensität des Anregungslichtes  
 $f(\lambda)$  = Anteil der Emission bei der Wellenlänge  $\lambda$   
 $\delta$  = geometrischer Faktor

4. Die Polarisation der Fluoreszenz liefert Informationen über Größe, Form und Flexibilität von Makromolekülen. Bei Anregung mit linear polarisiertem Licht erfolgt durch Photoselenktion eine anisotrope Verteilung angeregter Moleküle. Die Folge ist eine anisotrope Emission. Für die Polarisation ( $P$ ) und Anisotropie ( $A$ ) gilt:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (2.4)$$

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.5)$$

mit  $I_{\parallel}$  = Fluoreszenzintensität parallel zur Polarisationssebene

$I_{\perp}$  = Fluoreszenzintensität senkrecht zur Polarisationssebene

### 2.2.2 2-Aminopurin-Ribonukleosid als chromophore Gruppe

pe

Die natürlichen Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil einer RNA-Struktur besitzen nur sehr geringe Fluoreszenz-Quantenausbeuten (ca.  $10^{-4}$ ) und auffallend kurze Fluoreszenz-Lebensdauern von  $\tau_F < 20$  ps [19b]. Die Fluoreszenzuntersuchung einer RNA-Struktur oder Dynamik muß also mit anderen Chromophoren erfolgen.

Eine häufige Anwendung ist der Einbau einer chromophoren Gruppe, wie z. B. Rhodamin- oder Fluorescein-Farbstoffe, in die RNA über einen Linker, der meist über die Hydroxygruppen der Phosphate verestert wird. Dabei besteht jedoch immer die Gefahr, daß die natürliche Struktur eines Makromoleküls wie der RNA verändert wird und so die gewünschte Strukturklärung nicht möglich ist. Die Verwendung von natürlich vorkommenden Basen mit erhöhter Eigenfluoreszenz oder synthetisch modifizierten Basen beeinflussen die RNA-Struktur in viel geringerem Maße und eignen sich deshalb besser als chromophore Gruppen. Die natürlichen,

fluoreszierenden Y-Basen (Wytosine) in t-RNA<sup>Phe</sup> sind für die Struktur- und Dynamikaufklärung der t-RNA intensiv genutzt worden, und haben z. B. den Beweis eines *Inner-Sphere*-Komplexes eines Mg<sup>2+</sup>-Ions in der t-RNA<sup>Phe</sup> durch Fluoreszenz-Temperatursprung-Experimente ermöglicht [77]. Synthetisch modifizierte, fluoreszierende Basen sind z. B. das Ethenoadenosin oder das 2-Aminopurin.

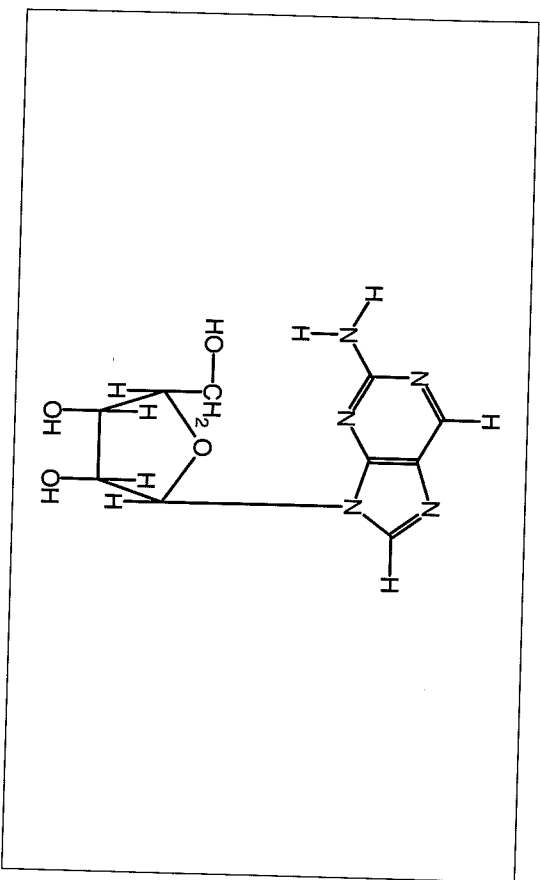


Abbildung 2.7: Struktur des 2-Aminopurin-Ribonucleosids (2AP).

Das Potential der Reportergruppe 2-Aminopurin für Fluoreszenzuntersuchungen von 2-Aminopurin-substituierten Nucleinsäuren ist schon lange bekannt, denn bereits 1969 sind zum 2-Aminopurin-Ribonucleosid (2AP) erste Fluoreszenz-Studien angefertigt worden [168]. Das 2AP (s. Abb. 2.7) besitzt eine Fluoreszenz-Quantenausbeute von ca. 0,7 und eine Fluoreszenz-Lebensdauer von ca. 7 ns. Maxima des Anregungs- und Emissionsspektrum liegen in einem pH-Bereich von 4–11 bei 303 und 370 nm. Aufgrund einer Protonierung des 2APs (pK = 3,4) ist im sauren Milieu eine kontinuierliche Verschiebung dieser Maxima zu einer Wellenlänge von 312 und 383 nm (bei pH 2) zu beobachten. Die pH- und temperaturabhängige relative Fluoreszenzintensität erreicht im Bereich von pH 5–11 ein maximales Niveau und nimmt

mit steigender Temperatur ab. Entscheidend für die Strukturuntersuchungen ist die Tatsache, daß die Fluoreszenzintensität umso schwächer wird, je mehr das 2AP in einer Nucleinsäurestruktur den Wechselwirkungen der Basenstapelung unterliegt.

Der Einsatz der Reportergruppe 2-Aminopurin erfolgte sowohl in RNA- als auch in DNA-Sequenzen. Bei der Untersuchung der Basenpaarwechselwirkungen von kurzen 2-Aminopurin-substituierten DNA-Doppelhelices wurden sowohl ein 2AP/T *Watson-Crick*-Basenpaar [92] als auch ein 2AP/C Basenfehlpaar [43, 55] gefunden. Ebenfalls sind Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Polyrbonucleotiden [142] und DNA-PNA-Strukturen [49] nach Substitution des 2-Aminopurins durchgeführt worden. DNA-Protein-Wechselwirkungen lassen sich mit 2-Aminopurin auch gut untersuchen, weil auch in Gegenwart der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan eine selektive Anregung der Reportergruppe möglich ist [64, 95].



## 2.3 Relaxationsmethoden

Theorie und Methoden der chemischen Relaxation sind in mehreren Abhandlungen ausführlich erörtert worden [11, 19c, 40, 154]. Daher wird hier nur eine kurze Darstellung der Zusammenhänge gegeben.

### 2.3.1 Die Temperatursprung-Methode

Die Gleichgewichtskonstante ( $K$ ) einer Reaktion ist eine Funktion der Temperatur ( $T$ ), des Drucks ( $P$ ) und, bei einer Änderung der Ladungsverteilung (Dipolmoment oder ionische Ladungen), auch eine Funktion der elektrischen Feldstärke. Diese Abhängigkeit von einer intensiven Größe wie der Temperatur machen sich die Sprungmethoden (*transient methods*) zunutze. Die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten wird durch die *van't Hoff'sche* Gleichung beschrieben:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta H}{R_m T^2} \quad (2.6)$$

mit  $\Delta H$  = Reaktionsenthalpie in J mol<sup>-1</sup>

$R_m$  = molare Gaskonstante mit dem Wert 8.314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>

Wenn die Temperaturänderung hinreichend klein ist, ergibt sich eine direkte Proportionalität:

$$\frac{\Delta K}{K} = \frac{\Delta H}{R_m T^2} \Delta T \quad (2.7)$$

Der Temperatursprung kann durch die Umwandlung von elektrischer Energie in Wärme (*joule heating*) erreicht werden. Die Entladung eines Kondensators ist dabei die am meisten angewandte Methode zur Temperaturerhöhung ( $\Delta T$ ), die proportional zur zugeführten Wärmemenge ist:

$$\Delta T = \frac{CU^2}{2c_p \rho V} \quad (2.8)$$

mit  $C$  = Kondensatorkapazität in F

$U$  = Spannung zwischen den Kondensatorplatten in V

$c_p$  = spezifische Wärme bei konstantem Druck in J K<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>

### 2.3. RELAXATIONSMETHODEN

$\rho$  = Dichte in g cm<sup>-3</sup>

$V$  = Volumen in cm<sup>3</sup>

Die Temperaturerhöhung durch das Aufheizen einer Elektrolytlösung folgt einer zeitabhängigen Exponentialfunktion ( $\Delta T_t$ ), die durch die Aufheizzeit ( $\tau_d$ ) der Elektrolytlösung bestimmt wird:

$$\Delta T_t = \Delta T_\infty \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_d}\right)\right) \quad (2.9)$$

$$\tau_d = \frac{RC}{2} \quad (2.10)$$

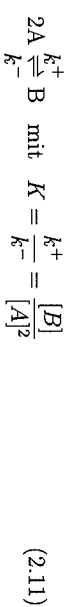
mit  $C$  = Kondensatorkapazität in F

$R$  = Widerstand der Elektrolytlösung in  $\Omega$

Dabei ist zu beachten, daß einerseits für einen Temperatursprung eine genügend hohe Kondensatorkapazität benötigt wird, andererseits aber eine zu hohe Kondensatorkapazität die Aufheizzeit und so auch die untere zeitliche Nachweisgrenze von Relaxationseffekten erhöhen wird.

### 2.3.2 Relaxationszeit in einstufigen Systemen

Die Relaxationszeit eines einstufigen Systems wird am Beispiel einer Dimerisierungsreaktion erörtert:



Weil sich das System vor und nach einem Temperatursprung im Gleichgewicht befindet, gilt für die Bildungsgeschwindigkeiten von B:

$$\frac{d[B]_v}{dt} = k_0^+ [A]_v^2 - k_0^- [B]_v = 0 \quad \text{und} \quad \frac{d[B]_n}{dt} = k_n^+ [A]_n^2 - k_n^- [B]_n = 0 \quad (2.12)$$

mit  $k_0^+$ ,  $k_0^-$  = Geschwindigkeitskonstante vor dem Temperatursprung

$k_n^+$ ,  $k_n^-$  = Geschwindigkeitskonstante nach dem Temperatursprung

$[A]_v$ ,  $[B]_v$  = Gleichgewichtskonzentrationen vor dem Temperatursprung

$[A]_n$ ,  $[B]_n$  = Gleichgewichtskonzentrationen nach dem Temperatursprung

Aufgrund der Massenerhaltung und der Stöchiometrie besteht zwischen den Konzentrationen  $[A]$  und  $[B]$  und der Umsatzvariablen  $x$  folgende Beziehung:

$$[A] = [A]_n + x \quad \text{und} \quad [B] = [B]_n - \frac{x}{2} \quad (2.13)$$

Einsetzen in Gleichung 2.12 und Umformen ergeben:

$$\underbrace{\frac{d[B]_n}{dt}}_{=0} - \frac{dx}{2dt} = \underbrace{k_0^+ [A]_n^2 - k_0^- [B]_n + 2k_0^+ [A]_n x + k_0^+ x^2 + \frac{k_0^- x}{2}}_{=0} \quad (2.14)$$

Im Gleichgewicht sind  $d[B]_n/dt$  und ebenso  $k_0^+ [A]_n^2 - k_0^- [B]_n$  gleich null, und der quadratische Term der Umsatzvariable  $x$  kann wegen der Annahme einer hinreichend kleinen Störung des Gleichgewichts  $|x| = |[A]_n - [A]| \ll [A]$  vernachlässigt werden. Somit ergibt sich für das System folgende Relaxationsgleichung:

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{x}{\tau} \implies x(t) = x_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.15)$$

mit

$$\frac{1}{\tau} = 4k^+ [A] + k^- \quad (2.16)$$

Aus einer graphischen Auftragung von  $\frac{1}{\tau}$  gegen  $[A]$  können die Geschwindigkeitskonstanten direkt aus der Steigung und dem Achsenabschnitt der Geraden bestimmt werden.

### 2.3.3 Relaxationszeiten in mehrstufigen Systemen

Die Kinetik eines mehrstufigen Systems, das  $n+1$  verschiedene Zustände besitzt, wird durch ein gekoppeltes Differentialgleichungssystem von  $n$  linearisierten Geschwindigkeitsgleichungen beschrieben:

$$\frac{dx_1}{dt} + \sum_{i=1}^n a_{1i} x_i = 0 \quad \dots \quad \frac{dx_n}{dt} + \sum_{i=1}^n a_{ni} x_i = 0 \quad (2.17)$$

mit  $x_i$  = Umsatzvariablen der Elementarreaktionen

$a_{ni}$  = Funktionen der Geschwindigkeitskonstanten und der Gleichgewichtskonzentrationen des spezifischen Reaktionschemas

Die Lösungen dieser  $n$  Differentialgleichungen sind  $n$  Summen von Exponentialen, deren Relaxationszeiten  $\tau_i$  die Eigenwerte der Matrix  $(a_{ni})$  sind:

$$x_1 = \sum_{i=1}^n x^{01} \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad \dots \quad x_n = \sum_{i=1}^n x^{0n} \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (2.18)$$

$$\det \begin{pmatrix} a_{ni} - \frac{1}{\tau} \delta_{ni} \end{pmatrix} \quad \text{mit} \quad \delta_{ni} = \begin{cases} 0 & \text{für } n \neq k \\ 1 & \text{für } n = k \end{cases} \quad (2.19)$$

Die Relaxationszeiten ( $\tau_i$ ) beziehen sich nicht mehr auf eine einzelne Elementarreaktion, denn alle Reaktionen sind miteinander gekoppelt. Für  $n = 2$  wird ein analytisch lösbares, quadratisches Gleichungssystem gefunden, jedoch ist das für  $n = 3$  erhaltene Gleichungssystem im allgemeinen nur numerisch lösbar [11].

### 2.3.4 Modelle von Reaktionsmechanismen

Die Aufklärung von Reaktionsmechanismen wird durch Kinetikuntersuchungen erreicht. Dazu wird die Übereinstimmung eines postulierten Reaktionsmechanismus mit experimentell ermittelten Daten überprüft.

Mit Hilfe des im *MPI für biophysikalische Chemie* entwickelten Computerprogramms *sim* konnten die experimentellen Daten an ein Reaktionsmodell angepaßt werden. Der Vorteil dieses Programmes liegt in der gleichzeitigen numerischen Simulation der Relaxationszeiten ( $\tau_i$ ) und der Amplituden ( $A_i$ ) eines Systems, in dem  $i$  Relaxationseffekte analysiert worden sind.

Im folgenden werden Reaktionsmodelle und Gleichungen aufgeführt, die zur Anpassung der experimentellen Daten benutzt worden sind:

#### Modell I

$$2 A \xrightleftharpoons[k_1^-]{k_1^+} B \quad (2.20)$$

mit  $K_1 = \frac{k_1^+}{k_1^-}$  folgt:

$$\frac{d[A]}{dt} = k_1^- [B] - k_1^+ [A]^2 \quad (2.21)$$

## Modell II



mit  $K_i = \frac{k_i^+}{k_i^-}$  und  $i = 1$  und 2 folgt:

$$\frac{d[A]}{dt} = k_1^- [C] - k_1^+ [A][B] \quad (2.23)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k_2^+ [C] - k_2^- [D] \quad (2.24)$$

## Modell III

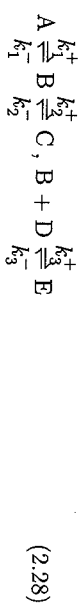


mit  $K_i = \frac{k_i^+}{k_i^-}$  und  $i = 1$  und 2 folgt:

$$\frac{d[A]}{dt} = k_1^- [B] - k_1^+ [A] \quad (2.26)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k_2^+ [B][C] - k_2^- [D] \quad (2.27)$$

## Modell IV



mit  $K_i = \frac{k_i^+}{k_i^-}$  und  $i = 1, 2$  und 3 folgt:

$$\frac{d[A]}{dt} = k_1^- [B] - k_1^+ [A] \quad (2.29)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_2^+ [B] - k_2^- [C] \quad (2.30)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = k_3^+ [B][D] - k_3^- [E] \quad (2.31)$$

## Kapitel 3

## Material

## 3.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Feinchemikalien sind von folgenden Firmen bezogen worden, wobei einige Chemikalien *pro analysi* (p. a.) Qualität hatten. Bezugsquellen spezieller Chemikalien werden in den einzelnen Abschnitten angegeben.

Firma	Chemikalien
Aldrich, Steinheim	Rhodamin B
Baker, Deventer (Holland)	Ethylenglykol
	Formamid (p. a.)
	Harnstoff (p. a.)
	1 M Natronlauge (p. a.)
	65 %ige Salpetersäure (p. a.)
	1 M Salzsäure (p. a.)
	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (p. a.)
Merk, Darmstadt	Ammoniumperoxodisulfat (p. a.)
	Ascorbinsäure (p. a.)
	Borsäure (p. a.)
	Bromphenolblau-Natriumsalz

Firma	Chemikalien
Merk, Darmstadt	Calciumchlorid-Tetrahydrat (Suprapur) 2,6-Dichlorphenolindophenol-Natriumsalz-Dihydrat (p. a.) Ehridiumbromid Magnesiumchlorid-Hexahydrat (p. a.) Natriumchlorid (p. a.) Natriumperchlorat-Monohydrat (p. a.) N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (p. a.) Titrplex III (EDTA) (p. a.)
Pharmacia, Freiburg	Ficoll 400
Roth, Karlsruhe	Acrylamidlösung (30 % (w/v), 40 % (w/v)) RBS 35 Konzentrat
Serva, Heidelberg	L-Typtophan (p. a.) Xylencyanol FF
Sigma, Deisenhofen	Agarose 2-Aminopurin-Ribonukleosid Dimethylarsinsäure (Cacodylsäure)

### 3.2 Nukleinsäuren

#### 3.2.1 Umgang mit Ribonukleinsäuren

Da Ribonukleasen allgegenwärtig sind und schon in geringsten Spuren zum RNA-Abbau führen können, sind beim Umgang mit Ribonukleinsäure-Lösungen unbedingt einige Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. Neben dem Tragen von Einweg-Gummihandschuhen wurden stets nur gewaschene und autoklavierte Einweg-Pipettenspitzen und Einweg-Reaktionsgefäße benutzt. Außerdem wurden alle verwendeten wässrigen Lösungen autoklaviert oder sterilfiltriert.

### 3.2. NUKLEINSÄUREN

#### 3.2.2 Ribonukleinsäuren (RNA)

Die in dieser Dissertation verwendeten Ribonukleinsäuren wurden ausschließlich in der Arbeitsgruppe *Bioorganische Chemie* von Prof. Dr. FRITZ ECKSTEIN am *Max-Planck-Institut (MPI) für Experimentelle Medizin* in Göttingen hergestellt.

Die RNA-Synthese wurde je nach Verwendung der Synthesekartusche im 1  $\mu$ mol bzw. 2  $\mu$ mol Maßstab von URSULA KURTZKE mit einem 380B DNA-Synthesizer von *Applied Biosystems* durchgeführt. Neben den Synthesereagenzien, die von *Applied Biosystems* für die Modelle 380 geliefert werden, wurden die Festphasen-Synthesesäulen und Ribonukleosid-Phosphoramidite natürlicher Basen von *Miligen/Bioserch* bezogen. Die Synthese der 2-Aminopurin-Ribonukleosid-Phosphoramidite erfolgte in der Arbeitsgruppe ECKSTEIN [161, 162]. In der Verlängerung der tetrazol-katalysierten Kopplungsreaktion auf 10 min bestand die einzige Veränderung des herstellereigenen Syntheseprotokolls. Die Kopplungseffizienz jedes RNA-Bausteines wurde während der Synthese automatisch verfolgt, indem die Farbtintensitäten der Lösungen verglichen wurden, welche die abgespaltene Tryptylgruppe nach jeder Kopplung enthielten. Die Kopplungseffizienz des 2-Aminopurin-Ribonukleosid-Phosphoramidits lag oberhalb von 99 % und war damit vergleichbar mit denen der kommerziellen Amidite.

Neben der Abspaltung der Tryptylgruppe nach jeder Kopplung erfolgte am Ende der chemischen Synthese die Abspaltung der Aminoschutzgruppen der Basen in einer ammoniakalischen Ethanollösung. Jedoch lag die RNA noch immer nicht als homogene Ribonukleinsäure einer Länge vor, weil sowohl durch unvollständige Kopplung bei der Synthese als auch durch partielle alkalische Hydrolyse nach Verlust der 2'-O-Silylschutzgruppe in ammoniakalischer Lösung kürzere Bruchstücke entstanden waren. Diese kürzeren Fragmente wurden durch eine denaturierende Gelelektrophorese abgetrennt, und die jeweils gewünschte Nukleinsäure durch eine Elektroelution in BIOTRAPs BT1000 der Firma *Schleicher & Schuell* zurückgewonnen.

Nach einer anschließenden Entsalzung der angereicherten RNA-Lösungen durch Spek-Pak C18 Reverse-Phase-Säulen wurde die RNA in 200-400  $\mu$ l bidestillierten Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. Die Nukleinsäurekonzentration wurde UV-spektroskopisch bestimmt [164].

Tabelle 3.2: Basensequenzen der synthetisierten Ribonukleinsäuren (Primärstruktur) in 5' → 3'-Richtung mit dem teilweisen Einbau des 2-Aminopurin-Ribonukleosids (2AP).

Typ	Länge	Sequenz [5' → 3']
OH1	12 nt	GGG AGU C(2AP)G GAU
OH1Compl.	12 nt	AUC CUG ACU CCC
OH2	12 nt	GAA AGU C(2AP)A AAG
OH2Compl.	12 nt	CUU UUG ACU UUC
OH3	12 nt	AAA AAA A(2AP)A AAA
OH4	12 nt	UUU UUU U(2AP)U UUU
HP1	15 nt	GGG CG(2AP) AAG CCU UAU
HP2	15 nt	GGG CGA (2AP)AG CCU UAU
HH1	49 nt	GCG CUC UGA UGA GGC CGC AAG GCC GAA ACU GCC GCA AGG CAG Udc(2AP) GCG C
HH2	49 nt	GCG CUC UGA UGA GGC CGC AAG GCC GAA ACU GCC GCA AGG CAG U(2'-NH <sub>2</sub> -C)(2AP) GCG C
HH3	49 nt	GCG CUC UGA (2AP)GA GGC CGC AAG GCC GAA ACU GCC GCA AGG CAG UdCA GCG C
HH4	49 nt	GCG CUC UGA UGA GGC CGC AAG GCC GAA ACU GCC GC(2AP) AGG CAG UdCA GCG C
HH5	49 nt	GCG CUC UGA UGA GGC CGC AAG GCC GAG ACU GCC GCA AGG CAG Udc(2AP) GCG C

Das 2-Aminopurin-Ribonukleosid (2AP) wurde sowohl in kürzere Oligoribonukleinsäuren (OH1-4 und HP1-2) der Kettenlänge 12 und 15 nt als auch in die *Hammerhead*-Ribozyme (HH1-5) der Kettenlänge 49 nt eingebaut. Bei den *Hammerhead*-Ribozymen wurde zusätzlich an der Spaltstelle (Position 44 in 5' → 3'-Richtung bzw. Position 17 bei der Nummerierung nach HERTZL et al. [58]) ein Cytidin durch ein 2'-Desoxycytidin (dC) bzw. ein 2'-Desoxy-2'-aminocytidin (2'-NH<sub>2</sub>-C) ersetzt, um die

### 3.2. NUKLEINSÄUREN

katalytische Aktivität der verschiedenen Ribozyme zu unterdrücken (s. Tab. 3.2). Die Sekundärstrukturen der *Hairpin*-Ribonukleinsäuren (HP1-2) und der *Hammerhead*-Ribozyme (HH1-5) sind in den Abbildungen 5.6 und 5.10 graphisch dargestellt.

#### 3.2.3 DNA-Molekulargewichtsstandards

Zur Überprüfung der Homogenität und der richtigen Kettenlänge der synthetisierten Ribonukleinsäuren wurden bei den gelelektrophoretischen Methoden zwei verschiedenen DNA-Molekulargewichtsstandards benutzt, die eine genaue Zuordnung in einen Fragmentgrößenbereich von 10–500 Basen ermöglichen:

##### 1. DNA-Molekulargewichtsstandard V (*Boehringer Mannheim*)

- Verdau von pBR322 DNA mit der Restriktionsendonuklease *Hae* III
- Fragmentgrößen: 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80, 64, 57, 51, 21, 19, 18, 11 und 8 Basenpaare
- 250 µg/ml in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)

##### 2. 10-bp-DNA-Leiter (*Gibco BRL*)

- Die 10 bp- und 100 bp-Bande sind zum besseren Vergleich zwei- bis dreifach verstärkt
- Fragmentgrößen: 1668, 330, 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 und 10 Basenpaare
- 1 µg/µl in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7.5)

### 3.3 Puffer und Stammlösungen

Die folgende Liste enthält alle verwendeten Puffer und Stammlösungen, die mit bi-destilliertem Wasser angesetzt worden sind, sowie ihre Abkürzungen:

Abkürzung	Zusammensetzung
Agarose-Lsg.	Agarose 1 %
APS-Lsg.	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> 10 %
C-Puffer	Caodylsäure pH 7.0 1 mM
EtBr-Lsg.	Ethidiumbromid 1 µg/ml
Ladepuffer A	Formamid 10x TBE-Puffer pH 7.6 80 % Bromphenolblau/Xylol Cyanolblau F 0.1 % 20 %
Ladepuffer B	Formamid EDTA 98 % 10 mM
Ladepuffer C	Bromphenolblau/Xylol Cyanolblau F Ficoll 400 15 % 0.1 %
Marker-Lsg. A	Boehringer V DNA-Marker (250 µg/ml) 25 µl
Marker-Lsg. B	Ladepuffer B ohne BPB 10 bp Leiter Gibco-DNA-Marker (1 µg/µl) 5 µl
Ladepuffer C	10 µl H <sub>2</sub> O 20 µl
RBS-Lsg.	RBS 35 Konzentrat pH 11 20 %
Rhodamin-Lsg.	Rhodamin B in Äthylenglykol 3 g/l
T-Puffer	Tris-HCl pH 7.5 75 mM

### 3.3. PUFFER UND STAMMLÖSUNGEN

Abkürzung	Zusammensetzung
TBE-Puffer	Tris Borsäure EDTA 89 mM 89 mM 2.5 mM
TGN-Puffer	Tris Caodylsäure Natriumperchlorat pH 7.2 50 mM 50 mM 100 mM
TE-Puffer	Tris-HCl EDTA pH 8.0 10 mM 1 mM

### 3.4 Geräte

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden folgende Geräte benutzt:

Autoklav	Matachana 21-L ( <i>Reithberg</i> ; Göttingen)
Elektroelution	BIOTRAPs BT1000 ( <i>Schleicher &amp; Schuell</i> ; Dassel)
Gel-Foto	UV-Transilluminator (UV-Durchstrahlröhren) mit einem 254nm Filter ( <i>Bachhofer</i> ; Reutlingen) Polaroid-Kamera
Gefrierdörrer	Speed Vac Concentrator und Kühlfälle ( <i>Bachhofer</i> ; Reutlingen)
Kühlzentrifuge	Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge mit dem Sorvall-Rotor SS-34 ( <i>DuPont Instruments</i> ; Homburg)
Oligonukleotid-synthese	380B DNA-Synthesizer ( <i>PE Applied Biosystems</i> ; Foster City, USA)
Pipetten	Pipetman 2, 20, 100, 200 und 1000 ( <i>Gilson</i> ; Worthington, USA)
Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer (Pharmacia; Uppsala, Schweden)	Gelelektrophoresekammer ( <i>Pharmacia</i> ; Uppsala, Schweden) Netzgerät: Bio-Rad Laboratories 1420 B ( <i>Reithberg</i> ; Göttingen)
Schüttler	Vortex Genie 2 <sup>TM</sup> ( <i>Bender &amp; Hoborn</i> ; Zürich, Schweiz)
Schmelzkurven	Cary219 ( <i>Varian</i> ; Australien) Cary4 ( <i>Varian</i> ; Australien) Temperaturregler PG20 ( <i>Haake</i> ; Karlsruhe) Temperaturmeßgerät Quat 100 ( <i>Heraeus</i> ; Hanau) Umwälz-/Kühlthermostat F3-CH ( <i>Haake</i> ; Karlsruhe)
Spektrofluorimeter	SLM 8000 S ( <i>SLM Instruments</i> , Inc.; Urbana, IL, USA) UVIKON 933A ( <i>Konttron Instruments</i> ; Eching)

### 3.5. KUNSTSTOFFMATERIAL

Stopped-Flow	Entwicklung in der Abt. Biochemische Kinetik ( <i>MPI f. biophysikalische Chemie</i> ; Göttingen)
Titration	Mikrometerschraube 0-50 mm - SKT $\Delta$ 0.005 mm ( <i>Mitoyo</i> ; Japan)
T-Sprung	Aufbau nach <i>RIGLER</i> et al. [131] mit Verbesserungen durch C.R. RABL ( <i>MPI f. biophysikalische Chemie</i> ; Göttingen)
UV/VIS Spektrophotometer	Lambda 17 ( <i>Perkin Elmer</i> ; Überlingen) Cary4 ( <i>Varian</i> ; Australien) F4500 ( <i>Hitachi</i> ; Japan)
Waagen	Präzisionswaage 10-1000 g ( <i>Sartorius</i> ; Göttingen) Präzisionswaage 1207MP2 ( <i>Sartorius</i> ; Göttingen)
Zentrifuge	Centrifuge 5415C ( <i>Eppendorf</i> , Hamburg) Christ UJ1 ( <i>Schmid</i> ; Göttingen)

### 3.5 Kunststoffmaterial

Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Einmalpipetten, Einmalspritzen und Spritzflaschen wurden von *Eppendorf*, *Greiner*, *Packard* und *Sarstedt* bezogen. Alle Plastikgefäße, die mit den Ribonukleinsäuren in Berührung kamen, wurden vorher gewaschen und autoklaviert.

# Kapitel 4

## Methoden

### 4.1 Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentrationen der verwendeten Ribonukleinsäuren wurden durch Absorptionsmessungen gegen Puffer bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Zweistrahlphotometer Lambda 17 von *Perkin Elmer* bestimmt. Wenn monochromatisches Licht mit der Intensität  $I_0$  eine homogene Schicht durchquert, ist nach dem *Lambert-Beerschen* Gesetz die Intensitätsabnahme ( $dI$ ) proportional zu der Schichtdicke ( $dx = l$ ) und der Konzentration der absorbierenden Teilchen ( $c$ ). Durch Integration ergibt sich für die Absorption ( $A$ ) mit dem molaren Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) — auch Extinktionskoeffizient genannt — und der Transmission (Durchlässigkeit) mit  $T = I/I_0$ :

$$A = -\log \left( \frac{I}{I_0} \right) = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (4.1)$$

Die dimensionslose Größe Absorption (optische Dichte) ist sowohl von der Temperatur als auch von der Wellenlänge abhängig und wurde in der Vergangenheit häufig auch als Extinktion bezeichnet [6].

Für doppelsträngige Nukleinsäuren wird bei pH = 7 und 20°C in Abhängigkeit vom Adenin/Thymin-Gehalt ein Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{260}$ ) zwischen 6.3 (100 % A/T) und 7.6 (0 % A/T)  $\cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , bezogen auf eine Phosphateneinheit, benutzt, wobei meistens ein durchschnittlicher Wert von  $\epsilon_{260} = 6.6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  verwendet wird. Der Extinktionskoeffizient für einzelsträngige Oligonukleinsäuren



läßt sich mit einer Formel aus dem *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* [44] bestimmen.

Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten der verwendeten Ribonukleinsäuren erfolgte unter Berücksichtigung ihrer Sekundärstrukturen, die mit Hilfe theoretischer Simulationsprogramme [65, 80, 175] bestimmt werden konnten (s. Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: *Berechnete Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{260}$ ) der Ribonukleinsäuren.*

RNA	$\epsilon_{260}$ [ $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]	RNA	$\epsilon_{260}$ [ $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
Oh1	11.1	Oh3	12.3
Oh1Compl.	9.1	Oh4	9.7
Oh2	11.3	HP1/HP2	9.6
Oh2Compl.	9.4	HH1-5	8.5

Mit Gleichung 4.1 resultiert daraus unter Berücksichtigung der Schichtdicke (optische Länge)  $l = 1 \text{ cm}$  und der Anzahl der Phosphatgruppen ( $\rho$ ) eines Nukleinsäuremoleküls für die Molarität ( $c$ ) der Nukleinsäure (Polymer) in der Lösung:

$$c = \frac{A_{260}}{\epsilon_{260} \cdot l \cdot \rho} \quad [\text{M}] \quad (4.2)$$

Weiterhin ergibt sich unter Berücksichtigung der Masse  $m$  und der Dichte von Wasser bei  $20^\circ\text{C}$  mit  $\rho = 0.99823 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  in wäßrigen Lösungen für die Stoffmenge  $n$  der Nukleinsäuren mit der Einheit mol:

$$n = c \cdot V = \frac{c \cdot m}{\rho} \quad [\text{mol}] \quad (4.3)$$

Das Verhältnis der optischen Dichten (OD) bei 260 nm und 280 nm einer Nukleinsäurelösung ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ) ist ein qualitatives Maß für die Reinheit einer Nukleinsäure und liegt normalerweise zwischen 1.8 und 2.0 [139].

## 4.2 Gelelektrophoretische Methoden

Die Gelelektrophorese ist eine hervorragend geeignete Methode zur analytischen und präparativen hochauflösenden Trennung geladener Oligomere und Polymere.

### 4.2. GEELEKTROPHORETISCHE METHODEN

Sie wird deshalb häufig zur Charakterisierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren eingesetzt. Alle gelelektrophoretischen Trennungen wurden mit Polyacrylamidgelen in der Flachbett-Technik ausgeführt [1, 139, 156].

#### 4.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

**Charakterisierung von Ribonukleinsäuren** Die Charakterisierung von Ribonukleinsäuren in Polyacrylamid-Gelen erfolgte unter nativen Bedingungen. Die Konzentration des Acrylamides, die 10 bis 16 % betrug, bestimmte die Auftrennung der eingesetzten RNA-Fragmente.

Für ein Gel mit 1 mm Dicke wurden drei 1 mm dicke Abstandhalter U-förmig zwischen zwei Glasplatten mit einer Größe von  $15 \times 15 \text{ cm}^2$  gelegt. Zur Abdichtung dieser Glasplattenkammer wurden die Glasplatten mit Klemmen zusammengehalten und die Ränder mit 1 %iger Agarose-Lösung abgedichtet. In diesen Tank (Kammer) wurde luftblasenfrei folgende Lösung gegossen:

- x ml 30 %ige Acrylamid-Lösung mit  $x = \frac{\text{Gelprozent} \cdot 25}{30 \%}$
- 2.5 ml  $10 \times \text{TBE}$ -Puffer
- ad 25 ml bidest.  $\text{H}_2\text{O}$
- Lösung im Exsikkator entgasen
- Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  10 %iger Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung
- Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  TEMED als Polymerisationskatalysator

Im Anschluß wurde von oben ein Kamm eingesteckt, um die sogenannten Gel-taschen zum Auftragen der Proben zu erhalten. Nach ca. 90 min war das Gel vollständig polymerisiert, der Kamm und der untere Abstandhalter wurden entfernt, und die Glasplatten mit dem Gel wurden in die Elektrophoresekammer gestellt. Nach dem Auffüllen der Kammer mit 700 ml TBE-Puffer wurden durch einen 15 min langen Vorlauf bei 200 V nicht zersetzte Peroxidationen und wasserlösliche Acrylate entfernt. Nach dem Spülen der Gel-taschen mit TBE-Puffer wurden die Proben,

die mit 5–10  $\mu$ l Ladepuffer A versetzt worden waren, auf das Gel aufgetragen und 1–3 h bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 25–50 mA getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer genommen, 5–10 min in EtBr-Lösung angefärbt und zur Entfernung von überschüssigem Ethidiumbromid 2–5 min gewässert. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator (254 nm) mit einer Polaroid-Kamera fotografiert (Orangefilter, Blende 5,6, Belichtungszeit 1–3 s, Polaroid-Film Typ 667).

**Reinheitsbestimmung der Ribonukleinsäuren** Zur Reinheitsbestimmung der Ribonukleinsäuren wurden die Polyacrylamid-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff,  $T \geq 60^\circ\text{C}$ ) durchgeführt.

Das Gel wurde wie unter nativen Bedingungen hergestellt, jedoch wurden einem 25 ml-Ansatz vor der Zugabe des bidest. Wassers 10,5 g Harnstoff hinzugegeben. Daraufhin wurde das Gel zusammen mit einer Wärmeleitplatte aus Aluminium in die Kammer gestellt und 20 min durch Anlegen einer Spannung von 700 V vorgeheizt. Durch das Spülen der Geltaschen mit TBE-Puffer wurde der Harnstoff entfernt, da sonst wegen der Diffusion des Harnstoffes die Lösung in den Geltaschen eine höhere Dichte als der Ladepuffer hätte und so dessen gleichmäßige Verteilung auf den Taschenboden verhindert würde. Nun wurden die Proben, die mit 5–10  $\mu$ l Ladepuffer B versetzt worden waren, auf das über  $60^\circ\text{C}$  heiße Gel geladen und bei einer Spannung von 700 V und einer Stromstärke von 50–100 mA getrennt. Das Polyacrylamid-Gel wurde ebenfalls mit Ethidiumbromid gefärbt und 2–5 min gewässert. Für präparative Gele mit 1,5 mm Dicke wurde 50 ml Gel-Lösung benötigt.

Außerdem wurde ein sogenanntes Zweiphasengel verwendet. Dieses Gel bestand aus zwei Teilen mit jeweils unterschiedlicher Acrylamidkonzentration, wobei der erste Teil (*stack*) eine deutlich geringere Acrylamidkonzentration (hier 6 %) besaß und nur ca. 15 % der Gesamtlänge des Gels ausmachte. An der Grenzschicht der beiden unterschiedlich konzentrierten Gelbereiche kam es hierbei zu einer Aufkonzentrierung der zu trennenden Substanzen; die eigentliche analytische Trennung erfolgte im höherprozentigen Teil des Gels.

### 4.3. ANNEALING DER RIBONUKLEINSÄUREN

#### 4.3.1. Annealing der Ribonukleinsäuren

In der Molekularbiologie versteht man unter der Denaturierung — auch Schmelzen genannt — die Auftrennung der Nukleinsäure-Doppelhelix durch Auflösung von nicht-kovalenten Bindungen (Wasserstoffbrücken) zu Nukleinsäure-Einzelsträngen. Die Denaturierung ist unter geeigneten Bedingungen reversibel, d. h., daß die getrennten komplementären Stränge wieder eine Doppelhelix ausbilden können. Dieser Vorgang wird als Renaturierung oder *Annealing* bezeichnet. Wenn die sich paarenden Nukleinsäuren verschiedenen Ursprungs, also zwei beliebig komplementäre Nukleinsäuresequenzen sind, wird jedoch von einer Hybridisierung gesprochen, die im klassischen Fall die Bildung eines DNA-RNA-Hybridmoleküls beinhaltet. Die Stabilität der Doppelhelices wächst mit steigender Sequenzhomologie der Nukleinsäuremoleküle und steigendem GC-Basenpaarungsanteil. Die Bildung einer Doppelhelix kann nicht nur inter-, sondern auch intramolekular erfolgen und bestimmt die Sekundärstruktur einer Nukleinsäure [78, 143].

Die Nukleinsäuren wurden einer *Annealing*-Prozedur unterworfen, damit für die nachfolgenden Experimente eine definierte Sekundär- und Tertiärstruktur der jeweiligen Nukleinsäure vorlag. In dieser Arbeit sind zwei verschiedene *Annealing*-Prozeduren verwendet worden:

**Annealing-Prozedur I.** Die Ribonukleinsäurelösung wurde 10 min in ein auf  $60^\circ\text{C}$  temperiertes Wasserbad gestellt und langsam (ca. 1 h) auf eine Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  abgekühlt.

**Annealing-Prozedur II.** Die Ribonukleinsäurelösung wurde 2,5 min in ein auf  $90^\circ\text{C}$  temperiertes Wasserbad gestellt und sehr langsam (ca. 3–4 h) im Wasserbad auf eine Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  abgekühlt.

#### 4.4. Schmelzkurvenanalyse

Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse können doppelhelikale Bereiche in einer Nukleinsäurelösung bestimmt und somit Aussagen über die Reinheit und das strukturelle Verhalten gemacht werden.

relle Aussehen einer Nukleinsäure getroffen werden.

Da die Einzelstrang-RNA das UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm stärker absorbiert als Doppelstrang-RNA, nimmt die Absorption bei 260 nm beim Aufbruch doppelhelikaler Bereiche zu (*Hyperchromie-Effekt*). Diese abrupte Absorptionsänderung demonstriert auch die hochgradig kooperative Struktur einer Doppelhelix, deren Stabilität sowohl von der Basenpaarung als auch von der Basenstapelung abhängt und mit steigendem GC-Gehalt zunimmt. Der Aufbruch doppelhelikaler Bereiche wird durch Erwärmen (Schmelzen) der Nukleinsäurelösung erreicht. Die Schmelztemperatur ( $T_M$ -Wert) wird dabei als diejenige Temperatur bezeichnet, bei der gerade die Hälfte der doppelhelikalen Bereiche aufgebrochen sind [155].

Dazu wurden die bis zu 10  $\mu$ M Nukleinsäurelösungen meistens zuerst einer *Annealing*-Prozedur (s. Kap. 4.3) ausgesetzt. Anschließend wurden ca. 750  $\mu$ l der RNA-Lösungen in die aus dem Quarzglas *Suprasil* bestehenden 1 cm Spezialküvetten der Firma *Helma* gegeben. Zur Schmelzkurvenanalyse wurde die Extinktion bei 260 nm dieser RNA-Lösung gegen den jeweiligen Reaktionspuffer zwischen 3°C und 100°C in einem *Varian Cary4* bzw. 219 Zweistrahlphotometer gemessen. Die Temperatur wurde mittels eines Temperaturreglers *Haake PG20* kontinuierlich mit einer Rate von 0,1°C/min erhöht. Um eine Wasserdampfcondensation an den Wänden der Quarzküvetten und daraus resultierende Meßwertfehler bei der Absorption zu verhindern, wurde der Küvettenraum des Zweistrahlphotometers ständig mit Stickstoff ( $N_2$ ) gespült. Die Absorption und die mit Hilfe eines Temperaturfühlers gemessene Temperatur der jeweiligen Meßküvette wurden von einem Personalcomputer aufgezeichnet. Zur Messung zyklischer Schmelzkurven wurde nach dem Erreichen der Endtemperatur diese 5 min gehalten, bevor die Abkühlphase begann, weil sich die Temperatur der Meßlösung relativ zur Temperatur des Thermostaten mit zeitlicher Verzögerung einstellte. Als Puffer wurden der C- und TCN-Puffer verwendet.

Die Meßdaten wurden anschließend auf das *UNIX-Cluster* der *Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung (GWDG)* transferiert. Dort wurden die experimentellen Daten nach dem einfachen *Alles-oder-Nichts-Modell A*  $\rightleftharpoons$  *B* [118] unter Verwendung der *Simplex-Methode* zur Minimierung der Fehlerquadratsumme [90] ausgewertet. Dieses Verfahren lieferte neben der Schmelztemperatur ( $T_M$ -Wert) auch die Schmelzenthalpie.

## 4.5 Fluoreszenz-Titrationen

Zur Charakterisierung der Bindung von zweiwertigen Kationen (insbesondere Magnesium und Calcium) an die synthetisierten Ribonukleinsäuren (s. Kap. 3.2.2) wurden Fluoreszenz-Titrationen mit Hilfe eines SLM 8000 S Spektrofluorimeters durchgeführt. In Abhängigkeit von den unterschiedlichen Umgebungsveränderungen der Reportergruppe 2-Aminopurin-Ribonukleosid wurden aufgrund von Metall-Nukleinsäure-Komplexbildungen aus den daraus resultierenden Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe eines Auswertungsprogrammes Komplexbildungskonstanten ( $K$ ) mit  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen bestimmt [82].

### 4.5.1 Aufbau des Spektrofluorimeters

Das SLM 8000 S Spektrofluorimeter der Firma *SLM Instruments, Inc.* (Urbana, IL, USA) besitzt durch die Verwendung von Leistungsmonochromatoren eine hohe Empfindlichkeit [56]. Dieses optische Gerät wird zur spektralen Bestimmung der Fluoreszenz von Stoffen benutzt und ist aus einzelnen, leicht austauschbaren Modulen zusammengesetzt (s. Abb. 4.1):

- Das **LH-450 Lampengehäuse** besitzt einen *Shutter* und eine Xenon-Argon-Lampe mit einer Leistung von 450 Watt als Lichtquelle, die sich sowohl in horizontaler wie auch vertikaler Richtung justieren läßt.
- Der **MC640 Doppel-Anregungsmonochromator** ist ein zweifacher, konvex holographischer Gittermonochromator, dessen Bandbreite an drei Positionen in sechs Stellungen (0,5–16 nm) variiert werden kann. Durch die Verwendung eines Beugungsgerätes (Diffraktionsgitter) werden reflektierte Strahlen einer Wellenlänge  $\lambda$  herausgefiltert. Außerdem wurde das Streulicht ausgeschlossen.
- In dem **optischen Modul OP-450** gelangt der mit Hilfe einer Quarzplatte geteilte Lichtstrahl einerseits über eine Referenzzelle, eine Rhodamin-Lösung, zum Referenzphotomultiplier C und andererseits über den Probenraum, der

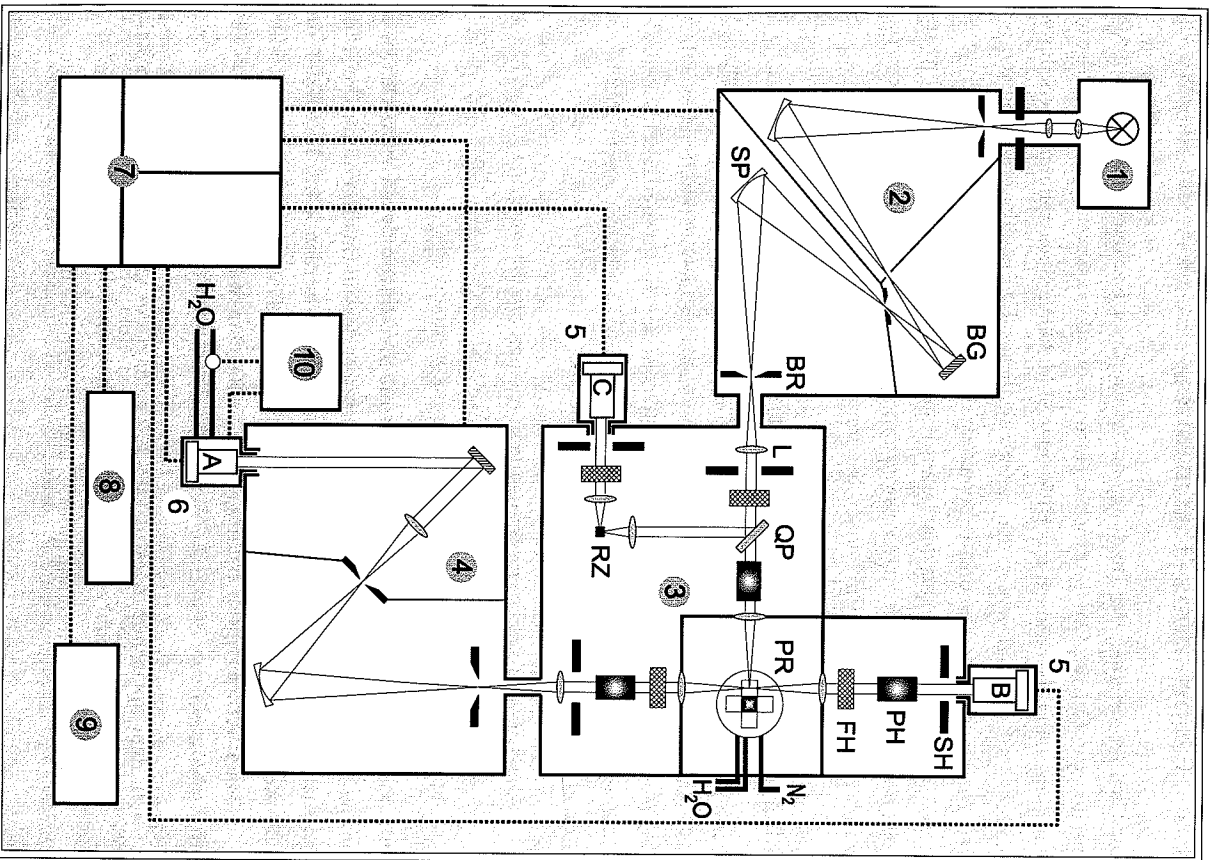


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau des Spektrofluorimeters.

Erläuterungen zu Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau des Spektrofluorimeters: 1. LH-450 Lampengehäuse, 2. MC640 Doppel-Arregungsmonochromator, 3. optisches Modul OP-450, 4. MC320 Emissionsmonochromator, 5. Photomultiplier vom Typ PH-PC-9635, 6. gekühlter Photomultiplier vom Typ Thorn Emi 96350B, 7. Typ PH-PC-9635, 8. XY-Schreiber, 9. XY-Schreiber, 10. SMC-220 Monochromatorregler und SPC-822/823 Datenprozessor, 8. XY-Schreiber, 9. Personalcomputer, 10. Regler; BG = Beugungsgitter, BR = Bandbreitenregler, FH = Filterhalter, L = Linse, PH = Polarisatorhalter, PR = Probenraum, QP = Quarzplatte, RZ = Referenzzelle, SH = Shutter und SP = Spiegel.

einen drehbaren, thermostatisierbaren 4-fach-Probenhalter besitzt und mit Stickstoff ( $N_2$ ) gespült werden kann, zu den Meßphotomultipliern A und B. Für Fluoreszenz-Polarisationsmessungen sind vor und hinter dem Probenraum entsprechende drehbare Polarisatorhalter vorhanden. Außerdem sind neben den vier Filterhaltern auch noch insgesamt drei *Shutter* am Lichtstrahleneinlaß (1) und -auslaß (2) in dem Modul enthalten.

• Der MC320 Emissionsmonochromator ist ein einfacher, konkav holografischer Gittermonochromator, dessen Bandbreite an zwei Positionen in sechs Stellungen (0,5–16 nm) variiert werden kann.

• Die zur Detektion verwendeten **Photomultiplier** sind für den Kanal B und vom Typ PH-PC-9635. Im Falle von Kanal A wird ein Photomultiplier vom Typ Thorn Emi 96350B der Firma *Products For Research, Inc.* (Davens, USA) benutzt, dessen Gehäuse mit Peltier-Elementen gekühlt wird. Die Peltier-Elemente besaßen ihrerseits eine Wasserkühlung, wobei über einen Regler vom Typ TE104TBRF der Firma *Products For Research, Inc.* die gesamte Photomultiplierkühlung kontrolliert wird. Durch die Kühlung wird das Dunkelrauschen des Detektors wesentlich herabgesetzt.

• Als weitere **elektronische Komponenten** besitzt das Fluorimeter neben dem SMC-220 Monochromatorregler noch den SPC-822/823 Datenprozessor, an dem ein Personalcomputer und ein XY-Schreiber angeschlossen sind.

#### 4.5.2 Titrationsmessungen

**Vorbereitungen** Zunächst wurden die Meßkvetten, die jeweils aus einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,7 cm und einem zweifelligen Teflon-Stopfen bestanden, gereinigt, indem sie einmal mit halbkonzentrierter Salpetersäure und zweimal mit bidest. Wasser ca. 5–10 min ausgekocht wurden. Nach jedem Auskochen wurden die Meßkvetten gut mit bidest. Wasser ausgespült und zum Schluß im Exsikkator getrocknet.

Für die Titrationsmessungen wurden 0,2–1,0  $\mu\text{M}$  Ribonukleinsäuren in dem jeweiligen Meßpuffer ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{T}^{-}$  oder  $\text{TCN}$ -Puffer) in einem Gesamtvolumen von 1,1 ml gelöst und anschließend der *Annealing*-Prozedur I. (s. Kap. 4.3) unterzogen. Abweichend von dieser Regelung wurde erstmals bei den *Hammerhead*-Ribozymen die *Annealing*-Prozedur I. nur stichprobenartig verwendet und zweitens zur Bildung der zwei doppelsträngigen Oligoribonukleinsäuren 1 und 2 ( $\text{dsOli}$  und  $\text{dsOH2}$ ) die *Annealing*-Prozedur II. eingesetzt. Nach dem Abkühlen wurde die Ribonukleinsäure-Lsg. kurz auf dem Vortex gemischt und bei ca. 8200 g (1 min, 20°C,  $r = 73$  mm, 10000 RPM, *Eppendorf*-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Von dieser Lösung wurde 1,0 ml abpipettiert und in die 0,7 cm Meßkvetten gefüllt. Eine äquivalente Menge Puffer wurde in eine Referenzküvette gegeben, gegen die ein UV-Spektrum zur genauen Konzentrationsbestimmung (s. Kap. 4.1) und Reinheitsüberprüfung gemessen wurde.

Die Tierierlösung ( $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  oder  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  in dem jeweiligen Puffer) wurde luftblasenfrei in eine gereinigte Quartspritze mit Polyethylenschlauchvorsatz gefüllt und bei der Messung mit Hilfe einer Mikrometerschraube der Firma *Mitutoyo* zugegeben, wobei die Volumenzunahme pro Skalenteil der Mikrometerschraube vorher mit einer Präzisionswaage bestimmt wurde. Die Reinigung der Spritze wurde durch mehrmaliges Spülen mit RBS-Lösung und bidest. Wasser erreicht.

**Messung** Aus den Anregungs- und Emissionsspektren der Reportergruppe (2-Aminopurin-Ribonukleosid) sind unter Vermeidung von Streulichtstörungen, die sowohl aus dem elastischen Streulicht (*Rayleigh*-Effekt) als auch aus dem inelastischen Streulicht (*Raman*-Effekt) bestanden, folgende Meßparameter gewählt worden. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 320 nm mit einer Bandbreite von 1 nm

#### 4.5. FLUORESCENZ-TITRATIONEN

angeregt. Die Detektion der Emission erfolgte bei einer Wellenlänge von 380 nm mit einer Bandbreite von 16 nm in einem Winkel von 90° zum Anregungslicht. Nach dem Einschalten des Gerätes (Nr. 7 in Abb. 4.1) wurden die Monochromatoren mit Hilfe einer im Gerät programmierten Routine kalibriert und am Referenzkanal C ein definiertes Signal eingestellt. Die Gerätestabilität wurde durch die Messung des Signals einer mit bidest. Wasser gefüllten Meßküvette überprüft. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 20°C durchgeführt.

Meß- und Referenzküvette wurden zunächst mehrmals per Hand geschüttelt, bei 1800 g (2 min, 20°C,  $r = 100$  mm, 4000 RPM, *Christ* Tischzentrifuge) zentrifugiert und 5 min in dem Probenhalter thermostatiert. Nun erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität von Meß- und Referenzküvette über 400 s mit einem jeweiligen Zeitintervall von 5 s. Für das nächste Meßwertepaar wurde nach Zugabe der Tierierlösung mit Hilfe der Mikrometerschraube dieser Vorgang wiederholt. Die Titration erfolgte dabei standardmäßig bis zu einer Metallionenkonzentration ( $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$ ) von 220 mM und einer *Hammerhead*-Ribozyme außer dem HH5 bischend von dieser Regelung wurden alle *Hammerhead*-Ribozyme außer dem HH5 bis zu einer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von 120 mM, sowie  $\text{TCN}$ -Puffer und 2AP bis 430 mM titriert. Bei allen Fluoreszenzintensitätsmessungen wurden keine Anzeichen für das Vorhandensein eines langsamen Prozesses beobachtet.

**Auswertung** Die 80 Einzelmesswerte für jeden Meßpunkt wurden mit Hilfe des Computerprogramms *sintemp* gemittelt. Nach einer Voluminkorrektur wurde die Differenz der gemittelten Meßwertepaare von der jeweiligen Meß- und Referenzküvette genommen, um Fluoreszenzveränderungen aufgrund von Störeffekten zu eliminieren. Die Korrektur der Meßdaten wegen des Inner-Filter-Effektes [119] konnte vernachlässigt werden, weil die Absorption bei der gewählten Anregungswellenlänge mit  $\leq 0,05$  sehr niedrig war. Die korrigierten Meßdaten wurden auf das *UNIX-Cluster* der *Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung (GWDG)* transferiert. Dort wurden die experimentellen Daten unter Verwendung der *Simplex*-Methode zur Minimierung der Fehlerquadratsumme [90] an verschiedene Reaktionsmodelle (s. Kap. 5.1) angepaßt. Dabei wurden neben den Komplexbildungskonstanten ( $K$ ) der RNAs mit  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auch die relativen Quantenausbeuten ( $q$ ) bestimmt.

## 4.6 Temperatursprung-Experimente

Die Temperatursprung(*T-jump*)-Methode [30] gehört zu der vielfältigen Gruppe der Relaxationsmethoden, die die kinetische Untersuchung schneller Reaktionen bis zu einer Zeitauflösung von  $10^{-10}$  s ermöglichen. Dabei wird der Zustand eines Systems, das sich in einem Gleichgewicht oder in einem stationären Zustand befindet, durch einen sprunghaften oder periodische Veränderung (*transient perturbation* oder *stationary perturbation*) einer intensiven Größe gestört, d. h. einer physikalischen Größe, deren Wert unabhängig von der Systemgröße ist. Die Antwort des Systems wird über eine konzentrationsabhängige physikalische Größe (z. B. Absorption, Fluoreszenz oder elektrische Leitfähigkeit) verfolgt. Die beträchtlichen Vorteile der Relaxationsmethoden liegen zum einen im Wegfallen von zeitaufwendigen Mischungsprozeduren der Reaktionsteilnehmer und in der mehrfachen Wiederholbarkeit einer Messung mit der gleichen Probe. Zum anderen gewährleisten sie die Beobachtung schneller Reaktionen und die Linearisierung der Geschwindigkeitsgleichung, welche die Relaxation zum Gleichgewicht beschreiben, wenn die thermodynamische Störung des Ausgangszustandes hinreichend klein ist. Generell existiert jedoch für jede dieser Methoden eine zeitliche Untergrenze und in den meisten Fällen auch eine zeitliche Obergrenze. Beim Temperatursprung liegen die Untergrenze in der schnellst möglichen Aufheizrate des Gleichgewichtssystems ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  s) und die Obergrenze im wesentlichen in der Abkühlungsrate des Systems von ca. 1 s. Zu dieser Gruppe gehören außerdem noch die bekannten Feldsprung- und die Drucksprung-Methoden [11, 19c, 40, 117, 154].

### 4.6.1 Aufbau der Temperatursprungapparatur

Für die *T-jump*-Experimente ist eine im *MPI für biophysikalische Chemie* (Göttingen) von RIGLER et al. [131] entwickelte und von C. R. RABL verbesserte Temperatursprungapparatur verwendet worden. Sie ermöglicht die Messung der Absorption, der Fluoreszenz und der Fluoreszenz-Polarisation eines Systems (s. Abb. 4.2 und 4.3).

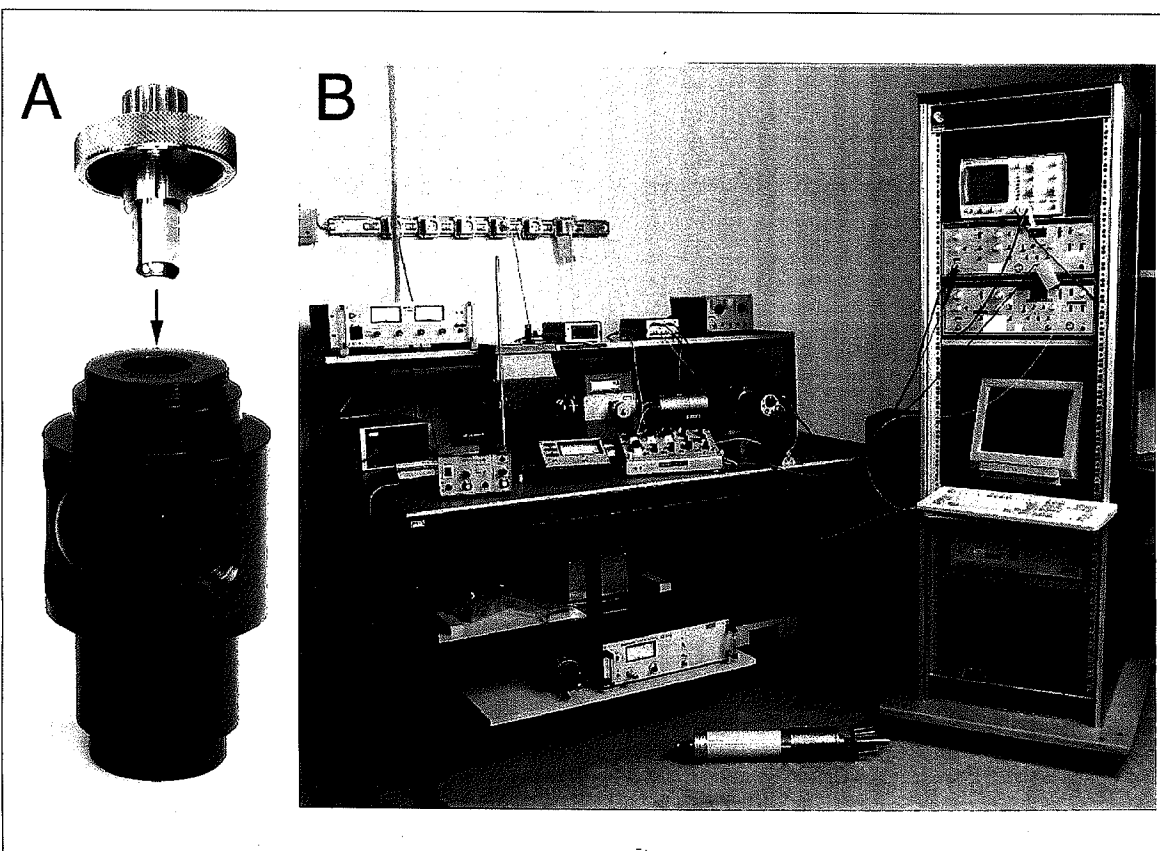


Abbildung 4.2: Foto von der Temperatursprungzelle FZVIII (A) und der Temperatursprungapparatur (B).

## 4.6 Temperatursprung-Experimente

Die Temperatursprung(*T-jump*)-Methode [30] gehört zu der vielfältigen Gruppe der Relaxationsmethoden, die die kinetische Untersuchung schneller Reaktionen bis zu einer Zeitauflösung von  $10^{-10}$  s ermöglichen. Dabei wird der Zustand eines Systems, das sich in einem Gleichgewicht oder in einem stationären Zustand befindet, durch eine sprungartige oder periodische Veränderung (*transient perturbation* oder *stationary perturbation*) einer intensiven Größe gestört, d. h. einer physikalischen Größe, deren Wert unabhängig von der Systemgröße ist. Die Antwort des Systems wird über eine konzentrationsabhängige physikalische Größe (z. B. Absorption, Fluoreszenz oder elektrische Leitfähigkeit) verfolgt. Die beträchtlichen Vorteile der Relaxationsmethoden liegen zum einen im Wegfallen von zeitaufwendigen Mischungsprozeduren der Reaktionsteilnehmer und in der mehrfachen Wiederholbarkeit einer Messung mit der gleichen Probe. Zum anderen gewährleisten sie die Beobachtung schneller Reaktionen und die Linearisierung der Geschwindigkeitsgleichung, welche die Relaxation zum Gleichgewicht beschreiben, wenn die thermodynamische Störung des Ausgangszustandes hinreichend klein ist. Generell existiert jedoch für jede dieser Methoden eine zeitliche Untergrenze und in den meisten Fällen auch eine zeitliche Obergrenze. Beim Temperatursprung liegen die Untergrenze in der schnellst möglichen Aufheizrate des Gleichgewichtssystems ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$  s) und die Obergrenze im wesentlichen in der Abkühlungsrate des Systems von ca. 1 s. Zu dieser Gruppe gehören außerdem noch die bekannten Feldsprung- und die Drucksprung-Methoden [11, 19c, 40, 117, 154].

### 4.6.1 Aufbau der Temperatursprungapparatur

Für die *T-jump*-Experimente ist eine im *MPI für biophysikalische Chemie* (Göttingen) von RIGLER et al. [31] entwickelte und von C. R. RABL verbesserte Temperatursprungapparatur verwendet worden. Sie ermöglicht die Messung der Absorption, der Fluoreszenz und der Fluoreszenz-Polarisation eines Systems (s. Abb. 4.2 und 4.3).

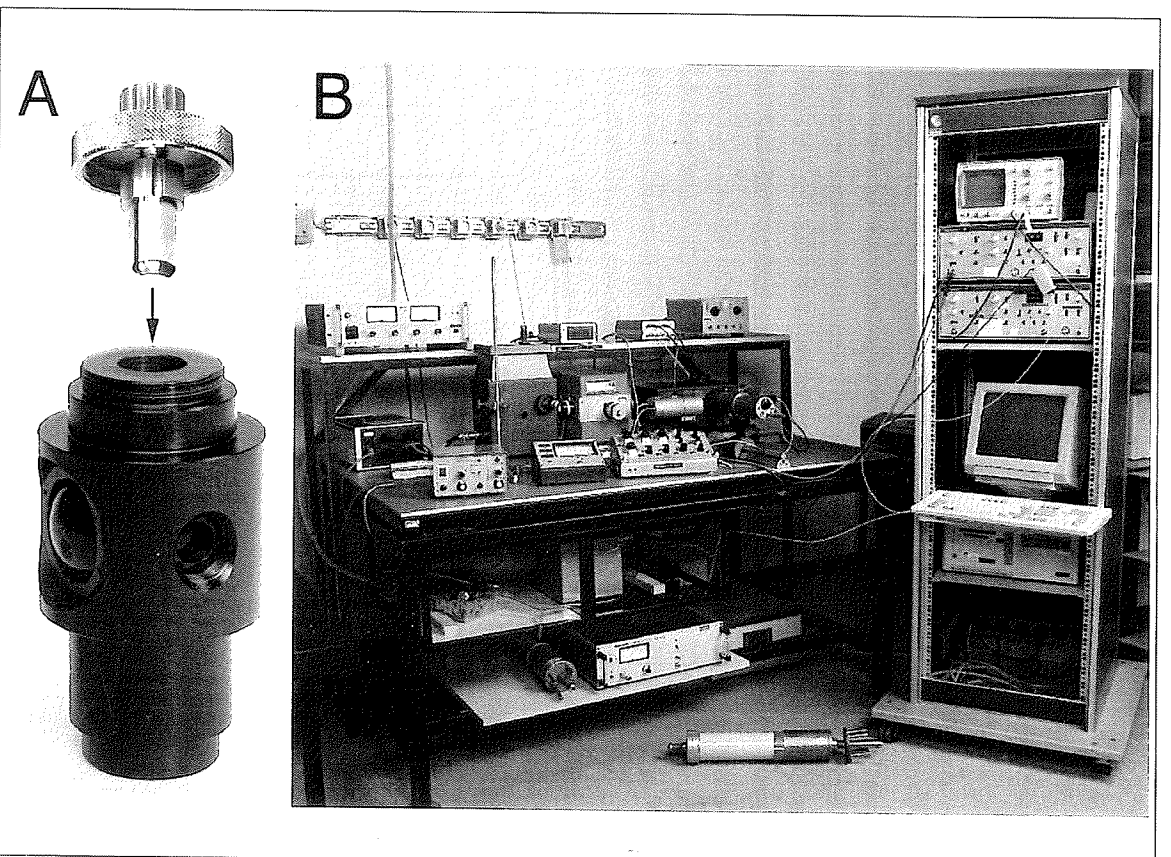


Abbildung 4.2: Foto von der Temperatursprungzelle FZVIII (A) und der Temperatursprungapparatur (B).

**Temperatursprung** Der Temperatursprung wird durch die Umwandlung von elektrischer Energie in Wärme (*joule heating*) erreicht, indem ein hohen elektrischen Strom für eine kurze Zeitdauer durch eine Elektrolytlösung fließt. Über einen Hochspannungsgenerator (bis zu 40 kV) wird ein Hochspannungskondensator mit einer Kapazität von 10–50 nF bis zur Zündspannung einer Funkenstrecke aufgeladen. Über eine Steuerungseinheit erfolgt die Zündung der Funkenstrecke, über die durch einen Optokoppler auch ein Transientenrecorder getriggert wird. Das Meßsignal gelangt von den Photomultipliern über ein Meßpult (Photometrische Kontrol-Einheit — PCE) ebenfalls zum Transientenrecorder und von dort zu einem Personalcomputer. Im Meßpult erfolgt die analoge Verarbeitung des Meßsignals mit der Einstellung der Bandbreite und der Kompensation des Ausgangssignal von Meß- und Referenzphotomultiplier auf 0 V. Als digitale Recorder sind entweder ein DSA 602 der Firma *Tektronix* oder ein Biomation 1010 der Firma *Goold Inc.* mit dem Oszilloskop HP 1220A von *Heulett Packard* verwendet worden. Da die Funkenstrecke mit der Meßzelle in Reihe geschaltet ist, ergibt sich nach ihrer Zündung durch Entladung des Kondensators in der Meßzelle eine Temperaturerhöhung ( $\Delta T$ ) von 2–10°C in einer Aufheizzeit ( $\tau_D$ ), die durch den Widerstand der Meßzelle und die Kondensatorkapazität bestimmt wird (s. Gleichung 2.10). Im Rahmen dieser Dissertation mußten aufgrund von Induktionstörsignalen aufwendige Umbaumaßnahmen von ungefähr einem Jahr durchgeführt werden, um den ursprünglichen Hochspannungsgenerator durch ein analoges Gerät vom Typ HNCK 60000-100ps. der Firma *Heinzinger* ersetzen zu können.

Neben der Standard-Temperatursprung-Methode sind heute nur noch zwei weitere Temperatursprung-Methoden von praktischer Bedeutung. Einerseits kann durch das sog. *joule heating* mit Hilfe eines Koaxialkabels [66, 67] die Aufheizzeit wesentlich verkürzt werden, so daß eine Temperaturerhöhung von bis zu 10°C in weniger als 50 ns erreicht wird. Andererseits ermöglicht das sog. *optical heating* mit Hilfe eines Lasers [69, 70] z. B. auch Kinetikuntersuchungen in Puffern geringerer Ionenstärke, weil die Zeitrafflösung nicht von der Ionenstärke des Puffers, sondern von der Emissionszeit des Lasers und der Thermalisierung der absorbierten Photonenenergie abhängig ist, die im Bereich von 10<sup>-10</sup> s liegen kann.

**Meßzelle** Die Meßzelle besteht aus einem schwarzen, harten Polyoxymethylen (POM)-Block, in den über ein Gewinde die Gold- bzw. Platinelektroden mit dem Abstand  $l_E$  eingedreht werden. Eine Bohrung in der oberen Elektrode gewährleistet mittels eines Temperaturfühlers und Digitalthermometers die Kontrolle der Meßtemperatur, die durch einen thermostatisierbaren Zellhalter eingestellt wird. Die obere und untere Elektrode sind mit der Temperatursprung-Einheit verbunden. Senkrecht dazu werden die Anregungs- und Emissionsfenster aus Quarzglas eingesetzt, mit Hilfe einer Zweikomponenten-Silikon-Kautschukmasse abgedichtet und mit einem drehbaren Ring von außen fixiert. Dadurch entsteht ein Probenvolumen ( $v_P$ ) von ca. 0.7 ml mit einer optischen Weglänge von  $l = 7$  mm. Während die Anregungsfenster nur ein leicht konische Form besitzen, sind die Emissionsfenster deutlich stärker konisch und nach außen hin kugelförmig gewölbt, um möglichst viel des Fluoreszenzlichtes einzufangen. Anstelle dieses Typs von Fluoreszenzmeßzellen (FZ) wurde auch noch eine Zelle (Quarz-FZ) mit einem einzigen inneren Quarzglas-Block verwendet (s. Tab. 4.2 und 4.2).

Tabelle 4.2: *Elektrodenabstände und Probenvolumina der verwendeten Temperatursprung-Meßzellen.*

Meßzelle	Elektrodenabstand $l_E$ [cm]	Probenvolumen $v_P$ [ml]
FZ IV	12.5	0.613
FZ VII	12.6	0.617
FZ (4PS)	12.7	0.622
FZ VIII	12.6	0.617
Quarz-FZ	15.3	0.750

Beide Zelltypen eignen sich besonders gut für Titrationsmessungen, weil durch das einfache Abschrauben der oberen Elektrode die Zelle leicht ohne vorheriges Entfernen aus dem Zellhalter geöffnet werden kann.



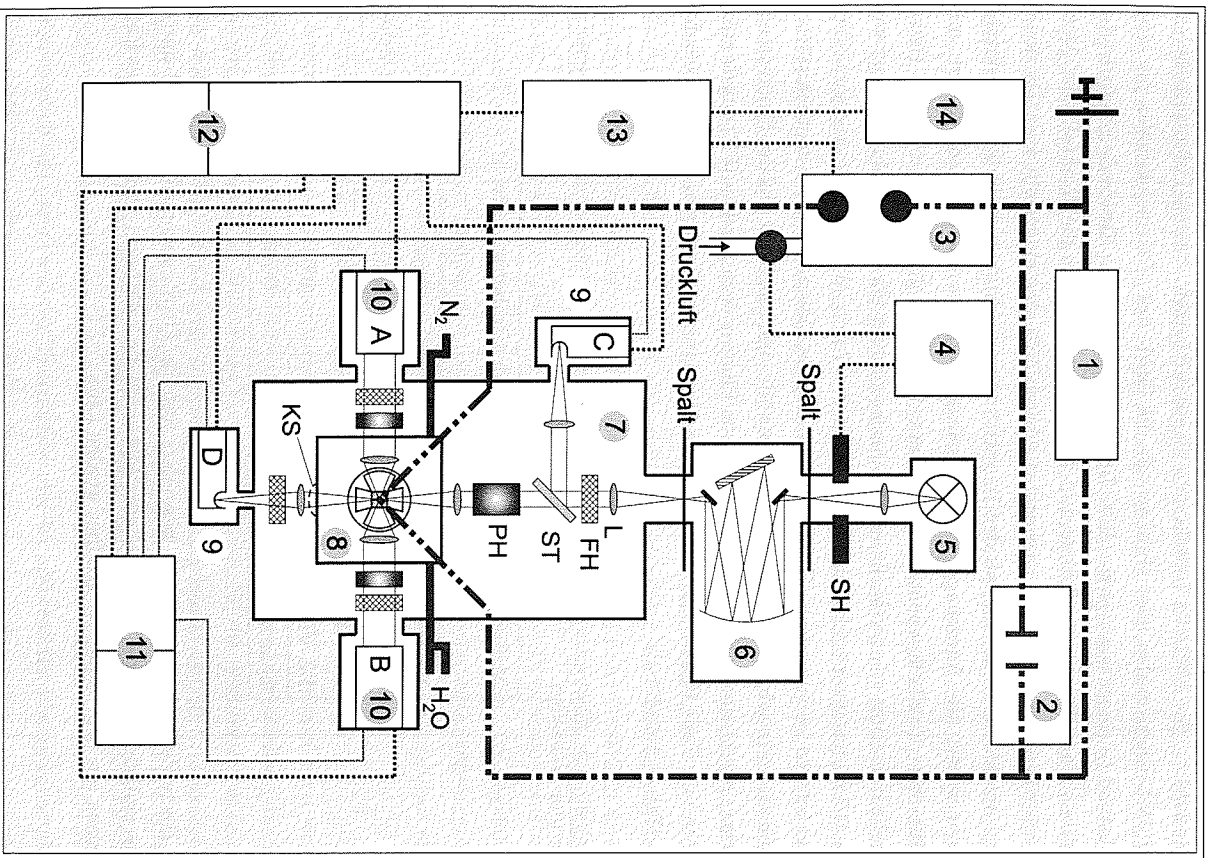


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau der Temperatursprungsapparatur.

## 4.6. TEMPERATURSPRUNG-EXPERIMENTE

55

Erläuterungen zu Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau der Temperatursprungsapparatur: 1. Hochspannungsgenerator, 2. Kondensator, 3. Funkenstrecke, 4. Steuerungseinheit, 5. Lampe, 6. Gittermonochromator, 7. Probenkammer, 8. Probenhalter mit Meßzelle, 9. Absorptions- und Referenzphotomultiplier (D und C), 10. Fluoreszenzphotomultiplier (A und B), 11. Spannungsnetzgerät mit Regler, 12. Meßpult (PCE) mit Voltmeter 13, Transientenrecorder, 14. Personalcomputer; FH = Filterhalter, KS = Konkavspiegel für Fluoreszenzmessungen, L = Linse, PH = Polarisator- und Analysatorhalter, SH = Shutter und ST = Strahlenteiler.

**Optisches Detektionssystem** Als Lichtquellen wurden Hg/Xe-Bogenlampen mit einer Leistung von 200 W der Firma *Hammatsu* und von 600 W der Firma *Hanovia* verwendet. Der Lichtstrahl gelangt über einen variablen *Shutter* durch einen Gittermonochromator der Firma *Schöffel Kratos* mit variablen Ein- und Ausgangsspalten, so daß ein monochromatischer Lichtstrahl bestimmter Intensität und Bandbreite herausgefiltert wird. In der folgenden Probenkammer befinden sich neben dem Probenhalter samt Meßzelle verschiedene optische Einheiten. Nach einer Sammellinse wird einerseits über einen Strahlenteiler aus Quarzglas ca. 6 % des Lichtes zu dem Referenzphotomultiplier C (RCA 1P28) und andererseits der Rest des Lichtes zur Meßzelle geleitet, wobei das parallele Licht nach einem Polarisationshalter auf die Meßzelle fokussiert wird. Hinter der Meßzelle befindet sich eine Sammellinse, ein Filterhalter und schließlich der Absorptionsphotomultiplier (RCA 1P28). Bei Fluoreszenzmessungen wird direkt hinter der Meßzelle ein Konkavspiegel zur Verdoppelung der Lichtintensität in der Zelle angebracht. Senkrecht dazu sind an beiden Seiten die Fluoreszenzphotomultiplier A und B (EMI 9558 QA oder QB) angebracht, wobei das Emissionslicht vorher durch eine fokussierende Linse und einen Filterhalter gelangt. Die Detektoren können über einen Regler durch ein Hochspannungsnetzgerät mit bis zu 2000 V versorgt werden.

Für Fluoreszenz-Polarisationsmessungen können vor der Meßzelle ein Polarisator und in die Filterhalter bis zu 90° drehbare Analysatoren eingesetzt werden. Alle Linsen, Strahlenteiler und Zellfenster bestehen aus spannungsstremem Quarzglas.

## 4.6.2 Temperatursprungmessungen

**Vorbereitungen** Zur Reinigung der Meßzelle wurde zunächst der aus den Ritzen austretende Silikonkautschuk an den Innenwänden des Probenraums mit einem

weichen Gegenstand (z. B. Holzzahnstocher) entfernt. Um in den Silikonkautschuk diffundierte Probenreste aus vorherigen Messungen zu entfernen, wurde die Zelle mit bidest. Wasser gefüllt und im Exsikkator mehrmals ca. 1 min entgast. Die Quarzgläser und Elektroden ließen sich mit abs. Ethanol gut reinigen und entfetten. Zum Schluß wurde die gesamte Meßzelle mehrmals mit bidest. Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

Die zu untersuchenden Ribonukleinsäuren wurden im Meßpuffer TCN, der eine für T-Sprung-Messungen ausreichende Ionenstärke von  $I = 145 \text{ mM}$  besaß, je nach Meßzelle in einem Gesamtvolumen von 1.7–2.0 ml gelöst und der *Annealing*-Prozedur I. (s. Kap. 4.3) unterzogen. Nach dem Abkühlen wurde die Ribonukleinsäure-Lsg. kurz mit dem Vortex gemischt und bei ca. 8200 g (1 min, 20°C,  $r = 73 \text{ mm}$ , 10000 rpm, *Eppendorf* Tischzentrifuge) zentrifugiert. Von dieser Lösung wurden 1.6 bzw. 1.8 ml (Quarz-FZ) abpipettiert und zur Entfernung von Staubpartikeln über einen sterilen Minisart-Filter (Celluloseacetat-Filter, Porengröße 0.2  $\mu\text{m}$ ) von *Satorius* in die Meßzelle filtriert. Nach vorsichtiger Entgasung im Exsikkator wurde die Meßzelle durch das Hinderdrehen der oberen Elektrode in die Probenlösung luftblasenfrei verschlossen. Nach der Entfernung von Staubpartikeln von den Quarzfenster mit Stickstoff und einer genauen Konzentrationsbestimmung durch ein UV-Spektrum (s. Kap. 4.1) wurde die Meßzelle in den Probenhalter eingesetzt und mit einem Metallring fixiert.

**Messung** Nach der Bestimmung des Meßzellenwiderstandes mit Hilfe einer *Wheatstoneschen* Brücke und der Justage der jeweiligen Hg-Lampe mit Hilfe des Absorptionsphotomultiplier konnte mit einer Meßserie begonnen werden. Bei den Fluoreszenzmessungen mit 2AP bzw. mit 2AP-substituierten Ribonukleinsäuren erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 313 \text{ nm}$  mit 2–4 mm großen Ein- und Ausgangspalten am Monochromator. Zur Unterdrückung von Streulicht wurden die Filter WG385 oder WG345 mit einer Schichtdicke von  $d = 2 \text{ mm}$  der Firma *Schott* hinter die Meßzelle plaziert. Die Kantenlage  $\lambda_H$  eines Filters wird nicht nur durch seine chemische Zusammensetzung (Glasmischung), sondern auch geringfügig durch seine Schichtdicke  $d$  bestimmt, so daß z. B. die genaue Kantenlage des Filters WG345 ( $d = 2 \text{ cm}$ ) bei  $\lambda_H = 341 \text{ nm}$  lag. Die Meßtemperatur betrug 2°C, weil in der Nähe von 4°C der thermische Ausdehnungskoeffizient in wäßrigen Lösungen fast

null ist und somit Störungen wie Kavitation minimiert werden konnten. Nach der Wahl der Meßparameter einer Meßserie wurden in der Regel 6–10 Einzelmessungen durchgeführt. Einige Standardstellungen sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tabelle 4.3: Standardstellungen beim Temperaturprung mit  $\Delta T$ -Werten für die Meßzelle FZ VIII.

Hochspannung $U$ [kV]	Kondensatorkapazität $C$ [nF]	Risetime $\tau_r$ [ $\mu\text{s}$ ]	Temperaturprung $\Delta T$ [°C]
40	10	1	2.1
40	20	2	6.1
30	50	5	8.6

Kurz vor der Anlösung eines Temperaturprunges über die Steuerungseinheit wurden nach der Kondensatoraufladung und dem Öffnen des *Shutters* die benutzten Photomultiplier mit Hilfe des Meßputes (PCE) und des daran angeschlossenen Voltmeters auf 4 V abgeglichen. Bei Titrationsmessungen wurde vor einer neuen Meßserie die entsprechende Menge an Titratorlösung hinzupipettiert, thermostatisiert und der Meßzellenwiderstand erneut bestimmt.

Bei den durchgeführten Temperaturprung-Experimenten lagen die Nukleinsäurekonzentrationen in einem Konzentrationsbereich von 0.5–25.0  $\mu\text{M}$ . Die Erhöhung der Metallionenkonzentration von  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgte in 4–8 Schritten standardmäßig bis zu einer Endkonzentration von 100 mM.

Als Referenz für die Dekonvolution wurden entsprechende Fluoreszenz-Meßserien mit der Aminosäure Tryptophan in TCN-Puffer bei einer Wellenlänge von 280 nm unter Verwendung des WG345 Filters durchgeführt. Zur genauen Bestimmung der Anstiegszeiten (*Risetime*) des Meßputes (PCE) und der Photomultiplier dienten Messungen mit einer Leuchtdiode und einem HP 8004A Pulsgenerator von *Hewlett Packard*.

**Auswertung** Von dem Personalcomputer wurden die Meßdaten auf das *UNIX-Cluster der Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung (GWDG)* transfe-

niert. Durch Anpassung eines Exponentialfunktion-Systems an die experimentellen Daten wurden die Relaxationszeiten ( $\tau_1$ ) und die Amplituden ( $A_1$ ) bestimmt. Die Anpassung erfolgte entweder unter Verwendung der Aufheizzeit ( $\tau_d$ ) und der experimentell bestimmten Anstiegszeiten ( $\tau_r$ ) [35] oder durch eine Dekonvolutionsprozedur unter Verwendung der entsprechenden Tryptophan-Meßkurve als Referenzkurve [120]. In beiden Fällen wurde die Kalkulation mit Hilfe der *Simplex*-Methode zur Funktionsminimierung [90] erreicht.

#### 4.7 Stopped-Flow-Experimente

Mit der *Stopped-Flow*-Methode können ebenfalls kinetische Untersuchungen an schnellen Reaktionen durchgeführt werden. Das Mischen der einzelnen Reaktionspartner ist bei der konventionellen Kinetikmessung der beschränkende Schritt. Während bei dem klassischen Verfahren, bei dem die Reaktion durch Zugabe eines Reaktanden zu einer in einem Rührgefäß befindlichen Reaktionslösung gestartet wird, mindestens einige Sekunden zum Mischen der Reaktionsteilnehmer benötigt werden, kann durch spezielle Strömungsmethoden das Mischen in weniger als einer 1 ms erreicht werden. Im Gegensatz zur sog. *Continuous-Flow*-Methode, die aufgrund des hohen Probenverbrauchs für die Untersuchung von biochemischen Systemen in der Regel ungeeignet ist, erfolgt die Mischung der Reaktionspartner bei der *Stopped-Flow*-Methode nicht kontinuierlich, sondern in mehrmals wiederholbaren, kurzen Zeitintervallen, weil bei diesem Verfahren die Strömung immer wieder unterbrochen wird [11, 117, 154].

##### 4.7.1 Aufbau der Stopped-Flow-Apparatur

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete *Stopped-Flow*-Apparatur wurde in der Abteilung *Biochemische Kinetik* im *MPI für biophysikalische Chemie* (Göttingen) entwickelt und aufgebaut [83, 84].

In Abbildung 4.4 ist der Aufbau schematisch dargestellt. Die Reaktionslösungen mit den jeweiligen Reaktionspartnern liegen zunächst in den Spritzen A und B vor,

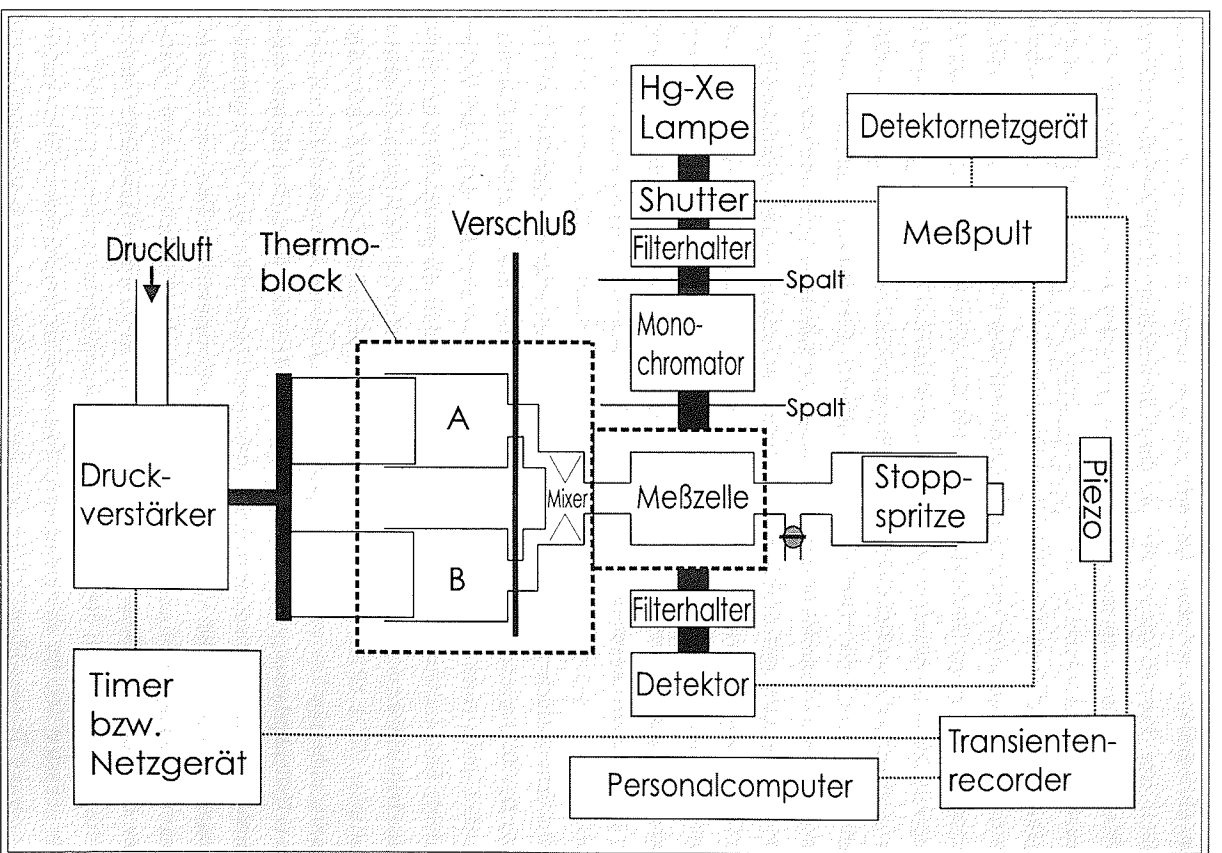


Abbildung 4.4: Schematischer Aufbau der Stopped-Flow-Apparatur.

von wo aus sie unter hohem Druck durch eine Mischkammer und Beobachtungszelle in eine Stoppspritze gedrückt werden. Um eine hohe Turbulenz und maximale Mischungseffizienz zu erzielen, werden die Lösungen in der Mischkammer über kreuzförmig angeordnete Düsen vermischt. Durch den Aufprall des Stempels der Stoppspritze auf einen Piezokristall werden zum einen der Fluß der gemischten Lösung abrupt gestoppt und zum anderen über den Piezokristall ein elektrisches Triggersignal erzeugt. Die Spritzen A und B, die Mischkammer und die Beobachtungszelle befinden sich in einem thermostatisierten Metallblock (Thermoblock). Durch einen seitlichen Hahn läßt sich die Stoppspritze, deren Volumen variabel einstellbar ist, nach einer Mischung wieder entleeren. Der auf die Spritzen A und B ausgeübte Druck kann bis zu ca. 30 bar betragen, indem ein Luftdruck von 3–7 bar über einen Verstärker vervielfacht wird. Neben der manuellen Druckausübung kann der Druck auch durch einen elektrischen Impuls beliebig lang über ein Netzgerät von *Schroff* (Karlruhe) oder über eine digital gesteuerte Zeiteinheit (*Timer*) konstant ausgeübt werden, wobei der elektrische Impuls bei einigen besonderen Experimenten (Fluoreszenz-Langzeitmessungen) auch als elektrisches Triggersignal verwendet worden ist.

Bei dem **optischen Detektionssystem** dient als Lichtquelle eine 200 bzw. 500 Watt Hg/Xe-Bogenlampe der Firma *Hammamatsu*. Nach einem *Shutter* und Filterhalter wird durch einen Gittermonochromator der Firma *Bausch & Lomb* und dessen variable Ein- und Ausgangspalte die gewünschte Wellenlänge und Lichtintensität eingestellt. Hinter der nun folgenden Meßzelle wird entweder der Absorptionsphotomultiplier (RCA 1P28) oder der Fluoreszenzphotomultiplier (EMI 9558 QB) angebracht, wobei das Fluoreszenzlicht im rechten Winkel zum Anregungslicht mit Hilfe eines Umlenkprismas gesammelt und störendes Streulicht durch den Einsatz eines Emissionsfilters eliminiert wird. Die Detektoren können über ein Hochspannungsnetzgerät mit bis zu 3000 V versorgt werden. Das vom jeweiligen Photomultiplier erzeugte elektrische Meßsignal gelangt über das Meßpult P2F (*Risetime*: 1  $\mu$ s – 5 ms) oder das Meßpult Tübingen (*Risetime*: 1 ms – 5 s) zu einem Transientenrecorder (s. Kap. 4.6.1) und von dort zu einem Personalcomputer.

In jüngster Zeit ist eine erfolgreiche Kombination verschiedener Spüngerfahren mit der *Stopped-Flow*-Technik gelungen [123]. Dieses neue Gerät ermöglicht die

#### 4.7. STOPPED-FLOW-EXPERIMENTE

Durchführung von kombinierten *Stopped-Flow*-Temperatur sprung-Experimenten und *Stopped-Flow*-Feldsprung-Experimenten.

##### 4.7.2 Messungen am *Stopped-Flow*

Während die 14 mm-Meßzelle ausschließlich für Absorptionsmessungen benutzt wurde, konnte die 2 mm-Meßzelle sowohl für Fluoreszenzmessungen — in Verbindung mit dem Emissionsfilter GG385(2 mm) von *Schott* — als auch für Absorptionsmessungen eingesetzt werden. Bei den Fluoreszenz-Langzeitmessungen wurde die Lichtintensität zur Vermeidung von Photoreaktionen durch die Verwendung eines schmaleren Eingangspaltes (3,0 auf 0,3) und der drei Filter UV-II-311, WG320 (3 mm) und UG11 (1 mm) von *Schott* vor dem Monochromator reduziert. Nach der Vorthermostatisierung und dem Zusammenbau der *Stopped-Flow*-Einzelblöcke wurde die *Stopped-Flow*-Apparatur zur Reinigung 2–3mal mit entgasem bidest. Wasser durchgespült, wobei die Anlage zwischen durch einmal auf Dichtigkeit getestet wurde. Zusätzlich wurde auch hier die Lichtquelle vor jeder Messung justiert.

Die untersuchten Ribonukleinsäurelösungen wurden zunächst der *Annealing*-Prozedur I. (s. Kap. 4.3) unterzogen. Zur Entfernung von Staubpartikeln wurden die Probenlösungen über einen sterilen Minisart-Filter (Cellulosacetat-Filter, Porengröße 0,2  $\mu$ m) von *Satorius* in Reagenzgläser ( $l = 10$  cm,  $\varnothing = 2$  cm) filtriert. Nach vorsichtigem Entgasen im Exsikkator wurden die Probenlösungen bei ca. 3000 g (5 min, 4°C,  $r = 10,7$  cm, 5000 rpm, Kühlzentrifuge) zentrifugiert, luftblasenfrei in die Spritzen A bzw. B gefüllt und thermostatiert.

Nach Öffnen des *Shutters* und des Mischkammerzugangs wurde das Ausgangssignal mit dem Meßpult auf 5 V verstärkt und mit einer konstanten Referenzspannung auf 0 V kompensiert. Dann wurden die Reaktionsteilnehmer durch die Druckauslösung gemischt, wobei das von der Stoppspritze aufgenommene Volumen konstant auf ca. 200  $\mu$ l eingestellt war. Nach dem Entleeren der Stoppspritze konnte eine neue Messung erfolgen. Für Fluoreszenz- bzw. Absorptionsmessungen wurde eine Detektorspannung von 1 kV bzw. 800 V verwendet.

Von dem Personalcomputer wurden die Meßdaten auf das *UNIX-Cluster* der *Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung (GWDG)* transferiert. Durch An-

passung eines Exponentialfunktion-Systems an die experimentellen Daten wurden die Relaxationszeiten ( $\tau_i$ ) und die Amplituden ( $A_i$ ) bestimmt [35], wobei die *Simplex*-Methode zur Minimierung der Fehlerquadratsumme [90] verwendet wurde.

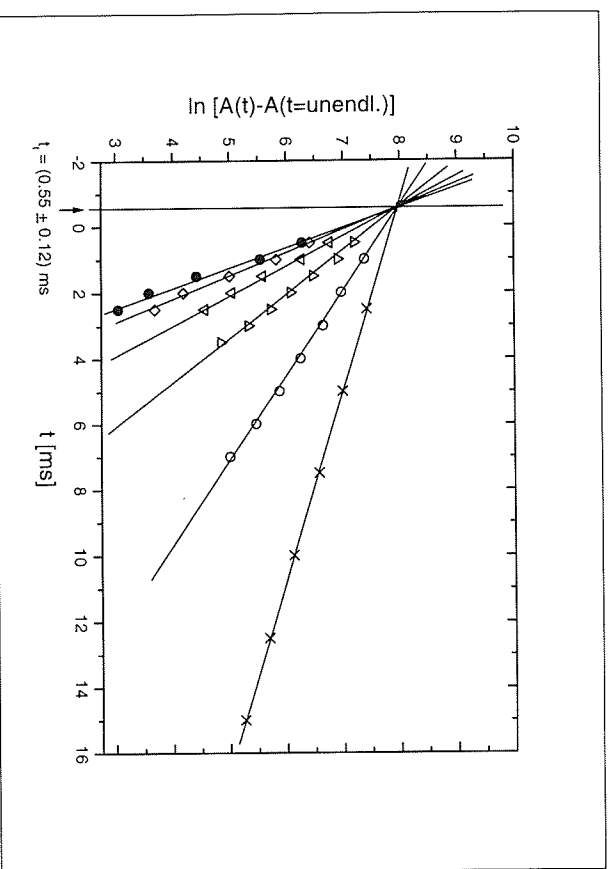


Abbildung 4.5: Bestimmung der Totzeit der Stopped-Flow-Apparatur nach PETERMAN [106]. Dazu wurde die Reaktion von jeweils 250  $\mu\text{M}$  2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) in 0,2 M NaCl/10% Propenol mit 5 (x), 10 (o), 20 ( $\Delta$ ), 30 ( $\nabla$ ), 40 ( $\circ$ ) und 50 ( $\bullet$ ) mM Ascorbinsäure in 0,2 M NaCl/HCl (pH 2) durch die Detektion der Absorption des DCIP ( $\lambda_{\text{exc}} = 516 \text{ nm}$ , KV399 (2 nm) von Schott) bei 20°C verfolgt. Aus der Auftragung der logarithmierten Differenz des Absorptionssignal zur Zeit  $t$  und zur Zeit  $t = \text{unendlich}$  gegen die Zeit  $t$  wurde durch Zurückextrapolieren über den Zeitpunkt 0 der Beobachtung die Totzeit  $t_t$  bestimmt.

Die Totzeit ( $t_t$ ) der Apparatur ist als die Zeit definiert, die vom Beginn der Reaktion bis zum Zeitpunkt der ersten Beobachtungsmöglichkeit verstreicht. Sie wurde nach der Methode von B.F. PETERMAN [106] mit einem Testsystem, der Reduktion des 2,6-Dichlorphenolindophenols bei pH 2 durch Ascorbinsäure [160], bestimmt und hatte den Wert  $t_t = (0,55 \pm 0,15) \text{ ms}$  (s. Abb. 4.5).

## Kapitel 5

### Experimentelle Ergebnisse

Bei den durchgeführten Untersuchungen stand die Frage nach der Natur der Magnesiumbindung an die 2-Aminopurin-substituierten RNA-Moleküle, insbesondere den *Hammerhead*-Ribozymen, im Vordergrund.

Zunächst wurden durch Fluoreszenztitrations die Bindungsgleichgewichte von zweiwertigen Metallionen ( $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) und den verschiedenen RNA-Molekülen charakterisiert. Dabei konnten die experimentellen Daten entweder durch die Besetzung von einem oder zwei voneinander unabhängigen Bindungsplätzen beschrieben werden. Die Fluoreszenzlösung der Reportergruppe 2AP in dem jeweiligen RNA-Molekül ermöglichte vor und nach einer Metallionenzugabe eine Charakterisierung der RNA-Strukturen. In einigen RNA-Strukturen konnten durch Schmelzkurvenanalysen inter- und intramolekulare, doppelhelikale Bereiche nachgewiesen werden.

Zur weiteren Aufklärung der Struktur und Dynamik der verwendeten Ribonukleinsäuren wurden Kinetikmessungen an der Temperatursprung- und der *Stopped-Flow*-Apparatur unternommen. In Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen konnten bei allen Ribonukleinsäuren mit ausgeprägter Sekundärstruktur, wie den *Hammerhead*-Ribozymen und den *Hairpins*, mehrere Konformationszustände beobachtet werden. Durch weitere Titrationsmessungen wurde die Abhängigkeit dieser Prozesse sowohl von der RNA- als auch von der Metallionenkonzentration ( $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) untersucht. Unter den vier kurzen Oligonukleinsäuren wurden bei zwei Nukleinsäuren eine Dimerisierungsreaktion und bei einer anderen ein  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion *Inner-Sphere*-Komplex an diesem RNA-Molekül festgestellt.

## 5.1 Bindungsgleichgewichte mit den $\text{Me}^{2+}$ -Kationen ( $\text{Mg}^{2+}$ und $\text{Ca}^{2+}$ )

Bevor die Bindungsgleichgewichte zwischen den 2AP-substituierten RNA-Molekülen und den zweiwertigen Kationen ( $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) untersucht wurden, wurden einige Voruntersuchungen am Spektrofluorimeter (s. Kap. 4.5) durchgeführt:

1. Test aller RNA-Proben auf mehrwertige Kationen mit dem Metallkomplexbildner EDTA
2. Charakterisierung der verwendeten Puffer
3. Charakterisierung des 2-Aminopurin-Ribonukleosids (2AP)

**EDTA** Alle verwendeten RNA-Proben (*Charge*) wurden einer Fluoreszenztitration mit dem Metallkomplexbildner Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA) unterzogen, um zu überprüfen, ob die RNA-Proben nach ihrer Synthese frei von mehrwertigen Kationen waren. Sonst würden diese bei den folgenden Experimenten die Ergebnisse verfälschen. Der Komplexbildner EDTA bildet mit mehrwertigen Metallionen einen leicht löslichen, stabilen Chelatkomplex, einen sechsfach koordinierten 1:1 Komplex. Die pH-abhängigen Bildungskonstanten der EDTA-Komplexe sind für die  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit  $K_{Mg} = 10^{5.3} \text{ M}^{-1}$  und  $K_{Ca} = 10^{7.3} \text{ M}^{-1}$  bei pH = 7 und  $20^\circ\text{C}$  recht hoch [132]. Die Fluoreszenzintensitätsänderungen bei der Titration mit  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  waren bei allen RNA-Proben meist deutlich kleiner als 4 % und somit innerhalb der Meßgenauigkeitsgrenzen des Spektrofluorimeters. Daher konnten unter diesen Reaktionsbedingungen eventuell auftretende, sehr geringe Konzentrationen von zweiwertigen Kationen in den RNA-Proben vernachlässigt werden. Dies gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, daß eventuell vorhandene Konzentrationen an zweiwertigen Metallionen keine nennenswerte Änderung der Fluoreszenz bewirken.

**Puffer** Für die Fluoreszenztitrationen (s. Kap. 4.5) wurde vorwiegend der TCN-Puffer (pH = 7.2, I = 145 mM) benutzt, der aufgrund seiner Ionenstärke für die

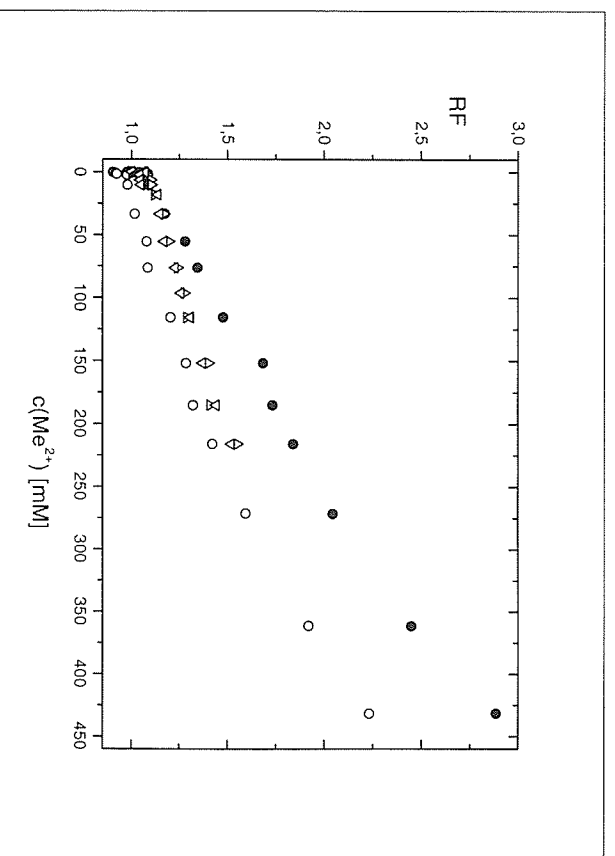


Abbildung 5.1: Fluoreszenztitrationen von den Reaktionspuffern. Relative Fluoreszenzintensität (RF) des TCN- und T-Puffers in Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration bei  $20^\circ\text{C}$ : TCN +  $\text{Mg}^{2+}$  (●), TCN +  $\text{Ca}^{2+}$  (○), T +  $\text{Mg}^{2+}$  (▽) und T +  $\text{Ca}^{2+}$  (◇). Aufgrund der niedrigen Signalintensität war die Streuung des relativen Signals sehr hoch.

folgenden Temperatursprung-Experimente ausgewählt wurde. Zusätzlich wurde der T-Puffer (pH = 7.5, I = 63 mM) verwendet, weil dieser in der Vergangenheit bei der Untersuchung der katalytischen Aktivität von Ribozymen häufig als Reaktionsmedium zum Einsatz kam.

Bei der Charakterisierung der verwendeten Reaktionspuffer mit dem Fluorimeter zeigte sich, daß der T-Puffer und der TCN-Puffer ein deutlich höheres Signal als bildet. Wasser bei gleichen Einstellungen des Gerätes hatte, dessen Intensität bei einer Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$ - bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bis zu einer Ionenkonzentration von 220 mM (T-Puffer) bzw. 430 mM (TCN-Puffer) um den Faktor von 1.5 bis 3 zunahm (s. Abb. 5.1). Die Natur des Signals ist nicht geklärt. Es könnte durch Reststreich

oder fluoreszente Verunreinigungen entstanden sein. Die Fluoreszenzintensität der meisten Ribonukleinsäuren (*Hammerhead*-Ribozyme und *Harpins*) war bei dem verwendeten Konzentrationsbereich von 0.2–1.0  $\mu\text{M}$  sehr gering. Da unter diesen Bedingungen die Änderungen der Hintergrundintensität des Puffers ab einer Metallionenkonzentration von 0.1 M in derselben Größenordnung der Intensitätsänderung der titrierten RNA lag, wurde bei allen Untersuchungen eine parallele Titration mit der Pufferlösung durchgeführt. Nach einer Volumenkorrektur in beiden Fällen wurden die erhaltenen Meßdaten einer RNA-Titration mit denen einer entsprechenden Puffer-Titration korrigiert.

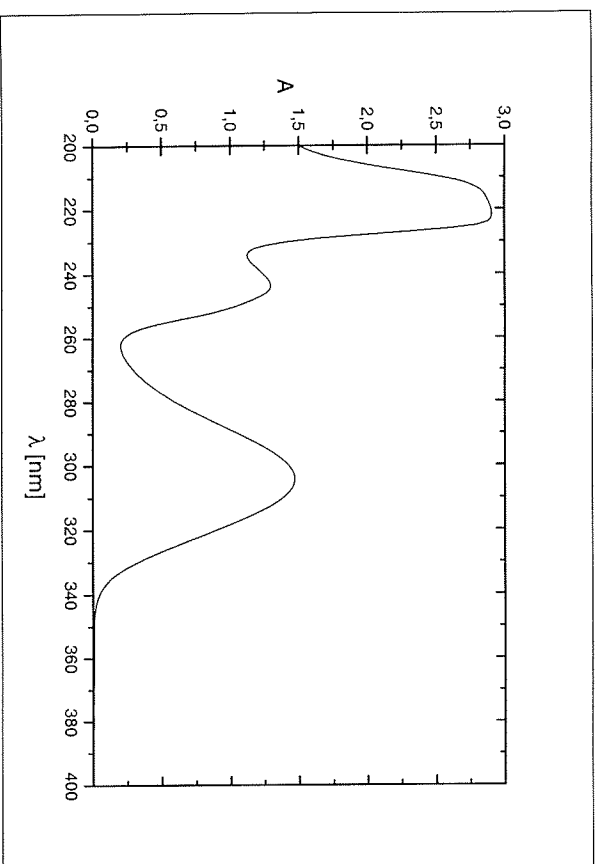


Abbildung 5.2: Absorptionsspektrum von 180  $\mu\text{M}$  2-Aminopurin-Ribonukleosid in C-Puffer mit F4500 Spektrophotometer von Hitachi. Dargestellt ist die Absorption (A) in Abhängigkeit von der Wellenlänge ( $\lambda$ ) mit den lokalen Maxima  $\lambda_{220} = 2.93$ ,  $\lambda_{244} = 1.29$  und  $\lambda_{304} = 1.47$ .

### 5.1. BINDUNGSGLEICHGEWICHTE MIT DEN $\text{ME}^{2+}$ -KATIONEN

**2AP** Das Absorptionsspektrum (s. Abb. 5.2) des 2-Aminopurin-Ribonukleosids (2AP) zeigte in einem Wellenlängenbereich von 200–400 nm bei  $\lambda = 220, 244$  und 304 nm drei lokale Absorptionsmaxima. Um störende Photoreaktionen zu reduzieren, wurde für die weiteren Fluoreszenztitrationsmessungen eine Anregungswellenlänge von  $\lambda_{exc} = 320$  nm gewählt.

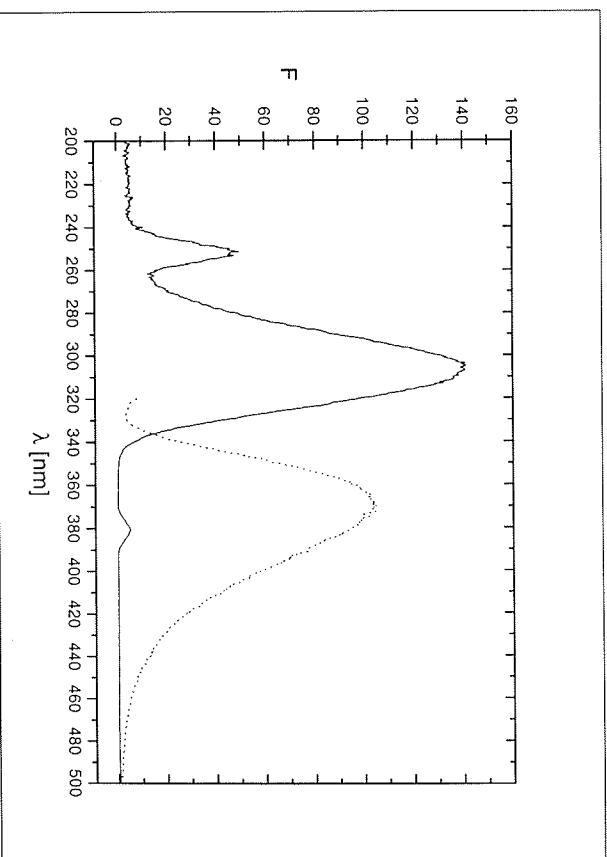


Abbildung 5.3: Anregungs- und Emissionsspektrum von 0.45  $\mu\text{M}$  2-Aminopurin-Ribonukleosid in C-Puffer mit VIKOM 933A Spektrofluorimeter von Kontron Instruments. Dargestellt ist die Fluoreszenz (F) in willkürlichen Einheiten in Abhängigkeit von der Wellenlänge ( $\lambda$ ). Folgende Parameter wurden benutzt: 1. Anregungsspektrum (durchgezogene Linie) EX 200–500 nm (BP 1 nm) / EM 380 nm (BP 10 nm), 2. Emissionsspektrum (gestrichelte Linie) EX 320 nm (BP 1 nm) / EM 320–500 nm (BP 10 nm).

Das Emissionsspektrum (s. Abb. 5.3) zeigte in einem Wellenlängenbereich von 320–500 nm ein Maximum bei  $\lambda_{emi} = 370$  nm. Bei einem Anregungsspektrum von einer Puffer- oder Wasserlösung wurde mit  $\lambda_{exc} = 320$  nm ein Maximum bei  $\lambda_{emi} = 360$  nm beobachtet, das die inelastische Streulichtemission (Raman-Effekt)

widerspiegelt. Um diese Störung auszuschließen, wurde bei den weiteren Messungen mit 2-Aminopurin-Ribonukleosiden eine Emissionswellenlänge von  $\lambda_{emi} = 380$  nm benutzt. Das Anregungsspektrum (s. Abb. 5.3) des 2AP lieferte in einem Bereich von 200–500 nm bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{emi} = 380$  nm neben denen aus dem Absorptionsspektrum bekannten Maxima bei  $\lambda = 244$  nm und  $\lambda = 304$  nm auch noch ein weiteres lokales Maximum bei  $\lambda = 380$  nm (*Rayleigh*-Effekt).

Bei den Fluoreszenztitrationen (s. Kap. 4.5) des 2-Aminopurin-Ribonukleosids wurde keine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der beiden Metallionen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  gefunden. Die Änderungen der relativen Fluoreszenzintensität (RF) — bezogen auf die Fluoreszenzintensität vor der ersten Zugabe der Titrierlösung — waren bis zu einer Metallionenkonzentration von 430 mM in beiden Fällen kleiner als 2 % und somit innerhalb der Meßgenauigkeit des Spektrofluorimeters. Allerdings wurde eine 6 %ige Zunahme des RF-Wertes beobachtet, wenn das 2-Aminopurin-Ribonukleosid vor der Titration der *Annealing*-Prozedur I. (s. Kap. 4.3) unterzogen wurde. Die Ursache für diese Änderung konnte nicht eindeutig geklärt werden.

In den im folgenden untersuchten, 2AP-substituierten Ribonukleinsäuren war die Fluoreszenzintensität aufgrund der Wechselwirkungen der Basenstrapelung deutlich niedriger und betrug 0.1 bis 17 % von der des „freien“ 2-Aminopurin-Ribonukleosids (s. Abb. 5.13).

### 5.1.1 Oligoribonukleinsäuren ohne Sekundärstruktur

Die beiden Oligoribonukleinsäuren OIi3 und OIi4 besitzen als Homomere sehr einfache Primärstrukturen (s. Tab. 3.2). Sowohl die Oligoriboadenylnsäure OIi3 als auch die Oligouridylnsäure OIi4 haben eine Kettenlänge von 12 nt. In der 5' → 3'-Richtung der Basensequenz ist in beiden Fällen die Position 8 durch ein 2-Aminopurin-Ribonukleosid ersetzt worden. Da beide Ribonukleinsäuren aufgrund ihrer Basensequenz eigentlich keine normalen inter- und intramolekularen Basenpaare ausbilden können, sollten diese RNAs ohne Sekundärstruktur als Referenz für die Erforschung des Fluoreszenzverhaltens des 2-Aminopurin-Ribonukleosids in Ribonukleinsäuren geeignet sein.

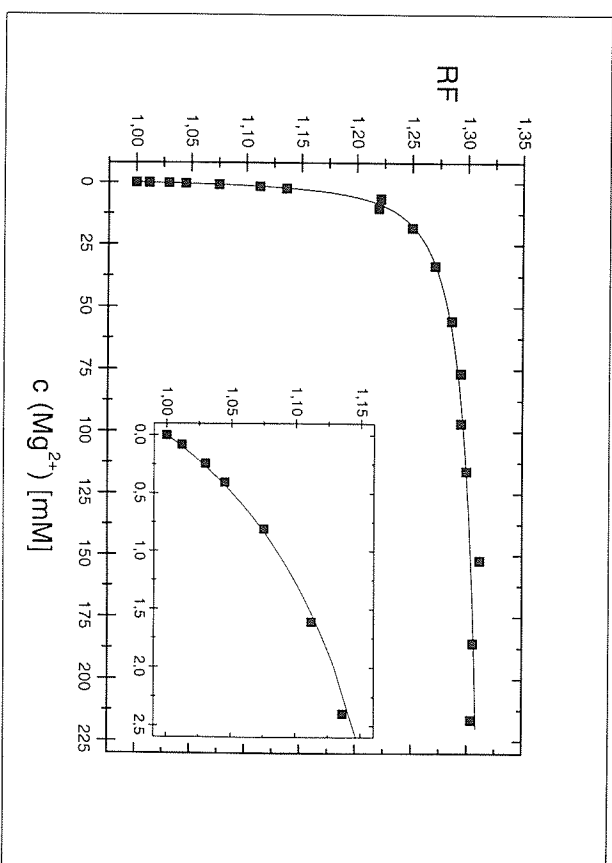


Abbildung 5.4: Fluoreszenztitration des OIi3 mit  $Mg^{2+}$ -Ionen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (RF) des OIi3 als Funktion der Magnesiumkonzentration ( $c(Mg^{2+})$ ) im TCN-Puffer bei  $20^\circ C$ , wobei die durchgezogene Linie die Anpassung an das Modell des einstufigen Bindungsprozesses repräsentiert. Bindungskonstante  $K_{Mg} = 350 M^{-1}$  und relative Quantenausbeute  $q = 1.30$ .

Bei den Fluoreszenztitrationen (s. Kap. 4.5) dieser Oligoribonukleinsäuren konnte eine unterschiedliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Metallionenkonzentration im TCN-Puffer entdeckt werden. Während beim OIi4 nur eine geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität (7 %) bei der Metallionenzugabe zu beobachten war, wurde beim OIi3 eine deutliche Zunahme von 26–30 % festgestellt (s. Abb. 5.4). Außerdem wurde bei den Fluoreszenztitrationen bis zu einer Metallionenkonzentration von 220 mM nur beim OIi3 ein Grenzwert für die relative Fluoreszenzintensität (ein ausreichendes Plateau) erreicht, so daß eine Anpassung der experimentellen Daten an das Reaktionsmodell A möglich war. Die einfachste Interpretation der experimentellen Daten wurde durch die Besetzung eines individuellen



RNA-Bindungsplatzes durch ein Metallion gemäß dem folgenden Reaktionsschema erreicht:



$$\rightleftharpoons K_{Me} = \frac{[\text{Komplex}]}{[\text{RNA (Platz)}] [\text{Me}^{2+}]} \quad (5.2)$$

mit  $K_{Me}$  = Bindungskonstante des Metalls  $\text{Me}^{2+}$

[j] = Gleichgewichtskonzentration einer entsprechenden Spezies i

Unter der Annahme, daß die Fluoreszenzintensität eine lineare Funktion des Bindungsgrades war, konnte die Anpassung der Meßdaten mit ausreichender Genauigkeit erfolgen. Dabei wurden für die Ribonukleinsäure OIi3 erstens die Komplex-Bindungskonstanten  $K_{Mg} = 350 \text{ M}^{-1}$  bzw.  $K_{Ca} = 320 \text{ M}^{-1}$  und zweitens die relativen Quantenausbeuten  $q = 1.30$  bzw.  $q = 1.26$  bestimmt (s. Tab. 5.1).

Tabelle 5.1: Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen der Oligoribonukleinsäuren OIi3 und OIi4 (Position des 2-Aminopurins in der RNA).

RNA (2AP Position)	$\text{Me}^{2+}$ - Ion	c( $\text{Me}^{2+}$ ) [mM]	Puffer	$\Delta\text{RF}$ [%]	$K_{Me}$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	$q$
OIi3 (2AP8)	Mg Ca	220 220	TCN TCN	+(30±2) +(26±2)	350±100 320±100	1.30±0.02 1.26±0.02
OIi4 (2AP8)	Mg Ca	220 220	TCN TCN	+(7±2) +(7±2)	- -	- -

Die Fluoreszenzintensität vor der Metallionenzugabe betrug beim OIi3 ca. 13 % und beim OIi4 nur ca. 2 % von der des „freien“ 2-Aminopurin-Ribonukleosids. Die Fluoreszenzlösung um den Faktor 8 bzw. 50 scheint schon durch die Basenstapelung eines Einzelstranges erreicht zu werden, wobei beim OIi4 das 2-Aminopurin im Einzelstrang anscheinend viel stärker — in welcher Form auch immer — gestapelt ist (s. Abb. 5.13).

### 5.1.2 Oligoribonukleinsäuren mit Sekundärstruktur

Die Oligoribonukleinsäuren OIi1 und OIi2 sollten ursprünglich als Referenzsubstanzen verwendet werden. Vor allem bei den noch folgenden Kinetikuntersuchungen zeigte sich jedoch, daß sie internmolekularen Wechselwirkungen unterliegen und somit eine ausgeprägte Sekundärstruktur besitzen.

Beide Oligoribonukleinsäuren der Kettenlänge 12 nt haben eine heterogene Basensequenz und in ihrer Primärstruktur (s. Tab. 3.2) über kurze Sequenzbereiche eine auffallende Sequenzanalogie zu dem *Hammerhead*-Ribozym HHI, wobei die Basen-Übereinstimmungen vor allem im Bereich der konservativen Nucleotide des Substrat-*Hammerhead*-Ribozyms zu finden sind. Konkret stimmen die Basensequenzen in 5' → 3'-Richtung einerseits beim OIi1 in Position 4 bis 9 und andererseits beim OIi2 in Position 4 bis 8 mit der des HHI in Position 41 bis 46 bzw. 45 mit der Einschränkung dertat überein, daß das 2'-Deoxyrytidin (dC) im HHI durch ein Cytidin (C) ersetzt worden ist.

Bei den Fluoreszenztitrationen (s. Kap. 4.5) dieser RNA-Moleküle konnte eine gegenläufige Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration im TCN-Puffer beobachtet werden. Während beim OIi1 eine leichte Abnahme der Fluoreszenzintensität (5–8 %) bei der Metallionenzugabe festzustellen war, wurde beim OIi2 eine deutliche Zunahme von über 50 % entdeckt (s. Tab. 5.2).

Tabelle 5.2: Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen und  $T_M$ -Werte der Oligoribonukleinsäuren OIi1 und OIi2 (Position des 2-Aminopurins in der RNA).

RNA (2AP Position)	$\text{Me}^{2+}$ - Ion	c( $\text{Me}^{2+}$ ) [mM]	Puffer	$\Delta\text{RF}$ [%]	$T_M$ [°C]
OIi1 (2AP8)	Mg Ca	220 220	TCN TCN	-(5±2) -(8±2)	- -
dsOIi1	Mg	220	TCN	-	66±1
OIi2 (2AP8)	Mg Ca	220 220	TCN TCN	+(53±2) +(56±2)	- -
dsOIi2	Mg	220	TCN	+(31±2)	40±1

Um das Fluoreszenzverhalten des 2AP auch in einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zu charakterisieren, wurden äquimolare Mengen von OH1 bzw. OH2 mit dem jeweiligen Komplementärstrang OH1Compl. bzw. OH2Compl. im TCN-Puffer zur Ausbildung von doppelsträngigen Oligoribonukleinsäuren (dsOH1 bzw. dsOH2) der *Annealing*-Prozedur II. (s. Kap. 4.3) unterworfen und anschließend eine Fluoreszenztitration (s. Kap. 4.5) mit  $Mg^{2+}$ -Ionen durchgeführt. Dabei wurde beim dsOH1 innerhalb der Meßgenauigkeit des Spektrofluorimeters keine Fluoreszenzintensitätsänderung erreicht, wohingegen beim dsOH2 eine ca. 30 %ige Zunahme beobachtet wurde (s. Tab. 5.2).

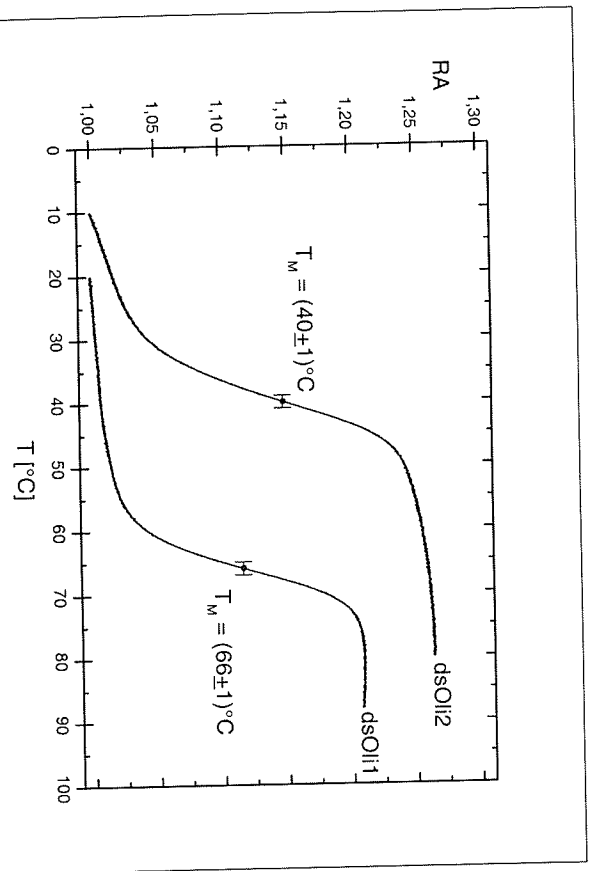


Abbildung 5.5: Schmelzkurven von jeweils  $2.2 \mu M$  der doppelsträngigen Oligoribonukleinsäuren dsOH1 und dsOH2. Nach der *Annealing*-Prozedur II. wurde die Temperatur im TCN-Puffer kontinuierlich mit einer Rate von  $0.1^\circ C/min$  erhöht. Dargestellt ist die relative Absorption (RA) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  in Abhängigkeit von der Temperatur ( $T$ ).

Zum Nachweis einer Doppelstrangbildung wurden jeweils die vier einzelnen Ribonukleinsäuren und die kombinierten Mischungen nach der *Annealing*-Prozedur II. (s. Kap. 4.3) einer Schmelzkurvenanalyse (s. Kap. 4.4) unterzogen, wobei nur im Falle der kombinierten Mischungen eine kooperative Änderung der Absorption entdeckt und somit ein doppelhelikaler Bereich eindeutig nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 5.5). Der Schmelzpunkt des Doppelstranges aus dem RNA-Paar OH1 und OH1Compl. lag aufgrund des höheren Anteils an GC-Basenpaaren (7 gegenüber 4 beim dsOH2) erwartungsgemäß über  $25^\circ C$  höher. Die Zunahme der Absorption (Hyperchromie-Effekt) beim Schmelzen lag bei beiden RNA-Paaren in der gleichen Größenordnung. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  wurde eine 20–25 %ige Zunahme der relativen Absorption (RA) — relativ zu der Absorption zu Beginn der Schmelzkurve — festgestellt.

Die Fluoreszenzintensität vor Metallionenzugabe betrug bei den Einzelsträngen OH1 und OH2 ca. 2 % bzw. bei den Doppelhelices dsOH1 und dsOH2 nur noch 0.1 bis 0.5 % von der des „freien“ 2-Aminopurin-Ribonukleosids. In beiden Fällen kann die Fluoreszenzlöschung durch eine erhöhte Wechselwirkung der Basenstapelung erklärt werden. Die Fluoreszenzintensität wird in der Doppelhelix um eine weitere Zehnerpotenz (Faktor 200–1000 im Vergleich zum „freien“ 2AP) reduziert (s. Abb. 5.13).

### 5.1.3 Die *Haarpin*-Ribonukleinsäuren

Die Oligoribonukleinsäuren HP1 und HP2 der Kettenlänge 15 nt haben in ihrer Primär- und Sekundärstruktur viele Analogien zu dem *Hammerhead*-Ribozym. Die Sekundärstruktur von HP1 und HP2 (s. Abb. 5.6) wurde mit Hilfe eines theoretischen Simulationsprogrammes [65, 80, 175] analysiert.

Dabei ergab sich für beide Ribonukleinsäuren eine Haarnadel(*Haarpin*)-Struktur durch die Ausbildung eines antiparallelen Doppelstranges (s. Kap. 2.1.2). Der Stamm besteht aus insgesamt vier Basenpaaren, einem  $GU$ - und drei stabilen  $GC$ -Basenpaaren. Die *Tetraloops* G(2AP)AA beim HP1 und GAT(2AP)A beim HP2 gehören zur Familie der GNRA-Schleifen (s. Kap. 2.1.2). Diese Haarnadel-Struktur wird in der Sekundärstruktur der Helix II und III. des *Hammerhead*-Ribozyms wiedergefunden, wobei jedoch im *Hammerhead*-Ribozym anstatt des GAAA-*Tetraloops* ein GCAA-

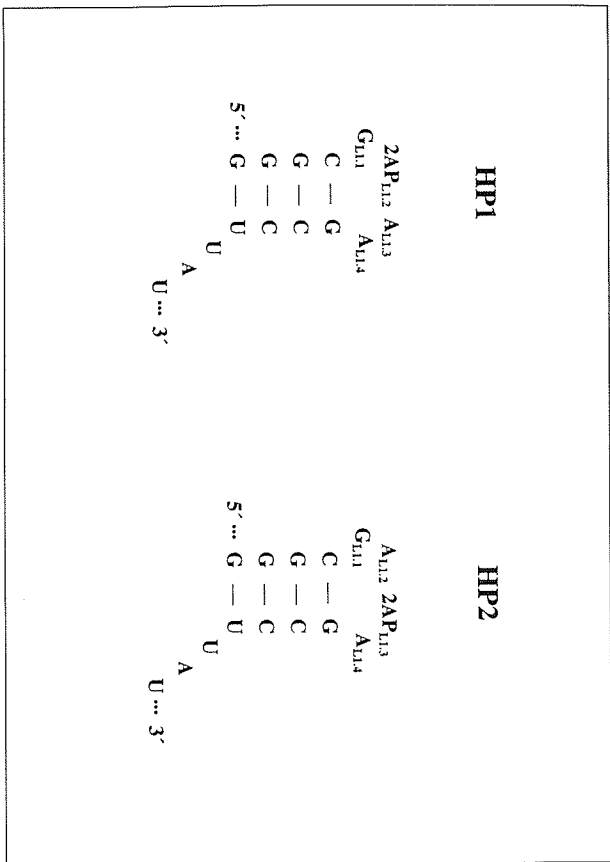


Abbildung 5.6: Sekundärstruktur der Hairpins HP1 und HP2.

Tetraloop und anstelle des GU ein UA-Basenspaar vorliegt. Trotz der großen strukturellen Analogien wird beim Vergleich der Primärstrukturen in 5' → 3'-Richtung nur in 7 von 15 möglichen Positionen eine Übereinstimmung gefunden (s. Tab. 3.2).

Bei den Fluoreszenztitrationsen (s. Kap. 4.5) in TCN- und T-Puffer wurden trotz der vielen Übereinstimmungen in den Primär- und Sekundärstrukturen der *Hairpins* HP1 und HP2 große Unterschiede festgestellt. Dies zeigt die hohe Sensibilität der Fluoreszenzintensität des 2-Aminopurin-Ribonukleosids in verschiedenen räumlichen Umgebungen. Während bei der *Hairpin*-Ribonukleinsäure HP2 mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen (s. Abb. 5.7) eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um ca. 10 % beobachtet wurde, konnte beim HP1 mit Mg<sup>2+</sup>-Ionen (s. Abb. 5.8) eine 40–50 %ige Zunahme festgestellt werden. Die aus einer Titration erhaltenen experimentellen Daten konnten nicht mit ausreichender Genauigkeit an das einfache Reaktionsmodell A (s. Seite 70)

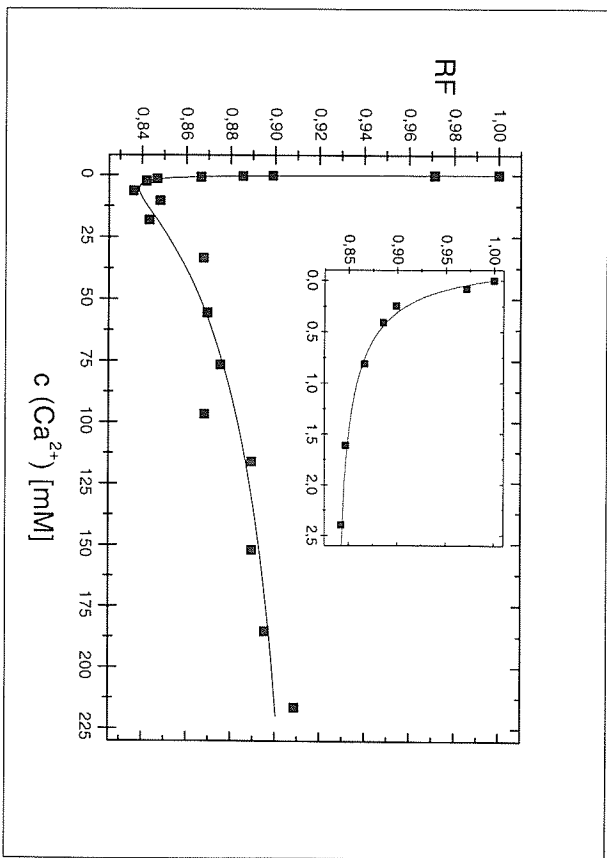


Abbildung 5.7: Fluoreszenztitration des HP2 mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (RF) des HP2 als Funktion der Calciumkonzentration ( $c(\text{Ca}^{2+})$ ) in T-Puffer bei 20°C, wobei die durchgezogene Linie die Anpassung an das Modell des zweistufigen Bindungsprozesses repräsentiert. Bindungskonstanten  $K1_{\text{Ca}} = 4340 \text{ M}^{-1}$  und  $K2_{\text{Ca}} = 14 \text{ M}^{-1}$ , relative Quantenausbeuten  $q1 = 0,82$  und  $q2 = 1,15$ .

angepaßt werden. Mit Hilfe des komplexeren Reaktionsmodells B mit zwei voneinander unabhängigen Bindungsplätzen für die Metallionen wurden schließlich auch diese Meßdaten analysiert. Die Besetzung der beiden Bindungsplätze durch Metallionen verlief dabei gleichzeitig und unabhängig voneinander gemäß folgendem Reaktionsschema:



mit

$$K1_{\text{Me}} = \frac{[\text{Komplex 1}]}{[\text{RNA (Platz 1)}] [\text{Me}^{2+}]} \quad (5.5)$$

$$K_{2Me} = \frac{[\text{Komplex 2}]}{[\text{RNA (Platz 2)}] [\text{Me}^{2+}]} \quad (5.6)$$

mit  $K_{1Me}$  = Bindungskonstante 1 des Metalls  $\text{Me}^{2+}$

$K_{2Me}$  = Bindungskonstante 2 des Metalls  $\text{Me}^{2+}$

[j] = Gleichgewichtskonzentration einer entsprechenden Spezies i

Voraussetzung dafür war, daß sich die Änderung der Fluoreszenzintensität additiv aus der Besetzung der beiden Bindungsplätze zusammensetzt und der Grad der Fluoreszenzlöschung einer Bindungsstelle unabhängig war, also nicht von der anderen beeinflußt wurde.

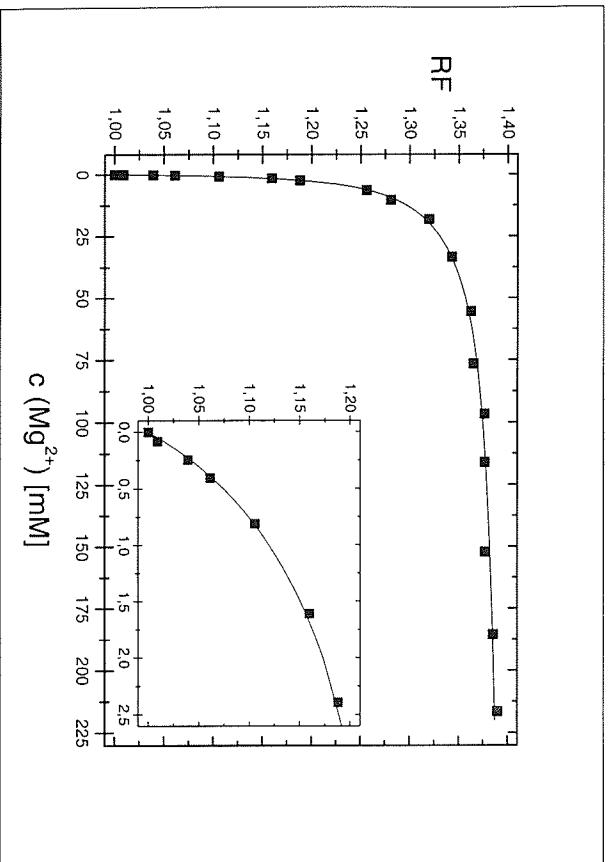


Abbildung 5.8: Fluoreszenztitration des HP1 mit  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (RF) des HP1 als Funktion der Magnesiumkonzentration ( $c(\text{Mg}^{2+})$ ) im TCN-Puffer bei  $20^\circ\text{C}$ , wobei die durchgezogene Linie die Anpassung an das Modell des zweistufigen Bindungsprozesses repräsentiert: Bindungskonstanten  $K_{1\text{Mg}} = 674 \text{ M}^{-1}$  und  $K_{2\text{Mg}} = 48 \text{ M}^{-1}$ , relative Quantenausbeuten  $q_1 = 1.29$  und  $q_2 = 1.07$ .

Aus den Fluoreszenztitrationen mit  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurden folgende Parameter bestimmt. Während die erste Bindungskonstante des Komplexes 1 ( $K_1$ ) für beide Metallionen im Bereich von 660 bis  $4770 \text{ M}^{-1}$  lag, wurde die zweite Bindungskonstante des Komplexes 2 ( $K_2$ ) in einem Bereich von 14 bis  $97 \text{ M}^{-1}$  gefunden. Beide relativen Quantenausbeuten ( $q_1$  und  $q_2$ ) lagen zwischen 0.77 und 1.35, wobei die Werte für  $q_2$  immer größer als eins waren. Die erste Bindungskonstante ( $K_1$ ) für beide HPs war im TCN-Puffer nicht nur bei den Titrationen mit  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen, sondern auch bei denen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ungefähr doppelt so groß wie beim Oli3. Im T-Puffer waren die Werte für  $K_1$  bei beiden *Haarpins* um den Faktor 3-6 größer als im TCN-Puffer. Die Hauptursache für diesen Effekt kann sicherlich durch die unterschiedlichen Ionenstärken der Puffer (T-Puffer:  $\text{I} = 63 \text{ mM}$ , TCN-Puffer:  $\text{I} = 145 \text{ mM}$ ) erklärt werden. Die Parameter der beiden Metallionen im jeweiligen Puffer sind innerhalb der Fehlergrenzen gleich. Die genauen Parameter der Magnesium- und Calcium-Bindungsgleichgewichte sind in Tabelle 5.3 wiedergegeben.

Tabelle 5.3: Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen der Hairpin-Ribonukleinsäuren HP1 und HP2 (Position des 2-Aminopurins in der RNA) bis zu einer Metallionenkonzentration von  $220 \text{ mM}$ .

RNA (2AP)	$\text{Me}^{2+}$ - Ion	Puffer	$\Delta\text{RF}$ [%]	$K_{1\text{Me}}$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	$K_{2\text{Me}}$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	$q_1$	$q_2$
HP1 (L1.2)	Mg	TCN	$+(41 \pm 2)$	$820 \pm 160$	$40 \pm 8$	$1.29 \pm 0.01$	$1.08 \pm 0.01$
	Ca	TCN	$+(41 \pm 2)$	$660 \pm 150$	$26 \pm 15$	$1.31 \pm 0.01$	$1.07 \pm 0.01$
HP2 (L1.3)	Mg	T	$+(51 \pm 3)$	$2460 \pm 100$	$83 \pm 34$	$1.35 \pm 0.02$	$1.09 \pm 0.01$
	Ca	T	$+(48 \pm 2)$	$2570 \pm 100$	$97 \pm 30$	$1.32 \pm 0.02$	$1.09 \pm 0.01$
HP2 (L1.3)	Mg	TCN	$-(10 \pm 3)$	$690 \pm 380$	$53 \pm 40$	$0.79 \pm 0.09$	$1.26 \pm 0.18$
	Ca	TCN	$-(11 \pm 1)$	$810 \pm 370$	$36 \pm 53$	$0.79 \pm 0.11$	$1.23 \pm 0.29$
HP2 (L1.3)	Mg	T	$-(20 \pm 5)$	$4770 \pm 200$	$49 \pm 40$	$0.77 \pm 0.02$	$1.06 \pm 0.02$
	Ca	T	$-(9 \pm 3)$	$4340 \pm 200$	$14 \pm 35$	$0.82 \pm 0.02$	$1.15 \pm 0.02$

Ein sehr deutlicher Unterschied konnte beim Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der beiden *Hairpins* vor der Metallionenzugabe beobachtet werden (s. Tab. 5.13). Während beim HP2 in beiden Puffern nur ca. 2 % von der Fluoreszenzintensität des „freien“ 2-Aminopurin-Ribonukleosids entdeckt wurde, wurden beim HP1 mit 13 % (T-Puffer) und 17 % (TCN-Puffer) die höchsten Prozentsätze von allen in dieser Arbeit mit der Base 2-Aminopurin versetzten RNA-Moleküle gefunden. Die „geringe“ Fluoreszenzlösung um den Faktor 6–8 beim HP1 scheint ein deutlicher Beweis dafür zu sein, daß die *Tetraloop*-Base an der Position L1.2 in der Schleife viel weniger einer Basenstapelung unterliegt als an der Position L1.3. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der Strukturaufklärungen dieser *Tetraloops* (s. Kap. 2.1.2). Die durch NMR-Messungen [62] und Röntgenstrukturanalyse [108] erhaltenen tertiären Strukturen von *Hairpins* mit GCAA bzw. GAAA-*Tetraloops* haben gezeigt, daß die Base an der Position 6 (L1.2) sowohl frei von Wasserstoffbrückenbindungen zu anderen Basen ist, als auch nur geringen Basenstapelungswirkungen unterliegt.

Durch Schmelzkurvenanalysen (s. Kap. 4.4) der Ribonukleinsäuren HP1 und HP2 sollte deren vermutete Sekundärstruktur erneut bestätigt werden. Da aufgrund der vier vorliegenden Basenpaarungen in der Helix ein hoher Schmelzpunkt ( $T_M$ ) zu erwarten war, wurde zur  $T_M$ -Erniedrigung als Analysenmedium neben dem TCN-Puffer auch der C-Puffer (s. Abb. 5.9) mit deutlich geringerer Ionenstärke von  $I = 843 \mu\text{M}$  bei pH 7.0 verwendet. Um eine Schmelzpunkterhöhung durch geringe Mengen von zweiwertigen Kationen vor allem im C-Puffer auszuschließen, wurden zu 1–10  $\mu\text{M}$  RNA-Lösungen bis zu 100  $\mu\text{M}$  des Komplexbildners EDTA hinzugegeben.

Tabelle 5.4: Schmelzpunkte ( $T_M$ ) der Ribonukleinsäuren HP1 und HP2 (Position des 2-Aminopurins in der RNA) in C- und TCN-Puffer.

RNA (2AP Position)	Puffer	$T_M$ [°C]
HP1	C	67±1
(2APL1.2)	TCN	86±6
HP2	C	65±1
(2APL1.3)	TCN	80±2

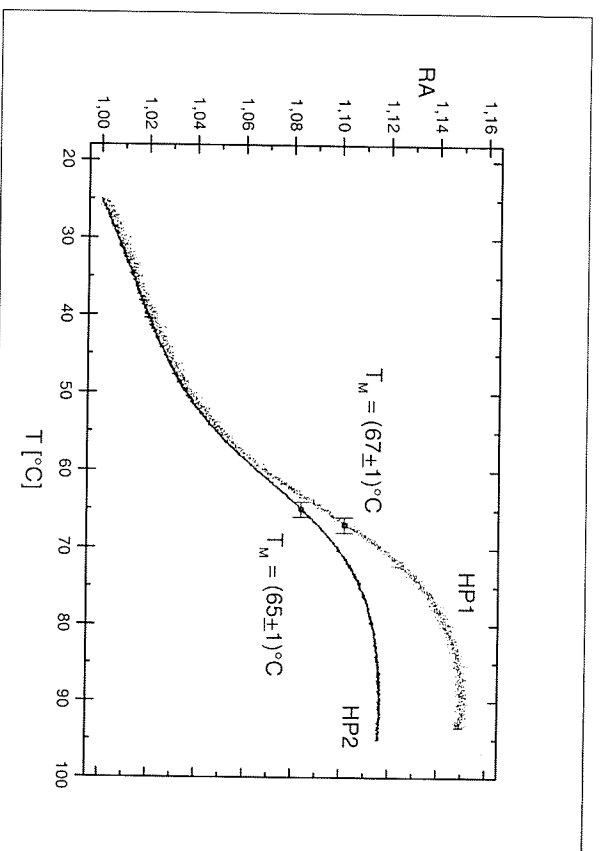


Abbildung 5.9: Schmelzkurven von ca. 2  $\mu\text{M}$  der Ribonukleinsäuren HP1 und HP2. Im C-Puffer wurde die Temperatur kontinuierlich mit einer Rate von  $0,1^\circ\text{C}/\text{min}$  erhöht. Dargestellt ist die relative Absorption (RA) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  in Abhängigkeit von der Temperatur ( $T$ ).

Bei einer kooperativen Änderung der Absorption von bis zu 15 % zeigt HP1 in beiden Puffern einen um die 5 % höheren Schmelzpunkt. Eine vollständige Aufstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 5.4 zu finden.

5.1.4 Die *Hammerhead*-Ribozyme

Die zur Charakterisierung der Bindungsgleichgewichte mit Metallionen verwendeten *Hammerhead*-Ribozyme sind ausschließlich cis-spaltende, d. h. intramolekular spaltende Ribozyme (s. Kap. 2.1.3). Alle fünf verwendeten Ribozyme besaßen eine Kettenlänge von 49 nt und wurden in ihrer Primärstruktur durch den Austausch von 1-2 Basen nur geringfügig verändert (s. Tab. 3.2). Durch den Einbau des Nucleosids 2'-Desoxy-2'-aminocytidin beim HH2 bzw. 2'-Desoxycytidin bei den anderen vier Varianten an der Position 17 konnte die Ribozymaktivität (Spaltungsreaktion) unterdrückt werden [31]. Die Base 2-Aminopurin wurde beim HHI, HH2 und HH5 in direkter Nachbarschaft zur Spaltstelle an der Position 1.1 substituiert, während sie beim HH3 an der einzigen variablen Kernposition [10], der Position 7, und beim HH4 im *Loop* III an der Position L3.3 eingebaut wurde. Während der Einbau der Base 2-Aminopurin beim HH4 Vergleiche mit den *Harpin*-Ribonucleinsäuren ermöglichte, wurde durch den Einbau der Base 2-Aminopurin an den anderen Positionen die Natur der Metallbindung im aktiven Zentrum des Ribozyms untersucht. Beim Ribozym HH5 wurde als weitere Modifikation an der Kernposition 14 ein Adenosin gegen ein Guanosin ersetzt, das die Spaltungsaktivität des Ribozyms drastisch reduziert [36]. Eine Zusammenfassung der Substitutionen und die Sekundärstruktur der *Hammerhead*-Ribozyme HHI-HH5 sind in der Abbildung 5.10 dargestellt, wobei die Nummerierung der Basenpositionen nach HERRTEL et al. [58] erfolgte.

Die hohe Empfindlichkeit der Fluoreszenzintensität des 2APs konnte auch bei den *Hammerhead*-Ribozymen bestätigt werden, denn bei den Fluoreszenztitrations (s. Kap. 4.5) mit den Metallionen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  wurden mit nur einer Ausnahme teilweise deutliche Fluoreszenzlöschungen nachgewiesen. Die Reduzierung der relativen Fluoreszenzintensität lag in einem Bereich von 0 bis 57 %, wobei das Fehlen einer sichtbaren Änderung der Fluoreszenzintensität bei  $Mg^{2+}$ -Zugabe zum HH4 in TCN-Puffer nicht die Abwesenheit von Metall-Bindungsplätzen impliziert. Im Gegensatz zu den vorherigen Titrationsexperimenten konnte bei allen Ribozymtypen, außer dem HH5, schon nach einer Zugabe von 120 mM des Metallsalzes ein Grenzwert für die relative Fluoreszenzintensität erreicht werden.

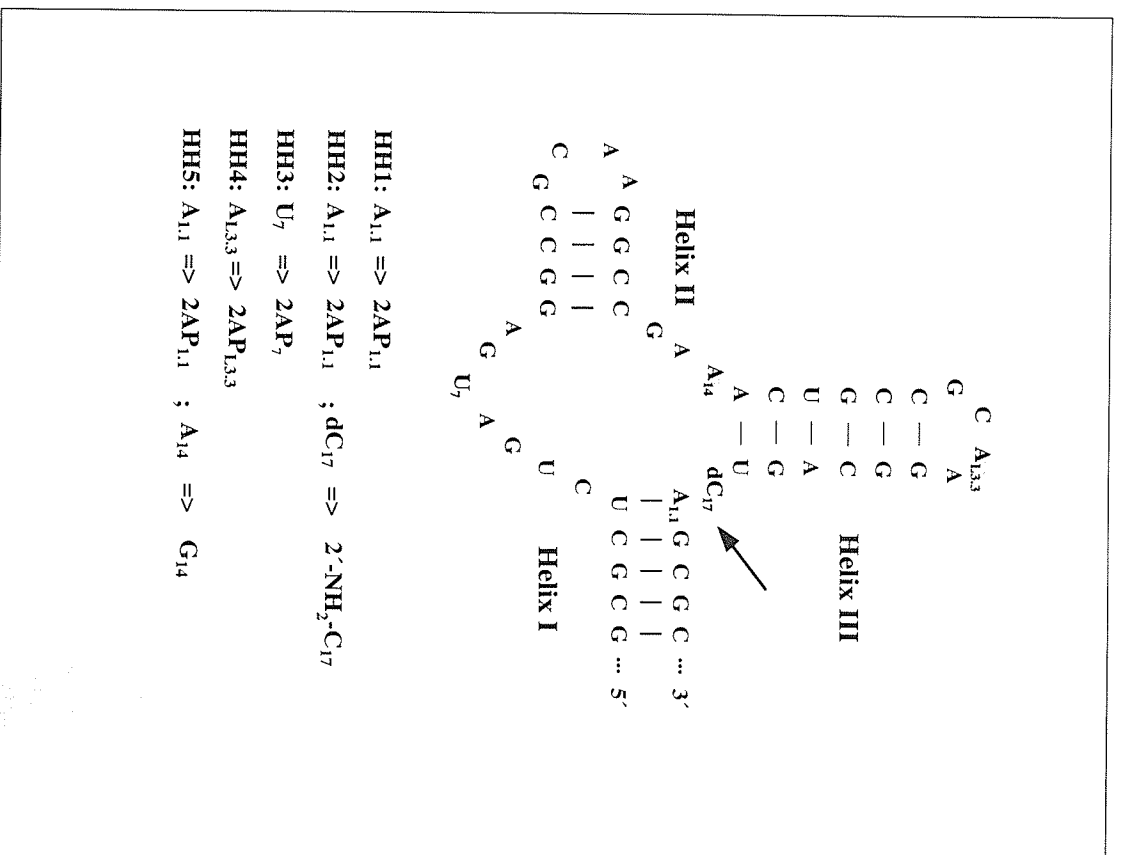


Abbildung 5.10: Sekundärstruktur der *Hammerhead*-Ribozyme HHI-HH5. Der Pfeil deutet auf die Spaltstelle, und die grau hinterlegten Basen zeigen die verwendeten Substitutionspositionen, wobei die Nummerierung nach HERRTEL et al. [58] erfolgte.

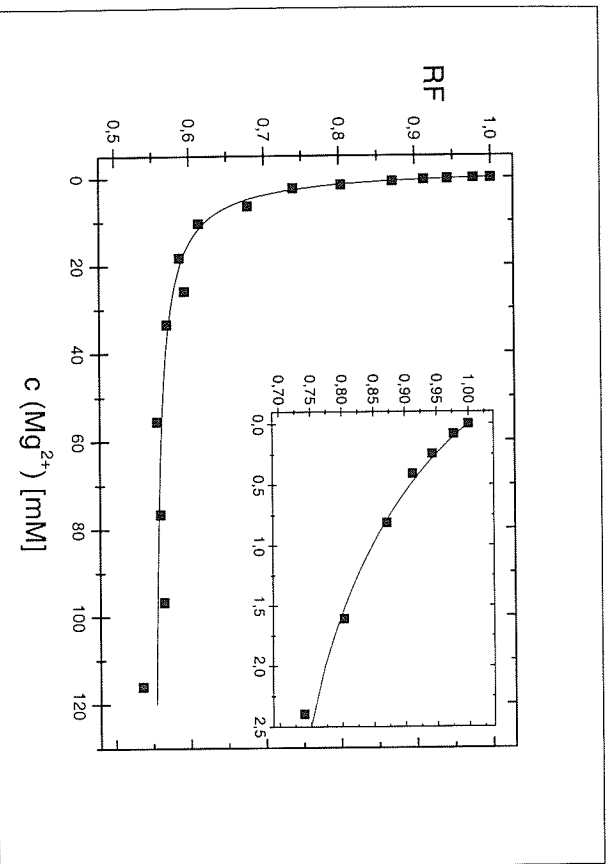


Abbildung 5.11: Fluoreszenztitration des HH2 mit  $Mg^{2+}$ -Ionen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (RF) des HH2 als Funktion der Magnesiumkonzentration ( $c(Mg^{2+})$ ) im TCN-Puffer bei  $20^\circ C$ , wobei die durchgezogene Linie die Anpassung an das Modell des einstufigen Bindungsprozesses repräsentiert: Bindungskonstante  $K_{Mg} = 510 M^{-1}$  und relative Quantenausbeute  $q = 0,55$ .

Die Meßdaten konnten an die entsprechenden Reaktionsmodelle A oder B (s. Seite 70 oder 75) mit ausreichender Genauigkeit angepaßt werden. Die Titrationsdaten mit den Metallionen wurden einerseits — im Falle des HH1, HH2, HH3 und teilweise des HH4 — durch die Besetzung eines individuellen Bindungsplatzes, und andererseits — beim HH5 und in einem Fall beim HH4 — durch die Besetzung von zwei voneinander unabhängigen Bindungsplätzen beschrieben. Die Bindungskonstanten für  $Mg^{2+}$ -Ionen lagen im Bereich von 510 bis  $7580 M^{-1}$ . Im T-Puffer (z. B. Abb. 5.12) waren diese Bindungskonstanten um den Faktor 2–3 größer als im TCN-Puffer (z. B. Abb. 5.11). Die zweite Bindungskonstante ( $K_2$ ) war 1–2 Zehnerpotenzen kleiner und lag im Bereich von 12 bis  $78 M^{-1}$ . Wie schon bei den anderen untersuchten Rib-

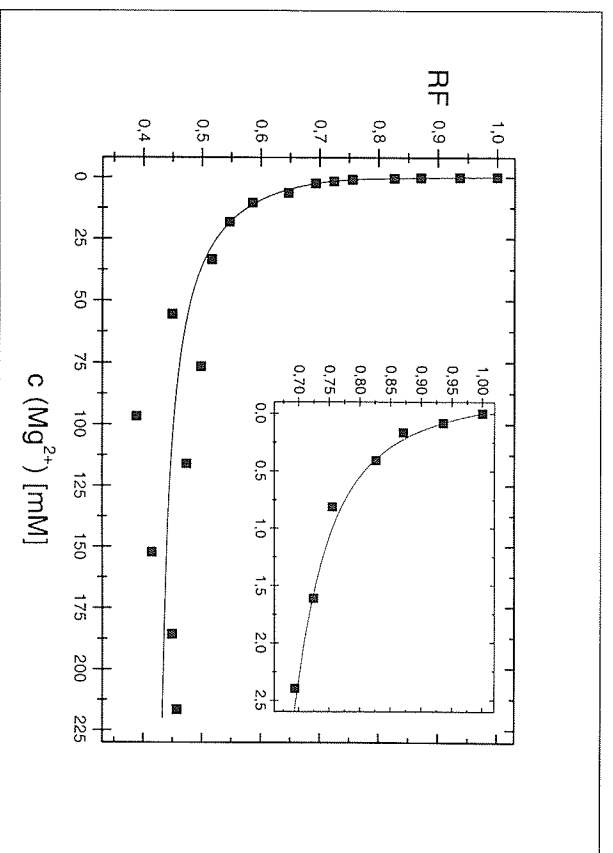


Abbildung 5.12: Fluoreszenztitration des HH5 mit  $Mg^{2+}$ -Ionen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (RF) des HH5 als Funktion der Magnesiumkonzentration ( $c(Mg^{2+})$ ) im T-Puffer bei  $20^\circ C$ , wobei die durchgezogene Linie die Anpassung an das Modell des zweistufigen Bindungsprozesses repräsentiert: Bindungskonstanten  $K_{1Mg} = 3280 M^{-1}$  und  $K_{2Mg} = 70 M^{-1}$ , relativen Quantenausbeuten  $q_1 = 0,71$  und  $q_2 = 0,50$ .

nukleinsäuren konnten für die Bindungskonstanten der  $Ca^{2+}$ -Ionen im TCN-Puffer kaum Unterschiede zu denen mit Magnesium festgestellt werden. Auffallend war in jedem Fall das HH4 mit dem 2-Aminopurin-Ribonukleosid im Loop III. Dort wurde im Gegensatz zu der mit  $Ca^{2+}$  bei den Fluoreszenztitrationen im TCN-Puffer mit  $Mg^{2+}$  keine Änderung der Fluoreszenzintensität entdeckt. Für die relativen Quantenausbeuten  $q$  wurden Werte im Bereich von 0,43 bis 1,07 bestimmt. In der Tabelle 5.5 sind die genauen Parameter der Magnesium- und Calcium-Bindungsgleichgewichte zusammengestellt.

Tabelle 5.5: Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen der Hammerhead-Ribozyme HH1-HH5 (Position des 2-Aminopurins in der RNA) bis zu einer Metallionenkonzentration von 120 mM (\*  $\Delta$  220 mM).

RNA (2AP)	Me <sup>2+</sup> -Ion	Puffer	$\Delta$ RF [%]	K <sub>1<sup>Me</sup></sub> [M <sup>-1</sup> ]	K <sub>2<sup>Me</sup></sub> [M <sup>-1</sup> ]	q <sub>1</sub>	q <sub>2</sub>
HH1 (1.1)	Mg	TCN	-(25±2)	1610±250	-	0.74±0.02	-
	Ca	TCN	-(8±3)	1010±190	-	0.91±0.03	-
HH2 (1.1)	Mg	T	-(34±7)	2930±170	-	0.66±0.07	-
	Mg	TCN	-(38±6)	510±10	-	0.60±0.05	-
HH3 (7)	Ca	TCN	-(37±2)	680±140	-	0.66±0.02	-
	Mg	T	-(53±1)	1420±130	-	0.48±0.01	-
HH4 (L3.3)	Mg	TCN	-(40±1)	970±10	-	0.59±0.01	-
	Ca	TCN	-(42±2)	900±50	-	0.59±0.01	-
HH5 (1.1)	Mg	T	-(49±2)	2640±30	-	0.51±0.02	-
	Mg	TCN	±3	-	-	1.00±0.03	-
HH5 (1.1)	Ca	TCN	-(10±1)	440±110	-	0.90±0.01	-
	Mg	T	-(13±2)	7580±110	12±6	0.85±0.01	1.07±0.03
HH5 (1.1)	Mg*	TCN	-(57±2)	1270±90	22±6	0.72±0.03	0.43±0.06
	Mg*	T	-(53±1)	3060±220	72±2	0.74±0.03	0.49±0.01

Abschließend konnte beim Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten der fünf Hammerhead-Ribozyme mit der des „freien“ 2-Aminopurin-Ribonukleosids vor der Metallionenzugabe die aufgrund der Strukturkomplexität der HH-Moleküle zu erwartende, deutliche Reduzierung beobachtet werden. Die Fluoreszenzlösung um den Faktor 29-125 zeigte, daß das 2AP an den gewählten Positionen innerhalb der jeweiligen RNA-Struktur einer recht starken Basenstapelung (*Stacking*) unterliegt. Beim HH1, HH2 und HH5, bei denen das 2AP an der Spaltstelle (Position 1.1) positioniert ist, betrug die relative Fluoreszenzintensität nur 0.8 bis 1.7 % von der des „freien“ 2AP. Diese deutliche Reduzierung ist bei Betrachtung der Ribozym-Sekundärstruktur leicht erklärbar, denn die Position 1.1 besitzt eine Basenpaarung

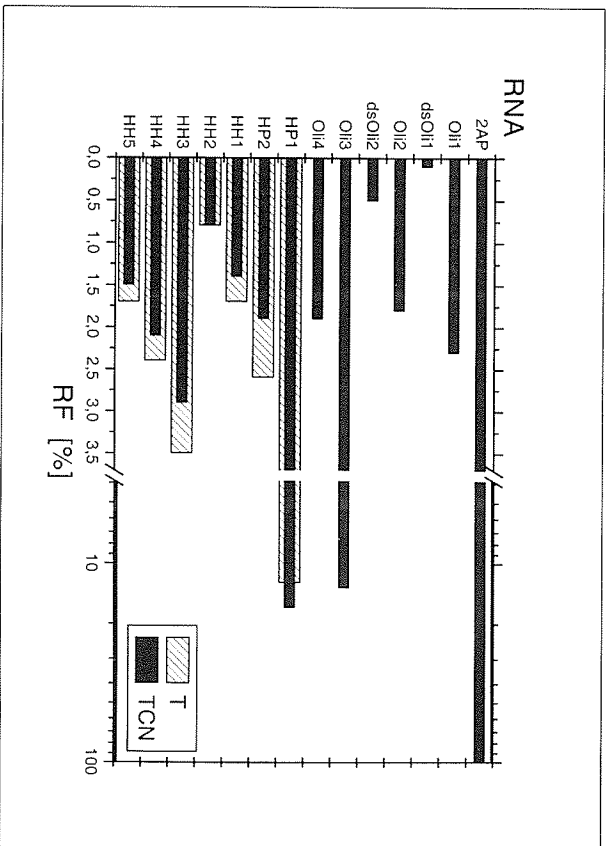


Abbildung 5.13: Fluoreszenzintensität der Ribonukleinsäuren in T- und TCN-Puffer vor der Metallionenzugabe. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (RF), bezogen auf die des „freien“ 2-Aminopurin-Ribonukleosids (2AP) in Prozent [%], von allen mit 2AP-substituierten RNA-Molekülen.

mit der Position 2.1 am Rand der Helix I. Der Wert für das HH4 lag mit ca. 2.2 % in der gleichen Größenordnung wie beim *Hairpin* HP2; dies ist damit zu erklären, daß in beiden RNA-Molekülen das 2AP an der Position 3 eines GNRA-*Tetraloops* substituiert worden ist. Die geringste Fluoreszenzlösung wurde beim HH3 mit dem 2AP an der Kernposition 7 festgestellt, wobei die relative Fluoreszenzintensität noch 2.9 % (TCN-Puffer) bzw. 3.5 % (T-Puffer) von der des „freien“ 2AP betrug. Mit Ausnahme des HH2 war bei allen anderen HH-Typen die Fluoreszenzlösung im TCN-Puffer durchschnittlich um den Faktor 1.15 größer als im T-Puffer. In der Abbildung 5.13 ist die relative Fluoreszenzintensität (RF), bezogen auf die des „freien“ 2-Aminopurin-Ribonukleosids (2AP) in Prozent [%], von allen mit 2AP-substituierten RNA-Molekülen noch einmal zusammenfassend graphisch dargestellt.



## 5.2 Kinetik der Bindungsgleichgewichte

### 5.2.1 Allgemeines zu den Temperatursprung-Meßdaten

Die von einem Temperatursprung erhaltenen Daten eines Meßsignals beinhalten neben den chemischen und physikalischen Prozessen des untersuchten Systems auch externe physikalische Parameter der Meßapparatur, wie die Aufheizzeit ( $\tau_d$ ) der Elektrolyse in der Zelle und der Anstiegszeit ( $\tau_r$ ) des Detektionssystems. Die physikalischen Effekte eines Systems, wie z. B. die Rotationsdiffusion, sind meist viel schneller als die durch die Änderung der äußeren Parameter induzierten „chemischen“ Prozesse. Ein „chemischer“ Prozeß kann eine Reaktion wie z. B. ein Protonentransfer oder auch eine Konformationsumwandlung eines Moleküls sein. Zu den externen physikalischen Prozessen zählen aufgrund der temperaturabhängigen Volumenexpansion des Lösungsmittels Konzentrationsänderungen. Ein weiterer physikalischer Effekt kann durch die meist geringe Temperaturabhängigkeit eines Extinktionskoeffizienten entstehen. Die Zeitkonstante der Kondensatorentladung zeigt eine starke, genau bekannte Abhängigkeit von der Ionenstärke, so daß durch Variation der Ionenstärke eine Unterscheidung von den chemischen Prozessen möglich ist.

Die untere zeitliche Nachweilgrenze einer Temperatursprung-Apparatur wird durch die Aufheizzeit  $\tau_d$  (s. Gleichung 2.10) und die experimentell bestimmbare Anstiegszeit  $\tau_r$  des spektrometrischen Detektionssystems bestimmt. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen (s. Kap. 4.6.2) lag  $\tau_d$  zwischen 0.6-9.0  $\mu$ s, wobei der Widerstand der Meßlösung und somit auch  $\tau_d$  mit zunehmender Metallionenkonzentration deutlich kleiner wurde. Bei einem Temperatursprung durch eine Kondensatorentladung ist die Anstiegszeit gegenüber der wesentlich größeren Aufheizzeit vernachlässigbar. Wenn die Relaxationszeit eines Systems im selben Zeitbereich wie die Aufheizzeit liegt, kann das durch die Konvolution beider Komponenten entstehende Signal  $x(t)$  durch folgende Gleichung beschrieben werden [11]:

$$x(t) = x_\infty \left[ 1 + \frac{\tau_d}{\tau - \tau_d} \exp\left(-\frac{t}{\tau_d}\right) - \frac{\tau}{\tau - \tau_d} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \quad (5.7)$$

mit  $x_\infty$  = Signal bei  $t = \infty$

$\tau$  = Relaxationszeit des Systems

### 5.2. KINETIK DER BINDUNGSGLEICHGEWICHTE

Unter Verwendung eines Referenzsystems ohne Relaxationseffekt kann eine Dekonvolution erreicht werden.

Die praktische Anwendung der zeitlichen Untergrenze und die Genauigkeit, mit welcher ein Relaxationseffekt beobachtet werden kann, werden letztendlich durch das Signal/Rausch(S/N)-Verhältnis bestimmt. In elektrischen Schaltungen können eine Vielzahl von elektrischen Schwankungserscheinungen auftreten. Diese machen sich als sog. elektronische Rauschen bemerkbar und bestehen im wesentlichen aufgrund der *Brownischen* Bewegung der Elektronen aus dem thermischen Rauschen (*thermal noise*) und dem Schrottrauschen (*shot noise*), das infolge von Stromschwankungen, wie z. B. bei der durchgehenden Hintergrundbeleuchtung einer Photomultiplierkathode, entsteht. Ihre Effektivwerte (quadratische Mittelwerte) [154] lauten wie folgt:

$$E_{rN} = (4RkT\Delta f)^{1/2} \quad \text{und} \quad E_{sN} = (2qIR^2\Delta f)^{1/2} \quad (5.8)$$

mit  $R$  = Ohmscher Widerstand in  $\Omega$  ,  $k$  = Boltzman-Konstante

$T$  = Temperatur in K ,  $q$  = Ladung des Elektron in C

$I$  = Stromstärke in A ,  $\Delta f$  = Frequenzbandbreite in Hz

Die Frequenzbandbreite  $\Delta f$  einer Detektionsschaltung entspricht der reziproken Anstiegszeit  $1/\tau_r$  des Detektionssystems. Das S/N-Verhältnis ist proportional zu der quadratischen Wurzel des Produkts aus der Anstiegszeit und der detektierten Lichtintensität ( $I$ ) [117]:

$$\frac{S}{N} = \text{const} (I\tau_r)^{1/2} \quad (5.9)$$

Zusammenfassend ist zu sagen, daß ein Relaxationseffekt im kurzen Zeitbereich, also mit einer Zeitkonstante im Bereich der Aufheizzeit und Anstiegszeit, deshalb sehr kritisch betrachtet werden muß, weil es sich dabei leicht um einen durch äußere Parameter verursachten Effekt und nicht um einen gesuchten, chemischen Relaxationseffekt handeln kann. Im längeren Zeitbereich (ms-s) können z. B. Störungen im Form von Intensitätsschwankungen der Lichtquelle auftreten. Außerdem ist hier schon die beginnende Abkühlung nach einem Temperatursprung zu berücksichtigen.

## 5.2.2 Tryptophan als Referenzsystem für die Dekonvolution

Die Aminosäure Tryptophan (Trp -  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -indolylpropionsäure) wurde bei den Kinetikuntersuchungen als Referenz für die Dekonvolution von Temperatur sprungmessungen mit 2AP bzw. 2AP-substituierten Ribonukleinsäuren benutzt.

Die neutrale Aminosäure ist durch den an einer Methylengruppe gebundenen Indoring in der aromatischen Seitenkette stark hydrophob. Das Absorptionsspektrum dieser essentiellen Aminosäure ist komplex, denn es besitzt im Bereich von 240–290 nm mindestens drei Elektronenübergänge [19b], wobei im Gegensatz zur aromatischen Aminosäure Tyrosin das Absorptionsspektrum nur eine geringe pH-Abhängigkeit besitzt [153]. In Wasser wurde ein Absorptionsmaximum bei pH 7 und bei  $\lambda = 280$  nm mit einem Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{280} = 5,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt. Im Emissionsspektrum des Tryptophans wurde unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{exc} = 280$  nm ein Maximum bei  $\lambda = 348$  nm mit einer Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau_F = 2,6$  ns und einer Fluoreszenz-Quantenausbeute von  $\Phi_F = 0,2$  gefunden [19b].

Als Referenz für die Dekonvolution war das Tryptophan gut geeignet, weil bei den Temperatursprung-Messungen (s. Kap. 4.6.2) mit Trp bei einer Temperatur von 5–11°C neben einem physikalischen kein chemischer Relaxationseffekt entdeckt wurde. Dieser Befund änderte sich auch nicht nach Zugabe von bis zu 100 mM  $\text{Mg}^{2+}$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Der physikalische Relaxationseffekt besaß eine große Amplitude, so daß das Signal/Rausch(S/N)-Verhältnis sehr groß war.

### 5.2.3 Kinetik des 2-Aminopurin-Ribonukleosids

Bei den Temperatursprung-Messungen (s. Kap. 4.6.2) mit dem 2-Aminopurin-Ribonukleosid wurde kein chemischer Relaxationseffekt gefunden. Dieser Befund ergab sich sowohl in Fluoreszenz als auch in Absorption bei einer 2AP-Konzentration von ca. 10 bzw. 180  $\mu\text{M}$ . Kleinere Schwankungen bei den Amplituden (ca. 2–3 % der Gesamtamplitude) lagen im Bereich der Rauschamplitude. Nach der Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen war noch immer nur ein physikalischer Relaxationseffekt zu beobachten. Die recht großen Fluoreszenzamplituden konnten beim 2AP — ebenso wie beim Tryptophan — schon bei geringer Verstärkung der Photo-

multiplier beobachtet werden. Je geringer die Verstärkung an den Photomultiplier gewählt werden konnte, desto größer wurde dadurch auch das S/N-Verhältnis. Da das 2-Aminopurin-Ribonukleosid selbst keine chemischen Relaxationseffekte in dem beobachteten Zeitbereich zeigte, war es somit für die weiteren Kinetikuntersuchungen in 2AP-substituierten Ribonukleinsäuren geeignet.

### 5.2.4 Kinetik der Oligoriboadenylsäure (Oli3)

#### 5.2.4.1 Kinetik der Oligoriboadenylsäure in Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen

In Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen konnte bei der Oligoriboadenylsäure (Oli3) kein Relaxationseffekt mit einer Zeitkonstante größer als ca. 4  $\mu\text{s}$  entdeckt werden. Mögliche Relaxationseffekte aufgrund von Wechselwirkungen der Basenstapelung müssen schneller als die Zeitauflösung der verwendeten Temperatursprung-Apparatur sein. Das 2AP-substituierte Oli3 bildet eine einzelsträngige Helixstruktur mit einem relativ hohem Anteil an gestapelten Basen. Da das durch Messung der Fluoreszenz des 2APs erhaltene Temperatursprung-Signal keinen langsamen Effekt zeigt, kann geschlossen werden, daß die Stapelungsreaktion von 2AP in einzelsträngigen Helices mit einer Zeitkonstante von weniger als 4  $\mu\text{s}$  erfolgt. Dieses Ergebnis belegt, daß 2AP als Indikator genügend schnell Veränderungen der Basenstapelung anzeigt. Diese RNA ohne Sekundärstruktur eignet sich somit als Referenzsystem für die weiteren kinetischen Untersuchungen.

#### 5.2.4.2 $\text{Mg}^{2+}$ -Ion Inner-Sphere-Komplex in der 2AP-substituierten Oligoriboadenylsäure

Das in Kapitel 5.1.1 untersuchte Bindungsgleichgewicht zwischen der 2AP-substituierten Oligoriboadenylsäure Oli3 und den beiden Metallionen Magnesium und Calcium wurde durch Kinetikuntersuchungen weiter charakterisiert. Bei den Temperatursprung-Experimenten (s. Kap. 4.6.2) konnte vor der Metallionenzugabe und nach der Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kein Relaxationseffekt gefunden werden. Nach der Zugabe

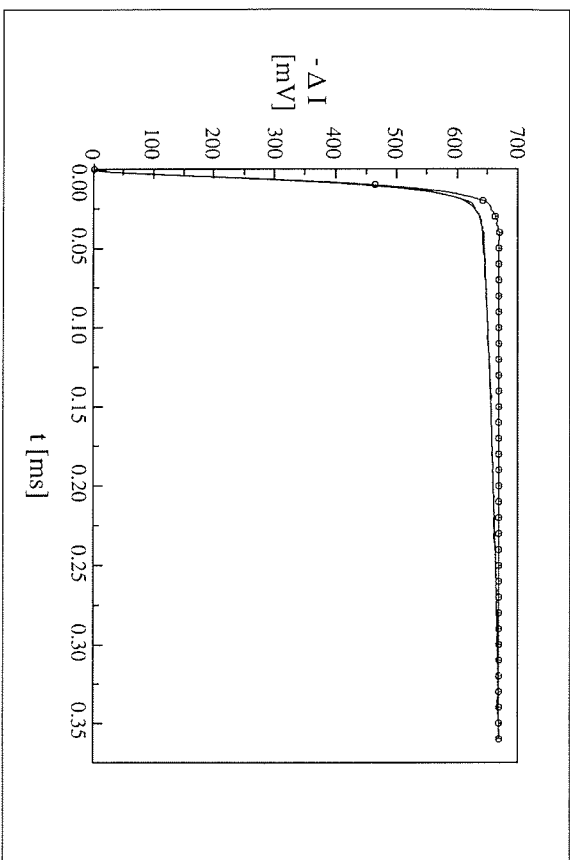


Abbildung 5.14: Temperatur sprung Relaxation von  $5,5 \mu\text{M}$  Oli3 im TCN-Puffer und  $20 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  bei  $10,6^\circ\text{C}$ . Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenzintensität ( $\Delta I$ ) in Abhängigkeit von der Zeit ( $t$ ), wobei erstens die durchgezogenen Linien die Meßkurve und deren Anpassung mit einer Exponentialkurve und zweitens die durchgezogene Linie mit (o) die entsprechende Referenzkurve des Tryptophans repräsentieren. Die chemische Relaxationszeit wurde mit  $\tau = 95 \mu\text{s}$  bestimmt.

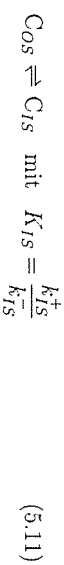
von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen wurde ein chemischer Relaxationseffekt mit einer Zeitkonstante von ca.  $100 \mu\text{s}$  beobachtet (s. Abb. 5.14).

Der nur in Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen gefundene Relaxationsprozeß deutet auf Bildung eines *Inner-Sphere*-Komplexes (IS-Komplex) — die Bindung eines Liganden an die innere Koordinationssphäre des Metallions — hin, d. h., daß im Falle von wäßrigen Lösungen ein Ligand gegen ein  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül im sechsfach koordinierten  $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  durch einen  $\text{S}_\text{N}1$ -Mechanismus substituiert wird. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion hat einen 1,5-fach größeren Ionenradius ( $0,66 \text{ \AA}$  beim  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $0,99 \text{ \AA}$  beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion [68]) als das  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion. Die Größe des Ionenradius ist ein Faktor für die Höhe der Aktivierungsbarriere für den Austausch eines oktaedrisch koordinierten  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküls. Im Falle des Calciums ist die Aktivierungsbarriere deutlich niedriger. Somit erfolgt

die IS-Komplexbildung beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion relativ schnell [40, 41]. Während die Geschwindigkeitskonstante ( $k_{\text{IS}}$ ) für einen IS-Komplex des  $\text{Mg}^{2+}$ -Ions bei  $10^5 \text{ s}^{-1}$  liegt, ist der entsprechende Wert beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion mit  $10^8$ – $10^9 \text{ s}^{-1}$  deutlich größer [34]. Somit konnte der schnelle Prozeß der IS-Komplexbildung mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion nicht mit der hier verwendeten Temperatursprungapparatur detektiert werden. Außerdem konnten schon in früheren Untersuchungen [116] *Inner-Sphere*-Komplexe von Oligoribodensäuren der Kettenlänge 5–10 nt und 17 nt an  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen durch Feldsprungmessungen nachgewiesen werden.

Während die Amplitudengröße dieses Relaxationseffektes mit steigender Metallionenkonzentration zunahm, wurde die Relaxationszeit, die im Bereich von  $100 \mu\text{s}$  lag, mit steigender  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration kleiner. Die Amplituden und die reziproke Relaxationszeit ( $1/\tau$ ) streben bei hohen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen einem Grenzwert entgegen (s. Abb. 5.15). Vor der Bildung eines IS-Komplexes wird immer eine Bildung eines *Outer-Sphere*-Komplexes (OS-Komplex) — die Bindung eines Liganden an eine äußere Koordinationssphäre (Solvathülle) des Metallions — erfolgen, wobei die Geschwindigkeitskonstante für die OS-Komplexbildung ( $k_{\text{OS}}$ ) mit  $10^{10} \text{ s}^{-1}$  sehr hoch ist.

Unter Verwendung des Reaktionsmechanismus von Modell II (s. Kap. 2.3.4) erfolgt die Bindung des  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion an die Oligoribodensäure Oli3 gemäß folgendem Reaktionsschema:



Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion wird nach dem gleichen Reaktionsmechanismus an das Oli3 binden, jedoch mit dem Unterschied, daß die Bildung des IS-Komplexes in einem schnelleren Zeitbereich eintritt, als die verwendete Temperatursprungapparatur erfassen kann. Unter Berücksichtigung der obigen Gleichungen (s. Anhang B) ergibt sich für die Gesamtbindungskonstante ( $K$ ), die mit Hilfe der Fluoreszenztitrationen (s. Kap. 5.1.1) ermittelt worden ist, folgender Ausdruck:

$$K = K_{\text{OS}}(K_{\text{IS}} + 1) \quad (5.12)$$

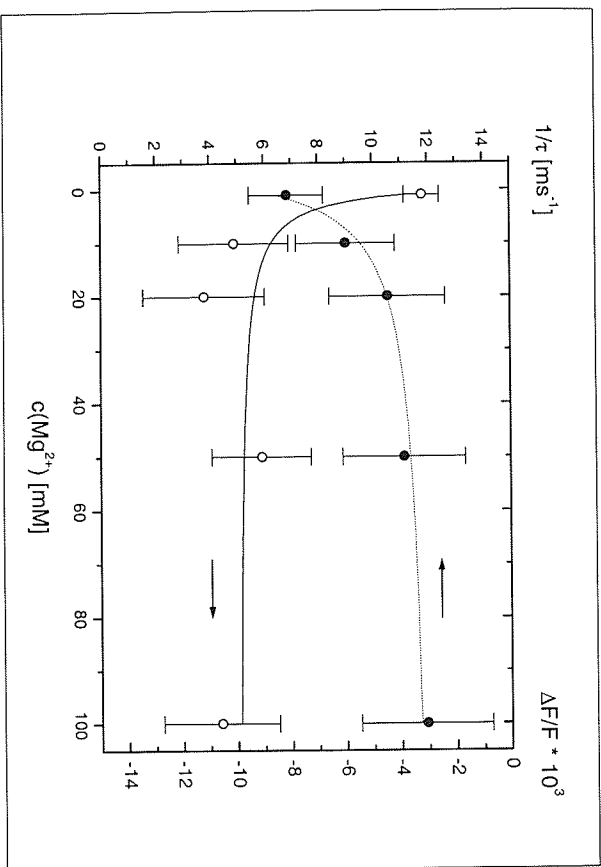


Abbildung 5.15: Relaxationszeiten und Fluoreszenzamplituden beim Temperatur-sprung von  $5.5 \mu\text{M}$  Oli3 im TCN-Puffer bei  $10.6^\circ\text{C}$ . Dargestellt sind die reziproken Relaxationszeiten  $1/\tau$  ( $\bullet$ ) und die Fluoreszenzamplituden  $\Delta F/F$  ( $\circ$ ) mit 20 %igen Fehlergrenzen als Funktion der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration. Die gepunktete und durchgezogene Linie repräsentiert die Anpassung an das Reaktionsschema Modell II unter der Verwendung der Parameter  $\alpha = 0.01$ ,  $\beta = 2.98$ ,  $\Delta \ln K_{OS} = 0.0$ ,  $\Delta \ln K_{IS} = -0.0222$  und den Parametern in Tab. 5.6.

Weiterhin ergibt sich für den Gesamtfluoreszenzfaktor ( $\Delta$ ), wenn  $\alpha$  und  $\beta$  die Quantenausbeuten von  $C_{OS}$  und  $C_{IS}$  relativ zu der von Oli3 sind:

$$\Delta = \left( \frac{1}{K_{IS} + 1} \right) \alpha + \left( \frac{K_{IS}}{K_{IS} + 1} \right) \beta \quad (5.13)$$

Eine Anpassung der experimentellen Daten an den Reaktionsmechanismus von Modell II mit Hilfe eines Computerprogrammes ermöglichte die Analyse der kinetischen und thermodynamischen Parameter dieses Systems. Dabei wird durch eine Auswahl von Parametern versucht, die Relaxation eines solchen kinetischen Sys-

tems, also die Relaxationszeiten und deren Amplituden, an die experimentellen Daten anzupassen. Für diese Anpassung sind neben der Geschwindigkeitskonstante  $k_{OS}^+ = 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  auch die Bindungskonstante  $K$  und die Quantenausbeute  $q$  aus den Fluoreszenztitrationen als feste Werte gesetzt worden. In Abbildung 5.15 ist ein Beispiel für eine Anpassung dargestellt und deren Parameter sind in Tabelle 5.6 aufgeführt. Die Werte für die Quantenausbeuten und  $\Delta \ln K$  fehlen dort und sind nur beispielhaft in der Legende von Abbildung 5.15 aufgeführt, weil sich diese Parameter aufgrund der starken gegenseitigen Kopplung nicht aus den vorliegenden Daten ermitteln lassen.

Tabelle 5.6: Kinetische und thermodynamische Parameter für die Bindung von  $\text{Mg}^{2+}$  an das Oli3.

Komplex $C_i$	$K_i$	$k_i^+$	$k_i^-$
$C_{OS}$	$160 \text{ M}^{-1}$	$1.0 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$6.3 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
$C_{IS}$	1.20	$6.6 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$	$5.5 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$
$C_{OS} + C_{IS}$ (gesamt)	$350 \text{ M}^{-1}$		

Mit einer abgeschätzten Fehlergrenzen von  $\pm 20\%$  konnten die experimentellen Daten an das obige Reaktionsschema Modell II angepaßt werden. Im Vergleich zu den von PORSCHE [116] gefunden Werten für IS-Komplexe von Oligoriboadenylaten mit  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen ist die Bindungskonstante  $K_{IS} = 1.20$  ca. eine Zehnerpotenz größer. Die Ursache für die höhere Bindungskonstante  $K$  liegt in der höheren Ionenstärke des Puffers. Letztendlich konnte gezeigt werden, daß sich ein *Inner-Sphere*-Komplex in Ribonukleinsäuren mit Hilfe der Reportergruppe 2-Aminopurin-Ribonukleosid prinzipiell über Relaxationsmethoden nachweisen läßt.

In weiteren Experimenten zeigte sich, daß mit zunehmender Konzentration des Oli3 in einem Bereich von 5 bis  $25 \mu\text{M}$  zwar die relativen Amplituden des Relaxationseffektes in derselben Größenordnung blieben, jedoch die Relaxationszeiten um den Faktor 1.5–3.0 zunahmten. Diese Beobachtung muß einen Dimerisierungsprozeß zugeordnet werden, der bei den kleineren RNA-Konzentrationen zu vernachlässigen ist und somit das vorliegende Reaktionsmodell nicht in Frage stellt.

### 5.2.5 *Haïrpin*-Struktur der 2AP-substituierten Oligouridylsäure

Das Bindungsgleichgewicht (s. Kap. 5.1.1) zwischen der 2AP-substituierten Oligouridylsäure OI<sub>4</sub> und den beiden Metallionen Magnesium und Calcium konnte aufgrund eines fehlenden Grenzwertes bei den Fluoreszenztitrationen nicht quantitativ ermittelt werden. Bei den Kinetikuntersuchungen durch Temperatursprungexperimente (s. Kap. 4.6.2) konnte vor und nach der Metallionenzugabe bis zu einer Konzentration von 10 mM — wie schon aus den beim OI<sub>3</sub> genannten Gründen — kein eindeutiger Beweis für einen chemischen Relaxationseffekt gefunden werden. Bei einer Metallionenkonzentration von 100 mM wurde jedoch mit Magnesium und mit Calcium in einem Temperaturbereich von 5–11°C ein chemischer Relaxationseffekt entdeckt, dessen Relaxationszeiten ( $\tau$ ) und Fluoreszenzamplituden ( $\Delta F/F$ ) eine Temperaturabhängigkeit zeigten. Im Falle des Magnesiums reduzierte sich z. B. die Relaxationszeit  $\tau$  von  $(20 \pm 2)$   $\mu$ s bei 10,6°C auf  $(14 \pm 2)$   $\mu$ s bei 8,1°C. Es konnte nicht geklärt werden, warum die Relaxationszeit bei abnehmender Temperatur kleiner wird.

Die Ergebnisse der kinetischen Messungen am OI<sub>4</sub> sind mit denen von DOURLANT et al. [36] gemachten Beobachtungen konsistent, wobei sie eine Polynuridylsäure einer Kettenlänge von 31 nt durch Temperatursprungexperimente in 0,5 M CsCl charakterisierten. Dabei ist neben einem langsamen Relaxationseffekt von ca. 22  $\mu$ s noch zusätzlich eine schnellere Relaxationszeit im Bereich von 3  $\mu$ s entdeckt worden. In Kombination mit den aus Schmelzkurvenanalysen von Oligo- und Polynuridylsäure erhaltenen Daten postulierte er für den langsamen Relaxationseffekt einen intramolekularen *Coil-Helix*-Übergang, wobei die Helixform eine *Haïrpin*-Struktur war. Die Daten der Schmelzkurvenanalyse (s. Kap. 4.4) von OI<sub>4</sub> unter Verwendung der *Annealing*-Prozedur II im TCN-Puffer sind auch konsistent mit den von DOURLANT et al. [36] erhaltenen Ergebnissen, denn auch hier konnte für eine Kettenlänge von 12 nt noch keine kooperative Änderung der Absorption nachgewiesen werden. Da der Relaxationseffekt zwar unabhängig von der Wahl des Metallions war, aber erst in beiden Fällen bei einer Konzentration von 100 mM auftrat, ist zu vermuten, daß die Bildung der *Haïrpin*-Struktur erst ab einer bestimmten Ionenstärke erfolgt. Diese

### 5.2. KINETIK DER BINDUNGSGLEICHGEWICHTE

Hypothese müßte sicherlich durch weitere Experimente überprüft werden. Insgesamt zeigt sich jedoch erneut, daß sich die Kinetik von Ribonukleinsäuren mit Hilfe der Reportergruppe 2-Aminopurin-Ribonukleosid untersuchen läßt.

### 5.2.6 Dimerisierung der heterogenen Oligoribonukleinsäuren zu RNA-Doppelhelices

Bei den Kinetikuntersuchungen der beiden Oligoribonukleinsäuren OI<sub>1</sub> und OI<sub>2</sub> mit heterogener Basensequenz wurden durch Temperatursprung-Messungen in beiden Fällen vor der Zugabe von Metallionen mehrere chemische Relaxationseffekte in verschiedenen Zeitbereichen bei einer Temperatur von 5–11°C entdeckt. Dabei konnte für den langsamsten Relaxationseffekt eine Abhängigkeit von der RNA-Konzentration nachgewiesen werden. Seine Amplitude nahm mit steigender RNA-Konzentration im Bereich von 0,6–6,0  $\mu$ M bis zu 15 % zu.

Bei den Temperatursprung-Messungen (s. Kap. 4.6.2) der Ribonukleinsäure OI<sub>1</sub> wurden in Abhängigkeit von der RNA-Konzentration zwei Relaxationseffekte beobachtet, wobei die Amplitude des langsameren Effektes über 90 % der Gesamtamplitude des jeweiligen Temperatursprunges ausmachte. Während sich die Amplituden mit RNA-Konzentrationen im Bereich von 0,6–6,0  $\mu$ M fast verdreifachten, blieb  $\tau_1$  bei ca. 4 ms recht konstant, und  $\tau_2$  halbierte seinen Wert von ca. 140 ms auf 70 ms.

Ebenfalls wurden in Abhängigkeit von der RNA-Konzentration durch Temperatursprung-Messungen (s. Kap. 4.6.2) bei der Ribonukleinsäure OI<sub>2</sub> zwei Relaxationseffekte entdeckt, wobei die Amplitude des langsameren Effektes ca. 80 % der Gesamtamplitude des jeweiligen Temperatursprunges mit zunehmender RNA-Konzentration betrug. Während die Amplituden des schnellen Relaxationseffektes im  $\mu$ s-Bereich relativ konstant blieben, nahmen die des langsamen Relaxationseffektes in einem Konzentrationsbereich von 0,6–6,0  $\mu$ M um mehr als das 15-fache zu. Die Relaxationszeit  $\tau_2$  wuchs mit zunehmender RNA-Konzentration um 4–10 % und war bei 10,6°C mit ca. 5 ms deutlich schneller als bei 5,8°C mit ca. 16 ms.

Aufgrund seiner Konzentrationsabhängigkeit konnte der langsame Relaxationseffekt einer Dimerisierung zweier RNA-Moleküle zu einer RNA-Doppelhelix zuge-

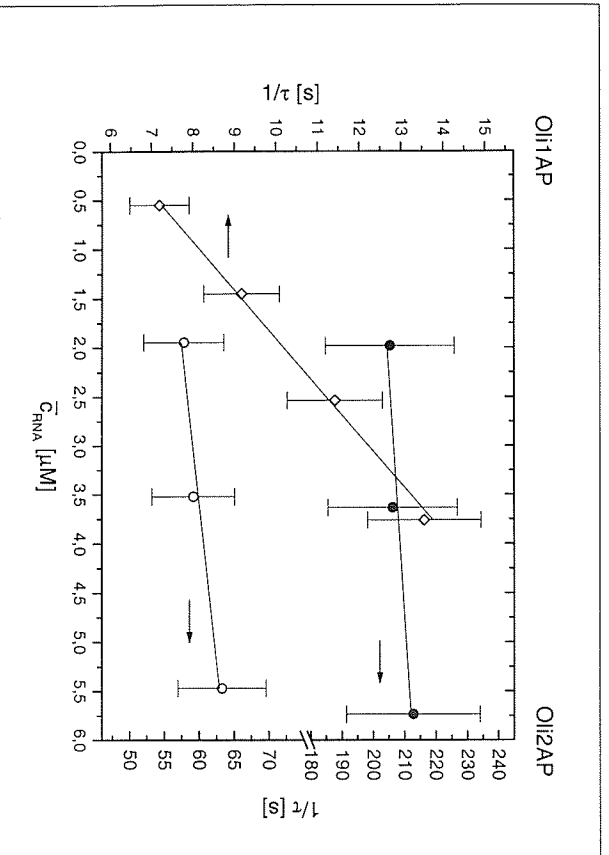
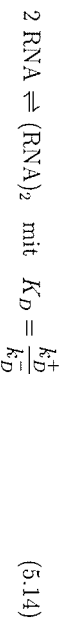


Abbildung 5.16: Relaxationszeiten beim Temperaturprung des Oh1 und des Oh2 im TCN-Puffer. Dargestellt sind die reziproken Relaxationszeiten  $1/\tau$  von Oh1 (links) bei  $5,8^\circ\text{C}$  ( $\diamond$ ) und von Oh2 (rechts) bei  $5,8^\circ\text{C}$  ( $\circ$ ) und bei  $10,6^\circ\text{C}$  ( $\bullet$ ) mit den 10 %igen Fehlergrenzen als Funktion der RNA-Gleichgewichtskonzentration  $\bar{c}_{\text{RNA}}$ . Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassungen an das Modell einer Dimerisierungsreaktion.

ordnet werden. Der schnelle Relaxationseffekt beschreibt wahrscheinlich ein Konformationsgleichgewicht. Unter Vernachlässigung des sehr kleinen und schnellen Relaxationseffektes und unter Verwendung des Reaktionsmechanismus von Modell I (s. Kap. 2.3.4) kann das System mit folgendem vereinfachten Reaktionsschema beschrieben werden:



Für ein solches einstufiges Gleichgewicht können die thermodynamischen Parameter bei Kenntnis der Gleichgewichtskonzentrationen aus der graphischen Auftragung ermittelt werden (s. Abb. 5.16), denn es gelten für die Ausgangskonzentration ( $c_0$ )

und die reziproke Relaxationszeit ( $1/\tau$ ) folgende Beziehungen:

$$c_0 = \bar{c}_{\text{RNA}} + 2 \cdot \bar{c}_{(\text{RNA})_2} \quad (5.15)$$

$$\frac{1}{\tau} = 4 \cdot k_D^+ \cdot \bar{c}_{\text{RNA}} + k_D^- \quad (5.16)$$

Die daraus erhaltenen Bildungskonstanten (s. Tab. 5.7) lagen für die Dimerisierung im Bereich von  $10^4 \text{ M}^{-1}$  beim Oh1 und  $10^3 \text{ M}^{-1}$  beim Oh2, wobei beim Oh2  $K_D$  mit steigender Temperatur erwartungsgemäß kleiner wurde. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Bildungsreaktion  $k_D^+$  lagen in allen drei Fällen in der gleichen Größenordnung.

Tabelle 5.7: Kinetische und thermodynamische Parameter für die Dimerisierung beim Oh1 und Oh2.

RNA	T [ $^\circ\text{C}$ ]	$K_D$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	$k_D^+$ [ $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_D^-$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
Oh1	5,8	$8,3 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^5$	$6,1 \cdot 10^9$
	5,8	$7,1 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^1$
Oh2	10,6	$2,5 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^2$

Die energetisch günstigsten RNA-Sekundärstrukturen der beiden Oligoribonukleinsäuren wurden mit Hilfe von theoretischen Simulationsprogrammen [65, 80, 175] ermittelt. Beide Ribonukleinsäuren besitzen aufgrund ihrer Basensequenzen viele Möglichkeiten zu intra- und vor allem internukleularen Basenpaarungen. Die energetisch günstigste Struktur ist beim Oh1 die Ausbildung einer Doppelhelix mit einer inneren Schleife und insgesamt sechs ( $2 \times 3$ ) internukleularen Basenpaarungen, wobei die zwei 2-Aminopurin-Ribonukleoside ungepaart in der inneren Schleife zu finden sind. Obwohl beim Oh2 eher eine intramolekulare Basenpaarung unter Ausbildung einer *Hairpin*-Struktur als die thermodynamisch stabilste Sekundärstruktur bestimmt wurde, kann auch in diesem Fall eine Doppelhelix unter Ausbildung einer inneren Schleife mit insgesamt vier ( $2 \times 2$ ) internukleularen Basenpaarungen entstehen. In Abbildung 5.17 sind die hypothetischen Sekundärstrukturen der Doppelhelices von beiden Oligoribonukleinsäuren dargestellt. Die Ausbildung einer RNA-Doppelhelix ist also in beiden Fällen aufgrund der Basensequenz möglich.

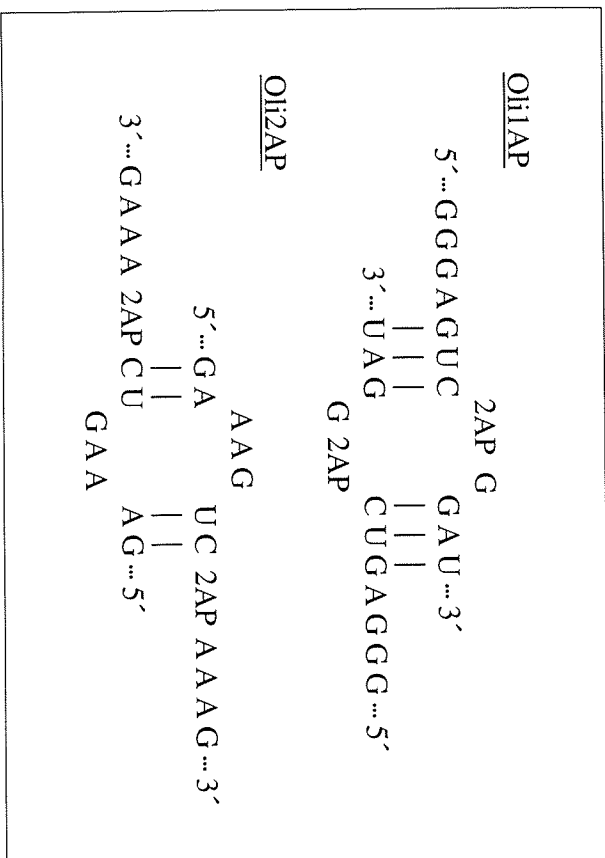


Abbildung 5.17: Hypothetische Sekundärstrukturen nach der Dimerisierungsreaktion von *Oli1* und *Oli2*.

Diese Ergebnisse unterstützen das aus den Kinetikmessungen abgeleitete Reaktionsmodell einer Dimerisierung zweier RNA-Einzelstränge zu einer RNA-Doppelhelix.

### 5.2.7 Verschiedene Konformationszustände bei den *Hairpin*-Ribonukleinsäuren

Durch die Kinetikuntersuchungen wurden die Bindungsgleichgewichte (s. Kap. 5.1.3) zwischen den *Hairpin*-Ribonukleinsäuren und den Metallionen Magnesium und Calcium weiter charakterisiert. Während bei den *Stopped-Flow*-Experimenten kein Effekt und somit kein Bindungsgleichgewicht mit einem Metallion nachgewiesen werden konnte, wurde jedoch bei den Temperatursprung-Experimenten mit den Ribonukleinsäuren schon in Abwesenheit von Metallionen mindestens ein chemischer

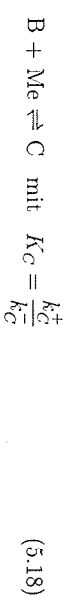
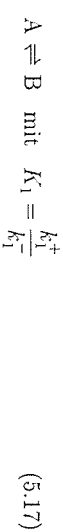
## 5.2. KINETIK DER BINDUNGSGLEICHGEWICHTE

Relaxationseffekt, einer beim HP1 und zwei beim HP2, gefunden. Bei beiden Ribonukleinsäuren konnte jedoch nach der Zugabe von Metallionen weder im Falle des Magnesiums noch des Calciums ein zusätzlicher Relaxationseffekt entdeckt werden. Die bei den Kinetikuntersuchungen gemachten Beobachtungen zeigen, daß bei beiden *Hairpin*-Ribonukleinsäuren unterschiedliche Konformationszustände vorhanden sind.

### 5.2.7.1 Die Ribonukleinsäure HP1

Bei den Temperatursprung-Messungen (s. Kap. 4.6.2) der Ribonukleinsäure HP1 wurde in Abwesenheit und in Anwesenheit von zweiwertigen Metallionen ein chemischer Relaxationseffekt im  $\mu$ s-Bereich entdeckt (s. Abb. 5.18). Die Fluoreszenzamplituden wurden mit zunehmender Metallionenkonzentration immer kleiner. Die Relaxationszeiten  $\tau_1$  wurden in einem Temperaturbereich von 8–11°C größer.

Diese Resultate zeigen, daß die Ribonukleinsäure HP1 mindestens zwei Konformationen (A und B) besitzt. Unter der Annahme, daß die jeweilige Metallionen bevorzugt an eine der beiden Konformationen unter Bildung eines Komplexes C binden, läßt sich die Metallbindung durch den Reaktionsmechanismus von Modell III (s. Kap. 2.3.4) beschreiben. Der Komplex C ist wahrscheinlich ein OS-Komplex, weil bei den Temperatursprung-Experimenten bei Zugabe von den zweiwertigen Kationen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  kein Hinweis für die Ausbildung eines IS-Komplex gefunden worden ist. Die Bindung eines Metallions erfolgt gemäß folgendem Reaktionsschema:



Für die Gesamtbindungskonstante ( $K$ ) ergibt sich somit (s. Anhang B):

$$K = \frac{K_1}{K_1 + 1} \cdot K_C \quad (5.19)$$

Weiterhin ergibt sich für den Gesamth fluoreszenzfaktor ( $\Delta$ ), wenn  $\alpha$  und  $\beta$  die Quantenausbeuten von A und B relativ zu der von C sind:

$$\frac{1}{\Delta} = \left( \frac{1}{K_1 + 1} \right) \alpha + \left( \frac{K_1}{K_1 + 1} \right) \beta \quad (5.20)$$

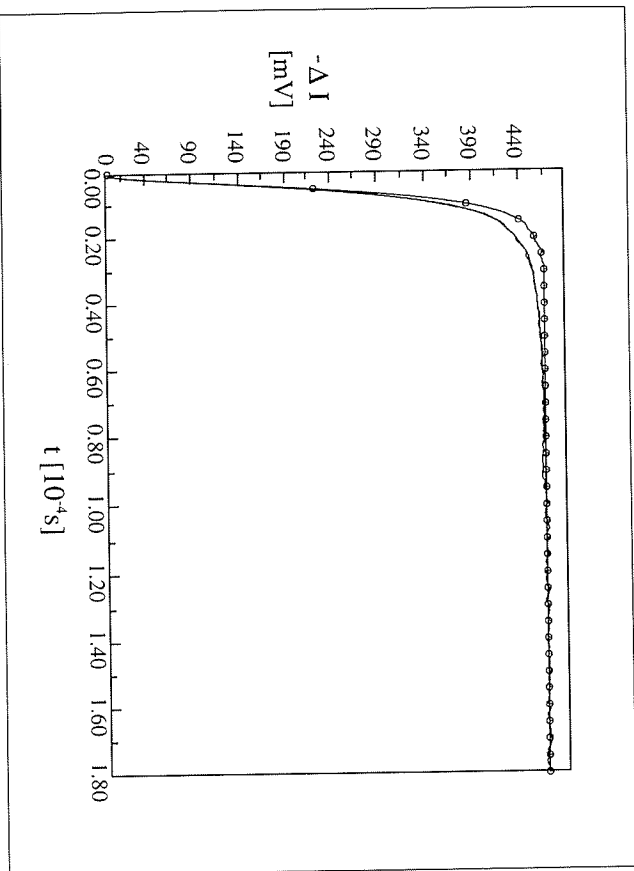


Abbildung 5.18: Temperatur sprung Relaxation von  $7.1 \mu\text{M}$  HP1 im TCN-Puffer bei  $8.1^\circ\text{C}$ . Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenzintensität ( $\Delta I$ ) in Abhängigkeit von der Zeit ( $t$ ), wobei erstens die durchgezogene Linie die Meßkurve und deren Anpassung mit einer Exponentialkurve und zweitens die durchgezogene Linie mit ( $\circ$ ) die entsprechende Referenzkurve des Tryptophans repräsentieren. Die chemische Relaxationszeit wurde mit  $\tau = 22.1 \mu\text{s}$  bestimmt.

Die experimentellen Daten konnten mit Hilfe eines Computerprogramms an den postulierten Reaktionsmechanismus erfolgreich angepaßt werden. Für die Anpassung der experimentellen Daten an das Reaktionsmodell III wurden neben der Geschwindigkeitskonstante  $k_2^+ = 10^{10} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  auch die Bindungskonstante  $K1$  und die Quantenausbeute  $q1$  des ersten Bindungsprozesses aus den Fluoreszenztitrationen als feste Parameter verwendet. In Abbildung 5.19 ist ein Beispiel für eine Anpassung zu sehen.

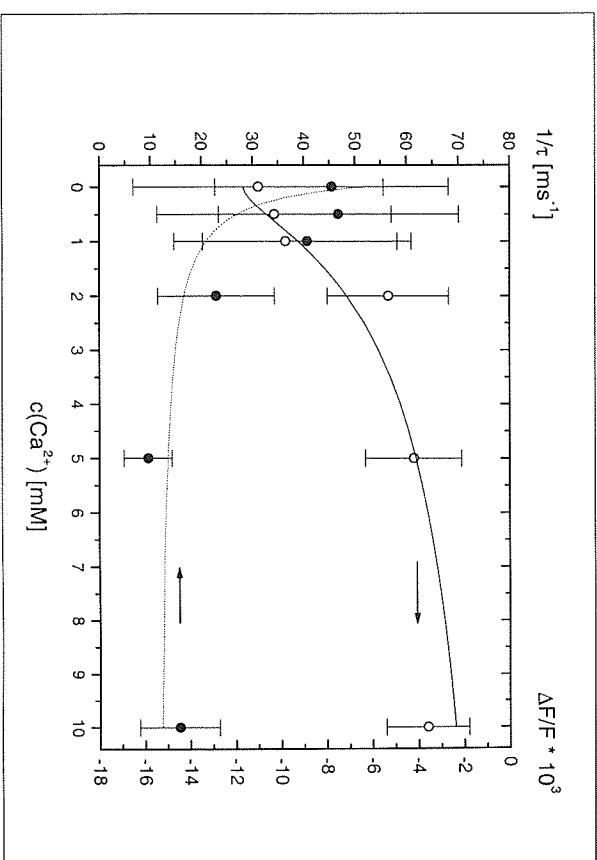


Abbildung 5.19: Relaxationszeiten und Fluoreszenzamplituden beim Temperatur sprung des HP1 im TCN-Puffer bei  $8.1^\circ\text{C}$ . Dargestellt sind die reziproken Relaxationszeiten  $1/\tau$  ( $\bullet$ ) und die Fluoreszenzamplituden  $\Delta F/F$  ( $\circ$ ) mit 40%igen Fehlergrenzen als Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die gepunktete und durchgezogene Linie repräsentiert die Anpassung an das Reaktionsschema Modell III unter der Verwendung der Parameter  $\alpha = 0.45$ ,  $\beta = 1.93$ ,  $\Delta \ln K1 = -0.036$ ,  $\Delta \ln Kc = 0$  und den Parametern in Tab. 5.8.

Die Parameter sind in Tabelle 5.8 aufgeführt, wobei die Werte für die Quantenausbeuten und  $\Delta \ln K$  fehlen. Sie sind nur beispielhaft in der Legende von Abbildung 5.19 aufgeführt, da sich diese Parameter aufgrund der starken gegenseitigen Kopplungen nicht aus den vorliegenden Daten bestimmen lassen. Beim Vergleich der Parameter kann zwischen dem Prozeß der Metallionenbindung des  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Innerhalb der Fehlergrenzen ist auch keine Temperaturabhängigkeit zu erkennen.



Tabelle 5.8: Kinetische und thermodynamische Parameter für die Strukturumwandlung der Ribonukleinsäure HP1 in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  bzw.  $\text{Mg}^{2+}$ .

T [°C]	8.1		10.6
Metallion	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$
$K_1$	0.27	0.37	0.52
$k_1^+$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$1.1 \cdot 10^4$	$1.2 \cdot 10^4$	$2.5 \cdot 10^4$
$k_1^-$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$4.1 \cdot 10^4$	$3.3 \cdot 10^4$	$4.8 \cdot 10^4$
$K_C$	3100	3000	2400
$k_C^+$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$1.0 \cdot 10^{10}$	$1.0 \cdot 10^{10}$	$1.0 \cdot 10^{10}$
$k_C^-$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$3.2 \cdot 10^6$	$3.3 \cdot 10^6$	$4.2 \cdot 10^6$
K [ $\text{M}^{-1}$ ]	660	820	820

### 5.2.7.2 Die Ribonukleinsäure HP2

Bei den Temperatursprung-Experimenten (s. Kap. 4.6.2) der Ribonukleinsäure HP2 konnten zwei chemische Relaxationseffekte im  $\mu\text{s}$ -Bereich entdeckt werden (s. Abb. 5.20). Bei Zugabe der zweiwertigen Metallionen Magnesium oder Calcium wurde kein weiterer chemischer Relaxationseffekt entdeckt. Außerdem zeigten die zwei Relaxationseffekte keine Abhängigkeit von der *Hairpin*-Konzentration in einem Konzentrationsbereich von 5–30  $\mu\text{M}$ .

Mit den Temperatursprung-Experimenten bei 10.6°C wurde zunächst eindeutig nur ein Relaxationseffekt im Bereich von 30–40  $\mu\text{s}$  erkannt. Bei den Untersuchungen bei 8.1°C wurde unter der Verwendung einer beschleunigten Aufheizzeit von  $\tau_d = 1.5\text{--}3.1 \mu\text{s}$  durch einen kleineren Kondensator und einer kürzeren Anstiegszeit die Nachweisgrenze für Relaxationseffekte herabgesetzt. Neben einem Relaxationseffekt im Bereich von 40–50  $\mu\text{s}$  wurde nun noch ein schnellerer Relaxationseffekt im Bereich von 5–6  $\mu\text{s}$  festgestellt.

Nach der Zugabe des jeweiligen Metallions  $\text{Mg}^{2+}$  bzw.  $\text{Ca}^{2+}$  wurde wie schon beim HP1 kein weiterer chemischer Relaxationseffekt gefunden. Während die schnelle Relaxationszeit mit zunehmender Metallionenkonzentration abnahm, wurde bei der

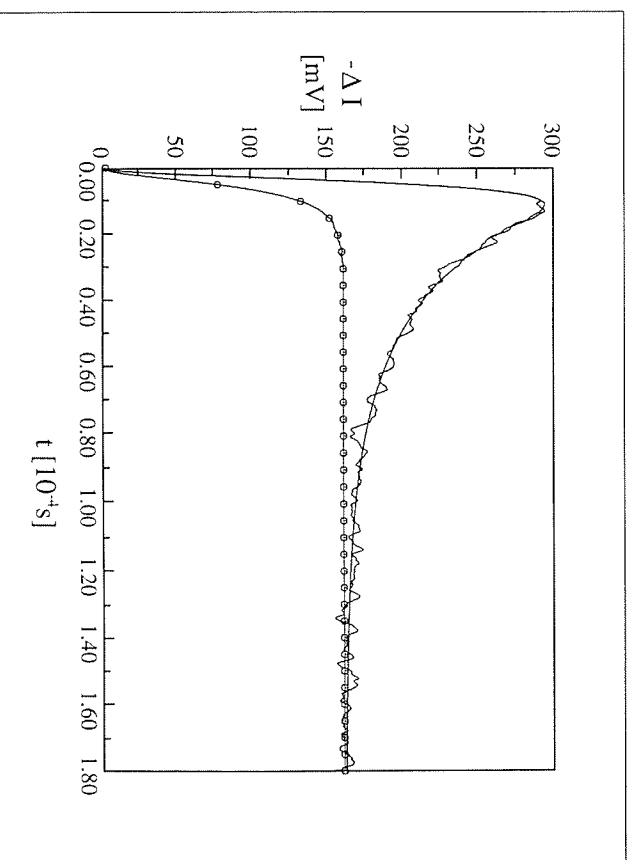


Abbildung 5.20: Temperatursprung Relaxation von 7.1  $\mu\text{M}$  HP2 im TCN-Puffer bei 8.1°C. Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenzintensität ( $-\Delta I$ ) in Abhängigkeit von der Zeit ( $t$ ), wobei erstens die durchgezogene Linie die Meßkurve und deren Anpassung mit einer Exponentialkurve und zweitens die durchgezogene Linie mit ( $\circ$ ) die entsprechende Referenzkurve des Tryptophans repräsentieren. Die chemische Relaxationszeit wurde mit  $\tau_1 = 5.2 \mu\text{s}$  und  $\tau_2 = 41.3 \mu\text{s}$  bestimmt.

langsameren Relaxationszeit eine geringfügige Zunahme beobachtet. Insgesamt waren die Änderungen der Relaxationszeiten im Gegensatz zu denen der Fluoreszenzamplituden jedoch sehr klein. Beide Fluoreszenzamplituden nahmen mit zunehmender Metallionenkonzentration um ein Faktor 4–5 deutlich ab (s. Abb. 5.21 und 5.22). Die Richtung der Fluoreszenzamplituden von HP2 war entgegengesetzt zu der von HP1, d. h., daß die Fluoreszenzintensität bis zur Einstellung des chemischen Gleichgewichtes beim HP2 zunahm.

Diese Beobachtung zeigt, daß die Ribonukleinsäure HP2 mindestens drei Konformationen (A, B und D) besitzt, weil beide Relaxationseffekte schon vor der

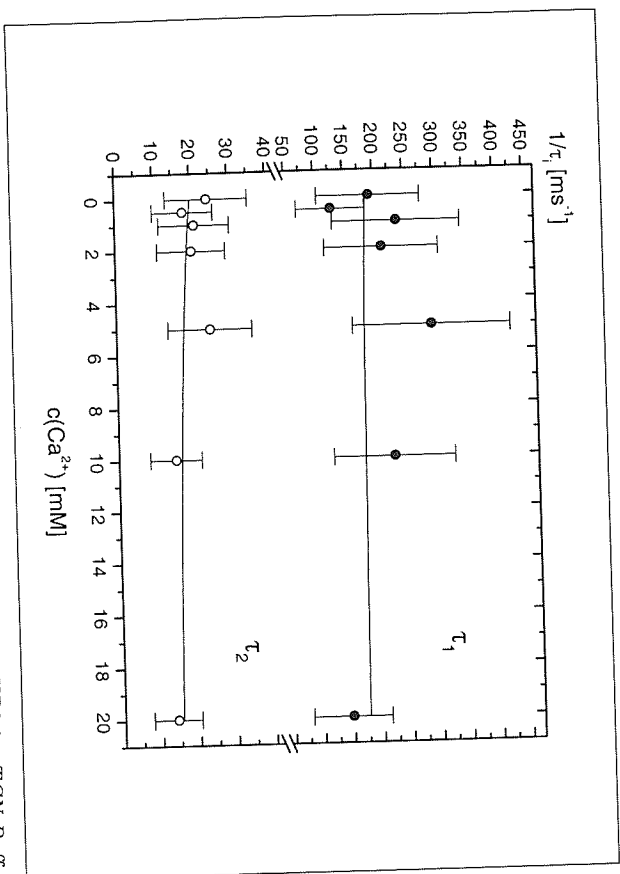
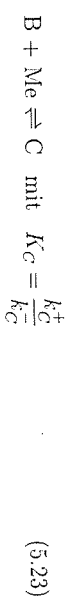
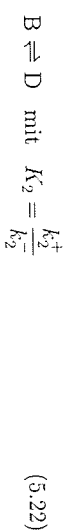
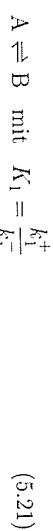


Abbildung 5.21: Relaxationszeiten beim Temperaturprung des HP2 im TCN-Puffer bei 8,1°C. Dargestellt sind die reziproken Relaxationszeiten  $1/\tau_1$  (●) mit 4,5%igen und  $1/\tau_2$  (○) mit 30%igen Fehlergrenzen als Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassung an das Reaktionsschema Modell IV unter der Verwendung der Parameter  $\alpha = 2,00$ ,  $\beta = 0,98$ ,  $\delta = 0,34$ ,  $\Delta \ln K_1 = -1,04$ ,  $\Delta \ln K_2 = -0,035$ ,  $\Delta \ln K_C = 0$  und den Parametern in Tab. 5.9.

Metallionenzugabe vorhanden waren. Unter der Annahme, daß das jeweilige Metallion bevorzugt an eine der drei Konformationen unter Bildung eines Komplexes C bindet, wird die Bindung durch den Reaktionsmechanismus von Modell IV (s. Kap. 2.3.4) beschrieben. In Analogie zu den Verhältnissen beim HP1 handelt es sich auch hier bei dem Komplex C wahrscheinlich um einen OS-Komplex, weil bei den Temperaturprung-Experimenten bei Zugabe von den zweiwertigen Kationen  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  ebenfalls kein Hinweis für die Ausbildung eines IS-Komplex gefunden worden ist. Die Bindung eines Metallions wird durch folgendes Reaktionsschema beschrieben:



Für die Gesamtbindungskonstante ( $K$ ) ergibt sich somit (s. Anhang B):

$$K = \frac{K_1}{K_1 K_2 + K_1 + 1} \cdot K_C \quad (5.24)$$

Weiterhin ergibt sich für den Gesamtfluoreszenzfaktor ( $\Delta$ ), wenn  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  die Quantenausbeuten von A, B und D relativ zu der von C sind:

$$\frac{1}{\Delta} = \left( \frac{1}{K_1 K_2 + K_1 + 1} \right) \alpha + \left( \frac{K_1}{K_1 K_2 + K_1 + 1} \right) \beta + \left( \frac{K_1 K_2}{K_1 K_2 + K_1 + 1} \right) \delta \quad (5.25)$$

Die Anpassung der experimentellen Daten an das postulierte Reaktionsschema gelang mit Hilfe eines Computerprogramms. Für die Anpassung der experimentellen Daten an das Reaktionsmodell IV wurden neben der Geschwindigkeitskonstante  $k_1^+ = 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  auch die Bindungskonstante  $K_2$  und die Quantenausbeute  $q_2$  des zweiten Bindungsprozesses aus den Fluoreszenztitrations als feste Parameter verwendet. Im Gegensatz zum HP1 wurde beim HP2 die kleinere Bindungskonstante der Metall-Bindungsgleichgewichte benutzt, weil nur in diesem Fall die experimentellen Daten mit ausreichender Genauigkeit an das Reaktionsmodell IV anzupassen waren. In beiden Fällen war der Bindungsprozeß jedoch mit einer Fluoreszenzunahme, also einer Quantenausbeute  $q > 1$ , verbunden. Die Werte  $K_2$  und  $q_2$  konnten auch hier direkt als Parameter für die Gesamtbindungskonstante  $K$  und den Gesamtfluoreszenzfaktor  $\Delta$  in dem Reaktionsmodell IV eingesetzt werden, weil die bei den Fluoreszenztitrations beobachteten Bindungsprozesse voneinander unabhängig waren. Ein Beispiel für eine mögliche Anpassung ist in Abbildung 5.21 und 5.22 zu sehen.

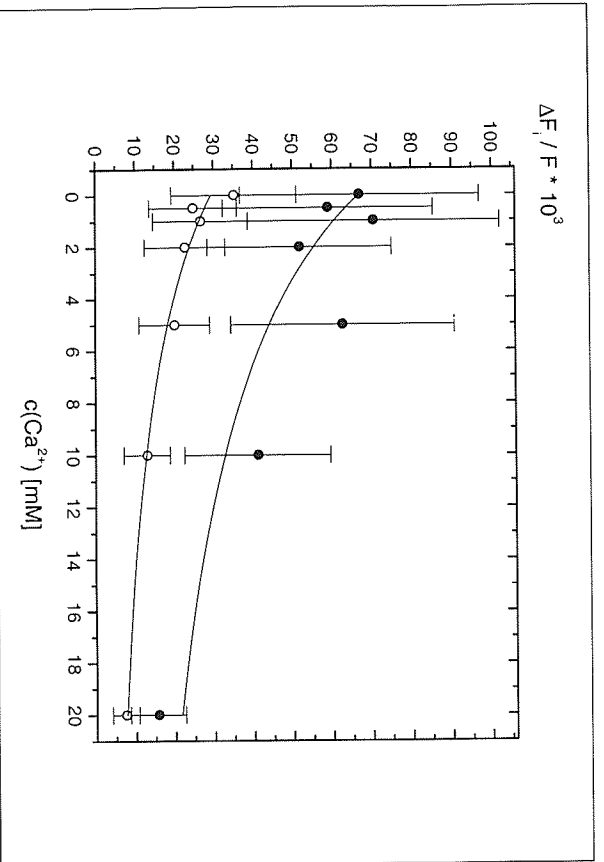


Abbildung 5.22: Fluoreszenzampplituden beim Temperatursprung des HP2 in TCN-Puffer bei 8.1°C. Dargestellt sind Fluoreszenzampplituden  $\Delta F_1/F$  (●) mit 45%igen und  $\Delta F_2/F$  (○) mit 30%igen Fehlergrenzen als Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassung an das Reaktionsschema Modell IV unter der Verwendung der Parameter  $\alpha = 2.00$ ,  $\beta = 0.98$ ,  $\delta = 0.34$ ,  $\Delta \ln K_1 = -1.04$ ,  $\Delta \ln K_2 = -0.035$ ,  $\Delta \ln K_C = 0$  und den Parametern in Tab. 5.9.

Die Parameter sind in Tabelle 5.9 aufgeführt, wobei die Werte für die Quantenanteile und die  $\Delta \ln K_i$  fehlen. Sie sind aufgrund der starken gegenseitigen Kopplungen nur beispielhaft in der Legende von Abbildung 5.21 bzw. 5.22 aufgeführt. Beim Vergleich der Parameter ist zwischen den beiden verschiedenen Metallbindungsprozessen wie beim HP1 kein großer Unterschied festzustellen. Eine Temperaturabhängigkeit der Konformationsgleichgewichte ist auch hier innerhalb der Fehlergrenzen nicht zu erkennen. Auffallend ist jedoch, daß die Bindungskonstanten für die Metallbindungen ( $K_C$ ) beim HP2 im Bereich von ca.  $100 \text{ M}^{-1}$  um den Faktor 20–30 niedriger sind als beim HP1.

Tabelle 5.9: Kinetische und thermodynamische Parameter für die Strukturumwandlung der Ribonukleinsäure HP2 in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  bzw.  $\text{Mg}^{2+}$ .

T [°C]	8.1		10.6	
Metallion	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$
$K_1$	10	10	10	10
$k_1^+$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$1.7 \cdot 10^5$	$2.0 \cdot 10^5$	$2.0 \cdot 10^5$	$2.0 \cdot 10^5$
$k_1^-$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$1.7 \cdot 10^4$	$2.0 \cdot 10^4$	$2.0 \cdot 10^4$	$2.0 \cdot 10^4$
$K_2$	0.60	0.60	0.60	0.65
$k_2^+$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$7.8 \cdot 10^3$	$9.4 \cdot 10^3$	$1.1 \cdot 10^4$	$1.3 \cdot 10^4$
$k_2^-$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$1.3 \cdot 10^4$	$1.5 \cdot 10^4$	$1.9 \cdot 10^4$	$2.1 \cdot 10^4$
$K_C$	100	93	100	93
$k_C^+$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$1.0 \cdot 10^{10}$	$1.0 \cdot 10^{10}$	$1.0 \cdot 10^{10}$	$1.0 \cdot 10^{10}$
$k_C^-$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$9.8 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^8$	$9.8 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^8$
K [ $\text{M}^{-1}$ ]	36	53	36	53

Diese unterschiedlichen Beobachtungen bei den beiden *Hairpin*-Ribonukleinsäuren dokumentieren einmal mehr den Nutzen und die hohe Empfindlichkeit der Reportergruppe 2-Aminopurin. Wegen der nur geringfügigen Unterschiede in der Primärstruktur — Verschiebung des 2APs um nur eine Position — müssen die Basen an den Positionen L1.2 und L1.3 deshalb sehr unterschiedlich in der Sekundär- und Tertiärstruktur eingebunden zu sein.

Durch weitere Temperatursprung-Experimente in Abwesenheit von zweiwertigen Kationen wurden die chemischen Relaxationseffekte auf eine Abhängigkeit von der *Hairpin*-Konzentration überprüft, um eine Dimerisierungsreaktion, wie im Falle der Oligoribonukleinsäuren Ohi1 und Ohi2 beobachtet, auszuschließen. Mit zunehmender HP2-Konzentration blieben jedoch sowohl die Relaxationszeiten  $\tau_i$  als auch die Fluoreszenzintensitäten konstant, und es konnte auch kein zusätzlich Relaxationseffekt beobachtet werden. Somit konnte kein Beweis für eine Dimerisierungsreaktion erbracht werden. In Abbildung 5.23 ist die Konzentrationsabhängigkeit der Relaxationsprozesse vom HP2 graphisch dargestellt.

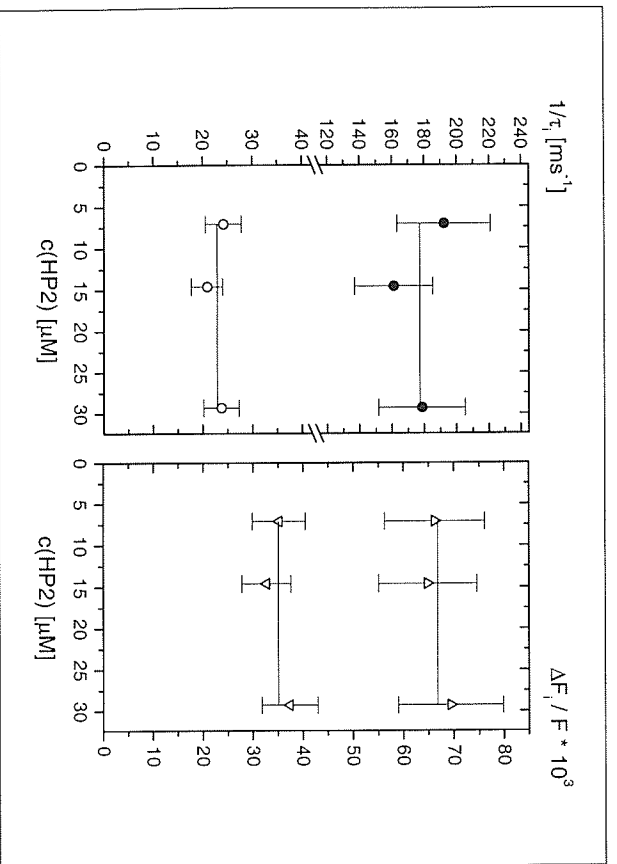


Abbildung 5.23: Relaxationszeiten und Fluoreszenzampplituden in Abhängigkeit von der  $HP_2$ -Konzentration beim Temperatursprung in TGN-Puffer bei  $8.1^\circ C$ . Dargestellt sind sowohl die reziproken Relaxationszeiten  $1/\tau_1$  (●) und  $1/\tau_2$  (○) als auch die Fluoreszenzampplituden  $\Delta F_1/F$  (△) und  $\Delta F_2/F$  (▽) mit 15%igen Fehlergrenzen als Funktion der  $HP_2$ -Konzentration. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den jeweiligen Mittelwert.

### 5.2.8 Kinetik bei den *Hammerhead*-Ribozymen

Zur weiteren Charakterisierung der Bindungsgleichgewichte (s. Kap. 5.1.4) zwischen den *Hammerhead*-Ribozymen HH1-5 und den zweiwertigen Kationen Magnesium und Calcium wurden deren Kinetik sowohl durch Temperatursprung-Experimente als auch durch *Stopped-Flow*-Experimente bei ca.  $8-11^\circ C$  untersucht. Im ersten Fall (Temperatursprung) konnten schon vor der Metallionenzugabe bei allen fünf *Hammerhead*-Ribozymtypen mehrere Relaxationseffekte mit ausschließlich positiven Fluoreszenzampplituden, d. h. einer Zunahme der Fluoreszenzintensität bis zur Einstellung des jeweiligen Gleichgewichtes, beobachtet werden. Nach der Metall-

ionenzugabe wurde bei keinem *Hammerhead*-Ribozym ein zusätzlicher Relaxationseffekt in dem untersuchten Zeitintervall (ca.  $10^{-6}$  s bis 1 s) festgestellt. Im zweiten Fall (*Stopped-Flow*) zeigten sich beim HH1 bei der Untersuchung der Bindungsgleichgewichte mit zweiwertigen Metallionen neben einer Reaktion im ms-Bereich noch zwei zusätzliche Reaktionen im Sekundenbereich. Die *Hammerhead*-Ribozyme lagen somit ebenfalls in unterschiedlichen Konformationzuständen vor.

#### 5.2.8.1 Die *Hammerhead*-Ribozyme mit dem 2AP an der Spaltstelle

Bei den *Hammerhead*-Ribozymen HH1, HH2 und HH5 wurde das 2-Aminopurin-Ribonukleosid an der Position 1.1 — also in direkter Nachbarschaft zur Spaltstelle des Ribozyms — gegen ein Adenosin substituiert (s. Abb. 5.10).

**HH1** Die Kinetik des *Hammerhead*-Ribozyms HH1 wurde sowohl durch Temperatursprung- als auch durch *Stopped-Flow*-Messungen untersucht.

Bei den Temperatursprung-Experimenten (s. Kap. 4.6.2) wurden vor und nach der Zugabe des jeweiligen Metallions ( $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$ ) drei nahezu identische Relaxationseffekte nachgewiesen. Die Relaxationszeiten (s. Tab. 5.11) lagen in einem Bereich von  $\tau_1 = 20-65 \mu s$ ,  $\tau_2 = 0.4-4$  ms und  $\tau_3 = 10-30$  ms, wobei  $\tau_2$  und  $\tau_3$  mit zunehmender Metallionenkonzentration zunahm. Die Fluoreszenzampplituden lagen in einem Bereich von 0.4-3.0 % und wurden meist mit wachsender Metallionenkonzentration etwas kleiner.

Bei den *Stopped-Flow*-Experimenten (s. Kap. 4.7.2) wurde die Bindungsreaktion zwischen dem *Hammerhead*-Ribozym HH1 und dem jeweiligen Metallionen ( $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$ ) untersucht. Es wurden insgesamt drei Reaktionsgleichgewichte mit beiden Metallionen beobachtet. Die schnellste Zeitkonstante wurde bei ca. 3 ms gefunden. Die anderen beiden Zeitkonstanten wurden mit Hilfe der Fluoreszenz-Langzeitmessungen unter Korrektur einer Photoreaktion bestimmt und lagen für  $\tau_2$  bei ca. 40-50 s und für  $\tau_3$  bei ca.  $10^3$  s (s. Abb. 5.24 und s. Tab. 5.10).

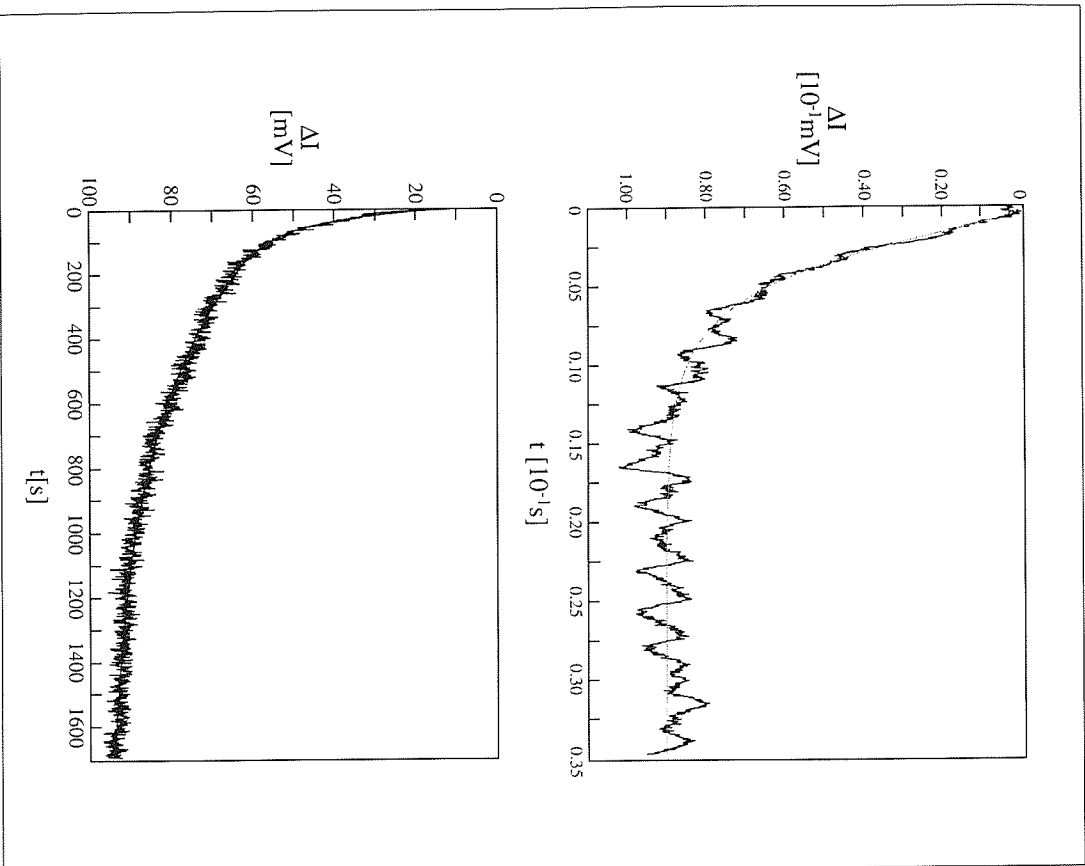


Abbildung 5.24: Stopped-Flow-Experiment mit  $1,6 \mu\text{M}$  Hammerhead-Ribozym HH1 und  $10 \text{ mM}$   $\text{Cd}^{2+}$  bei  $10^\circ\text{C}$ . Dargestellt ist die Änderung der Lichtintensität ( $\Delta I$ ) in Abhängigkeit von der Zeit  $t$ , wobei die durchgezogene Linie die Meßkurve und deren Anpassung mit einer Exponentialkurve repräsentiert. Die obere Abbildung zeigt den Zeitbereich bis  $35 \text{ ms}$  und die untere Abbildung den Zeitbereich bis  $1700 \text{ s}$ . Die Zeitkonstanten sind in Tab. 5.10 aufgeführt.

Tabelle 5.10: Zeitkonstanten  $\tau_i$  der Reaktion von  $1,6 \mu\text{M}$  Hammerhead-Ribozym HH1 und  $10 \text{ mM}$  Metallionen ( $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$ ) in TCN-Puffer bei  $10^\circ\text{C}$  aus den Stopped-Flow-Experimenten.

$\text{Me}^{2+}$ -Ion	$\tau_1$ [ms]	$\tau_2$ [s]	$\tau_3$ [ $10^3$ s]
Mg	3.3	50	1.6
Ca	2.7	38	0.5

**HH2** Neben dem 2-Aminopurin-Ribonukleosid an der Position 1.1 wurde bei dem Hammerhead-Ribozym HH2 zusätzlich an der Position 17 das 2'-Desoxy-2'-amino-cytidin anstelle des 2'-Desoxycytidins eingebaut (s. Abb. 5.10), wodurch die Ribozymaktivität ebenfalls unterdrückt werden konnte [107]. Bei den Temperatursprung-Experimenten (s. Kap. 4.7.2) wurden drei Relaxationseffekte entdeckt, die nahezu den gesamten beobachteten Zeitbereich abdeckten. Die Relaxationszeiten (s. Tab. 5.11) lagen in einem Bereich von  $\tau_1 = 50\text{--}100 \mu\text{s}$ ,  $\tau_2 = 2\text{--}5 \text{ ms}$  und  $\tau_3 = 30\text{--}60 \text{ ms}$ . Die Fluoreszenzamplituden wurden in einem Bereich von  $0,3\text{--}2,0 \%$  bestimmt und blieben mit zunehmender  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration innerhalb ihrer Fehlergrenzen konstant.

**HH5** Neben dem Einbau des 2-Aminopurinribonukleosids an der Position 1.1 wurde bei dem Hammerhead-Ribozym HH5 zusätzlich an der Position 14 ein Adenosin gegen ein Guanosin ausgetauscht (s. Abb. 5.10), wodurch die Spaltungsaktivität des Ribozyms drastisch reduziert werden konnte [136]. Die Temperatursprung-Experimente (s. Kap. 4.7.2) ermöglichten den Nachweis von drei Relaxationseffekten, die ebenfalls nahezu den gesamten beobachteten Zeitbereich abdeckten. Die Relaxationszeiten (s. Tab. 5.11) lagen in einem Bereich von  $\tau_1 = 100\text{--}400 \mu\text{s}$ ,  $\tau_2 = 2\text{--}10 \text{ ms}$  und  $\tau_3 = 100\text{--}250 \text{ ms}$  und wurden mit zunehmender  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration kleiner. Die Fluoreszenzamplituden wurden in einem Bereich von  $0,5\text{--}1,5 \%$  bestimmt und nahmen mit zunehmender  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration deutlich ab. Außerdem wurde bei Temperatursprung-Messungen bei  $8,1^\circ\text{C}$  noch eine Relaxationszeit bei ca.  $10 \mu\text{s}$  entdeckt.

5.2.8.2 Das *Hammerhead*-Ribozyme HH3

Beim *Hammerhead*-Ribozym HH3 wurde das 2-Aminopurin-Ribonukleosid an die Position 7 anstelle eines Uridin eingebaut (s. Abb. 5.10). Diese Position in der *Hammerhead*-Konsensus-Struktur ist nicht invariant und kann ohne Verlust der katalytischen Aktivität des *Hammerhead*-Ribozyms durch Ribonukleoside ohne Basenrest (*abasic nucleotides*) ersetzt werden [10].

Bei den Temperatursprung-Messungen (s. Kap. 4.7.2) bei 8,1°C und 10,6°C wurden drei Relaxationseffekte nachgewiesen (s. Abb. 5.25). Die Relaxationszeiten (s. Tab. 5.11) wurden mit zunehmender  $Mg^{2+}$ -Konzentration langsamer und lagen in einem Bereich von  $\tau_1 = 10\text{--}80\ \mu\text{s}$ ,  $\tau_2 = 0.2\text{--}1.0\ \text{ms}$  und  $\tau_3 = 3\text{--}10\ \text{ms}$ . Die Fluores-

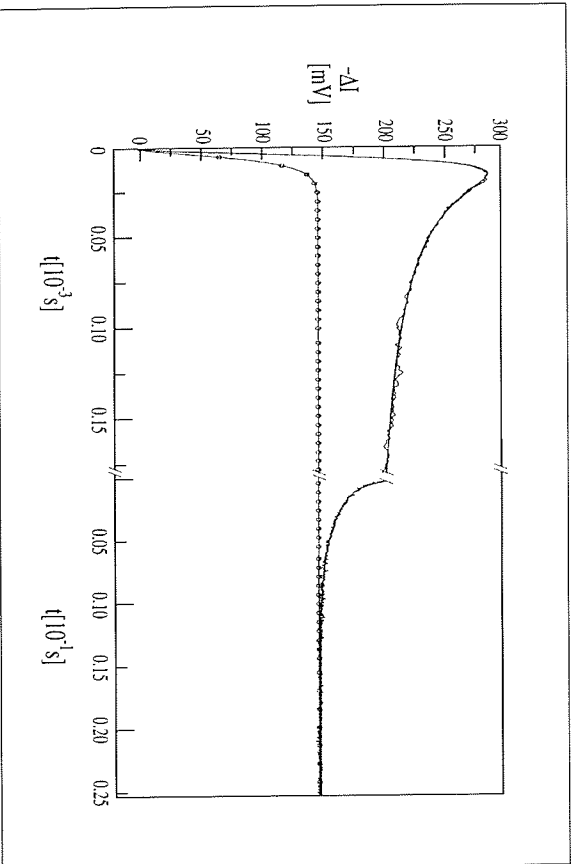


Abbildung 5.25: Temperatur sprung Relaxation von  $7,1\ \mu\text{M}$  HH3 und  $5\ \text{mM}$   $Mg^{2+}$  im TCN-Puffer bei  $10,6^\circ\text{C}$ . Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenzintensität ( $-\Delta I$ ) in Abhängigkeit von der Zeit ( $t$ ), wobei erstens die durchgezogenen Linien die Meßkurve und deren Anpassung mit einer Exponentialkurve und zweitens die durchgezogene Linie mit ( $\circ$ ) die entsprechende Referenzkurve des Tryptophans re-präsentieren. Die chemische Relaxationszeit wurde mit  $\tau_1 = 46\ \mu\text{s}$ ,  $\tau_2 = 0,4\ \text{ms}$  und  $\tau_3 = 3,4\ \mu\text{s}$  bestimmt.

## 5.2. KINETIK DER BINDUNGSGLEICHGEWICHTE

zenzamplituden wurden in einem Bereich von 0,6–2,0 % bestimmt und nahmen mit zunehmender  $Mg^{2+}$ -Konzentration in erster Linie bei den schnellen Relaxationseffekten deutlich ab.

5.2.8.3 Das *Hammerhead*-Ribozym HH4 mit dem 2AP im Loop 3

Beim *Hammerhead*-Ribozym HH4 wurde das 2-Aminopurin-Ribonukleosid an der Position L3.3 in einem GCAA-Termloop eingebaut (s. Abb. 5.10). Aufgrund der vielen Übereinstimmungen in der Primär- und Sekundärstruktur zu der *Hairpin*-Ribonukleinsäure HP2 wurden bei den Temperatursprung-Messungen vergleichbare Ergebnisse erwartet.

Bei den Temperatursprung-Experimenten (s. Kap. 4.7.2) bei 8,1°C und 10,6°C waren die Fluoreszenzamplituden der Relaxationseffekte in einem Bereich von 0,5–2 %. Bei 8,1°C wurde, wie schon bei den *Hairpin*-Ribonukleinsäuren, eine Anstiegszeit  $\tau_d$  im Bereich von 1,5–3,1  $\mu\text{s}$  und eine Anstiegszeit von ca. 2  $\mu\text{s}$  verwendet, so daß durch diese Herabsetzung der Nachweisgrenze zwei Relaxationseffekte nachgewiesen werden konnten. Die Relaxationszeiten (s. Tab. 5.11) lagen im Bereich von 5–7  $\mu\text{s}$  und 50–100  $\mu\text{s}$ ; und die Fluoreszenzamplituden nahmen mit steigender  $Mg^{2+}$ -Konzentration ab. Diese Beobachtungen sind nahezu identisch mit denen beim HP2. Bei 10,6°C kam jedoch ein weiterer Relaxationseffekt im ms-Bereich hinzu. Während mit zunehmender  $Mg^{2+}$ -Konzentration die Relaxationszeit im Bereich von 2–5 ms leicht zunahm, blieben die recht kleinen Fluoreszenzamplituden im Bereich ca. 0,5 % konstant.

Somit konnten bei dem *Hammerhead*-Ribozym HH4 insgesamt drei Relaxationseffekte, d. h. die Existenz von mindestens vier Konformationszuständen nachgewiesen werden, wobei drei davon aufgrund der Analogien zum HP2 auf strukturelle Veränderungen im Bereich der Haarnadel 3 hindeuten. Die vierte Konformation scheint mit einer strukturellen Veränderung in einem anderen Bereich des HH-Moleküls gekoppelt zu sein.

In der Tabelle 5.11 sind noch einmal alle beobachteten Relaxationszeiten  $\tau_1$  der *Hammerhead*-Ribozyme HH1–HH5 abschließend zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß bei allen Ribozymtypen ein Spektrum von Relaxationszeiten analysiert wurde. Da alle chemischen Relaxationseffekte schon vor der Zugabe von zweiwertigen Metallionen gefunden wurden, besaß jedes Ribozymmolekül mehrere unterschiedliche Konformationszustände. Die relativ kleinen Fluoreszenzamplituden und geringe Separation der Relaxationszeiten in dem untersuchten Zeitbereich erlaubten leider keine gesicherte quantitative Analyse der beobachteten Relaxationseffekte. Aufgrund der Empfindlichkeit der Reportergruppe 2AP kann vermutet werden, daß die beobachteten Relaxationseffekte teilweise lokale Konformationsänderungen in einem RNA-Molekül erfassen. Aufgrund der Vielzahl der Relaxationseffekte könnte ein *Inner-Sphere*-Komplex bei der Zugabe von den zweiwertigen Metallionen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  nur gefunden werden, wenn dessen relative Amplitude sehr groß ist. Ansonsten würde er von den vielen Relaxationseffekten, die die einzelnen Konformationszustände eines Ribozymmoleküls beschreiben, überlagert werden.

Tabelle 5.11: *Relaxationszeiten  $\tau_1$  der Hammerhead-Ribozyme HH1–HH5 aus den Temperatursprung-Messungen. Die Pfeile nach den Relaxationszeiten zeigen deren Gang mit zunehmender Metallionenkonzentration: ( $\uparrow$ )  $\triangleq$  wird größer (langsamer), ( $\downarrow$ )  $\triangleq$  wird kleiner (schneller) und ( $\updownarrow$ )  $\triangleq$  keine eindeutige Richtung erkennbar.*

RNA-Typ	Me <sup>2+</sup>	T [°C]	$\tau_1$ [ $\mu$ s]	$\tau_2$	$\tau_3$ [ms]
HH1	Ca	10.6	25–60	$\updownarrow$ 0.5–4.0 ms	$\uparrow$ 10–30
	Mg	10.6	20–65	$\updownarrow$ 0.4–2.0 ms	$\uparrow$ 10–20
HH2	Mg	10.6	40–100	$\updownarrow$ 2–5 ms	$\downarrow$ 30–60
HH5	Mg	10.6	100–400	$\downarrow$ 2–10 ms	$\downarrow$ 100–250
HH3	Mg	8.1	15–30	$\updownarrow$ 0.2–0.8 ms	$\uparrow$ 4–9
	Mg	10.6	40–80	$\updownarrow$ 0.2–1.0 ms	$\uparrow$ 3–10
HH4	Mg	8.1	5–7	$\updownarrow$ 50–100 $\mu$ s	$\downarrow$ –
	Mg	10.6	2–7	$\updownarrow$ 15–30 $\mu$ s	$\uparrow$ 2–5

## Kapitel 6

### Diskussion

Die Entdeckung von katalytisch wirksamen RNA-Molekülen, den Ribozymen, durch GECH [75] und ALTMAN [54] hat die Kenntnisse über die biologischen Funktionen der Ribonukleinsäuren wesentlich erweitert. Die Fähigkeit zur Katalyse ist bis dahin ausschließlich den Proteinen zugeordnet worden. Die Existenz der Ribozyme bedingt ein neues Verständnis der molekularen Evolution [50]. In der Medizin wird der Einsatz der Ribozyme als therapeutische Reagenzien für die Bekämpfung bestimmter Krankheiten intensiv erforscht.

Das *Hammerhead*-Ribozym ist eines der am besten charakterisierten Ribozyme [13, 16, 38, 39, 158, 170]. Für die Ausbildung seines aus 17 Nucleotiden bestehenden aktiven Zentrums werden weniger als 40 Nucleotide benötigt. Eine potentielle therapeutische Anwendung des *Hammerhead*-Ribozyms ist gerade wegen seiner geringen Größe von großem Interesse. Für die katalytische Aktivität ist die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen wie dem  $Mg^{2+}$ -Ion essentiell [32]. Das  $Mg^{2+}$ -Ion hat dabei nicht nur eine Struktur-stabilisierende Funktion, sondern ist auch direkt an der katalytischen Spaltungsreaktion beteiligt [127].

Die Aufklärung der Struktur und Dynamik des *Hammerhead*-Ribozyms ist deshalb für das Verständnis der katalytischen Aktivität genauso wichtig, wie die Position und die Art der Magnesiumbindung im Ribozym. Die Bestimmung von thermodynamischen Größen, wie den Bindungskonstanten, und die Untersuchung der Bindungskinetik sind ein wichtiger Beitrag dazu.

**Methoden** Für die Strukturanalyse von Makromolekülen und die Untersuchung von Reaktionskinetiken steht heute eine Vielzahl von biochemischen und biophysikalischen Methoden zur Verfügung. Im folgenden kann deshalb nur eine Auswahl der für die Thematik dieser Arbeit wichtigen Methoden diskutiert werden:

Eine Methode zur RNA-Strukturvorhersage, vor allem der Sekundärstruktur, basiert auf THERMODYNAMISCHEN STABILITÄTSBERECHNUNGEN [65, 175]. Die von diesen Programmen benutzten Algorithmen berechnen nicht nur die energetisch günstigste Sekundärstruktur, sondern können auch die Wahrscheinlichkeit aller möglichen Basenpaarungen in einer RNA berechnen [80]. Durch derartige Berechnungen konnten die Sekundärstrukturen des *Hammerhead*-Ribozyms und der *Hairpins* bestätigt werden. Außerdem konnten damit mögliche Sekundärstrukturen von den in dieser Arbeit untersuchten, dimerisierten Oligoribonukleinsäuren bestimmt werden. Die SCHMELZKURVENANALYSE [125] ermöglicht die Bestimmung von doppelhelikalen Bereichen in einer Nukleinsäurestruktur. Dabei wird ein temperaturinduzierter Übergang, der kooperativ abläuft, vom nativen zum denaturierten Zustand einer oder mehrerer (meistens zwei) Nukleinsäuren betrachtet. Wenn mehrere unterschiedliche, doppelhelikale Strukturen in einer Nukleinsäure vorhanden sind, besitzt die Nukleinsäure auch mehrere unterschiedliche Schmelzpunkte. Diese können in einer Schmelzkurve nur noch direkt bestimmt werden, wenn sie weit genug voneinander entfernt sind (Stufenfunktion). Die Höhe der dazu erforderlichen Temperatur wird bei genau definierten Reaktionsbedingungen wie Ionenstärke und pH-Wert durch die in der Struktur vorkommenden Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, Basenstapelung und elektrostatische Wechselwirkungen) bestimmt. Durch Schmelzkurvenanalysen konnten in dieser Arbeit sowohl eine *Hairpin*-Struktur als auch Doppelhelices aus zwei RNA-Molekülen nachgewiesen werden.

Neben der Bestimmung von Sekundärstrukturen lassen sich mit den folgenden Methoden auch Aussagen zur Tertiärstruktur machen. Bei der Analyse der ELEKTROPHORETISCHEN MOBILITÄT wird das unterschiedliche Laufverhalten von strukturell unterschiedlichen Makromolekülen in nativen Polyacrylamidgelen ausgenutzt. Durch Anlegen eines Temperaturgradienten können gerade bei komplexen Nukleinsäuren Schmelzkurven mit mehreren Übergängen gefunden werden, die die Destabilisierung

tertiärer und sekundärer Wechselwirkungen empfindlich nachweisen [130]. Ein Vorteil dieser gelelektrophoretischen Methode ist, daß kleinste Substanzmengen sehr schnell qualitativ untersucht werden können, wobei z. B. eine Mischung von geladenen Makromolekülen sehr gut getrennt wird und die Zahl der Einzelkomponenten direkt bestimmt werden kann. Aufgrund von Wechselwirkungen mit der Gelmatrix können jedoch immer störende Artefakte auftreten. Für die Struktur des *Hammerhead*-Ribozyms wurde mit dieser Methode in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen eine kollineare Anordnung der Helices I und II vorhergesagt, welche bei Zugabe von milimolaren  $Mg^{2+}$ -Mengen in die Y-förmige Gestalt übergeht.

Die Untersuchung des FLUORESCENZ-RESONANZ-ENERGIEÜBERTRAGERS (FRET) [27] ermöglicht es, die Entfernung in einem Bereich von 10–100 Å zweier an eine Nukleinsäure gekoppelter Fluorophore in Lösung mit großer Genauigkeit zu bestimmen. Dazu muß das Fluorophorenpaar, eine Donator- und Akzeptorgruppe, methodenbedingt meist an die Enden einer Nukleinsäure gekoppelt werden. Bei dieser Methode muß allerdings berücksichtigt werden, daß die natürliche Tertiärstruktur eines Moleküls durch den Einbau der recht großen Fluorophore beeinflußt und verändert werden kann. FRET-Messungen mit dem *Hammerhead*-Ribozym [163, 164] haben zwar die Y-förmige Helixstruktur bestätigt, jedoch keine Aussagen über die Kernstruktur zugelassen. Außerdem war die so bestimmte Tertiärstruktur mit der Röntgenstrukturanalyse nicht völlig konsistent, wobei durch spätere *cross-linking*-Studien [150] die Röntgenstrukturanalyse bestätigt wurde. Der Einbau der Fluorophore scheint die Tertiärstruktur verändert zu haben.

Zur Gewinnung von Sekundär- und Tertiärstrukturinformationen gibt es einige wichtige und leistungsfähige Methoden, wie die Röntgenstrukturanalyse, die NMR-Spektroskopie und die hydrodynamischen Methoden.

Die RÖNTGENSTRUKTURANALYSE [51] von Biomolekülen liefert sehr detaillierte Strukturen in atomarer Auflösung, welche durch die *Bragg*-Gleichung definiert ist. Für diese Beugungsmethode wird eine translatorisch geordnete Probe — ein Einkristall — benötigt. Die Züchtung dieser Kristalle ist gerade bei großen Molekülen wie Proteinen oder Nukleinsäuren sehr schwierig und bedarf großer praktischer Erfahrung. In den Makromolekülen werden zudem die Röntgenstrahlen auf-



grund des meist hohen Wassergehalts mit relativ schlechter Auflösung gebengt. Trotz der erfolgreichen und wichtigen Röntgenstrukturanalyse des *Hammerhead*-Ribozyms und der darin enthaltenen *Tetraloops* [108, 145, 146] müssen deren Ergebnisse immer kritisch betrachtet werden, denn diese Analyseform ist auf die Charakterisierung von im Kristall eingefrorenen Strukturen beschränkt. Aufgrund von Wechselwirkungen einzelner molekularer Gruppen im Kristall (Packungswechselwirkungen) muß die aus der Röntgenstrukturanalyse abgeleitete Tertiärstruktur nicht unbedingt mit der Konformation eines Moleküls in der Lösung übereinstimmen, in der das Molekül flexibel ist und vor allem seine biologische Funktion ausüben kann. Diese Problematik verdeutlicht auch die Röntgenstrukturanalyse des *Hammerhead-Ribozyms*. Eine Spaltungsreaktion nach dem vermuteten  $S_N2(P)$ -Mechanismus — die 2-Hydroxylylgruppe greift das Phosphoratom unter Inversion der Konfiguration an [74, 152, 166] — ist nach der Röntgenstruktur nur schwer vorstellbar. Eine Änderung der Konformation im Bereich der Spaltstelle ist notwendig, um einen erfolgreichen *in-line*-Angriff der 2-Hydroxylylgruppe zu ermöglichen.

Die NMR-SPEKTROSKOPIE (*nuclear magnetic resonance*) [12] ist ebenso wie die ESR-Spektroskopie (*electron spin resonance*), bei der Moleküle mit ungepaarten Elektronen untersucht werden können, eine Methode, die auf magnetischer Resonanz beruht. Die NMR-Spektroskopie liefert eine fast ebenso gute Auflösung der Struktur wie die Röntgenstrukturanalyse und ermöglicht z. B. auch die Untersuchung der Dynamik eines RNA-Moleküls in Lösung. Anhand des *Kern-Overhauser*-Effektes (NOE) können Informationen über die Abstände benachbarter Protonen gewonnen werden, und durch Spin-Spin-Kopplung lassen sich die Torsionswinkel eines RNA-Rückgrats bestimmen. Die multidimensionalen NMR-Techniken haben durch die Entwicklung der *Fourier*-Transformations-Spektrometer und die Untersuchung von anderen Kernen als Protonen, wie z. B.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{31}\text{P}$ , die Möglichkeiten zur Strukturklärung noch erweitert. Allerdings sind aufgrund der Vielzahl von atomaren Kopplungen die NMR-Spektren sehr komplex, so daß die Interpretation der NMR-Daten bisher nur bei kleineren Proteinen und Nukleinsäuren gelungen ist. Außerdem werden für die NMR-Messungen recht hohe Konzentrationen im millimolaren Bereich benötigt, so daß gerade bei größeren Makromolekülen Lösungsmittel wie TFA zur Vermeidung von Aggregationen hinzugegeben werden müssen.

NMR-Studien sind sowohl von GNRA-*Tetraloops* [62] als auch von UUCG-*Tetraloops* [167] angefertigt worden. Während es bei den ersten  $^1\text{H}$ -NMR-Studien von *Hammerhead*-Ribozymen noch Schwierigkeiten gab, alle drei Doppelhelices der Sekundärstruktur eindeutig nachzuweisen [60, 61], konnte durch neuere  $^1\text{H}$ -NMR-Studien und heteronukleare multidimensionale NMR-Studien sogar eine  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Faltung eines Ribozym-Substrat-Komplexes festgestellt werden [94, 151].

Die HYDRODYNAMISCHEN METHODEN liefern globale Strukturen von Proteinen und Nukleinsäuren in Lösung. Die aus der Translationsdiffusion (dynamische Lichtstreuung) und der Rotationsdiffusion (elektrooptische Verfahren, Fluoreszenzlebenszeit-Messungen) erhaltenen Strukturinformationen besitzen allerdings nicht, wie die Röntgenstrukturanalyse und die NMR-Spektroskopie, eine atomare Auflösung.

Die DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG [100] eignet sich nur für die Untersuchung von größeren Teilchen und benötigt auch eine hohe Konzentration dieser Teilchen. Da biologische Makromoleküle in hoher Konzentration die Tendenz zur Aggregation besitzen und deren Aufkonzentrierung in der Regel aufwendig und teuer ist, sind die Einsatzmöglichkeiten dieser Technik meist eingeschränkt. Die Genauigkeit dieser Methode ist durch die lediglich lineare Abhängigkeit des Translationsdiffusionskoeffizienten von den effektiven, hydrodynamischen Dimensionen des untersuchten Teilchens begrenzt.

Die Messung der ROTATIONSDIFFUSION von Biopolymeren mittels elektrooptischer Verfahren liefert detaillierte Informationen über globale Strukturen und deren Dynamik in Lösung. Bei diesem Verfahren wird eine feldinduzierte Ausrichtung des Biopolymers, wofür die Biopolymere einem elektrischen Feldpuls ausgesetzt werden, spektrophotometrisch z. B. durch die Änderung des Dichroismus oder der Doppelbrechung detektiert [47, 122]. Mit dieser hochempfindlichen Methode können Informationen über die Größe und Form eines untersuchten Biopolymers aufgrund der Abhängigkeit des Rotationsdiffusionskoeffizienten von der dritten Potenz des effektiven hydrodynamischen Volumens gefunden werden. Weiterhin kann auf diese Weise zwischen permanenten und induzierten Dipolmomenten unterschieden und die Größe eines Dipolmomentes bestimmt werden. Zusätzliche Informationen über die Lage der Chromophore im Molekül in Bezug auf den Dipolmomentvektor werden durch die Bestimmung des Grenzwertes des reduzierten Dichroismus für vollständige

Ausrichtung des Moleküls in Richtung des Feldvektors gefunden. Die bei den Untersuchungen der elektrophoretischen Mobilität [8] gefundenen Ergebnisse über die Orientierung der Helices mit und ohne  $Mg^{2+}$ -Ionen im *Hammerhead*-Ribozym sind mit den durch elektrische Doppelbrechung [2] erhaltenen Ergebnissen konsistent. Die globale Konformation des *Hammerhead*-Ribozyms während der Spaltungsreaktion wurde ebenfalls mit dieser Methode untersucht [3].

Die detailliertesten Strukturinformationen von allen hydrodynamischen Techniken werden durch die von ANTONIEWICZ und PÖRSCHKE entwickelte Methode der QUANTITATIVEN ELEKTROOPTIK [4, 5] erreicht. Eine quantitative Analyse der hydrodynamischen Struktur und der elektrostatischen und spektroskopischen Parameter kann durch den Vergleich von hydrodynamischen Simulationen mit den experimentellen Daten aus den elektrooptischen Methoden erstellt werden.

Bei der FLUORESCENZSPEKTROSKOPIE kann selektiv ein lokaler Reporter in ein Makromolekül eingebaut werden. Gegenüber der Absorptionsspektroskopie besitzt diese Methode den Vorteil, viel empfindlicher gegenüber Veränderungen in der Umgebung eines jeweiligen Chromophors zu sein [19b]. Durch die relativ lange Lebensdauer der angeregten Moleküle ist sie eine der effektivsten Methoden zur Untersuchung kinetischer Prozesse wie der Bindung von Liganden oder der Faltung von RNA-Molekülen (Konformationsänderungen). Eine weitere nützliche Eigenschaft der fluoreszierenden Moleküle ist ihre Fluoreszenzlöschung in wässrigen Lösungen, wohingegen in einer unpolaren oder starren Umgebung eine hohe Verstärkung ihrer Quantenausbeute beobachtet wird.

Die in dieser Arbeit verwendete Reportergruppe 2-Aminopurin-Ribonukleosid (2AP) [87, 108] eignet sich aus zwei Gründen besonders hervorragend als sensitiver Indikator von RNA-Strukturveränderungen, die z. B. auch bei der Bindung eines Metalls an eine RNA-Struktur auftreten können. Einerseits reagiert die fluoreszierende Gruppe des 2APs sehr empfindlich auf Veränderungen in den Wechselwirkungen der Basenstapelung, wobei mit zunehmender Basenstapelung eine Fluoreszenzlöschung zu beobachten ist. Andererseits sind die strukturellen Unterschiede zu den natürlich vorkommenden Basen sehr gering. Aus diesem Grund konnte das 2AP erfolgreich selektiv an beliebige Positionen des *Hammerhead*-Ribozyms eingebaut

werden [91, 162]. Die rechte hohe Quantenausbeute des „freien“ 2APs von ca. 0.7 [168] und ihre starke Abhängigkeit von der Umgebung ermöglichen schon bei relativ niedrigen RNA-Konzentrationen ( $\mu M$ ) die Untersuchung von RNA-Strukturen und von Metallbindungen an RNA-Molekülen. Dadurch wird auch der Verbrauch an wertvollem Material reduziert.

Spektroskopische Titrations wie z. B. die FLUORESCENZTITRATION erlauben die Untersuchung eines ungestörten Gleichgewichtes bei guter Reproduzierbarkeit. Eine Gleichgewichtseinstellung läßt sich leicht verfolgen und kann zur Identifizierung von langsamen Reaktionsschritten meist schon während der Titration benutzt werden. Außerdem erfolgt die Untersuchung des Gleichgewichtes direkt. Mit Hilfe der Fluoreszenztitrations mit den zweiwertigen Metallionen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  konnten lokale Metallionen-Bindungsplätzen identifiziert und thermodynamische Größen wie Bindungskonstanten und Quantenausbeuten bestimmt werden. Die Bindungskinetik konnte jedoch aufgrund der schnellen Gleichgewichtseinstellung ( $k \ll \text{min}$ ) nicht mit dieser Methode untersucht werden.

Die Aufklärung von Reaktionsmechanismen wird durch die Untersuchung der Wechselwirkungskinetik erreicht. Schnelle Reaktionen, wie Konformationsumwandlungen oder Metallionenbindungen im  $\mu s$ -ms Bereich, können nur mit Techniken analysiert werden, die eine hohe Zeitauflösung besitzen. Die RELAXATIONSMETHODEN und die MISCUNGSMETHODEN sind dazu in der Lage und ermöglichen über spektroskopische Detektion wie z. B. die Fluoreszenz die kontinuierliche Verfolgung einer Reaktion [11, 40, 117].

Sprungverfahren wie die TEMPERATURSPRUNG-METHODE gehören zu den Relaxationsmethoden. Da die Gleichgewichtskonstante einer chemischen Reaktion von den intensiven Größen, wie der Temperatur, dem Druck und der elektrischen Feldstärke (bei einer möglichen Änderung der Ladungsverteilung), abhängig ist, wird durch eine kleine Änderung dieser Parameter eine Gleichgewichtsänderung bewirkt und dadurch eine Reaktion zur Einstellung eines neuen Gleichgewichts induziert. Die Parameteränderung, wie bei der Kondensator- oder Koxialkabelentladung, erfolgt schnell ( $\mu s$  bzw. ns Bereich). Die Ansprechzeit des spektroskopischen Detektionssystems liegt etwa im gleichen Zeitbereich. Nur Reaktionen, die oberhalb dieses Zeit-

Bereiches ablaufen, können verfolgt werden. Die konventionellen Temperatursprungsapparaturen besitzen eine Zeitauflösung von  $10^{-6}$  Sekunden. Der relativ leichte Zugang zu diesem großen Zeitbereich von bis zu sechs Größenordnungen zeichnet die Temperatursprung-Methode aus. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in dem geringen Verbrauch der zu untersuchenden Substanz, weil einerseits das Reaktionsvolumen von einigen Mikro- bis Millilitern sehr klein ist und andererseits die Probe für mehrere Temperatursprünge benutzt werden kann. Durch den Austausch der Metallionen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  in Temperatursprung-Experimenten kann die Art der Metallionenbindung an ein Makromolekül analysiert werden [121], welche ein *Inner-Sphere*- oder *Outer-Sphere*-Komplex sein kann.

Von den Mischungsverfahren besitzt die STOPPED-FLOW-METHODE eine Zeitauflösung im ms-Bereich. Nach einer Mischung der Reaktionsteilnehmer einer chemischen Reaktion unter hohem Druck wird die chemische Reaktion mit Hilfe von spektroskopischer Detektion (Fluoreszenz oder Absorption) verfolgt. Der Vorteil gegenüber den klassischen Mischungsverfahren liegt in der schnellen Mischungsphase von bis zu 100  $\mu s$ . Außerdem ist der Verbrauch an der zu untersuchenden Substanz wesentlich geringer als bei den kontinuierlichen Mischungsverfahren.

**Ergebnisse** Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse entstanden im wesentlichen bei der Untersuchung der Bindungsgleichgewichte von zweiwertigen Metallionen an verschiedene RNA-Moleküle, insbesondere dem *Hammerhead*-Ribozym. Durch die Fluoreszenztitrations konnten thermodynamische Parameter der Bindungsgleichgewichte, wie Bindungskonstanten und Quantenausbeuten, bestimmt werden. Die Untersuchung der Dynamik der Metallbindung ermöglicht in einigen Fällen die Aufklärung von Reaktionsmechanismen und bei einigen RNA-Molekülen die Bestimmung von verschiedenen Konformationszuständen. Letzteres gelang auch schon in Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen.

Das 2-AMINOPURIN-RIBONUKLEOSID (2AP) selbst besitzt aufgrund seiner hohen Quantenausbeute von 0.7 [168] eine recht hohe Fluoreszenzintensität. In 2AP-substituierten Ribonukleinsäuren wurde eine teilweise deutliche Löschung der Fluoreszenzintensität um einen Faktor von 6 bis  $10^3$  beobachtet. Die Ursache für die Fluoreszenzlöschung liegt im Auftreten von Wechselwirkungen der Basenstapelung. Je stärker diese in einer RNA-Struktur sind, desto größer ist die Reduzierung der Fluoreszenz. Diese Beobachtung ist konsistent mit früheren Ergebnissen [168]. In den meisten Fällen wird die Fluoreszenz eines Chromophors in wässrigen Lösungen gelöscht und in unpolaren Lösungsmitteln um ein Vielfaches (bis zu 20-fach) verstärkt. Es ist jedoch bis heute nicht geklärt, in welchem Fall die Fluoreszenz eines Chromophors in wässriger Lösung gelöscht oder eben verstärkt wird. Bei den Kinetikuntersuchungen wurde kein chemischer Relaxationseffekt mit einer Zeitkonstante gefunden, die größer als ca. 4  $\mu s$  war. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich, denn die Relaxationszeit für die Basenstapelung von monomeren Basen liegt bei  $10^{-9}$  s, also um ca. drei Größenordnungen unterhalb der hier verwendeten Nachweisgrenze [112]. In Gegenwart von millimolaren Metallionenkonzentrationen in einem Überschuß von mehr als vier Größenordnungen gegenüber dem 2AP konnte keine Metallbindung beobachtet werden, die mit einer Fluoreszenzänderung verbunden war.

Die Oligoriboadenylnsäure OI<sub>3</sub> und die Oligoribouridylnsäure OI<sub>4</sub> sollten aufgrund ihrer Primärstruktur keine Sekundärstruktur ausbilden und deshalb als Referenzsys-

stem für die Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens von 2AP-substituierten Ribonukleinsäuren geeignet sein.

Die OLIGORIBOADENYLSÄURE OL13 zeigte im Abwesenheit von Metallionen in einem Zeitbereich über 4  $\mu$ s keinen chemischen Relaxationseffekt. Dies zeigt, daß 2AP als schneller Indikator von Veränderungen der Basenstapelung verwendet werden kann.

PORSCHKE [113] konnte mit einer Temperatursprung-Apparatur, die mit Hilfe einer Koxalalkabelentladung eine Aufheizzeit von ca. 50 ns besaß, auch ein Konformationsgleichgewicht bei Oligo- und Polyriboadenylnsäuren mit einer in Abhängigkeit von der Kettenlänge bestimmten Relaxationszeit von 0.1–1  $\mu$ s beobachten. Da diese Relaxationszeit unter der hier verwendeten Nachweisgrenze von ca. 4  $\mu$ s liegt, konnte dieser Effekt nicht gefunden werden. Der Effekt beschreibt eine Konformationsumwandlung in einer einzelsträngigen RNA-Struktur durch die Ausbildung von Basenstapelungswechselwirkungen. Die auffallend geringe Reduzierung der Fluoreszenzintensität des OL13 gegenüber dem „freien“ 2AP (nur Faktor 8) zeigt, daß die Basenstapelung im OL13 gering ist und keine Sekundärstruktur infolge von Basenpaarungen entstanden sein kann, weil sonst die Reduzierung deutlich größer wäre.

Bei Zugabe von Metallionen ( $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$ ) nahm die Fluoreszenzintensität um ca. 30 % zu. Die Bindungskonstanten für das Reaktionsmodell A mit einem unabhängigen Bindungsplatz für das jeweilige Metallion lagen mit etwa  $350 M^{-1}$  um ca. eine Zehnerpotenz niedriger als der von PORSCHKE [116] über Absorptions- und CD-Titrationsmessungen bestimmten Wert von  $2.6 \cdot 10^4 M^{-1}$  einer Oligoadenylnsäure mit einer Kettenlänge von 10 nt.

Bei den Temperatursprung-Experimenten wurde nur in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  ein Relaxationseffekt mit einer Zeitkonstanten von ca. 100  $\mu$ s beobachtet. Dieser konnte eindeutig der Bildung eines *Inner-Sphere*-Komplex zugeordnet werden. Die aus diesen Relaxationseffekt bestimmte Bindungskonstante für den IS-Komplex liegt mit 1.2 um ca. eine Zehnerpotenz höher als der entsprechende von PORSCHKE [116] bestimmte Wert. Der Grund für die Differenzen ist die unterschiedliche Ionenstärke der beiden Reaktionsmedien, die bei PORSCHKE um einen Faktor von ca.  $10^2$  niedriger lag. Die Bindungskonstante für den IS-Komplex liegt somit eher im Bereich der für den IS-Komplex von  $Mg^{2+}$  an tRNA<sup>Pro</sup> bestimmten Wert von 2–3 [77]. Dort war die

Relaxationszeit jedoch um einen Faktor 10 größer. Im Gegensatz dazu sind in Polyadenylnsäuren keine IS-Komplexe, sondern *Outer-Sphere*-Komplexe gefunden worden [115, 116]. Jedoch zeigt der IS-Komplex am OL13 zeigt insgesamt, daß die Reportergruppe 2AP grundsätzlich dazu in der Lage ist, IS-Komplexe an Ribonukleinsäuren anzuzeigen.

Bei der OLIGORIBOURIDYLSÄURE OL14 wurde ebenfalls bei Metallionenzugabe eine ca. 10 %ige Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet. Bei den Temperatursprung-Messungen konnte erst bei einer Metallionenkonzentration von 100 mM ein Relaxationseffekt mit einer Zeitkonstante von ca. 14–20  $\mu$ s festgestellt werden. Dieser Effekt wurde einem intramolekularen *Coil-Helix*-Übergang zugeordnet, welchen auch schon DOURENT und Mitarbeiter [36] bei einer Polyuridylnsäure mit einer Kettenlänge von 31 nt mit nahezu der gleichen Relaxationszeit entdeckt haben. Die *Helix*-Form entsteht dabei durch eine intramolekulare Basenpaarung zu einer *Hairpin*-Struktur. Auffallend war jedoch, daß die Relaxationszeit mit zunehmender Temperatur kleiner wurde. Dieses ungewöhnliche Verhalten bedarf einer weiteren Aufklärung.

Die OLIGORIBONUKLEINSÄUREN OL11 und OL12 waren ursprünglich als Referenzsysteme gedacht. Im Laufe der kinetischen Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß sie durch Basenpaarungen zur Dimerisierung neigen. In Abhängigkeit von der RNA-Konzentration konnte bei beiden RNAs jeweils ein Relaxationseffekt im ms-Bereich einer Dimerisierungsreaktion zugeordnet werden. Die daraus bestimmten Bindungskonstanten lagen im Bereich von  $10^3$ – $10^4 M^{-1}$ , wobei die Bindungskonstanten mit zunehmender Temperatur abnahmen. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Dimerisierung lagen bei  $10^5 M^{-1}s^{-1}$ . Mit Hilfe von Computerprogrammen, welche die thermodynamische Stabilität von RNA-Strukturen berechnen, konnten die möglichen Sekundärstrukturen analysiert werden. Damit ließ sich die um den Faktor 10 größere Bindungskonstante des Dimers von OL11 erklären, dessen Sekundärstruktur zwei zusätzliche G-U Basenpaare besaß. PORSCHKE und EIGEN [110, 111] haben die vollständige Doppelstrangbildung von Oligoriboadenylnsäuren und Oligoribouridylnsäuren in Abhängigkeit von der Kettenlänge und der Temperatur untersucht. Die von ihnen bestimmten Parameter für die Ausbildung einer Doppelhelix lagen in

der gleichen Größenordnung wie die der Dimere von OH1 bzw. OH2.

Gegenüber dem „freien“ 2AP war die Fluoreszenzintensität von OH1 bzw. OH2 ca. um den Faktor 50 geringer. Bei Zugabe von Metallionen wurde diese Fluoreszenzintensität beim OH1 nochmals um ca. 10 % gelöscht, jedoch beim OH2 um ca. 55 % verstärkt. In vollständig gepaarten A-RNA Doppelhelices ist die Fluoreszenzlösung noch deutlich höher. Nach der langsamen Aneinanderlagerung (*Annealing*) der komplementären Einzelstränge von OH1 bzw. OH2 ist eine bis zu 1000-fache Reduzierung der Fluoreszenzintensität festgestellt worden. Eine kooperative Absorptionsänderung bei der jeweiligen Schmelzkurvenanalyse der aneinander gelagerten Oligoribonukleinsäuren OH1 bzw. OH2 war in beiden Fällen ein eindeutiger Beleg für die Anwesenheit eines Doppelstranges, wobei aufgrund des höheren GC-Gehaltes bei der doppelsträngigen Oligoribonukleinsäure dsOH1 mit 66°C ein um 25°C höherer  $T_M$ -Wert gefunden wurde als bei dem OH2.

Die HAIRPIN-RIBONUKLEINSÄUREN HP1 und HP2 sind ein Strukturelement der in dieser Arbeit untersuchten *Hammerhead*-Ribozyme. Trotz der geringen Unterschiede in der Primär- und Sekundärstruktur wurde bei den durchgeführten Untersuchungen ein sehr unterschiedliches Verhalten beobachtet.

Gegenüber dem „freien“ 2AP wurde die Fluoreszenzintensität beim HP1 nur um den Faktor 6-8, beim HP2 jedoch um den Faktor 50 gelöscht. Diese Befunde lassen sich mit Hilfe der durch NMR-Studien [62] und Röntgenstrukturanalysen [108, 145] von *Hammerhead*-Ribozymen erhaltenen Sekundär- und Tertiärstruktur dieser *Tetraloops* vom Typ GNRA leicht erklären. Während die Nukleotidbase an der Position L1.3 (HP2) mit beiden direkten Nachbarn Wechselwirkungen der Basenstapelung unterliegt und somit eine große Fluoreszenzlösung besitzt, ging die Nukleotidbase an der Position L1.2 nur mit einem Nachbarn (Position L1.3) diese Wechselwirkungen ein. Aufgrund der stabilen Basenpaarungen im doppelhelikalen Bereich waren die hohen  $T_M$ -Werte beider *Hairpins* von über 80°C im TCN-Puffer zu erwarten und bestätigten so indirekt die sehr stabile Sekundärstruktur.

Bei Temperatursprung-Experimenten konnten schon vor der Zugabe von Metallionen Relaxationseffekte (beim HP1 einer und beim HP2 zwei) mit Zeitkonstanten in einem Bereich von 5-40  $\mu$ s festgestellt werden. Da diese Effekte keine RNA-

Konzentrationsabhängigkeit zeigten, handelt es sich um intramolekulare Konformationsänderungen. Die *Hairpin*-Ribonukleinsäuren besitzen somit zwei bzw. drei verschiedene Konformationszustände.

Heus und PARDI [62] fanden bei ihren  $^1\text{H}$  NMR-Studien an diesen *Tetraloops* nur eine Konformation. Die Zeitauflösung der NMR-Spektroskopie beträgt  $10^{-3}$  s. Dies ist die Zeit, die für die Umorientierung des Kernspins notwendig ist. Die von HEUS und PARDI vorgeschlagene Struktur stellt einen Mittelwert der tatsächlich in Lösung vorliegenden unterschiedlichen Strukturen dar. Mit einem Temperatursprung können dagegen Reaktionen bis zu einer Zeitauflösung von ca.  $10^{-6}$  s nachgewiesen werden. Die Temperatursprung-Methode ist somit für die Untersuchung von schnellen Reaktionen besser als die NMR-Spektroskopie geeignet.

Die Natur der Konformationsumwandlungen konnte nicht geklärt werden. PORSCHKE [114] hat in einer  $\text{A}_6\text{C}_6\text{U}_6$ -*Hairpin*-Struktur für die *Helix-coil*-Umwandlung eine Relaxationszeit von 46-34  $\mu$ s in einem Temperaturbereich von 4-14°C gefunden. Aufgrund der thermodynamisch sehr stabilen Basenpaarungen in den *Hairpins* HP1 und HP2 ist zu erwarten, daß das Gleichgewicht einer *Helix-coil*-Umwandlung bei einer Meßtemperatur von 10°C fast ausschließlich auf der Seite der stabilen Helixstruktur liegt. Daher bleibt unklar, welchen Konformationszuständen die beobachteten Relaxationseffekte zugeordnet werden können.

Bei der Titration mit Metallionen nahm beim HP1 die Fluoreszenzintensität um 40-50 % zu und beim HP2 um 10-20 % ab. Die Bindungskonstanten  $K_1$  und  $K_2$  für das Reaktionsmodell B mit zwei voneinander unabhängigen Bindungsplätzen lagen bei 660-4770  $\text{M}^{-1}$  und 14-97  $\text{M}^{-1}$ . Die hohen Bindungskonstanten im Bereich von  $10^3 \text{ M}^{-1}$  wurden bei Messungen im T-Puffer beobachtet, dessen geringere Ionenstärke gegenüber dem TCN-Puffer eine stärkere Metallbindung induziert. Auffällig war außerdem, daß die Besetzung eines Bindungsplatzes durch Metallionen nur in einem Fall des HP2 zu einer Fluoreszenzlösung führte.

Die experimentellen Daten konnten an unterschiedliche Reaktionsmechanismen angepaßt werden. Dafür wurden beim HP1 die thermodynamischen Parameter der starken Metallbindung ( $K_1$ ,  $q_1$ ) und beim HP2 die der schwachen Metallbindung ( $K_2$ ,  $q_2$ ) benutzt, um eine Anpassung mit ausreichender Genauigkeit zu erreichen. Diese freie Auswahl ist legitim, weil die beiden Bindungsplätze bei beiden *Hairpin*-

Ribonukleinsäuren unabhängig voneinander sind.

Die sehr unterschiedlichen Beobachtungen beim HP1 und HP2 zeigen einmal mehr die lokale Empfindlichkeit der Reportergruppe 2AP. Schon geringe Veränderungen in der Umgebung des Chromophors wirken sich auf dessen Fluoreszenz aus.

Bei den HAMMERHEAD-RIBOZYMEN HH1-HH5 waren die jeweiligen Fluoreszenzlösungen mit einem Faktor von 30 bis 130 gegenüber dem „freien“ 2AP sehr unterschiedlich. Die Wechselwirkungen der Basenstapelung sind beim 2AP-substituierten HH5 (2AP an der Position 7) am schwächsten und beim HH2 (2AP an Spaltstelle) am stärksten. Im TCN-Puffer ist aufgrund der höheren Ionenstärke die Reduzierung der Fluoreszenzintensität noch ausgeprägter.

Die Bindung von Metallionen an das *Hammerhead*-Ribozym wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. Die kinetischen Studien zur Spaltungsrate [32; 52, 104] und Studien mit substituierten chiralen Phosphorthioaten an der Spaltungsstelle [32, 74, 152] haben ein detailliertes Bild von der Metallbindung an der Spaltungsstelle geliefert. Der daraus abgeleitete  $S_N2(P)$ -Mechanismus für die Spaltungsreaktion beinhaltet eine Bindung eines zweiwertigen Metallions wie  $Mg^{2+}$  an das *pro-Rp*-Sauerstoffatom der Phosphatgruppe an der Position  $X_{17}$ . Vor allem durch weitere strukturaufklärende Untersuchungen, wie Röntgenstrukturanalyse [108, 145, 146] und NMR-Studien [60, 61, 93, 94, 99, 151], wurden einerseits die strukturstabilisierende Wirkung und andererseits die direkte katalytische Wirkung des  $Mg^{2+}$ -Ions bestätigt. Bindungen des  $Mg^{2+}$ -Ions an andere Positionen des RNA-Moleküls als an der Spaltstelle wurden ebenfalls entdeckt. So konnte z. B. eine Metallbindung an das  $G_3$  im aktiven Zentrum durch Messungen der gelelektrophoretischen Mobilität gefunden werden [8]. Die Natur der  $Mg^{2+}$ -Bindung an der Spaltstelle ist bis heute jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Während KOIZUMI und OHTSUKA [74] einen *Outer-Sphere*-Komplex des  $Mg^{2+}$ -Ions mit einer Bindungskonstante von  $10^4 M^{-1}$  postulierten, konnte an einem *pro-Rp*-Schwefelatom der Thiophosphatgruppe der Position  $X_{17}$  mit  $Hg^{2+}$ -Ionen ein *Inner-Sphere*-Komplex bestimmt werden [29].

Die doppelte Rolle der  $Mg^{2+}$ -Ionen in der katalytischen Spaltungsreaktion des *Hammerhead*-Ribozyms wurde durch die Untersuchung der Bindungsgleichgewich-

te mit Metallionen näher charakterisiert. Bei der Zugabe von Metallionen konnte in fast allen Fällen eine Fluoreszenzlösung beobachtet werden. Diese lag in einem Bereich von 0-57%. Die maximale Fluoreszenzlösung von 57% wurde beim HH5 in TCN-Puffer unter  $Mg^{2+}$ -Zugabe beobachtet. Nur beim HH4 wurde eine Verstärkung der Fluoreszenz für die Besetzung des zweiten Bindungsplatzes gefunden. Während die experimentellen Daten der Fluoreszenztitrations von HH1-4 an das einfache Reaktionsmodell A mit einem unabhängigen Bindungsplatz angepaßt werden konnten, wurde bei den Werten von HH5 und einer Titration von HH4 das Reaktionsmodell B mit zwei voneinander unabhängigen Bindungsplätzen benötigt. Die analysierten Bindungskonstanten  $K_1$  und  $K_2$  für die Metallionen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  lagen im Bereich von  $510-7580 M^{-1}$  und  $12-72 M^{-1}$ , wobei die im T-Puffer gefundenen Bindungskonstanten im Vergleich zu denen im TCN-Puffer um den Faktor 2-3 höher waren. Auffallend hoch war die Bindungskonstante des  $Mg^{2+}$ -Ions an das HH4 im T-Puffer mit  $7580 M^{-1}$ . Insgesamt nahm die Höhe der Bindungskonstanten von der Oligonucleotidsäure  $OH_3$  über die *Hairpin*-Ribonukleinsäuren HP1 und HP2 zu den *Hammerhead*-Ribozymen kontinuierlich zu, wobei im Falle von zwei Bindungsstellen die erste Bindungskonstante um 1-2 Größenordnungen größer ist als die zweite. Aufgrund von elektrostatischen Kopplungen [79, 129] nimmt die Stärke der Bindung mit zunehmender lokaler Phosphatkonzentration in der Umgebung des Bindungsplatzes zu. Die Ladungsdichte steigt proportional zur Anzahl der Phosphatreste und somit zu der Kettenlänge der untersuchten RNA-Moleküle. Diese Betrachtung ist jedoch stark vereinfacht, weil gerade die Sekundär- und die Tertiärstruktur auf lokale Ladungsdichten einen Einfluß haben. Eine detaillierte Betrachtung und Einschätzung der analysierten lokalen Bindungskonstanten in den *Hammerhead*-Ribozymen in Abhängigkeit von der RNA-Struktur sind bei MENER *et al.* [82] zu finden. Prinzipiell ist jedoch bei diesen Bindungsgleichgewichten zu berücksichtigen, daß eine Fluoreszenzänderung nicht zwingend eine Bindung des Metallions an die chromophore Gruppe beinhaltet, sondern die Fluoreszenzänderung auch auf einer lokalen oder auch globalen Konformationsänderung in der näheren Umgebung der Reportergruppe 2AP aufgrund einer Metallbindung an einer nicht explizit zu definierenden Stelle beruhen kann.

Mit Hilfe der Kinetikuntersuchungen sollte die Natur der  $Mg^{2+}$ -Bindung und de-

ren Reaktionsmechanismen aufgeklärt werden. Jedoch wurden schon in Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen bei allen 2AP-substituierten *Hammerhead*-Ribozymen 2-3 Relaxationseffekte gefunden, die meist den gesamten beobachteten Zeitbereich ( $10^{-6}$ -1 s beim Temperatursprung) abdeckten. Jedes *Hammerhead*-Ribozym besitzt somit mindestens 3-4 Konformationszustände. Es ist allerdings zu vermuten, daß weitere Effekte von diesen drei Relaxationseffekten überlagert werden. Die beobachteten Relaxationseffekte waren trotz der unterschiedlichen Positionen des Fluoreszenzindikators 2AP in den *Hammerhead*-Ribozymen bis auf wenige Ausnahmen gleich. Daher sind sie vermutlich globalen Konformationsänderungen zuzuordnen.

Im Falle des HH5, bei dem ein 2AP an der Spaltstelle und ein Adenin gegen ein Guanin substituiert wurde, war eine um eine Größenordnung größere Zeitkonstante zu beobachten. Dieser Relaxationseffekt kann auf einer lokalen Konformationsänderung beruhen.

Beim HH4 konnte, wie erwartet, eine große Analogie zum HP2 festgestellt werden, wobei ein weiterer Relaxationseffekt im Millisekundenbereich einer globalen Konformationsänderung zuzuordnen ist. Aufgrund der Vielzahl an Relaxationszeiten bei *Hammerhead*-Ribozymen ist es relativ schwer, bei der Metallionenzugabe einen zusätzlichen Relaxationseffekt zu finden. Die Analyse eines solchen Effektes wäre nur dann einfach gewesen, wenn dessen Fluoreszenzampplituden sehr groß gewesen wären oder eine andere Richtung gegenüber den vorhandenen Effekten gehabt hätten. Diese Hoffnung bestätigte sich leider nicht; der Gang der gefundenen Relaxationszeiten mit zunehmender Metallionenkonzentration war sehr unterschiedlich und konnte teilweise überhaupt nicht zugeordnet werden. Die meist sehr kleinen relativen Fluoreszenzampplituden sind ein Hauptgrund dafür.

Beim *Hammerhead*-Ribozym HH1 konnten durch *Stopped-Flow*-Experimente noch weitere Bindungsgleichgewichte mit insgesamt drei Relaxationszeiten im Millisekunden- und Sekundenbereich gefunden werden, die jedoch bei der Reaktion mit beiden Metallionen ( $Mg^{2+}$  bzw.  $Ca^{2+}$ ) auftraten.

Somit konnte kein eindeutiger Nachweis für den vermuteten *Inner-Sphere*-Komplex des  $Mg^{2+}$ -Ions an das *Hammerhead*-Ribozym erbracht werden. Die Natur der Magnesiumbindung, insbesondere an der Spaltstelle, bleibt also weiter ungeklärt.

## Kapitel 7

### Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Struktur und Dynamik von Oligoribonukleinsäuren und *Hammerhead*-Ribozymen charakterisiert werden. Dabei wurde das Potential des 2-Aminopurins als Fluoreszenzindikator ausgenutzt. Die Natur der Bindung von zweiwertigen Metallionen, insbesondere von  $Mg^{2+}$ , an 2-Aminopurin-substituierte Nukleinsäuren stand dabei im Vordergrund. Im Falle der *Hammerhead*-Ribozyme sollte versucht werden, den Mechanismus der  $Mg^{2+}$ -abhängigen Spaltungsreaktion weiter aufzuklären.

Das 2-Aminopurin-Ribonukleosid (2AP) eignete sich nicht nur aufgrund seiner Struktur analogie zu den natürlich vorkommenden Nukleotiden, sondern vor allem wegen seiner fluoreszierenden Gruppe gut als Fluoreszenzindikator in Ribonukleinsäuren. Die Fluoreszenz des 2APs reagiert auf Veränderungen in den Wechselwirkungen der Basenstapelung von Nukleinsäuren sehr empfindlich. Zur Bestimmung des Potentials des Fluoreszenzindikators 2AP wurde das 2AP sowohl in Oligoribonukleinsäuren der Kettenlänge von 12-15 nt als auch an unterschiedlichen Positionen des *Hammerhead*-Ribozyms eingebaut, wobei die Oligoribonukleinsäuren in einigen Fällen sehr unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstrukturen besaßen.

Die sehr sensitive Fluoreszenzänderung des 2-Aminopurins, die schon auf geringe lokale Konformationsänderungen in der näheren Umgebung des Fluoreszenzindikators reagiert, hat die Untersuchung der Bindungsgleichgewichte der zweiwertigen

Metallionen  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  mit den 2AP-substituierten RNA-Molekülen mit Hilfe von Titrationsmessungen ermöglicht. In Abhängigkeit von der Substitutionsposition des 2APs und der RNA-Struktur selbst konnte sowohl eine Reduzierung (z. B. bei fast allen *Hammerhead*-Ribozymen) als auch eine Verstärkung (z. B. beim *Hairpin* HP1) der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Sie lag für beide Richtungen im Bereich von ca. 0–60 %, wobei für die Bindung der beiden verwendeten Metallionen kein unterschiedliches Verhalten gefunden wurde. Eine Anpassung der experimentellen Daten der Fluoreszenztitrations an ein einfaches Reaktionsmodell mit einem oder zwei voneinander unabhängigen Metallbindungsplätzen ermöglichte die Bestimmung thermodynamischer Größen, wie die Bindungskonstanten der Metallionen, die bei den in dieser Arbeit untersuchten Ribonukleinsäuren im Bereich von  $10^{-10}$  bis  $10^5 M^{-1}$  lagen.

Der große Bereich der Bindungskonstanten für die *Hammerhead*-Ribozyme von 12 bis  $7600 M^{-1}$  im T-Puffer zeigte die Anwesenheit vieler Bindungsplätze mit teilweise sehr unterschiedlicher Bindungsaffinität. Die über die Spaltungsrate des Ribozyms im T-Puffer bestimmte Bindungskonstante lag mit  $100 M^{-1}$  im unteren Bereich der gefundenen Werte [52, 104].

Bei Temperatursprung-Experimenten zur Untersuchung der Kinetik an einer 2AP-substituierten Oligoriboadenylnsäure wurden im Zeitbereich über 4  $\mu s$  keine Relaxationseffekte gefunden. Damit wird gezeigt, daß 2AP als schneller Indikator von Veränderungen der Basenstapelung verwendet werden kann.

In Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen wurde an der 2AP-substituierten Oligoriboadenylnsäure ein Relaxationseffekt mit einer Zeitkonstanten von ca. 100  $\mu s$  beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde bei Zugabe von  $Ca^{2+}$ -Ionen kein Relaxationseffekt gefunden. Somit konnte der Relaxationseffekt beim  $Mg^{2+}$ -Ion eindeutig einem *Inner-Sphere*-Komplex mit einer Bindungskonstanten von 1.20 zugeordnet werden. Dies zeigt, daß der Fluoreszenzindikator 2AP prinzipiell dazu in der Lage ist, IS-Komplexe anzuzeigen.

Eine RNA-Konzentrationsabhängigkeit eines Relaxationseffektes konnte bei zwei Hetero-Oligoribonukleinsäuren entdeckt werden. Dieser konnte einer Dimerisierungsreaktion unter Ausbildung einer Doppelhelix zugeordnet werden.

Bei den *Hairpin*-Ribonukleinsäuren mit einem GNRA-*Tetraloop* wurden aufgrund der beobachteten Relaxationseffekte zwei (HP1) bzw. drei (HP2) Konformationszustände mit Relaxationszeiten im  $\mu s$ -Bereich gefunden. HEUS und PARDI [62] fanden bei ihren  $^1H$ -NMR-Studien an diesen *Tetraloops* nur eine Konformation. Die Zeitauflösung der NMR-Spektroskopie beträgt  $10^{-3}$  s. Mit einem Temperatursprung können dagegen Reaktionen bis zu einer Zeitauflösung von ca.  $10^{-6}$  s nachgewiesen werden. Die Temperatursprung-Methode ist somit für die Untersuchung von schnellen Reaktionen besser geeignet als die NMR-Spektroskopie.

Anhand von Temperatursprung- und *Stopped-Flow*-Experimenten wurde die Topographie der Dynamik von 2AP-substituierten *Hammerhead*-Ribozymen untersucht. Bei jedem der fünf unterschiedlich substituierten Ribozyme konnten vier Konformationszustände nachgewiesen werden. Die Zeitkonstanten der Relaxationseffekte lagen in einem Zeitbereich von 10  $\mu s$  bis 250 ms. Trotz der unterschiedlichen Positionen des Fluoreszenzindikators 2AP waren die beobachteten Relaxationseffekte bis auf wenige Ausnahmen gleich. Vermutlich sind sie daher globalen Konformationsänderungen zuzuordnen.

In einem Fall wurde eine um eine Größenordnung größere Zeitkonstante ermittelt. Dieser Relaxationseffekt kann auf einer lokalen Konformationsänderung beruhen. Die schnellen Relaxationseffekte eines der *Hammerhead*-Ribozyme waren nahezu identisch mit denen des an gleicher Position substituierten *Hairpins*. Zusätzlich konnten durch *Stopped-Flow*-Experimente für die Bindung von Metallionen an ein *Hammerhead*-Ribozym mit 2AP an der Spaltstelle zwei weitere Reaktionszeitkonstanten im Sekundenbereich bestimmt werden.

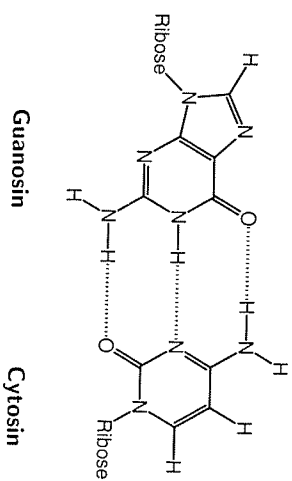
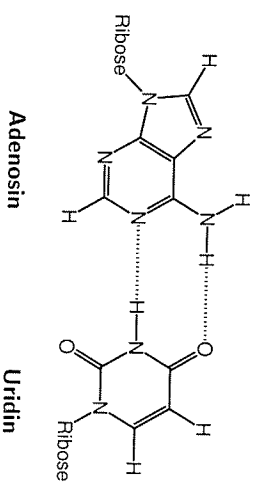
Obwohl an einer 2AP-substituierten Oligoriboadenylnsäure gezeigt wurde, daß mit Hilfe des Fluoreszenzindikators ein *Inner-Sphere*-Komplex prinzipiell nachgewiesen werden kann, wurde kein IS-Komplex am *Hammerhead*-Ribozym gefunden. Eine mögliche Bildung eines *Inner-Sphere*-Komplex wurde von der Vielzahl der Relaxationseffekte überdeckt.



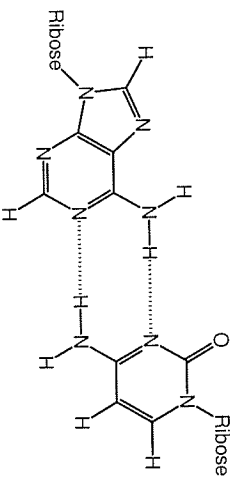
# Anhang A

## Basenpaarungen

### A.1 Watson-Crick-Basenpaare

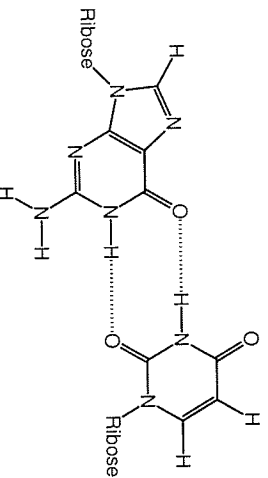


## A.2 Wobble-Basenpaare



Adenosin

Cytosin



Guanosin

Uridin

## Anhang B

Parameter der  
Fluoreszenztitrationen

## B.1 Gesamtbindungskonstante der Metallbindung

Meist erfolgt die Bindung eines Metallions an eine RNA nicht über einen, sondern über mehrere Elementarschritte. Die Gesamtgleichgewichtskonstante ( $K$ ) der Metallbindung, welche z. B. aus den Fluoreszenztitrationen bestimmt werden kann (s. Kap. 4.5), ist eine Funktion der Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Elementarschritte. Die Bestimmung einer solchen Abhängigkeit wird im folgenden an einem Beispiel demonstriert. Ausgangspunkt ist der Reaktionsmechanismus Modell II (s. Kap. 2.3.4):



mit

$$K_1 = \frac{k_1^+}{k_1^-} = \frac{[C]}{[A][Me]} \quad \text{und} \quad K_2 = \frac{k_2^+}{k_2^-} = \frac{[D]}{[C]} \quad (\text{B.2})$$

Für die Bestimmung der Gesamtgleichgewichtskonstante ( $K$ ) von der Bindung des Metallions ( $Me$ ) wird folgende Beziehung verwendet:

$$K = \frac{[C] + [D]}{[A][Me]} \quad (\text{B.3})$$

Einsetzen der Gleichungen B.2 und anschließende Umformung liefern die Lösung:

$$K = \frac{[C] + K_2 [C]}{[C] (K_1 [Me]^{-1} [Me])} = K_1 (1 + K_2) \quad (\text{B.4})$$

## B.2 Gesamtfloreszenzfaktor der Metallbindung

Die Fluoreszenzintensität einer Substanz wird durch die Gleichung 2.3 beschrieben. Eine wäßrige Lösung enthält jedoch oft mehrere verschiedene fluoreszierende Substanzen oder eine Substanz in verschiedenen Konformations- oder Bindungszuständen mit unterschiedlichen Konzentrationen ( $c_i$ ) und Quantenausbeuten ( $\Phi_{Fi}$ ). Im letzteren Fall ist die Änderung der Extinktionskoeffizienten der Spezies  $i$  so vernachlässigbar klein, daß die Gesamtfloreszenzintensität der Lösung nur noch bestimmt wird durch

$$F(\lambda) = k \sum_{i=1}^i c_i \Phi_{Fi} \quad \text{mit} \quad k = 2.303 \cdot \epsilon(\lambda) \cdot d \cdot I_0 \cdot f(\lambda) \cdot \delta. \quad (\text{B.5})$$

Die Abhängigkeit des Gesamtfloreszenzfaktors einer Metallbindung von den Quantenausbeuten einzelner Zustände wird am folgenden Beispiel demonstriert. Ausgangspunkt ist erneut der Reaktionsmechanismus des Modells II (s. Kap. 2.3.4):



Aufgrund der Massenerhaltung gilt weiterhin für die Ausgangskonzentration  $[A]_0$ :

$$[A]_0 = [A] + [C] + [D] \quad (\text{B.7})$$

Der Gesamtfloreszenzfaktor ( $\Delta$ ) ist der Quotient aus der Fluoreszenzintensität vor und nach der Metallbindung:

$$\Delta = \frac{F(\lambda)_{\text{nach Bindung}}}{F(\lambda)_{\text{vor Bindung}}} \quad (\text{B.8})$$

Wenn der Ligand, das Metallion  $Me$ , im Überschuß vorliegt, und die RNA-Bindungsplätze nahezu vollständig besetzt werden, kann der Fluoreszenzanteil von der Spezies

A an der Gesamtfloreszenz nach der Metallbindung vernachlässigt werden. Mit Gleichung B.5 und unter Berücksichtigung der obigen Reaktionsgleichung gilt:

$$\Delta = \frac{F_C + F_D}{F_{A_0}} = \frac{[C] \Phi_C + [D] \Phi_D}{[A_0] \Phi_A} \quad (\text{B.9})$$

Mit der Definition von  $\alpha$  und  $\beta$  als Quantenausbeuten von  $[C]$  und  $[D]$  relativ zu der von  $[A]$  gilt:

$$\Delta = \frac{[C] \alpha + [D] \beta}{[A_0]} = \frac{[C] \alpha + [C] K_2 \beta}{[A_0]} \quad (\text{B.10})$$

Unter Berücksichtigung der Massenerhaltung ergibt sich aus dem obigen Reaktionsschema:

$$K_2 = \frac{[D]}{[C]} = \frac{[A]_0 - [A] - [C]}{[C]} \quad (\text{B.11})$$

$$\implies \frac{[C]}{[A]_0 - [A]} = \frac{1}{1 + K_2} \quad (\text{B.12})$$

Wegen  $[A] \ll [A]_0$  kann der Nenner durch  $[A]_0$  ersetzt werden. Mit Gleichung B.10 ergibt sich für die Gesamtfloreszenzausbeute ( $\Delta$ ):

$$\Delta = \left( \frac{1}{1 + K_2} \right) \alpha + \left( \frac{K_2}{1 + K_2} \right) \beta \quad (\text{B.13})$$

## Anhang C

### Abkürzungen

A	Absorption, Adenin, Adenosin, Adenyilat, Anisotropie
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
2AP	2-Aminopurin-Ribonukleosid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration, Lichtgeschwindigkeit
C	Kohlenstoffatom, Kondensatorkapazität, Cytosin, Cytidin, Cytidyilat, Celsius
$c_p$	spezifische Wärme bei konstanten Druck
Ca	Calcium
ca.	circa
cm	Zentimeter
Co	Cobalt
d	Schichtdicke
2D	zweidimensional
Da	Dalton
dC	2-Desoxycytidin, Desoxycytidyilat

det	Determinante
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	Elektrische Feldstärke, Emission, Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E <sub>2</sub> Br	Ethidiumbromid
E <sub>2</sub> OH	Ethanol
f	femto
Δf	Frequenzbandbreite
F	Farad, Fluoreszenz, Fluoreszenzintensität, Funkenstrecke
FZ	Fluoreszenzmeßzelle
g	Erdbeschleunigung, Gramm
G	Guanin, Guanosin, Guanylat, freie Enthalpie, Giga
GWDG	Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung Göttingen
h	Stunde
ΔH	Reaktionsenthalpie
Hg	Quecksilber
HH	<i>Hammerhead</i> -Ribozym
HP	Haarnadelschleife ( <i>Hairpin</i> )
Hz	Hertz
i	Variable
I	Ionenstärke, Lichtintensität, Stromstärke
I <sub>  </sub>	Fluoreszenzintensität parallel zur Polarisationsebene
I <sub>⊥</sub>	Fluoreszenzintensität senkrecht zur Polarisationsebene
IC	Interne Umwandlung ( <i>internal conversion</i> )
IS	<i>Inner-Sphere</i>
ISC	Umwandlung zwischen angeregten Singulett- und angeregten Triplettzuständen ( <i>intersystem crossing</i> )

J	Joule
k	<i>Boltzmann</i> -Konstante, Geschwindigkeitskonstante, kilo, Variable
K	Gleichgewichtskonstante, Kelvin
k <sup>+</sup>	Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion
k <sup>-</sup>	Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion
k <sub>cat</sub>	katalytische Geschwindigkeitskonstante
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KT	thermische Energie
kV	Kilovolt
l	Liter, Schichtdicke, optische Weglänge
l <sub>e</sub>	Elektrodenabstand in der Messzelle
m	Milli-, Meter, Masse
M	Molar, Molmasse
mA	Milliampere
Me	Metall
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
min	Minute
mm	Millimeter
Mn	Mangan
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger-RNA</i> )
n	Nano-, Stoffmenge, Brechzahl
N	Nukleosid, Stickstoffatom
N <sub>A</sub>	Avogadro-Konstante
Na	Natrium
2'-NH <sub>2</sub> -C	2'-Desoxy-2'-aminocytidin
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie
NOE	<i>Kern-Overhauser</i> -Effekt
nt	Anzahl der Nukleotide

O	Sauerstoffatom
OD	Optische Dichte
Oli	Oligoribonukleinsäure
OS	<i>Outer-Sphere</i>
p	piko
P	Polarisation, Purinribonukleosid
p. a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Personal-Computer
PCE	Photometrische Kontrol-Einheit
PE	Polyethylen, Perkin-Elmer
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Aktivität
POM	Polyoxymethylen
q	Elektronenladung, Quantenausbeute
r	Entfernung zum Rotorzentrum, Kugelradius
R	Widerstand
R <sub>m</sub>	molare Gaskonstante
RE	Relative Extinktion
RF	Relative Fluoreszenzintensität
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPM	Umdrehung pro Minute
rRNA	<i>ribosome</i> -Ribonukleinsäure
s	Sekunde
s.	siehe
S	Schwefelatom, Singulett-Zustand
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis ( <i>Signal-to-Noise Ratio</i> )
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit

T	Temperatur, Thymin, Transmission
ΔT	Temperaturerhöhung, Temperatursprung
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamid
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> -Ribonukleinsäure
Trp	Tryptophan (α-Amino-β-indolylpropionsäure)
U	Unit, Spannung, Uracil, Uridin, Uridylat
UV	Ultraviolett
V	Volt, Volumen
Vol	Volumenäquivalent
v <sub>p</sub>	Probenvolumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x	Signal, Umsatzvariable
X	beliebiges Ribonukleosid außer Guanin
Xe	Xenon
Y	Pyrimidinribonukleosid
z. B.	zum Beispiel
α	Quantenausbeute
β	Quantenausbeute
γ	Quantenausbeute
δ	geometrischer Faktor, Quantenausbeute
ε	molarer Extinktionskoeffizient
η	Anzahl der Phosphateneinheiten
λ	Wellenlänge
λ <sub>emi</sub>	Emissionswellenlänge
λ <sub>exi</sub>	Anregungswellenlänge
λ <sub>H</sub>	Kantenlage
μ	Mikro-

146	
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\rho$	Dichte
$\tau$	Relaxationszeit
$\tau_d$	Aufheizzeit
$\tau_F$	Fluoreszenzlebensdauer
$\tau_r$	Anstiegszeitkonstante ( <i>Risetime</i> )
$\bar{\tau}$	mittlere Zeitkonstante
$\Phi$	Quantenausbeute
$\Omega$	Ohm

## Literaturverzeichnis

- [1] AMES G.F.-L., *Resolution of Bacterial Proteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis on Slabs*. J. Biol. Chem. **249**, 634-644 (1974).
- [2] AMIRI K.M.A. & HAGERMAN P.J., *Global Conformation of a Self-cleaving Hammerhead RNA*. Biochemistry **33**, 13172-13177 (1994).
- [3] AMIRI K.M.A. & HAGERMAN P.J., *The Global Conformation of an Actin Hammerhead RNA during the Process of self-cleavage*. J. Mol. Biol. **261**, 125-134 (1996).
- [4] ANTOSIEWICZ J. & PORSCHKE D., *Turn of promotor DNA by cAMP receptor protein characterized by bead model simulation of rotational diffusion*. J. Biomol. Struct. Dyn. **5**, 819-837 (1988).
- [5] ANTOSIEWICZ J. & PORSCHKE D., *Volume Corrections for the Bead Model Simulations of Rotational Friction Coefficients of Makromolekules*. J. Phys. Chem. **93**, 5301-5305 (1989).
- [6] ATKINS P.W., *Physikalische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim - New York (1988).
- [7] BASS B.L. & CECI T.R., *Specific Interaction between the Self-splicing RNA of Tetrahymena and Its Guanosine Substrate: Implications for Biological Catalysis by RNA*. Nature **308**, 820-826 (1984).
- [8] BASSI G.S., MØLLGAARD N.-E., MURCHIE A.I.H., VON KITZING E. & LILLEY D.M.J., *Ionic Interactions and the Global Conformation of the Hammerhead Ribozyme*. Nat. Struct. Biol. **2**, 45-55 (1995).

- [9] BEEN M.D., *Cis-acting and Trans-acting Ribozymes from a Human Pathogen, Hepatitis Delta Virus*. Trends in Biochem. Sci. **19**, 251-256 (1994).
- [10] BEIGELMAN L., KARPEISKY A., MATULIC-ADAMIC J., GONZALES C. & USMAN N., *New Structural Motifs For Hammerhead Ribozymes*. *Catalytic Activity Of Abasic Nucleotide Substituted Ribozymes*. Nucleosides Nucleotides **14**, 907-910 (1995).
- [11] BERNASCONI C.F., *Relaxation Kinetics*. Academic Press, New York (1976).
- [12] BERTINI H., MOLINARI N. & NICCOLAI N., *NMR and Biomolecular Structure*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1991).
- [13] BIRUKH K.R., HEATON P.A. & ECKSTEIN F., *The structure, function and application of the hammerhead ribozyme*. Eur. J. Biochem. **245**, 1-16 (1997).
- [14] BLACKBURN P. & MOORE S., *Pancreatic ribonuclease*. In *The Enzymes* (BOYER P.D.) Vol. 15, Academic Press, New York, 317-433 (1982).
- [15] BRAMLAGE B., LUZI E. & ECKSTEIN F., *Designing ribozymes for the inhibition of gene expression*. Trends in Biotech. **16**, 434-438 (1998).
- [16] BRATTY J., CHARTRAND P., FERREYRE G. & CEDERGREN R., *The hammerhead RNA domain, a model ribozyme*. Biochim. Biophys. Acta **1216**, 345-359(1993).
- [17] BRUENING G., *Compilation of self-cleaving sequences from plant virus satellite RNAs and other sources*. In *RNA Processing* (DAHLBERG J.E. & ABELSON J.N.) Vol. 180, Academic Press, Inc., San Diego, 546-558 (1989).
- [18] BUZAVAN J.M., GERLACH W.L. & BRUENING G., *Non-enzymatic Cleavage and Ligation of RNAs with Sequences that are Complementary to a Plant Virus Satellite RNA*. Nature **323**, 349-352 (1986).
- [19] CANTOR C.R. & SCHIMMEL P.R., *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman and Company, New York (1980).

- [19a] Part I: *The conformation of biological macromolecules*.
- [19b] Part II: *Techniques for the study of biological structure and function*.
- [19c] Part III: *The behavior of biological macromolecules*.
- [20] CECH T.R., *RNA as an Enzyme*. Sci. Amer. **255** (5), 76-84 (1986).
- [21] CECH T.R., *The Chemistry of Self-Splicing RNA and RNA Enzymes*. Science **236**, 1532-1539 (1987).
- [22] CECH T.R., *Ribozyme self-replication?* Nature **339**, 507-508 (1989).
- [23] CECH T.R., *Self-Splicing Of Group I Introns*. Annu. Rev. Biochem. **59**, 543-568 (1990).
- [24] CHASTIAN M. & TINOCO JR.I., *Structural elements in RNA*. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **41**, 131-171 (1991).
- [25] CHOWRIRA B.M., BERZAL-HERRANZ A. & BURKE J.M., *Ionic Requirements for RNA Binding, Cleavage, Ligation by the Hairpin Ribozyme*. Biochemistry **32**, 1088-1095 (1993).
- [26] CHRISTOFFERSEN R.E., MCSWIGGEN J. & KONINGS D., *Application of computational technologies to ribozyme biotechnology products*. J Mol. Struct. (Theochem.) **311**, 273-284 (1994).
- [27] CLEGG R.M., *Fluoreszenz Resonance Energy Transfer and Nucleic Acids*. Methods Enzymol. **211**, 353-388 (1992).
- [28] COUTURE L.A. & STINGHOMB D.T., *Anti-gene therapy: the use of ribozymes to inhibit gene function*. Trends in Genetics **12**, 510-515 (1996).
- [29] CUNNINGHAM L.A., LI J. & LU Y., *Spectroscopic Evidence for Inner-Sphere Coordination of Metal Ions to the Active Site of a Hammerhead Ribozyme*. J. Am. Chem. Soc. **120**, 4518-4519 (1998).



- [30] CZERLINSKI G. & EIGEN M., *Eine Temperatursprungmethode zur Untersuchung chemischer Relaxation*. Z. Elektrochem. **63**, 652-661 (1959).
- [31] DAHM S.C. & UHLENBECK O.C., *Characterization of desoxy- and ribonucleotid oligonucleotide substrates in the hammerhead self-cleavage reaction*. Biochimie **72**, 819-823 (1990).
- [32] DAHM S.C. & UHLENBECK O.C., *Role of Divalent Metal Ions in the Hammerhead RNA Cleavage Reaction*. Biochemistry **30**, 9464-9469 (1991).
- [33] DAHM S.C., DERRICK W.B. & UHLENBECK O.C., *Evidence for the Role of Solvated Metal Hydroxide in the Hammerhead Cleavage Mechanism*. Biochemistry **32**, 13040-13045 (1993).
- [34] DIEBLER H., EIGEN M., IGENFRITZ G., MAASS G. & WINKLER R., *Kinetics And Mechanism Of Reactions Of Main Group Metal Ions With Biological Carriers*. Pure Appl. Chem. **20**, 93-115 (1969).
- [35] DIEKMANN S., HILLEN W., MORGENEYER B., WELLS R.D. & PORSCHKE D., *Orientation Relaxation Of DNA Restriction Fragments And The Internal Mobility Of Double Helix*. Biophys. Chem. **15**, 263-270 (1982).
- [36] DOURLANT M., THIERRE J.C., BRUN F. & LENG M., *Formation Of Hairpin Helices In Uridylic Acid Oligomers*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **41**, 1590-1596 (1970).
- [37] EARNSHAW D.J. & GAIR M.J., *Hairpin ribozyme cleavage catalyzed by aminoglycoside antibiotics and the polyamine spermine in the absence of metal ions*. Nucleic Acids Res. **26**, 5561-5561 (1998).
- [38] ECKSTEIN F. & LILLEY D.M.J., *Catalytic RNA*. In *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Vol. 10, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg (1996).
- [39] ECKSTEIN F., *The hammerhead ribozyme*. Biochem. Soc. Trans. **24**, 601-604 (1996).

- [40] EIGEN M. & DE MAEYER L., *Relaxations methods*. In *Technique in Organic Chemistry* (FRIESS S.L., LEWIS E.S. & WEISSBERGER A.). Vol. VIII, part II, 895-1054, Interscience Publishers, New York (1963).
- [41] EIGEN M. & MAASS G., *Über die Kinetik der Metallkomplexbildung der Alkali- und Erdalkalitionen in wässrigen Lösungen*. Z. physik. Chem. N.F. **49**, 163-177 (1966).
- [42] EPSTEIN L.M. & GALL J.G., *Self-cleaving Transcripts of Satellite DNA from the Neut. Cell* **48**, 535-543 (1987).
- [43] FAGAN P.A., FÀBREGA C., ERITJA R., GOODMAN M.F. & WEMMER D.E., *NMR Study of the Conformation of the 2-Aminopurine: Cytosine Mismatch in DNA*. Biochemistry **35**, 4026-4033 (1996).
- [44] FASMAN G.D., *CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. 3rd ed., Vol. I, 589-590, CRC Press, Inc., Cleveland, Ohio (1975).
- [45] FEDOR M.J. & UHLENBECK O.C., *Substrate sequence effects on "hammerhead" RNA catalytic efficiency*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**, 1668-1672 (1990).
- [46] FEDOR M.J. & UHLENBECK O.C., *Kinetics of Intermolecular Cleavage by Hammerhead Ribozymes*. Biochemistry **31**, 12042-12054 (1992).
- [47] FREDERICQ E. & HOUSSIER C., *Electric dichroism and electric birefringence*. Clarendon Press, New York (1973).
- [48] FREIER S.M., KIERZEK R., JAEGER J.A., SUGIMOTO N., CARUTHERS M.H., NELSON T. & TURNER D.H., *Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**, 9373-9377 (1986).
- [49] GANGAMANI B.P., KUMAR V.A. & GANESH K.N., *2-Aminopurine peptide nucleic acids (2-ampPNA): intrinsic fluorescent PNA analogues for probing PNA-DNA interaction dynamics*. Chem. Commun., 1913-1914 (1997).

- [50] GILBERT W., *The RNA World*. Nature **319**, 618 (1986).
- [51] GLUSKER J.P., LEWIS M. & ROSSI M., *Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1992).
- [52] GRASBY J.A., JONATHAN P., BUTLER G. & GAIT M.J., *The synthesis of oligoribonucleotides containing O<sup>6</sup>-methylguanosine: the role of conserved guanosine residues in hammerhead ribozyme cleavage*. Nucleic Acids Res. **19**, 4444-4450 (1993).
- [53] GROEBE D.R. & UHLENBECK O.C., *Characterization of RNA hairpin loop stability*. Nucleic Acids Res. **16**, 11725-11735 (1988).
- [54] GUERRIER-TAKADA C., GARDINER K., MARSH T., PAGE N. & ALTMAN S., *The RNA Moiety of Ribonuclease P is the Catalytic Subunit of the Enzyme*. Cell **35**, 849-857 (1983).
- [55] GUEST C.R., HOCHSTRASSER R.A., SOWERS L.C. & MILLAR D.P., *Dynamics of Mismatched Base Pairs in DNA*. Biochemistry **30**, 3271-3279 (1991).
- [56] Handbook *SLM 8000/8000S - Photon Counting Spectrofluorometer*. SLM Instruments, Inc., Urbana, IL, USA (1981).
- [57] HASELOFF J. & GERLACH W.L., *Simple RNA enzymes with the new and highly specific endoribonuclease activities*. Nature **334**, 585-591 (1988).
- [58] HERTTEL K.J., PARDI A., UHLENBECK O.C., KOIZUMI M., OHTSUKA E., UESUGI S., CEDERGREN R., ECKSTEIN F., GERLACH W.L., HODGSON R. & SYMONS R.H., *Numbering system for the hammerhead*. Nucleic Acids Res. **20**, 3252 (1992).
- [59] HERTTEL K.J., HERSCHLAG D. & UHLENBECK O.C., *A Kinetic and Thermodynamic Framework for the Hammerhead Ribozyme Reaction*. Biochemistry **33**, 3374-3385 (1994).

- [60] HEUS H.A., UHLENBECK O.C. & PARDI A., *Sequence-dependent structural variations of hammerhead RNA enzymes*. Nucleic Acids Res. **18**, 1103-1108 (1990).
- [61] HEUS H.A. & PARDI A., *Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Hammerhead Ribozyme Domain*. J. Mol. Biol. **217**, 113-124 (1991).
- [62] HEUS I.A. & PARDI A., *Structural Features That Give Rise to the Unusual Stability of RNA Hairpins Containing GNRA Loops*. Science **253**, 191-194 (1991).
- [63] HILBERS C.W., HEUS H.A., VAN DONGEN M.J.P. & WUMENGA S.S., *The Hairpin Elements of Nucleic Acid Structure: DNA and RNA Folding*. In *Nucleic Acids and Molecular Biology* (ECKSTEIN F. & LILLEY D.M.J.). Vol. 8, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, 56-104 (1996).
- [64] HOCHSTRASSER R.A., CARVER T.E., SOWERS L.C. & MILLAR D.P., *Melting of a DNA Helix Terminus within the Active Site of DNA Polymerase*. Biochemistry **33**, 11971-11979 (1994).
- [65] HOFACKER I.L., FONTANA W., STADLER P.F., BONHOEFFER L.S., TACKER M. & SCHUSTER P., *Fast Folding and Comparison of RNA Secondary Structures*. Monatshefte für Chemie **125**, 167-188 (1994).
- [66] HOFFMANN G.W., *A Nanosecond Temperature-Jump Apparatus*. Rev. Sci. Instrum. **42**, 1643-1647 (1971).
- [67] HOFFMANN G.W., *Dissertation: Entwicklung einer schnellen Temperatur-Sprung-Anlage und ihre Anwendung auf kooperative Basenpaarung*. Universität Braunschweig (1972).
- [68] HOLLEMANN A.F. & WIBERG N., *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. De Gruyter Verlag, Berlin - New York (1985).
- [69] HOLZWARTH J.F., ECK V. & GENZ A., *Iodine Laser Temperature-jump: Relaxation Processes in Phospholipid Bilayers on the Picosecond to Millisecond*

- [69] *Time-scale. In Spectroscopy and the Dynamics of Molecular Biological Systems* (BAYLEY P.M. & DALE R.E.), 351-377, Academic Press, London (1985).
- [70] HOLZWARTH J.F., MEYER F., PICKARD M. & DUNFORD H.B., *Mechanism of Azide Binding to Chloroperoxidase and Horseradish Peroxidase: Use of an Iodine Laser Temperature-Jump Apparatus*. *Biochemistry* **27**, 6628-6633 (1988).
- [71] HUTCHINS C.J., RATHIEN P.D., FORSTER A.C. & SYMONS R.H., *Self-cleavage of Plus and Minus RNA Transcripts of Avocado Sunblotch Viroid*. *Nucleic Acids Res.* **14**, 3627-3640 (1986).
- [72] JACOB F. & MONOD J., *Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins*. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356 (1961).
- [73] JAEGER L., MICHEL F. & WESTHOF E., *Involvement of a GNRA Tetraloop in Long-Range RNA Tertiary Interactions*. *J. Mol. Biol.* **236**, 1271-1276 (1994).
- [74] KOZUMI M. & OHTSUKA E., *Effects of Phosphorothioate and 2-Amino Groups in Hammerhead Ribozymes on Cleavage Rates and Mg<sup>2+</sup> Binding*. *Biochemistry* **30**, 5145-5150 (1991).
- [75] KRUGER K., GRABOWSKI P.J., ZAUG A.J., SANDS J., GOTTSCHLING D.E. & CECIL T.R., *Selfsplicing: Autoexcision and Autocyclization of the Ribosomal RNA Intervening Sequence of Tetrahymena*. *Cell* **31**, 147-157 (1982).
- [76] KUMMELS R.G. & MCLAUGHLIN L.W., *Probing the cleavage activity of the hammerhead ribozyme using analogue complexes*. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **10**, 197-215 (1996).
- [77] LABUDA D. & PORSCHKE D., *Magnesium Ion Inner Sphere Complex in the Anticodon Loop of Phenylalanine Transfer Ribonucleic Acid*. *Biochemistry* **21**, 49-53 (1982).
- [78] LEWIN B., *Gene - Lehrbuch der molekularen Genetik*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim - New York (1991).

- [79] MANNING G.S., *The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides*. *Q. Rev. Biophys.* **11**, 179-246 (1978).
- [80] MCCASKILL J.S., *The Equilibrium Partition Function and Base Pair Binding Probabilities for RNA Secondary Structure*. *Biopolymers* **29**, 1105-1119 (1990).
- [81] MCKAY D.B., *Structure and function of the hammerhead ribozyme: An unfinished story*. *RNA* **2**, 395-403 (1996).
- [82] MENGER M., TUSCHL T., ECKSTEIN F. & PORSCHKE D., *Mg<sup>2+</sup>-Dependent Conformational Changes in the Hammerhead Ribozyme*. *Biochemistry* **35**, 14710-14716 (1996).
- [83] MEYER-ALMES F.J. & PORSCHKE D., *Mechanism of Intercalation into the DNA Double Helix by Ethidium*. *Biochemistry* **32**, 4246-4253 (1993).
- [84] MEYER-ALMES F.J., *Dissertation: Mechanismus der Genregulation durch den cAMP-Rezeptor*. Universität Göttingen (1994).
- [85] MICHALSKI J., MIKOŁAJCZYK M., MŁOTKOWSKA B. & OMELANCZUK J., *Stereochemistry of nucleophilic substitution reaction at a thiophosphoryl centre*. *Tetrahedron* **25**, 1743-1748 (1969).
- [86] MICHEL F. & WESTHOF E., *Modeling of the Three-Dimensional Architecture of Group I Catalytic Introns Based on Comparative Sequence Analysis*. *J. Mol. Biol.* **216**, 585-610 (1990).
- [87] MILLAR D.P., *Fluorescence studies of DNA and RNA structure and dynamics*. *Current Opinion in Struct. Biol.* **6**, 322-326 (1996).
- [88] MURPHY F.L. & CECIL T.R., *GAAA Tetraloop and Conserved Bulge Stabilize Tertiary Structure of a Group I Intron Domain*. *J. Mol. Biol.* **236**, 49-63 (1994).
- [89] MURRAY J.B., TERWEY D.P., MALONEY L., KARPEISKY A., USMAN N., BEIGELMAN L. & SCOTT W.G., *The Structural Basis of Hammerhead Ribozyme Self-Cleavage*. *Cell* **92**, 665-673 (1998).

- [90] NELDER J.A. & MEAD R., *A simplex method for function minimization*. Comput. J. **7**, 308-313 (1964/65).
- [91] NG M.M.P., BENSELER F., TUSCHL T. & ECKSTEIN F., *Isoguanosine Substitution of Conserved Adenosines in the Hammerhead Ribozyme*. Biochemistry **33**, 12119-12126 (1994).
- [92] NORDLUND T.M., ANDERSSON S., NILSSON L., RIGLER R., GRÄSLUND A. & McLAUGHLIN L.W., *Structure and Dynamics of a Fluorescent DNA Oligomer Containing the EcoRI Recognition Sequence: Fluorescence, Molecular Dynamics, and NMR Studies*. Biochemistry **28**, 9095-9103 (1989).
- [93] ODAI O., KODAMA H., HIROAKI H., SAKATA T., TANAKA T. & UESUGI S., *Synthesis and NMR study of ribooligonucleotides forming a hammerhead-type RNA enzyme system*. Nucleic Acids Res. **18**, 5955-5959 (1990).
- [94] ORITA M., VINAYAK R., ANDRUS A., WARASHINA M., CHIBA A., KANIWA H., NISHIKAWA F., NISHIKAWA S. & TAIRA K., *Magnesium-mediated Conversion of an Inactive Form of a Hammerhead Ribozyme to an Active Complex with Its Substrate*. J. Biol. Chem. **271**, 9447-9454 (1996).
- [95] OTTO M.R., BLOOM L.B., GOODMAN M.F. & BEECHEM J.M., *Stopped-Flow Fluorescence Study of Pre-catalytic Primer Strand Base-Unstacking Transitions in the Exonuclease Cleft of Bacteriophage T4 DNA Polymerase*. Biochemistry **37**, 10156-10163 (1998).
- [96] PAN T. & UHLENBECK O.C., *In Vitro Selection of RNAs that Undergo Autolytic Cleavage with  $Pb^{2+}$* . Biochemistry **31**, 3887-3895 (1992).
- [97] PAN T. & UHLENBECK O.C., *A small metaloribozyme with a two-step mechanism*. Nature **358**, 560-563 (1992).
- [98] PEARSON R.G., *Hard and Soft Acids and Bases*. Survey Prog. Chem. **5**, 1-52 (1969).

- [99] PEASE A.C. & WEMMER D.E., *Characterization of the Secondary Structure and Melting of a Self-cleaved RNA Hammerhead Domain by  $^1H$  NMR Spectroscopy*. Biochemistry **29**, 9039-9046 (1990).
- [100] PECORA R., *Dynamic Light Scattering*. Plenum Press, New York (1985).
- [101] PECORARO V.L., HERMES J.D. & CLELAND W.W., *Stability Constants of  $Mg^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  Complexes of Adenine Nucleotides and Thionucleotides and Rate Constants for Formation and Dissociation of  $MgATP$  and  $MgADP$* . Biochemistry **23**, 5262-5271 (1984).
- [102] PEEBLES C.L., PERLMAN P.S., MECKLENBURG K.L., PETRILLO M.L., TAVOR J.H., JARRELL K.A. & CHENG H.L., *A self-Splicing RNA Excises an Intron *Lariat**. Cell **44**, 213-223 (1986).
- [103] PERREAULT J.P., WU T., COUSINEAU B., OGILVIE K.K. & CEDERGREN R., *Mixed desoxyribo- and ribooligonucleotides with catalytic activity*. Nature **344**, 565-567 (1990).
- [104] PERREAULT J.P., LABUDA D., USMAN N., YANG J.H. & CEDERGREN R., *Relationship between 2'-Hydroxyls and Magnesium Binding in the Hammerhead RNA Domain: A Model for Ribozyme Catalysis*. Biochemistry **30**, 4020-4025 (1991).
- [105] PERROTTA A.T. & BEEN M.D., *The Self-cleaving Domain from the Genomic RNA of Hepatitis Delta Virus: Sequence Requirements and the Effects of Denaturation*. Nucleic Acids Res. **18**, 6821-6827 (1990).
- [106] PETERMAN B.F., *Measurement of the Dead Time of a Fluorescence Stopped-Flow Instrument*. Anal. Biochem. **93**, 442-444 (1979).
- [107] PIEKEN W.A., OLSEN D.B., BENSELER F., AURUP H. & ECKSTEIN F., *Kinetic Characterization of Ribonuclease-Resistant 2'-modified Hammerhead Ribozymes*. Science **253**, 314-317 (1991).
- [108] PLEY H.W., FLAHERTY K.M. & MCKAY D.B., *Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme*. Nature **372**, 68-74 (1994).

- [109] PLEY H.W., FLAHERTY K.M. & MCKAY D.B., *Model for RNA tertiary interaction from the structure of an intermolecular complex between a GAAA tetraloop and RNA helix*. Nature **372**, 111-113 (1994).
- [110] PORSCHKE D., *Cooperative Nonenzymic Base Recognition. II. Thermodynamic of the Helix-Coil Transition of Oligodeoxylic + Oligouridylic Acids*. Biopolymers **10**, 1989-2013 (1971).
- [111] PORSCHKE D. & EIGEN M., *Cooperative Nonenzymic Base Recognition. III. Kinetics of the Helix-Coil Transition of Oligouridylic + Oligodeoxylic Acid System and of Oligoriboadenylic Acid alone at acidic pH*. J. Mol. Biol. **62**, 361-381 (1971).
- [112] PORSCHKE D. & EGGERS F., *Thermodynamics and Kinetics of Base-Stacking Interactions*. Eur. J. Biochem. **26**, 490-498 (1972).
- [113] PORSCHKE D., *The Dynamics of Nucleic-Acid Single-Strand Conformation Changes*. Eur. J. Biochem. **39**, 117-126 (1973).
- [114] PORSCHKE D., *Thermodynamic And Kinetic Parameters Of Oligonucleotide Hairpin Helix*. Biophys. Chem. **1**, 381-386 (1974).
- [115] PORSCHKE D., *Thermodynamic And Kinetic Parameters Of Ion Condensation To Polynucleotides. Outer Sphere Complex Formed By Mg<sup>++</sup> Ions*. Biophys. Chem. **4**, 383-394 (1976).
- [116] PORSCHKE D., *The mode of Mg<sup>++</sup> binding to oligonucleotides. Inner sphere complexes as markers for recognition?* Nucleic Acids Res. **6**, 883-898 (1979).
- [117] PORSCHKE D., *Methods for Studying Fast Kinetics in Biological Systems*. In *Structural Molecular Biology* (DAVIES D.B., SAENGER W. & DANNLURK S.S.). Plenum Publishing Corporation, New York, 333-358 (1982).
- [118] PORSCHKE D. & JUNG M., *Stability decrease of RNA double helices by phenylalanine-, tyrosine- and tryptophane-amides. Analysis in terms of site binding and relation to melting proteins*. Nucleic Acids Res. **10**, 6163-6176 (1982).

- [119] PORSCHKE D. & RAUH H., *Cooperative, Excluded-Site Binding and Its Dynamics for the Interaction of Gene 5 Protein with Polynucleotides*. Biochemistry **22**, 4737-4745 (1983).
- [120] PORSCHKE D. & JUNG M., *The Conformation of Single Stranded Oligonucleotides and of Oligonucleotide-Oligopeptide Complexes from their Rotation Relaxation in the Nanosecond Range*. J. Biomol. Struct. Dyn. **2**, 1173-1184 (1985).
- [121] PORSCHKE D., *Modes and Dynamics of Mg<sup>2+</sup>-Polynucleotide Interactions*. In *The Biological Chemistry of Magnesium* (Cowan J.A.). 85-110, VCH Publishers, New York (1995).
- [122] PORSCHKE D., *Electric dichroism*. Methods Mol. Biol. **90**, 241-258 (1997).
- [123] PORSCHKE D., *Time-Resolved Analysis of Macromolecular Structures During Reactions by Stopped-Flow Electrooptics*. Biophys. J. **75**, 528-537 (1998).
- [124] PRODY G.A., BAKOS J.T., BUZAYAN J.M., SCHNEIDER I.R. & BRUENING G., *Autolytic Processing of Dimeric Plant Virus Satellite RNA*. Science **231**, 1577-1580 (1986).
- [125] PUGLISI J.D. & TINOCO JR.I., *Absorbance melting curves of RNA*. Methods Enzymol. **180**, 304-325 (1989).
- [126] PYLE A.M., *Ribozymes: A Distinct Class of Metalloenzymes*. Science **261**, 709-714 (1993).
- [127] PYLE A.M., *Role of Metal Ions in Ribozymes*. In *Metal Ions In Biological Systems* (SIEGEL A. & SIEGEL H.). Vol. 32, 479-520, Marcel Dekker, Inc., New York - Basel (1996).
- [128] QUIGLEY G.J. & RICH A., *Structural domains of transfer RNA molecules*. Science **194**, 796-806 (1976).
- [129] RECORD M.T., ANDERSON C.F. & LOHMAN T.M., *Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and*

- nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. *Q. Rev. Biophys.* **11**, 103-178 (1978).
- [130] RIESNER D., STEGER G., ZIMMAT R., OWENS R.A., WAGENHÖFFER M., HULLEN W., VOLLBACH S. & HENCO K., *Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations and protein-nucleic acids interaction. Elektrophoresis* **10**, 377-389 (1989).
- [131] RIGLER R., RABL C.-R. & JOVIN T.M., *A temperature-jump apparatus for fluorescence measurements. Rev. Sci. Instrum.* **45**, 580-588 (1974).
- [132] RINGBOM A., *Complexation In Analytical Chemistry. In Chemical Analysis (EVLING P.J. & KOLTHOFF I.M.). Vol. XVI, 22-60, Interscience Publishers, New York (1963).*
- [133] ROBERTSON M.P. & ELLINGTON A.D., *How to make a nucleotide. Nature* **395**, 223-225 (1998).
- [134] ROSSI J.J., *Controlled, targeted, intracellular expression of ribozymes: progress and problems. Trends in Biotech.* **13**, 301-306 (1995).
- [135] RUFFNER D.E., STORMO G.D. & UHLENBECK O.C., *Sequence Requirements of the Hammerhead RNA Self-Cleavage Reaction. Biochemistry* **29**, 10695-10702 (1990).
- [136] RUFFNER D.E. & UHLENBECK O.C., *Thiophosphate interference experiments locate phosphates important for the hammerhead RNA self-cleavage reaction. Nucleic Acids Res.* **18**, 6025-6029 (1990).
- [137] SAENGER W., SUCK D. & ECKSTEIN F., *On mechanism of RNase A. Eur. J. Biochem.* **46**, 559-567 (1974).
- [138] SAENGER W., *Principles of nucleic acids structure. Springer-Verlag, New York (1983).*
- [139] SAMBROOK J., FRITSCH E.F. & MANIATIS T., *Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (1989).*

- [140] SANTALUCIA J.J. & TURNER D.H., *Structure of (rGGCGAGCC)<sub>2</sub> in solution from NMR and restrained molecular dynamics. Biochemistry* **32**, 12612-12623 (1993).
- [141] SAWATA S., KOMIYAMA M. & TAIRA K., *Kinetic evidence based on solvent isotope effects for the nonexistence of proton-transfer process in reactions catalyzed by a hammerhead ribozyme: implication to the double-metal-ion mechanism of catalysis. J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2357-2358 (1995).
- [142] SCHEIT K.H. & RACKWITZ H.R., *Synthesis and physicochemical properties of two analogs of poly(dA): poly(2-aminopurine-9-β-D-desoxyribonucleotide) and poly 2-amino-desoxyadenylic acid. Nucleic Acids Res.* **10**, 4059-4069 (1982).
- [143] SCHLEE D. & KLEBER H.-P., *Wörterbücher der Biologie: Biotechnologie Teil 1 und 2. Gustav Fischer Verlag, Jena (1991).*
- [144] SCHÖNKNECHT T., *Dissertation: Elektrooptische Messungen von Biopolymeren. Universität Göttingen (1993).*
- [145] SCOTT W.G., FINCH J.T. & KLUG A., *The Crystal Structure of an All-RNA Hammerhead-Ribozyme: A Proposed Mechanism for RNA Catalytic Cleavage. Cell* **81**, 991-1002 (1995).
- [146] SCOTT W.G., MURRAY J.B., ARNOLD J.R.P., STODDARD B.L. & KLUG A., *Capturing the Structure of a Catalytic RNA Intermediate: The Hammerhead Ribozyme. Science* **274**, 2065-2069 (1996).
- [147] SHELDON C.C. & SYMONS R.H., *Mutagenesis analysis of a self-cleaving RNA. Nucleic Acids Res.* **17**, 5679-5685 (1989).
- [148] SHELDON C.C., JEFFRIES A., DAVIES C. & SYMONS R.H., *RNA self-cleavage by the hammerhead structure. In Nucleic Acids and Molecular Biology (ECKSTEIN F. & LILLEY D.M.J.). Vol. 4, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, 227-242 (1990).*

- [149] SHIMAYANA T., NISHIKAWA S. & TAIRA K., *Generality of the NUX Rule - Kinetic Analysis of the Results of Systematic Mutations in the Trimucleotide at the Cleavage Site of Hammerhead Ribozymes*. *Biochemistry* **34**, 3649-3654 (1995).
- [150] SIGURDSSON S.T., TUSCHL T. & ECKSTEIN F., *Probing RNA tertiary structure: Interhelical crosslinking of the hammerhead ribozyme*. *RNA* **1**, 575-583 (1995).
- [151] SIMORRE J.P., LEGAULT P., HANGAR A.B., MICHELIS P. & PARDI A., *A Conformational Change in the Catalytic Core of the Hammerhead Ribozyme upon Cleavage of an RNA Substrate*. *Biochemistry* **36**, 518-525 (1997).
- [152] SLIM G. & GAIT M.J., *Configurationaly defined phosphorothioate-containing oligoribonucleotides in the study of the mechanism of cleavage of hammerhead ribozymes*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1183-1188 (1991).
- [153] STEINER R.F. & WEINRYB I., *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*. Plenum Press, New York (1971).
- [154] STREHLOW H., *Rapid Reactions in Solution*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1992).
- [155] STRYER L., *Biochemie*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg - New York (1991).
- [156] STUDDIER F.W., *Analysis of Bacteriophage T7 Early RNAs and Proteins on Slab Gels*. *J. Mol. Biol.* **79**, 237-248 (1973).
- [157] SYMONS R.H., *Small Catalytic RNAs*. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 641-671 (1992).
- [158] THOMSON J.B., TUSCHL T. & ECKSTEIN F., *The hammerhead ribozyme*. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **10**, 173-196 (1996).
- [159] TINOCO JR.I., *Nucleic Acid Structures, Energetics and Dynamics*. *J. Phys. Chem.* **100**, 13311-13322 (1996).

- [160] TONOMURA B., NAKATANI H., OHNISHI M., YAMAGUCHI-IYO J. & HIROMI K., *Test Reactions for a Stopped-Flow Apparatus*. *Anal. Biochem.* **84**, 370-383 (1978).
- [161] TUSCHL T., *Diplomarbeit: Einbau von 2-Aminopurintribonucleosid in ein Hammerhead-Ribozym - Auswirkungen auf die Aktivität*. Universität Regensburg (1992).
- [162] TUSCHL T., NG M.M.P., PIEKEN W., BENSELER F. & ECKSTEIN F., *Importance of Exocyclic Base Functional Groups of Central Core Guanines for Hammerhead Ribozyme Activity*. *Biochemistry* **33**, 11658-11668 (1993).
- [163] TUSCHL T., GOHLKE C., JOVIN T.M., WESTHOF E. & ECKSTEIN F., *A three-dimensional model for a hammerhead ribozyme based on fluorescence measurements*. *Science* **266**, 785-788 (1994).
- [164] TUSCHL T., *Dissertation: Struktur- und Funktionsbeziehungen in Hammerhead-Ribozymen*. Universität Regensburg (1995).
- [165] UHLENBECK O.C., *A small catalytic oligoribonucleotide*. *Nature* **328**, 596-600 (1987).
- [166] VAN TOL H., BUZAVAN J.M., FELDSTEIN P.A., ECKSTEIN F. & BRUENING G., *Two autolytic processing reactions of a satellite RNA proceed with inversion of configuration*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1971-1975 (1990).
- [167] VARANI G., CHEONG C. & TINOCO JR.I., *Structure of an unusually stable RNA hairpin*. *Biochemistry* **30**, 3280-3289 (1991).
- [168] WARD D.C., REICH E. & STRYER L., *Fluorescence Studies of Nucleotides and Polynucleotides*. *J. Biol. Chem.* **244**, 1228-1237 (1969).
- [169] WATSON J.D. & CRICK F.H.C., *A Structure of Desoxyribose Nucleic Acid*. *Nature* **171**, 737-738 (1953).

- [170] WEDEKIND J.E. & MCKAY D.B., *Crystallographic Structures Of The Hammerhead Ribozyme: Relationship to Ribozyme Folding and Catalysis*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **27**, 475-502 (1998).
- [171] WOESE C.R., WINKER S. & GUTTELL R.R., *Architecture of ribosomal RNA: Constraints on the sequence of "tetra-loops"*. Prog. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**, 8467-8471 (1990).
- [172] YOUNG K.J., GILL F. & GRABSV J.A., *Metal ions play a passive role in the hairpin ribozyme catalysed reaction*. Nucleic Acids Res. **25**, 3760-3766 (1997).
- [173] ZAUG A.J. & CEGH T.R., *The Intervening Sequence RNA of Tetrahymena Is an Enzyme*. Science **231**, 470-475 (1986).
- [174] ZOUHADAKIS M. & TABLER M., *Comparative analysis of cleavage rates after systematic permutation of the NUX consensus target motif for hammerhead ribozymes*. Nucleic Acids Res. **23**, 1192-1196 (1995).
- [175] ZUCKER M. & STIEGLER P., *Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information*. Nucleic Acids Res. **9**, 133-148 (1981).
- [176] ZWIEB C., *Recognition of a Tetranucleotide Loop of Signal Recognition Particle RNA by Protein SRP19*. J. Biol. Chem. **267**, 15650-15656 (1992).

## Abbildungsverzeichnis

2.1	Sekundärstrukturelemente einer RNA	8
2.2	Stereobild der GAA-A-Tetranucleotid-Haarnadelschleife im Hammerhead-Ribozym	10
2.3	Konsensus-Struktur des Hammerhead-Ribozyms	12
2.4	Tertiärstruktur des Hammerhead-Ribozyms	14
2.5	Reaktionsmechanismen des Hammerhead-Ribozyms	16
2.6	Stereochemischer Verlauf der Phosphatdiesterlyspaltung	18
2.7	Struktur des 2-Aminopurin-Ribonucleosids (2AP)	22
4.1	Schematischer Aufbau des Spektrofluorimeters	46
4.2	Foto von der Temperatursprungzelle und der Temperatursprungapparatur	51
4.3	Schematischer Aufbau der Temperatursprungapparatur	54
4.4	Schematischer Aufbau der Stopped-Flow-Apparatur	59
4.5	Bestimmung der Totzeit der Stopped-Flow-Apparatur nach PETERMAN	62
5.1	Fluoreszenztitrationen von den Reaktionspuffern	65
5.2	Absorptionsspektrum des 2-Aminopurin-Ribonucleosids	66
5.3	Anregungs- und Emissionsspektrum des 2-Aminopurin-Ribonucleosids	67
5.4	Fluoreszenztitration des Oli3 mit Mg <sup>2+</sup> -Ionen	69
5.5	Schmelzkurven der doppelsträngigen Oligoribonucleinsäuren dsOli1 und dsOli2	72
5.6	Sekundärstruktur der Hairpins HP1 und HP2	74
5.7	Fluoreszenztitration des HP2 mit Ca <sup>2+</sup> -Ionen	75
5.8	Fluoreszenztitration des HP1 mit Mg <sup>2+</sup> -Ionen	76



5.9	Schmelzkurven der Ribonukleinsäuren HP1 und HP2	79
5.10	Sekundärstruktur der Hammerhead-Ribozyme HH1-HH5	81
5.11	Fluoreszenztitration des HH2 mit $Mg^{2+}$ -Ionen	82
5.12	Fluoreszenztitration des HH5 mit $Mg^{2+}$ -Ionen	83
5.13	Fluoreszenzintensität der Ribonukleinsäuren in T- und TCN-Puffer vor der Metallkonzugabe	85
5.14	Temperatursprung Relaxation von Ohi3 in TCN-Puffer und 20 mM $MgCl_2$ bei 10,6°C	90
5.15	Relaxationszeiten und Fluoreszenzamplituden beim Temperatursprung des Ohi3 in TCN-Puffer bei 10,6°C	92
5.16	Relaxationszeiten beim Temperatursprung des Ohi1 und des Ohi2	96
5.17	Hypothetische Sekundärstrukturen nach der Dimerisierungsreaktion von Ohi1 und Ohi2	98
5.18	Temperatursprung Relaxation von HP1 in TCN-Puffer bei 8,1°C	100
5.19	Relaxationszeiten und Fluoreszenzamplituden beim Temperatursprung des HP1 in TCN-Puffer bei 8,1°C	101
5.20	Temperatursprung Relaxation von HP2 in TCN-Puffer bei 8,1°C	103
5.21	Relaxationszeiten beim Temperatursprung des HP2 in TCN-Puffer bei 8,1°C	104
5.22	Fluoreszenzamplituden beim Temperatursprung des HP2 in TCN-Puffer bei 8,1°C	106
5.23	Relaxationszeiten und Fluoreszenzamplituden in Abhängigkeit von der HP2-Konzentration	108
5.24	Stopped-Flow-Experiment mit dem Hammerhead-Ribozym HH1 und $Ca^{2+}$ -Ionen	110
5.25	Temperatursprung Relaxation von HH3 und 5 mM $Mg^{2+}$ im TCN-Puffer bei 10,6°C	112

## Tabellenverzeichnis

Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen	29
3.2 Basensequenzen der synthetisierten Ribonukleinsäuren (Primärstruktur) in 5' → 3'-Richtung	32
Puffer und Stammlösungen	34
Geräte	36
4.1 Berechnete Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{650}$ ) der Ribonukleinsäuren	40
4.2 Temperatursprung-Meßzellen	53
4.3 Standardstellungen beim Temperatursprung	57
5.1 Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen der Oligoribonukleinsäuren Ohi3 und Ohi4	70
5.2 Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen und $T_M$ -Werte der Oligoribonukleinsäuren Ohi1 und Ohi2	71
5.3 Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen der Hairpin-Ribonukleinsäuren HP1 und HP2	77
5.4 Schmelzpunkte ( $T_M$ ) der Ribonukleinsäuren HP1 und HP2	78
5.5 Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen der Hammerhead-Ribozyme	84
5.6 Kinetische und thermodynamische Parameter für die Bindung von $Mg^{2+}$ an das Ohi3	93
5.7 Kinetische und thermodynamische Parameter für die Dimerisierung beim Ohi1 und Ohi2	97
5.8 Kinetische und thermodynamische Parameter für die Strukturumwandlung der Ribonukleinsäure HP1 in Gegenwart von $Ca^{2+}$ bzw. $Mg^{2+}$	102

- 5.9 *Kinetische und thermodynamische Parameter für die Strukturumwandlung der Ribonukleinsäure HP<sub>2</sub> in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> bzw. Mg<sup>2+</sup> . . . 107*
- 5.10 *Zeitkonstanten  $\tau_1$  der Reaktion von dem Hammerhead-Ribozym HH1 und den Metallionen aus den Stopped-Flow-Experimenten . . . . . 111*
- 5.11 *Relaxationszeiten  $\tau_1$  der Hammerhead-Ribozyme HH1-HH5 aus den Temperatur sprung-Messungen . . . . . 114*

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe *Biomolekulare Dynamik* am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Dietmar Pörschke angefertigt. Ihm möchte ich herzlich für die interessante Themenstellung, viele fachliche Ratschläge und seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Heinz Georg Wagner für die Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Manfred Eigen, Abteilung *Biochemische Kinetik*, und Herrn Prof. Dr. Thomas Jovin, Abteilung *Molekulare Biologie*, danke ich für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen und die Schaffung einer anregenden Atmosphäre während der Zeit, in der die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dietmar Pörschke diesen Abteilungen zugeordnet war.

Herrn Prof. Dr. Fritz Eckstein und Frau Ursula Kutzke, Abteilung *Bioorganische Chemie* am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, möchte ich für die vielen Synthesen von 2-Aminopurin-substituierten Ribonukleinsäuren danken. Herrn Prof. Dr. Fritz Eckstein danke ich insbesondere für seine Diskussionsbereitschaft und sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ganz besonders dankbar bin ich Herrn Roderich Weise für seine vielfältige und unkomplizierte Hilfe in ungezählten elektronischen Notlagen sowie — stellvertretend für die Feinmechanik-Werkstatt des Instituts — Herrn Helmut Penker. Ohne ihre Erfahrung und ihre stete Hilfsbereitschaft wäre ein Fortgang der Arbeit sehr schwierig gewesen.

Auch Herrn Jürgen Wawrzinek möchte ich für seine ständige Hilfe in dieser sehr kleinen Arbeitsgruppe danken.

Frau Dr. Susanne Brakmann, Frau Claudia Skamel, Herrn Axel Wetlich, Herrn Jan Biesche, Herrn Dr. Thomas Hartsch und Herrn Hans Barth danke ich für ihre freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und nicht zuletzt für die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Holger Dunkel, Herrn Timm Wetzel, Herrn Stephan Trebels sowie — stellvertretend für die Elektronik-Werkstatt — Herrn Karl-Heinz Knauber danke ich für die Hilfe bei der Beseitigung von Computerproblemen.

Ferner danke ich den Mitarbeitern der Reprorstelle für die Hilfe bei der Anfertigung einiger Abbildungen.

Zu Dank bin ich auch der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) für die Finanzierung im Rahmen des Projekts *Struktur und Dynamik des Hammerhead-Ribozyms* verpflichtet.

Für zahlreiche Diskussionen, einen regen Ideenaustausch und eine freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung *Biochemische Kinetik*, insbesondere Frau Kathrin Baumert, Frau Dr. Christiane Buta, Frau Gabriele Carrette, Frau Sandra Grzeszik, Herrn Dr. Franz-Josef Meyer-Almes, Frau Dr. Regine Preuß und nicht zuletzt den Mitgliedern des „1. FC 081“ für attraktiven Spitzensport.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Unterstützung während des Studiums herzlich danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Sylvia Schulze für ihren moralischen Beistand bei so manchen Stimmungstiefs. Ihr möchte ich diese Arbeit widmen.

Göttingen, im Mai 1999

## Persönliche Daten

### Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

Name: Marcus Menger  
Geburtsdatum: 05.01.1969  
Geburtsort: Helmarshausen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

#### Schulausbildung:

Aug 1975 — Jun 1979 Gemeinschaftsgrundschule in Beverungen  
Aug 1979 — Mai 1988 Städtisches Gymnasium in Beverungen  
25. Mai 1988 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

#### Hochschulausbildung:

Okt 1988 — Mar 1992 Grundstudium der Chemie an der Georg-August-Universität zu Göttingen  
16. Apr 1992 Diplomvorprüfung Chemie an der Georg-August-Universität zu Göttingen  
Mai 1992 — Jun 1993 Hauptstudium der Chemie an der Georg-August-Universität zu Göttingen

- Jun 1993 — Okt 1994 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen bei Dr. D. Pörschke, Abteilung *Biochemische Kinetik* (Prof. Dr. M. Eigen), Thema: „Struktur und Dynamik von DNA-Doppelhelices.“
28. Okt 1994 Diplomprüfung im Studiengang Chemie an der Georg-August-Universität zu Göttingen
- Dez 1994 — Jun 1999 Promotion am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen bei Prof. Dr. D. Pörschke, Arbeitsgruppe *Biomolekulare Dynamik*, Thema: „2-Aminopurin als Fluoreszenzindikator zur Analyse der Struktur und Dynamik von Oligoribonukleinsäuren und Hammerhead-Ribozymen.“
24. Jun 1999 Dokorexamen an der Georg-August-Universität zu Göttingen

## Eigene Veröffentlichungen

- MENGER M., *Diplomarbeit: Struktur und Dynamik von DNA-Doppelhelices*. Universität Göttingen (1994).
- MENGER M., TUSCHL T., ECKSTEIN F. & PORSCHKE D., *Mg<sup>2+</sup>-Dependent Conformational Changes in the Hammerhead Ribozyme*. *Biochemistry* **35**, 14710–14716 (1996).
- MENGER M., ECKSTEIN F. & PORSCHKE D., *Dynamics of the RNA hairpin GNRA tetraloop*. *Biochemistry* — In Press (1999).